酶促水解斯替夫苷制甜茶苷及其反应路径解析

周卓愉[1,2]，夏咏梅[*1,2]

（1. 江南大学 化学与材料工程学院，江苏 无锡 214122；2. 食品科学与技术国家重点实验室，江南大学，江苏 无锡 214122）

摘要：β-葡萄糖苷酶可催化水解斯替夫苷生成甜茶苷，但是斯替夫苷分子中具有3个以β-1,2键连接的葡萄糖残基；反应过程中可能产生甜茶苷、甜菊双糖苷、甜菊醇单葡萄糖酯、甜菊单糖苷和甜菊醇。该水解反应的副产物的结构解析较少，反应路径解析更少，合成通量也较低，不利于工业化。以来自 *Aspergillus niger* 的β-葡萄糖苷酶催化水解斯替夫苷高通量生成甜茶苷，并通过底物特异性分析实验、产物和副产物结构解析以及过程中各组分经时变化的分析，解析β-葡萄糖苷酶催化水解斯替夫苷的具体过程。实验结果表明，该酶对斯替夫苷具有特异性，水解主产物为甜茶苷，首次阐明副产物甜菊醇单葡萄糖酯由斯替夫苷直接水解槐糖基生成，而非甜茶苷的进一步水解产物。

关键词：甜茶苷；斯替夫苷；β-葡萄糖苷酶；酶催化路径；甜菊醇单葡萄糖酯

中图分类号：TS 201.1　**文章编号：**1673-1689(2021)05-0053-07　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.05.007

Enzymatic Preparation of Rubusoside from Stevioside and Its Reaction Route

ZHOU Zhuoyu[1,2]，*XIA Yongmei*[*1,2]

(1. School of Chemical and Materials Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: β-glucosidase may stimulate hydrolysis of stevioside to produce rubusoside. However, there are three β-1,2-glucose residues in stevioside molecule, which may produce rubusoside, steviolbioside, steviol glucosyl ester, steviolmonoside and steviol during the hydrolysis. To date, the structures of by-products remain unclear, and the analysis of reaction route is even more limited. The reported production throughput is not high enough for industry production. β-glucosidase from *Aspergillus niger* was applied to catalyze the hydrolysis of stevioside for rubusoside production in high-throughput. This reaction route was analyzed through substrate specificity test, structural characterization of products and by-products, and analysis of real-time composition. The results indicate that the enzyme is specific to stevioside. The main hydrolysis product is rubusoside, and it is demonstrated for the first time that the by-product, steviol glucosyl ester, is directly produced by hydrolyzing sophorosyl group of stevioside instead of the hydrolysate of rubusoside.

Keywords: rubusoside, stevioside, β-glucosidase, catalytic pathway, steviol glucosyl ester

收稿日期：2020-01-22

基金项目：国家自然科学基金项目(31772017，31371837)；国家轻工业技术与工程一流学科计划项目(LITE2018-03)。

* **通信作者：**夏咏梅(1965—)，女，博士，教授，博士研究生导师，主要从事酶工程、精细化学品合成与应用研究。

E-mail：ymxia@jiangnan.edu.cn

甜茶苷（Rubusoside,13-O-β-glucosyl-19-O-β-D-glucosyl-steviol,Ru）是一种稀少的天然甜味剂,少量存在于我国特有珍稀植物甜茶中[1-2],产量较低且受气候、产地等因素影响。目前尚无化学全合成甜茶苷的报道。由于斯替夫苷(Stevioside,13-O-β-sophorosyl-19-O-β-D-glucosyl-steviol,St)与甜茶苷的结构相似性(甜茶苷仅在C13位比斯替夫苷少一个β-1,2连接的葡萄糖基)，已有许多关于酶法催化水解斯替夫苷制备甜茶苷的报道（表1)。然而,目前的研究尚有一些未决问题,例如甜茶苷的产率较低、副产物结构及反应路径不明等。

斯替夫苷具有3个以β-糖苷键链接的葡萄糖残基,酶催化反应下葡糖基单元的连续水解及重排可能产生:甜茶苷、甜菊双糖苷、甜菊醇单葡萄糖酯、甜菊单糖苷或甜菊醇[9](图1)。目前对于甜菊糖苷的鉴定,通常仅采用HPLC以及LC-MS确定相对分子质量以及保留时间。然而,互为同分异构体的甜菊糖苷在HPLC中具有近似甚至相同的保留时间,仅上述表征手段无法明确副产物的结构。

酶对不同糖苷键的特异性水解决定了副产物中葡萄糖基的连接方式。例如相对分子质量为480的单葡萄糖基甜菊醇,其可能的结构为甜菊单糖苷(葡萄糖基接于C-13位)或甜菊醇单葡萄糖酯(葡萄糖基接于C-19位),其可能是斯替夫苷直接水解产生的一级水解产物亦可能是甜茶苷进一步水解产生的二级产物。明确产物结构及反应方式有助于进一步了解酶的催化反应机理。

本研究首次确定了β-葡萄糖苷酶水解斯替夫苷产生的副产物结构及其生成方式,明确解析出β-葡萄糖苷酶催化水解斯替夫苷的反应路径。

表1　已报道的斯替夫苷水解制甜茶苷研究

Table 1　Reported studies on hydrolysis of stevioside to rubusoside

酶	St转化率/%	Ru产率/%	反应时间/h	疑似副产物	结构解析判据
β-半乳糖苷酶[3]	98.3	91.4	72	St转苷产物	LC-MS
β-半乳糖苷酶[4]	95.4	86	24	未报道	无
β-葡萄糖苷酶[5]	98.2	78.8	6	St异构体、St单葡萄糖基转苷产物	HPLC,LC-MS
β-葡萄糖苷酶[6]	未报道	66 (软件优化值)	12	甜菊醇单葡萄糖酯	NMR
β-葡萄糖苷酶[7]	100	未报道	24	未报道	TLC,HPLC,MS
β-葡萄糖苷酶[8]	98.6	99.9	6	未报道	HPLC

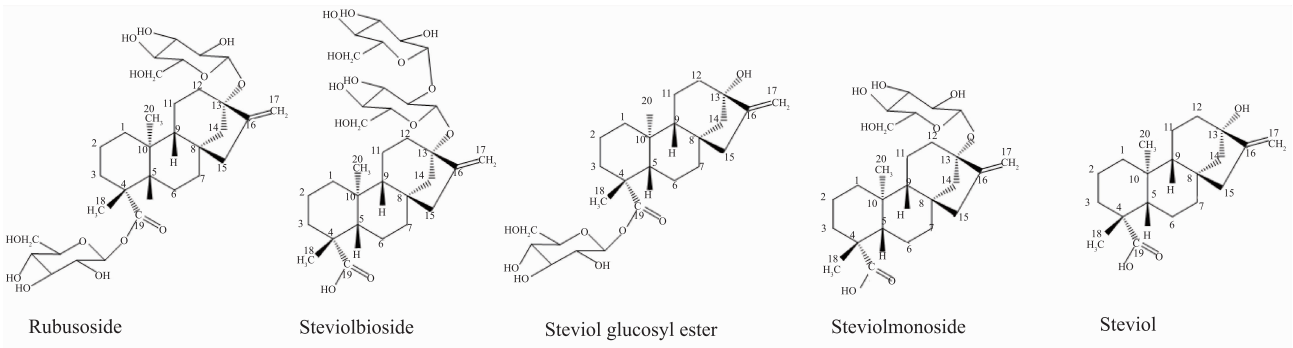


图1　斯替夫苷可能的水解产物

Fig. 1　Possible hydrolysis products of stevioside

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

来自*Aspergillus niger*的β-葡萄糖苷酶(ATCC® 16404,39 000 U/g):由江南大学吴敬教授提供;斯替夫苷(97%,HPLC):由诸城市浩天药业有限公司提供;乙腈(HPLC):购自Oceanpak(瑞典);甲醇、乙酸、乙酸钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、氯化铁、氯化铜、硝酸银、氯化镁、氯化钡、氯化钾:均购自国药集团化学试剂有限公司(上海)。

1.2 仪器与设备

液相色谱串联四极杆飞行时间质谱仪(Waters

Acquity UPLC 和 Waters Maldi Synapt Q-TOF MS):美国 Waters 公司产品;高效液相色谱仪2695(二极管阵列检测器 996,Masslynx 色谱工作站):美国 Waters 公司产品;KQ 22000 型超声波清洗器:昆山市超声仪器有限公司产品;EL 204 电子天平:上海梅特勒-托利多仪器有限公司产品;葡萄糖生物传感分析仪:山东省科学院生物研究所产品;核磁共振仪(Bruker Avance III 600):德国布鲁克公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 *β*-葡萄糖苷酶催化水解斯替夫苷　在 50 mL 锥形瓶中加入 20 mL 斯替夫苷溶液(质量浓度为 100 g/L),在 60 ℃下保温 30 min。加入1%底物质量的 *β*-葡萄糖苷酶,60 ℃水浴中振荡(150 r/min)反应 24 h。定时取样,用等体积甲醇终止反应。用葡萄糖生物传感分析仪测定不同时间反应液中葡萄糖质量浓度,斯替夫苷转化率、甜茶苷产率计算如下:

$$\text{St 转化率}(\%)=(C_0-C_t)/C_0\times100\% \quad (1)$$

$$\text{Ru 产率}(\%)=\frac{C_{Ru}/MW_{Ru}}{C_0/MW_{St}}\times100\% \quad (2)$$

式中:C_0 是反应液中 St 的初始质量浓度(g/L),C_t 是 t 时刻反应液中 St 的质量浓度 (g/L),C_{Ru} 是反应液中 Ru 的质量浓度(g/L);MW_{Ru}=642,MW_{St}=804,分别为 Ru 和 St 的摩尔质量。以斯替夫苷标准品的质量浓度-峰面积标准曲线计算出反应液中 St 与 Ru 的质量浓度。

1.3.2 水解产物的分离与结构表征　1.3.1 中所得反应液各组分的相对分子质量通过液相色谱串联四极杆飞行时间质谱仪 (Waters Acquity UPLC 和 Waters Maldi Synapt Q-TOF MS)进行鉴定。检测条件为:BEH HILIC 色谱柱 (2.1 mm×100 mm,1.7 μm),柱温 45 ℃;流动相组成:流动相 A(80%乙腈+0.1%氨水,体积分数),流动相 B(30%乙腈+0.1%氨水,体积分数);梯度洗脱:0~10 min,流动相 A 体积分数为 80%;10~20 min,流动相 A 体积分数从 80%线性减至 60%;20~26 min, 流动相 A 体积分数为 60%;26~27 min,流动相 A 体积分数从 60%线性增至 100%;27 min,流动相 A 体积分数为 100%,流速为 0.3 mL/min;进样量 1 μL,进样质量浓度 1 mg/mL。质谱条件:碰撞电压 6 V,锥孔电压 20 V,离子化方式为电喷雾电离(ESI),离子源温度 100 ℃,负离子检测模式,相对分子质量范围为 200~2 000。

通过制备 TLC 纯化水解产物,得相对分子质量为 480 与 1 128 的化合物 (用 Waters Maldi Synapt Q-TOF MS 鉴定)。洗脱剂为正丁醇:乙酸乙酯=4:1(体积比)的水饱和溶液。纯化所得水解产物溶解于氘代甲醇,用 Bruker Avance III 600 核磁共振仪,分别在 600 和 151 MHz 下记录 ^{1}H-NMR 和 ^{13}C-NMR 谱。用液氦冷冻探针于 25 ℃下测试。所有化学位移以氘代甲醇的 ^{1}H(3.3)和 ^{13}C(47.6)为基准。

1.3.3 斯替夫苷水解条件优化　采用单因素法考察温度、pH、金属离子、底物浓度、加酶量、反应时间及加酶方式对 *β*-葡萄糖苷酶水解斯替夫苷的影响。

2 结果与分析

2.1 水解产物结构解析

如图 2 所示,在 *β*-葡萄糖苷酶的催化下,斯替夫苷水解成相对分子质量分别为 642 与 480 的化合物,即二者分别比斯替夫苷少 1 个或 2 个葡萄糖基。用 NMR 分析纯化后的产物,二者的核磁 ^{1}H 和 ^{13}C 谱见图 3、图 4,水解主产物的质子化学位移汇总于表 2。主水解产物 (相对分子质量为 642)的 HMBC 图谱(支撑材料图 S1)有明显的葡萄糖 H1 与甜菊醇骨架 13 位、19 位上 C 的耦合信号峰,可以确定两个葡萄糖基分别连接在 C13 与 C19 位上,排除甜菊双糖苷的可能,确定主水解产物是甜茶苷。副水解产物(相对分子质量为 480)的化学位移通过对照文献报道值[10],确定其结构为甜菊醇单葡萄糖酯。

2.2 水解反应条件优化

前期实验表明,*β*-葡萄糖苷酶具有高效特异性水解斯替夫苷制备甜茶苷的能力(数据未发表);为便于工业化,进一步研究了该反应的最适条件,如图 5 所示。该酶的催化活性对温度较为敏感,在 60 ℃,pH 为 5 时具有最强催化活性(图 5(a)、(b));考虑到在纯水相中反应速度与 pH 为 5 时相近, 且不会引入用于调节 pH 所需的化合物, 后续试验均用纯水相作为反应介质。Fe^{3+}、Ag^{+}、Cu^{2+}对反应有明显抑制效果(图 5(c));可能是这些金属离子与酶形成配位键,从而影响了酶的活性,因此在生产中应尽量避免这类金属离子的混入。底物浓度不会影响水解反应的速率,表明在此浓度范围内,水解反应不存在底物抑制作用(图 5(d))。底物质量浓度为 200 mg/mL 时,加酶量为 300 U/g 底物, 反应 24 h 后St 转化率为 98.2%,Ru 的产率为 90.8%; 当加酶量为 800 U/g 底物,反应 12 h 后 St 的转化率达98.8%,Ru 的产率为

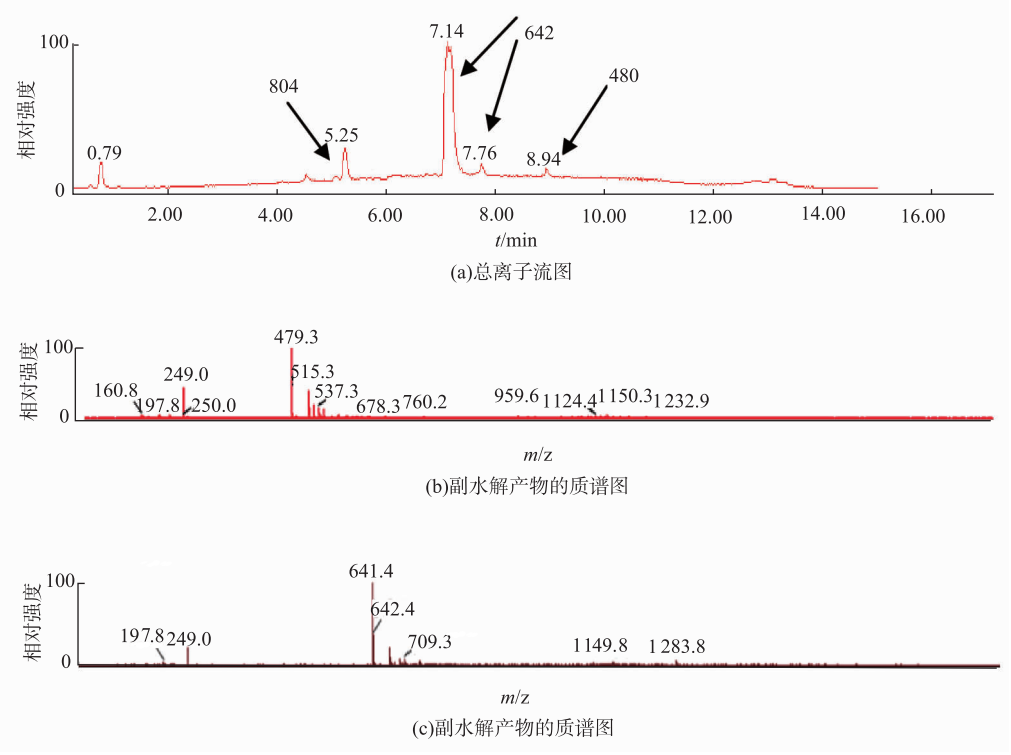


图 2　水解产物 LC–MS 图

Fig. 2　LC–MS spectra of the hydrolysis product

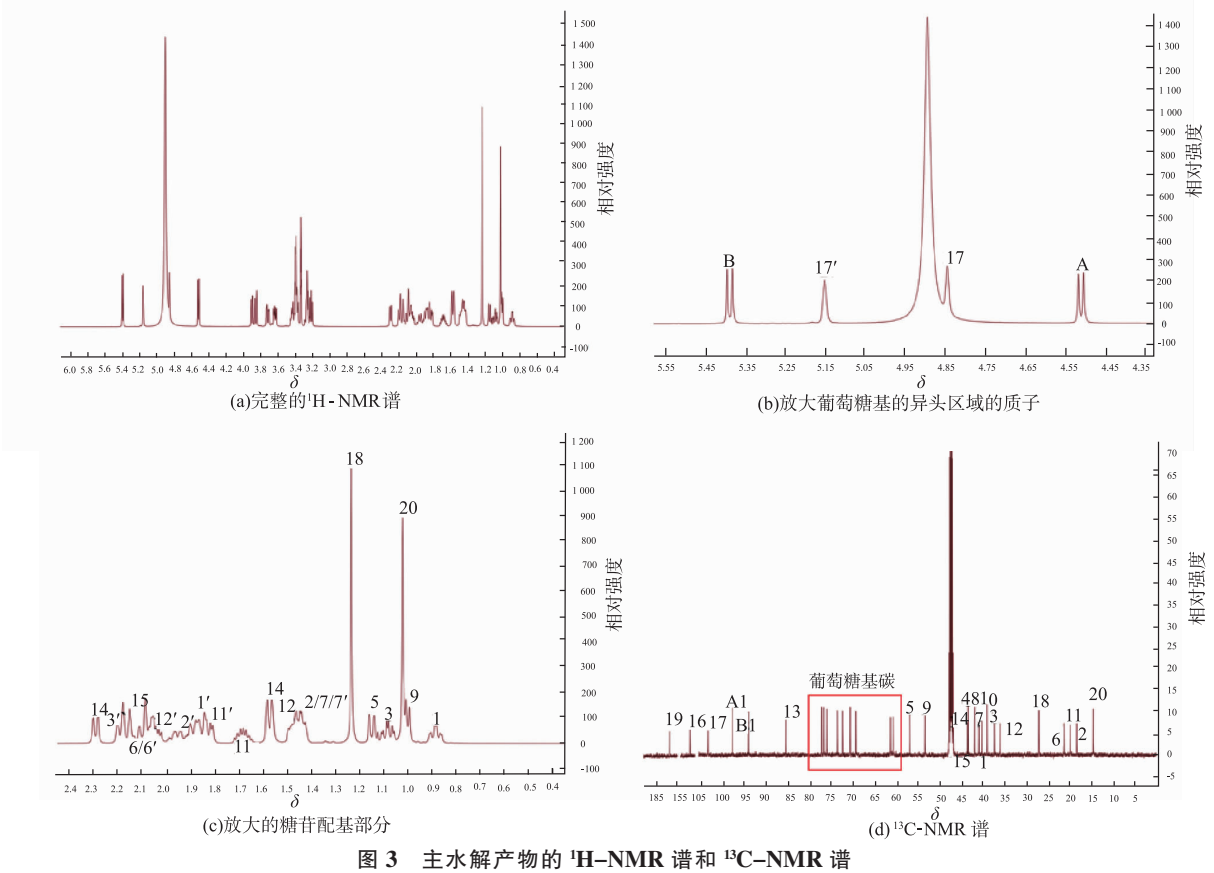
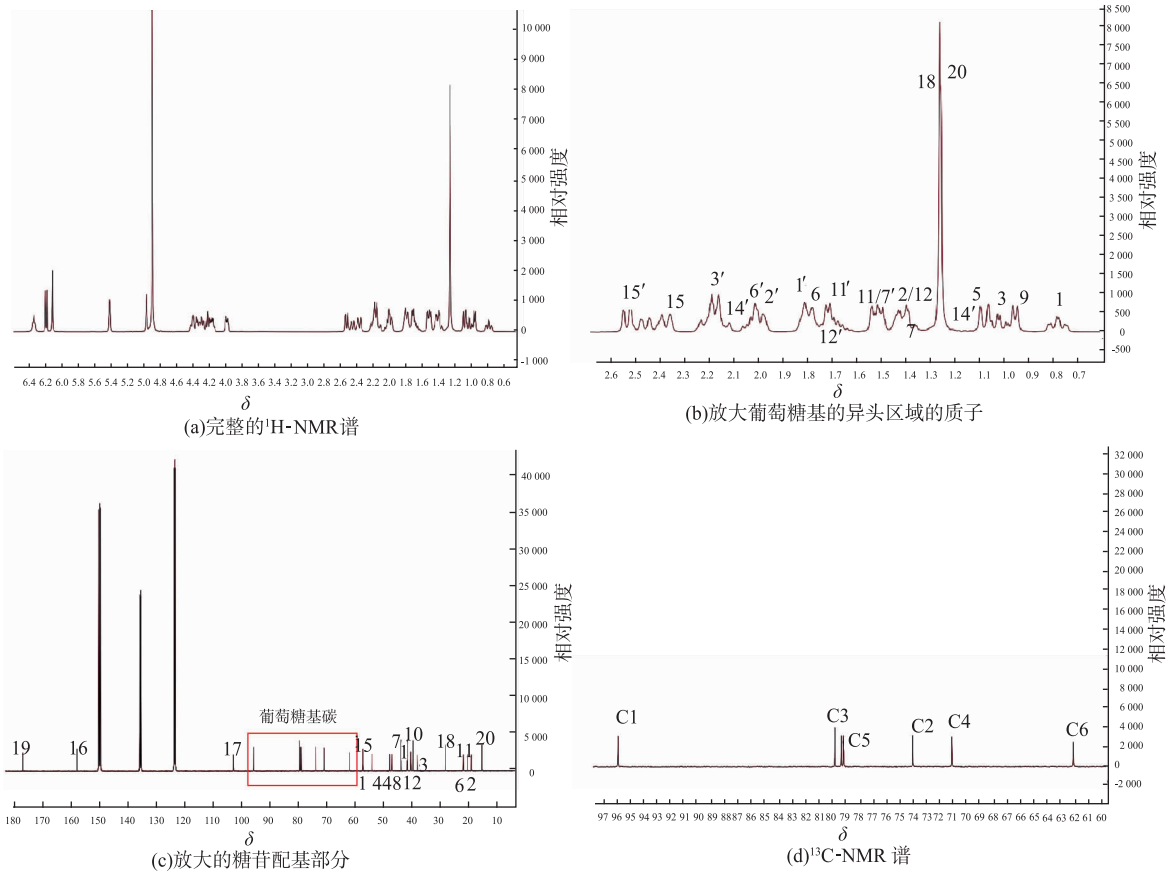


图 3　主水解产物的 ^{1}H–NMR 谱和 ^{13}C–NMR 谱

Fig. 3　^{1}H–NMR and ^{13}C–NMR profiles of the main hydrolysis product



(a)完整的^{1}H-NMR谱　(b)放大葡萄糖基的异头区域的质子

(c)放大的糖苷配基部分　(d)^{13}C-NMR 谱

图 4　副水解产物的 ^{1}H–NMR 谱和 ^{13}C–NMR 谱

Fig. 4　^{1}H–NMR profile and ^{13}C–NMR profile of the minor hydrolysis product

表 2　水解主产物的化学位移

Table 2　Chemical shifts of the main hydrolysis product

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
C	40.5	18.7	37.6	43.7	57.1	21.6	41.2	42.1	53.6	39.4
H	0.87	1.45	1.07	–	1.15	2.08	1.42	–	1.00	–
H′	1.88	1.93	2.19	–	–	2.11	1.44	–	–	–
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
C	20.1	36.3	85.6	43.8	47.2	153.4	103.4	27.4	177.1	14.9
H	1.68	1.48	–	1.57	2.09	–	4.85	1.23	–	1.01
H′	1.83	2.04	–	2.29	2.16	–	5.15	–	–	–

葡萄糖单元	H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6/C6
A	4.51/97.8	3.21/73.8	3.39/76.9	3.25/70.8	3.25/76.2	3.63/61.6
B	5.39/94.3	3.23/72.6	3.43/77.4	3.38/69.6	3.43/77.3	3.71/60.9

90.4%。增大加酶量不会明显改变 St 的转化率及 Ru 的产率。水解反应是一个平衡反应,为了尽可能减少副产物的生成,可在 St 转化率达 40%左右时移去甜茶苷(图 5(e)、(f))。受 St 溶解度限制,难以在反应温度下配制高浓度的 St 溶液用于工业生产,而产物 Ru 作为一种增溶剂,不仅自身溶解度高,并且能有效提高 St 在水中的溶解度,如图 5(g)所示,采用流加 St 的方式,最高可实现质量分数为 55%的 St 制备 Ru,有利于工业上 Ru 大规模生产。

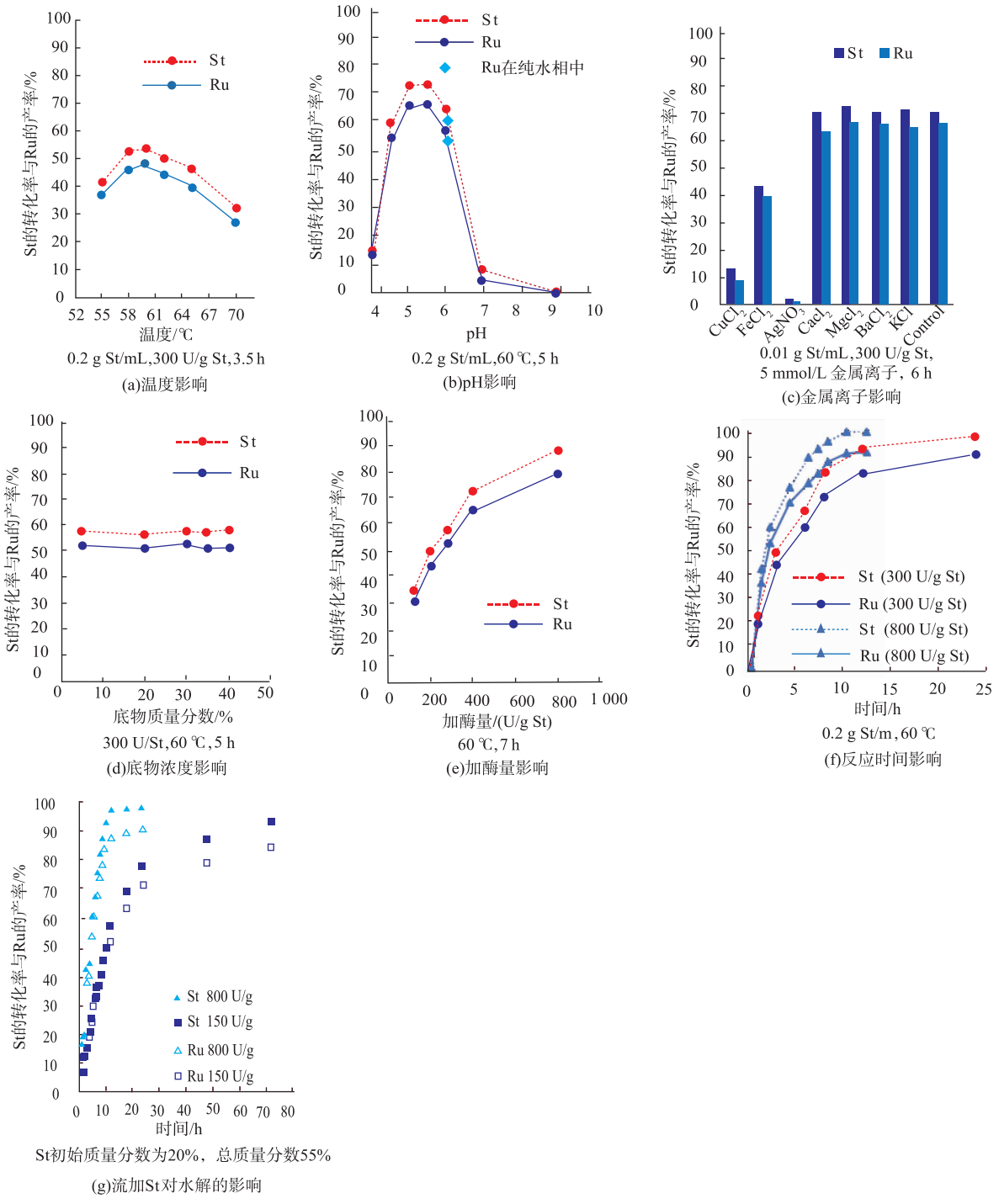
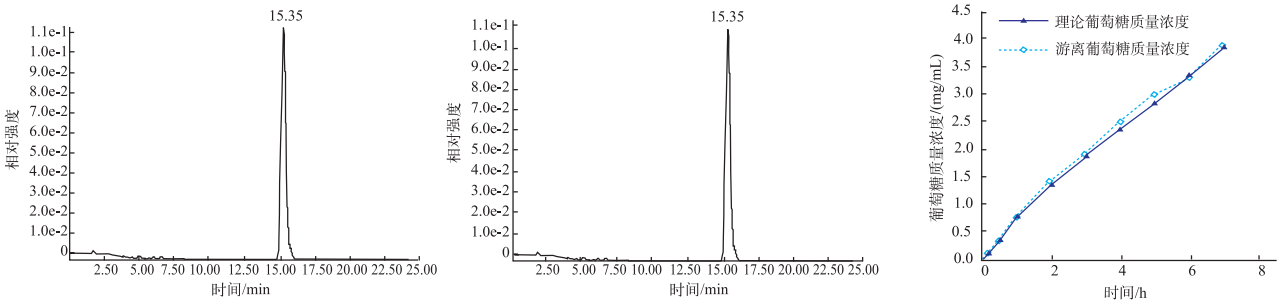


图 5　黑曲霉 *β*–葡萄糖苷酶催化水解斯替夫苷反应条件优化

Fig. 5　Single factor test on production of Ru from St with the *β*–glucosidase from *Aspergillus niger*

2.3　水解途径确定

通过实时检测反应液中的游离葡萄糖含量,以及对甜茶苷的单独酶促水解实验,来进一步确定反应过程,特别是副产物甜菊醇单葡萄糖酯的生成方式。由图 6(a)、(b)可知,*β*–葡萄糖苷酶不能催化甜茶苷的水解;由此可推断:原水解反应体系中的甜菊醇单葡萄糖酯是由 St 直接水解得到。图 6(c)中 St 水解时溶液中游离葡萄糖含量与理论值的差值归因于副产物甜菊醇单葡萄糖酯的生成。



(a)纯化后Ru的HPLC图　(b)Ru与3 000 U/g β-葡萄糖苷酶于60 ℃下反应24 h产物的HPLC图　(c) St水解时溶液中游离葡萄糖质量浓度和理论葡萄糖质量浓度

图 6　St 水解途径的确定

Fig. 6　Determination of St hydrolysis pathway

3 结　语

关于水解斯替夫苷制备甜茶苷已有一系列报道,然而尚无对水解反应的具体副产物及反应过程的解析。本研究采用来自 *Aspergillus niger* 的β–葡萄糖苷酶高效特异性水解斯替夫苷。通过过程分析,确定主要的水解产物为甜茶苷,副产物为甜菊醇单葡萄糖酯。在加酶量为 800 U/g 底物时,仅 12 h,斯替夫苷的转化率就可达 98.8%,产率为 90.1%。该水解反应无底物抑制作用,连续加酶有利于工业上甜茶苷的高通量生产。同时,明确了β–葡萄糖苷酶水解斯替夫苷的水解过程,有利于对该酶催化反应机理的进一步认识。

参考文献:

[1] OHTANI K,AIKAWA Y,KASAI R,et al. Minor diterpene glycosides from sweet leaves of Rubus suavissimus[J]. **Phytochemis–try**,1992,31(31):1553-1559.

[2] GAR Y K,GUIXIN C,ZHIJUN L. Purification of a water extract of Chinese sweet tea plant (*Rubus suavissimus* S. Lee) by alcohol precipitation[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2009,57(11):5000-5006.

[3] WAN H D,TAO G J,KIM D,et al. Enzymatic preparation of a natural sweetener rubusoside from specific hydrolysis of stevioside with beta-galactosidase from *Aspergillus* sp.[J]. **Journal of Molecular Catalysis B–Enzymatic**,2012,82:12-17.

[4] NGUYEN T T H,JUNG S J,KANG H K,et al. Production of rubusoside from stevioside by using a thermostable lactase from *Thermus thermophilus* and solubility enhancement of liquiritin and teniposide[J]. **Enzyme and Microbial Technology**,2014,64/65(7):38-43.

[5] WANG Z L,WANG J P,JIANG M H,et al. Selective production of rubusoside from stevioside by using the sophorose activity of beta-glucosidase from *Streptomyces* sp. GXT6[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2015,99(22):9663-9674.

[6] KO J A,KIM Y M,RYU Y B,et al. Mass production of rubusoside using a novel stevioside-specific beta-glucosidase from *Aspergillus aculeatus*[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2012,60(24):6210-6216.

[7] UDOMPAISARN S,ARTHAN D,SOMANA J.Development and validation of an enzymatic method to determine stevioside content from *Stevia rebaudiana*[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2017,65(15):3223-3229.

[8] LAN Q,TANG T,YIN Y,et al. Highly specific sophorose beta-glucosidase from *Sphingomonas elodea* ATCC 31461 for the efficient conversion of stevioside to rubusoside[J]. **Food Chemistry**,2019,295:563-568.

[9] KO J A,RYU Y B,KWON H J,et al. Characterization of a novel steviol-producing beta-glucosidase from *Penicillium decumbens* and optimal production of the steviol[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2013,97(18):8151-8161.

[10] CHATURVEDULA V S P,KLUCIK J,UPRETI M,et al. Synthesis of ent-kaurane diterpene monoglycosides[J]. **Molecules**,2011,16(10):8402-8409.