

生物合成法制备2-O- α -甘油葡萄糖苷的研究进展

徐海畅^{1,2}, 刘振东^{1,2}, 蒋棱^{1,2}, 梁浩^{1,2}

(1.北京化工大学生命科学与技术学院, 北京, 100029;

2..北京化工大学化工资源有效利用国家重点实验室, 北京, 100029)

摘 要: 2-O- α -甘油葡萄糖苷 (2-O- α -glucosyl glycerol, 2-O- α -GG) 是一种来源于蓝藻的天然葡萄糖苷类化合物, 在皮肤保湿、抗炎舒敏等方面表现出优良性能, 已被广泛应用于面膜、面霜、浴液和化妆水等多种化妆品和个人护理产品中。生物合成法制备2-O- α -甘油葡萄糖苷具有环境友好性、操作方式简单、反应条件温和等优势。文章主要从酶催化法和全细胞催化法两个方面综述了2-O- α -甘油葡萄糖苷的生物合成研究现状, 旨在为通过生物法实现2-O- α -甘油葡萄糖苷的工业化生产提供理论依据与参考。

关键词: 2-O- α -甘油葡萄糖苷; 生物合成法; 酶催化法; 全细胞催化法

作者简介: 徐海畅, 博士, 长期从事蔗糖磷酸化酶改造及固定化的研究。E-mail: xuhaichang666@sina.com。

通信作者简介: 梁浩, 教授, 博士生导师, 研究方向为天然产物生物合成与稳态增效。

E-mail: lianghao@mail.buct.edu.cn。



徐海畅

甘油葡萄糖苷 (Glucosyl glycerol, GG) 是一类由一分子葡萄糖和一分子甘油通过 α -糖苷键或 β -糖苷键连接而成的糖苷类化合物。目前为止, 自然界中已鉴别出6种不同构型的甘油葡萄糖苷, 包括2-O- α -甘油葡萄糖苷^[1] (2-O- α -GG), (2S)-1-O- α -甘油葡萄糖苷 (2S-1-O- α -GG), (2R)-1-O- α -甘油葡萄糖苷^[2] (2R-1-O- α -GG), 2-O- β -甘油葡萄糖苷^[3] (2-O- β -GG), (2S)-1-O- β -甘油葡萄糖苷^[4] (2S-1-O- β -GG), (2R)-3-O- β -甘油葡萄糖苷^[5] (2R-3-O- β -GG)。其中, 2-O- α -甘油葡萄糖苷是目前已报道生物活性最高、应用最广的甘油葡萄糖苷, 具有补水保湿^[6]、抗炎舒敏^[7]、治疗糖尿病^[8]、稳定蛋白质^[9]等多种功效 (图1), 在食品、医药、化妆品领域的应用前景十分光明。随着2-O- α -甘油葡萄糖苷

的生物活性和功能被逐步明确, 近年来2-O- α -甘油葡萄糖苷在化妆品领域的应用越来越广泛。作为优秀的保湿剂, 2-O- α -甘油葡萄糖苷常被补充到许多化妆品和个人护理产品中, 如面膜、面霜、身体乳液和化妆水等。生物合成法制备2-O- α -甘油葡萄糖苷催化效率更高、专一性更强、反应条件更温和、产品纯度更高、产量更高、更易于工业放大、更符合可持续发展理念和绿色生物制造基本内涵。本综述分别从游离酶法、固定化酶法、全细胞催化法、固定化细胞催化法、蓝藻发酵法五个方面介绍了生物法合成2-O- α -甘油葡萄糖苷的研究进展, 为工业化生产2-O- α -甘油葡萄糖苷提供理论参考及依据。

1. 游离酶催化法制备2-O- α -甘油葡萄糖苷

细菌或真菌来源的 α -葡萄糖苷酶^[6] (EC 3.2.1.20)、环糊精葡聚糖转移酶^[10] (EC 3.2.1.19)、淀粉酶^[11] (EC 2.4.1.4)、蔗糖磷酸化酶^[12] (EC 2.4.1.7)、甘油葡萄糖苷磷酸化酶^[13, 14] (EC 2.4.1.332) 均能在体外系统中催化制备2-O- α -甘油葡萄糖苷。糖苷酶法制备2-O- α -甘油葡萄糖苷几乎均遵循保留型双取代作用机制, 催化过程中存在共价连接的 β -葡萄糖基-酶中间体^[15]。由 α -葡萄糖苷酶、环糊精葡聚糖转移酶、淀粉酶催化产生的甘油葡萄糖苷是由2-O- α -甘油葡萄糖苷、1-O- α -甘油葡萄糖苷等多种异构体组成的混合物 (表1), 产物构型复杂、分离纯化十分困难。仅有蔗糖磷酸化酶和甘油葡萄糖苷磷酸化酶催化产生单一构型的2-O- α -甘油葡萄糖苷。

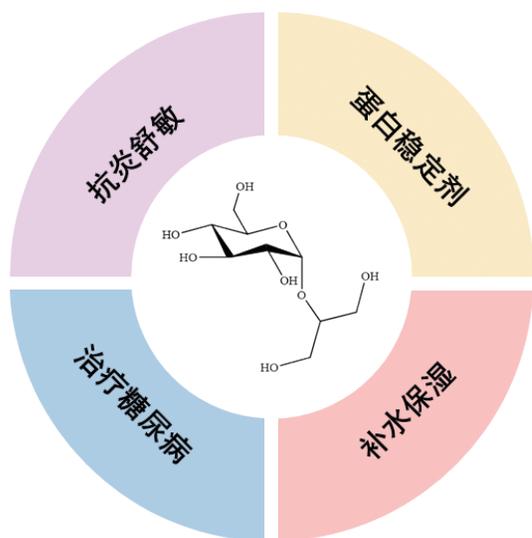


图1 2-O- α -甘油葡萄糖苷的功能

表1 酶催化法制备 GG产物构型对比

酶	糖基供体	产物	最高转化率	参考文献
α -葡萄糖苷酶	麦芽糖	(2R)-1-O-	66%	[6]
		α -GG (2S)-		
		1-O- α -GG		
环糊精葡萄糖基转移酶	淀粉	2-O- α -GG	22%	[10]
		1-O- α -GG		
淀粉酶	蔗糖	2-O- α -GG	48%	[11]
		1-O- α -GG		
甘油葡萄糖苷磷酸化酶	α -葡萄糖-1-磷酸或 β -葡萄糖-1-磷酸	2-O- α -GG	/	[13, 14]
蔗糖磷酸化酶	蔗糖	2-O- α -GG	90%	[12]

1.1 蔗糖磷酸化酶

蔗糖磷酸化酶 (Sucrose Phosphorylase, SPase) 属于 GH13 家族, 主要分布在 [16] 肠膜明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides*, LmSPase)、变异链球菌 (*Streptococcus mutans*, SmSPase)、双歧杆菌 (*Bifidobacterium sp.*, BaSPase)、嗜糖假单胞菌 (*Pseudomonas saccharophila*, PsSPase)、热杆菌 (*Thermobacillus sp.*, TbSPase)、罗伊氏乳杆菌 (*Lactobacillus reuteri*, LrSPase) 等细菌中。SPase 在体内催化蔗糖与无机磷酸盐的可逆磷酸化, 产生 1-磷酸葡萄糖 (Glucose 1-phosphate, G1P) 和果糖。SPase 底物特异性范围广, 可以将蔗糖中的葡萄糖基转移至氢醌 [17]、甘油 [18, 19]、L-抗坏血酸 [20, 21] 等受体上, 生成 α -熊果苷、2-O- α -甘油葡萄糖、L-抗坏血酸-2-O- α -葡萄糖苷等多种糖基化产物, 在食品、医药、化妆品等领域应用广泛。

自从 Bernd Nidetzky 等人 [12] 首次报道利用蔗糖磷酸化酶生产 2-O- α -甘油葡萄糖苷的方法以来, 研究人员不断在细菌等微生物中挖掘高活性、高稳定性的蔗糖磷酸化酶。Bernd Nidetzky 等人以 LmSPase (20 U/mL) 为催化剂, 在 48 h 内, 将 0.8 M 蔗糖转化为 0.72 M 2-O- α -甘油葡萄糖苷, 转化率高达 90%。梁浩等人 [22] 在长双歧杆菌 (*Bifidobacterium longum*) 中挖掘出一种高活性蔗糖磷酸化酶 (BISPase)。在 24 h 内, BISPase (20 U/mL) 可以将 1.4 M 蔗糖转化为 1.134 M 2-O- α -甘油葡萄糖苷。BISPase 的催化活性是 LmSPase 的 3.15 倍, 非常有潜力作为生物催化剂用于 2-O- α -甘油葡萄糖苷工业化生产。

野生型 SPase 由于活性低、稳定性差, 难以满足工业应用需求, 研究人员利用理性设计、定向进化等蛋白质工

程技术改造蔗糖磷酸化酶, 以提升其活性及稳定性。陈献忠等人 [20] 利用 FireProt 预测 LmSPase 的热稳定性增强突变位点, 所获得的 LmSPase-T219L 和 LmSPase-I13F/T219L/T263L/S360A 突变体, 在 50°C 下的半衰期是野生型 LmSPase 的 200%。贾红华等人 [23] 通过丙氨酸扫描改造 BISPase, 将 BISPase 293 位的甘氨酸突变成丙氨酸, 使 BISPase 活性增强 50%, 在 48 h 内催化制备 177.6 g/L 2-O- α -甘油葡萄糖苷。与 LmSPase 和 BISPase 相比, BaSPase 热稳定性更高, 但 BaSPase 对甘油亲和力较低且选择性差, 导致其催化活性低, 产物成分复杂。Tom Desmet 等人 [24] 通过建立突变体文库, 筛选得到高活性突变体 BaSPase-P134Q, 其制备 2-O- α -甘油葡萄糖苷的催化效率是野生型 BaSPase 的 21 倍。蔗糖磷酸化酶的活性、稳定性增强机制均与酶内部的氢键网络和酶与底物的氢键相互作用相关。因此, 未来对于蔗糖磷酸化酶的改造应围绕酶活性位点周围及表面氨基酸的氢键展开, 通过增加氢键数量、重塑氢键网络、增强氢键相互作用力提升蔗糖磷酸化酶的性能。

1.2 甘油葡萄糖苷磷酸化酶

与蔗糖磷酸化酶不同, 甘油葡萄糖苷磷酸化酶的反应底物为 1-磷酸葡萄糖, 其稳定性差、且成本极高, 并不适合工业应用。因此, 孙媛霞等人 [25] 构建了由蔗糖磷酸化酶和甘油葡萄糖苷磷酸化酶 (Glucosyl glycerol phosphorylase, GGP) 组成的双酶级联催化反应系统, 经磷酸化反应和糖基化反应, 制备 2-O- α -甘油葡萄糖苷。在 100 mL 反应体系中, 加入 2.4 M 甘油、2 M 蔗糖、40 U/mL SPase、20 U/mL GGP, 反应 48 h, 2-O- α -甘油葡萄糖苷产量高达 452 g/L。双酶级联催化制备 2-O- α -甘油葡萄糖苷, 具有巨大的工业应用潜力, 但催化反应所需双酶总浓度为 60 U/mL, 导致工业化成本较高, 是亟待解决的问题。

2. 固定化酶法制备 2-O- α -甘油葡萄糖苷

随着现代工业化学中对环保、绿色、可持续的要求越来越高, 酶作为一种绿色、环保的催化剂越来越受到广泛的关注 [26]。酶的高选择性和特异性可以最大限度地提高原子经济性, 并且酶在发挥其催化功能时, 通常在温和条件下, 水介质中。然而, 酶作为生物催化剂, 存在稳定性差、不能重复利用等一系列天然问题 [27], 严重阻碍酶在工业化过程中的应用。固定化是一种简单的方法, 可以克服

工业生产中游离酶稳定性差、不可重复使用的缺点^[28]。静电吸附、共价结合、特异性吸附、共沉淀和交联酶聚集体是几种典型的固定化技术^[29]。迄今为止,共价结合^[30]、交联酶聚集体^[31,32]、离子吸附^[33]、特异性吸附^[22]、仿生矿化^[34]是五种已报道的蔗糖磷酸化酶固定化方法(表2)。

表2 SPase固定化方法的优劣势对比

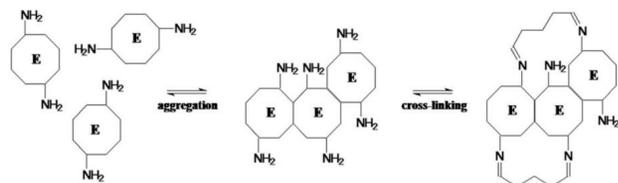
方法	优势	劣势	参考文献
共价结合	酶与载体之间相互作用力强	操作繁琐、酶活损失大	[30]
交联酶聚集体	无需载体、成本低	环境污染大、固载率低	[31,32]
离子吸附	反应条件温和、绿色化学	酶活损失高	[33]
特异性吸附	酶无需纯化、酶活性增强	载体成本高	[22]
仿生矿化	制备条件温和、不损失酶活、反应时间短	酸性条件下载体易分解	[34]

2.1 共价结合

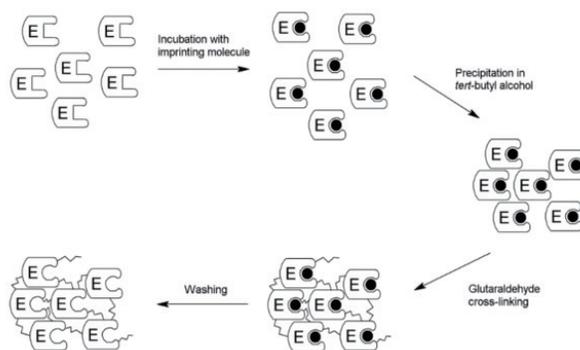
共价结合是指将载体表面基团在适宜条件下激活,与酶表面基团发生共价偶联反应,使酶在载体上固定化。An Cerdobbel等人^[30]将BaSPase通过多点共价结合,分别固定在Sepabeads EC-EP和EC-HFA上。BaSPase固定化条件经响应面法优化和载体筛选后,在Sepabeads EC-HFA上的最高固载率为72%。固定化后,BaSPase最适温度从58℃提升至65℃,更适用于在高温条件下催化制备2-O- α -甘油葡萄糖苷。固定化BaSPase在60℃下孵育16 h后,其催化活性仍保留65%,具有优异的热稳定性,符合当今工业生物催化剂的要求。

2.2 交联酶聚集体

交联酶聚集体(Cross-linked enzyme aggregates, CLEAs)是一种通过物理聚集和化学交联,在无载体条件下固定化酶的手段。Wim Soetaert等人^[32]将BaSPase在叔丁醇中沉淀,戊二醛交联制备BaSPase交联酶聚集体(图2)。BaSPase交联酶聚集体的最适温度比游离BaSPase高17℃。BaSPase最适温度的显著提高可以使其在催化过程中减少杂菌的生长,对于2-O- α -甘油葡萄糖苷的工业化生产具有重要意义。BaSPase交联酶聚集体可重复使用十次且热稳定性强,在60℃放置1周后仍未损失催化活性。

图2 BaSPase交联酶聚集体的制备流程^[32]

Tom Desmet等人^[31]将BaSPase通过分子印迹法和交联酶聚集体固定化(图3),将BaSPase制备2-O- α -甘油葡萄糖苷活性提升两倍。BaSPase印迹交联酶聚集体有潜力作为高效、绿色的生物催化剂用于2-O- α -甘油葡萄糖苷的合成。交联酶聚集体固定化酶具有成本低,操作简单等优势,但固载率低(20%~30%),制备过程需加入有机溶剂,与环境友好性理念相悖。

图3 BaSPase印迹交联酶聚集体的制备流程^[31]

2.3 离子吸附

离子吸附是一种利用酶与载体之间存在的电荷差异,通过阴阳离子间相互作用固定化酶的方法。Bernd Nidetzky等人^[33]将LmSPase通过离子吸附作用,固定在阳离子砌块 Z_{basic2} 上,制备固定化酶LmSPase- Z_{basic2} 。LmSPase在 Z_{basic2} 上的负载量高达90 mg/g,固定化后,LmSPase的酶活性保留50%。LmSPase- Z_{basic2} 可在流动反应器中连续生产2-O- α -甘油葡萄糖苷,在底物浓度为200 mM时,2-O- α -甘油葡萄糖苷的时空转化率500 mmol/(L·h)。 Z_{basic2} 离子吸附固定化酶具有反应条件温和,载体重复使用性好等优势,但酶活损失高,工业化成本高。

2.4 特异性吸附

特异性吸附是一种利用带有组氨酸标签的酶与过渡金属离子之间存在的配位作用,特异性吸附固定化酶的方法。梁浩等人^[22]以Ni-NTA功能化琼脂糖微球为载体,直接从BISPase粗酶液中特异性吸附固定化酶,实现了BISPase的一步纯化和固定化。固定化后,基于琼脂糖载体优异的亲水性,BISPase催化活性增强30%。BISPase热稳定性显著增强,在50℃下孵育120 min后,仍有95%的相对活性。该团队首次发现BISPase在Ni-NTA功能化琼脂糖微球固定化后,其果糖副产物耐受性显著提升。经拉曼光谱分析,BISPase固定化后,其二级结构中 β -折叠组分显著增加,进而使BISPase稳定性和果糖副产物耐受性显著增强。Ni-NTA功能化琼脂糖微球特异性吸附固定化酶,

不仅省去繁琐的酶纯化步骤,而且还显著增强 BISPase 活性、稳定性及副产物耐受性,有潜力作为一种高效生物催化剂用于 2-O- α -甘油葡萄糖苷的工业化生产。

2.5 仿生矿化

有机-无机杂化纳米花是一类通过仿生矿化作用制备的花状功能性材料,因其合成方法简单、反应条件温和、稳定性强、生物相容性好而被广泛用于酶固定化。梁浩等人^[34]基于壳聚糖调控仿生矿化作用制备一种新型有机-无机杂化纳米材料,并将其应用于蔗糖磷酸化酶固定化(图4)。固定化后, BISPase 在酸性条件下(pH 4)的稳定性提高 2.42 倍。固定化 BISPase 作为强稳定性、高催化活性的生物催化剂,在 2-O- α -甘油葡萄糖苷生物合成中应用前景光明。基于固定化酶的简单工序和理想性能,此研究建立的壳聚糖调控策略可为设计和开发有机-无机杂化材料提供一定启发,推动酶固定化通用平台的发展。

刘逸寒等人^[35]通过共价结合和仿生矿化的共同作用,将 SPase 和 GGP 分步共固定在有机-无机杂化纳米花中。此方法首先将 SPase 的 C 端连接 Tag, GGP 的 C 端连接 Catcher。GGP-Catcher 通过仿生矿化作用固定在 GGP-CaP 杂化纳米花内,形成固定化酶 GGP@CaP。SPase-Tag 与 GGP@CaP 通过异肽键作用自组装,进而形成固定化双酶级联系统 SPase-GGP@CaP。SPase-GGP@CaP 在重复使用 10 次后,仍保留 61% 的相对活性。此研究提出的分步共固定策略为双酶级联系统固定化提供了重要参考和理论依据。

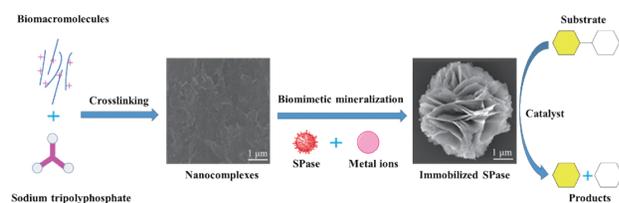


图4 生物大分子调控仿生矿化固定化 BISPase

3. 全细胞催化法制备 2-O- α -甘油葡萄糖苷

与游离酶催化法相比,全细胞催化法制备 2-O- α -甘油葡萄糖苷的稳定性更强,因为细胞结构可以保护酶免受外界条件影响。全细胞催化法可以避免酶的分离和纯化过程,并且细胞可以经离心后多次重复使用,降低生产成本。大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、谷氨酸棒状杆菌均能作为蔗糖磷酸化酶的表达宿主,全细胞催化制备 2-O- α -甘油葡萄糖苷。

3.1 大肠杆菌 (*Escherichia coli*)

大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) 是最常用的原核表达系统之一,因其培养条件简单、成本低廉、易于操作、生长周期短,广泛应用于科研和工业生产中。Bernd Nidetzky 等人^[36]将 LmSPase 和 BaSPase 基因在 *E. coli* BL21(DE3) 中成功表达,其中 LmSPase 能表达 80% 可溶性蛋白, BaSPase 仅能表达 40% 可溶性蛋白。表达 LmSPase 的大肠杆菌 BL21(DE3) 经发酵培养得 40 g 干重细胞,冻融后用于催化制备 2-O- α -甘油葡萄糖苷,产量高达 65 g/L,蔗糖转化率为 90%。朱林江等人^[37]则是将 LrSPase 基因在 *E. coli* BL21(DE3) 异源表达,并结合分批补料策略制备 2-O- α -甘油葡萄糖苷。该研究在 50 L 反应体系中,加入 OD₆₀₀ 为 15 *E. coli* BL21(DE3)、1.5 M 甘油,分两批加入 1 M 蔗糖,2-O- α -甘油葡萄糖苷产量高达 237.68 g/L,时空产率为 23.39 mM/h。

3.2 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*, *B. subtilis*) 作为一种重要的模式微生物,具有较强的蛋白分泌能力,并被公认为食品级安全微生物,在工业生产和科学研究中被广泛用于蛋白表达。饶志明等人^[38]构建了异源表达 LmSPase 的重组 *Bacillus subtilis* 168/pMA5-gtfA,并将其用作全细胞催化剂制备 2-O- α -甘油葡萄糖苷。*B. subtilis* 168/pMA5-gtfA 在 1 mol/L 蔗糖、2.5 mol/L 甘油、OD₆₀₀ 为 40、30 °C 下全细胞转化反应 48 h,共生成 189.3 g/L 2-O- α -甘油葡萄糖苷,平均转化速率为 15.6 mmol/(L·h),蔗糖转化率约为 75.1%,是目前报道的利用重组 *B. subtilis* 催化制备 2-O- α -甘油葡萄糖苷的最高产量,为 2-O- α -甘油葡萄糖苷的工业化生产及应用奠定了理论和实验基础。

3.3 谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*)

谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*, *C. glutamicum*) 同样为食品级安全微生物,能够在较宽的温度和 pH 范围内生长,适用于多种生产环境,可以使用廉价的碳源和氮源进行培养,适合大规模工业化生产。饶志明等人^[39]从 *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293 菌株中挖掘出一种新 SPase,并结合计算机辅助的蛋白质工程技术改造 SPase,将其活性提升了 60%。改造后的 SPase 基因在重组 *C. glutamicum* ATCC 13032 成功表达,并将其用作全细胞催化剂制备 2-O- α -甘油葡萄糖苷。*C. glutamicum* ATCC 13032 在 1.4 mol/L 蔗糖、3.5 mol/L 甘油、OD₆₀₀ 为 30、30 °C 下全细胞转化反应 20 h,生成 351.8 g/L 2-O- α -

甘油葡萄糖苷, 蔗糖转化率为 98%, 是迄今为止全细胞催化制备 2-O- α -甘油葡萄糖苷的最高产量, 工业化前景十分光明。

4. 固定化细胞催化法制备 2-O- α -甘油葡萄糖苷

与游离酶相似, 全细胞催化法也存在重复使用性差、稳定性差等问题。固定化细胞可以被回收并多次使用, 进一步减少了细胞的消耗, 降低了生产成本。并且, 固定化细胞的稳定性更强, 能够在较长时间内保持催化活性。Bernd Nidetzky 等人^[40]首先将表达 BaSPase 的 *E. coli* 细胞通过聚合作用固定在聚丙烯酰胺凝胶中制备固定化 *E. coli*。固定化 *E. coli* 被填充至固定床反应器中, 用于 2-O- α -甘油葡萄糖苷的连续生产。2-O- α -甘油葡萄糖苷的最大时空产率为 45 g/(L·h), 最高产量为 120 g/L。该研究建立了以固定化细胞为基础的 2-O- α -甘油葡萄糖苷连续流生产工艺, 开辟了 2-O- α -甘油葡萄糖苷生物合成新途径。

5. 蓝藻发酵法制备 2-O- α -甘油葡萄糖苷

除酶催化法与全细胞催化法之外, 2-O- α -甘油葡萄糖苷也可以被光合自养蓝藻合成。例如, 集胞藻 PCC8603 细胞受到盐胁迫时, 在甘油葡萄糖苷磷酸合成酶 (ggpS 基因编码) 和甘油葡萄糖苷磷酸酶 (ggpP 基因编码) 的共同作用下生成 2-O- α -甘油葡萄糖苷。ggtA、B、C 和 D 基因编码 ABC 转运蛋白, 负责将胞外的 2-O- α -甘油葡萄糖苷转运至胞内, 而 ggpR 是一个抑制 ggpS 基因转录的转录因子。吕雪峰等人^[41]分别敲除集胞藻 PCC6803 的 ggtC、ggtD 基因, 获得突变型集胞藻 PCC6803 Δ ggtCD。盐胁迫条件下, 突变型集胞藻 PCC6803 Δ ggtCD 在 8 天内生成 250 mg/L 2-O- α -甘油葡萄糖苷, 是野生型的 2.5 倍。在此基础上继续敲除 Δ ggpR 后, 突变型集胞藻 PCC6803 Δ ggtCD Δ ggpR 胞内和胞外 2-O- α -甘油葡萄糖苷产量均略有增加, 总 2-O- α -甘油葡萄糖苷产量增加至 291 mg/L, 比 Δ ggtCD 高 16%。改造后的突变型集胞藻 PCC6803 Δ ggtCD Δ ggpR 经半连续培养 24 天后, 2-O- α -甘油葡萄糖苷产量高达 981.8 mg/L。目前, 中科院青岛能源所在此基础上开发了蓝藻发酵法生产 2-O- α -甘油葡萄糖苷的先进生物制造技术。通过选育高产藻种、开发养

殖技术、创制绿色分离纯化技术, 最终实现了蓝藻规模培养制备 2-O- α -甘油葡萄糖苷的标准化生产全链条贯通与产业应用。

6. 结语

作为一种补水明星分子, 2-O- α -甘油葡萄糖苷在化妆品领域具有广阔的应用前景。虽然在可持续发展理念和绿色生物制造的需求推动下, 2-O- α -甘油葡萄糖苷的生物合成技术已取得了突破性进展。蓝藻发酵法制备 2-O- α -甘油葡萄糖苷已颇具产业化规模, 实现了高纯 2-O- α -甘油葡萄糖苷的产业化合成, 但是其在生物合成法方面还有较大的提升空间。全细胞催化法及酶催化法制备 2-O- α -甘油葡萄糖苷的研究均聚焦于蔗糖磷酸化酶。挖掘高活性蔗糖磷酸化酶并结合蛋白质工程、酶固定化等技术提升酶的稳定性, 建立起以蔗糖磷酸化酶为基础的 2-O- α -甘油葡萄糖苷生物合成技术仍是一大难题。用于 2-O- α -甘油葡萄糖苷绿色生物制造的蔗糖磷酸化酶研究较少, 还需要在以下几个方面做出努力: (1) 挖掘高活性、高稳定性蔗糖磷酸化酶, 构建蔗糖磷酸化酶高表达重组菌株; (2) 利用蛋白质工程技术改造蔗糖磷酸化酶, 提升游离酶本身的活性及稳定性; (3) 引入廉价、高性能、酶负载量高的固定化新材料, 使酶在固定化后不损失催化活性, 增强固定化酶的操作稳定性, 进而大大降低 2-O- α -甘油葡萄糖苷的生产成本; (4) 消除 2-O- α -甘油葡萄糖苷合成过程中存在的果糖副产物抑制效应, 进一步提高 2-O- α -甘油葡萄糖苷产量; (5) 构建适于固定化技术的反应器, 如微通道反应器, 通过批次反应、放大试验, 实现 2-O- α -甘油葡萄糖苷连续、稳定、规模化合成, 促进绿色生物制造产业发展。

致谢: 本文章作者感谢国家重点研发计划 (2021YFC2102800)、国家自然科学基金 (22078014) 的资助。

参考文献

- [1] MACKAY M A, NORTON R S, BOROWITZKA L J. Marine blue-green algae have a unique osmoregulatory system [J]. *Marine Biology*, 1983, 73: 301-307.
- [2] TAKENAKA F, UCHIYAMA H, T I. Identification of α -d-glucosylglycerol in sake [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, 64(2): 378-385.
- [3] MIYUKI K, EIYOYASU M, YOSHIKO T, et al. Liliocide a and b,

- two new glycerol glucosides isolated from *lilium longiflorum* thunb. [J]. *Tetrahedron Letters*, 1974, 45: 3937–3940.
- [4] MIYUKI KANEDA, KYOKO KOBAYASHI, KAYO NISHIDA, et al. Liliosides d and e, two glycerol glucosides from *lilium japonicum* [J]. *Phytochemistry*, 1984, 23: 4.
- [5] MIYUKI KANEDA T K M A K T. Lilioside c, a glycerol glucoside from *lilium lancifolium** [J]. *Phytochemistry*, 1982, 21.
- [6] TAKENAKA F, UCHIYAMA H. Synthesis of α -d-glucosylglycerol by α -glucosidase and some of its characteristics [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, 64(9) : 1821–1826.
- [7] HARADA N, ZHAO J, KURIHARA H, et al. Effects of topical application of α -d-glucosylglycerol on dermal levels of insulin-like growth factor-i in mice and on facial skin elasticity in humans [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2010, 74(4) : 759–765.
- [8] KATO J, SHIRAKAMI Y, MIZUTANI T, et al. Alpha-glucosidase inhibitor voglibose suppresses azoxymethane-induced colonic preneoplastic lesions in diabetic and obese mice [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(6) : 2226.
- [9] BORGES N, RAMOS A, RAVEN N D, et al. Comparative study of the thermostabilizing properties of mannosylglycerate and other compatible solutes on model enzymes [J]. *Extremophiles*, 2002, 6(3) : 209–216.
- [10] HIROFUMI NAKANO, TARO KISO, KATSUYUKI OKAMOTO, et al. Synthesis of glycosyl glycerol by cyclodextrin glucanotransferases [J]. *Journal of BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING*, 2003, 95(6) : 583–588.
- [11] JEONG J W, SEO D H, JUNG J H, et al. Biosynthesis of glucosyl glycerol, a compatible solute, using intermolecular transglycosylation activity of amylosucrase from *methylobacillus flagellatus* kt [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2014, 173(4) : 904–917.
- [12] GOEDL C, SAWANGWAN T, MUELLER M, et al. A high-yielding biocatalytic process for the production of 2-o-(α -d-glucopyranosyl)-sn-glycerol, a natural osmolyte and useful moisturizing ingredient [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2008, 47(52) : 10086–10089.
- [13] NIHIRA T, SAITO Y, OHTSUBO K, et al. 2-o- α -d-glucosylglycerol phosphorylase from *bacillus selenitireducens* mls10 possessing hydrolytic activity on β -d-glucose 1-phosphate [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1) : e86548.
- [14] TOUHARA K K, NIHIRA T, KITAOKA M, et al. Structural basis for reversible phosphorolysis and hydrolysis reactions of 2-o- α -glucosylglycerol phosphorylase [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(26) : 18067–18075.
- [15] JIANG R, YE K, FAN T, et al. [application of sucrose phosphorylase in glycosylation] [J]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 2021, 37(1) : 112–129.
- [16] 陈献忠, 杨夏. 蔗糖磷酸化酶的研究进展 [J]. *微生物学通报*, 2021, 48(12) : 4904–4917.
- [17] AO J, PAN X, WANG Q, et al. Efficient whole-cell biotransformation for α -arbutin production through the engineering of sucrose phosphorylase combined with engineered cell modification [J]. *J Agric Food Chem*, 2023, 71(5) : 2438–2445.
- [18] KRUSCHITZ A, NIDETZKY B. Biocatalytic production of 2- α -d-glucosyl-glycerol for functional ingredient use: Integrated process design and techno-economic assessment [J]. *ACS Sustain Chem Eng*, 2022, 10(3) : 1246–1255.
- [19] XIA Y, LI X, YANG L, et al. Development of thermostable sucrose phosphorylase by semi-rational design for efficient biosynthesis of α -d-glucosylglycerol [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2021, 105(19) : 7309–7319.
- [20] ZHOU Y, KE F, CHEN L, et al. Enhancing regioselectivity of sucrose phosphorylase by loop engineering for glycosylation of l-ascorbic acid [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2022, 106(12) : 4575–4586.
- [21] ZHOU Y, LV X, CHEN L, et al. Identification of process-related impurities and corresponding control strategy in biocatalytic production of 2-o- α -d-glucopyranosyl-l-ascorbic acid using sucrose phosphorylase [J]. *J Agric Food Chem*, 2022, 70(16) : 5066–5076.
- [22] XU H, WEI B, LIU X, et al. Robust enhancing stability and fructose tolerance of sucrose phosphorylase by immobilization on ni-nta functionalized agarose microspheres for the biosynthesis of 2- α -glucosylglycerol [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2022, 180.
- [23] LEI J, TANG K, ZHANG T, et al. Efficient production of 2-o- α -d-glucosyl glycerol catalyzed by an engineered sucrose phosphorylase from *bifidobacterium longum* [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2022, 194(11) : 5274–5291.
- [24] FRANCEUS J, UBIPARIP Z, BEERENS K, et al. Engineering of a thermostable biocatalyst for the synthesis of 2-o-glucosylglycerol [J]. *Chembiochem*, 2021, 22(18) : 2777–2782.
- [25] SHU P, NIU H, ZHANG L, et al. Regioselective dechloroacetylations mediated by ammonium acetate: Practical syntheses of 2,3,4,6 - tetra - o - chloroacetyl - glycopyranoses and cinnamoyl glucose esters [J]. *ChemistrySelect*, 2020, 5(21) : 6360–6364.
- [26] ASHKAN Z, HEMMATI R, HOMAEI A, et al. Immobilization of enzymes on nanoinorganic support materials: An update [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 168: 708–721.
- [27] WEI B, XU H, CHENG L, et al. Highly selective entrapment of his-tagged enzymes on superparamagnetic zirconium-based mofs with robust renewability to enhance ph and thermal stability [J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2021, 7(8) : 3727–3736.
- [28] YUSHKOVA E D, NAZAROVA E A, MATYUHINA A V, et al. Application of immobilized enzymes in food industry [J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(42) : 11553–11567.
- [29] ARCUS V L, VAN DER KAMP M W, PUDNEY C R, et al. Enzyme evolution and the temperature dependence of enzyme catalysis [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2020, 65: 96–101.
- [30] CERDOBBEL A, DESMET T, DE WINTER K, et al. Increasing the thermostability of sucrose phosphorylase by multipoint covalent

immobilization [J]. *J Biotechnol*, 2010, 150(1) : 125–130.

[31] DE WINTER K, SOETAERT W, DESMET T. An imprinted cross-linked enzyme aggregate (iclea) of sucrose phosphorylase: Combining improved stability with altered specificity [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(9) : 11333–11342.

[32] CERDOBBEL A, DE WINTER K, DESMET T, et al. Sucrose phosphorylase as cross-linked enzyme aggregate: Improved thermal stability for industrial applications [J]. *Biotechnol J*, 2010, 5(11) : 1192–1197.

[33] BOLIVAR J M, LULEY-GOEDL C, LEITNER E, et al. Production of glucosyl glycerol by immobilized sucrose phosphorylase: Options for enzyme fixation on a solid support and application in microscale flow format [J]. *J Biotechnol*, 2017, 257: 131–138.

[34] XU H, LIANG H. Chitosan-regulated biomimetic hybrid nanoflower for efficiently immobilizing enzymes to enhance stability and by-product tolerance [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 220: 124–134.

[35] YANG W, SUN H, CUI Z, et al. Spatially sequential co-immobilization of phosphorylases in tiny environments and its application in the synthesis of glucosyl glycerol [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 279.

[36] SCHWAIGER K N, CSERJAN-PUSCHMANN M, STRIEDNER G, et al. Whole cell-based catalyst for enzymatic production of the

osmolyte 2- α -glucosylglycerol [J]. *Microb Cell Fact*, 2021, 20(1) : 79.

[37] ZHOU J, JIANG R, SHI Y, et al. Sucrose phosphorylase from *Lactobacillus reuteri*: Characterization and application of enzyme for production of 2- α -D-glucopyranosyl glycerol [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 209(Pt A) : 376–384.

[38] DUAN P, YOU J, XU M, et al. whole-cell biosynthesis of 2- α -D-glucopyranosyl-sn-glycerol by recombinant *Bacillus subtilis* [J]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 2020, 36(9) : 1918–1928.

[39] DUAN P, LONG M, ZHANG X, et al. Efficient 2- α -D-glucopyranosyl-sn-glycerol production by single whole-cell biotransformation through combined engineering and expression regulation with novel sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides* atcc 8293 [J]. *Bioresour Technol*, 2023, 385: 129399.

[40] KRUSCHITZ A, PEINSIPP L, PFEIFFER M, et al. Continuous process technology for glucoside production from sucrose using a whole cell-derived solid catalyst of sucrose phosphorylase [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2021, 105(13) : 5383–5394.

[41] TAN X, DU W, LU X. Photosynthetic and extracellular production of glucosylglycerol by genetically engineered and gel-encapsulated cyanobacteria [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(5) : 2147–2154.

Research Progress on Biosynthetic Preparation of 2-O- α - Glucosyl Glycerol

Xu Hai-chang^{1,2}, Liu Zhen-dong^{1,2}, Jiang Ling^{1,2}, Liang Hao^{1,2}

(1.College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing, 100029;

2.State Key Laboratory of Chemical Resource Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing, 100029)

Abstract : 2-O- α -glucosyl glycerol (2-O- α -GG) is a natural glucoside derived from cyanobacteria. Due to its excellent performance in skin moisturization, anti-inflammatory, and allergy relief, 2-O- α -GG has been widely used in various cosmetics and personal care products such as masks, creams, baths and lotions. The biosynthetic method of 2-O- α -GG has advantages like environmentally friendly, simple operation, and mild reaction conditions. This work mainly reviews the research progress of 2-O- α -GG biosynthesis from the aspects of enzymatic catalysis and whole-cell catalysis, aiming to provide theoretical basis and guidances for the industrial production of 2-O- α -GG through biosynthetic methods.

Keywords : 2-O- α -glucosyl glycerol; biosynthesis; enzymatic catalysis; whole-cell catalysis

