

工业生物技术

高通量筛选具有催化活性和立体选择性羰基还原酶

张航¹, 陈曦², 冯进辉², 鲍锦库¹, 吴洽庆², 朱敦明²

1 四川大学生命科学学院 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 四川 成都 610064

2 中国科学院天津工业生物技术研究所 工业酶国家工程实验室 天津市生物催化技术工程中心, 天津 300308

张航, 陈曦, 冯进辉, 等. 高通量筛选具有催化活性和立体选择性羰基还原酶. 生物工程学报, 2015, 31(2): 220-230.

Zhang H, Chen X, Feng JH, et al. High throughput screening of active and stereoselective carbonyl reductases. Chin J Biotech, 2015, 31(2): 220-230.

摘要: 根据羰基还原酶催化可逆氧化还原反应的原理, 利用与偶氮还原酶催化偶氮染料还原反应耦合的颜色变化, 建立了一种新的羰基还原酶筛选方法。由于羰基还原酶在催化醇底物氧化反应时会产生 NAD(P)H, 当在反应体系中加入偶氮还原酶 AzoB 和偶氮染料金橙 I 的时候, 偶氮还原酶可以利用 NAD(P)H 作为电子的供体与底物金橙 I 发生反应, 导致反应体系颜色的变化, 这样就能够根据明显的颜色变化推断出该羰基还原酶是否对所选底物表现出特定的活性, 进而可以筛选出有活性的羰基还原酶。同时, 使用不同构型的手性醇作为底物时, 根据体系的颜色变化, 可以实现羰基还原酶的活性和立体选择性的同时筛选。

关键词: 手性醇, 羰基还原酶, 偶氮还原酶, 偶氮染料, 筛选方法

Received: May 4, 2014; **Accepted:** May 30, 2014

Supported by: Key Research Program of the Chinese Academy of Sciences (No. KSEZ-EW-Z-021-2), National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2011CB710800).

Corresponding author: Jinhui Feng. Tel: +86-22-24828734; E-mail: feng_jh@tib.cas.cn

Jinku Bao. Tel: +86-28-85415171; E-mail: baojinku@scu.edu.cn

中国科学院重点部署项目 (No. KSEZ-EW-Z-021-2), 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2011CB710800) 资助。

High throughput screening of active and stereoselective carbonyl reductases

Hang Zhang¹, Xi Chen², Jinhui Feng², Jinku Bao¹, Qiaqing Wu², and Dunming Zhu²

¹ Key Laboratory of Bio-resources, Ministry of Education, School of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, Sichuan, China

² Tianjin Biocatalysis Technology Engineering Center, National Engineering Laboratory for Industrial Enzymes, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

Abstract: In this study, a fast carbonyl reductases colorimetric screening method for discovering stereoselective carbonyl reductases was established by combining the reverse alcohol oxidation with the azoreductase-catalyzed reduction of azo dye. When azo dye (Orange I, 4-(4-hydroxy-1-naphthylazo) benzenesulfonic acid) and azoreductase (AzoB) were added into the reaction system of alcohol oxidation catalyzed by carbonyl reductase, the produced NAD(P)H served as electron donor for the azoreductase to reduce the azo dye, resulting the color fade. Hence, the carbonyl reductases can be screened by the obvious color change. When chiral alcohol was used as the substrate, the activity and stereoselectivity of carbonyl reductases can be screened at the same time.

Keywords: chiral alcohol, carbonyl reductase, azoreductase, azo dye, screening method

手性醇是一类非常重要的化合物, 广泛应用于药物研发、有机合成、材料科学、毒理学以及环境化学等众多领域。手性醇可以直接通过化学不对称催化和生物不对称转化相应的酮底物获得, 能够实现手性醇合成的生物催化剂是羰基还原酶。羰基还原酶是氧化还原酶的一种, 能够将酮还原为手性醇 (醛还原为一级醇) 或将手性醇氧化为酮 (一级醇氧化为醛)^[1-3]。在氧化反应过程中, 酶能够催化底物的氢转移至辅因子, 生成还原态 NAD(P)H。羰基还原酶的研究与应用已经有了飞速的发展, 来源于酵母和马肝的羰基还原酶均有商品供应, 可以像有机催化试剂一样购买。羰基还原酶在还原脂肪酮底物, 特别是当羰基两边的取代基团相差不大时, 表现出了化学催化剂不具有的高立体选择性。但是由于酶本身的特点, 在催化一些非天然底物的时候会出现酶活性低, 立体选择性

差等问题。目前针对这些问题的解决方法主要是野生酶的大规模筛选以及酶的定向进化与改造, 在此过程中, 液相色谱 (HPLC) 和气相色谱 (GC) 是两种最常用的检测立体选择性的方法^[4-8], 但是这两种方法目前都无法对羰基还原酶的立体选择性实现高通量筛选。

偶氮染料一般具有明亮的颜色, 偶氮还原酶是细菌降解偶氮染料的关键酶。一种偶氮还原酶可作用于一种或几种偶氮染料, 它通过还原特定的偶氮染料的偶氮键而使染料的颜色褪去^[9-11]。目前人们已经在许多细菌中发现了不敏感的偶氮还原酶的基因, 如球形芽胞杆菌 *Bacillus* sp. OY1-2^[12]、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*^[13]、大肠杆菌 *Escherichia coli*^[14]、球形红细菌 *Rhodobacter sphaeroides*^[15]、铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa*^[16]以及粪肠球菌 *Enterococcus faecalis*^[17]等, 并且已经

克隆、表达与鉴定了很多基因。这些对氧不敏感的偶氮还原酶主要分为核黄素依赖型偶氮还原酶和非核黄素依赖型偶氮还原酶两类^[18]。*azoB*是从 *Pigmentiphaga kullae* K24 中克隆并鉴定的一种偶氮还原酶基因^[18-19]。它编码一种由 203 个氨基酸组成的 21 295 Da 的非核黄素依赖型的偶氮还原酶 AzoB。该酶可以利用 NAD(P)H 作为电子供体,还原偶氮染料金橙 I 的偶氮键使其颜色消失。该酶对其他的偶氮染料如甲基红、金橙 II、苋菜红、丽春红 S 等都没有活性。上述的偶氮染料除金橙 I 外都可以被在粪肠球菌中发现的偶氮还原酶 AzoA 所还原^[17]。

根据羰基还原酶催化可逆的氧化还原反应的原理,本文利用羰基还原酶可以在 NAD(P)⁺ 存在的条件下催化相应的醇类底物生成对应的酮类物质以及 NAD(P)H,而偶氮还原酶则利用羰基还原酶生成的 NAD(P)H,作用于偶氮染料,引起偶氮染料的颜色变化,利用目测的方式可以直接实现羰基还原酶活性和立体选择性的高通量筛选(图 1)。

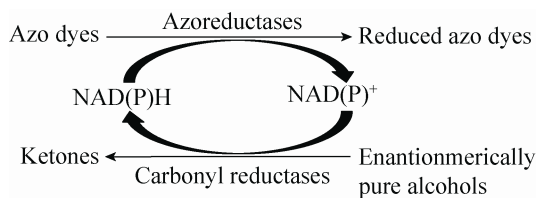


图 1 筛选方法的作用机制

Fig. 1 Reaction mechanism of screening method.

1 材料与方 法

1.1 药品及试剂

偶氮染料金橙 I、金橙 II、甲基红、苋菜

红、丽春红 S,均购自国药集团化学试剂有限公司;NAD(P)⁺、NAD(P)H 购自罗氏公司;筛选实验所选底物购自美国 Sigma 公司及日本 TCI 公司;其他试剂均为国产分析纯。

限制性内切酶、T4 连接酶购自 Thermo 公司;质粒提取试剂盒、凝胶回收试剂盒购自 Omega 公司;表达载体购自 Stratagene 公司。

1.2 菌株培养、表达与纯化

大肠杆菌 *Escherichia coli* 菌株 BL21(DE3) AzoB-pET-11a 在含有氨苄青霉素 (50 μg/mL) 的 LB 培养基中 37 °C 培养 12 h。按照 Omega 公司试剂盒的说明对该菌株进行质粒提取。利用 *Nde* I 和 *Bam*H I 对提取的质粒进行双酶切处理,并利用 T4 连接酶将目的基因连接到同样处理过的表达载体 pET-28a (带有组氨酸标签) 上,转化至 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞中进行功能表达。*E. coli* BL21(DE3) AzoB-pET-28a 在含有卡那霉素 (50 μg/mL) 的 LB 培养基中 37 °C 培养 12 h 后,以 10% 的接种量进行转接,继续培养 2 h 后加入异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG, 0.1 mmol/L) 进行诱导,37 °C 再培养 2.5 h。6 000×g 低温离心收集细胞后利用高压匀浆机对细胞进行破碎处理。12 000×g 低温离心 20 min 去除细胞碎片,上清液用 HisTrap HP 亲和层析柱 (5 mL) 进行纯化。层析柱在上样前用含有 250 mmol/L NaCl 的 20 mmol/L Tris-HCl (pH 6.8) 缓冲液进行平衡。上样后,用含有 500 mmol/L 咪唑的上述缓冲液进行线性梯度洗脱,分别收集各个洗脱峰,通过 SDS-PAGE 电泳检测各个洗脱峰及蛋白纯度。

1.3 酶活验证

偶氮还原酶 AzoB 的酶活测定根据文献中

的描述进行^[18]。通过测定室温 (23 °C) 下偶氮染料金橙 I 在 482 nm 波长下光吸收值 ($\epsilon_{482} = 22.3 \text{ mmol}/(\text{L}\cdot\text{cm})$) 的减少,来计算偶氮还原酶的酶活。每分钟消耗 1 μmol 金橙 I 所需要的酶量定义为一个酶活力单位,反应在 200 μL 100 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 6.8) 中进行,反应体系中含有 200 μmol NADPH, 0.15 mmol/L 金橙 I 以及 72 μg AzoB。

羰基还原酶的酶活测定通过检测室温下 NADPH 在 340 nm 波长下光吸收值 ($\epsilon_{340} = 6.22 \text{ mmol}/(\text{L}\cdot\text{cm})$) 的变化。反应在 96 孔板中进行,反应体系共 200 μL (100 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 6.8)、7.0 mmol/L 底物 (*1S, 3R*)-3-甲基环己醇、0.5 mmol/L NADP⁺以及 50 μg 纯化的羰基还原酶 SSCR M242F/Q245T) 每分钟生成 1 μmol NADPH 所需要的酶量定义为一个酶活力单位。没有加入羰基还原酶的反应体系作为空白组,加入对该底物没有活力的羰基还原酶 CMCR 设置为对照组^[20-21]。

羰基还原酶与偶氮还原酶的耦合反应在 200 μL 100 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 6.8) 中进行,反应体系中含有 5.0 mmol/L (*1S, 3R*)-3-甲基环己醇、0.5 mmol/L NADP⁺、0.15 mmol/L 金橙 I 以及 50 μg SSCR M242F/Q245T 和 72 μg AzoB。

1.4 筛选方法的建立与优化

为了探究筛选方法中的组分偶氮染料或偶氮还原酶是否会影响羰基还原酶的活力,设计 A、B、C、D 四组实验。A 组含有 100 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 6.8)、5.0 mmol/L 底物 (*1S, 3R*)-3-甲基环己醇、0.5 mmol/L NADP⁺以及 50 μg 羰基还原酶 SSCR M242F/Q245T; B 组为

A 组加入 72 μg 的偶氮还原酶 AzoB; C 组为 A 组加入偶氮染料金橙 I (0.15 mmol/L AzoB 的底物); D 组为 B 组加入偶氮染料金橙 I (0.15 mmol/L)。

为了优化偶氮染料金橙 I 的加入时间,设计 6 组实验。6 组反应体系中均含有 100 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 6.8)、5.0 mmol/L 底物 (*1S, 3R*)-3-甲基环己醇、0.5 mmol/L NADP⁺、50 μg 羰基还原酶 SSCR M242F/Q245T 以及 72 μg 偶氮还原酶 AzoB。反应不同时间 (0, 1, 2, 3, 4, 5 min) 后,加入金橙 I,使其终浓度为 0.15 mmol/L,2 min 后,测定 482 nm 下光吸收值。采用同样的方法,对羰基还原酶底物浓度 (5.0 mmol/L、6.0 mmol/L、7.0 mmol/L)、NADP⁺ 浓度 (0.1 mmol/L、0.3 mmol/L、0.5 mmol/L) 以及金橙 I 浓度 (0.15 mmol/L、0.3 mmol/L、0.45 mmol/L) 进行优化。

1.5 羰基还原酶的活性筛选

为了检测该方法的活性筛选可行性,选用实验室保存的 16 种羰基还原酶以及 5 种醇类或手性醇类底物进行方法验证。5 种底物分别为 (*1S, 3R*)-3-甲基环己醇、(*S*)-1-苯基-1,2-乙二醇、1-苯基-1,2-乙二醇、1,2-戊二醇以及(-)-薄荷醇。反应在 96 孔板中进行,反应体系 200 μL (100 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 6.8)、5.0 mmol/L 底物、0.5 mmol/L NADP⁺以及 50 μg 纯化的羰基还原酶) 2 min 后,加入 72 μg 纯化的偶氮还原酶 AzoB,以及偶氮染料金橙 I (终浓度 0.15 mmol/L),反应 2 min。不同羰基还原酶对不同底物的活力可以通过颜色反应直观地看到。

1.6 羰基还原酶的立体选择性筛选

为了验证该方法在立体选择性筛选的可行

性,以羰基还原酶 CMCR 作用不同构型的 1-苯基-1,2-乙二醇的结果验证。反应在 96 孔板中进行,反应体系 200 μL (100 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 6.8)、5.0 mmol/L 底物 ((*S*)-1-苯基-1,2-乙二醇或(*R*)-1-苯基-1,2-乙二醇)、0.5 mmol/L NADP^+ 以及 50 μg 纯化的羰基还原酶), 2 min 后,加入 72 μg 纯化的偶氮还原酶 AzoB, 以及偶氮染料金橙 I (终浓度 0.15 mmol/L), 反应 2 min。观察颜色变化。

1.7 羰基还原酶的活性、立体选择性酮底物还原验证

为了验证该方法筛选的羰基还原酶是否具有活性及立体选择性,以(*R*)-3-甲基环己酮和 α -羟基苯乙酮为底物,利用筛选得到的羰基还原酶进行还原。反应体系为 1 mL 磷酸盐缓冲液 (100 mmol/L, pH 6.8) 中含酮底物 10 mmol/L、 NADP^+ 0.5 mg、葡萄糖脱氢酶 0.5 mg、葡萄糖 30 mmol/L 和羰基还原酶 1 mg, 30 $^{\circ}\text{C}$ 过夜反应。等体积乙酸乙酯萃取,无水硫酸钠干燥后,产物用 GC 或 HPLC 与相应的手性标准品对照检测。

2 结果与分析

2.1 偶氮还原酶 AzoB 的纯化

利用限制性内切酶 *Nde* I 和 *Bam*H I 对偶氮还原酶基因 *azoB* 进行酶切,连接到表达载体 pET-28a 上,并成功转化至 *E. coli* BL21 (DE3) 中进行功能表达。*E. coli* BL21 (DE3) AzoB-pET-28a 在含有卡那霉素 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 培养基中培养、诱导表达,经离心、破菌处理后,利用 ÄKTA 蛋白纯化仪器进行镍柱亲和层析。结果如图 2 所示, SDS 蛋白电泳显示目的蛋白在表达宿主 *E. coli* BL21(DE3) 中得到了成功表达,

蛋白主要存在于上清液中。

2.2 酶活验证

羰基还原酶与偶氮还原酶的耦合实验表明,羰基还原酶 SSCR M242F/Q245T 对底物 (*1S*, *3R*)-3-甲基环己醇表现出了较高的酶活力,反应体系颜色消失;而 CMCR 对该底物没有表现出任何活力,反应体系仍为橙色 (图 3)。

2.3 筛选方法的建立与优化

为了探究偶氮染料或者偶氮还原酶是否会影 响羰基还原酶的活力,设计 A、B、C、D 四组实验。羰基还原酶的酶活通过测定室温下 NADPH 在 340 nm 波长下光吸收值的变化来计算。结果如表 1,由 A 组和 B 组实验可知,偶氮还原酶 AzoB 对羰基还原酶的活力影响不大,其中 A 组为 9.0 U/mg, B 组为 7.6 U/mg。对比 A 组、C 组和 D 组可知,偶氮染料金橙 I 的存

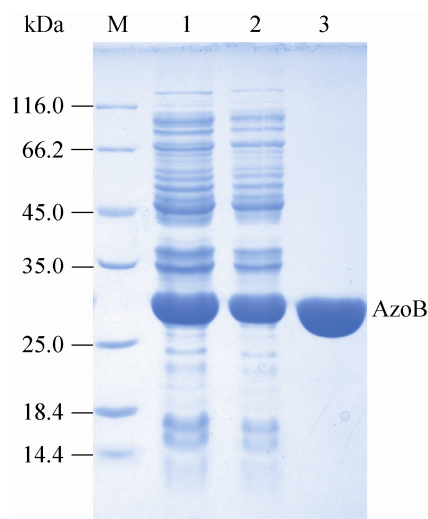


图 2 偶氮还原酶 AzoB 的纯化

Fig. 2 Purification of azoreductase AzoB. M: protein marker; 1: extraction of the recombinant *E. coli*; 2: supernatant; 3: pooled fractions with Ni-affinity chromatography.

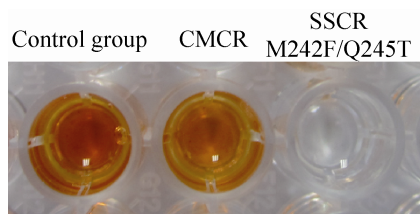


图3 酶活验证及筛选方法建立

Fig. 3 Validation of enzyme activity and establishment of the screening method.

表1 偶氮还原酶 AzoB 和偶氮染料金橙 I 对羰基还原酶活力的影响

Table 1 The effects of AzoB and Orange I to the activity of carbonyl reductase

Group	Main ingredients	Specific activity (U/mg)
A	SSCR M242F/Q245T	9.0
B	SSCR M242F/Q245T, AzoB	7.6
C	SSCR M242F/Q245T, Orange I	2.5
D	SSCR M242F/Q245T, AzoB, Orange I	2.1

在明显影响了羰基还原酶的活力, 导致 NADPH 的生成量减少, 为偶氮还原酶提供的电子不足, 因而偶氮染料不能被完全降解。

由于金橙 I 的存在明显影响了羰基还原酶的酶活力, 设计了 6 组实验进行优化, 即在不同的反应时间 (0、1、2、3、4、5 min) 后再加入金橙 I。实验结果如表 2 所示, 如果在加入金橙 I 以及 AzoB 之前反应 2 min 或更长时间, 482 nm 下的光吸收值已经低至 0.3 以下, 说明偶氮染料几乎被全部降解, 同时从反应体系的颜色上也可以看到颜色的消失 (图 4)。反应时间不足 2 min 的, 482 nm 下的光吸收值在 1.0 以上 (分别为 1.270 和 1.013), 说明还有大量偶

氮染料没有被降解, 因而反应体系的颜色没有发生明显的变化。

同样, 采取设计对照实验的方法对 NADP⁺ 浓度 (0.1 mmol/L、0.3 mmol/L、0.5 mmol/L) 以及金橙 I 浓度 (0.15 mmol/L、0.30 mmol/L、0.45 mmol/L) 进行优化。当 NADP⁺ 的浓度为 0.5 mmol/L 时, 反应体系颜色会在 2 min 之内很快消失, 当 NADP⁺ 的浓度降低至 0.3 mmol/L 甚至 0.1 mmol/L 时, 反应需要 6 h 甚至更长的时间才实现颜色的褪去。当金橙 I 的浓度为 0.15 mmol/L 时, 反应体系会在 2 min 之内很快

表2 不同的反应时间对筛选结果的影响

Table 2 Influence of reaction time on the screening result

Reaction time (min)	Absorbance (482 nm)
0	1.270
1	1.013
2	0.272
3	0.151
4	0.161
5	0.144

All of the reactions were detected at 482 nm after 2 min.

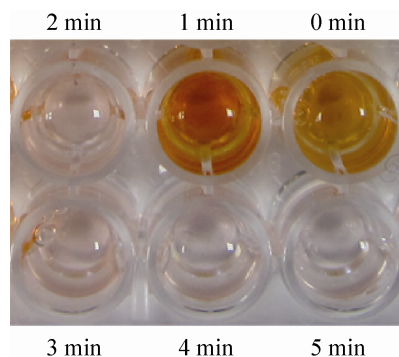


图4 不同的反应时间对筛选结果的影响

Fig. 4 Influence of reaction time on the screening result.

消失,当金橙 I 的浓度增加到 0.30 mmol/L 甚至 0.45 mmol/L 时,反应需要更长的时间才能实现颜色的明显消失。

AzoB 可以利用羰基还原酶生成的 NADPH 作为电子供体还原偶氮染料,同时生成 NADP^+ ,和羰基还原酶形成循环反应,并且 AzoB 可以利用的 NADPH 浓度可以低至 $1 \mu\text{mol/L}$ ^[18],理论上不需要额外添加 NADP^+ ,但如表 1 所示,金橙 I 的存在抑制了羰基还原酶 SSCR M242F/Q245T 的活力,同时也影响了该循环反应的正常进行。同时,随着金橙 I 的浓度增加,反应体系颜色会变深,颜色反应会更明显;但随着金橙 I 浓度的增加,金橙 I 对羰基还原酶活力

的影响会增加,同时降解金橙 I 所需要的 NADPH 的量也会增大。在本研究中,在加入金橙 I 和 AzoB 之前给予 2 min 的反应时间,如果羰基还原酶的活力明显或提高羰基还原酶的用量,反应所积累的 NADPH 量足够降解 0.15 mmol/L 的金橙 I。另外,由于羰基还原酶底物是过量的,5.0 mmol/L 的底物浓度也较为合适。

2.4 羰基还原酶的活性筛选

按照上文所述的方法,设计筛选实验,选择 5 种底物,对 16 种羰基还原酶的活性及立体选择性进行筛选并对该方法的可行性进行验证。所有的反应体系均在 96 孔中进行,筛选结果如图 5 所示。

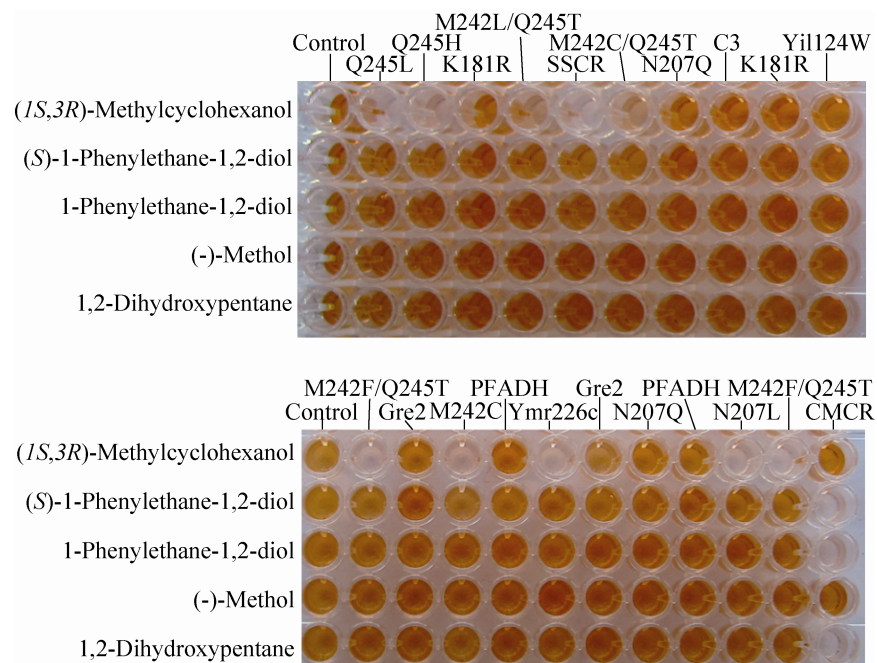


图 5 利用 AzoB 和 Orange I 进行的筛选实验

Fig. 5 Screening of carbonyl reductases by AzoB and Orange I .

所选羰基还原酶对(-)-薄荷醇都没有表现活力; 共有 9 种羰基还原酶对(1*S*,3*R*)-3-甲基环己醇表现出明显活力, 包括 SSCR、SSCR Q245H、SSCR Q245L、SSCR N207L、SSCR M242C、SSCR M242L/Q245T、SSCR M242C/Q245L、SSCR M242F/Q245T 以及 Ymr226c; 检测结果和相应酮底物还原的气相色谱检测结果一致(表 3), 并且没有假阳性结果出现。但是, 阴性结果中有错误发生。例如, SSCR N207Q、Gre2 的 GC 结果都显示有活性, 而通过本方法却没有检测到活性。原因推测为 SSCR N207Q 和 Gre2 的活力较低(无法用 NADPH 在 340 nm 波长下光吸收检测酶活)。另外还有其他的 3 种底物也用于了本实验的筛选, 其中只有 CMCR 对它们表现出了活性, 其他羰基还原酶由于酶活力较低, 该方法没有检测出, 但是建立羰基还原酶的还原反应, 延长反应时间, 可以检测出相应的产物。

由于偶氮染料对羰基还原酶催化反应的抑制作用, 导致本方法对一些活性较低的羰基还原酶不能检测到活性, 降低了其灵敏度。因而, 我们对其他的偶氮染料如金橙 II、甲基红、苋菜红、丽春红 S 也同样进行了研究, 利用粪肠球菌中的偶氮还原酶 AzoA 对这些偶氮染料进行还原。实验发现, 金橙 II、苋菜红以及丽春红 S 都不会对实验所用的羰基还原酶产生抑制作用。然而, AzoA 尽管可以利用 NADPH, 但偏好 NADH^[17], 当用在此方法时, 需要更长的反应时间(8 h 以上) 才能实现对偶氮染料的降解, 其检测结果和 GC 结果相符(表 4)。

2.5 羰基还原酶的立体选择性筛选

按照上述的方法, 验证 CMCR 对(*R*)-1-苯基

-1,2-乙二醇和(*S*)-1-苯基-1,2-乙二醇的立体选择性, 结果如图 6A 所示, (*S*)-1-苯基-1,2-乙二醇的颜色明显褪去, 而(*R*)-1-苯基-1,2-乙二醇则没有颜色变化。HPLC 的检测结果表明, CMCR 还原 α -羟基苯乙酮产生(*S*)-1-苯基-1,2-乙二醇, 本结果与之相符, 表明该方法同样可以应用于立体选择性的筛选。1-苯基-1,2-乙二醇的消旋体及羰基还原酶 CMCR 还原 α -羟基苯乙酮产物的 HPLC 结果见图 6B 和 6C。

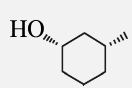
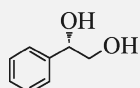
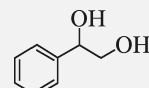
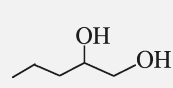
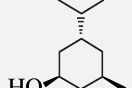
表 3 气相色谱测定羰基还原酶的活性及立体选择性

Table 3 Activities and enantioselectivities screening of carbonyl reductases by GC

	Conversion (%)	Diastereoselectivity excess (%)
SSCR	81.7	58.7(<i>S</i>)
SSCR Q245H	57.5	96.3(<i>S</i>)
SSCR Q245L	76.1	88.0(<i>S</i>)
SSCR K181R	-	-
SSCR N207Q	69.4	10.1(<i>S</i>)
SSCR N207L	89.5	79.4(<i>S</i>)
SSCR M242C	55.5	62.7(<i>S</i>)
SSCR M242L/Q245T	99.9	91.1(<i>S</i>)
SSCR M242C/Q245L	87.9	88.2(<i>S</i>)
SSCR M242F/Q245T	99.8	93.4(<i>S</i>)
CMCR	99.8	99.9(<i>R</i>)
Ymr226c	86.2	89.7(<i>S</i>)
Gre2	77.5	16.8(<i>S</i>)
PFADH	-	-
Yil124W	-	-
C3	-	-

表 4 利用 AzoA 和苋菜红进行的活性与对映性筛选

Table 4 Screening of carbonyl reductases by AzoA and Amaranth

					
SSCR	+	-	-	-	-
SSCR Q245H	+	-	-	-	-
SSCR Q245L	+	-	-	-	-
SSCR K181R	-	-	-	-	-
SSCR N207Q	-	-	-	-	-
SSCR N207L	+	-	-	-	-
SSCR M242C	+	-	-	-	-
SSCR M242L/Q245T	+	-	-	-	-
SSCR M242C/Q245L	+	-	-	-	-
SSCR M242F/Q245T	+	-	-	-	-
CMCR	-	+	+	+	-
Ymr226c	+	-	-	-	-
Gre2	-	-	-	-	-
PFADH	-	-	-	-	-
Yil124W	-	-	-	-	-
C3	-	-	-	-	-

+: had the activity; -: no activity.

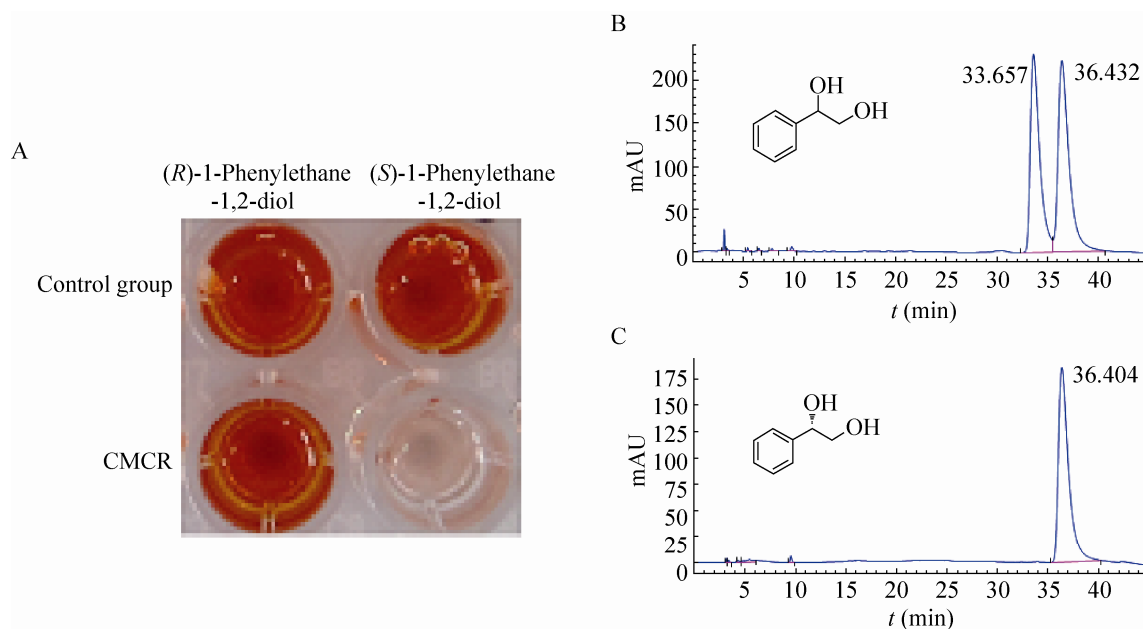


图 6 CMCR 对(R)-1-苯基-1,2-乙二醇和(S)-1-苯基-1,2-乙二醇的活性及对映体选择性筛选实验

Fig. 6 Activities and enantioselectivities screening of carbonyl reductases CMCR by (R)-1-Phenylethane-1,2-diol and (S)-1-Phenylethane-1,2-diol. (A) Screening by AzoB. (B) The HPLC spectrum of racemic 1-phenylethane-1,2-diol. (C) The product HPLC spectrum of CMCR reduced α -hydroxy acetophenone.

3 结论

在本研究中,利用偶氮染料金橙 I、偶氮还原酶 AzoB 与羰基还原酶及其相应的底物耦合,基于偶氮染料还原的颜色变化,提出并建立了一种新的羰基还原酶筛选方法,并对该方法进行了验证。这种新的筛选方法快速、有效,筛选结果直观,当所筛选的羰基还原酶对特定底物有活性时,会产生明显的颜色变化,如果所用的羰基还原酶底物为手性醇,能初步实现快速的手性筛选,因而该方法在一定程度上可以代替 HPLC 和 GC 来完成大规模筛选工作。利用偶氮还原酶 AzoA 与其他偶氮染料对 NADH 依赖的羰基还原酶的高通量筛选正在进行中。相信未来会发现对羰基还原酶没有抑制作用的偶氮染料及相应的 NAD(P)H 倾向型偶氮还原酶,将提高本方法的灵敏度,使其完善。

致谢:感谢 National Center for Toxicological Research, Food and Drug Administration (美国) 的 Dr. Huizhong Chen 无私馈赠 *azoA* 和 *azoB* 基因。

REFERENCES

- [1] Kataoka M, Kita K, Wada M, et al. Novel bioreduction system for the production of chiral alcohols. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, 62(5/6): 437–445.
- [2] Goldberg K, Schroer K, Lütz S, et al. Biocatalytic ketone reduction—a powerful tool for the production of chiral alcohols—part I: processes with isolated enzymes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 76(2): 237–248.
- [3] Goldberg K, Schroer K, Lütz S, et al. Biocatalytic ketone reduction—a powerful tool for the production of chiral alcohols—part II: whole-cell reductions. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 76(2): 249–255.
- [4] Vozka J, Kalíková K, Janečková L, et al. Chiral HPLC separation on derivatized cyclofructan versus cyclodextrin stationary phases. *Anal Lett*, 2012, 45(16): 2344–2358.
- [5] Paik MJ, Kang JS, Huang BS, et al. Development and application of chiral crown ethers as selectors for chiral separation in high-performance liquid chromatography and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Chromatogr A*, 2013, 1274(25): 1–5.
- [6] Gassmann E, Kuo JE, Zare RN. Electrokinetic separation of chiral compounds. *Science*, 1985, 230(4727): 813–814.
- [7] Cavazzini A, Pasti L, Massi A, et al. Recent applications in chiral high performance liquid chromatography: a review. *Anal Chim Acta*, 2011, 706(2): 205–222.
- [8] Jibuti G, Mskhiladze A, Takaishvili N, et al. HPLC separation of dihydropyridine derivatives enantiomers with emphasis on elution order using polysaccharide-based chiral columns. *J Sep Sci*, 2012, 35(19): 2529–2537.
- [9] Liu G, Zhou J, Meng X, et al. Decolorization of azo dyes by marine *Shewanella* strains under saline conditions. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(9): 4187–4197.
- [10] Pandey A, Singh P, Iyengar L. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes. *Int Biodeterior Biodegrad*, 2007, 59(2): 73–84.
- [11] Stolz A. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 56(1/2): 69–80.
- [12] Suzuki Y, Yoda T, Ruhul A, et al. Molecular cloning and characterization of the gene coding for azoreductase from *Bacillus* sp. OY1-2 isolated from soil. *J Biol Chem*, 2001, 276(12): 9059–9065.
- [13] Chen H, Hopper SL, Cerniglia CE. Biochemical and molecular characterization of an azoreductase from *Staphylococcus aureus*, a tetrameric

- NADPH-dependent flavoprotein. *Microbiology*, 2005, 151(Pt5): 1433–1441.
- [14] Nakanishi M, Yatome C, Ishida N, et al. Putative ACP phosphodiesterase gene (*acpD*) encodes an azoreductase. *J Biol Chem*, 2001, 276(49): 46394–46399.
- [15] Bin Y, Jiti Z, Jing W, et al. Expression and characteristics of the gene encoding azoreductase from *Rhodobacter sphaeroides* AS1.1737. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, 236(1): 129–136.
- [16] Wang CJ, Hagemeyer C, Rahman N, et al. Molecular cloning, characterisation and ligand-bound structure of an azoreductase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Mol Biol*, 2007, 373(5): 1213–1228.
- [17] Chen H, Wang RF, Cerniglia CE. Molecular cloning, overexpression, purification, and characterization of an aerobic FMN-dependent azoreductase from *Enterococcus faecalis*. *Protein Expres Purif*, 2004, 34(2): 302–310.
- [18] Chen H, Feng J, Kweon O, et al. Identification and molecular characterization of a novel flavin-free NADPH preferred azoreductase encoded by *azoB* in *Pigmentiphaga kullae* K24. *BMC Biochem*, 2010, 11: 13–22.
- [19] Blumel S, Stolz A. Cloning and characterization of the gene coding for the aerobic azoreductase from *Pigmentiphaga kullae* K24. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, 62(2/3): 186–190.
- [20] Zhu DM, Ankati H, Mukherjee C, et al. Asymmetric reduction β -Ketonitriles with a recombinant carbonyl reductase and enzymatic transformation to optically pure β -Hydroxy carboxylic acids. *Org Lett*, 2007, 9(13): 2561–2563.
- [21] Zhu DM, Yang Y, Ling H. Stereoselective enzymatic synthesis of chiral alcohols with the use of a carbonyl reductase from *Candida magnoliae* with anti-Prelog enantioselectivity. *J Org Chem*, 2006, 71(11): 4202–4205.

(本文责编 陈宏宇)