构建高效糖配体再生重组菌生物催化合成莱鲍迪苷D

费理文[1]，王 勇[2,*]
（1.上海市农业科学院食用菌研究所，农业部南方食用菌资源利用重点实验室，国家食用菌工程技术研究中心，国家食用菌加工技术研发分中心，上海市农业遗传育种重点开放实验室，上海 201403；
2.中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所，上海 200032）

摘 要：利用拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）蔗糖合酶AtSUS3构建活化糖配体尿苷二磷酸葡萄糖（uridine diphosphate glucose，UDPG）再生体系，与高效催化莱鲍迪苷D（rebaudioside D，RD）合成的糖基转移酶协同偶联完成RD的高效生物催化。从拟南芥cDNA克隆获得*AtSUS3*基因，将其装配至pET28a获得表达质粒pLW105，随后pLW105与携带糖基转移酶*EUGT11*基因的质粒共转化大肠杆菌BL21（DE3）构建双酶共表达工程菌。在不添加UDPG或者尿核苷二磷酸（uridine diphosphate，UDP）的条件下，以上述双酶共表达工程菌全细胞催化莱鲍迪苷A（RA）获得的底物摩尔转化率大于80%，RD产量达到930 mg/L。随后构建双酶基因串连质粒pLW108及双酶共表达大肠杆菌BL21（DE3）工程菌。用串连质粒构建的工程菌催化效果与双质粒共转化相同。采用共表达双酶工程菌的发酵破碎粗酶进行催化，结果显示以粗酶催化可简化催化体系，并可将细胞催化体系所需高质量浓度蔗糖用量降至质量浓度5 g/100 mL，同时在不添加外源UDPG的条件下实现RD的高效生物催化，RA底物摩尔转化率达到93%，RD产量约为1 051 mg/L。

关键词：甜菊糖苷；莱鲍迪苷D；尿苷二磷酸葡萄糖；蔗糖合酶；UDP-糖基转移酶；生物催化

Construction of *in Situ* UDPG Regeneration Strain for Biosynthesis of Rebaudioside D

FEI Liwen[1], WANG Yong[2,*]
(1. Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding of Shanghai, National R&D Center for Edible Fungi Processing, National Engineering Research Center of Edible Fungi, Key Laboratory of Edible Fungi Resources and Utilization (South), Ministry of Agriculture, Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China; 2. Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

Abstract: Sucrose synthase 3 from *Arabidopsis thaliana* (AtSUS3) was used to regenerate uridine diphosphate glucose, an activated glucose donor required in biotransformation of rebaudioside D (RD) from rebaudioside A (RA). The *AtSUS3* gene was cloned from the cDNA of *A. thaliana* and assembled into plasmid pET28a to construct a expression plasmid pLW105. Co-transformation of pLW105 and plasmid pYF09 harboring UDP-glucosyltransferase *EUGT11* gene into *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21(DE3) generated the engineered strain pLW105+pYF09-BL21(DE3) co-expressing both enzymes. Using the whole cells of this strain as a biocatalyst, more than 80% of RA was conversed to RD without exogenous addition of UDPG, yielding about 930 mg/L RD. Then a plasmid harboring the genes encoding both enzymes was constructed and the resulting engineered strain *E. coli* BL21(DE3) showed the same biotransformation efficiency as the strains containing two plasmids. In order to decrease the amount of sucrose used in the bioconversion reaction, the cell lysate instead of the whole cells was used to catalyze the biotransformation of RD. Using the cell lysate of the engineered strain pLW108-BL21(DE3), about 93% RA was conversed to RD with a yield of about 1 051 mg/L at 5 g/100 mL sucrose concentration, which used only 1/8 of the amount of sucrose used in whole cell catalysis with a comparable RD yield.

收稿日期：2017-10-23
基金项目：国家自然科学基金面上项目（31670099）；中国科学院STS项目（KFJ-SW-STS-164-08）
第一作者简介：费理文（1981—），女，助理研究员，博士，研究方向为天然产物的异源生物合成、植物反应器。
E-mail：liwenfei18@126.com
*通信作者简介：王勇（1974—），男，研究员，博士，研究方向为天然产物合成生物学。E-mail：yongwang@sibs.ac.cn

Keywords: steviol glycosides; rebaudioside D; uridine diphosphate glucose (UDPG); sucrose synthase; uridine diphosphate glycosyltransferase (UDP-glycosyltransferase); biocatalysis

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201822018

中图分类号：Q815A 文献标志码：A 文章编号：1002-6630（2018）22-0116-07

引文格式：

费理文, 王勇. 构建高效糖配体再生重组菌生物催化合成莱鲍迪苷D[J]. 食品科学, 2018, 39(22): 116-122. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201822018. http://www.spkx.net.cn

FEI Liwen, WANG Yong. Construction of *in situ* UDPG regeneration strain for biosynthesis of rebaudioside D[J]. Food Science, 2018, 39(22): 116-122. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201822018. http://www.spkx.net.cn

莱鲍迪苷D（rebaudioside D，RD）是一种来源于甜叶菊的甜菊糖苷类物质（图1）[1]。甜菊糖苷类物质组分众多，目前已知甜叶菊来源的就有约40 多种，具有不同程度的甜味口感，随着分离分析技术的提高，不断有新组分的报道，它们在化学结构上具有共同的四环二萜母环以及不同的糖基化侧链修饰[2-5]。由于甜菊糖苷物质具有低热量、高甜度、高食用安全性[6-7]，目前甜叶菊中含量相对丰富的甜菊糖和莱鲍迪苷A（RA）已广泛应用于食品饮料、调味剂、酒类、乳制品等食品加工领域[8-11]。但是甜菊糖和RA具有较明显的苦后味，口感上尚不能完全替代蔗糖[12]。而天然含量相对稀少的RD则具有相对更优的口感[13]，是甜菊糖类甜味剂升级的方向，美国FDA于2017年认证RD为“一般安全”物质作为食品添加剂应用于食品工业[14]。

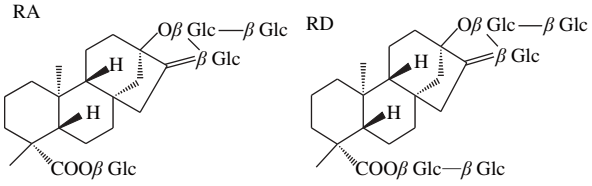


图 1 RA和RD化学结构示意图

Fig. 1 Structures of rebaudioside A and rebaudioside D

由于RD的天然来源含量低，从植物提取的方式无法满足市场需求，因此多有研究挖掘其生物合成途径并开发其异源合成方法[15-20]。本实验室在先前的工作中，采用来自水稻的可高效催化RA生物合成RD的糖基转移酶EUGT11，构建重组大肠杆菌，实现了全细胞催化合成RD[21]。在此生物催化反应中，糖基转移酶EUGT11可催化RA的C_{13}-羧基位置上的糖基与活化糖配体尿苷二磷酸葡萄糖（uridine diphosphate glucose，UDPG）提供的葡萄糖进一步形成1,2-*β*-*D*-葡萄糖苷键，从而获得RD。虽然该重组大肠杆菌可催化RD合成，但是RD产量低下，且需要向催化体系外源添加活化糖配体UDPG才能有效推动催化反应[21]。而UDPG成本高，以外源添加形式进行生产不可行，因此需要进一步探索增加异源催化细胞内源性UDPG供给的改造策略。参考KEGG中糖代谢途径后，蔗糖合酶成为理想的候选酶。蔗糖合酶（EC 2.4.1.13）参与植物蔗糖代谢，催化蔗糖和尿核苷二磷酸（uridine diphosphate，UDP）生成果糖和UDPG的可逆反应，反应方向的偏向性受到环境pH值等条件的影响，不同植物来源的蔗糖合酶偏向条件各不相同[22]。蔗糖裂解方向反应的产物UDPG可以为RA生产RD的糖基转移反应提供活化的糖配体，因此利用蔗糖合酶与糖基转移酶的偶联可实现生物催化体系UDPG的原位再生，从而满足RD生物合成过程中对活化糖配体需求，同时可通过再生反应避免糖基转移反应产物UDP的积累对反应产物抑制效应，不断推动反应向RD合成进行（图2）。参考目前已有研究的植物蔗糖合酶的酶学参数[22-23]，并结合EUGT11催化的适宜条件，选择拟南芥来源的AtSUS3参与酶偶联催化合成RD的实验。

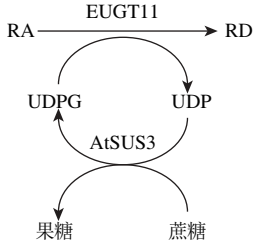


图 2 双酶偶联生物合成RD示意图

Fig. 2 Illustration of biotransformation of RD by coupling EUGT11 and AtSUS3

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

载体pET28a、pETDuet-1 美国Novagen公司；菌株*Escherichia coli* DH10B、*E. coli* BL21（DE3） 上海泽叶生物科技有限公司。质粒pYF09及相应重组工程菌为本实验室前期构建[21]。

引物合成及测序、异丙基硫代-*β*-*D*-半乳糖苷（isopropyl-*β*-*D*-thiogalactoside，IPTG）、氨苄青霉素、卡纳霉素 生工生物工程（上海）有限公司；各限制性内切酶 New England Biolabs公司；PrimerSTAR Max

大连TaKaRa公司；质粒抽提及DNA片段纯化与胶回收试剂盒　美国Axygen公司；Vazyme ClonExpress II一步法克隆试剂盒　南京诺维赞生物科技有限公司；RA标准品（纯度＞97%）　美国Thermo Fisher公司；RD标准品（纯度＞95%）　四川盈嘉合生物科技有限公司；酵母提取物、胰蛋白胨　英国Oxoid公司；其余化学试剂上海国药集团化学试剂有限公司。

1.2　仪器与设备

聚合酶链式反应（polymerase chain reaction，PCR）仪、Ultra 3000高效液相色谱仪　美国Thermo Fisher公司；小型离心机、高速冷冻离心机　德国Eppendorf公司；摇床　上海智城分析仪器制造有限公司。

1.3　方法

1.3.1　*AtSUS3*的克隆

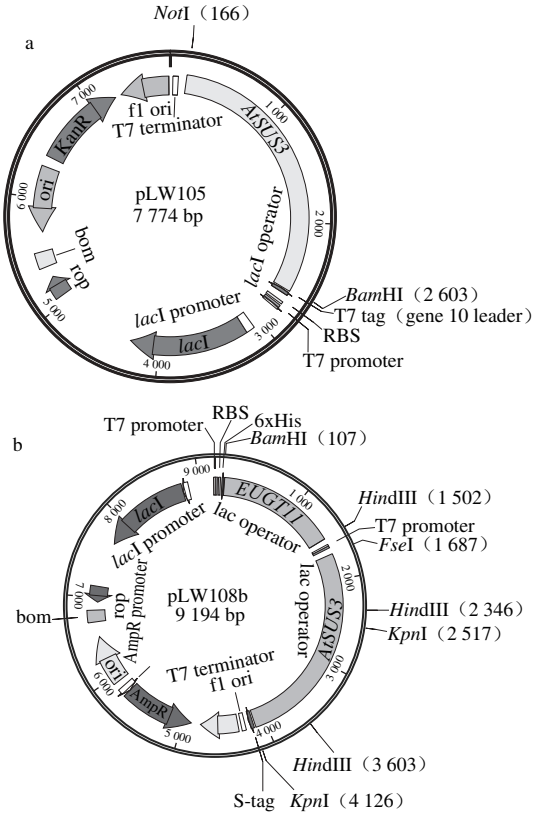


图3　质粒pLW105（a）及pLW108（b）示意图

Fig. 3　Schematics showing plasmid pLW105 (a) and pLW108 (b)

根据NCBI上*AtSUS3*（NM_116461.3）的开放阅读框240～266 9 bp序列以及拟插入载体pET28a位置*Bam*HI-*Not*I两端的序列设计引物对，正向引物：5′-AGCAAATGGGTCGCGGATCCATGGCAAACCCTAAGCTCA-3′，反向引物：5′-TGCTCGAGTGCGGCCGCTCAGTCATCGGCGGTTGA-3′。随后以拟南芥cDNA为模板进行PCR，50 μL反应体系中添加25 μL PrimerSTAR Max、上述引物（10 μmol/L）各1 μL、拟南芥cDNA模板0.4 μL，去离子水补满余下体积，反应条件为98 ℃ 3 min，随后25 个循环98 ℃ 10 s、55 ℃ 15 s、72 ℃ 30 s，接着72 ℃ 10 min，降温至16 ℃。PCR结束后反应产物进行电泳并切胶回收。经纯化的PCR产物以Infusion法装配至载体pET28a *Bam*HI-*Not*I位点之间，构建质粒pLW105（图3），转化大肠杆菌DH10B，涂布含50 μg/mL卡那霉素的LB固体培养基平板，37 ℃过夜培养后挑取克隆双酶切以及测序验证。

1.3.2　共表达*EUGT11*与*AtSUS3*质粒pLW108的构建

前期工作中构建的pYF09是以pETDuet1为载体，在P1的多克隆位点整合*EUGT11*基因[21]。鉴于pETDuet1系双启动子质粒，因此在其P2的多克隆位点插入蔗糖合酶*AtSUS3*基因获得共表达质粒pLW108。根据NCBI上*AtSUS3*（NM_116461.3）的开放阅读框240～2 669 bp序列以及拟插入载体pETDuet1P2下游*Fse*I-*Kpn*I位置两端的序列设计引物对，正向引物：5′-TCAATTGGATATCGGCCGGCCAGATGGCAAACCCTAAGCTCA-3′，反向引物：5′-CTTTACCAGACTCGAGGGTACCTCAGTCATCGGCGGTTGA-3′，以pLW105为模板进行PCR，条件同构建pLW105。PCR结束后产物进行电泳并切胶回收。纯化后的PCR产物以Infusion法克隆至质粒pYF09（*Fse*I、*Kpn*I双酶切），所构质粒pLW108（图3）转化大肠杆菌DH10B，涂布含100 μg/mL 氨苄青霉素的LB固体培养基平板，37 ℃过夜培养后挑取克隆子测序验证。

1.3.3　细胞催化合成RD

将测序验证正确的pLW108转化大肠杆菌宿主BL21（DE3）。挑取含100 μg/mL氨苄青霉素的LB转化平板上的单克隆接种至含抗生素的液体LB培养基，37 ℃摇床转速250 r/min培养过夜。然后以1%接种量接种至100 mL含氨苄青霉素的LB培养基，同样条件培养约1.5 h检测$OD_{600\ nm}$达到0.3～0.4左右时停止培养，菌液降温至16 ℃左右后加入IPTG诱导，诱导剂IPTG终浓度为0.1 mmol/L。随后将培养菌液置于16 ℃，180 r/min转速培养18 h。培养结束后离心收集菌体，以100 mmol/L pH 8磷酸钠缓冲液重悬清洗2 遍后用于细胞催化反应。催化体系为2 mL，催化体系以100 mmol/L pH 8磷酸钠缓冲液配制，每毫升含0.2 g湿菌体、60 mmol/L柠檬酸三钠、1 mmol/L RA、10 g/L普朗尼克F68、0.1 mmol/L $ZnCl_2$，以及质量浓度40 g/100 mL蔗糖。催化反应条件为反应温度37 ℃，反应时间24 h。平行实验5 次，所得样品分析及统计方法见1.3.5节。

1.3.4　粗酶催化合成RD

裂解细胞催化的细胞培养方法同全细胞催化。在培养结束后离心收集菌体，用100 mmol/L pH 8磷酸钠缓冲液清洗2 遍后重悬于100 mmol/L pH 8磷酸钠缓冲液中，菌悬液浓度为每毫升反应液0.1 g湿菌体，置于冰上超声破碎至菌悬液清澈。随后以此破碎菌悬液中添加其他反应物进行催化反应，催化反应体系各添加成分终含量为1 g/L RA，0.1 mmol/L $ZnCl_2$，以及不同质量浓度蔗糖

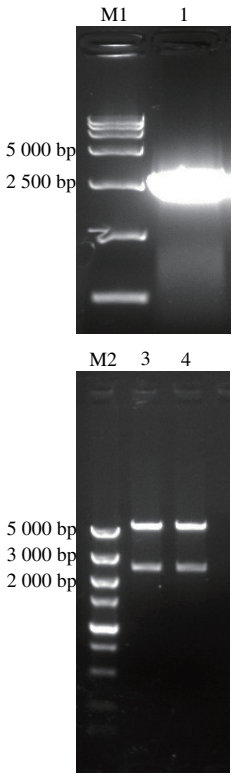
分别为0、0.5、1、5 g/100 mL和10 g/100 mL。反应温度37 ℃，反应时间24 h，每组条件平行实验5 次。

1.3.5 检测与统计分析

RA、RD由高效液相色谱进行检测。色谱柱Thermo Hypersil Gold AQ（250 mm×4.6 mm，5 μm），检测波长205 nm，柱温控制40 ℃，进样量40 μL。色谱条件为：A相水，B相乙腈，0～5 min，25% B；5～30 min，25%～65% B；30～34 min，65% B；34～35 min，65%～25% B；35～40 min，25% B。标准曲线以RA、RD标准品配制制作。RA标准曲线方程为y=0.260 6x－0.931 8；RD标准曲线方程为y=0.202 5x－0.135 7。催化反应结束后的反应体系离心取上清液，0.2 μm滤膜过滤后进行液相分析。数据由SPSS软件中GLM One-Way ANOVA进行分析。

2 结果与分析

2.1 蔗糖合酶基因*AtSUS3*的克隆



M1. DL15000 Marker；泳道1. *AtSUS3* PCR扩增电泳结果；M2. DL5000 Marker；泳道3、4.阳性克隆pLW105 *Bam*HI、*Not*I双酶切验证。

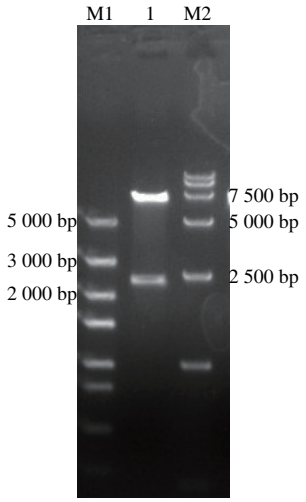
图4 蔗糖合酶*AtSUS3*的克隆与质粒pLW105的构建

Fig. 4 Cloning of *AtSUS3* gene and construction of pLW105

以1.3.1节方法克隆蔗糖合酶基因*AtSUS3*，装配至载体pET28a，构建质粒pLW105。由图4可知，以*Bam*HI和*Not*I双酶切pLW105，凝胶电泳结果显示2 条条带，较大的条带系载体pET28a骨架（约5 369 bp），较小的条带大小在2 000～3 000 bp之间，2 500 bp左右，与*AtSUS3*实际的2 430 bp接近，结合测序结果，表明质粒pLW105构建成功。

2.2 糖基转移酶基因与*AtSUS3*基因串联质粒构建结果

获得蔗糖合酶克隆后，将其与催化RA合成RD的糖基转移酶*EUGT11*基因在双启动子质粒pETDuet1上共同表达，构建酶偶联协同作用质粒pLW108。由于表达*EUGT11*的质粒pYF09本身就是以pETDuet1为载体构建的，因此在构建pLW108时，只需将*AtSUS3*基因序列装配至该双启动子载体的第2个启动子下游即可。按照1.3.2节方法构建pLW108后，由于*AtSUS3*基因序列内存在*Kpn*I识别序列，因此酶切验证时选取质粒上另外两个单一位点*Bam*HI（位于质粒107 bp）以及*Eco*RI（位于质粒2 373 bp）进行双酶切验证，以此双酶切后应该获得2 个片断，大小分别为2 266 bp和6 928 bp。由图5可知，电泳结果显示两条条带分别位于大约2 500 bp以及7500 bp，与预期片断大小相符，结合测序结果，确认*AtSUS3*已经成功插入目标位置。



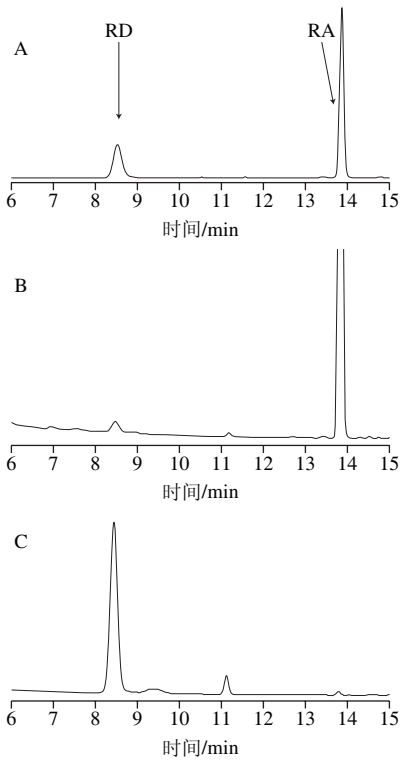
M1. DL5000 Marker；1. pLW108 *Bam*HI、*Eco*RI双酶切；M2. DL15000 Marker。

图5 酶偶联共表达质粒pLW108的酶切验证

Fig. 5 Restriction digestion of pLW108 co-expressing *EUGT11* and *AtSUS3*

2.3 偶联双酶全细胞催化合成RD

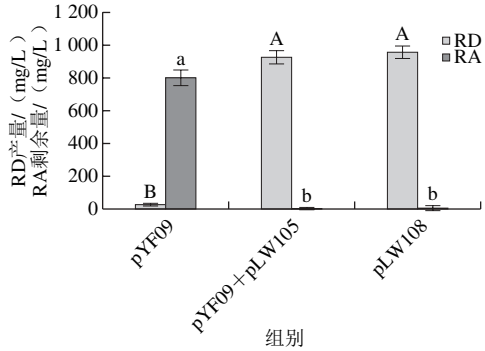
为了验证*AtSUS3*的效果，首先在不添加外源UDPG的情况下，用共转化pYF09及pLW105双质粒的BL21（DE3）进行细胞催化，结果表明反应上清液中RD质量浓度约930 mg/L，RA底物摩尔转化率大于80%，样品上清液中仅余少量RA（约6～20 mg/L）（图6、7）。而对照pYF09-BL21（DE3）在相同条件下，RD质量浓度约为23 mg/L，底物摩尔转化率2.3%（图6、7）。这一结果说明引入了UDPG再生循环之后，催化反应的瓶颈获得了非常明显的缓解。考虑到双质粒转化对今后产品开发影响，随后构建了共表达双酶的质粒pLW108，催化效果与双质粒转化没有显著差异（图7）。



A.样品为RA与RD的标准品混合物；B.样品为pYF09-BL21（DE3）催化产物；C. pYF09＋pLW105-BL21催化产物。

图 6 不同大肠杆菌工程菌转化RA生产RD的液相色谱图

Fig. 6 HPLC chromatograms showing biotransformation of RD by different engineered *E. coli* strains

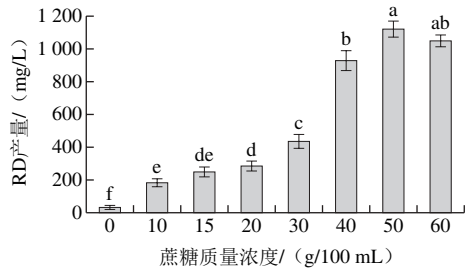


不同大写字母表示RD产量差异显著，$P<0.05$；不同小写字母表示RA剩余量差异显著，$P<0.05$。图9同。

图 7 携带不同质粒的大肠杆菌BL21（DE3）工程菌催化RA合成RD的结果

Fig. 7 RD yields with different engineered *E. coli* BL21(DE3) strains

由于推动UDPG再生的重要底物是外源添加的蔗糖，因此催化体系内蔗糖质量浓度对催化的影响至关重要。研究一系列外源蔗糖质量浓度后发现，蔗糖质量浓度50 g/100 mL条件下，RD产量最佳，可达1 100 mg/L，底物转化率高于95%（图8）。但是细胞催化体系内蔗糖质量浓度高于40 g/100 mL时，反应结束时细胞呈现部分裂解状态，不能称为全细胞催化，而且高质量浓度的蔗糖残留于反应体系，会给后续的分离纯化造成困难。因此下一步的工作需要研究降低催化体系蔗糖质量浓度的策略。



不同小写字母表示差异显著，$P<0.05$。

图 8 蔗糖质量浓度对工程菌全细胞催化合成RD的影响

Fig. 8 Effect of sucrose concentration on RD yield by whole cell catalysis

2.4 共表达双酶细胞破碎物催化合成RD

以全细胞进行催化时，为了获得高效的UDPG再生，需要向体系内添加高质量浓度的蔗糖（图9）以形成有效的胞内浓度，提示即使体系内添加了细胞透性剂，工程菌细胞的细胞膜仍然影响蔗糖进入细胞。为降低蔗糖用量，考虑可以用共表达双酶的工程菌细胞破碎粗酶进行“一锅法”催化合成RD。用粗酶进行反应的实验测试0～10 g/100 mL的蔗糖用量，结果显示蔗糖质量浓度5 g/100 mL条件下RD产量最高，达到1 051 mg/L，RA底物摩尔转化率为93%（图9）。同全细胞催化相比，粗酶催化实现了更低质量浓度蔗糖条件下RD的高效合成。

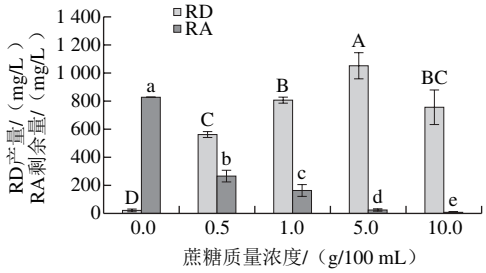


图 9 糖基转移酶EUGT11与蔗糖合酶AtSUS3粗酶偶联催化合成RD

Fig. 9 One-pot biocatalysis of RD by raw cell lyse containing EUGT11 and AtSUS3

3 讨 论

随着天然产物生物合成途径挖掘工作的推进，异源表达系统生物合成高附加值的天然来源糖苷类化合物是天然产物合成生物学的重要发展方向。由于异源表达底盘大肠杆菌的代谢系统先天缺少糖基化反应，因此存在内源性UDPG供给不足的问题[24]。为了增加底盘细胞内源UDPG供给，目前已见报道的代谢工程改造策略主要从两个方面入手，一方面是对底盘细胞自身的UDPG代谢路径进行改造，通过敲除和（或）替换UDPG生物合成和代

谢路径上的相关基因，结合过表达UDPG的合成酶引导UDPG的富集，另一方面是挖掘自然界其他物种的UDPG合成通路引入底盘提高UDPG含量。

单独对底盘细胞已有UDPG生物合成途径改造成效往往并不明显，敲除UDPG合成路线上的分支代谢不能有效提高UDPG供给[25-27]。因此对已有路径的改造往往与外源引入其他途径结合从而实现理想的UDPG供给。例如De Bruyn等[27-28]以*Bifidobacterium adolescentis*的蔗糖磷酸化酶（EC 2.4.1.7）替换大肠杆菌底盘原有的蔗糖水解酶，将菌体生长与UDPG合成分开并富集UDPG合成前体1-磷酸葡萄糖，敲除大肠杆菌内UDPG的生物合成路径中消耗1-磷酸葡萄糖各途径多个基因以及UDPG降解酶基因*ushA*，再结合过表达催化前体1-磷酸葡萄糖生成UDPG的UTP-1-磷酸葡萄糖尿苷转移酶构建了糖基化平台合成糖基化酚类和槲皮苷。Weyler等[29]则仅敲除了催化6-磷酸葡萄糖与1-磷酸葡萄糖互变的磷酸变位酶，结合来自*Leuconostoc mensenteroides*的蔗糖磷酸化酶构建了高效合成UDPG的菌株，在不添加ATP的情况下达到了54%的底物转化率。事实上对底盘已有UDPG的改造相较外源引入UDPG合成通路来说，并不是必要的操作。Pei Jianjun等[30]采用重组*Bifidobacterium adolescentis*的蔗糖磷酸化酶结合过表达UTP-1-磷酸葡萄糖尿苷转移酶实现了内源性UDPG的富集，以此方法生物催化黄芪苷，产量达到1.7 g/L，底物转化率91.9%。

由于蔗糖磷酸化酶（EC 2.4.1.7）的产物是果糖和UDPG的前体1-磷酸葡萄糖，因此引入该酶的同时需要加强UTP-1-磷酸葡萄糖尿苷转移酶的表达才能实现UDPG的富集。而除了蔗糖磷酸化酶之外，还有一个简洁的UDPG富集策略，即引入蔗糖合酶，同糖基化反应形成偶联原位再生UDPG。蔗糖合酶对糖基化反应的贡献是双效的，一方面通过消耗蔗糖和UDP再生UDPG，另一方面消耗了UDP可防止UDP积累抑制糖基化反应。但是蔗糖合酶催化的反应是可逆的，并且其作为植物糖代谢的重要酶类广泛存在，对于UDPG富集所需的蔗糖裂解方向倾向的条件各有不同，因此选择与目标产物糖基化反应搭配得宜的蔗糖合酶成为双酶高效偶联催化糖基化产物的关键。Masada等[31]采用拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）的AtSUS1用于姜黄素苷的合成，可大大降低外源UDPG的添加量至原有添加量的1/10。AtSUS1亦有用于催化合成RA的报道，但体系内需要添加UDP[32]。Huang等[33]则选取来自大豆的蔗糖合酶GmSUS构建UDPG再生平台，用于合成多种糖基化小分子，其中香叶苷的产率可达99%。本实验选择拟南芥AtSUS3与糖基转移酶EUGT11偶联，因为与其他已有报道的蔗糖合酶的酶学特性相比，AtSUS3可以在EUGT11的催化条件下高效再生UDPG[22]。实际结果也表明AtSUS3与EUGT11结合可在不外源添加UDPG或UDP的条件下高效催化RD合成。

高效异源催化合成RD有赖于筛选出活性与专一性均优异的糖基转移酶，以及充足的内源性UDPG供给。本实验选择高效专一糖基转移酶EUGT11，联合适宜糖基转移反应条件下高效循环再生UDPG的蔗糖合酶AtSUS3，实现了仅添加底物RA和蔗糖为起始物料的RD高效合成，为开发甜菊糖苷类珍稀组分的生产提供了参考基础。

参考文献：

[1] SAKAMOTO I, YAMASAKI K, TANAKA O. Application of ^{13}C NMR spectroscopy to chemistry of plant glycosides: rebaudiosides-D and -E, new sweet diterpene-glucosides of *Stevia rebaudiana* Bertoni[J]. Chemical and Pharmarceutical Bulletin, 1977, 25(12): 3437-3439. DOI:10.1248/cpb.25.3437.

[2] CEUNEN S, GEUNS J M C. Steviol glycosides: chemical diversity, metabolism, and function[J]. Journal of Natural Products, 2013, 76(6): 1201-1228. DOI:10.1021/np400203b.

[3] PRAKASH I, MA G, BUNDERS C, et al. A novel diterpene glycoside with nine glucose units from *Stevia rebaudiana* Bertoni[J]. Biomolecules, 2017, 7(1): 1-10. DOI:10.3390/biom7010010.

[4] PERERA W H, GHIVIRIGA I, RODENBURG D L, et al. Rebaudiosides T and U, minor C-19 xylopyranosyl and arabinopyranosyl steviol glycoside derivatives from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni[J]. Phytochemistry, 2017, 135: 106-114. DOI:10.1016/j.phytochem.2016.12.001.

[5] CHATURVEDULA V S P, CLOS J F, RHEA J, et al. Minor diterpenoid glycosides from the leaves of *Stevia rebaudiana*[J]. Phytochemistry Letters, 2011, 4(3): 209-212. DOI:10.1016/j.phytol.2011.01.002.

[6] LEMUS-MONDACA R, VEGA-GÁLVEZ A, ZURA-BRAVO L, et al. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: a comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects[J]. Food Chemistry, 2012, 132(3): 1121-1132. DOI:10.1016/j.foodchem.2011.11.140.

[7] FERRAZZANO G, CANTILE T, ALCIDI B, et al. Is *Stevia rebaudiana* Bertoni a non cariogenic sweetener? a review[J]. Molecules, 2016, 21(1): 38-50. DOI:10.3390/molecules21010038.

[8] PURI M, SHARMA D, TIWARI A K. Downstream processing of stevioside and its potential applications[J]. Biotechnology Advances, 2011, 29(6): 781-791. DOI:10.1016/j.biotechadv.2011.06.006.

[9] BELOVIĆ M, TORBICA A, PAJIĆ-LIJAKOVIĆ I, et al. Development of low calorie jams with increased content of natural dietary fibre made from tomato pomace[J]. Food Chemistry, 2017, 237: 1226-1233. DOI:10.1016/j.foodchem.2017.06.045.

[10] BELŠČAK-CVITANOVIĆ A, KOMES D, DUJMOVIĆ M, et al. Physical, bioactive and sensory quality parameters of reduced sugar chocolates formulated with natural sweeteners as sucrose alternatives[J]. Food Chemistry, 2015, 167: 61-70. DOI:10.1016/j.foodchem.2014.06.064.

[11] HANSON J R. From Caa-ehe to a commercial sweetener: the diterpenoid glycosides of *Stevia rebaudiana*[J]. Science Progress, 2016, 99(4): 413-419. DOI:10.3184/003685016X14773090197508.

[12] PRAKASH I, CAMPBELL M, SAN MIGUEL R I, et al. Synthesis and sensory evaluation of ent-kaurane diterpene glycosides[J]. Molecules, 2012, 17(8): 8908-8916. DOI:10.3390/molecules17088908.

[13] PRAKASH I, CAMPBELL M, CHATURVEDULA V. Catalytic hydrogenation of the sweet principles of *Stevia rebaudiana*, rebaudioside B, rebaudioside C, and rebaudioside D and sensory evaluation of their reduced derivatives[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2012, 13(11): 15126-15136. DOI:10.3390/ijms131115126.

[14] FDA. GRAS notice 715, rebaudioside D[EB/OL]. https://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/index.cfm?set=GRASNotices&id=715.

[15] KUMAR H, KAUL K, BAJPAI-GUPTA S, et al. A comprehensive analysis of fifteen genes of steviol glycosides biosynthesis pathway in *Stevia rebaudiana* (Bertoni)[J]. Gene, 2012, 492(1): 276-284. DOI:10.1016/j.gene.2011.10.015.

[16] MOHAMED A, CEUNEN S, GEUNS J, et al. UDP-dependent glycosyltransferases involved in the biosynthesis of steviol glycosides[J]. Journal of Plant Physiology, 2011, 168(10): 1136-1141. DOI:10.1016/j.jplph.2011.01.030.

[17] MAO G, VICK J E, LI S Y, et al. Production of non-calroic sweetners using engineered whole-cell catalysts: US201562147160[P]. 2016-10-20 [2017-10-23].

[18] SIMON E, ANDERSON I N, MIKKELSEN M D, et al. Efficient production of steviol glycosides in recombinant hosts: US2015361476[P]. 2015-12-17[2017-10-23].

[19] ROBERTSEN H L, ANDERSEN I N, TAKOS A M, et al. Production of steviol glycosides in recombinant hosts: WO2016038095[P]. 2016-03-17[2017-10-23].

[20] WANG J F, LI S Y, XIONG Z Q, et al. Pathway mining-based integration of critical enzyme parts for *de novo* biosynthesis of steviolglycosides sweetener in *Escherichia coli*[J]. Cell Research, 2016, 26(2): 258-261. DOI:10.1038/cr.2015.111.

[21] 杨玉凤, 费理文, 李建华, 等. 重组大肠杆菌全细胞催化合成莱鲍迪苷D[J]. 工业微生物, 2017, 47(5): 1-7. DOI:10.3969/j.issn.1001-6678.2017.05.001.

[22] SCHMOLZER K, GUTMANN A, DIRICKS M, et al. Sucrose synthase: a unique glycosyltransferase for biocatalytic glycosylation process development[J]. Biotechnology Advances, 2016, 34(2): 88-111. DOI:10.1016/j.biotechadv.2015.11.003.

[23] BAROJA-FERNANDEZ E, MUNOZ F J, LI J, et al. Sucrose synthase activity in the *sus1/sus2/sus3/sus4 Arabidopsis* mutant is sufficient to support normal cellulose and starch production[J]. Proceedings of National Academy of Sciences USA, 2012, 109(1): 321-326. DOI:10.1073/pnas.1117099109.

[24] BENNETT B D, KIMBALL E H, GAO M, et al. Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*[J]. Nature Chemical Biolology, 2009, 5(8): 593-599. DOI:10.1038/nchembio.186.

[25] MALLA S, PANDEY R P, KIM B G, et al. Regiospecific modifications of naringenin for astragalin production in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2013, 110(9): 2525-2535. DOI:10.1002/bit.24919.

[26] FAN Y X, ZHAO M J, WEI L J, et al. Enhancement of UDPG synthetic pathway improves ansamitocin production in *Actinosynnem pretiosum*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(6): 2651-2662. DOI:10.1007/s00253-015-7148-2.

[27] DE BRUYN F, PAEPE B, MAERTENS J, et al. Development of an *in vivo* glucosylation platform by coupling production to growth: production of phenolic glucosides by a glycosyltransferase of *Vitis vinifera*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2015, 112(8): 1594-1603. DOI:10.1002/bit.25570.

[28] DE BRUYN F, VAN BREMPT M, MAERTENS J, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* into a versatile glycosylation platform: production of bio-active quercetin glycosides[J]. Microbial Cell Factories, 2015, 14: 138. DOI:10.1186/s12934-015-0326-1.

[29] WEYLER C, HEINZLE E. Multistep synthesis of UDP-glucose using tailored, permeabilized cells of *E. coli*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2015, 175(8): 3729-3736. DOI:10.1007/s12010-015-1540-3.

[30] PEI J J, DONG P, WU T, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for astragalin biosynthesis[J]. Journal of Agricutural and Food Chemistry, 2016, 64(42): 7966-7972. DOI:10.1021/acs.jafc.6b03447.

[31] MASADA S, KAWASE Y, NAGATOSHI M, et al. An efficient chemoenzymatic production of small molecule glucosides with *in situ* UDP-glucose recycling[J]. FEBS Letters, 2007, 581(13): 2562-2566. DOI:10.1016/j.febslet.2007.04.074.

[32] WANG Y, CHEN L L, LI Y, et al. Efficient enzymatic production of rebaudioside A from stevioside[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2015, 80(1): 67-73. DOI:10.1080/09168451.2015.1072457.

[33] HUANG F C, HINKELMANN J, HERMENAU A, et al. Enhanced production of β-glucosides by *in-situ* UDP-glucose regeneration[J]. Journal of Biotechnology, 2016, 224: 35-44. DOI:10.1016/j.jbiotec.2016.02.022.