

罗汉果苷 III E 的酶法定点糖基化修饰

李程飞, 陈玲, 吴旭日*

(中国药科大学生命科学与技术学院化学生物学研究室, 南京 210009)

摘要 罗汉果苷是由罗汉果 *Siraitia grosvenorii* 生物合成的四环三萜类皂苷。基于甜度高、热量低和口感好等优点, 罗汉果苷已成为开发全新非营养型天然甜味剂的重要来源。本研究以甜度为蔗糖 300 倍且口味较好的罗汉果苷 III E 为模型化合物, 利用糖基转移酶对 11 位羟基进行糖基化修饰, 研究其与罗汉果苷类化合物甜度和口味的构效关系。通过糖基转移酶库的筛选, 获得了能够区域选择性糖基化罗汉果苷 III E 11 位羟基的糖基转移酶 HXSW-GT-2, 然后经诱导表达条件优化实现了该酶在大肠埃希菌中的高效可溶性表达。在此基础上, 通过对 HXSW-GT-2 反应条件如反应 pH、温度、二磷酸尿苷葡萄糖二钠盐用量、反应时间等系统优化, 罗汉果苷 III E 糖基化的转化率被提高至 85% 以上, 扩大反应体系后纯化得纯度大于 95% 的糖基化产物 MG-III E-Glu。口感测试结果表明, 与罗汉果苷 III E 和 5% 蔗糖溶液相比, MG-III E-Glu 的甜度基本消失, 苦涩味明显。本研究初步阐释了 11 位羟基与罗汉果苷甜度和口味的构效关系, 为该类天然甜味剂的构效改造和开发提供理论指导。

关键词 罗汉果苷; 非营养型天然甜味剂; 构效关系; 糖基转移酶; 生物合成

中图分类号 S567 **文献标志码** A **文章编号** 1000–5048(2019)02–0222–08

doi:10.11665/j.issn.1000–5048.20190214

引用本文 李程飞, 陈玲, 吴旭日. 罗汉果苷 III E 的酶法定点糖基化修饰[J]. 中国药科大学学报, 2019, 50(2): 222–229.

Cite this article as: LI Chengfei, CHEN Ling, WU Xuri. Regio-selective glycosylation of mogroside III E by glycosyltransferase [J]. *J China Pharm Univ*, 2019, 50(2): 222–229.

Regio-selective glycosylation of mogroside III E by glycosyltransferase

LI Chengfei, CHEN Ling, WU Xuri*

Laboratory of Chemical Biology, School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract Mogrosides, the main sweet components isolated from *Siraitia grosvenorii*, are a family of cucurbitane-type tetracyclic triterpenoid saponins. Given that the high sweetness, low calorie and excellent taste, mogrosides have become the important resource for the development of natural non-nutritive sweeteners. As reported, 11 α -hydroxyl group in the structural skeleton of mogrosides was closely related to sweetness and taste, but it had not been confirmed experimentally. In this work, we used mogroside III E as a model compound, which was 300 times sweeter than 5% sucrose and tasted better, and modified its 11 α -hydroxyl group through glycosyltransferase to elucidate the relations between structure and sweetness of mogroside compounds. The glycosyltransferase HXSW-GT-2 was obtained to regio-selectively glycosylate the 11 α -hydroxyl group of mogroside III E through the screening of glycosyltransferase library. And then, the soluble expression of HXSW-GT-02 in *Escherichia coli* was efficiently achieved by optimizing the induction conditions. Subsequently, the yield of glycosylated mogroside III E (MG-III E-Glu) was increased to > 85% through optimizing reaction pH, temperature, UDP-G dosage and biocatalyst loading. The product MG-III E-Glu was bio-prepared at a 0.5 L scale and the final purity was 97.8%. A “mouth feel” test showed that MG-III E-Glu had no sweetness and displayed obvious bitterness through the comparison with mogroside III E and 5% sucrose. In conclusion, the function of the 11 α -hydroxyl group of mogrosides in sweetness

收稿日期 2019-01-08 * **通信作者** Tel: 025–83271031 E-mail: xuriwu@cpu.edu.cn

基金项目 江苏省自然科学基金资助项目 (No. BK20181334); 江苏高校“青蓝工程”资助项目; 江苏省“六大人才高峰”项目 (No. SWYY-097)

and taste was preliminarily elucidated which would be beneficial for the structural modification and development of mogroside sweeteners.

Key words mogroside; non-nutritive natural sweetener; structure-function analysis; glycosyltransferase; biosynthesis

This study is supported by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20181334), “Qing-Lan” Project and the Six Talent Peaks Project in Jiangsu Province(No. SWYY-097)

罗汉果 (*Siraitia grosvenorii*) 学名光果木鳖, 为葫芦科罗汉果属草本植物, 主要分布在我国广西、湖南、贵州等地区, 药食两用。罗汉果果实中的主要活性成分为葫芦烷型四环三萜类皂苷^[1-2], 即罗汉果苷元 (10α -cucurbit-5-ene- 3β , 11α , $24(R)$, 25-tetraol), 罗汉果苷元属于连接 2~6 个葡萄糖单元所形成的系列化合物^[3]。近些年的研究发现, 罗汉果苷类化合物不仅具有抗炎^[4]、抗氧化^[5]、降血糖^[6]、降血脂^[7]等多种生物活性, 而且还展现出一定的抗肿瘤活性^[8], 已成为新药研发的重要先导化合物来源之一。与此同时, 甜度高、热量低、口味更加纯正和安全性好的罗汉果甜苷类化合物就成为非营养型天然甜味剂开发的热点, 有望被开发成新一代优良商业用糖^[9]。

目前, 从罗汉果中提取、分离得到的罗汉果苷已超过 30 种, 它们的苷元骨架基本相同, 主要区别点在于糖基数目、糖苷键类型和立体构型以及甜度和口感^[1]。甜味构效关系研究发现, 罗汉果苷元的 3 位和 24 位羟基连接的葡萄糖单元总数超 3 个是罗汉果苷具有较高甜味和较好口感的结构基础,

例如罗汉果苷 III E、IV、V 和赛门苷 I (siamenoside I) 等^[1,10]。此外, 研究人员推测罗汉果苷元的 11 位羟基与甜度及口感关系密切, 但由于罗汉果苷糖基上的活泼羟基较多, 所以一直难以采用化学方法定点修饰苷元的 11 位羟基以阐释该构效推测^[1,3,10], 在一定程度上阻碍了罗汉果苷的构效改造和深度开发利用。

鉴于糖基转移酶的高效区域选择性特征, 本研究以口感较好、甜度为 5% 蔗糖 300 倍的罗汉果苷 III E 为模型底物^[1], 筛选糖基转移酶库后获得能特异性葡萄糖基化修饰模型化合物 11 位羟基的糖基转移酶 HXSW-GT-2 (图 1)。在此基础上, 通过酶诱导表达条件和生物催化条件的系统考察, 将罗汉果苷 III E 11 位羟基定点糖基化修饰的效率提高至 85% 以上, 并扩大反应后纯化制备纯度大于 95% 的产物 MG-III E-Glu。口感测试结果显示, MG-III E-Glu 基本无甜味, 且呈现出明显的苦涩感, 本研究初步阐释了 11 羟基对罗汉果苷甜度和口感的重要性, 为该类天然甜味剂的改造和深度开发提供构效依据。

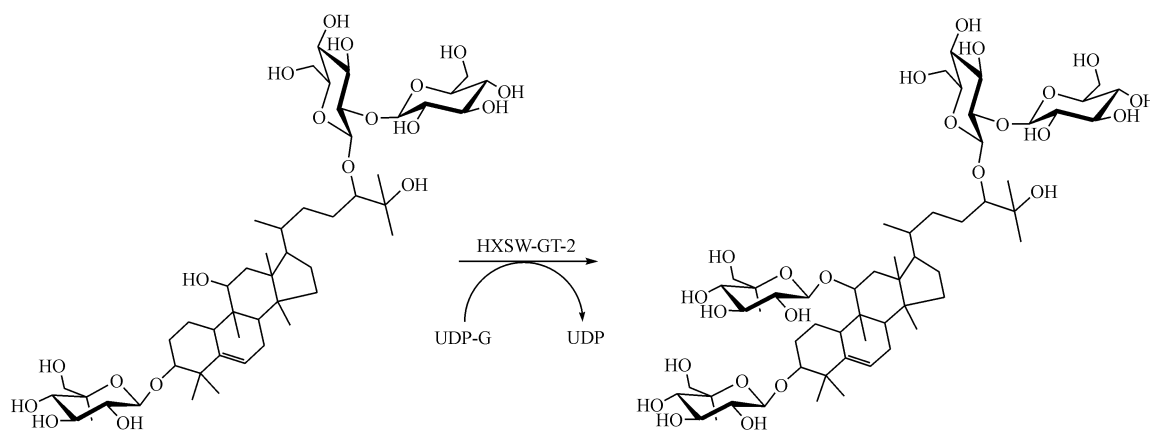


Figure 1 Enzymatic synthesis of MG-III E-Glu from mogroside III E

1 材料

1.1 主要试剂和材料

罗汉果苷 III E (成都德思特生物技术有限公司); 氨苄青霉素、异丙基硫肽半乳糖苷 (IPTG) (上海生工生物工程有限公司); 乙腈和甲酸 (色谱纯, 美国 Tedia 公司); 蛋白质相对分子质量标准 (美国 Fermentas 公司); 蛋白质浓度测定试剂盒 (江苏凯基生物技术有限公司); 蛋白胨和酵母粉 (英国 Oxoid 公司); 二磷酸尿苷葡萄糖二钠盐 (UDP-G, 南京康满林化工实业有限公司); 其余试剂均为市售分析纯。糖基转移酶库 (共 34 种) 由中国药科大学化学生物学研究室前期构建。

1.2 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 科技有限公司); Beckman Microfuge16 离心机 (美国 Beckman Coulter 有限公司); 蛋白质电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); YMC-Pack ODS-A C₁₈ 色谱柱、C₁₈ 硅胶填料 (日本 YMC 股份有限公司); 冷冻干燥机 (上海 Christ 仪器有限公司); pH 计 (瑞士 Mettler-Toledo 公司); 微孔板恒温振荡器 MB100-4A (杭州奥盛仪器有限公司)。

2 方法

2.1 罗汉果苷 III E 和糖基化产物 MG-III E-Glu 的 HPLC 分析

色谱条件: 色谱柱为 Agilent C₁₈ 反相柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相 A 为去离子水 (加 0.1% 甲酸); 流动相 B 为乙腈 (加 0.1% 甲酸)。洗脱梯度为有机相 B 10% ~ 90%, 梯度时间为 25 min。反应液样品进样 10 μL, 柱温为 30 °C; 流速为 1 mL/min; 检测波长为 210 nm。在该色谱条件下, 罗汉果苷 III E 和 MG-III E-Glu 的保留时间分别为 12.8 和 9.3 min。

2.2 糖基转移酶库的诱导表达和筛选

在糖基转移酶筛选时, 酶库中所有酶的诱导表达条件统一为: 0.2 mmol/L IPTG、诱导温度 16 °C、诱导时间 12 h。诱导表达完成后, 离心收集菌体, 用 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 洗涤稀释菌体至 10 g/L, 然后加入罗汉果苷 III E 至 2 mg/mL, UDP-G 至 5 mg/mL, 于 30 °C, 220 r/min 反应 14 h。反应结束后, 用等体积甲醇终止反应, 12 000 r/min

离心 10 min, 取上清液进行 HPLC 和 LC-MS 分析, 以考察罗汉果苷 III E 的糖基化修饰情况。

在筛选出可催化罗汉果苷 III E 糖基化修饰的糖基转移酶 HXSW-GT-2 后, 放大反应体系至 100 mL (转化效率仅约为 36%), 利用制备液相色谱仪纯化出纯度大于 95% 的糖基化产物以进行结构鉴定。制备液相的色谱条件为: 色谱柱为 Waters 反相柱 (35 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相 A 为去离子水 (加 0.1% 甲酸); 流动相 B 为乙腈 (加 0.1% 甲酸)。洗脱梯度为有机相 B 59% ~ 66%, 梯度时间为 15 min。

2.3 HXSW-GT-2 的诱导表达条件考察

在 0.2 mmol/L IPTG 和诱导 12 h 条件下, 考察诱导温度为 15, 20, 25, 30, 35 °C 时的 HXSW-GT-2 可溶性表达量。在 25 °C 和诱导 12 h 条件下, 考察 IPTG 浓度为 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mmol/L 时的 HXSW-GT-2 可溶性表达量。在优化后的诱导温度和 IPTG 浓度条件下, 考察诱导表达时间为 4 ~ 16 h 时的 HXSW-GT-2 可溶性表达量。

2.4 HXSW-GT-2 酶催化反应条件考察

为提高罗汉果苷 III E 的糖基化产物 MG-III E-Glu 的转化率, 制备可供甜度和口感测试的样品, 本研究对 HXSW-GT-2 生物合成 MG-III E-Glu 的反应温度、反应 pH、糖供体 UDP-G 用量和含 HXSW-GT-2 的菌体用量等参数进行了单因素考察。反应温度考察范围为 30 ~ 60 °C; 反应 pH 考察范围为 4.0 ~ 10.0, 种类为: 0.1 mol/L Tris-HCl (7.5 ~ 10.0)、0.05 mol/L NaOAc-HAc (4.0 ~ 5.6)、0.05 mol/L Na₂HPO₄-柠檬酸 (5.4 ~ 7.0); 糖供体与底物物质的量比考察范围为 1:1 ~ 20:1; 全细胞反应菌体质量的考察范围为 5 ~ 25 g/L。所有考察反应的总体积均为 2 mL, 反应时间均为 14 h。

2.5 反应体系的放大验证和 MG-III E-Glu 的制备

在最优反应条件下, 将 MG-III E-Glu 的生物合成体系扩大至 0.5 L, 并于不同反应时间点取样监测反应进程。反应结束后, 反应液煮沸 5 min, 离心去除变性的蛋白质, 上清液冷冻干燥制备 MG-III E-Glu 粗品。利用 C₁₈ 反相色谱柱 (内径 2 cm, 长度 75 cm) 分离纯化 MG-III E-Glu, 洗脱液为含 45% 乙腈的水溶液。HPLC 监测纯化过程, 收集含高纯度 MG-III E-Glu 的洗脱液, 干燥后获得终产品。

2.6 MG-III E-Glu 的甜度和口感测试

挑选 20 名健康人员组成评定小组(10 男,10 女),分别品尝对比 5% 蔗糖溶液与质量体积比浓度分别为 0.1%、0.05%、0.025%、0.017%、0.0125%、0.01%、0.008 3% 的罗汉果苷 III E 和 MG-III E-Glu 溶液的甜度和口感风味。

3 结 果

3.1 糖基转移酶的筛选

课题组前期将 34 种不同的糖基转移酶基因分别插入 pET22b(+) 或 pET28a(+) 载体获得相应重组质粒,分别转化至大肠埃希菌 BL21(DE3) 后构建了糖基转移酶库。本研究采用统一的诱导表达条件(0.2 mmol/L IPTG、诱导温度 16 ℃、诱导时

间 12 h) 对酶库进行诱导表达,然后构建全细胞生物合成体系筛选能够区域选择性糖基化修饰模型底物罗汉果苷 III E 的糖基转移酶。分析结果显示,有 3 个糖基转移酶能够催化罗汉果苷 III E 进行葡萄糖糖基修饰(图 2),经来源分析,这 3 种酶分别为来源于 *Streptomyces antibioticus* 的 UDP-G 依赖的糖基转移酶 OleD(酶库中编号:HXSW-GT-2)^[11]、OleD 突变体 ASP(酶库中编号:HXSW-GT-9)^[11-12] 和突变体 TDP16(酶库中编号:HXSW-GT-24)^[12]。鉴于 HXSW-GT-2 催化罗汉果苷 III E 糖基化修饰的转化率最高,可达到 36%,所以本研究选择 HXSW-GT-2 作为生物催化剂进行后续实验研究。

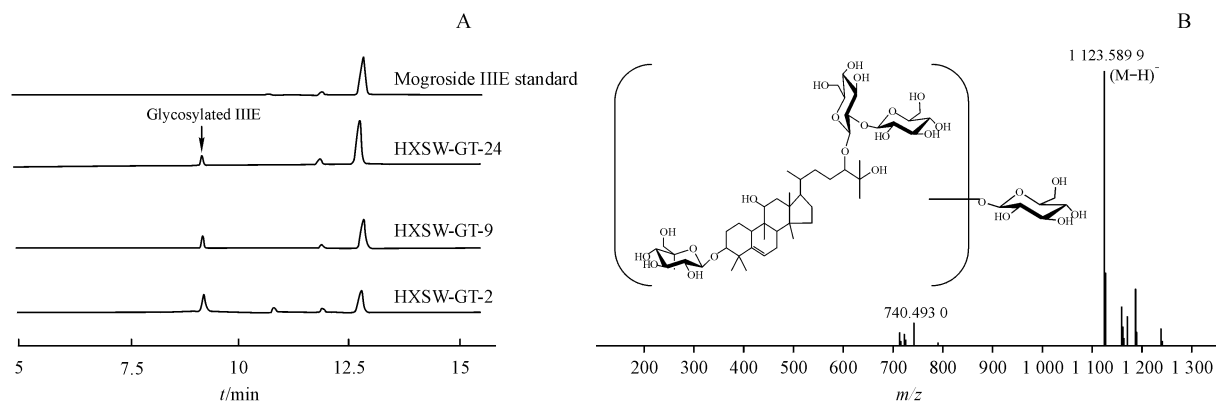


Figure 2 Glycosylation of mogroside III E by HXSW-GT-2

A: HPLC analysis of mogroside III E and glycosylation of mogroside III E by HXSW-GT-2, HXSW-GT-9, HXSW-GT-24. B: LC-MS analysis of glycosylated mogroside III E

3.2 罗汉果苷 III E 糖基化产物的结构鉴定

在 LC-MS 确定糖基转移酶 HXSW-GT-2 能够催化合成葡萄糖基化罗汉果苷 III E 后,反应体系被放大至 100 mL,制备获得纯度大于 95% 的白色粉末状糖基化产物 8 mg,并进行了核磁共振结构鉴定。核磁共振鉴定罗汉果苷 III E 糖基化修饰产物的结果为:¹H NMR (500 MHz, Pyridine-*d*₅) δ: 0.82 (3H, s), 0.87 (3H, s), 0.98 (1H, m), 1.05 (3H, s), 1.08 (1H, m), 1.08 (3H, d, *J* = 6.3 Hz), 1.37 (3H, s), 1.45 (3H, s), 1.47 (3H, s), 1.51 (3H, s), 1.57 (1H, m), 1.62 (1H, d, *J* = 7.1 Hz), 1.68 (1H, m), 1.70 (1H, m); 1.79 (1H, m), 1.80 (1H, m), 1.82 (1H, m), 1.85 (1H, m), 1.87 (1H, m), 1.87 (1H, m), 1.98 (1H, m), 1.98 (1H, m), 2.11 (1H, m), 2.23 (1H, m), 2.24 (1H, m), 2.64

(1H, dd, *J* = 11.5, 6.5 Hz), 2.82 (1H, d, *J* = 9.1 Hz), 3.63 (1H, t, *J* = 7.0 Hz), 3.92 (1H, m), 3.93 (1H, m), 3.94 (1H, m), 3.95 (1H, m), 3.96 (1H, m), 3.97 (1H, dd, *J* = 7.3, 8.4 Hz), 4.10 (1H, dd, *J* = 8.2, 8.8 Hz), 4.14 (1H, dd, *J* = 7.6, 8.5 Hz), 4.17 (1H, m), 2.28 (1H, m), 4.17 (1H, t, *J* = 8.5 Hz), 4.19 (1H, t, *J* = 8.8 Hz), 4.22 (1H, m), 4.25 (1H, t, *J* = 7.3 Hz), 4.27 (1H, dd, *J* = 8.4, 8.8 Hz), 4.30 (1H, t, *J* = 8.5 Hz), 4.30 (1H, dd, *J* = 10.7, 5.2 Hz), 4.38 (1H, dd, *J* = 10.6, 5.0 Hz), 4.38 (1H, dd, *J* = 10.7, 5.1 Hz), 4.38 (1H, dd, *J* = 10.8, 5.2 Hz), 4.51 (1H, d, *J* = 10.6 Hz), 4.51 (1H, d, *J* = 10.7 Hz), 4.51 (1H, d, *J* = 10.7 Hz), 4.53 (1H, d, *J* = 10.8 Hz), 4.85 (1H, d, *J* = 7.3 Hz), 4.86 (1H, d, *J* = 7.3 Hz), 5.06 (1H, d, *J* = 7.6

Hz), 5.28 (1H, d, $J = 7.7$ Hz), 5.40 (1H, dd, $J = 5.4$ Hz); ^{13}C NMR (125 MHz, Pyridine- d_5) δ : 16.9, 19.1, 19.1, 24.5, 25.8, 25.8, 26.2, 26.2, 27.1, 27.7, 27.9, 28.3, 29.5, 33.6, 34.3, 36.1, 36.7, 36.8, 39.7, 42.2, 43.7, 47.1, 49.4, 50.6, 62.5, 62.9, 63.2, 63.2, 71.4, 71.8, 72.1, 72.2, 72.3,

75.4, 75.5, 76.1, 78.0, 78.1, 78.2, 78.3, 78.4, 78.4, 78.6, 78.8, 84.0, 86.3, 87.4, 87.6, 101.5, 103.5, 106.3, 107.3, 118.2, 143.6。核磁结果表明, HXSW-GT-2 催化合成的糖基化产物为罗汉果苷 III E 的 11-位羟基的 β -葡萄糖基化修饰产物, 命名为 MG-III E-Glu (图 3)。

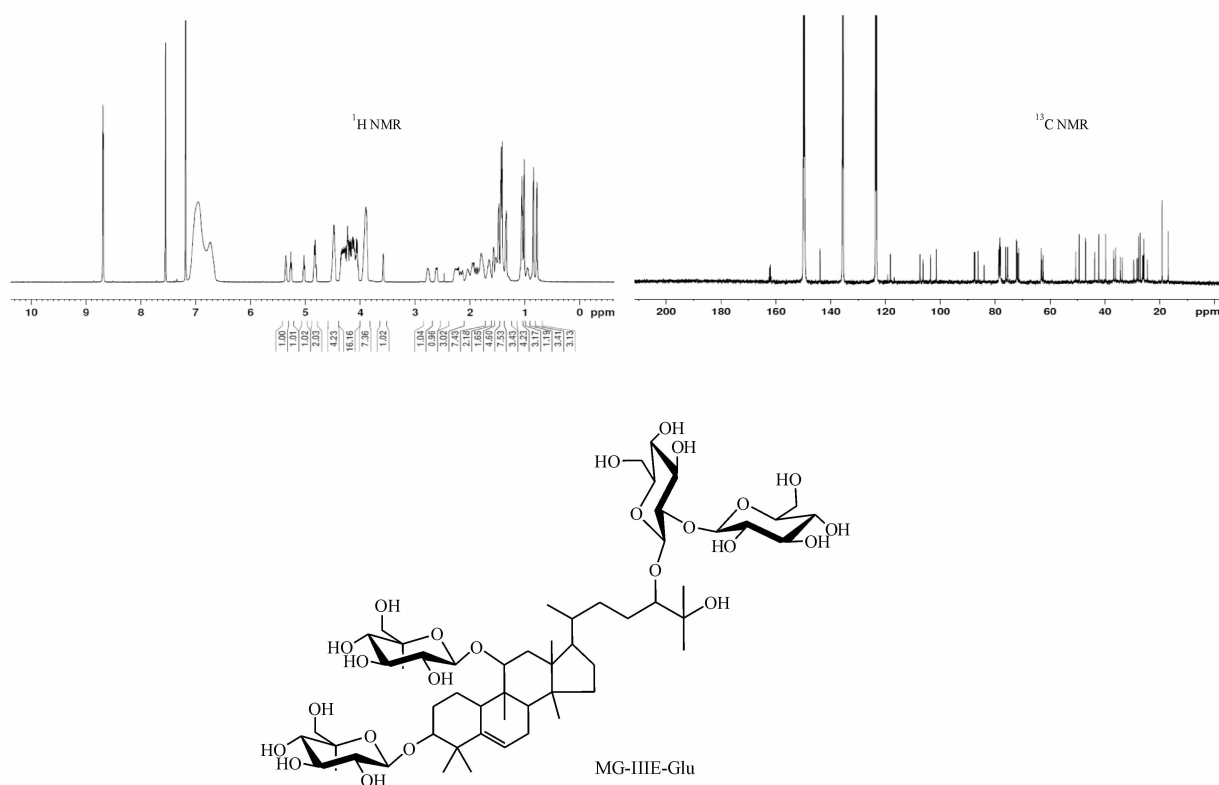


Figure 3 Identification of MG-III E-Glu from HXSW-GT-2

3.3 HXSW-GT-2 的可溶性表达

为进一步提高 HXSW-GT-2 的催化产率, 制备出可供甜度和口感测试的 MG-III E-Glu, 本研究主要对影响大肠埃希菌中重组蛋白异源表达的诱导剂用量、诱导温度和诱导时间等参数进行了系统考察^[13], 以期提高 HXSW-GT-2 的可溶性表达量。如图 4-A 所示, HXSW-GT-2 在 SDS-PAGE 中测定的相对分子质量约为 45 kD, 与计算相对分子质量为 44.6 kD 基本一致。大肠埃希菌中重组蛋白的可溶性表达情况对温度较为敏感, 诱导温度过高容易错误折叠形成包涵体, 温度过低则会导致菌体生长

缓慢, 重组蛋白的表达量降低。如图 4-B 所示, 当诱导温度为 25 $^{\circ}\text{C}$ 时, HXSW-GT-2 可溶性表达量最佳, 约占可溶性总蛋白的 21.1%。诱导剂 IPTG 的用量是影响大肠埃希菌中重组蛋白表达量和可溶性的重要因素。如图 4-C 所示, 0.4 mmol/L IPTG 浓度时, HXSW-GT-2 的可溶表达量达到峰值, 约占可溶性总蛋白的 22.3%, 随着 IPTG 浓度进一步提高而逐渐下降。在 0.4 mmol/L 和 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, HXSW-GT-2 的表达量在 12 h 时达到最高值 25.8% (图 4-D)。因此, HXSW-GT-2 的最佳可溶性表达条件确定为: 0.4 mmol/L IPTG、25 $^{\circ}\text{C}$ 和 12 h。

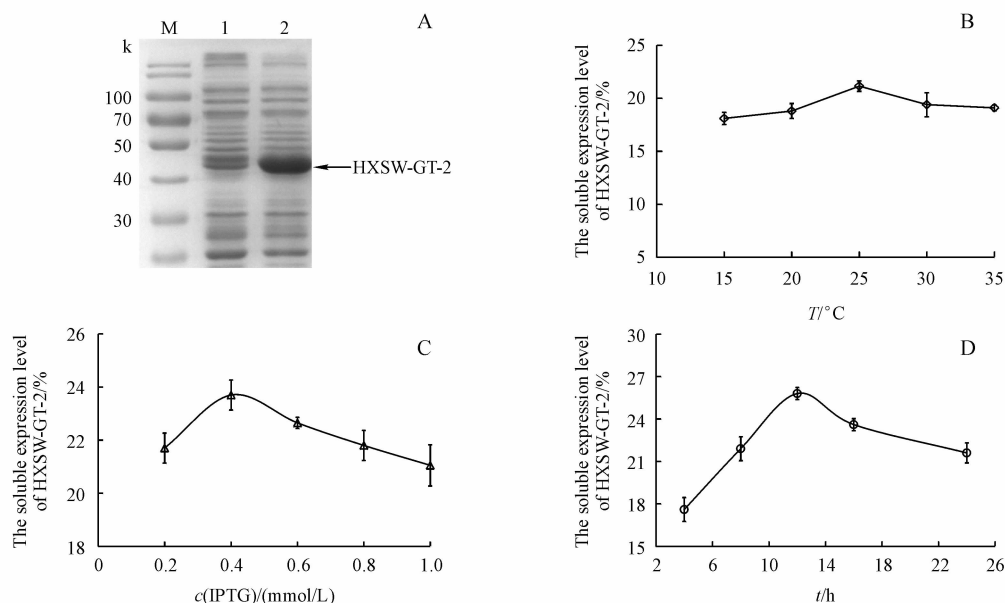


Figure 4 Optimization of expression conditions for HXSW-GT-2

A: SDS-PAGE analysis at optimal conditions (Lane M: Protein marker, Lane 1: Soluble proteins from *E. coli* cells containing pET22b(+)) after induction, Lane 2: Soluble HXSW-GT-2 in cell extract after induction); B: Effects of temperature; C: Effects of IPTG; D: Effects of induced time ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.4 MG-III E-Glu 生物合成的最佳条件

3.4.1 最佳反应温度 酶促反应速率与温度密切相关,反应温度升高可增加底物分子的热能,提高反应速率,但温度过高会导致酶蛋白的变性失活^[14-15]。本研究考察了 30 ~ 60 °C 条件下 HXSW-GT-2 催化合成 MG-III E-Glu 的产率。如图 5-A 所示,当反应温度为 37 °C 时, MG-III E-Glu 的产率达到了最大值,约为 41%;但是当反应温度高于 37 °C 后, MG-III E-Glu 的产率随着温度升高逐渐降低,这可能是 HXSW-GT-2 变性失活所致。因此,选择 37 °C 作为进行后续反应条件的优化。

3.4.2 最佳反应 pH 反应 pH 不仅可以通过改变酶活性中心催化氨基酸残基的离子化状态进而影响酶的催化效率,而且过高或过低的 pH 还会引起酶的失活^[14-15]。本研究采用不同的缓冲液类型,考察了 pH 4.0 ~ 10.0 条件下 HXSW-GT-2 生物合成 MG-III E-Glu 的情况。如图 5-B 所示, HXSW-GT-2 的催化效率对反应 pH 变化较为敏感,其催化罗汉果苷 III E 合成 MG-III E-Glu 的最适 pH 为 8.0。

3.4.3 最佳糖供体 UDP-G 用量 HXSW-GT-2 是一种 UDP-G 依赖的糖基转移酶,催化罗汉果苷 III E 合成 MG-III E-Glu 的反应过程中需要添加糖基供体 UDP-G^[16],但糖供体 UDP-G 可能会对 HXSW-GT-2 产生底物抑制^[15]。因此,本研究以 UDP-G 与

底物罗汉果苷 III E 的物质的量比作为考察参数以确定最佳 UDP-G 用量。结果如图 5-C 所示,当 UDP-G 与罗汉果苷 III E 的物质的量比为 10:1 时, MG-III E-Glu 的产率最高,达到 82.6%。

3.4.4 最佳生物催化剂用量 在 MG-III E-Glu 的生物合成过程中,生物催化剂为表达 HXSW-GT-2 的大肠埃希菌细胞。在 10 g/L 罗汉果苷 III E 质量浓度下,本研究考察了不同用量全细胞生物催化剂与 MG-III E-Glu 产率的关系。如图 5-D 所示,当全细胞催化剂质量浓度达到 10 g/L 时, MG-III E-Glu 的产率即达到平台期,不会随着细胞质量浓度的增加而提高,因此选择 10 g/L 的全细胞生物催化剂用量进行 MG-III E-Glu 的纯化制备。

3.5 MG-III E-Glu 的制备

在确定 MG-III E-Glu 的最佳生物合成条件后,本研究将反应体系放大至 0.5 L 规模(罗汉果苷 III E 为 5 g)以制备 MG-III E-Glu 用于甜度和口感测试。与此同时,通过反应进程的监测发现,在反应 12 h 时, MG-III E-Glu 产率即达到最高值 85.6%,且随着反应时间的推移并未出现提升情况(图 6-A)。在反应结束后,反应液经过加热、离心和冻干,获得淡黄色粗品 5.4 g。粗品经 C₁₈ 反相色谱柱一步纯化和洗脱液浓缩冻干后获得纯度为 97.8% 的白色粉末状 MG-III E-Glu 0.86 g(图 6-B),完全

达到了甜度和口感测试的质量和用量要求。

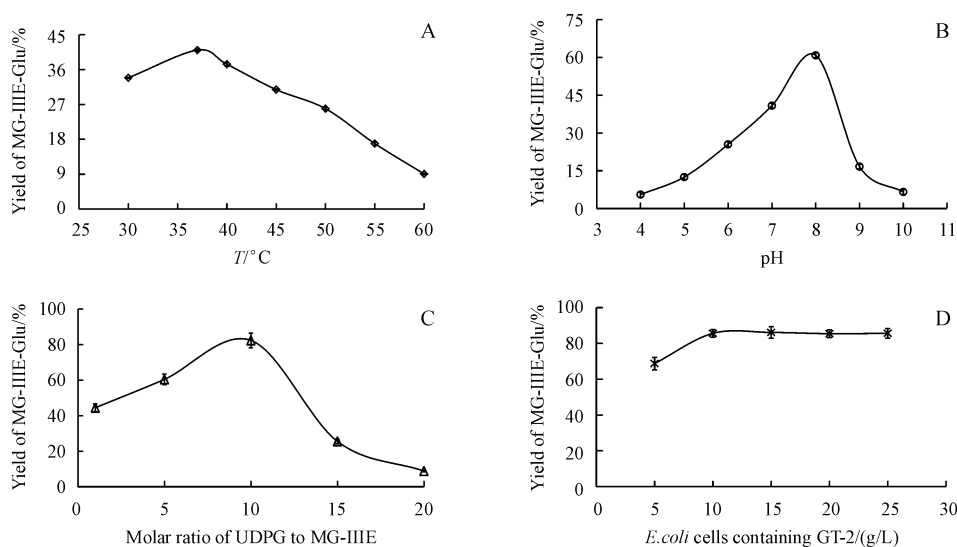


Figure 5 Optimization of reaction conditions for HSWX-GT-2

A: Effects of reaction temperature; B: Effects of reaction pH; C: Effects of molar ratio of UDPG to mogroside III-E; D: Effects of biocatalyst loading ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

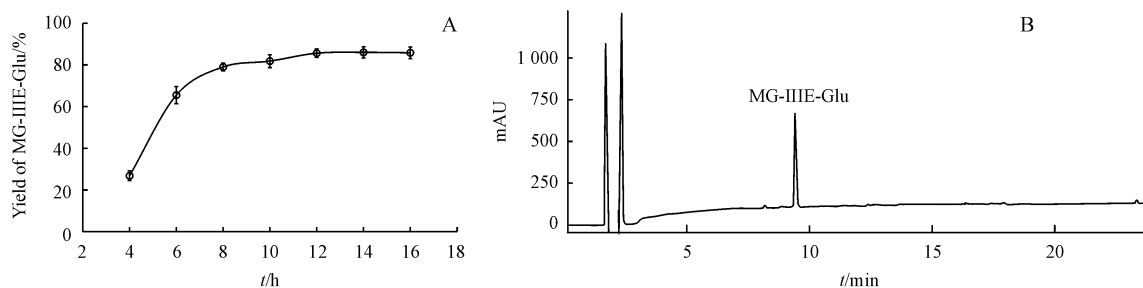


Figure 6 Preparation of MG-III-E-Glu at 0.5 L scale

A: Time course on the reaction catalyzed by HSWX-GT-2 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$); B: HPLC analysis of purified MG-III-E-Glu

3.6 MG-III-E-Glu 的感官评价

罗汉果苷 III-E 是一种低热量高甜度的天然甜味剂,甜度约为 5% 蔗糖的 300 倍,且口感较好^[1]。以罗汉果苷 III-E 和 5% 蔗糖为参照,20 人的评定小组一致认为 MG-III-E-Glu 的甜度显著低于 5% 蔗糖和同浓度的罗汉果苷 III-E,基本无甜味,无持久口感,且苦涩味非常明显。该结果表明,苷元结构中的 11 位羟基的状态对罗汉果苷的甜度和口感影响明显,其一旦被修饰,罗汉果苷的甜度即有可能消失,产生明显的苦涩味。该构效关系的实验阐释将加强研究人员对罗汉果苷类天然甜味剂甜度和口感结构基础的认知,从而为寻找和开发新的非营养型天然甜味剂提供一定的构效关系理论指导。

4 讨论

罗汉果苷是一类由罗汉果苷元 (10 α -cucurbit-5-ene-3 β ,11 α ,24(R),25-tetraol) 连接 2~6 个糖单元的四环三萜皂苷,目前从罗汉果中发现的皂苷种类已超过 30 种^[1]。低热量、高甜度和口感好的罗汉果苷已成为非营养型天然甜味剂开发的重要来源之一,具有巨大的潜在商业价值和应用前景^[1,9]。前期研究发现,罗汉果苷元连接 3 个及以上糖单元是罗汉果苷产生甜味和较好口感的结构基础,例如甜度是蔗糖 500 以上的赛门苷 I^[1-3]。后续研究发现罗汉果苷元的 11 位羟基与甜度和口感存在一定的关联,但由于罗汉果苷糖单元中的活泼羟基较多,所以一直未能找到合适的方法对苷元

的 11 羟基进行定点结构修饰,也未能以实验阐释其与甜度和口感的构效关系^[1,3,10]。

本研究以甜度为蔗糖 300 倍的罗汉果苷 III E 为模型底物筛选已有的糖基转移酶库,发现 HXSW-GT-2 可催化罗汉果苷 III E 的 11 位羟基糖基化修饰生成产物 MG-III E-Glu,但产率偏低。在此基础上,优化诱导表达条件后确定了 HXSW-GT-2 在大肠埃希菌中的最佳可溶性表达条件:0.4 mmol/L IPTG、25 ℃ 和 12 h。然后,在确定优化确定最佳反应条件(pH 8.0、30 ℃、UDP-G/罗汉果苷 III E 的物质的量比 10 和全细胞催化剂 10 g/L)后,放大反应体系纯化制备出纯度为 97.8% 的 MG-III E-Glu。感官评价结果显示,苷元结构中的 11 位羟基一旦被修饰,罗汉果苷的甜味即有可能消失,产生明显的苦涩味。该构效关系的研究将进一步深化对罗汉果苷类甜味剂甜度和口感的认知,为罗汉果苷的构效改造和产业开发提供理论指导。

参 考 文 献

- [1] Li C, Lin LM, Sui F, et al. Chemistry and pharmacology of *Siraitia grosvenorii*; a review[J]. *China J Nat Med*, 2014, **12** (2): 89–102.
- [2] Chen L, Chen YJ, Wang SZ, et al. Enzymatic synthesis of mogroside III E[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2018, **49** (3): 354–359.
- [3] Wang L, Yang Z, Lu F, et al. Cucurbitane glycosides derived from mogroside III E: structure-taste relationships, antioxidant activity, and acute toxicity[J]. *Molecules*, 2014, **19** (8): 12676–12689.
- [4] Di R, Huang MT, Ho CT, et al. Anti-inflammatory activities of mogrosides from *Momordica grosvenorii* in murine macrophages and a murine ear edema model[J]. *J Agr Food Chem*, 2011, **59** (13): 7474–7481.
- [5] Takeo E, Yoshida H, Tada N, et al. Sweet elements of *Siraitia grosvenorii* inhibit oxidative modification of low-density lipoprotein [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2002, **9** (2): 114–120.
- [6] Suzuki YA, Murata Y, Inui H, et al. Triterpene glycosides of *Siraitia grosvenorii* inhibit rat intestinal maltase and suppress the rise in blood glucose level after a single oral administration of maltose in rats [J]. *J Agr Food Chem*, 2005, **53** (8): 2941–2946.
- [7] Lin GP, Jiang T, Hu XB, et al. Effect of *Siraitia grosvenorii* polysaccharide on glucose and lipid of diabetic rabbits induced by feeding high fat/high sucrose chow[J]. *Exp Diabetes Res*, 2007, 2007: 67435.
- [8] Matsumoto S, Jin M, Dewa Y, et al. Suppressive effect of *Siraitia grosvenorii* extract on dicyclanil-promoted hepatocellular proliferative lesions in male mice[J]. *J Toxicol Sci*, 2009, **34** (1): 109–118.
- [9] Pawar RS, Krynitsky AJ, Rader JJ, et al. Sweeteners from plants with emphasis on *Stevia rebaudiana* (Bertoni) and *Siraitia grosvenorii* (Swingle) [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2013, **405** (13): 4397–4407.
- [10] Kaiser R, Matsumoto K, Nie RL, et al. Glycosides from Chinese medicinal plant, *Hemsleyapanacis-scandens* and structure-taste relationship of cucurbitane-glycosides [J]. *Chem Pharm Bull*, 1988, **36** (1): 234–243.
- [11] Zhou M, Thorson J, Jon S, et al. Asymmetric enzymatic glycosylation of mitoxantrone[J]. *Org Lett*, 2011, **13** (10): 2786–2788.
- [12] Gantt RW, Peltier-Pain P, Singh S, et al. Broadening the scope of glycosyltransferase-catalyzed sugar nucleotide synthesis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, **110** (19): 7648–7653.
- [13] Rosano GL, Ceccarelli EA, Leandro, et al. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges [J]. *Front Microbiol*, 2014, **5**: 172.
- [14] Wu XR, Gou XD, Chen YJ, et al. Enzymatic preparation of *t*-butyl-6-cyano-(3*R*, 5*R*)-dihydroxyhexanoate by a whole-cell biocatalyst co-expressing carbonyl reductase and glucose dehydrogenase [J]. *Process Biochem*, 2015, **50** (1): 104–110.
- [15] Vera C, Guerrero C, Wilson L, et al. Optimization of reaction conditions and the donor substrate in the synthesis of hexyl- β -D-galactoside [J]. *Process Biochem*, 2017, **58**: 128–136.
- [16] Choi SH, Ryu M, Yoon YJ, et al. Glycosylation of various flavonoids by recombinant oleandomycin glycosyltransferase from *Streptomyces antibioticus* in batch and repeated batch modes [J]. *Biotechnol Lett*, 2012, **34** (3): 499–505.