DOI:10.12441/spyswjs.20250612001 [文章编号] 1673-1689(2026)05-0073-09

固定化糖基转移酶和蔗糖合酶偶联合成红景天苷

宗卫勇 窦文芳*

(江南大学生命科学与健康工程学院,江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】开发一种利用固定化酶偶联蔗糖合酶合成红景天苷的催化体系。**【方法】**以镍螯合聚丙烯酸树脂为固定化载体,分别固定原核表达的糖基转移酶UGT85AF8和蔗糖合酶*Gm*SUS。其中固定化UGT85AF8催化酪醇发生糖基化反应,固定化*Gm*SUS实现尿苷二磷酸葡萄糖(uridine diphosphate glucose,UDPG)的循环再生。对反应体系的温度、pH、酶添加量和底物浓度等参数进行优化,考察固定化酶的重复使用性能,并采用大孔树脂LSA-30对红景天苷进行分离纯化。**【结果】**在最优条件下反应12 h,红景天苷产量达11.87 g/L。连续6批反应的平均摩尔转化率为88.47%,纯化后的红景天苷纯度>99%,结晶回收率为51.49%。**【结论】**该研究开发的固定化酶偶联合成红景天苷的催化体系具备良好的工业化应用潜力。

关键词:红景天苷;固定化酶;糖基转移酶;蔗糖合酶;尿苷二磷酸葡萄糖

Synthesis of Salidroside by Coupling Immobilized Glycosyltransferase and Sucrose Synthase

*ZONG Weiyong DOU Wenfang**

(School of Life Sciences and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: [**Objective**] This study aimed to develop a catalytic system utilizing immobilized enzyme coupling glycosyltransferase for the synthesis of salidroside. [**Method**] The prokaryotically expressed glycosyltransferase UGT85AF8 and sucrose synthase *Gm*SUS were immobilized on nickel-chelated polyacrylic acid resin. The immobilized UGT85AF8 was used to catalyze tyrosol glycosylation, and the immobilized *Gm*SUS was used for the regeneration of uridine diphosphate glucose (UDPG). The reaction system conditions, including temperature, pH, enzyme loading, and substrate concentration, were optimized. The reusability of immobilized enzymes was investigated, and salidroside was separated and purified *via* the macroporous resin LSA-30. [**Result**] Under optimal conditions, the reaction for 12 h achieved a salidroside titer of 11.87 g/L. Moreover, the average molar conversion rate was 88.47% in six consecutive reaction batches. After purification, the purity of salidroside exceeded 99%, with a crystallization recovery rate of 51.49%. [**Conclusion**] The immobilized enzyme coupling catalytic system demonstrates promising potential for industrial-scale production of salidroside.

Keywords: salidroside; immobilized enzyme; glycosyltransferase; sucrose synthase; uridine diphosphate glucose

红景天苷属于苯乙醇苷类化合物,由酪醇(4-羟基苯乙醇)的醇羟基与UDPG的半缩醛羟基缩合而成[1]。红景天苷广泛存在于红景天、女贞和肉苁蓉等药食同源植物中[2],具有抗疲劳、抗氧化、缓解高原反应、保护神经等多种生物活性[3-4],目前已应用于功能食品、保健品及医药领域。近年来,国内市场对红景天苷的需求不断增长。

红景天苷的制备方法主要包括植物提取法[5]、化学合成法[6]、微生物发酵法[7]和酶法合成[8]。其中植物提取法易于大量生产,是目前主要的工业化生

基金项目:中央高校自主科研项目(JUSRP10163)。

通信作者:窦文芳(1976—),男,博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事微生物与生化药学研究。E-mail:douwenfang@yahoo.com.cn

收稿日期:2025-06-12 **修回日期:**2025-08-10

产方法，但受限于原料植物资源稀缺且红景天苷含量较低。化学合成法需引入额外的基团保护流程，产物纯化难度大、易产生有毒废液，不符合绿色工业化生产要求。微生物发酵法近年来取得一定的进展，现有报道中红景天苷产量最高达 26.55 g/L[9]，产率最大为 0.37 g/(L·h)[10]，但仍存在发酵时间长、底物转化率低、产物纯化过程烦琐等问题。相较而言，酶法合成具有效率高、选择性强、环境友好等优势，逐渐受到研究人员的关注[11]。

可用于酶法合成红景天苷的酶主要包括糖苷酶和糖基转移酶。糖苷酶兼具合成与水解双重活性，因此利用该酶合成红景天苷的产率普遍偏低。魏胜华等[12]以 β-葡萄糖苷酶纳米凝胶催化合成红景天苷的产率仅为 23.7%。目前，已有多种尿苷二磷酸（uridine diphosphate，UDP）依赖性糖基转移酶（uridine diphosphate dependent glycosyltransferases，UGTs）用于红景天苷的合成，如 UGT73B6[13]、UGT73C5[14]、UGT85A1[15]、*Rr*UGT33[16]、UGT85AF8[17]等。但此类糖基转移酶普遍存在异源表达可溶性差、体外稳定性差、底物抑制效应明显等问题，制约了其工业应用[11]。以 UGT85AF8 为例，该酶在大肠杆菌 BL21（DE3）中表达时只有极少量的酶可溶，无法通过一步镍柱亲和层析纯化得到高纯度酶。此外，糖基转移酶合成红景天苷需要昂贵的 UDPG 作为糖基供体，且生成的副产物 UDP 会抑制反应的进行[18]。将糖基转移酶与蔗糖合酶偶联可有效解决上述问题，蔗糖合酶能够催化蔗糖与 UDP 反应生成 UDPG，不仅可以为糖基化反应提供糖基供体，还能消耗抑制糖基化的副产物 UDP。Chu 等[19]在肉桂醇糖基化合成松香的过程中引入蔗糖合酶 *Gm*SUS，构建了 UDPG 再生系统，实现了肉桂醇的高效转化。

作者首先筛选得到大肠杆菌中表达活性较高的糖基转移酶 UGT85AF8，添加小分子泛素相关修饰蛋白（small ubiquitin-related modifier protein，SUMO）促溶标签提高其可溶性。随后以聚丙烯酸树脂 LX-1000IDA 螯合镍离子为固定化载体，利用重组酶的多聚组氨酸标签实现特异性吸附，制备固定化 UGT85AF8；采用相同方法制备固定化蔗糖合酶 *Gm*SUS，进而构建双固定化酶偶联催化体系用于红景天苷合成，见图 1。另外，作者对固定化酶偶联催化反应条件进行优化，并开展多批次重复试验。最后采用大孔树脂结合浓缩结晶工艺对反应液中的红景天苷进行分离纯化，并通过核磁共振（nuclear magnetic resonance，NMR）鉴定产物结构。

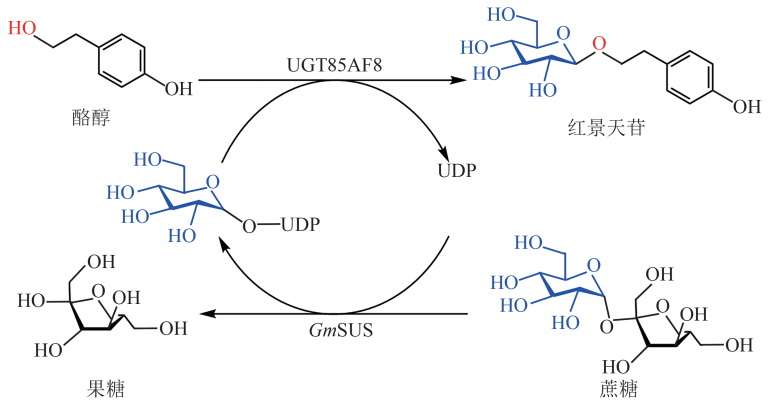


图 1　UGT85AF8 和 *Gm*SUS 偶联合成红景天苷示意图

Fig. 1　Schematic diagram of UGT85AF8 and *Gm*SUS coupling for salidroside synthesis

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　菌株来源

蛋白质表达的宿主为大肠杆菌 BL21（DE3），载体质粒为 pET-28a（+）和 pET-28a-SUMO，本研究中所有表达的酶及 GeneBank 登录号见表 1。其中 UGT85AF8 使用 pET-28a（+）和 pET-28a-SUMO 这 2 种质粒表达，其余酶使用质粒 pET-28a（+）表达。

表 1　本研究中使用的酶

Table 1　Enzymes used in this study

酶	来源	GeneBank 登录号
UGT73B6	*Rhodiola rosea*	AY547304.1
*Rr*UGT33	*Rhodiola rosea*	MF674558.1
UGT85A1	*Arabidopsis thaliana*	NM_102089.5
UGT73C5	*Arabidopsis thaliana*	NM_129235.4
UGT85AF8	*Ligustrum robustum*	MZ734610.1
*Gm*SUS	*Glycine max*	NM_001250596.2

使用GenSmart密码子优化工具对目的基因进行密码子优化，优化后的目的基因由天霖生物科技（上海）有限公司合成并构建重组菌株。

1.1.2 试剂

Ni-NTA层析介质、G25葡聚糖层析介质、LSA-30大孔树脂：西安蓝晓科技新材料股份有限公司；对羟基苯乙醇、UDP、UDPG、红景天苷：上海麦克林生化科技股份有限公司；卡那霉素、氨苄青霉素钠、异丙基-*β*-*D*-硫代半乳糖苷（IPTG）、改良型Bradford蛋白质测定试剂盒：生工生物工程（上海）股份有限公司；3，5-二硝基水杨酸（DNS）：上海源叶生物科技有限公司；其余培养基原料及试剂：国药集团化学试剂有限公司。

1.1.3 培养基

LB培养基：蛋白胨10 g/L、酵母粉5 g/L、氯化钠10 g/L，pH 7.0。TB培养基：蛋白胨12 g/L、酵母粉24 g/L、甘油5 g/L、KH_2PO_4 2.31 g/L、K_2HPO_4 12.54 g/L，pH 7.2。

1.2 方法

1.2.1 糖基转移酶和蔗糖合酶的表达与纯化

1）糖基转移酶的表达与纯化：将100 μL的甘油保藏菌液接种至100 mL含50 μg/mL卡那霉素的LB液体培养基中，于37 ℃、220 r/min条件下培养15 h。以体积分数2%的接种量转接至200 mL含50 μg/mL卡那霉素的TB培养基中，37 ℃、220 r/min继续培养。待培养菌液的OD_{600}值为0.6~0.8时，加入终浓度为0.1 mmol/L的IPTG，于16 ℃、160 r/min诱导培养18 h。培养结束后，菌液于4 ℃、7 000 r/min离心8 min，收集菌体。每克湿菌体加入10 mL裂解缓冲液（50 mmol/L Tris-HCl、500 mmol/L氯化钠、126.1 g/L甘油，pH 7.8）重悬，冰水浴超声破碎10 min。破碎液于4 ℃、12 000 r/min离心25 min，所得上清液即为粗酶液。粗酶液经Ni-NTA层析介质纯化、G25脱盐柱脱盐后获得纯酶液。采用改良型Bradford蛋白质测定试剂盒测定蛋白质质量浓度，并通过SDS-PAGE进行蛋白质电泳分析。

2）蔗糖合酶的表达与纯化：培养、诱导及纯化流程与糖基转移酶一致，仅将IPTG诱导浓度调整为0.2 mmol/L。

1.2.2 酶固定化方法及固定化效果验证

取适量湿菌体，按每克菌体加入6 mL裂解缓冲液进行重悬，经超声破碎后，加入适量经预处理的LX-1000IDA树脂（树脂用量通过前期试验确定，水洗后用100 mmol/L硫酸镍溶液浸泡过夜）。冰浴搅拌1 h，静置20 min，弃去部分上清液后抽滤，再用磷酸盐缓冲液（50 mmol/L，pH 7.5）洗涤树脂，抽干后得到固定化酶。采用洗脱缓冲液（含500 mmol/L咪唑的裂解缓冲液）洗脱树脂上的蛋白质，通过SDS-PAGE检测是否有较明显条带，以此验证酶的固定化效果。

1.2.3 糖基转移酶与蔗糖合酶的酶活力测定

1）糖基转移酶的酶活力测定：反应体系为1 mL，包含50 mmol/L Tris-HCl缓冲液（pH 7.5）、8 mmol/L酪醇、12 mmol/L UDPG和适量酶液或固定化酶。35 ℃反应15 min，加入1 mL甲醇终止反应，12 000 r/min离心10 min，采用HPLC测定红景天苷浓度。酶活力单位（U）定义为：在上述条件下，每分钟催化合成1 μmol红景天苷所需的酶量。粗酶液酶活力为每毫升粗酶液所具有的酶活力单位数，固定化酶的酶活力为每克固定化酶所具有的酶活力单位数。

2）蔗糖合酶的酶活力测定：反应体系为1 mL，包含50 mmol/L Tris-HCl缓冲液（pH 7.5）、100 mmol/L蔗糖、10 mmol/L UDP和适量酶液或固定化酶。35 ℃反应15 min后，加入DNS试剂，于540 nm处测定吸光度，计算果糖生成量。酶活力单位（U）定义为：在上述条件下，每分钟生成1 μmol果糖所需的酶量。粗酶液酶活力为每毫升粗酶液所具有的酶活力单位数，固定化酶的酶活力为每克固定化酶所具有的酶活力单位数。

配制不同浓度的红景天苷标准品溶液并用HPLC检测，绘制红景天苷标准品峰面积与红景天苷标准品浓度（mmol/L）的函数曲线，得到标准曲线的斜率。红景天苷浓度按式（1）计算，粗酶液酶活力按式（2）计算，固定化酶的酶活力按式（3）计算，固定化酶的酶活力回收率按式（4）计算。

$$C_1=\frac{Q\times A_1}{k} \quad (1)$$

式中：

C_1——反应液的红景天苷浓度，mmol/L；

Q——样品溶液稀释倍数；

A_1——反应液红景天苷的峰面积；

k——标准曲线的斜率，L/mmol。

$$U_1=\frac{C_1}{T_1\times V_1} \quad (2)$$

式中：

U_1——粗酶液的酶活力，U/mL；

C_1——粗酶液的红景天苷浓度，mmol/L；

T_1——反应时间，min；

V_1——反应液添加的粗酶液体积，mL。

$$U_2=\frac{C_2}{T_2\times m_1} \quad (3)$$

式中：

U_2——固定化酶的酶活力，U/g；

C_2——固定化酶反应液的红景天苷浓度，mmol/L；

T_2——反应时间，min；

m_1——反应液添加的固定化酶质量，g。

$$R_1=\frac{U_2\times m_2}{U_1\times V_2}\times 100\% \quad (4)$$

式中：

R_1——酶活力回收率，%；

U_2——固定化酶的酶活力，U/g；

m_2——制得的固定化酶质量，g；

U_1——粗酶液的酶活力，U/mL；

V_2——用于固定化的粗酶液体积，mL。

1.2.4 游离 UGT85AF8 与固定化 UGT85AF8 的最适温度及热稳定性测定

测定不同温度下游离 UGT85AF8 和固定化 UGT85AF8 的酶活力，确定最适温度。将游离 UGT85AF8 和固定化 UGT85AF8 分别置于磷酸缓冲液中，于 35 ℃贮存，放置不同时间后测定酶活力，评价其热稳定性。

1.2.5 固定化酶偶联催化的条件优化

标准反应体系为 1 mL，包含 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液（pH 7.5）、16 mmol/L 酪醇、1 mmol/L UDP、400 mmol/L 蔗糖以及等量的固定化 UGT85AF8 和固定化 *Gm*SUS。35 ℃反应 2 h，加入 1 mL 甲醇终止反应，12 000 r/min 离心 15 min，通过 HPLC 测定红景天苷浓度。首先探究固定化 UGT85AF8 和固定化 *Gm*SUS 的最适添加量及比例，随后依次考察不同温度、pH、蔗糖浓度、UDP 浓度和酪醇浓度对催化效果的影响，确定最佳偶联催化条件。

1.2.6 多批次反应

反应体系扩大为 150 mL，在 35 ℃进行多批次偶联催化，单批次反应时间为 12 h。首批次反应底物酪醇浓度为 40 mmol/L，监测不同反应时间下红景天苷的转化率；其余批次酪醇浓度为 32 mmol/L。单批次反应结束后，用磷酸缓冲液洗涤树脂并滤干，用于下一批次反应。

1.2.7 产物的纯化与鉴定

参考文献[20]的方法，采用大孔树脂 LSA-30 纯化产物。反应液稀释一定倍数后加入预处理（体积分数 95% 乙醇浸泡过夜后水洗）后的大孔树脂 LSA-30，搅拌吸附 3 h；随后用纯水洗净，按每克树脂加入 25 mL 体积分数 50% 的乙醇进行洗脱。洗脱液置于 55 ℃旋转蒸发仪中进行蒸发浓缩，控制浓缩液体积，确保每克红景天苷对应的浓缩液体积为 1.2 mL。浓缩液于 4 ℃静置过夜进行结晶，抽滤收集晶体，用−20 ℃无水乙醇洗涤 2 次，产物过滤后烘干，计算结晶回收率。

分别配制 1 g/L 的红景天苷标准品溶液与产物溶液，利用 HPLC 进行产物鉴定与纯度检测。将纯化后的产物溶于氘代 DMSO 溶液中，通过核磁共振氢谱、碳谱鉴定产物结构。红景天苷的摩尔转化率按式（5）计算，纯度按式（6）计算。

$$R_2=\frac{C_1}{C_0}\times 100\% \quad (5)$$

式中：

R_2——红景天苷的摩尔转化率，%；

C_1——反应液的红景天苷浓度，mmol/L；

C_0——反应开始时的底物浓度，mmol/L。

$$P=\frac{A_2}{A_0}\times 100\% \quad (6)$$

式中：

P——产物纯度，%；

A_2——1 g/L 的纯化产物溶液中红景天苷的峰面积；

A_0——1 g/L 的红景天苷标准品溶液中红景天苷的峰面积。

1.2.8 HPLC 检测条件

采用 Agilent 5 TC-C18 色谱柱（4.6 mm×150 mm×5 μm），流动相 A 为乙腈，流动相 B 为体积分数 0.1% 的磷酸水溶液，流量 0.5 mL/min，柱温 30 ℃，检测波长 275 nm。梯度洗脱程序为：0~1.0 min，流动相 A 体积分数为 13%；1.0~5.5 min，流动相 A 体积分数为 63%；5.5~6.5 min，流动相 A 体积分数为 13%；6.5~10.0 min，流动相 A 体积分数为 13%。

2 结果与讨论

2.1 UGTs 的筛选

UGTs 是催化红景天苷合成的关键酶[16]，在大肠杆菌中表达时普遍存在可溶性差、体外稳定性差、易受底物抑制等问题，严重限制了其在红景天苷酶法规模化制备中的应用。因此，筛选活性高、适配性强

的糖基转移酶是构建高效合成体系的首要前提。作者对UGT73B6、*Rr*UGT33、UGT85A1、UGT73C5、UGT85AF8这5种UGTs的粗酶液酶活力进行测定。试验过程中适当延长反应时间并采用HPLC对产物进行定量分析，见图2。结果表明，通过对比反应液产物和红景天苷标准品的保留时间，初步验证了UGT85AF8可以催化酪醇合成红景天苷。

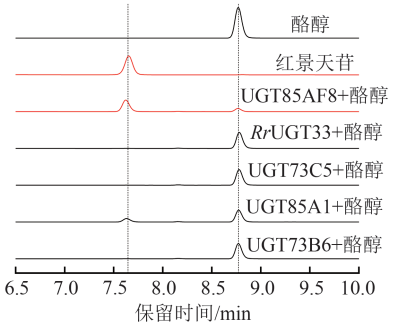


图2　5种UGTs催化酪醇合成产物的HPLC结果

Fig. 2　HPLC results of the glycosylation product of tyrosol catalyzed by five glycosyltransferases

作者比较了5种UGTs的粗酶液酶活力及固定化酶的酶活力，见表2。其中UGT85AF8的酶活力明显高于其他酶，因此选择UGT85AF8作为后续偶联反应的糖基转移酶。另外，UGT85A1的酶活力仅次于UGT85AF8，而UGT73B6、*Rr*UGT33、UGT73C5的酶活力较低。一方面是由于其本身的酶活力与稳定性较差，另一方面可能是由于它们无法耐受8 mmol/L的酪醇。考虑到部分糖基转移酶的可溶性较差，无法通过单步镍柱纯化得到高纯度的酶液，因此未对5种UGTs的比活力进行对比分析。

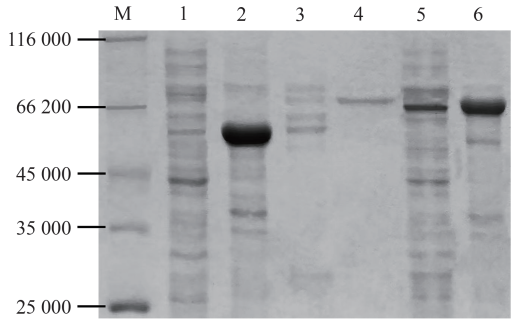
表2　UGTs的粗酶液酶活力和固定化酶的酶活力

Table 2　Enzyme activities of crude enzyme solutions and immobilized glycosyltransferases

酶	粗酶液酶活力/（U/mL）	固定化酶的酶活力/（U/g）
UGT73B6	<0.01	0.10±0.01
*Rr*UGT33	<0.01	0.11±0.01
UGT85A1	0.11±0.01	1.50±0.07
UGT73C5	<0.01	0.46±0.05
UGT85AF8	1.14±0.02	10.06±0.10
SUMO-UGT85AF8	1.28±0.02	11.66±0.08

2.2　UGT85AF8的可溶性表达

尽管UGT85AF8的酶活力最高，但是文献报道该酶在大肠杆菌中几乎无法可溶性表达。有研究者在9 L发酵体系中通过2步亲和层析纯化，仅获得不足50 μg的目标蛋白质[17]。为了实现UGT85AF8的可溶性表达，作者对UGT85AF8进行密码子优化，并在其N末端添加SUMO促溶标签，成功构建了重组菌株。通过SDS-PAGE分析未添加标签与SUMO标签修饰的UGT85AF8的表达情况，见图3。结果表明，仅经密码子优化的UGT85AF8重组菌株表达的蛋白质仍以包涵体的形式存在，且镍柱纯化后的酶液中存在较多的杂蛋白质；而SUMO-UGT85AF8粗酶液中的可溶性蛋白明显增多，且经过镍柱纯化后得到与理论相对分子质量（66 700）一致的单一特异性条带。



M—蛋白质Marker；1—UGT85AF8粗酶液；2—UGT85AF8破碎后沉淀；3—UGT85AF8纯酶液；4—SUMO-UGT85AF8纯酶液；5—SUMO-UGT85AF粗酶液；6—SUMO-UGT85AF8破碎后沉淀。

图3　UGT85AF8和SUMO-UGT85AF8的SDS-PAGE结果

Fig. 3　SDS-PAGE results of UGT85AF8 and SUMO-UGT85AF8

作者进一步探究了SUMO标签对UGT85AF8粗酶液及固定化酶的酶活力的影响，见表2。添加SUMO标签后，UGT85AF8固定化酶活力提高了约16%。作者验证了SUMO标签对固定化UGT85AF8热稳定性的影响，结果表明在35 ℃孵育1 h后，UGT85AF8剩余的固定化酶的酶活力相当于孵育前的53%，而SUMO-UGT85AF8剩余的固定化酶活力相当于孵育前的70%。综上，SUMO标签不仅能改善UGT85AF8的可溶性表达，还可有效提高其热稳定性。

2.3　固定化对SUMO-UGT85AF8和*Gm*SUS的影响

2.3.1　SUMO-UGT85AF8的热稳定性结果

LX-1000IDA羧基载体树脂带有的亚氨基二乙酸能与金属离子共价结合，并进一步与含有多聚组氨酸标签的酶形成配位键。已有研究表明，基于该固定化原理的Ni-NTA固定的吡哆醛激酶，具有良好的温度耐受性、pH耐受性与操作稳定性[21]。另外，与游离酶相比，经LX-1000IDA固定的海洋脂肪酶的

最适反应条件更稳定，热稳定性也得到显著提升[22]。作者分别测定了固定化 SUMO-UGT85AF8 和游离 SUMO-UGT85AF8 的最适温度，并对比了 2 种酶在 35 ℃的热稳定性，见图 4。结果表明，固定化 SUMO-UGT85AF8 的最适温度为 50 ℃，较游离 SUMO-UGT85AF8 提升了 5 ℃。在 35 ℃条件下孵育不同时间后，固定化 SUMO-UGT85AF8 的相对酶活力始终高于游离 SUMO-UGT85AF8。

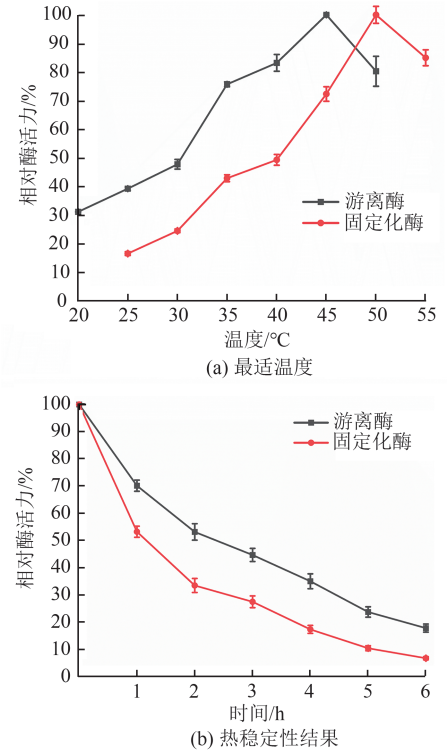


图 4 SUMO-UGT85AF8 的最适温度和热稳定性

Fig. 4 Optimal temperature and thermal stability of SUMO-UGT85AF8

2.3.2 SUMO-UGT85AF8 和 *Gm*SUS 的固定化效果

对 SUMO-UGT85AF8 和 *Gm*SUS 固定化后，SUMO-UGT85AF8 的酶活力回收率为(130.12±1.12)%，*Gm*SUS 的酶活力回收率为(68.15±0.94)%。SUMO-UGT85AF8 的酶活力回收率大于 100%，可能的原因是：固定化过程提高了酶的稳定性；酶与树脂的相互作用改变了酶的分子构象，导致酶活力提高；粗酶液反应体系复杂，含有小分子抑制物质。

2.4 偶联反应条件优化结果

为降低昂贵的糖基供体 UDPG 的用量，在糖基化反应体系中引入蔗糖合酶构建偶联催化体系是目前常用的改造策略[14]。同时，引入蔗糖合酶还可以避免高浓度 UDPG 参与反应时，体系中 UDP 积累对糖基转移酶的反馈抑制作用。大豆来源的蔗糖合酶 *Gm*SUS 对黄酮类和酚类底物具有良好的耐受性[19]，且其最适 pH 为 7.0[23]，相较于其他蔗糖合酶，与糖基转移酶的最适 pH 更接近。基于此，引入 *Gm*SUS 构建偶联催化体系。

作者对固定化 SUMO-UGT85AF8 和固定化 *Gm*SUS 偶联催化体系进行了反应条件优化，见图 5。将 1 mL 反应液中固定化蔗糖合酶的添加量固定为 0.03 g(相当于 4.2 U/mL)，设置固定化 SUMO-UGT85AF8 的添加量分别为 0.006、0.015、0.030、0.060、0.090、0.120、0.180 g。结果表明，当固定化 SUMO-UGT85AF8 与固定化 *Gm*SUS 的质量比为 3∶1，即固定化 *Gm*SUS 添加量 0.03 g、固定化 SUMO-UGT85AF8 添加量 0.090 g 时，红景天苷的产量最高，为 3.73 g/L，见图 5(a)。当 2 种固定化酶的质量比提升至 4∶1 甚至 6∶1 时，偶联反应的红景天苷产量明显下降，这可能是由于反应体系中 UDP 浓度持续升高，限制了糖基转移酶的催化活性。不同温度下偶联反应的红景天苷产量见图 5(b)，在 45 ℃下红景天苷的产量和摩尔转化率最高。该温度相较于固定化 SUMO-UGT85AF8 的最适温度有所下降，可能是植物来源的蔗糖合酶的最适温度较低导致的[24]。蔗糖合酶反应的适宜条件一般为酸性，而糖基转移酶则适宜在中性或偏碱性条件下反应。基于此，作者测定了不同 pH 下偶联反应的红景天苷产量，最终确定偶联反应的最适 pH 为 7.5，见图 5(c)。不同蔗糖浓度下偶联反应的红景天苷产量见图 5(d)。当蔗糖浓度为 400 mmol/L 时，红景天苷的产量最高，达 3.76 g/L；当蔗糖浓度≥500 mmol/L 时，红景天苷产量下降，这一现象可能是由于高浓度蔗糖会产生抑制效应，同时反应液渗透压与黏度升高，阻碍了催化反应的高效进行。UDP 是蔗糖合酶的底物，但其浓度过高会抑制糖基转移酶活性[25]。UDP 浓度对偶联反应中红景天苷产量的影响见图 5(e)。红景天苷产量和摩尔转化率随 UDP 浓度的增加而升高；当 UDP 浓度为 1.5 mmol/L 时，红景天苷的产量和摩尔转化率分别为 3.99 g/L 和 82.3%；当 UDP 浓度高于 1.5 mmol/L 时，红景天苷的产量和摩尔转化率降低，表明在此浓度下 UDP 对糖基转移酶的抑制作用明显。高浓度酪醇会对糖基转移酶产生一定的抑制作用，但适宜浓度的酪醇可促进红景天苷的积累。不同酪醇浓度下偶联反应中红景天苷

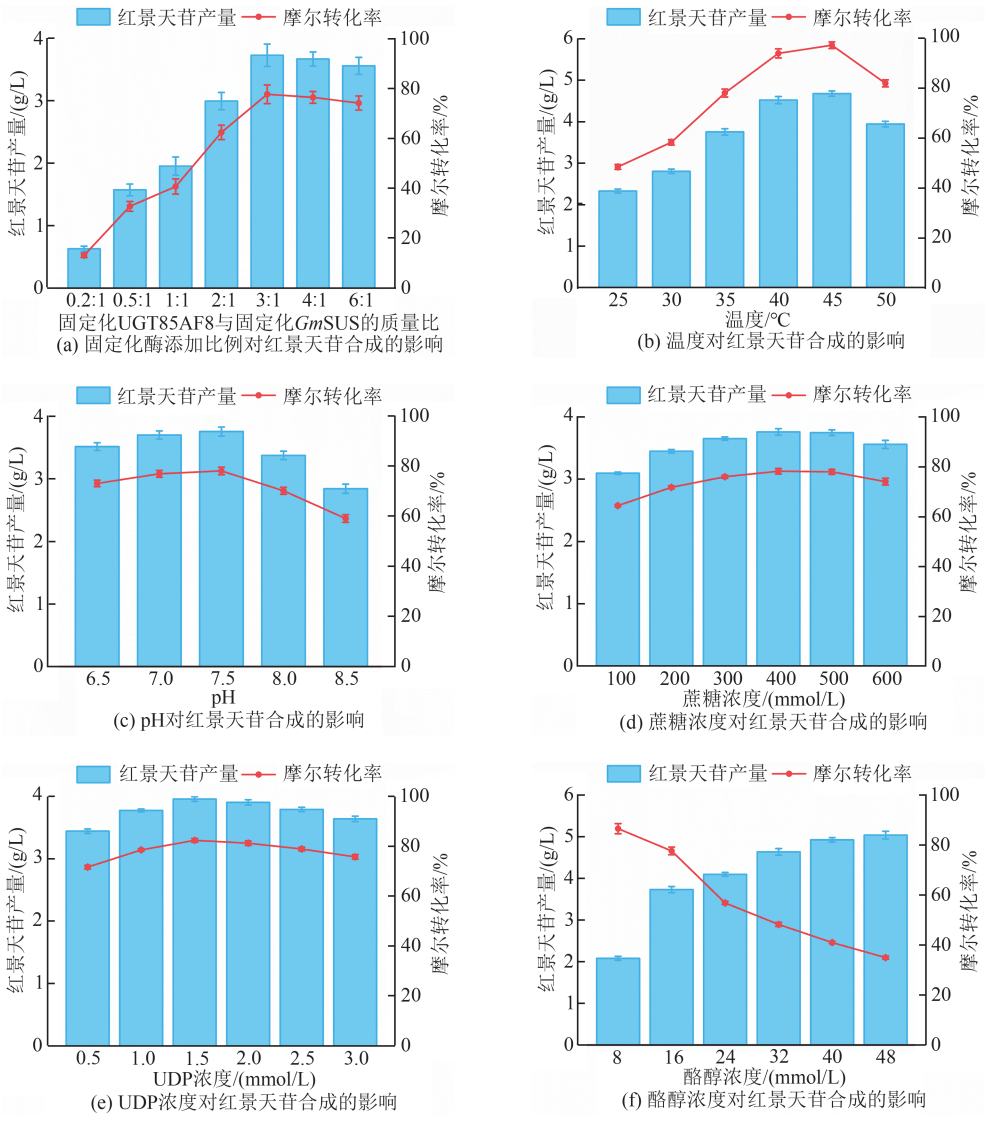


图 5　偶联催化体系的反应条件优化

Fig. 5　Optimization of reaction conditions for coupling catalytic system

的产量和摩尔转化率见图 5(f)。当酪醇浓度为 8~32 mmol/L 时，红景天苷产量随酪醇浓度的增加明显升高；当酪醇浓度≥40 mmol/L 时，红景天苷产量随酪醇浓度的增加无显著变化。同时，随着酪醇浓度的增加，红景天苷的摩尔转化率稳定下降，这可能是由于反应时长不足导致高浓度底物无法充分转化。因此，选择 32 mmol/L 作为后续多批次反应的起始酪醇浓度。

2.5　反应体系扩大和多批次反应结果

为验证固定化酶偶联催化体系的操作稳定性及规模化应用潜力，将反应体系扩大至 150 mL 并进行多批次反应，见图 6。结果表明，首批次反应的红景天苷产量可达 11.87 g/L，摩尔转化率高达 98.8%。在前 5 批次反应中，红景天苷产量维持在 7.9 g/L 以上，摩尔转化率保持在 80% 以上，表明该固定化酶至少可以稳定反应 5 个批次。第 6 批次反应的红景天苷产量和摩尔转化率明显下降，说明此时固定化酶活力明显下降。6 个反应批次的红景天苷平均产量为 10.63 g/L，平均摩尔转化率为 88.47%。综上，该固定化酶偶联催化体系具备良好的操作稳定性与规模化应用潜力。

2.6　纯化产物的鉴定和纯度

采用大孔树脂 LSA-30 对偶联反应液中的红景天苷进行分离纯化，并在水中结晶产物。结果表明，结晶回收率仅为 51.49%，这是由于红景天苷在水中的溶解度较高。后续为了提高结晶回收率，可以考虑在体积分数 95% 的乙醇中结晶。使用 HPLC 分别分析了纯化产物和红景天苷标准品，发现纯化产物

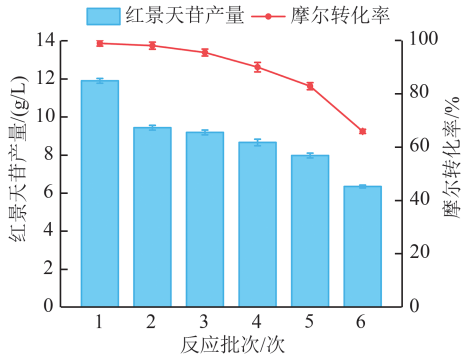


图 6 利用固定化酶多批次反应合成红景天苷

Fig. 6 Synthesis of salidroside by multiple batch reaction using immobilized enzymes

和红景天苷标准品的保留时间均为 7.68 min，通过峰面积计算纯化产物的纯度为 99.6%。纯化产物的 ^{13}C-NMR 谱图见图 7。该物质的碳谱数据为 ^{13}C-NMR（101 MHz，DMSO），δ 为 156.09、130.22、129.07、115.49、103.32、77.37、77.27、73.93、70.59、70.37、61.58、35.31，该结果与文献报道的结果基本一致[26]。综上，本试验纯化产物为红景天苷。

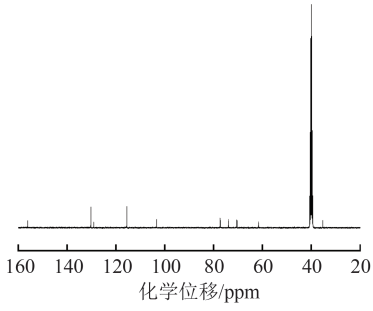


图 7 纯化产物的 ^{13}C-NMR 谱图

Fig. 7 ^{13}C-NMR spectrum of purified product

3 结论

本研究聚焦红景天苷的高效酶法合成工艺，从关键的糖基转移酶入手，筛选出一株异源表达后体外活性较高但可溶性较差的 UGT85AF8；通过添加 SUMO 促溶标签，有效改善了其可溶性和热稳定性；进一步引入 *Gm*SUS 构建 UDPG 循环再生系统，并采用 LX-1000IDA 树脂对 2 种酶进行固定化，成功构建了双固定化酶偶联催化体系。在最优反应条件下，该体系可实现连续 6 个批次的高效转化，红景天苷平均产量为 10.63 g/L，平均摩尔转化率为 88.47%。综上，本研究建立的基于固定化酶偶联合成红景天苷的策略具有良好的工业化应用潜力，为红景天苷高效酶法合成工艺的建立提供了理论依据。

尽管 SUMO 标签修饰可提升 UGT85AF8 的可溶性表达，但该酶的可溶性仍有较大的优化空间。后续可通过分子伴侣共表达、融合其他促溶标签、蛋白质理性设计等手段进一步改良其酶学性质。作者前期已尝试通过理性设计改善 UGT85AF8 的可溶性，将 UGT85AF8 与 UGT85A 家族的其他成员进行蛋白质序列对比，将 UGT85AF8 的非保守位点替换为高度保守的位点，且优先将疏水氨基酸替换为亲水氨基酸，将存在于 α 螺旋的亲水区疏水氨基酸转化为亲水性氨基酸[27]，最终共获得 32 个候选突变位点；结合 AggreProt 软件预测的蛋白质聚集倾向区域，进一步筛选获得 6 个聚集核心区域附近的优势突变位点[28]。但后续试验发现，这 6 个点突变的酶均未观察到较好的可溶性改善，或者尽管可溶性得到改善但是酶活性和稳定性明显下降。针对本研究存在的不足，后续可从以下 5 个方面开展研究：1）对初步建立的突变体库中的其余突变位点进行验证；2）使用 SWISS-MODEL 构建蛋白质结构后，用 AggreProt 预测蛋白质的溶剂可及性，选择蛋白质表面暴露的易聚集区域进行突变；3）用 CASTp 预测蛋白质的活性位点，在远离活性中心的区域进行突变；4）采用细菌或真菌来源的蔗糖合酶代替植物来源的蔗糖合酶，进一步提高固定化酶体系的操作稳定性；5）使用强碱型阴离子交换树脂回收反应液中较昂贵的 UDP 和 UDPG。

参考文献

[1] Jiménez C，Riguera R. Phenylethanoid glycosides in plants：structure and biological activity [J]. Nature Product Reports，1994，11(6)：591-606.

[2] Zhang X M，Xie L，Long J Y，et al. Salidroside：a review of its recent advances in synthetic pathways and pharmacological properties [J]. Chemico-Biological Interactions，2021，339：109268.

[3] 南星梅，于洋，杨进，等. 唐古特红景天化学成分和药理作用的研究进展[J]. 中草药，2023，54(16)：5433-5441.
Nan X M，Yu Y，Yang J，et al. Research progress on chemical components and pharmacological effect of *Rhodiola algida* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs，2023，54(16)：5433-5441.(in Chinese)

[4] Liu X R，Wen S H，Yan F，et al. Salidroside provides neuroprotection by modulating microglial polarization after cerebral ischemia [J]. Journal of Neuroinflammation，2018，15(1)：39.

[5] 蒋梅香，刘艳，姚淑琼，等. 碱水解法提取女贞子中红景天苷的工艺研究[J]. 中医药导报，2023，29(2)：43-46，67.
Jiang M X，Liu Y，Yao S Q，et al. Study on the extraction technology of salidroside from nuzhenzi (*Ligustri lucidi*

fructus）by alkaline hydrolysis［J］. Guiding Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy，2023，29（2）：43-46，67.（in Chinese）

［6］Troshchenko A T，Yuodvirshis A M. Synthesis of glycosides of 2-（*p*-hydroxyphenyl）ethanol（tyrosol）［J］. Chemistry of Natural Compounds，1969，5（4）：217-220.

［7］Liu S S，Xia Y Y，Yang H Q，et al. Rational chromosome engineering of *Escherichia coli* for overproduction of salidroside［J］. Biochemical Engineering Journal，2022，184：108474.

［8］Tong A M，Lu W Y，Xu J H，et al. Use of apple seed meal as a new source of *β*-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.

［9］Liu H Y，Tian Y J，Zhou Y，et al. Multi-modular engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for high-titre production of tyrosol and salidroside［J］. Microbial Biotechnology，2021，14（6）：2605-2616.

［10］Zeng W Z，Wang H J，Chen J B，et al. Engineering *Escherichia coli* for efficient *de novo* synthesis of salidroside［J］. Journal of Agricultural and Food Chemistry，2024，72（51）：28369-28377.

［11］Zhang T，Tian S W，Gao Z，et al. Engineering an ancestral glycosyltransferase for biosynthesis of 2-phenylethyl-*β*-*D*-glucopyranoside and salidroside［J］. Journal of Agricultural and Food Chemistry，2024，72（36）：19966-19976.

［12］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.
Wei S H，Qian W，Zhou Q H，et al. Synthesis of salidroside by *β*-glucosidase nanogel in non-aqueous media［J］. Chemical Industry and Engineering Progress，2018，37（2）：694-701.（in Chinese）

［13］Bai Y F，Bi H P，Zhuang Y B，et al. Production of salidroside in metabolically engineered *Escherichia coli*［J］. Scientific Reports，2014，4：6640.

［14］魏晨昱，黄珠莹，沈知行，等. 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 C Y，Huang Z Y，Shen Z X，et al. Efficient synthesis of salidroside from tyrosol based on UDPG recycling system［J］. Chinese Journal of Biotechnology，2024，40（9）：3127-3141.（in Chinese）

［15］Chung D，Kim S Y，Ahn J H. Production of three phenylethanoids，tyrosol，hydroxytyrosol，and salidroside，using plant genes expressing in *Escherichia coli*［J］. Scientific Reports，2017，7：2578.

［16］Torrens-Spence M P，Pluskal T，Li F S，et al. Complete pathway elucidation and heterologous reconstitution of *Rhodiola* salidroside biosynthesis［J］. Molecular Plant，2018，11（1）：205-217.

［17］Yang Y H，Wu Y N，Zhuang Y B，et al. Discovery of glycosyltransferases involved in the biosynthesis of ligupurpuroside B［J］. Organic Letters，2021，23（20）7851-7854.

［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（14/15）：2757-2763.

［19］Chu J L，Ge Y，Dong W X，et al. 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.

［20］王聪庆，陈娟. 大孔树脂分离纯化红景天苷工艺研究［J］. 中药材，2011，34（12）：1936-1939.
Wang C Q，Chen J. Purification of salidroside in *Rhodiola crenulata* with macroporous resin［J］. Journal of Chinese Medicinal Materials，2011，34（12）：1936-1939.（in Chinese）

［21］侯学雯，李梦磊，叶蕾，等. 固定化吡哆醇激酶催化合成磷酸吡哆醇的研究［J］. 食品与生物技术学报，2024，43（12）：119-126.
Hou X W，Li M L，Ye L，et al. Immobilized pyridoxine kinase catalyzes synthesis of pyridoxine phosphate［J］. Journal of Food Science and Biotechnology，2024，43（12）：119-126.（in Chinese）

［22］朱衡，张继福，张云，等. 基于羧基载体LX-1000 IDA的脂肪酶固定化研究［J］. 广西师范大学学报（自然科学版），2020，38（6）：88-101.
Zhu H，Zhang J F，Zhang Y，et al. Immobilization method of lipase based on carboxyl carrier LX-1000IDA［J］. Journal of Guangxi Normal University（Natural Science Edition），2020，38（6）：88-101.（in Chinese）

［23］Liu S K，Lyu Y B，Yu S Q，et al. Efficient production of orientin and vitexin from luteolin and apigenin using coupled catalysis of glycosyltransferase and sucrose synthase［J］. Journal of Agricultural and Food Chemistry，2021，69（23）：6578-6587.

［24］Chen K，Lin L，Ma R Q，et al. Identification of sucrose synthase from *Micractinium conductrix* to favor biocatalytic glycosylation［J］. Frontiers in Microbiology，2023，14：1220208.

［25］Pei J J，Sun Q，Gu N，et al. Production of isoorientin and isovitexin from luteolin and apigenin using coupled catalysis of glycosyltransferase and sucrose synthase［J］. Applied Biochemistry and Biotechnology，2020，190（2）：601-615.

［26］段丛雪. 红景天苷及其衍生物的合成、抗肝癌细胞活性研究［D］. 汉中：陕西理工大学，2024：35.

［27］Shinoda S，Itakura A，Sasano H，et al. Rational design of the soluble variant of l-pipecolic acid hydroxylase using the α-helix rule and the hydropathy contradiction rule［J］. ACS Omega，2022，7（33）：29508-29516.

［28］Planas-Iglesias J，Borko S，Swiatkowski J，et al. AggreProt：a web server for predicting and engineering aggregation prone regions in proteins［J］. Nucleic Acids Research，2024，52（1）：159-169.