

微生物合成甜菊糖的研究进展

刘梦雨, 何海琳, 马婷, 苏筱淳, 丁一飞, 王瑾璇, 雷银凤, 李树波

Progress on Synthetic Biology for Steviol Glycosides Biosynthesis

LIU Mengyu, HE Hailin, MA Ting, SU Xiaochun, DING Yifei, WANG Jinxuan, LEI Yinfeng, and LI Shubo

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024030397>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

基于合成生物学微生物底盘细胞构建与优化的研究进展

Advances in Microbial Genome Reduction and Optimization Based on Synthetic Biology

食品工业科技. 2025, 46(1): 394-402 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023120354>

亚油酸水合酶生物合成微生物源羟基不饱和脂肪酸的研究进展

Research Progress in Biosynthesis of Microbial Hydroxyl Unsaturated Fatty Acids by Linoleic Acid Hydratase

食品工业科技. 2021, 42(22): 449-456 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020100119>

代谢工程改造微生物合成单萜芳香产品的研究进展

Research Progress in Microbial Metabolic Engineering for Producing Monoterpene Aroma Products

食品工业科技. 2021, 42(7): 390-398 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020050361>

微生物合成纳米硒的研究进展

Research Progress in the Synthesis of Nano-Selenium by Microorganism

食品工业科技. 2020, 41(15): 339-344,351 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.15.052>

虾青素化学和生物合成研究进展

Research Progress on Chemical and Biological Synthesis of Astaxanthin

食品工业科技. 2021, 42(21): 445-453 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020100037>

环二鸟苷酸调控细菌胞外多糖生物合成的研究进展

Research Progress on Regulation of Bacterial Exopolysaccharide Biosynthesis by Cyclic Diguanilate

食品工业科技. 2023, 44(9): 422-430 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022060142>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

刘梦雨, 何海琳, 马婷, 等. 微生物合成甜菊糖的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2025, 46(6): 387–397. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024030397

LIU Mengyu, HE Hailin, MA Ting, et al. Progress on Synthetic Biology for Steviol Glycosides Biosynthesis[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(6): 387–397. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024030397

· 专题综述 ·

微生物合成甜菊糖的研究进展

刘梦雨^{1,*}, 何海琳^{1,+}, 马婷¹, 苏筱淳¹, 丁一飞¹, 王瑾璇¹, 雷银凤¹, 李树波^{1,2,*}

(1. 广西大学轻工与食品工程学院, 广西南宁 530004;

2. 广西壮族自治区教育厅广西高校特色农产品深加工与安全控制重点实验室, 广西南宁 530004)

摘要: 甜菊糖苷, 又称甜菊糖, 是一类从甜叶菊中提取具有高度甜味的二萜类化合物, 具有甜度高、热量低、安全无毒、降血糖、降血压等生理特性, 被认为是“世界第三天然糖原”, 已被广泛应用于食品、医药、日用化工、酿酒等行业。然而, 基于传统提取工艺的提取物存在产品纯化难、提取效率较低、消耗过多溶剂等问题, 限制了其使用范围。合成生物学的快速发展为植物天然产物的生产提供了一种绿色高效的新型生产模式。为此, 文章在阐述甜菊糖苷的结构与生理活性的基础上, 综述甜菊糖苷的生物合成研究进展。解析了甜菊糖苷的生物合成路径及其关键酶的催化机制, 重点介绍利用糖基转移酶生物催化合成和基于微生物从头合成特定甜菊糖苷的机制及途径, 并介绍了两种生物合成方法在生产甜度高、苦味低的莱鲍迪甙 A、莱鲍迪甙 D 和莱鲍迪甙 M 方面的应用。基于以上研究进展, 对甜菊糖苷生物合成法目前面临的主要难题及未来研究方向进行了探讨, 以期对甜菊糖苷的生物合成提供理论参考。

关键词: 甜菊糖苷, 合成途径, 糖基转移酶, 生物催化, 微生物合成

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2025)06-0387-11

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024030397

本文网刊:



Progress on Synthetic Biology for Steviol Glycosides Biosynthesis

LIU Mengyu¹, HE Hailin^{1,+}, MA Ting¹, SU Xiaochun¹, DING Yifei¹, WANG Jinxuan¹,
LEI Yinfeng¹, LI Shubo^{1,2,*}

(1. College of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China;

2. Key Laboratory of Deep Processing and Safety Control for Specialty Agricultural Products in Guangxi Universities,
Education Department of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530004, China)

Abstract: Stevioside, also known as stevia, is a class of diterpenoids extracted from stevia with high sweetness, low calories, safety and non-toxicity, hypoglycemic, hypotensive, and other physiological characteristics. It is regarded as the "world's third natural glycogen", and widely used in the food, pharmaceutical, daily-use chemicals, brewing, and other industries. However, extracts based on the traditional extraction process have problems such as difficult purification, low extraction efficiency, and excessive consumption of solvents, which limit their value and application scope. The rapid development of synthetic biology provides a new green and efficient production mode for the production of plant-based natural products. To this end, the article reviews the research progress of steviol glycosides' biosynthesis based on the elucidation of their structure and physiological activities. It analyzes the biosynthetic pathways of steviol glycosides and the catalytic mechanisms of the key enzymes involved. The focus is on the mechanisms and approaches for biocatalytic synthesis using glycosyltransferases and the de novo synthesis of specific steviol glycosides by microorganisms. Additionally, it discusses the application of two biosynthetic methods in the production of high sweetness, low bitterness rebaudiosides A, D, and M. Based on the aforementioned research advances, the paper explores the main challenges currently faced in the biosynthesis of steviol glycosides and future research directions, aiming to provide theoretical insights

收稿日期: 2024-03-26 +并列第一作者

基金项目: 国家自然科学基金 (AE30500184)。

作者简介: 刘梦雨 (1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品微生物, E-mail: qdkjlm@163.com。

何海琳 (2000-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品微生物, E-mail: 1148499512@qq.com。

* 通信作者: 李树波 (1985-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品微生物技术, E-mail: shubo1207@gux.edu.cn。

for the biosynthesis of steviol glycosides.

Key words: steviol glycosides; synthetic pathway; glycosyltransferases; biocatalysis; biosynthesis

甜味使人产生快乐和幸福的感觉,但过量摄入高热量的糖类可使人体脂肪堆积,引起高甘油三酯血症、高血压、心脑血管疾病和胰岛素耐受症等问题,进而危害身体健康^[1]。然而,消费者对糖的消费需求依旧旺盛,需求量依然呈强劲上升趋势^[2]。目前,根据甜味剂来源可分为人工甜味剂和天然甜味剂^[3]。人工甜味剂(如阿斯巴甜、三氯蔗糖和爱德万甜等)具有热量低和甜味强烈等特点,摄入后虽然能激活舌头上的与摄入糖类时相同的味觉受体,但不会激活肠-脑糖回路,导致食物奖励被部分激活。食物奖励是指大脑对特定食物表现出“喜欢”和“想要”,并为进食动机提供方向和强度。在人工甜味剂的影响下,奖励系统会诱导人体产生出于喜好而不是出于能量需求的食物摄入行为,对糖产生偏好,最终影响人体对糖的摄入量^[4-5],进而引起肠道菌群紊乱、干扰神经细胞功能、肝毒性和肾功能失常等问题^[6-7]。而新型天然甜味剂(如甜菊糖苷、罗汉果甜苷和甘草酸等)具有甜度高、热值低、安全稳定和人体无法直接吸收代谢等特性^[8],且目前尚未发现其会激发食物奖励,已然成为满足甜味需求的新一代甜味剂^[9]。将甜菊糖苷应用于食品生产中,不仅能满足消费者对糖类持续上升的品质要求和消费需求^[2],还可减少高热量糖类的摄入,降低对食用者身体健康的损害,因此以甜菊糖苷为原料开发绿色、健康的天然甜味剂已然成为研究热点^[10]。

近年来,植物细胞培养和合成生物学的发展为新型甜味剂中天然产物的获取提供了可持续的生产思路^[11]。然而,植物细胞培养成本高、耗时长、产量低、产物特异性差,且缺乏适当的遗传改造工具和方法,进而导致代谢改造植物细胞高效生产特定甜菊糖苷具有挑战性。作为对生命系统和过程进行重新设计和工程化构建与应用的科学,合成生物学构建微生物细胞工厂具有周期短、产量高、提取工艺简单等优势,是一种绿色高效的新型生产模式^[12]。随着基因组测序和表达序列标签(Expressed Sequence Tag, EST)等技术揭示甜叶菊中甜菊糖苷的生物合成机制,为高效生物合成甜菊糖苷奠定了基础^[13]。为此,本文综述甜菊糖苷的生物合成机制及合成生物学应用研究进展,重点介绍了目前主要研究的几种甜菊糖苷,并探讨其微生物合成所面临的挑战,以期对甜菊糖苷类物质的生物合成提供一定的理论参考。

1 甜菊糖苷简介

甜菊糖苷,又称甜菊糖,是一类具有高度甜味的二萜类化合物,具有非着色性、甜度高(蔗糖的250~350倍)、热量低(约为蔗糖的1/300)、安全无毒、不引起美拉德反应、不影响食品粘稠性和凝固性等特点,被认为是“世界第三天然糖原”^[14]。甜菊糖

苷具有非发酵性,食用后不能被口腔中的细菌分解利用而发酵产酸,故可用于预防龋齿^[15]。此外,甜菊糖苷具有降血糖、降血压、抗肿瘤、免疫调节等生理活性^[16],已然成为世界上使用最广泛的零卡路里天然高强度甜味剂,被广泛应用于食品、医药、日用化工、酿酒等行业^[17]。目前,甜菊糖苷主要通过热水提取法、溶剂提取法、浸渍法、大孔树脂吸附法、微波辅助提取法、超临界流体萃取法、超声辅助提取法、快速固液动态萃取法等技术方法从甜叶菊中提取^[15]。但由于现今新型甜菊糖苷的合成主要通过从贝壳杉烯的萜烯苷元的不同位点连接不同类型、不同数量的糖分子,导致合成的甜菊糖苷成分复杂,含有多种框架结构相似的类似物^[18]。此外,由于提取物还受到甜菊糖苷含量及植物生长周期的影响,因此存在产品纯化难、提取效率较低、消耗过多溶剂等问题,进而限制其应用和导致产业化应用成本较高^[19]。利用生物合成法高效合成甜菊糖苷可以从源头上解决其提取成本高但产量低的问题,一定程度上改善甜菊糖苷供应不足的情况,提高甜菊糖苷用作天然甜味剂的商业性。

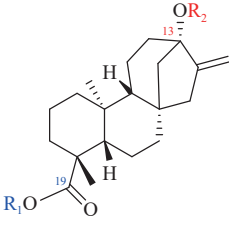
2 甜菊糖苷的结构与生理活性

甜叶菊(*Stevia rebaudiana Bertoni*)属于菊科甜叶菊属或斯台比亚属多年生草本植物,而甜菊糖苷(Steviol glycosides)是由甜叶菊叶子中提取获得的新型纯天然甜味剂,是多种结构相似的二萜类混合物^[20]。如表1所示,目前已从甜菊叶中分离鉴定多种甜菊糖苷,主要包括甜菊糖、莱鲍迪苷 A(Reb A)、莱鲍迪苷 B(Reb B)、莱鲍迪苷 C(Reb C)、莱鲍迪苷 D(Reb D)、莱鲍迪苷 E(Reb E)和莱鲍迪苷 F(Reb F)、杜尔可苷 A(Dulcoside A)、莱鲍迪苷 M(Reb M)、甜茶(RS)、莱鲍迪苷 I(Reb I)和甜菊双糖苷等,其区别为 C₁₃ 和 C₁₉ 位连接糖基的差异性^[21]。其中,Reb A 甜味最接近蔗糖,但其甜度却是蔗糖的350~450倍,且 Reb A 含量越高,甜味越纯正,是理想的甜味成分。因此,提高甜菊糖苷产品中 Reb A 含量可有效改善甜菊糖苷的口感、甜度及其产品风味。对于 Reb D,可通过在 Reb A 的 R1 端以 β -1,2 糖苷键连接葡萄糖基形成,也可通过在 Reb E 的 R2 端以 β -1,3 糖苷键连接葡萄糖基形成^[22]。虽 Red D 在甜叶菊中含量较少,约占甜叶菊叶子干重的0.2%,但却比甜菊糖和 Reb A 具有更高的甜度和更少的回苦味,进而具有更好的口感和应用价值。类似的,Reb M 在甜叶菊中含量低于0.1%,但却具有高甜度(约为蔗糖甜度的300~350倍)、甜味迅速和甜味纯净且无苦味、涩味、酸味以及甘草味等杂味的特点,已然成为新一代甜味剂的开发热点^[23]。

甜菊糖苷具有抗炎、抗糖尿病、抗氧化、抗癌等

表 1 甜菊糖苷化学结构及相对甜度

Table 1 Chemical structure and relative sweetness of stevia glycosides

苷元结构	甜苷名称	R ₁ (C-13)	R ₂ (C-19)	相对甜度
	莱鲍迪苷A (RA)	Glc(β1-2)[Glcβ1-3]Glc(β1)-	Glc(β1)-	300
	莱鲍迪苷B (RB)	Glc(β1-2)[Glcβ1-3]Glc(β1)-	H	150
	莱鲍迪苷C (RC)	Rha(α1-2)[Glcβ1-3]Glc(β1)-	Glc(β1)-	30
	莱鲍迪苷D (RD)	Glc(β1-2)[Glcβ1-3]Glc(β1)-	Glc(β1-2)Glc(β1)-	221
	莱鲍迪苷E (RE)	Glc(β1-2)Glc(β1)-	Glc(β1-2)Glc(β1)-	174
	莱鲍迪苷F (RF)	Xyl(β1-2)[Glcβ1-3]Glc(β1)-	Glc(β1)-	200
	莱鲍迪苷M (RM)	Glc(β1-2)[Glcβ1-3]Glc(β1)-	Glc(β1-2)[Glcβ1-3]Glc(β1)-	250
	甜茶苷 (RS)	Glc(β1)-	Glc(β1)-	114
	杜可尔苷A (DA)	Rha(α1-2)Glc(β1)-	Glc(β1)-	30

多种生理活性^[24-25]。其中,甜菊糖苷无法被身体吸收代谢,服用后不产生热量,也不会影响正常人群的血糖,适用于孕妇、儿童和糖尿病患者^[26],并因其可以促进胰岛素释放而被传统医学应用于治疗糖尿病^[27]。实验表明,甜菊糖苷可以提高机体的胰岛素敏感性,适度改善了体外胰岛素对骨骼肌葡萄糖转运的作用,具有一定的降糖功能^[28]。此外,甜菊糖苷通过将蛋白激酶的信号传导抑制和将 NF-κB 活性的抑制来起到抗炎作用^[15]。同时,也有研究报道甜菊糖苷具有显著的抗癌作用。在小鼠皮肤癌模型中,甜菊糖苷成功抑制了肿瘤启动子 12-O-十四烷酰佛波醇-13-乙酸酯(TPA)对诱导小鼠产生的炎症的活性,降低了 TPA 对小鼠皮肤肿瘤生长的促进作用^[29]。甜菊糖苷根据其雌激素受体(ER)状态对乳腺癌细胞具有不同的作用,这表明甜菊糖苷对各类乳腺癌尤其是三阴性乳腺癌(TNBC)具有潜在的抗癌活性^[30]。甜菊糖苷还对人类胃肠道癌细胞具有强烈的抗癌活性,能够抑制如 5-氟尿嘧啶等 6 种人胃肠道癌细胞^[31]。甜菊糖苷优良的高甜度及生理活性使其不仅可以作为蔗糖的良好天然替代品,还可以作为潜在的能够治疗糖尿病、癌症等疾病的新药候选药物。

3 甜菊糖苷生物合成路径的解析

近年来,基于 RNA-Seq 技术实现对甜叶菊三种基因型中不同 SGs 组分的转录组谱分析,共鉴定出 80160 个单基因,同时和生物信息学比较分析,发现 315 个单基因参与甜菊糖苷生物合成,进而初步解析甜菊糖苷生物合成途径^[32]。如图 1 所示,甜菊糖醇与赤霉素共享部分生物合成途径,具有相同的中间代谢物——贝壳杉烯酸,并经过一系列有序的糖基化反应形成甜菊糖苷,其主要合成过程如下。

3.1 甲基赤藓糖醇磷酸 (MEP) 或甲羟戊酸 (MVA) 途径

在植物萜类化合物合成过程中,甲基赤藓糖醇

磷酸途径(MEP)途径为单萜、二萜和四萜的合成提供 C₅ 骨架——二磷酸戊烯基,而甲羟戊酸途径(MVA)为倍半萜、三萜和多萜的合成提供相同的通用前体^[33]。如图 1 所示,甜菊糖苷的合成起始于胞质中 DXS 催化丙酮酸和甘油醛 3-磷酸(G3P)的缩合反应而形成 1-脱氧-d-5-磷酸木糖(DXP)^[34],该反应为萜类化合物合成的第一个限速步骤。随后,DXP 在 DXR 还原酶催化下转化为 MEP,其中 DXR 通过催化 DXP 分子内重排反应生成 2-c-methylerythrose,该反应平衡有利于 MEP 的形成,但催化反应需要 NADPH 和二价阳离子(尤其 Mn²⁺)^[35]。最后,在 4-焦磷酸-2-c-甲基-d-赤藓糖醇合成酶(CMS)、4-焦磷酸-2c-甲基-d-赤藓糖醇激酶(CMK)、2-甲基-d-赤藓糖醇-2,4-环焦磷酸合成酶(MCS)和(E)-4-羟基-3-甲基-2-烯基焦磷酸合成酶(HDS)等关键酶的协同催化作用下,通过复杂的生物反应机制共同催化 MEP 生成(E)-4-羟基-3-甲基-2-烯基焦磷酸(HMBPP)^[36]。同时,HMBPP 被(E)-4-羟基-3-甲基-2-烯基焦磷酸还原酶(HDR)以类似机制进一步催化形成焦磷酸异戊烯基(IPP)和焦磷酸二甲基烯基(DMAPP)等基本五碳(C₅)结构前体^[37],而 IPP 和 DMAPP 间转化可由焦磷酸异戊烯基异构酶(IDI)完成^[38]。因此,DXS 和 DXR 是萜类生物合成的关键酶^[39],其中 DXS 活性依赖于硫胺素二磷酸(TPP),且氨基酸序列在植物物种中高度保守^[37],而过量表达 DXS 和 DXR 可导致胞内 IPP 和 DMAPP 水平的增加,进而实现下游相关萜类物质的高效积累^[40]。例如,利用农杆菌介导的 *S. reaudiana* 转化方法,过表达甜菊苷合成过程中 DXS 1(SrDXS1)酶可使转基因植株的甜菊苷总含量提高了 42%~54%^[41]。

3.2 萜烯合成途径

S. reaudiana 中甜菊苷的二萜苷元部分可通过甲基 MEP 途径合成^[42],始于将 IPP 单元添加至二萜

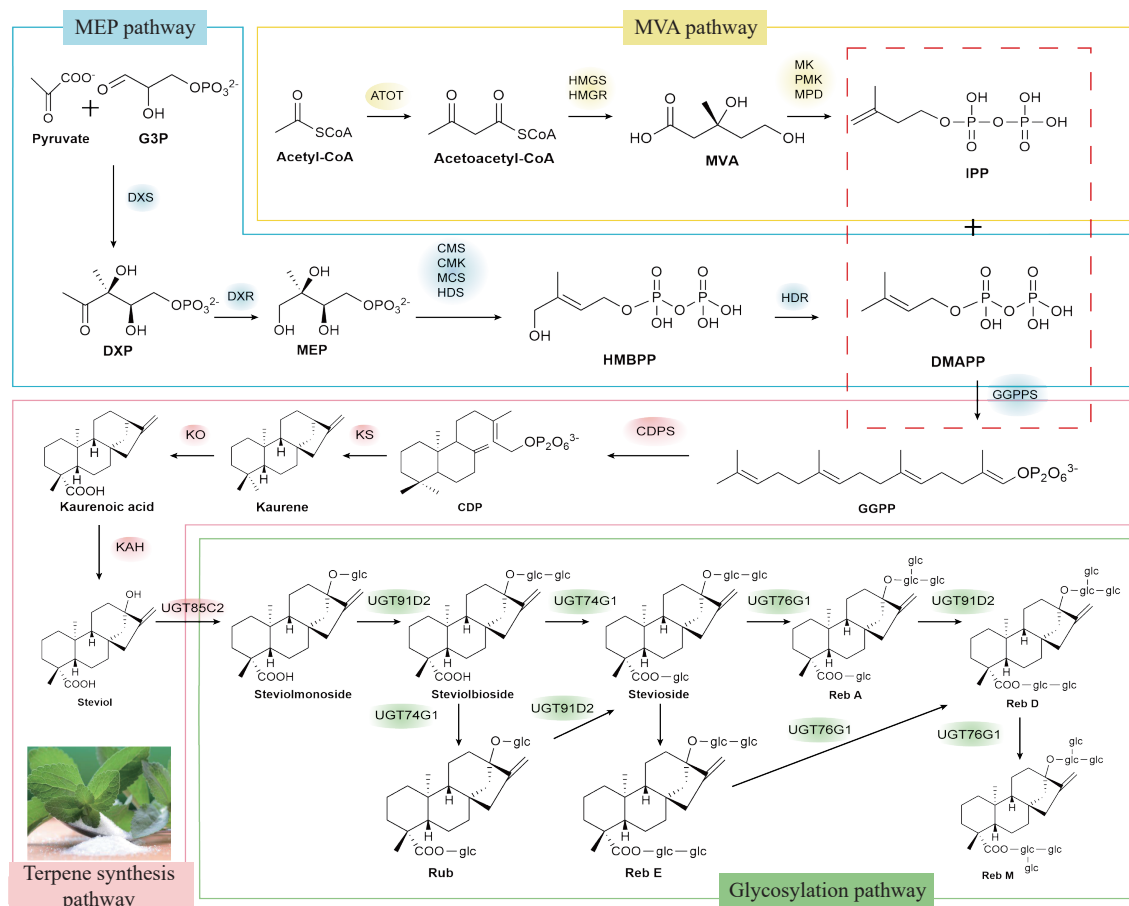


图1 甜菊糖苷生物合成途径

Fig.1 Biosynthetic pathway of stevia glycoside

酸二甲基烯丙基,即IPP和DMAPP在香叶基焦磷酸合成酶(GGPPS)催化下缩合生成萜类化合物前体——香叶基焦磷酸(GGPP)^[43]。同时,GGPP在柯巴基焦磷酸合成酶(CDPS)作用下发生质子化并环化形成柯巴基焦磷酸(CDP),随之在贝壳杉烯合成酶(Kaurene Synthase,KS)催化下发生离子依赖的环化而生成内根-贝壳杉烯(*ent*-Kaurene)。在此基础上,内根-贝壳杉烯穿过质体膜被转运至内质网,在P450单加氧酶内根-贝壳杉烯氧化酶(Kaurene Oxidase,KO)催化下通过三步氧化反应进一步转化成内根-贝壳杉烯酸(*ent*-kaurenoic acid,*ent*-KA),该反应是甜菊糖苷合成途径与赤霉素合成途径的分界点。随后,基于内根-贝壳杉烯酸羟化酶(Kaurenoic acid Hydroxylase,KAH)的作用,内根-贝壳杉烯酸中C-13位发生脱氢氧化反应形成甜菊糖苷合成前体——甜菊醇(steviol),该反应是合成甜菊糖苷的关键步骤。

作为一种膜结合的血红蛋白蛋白酶,细胞色素P450酶(CYPs)可通过催化一个氧原子插入底物而使另一个氧原子还原生成水,其活性取决于NADPH依赖性细胞色素P450还原酶(CPR)催化两个电子的转移^[44]。因此,CYP和CPR复合体通过蛋白-蛋白作用相互结合,其中CPR是CYP亚基与其他蛋白的作用节点^[45]。KO作为一种多功能细胞色素

P450,可在植物激素生物合成中催化三次连续氧化,其催化机制为:KO首先催化内根-贝壳杉烯中C-19的羟基化反应生成内根-贝壳杉烯醇,接着发生氧化反应生成内根-贝壳杉烯醛,最后氧化生成内根-贝壳杉烯酸。此外,另一细胞色素P450酶——KAH可催化内根-贝壳杉烯酸中C-13的羟基化反应,进一步生成甜菊醇^[46]。因此,在NADPH依赖性酶CPR的催化作用下,KO和KAH依次将贝壳杉烯催化生产甜菊醇苷元。

4 甜菊糖苷的生物合成研究进展

目前,甜菊糖苷被认为是一种高需求的天然零热量蔗糖替代品。然而,从甜叶菊中提取甜菊糖苷的效率较低,获得的甜菊糖苷成分复杂,具有轻微的苦味和涩味,从而限制了其在食品和药品中的使用^[47]。为此,研究人员一方面通过采用以麦芽糖糊精和菊粉为包封剂的微胶囊化方法,辅以增味剂和风味调节剂来削弱甜菊糖苷的苦味;另一方面通过利用从头化学合成和化学/酶修饰的方法来从本质上改善甜菊糖苷的感官特性,但由于目前对结构-甜味关系机制尚未深入研究,且化学合成或修饰涉及有机溶剂等安全问题,因此难以制定简单可行的合成或修饰方案。近年来,研究人员新开发了基于合成生物学设计或构建微生物细胞工厂的甜菊糖苷合成方法,能够按照预期的路线从头“绿色”合成特定的甜菊糖苷,耗时更短,且

对环境友好,合成的产物也有着更精准的质量指标、更优良的感官品质和更丰富的衍生类型^[48],使得该方法已然成为最佳规模化生产甜菊糖苷的替代方法^[13]。

目前,甜菊糖苷的生物合成主要包括生物催化合成甜菊糖苷和基于微生物从头合成甜菊糖苷两种。研究人员通过采用酶改造、酶修饰、酶催化、酶的分选纯化等先进的酶工程技术,对甜菊糖苷合成过程中所需酶的生物学性质进行了改良,从而改善了甜菊糖苷的生产过程,使其质量和产量得到了显著提升。其中,针对莱鲍迪甙 A(Reb A)、莱鲍迪甙 D(Reb D)和莱鲍迪甙 M(Reb M)等关键成分的合成,研究人员采用了一系列创新的方法,包括优化反应条件、酶的工程化、基因表达的调控等,从而有效地提高了甜度高不良风味弱的优良甜菊糖苷的产率和选择性^[49]。此外,尽管微生物从头合成甜菊糖苷仍然面临挑战,但通过改造微生物底盘细胞和优化合成路径,也取得了一定的突破,为甜菊糖苷的可持续高效生产提供了新的思路和方法。这些研究成果为甜菊糖苷在食品和药品等领域的广泛应用奠定了坚实的基础,同时也为未来的相关研究提供了重要的参考和借鉴。

4.1 生物催化合成甜菊糖苷

生物催化合成甜菊糖苷是指利用酶或产酶微生物作为催化剂合成甜菊糖苷的过程。目前主要通过利用糖基转移酶改变甜菊醇不同位点上的糖基数量,来合成多种口感、理化性质各异的甜菊糖苷。

4.1.1 甜菊糖苷合成途径中糖基转移酶及其催化机制 糖基化是由糖基转移酶(GTs)介导的修饰反应,而 GTs 是一个由多成员组成的转移酶家族,通过将糖基供体(如核苷二磷酸糖、核苷单磷酸糖或脂质磷酸糖)中糖基团转移至特定受体分子形成糖苷键,而在糖基团转移过程中异头碳原子构型保留或翻转而形成不同构型的糖基化产物,如寡糖、多糖和糖复合物等功能性分子,进而参与介导天然产物的合成、亚细胞定位、信号储存和传递等生命活动^[50]。一般来说,根据氨基酸序列相似性、底物特异性、反应机理和三维结构等特点,可将 GTs 分为 114 个家族(GT1~GT114)^[51],其中 GT1 属于 UDP 依赖性糖基转移酶(UGTs),即在糖基化反应中使用 UDP 活化糖作为糖基供体^[52]。在甜菊糖苷形成过程中,糖基转移酶以区域选择性方式识别不同甜菊糖苷,将糖基供体 UDPG 的活性糖转移至甜菊醇的 C-13 和 C-19 位,从而形成不同甜菊糖苷^[53]。

近年来,基于 *S. rebaudiana* 的转录组学分析,结合表达序列标签(ESTs)和功能表征筛选从甜叶菊中鉴定获得了 5 个参与甜菊糖苷合成的糖基转移酶^[54](SrUGT85C2、SrUGT74G1、SrUGT73E1、SrUGT76G1、SrUGT91D2)。其中,糖基转移酶 UGT85C2 催化甜菊醇 C-13 位羟基糖基化形成 β -D-

葡萄糖苷,糖基转移酶 UGT74G1 和 UGT73E1 负责催化甜菊醇 C-19 位羧酸酯化,而 UGT76G1 能够催化 C-13 位羟基和 C-19 位羟基形成 β -1,3 糖苷键^[54],UGT91D2 则通过形成 1,2- β -d-糖苷键催化与 C13 或 C19 结合葡萄糖基的糖基化,也可形成 1,6- β -d-糖苷键^[22]。因此,UGT91D2 能催化甜菊单苷中 C13 的糖基化而形成甜菊双糖苷,或能催化甜菊双糖苷中 C₁₃ 糖基化形成甜菊三糖苷,或能进一步催化甜菊三糖苷中 C₁₉ 糖基化而形成 Reb E^[55],但却不能对 1,3-糖苷键中含有葡萄糖残基的糖苷结构进一步的糖基化^[22]。因此,糖基转移酶 UGT76G1 能催化 Reb E 和 Reb D 形成 Reb D 和 Reb M,而 UGT91D2 能够催化 Reb A 合成 Reb D^[56]。

糖基转移酶催化机制与糖基水解酶催化机制类似,即需要一个酸性氨基酸通过脱质子作用激活受体羟基,其主要催化机制包括 SN2 催化机制、双取代催化机制和 S_Ni 催化机制^[57]。目前,已成功解析糖基转移酶 UGT76G1 蛋白质结构,发现 UGT76G1 结构中存在由 Leu85、Met88、Ile90、Asn196、Leu200 及 Ile203 等氨基酸形成的疏水口袋,该疏水口袋通过与二核苷骨架结构间的疏水作用进行识别,进而控制催化 C-13 和 C-19 位糖基化反应的立体选择特异性^[36]。鉴于此,Yang 等^[58]基于 UGT76G1 的底物结合晶体结构,提出 UGT76G1 的 His25 可使葡萄糖的 3-羟基去质子化成为亲核试剂,而亲核试剂攻击 UDPG 形成过渡态而发生 SN2 反应,并以 UDP 为离去基。同时,Asp 124 与 His 25 形成二元基团,表明其在质子向 His 25 转移中起重要的催化作用。此外,结合生化数据构建的 UGT76G1 的多个复杂结构表明了该酶使用疏水相互作用来识别不同底物,UGT76G1 的底物可塑性使其能利用疏水识别同一活性位点的两种不同底物,进而利用纯疏水识别以扩大糖基转移酶的范围,以期生物技术提供新途径^[58]。接下来,基于解析的 SrUGT76G1 结构的疏水口袋,研究人员利用分子对接分析等技术探究位于活性口袋中的蛋白质-底物结合位点的靶氨基酸残基及其对甜菊糖苷合成的影响,利用突变技术获得能够促进目标产物催化合成和降低副产物积累的酶突变体。例如,Liu 等^[59]发现疏水口袋中 Gly87 和 Leu204 残基会影响底物偏好,在糖基化反应中起着关键作用。通过突变残基后筛选获得的突变体 T284S,可使催化合成 Reb M 的活性提高 1.5 倍,并同时抑制形成 Reb I 的活性。类似地,研究人员通过分子对接分析鉴定预测了活性袋内会影响目标产物积累的关键残基,将其进行点饱和突变后构建了包含 1748 个 UGT76G1 变异体的突变文库,以积累 Reb D 或 Reb M 的能力为筛选指标,最终筛选获得的 UGT76G1Thr146Gly 和 UGT76G1His155Leu 突变体具有增强催化合成 Reb M、抑制副产物积累等特性。再例如,参考 SrUGT76G1 的相关研究,Zhang

等^[60]通过同源性建模和分子对接分析,预测 T84、T144、A194、S284、E285、V286、G365、E369、R404 和 G409 是 SrUGT91D2 催化 SGs 糖基化的关键残基。经过位点突变和酶分析,确认 T84、T144、R404、A194 和 G409 是 SrUGT91D2 蛋白的关键残基。此外,Zhang 等^[61]基于 UGT91C1 蛋白质结构,建立 UGT91C1 催化甜菊糖苷 C-13 和 C-19 形成 β -1,2 和 β -1,6 糖苷键选择灵活性的三种模型,结合蛋白质工程获得突变体 F208M/F379A,使其催化 Reb A 合成 Reb D 的活性提高了 4.2 倍,同时降低形成 Reb I 的活性。因此,随着对 UGT 糖基转移酶催化机制的全面解析,将为结合代谢工程和酶工程改善 SGs 的产量和质量提供理论和技术参考。

4.1.2 甜菊糖苷的糖基化途径 以甜菊醇为底物,在尿苷二磷酸(uridine diphosphate, UDP)依赖性糖基转移酶(UDP-葡萄糖基转移酶, UDP-glucosyltransferases, UGT)的催化下,活化糖基团(如 UDP-葡萄糖)被转移至特定受体分子位点而形成糖苷键,进而形成一系列不同甜度的甜菊糖苷^[62]。作为糖基化反应的关键酶,UGTs 可在甜菊醇中 C₁₉ 和 C₁₃ 两个位置进行糖基化修饰,且由多个糖基转移酶协同催化甜菊糖苷的合成,其催化过程为:首先,在糖基转移酶 UGT85C2 催化下,将糖基供体尿苷二磷酸葡萄糖(uridine diphosphate glucose, UDPG)中活性葡萄糖基通过 β -D-葡萄糖苷键连接至骨架的 C₁₃-羟基而形成甜菊一糖苷(Steviolmonoside),此为甜菊糖苷合成的关键调控步骤。接着,UGT91D2 催化甜菊单苷的 C₂-位置重新糖基化,形成甜菊双糖苷(Steviobioside)^[63],随之 UGT74G1 催化甜菊双糖苷在 C₁₉-羧基官能团上糖基化生成甜茶苷(rubusoside, Rub);而甜茶苷的 C₁₃-糖基在 UGT91D2 催化形成 1,2- β -D-糖苷键而生成甜菊糖(Stevioside, St)。最后,UGT76G1 催化甜菊糖的 C₁₃ 位葡萄糖基形成 1,3- β -D-糖苷键而生成 Reb A,即在甜菊醇苷元的 C₁₉-位置连接一个葡萄糖基和 C₁₃-位置连接数个葡萄糖基构成 Reb A 生物合成途径^[64]。在此基础上,Reb A 的 C₁₉ 位葡萄糖基被 UGT91D2 进一步催化形成 Reb D,而 UGT76G1 进一步催化 Reb D 而形成 Reb M。因此,UGT85C2 催化反应为糖基化途径的限速步骤,但失活 UGT76G1 基因功能的甜菊突变体仅能合成微量的莱鲍迪甙 A^[65]。

此外,不同糖类型(如葡萄糖基、鼠李糖基和木糖基)、不同数量的糖基化和糖苷连接方式可形成不同的甜菊糖苷,丰富了甜菊糖苷种类,进而产生不同的甜度及口感。例如,在甜菊醇苷元的 C-13 位上依次连接葡萄糖基和鼠李糖基,即为 RC 生物合成途径,而依次连接葡萄糖基和木质糖基,即为 RF 的生物合成途径^[62]。因此,目前报道的甜叶菊合成甜菊糖苷类化合物已有约 43 种,但甜叶菊提取物具有的不同程度的苦味和涩味极大限制了其在食品中的应用,

而如何改善甜菊糖苷的口味已然成为研究的热点^[66]。

4.1.3 几种重要甜菊糖苷的酶法合成研究进展 在酶法合成甜菊糖苷的过程中,可以通过结合酶工程、调节基因表达等方法来显著改善甜菊糖苷的质量和含量。生物催化技术操作简单,具有高度的催化特异性,且副产物较少,便于后续产物的分离纯化,从而有利于甜菊糖苷的工业化生产^[67]。目前,工业上主要利用生物酶法催化合成甜菊糖苷中甜度高、苦味低的莱鲍迪甙 A、莱鲍迪甙 D 和莱鲍迪甙 M。

4.1.3.1 莱鲍迪甙 A(Reb A)的合成 作为一种非营养性天然甜味剂,Reb A 口感甘甜,无不良余味,而提高甜菊糖苷中 Reb A 的含量可有效改善甜菊糖苷的口感。一般来说,传统上采用大孔树脂吸附法、亲水色谱法和结晶法等技术分离甜菊糖提取物中 Reb A,但其过程涉及大量有机溶剂的使用,有机溶剂价格昂贵且对环境具有一定的污染性^[68],进而限制了 Reb A 的应用领域。为此,借助生物酶法催化技术可使 Reb A 的制备不需消耗有机溶剂,为改善甜叶菊提取物的口感提供了绿色途径。

在生物转化纯甜菊糖苷以生产 Reb A 的传统方法中,可以通过筛选并优化催化效率更高的新酶等方式提高 Reb A 的转化率,并且可以通过全细胞生物催化、基因共表达等技术进一步降低生产成本。例如,Zhang 等^[57]从甜菊种植土壤中分离筛选获得了产 CGTase 的 *Alkalihalobacillus oshimensis* CGMCC 23164 菌株。在 <40 °C 条件下,以 10 g/L 甜菊醇和 50 g/L 可溶性淀粉为底物,CGTase-13 表现出最佳的转糖基化活性,可使甜菊糖苷和莱鲍迪甙 A 的转化率分别达到 86.1% 和 90.8%,进而使该糖基化甜菊醇糖苷具有较弱的涩味和苦味,更快的甜味,更强的甜味强度。此外,Chen 等^[69]通过将蔗糖合成酶 mbSUS 与 UGT76G1 在毕氏酵母 GS115 中共表达,实现反应系统中 UDPG 的再生,降低了 UGT76G1 催化 ST 转化为 Reb A 过程中所需糖基供体的生产成本。通过优化 mbSUS 与 UGT76G1 的基因剂量比,构建全细胞生物催化剂 GS115(U76/mb3:1),从而进一步提高酶的催化效率。在最优反应条件下,1 L 批次的莱鲍迪甙 A 的产率在 26 h 内达到 261.2 mmol/L。基于其较高的反应效率和较低的生产成本,全细胞催化剂 GS115(U76/mb3:1)是一种具有工业规模合成潜力的强大生物催化剂。

除去传统酶法转化外,研究人员还尝试以甜叶菊提取物为原料酶法合成 Reb A,从而进一步降低生产成本。例如,以地衣芽孢杆菌发酵的环糊精糖基转移酶 DSM13 为原料,对甜叶菊提取物进行酶生物转化,可使莱鲍迪甙 A 含量提高 1 倍,而甜叶菊苷转化率达到 70%~80% 时,最大增幅为 5 倍^[70]。此外,为减少副产物含量,提高 Reb A 的相对纯度,通过在大肠杆菌中共表达多种 β -葡萄糖苷酶(SPBGL1、SBGL、SBGL2 和 SBGL3)和 α -L-鼠李糖苷酶

(SPRHA2), 利用其细胞提取物或全细胞高效催化甜叶菊提取物中的甜茶苷 (ST)、甜菊糖 (Rub)、莱鲍迪苷 B (Reb B) 和莱鲍迪苷 C (Reb C) 水解为微溶于水的甜菊醇, 离心后降低了甜叶菊提取物中其他成分的含量, 进一步提高了莱鲍迪苷 A 的纯度, 使 Reb A 的相对含量分别由 24% 提高至 71.4% 和 83.4%^[56]。

4.1.3.2 莱鲍迪甙 D (Reb D) 的合成 莱鲍迪苷 D 因具有零热量和更高甜度的特性而成为一种很有前途的甜味剂, 其常见的生物合成方法是以 Reb A 为底物, 利用糖基转移酶催化合成 Reb D^[71]。例如, 在毕赤酵母中表达来源于 *Oryza sativa* 的转糖酶基因 *EUGT11*, 获得能够催化 Reb A 转化为 Reb D 的重组菌株 XE-3。其中, 该基因在 pH 为 5.5, 含 0.75% 甲醇的 BMMY 培养基中诱导菌株 XE-3 时表达量最高, 可于 28 °C 表达 3~4 d 后获得约 790 mg/L 目的蛋白; 而重组酶 *EUGT11* 在 pH6.0~6.5 的磷酸钠缓冲液中, 以 UDPG 为糖基供体, 45 °C 时催化生成 Reb D 的活性最高。由于 *EUGT11* 表达和催化的最佳 pH 和最佳温度都不同, 为获得 Reb A 的最大转化率, 研究人员利用正交设计开发了合适的 Reb D 生产策略。研究表明, 采用一锅法生产 Reb D 时, 培养基的初始 pH 是主要因素, 会同时影响酶的表达水平和催化效率, 并进一步主导底物的转化。最终选择了初始 pH7.0 为最优 pH, 此时 Reb A 显示出最高的转化率。之后在此基础上采用两步控温策略以高产 Reb D。结果表明, Reb A 的转化率从 28 °C 下的 62.41% 提高至 28/35 °C 下的 95.31%, Reb D 的产率也从 60.57% 增加至 93.47%。该方法简化了蛋白分离及纯化的步骤, 为甜味剂生产提供了一种成本更低、效率更高的全细胞生物催化剂技术^[72]。

此外, 糖基转移酶 *UGTSL2* 也能够催化 Reb A 生成 Reb D。例如, 将番茄的糖基转移酶 *UGTSL2* 在大肠杆菌中表达, 重组酶能够以 Reb A 为底物催化生成 Reb D 和 Reb M^[73]。此外, 由于合成所需的 UDPG 价格昂贵, 为降低生产成本, 可以通过共同表达来源于马铃薯的 *UGTSL2* 和蔗糖合成酶 *SUS1*, 在大肠杆菌中构建 Reb D 合成和 UDP-葡萄糖回收的途径。其中 *StSUS1* 以价格低廉的蔗糖和 UDP 为底物催化合成 UDPG, 而 *UGTSL2* 则利用合成的 UDPG 为糖基供体催化 Reb A 合成 Reb D, 最终从 20 g/L Reb A 中得到 17.4 g/L Reb D^[74]。在此基础上, 在大肠杆菌中构建 *UGT76G1*、*UGTSL2* 和 *SUS1* 多酶反应体系, 实现 St 到 Reb D 的低成本转化。其中为了提高最终目标产物 Reb D 产量, 对 *UGTSL2* 的 358Asn 进行了饱和突变, 以提高 *UGTSL2* 糖基化 Reb A 的催化活性和降低副产物莱鲍迪苷 M2 的形成为指标, 筛选出 Asn358Phe 突变体代替野生型 *UGTSL2*, 最终可使 Reb D 含量提高至 14.4 g/L^[75]。值得注意的是, 突变体 Asn358Phe 的催化活性虽提高了 21.9%, 但产物中仍存在少部分 Reb M2。为了

发掘活性更高的新型糖基转移酶, 结合生物信息学方法, 通过同源序列比对、结构域分析及三级结构模拟等筛选技术, 将来源于辣椒的糖基转移酶 *CaUGT* 和马铃薯的糖基转移酶 *StUGT* 在大肠杆菌中表达, 重组酶 *CaUGT* 和 *StUGT* 均能够以 UDPG 为糖基供体, 通过酶催化将 Reb A 转化为 Reb D, 但重组酶 *CaUGT* 的催化产物存在副产物 Reb M2, 重组酶 *StUGT* 能够特异地催化 Reb A 转化为 Reb D, 产率为 97%^[76]。

4.1.3.3 莱鲍迪甙 M (Reb M) 的合成 Reb M 可由两种糖基转移酶催化莱鲍迪糖苷 A (Reb A) 和莱鲍迪糖苷 D (Reb D) 级联糖基化而成。目前, 除 *SrUGT76G1* 外, 暂未发现其他能够催化 Reb D 生成 Reb M 的糖基转移酶, 因此关于促进 Reb M 酶法合成的研究主要聚焦在 *SrUGT76G1* 的过表达及优化方面。例如, 在大肠杆菌中表达的重组酶 *SrUGT76G1* 能够以 Reb D 为底物, 经过酶催化生成 Reb M, 转化率为 72.2%^[77]; 而突变体 *SrUGT76G1 T284S* 催化 Reb D 转化为 Reb M 的产率提高了约 50%。类似地, 通过将酸性尾短肽标签融合在 *SrUGT76G1* 的 C 末端, 获得四种酸性尾融合酶, 进而提高了 *SrUGT76G1* 在大肠杆菌中的可溶性表达水平、热稳定性及催化活性。结果表明: 酸性尾融合酶在 pH9.0 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液中, 以 Reb D 和 UDPG 为底物, 其催化生成 Reb M 的活性为野生型的 202.46%^[78]。同时, 为提高糖基转移酶的可重复利用性, 从而降低这些酶的生产成本, Wang 等^[79]将重组糖基转移酶 *OsEUGT11* (*UGT1*) 和 *SrUGT76G1* (*UGT2*) 在大肠杆菌中表达并共价固定在壳聚糖微球上。结果表明: 共固定化酶体系的活性比混合固定化酶体系高 3.2 倍。当 Reb A 投料浓度为 5 g/L 时, Reb A 的转化率为 97.3%, Reb M 的产率为 72.2% (4.82 g/L)。更为重要的是, 当重复使用 4 次和 8 次循环后, 共固定酶的活性分别保持在原来的 72.5% 和 53.1%, 显示出较高的稳定性, 表明共固定 *UGT* 对 Reb M 的生产具有潜在的重要价值。

4.2 基于微生物从头合成甜菊糖苷的研究进展

目前, 虽有微生物发酵合成莱鲍迪苷 A 等甜菊糖苷类产品等相关报道, 但因微生物体从头合成甜菊糖苷涉及的催化反应步骤较多, 关键酶表达量低、活性较差, 进而导致甜菊糖苷产量较低, 表明甜菊糖苷合成途径仍需进一步改善优化。底盘细胞是天然产物合成的工厂, 选择具有成熟操作系统以及遗传稳定的底盘细胞是天然产物高效生产的基础, 而模式微生物大肠杆菌和酿酒酵母常被用作底盘细胞。例如, Wang 等^[13]将菊糖苷生物合成路径分为三个模块, 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中构建并实现异源从头合成 Reb A。同时, 为弱化 KAH 步骤瓶颈, 利用来源于拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的 KAH 功能同源物 *CYP714A2* 替换 *S. reaudiana* 衍生的 KAHs, 并对

CYP714A2 的 N 端进行工程化,可使甜菊醇产量提高 16 倍,达到 9.47 mg/L, Reb A 产量达到 10.03 mg/L。为进一步提高甜菊醇产量,通过改造关键酶 KS 的 5'非翻译区(UTR)序列和 KO 的 N 端序列、删除编码谷氨酸脱氢酶编码基因 *gdhA* 和胞内 NADPH/NADP⁺,进而构建甜菊糖苷的从头合成途径,使甜菊醇在大肠杆菌中合成量提高至 38.4 mg/L^[80]。类似地,研究人员在大肠杆菌中偶联表达来源于 *Solanum lycopersicum* 的 UDP-葡萄糖基转移酶 UGTSL2 和 *Solanum tuberosum* 的蔗糖合成酶 StSUS1,成功构建 Reb D 合成途径^[74]。

酿酒酵母异源合成甜菊糖苷具有独特优势:内源性的 MVA 途径和麦角固醇合成途径能够稳定提供前体 IPP、DMAPP,完整的膜系统和翻译后修饰

有利于环化酶、CYP450 的活性表达等,表明真核细胞是生产稀有甜菊糖苷(如 Reb M 或 Reb D)的适宜宿主细胞^[45]。为此,研究人员通过对 KO 和 KAH 的功能同源组合进行批量实验,进而确定最佳 KO-KAH-CPR 组合——新 KO75(CYP701)和新 KAH82(CYP72),进而实现贝壳杉烯高效转化为甜菊醇,并限制副产物的合成。同时,两拷贝 KO75 可有效增加甜菊醇的产量(比单拷贝 KO75 多 61%)^[81]。此外,研究人员以 *Synechococcus elongatus* 为出发菌株,结合基因表达和模块化工程过量表达细胞色素 P450 酶 CYP79A1 和 CYP71E1,进而实现二氧化碳直接合成内根-贝壳杉烯酸,且产量可达 2.9 mg/L^[81]。生物法合成甜菊糖苷的研究进展汇总于表 2。

表 2 生物法合成甜菊糖苷的研究进展
Table 2 Progress in biosynthesis of stevia glycosides

关键酶	菌株	研究方法	产物	产量	参考文献
UGTs, KAH	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	IPTG(0.02 mmol/L)、30 ℃	<i>ent</i> -kaurene	产量至194.12 mg/L(摇瓶)和1.872 g/L(5-L发酵罐)	[13]
KO, KAH	<i>E. coli</i> BL21(SSY10)	强化KO-Sr的表达和优化发酵条件22 ℃、IPTG (0.1 mmol/L)	<i>ent</i> -kaurene	100.23 mg/L	[13]
KAH	<i>E. coli</i> BL21(SSY10)	将拟南芥CYP714A2的N端改造为17 α TR29CYP714A2,并取代甜叶菊衍生的关键酶 KAH	甜菊醇	15.47 mg/L	[13]
UGTs, KAH, KO	<i>E. coli</i> BL21(SSY10)	构建并表达将UGT模块 UGT85C2/UGT91D2w/UGT74G1/UGT76G1并入17 α TR29CYP714A2 GGPPS、CPPS和KS的5' UTR基因	Reb A	10.03 mg/L	[13]
二磷酸合成酶、共醛基二磷酸合成酶和高脲合成酶	<i>E. coli</i> BL21	构建并表达GGPPS, CPPS和KS的5' UTR	<i>ent</i> -kaurene	623.6 \pm 3 mg/L(分批发酵)	[80]
kaurene oxidase	<i>E. coli</i> BL21	过表达来源于拟南芥的改造5' -UTR, n-末端的KO, 和增加胞内NADPH/NADP ⁺ 比例	<i>ent</i> -kaurenoic acid	50.7 \pm 9.8 mg/L(分批发酵)	[80]
UtrCYP7 14A2-AtCPR2	<i>E. coli</i> BL21	过表达5' UTR修饰的trCYP714A2和N端修饰的 UTRCYP714A2-ATCPR2的融合蛋白	甜菊醇	38.4 \pm 1.7 mg/L(分批发酵)	[80]
细胞色素P450的还原酶	<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942	代谢改造cyanobacteria, 使其利用二氧化碳合成内根-KA	<i>ent</i> - kaurenoic acid	2.9 \pm 0.01 mg/L	[81]
UGT76G1	<i>S. cerevisiae</i>	通过表达UGT76G1构建全细胞生物催化剂,并优化全细胞催化条件(细胞通透性、温度、pH、柠檬酸盐、Mg ²⁺ 浓度和葡萄糖供应)	甜菊苷转化为 Reb A	1160.5 mg/L(底物为2 g/L 甜菊苷)	[82]
UGT76G1、UGTSL2和StSUS1	<i>E. coli</i> BL21	利用UGT76G1, UGTSL2和StSUS1建立多酶反应体系	甜菊苷转化为 Reb D	14.4 g/L(底物为20 g/L 甜菊苷)	[75]
UGTs	<i>Pichia pastoris</i>	过表达来源于水稻的EUGT11	Reb A转化为 Reb D	转化率高达95.3%	[72]
甜菊糖苷	<i>P. pastoris</i>		甜菊糖苷转化为 Reb A	甜菊糖苷转化率为 34.6%, Reb A转化率为25.6%~35.6%	[83]
Smt3-UGT76G1	<i>E. coli</i> BL21	在 <i>E. coli</i> 中共表达内源基因 <i>prpD</i> 和 <i>malK</i> 以促进 Smt3-UGT76G1的表达	St转化为Reb A; Reb D转化为 Reb M	4.8 g/L; 1.8 g/L	[77]

5 结论与展望

随着人们健康意识的提高,消费者对食物的追求越来越重视口感、健康和功能性的平衡发展,进而对天然非糖甜味剂的需求呈“爆炸式”增长^[84]。作为一种新型零热量天然甜味剂,甜菊糖苷已然被广泛应用于食品、医药、日用化工、酿酒等行业,其中 Reb A、Reb D 和 Reb M 又因在甜度、热量和呈味品质上均优于其他糖苷而具有更高的商业价值。然而,由于

从植物中提取、纯化操作困难,甜菊糖苷的产量较低,不能满足工业化需求。而且与蔗糖相比,甜菊糖苷仍存在后苦味重、余味绵延不足等问题,极大局限其应用价值。

生物合成法是目前解决以上问题的一种良好途径,利用酶法催化合成甜菊糖苷可以显著提高其产量和甜度,降低生产成本,实现甜菊糖苷的工业化生产。目前,甜菊糖苷生物合成途径及关键酶已经得到

完整解析,同时也已发掘出多种应用于酶法催化甜菊糖苷合成的特异性糖基转移酶,但微生物生产仍存在诸多难题,如甜菊糖苷生物合成途径涉及较多的催化反应和酶,微生物细胞难以实现其高效协调表达;缺少特异性关键酶,导致底盘细胞催化的顺序和方向难以控制等。为此,为进一步提高甜菊糖苷类产品的产量和质量,进而实现甜菊糖苷各组分低成本、规模化生产,仍需以下四个方展开研究:

a.结合生物信息学发掘新型高效糖基转移酶,或利用酶工程提高关键酶的表达水平、催化效率及热稳定性。

b.基于结构生物学解析关键酶蛋白结构,全面了解相关催化机制,进而实现酶功能的定向改造,增强底物特异性和催化活性。

c.利用合成生物学技术实现甜菊糖苷在底盘微生物从头合成代谢途径的优化构建,并结合调节代谢网络、开发及优化基因调控元件等动态调控方法提高代谢途径流量;或采用模块化共培养工程成为减轻细胞压力、提高目标产物产量^[85]。

d.发展固定化、全细胞催化及多酶级联和辅酶再生技术,降低生产成本。

总之,基于合成生物学在植物天然产物的高效、可持续生产中具有的独特优势,利用合成生物学实现甜菊糖苷的规模化生产成为必然趋势。

© The Author(s) 2025. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] CASTRO-MUÑOZ R, CORREA-DELGADO M, CORDOVA-ALMEIDA R, et al. Natural sweeteners: Sources, extraction and current uses in foods and food industries[J]. *Food Chemistry*, 2022, 370: 130991.
- [2] ZHOU X, GONG M Y, LÜ X Q, et al. Metabolic engineering for the synthesis of steviol glycosides: Current status and future prospects[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(13): 5367–5381.
- [3] PERRIER D J, MIHALOV J J, CARLSON J S. FDA regulatory approach to steviol glycosides[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2018, 122: 132–142.
- [4] LI M T, TAN H E, LU Z Y, et al. Gut-brain circuits for fat preference[J]. *Nature*, 2022, 610: 722–730.
- [5] BUCHANAN K L, RUPPRECHT L E, KAELEBERER M M, et al. The preference for sugar over sweetener depends on a gut sensor cell[J]. *Nature Neuroscience*, 2022, 25: 191–200.
- [6] RINNINELLA E, CINTONI M, RAOUL P, et al. Food additives, gut microbiota, and irritable bowel syndrome: A hidden track[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2020, 17(23): 8816.
- [7] SCHWARZ A, HERNANDEZ L, AREFIN S, et al. Sweet, bloody consumption—what we eat and how it affects vascular ageing, the BBB and kidney health in CKD[J]. *Gut Microbes*, 2024, 16(1): 2341449.
- [8] SARAIVA A, CARRASCOSA C, RAHEEM D, et al. Natural Sweeteners: The relevance of food naturalness for consumers, food security aspects, sustainability and health impacts[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2020, 17(17): 6285.
- [9] CIRIMINNA R, MENEGUZZO F, PECORAINO M, et al. A bioeconomy perspective for natural sweetener Stevia[J]. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2019, 13(3): 445–452.
- [10] SALEHI B, LÓPEZ M D, MARTÍNEZ-LÓPEZ S, et al. Stevia rebaudiana Bertoni bioactive effects: From *in vivo* to clinical trials towards future therapeutic approaches[J]. *Phytotherapy Research: PTR*, 2019, 33(11): 2904–2917.
- [11] ABDULHAFIZ F, MOHAMMED A, REDUAN M F H, et al. Plant cell culture technologies: A promising alternatives to produce high-value secondary metabolites[J]. *Arabian Journal of Chemistry*, 2022, 15(11): 104161.
- [12] MOZEJKO-CIESIELSKA J, SERAFIM L S. Recent progress and challenges in synthetic biology for improving microbial production of biopolymers[J]. *Microbiological Research*, 2023, 275: 127463.
- [13] 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.
- [14] 韩羽彤. 甜菊糖苷的性质、提取、分离与结构鉴定研究现状[J]. 现代食品, 2023, 29(7): 39–41. [HAN Y T. Current status of research on the properties, extraction, separation and structure identification of stevioside[J]. *Modern Food*, 2023, 29(7): 39–41.]
- [15] HUANG C X, WANG Y, ZHOU C S, et al. Properties, extraction and purification technologies of Stevia rebaudiana steviol glycosides: A review[J]. *Food Chemistry*, 2024, 453: 139622.
- [16] CHATSUDTHIPONG V, MUANPRASAT C. Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness[J]. *Pharmacology Therapeutics*, 2009, 121(1): 41–54.
- [17] YANG Y Y, XU M Y, WAN Z L, et al. Novel functional properties and applications of steviol glycosides in foods[J]. *Current Opinion in Food Science*, 2021, 43: 91–98.
- [18] YOUNES M, AGGETT P, AGUILAR F, et al. Safety evaluation of glucosylated steviol glycosides as a food additive in different food categories[J]. *EFSA Journal*, 2022, 16(2): e07066.
- [19] CASTRO-MUÑOZ R, DÍAZ-MONTES E, CASSANO A, et al. Membrane separation processes for the extraction and purification of steviol glycosides: An overview[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2020, 61(13): 2152–2174.
- [20] AHMAD J, KHAN I, BLUNDELL R, et al. Stevia rebaudiana Bertoni: An updated review of its health benefits, industrial applications and safety[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2020, 100: 177–189.
- [21] TIAN X Y, ZHONG F, XIA Y X. Dynamic characteristics of sweetness and bitterness and their correlation with chemical structures for six steviol glycosides[J]. *Food Research International*, 2021, 151: 110848.
- [22] 郭保党, 饶义剑. 新型甜味剂莱鲍迪苷 D 和莱鲍迪苷 M 的生物转化进展[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(7): 289–296.
- [23] GUO B D, RAO Y J. Current advances in the biotransformation of new type sweeteners Rebaudioside D and Rebaudioside M[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2023, 49(7): 289–296.]
- [24] TAO R, CHO S. Consumer-Based Sensory Characterization of Steviol Glycosides (Rebaudioside A, D, and M)[J]. *Foods*, 2020, 9(8): 10226.
- [24] ORELLANA-PAUCAR A M. Steviol glycosides from stevia

- rebaudiana: An updated overview of their sweetening activity, pharmacological properties, and safety aspects[J]. *Molecules*, 2323, 28(3): 1258.
- [25] 陈俊名. 甜菊糖苷的体外代谢及生物活性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2019. [CHEN J M. *In vitro* metabolism and biological activity of the steviol glycosides[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2019.]
- [26] KUREK J M, KRÓL E, KREJCIO Z. Steviol glycosides supplementation affects lipid metabolism in high-fat fed STZ-induced diabetic rats[J]. *Nutrients*, 2020, 13(1): 112.1.
- [27] DYRSKOG S E U, JEPPESEN P B, CHEN J, et al. The diterpene glycoside, rebaudioside A, does not improve glycemic control or affect blood pressure after eight weeks treatment in the Goto-Kakizaki rat[J]. *The Review of Diabetic Studies*, 2005, 2(2): 84–91.
- [28] LAILERD N, SAENGSIKISUWAN V, SLONIGER J A, et al. Effects of stevioside on glucose transport activity in insulin-sensitive and insulin-resistant rat skeletal muscle[J]. *Metabolism*, 2004, 53(1): 101–107.
- [29] YASUKAWA K, KITANAKA S, SEO S. Inhibitory effect of stevioside on tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin[J]. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2002, 25(11): 1488.
- [30] VELESOTIS C, KANELAKIS M, VYNIOS D H. Steviol glycosides affect functional properties and macromolecular expression of breast cancer cells[J]. *IUBMB Life*, 2022, 74(10): 1012–1028.
- [31] CHEN J M, XIA Y M, SUI X C, et al. Steviol, a natural product inhibits proliferation of the gastrointestinal cancer cells intensively[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(41): 26299–26308.
- [32] CHEN J W, HOU K, QIN P, et al. RNA-Seq for gene identification and transcript profiling of three *Stevia rebaudiana* genotypes[J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 571.
- [33] HUANG Y, XIE F J, CAO X, et al. Research progress in biosynthesis and regulation of plant terpenoids[J]. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2022, 35(1): 1800–1809.
- [34] VOLKE D C, ROHWER J, FISCHER R, et al. Investigation of the methylerythritol 4-phosphate pathway for microbial terpenoid production through metabolic control analysis[J]. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1): 192.
- [35] KUMAR H, SINGH K, KUMAR S. 2C-methyl-D-erythritol 2, 4-cyclodiphosphate synthase from *Stevia rebaudiana* Bertoni is a functional gene[J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(12): 10971–10978.
- [36] FRANK A, GROLL M. The methylerythritol phosphate pathway to isoprenoids[J]. *Chemical Reviews*, 2017, 117(8): 5675–5703.
- [37] KWON M, SHIN B K, LEE J, et al. Characterization of *Burkholderia glumae* BGR1 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase (HDR), the terminal enzyme in 2-C-methyl-d-erythritol 4-phosphate (MEP) pathway[J]. *Applied Biological Chemistry*, 2013, 56(1): 35–40.
- [38] NETI S S, PAN J J, POULTER C D. Mechanistic studies of the protonation-deprotonation reactions for type 1 and type 2 isopentenyl diphosphate: Dimethylallyl diphosphate isomerase[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2018, 140(40): 12900–12908.
- [39] YOU M K, LEE Y J, KIM J K, et al. The organ-specific differential roles of rice DXS and DXR, the first two enzymes of the MEP pathway, in carotenoid metabolism in *Oryza sativa* leaves and seeds[J]. *BMC Plant Biology*, 2020, 20(1): 167.
- [40] WANG Q, QUAN S, XIAO H. Towards efficient terpenoid biosynthesis: manipulating IPP and DMAPP supply[J]. *Biore-sources and Bioprocessing*, 2019, 6: 6.
- [41] ZHENG J S, ZHUANG Y, MAO H Z, et al. Overexpression of SrDXS1 and SrKAH enhances steviol glycosides content in transgenic *Stevia* plants[J]. *BMC Plant Biology*, 2019, 19(1): 1.
- [42] BISWAS P, KUMARI A, MODI A, et al. Improvement and regulation of steviol glycoside biosynthesis in *Stevia rebaudiana* Bertoni[J]. *Gene*, 2023, 891: 147809.
- [43] TOTTE N, CHARON L, ROHMER M, et al. Biosynthesis of the diterpenoid steviol, an ent-kaurene derivative from *Stevia rebaudiana* Bertoni, via the methylerythritol phosphate pathway[J]. *Tetrahedron Letters*, 2000, 41: 6407–6410.
- [44] GOLD N D, ELENA F, HANSEN C C, et al. A combinatorial approach to study cytochrome P450 enzymes for *De Novo* production of steviol glucosides in baker's yeast[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(12): 2918–2929.
- [45] KNAUER J F, SCHULZ C, ZEMELLA A, et al. Synthesis of mono Cytochrome P450 in a modified CHO-CPR cell-free protein production platform[J]. *Scientific Reports*, 2024, 14(1): 1271.
- [46] LIBIK-KONIECZNY M, MICHALEC-WARZECHA A, DZ-IURKA M, et al. Steviol glycosides profile in *Stevia rebaudiana* Bertoni hairy roots cultured under oxidative stress-inducing conditions[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(13): 5929–5941.
- [47] CEUNEN S, GEUNS J M C. Steviol glycosides: Chemical diversity, metabolism, and function[J]. *Journal of Natural Products*, 2013, 76(6): 1201–1028.
- [48] 李亚桐, 马媛媛, 汪振洋, 等. 甜菊糖苷的应用及生物合成研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2023, 43(1): 104–114. [LI Y T, MA Y Y, WANG Z Y, et al. Research progress of application and biosynthesis of steviol glycosides[J]. *China Biotechnology*, 2023, 43(1): 104–114.]
- [49] OLSSON K, CARLSEN S, SEMMLER A, et al. Microbial production of next-generation stevia sweeteners[J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15: 207.
- [50] 刘啸尘, 刘护, 张良, 等. 细胞代谢过程中的酶促糖基化及其功能[J]. 中国生物工程杂志, 2018, 38(1): 69–77. [LIU X C, LIU H, ZHANG L, et al. Enzymatic glycosylation and its function in metabolic process of cells[J]. *Chinese Biotechnology*, 2018, 38(1): 69–77.]
- [51] RAHIMI S, KIM J, MIJAKOVIC I, et al. Triterpenoid-biosynthetic UDP-glycosyltransferases from plants[J]. *Biotechnology Advances*, 2019, 37(7): 107394.
- [52] OSMANI S A, BAK S, MØLLER B L. ChemInform abstract: Substrate specificity of plant UDP-dependent glycosyltransferases predicted from crystal structures and homology modeling[J]. *ChemInform*, 2009, 70(3): 325–347.
- [53] MOHAMED A A A, CEUNEN S, GEUNS J M C, et al. UDP-dependent glycosyltransferases involved in the biosynthesis of steviol glycosides[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2011, 168(10): 1136–1141.
- [54] WU Q, CHRISTOPHE H L, HAN-YI C, et al. An efficient *stevia rebaudiana* transformation system and *in vitro* enzyme assays reveal novel insights into UGT76G1 Function[J]. *Scientific reports*, 2020, 10(1): 3773.
- [55] LIBIK-KONIECZNY M, CAPECKA E, TULEJA M, et al. Synthesis and production of steviol glycosides: Recent research trends and perspectives[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(10): 3883–3900.
- [56] LIN Y, WEN M M, LAN Q, et al. A strategy to increase re-

- baudioside A content based on one-step bioconversion of Stevia extract to steviol[J]. *Green Chemistry*, 2023, 8: 3214–3222.
- [57] ZHANG R Q, TANG R Q, BI J H, et al. Efficient bioconversion of stevioside and rebaudioside a to glucosylated steviol glycosides using an *Alkalihalobacillus oshimensis*-derived cyclodextrin glucanotransferase[J]. *Molecules*, 2023, 28(3): 1245.
- [58] YANG T, ZHANG J Z, KE D, et al. Hydrophobic recognition allows the glycosyltransferase UGT76G1 to catalyze its substrate in two orientations[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 1–12.
- [59] LIU Z F, LI J X, SUN Y W, et al. Structural insights into the catalytic mechanism of a plant diterpene glycosyltransferase SrUGT76G1[J]. *Plant Communications*, 2020, 1(1): 100004.
- [60] ZHANG S S, YAN Y S, LYU C C, et al. Identification of the Key Residues of the Uridine Diphosphate Glycosyltransferase 91D2 and its Effect on the Accumulation of Steviol Glycosides in Stevia rebaudiana[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(6): 1852–1863.
- [61] ZHANG J Z, TANG M H, CHEN Y J, et al. Catalytic flexibility of rice glycosyltransferase OsUGT91C1 for the production of palatable steviol glycosides[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 7030.
- [62] BRANDLE J, TELMER P. Steviol glycoside biosynthesis[J]. *Phytochemistry*, 2007, 68(14): 1855–1863.
- [63] 王蓓蓓. 甜叶菊 UGT76G1 在毕赤酵母细胞的表面展示[D]. 广州: 华南理工大学, 2014. [WANG B B. Cell-surface display of UGT76G1 from Stevia rebaudiana in *Pichia pastoris*[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2014.]
- [64] KIM M J, ZHENG J, MING H, et al. Overexpression of SrUGT76G1 in Stevia alters major steviol glycosides composition towards improved quality[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, 17(6): 1037–1047.
- [65] YONEDA Y, SHIMIZU H, NAKASHIMA H, et al. Effect of treatment with gibberellin, gibberellin biosynthesis inhibitor, and auxin on steviol glycoside content in stevia rebaudiana Bertoni[J]. *Sugar Tech*, 2017, 20(4): 482–491.
- [66] GERWIG G J, TE POELE E M, DIJKHUIZEN L, et al. Stevia Glycosides: Chemical and enzymatic modifications of their carbohydrate moieties to improve the sweet-tasting quality[J]. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 2016, 73: 1–72.
- [67] 李铭敏, 郑仁朝, 郑裕国. 甜菊糖苷的生物合成途径与生物转化制备策略的研究概述[J]. *食品与发酵工业*, 2015, 41(9): 236–242. [LI M M, ZHENG R C, ZHENG Y G. Study of steviol glycosides biosynthesis pathway and the advances in its bioconversion strategies[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2015, 41(9): 236–242.]
- [68] 史石磊. 甜菊糖苷提取工艺进展[J]. *食品工业*, 2023, 44(6): 157–159. [SHI S L. Progress in steviol glycoside extraction process[J]. *The Food Industry*, 2023, 44(6): 157–159.]
- [69] CHEN M Q, ZENG X A, ZHU Q Q, et al. Effective synthesis of rebaudioside a by whole-cell biocatalyst *Pichia pastoris*[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2021, 175: 108117.
- [70] CZINKÓCZKY R, NÉMETH A. Enrichment of the rebaudioside A concentration in *Stevia rebaudiana* extract with cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus licheniformis* DSM 13[J]. *Engineering in Life Sciences*, 2021, 22(1): 30–39.
- [71] YANG S, HOU X, DENG Z W, et al. Improving the thermostability of glycosyltransferase YojK by targeting mutagenesis for highly efficient biosynthesis of rebaudioside D[J]. *Molecular Catalysis*, 2023, 535: 112898.
- [72] WANG Z Y, HONG J F, MA S Y, et al. Heterologous expression of EUGT11 from *Oryza sativa* in *Pichia pastoris* for highly efficient one-pot production of rebaudioside D from rebaudioside A[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 163: 1669–1676.
- [73] CHEN L L, PAN H Y, CAI R X, et al. Bioconversion of stevioside to rebaudioside E using glycosyltransferase UGTSL2[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2020, 193(3): 637–649.
- [74] CHEN L L, SUN P, ZHOU F F, et al. Synthesis of rebaudioside D, using glycosyltransferase UGTSL2 and in situ UDP-glucose regeneration[J]. *Food Chemistry*, 2018, 259: 286–291.
- [75] CHEN L L, CAI R X, WENG J Y, et al. Production of rebaudioside D from stevioside using a UGTSL2 Asn358Phe mutant in a multi-enzyme system[J]. *Microbial Biotechnology*, 2020, 13(4): 974–983.
- [76] 宋浩, 汪振洋, 马媛媛, 等. 一种能够催化莱鲍迪昔 A 生成多种甜菊糖苷衍生物的糖基转移酶 CaUGT: 中国, 202111680606.0[P]. 2023-01-03. [SONG H, WANG Z Y, MA Y Y, et al. CaUGT, a glycosyltransferase capable of catalyzing the generation of multiple steviol glycoside derivatives from Leiboldin A: China, 202111680606.0[P]. 2023-01-03.]
- [77] SHU W J, ZHENG H C, FU X P, et al. Enhanced heterologous production of glycosyltransferase UGT76G1 by co-expression of endogenous *prpD* and *malK* in *Escherichia coli* and its transglycosylation application in production of rebaudioside[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(16): 5752.
- [78] 马媛媛, 李亚桐, 魏晓珍, 等. 一种与特定短肽标签融合能高效催化 Reb M 生成的重组酶: 中国, 202111481579.4[P]. 2022-03-18. [MA Y Y, LI Y T, WEI X Z, et al. A recombinant enzyme fused to a specific short peptide tag efficiently catalyzes Reb M generation: China, 202111481579.4[P]. 2022-03-18.]
- [79] WANG Z Y, LIU W B, LIU W, et al. Co-immobilized recombinant glycosyltransferases efficiently convert rebaudioside A to M in cascade[J]. *RSC Advances*, 2021, 11(26): 15785–15794.
- [80] MOON J H, LEE K, LEE J H, et al. Redesign and reconstruction of a steviol-biosynthetic pathway for enhanced production of steviol in *Escherichia coli*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2020, 19(1): 20.
- [81] KO S C, WOO H M. Biosynthesis of the calorie-free sweetener precursor *ent*-kaurenoic acid from CO₂ using engineered *Cyanobacteria*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020: 2979–2985.
- [82] LI Y, LI Y Y, WANG Y, et al. Production of rebaudioside A from stevioside catalyzed by the engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2016, 178(8): 1586–1598.
- [83] ZERVA A, CHOROZIAN K, KRITIKOU A S, et al. β -glucosidase and β -galactosidase-mediated transglycosylation of steviol glycosides utilizing industrial byproducts[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, 9: 685099.
- [84] SINGH A K, SINGH A, SINGH R, et al. Non-sugar sweeteners and health outcomes in adults without diabetes: Deciphering the WHO recommendations in the Indian context[J]. *RSC Advances*, 2023, 17(8): 102829.
- [85] XU Y M, WU Y K, LIU Y F, et al. Sustainable bioproduction of natural sugar substitutes: Strategies and challenges[J]. *Trends in Food Science Technology*, 2022, 129: 512–527.