

# 双酶偶联一锅法高效合成虎杖苷

戴景莉<sup>1,2</sup>, 闫子旭<sup>1,2</sup>, 赵科学<sup>1,2</sup>, 李小利<sup>1,2</sup>, 臧永军<sup>2</sup>, 徐麒麟<sup>2</sup>, 朱富成<sup>2\*</sup>

1 安徽中医药大学 药学院, 安徽 合肥 230012

2 皖西学院 生物与制药工程学院, 安徽 六安 237012

戴景莉, 闫子旭, 赵科学, 李小利, 臧永军, 徐麒麟, 朱富成. 双酶偶联一锅法高效合成虎杖苷[J]. 生物工程学报, 2025, 41(1): 461-473.

DAI Jingli, YAN Zixu, ZHAO Kexue, LI Xiaoli, ZANG Yongjun, XU Qilin, ZHU Fucheng. Efficient synthesis of polydatin by a two-enzyme coupled with one-pot method[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(1): 461-473.

**摘要:** 虎杖是传统中药之一, 其主要活性成分虎杖苷具有调节糖代谢、脂代谢、镇咳平喘、抗菌抗炎等药理作用, 但传统的虎杖苷制备方法不足以满足当下市场需求。本研究聚焦于绿色高效的虎杖苷制备方法, 在已获得的糖基转移酶 UGT<sub>BS</sub> 三联突变体 IGW (Y14I/I62G/M315W) 基础上, 以白藜芦醇为底物, 通过双酶偶联一锅法生物催化高效制备虎杖苷, 同时实现尿苷二磷酸葡萄糖 (uridine diphosphate-glucose, UDPG) 的循环再生。对双酶偶联催化体系进行条件优化, 在 35 °C, pH 为 8.0, IGW:ArSuSy1 酶活比 3:4, 二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO) 体积比 5%, 尿苷二磷酸 (uridine diphosphate, UDP) 浓度 0.10 mmol/L, 蔗糖浓度 0.6 mol/L 的条件下, 1 h 内 2 mmol/L 白藜芦醇的转化率可达 80.6%, 虎杖苷的产物占比可达 90% 以上。本研究通过双酶偶联体系实现了 UDPG 的循环再生, 缩短了反应时间, 同时探究了分批补料策略, 在一锅法偶联反应中 24 h 虎杖苷产量可达到 6.28 g/L。本研究为绿色高效制备虎杖苷提供了新的策略。

**关键词:** 糖基转移酶; 虎杖苷; 一锅法偶联反应; 尿苷二磷酸葡萄糖的再生; 分批补料策略

资助项目: 国家自然科学基金(32201979); 安徽省高等学校科学研究项目(2022AH051682); 安徽省高校优秀青年科研项目(2023AH030109); 安徽省优秀青年教师培育重点项目(YQZD2023071)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32201979), the Scientific Research Project of Higher Education Institutions in Anhui Province (2022AH051682), the Scientific Research Outstanding Youth Project of Anhui Province (2023AH030109), and the Anhui Province Outstanding Young Teacher Training Project (YQZD2023071).

\*Corresponding author. E-mail: fucheng323@163.com

Received: 2024-05-15; Accepted: 2024-07-29; Published online: 2024-07-30

## Efficient synthesis of polydatin by a two-enzyme coupled with one-pot method

DAI Jingli<sup>1,2</sup>, YAN Zixu<sup>1,2</sup>, ZHAO Kexue<sup>1,2</sup>, LI Xiaoli<sup>1,2</sup>, ZANG Yongjun<sup>2</sup>, XU Qilin<sup>2</sup>, ZHU Fucheng<sup>2\*</sup>

1 School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, Anhui, China

2 School of Biological and Pharmaceutical Engineering, West Anhui University, Lu'an 237012, Anhui, China

**Abstract:** Traditional Chinese medicine of *Polygonum cuspidatum* has been utilized in China for thousands of years. Its primary active compound, polydatin, exhibits a variety of pharmacological effects including the regulation of glucose and lipid metabolism, suppression of cough and asthma, as well as antibacterial and anti-inflammatory properties. However, conventional methods for polydatin production are inadequate to satisfy the market demand. This study aims to explore the green and efficient preparation of polydatin. With resveratrol as the substrate, we efficiently synthesized polydatin by using the triple mutant IGW (Y14I/I62G/M315W) of the glycosyltransferase UGT<sub>BS</sub> based on a strategy of two-enzyme coupled with one-pot and realized the recycling of uridine diphosphate-glucose (UDPG). The conditions of the two-enzyme reaction were optimized. Under the conditions of 35 °C, pH 8.0, IGW:ArSuSy1 activity ratio of 3:4, dimethyl sulfoxide (DMSO) volume fraction of 5%, uridine diphosphate (UDP) concentration of 0.10 mmol/L, and sucrose concentration of 0.6 mol/L, the conversion of 2 mmol/L resveratrol reached 80.6% within 1 h, and the proportion of polydatin was over 90%. This study achieved the recycling of UDPG via a two-enzyme coupling system and shortened the reaction time. At the same time, the fed-batch strategy was adopted, and the yield of polydatin reached 6.28 g/L after 24 h in the one-pot coupling reaction, which provided a new strategy for green and efficient preparation of polydatin.

**Keywords:** glycosyltransferase; polydatin; one-pot coupling reaction; uridine diphosphate-glucose regeneration; fed-batch strategy

白藜芦醇因具有抗肿瘤、抗炎和免疫调节等药理活性<sup>[1]</sup>而受到广泛关注, 然而其水溶性不高, 导致其生物利用率较低<sup>[2]</sup>, 通过糖基化修饰增加化合物的溶解性和稳定性来提高化合物的生物利用度和药理性质是近年来研究的热点<sup>[3]</sup>。白藜芦醇经糖基化后可生成水溶性好、结构稳定性强的生物活性小分子虎杖苷, 而虎杖苷的传统获取方法主要是从天然植物虎杖中直接提取, 除此之外目前已报道的提取方法还包括超高压辅助提取<sup>[4]</sup>、超声波辅助提取<sup>[5]</sup>、微波辅助提取<sup>[6]</sup>等, 例如任薇等<sup>[7]</sup>通过优化低共熔

溶剂实现了对虎杖苷高效绿色的提取。但提取生产的过程具有分离难度大、缺乏质量可控性等缺点, 严重限制了虎杖苷的进一步研究与开发, 因此亟须建立虎杖苷绿色高效的制备方法。化学法可以经过一系列的酯化、羧化及糖化等反应步骤合成虎杖苷, 而通过微生物发酵也可合成虎杖苷, 如 Liu 等<sup>[8]</sup>基于白藜芦醇的转录组分析, 鉴定了白藜芦醇的关键糖基转移酶, 通过代谢工程和发酵优化, 虎杖苷产量达到了 545 mg/L; 相似地, Shang 等<sup>[9]</sup>选择解脂耶氏酵母来生产虎杖苷, 通过优化葡萄糖浓度并添加 2 个标记基

因, 最终在酵母浸出粉胨葡萄糖培养基(yeast extract peptone dextrose medium, YEPD)中发酵 144 h 后, 虎杖苷产量达到 6.88 g/L。

随着蛋白质工程的发展及生物学与化学、结构生物学、数据科学、计算科学和工程学等学科的交叉与融合<sup>[10]</sup>, 更多现代先进技术和方法应运而生, 研究结果也被更多地应用在天然药物开发中, 为药物提纯以及质量控制提供了新的解决思路<sup>[11]</sup>。近年来在虎杖苷生产的研究中, 糖基转移酶介导的糖基化反应因具有化学选择性好、区域选择性高<sup>[12]</sup>以及绿色高效等优势, 逐渐成为了热点研究课题之一。以小分子白藜芦醇作为底物, 尿苷二磷酸葡萄糖(uridine diphosphate-glucose, UDPG)作为糖基供体, 利用糖基转移酶糖基化反应是目前最直接生产虎杖苷的方式, 但 UDPG 本身价格较为昂贵且用量较大, 研究人员通过蔗糖合酶再生 UDPG 的双酶偶联法解决了这一问题, 比如 Li 等<sup>[13]</sup>用来源于地衣芽孢杆菌的糖基转移酶 *BIYjiC* 改造获得的 2 个突变体 M6 和 M2' 与大豆来源的蔗糖合酶(sucrose synthase from *Glycine max*, *GmSuSy*)催化以酪醇为底物的偶联反应, 在最优的条件下获得了区域选择性大于 99% 的红景天苷和淫羊藿次苷 D2, 且催化生成红景天苷时底物酪醇的摩尔转化率大于 99%; Han 等<sup>[14]</sup>以 2 mmol/L 肉桂醇(cinnamyl alcohol, CA)作为底物, 经拟南芥来源的蔗糖合酶 1 (sucrose synthase 1 from *Arabidopsis thaliana*, *AtSuSy1*)和 UGT73C5 偶联反应, 络总收率达到 100%; Dai 等<sup>[15]</sup>在探究糖基转移酶 *Bs-YjiC* 催化底物原人参二醇(protopanaxdiol, PPD)生成人参皂苷时, 将 *Bs-YjiC* 偶联蔗糖合酶(sucrose synthase, *SuSy*)进行一锅法反应, 最终获得了较高产量的人参皂苷 F12 (3.98 g/L)和 Rh2 (0.20 g/L)。但是, 双酶偶联一锅法因反应较为复杂导致产物的产

率较低, 所以在进行实验时需对反应条件进行优化来提高产物产率。

本研究利用实验室前期经改造获得的三联突变体 IGW (Y14I/I62G/M315W)与 *AtSuSy1* 进行双酶偶联。以白藜芦醇、UDP 和蔗糖作为底物, 在双酶的作用下构建了 UDP 的循环利用及 UDPG 的再生体系, 并对双酶偶联反应体系进行条件优化, 在此基础上通过双酶偶联反应分批补料策略一锅法合成虎杖苷, 避免了在单酶体系中使用价格昂贵的 UDPG, 为低成本高效制备虎杖苷奠定了基础(图 1)。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株、培养基及缓冲液

菌株: 本实验室保存的大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)。

大肠杆菌 LB 培养基(50 mL): 胰蛋白酶 0.5 g, 酵母粉 0.25 g, NaCl 0.5 g, pH 为自然值, 121 °C 灭菌 20 min。

大肠杆菌 Terrific-Broth (TB)培养基(50 mL): 酵母粉 0.59 g, 胰蛋白酶 1.18 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.47 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.11 g, 并添加 80%甘油 0.25 mL, pH 为自然值, 121 °C 高压灭菌 20 min。

PBS 缓冲液: 50 mmol/L 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠, 调节 pH 至 6.5–7.5。

Tris-HCl 缓冲液: 50 mmol/L Tris 用 HCl 调节 pH 至 7.5–8.5。

### 1.2 主要试剂及仪器

主要试剂: 白藜芦醇和虎杖苷购自上海麦克林生化科技股份有限公司, 二者均溶于二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)中使用; 尿苷二磷酸(uridine diphosphate, UDP)、尿苷二磷酸葡萄糖(uridine diphosphate-glucose, UDPG)、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(isopropyl-β-D-thiogalactoside, IPTG)、3,5-二硝基水杨酸

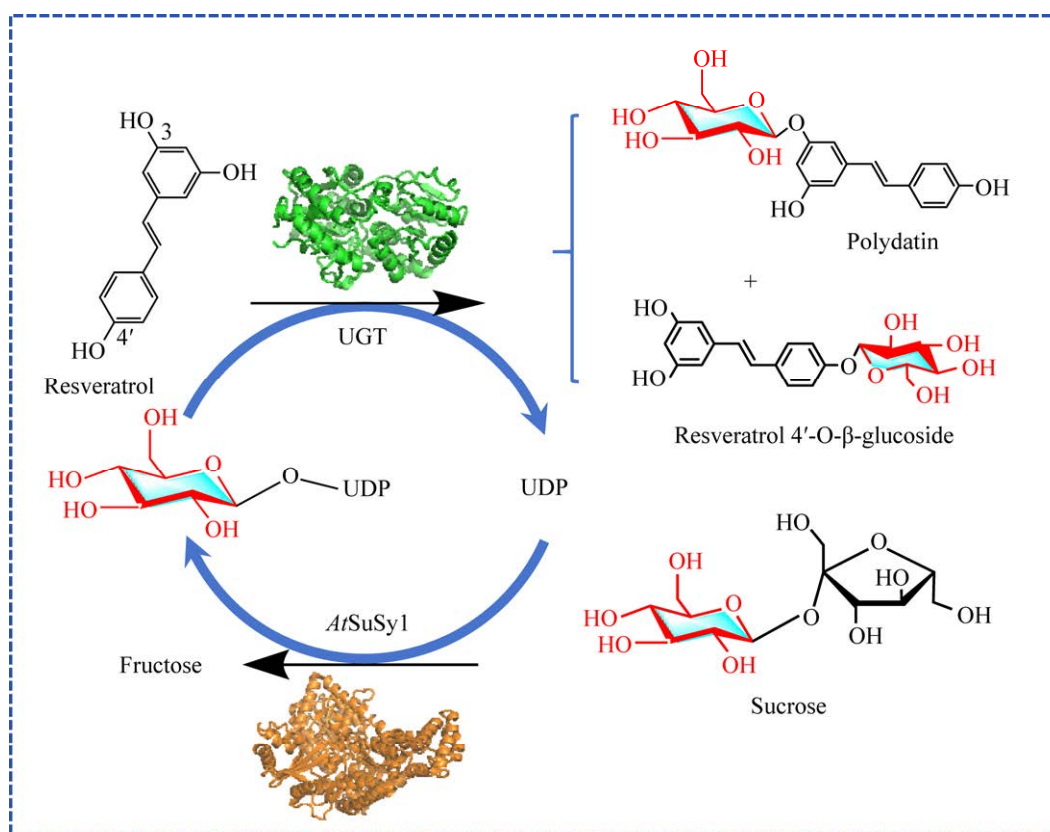


图1 IGW/*AtSuSy1* 双酶偶联合成虎杖苷路线

Figure 1 IGW/*AtSuSy1* two-enzyme cascade reaction route to synthesize polydatin.

(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)、蔗糖等试剂均购自 Sigma-Aldrich 公司。

主要仪器设备：高效液相色谱仪购自株式会社岛津制作所；摇床购自天津欧诺仪器股份有限公司；高速冷冻离心机购自湖南可成仪器设备有限公司；高压灭菌锅购自致微(厦门)仪器有限公司；UV1100 紫外分光光度计购自北京普析通用仪器有限责任公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 双酶的表达

三联突变体 IGW 的表达：实验室前期改造获得的三联突变体 IGW 在 *E. coli* BL21(DE3) 中可以高效表达，在含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 培养基中，37 °C 摇床培养含有 pET28a-IGW 的 *E. coli* BL21(DE3)，当  $OD_{600}$  达到 0.6–0.8 时，

加入终浓度 1 mmol/L IPTG，28 °C、200 r/min 诱导表达 24 h。

蔗糖合酶 *AtSuSy1* 的表达：蔗糖合酶基因 (GenBank 登录号：NM\_001036838) 插入到 pET-32a(+) 表达载体的 *Nco* I 和 *Xho* I 限制性酶切位点，使其 C 端带有 His $\times$ 6 基因标签，构建质粒 pET32a-*AtSuSy1*，将 pET32a-*AtSuSy1* 转化到 *E. coli* BL21(DE3) 中进行表达。在含有 100 mg/L 氨苄青霉素的 TB 培养基中，37 °C 摇床培养含有 pET32a-*AtSuSy1* 的 *E. coli* BL21(DE3)，当  $OD_{600}$  达到 0.6–0.8 时，加入终浓度 0.05 mmol/L IPTG，18 °C、200 r/min 诱导表达 24 h。

#### 1.3.2 双酶的纯化

发酵液于 4 °C、5 000 r/min 离心 30 min 收获细胞沉淀。蛋白纯化过程中，首先配制 lysis

buffer (50 mmol/L Tris-HCl buffer, 150 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, pH 8.0)、wash buffer (50 mmol/L Tris-HCl buffer, 150 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, pH 8.0)及 elution buffer (50 mmol/L Tris-HCl buffer, 150 mmol/L NaCl, 250 mmol/L 咪唑, pH 8.0)。lysis buffer 悬浮细胞, 超声破碎细胞, 将破碎后的细胞破碎液 4 °C、5 000 r/min 离心 30 min, 收集上清液过 0.45 μm 滤膜, 将次氨基三乙酸镍(Ni-NTA)填充到重力柱中, 去离子水清洗柱子后用 wash buffer 再冲洗 1 次。上清液添加到填料中, 关闭阀门, 二者充分混合 30 min, 打开阀门后收集流穿液。加入 wash buffer 洗脱杂蛋白, 过程中用 Coomassie G250 检测杂蛋白是否洗脱干净, 加入适量 elution buffer 洗脱目的蛋白, 同样用 Coomassie G250 检测目的蛋白是否洗脱完全, 收集洗脱后的目的蛋白, 得到纯化蛋白<sup>[16]</sup>。

### 1.3.3 三联突变体 IGW 催化白藜芦醇反应 HPLC 检测

HPLC 检测的色谱条件: 使用 C18 反相色谱柱(Eclipse Plus C18 色谱柱, 4.6 mm×150 mm, 5 μm), 纯水和甲醇作为流动相, 其中纯水为流动相 A, 甲醇为流动相 B。柱温和流速分别为 30 °C和 0.5 mL/min, UV 检测波长设置为 275 nm。梯度洗脱程序为 0–4 min 内流动相 B 占比为 20%, 4–15 min 内流动相 B 占比为 20%–50%, 15–18 min 内流动相 B 占比为 50%, 18–26 min 内流动相 B 占比为 50%–100%, 26–31 min 内流动相 B 占比为 100%, 31–33 min 内流动相 B 占比为 100%–20%, 33–35 min 内流动相 B 占比为 20%<sup>[17]</sup>。

### 1.3.4 酶活性测定

三联突变体 IGW 酶活测定: 200 μL 反应体系中含有 2 mmol/L 白藜芦醇, 4 mmol/L UDPG, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)和 40 μL 0.5 mg/mL

纯化的 IGW, 将反应混合物在 30 °C下反应 0.5 h, 取 50 μL 样品加入 200 μL 甲醇中终止反应。随后将样品以 12 000 r/min 离心 10 min, 通过 0.22 μm 尼龙过滤器过滤, 使用 HPLC 分析结果。IGW 酶活定义: 每 min 糖基化 1 μmol 白藜芦醇所需的酶量为 1 个单位酶活。

*AtSuSy1* 酶活测定: 本研究利用 DNS 法<sup>[18]</sup>测定 *AtSuSy1* 的酶活, 反应体系中含有 0.5 mmol/L UDP, 300 mmol/L 蔗糖, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)和 100 μg/mL 纯化的 *AtSuSy1*, 将反应液在 40 °C下反应 0.5 h, 随后冰浴冷却至室温, 加入 DNS 试剂并立即煮沸 10 min, 冰浴冷却至室温后在 540 nm 处检测吸光度, 根据果糖标准曲线计算从蔗糖中释放的果糖量从而测定 *AtSuSy1* 活性。*AtSuSy1* 酶活定义: 每 min 催化蔗糖生成 1 μmol 果糖所需的酶量为 1 个单位酶活<sup>[14-15]</sup>。

### 1.3.5 酶法合成虎杖苷反应体系建立

单酶催化白藜芦醇生成虎杖苷的基本反应体系(1 mL): 反应体系中包含 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0), 2 mmol/L 白藜芦醇, 4 mmol/L UDPG, 100 mU/mL 三联突变体 IGW。反应在 1.5 mL 的离心管中进行, 反应条件为 30 °C、1 000 r/min, 反应时间为 1 h, 之后取 50 μL 样品加入 200 μL 甲醇中终止反应, 通过 HPLC 进行结果分析。

双酶偶联催化白藜芦醇生成虎杖苷的基本反应体系(1 mL): 反应体系中包含 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0), 0.5 mmol/L UDP, 0.4 mol/L 蔗糖, 2 mmol/L 白藜芦醇, 100 mU/mL 三联突变体 IGW, 150 mU/mL *AtSuSy1*, 反应条件为 30 °C、1 000 r/min, 反应时间为 1 h。以此为基础, 探究不同因素对双酶催化反应的影响。

双酶偶联反应体系的条件优化: 经上述 Ni-NTA 重力柱法获得纯化后的三联突变体 IGW 和 *AtSuSy1*, 为了得到双酶偶联反应的最优体系, 需对反应条件进行优化。本研究主要

探究了反应温度、pH、双酶酶活比例、DMSO 体积比、UDP 浓度及蔗糖浓度 6 个因素对双酶偶联体系的影响。首先,选取 25–45 °C 范围内探究温度对反应体系的影响;为确定反应最适 pH,使用 50 mmol/L PBS 缓冲液(pH 6.5–7.5)和 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5–8.5)探究 pH 对反应体系的影响;为确定三联突变体 IGW 和 *AtSuSy1* 的最优酶活比例,在酶活比为 1:8 (50:400 mU/mL)、1:3 (100:300 mU/mL)、3:4 (150:200 mU/mL)、1:1 (200:200 mU/mL)、2:1 (200:100 mU/mL)、4:1 (200:50 mU/mL)的条件下测试双酶酶活的最优比例;为确定反应体系中 DMSO、UDP、蔗糖的最适浓度,本研究分别对 0%–20%的 DMSO、0.05–1.00 mmol/L 的 UDP、0.1–0.8 mol/L 蔗糖进行优化。研究前期对底物白藜芦醇浓度进行了考察,当底物白藜芦醇浓度为 2 mmol/L 时转化率可达 98%以上,随着白藜芦醇浓度进一步增加转化率急剧下降,所以在进行双酶偶联体系条件优化时底物白藜芦醇浓度始终为 2 mmol/L。反应 1 h 后取 50  $\mu$ L 样品加入 200  $\mu$ L 甲醇中终止反应,通过 HPLC 进行结果分析,根据底物相对转化率选择反应的最优条件。每一次条件优化均在上一次得到的最优条件基础上进行。

### 1.3.6 三联突变体 IGW 与 *AtSuSy1* 偶联反应分批补料

三联突变体 IGW 与 *AtSuSy1* 的偶联反应分批补料中,反应体系为最优体系,反应在磁力搅拌器中进行。反应结束后,取 50  $\mu$ L 样品加入到 200  $\mu$ L 的甲醇进行淬灭,4 °C、12 000 r/min 离心 10 min 后,通过 0.22  $\mu$ m 尼龙过滤器过滤上清液,使用 HPLC 分析结果。在 1、2、4、6、8、11、14、17、20 h 周期性地向反应混合物中加入适量的白藜芦醇溶液,在 6 h 和 10 h 分别加入新鲜酶液。根据 NADH 等氧化还原酶辅因

子再生的评价体系<sup>[19]</sup>,本研究计算了 UDPG “再生循环数”(regeneration cycles, RC),其中  $RC = (\text{反应液中加入的底物总浓度} \times \text{底物糖基化效率}) / \text{反应液中初始 UDP 浓度}$ 。

### 1.3.7 产物虎杖苷的分离纯化

本研究采用硅胶柱层析法对双酶偶联分批补料获得的虎杖苷粗品进行分离纯化。反应液在 100 °C 水中煮沸 10 min,待蛋白沉淀析出后 5 000 r/min 离心 10 min 去除。之后用反应液等量的乙酸乙酯萃取 3 次,将得到的萃取物进行硅胶柱层析,洗脱剂  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$  体积比设置为 10:1 到 5:1 进行样品洗脱,薄层色谱法(thin layer chromatography, TLC)检查并合并相同的部分,最终经 HPLC 确认纯化的虎杖苷产物。

## 2 结果与分析

### 2.1 三联突变体 IGW 及蔗糖合酶 *AtSuSy1* 的表达纯化

通过 SDS-PAGE 分析蛋白条带的大小。三联突变体 IGW 的蛋白理论分子量为 43.98 kDa, *AtSuSy1* 为 92.99 kDa,由图 2 可以看出,三联突变体 IGW 及蔗糖合酶 *AtSuSy1* 在 *E. coli* BL21 中均能够正常表达,可溶性表达相对较高,纯化后的 2 种蛋白条带大小均与预期结果一致。

### 2.2 双酶偶联反应条件的探究

#### 2.2.1 温度对双酶偶联催化反应的影响

温度对酶催化具有显著的影响<sup>[20]</sup>,为了探究温度对双酶偶联反应催化合成虎杖苷的影响,本研究选择了 25、30、35、40、45 °C 这 5 个温度。由图 3A 可知,在温度为 25–35 °C 时白藜芦醇相对转化率呈上升趋势;在温度为 35–45 °C 时白藜芦醇相对转化率呈下降趋势,因此双酶偶联反应体系的最优温度为 35 °C。

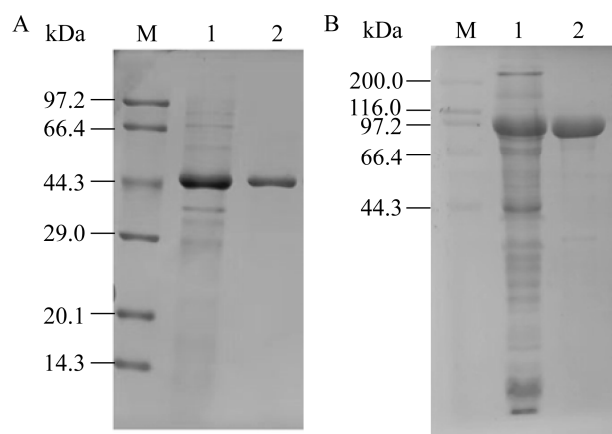


图2 三联突变体 IGW (A)和 *AtSuSy1* (B)表达纯化 SDS-PAGE 分析 M: 蛋白标准品; Lane 1: 未纯化的蛋白; Lane 2: 纯化后蛋白。

Figure 2 SDS-PAGE analysis of expression and purification of the triple mutant IGW (A) and *AtSuSy1* (B). M: Protein marker; Lane 1: Unpurified protein; Lane 2: Purified protein.

### 2.2.2 pH 对双酶偶联催化反应的影响

其他基本反应体系不变, 在最优温度为 35 °C, pH 为 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 条件下, 探究 pH 对此反应的影响。由图 3B 可知, 当 pH 在 6.5–8.5 范围内, 白藜芦醇相对转化率均在 80% 以上, 由此可以看出 pH 对反应体系的影响不大, pH 在 6.5–8.0 时白藜芦醇相对转化率呈上升趋势, 当 pH 为 8.0 时, 白藜芦醇相对转化率达到最高。

### 2.2.3 双酶比例对双酶偶联催化反应的影响

本研究还探究了双酶比例对反应的影响, 在温度为 35 °C, pH 为 8.0, 基本反应体系保持不变的情况下, 由图 3C 可知, 当双酶的酶活比为 1:8 (50:400 mU/mL) 时白藜芦醇的相对转化率最低; 当双酶的酶活比为 3:4 (150:200 mU/mL) 时白藜芦醇的相对转化率最高, 这与 Dai 等<sup>[15]</sup>在探究 *Bs-YjiC-AtSuSy* 双酶偶联反应催化底物 PPD 生成人参皂苷最优酶活比为 160:200 mU/mL 相似, 所以双酶比例对此催化反应影响的最优

条件是 3:4。

### 2.2.4 DMSO 对双酶偶联催化反应的影响

底物白藜芦醇在水中的溶解度极低, 几乎不溶于水, 但是可溶于一些有机试剂, DMSO 对白藜芦醇的溶解性能较佳, 所以当反应体系中加入适量的 DMSO 可促进虎杖苷的生成。本研究探究了 DMSO 体积比为 0%、5%、10%、15%、20% 时对催化反应的影响。由图 3D 可知, 当 DMSO 的体积占反应液总体积的 5% 时, 白藜芦醇的相对转化率达到最高; 但当 DMSO 的体积占反应液总体积的 0% 时, 白藜芦醇的相对转化率有所下降, 可能的原因是当不加入 DMSO 时, 白藜芦醇在反应体系中不能完全溶解, 导致白藜芦醇不能完全转化为虎杖苷。当 DMSO 的体积比为 10%–20% 时白藜芦醇的相对转化率呈明显下降趋势, 表明 DMSO 的体积过多也会抑制反应的进行, 这可能是由于高 DMSO 浓度下会抑制酶的活性<sup>[13]</sup>, 使白藜芦醇的相对转化率降低。

### 2.2.5 UDP 对双酶偶联催化反应的影响

UDP 是 IGW/*AtSuSy1* 双酶偶联反应的底物之一, 由于其在 UDPG 形成过程中的重要性<sup>[15]</sup>和对三联突变体 IGW 酶活性的抑制作用, UDP 浓度过高或者过低都会对催化反应产生一定影响。本研究选择 0.05、0.10、0.20、0.50、1.00 mmol/L 这 5 个 UDP 浓度进行探究。由图 3E 可知, UDP 的最优浓度为 0.10 mmol/L, 当 UDP 浓度在 0.05–0.10 mmol/L 时, 白藜芦醇的相对转化率呈上升趋势; UDP 浓度在 0.10–1.00 mmol/L 时白藜芦醇的相对转化率呈下降趋势。在最大浓度 1.00 mmol/L 时白藜芦醇的相对转化率仅为 30% 左右, 这表明 UDP 的浓度对双酶偶联催化反应有较大的影响。

### 2.2.6 蔗糖对双酶偶联催化反应的影响

在温度为 35 °C, pH 为 8.0, IGW 与 *AtSuSy1*

酶活比为 3:4 (150:200 mU/mL), DMSO 体积占比为 5%, UDP 浓度为 0.10 mmol/L 的最优条件下, 本研究选择 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 mol/L 这 5 种蔗糖浓度探究蔗糖对双酶偶联催化反应的影响。由图 3F 可知, 蔗糖浓度在 0.1–0.6 mol/L 时, 随着蔗糖浓度的不断增加, 白藜芦醇的相对转化率也随之增加, 蔗糖浓度达到 0.6 mol/L 时, 白藜芦醇的相对转化率达到最高, 随后相对转化率下降, 这可能由于在较高浓度的蔗糖下酶活性受到抑制引起的<sup>[21]</sup>。综合考虑, 选择蔗糖浓度 0.6 mol/L 为最优浓度。

综上所述, 温度为 35 °C, pH 为 8.0, IGW:*AtSuSy1* 酶活比为 3:4 (150:200 mU/mL), DMSO 体积比为 5%, UDP 浓度为 0.10 mmol/L,

蔗糖浓度为 0.6 mol/L 是 IGW/*AtSuSy1* 双酶偶联一锅法合成虎杖苷的最优条件。

### 2.3 单酶体系和双酶体系生成虎杖苷的比较

如图 4 所示, 通过比较单酶体系和双酶体系催化合成虎杖苷的转化率可知, 在 IGW/*AtSuSy1* 最优双酶体系的催化下, 反应进行 1 h 后 2 mmol/L 白藜芦醇的转化率为 80.6%, 是相同条件下单酶催化体系转化率(49.7%)的 1.6 倍, 这表明了经条件优化后的双酶体系的反应速率要显著高于单酶体系。由此可知, 相较单酶体系而言, IGW/*AtSuSy1* 最优双酶体系在催化合成虎杖苷时可大大缩短反应时间, 且在该体系中仅需加入廉价的蔗糖和极少量的 UDP

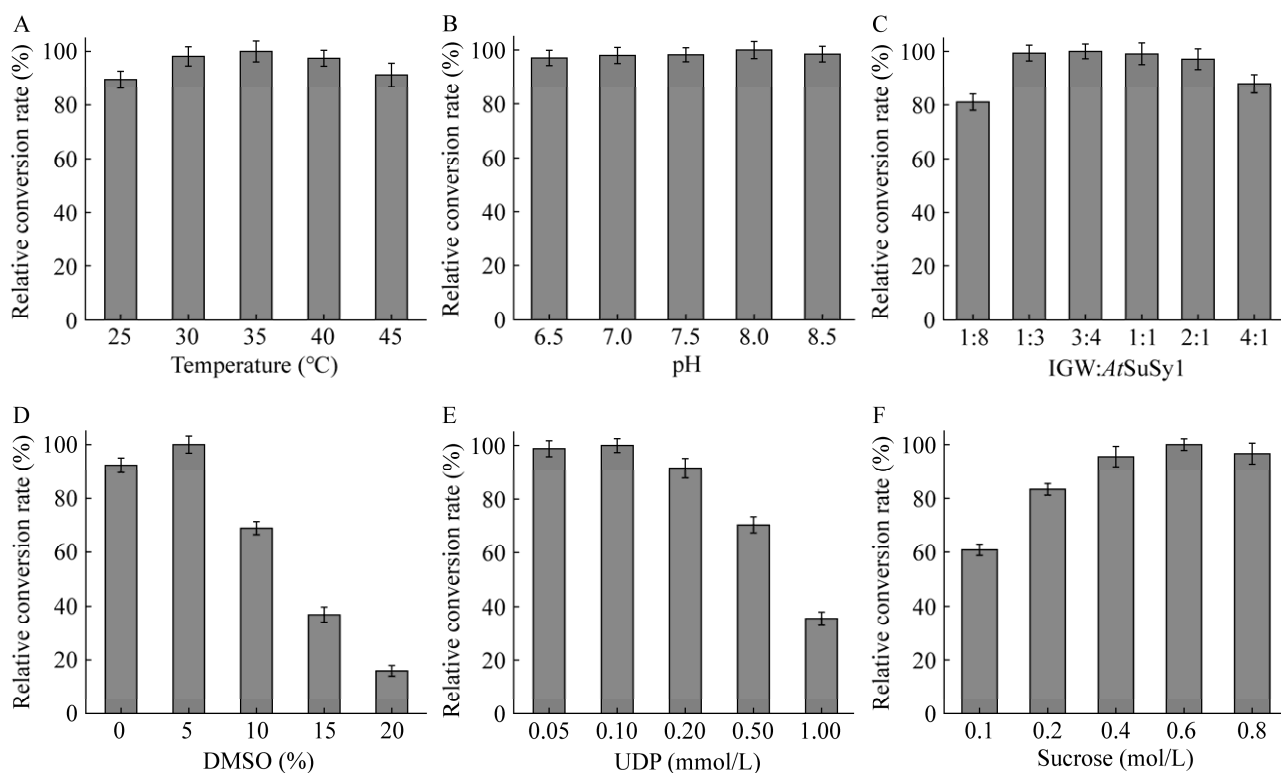


图 3 温度(A)、pH (B)、IGW:*AtSuSy1* (C)、DMSO 体积比(D)、UDP 浓度(E)及蔗糖浓度(F)对 IGW/*AtSuSy1* 偶联反应生成虎杖苷的影响

Figure 3 Influence of temperature (A), pH (B), IGW:*AtSuSy1* (mU/mL) (C), DMSO volume ratio (D), UDP concentration (E) and sucrose concentration (F) on the production of polydatin by the IGW/*AtSuSy1* cascade reaction.



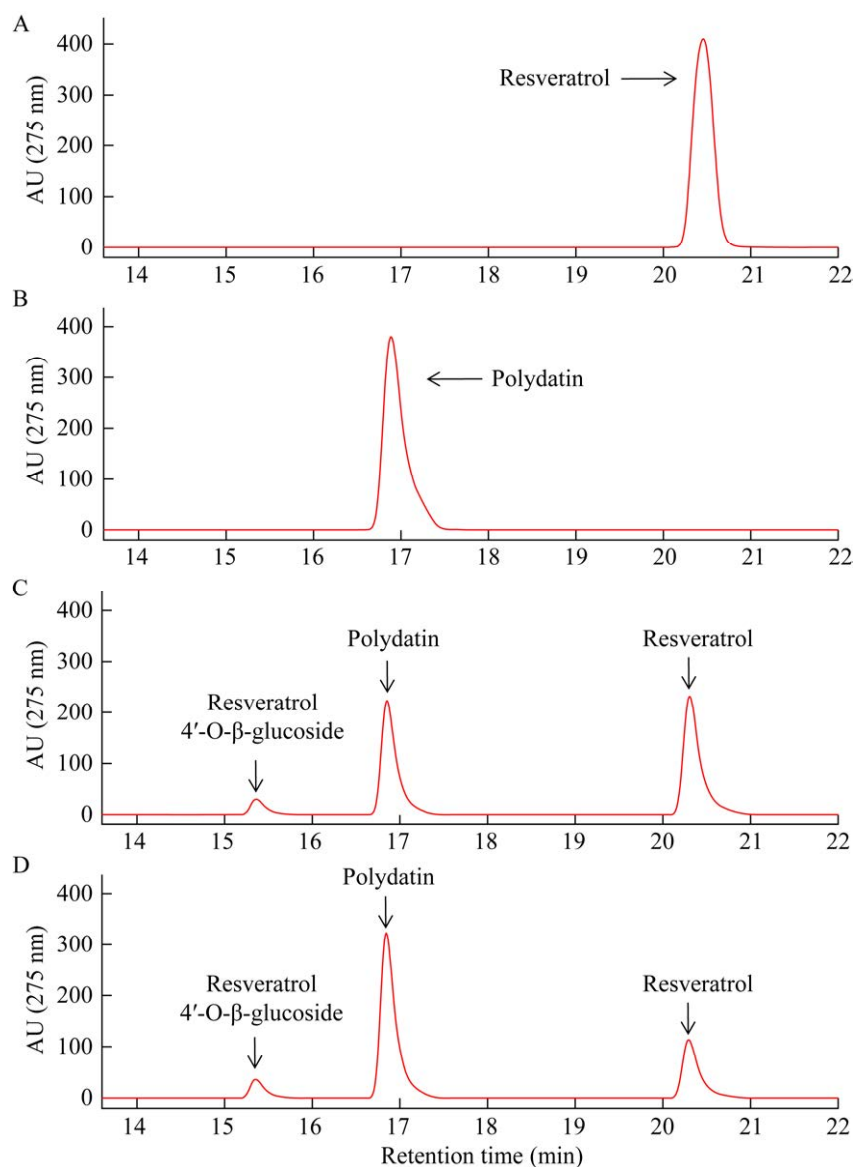


图4 白藜芦醇标准品(A)和虎杖苷标准品(B) HPLC 图谱以及单酶 IGW 体系(C)和 IGW/*AtSuSy1* 偶联反应体系(D)经 1 h 催化 2 mmol/L 白藜芦醇的 HPLC 结果对比

Figure 4 HPLC analysis of resveratrol standard (A) and polydatin standard (B) and comparison of HPLC results of 2 mmol/L resveratrol catalyzed by the single enzyme IGW system (C) and the IGW/*AtSuSy1* cascade reaction (D) for 1 h.

即可实现糖基供体 UDPG 的再生以及 UDP 的循环利用, 不需要额外添加大量昂贵的 UDPG, 这表明双酶体系较单酶体系而言更加遵循经济节约原则。因此, 经条件优化之后的 IGW/*AtSuSy1* 双酶偶联体系是较为理想的合成虎杖苷的反应

体系。

## 2.4 IGW/*AtSuSy1* 偶联反应分批补料一锅法合成虎杖苷

为了提高转化率并避免高浓度底物白藜芦醇对双酶偶联反应的抑制<sup>[22]</sup>, 本研究通过

IGW/*AtSuSy1* 偶联反应的分批补料策略来提高虎杖苷的生产水平。反应体系为 10 mL, 在分批补料之前对底物白藜芦醇浓度进行优化, 浓度小于 2 mmol/L 时转化率均大于 80%; 浓度大于 2 mmol/L 时转化率大幅下降, 因此分批补料的底物浓度为 2 mmol/L。如图 5 所示, 底物白藜芦醇的初始浓度为 2 mmol/L, 1 h 和 2 h 后分别向反应体系中加入 2 mmol/L 白藜芦醇, 白藜芦醇转化率均达到 80% 以上; 在 2–8 h 每隔 2 h 加入 2 mmol/L 白藜芦醇, 其转化率在 80% 左右, 这表明在前期双酶酶活均较高, 随着时间的延长双酶活性降低。24 h 内共经过 9 次白藜芦醇的分批补料, 在 UDP 浓度为 0.10 mmol/L 的条件下, 双酶偶联体系对 20 mmol/L 总白藜芦醇的糖基化效率为 80.4%, 根据 UDPG 的再生循环数计算公式得到 UDPG 再生循环数可达 161。24 h 后,

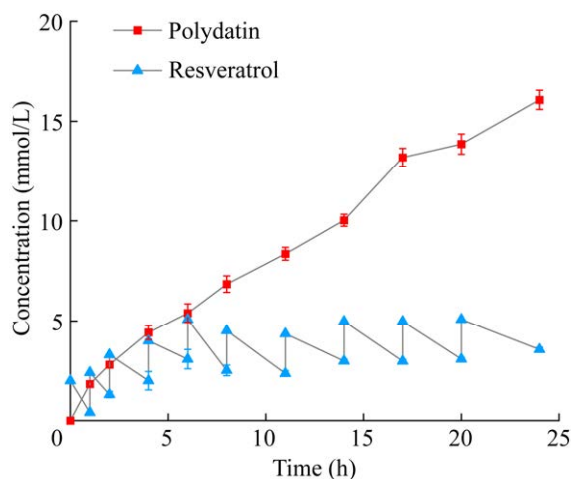


图 5 一锅法分批补料合成虎杖苷 在 1、2、4、6、8、11、14、17、20 h 时向反应液中加入 2 mmol/L 白藜芦醇, 在 6 h 和 10 h 时加入新鲜酶(150 mU/mL IGW 和 200 mU/mL *AtSuSy1*)。

Figure 5 One-pot synthesis of polydatin by fed-batch reaction. 2 mmol/L resveratrol was added to the reaction mixtures at 1, 2, 4, 6, 8, 11, 14, 17 and 20 h. Fresh enzymes (150 mU/mL IGW and 200 mU/mL *AtSuSy1*) were added at 6 h and 10 h.

产物虎杖苷逐渐积累, 最终产量达到 6.28 g/L, 这表明基于分批补料的 IGW/*AtSuSy1* 偶联策略可以实现虎杖苷的高效制备。

## 2.5 产物结构分析

因硅胶柱层析法具有方便、快速、分离纯化效果好等优点<sup>[23]</sup>, 所以本研究选择用硅胶柱层析法分离纯化虎杖苷。最终 10 mL 反应体系经 HPLC 分析, 产物虎杖苷理论产量为 62.8 mg, 萃取和柱层析之后, 最终纯化出的虎杖苷为 54.4 mg, 分离摩尔收率为 86.6%。如图 6 所示, 将纯化的虎杖苷进行 HPLC 以及核磁共振氢谱分析。利用 MestReNova 9.0 软件处理核磁数据, 核磁共振氢谱数据为  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  9.53 (s, 2H), 7.40 (d,  $J=8.5$  Hz, 2H), 7.03 (d,  $J=16.3$  Hz, 1H), 6.87 (d,  $J=16.3$  Hz, 1H), 6.77 (d,  $J=8.5$  Hz, 2H), 6.73 (s, 1H), 6.57 (s, 1H), 6.35 (s, 1H), 5.30 (s, 1H), 5.10 (s, 1H), 5.05 (s, 1H), 4.81 (d,  $J=7.6$  Hz, 1H), 4.66 (s, 1H), 3.73 (d,  $J=9.7$  Hz, 1H), 3.40–3.10 (m, 6H)。

## 3 讨论与结论

糖基化可以将溶解性及稳定性差的化合物转化为相应的水溶性好和稳定性强的糖苷类化合物, 从而提高其生物利用度<sup>[24]</sup>, 如黄酮类化合物、萜类化合物和聚酮类化合物等经糖基化后, 被广泛用于药物、食品加工及营养保健品<sup>[3]</sup>。一直以来, 白藜芦醇的多种药理活性在多个行业应用较广, 但是极低的水溶性阻碍了其进一步的开发利用。虎杖苷作为白藜芦醇的一种糖苷类化合物备受关注, 药理研究表明, 虎杖苷对多种组织器官如肺部、肝脏、肾脏、骨髓等具有保护作用<sup>[25]</sup>, 另外, 它在抗炎、抗氧化、调节糖代谢、脂代谢等方面也具有明显效果<sup>[26-29]</sup>。虎杖苷的制备从开始的植物提取到化学合成再到微生物发酵, 其工艺随着技术的发展不断更新, 酶法合成近年来成为虎杖苷制备的有效方

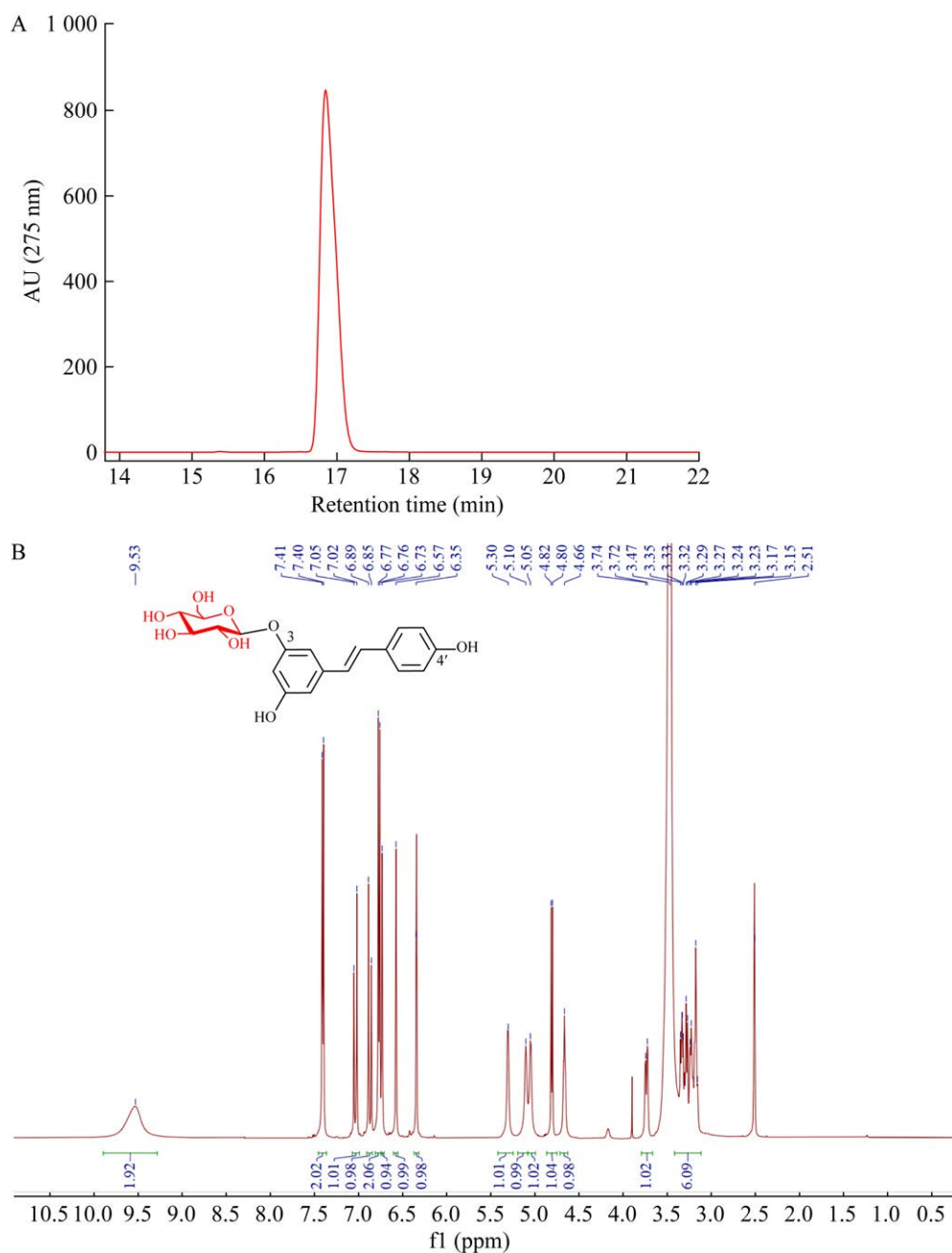


图 6 纯化后的虎杖苷液相图(A)和氢谱图(B)

Figure 6 HPLC analysis of purified polydatin (A) and  $^1\text{H}$  NMR of polydatin (B).

法。来源于枯草芽孢杆菌的糖基转移酶  $\text{UGT}_{\text{BS}}$ ，经研究发现对 19 个结构多样的化合物都表现出苷元多元性，同时  $\text{UGT}_{\text{BS}}$  能够以 UDPG 为糖基供体催化形成 O-、N-和 S-糖苷类化合物<sup>[30]</sup>，是一种底物谱较广的糖基转移酶。UDPG 由于

其价格昂贵，且难以从自然界中提取，因此发展了化学和生物技术人工合成 UDPG 的方法<sup>[31]</sup>。蔗糖合酶能够高效催化 UDPG 的一步生成<sup>[32]</sup>，因此利用糖基转移酶催化合成糖苷类化合物时，可与蔗糖合酶建立双酶偶联体系，实现 UDPG

的再生从而降低产物的合成成本。

本研究利用实验室前期经 UGT<sub>BS</sub> 改造后获得的糖基转移酶三联突变体 IGW 与 AtSuSy1 成功构建双酶偶联体系, 实现了虎杖苷的酶法合成。三联突变体 IGW 与 AtSuSy1 的双酶偶联体系涉及 2 个反应: 蔗糖与 UDP 在蔗糖合酶 AtSuSy1 的催化下生成果糖及 UDPG; 白藜芦醇和 UDPG 在糖基转移酶三联突变体 IGW 的催化下生成产物虎杖苷, 因此此反应体系的条件较为复杂, 为得到最优的反应条件, 对此体系的温度、pH、双酶酶活比、DMSO 体积比、UDP 及蔗糖浓度进行条件优化。在最优条件下, 2 mmol/L 白藜芦醇 1 h 转化率达到 80.6%。

综上所述, 利用糖基转移酶 UGT<sub>BS</sub> 三联突变体 IGW 与 AtSuSy1 构建的双酶偶联体系在整个反应过程中不需要单酶体系中昂贵的 UDPG 参与, 仅需加入价格低廉的 UDP 和蔗糖就能够实现 UDPG 的再生以及 UDP 的循环利用, 且优化后的双酶偶联体系较单酶体系提高了反应速率, 显著缩短了反应时间。利用双酶偶联分批补料策略, 24 h 虎杖苷产量达到 6.28 g/L, 显著高于基于酿酒酵母代谢工程所获得的产量<sup>[8]</sup>。因此, 基于双酶偶联一锅法合成虎杖苷的研究有助于降低成本, 为实现虎杖苷的绿色高效合成奠定了理论和应用基础。

## REFERENCES

- [1] 李延姣, 张徽, 黎俊, 解露, 喻洁, 鄂子健, 王淑静. 白藜芦醇药理活性及作用机制研究进展[J]. 食品与药品, 2021, 23(3): 284-288.  
LI YJ, ZHANG H, LI J, XIE L, YU J, E ZJ, WANG SJ. Research progress on pharmacological activity and action mechanism of resveratrol[J]. Food and Drug, 2021, 23(3): 284-288 (in Chinese).
- [2] 赵千婧, 程瑶, 王佳, 孙新晓, 申晓林, 袁其朋. 糖基转移酶合成相关糖苷类化合物研究进展[J]. 北京化工大学学报(自然科学版), 2018, 45(5): 92-99.  
ZHAO QJ, CHENG Y, WANG J, SUN XX, SHEN XL, YUAN QP. Advances in the use of glycosyltransferases in glycoside synthesis[J]. Journal of Beijing University of Chemical Technology (Natural Science Edition), 2018, 45(5): 92-99 (in Chinese).
- [3] WEN ZX, ZHANG ZM, ZHONG L, FAN JQ, LI M, MA YH, ZHOU Y, ZHANG W, GUO B, CHEN B, WANG JB. Directed evolution of a plant glycosyltransferase for chemo- and regioselective glycosylation of pharmaceutically significant flavonoids[J]. ACS Catalysis, 2021, 11(24): 14781-14790.
- [4] WANG JL, FENG J, XU L, MA JP, LI JL, MA R, SUN K, WANG ZB, ZHANG HQ. Ionic liquid-based salt-induced liquid-liquid extraction of polyphenols and anthraquinones in *Polygonum cuspidatum*[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2019, 163: 95-104.
- [5] KUO CH, CHEN BY, LIU YC, CHANG CM, DENG TS, CHEN JH, SHIEH CJ. Optimized ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Polygonum cuspidatum*[J]. Molecules, 2013, 19(1): 67-77.
- [6] DU FY, XIAO XH, LI GK. Application of ionic liquids in the microwave-assisted extraction of trans-resveratrol from *Rhizma Polygoni Cuspidati*[J]. Journal of Chromatography A, 2007, 1140(1/2): 56-62.
- [7] 任薇, 李少华, 陈雪娇. 低共熔溶剂对虎杖中虎杖苷的高效绿色提取工艺优化研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2023, 25(5): 52-57.  
REN W, LI SH, CHEN XJ. Optimization of green extraction process of polydatin from Huzhang (*Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix*) by deep eutectic solvent[J]. Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2023, 25(5): 52-57 (in Chinese).
- [8] LIU T, LIU YQ, LI L, LIU XN, GUO ZK, CHENG J, ZHU XX, LU LN, ZHANG JL, FAN GW, XIE NZ, LU J, JIANG HF. De novo biosynthesis of polydatin in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(21): 5917-5925.
- [9] SHANG YZ, ZHANG P, WEI WP, LI J, YE BC. Metabolic engineering for the high-yield production of polydatin in *Yarrowia lipolytica*[J]. Bioresource Technology, 2023, 381: 129129.
- [10] 李寅. 合成生物制造 2022[J]. 生物工程学报, 2023, 39(3): 807-841.  
LI Y. Biomanufacturing driven by engineered organisms (2022)[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 807-841 (in Chinese).
- [11] SHI WG, ZHANG GY, MA ZJ, LI LS, LIU MM, QIN L, YU ZY, ZHAO L, LIU Y, ZHANG X, QIN JJ, YE HL, JIANG XY, ZHOU HN, SUN H, JIAO ZY. Hyperactivation of HER2-SHCBP1-PLK1 axis promotes tumor cell mitosis and impairs trastuzumab sensitivity to gastric cancer[J]. Nature Communications, 2021, 12: 2812.
- [12] LIU F, DING FY, SHAO WM, HE BF, WANG GJ. Regulated preparation of Crocin-1 or Crocin-2' triggered by the cosolvent DMSO using Bs-GT/At-SuSy one-pot reaction[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(45): 12496-12501.
- [13] LI GS, WANG W, GUO H, YI SY, WANG F, HUANG SP, HU N, XU QL, ZANG YJ, HAN BX, YIN XJ. Mutability landscape guided engineering of a

- promiscuous microbial glycosyltransferase for regioselective synthesis of salidroside and icaricide D2[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 263(Pt 1): 130229.
- [14] HAN RZ, FANG HH, FAN ZY, JI Y, SCHWANEBERG U, NI Y. Coupled reaction of glycosyltransferase and sucrose synthase for high-yielding and cost-effective synthesis of rosin[J]. *Molecular Catalysis*, 2023, 540: 113035.
- [15] DAI LH, LIU C, LI J, DONG CX, YANG JG, DAI ZB, ZHANG XL, SUN YX. One-pot synthesis of ginsenoside Rh2 and bioactive unnatural ginsenoside by coupling promiscuous glycosyltransferase from *Bacillus subtilis* 168 to sucrose synthase[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(11): 2830-2837.
- [16] LIU B, ZHAO C, XIANG QY, ZHAO NL, LUO YZ, BAO R. Structural and biochemical studies of the glycosyltransferase Bs-YjiC from *Bacillus subtilis*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 166: 806-817.
- [17] CHEN TY, CHEN ZY, WANG N, CHU JL, FAN B, CHENG C, QIN S, HE BF. Highly regioselective and efficient biosynthesis of polydatin by an engineered UGT<sub>BL1</sub>-ArSuSy cascade reaction[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(31): 8695-8702.
- [18] 汪薛良, 钮成拓, 包敏, 李崎, 王金晶.  $\beta$ -淀粉酶酶活力测定方法改进及应用[J]. *东北农业大学学报*, 2019, 50(2): 56-61.  
WANG XL, NIU CT, BAO M, LI Q, WANG JJ. Improvement and application of determination method for enzyme activity of  $\beta$ -amylase[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2019, 50(2): 56-61 (in Chinese).
- [19] EL-ZAHAB B, JIA HF, WANG P. Enabling multienzyme biocatalysis using nanoporous materials[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2004, 87(2): 178-183.
- [20] MA W, ZHAO L, MA YD, LI YQ, QIN S, HE BF. Oriented efficient biosynthesis of rare ginsenoside Rh2 from PPD by compiling UGT-YjiC mutant with sucrose synthase[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 146: 853-859.
- [21] LI GS, XU QL, HU N, LIU XY, JIANG YQ, XUE HL, ZANG YJ, ZHU FC. Highly efficient biosynthesis of salidroside by a UDP-glucosyltransferase-catalyzed cascade reaction[J]. *Biotechnology Letters*, 2024, 46(2): 173-181.
- [22] CHU JL, GE Y, DONG WX, WU B, QIN S, HE BF. One-pot cascade reaction coupling a microbial glycosyltransferase to sucrose synthase for high-level production of cinnamyl alcohol mono-glucoside[J]. *Molecular Catalysis*, 2024, 553: 113730.
- [23] 于春刚, 李小平, 刘黎莎, 卢晓东, 李荣运, 韩志武. 硅胶柱层析法分离纯化没食子儿茶素没食子酸酯[J]. *中国药业*, 2023, 32(22): 77-80.
- YU CG, LI XP, LIU LS, LU XD, LI RY, HAN ZW. Separation and purification of epigallocatechin gallate by silica gel column chromatography[J]. *China Pharmaceuticals*, 2023, 32(22): 77-80 (in Chinese).
- [24] SHIMODA K, OTSUKA T, MORIMOTO Y, HAMADA H, HAMADA H. Glycosylation and malonylation of quercetin, epicatechin, and catechin by cultured plant cells[J]. *Chemistry Letters*, 2007, 36(10): 1292-1293.
- [25] MOSTAFA F, GALALY SR, MOHAMED HM, ABDEL-MONEIM A, ABDUL-HAMID M. Ameliorative effect of polydatin and polydatin-loaded chitosan nanoparticles against diabetes-induced pulmonary disorders in rats[J]. *Journal of Taibah University for Science*, 2021, 15(1): 37-49.
- [26] 林思, 秦慧真, 邓玲玉, 张森, 谢凤凤, 朱华. 虎杖苷药理作用及机制研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(22): 241-250.  
LIN S, QIN HZ, DENG LY, ZHANG M, XIE FF, ZHU H. Research progress on pharmacological effect and mechanism of polydatin[J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2021, 27(22): 241-250 (in Chinese).
- [27] 王亚运, 张琪. 虎杖苷的药理作用研究进展[J]. *医学综述*, 2017, 23(5): 989-991, 996.  
WANG YY, ZHANG Q. Research progress of polydatin pharmacologic actions[J]. *Medical Recapitulate*, 2017, 23(5): 989-991, 996 (in Chinese).
- [28] LI T, LIU YT, LI GC, WANG X, ZENG ZH, CAI SM, LI FY, CHEN ZQ. Polydatin attenuates ipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats[J]. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2014, 7(12): 8401-8410.
- [29] HUANG KP, CHEN C, HAO J, HUANG JY, WANG SG, LIU PQ, HUANG HQ. Polydatin promotes Nrf2-ARE anti-oxidative pathway through activating Sirt1 to resist AGEs-induced upregulation of fibronectin and transforming growth factor- $\beta$ 1 in rat glomerular mesangial cells[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2015, 399: 178-189.
- [30] DAI LH, LI J, YAO PY, ZHU YM, MEN Y, ZENG Y, YANG JG, SUN YX. Exploiting the aglycon promiscuity of glycosyltransferase Bs-YjiC from *Bacillus subtilis* and its application in synthesis of glycosides[J]. *Journal of Biotechnology*, 2017, 248: 69-76.
- [31] DINEV Z, WARDAK AZ, BROWNLEE RTC, WILLIAMS SJ. A convenient gram-scale synthesis of uridine diphospho( $^{13}\text{C}$ )glucose[J]. *Carbohydrate Research*, 2006, 341(10): 1743-1747.
- [32] SCHMÖLZER K, GUTMANN A, DIRICKS M, DESMET T, NIDETZKY B. Sucrose synthase: a unique glycosyltransferase for biocatalytic glycosylation process development[J]. *Biotechnology Advances*, 2016, 34(2): 88-111.