

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.10.001

• 基础研究 •

两种耐热磷酸化酶的构建及高效催化合成红景天苷*

何聪芬¹ 黄爱清² 王巧娥¹ 张贵友² 余磊² 王洪钟^{2Δ}

(1 北京工商大学 北京市植物资源研究开发重点实验室 北京 100048; 2 清华大学生命科学学院 北京 100084)

摘要 目的: 使用表达耐热蔗糖磷酸化酶的大肠杆菌重组工程菌 *E. coli* BL21/pET-Spase 和耐热纤维二糖磷酸化酶的大肠杆菌重组工程菌 *E. coli* BL21/pET-Cpase, 发酵培养后粗酶液作为催化剂, 以价格低廉的蔗糖为原料合成红景天苷。**方法:** 分别构建耐热蔗糖磷酸化酶和耐热纤维二糖磷酸化酶大肠杆菌重组菌, 然后将重组菌、蔗糖、酪醇和磷酸混合, 得到反应混合物, 使反应混合物在 45℃ 下转化, 而产生红景天苷。**结果:** 在耐热蔗糖磷酸化酶酶液 1200 U/L、耐热纤维二糖磷酸化酶酶液 500 U/L、蔗糖 110 g/L、酪醇 30 g/L 和磷酸 50 mM 的浓度下, 反应条件为 pH 7.0、温度 45℃、转速 50 转/分、反应时间 32 小时后, 红景天苷浓度达到 23.7 g/L。**结论:** 本研究使用蔗糖磷酸化酶和纤维二糖磷酸化酶联合催化的工艺, 成功地高收率合成了红景天苷。同时, 本研究构建的耐热磷酸化酶酶活高, 处理简单, 为拓展糖苷类似物的合成提供了一种新的方法。

关键词: 耐热蔗糖磷酸化酶; 耐热纤维二糖磷酸化酶; 红景天苷

中图分类号: Q55; Q78; Q814.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2019)10-1801-06

Efficient Synthesis of Salidroside by Two Kinds of
Thermostable Phosphorylases*HE Cong-fen¹, HUANG Ai-qing², WANG Qiao-e¹, ZHANG Gui-you², YU Le², WANG Hong-zhong^{2Δ}

(1 Beijing Key Lab of Plant Resource Research and Development, Beijing Technology and Business University, Beijing, 100048, China;

2 School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing, 100084, China)

ABSTRACT Objective: Thermostable cellobiose phosphorylase and sucrose phosphorylase were produced by recombinant strain *E. coli* BL21/pET-Spase and *E. coli* BL21/pET-Cpase. By combined use of these two phosphorylases, salidroside was efficiently synthesized from inexpensive sucrose. **Methods:** First, thermostable cellobiose phosphorylase and sucrose phosphorylase recombinant strains were constructed. Then two phosphorylases with sucrose, tyrosol and phosphoric acid were combined. Finally, the mixture was reacted and produced salidroside. **Results:** At optimal conditions, 23.7 g/L of salidroside was formed over 32 h from 1200 U/L thermostable sucrose phosphorylase, 500 U/L thermostable cellobiose phosphorylase, 110 g/L sucrose, 30 g/L Tyrosol and 50 mM phosphoric acid at the pH 7.0 and 45℃. **Conclusion:** In this study, thermostable cellobiose phosphorylase and sucrose phosphorylase were employed as the catalyst, and salidroside was successfully synthesized in high yield. And the thermostable phosphorylases constructed in this study had high activity, which offers a new way to expand the ability of phosphorylases in preparation of β-D-glucosides.

Key words: Thermostable cellobiose phosphorylase; Thermostable sucrose phosphorylase; Salidroside

Chinese Library Classification (CLC): Q55; Q78; Q814.9 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)10-1801-06

前言

红景天苷是红景天的主要活性成分。红景天属于珍贵的中药和藏药, 具有抗疲劳、抗缺氧、抗辐射、提高人体机能等多种功效^[1]。目前, 红景天苷可通过下述三种方法得到: 红景天提取、化学合成和生物催化制备。但是, 对于红景天苷提取而言, 原植物资源有限, 且含量低, 仅为约 0.1% 至 1.0%^[2]。其次, 提取工艺复杂, 收率低, 提纯成本高^[3,4]。化学合成法, 需要基团保护, 并且需要高温高压、多种有机溶剂等条件。尤其, 化学合成的产物不

是单一的β- 构型, 需要进一步纯化和精制, 工艺复杂、总收率低, 生产成本低。生物催化法, 其具有反应温和、效率较高以及环境友好等优势, 得到了更多的关注^[5]。

生物催化法主要以葡萄糖和酪醇为底物, 以β- 葡萄糖苷酶, 包括纯化酶、含葡萄糖苷酶的细胞破碎液, 以及菌体细胞, 或者糖基转移酶, 包括纯化酶、含糖基转移酶的细胞破碎液, 以及菌体细胞为生物催化剂, 在一定条件下进行生物催化合成红景天苷^[6-8]。

蔗糖磷酸化酶和纤维二糖磷酸化酶联合催化制备红景天

* 基金项目: 北京工商大学北京市植物资源研究开发重点实验室开放课题基金资助项目; 国家自然科学基金项目(21476124)

作者简介: 何聪芬(1966-), 教授, 研究方向: 应用生物技术, E-mail: hecf@th.btbu.edu.cn

Δ 通讯作者: 王洪钟(1965-), 博士, 副教授, 研究方向: 生物转化及生物催化, 电话: 010-62795632, E-mail: hzwang@tsinghua.edu.cn

(收稿日期: 2018-12-08 接受日期: 2019-01-10)

苷的催化反应如下图 1 所示,其原理是蔗糖磷酸化酶先将蔗糖磷酸化,产生果糖和葡萄糖-1-磷酸。葡萄糖-1-磷酸和酪醇被纤维二糖磷酸化酶催化产生红景天苷和无机磷酸。特别是纤维

二糖磷酸化酶催化产生的磷酸又可以作为反应物用于将蔗糖经蔗糖磷酸化酶催化产生葡萄糖-1-磷酸和果糖,进一步增加了生产效率。

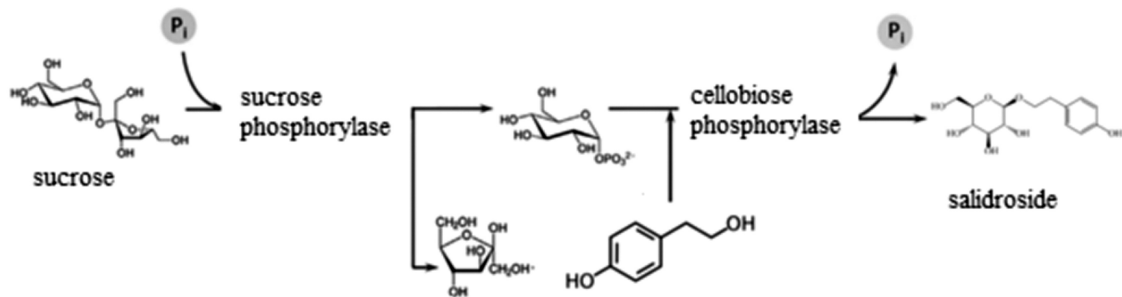


图 1 两种耐热磷酸化酶催化合成红景天苷的反应机制

Fig. 1 Reaction mechanisms catalyzed by two kinds of thermostable phosphorylase

本研究在前期蔗糖磷酸化酶构建、表达和应用研究基础上^[9],提出了以耐热蔗糖磷酸化酶的大肠杆菌重组工程菌 *E. coli* BL21/pET-Spase 和耐热纤维二糖磷酸化酶的大肠杆菌重组工程菌 *E. coli* BL21/pET-Cpase 发酵培养得到的粗酶液为催化剂,两种酶联合生物合成红景天苷的新方法。该方法操作简便,产物红景天苷浓度高,且以廉价的蔗糖为糖基供体,成本较低,比较适合于工业规模化生产。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒 嗜热解糖杆菌 *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*,嗜热纤维梭菌 *Clostridium thermocellum*,大肠杆菌 BL21(DE3),克隆/表达载体 pET-28A 均由本实验室保藏。

1.1.2 培养基 LB 液体培养基:胰蛋白胨 10 g/L,酵母浸粉 5 g/L,氯化钠 5 g/L,pH 值 7.0,121 °C 灭菌 15 min。自诱导培养基:酵母浸粉 30 g/L、蛋白胨 20 g/L、磷酸氢二钾 2 g/L、氯化钠 4.0 g/L、硫酸镁 2.5 g/L、乳糖 4.0 g/L、甘油 5.0 g/L,pH 值为 7.0,121 °C 灭菌 15 min。

1.1.3 主要试剂 TaqDNA 聚合酶、限制性内切酶、T4DNA 连接酶购于 TaKaRa 公司;质粒 DNA 微量提取试剂盒,琼脂糖凝胶 DNA 小量提取试剂盒均购于北京美基美生物科技有限公司;引物合成及测序工作均由北京睿博兴科生物技术有限公司完成;细菌基因组 DNA 提取试剂盒购于天根生化科技有限公司;其他试剂均为市售国产分析纯试剂。

1.1.4 主要仪器 PCR 仪,SDS-PAGE 蛋白电泳系统均购于美国 Bio-rad 公司;蛋白纯化系统 AKTA 购于 GE Healthcare 公司;高效液相色谱仪(HPLC)Waters 600,Waters 966 电光二极管矩阵检测器,Waters 717 plus,自动进样器均购于美国 Waters 公司。

1.2 方法

1.2.1 耐热蔗糖磷酸化酶大肠杆菌重组菌的构建 从嗜热解糖杆菌(*T. thermosaccharolyticum*)提取基因组作为模板,进行 PCR 扩增,得到 PCR 产物。PCR 条件为 94 °C 预变性 2 分钟;94 °C 变性 30 秒,55 °C 退火 30 秒,72 °C 延伸 1.5 分钟,30 个循

环;72 °C 保温 10 分钟。上游引物:CGCGGATCCATGGCTCT-GAAAAATAAAGTGCAACTG,下划线为酶切位点 *Bam*HI。

下游引物:CCGCTCGAGCACCAGGTATTTCACTTCTTCGCCGT,下划线为酶切位点 *Xho*I。

然后将上述 PCR 产物和质粒 pET-28A 使用内切酶 *Bam*HI 和 *Xho*I 进行双酶切并使用 DNA 纯化试剂盒纯化,再用 T4 连接酶将 PCR 产物和质粒 pET-28A 连接,得到连接产物。将连接产物转入到大肠杆菌感受态细胞 BL21(DE3)中,得到重组菌 *E. coli* BL21/pET-Spase。

1.2.2 耐热纤维二糖磷酸化酶大肠杆菌重组菌的构建 从嗜热纤维梭菌(*C. thermocellum*)提取基因组作为模板,进行 PCR 扩增,得到 PCR 产物。PCR 条件为 94 °C 预变性 2 分钟;94 °C 变性 30 秒,60 °C 退火 30 秒,72 °C 延伸 2.5 分钟,30 个循环;72 °C 保温 10 分钟。

上游引物:CGCGGATCCATGAAGTTCGGTTTTTTTGATGATGC,下划线为酶切位点 *Bam*HI。

下游引物:CCGCTCGAGTCCCATAATTACTTCAACTTTGTGAG,下划线为酶切位点 *Xho*I。

然后将上述 PCR 产物和质粒 pET-28A 使用内切酶 *Bam*HI 和 *Xho*I 进行双酶切并使用 DNA 纯化试剂盒纯化,再用 T4 连接酶将 PCR 产物和质粒 pET-28A 连接,得到连接产物。将连接产物转入到大肠杆菌感受态细胞 BL21(DE3)中,得到重组菌 *E. coli* BL21/pET-Cpase。

1.2.3 两种重组菌诱导表达 将蔗糖磷酸化酶的重组菌 *E. coli* BL21/pET-Spase、纤维二糖磷酸化酶大肠杆菌重组菌 Spase、*E. coli* BL21/pET-Cpase 接种于含 5 mg/L 卡那霉素的 LB 培养基中,在 37 °C,转速 200 转/分钟的条件下,培养 8 小时。然后,以 2%的接种量接种到自诱导培养基中。在 32 °C,转速为 200 转/分钟的条件下,培养 24 小时,进行诱导表达,得到各自的培养物。将含重组耐热蔗糖磷酸化酶的菌体培养物在转速为 4000 转/分下,离心 5 分钟,获取菌体,用去离子水洗涤再离心,重复三次。离心所获得菌体,再用 50 mM 柠檬酸缓冲液(pH 7.0)将菌体重新悬浮成菌悬液,然后经细胞超声破碎仪处理 5 分钟,再经 6000 转/分离心 5 分钟,弃除下层离心菌体碎片固形物,收集离心上清液。所得离心上清液即含有重组耐热

蔗糖磷酸化酶和纤维二糖磷酸化酶的酶液。

1.2.4 红景天苷的合成 按蔗糖 110 g/L、酪醇 30 g/L 和磷酸 50 mM 的浓度,将 1.10 g 蔗糖、0.30 g 酪醇和 57 μ L 磷酸(浓度 85%)依次加入到含有 6 mL 柠檬酸缓冲液(50 mmol/L, pH 值 7.0)的反应瓶(体积规格 25 mL)中,搅拌使反应原料溶解,然后按 250 U/L 的浓度,加入 0.5 mL 重组耐热蔗糖磷酸酶酶液,再按 1200 U/L 的浓度,加入 1 mL 重组耐热纤维二糖磷酸酶酶液,最后将反应液体积用同一柠檬酸缓冲液定容至 10 mL,并将反应液 pH 调至 7.0。然后置于恒温振荡器中进行生物反应制备红景天苷。反应完毕后,采用 HPLC 法测得反应液中红景天苷的浓度。

1.2.5 HPLC 检测条件 色谱柱:Diamondsil C18 柱,5 μ m (ϕ 250 $\times$ 4.6 mm);流动相:甲醇:水=35:65;柱温:30 $^{\circ}$ C;流速:0.6 mL/min;检测波长:280 nm;进样量:10 μ L。

1.3 统计学分析

用 SPSS10.0 进行统计分析,每个实验重复三次,使用 t 检验分析数据的统计学差异,*表示 $P<0.05$,即有显著差异。

2 结果

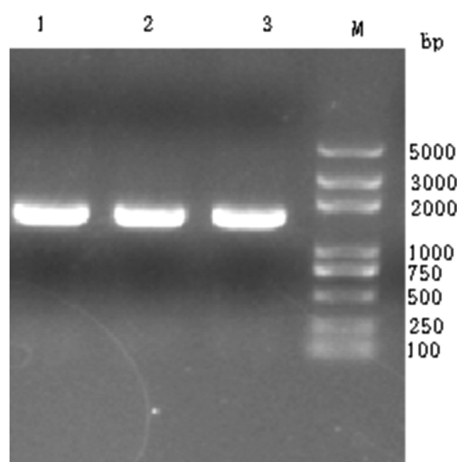


图2 蔗糖磷酸化酶目的基因 PCR 产物的电泳图

Fig. 2 Electrophotogram of PCR product of targeting genes of sucrose phosphorylase

注:1-3: 分别是目的片段在 60 $^{\circ}$ C、65 $^{\circ}$ C、70 $^{\circ}$ C 退火温度下的 PCR 产物;
M: trans2K plus DNA marker。

Note: 1-3: PCR product at the annealing temperature of 60 $^{\circ}$ C, 65 $^{\circ}$ C, 70 $^{\circ}$ C;
M: trans2K plus DNA marker.

在液体培养基中接种重组菌及对照菌,当 OD600 nm 达到 0.6 时,加入 IPTG 诱导表达 18 h 后收集菌体,破碎细胞后利用 12%的 SDS-PAGE 对诱导后菌液进行分析,电泳结果证明两种蛋白在重组大肠杆菌中皆能够成功表达。

2.2 双酶催化合成红景天苷的活性检测

图 4a 为双酶(SPase 和 CPase)反应液的 HPLC 谱图,底物酪醇的保留时间为 7.965 min,转化产物的保留时间为 6.132 min,与图 4b 中红景天苷对照品的保留时间(6.182 min)基本一致,说明双酶催化反应能够合成红景天苷。

2.3 双酶催化合成红景天苷催化条件的优化

2.1 两种基因表达载体的构建及重组菌蛋白的诱导表达

以提取的嗜热解糖杆菌(*T. thermosaccharolyticum*)基因组 DNA 为模板,扩增出目的基因,PCR 结果如图 2 所示,目的片段出现在 1500 bp 左右,与 Genebank 中查询到已报道的蔗糖磷酸化酶基因序列(CP002171.1)相似,相似比例为 92.3%。

将上述 PCR 产物以及 pET-28A 分别用 *Bam*HI 和 *Xho*I 进行双酶切、连接,转化入大肠杆菌 BL21(DE3)中,筛选阳性克隆并用菌液 PCR 法进行鉴定,对鉴定结果阳性的转化子送公司测序证明与 Genebank 中的序列(CP002171.1)相似,成功构建出重组菌 BL21-pET22b--Spase。

同理,以提取的嗜热纤维梭菌(*C. thermocellum*)基因组 DNA 为模板,扩增出目的基因,PCR 结果如图 3 所示,目的片段出现在 2400 bp 左右,与 Genebank 中查询到已报道的纤维二糖磷酸化酶基因序列(NC_009012.1)相似,相似比例为 91.2%。

将上述 PCR 产物以及 pET-28A 分别用 *Bam*HI 和 *Xho*I 进行双酶切、连接,转化入大肠杆菌 BL21(DE3)中,筛选阳性克隆并用菌液 PCR 法进行鉴定,对鉴定结果阳性的转化子送公司测序证明与 Genebank 中的序列(NC_009012.1)相似,成功构建出重组菌 *E.coli* BL21/pET-Cpase。

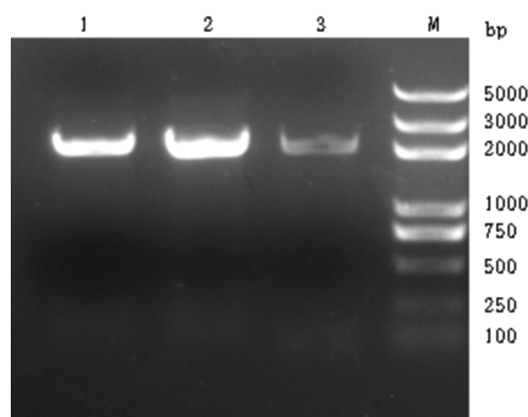


图3 纤维二糖磷酸化酶目的基因 PCR 产物的电泳图

Fig. 3 Electrophotogram of PCR product targeting genes of cellobiose phosphorylase

注:1-3:分别是目的片段在 50 $^{\circ}$ C、55 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C 退火温度下的 PCR 产物;
M: trans2K plus DNA marker。

Note: 1-3: PCR product at the annealing temperature of 50 $^{\circ}$ C, 55 $^{\circ}$ C, 60 $^{\circ}$ C;
M: trans2K plus DNA marker.

在耐热蔗糖磷酸化酶酶液 0.5 mL、耐热纤维二糖磷酸化酶酶液 1.0 mL、蔗糖 110 g/L、酪醇 30 g/L 的浓度下,研究了缓冲液 pH 值、反应温度和反应时间对产率的影响。

2.3.1 缓冲液 pH 对产物浓度的影响 在不同酸碱度的缓冲液中反应 24 h 后的结果如图 5 所示,结果表明构建得到的酶在弱酸性条件下的催化活性较高,即 pH 值为 7.0 的条件下能够获得较高的产物转化率。

2.3.2 反应温度对产物浓度的影响 试验测定了不同反应温度对催化合成红景天苷的影响,反应 24 h 后的结果如图 6 所示。此结果表明在 45 $^{\circ}$ C 反应条件下,产物转化率较高且产物量

相对比较稳定。

响如图 7 所示,结果表明反应 35 h 后红景天苷浓度达到 23.7 g/L。

2.3.3 反应时间对产物浓度的影响 测定不同反应时间的影

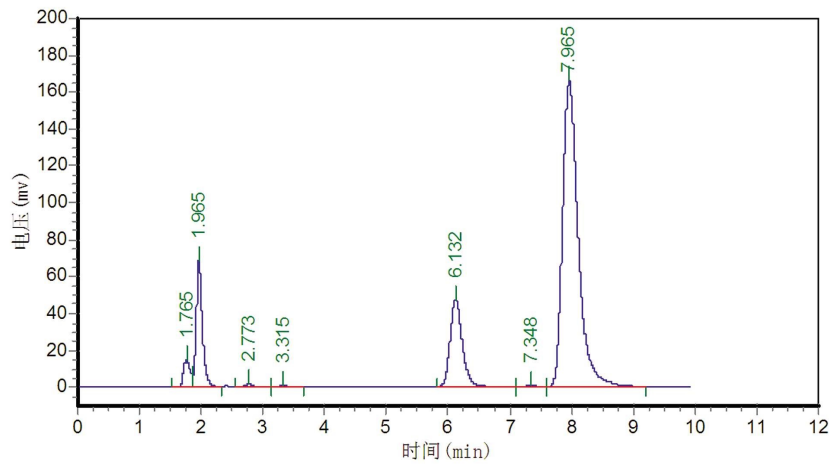


图 4a 双酶(SPase 和 CPase)反应液的 HPLC 谱图

Fig. 4a HPLC profile of the reaction product of two enzyme(SPase and CPase)

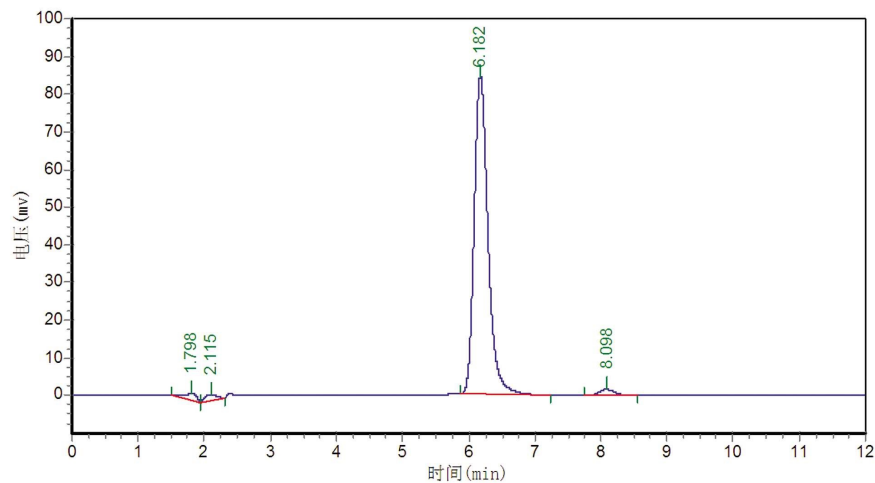


图 4b 红景天苷对照品 HPLC 谱图

Fig. 4b HPLC profile of the Salidroside standard

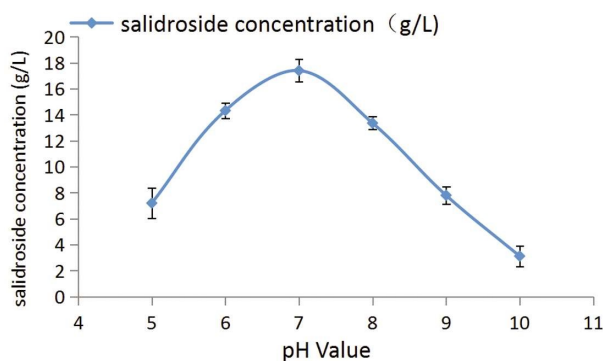


图 5 不同缓冲液 pH 值对红景天苷产率的影响

Fig.5 Effect of pH value of buffer solution on production of salidroside

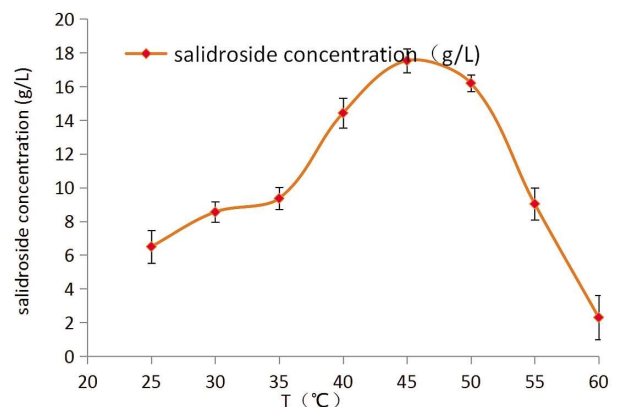


图 6 不同反应温度对红景天苷产率的影响

Fig. 6 Effect of reaction temperature on production of salidroside

3 讨论

红景天生长环境非常恶劣,一般在海拔 1500 米到 3500 米,在西藏一般都在海拔 3500 米以上的地方,且在阴阳坡以及人际罕至的悬崖峭壁附近,所以在我国的野生产量相当的低。

我国应用红景天很早,在《四部医典》和《本草纲目》均有记载,研究证明红景天有抗疲劳、抗衰老、免疫调节、清除自由基等多种药理作用^[10,11]。近代药理研究表明红景天能够迅速促进血红蛋白与氧的结合能力,带走机体部分数量的氧进入血液,降低

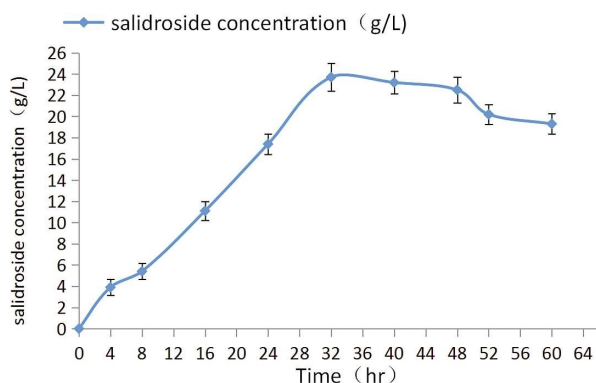


图7 反应时间对红景天苷产率的影响

Fig.7 Effect of reaction time on production of salidroside

耗氧量,显著提高超氧化物歧化酶的活性^[12]。

红景天苷是红景天的主要活性成分,被广泛应用于化妆品、保健食品和药物中。野生红景天植物中红景天苷含量低,由于红景天苷天然来源(植物资源日趋枯竭)稀缺且作用明显,市场需求量连年上升,因此人们不断探索能高效合成红景天苷的新途径。红景天苷的生产目前主要有化学合成法,但是红景天苷立体结构复杂,化学合成法在工艺上却受了生产步骤繁多、合成困难、生产收率低、污染严重和成本过高等问题的限制,特别是反应产生 α 和 β 混合物,后期纯化也较复杂,产物收率低,纯度低。和具有上述各种问题的化学合成法相比,酶法具有反应条件温和,较少反应步骤,高立体选择性和高区域选择性等优势。因此近年来,糖苷酶逐渐成为一大系列天然和天然糖苷合成的首选催化剂。

如前所述,目前生物催化法大多使用的是 β -葡萄糖苷酶,它是一种水解酶,它们的水解作用往往大于合成作用,因此转化率不高,产量较低。例如,魏胜华等报道了“ β -葡萄糖苷酶纳米凝胶非水相合成红景天苷”^[13],采用水相原位聚合的方法制备了杏仁 β -葡萄糖苷酶纳米凝胶,并以其作为催化剂,以水-有机溶剂体系为反应介质,催化葡萄糖和酪醇合成红景天苷。YU等利用苹果籽粉作为生物催化剂合成红景天苷,在水-叔丁醇体积比为1:9的体系中反应120小时的收率可达到20.7%^[14]。Hiroyuki Akita等利用从杏仁中提取的 β -葡萄糖苷酶催化合成红景天苷,收率为11%。Tong等利用从苹果种子中提取的 β -葡萄糖苷酶在二氧六环和水混合体系中催化合成红景天苷,收率为15.8%^[15]。Zhang等利用从黑曲霉中提取的 β -葡萄糖苷酶催化合成红景天苷,其产率大约为10%^[16]。

纤维二糖磷酸化酶也可以以纤维二糖或葡萄糖-1-磷酸为糖基供体,以其他一些化合物为糖基受体来合成相应的 β 型-葡萄糖苷化合物^[17],但纤维二糖或葡萄糖-1-磷酸原料稀缺,价格昂贵且不易获得,不适用工业化生产应用。蔗糖磷酸化酶能以蔗糖为糖基供体,以磷酸、维生素C或酚类化合物为糖基受体来合成相应的 α 型-葡萄糖苷化合物,如葡萄糖-1-磷酸^[18,19]、维生素C葡萄糖苷^[9,20,21]、 α -熊果苷^[22]等。但天然红景天苷是 β -构型,仅蔗糖磷酸化酶不能制备红景天苷。本研究利用蔗糖磷酸化酶先将蔗糖转化成葡萄糖-1-磷酸,再和酪醇反应得到红景天苷,是一种适合于工业化生产红景天苷的新方法。

在双酶催化合成红景天苷试验中,pH值是一个重要的反

应参数。不管蔗糖磷酸化酶或纤维二糖磷酸化酶,对于不同的转化底物,其反应的最佳pH值也会有所差异。例如,采用蔗糖磷酸化酶制备 α -熊果苷^[22,23]或者甘油- α -葡萄糖苷^[24]时,反应最佳pH值一般为6.5~6.8;而制备维生素C葡萄糖苷^[9,21],反应最佳pH值一般为4.5~5.0。日本学者Hiroyuki.N^[25]报道了利用纤维二糖磷酸化酶来制备寡糖时,反应最佳pH值为3.9;而Karel D.W.^[17]报道采用纤维二糖磷酸化酶来制备一些烷基糖苷和苯基糖苷时,反应最佳pH值为6.5。本文所采用的反应最佳pH值为7.0,其原因可能在该pH值下,同时兼顾了耐热蔗糖磷酸化酶和纤维二糖磷酸化酶两者的反应特点,从而发挥两者的最佳组合活性。

温度同样是重要催化反应重点考察的因素之一,最佳反应温度需同时考虑到酶的耐热稳定性以及反应底物、产物的稳定性等多方面的因素。Tom V.^[6]报道了来源于*T.thermosaccharolyticum*的蔗糖磷酸化酶在60℃时,半衰期为60小时,而反应最佳温度为55℃。Hiroyuki N.^[25]报道了来源于*C.thermocellum*的纤维二糖磷酸化酶的反应最佳温度高达60℃。本文中的反应最佳温度为45℃,与上述做报道的反应最佳温度有所不同,可能是由于采用双酶反应体系,使反应最佳温度有所改变。

本研究采用耐热的蔗糖磷酸化酶和蔗糖磷酸化酶的粗酶液作为联合生物催化剂,利用蔗糖和酪醇为底物,在45℃的条件下反应制备红景天苷,在该温度条件下,除了增加底物溶解性外,细胞内其他具有水解副反应、歧化反应的杂蛋白均已失活,还可以达到反应产物单一,产品纯度高的目的。且省去酶纯化等步骤。同时,在温度较高的条件下,反应向正向移动,转化率和产量较高,且利用蔗糖为糖基供体,价廉易得,总生产成本较低。

生物催化反应过程中底物浓度与转化率往往是一对矛盾。一般而言,底物浓度低,同样条件下转化率较高。底物浓度增加到一定程度,转化率大幅下降。在今后的工作中,我们将研究如何进一步实现同时提高产物浓度与转化率的双重目的。我们首先拟在反应体系中加入甲醇、乙醇等有机溶剂,进一步提高产物浓度。其次,采用微通道反应技术。微流控技术是近十年来迅速崛起的新交叉技术,它具有传质速度快(底物之间扩散距离缩短)、底物浓度、反应温度和流速易控制、易在线分析等特点,一般反应可在几分钟之内完成,很适宜有机溶剂存在下的生物催化反应(减少酶的失活),达到进一步提高反应转化率的目的。

4 结论

本研究利用基因克隆的手段构建了耐热蔗糖磷酸化酶的大肠杆菌重组工程菌*E.coli* BL21/pET-Spase和耐热纤维二糖磷酸化酶的大肠杆菌重组工程菌*E.coli* BL21/pET-Cpase, SDS-PAGE结果显示蛋白大小与预期相符。以重组表达菌株粗酶液为催化剂,以价格低廉的蔗糖为底物,催化红景天苷的合成。通过对反应温度、pH和反应时间的探索,优化了双酶反应的条件为:最适反应温度45℃,最适反应pH值7.0,最适反应时间35h,红景天苷浓度可达到23.7 g/L。

参考文献(References)

- [1] 王晓晨,魏清筠,李文赞,等.化学全合成红景天苷的研究进展[J].中国抗生素杂志,2018,43(7): 786-793
- [2] Linh P T, Kim Y H, Hong S P, et al. Quantitative determination of

- and tyrosol from the underground part of rhodiolarosea by high performance liquid chromatography[J]. Arch. Pharm. Res., 2000, 23(4): 349-352
- [3] 蒲忠慧, 陈希文, 王雄清, 等. 均匀设计法优选红景天苷提取工艺的研究[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(14): 51-54
- [4] 纪明江, 李玉峰, 杨文韬, 等. 红景天苷提取工艺的研究 [J]. 药物生物技术, 2014, 21(6): 554-557
- [5] Zhang H, Pereira B, Li Z, et al. Engineering Escherichia coli coculture systems for the production of biochemical products [J]. PNAS, USA, 2015, 112(27): 8266-8271
- [6] 王梦亮, 姜麒麟, 崔晋龙, 等. 表面活性剂在水-有机两相体系中对 β -葡萄糖苷酶催化合成红景天苷的影响 [J]. 分子催化, 2013, 27(1): 83-88
- [7] 何丽妃, 薛原楷, 石贤爱, 等. 特殊反应体系中交联 β -葡萄糖苷酶聚集体催化合成红景天苷[J]. 过程工程学报, 2015, 15(2): 313-317
- [8] Shi L, Wang C, Zhou X, et al. Production of salidroside and tyrosol in cell suspension cultures of *Rhodiola crenulata*[J]. Plant Cell, Tiss.Org. (PCTOC), 2013, 114(3): 295-303
- [9] 余磊, 李骥璇, 王忆茗, 等. 蔗糖磷酸化酶全细胞催化 AA-2G 的条件优化[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(14): 2601-2605
- [10] 韩雪娇, 郭娜, 朱美宣, 等. 红景天苷药理作用及其作用机理研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2015, 35(1): 171-176
- [11] 张明发, 沈雅琴. 红景天苷的神经保护作用及作用机制研究进展[J]. 药物评价研究, 2017, 40(7): 1019-1028
- [12] 张伟, 赵俊杰, 李涛, 等. 红景天苷对神经退行性疾病作用的研究进展[J]. 湖南中医药大学学报, 2016, 36(7): 86-89
- [13] 魏胜华, 钱伟, 周清华, 等. β -葡萄糖苷酶纳米凝胶非水相合成红景天苷[J]. 化工进展, 2018, 37(2): 694-701
- [14] Yu H L, Xu J H, Lu W Y, et al. Environmentally benign synthesis of natural glycosides using apple seed meal as green and robust biocatalyst[J]. J. Biotechnol., 2008, 133(4): 469-477
- [15] Hiroyuki A E, Kawahara M K, et al. Synthesis of naturally occurring β -D -glucopyranoside based on enzymatic β glycosidation [J]. J. Mol. Catal. B: Enzym. , 2006, 40(1-2): 8 -15
- [16] Zhang C, Yu H, Lu M, et al. Enzymic synthesis of salidroside: purification and characterization of salidosidase from *Aspergillus niger*[J]. Process Biochem., 2005, 40(9): 3143-3147
- [17] Winter K.D, Renterghem L V, Wuyts K, et al. Chemoenzymatic Synthesis of β -d- Glucosides using Cellobiose Phosphorylase from *Clostridium thermocellum*[J]. Adv. Synth. Catal., 2015, 357: 1961-1969
- [18] Wildberger P, Aish G A, Jakeman D L, et al. Interplay of catalytic subsite residues in the positioning of α -d-glucose 1-phosphate in sucrose phosphorylase[J]. Biochem and Biophys Rep., 2015, 2: 36-44
- [19] Valikhani D, Bolivar J M, Pfeiffer M, et al. Multivalency Effects on the Immobilization of Sucrose Phosphorylase in Flow Microchannels and Their Use in the Development of a High-Performance Biocatalytic Microreactor[J]. ChemCatChem, 2016, 9(1): 161-166
- [20] Kwon T, Kim C T, Lee J H. Transglucosylation of ascorbic acid to ascorbic acid 2-glucoside by a recombinant sucrose phosphorylase[J]. Biotechnol. Lett., 2007, 29: 611-615
- [21] Gudimich R K, Nidetzky B. Walking a Fine Line with Sucrose Phosphorylase: Efficient Single-Step Biocatalytic Production of L-Ascorbic Acid 2-Glucoside from Sucrose[J]. Chem Bio Chem, 2017, 18 (14): 1387-1390
- [22] Kitao S, Sekine H. α -D-Glucosyl Transfer to Phenolic Compounds by Sucrose Phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides* and Production of α -Arbutin[J]. Biosci. Biotechnol. Biochem., 1994, 58(1): 38-42
- [23] 李群良, 张欣英, 杨克迪, 等. 巨大芽孢杆菌 *Bacillus megaterium* NCIB8508 蔗糖磷酸化酶生物催化合成 α -熊果苷的研究[J]. 化学与生物工程, 2011, 28(4): 46-51
- [24] Bolivar J M, Luley-Goedl C, Leitner E, et al. Production of glucosyl glycerol by immobilized sucrose phosphorylase: Options for enzyme fixation on a solid support and application in microscale flow format [J]. J. Biotechnol , 2017, 257(9): 131-138
- [25] Hiroyuki N, Maher A H, Bent O P, et al. Efficient chemoenzymatic oligosaccharide synthesis by reverse phosphorolysis using cellobiose phosphorylase and cellodextrin phosphorylase from *Clostridium thermocellum*[J]. Biochimie, 2010, 92: 1818-1826
- [26] Tom V, Dirk A, Margo D, et al. The quest for a thermostable sucrose phosphorylase reveals sucrose 6'-phosphate phosphorylase as a novel specificity[J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2014, 98(16): 7027-7037