

体外偶联 UDP-糖基转移酶与蔗糖合成酶 高效催化合成莱鲍迪苷 A

朱清娟, 陈美琪, 梁书利, 王登刚, 林影

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东省发酵与酶工程重点实验室, 广东广州 510006)

摘要: 本研究构建了 UDP-糖基转移酶 UGT76G1 基因的重组毕赤酵母菌株 GS115/pPIC9K-UGT76G1 和绿豆来源的蔗糖合成酶 (mbSUS) 基因的重组毕赤酵母菌株 GS115/pPIC9K/pPICZA-mbSUS。通过甲醇诱导产酶, 制备 UDP-糖基转移酶 UGT76G1 和蔗糖合成酶, 并构建生物催化级联反应体系, 生物催化甜菊糖苷 (Stevioside, ST) 合成莱鲍迪苷 A (rebaudioside A, RA), 有效实现了级联反应体系中尿苷二磷酸葡萄糖 (UDPG) 的循环利用。本研究通过反应条件优化, 发现级联反应中的限速酶是糖基转移酶 UGT76G1, 添加酶活比例为 $U_{(UGT76G1)}:U_{(mbSUS)}=6:1$ 为合成莱鲍迪苷 A 的最佳酶活比例, 在 pH 7.0, UDP 浓度 1 mM, 蔗糖浓度 50 mM, $MgCl_2$ 浓度 3 mM 的反应条件下, 10 mM ST 转化合成 8.20 ± 0.11 mM RA, RA 的产率达到 82.91%, 与在大肠杆菌表达系统中相比, 极大缩短了催化反应时间。利用体外偶联 UDP-糖基转移酶与蔗糖合成酶催化合成 RA 为酶法高效生物合成 RA 及其产业化应用提供技术支持。

关键词: UDP-葡糖基转移酶; 蔗糖合成酶; 毕赤酵母; 莱鲍迪苷 A

文章编号: 1673-9078(2021)01-47-53

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.01.0172

Efficient Synthesis of Rebaudioside A Catalyzed by *in vitro* Coupling

UDP-Glycosyltransferase and Sucrose Synthase

ZHU Qing-juan, CHEN Mei-qi, LIANG Shu-li, WANG Deng-gang, LIN Ying

(Guangdong Key Laboratory of Fermentation and Enzyme Engineering, School of Biological Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: In this study, a UDP-glycosyltransferase UGT76G1 gene recombinant *Pichia pastoris* strain GS115/pPIC9K-UGT76G1 and a sucrose synthase mbSUS gene recombinant *Pichia pastoris* strain GS115/pPIC9K/pPICZA-mbSUS derived from mung bean were constructed. Methanol was used to induce the production of UDP-glycosyltransferase and sucrose synthase, and a biocatalytic cascade reaction system was constructed to catalyze the bioconversion of stevioside (ST) into rebaudioside A (RA), which realized the effective recycling of uridine diphosphate glucose (UDPG) in the cascade reaction system. Through optimization of reaction conditions, the rate-limiting enzyme in the cascade reaction was found to be the glycosyltransferase UGT76G1, with the optimal enzyme activity ratio, $U_{(UGT76G1)}:U_{(mbSUS)}$, as 6:1. Under the reaction conditions (pH 7.0, UDP 1 mM, sucrose 50 mM and $MgCl_2$ 3 mM), ST at 10 mM was converted to RA at 8.20 ± 0.11 mM, with the RA yield as 82.91%. The catalytic reaction time was greatly shortened compared to the *Escherichia coli* expression system. The *in vitro* coupling of UDP-glycosyltransferase and sucrose synthetase can lead to effective catalysis for the efficient synthesis of RA, and this research provides technical support for RA enzymatic biosynthesis and associated industrial application.

Key words: UDP-glycosyltransferase; sucrose synthase; *Pichia pastoris*; rebaudioside A

引文格式:

朱清娟,陈美琪,梁书利,等.体外偶联 UDP-糖基转移酶与蔗糖合成酶高效催化合成莱鲍迪苷 A [J].现代食品科技,2021,37(1): 47-53

ZHU Qing-juan, CHEN Mei-qi, LIANG Shu-li, et al. Efficient synthesis of rebaudioside A catalyzed by *in vitro* coupling UDP-glycosyltransferase and sucrose synthase [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(1): 47-53

收稿日期: 2020-02-25

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFA0901700); 国家自然科学基金资助项目 (31871739)

作者简介: 朱清娟 (1995-), 女, 硕士, 研究方向: 酶学与酶工程

通讯作者: 林影 (1962-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 酶工程

甜菊糖是从甜叶菊叶子中提取和纯化的二萜糖苷,具有高甜度、低热量、对人体无副作用等优点^[1],美国食品和药品管理局在2008年将其列入为一般认为安全(Generally Recognized As Safe, GRAS)的甜味剂^[2],其中甜菊苷(Stevioside, ST)和莱鲍迪苷A(Rebaudioside A)是甜菊糖含量最丰富的两种成分,分别占干叶重的5%~10%和2%~4%。甜菊苷ST在甜菊糖中含量最高且甜度是蔗糖的250~300倍,但其具有较严重的苦涩余味,从而限制了其在食品和药品中的消费和应用。然而莱鲍迪苷A(rebaudioside A, RA)除了具有高甜度、低热量(热值仅为蔗糖的1/300)、对人体无副作用等优点外,而且口味纯正,没有后苦味^[3]。因此可以作为天然甜味剂在食品和饮料行业广泛应用^[4],同时不会因长期食用使血糖浓度增加,可以有效预防肥胖症、糖尿病、高血压、苯丙酮尿症等病症^[5]。目前制备高纯度莱鲍迪苷A产品的方法主要包括培育高产莱鲍迪苷A的甜叶菊品种、树脂吸附或重结晶提纯莱鲍迪苷A和环糊精转移酶等酶对甜菊糖进行改性等^[6-9],但都存在工艺繁琐、成本高、效果不佳等缺点。已经有研究发现在糖基转移酶(Glycosyltransferases, GTs)类中存在UDP-糖基转移酶UGT76G1能特异性地催化甜菊苷通过一步糖基化反应合成莱鲍迪苷A^[10]。然而,甜叶菊中天然UGT76G1含量甚微,分离纯化成本高,难以获取大量的酶蛋白,并且糖基转移反应中需要昂贵的尿苷二磷酸葡萄糖(UDPG)作为糖基供体^[11,12],必然导致RA苷酶促合成应用的经济性差,解决糖基化反应过程中糖基转移酶的制备及底物UDPG昂贵的问题是提高RA生产效益的主要方法。

蔗糖合成酶(Sucrose synthase, SuSy)催化可逆的葡萄糖基转移反应,通过蔗糖合成酶催化蔗糖和UDP产生UDP-葡萄糖,有效地为UDP-糖基转移酶提供了UDP-糖的需求^[13,14]。在偶联蔗糖合成酶和UDP-糖基转移酶构建的级反应体系,产生UDP循环,实现UDP-葡萄糖的再生已成为糖基化生产权宜的供体^[15],已知的两类蔗糖合成酶,分别来源于植物和细菌,通常来源于细菌的蔗糖合成酶对ADP有高的亲和力,而对UDP亲和力相对低,植物蔗糖酶对UDP的亲和力高^[16]。最近的研究发现选择细菌来源的蔗糖合成酶耐热稳定性、比酶活和重组酶表达水平明显高于植物来源的酶,因此其工业化应用前景引起了人们极大的兴趣。目前已有研究者在毕赤酵母中共表达UDP-糖基转移酶UGT76G1和拟南芥来源的AtSUS这两个酶基因在细胞体内全细胞催化ST转化为RA,其中唐小雁等以10 mg/mL的ST为底物合成为7.46 mg/mL的

RA, RA的收率为74.60%^[17]。同时也有研究者在大肠杆菌宿主菌中结合来自rebaudiana的重组UDP-葡萄糖基转移酶UGT76G1和来自拟南芥的蔗糖合酶AtSUS1的活性,外源添加2.40 mM甜菊糖苷,7.20 mM蔗糖和0.006 mM UDP反应30 h,莱鲍迪苷A的收率为78.21%^[18],此前报道的酿酒酵母中利用UDP-糖基转移酶UGT76G1将ST转化为RA,其中刘欢等以1 g/L的ST为底物合成267.89 mg/L^[19]。

本研究分别构建了表达高活性UDP-糖基转移酶UGT76G1和绿豆来源的蔗糖合成酶mbSUS的重组毕赤酵母菌株。通过发酵产酶,制备UDP-糖基转移酶UGT76G1和蔗糖合成酶mbSUS,建立级联酶催化反应体系合成RA,实现UDPG在生物催化反应中的循环,如图1所示。此外,进一步探究生物催化体系中,两种酶不同的酶活配比量对RA合成的影响,确定了此级联反应中的限速酶和最适酶活配比,为RA酶法生物合成及其产业化应用提供技术支持。

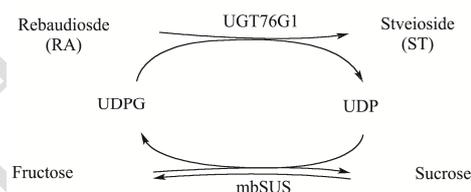


图1 UGT76G1和蔗糖合成酶级联反应催化体系

Fig.1 Process of catalytic synthesis of RA

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

宿主菌菌株(*E.coli Top*) 10F², (*Pichia pastoris*) GS115以及质粒pPICZA由本实验室保存。毕赤酵母表达质粒pPIC9K,购买自Invitrogen公司。质粒pUC57-mbSUS和质粒pUC57-UGT76G1,带已通过毕赤酵母密码子优化后的基因mbSUS和UGT76G1。这两个优化基因由南京金斯瑞生物科技有限公司全基因合成。

1.1.2 工具酶与试剂

限制性内切酶EcoR I、Not I、Sal I和Mss I购自宝生物工程(大连)有限公司;高保真、高效率扩增目的基因片段的KOD-Plus-Neo DNA聚合酶,购买自东洋纺(上海)生物科技有限公司。质粒小量制备试剂盒和琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒购自上海捷瑞生物工程有限公司;PCR纯化试剂盒购自Magen(美基)生物有限公司;甜菊苷、莱鲍迪苷A由曲阜海根甜菊制品有限公司提供;UDP,UDPG购买自上海源叶生

物科技有限公司。

1.1.3 培养基

LBL 平板培养基: 1%胰蛋白胨, 0.5%酵母抽提物, 0.5% NaCl, 1.5%的琼脂粉, 根据需要添加 zeocin 使终浓度为 100 mg/mL。YPD 平板培养基: 1.34% YNB; 0.4 mg/L 生物素; 2%葡萄糖, 1.5%的琼脂粉。YPD (含 Zeocin) 平板: 1%酵母粉, 2%蛋白胨, 2%葡萄糖, 2%琼脂粉, 100 μ g/mL Zeocin, MD 平板: 1.34% YNB, 2%葡萄糖, 2%琼脂粉, (4 \times 10⁻⁵)% Biotin。BMGY 培养基: 1.34% YNB, 1%酵母提取物, 2%蛋白胨, 10% PBS (pH 6.0), 1%甘油。BMMY 培养基: 1.34% YNB, 1%酵母提取物, 2%蛋白胨, 10% PBS (pH 6.0)。

1.2 方法

1.2.1 蔗糖合成酶目的基因的优化及合成

在 NCBI 数据库中获得绿豆来源的蔗糖合成酶 (Sequence ID: BAA01108.1)。将该基因氨基酸序列送往南京金斯瑞生物科技有限公司, 经毕赤酵母密码子优化而获得的碱基序列, 全基因合成后克隆至质粒 pUC57, 得到含有蔗糖合成酶编码基因的重组质粒 pUC57-mbSUS。

1.2.2 蔗糖合成酶 mbSUS 表达载体的构建

在 mbSUS 基因的两端引入 *EcoR* I 和 *Not* I 限制性酶切位点, 如下所示: *mbSUS*-F:5'-ACGAGGAATTCA TGGCTACTGACAGATT-3'(*EcoR* I); *mbSUS*-R:5'-GG CGGCCGCCTCAACA GCCAATGGAACA-3'(*Not* I)。以含有编码蔗糖合成酶并经毕赤酵母密码子优化的基因 mbSUS 的载体 pUC57-mbSUS 为模板, 进行 PCR 扩增。将 PCR 产物用试剂盒纯化, 用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Not* I 对 PCR 回收产物及质粒 pPICZA 分别进行双酶切, 纯化回收后用 T4 连接酶进行连接反应, 连接产物转化大肠杆菌 *E.coli* 感受态细胞, 得到表达载体 pPICZA-mbSUS。

1.2.3 糖基转移酶目的基因的优化及合成

在 NCBI 数据库中获得不含其自身信号肽的甜叶菊 UGT76G1 氨基酸序列 (Sequence ID: AGL95113.1)。将该氨基酸序列送往南京金斯瑞生物科技有限公司, 经毕赤酵母密码子优化而获得的碱基序列, 全基因合成后放入质粒 pUC57-UGT76G1。糖基转移酶 UGT76G1 目的基因的优化及合成。

1.2.4 糖基转移酶 UGT76G1 表达载体的构建

在 UGT76G1 基因的两端引入限制性酶切位点, 如下所示: UGT76G1-F:5'-GGATCCATAAGACCGAG ACTACCGTCAGAAGA-3'(*Bam*H I); UGT76G1-R:5'-GCGGCCGCTATGAAACAAGGGACTCCAAAGATT

-3'(*Not* I)。以含有编码蔗糖合成酶并经毕赤酵母密码子优化的基因 UGT76G1 的载体 pUC57-UGT76G1 为模板, 进行 PCR 扩增。将 PCR 产物用试剂盒纯化, 用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Not* I 对 PCR 回收产物及质粒 pPIC9K 分别进行双酶切, 纯化回收后用 T4 连接酶进行连接反应, 连接产物转化大肠杆菌 *E.coli* 感受态细胞, 得到表达载体 pPIC9K-UGT76G1。

1.2.5 重组毕赤酵母菌株的构建

重组质粒 pPICZA-mbSUS 用限制性内切酶 *Mss* I 线性化, 电击转化毕赤酵母 GS115/pPIC9K 感受态中, 涂布于 YPDZ 平板, 于 30 $^{\circ}$ C 恒温培养 2~4 d, 挑取博来霉素抗性重组转化子, 微波裂解菌体获得基因组。以基因组为模板, 进行 PCR 鉴定筛选得到表达蔗糖合成酶的重组毕赤酵母菌株。重组质粒 pPIC9K-UGT76G1 用限制性内切酶 *Sal* I 线性化, 电击转化毕赤酵母 GS115 感受态中, 涂布于 MD 平板, 于 30 $^{\circ}$ C 恒温培养 2~4 d, 挑取重组转化子, 微波裂解菌体获得基因组。以基因组为模板, 进行 PCR 鉴定筛选得到重组工程菌 GS115/pPIC9K-UGT76G1。分别取这两株毕赤酵母重组工程菌接种到 10 mL BMGY 液体培养基 (50 mL 的锥形瓶) 中, 30 $^{\circ}$ C 恒温摇床 250 r/min 振荡培养 16~18 h, 至 OD₆₀₀ 达到 4~6。离心后转至 25 mL BMMY 培养基 (250 mL 的锥形瓶, 控制起始 OD 值约为 1.0), 30 $^{\circ}$ C 恒温摇床 250 r/min 振荡培养。每隔 24 h 取 250 μ L 诱导培养液, 用于分析重组菌的生长情况。每次取样完毕后, 补加 1%甲醇, 连续诱导发酵 120 h。

1.2.6 糖基转移酶和蔗糖合成酶酶活的测定

取 200 μ L 诱导培养液于干净的 2 mL 离心管中, 控制菌体 OD₆₀₀=60, 用蒸馏水洗涤三次之后, 弃上清。加入 1 mL 蒸馏水转移至装有 0.73 g 破碎珠的破碎管中, 再加入 30 μ L 1%的蛋白酶抑制剂, 置于破碎仪中进行破碎, 800 r/min 破碎 1 min 后在冰上冰冻 1 min, 反复破碎 8 次之后在 4 $^{\circ}$ C 离心机中 12000 r/min 离心 10 min, 取上清到 2 mL 干净的离心管中, 放置在冰上保存备用。糖基转移酶 UGT76G1 与反应底物混合, 200 μ L 反应体系终浓度为 pH 7.0 的 50 mM 磷酸钾缓冲溶液, 10 mM MgCl₂, 10 mM ST, 2 mM UDPG, 45 $^{\circ}$ C 摇床 200 r/min 反应 20 min。蔗糖合成酶 mbSUS 与反应底物混合, 200 μ L 反应体系终浓度为 pH 7.0 的 50 mM 磷酸钾缓冲溶液, 10 mM MgCl₂, 10 mM 蔗糖, 2 mM UDP, 45 $^{\circ}$ C 摇床 200 r/min 反应 20 min。反应结束后加入 200 μ L 0.2 mM 的磷酸溶液, 静置 5 min 使酶失活, 再加入 200 μ L 的 0.2 mM 的氢氧化钠溶液中和 pH 值。终止反应结束后加入 400 μ L 的蒸馏水稀

释, 涡旋振荡, 14000 r/min 离心 2 min, 取上层液体用 0.22 μm 膜过滤后用于 HPLC 分析。

色谱检测条件: pHenomenex Gemini 5u C18 柱 (250 mm \times 4.6 mm), 流动相为 0.20 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (17.90 g/L 磷酸氢二钠缓冲液和 6.80 g/L 的磷酸二氢钾缓冲液) 和 1.61 g/L 的四丁基溴化铵的纯水相, 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$, 流速 1 mL/min, 进样量为 10 μL , 紫外检测波长 262 nm。使用 UDPG 标准品 (100%) 和 UDP (99%) 通过外标法进行定量。UDPG 和 UDP 浓度的线性范围为 0.1~2 g/L。

得到 UDP 和 UDPG 色谱峰面积, 根据标准曲线换算得到反应生成 UDP 或者消耗的 UDP 量, 通过一下酶活计算公式计算蔗糖合成酶 mbSUS 和糖基转移酶 UGT76G1 的酶活。

$$\text{酶活}/(\text{U}/\text{g}) = \frac{N \times C \times 1000}{T \times (\text{OD} \times 0.224)}$$

注: 酶活力单位定义为在上述反应条件下, 1 min 催化形成 1 mol UDPG 所需要的酶量为 1 个活力单位, 其中 N: 反应液后期处理的稀释倍数, C: 根据标准曲线换算得到的生成 UDPG 或 UDP 的量, T: 反应时间。

1.2.7 不同酶量配比生物催化合成 RA

用 ST 为底物分析新构建的两株重组酵母菌中的酶以不同酶活比例混合条件生物催化合成 RA。甲醇诱导摇瓶发酵 120 h 后离心收集两株菌体, 用 100 mM 磷酸钾缓冲液 (pH 7.0) 洗涤两次。参照 1.2.6 的破碎方法破碎之后收集上清液, 测定酶活。

控制体系中 UGT76G1(K) 的酶活为 10 U, 不同体系中 mbSUS(S) 的酶活为 10、20、40、60 U, 使体系中两个酶的酶活配比为 K1+S1、K1+S2、K1+S4、K1+S6 按照不同的酶活比例添加到 200 μL 反应体系中, 混合体系中各物质终浓度分别为 pH 7.0 的 50 mM 磷酸钾缓冲溶液, 3 mM MgCl_2 , 10 mM ST, 0.6 mM UDP, 50 mM 蔗糖。将混合物在 45 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 3 h 后终止反应。反应体系用蒸馏水稀释五倍, 经 0.22 μm 膜过滤后用于 HPLC 分析。

控制体系中 mbSUS(S) 的酶活为 10 U, 不同体系中 UGT76G1(K) 的酶活为 10、20、40、60 U, 使体系中两个酶的酶活配比为 K1+S1、K2+S1、K4+S1、K6+S1。按照不同的酶活比例添加到 200 μL 反应体系中, 混合体系中各物质终浓度分别为 pH 7.0 的 50 mM 磷酸钾缓冲溶液、3 mM MgCl_2 、10 mM ST、0.6 mM UDP、50 mM 蔗糖。将混合物在 45 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 3 h 后终止反应。反应体系用蒸馏水稀释五倍, 经 0.22 μm 膜过滤后用于 HPLC 分析。

控制不同体系中 mbSUS(S) 和 UGT76G1(K) 酶活

配比, 使其中配比分别为 K1+S1 (K=10 U, S=10 U)、K2+S2 (K=20 U, S=20 U)、K4+S4 (K=40 U, S=40 U)、K6+S6 (K=60 U, S=60 U)。按照不同的酶活比例添加到 200 μL 反应体系中, 混合体系中各物质终浓度分别为 pH 7.0 的 50 mM 磷酸钾缓冲溶液、3 mM MgCl_2 、10 mM ST、0.6 mM UDP、50 mM 蔗糖。将混合物在 45 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 3 h 后终止反应。反应体系用蒸馏水稀释五倍, 经 0.22 μm 膜过滤后用于 HPLC 分析。

1.2.8 数据统计分析

每个重组酵母菌株重复发酵三次, 每次酶活测定以及反应合成 RA 设置三个平行, 数据值为平行样品的平均值, 用误差线表示标准偏差。

2 结果与讨论

2.1 糖基化转移酶 UGT76G1 和蔗糖合成酶毕赤酵母表达质粒的构建

以质粒 pUC57-mbSUS 为模板, PCR 扩增得到约 2400 bp 的 mbSUS 基因片段, 经限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切后, 连接载体片段构建 pPICZA- mbSUS 重组质粒。重组质粒经限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切并用凝胶电泳鉴定。如图 2a 所示, 双酶切得到两条带分别为 3279 bp 和 2426 bp, 与预期的目的片段大小一致, 经 DNA 测序后无碱基突变, 结果正确, 重组质粒成功构建。重组质粒 pPICZA- mbSUS 经限制性内切酶 *Mss* I 线性化后电转化毕赤酵母 GS115/pPIC9K 感受态中。YPDZ 平板初筛得到的重组转化子, 微波裂解粗提基因组经 PCR 凝胶电泳鉴定。如图 2b 所示, 在 2700 bp 左右扩增出一条特异性条带, 与预期的目的片段大小一致, 表明 pPICZA-mbSUS 已成功整合到 GS115 基因组上。

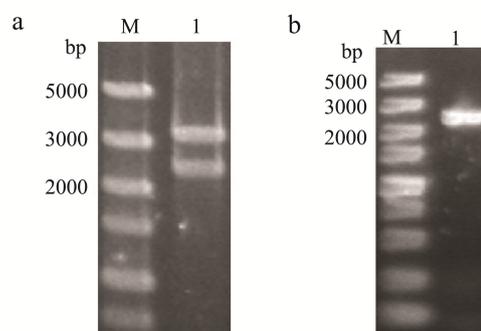


图2 重组质粒 pPICZA-mbSUS 的双酶切鉴定及转化子 PCR 鉴定

Fig.2 Dual-enzyme identification of transformant pPICZA-mbSUS and PCR identification of transformants

注: a: 重组质粒 pPICZA-mbSUS 双酶切鉴定结果; b: 重组毕赤酵母 GS115/pPIC9K/pPICZA-mbSUS PCR 鉴定结果。

以质粒 pUC57-UGT76G1 为模板, PCR 扩增得到约 1377 bp 的 UGT76G1 基因片段, 经限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Not* I 双酶切后, 连接载体片段构建 pPIC9K-UGT76G1 重组质粒。重组质粒经限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Not* I 双酶切并用凝胶电泳鉴定。如图 3a 所示, 双酶切得到两条带分别约为 8979 bp 和 1376 bp, 与预期的目的片段大小一致, 经 DNA 测序后无碱基突变, 结果正确, 重组质粒成功构建。重组质粒 pPIC9K-UGT76G1 经限制性内切酶 *Sal* I 线性化后电转化毕赤酵母 GS115 感受态中。MD 平板初筛得到的重组转化子, 微波裂解粗提基因组经 PCR 凝胶电泳鉴定。如图 3b 所示, 在 1376 bp 左右扩增出一条特异性条带, 与预期的目的片段大小一致, 表明 UGT76G1 已成功整合到 GS115 基因组上。

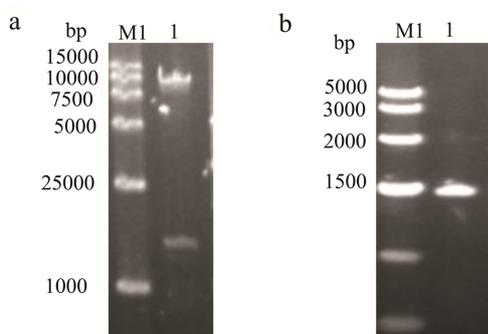


图 3 重组质粒 pPIC9K-UGT76G1 的双酶切鉴定及转化子 PCR 鉴定

Fig.3 Dual-enzyme identification of transformant pPIC9K-UGT76G1 and PCR identification of transformants

注: a: 重组质粒 pPIC9K-UGT76G1 双酶切鉴定结果; b: 重组毕赤酵母 GS115/pPIC9K-UGT76G1 PCR 鉴定结果。

2.2 糖基转移酶 UGT76G1 和蔗糖合成酶毕赤酵母高效表达体系的构建

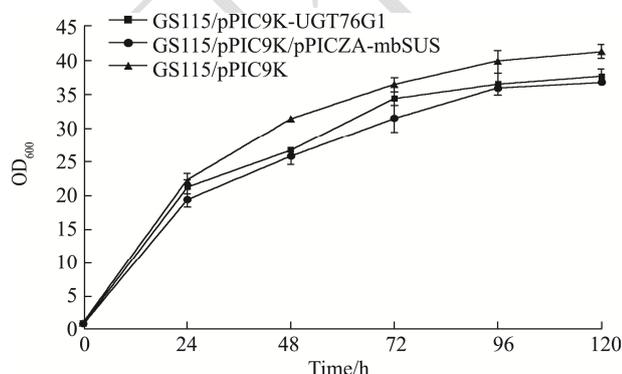


图 4 重组毕赤酵母菌株生长曲线

Fig.4 Recombinant *Pichia pastoris* growth curve

重组菌株经甲醇诱导 120 h 后, 生长情况正常, 如图 4 所示。从图上看, 随着发酵的进行, 两株重

组菌株的菌体数量都逐渐提高, 甲醇诱导到 120 h 时生长趋于稳定。两株重组菌株生长情况相似, 与对照菌株的生长情况相比较, 两株重组毕赤酵母菌株的生长情况均受到了一定影响。

收集经甲醇诱导 120 h 后的菌液, 蒸馏水洗涤 3 遍后进行破碎处理, 提取上清液按照 1.2.6 的方法测定酶活。根据酶活公式计算重组菌株中糖基转移酶 UGT76G1 和蔗糖合成酶 mbSUS 的酶活, 所得酶活如图 5 所示, 在反应条件下, 糖基转移酶 UGT76G1 的酶活约为 141.22 U/g, 蔗糖合成酶 mbSUS 的酶活约为 121.39 U/g。

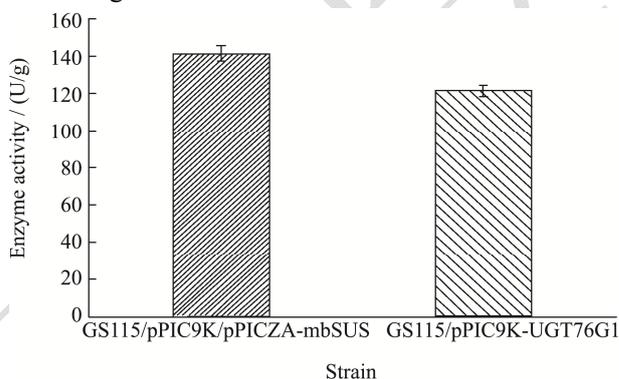


图 5 重组毕赤酵母菌株 UGT76G1 和蔗糖合成酶酶活分析

Fig.5 Enzyme activity of recombinant *Pichia pastoris* strains

2.3 糖基转移酶 UGT76G1 和蔗糖合成酶级联

反应催化体系构建及莱鲍迪昔 A 合成

在生物催化反应中, 添加 $U_{(UGT76G1)}:U_{(mbSUS)}=1:1$ 的条件下反应 3 h, RA 产量为 4.96 mM, 固定体系中 UGT76G1 的酶活为 10 U, 不同体系中 mbSUS 酶活分别为 10、20、40、60 U, 使体系中两个酶的酶活配比为 K1+S1, K1+S2, K1+S4, K1+S6, 如图 6a 所示, 随着蔗糖合成酶 mbSUS 酶活的增加, RA 产量增加。在添加 $U_{(UGT76G1)}:U_{(mbSUS)}=1:6$ 的条件下反应 3 h, RA 产量为 5.81 mM, 与 $U_{(UGT76G1)}:U_{(mbSUS)}=1:1$ 酶活比例条件下 RA 产量相比提高了 17.14%。在提高 mbSUS 的酶活情况下, 蔗糖和 UDP 作为底物充足的条件下, 积累了大量的 UDPG, 而糖基转移酶 UGT76G1 的量是固定的, 继续增加 mbSUS, UGT 的转化速度可能跟不上 mbSUS 的转化速度, 因此不能大量催化合成 RA。

固定体系中 mbSUS 的酶活为 10 U, 不同体系中 UGT76G1 酶活分别为 10、20、40、60 U, 使体系中两个酶的酶活配比为 K1+S1, K2+S1, K4+S1, K6+S1, 如图 6b 所示, 随着糖基转移酶 UGT76G1 酶活的增加, RA 产量有明显的增长。当 UGT76G1 的酶活增加到

60 U 时,与添加 40 U 的糖基转移酶相比,RA 产量仅提高 7.04%。说明此时,体系内 UGT 与 mbSUS 的循环速率可能达到最佳,级联反应获得最优平衡。添加 60 U 糖基转移酶 UGT76G1 和 10 U 蔗糖合成酶 mbSUS 反应 3 h,RA 产量为 8.20 mM,与 $U_{(UGT76G1)}:U_{(mbSUS)}=1:1$ 酶活比例催化相比,RA 产量提高了 65.32%,在此生物催化级联反应过程中,糖基转移酶的量增加到一定程度,由于缺少蔗糖合成酶催化蔗糖生成果糖提供 UDPG 作为底物催化甜菊糖苷生物合成大量的莱鲍迪昔 A。

在催化反应过程之中,同时增加 UGT76G1 和 mbSUS 的酶量,研究其对合成 RA 的影响。如图 6c 所示,糖基转移酶 UGT76G1 和蔗糖合成酶 mbSUS 的酶量同时增加,RA 的产量有少量增加,糖基转移酶 mbSUS 能可逆催化蔗糖和 UDP 生成 UDPG,提高蔗糖合成酶的酶活,可以大量积累 UDPG。在催化反应体系中,UDPG 作为底物可以通过糖基转移酶 UGT76G1 催化甜菊糖苷生成莱鲍迪昔 A,随着糖基转移酶 UGT76G1 和蔗糖合成酶 mbSUS 酶活的同时增加,RA 产量提高,在添加 $U_{(UGT76G1)}:U_{(mbSUS)}=6:6$ 的条件下反应 3 h,RA 产量为 6.38 ± 1.03 mM,与 $U_{(UGT76G1)}:U_{(mbSUS)}=1:1$ 酶活比例反应相比,RA 产量提高了 28.63%。

在对上述不同反应条件进行比较后,得到糖基转移酶 UGT76G1 和蔗糖合成酶 mbSUS 这两个酶在不同酶量比例反应生成 RA 的最适酶活比例为 $U_{(UGT76G1)}:U_{(mbSUS)}=6:1$,反应 3h RA 产量为 8.20 ± 0.11 mM,RA 的产率达到 82.91%。如图 6d 所示,最适的反应条件为单独提高糖基转移酶 UGT676G1 的酶活到 60 U,添加蔗糖合成酶 mbSUS 的酶活为 10 U,在此酶活比例条件下既避免蔗糖合成酶 mbSUS 过量,UGT 的转化速度跟不上 mbSUS 的转化速度,同时也提供适量的糖基转移酶 UGT76G1 进行催化糖基转移化反应,UGT 作为级联反应中的限速酶,提高其比例,能有效推动循环,提高 RA 产量。

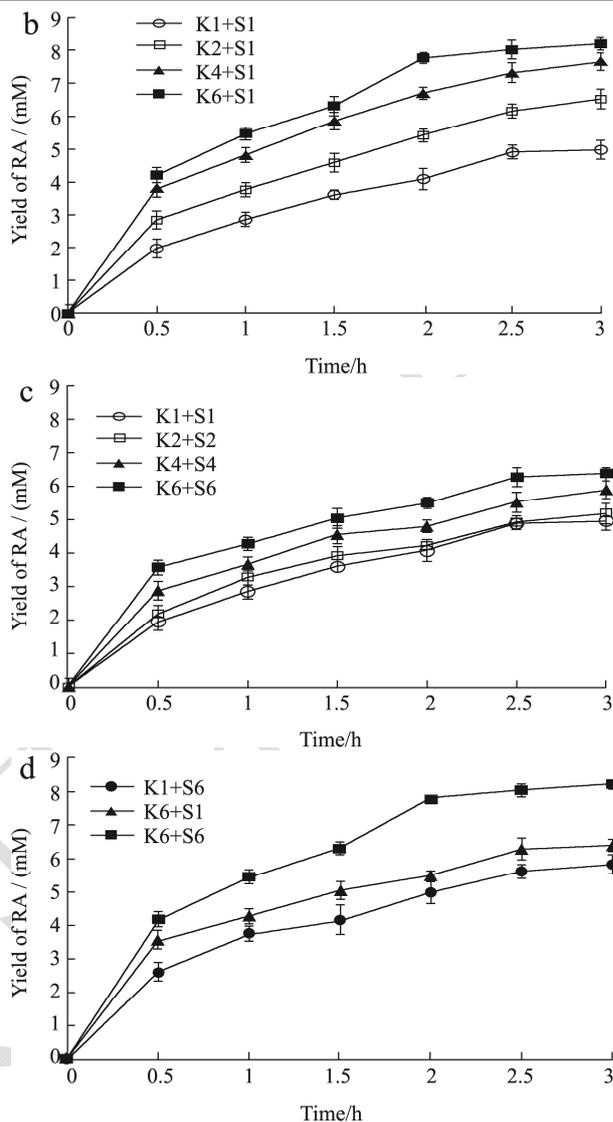
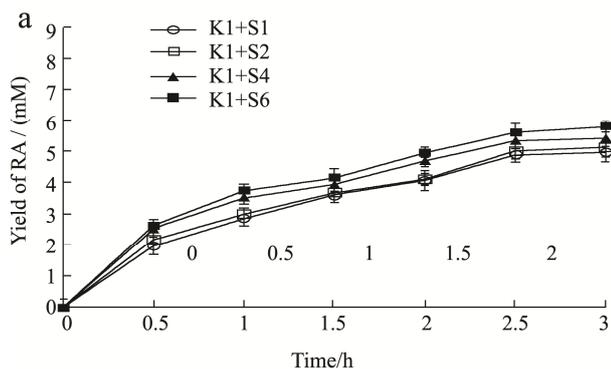


图 6 UGT76G1 和蔗糖合成酶不同比例组合催化合成莱鲍迪昔 A 效率比较

Fig.6 Comparison of the efficiency of catalytic synthesis of rebaudioside A with different ratios of UGT76G1 and sucrose synthase

注: a: 固定 UGT76G1 的酶活,增加 mbSUS 的酶活; b: 固定 mbSUS 的酶活,增加 UGT76G1 的酶活; c: 同时提高 UGT76G1 和 mbSUS 的酶活; d: 比较不同比例条件下 RA 的产量。

3 结论

3.1 莱鲍迪昔 A 作为甜菊糖苷中甜味高、口感好的成分,获取高纯度莱鲍迪昔 A 的产品是甜菊糖产品的一个重要发展方向。本研究利用毕赤酵母重组高效表达糖基转移酶 UGT76G1 和蔗糖合成酶 mbSUS,建立了双酶级联生物催化反应体系,优化了添加两个酶的最佳酶量配比为 $U_{(UGT76G1)}:U_{(mbSUS)}=6:1$,反应 3 h RA 产

量为 8.20 ± 0.11 mM, RA 的产率达到 82.91%, 较添加 $U_{(UGT76G1)}:U_{(mbSUS)}=1:1$ 酶活比例条件催化, RA 产量提高了 1.65 倍。与此前唐毕赤酵母重组菌株相比, RA 产量是其全细胞催化反应所得 RA 产率的 1.10 倍, 生物催化反应时间缩短了 5 倍, 与在大肠杆菌中进行糖基转移酶 UGT76G1 和拟南芥来源的蔗糖合成酶 AtSUS 纯酶催化 RA 相比, 本研究催化所得 RA 的产率是其催化反应所得 RA 产率的 1.22 倍, 且反应时间缩短了 10 倍。

3.2 本研究通过添加糖基转移酶 UGT76G1 与蔗糖合成酶 mbSUS, 可以在生物催化过程中实现级联反应, 实现催化反应过程中 UDPG 的循环, 在提高了 RA 产量的基础上, 极大的减少了催化反应时间, 提高了 RA 的生产效率。此外本研究发现在此级联反应中糖基转移酶 UGT76G1 作为限速酶在一定程度上影响了 RA 的合成, 后续研究可以通过提高基因剂量实现外源蛋白在毕赤酵母系统的高效表达。

参考文献

- [1] Carakostas M C, Curry L L, Boileau A C, et al. Overview: the history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages [J]. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46(7): 1-10
- [2] Varanuj Chatsudthipong, Chatchai Muanprasat. Stevioside and related compounds: therapeutic benefits beyond sweetness [J]. Pharmacol Ther, 2009, 121: 41-54
- [3] Rebekka Thøgersen, Petrat-Melin Bjørn, Zamaratskaia Galia, et al. *In vitro* effects of rebaudioside A, stevioside and steviol on porcine cytochrome p450 expression and activity [J]. Food Chemistry, 2018, 258: 245-253
- [4] Xiaoli Wu, Wang Baogui, Chen Tingtao, et al. The non-cytotoxicity characterization of rebaudioside A as a food additive [J]. Food and Chemical Toxicology, 2014, 66: 334-340
- [5] Kim Olsson, Carlsen Simon, Semmler Angelika, et al. Microbial production of next-generation stevia sweeteners [J]. Microbial Cell Factories, 2016, 15(1): 207-211
- [6] 叶发银, 杨瑞金, 华霄, 等. 大孔树脂 D392 对莱鲍迪昔 A 和甜菊苷吸附作用的研究 [J]. 食品工业科技, 2012, 33(23): 206-210
YE Fa -yin, YANG Rui-jin, HUA Xiao, et al. Study on adsorption effect of rebaudioside A and stevioside onto D392 macroporous resin [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(23): 206-210
- [7] Călin-Aurel Drăgan, Buchheit D, Bischoff D, et al. Glucuronide production by whole-cell biotransformation using genetically engineered fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* [J]. Drug Metabolism & Disposition, 2010, 38(3): 509-515
- [8] 张延栋. 斯替夫昔的酶促糖基化及甜菊糖苷的应用初探 [D]. 无锡: 江南大学, 2017
ZHANG Yan-dong. Enzymatic transglycosylation of stevioside and application of steviol glycosides [D]. Wuxi: Jiang Nan University, 2017
- [9] Yu Wang, Chen Liang-liang, Li Yan, et al. Efficient enzymatic production of rebaudioside A from stevioside [J]. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 2015, 80(1): 67-73
- [10] Frederik De Bruyn, Maertens Jo, Beauprez Joeri, et al. Biotechnological advances in UDP-sugar based glycosylation of small molecules [J]. Biotechnology Advances, 2015, 33(2): 288-302
- [11] 金月, 吴旭日, 陈依军. 糖基转移酶在改善天然产物成药性方面的应用 [J]. 中国药科大学学报, 2017, 48(5): 529-535
JIN Yue, WU Xu-ri, CHEN Yi-jun. Applications of glycosyltransferases in the improvement of druggability of natural product [J]. China Pharm Univ, 2017, 48(5): 529-535
- [12] M Diricks, De Bruyn F, Van Daele P, et al. Identification of sucrose synthase in non-photosynthetic bacteria and characterization of the recombinant enzymes [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2015, 99(20): 8465-8474
- [13] Alexander Gutmann, Nidetzky Bernd. Unlocking the potential of leloir glycosyltransferases for applied biocatalysis: efficient synthesis of uridine 5'-Diphosphate-Glucose by sucrose synthase [J]. Advanced Synthesis & Catalysis, 2016, 358(22): 3600-3609
- [14] Katharina Schmölder, Lemmerer Martin, Gutmann Alexander, et al. Integrated process design for biocatalytic synthesis by a leloir glycosyltransferase: UDP-glucose production with sucrose synthase [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2017, 114(4): 924-928
- [15] Carlos-M Figueroa, Asención Díez Matías-D, Kuhn Misty-L, et al. The unique nucleotide specificity of the sucrose synthase from *Thermosynechococcus elongatus* [J]. FEBS Letters, 2013, 587(2): 165-169

(下转第 64 页)