

基于尿苷二磷酸葡萄糖循环再生系统高效转化酪醇合成红景天苷

魏晨昱, 黄珠莹, 沈知行, 张显, 饶志明, 胡晓清*, 徐美娟*

江南大学 生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

魏晨昱, 黄珠莹, 沈知行, 张显, 饶志明, 胡晓清, 徐美娟. 基于尿苷二磷酸葡萄糖循环再生系统高效转化酪醇合成红景天苷[J]. 生物工程学报, 2024, 40(9): 3127-3141.

WEI Chenyu, HUANG Zhuying, SHEN Zhixing, ZHANG Xian, RAO Zhiming, HU Xiaoqing, XU Meijuan. Efficient synthesis of salidroside from tyrosol based on UDPG recycling system[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(9): 3127-3141.

摘要: 红景天苷是一种在食品、医药等领域应用广泛的功能性成分, 其传统生产方法为植物提取, 原料成本高昂且提取过程繁琐。本研究通过生物合成法, 以酪醇为底物高效生产红景天苷。在利用糖基转移酶实现酪醇糖基化的同时, 引入蔗糖合酶构建尿苷二磷酸葡萄糖(uridine diphosphate glucose, UDPG)循环再生系统。通过比较, 筛选出糖基转移酶 UGT33 以及蔗糖合酶 *AtSUS*, 构建重组大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21/pETDuet-*AtSUS*-*UGT33*, 并针对基因的拷贝数进行了优化, 确定糖基转移酶与蔗糖合酶的最优拷贝数比例为 3:1。进一步对重组菌株的全细胞催化条件进行优化, 在最适反应温度、pH、菌体量、底物浓度、适量金属离子的最优反应条件下, 在 5 L 发酵罐转化 24 h, 红景天苷最高产量达到 8.17 g/L。本研究为利用微生物高效生产红景天苷提供了一定的参考意义。

关键词: 红景天苷; 糖基转移酶; 蔗糖合酶; 尿苷二磷酸葡萄糖循环再生; 全细胞催化

资助项目: 国家自然科学基金(32070035); 国家重点研发计划(2023YFD1300700); 工业生物技术教育部重点实验室开放课题(KLIB-KF202305)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32070035), the National Key Research and Development Program of China (2023YFD1300700), and the Open Project of the Key Laboratory of Industrial Biotechnology of the Ministry of Education (KLIB-KF202305).

*Corresponding authors. E-mail: XU Meijuan, xumeijuan@jiangnan.edu.cn; HU Xiaoqing, xiaoqinghu@jiangnan.edu.cn

Received: 2024-02-27; Accepted: 2024-04-30

Efficient synthesis of salidroside from tyrosol based on UDPG recycling system

WEI Chenyu, HUANG Zhuying, SHEN Zhixing, ZHANG Xian, RAO Zhiming, HU Xiaoqing*, XU Meijuan*

Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Salidroside is a functional ingredient with wide applications in food and pharmaceutical fields. It is conventionally produced by extraction from plants, the application of which is limited by the scarcity of raw materials and cumbersome process. This study achieved the efficient production of salidroside by biosynthesis with tyrosol as the substrate. While utilizing glycosyltransferases for tyrosol glycosylation, we introduced sucrose synthase to construct the uridine diphosphate glucose (UDPG) recycling system. The glycosyltransferase UGT33 and sucrose synthase *AtSUS* were screened out by comparison, and the recombinant strain *Escherichia coli* BL21/pETDuet-*AtSUS-UGT33* was constructed. The copy number of the gene was optimized and the optimal copy number ratio of glycosyltransferase to sucrose synthase was determined to be 3:1. The whole-cell transformation conditions (temperature, pH, inoculum amount, substrate concentration, and concentrations of metal ions) of the recombinant strain were optimized, and the highest yield of salidroside reached 8.17 g/L after fermentation under the optimal conditions in a 5 L fermenter for 24 h. This study provides a reference for the efficient production of salidroside by microorganisms.

Keywords: salidroside; glycosyltransferases; sucrose synthase; uridine diphosphate glucose recycling; whole-cell catalysis

红景天是生长在高寒无污染地区的珍稀草本植物,应用历史悠久,具有刺激神经系统、消除疲劳、防治高原反应、保护心脑血管以及抗肿瘤抗辐射等功能^[1]。红景天苷作为在药品、食品、保健品等行业广泛应用的功能性成分,目前市场需求越来越高。

红景天苷的主要通过植物提取法^[2]、化学合成法^[3-4]、生物合成法^[5-7]获得,植物提取法受到原材料红景天植物稀缺不易得和提取效率低的限制。化学合成法虽然主要以酪醇及其类似物为原料进行催化,但成本高、过程复杂,不利于工

业化大规模生产。生物合成法主要是利用酶法催化或利用代谢工程技术进行合成,相比于植物提取法和化学合成法,生物合成法具有成本低、效率高、可持续的优点,因此通过生物合成法获取红景天苷具有良好的应用前景^[8]。

红景天苷的生物合成法是将苷元酪醇在尿苷二磷酸-葡萄糖基糖基转移酶(UDP-glycosyltransferases, UGTs)的催化下接受来自尿苷二磷酸葡萄糖(uridine diphosphate glucose, UDPG)的1分子葡萄糖残基,发生糖基化反应后生成红景天苷及副产物尿苷二磷酸

(uridine diphosphate, UDP)。在糖基转移酶的挖掘方面, Fan 等^[9]通过利用来源于地衣芽孢杆菌的糖基转移酶 UGT_{BL1}, 得到了 1.04 g/L 的红景天苷。Yu 等^[10]从高山红景天的组织中分离得到糖基转移酶 UGT72B14 和 UGT74R1; 其中糖基转移酶 UGT72B14 的酶活比 UGT74R1 和 UGT73B6 的酶活分别高 6.2 倍和 1.7 倍^[11]。除了筛选有效的糖基转移酶以外, 增强糖基供体 UDPG 的供应也可以帮助提升红景天苷的产量。蔗糖合酶(sucrose synthase, SUS)在分解蔗糖时, 除获得果糖外, 还可以将获得的葡萄糖残基与 UDP 结合产生 UDPG, 这一反应除了可以满足糖基化反应过程中对糖基供体的需要, 也可以消耗糖基化反应过程中产生的副产物 UDP。Terasaka 等^[12]在利用白藜芦醇合成槲皮素葡萄糖苷等产物的过程中, 利用 *AtSUS1* 建立了 UDPG 循环再生系统, 显著增强了糖基化效率。

本研究首先从不同来源的糖基转移酶中筛选出了在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中具有较强催化活性的 UGT33, 同时为了增强 UDPG 供应, 减轻副产物 UDP 对酶的抑制作用, 引入蔗糖合酶 *AtSUS* 构建 UDPG 循环再生系统, 使糖基化效率显著增强(图 1)。在生产红景天苷的基础上,

优化全细胞催化的条件, 提高了产量, 能够为其他糖苷类化合物的生产提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

实验中宿主菌株均为本实验室保藏的用于质粒保存和蛋白表达的 *E. coli* BL21(DE3)。pET28a、pETDuet-1 等均为本实验室保藏的大肠杆菌表达载体。糖基转移酶基因包括拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)来源的 UGT85A1^[13](GenBank 登录号: NM_102089.5)和 UGT73C5^[14](GenBank 登录号: NM_129235.4)、红景天(*Rhodiola rosea*)来源的 UGT73B6^[15](GenBank 登录号: AY547304.1)和 UGT33^[16](GenBank 登录号: MF674558.1)。蔗糖合酶基因包括欧洲亚硝化单胞菌(*Nitrosomonas europaea*)来源的 *NeSUS*^[17](GenBank 登录号: NC_007614.1)、大豆(*Glycine max*)来源的 *GmSUS*^[18](GenBank 登录号: NM_001250596.2)、绿豆(*Vigna radiata*)来源的 *MbSUS*^[19](GenBank 登录号: BAA01108.1)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)来源的 *AtSUS*^[20](GenBank 登录号: NM_122090.4)和嗜温嗜硫酸杆菌(*Acidithiobacillus*

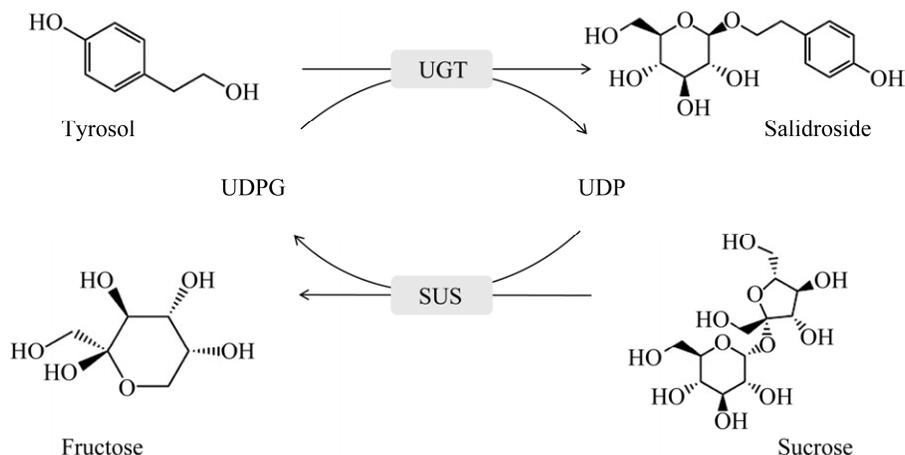


图 1 大肠杆菌全细胞催化合成红景天苷的构建策略

Figure 1 The strategy for production of salidroside using whole-cell biocatalyst of *Escherichia coli*. UGT: UDP-glucosyltransferases. SUS: Sucrose synthase.

calculus)来源的 *AcSUS*^[21] (GenBank 登录号: A0A059ZV61.1), 以上基因均由苏州金唯智生物科技有限公司合成, 同时根据大肠杆菌中密码子的偏好性进行了优化, 并连接至相应载体构建质粒。本研究使用的菌株及菌株见表 1。

1.1.2 酶和试剂

高保真 PCR 酶、同源重组酶克隆试剂盒均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、细菌基因组提取试剂盒均购自天根生化科技(北京)有限公司; 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG)、卡那霉素、氨苄青霉素均购自生工生物工程(上海)股份有

限公司; 酪醇、红景天苷标准品、UDP 均购自上海源叶生物科技有限公司; 其他试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。

1.1.3 培养基

Luria-Bertani (LB) 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0。

Terrific-Broth (TB) 培养基(g/L): 蛋白胨 12.00, 酵母提取物 24.00, 甘油 4.00 mL/L, KH_2PO_4 2.31, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 16.42。

ZYM 自诱导培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.00, Na_2HPO_4 3.56, KH_2PO_4 3.50, NH_4Cl 2.68, Na_2SO_4 0.72, MgSO_4 0.24, 甘油 5.00 mL/L, 葡萄糖 0.50, 乳糖 2.00。

表 1 本研究使用的质粒及菌株

Table 1 Plasmids and strains used in this study

Strains or plasmids	Illustration	Sources
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	Cloning and expression of host	Laboratory stock
<i>E. coli</i> BL21/pET28a	BL21 harboring pET28a	Laboratory stock
<i>E. coli</i> BL21/pETDuet-1	BL21 harboring pETDuet-1	Laboratory stock
<i>E. coli</i> BL21/pET28a- <i>UGT85A1</i>	BL21 harboring pET28a- <i>UGT85A1</i>	This work
<i>E. coli</i> BL21/pET28a- <i>UGT73C5</i>	BL21 harboring pET28a- <i>UGT73C5</i>	This work
<i>E. coli</i> BL21/pET28a- <i>UGT73B6</i>	BL21 harboring pET28a- <i>UGT73B6</i>	This work
<i>E. coli</i> BL21/pET28a- <i>UGT33</i>	BL21 harboring pET28a- <i>UGT33</i>	This work
<i>E. coli</i> BL21/pET28a- <i>NeSUS</i>	BL21 harboring pET28a- <i>NeSUS</i>	This work
<i>E. coli</i> BL21/pET28a- <i>GmSUS</i>	BL21 harboring pET28a- <i>GmSUS</i>	This work
<i>E. coli</i> BL21/pET28a- <i>MbSUS</i>	BL21 harboring pET28a- <i>MbSUS</i>	This work
<i>E. coli</i> BL21/pET28a- <i>AtSUS</i>	BL21 harboring pET28a- <i>AtSUS</i>	This work
<i>E. coli</i> BL21/pET28a- <i>AcSUS</i>	BL21 harboring pET28a- <i>AcSUS</i>	This work
<i>E. coli</i> S1	BL21 harboring pET28a- <i>AtSUS-UGT33</i>	This work
<i>E. coli</i> S2	BL21 harboring pET28a- <i>UGT33-AtSUS</i>	This work
<i>E. coli</i> S3	BL21 harboring pETDuet- <i>AtSUS-UGT33</i>	This work
<i>E. coli</i> S4	BL21 harboring pETDuet- <i>UGT33-AtSUS</i>	This work
<i>E. coli</i> S5	BL21 harboring pETDuet- <i>AtSUS-AtSUS-UGT33</i>	This work
<i>E. coli</i> S6	BL21 harboring pETDuet- <i>AtSUS-AtSUS-AtSUS-UGT33</i>	This work
<i>E. coli</i> S7	BL21 harboring pETDuet- <i>AtSUS-AtSUS-AtSUS-AtSUS-UGT33</i>	This work
<i>E. coli</i> S8	BL21 harboring pETDuet- <i>AtSUS-UGT33-UGT33</i>	This work
<i>E. coli</i> S9	BL21 harboring pETDuet- <i>AtSUS-UGT33-UGT33-UGT33</i>	This work
<i>E. coli</i> S10	BL21 harboring pETDuet- <i>AtSUS-UGT33-UGT33-UGT33-UGT33</i>	This work

PCR 并抽提质粒送苏州金唯智生物科技有限公司测序, 测序正确代表重组菌株构建成功。

1.2.3 酶的表达与纯化

将构建成功的大肠杆菌通过平板划线活化后挑取单菌落接入到 10 mL LB 液体培养基中并添加抗生素, 37 °C 培养 12 h, 按 1% 的接种量转接至含抗生素的 50 mL TB 培养基中继续培养, 当 OD_{600} 达到 0.6–0.8 后加入终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG, 16 °C 低温诱导 18 h。4 °C、8 000 r/min 离心 5 min 后收集菌体, 用 PBS 重悬洗涤菌体 2 次。使用超声破碎仪进行细胞破碎后, 将细胞破碎液在 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min, 所得上清液即为粗酶液样品。粗酶液用 0.22 μ m 滤膜过滤, 使用亲和层析镍柱进行纯化获得纯酶。得到的粗酶和纯酶通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)检测, 利用 Bradford 法^[22]测定蛋白浓度。

1.2.4 酶活测定

糖基转移酶酶活测定: 200 μ L 反应体系中包括 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)、250 μ mol/L 酪醇、2 mmol/L UDPG 和适量酶液, 于 30 °C 反应 1 h, 反应结束后加入 400 μ L 甲醇终止反应。12 000 r/min 离心 10 min, 反应产物采用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)分析。将上述条件下每 min 生成 1 μ mol 红景天苷所需酶量定义为 1 个酶活力单位(U), 纯酶比酶活为每 mg 蛋白质所包含的酶活力单位, 粗酶酶活为每 mL 酶液所包含的酶活力单位。

蔗糖合酶酶活测定^[23]: 200 μ L 反应体系中包括 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)、10 mmol/L UDP、100 mmol/L 蔗糖和适量酶液。混合物于 30 °C 反应 30 min 后加入 3,5 二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)试剂, 立即煮沸 10 min, 冷却至室温后在 540 nm 处测吸光值测定产物果

糖的含量。将每 min 释放 1 μ mol 果糖所需酶量定义为 1 个酶活力单位(U), 纯酶比酶活为每 mg 蛋白质所包含的酶活力单位, 粗酶酶活为每 mL 酶液所包含的酶活力单位。

1.2.5 酶学性质

糖基转移酶、蔗糖合酶的最适反应温度与最适反应 pH: 在不同温度条件下测定酶活, 检测酶的最适反应温度。在不同 pH 的反应体系下测定酶活, 检测酶的最适反应 pH。

酶的热稳定性检测与 pH 稳定性检测: 分别在不同温度的条件下存放酶液, 3 h 后检测剩余的酶活, 探究酶的热稳定性。分别在不同 pH 的条件下存放酶液, 3 h 后检测剩余的酶活, 探究酶的 pH 稳定性。

1.2.6 全细胞催化及催化条件优化

采用 1.2.3 的方法诱导转入质粒的大肠杆菌菌株, 8 000 r/min 离心 10 min 后收获细胞, 用 PBS 洗涤细胞后重悬细胞, 进行全细胞催化。单因素条件优化的实验均在 250 mL 摇瓶中进行, 总体积为 50 mL。单因素条件的优化包括菌体量 OD_{600} 、温度、pH、金属离子、底物浓度。反应过程中定期取样, 样品离心后进行适当稀释, 使用高效液相色谱法分析红景天苷的产量。

5 L 发酵罐转化条件: 在初始底物浓度酪醇 30 mmol/L、蔗糖 35 mmol/L、UDP 8 mmol/L 体系中添加 5 mmol/L Mn^{2+} , 菌体量 $OD_{600}=30$, 反应温度 30 °C、pH 7.0 的条件下于 5 L 发酵罐上转化。反应过程中定期取样, 使用高效液相色谱法分析红景天苷的产量。

1.2.7 高效液相色谱法检测条件

使用高效液相色谱法对红景天苷进行定量和分析^[24]。采用 C18 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m), 流动相 A 为含 0.1% 甲酸的水溶液, 流动相 B 为 100% 甲醇, 流速 1 mL/min, 梯度洗脱条件为 0–25 min 80% 流动相 A 和 20% 流动相 B; 26–40 min 80% 流动相 A 以及 20% 流动相 B 逐渐

过渡至 100%流动相 B; 41–45 min 100%流动相 B, 流速 1 mL/min, 紫外检测波长 224 nm, 柱温 35 °C, 进样量 10 μ L。配制不同浓度的红景天苷标准品溶液, 并生成标准曲线, 标准曲线 R^2 值>0.999。

2 结果与分析

2.1 关键途径酶的筛选

分别构建包含重组质粒 pET28a-*UGT85A1*、pET28a-*UGT73C5*、pET28a-*UGT73B6*、pET28a-

UGT33、pET28a-*NeSUS*、pET28a-*GmSUS*、pET28a-*MbSUS*、pET28a-*AtSUS*、pET28a-*AcSUS* 的大肠杆菌重组菌株。菌落 PCR 验证结果见图 2。

获得糖基转移酶 *UGT85A1*、*UGT73C5*、*UGT73B6*、*UGT33* 和蔗糖合酶 *NeSUS*、*GmSUS*、*MbSUS*、*AtSUS*、*AcSUS* 的纯酶后, 利用 SDS-PAGE 分析酶的表达情况, 结果如图 3 所示, 其中 *UGT73B6* 几乎无可溶性表达, 而糖基转移酶 *UGT85A1*、*UGT73C5*、*UGT33* 以及蔗糖合酶

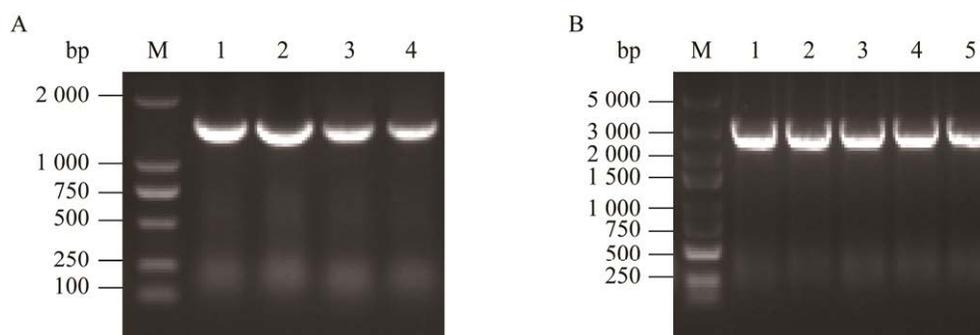


图 2 糖基转移酶基因(A)和蔗糖合酶基因(B)的菌落 PCR 验证

Figure 2 PCR verification of *UGT* and *SUS* genes. A: PCR verification of *UGT* genes. M: DNA marker; 1: *UGT85A1*; 2: *UGT73C5*; 3: *UGT73B6*; 4: *UGT33*. B: PCR verification of *SUS* genes. M: DNA marker; 1: *GmSUS*; 2: *NeSUS*; 3: *MbSUS*; 4: *AtSUS*; 5: *AcSUS*.

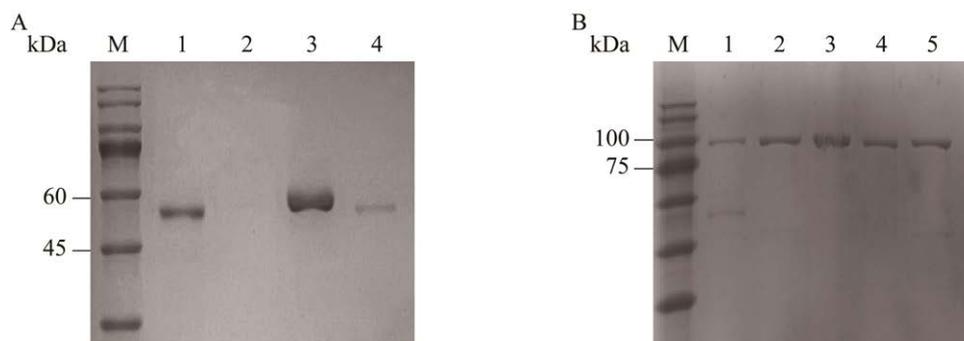


图 3 糖基转移酶纯酶(A)和蔗糖合酶纯酶(B)的 SDS-PAGE 分析

Figure 3 SDS-PAGE analysis of purified enzymes of *UGT* and *SUS*. A: Purified enzymes of *UGT*. M: Protein marker; 1: *UGT85A1*; 2: *UGT73B6*; 3: *UGT73C5*; 4: *UGT33*. B: Purified enzymes of *SUS*. M: Protein marker; 1: *AcSUS*; 2: *AtSUS*; 3: *GmSUS*; 4: *NeSUS*; 5: *MbSUS*.

NeSUS、*GmSUS*、*MbSUS*、*AtSUS*、*AcSUS* 均有明显条带。

将得到的纯酶液按 1.2.4 的方法检测比酶活, 测量结果如表 3 所示, 其中糖基转移酶 UGT33 比酶活最高为 1.36 U/mg, 蔗糖合酶 *AtSUS* 比酶活最高为 10.13 U/mg。

在不同温度条件下检测糖基转移酶比酶活, 结果如图 4A 所示, 糖基转移酶最适温度在 25–30 °C 之间, 其中 UGT73C5 在超过 30 °C 后比酶活显著下降, UGT85A1 与 UGT33 在 20–45 °C

表 3 糖基转移酶与蔗糖合酶比酶活

Table 3 Specific activity of glycosyltransferases and sucrose synthases

Enzymes	Specific activity (U/mg)
UGT85A1	0.96±0.03
UGT73C5	0.52±0.04
UGT73B6	0.12±0.02
UGT33	1.36±0.04
<i>NeSUS</i>	6.16±0.03
<i>GmSUS</i>	9.88±0.05
<i>MbSUS</i>	4.13±0.04
<i>AtSUS</i>	10.13±0.02
<i>AcSUS</i>	2.65±0.03

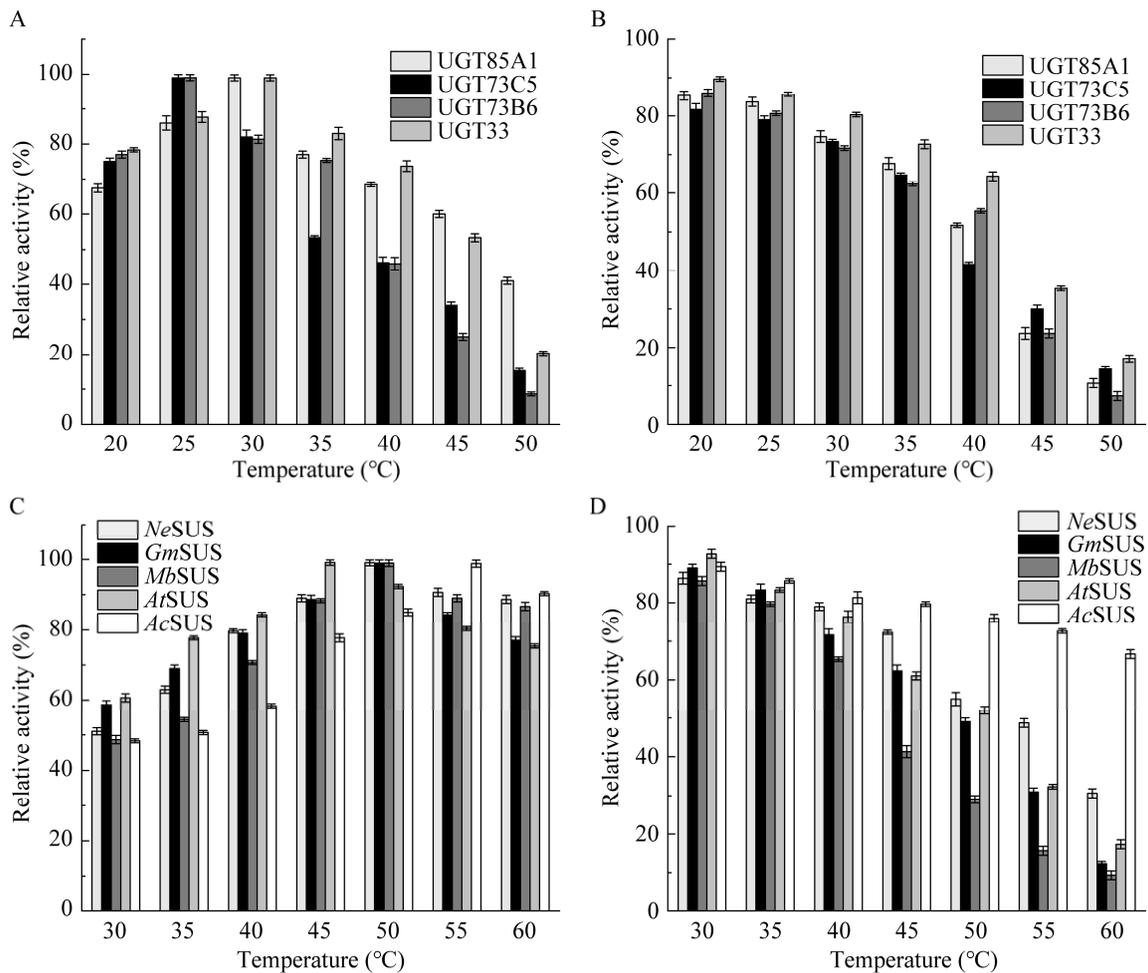


图 4 糖基转移酶最适温度(A)和热稳定性(B)以及蔗糖合酶最适温度(C)和热稳定性(D)

Figure 4 Optimal temperature (A), temperature stability (B) of glycosyltransferases and optimal temperature (C), temperature stability (D) of sucrose synthases.

范围内比酶活均能维持在 55%以上。热稳定性结果如图 4B 所示, 其中 UGT33 在 20–40 °C 范围内保存 3 h 后比酶活能够维持在 60%以上, 因此 UGT33 热稳定性更好, 具有更好的工业利用价值。在不同温度下检测蔗糖合酶比酶活, 结果如图 4C 所示, 蔗糖合酶最适温度在 45–55 °C 之间, 其中在 20–45 °C 范围内 *GmSUS* 与 *AtSUS* 比酶活均能维持在 50%以上。热稳定性结果如图 4D 所示, 其中细菌来源的 *AcSUS* 热稳定最好, 60 °C 保存 3 h 后比酶活能够维持在 65%以上, 而植物来源的 *NeSUS*、*GmSUS*、*AtSUS* 在超过 40 °C 条件下保存 3 h 后比酶活显

著下降。

在不同 pH 条件下检测糖基转移酶比酶活, 结果如图 5A 所示, 糖基转移酶的最适 pH 为 7.0–7.5, pH 稳定性测试结果如图 5B 所示, 酶液在偏酸性条件下保存 3 h 后, 比酶活均显著下降。在不同 pH 条件下检测蔗糖合酶比酶活, 结果如图 5C 所示, 蔗糖合酶的最适 pH 为 6.0–6.5, pH 稳定性测试结果如图 5D 所示, 当 pH 小于 7.0, *NeSUS*、*AcSUS* 的比酶活显著下降, 而 *GmSUS*、*NeSUS*、*AtSUS* 的 pH 稳定性更好, 因此 *GmSUS*、*NeSUS*、*AtSUS* 更适合用于增强 UDPG 的供应。

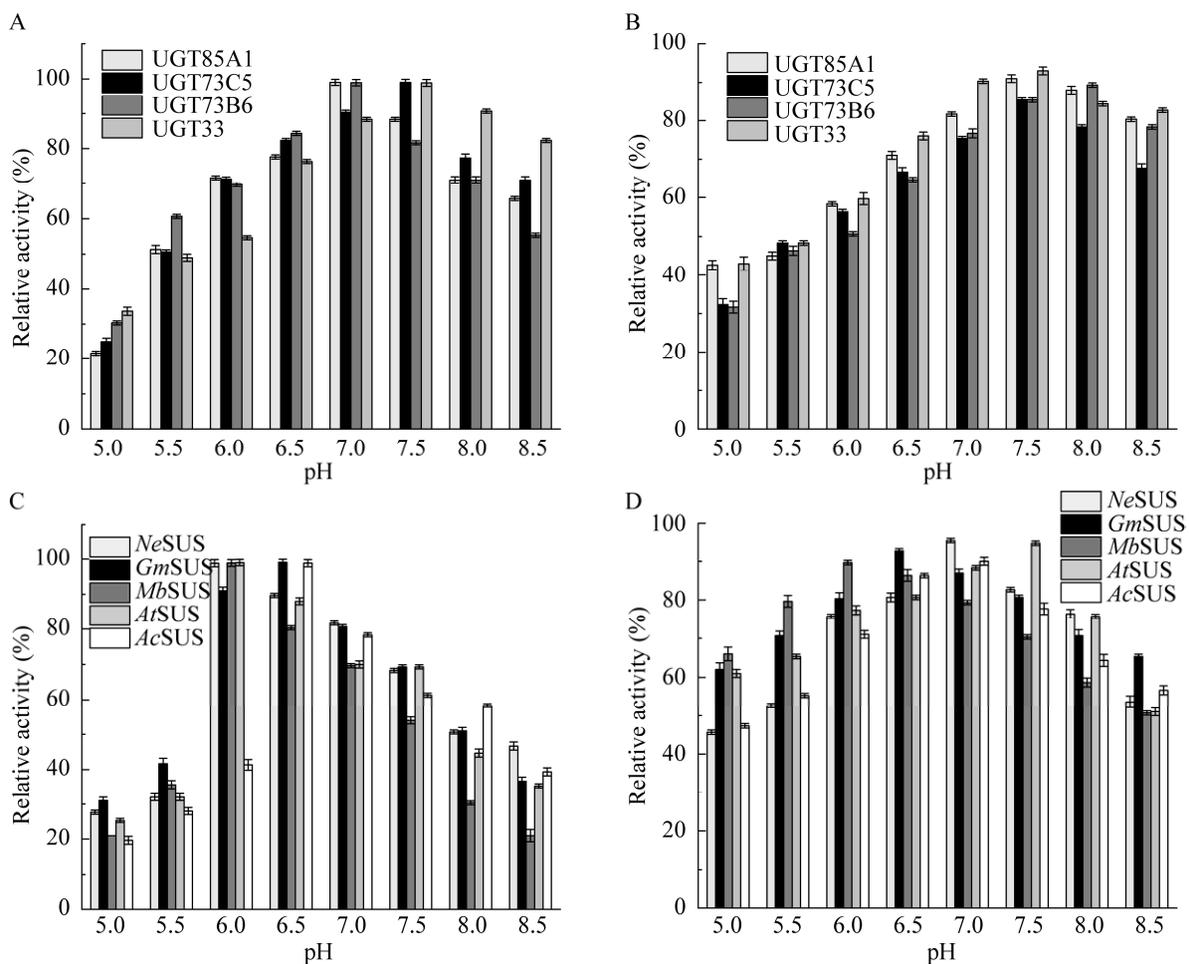


图 5 糖基转移酶最适 pH (A)和 pH 稳定性(B)以及蔗糖合酶最适 pH (C)和 pH 稳定性(D)

Figure 5 Optimal pH (A), pH stability (B) of glycosyltransferases and optimal pH (C), pH stability (D) of sucrose synthases.

综上,根据糖基转移酶、蔗糖合酶的比酶活以及酶学性质的研究结果,确定 UGT33 为后续转化的最佳关键酶,选用 *AtSUS* 用于 UDPG 的循环再生系统的构建。

2.2 酶诱导表达培养基以及表达载体的优化

为了实现糖基转移酶与蔗糖合酶的共表达,选择了 pET28a、pETDuet-1 两种大肠杆菌常用的表达载体构建 UGT33、*AtSUS* 双酶共表达重组质粒。为了比较两种酶在质粒上串联顺序对于

红景天苷产量的影响,分别构建了重组质粒 pET28a-*AtSUS*-UGT33、pET28a-UGT33-*AtSUS*、pETDuet-*AtSUS*-UGT33、pETDuet-UGT33-*AtSUS*,质粒图谱如图 6A 所示,将携带以上质粒的重组菌株分别命名为 *E. coli* S1、*E. coli* S2、*E. coli* S3、*E. coli* S4。通过全细胞催化实验发现当底物酪醇浓度为 10 mmol/L 时,菌株 *E. coli* S3 红景天苷的产量最高为 1.22 g/L,转化率为 40.63%,因此决定利用 pETDuet-*AtSUS*-UGT33 进行后续的研究(图 6B)。

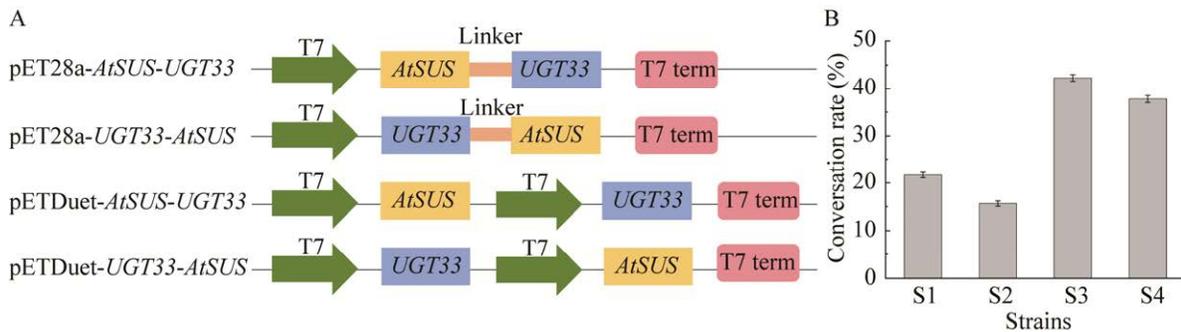


图 6 重组质粒图谱(A)以及不同菌株的转化率(B)

Figure 6 Maps of recombinant plasmids (A) and conversion rate of different strains (B).

由于糖基转移酶 UGT33 可溶性表达量较低,因此需要选用合适的培养基提高目标蛋白的可溶性表达。比较了重组菌株 *E. coli* S3 在 LB 培养基、TB 培养基、ZYM 自诱导培养基的诱导情况,根据 SDS-PAGE 检测结果以及蛋白浓度的测定(图 7),其中 ZYM 自诱导培养基中蛋白未成功表达, LB 培养基中目标蛋白表达量低,而 TB 培养基诱导表达情况良好,更适用于目标蛋白的诱导表达。

2.3 共表达重组大肠杆菌中糖基转移酶与蔗糖合酶拷贝数及其比例的优化

为了提高基因表达水平,在 pETDuet-*AtSUS*-UGT33 中增加糖基转移酶或蔗糖合酶的拷贝数,使糖基转移酶与蔗糖合酶的拷贝数比例分别

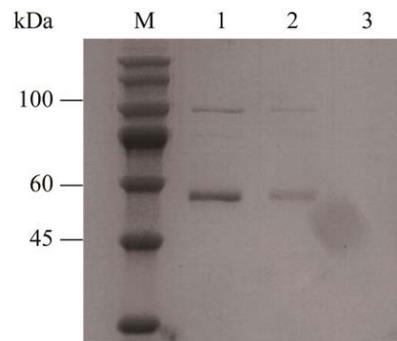


图 7 UGT33 和 *AtSUS* 过表达重组菌株的 SDS-PAGE 分析

Figure 7 SDS-PAGE analysis of UGT33 and *AtSUS* overexpressing recombinant strains. M: Protein marker; 1: Expression of purified enzymes in TB medium; 2: Expression of purified enzymes in LB medium; 3: Expression of purified enzymes in ZYM auto-induced medium.

为 1:2、1:3、1:4、2:1、3:1、4:1，将获得的重组菌株分别命名为 *E. coli* S5、*E. coli* S6、*E. coli* S7、*E. coli* S8、*E. coli* S9、*E. coli* S10。

利用上述构建成功的重组菌株进行全细胞催化，以 *E. coli* S3 作为对照组，底物浓度为酪醇 10 mmol/L、蔗糖 10 mmol/L、UDP 10 mmol/L，反应温度 30 °C，pH 8.0， $OD_{600}=30$ ，结果如图 8 所示，当糖基转移酶与蔗糖合酶的拷贝数比例为 3:1 时，转化效率与拷贝比例为 1:1 时提高了 37.70%，红景天苷的产量由 1.22 g/L 上升至 1.68 g/L。说明糖基转移酶与蔗糖合酶的拷贝数比例为 3:1 时，能有效提升全细胞催化效率，提高红景天苷的产量。

对重组菌株 *E. coli* S3 以及重组菌株 *E. coli* S9 进行诱导表达，并测定两株重组菌株中糖基转移酶与蔗糖合酶粗酶酶活，结果如表 4 所示，菌株 *E. coli* S3 中 UGT33 和 AtSUS 粗酶酶活分别为 0.88 U/mL 和 8.12 U/mL，菌株 *E. coli* S9 中

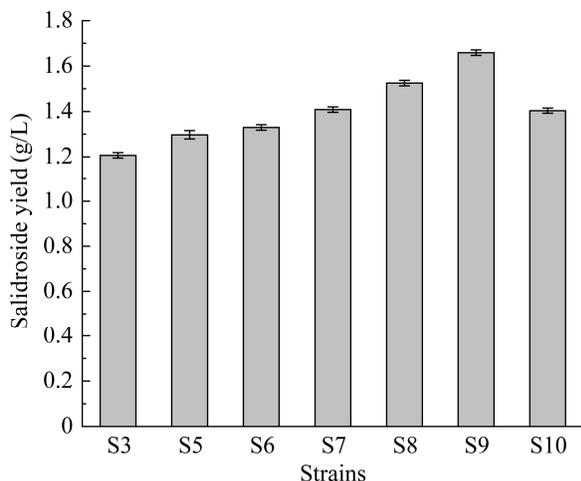


图 8 糖基转移酶与蔗糖合酶基因拷贝数及拷贝数比例的影响

Figure 8 Influence of copy number and copy ratio of glycosyltransferase and sucrose synthase genes.

UGT33 和 AtSUS 粗酶酶活分别为 2.61 U/mL 和 8.26 U/mL，说明拷贝数及其比例优化后有利于提高酪醇糖基化的反应速率。

2.4 全细胞催化合成红景天苷的条件优化

2.4.1 菌体量对全细胞催化合成红景天苷的影响

在实际工业生产中，控制反应过程中的菌体量有助于提高产率并降低成本。底物浓度为酪醇 10 mmol/L、蔗糖 10 mmol/L、UDP 10 mmol/L，反应温度 30 °C，pH 8.0，在 OD_{600} 分别为 10、20、30、40、50 的条件下进行全细胞催化合成红景天苷。结果如图 9A 所示，转化体系中 $OD_{600}=30$ 时，红景天苷的产量最高为 1.29 g/L，转化率为 41.58%。

2.4.2 pH 对全细胞催化合成红景天苷的影响

酪醇糖基化生成红景天苷的过程涉及 2 个酶的反应，并且蔗糖合酶的反应进程与 pH 密切相关，为了使反应能够高效进行，针对反应过程中的 pH 值进行了优化。控制菌体 $OD_{600}=30$ ，底物浓度为酪醇 10 mmol/L、蔗糖 10 mmol/L、UDP 10 mmol/L，反应温度 30 °C，pH 分别控制在 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5，进行全细胞催化。结果如图 9B 所示，当反应体系 pH 为 7.0 时，红景天苷的产量最高为 1.30 g/L，转化率为 43.30%。

表 4 糖基转移酶与蔗糖合酶拷贝数及其比例优化前后的粗酶酶活

Table 4 Specific activity of glycosyltransferase and sucrose synthase before and after optimization of copy number and copy ratio

Enzymes	Specific activity (U/mL)
<i>E. coli</i> S3	
UGT33	0.88±0.02
AtSUS	8.12±0.03
<i>E. coli</i> S9	
UGT33	2.61±0.05
AtSUS	8.26±0.03

2.4.3 温度对全细胞催化合成红景天苷的影响

温度会通过影响菌体状态和酶促反应效率从而影响红景天苷的合成。控制菌体 $OD_{600}=30$, pH 为 7.0, 底物浓度为酪醇 10 mmol/L、蔗糖 10 mmol/L、UDP 10 mmol/L, 反应分别在 20、25、30、35、40、45、50 °C 条件下进行, 结果如图 9C 所示, 当全细胞催化反应温度为 30 °C 时, 红景天苷的产量最高为 1.39 g/L, 转化率为 45.99%。

2.4.4 金属离子对全细胞催化合成红景天苷的影响

金属离子对反应途径中各个酶的活性也有一定的影响。控制菌体 $OD_{600}=30$, pH 为 7.0, 反应温度 30 °C, 底物浓度为酪醇 10 mmol/L、蔗糖 10 mmol/L、UDP 10 mmol/L, 向反应体系中添加不同的金属离子(Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{+} 、 Fe^{3+} 、 Co^{2+} 、 Al^{3+} 、 Na^{+} 、 K^{+} 、 Mg^{2+} 、 Bg^{2+} 、 Zn^{2+}) 至终浓度为 0.5 mmol/L, 以未添加任何金属离子的空白对照组。结果如图 9D 所示, 当体系中包

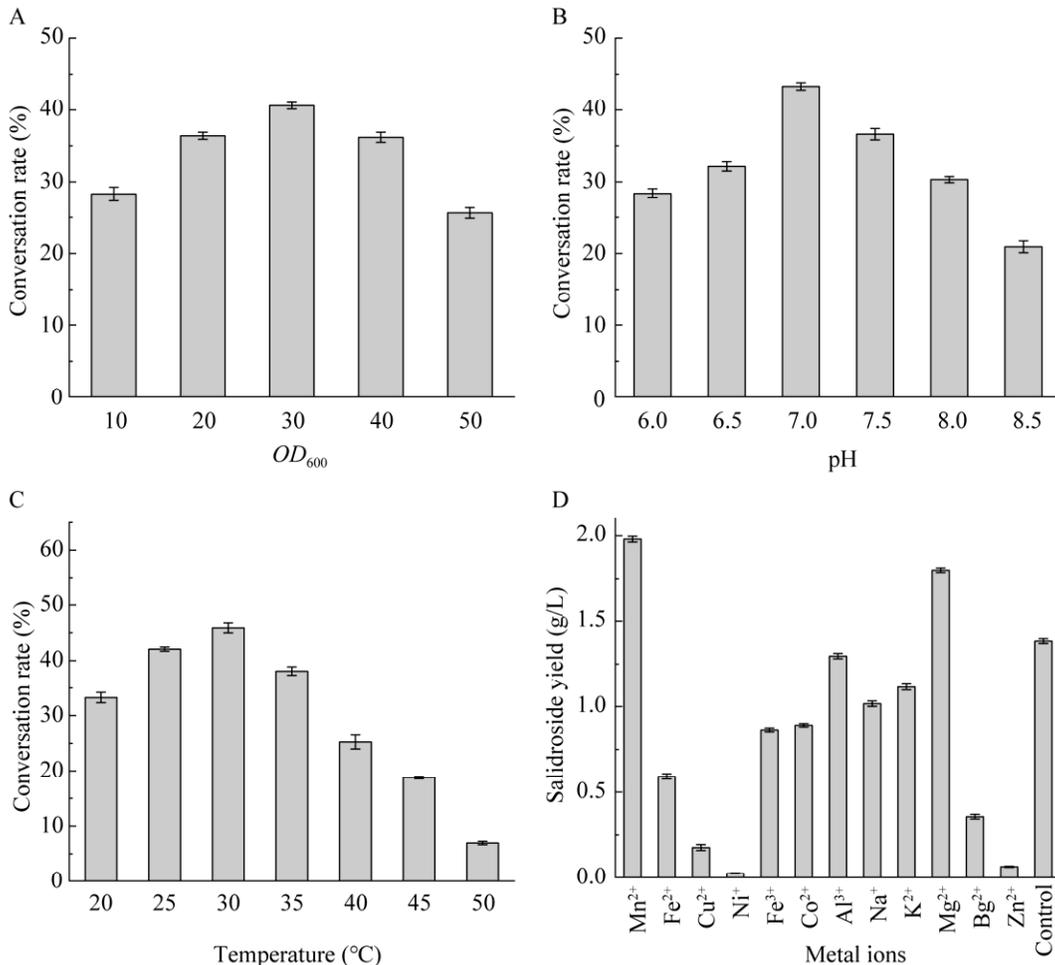


图 9 菌体量(A)、pH (B)、温度(C)及金属离子(D)对重组菌株 *Escherichia coli* S9 全细胞催化合成红景天苷的影响

Figure 9 Influence of biomass (A), pH (B), temperature (C) and metal ion (D) on the transformation of salidroside using whole-cells of recombinant *Escherichia coli* S9.

含 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 时, 红景天苷的产量分别可达到 1.98 g/L 以及 1.79 g/L。

2.4.5 底物浓度对全细胞催化合成红景天苷的影响

由于蔗糖合酶催化的 UDPG 循环再生的过程是一个可逆反应, 且蔗糖合酶的催化速度和反应进程与体系中 UDP/UDPG 浓度相关, 为了提高生产效率, 针对底物酪醇、蔗糖、UDP 的浓

度进行了优化。控制菌体 $OD_{600}=30$, pH 为 7.0, 反应温度 30 °C, 在体系中添加 5 mmol/L Mn^{2+} , 分别改变底物酪醇、蔗糖、UDP 浓度进行全细胞催化, 结果如图 10 所示, 选择单因素优化后的结果, 在底物浓度酪醇 30 mmol/L、蔗糖 35 mmol/L、UDP 8 mmol/L 时, 红景天苷的产量最高为 5.28 g/L, 转化率达到 58.61%。

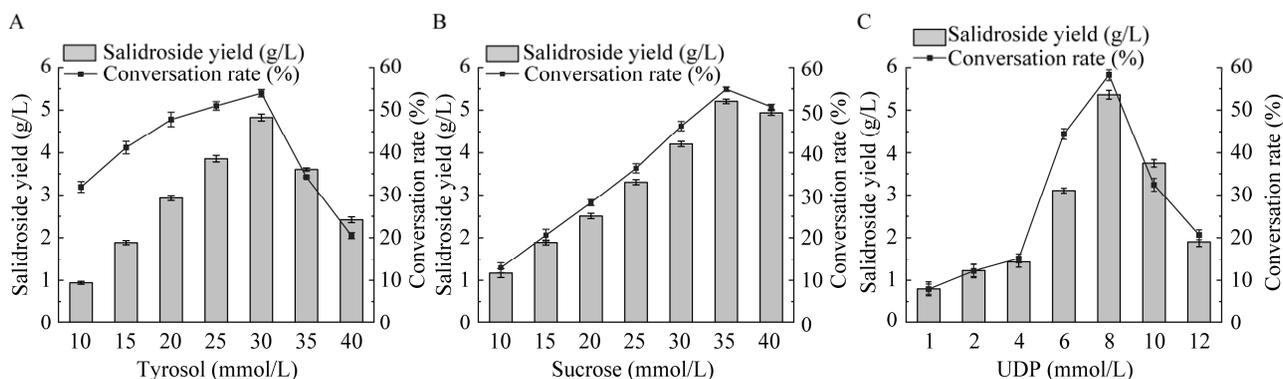


图 10 酪醇浓度(A)、蔗糖浓度(B)、UDP 浓度(C)对重组菌株 *Escherichia coli* S9 全细胞催化合成红景天苷的影响

Figure 10 Effect of tyrosol concentration (A), sucrose concentration (B) and UDP concentration (C) on the transformation of salidroside using whole-cells of recombinant *Escherichia coli* S9.

2.5 5 L 发酵罐水平全细胞催化合成红景天苷

为了验证重组菌 *E. coli* S9 在较大体系中的转化水平, 在 5 L 发酵罐中利用 *E. coli* S9 全细胞催化合成红景天苷。在初始底物浓度酪醇 30 mmol/L、蔗糖 35 mmol/L、UDP 8 mmol/L 条件下反应 12 h 后, 以流加底物的形式补加酪醇 15 mmol/L、蔗糖 17.5 mmol/L、UDP 4 mmol/L, 体系中添加 5 mmol/L Mn^{2+} , 在菌体 $OD_{600}=30$ 、反应温度 30 °C、pH 7.0 的最优条件下于罐上转化, 利用 HPLC 检测转化液中红景天苷的产量。结果如图 11 所示, 在 24 h 时红景天苷达到了最高产量, 产量最高可达到 8.17 g/L, 反应速率为 0.34 g/(L·h)。转化后期由于转化时间较长, 酶活力逐渐丧失, 因此虽然转化后期在继续流加底物, 但转化速率显著下降, 红景天苷产量不再增加。

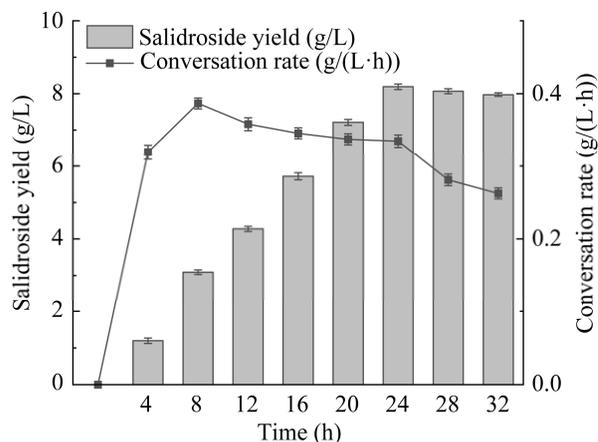


图 11 重组菌株 *Escherichia coli* S9 在 5 L 发酵罐全细胞催化合成红景天苷

Figure 11 Salidroside synthesis using whole-cells of recombinant *Escherichia coli* S9 in a 5 L fermenter.

3 讨论与结论

本研究主要通过双酶共表达的方法实现多酶协调,利用大肠杆菌进行全细胞催化,以酪醇为底物合成红景天苷。首先从关键酶糖基转移酶入手,筛选了4种糖基转移酶 UGT85A1、UGT73C5、UGT73B6、UGT33,通过测定比酶活以及酶学性质的分析,筛选出了具有更好催化潜能的红景天来源的 UGT33。接着为了增强糖基供体 UDPG 的供应并解除 UDP 对于酶的抑制作用,测定5个不同来源的蔗糖合酶 *AtSUS*、*NeSUS*、*AcSUS*、*MbSUS*、*GmSUS* 的比酶活并进行酶学性质分析,确定利用拟南芥来源的 *AtSUS* 构建 UDPG 循环再生系统。

然后从菌体量、pH、温度、金属离子、底物浓度这5个方面优化全细胞催化体系,确定最适条件为反应温度 30 °C, pH 7.0, 菌体量 $OD_{600}=30$, 底物浓度酪醇 30 mmol/L、蔗糖 35 mmol/L、UDP 8 mmol/L。最终发现重组菌株 *E. coli* S9 于最适反应条件下在 5 L 发酵罐中全细胞催化 24 h 最高可生产红景天苷 8.17 g/L。

本研究通过筛选确定了一个高效的糖基转移酶,成功利用蔗糖合酶构建了 UDPG 循环再生系统,并优化了相关的全细胞催化的条件,对提高红景天苷的生产效率有一定的意义,同时也为其他糖苷类产物的糖基化过程提供了参考。目前, Liu 等^[25]通过共培养大肠杆菌苯丙氨酸缺失型菌株 AG 和酪氨酸缺失型菌株 GD,使得红景天苷产量达到 6.03 g/L,该研究成功在大肠杆菌中利用共培养体系实现了红景天苷的从头合成。后续将以目前的研究为基础,在已有的红景天苷合成的基础上加入从酪氨酸出发生产酪醇的过程,以酪氨酸为底物高效生产酪醇以及红景天苷,降低红景天苷的工业生产成本。

REFERENCES

- [1] ZHONG ZF, HAN J, ZHANG JZ, XIAO Q, HU J, CHEN LD. Pharmacological activities, mechanisms of action, and safety of salidroside in the central nervous system[J]. *Drug Design, Development and Therapy*, 2018, 12: 1479-1489.
- [2] 吴秀稳, 彭玉帅, 王如峰. 红景天苷的替代生产方法研究概况[J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(21): 3656-3660. WU XW, PENG YS, WANG RF. Research progress of alternative production approaches of salidroside[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2013, 38(21): 3656-3660 (in Chinese).
- [3] TROSHCHENKO AT, YUODVIRSHIS AM. Synthesis of glycosides of 2-(p-hydroxyphenyl) ethanol (tyrosol)[J]. *Chemistry of Natural Compounds*, 1969, 5(4): 217-220.
- [4] 明海泉, 夏光成, 张瑞钧. 红景天研究进展[J]. *中草药*, 1988, 19(5): 37-42. MING HQ, XIA GC, ZHANG RD. Research progress of *Rhodiola sachalinensis*[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 1988, 19(5): 37-42 (in Chinese).
- [5] ZHANG L, DING RX, CHAI YR, BONFILL M, MOYANO E, OKSMAN-CALDENTY KM, XU TF, PI Y, WANG ZN, ZHANG HM, KAI GY, LIAO ZH, SUN XF, TANG KX. Engineering tropane biosynthetic pathway in *Hyoscyamus niger* hairy root cultures[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(17): 6786-6791.
- [6] TONG AM, LU WY, XU JH, LIN GQ. Use of apple seed meal as a new source of beta-glucosidase for enzymatic glucosylation of 4-substituted benzyl alcohols and tyrosol in monophasic aqueous-dioxane medium[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2004, 14(9): 2095-2097.
- [7] 薛飞燕, 杨明峰, 马兰青. 微生物法合成红景天苷[J]. *生物工程学报*, 2019, 35(7): 1184-1192. XUE FY, YANG MF, MA LQ. Microbial synthesis of salidroside[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2019, 35(7): 1184-1192 (in Chinese).
- [8] LIU XN, DING WT, JIANG HF. Engineering microbial cell factories for the production of plant natural products: from design principles to industrial-scale production[J]. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16(1): 125.
- [9] FAN B, CHEN TY, ZHANG S, WU B, HE BF. Mining of efficient microbial UDP-glycosyltransferases by motif evolution cross plant kingdom for application in

- biosynthesis of salidroside[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 463.
- [10] YU HS, MA LQ, ZHANG JX, SHI GL, HU YH, WANG YN. Characterization of glycosyltransferases responsible for salidroside biosynthesis in *Rhodiola sachalinensis*[J]. *Phytochemistry*, 2011, 72(9): 862-870.
- [11] 马兰青, 柳春梅, 于寒松, 张继星, 高东尧, 李彦舫, 王有年. 红景天甙生物合成途径: 酪醇合成的起始反应及其糖基化[J]. *生物工程学报*, 2012, 28(3): 282-294. MA LQ, LIU CM, YU HS, ZHANG JX, GAO DY, LI YF, WANG YN. Salidroside biosynthesis pathway: the initial reaction and glycosylation of tyrosol[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2012, 28(3): 282-294 (in Chinese).
- [12] TERASAKA K, MIZUTANI Y, NAGATSU A, MIZUKAMI H. *In situ* UDP-glucose regeneration unravels diverse functions of plant secondary product glycosyltransferases[J]. *FEBS Letters*, 2012, 586(24): 4344-4350.
- [13] CHUNG D, KIM SY, AHN JH. Production of three phenylethanoids, tyrosol, hydroxytyrosol, and salidroside, using plant genes expressing in *Escherichia coli*[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 2578.
- [14] POPPENBERGER B, FUJIOKA S, SOENO K, GEORGE GL, VAISTIJ FE, HIRANUMA S, SETO H, TAKATSUTO S, ADAM G, YOSHIDA S, BOWLES D. The UGT73C5 of *Arabidopsis thaliana* glucosylates brassinosteroids[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(42): 15253-15258.
- [15] BAI YF, BI HP, ZHUANG YB. Production of salidroside in metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. *Scientific Reports*, 2014, 4(5): 8.
- [16] LIU HY, TIAN YJ, ZHOU Y, KAN YY, WU TT, XIAO WH, LUO YZ. Multi-modular engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for high-titre production of tyrosol and salidroside[J]. *Microbial Biotechnology*, 2021, 14(6): 2605-2616.
- [17] WU R, ASECION DIEZ MD, FIGUEROA CM. The crystal structure of *Nitrosomonas europaea* sucrose synthase reveals critical conformational changes and insights into sucrose metabolism in prokaryotes[J]. *Journal of Bacteriology*, 2015, 197(17): 2734-2746.
- [18] BUNGARUANG L, GUTMANN A, NIDETZKY B. Leloir glycosyltransferases and natural product glycosylation: biocatalytic synthesis of the c-glucoside nothofagin, a major antioxidant of redbush herbal tea[J]. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2013, 355(14): 2757-2763.
- [19] DELMER DP. The purification and properties of sucrose synthetase from etiolated *Phaseolus aureus* seedlings[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1972, 247(12): 3822-3828.
- [20] BAROJA-FERNÁNDEZ E, MUÑOZ FJ, LI J, BAHAJI A, ALMAGRO G, MONTERO M, ETXEBERRIA E, HIDALGO M, SESMA MT, POZUETA-ROMERO J. Sucrose synthase activity in the *sus1/sus2/sus3/sus4 Arabidopsis* mutant is sufficient to support normal cellulose and starch production[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(1): 321-326.
- [21] DIRICKS M, de BRUYN F, van DAELE P, WALMAGH M, DESMET T. Identification of sucrose synthase in nonphotosynthetic bacteria and characterization of the recombinant enzymes[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(20): 8465-8474.
- [22] BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248-254.
- [23] WAFFENSCHMIDT S, JAENICKE L. Assay of reducing sugars in the nanomole range with 2,2'-biconchinate[J]. *Analytical Biochemistry*, 1987, 165(2): 337-340.
- [24] XIAO F, LIAN JZ, TU S, XIE LL, LI J, ZHANG FM, LINHARDT RJ, HUANG HC, ZHONG WH. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for high-level production of chlorogenic acid from glucose[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2022, 11(2): 800-811.
- [25] LIU X, LI XB, JIANG JL, LIU ZN, QIAO B, LI FF, CHENG JS, SUN XC, YUAN YJ, QIAO JJ, ZHAO GR. Convergent engineering of syntrophic *Escherichia coli* coculture for efficient production of glycosides[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 47: 243-253.

(本文责编 陈宏宇)