

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201405003

王磊,刘金磊,卢凤来,等. 酶催化糖基转移反应在改善罗汉果苦味皂苷口味中的应用[J]. 广西植物, 2015, 35(6):782—785

Wang L., Liu J.L., Lu F.L., et al. Improve the taste of bitter mogroside by enzymatic glycosylation method[J]. *Guihaia*, 2015, 35(6):782—785

# 酶催化糖基转移反应在改善罗汉果苦味皂苷口味中的应用

王磊<sup>1,2</sup>, 刘金磊<sup>1</sup>, 卢凤来<sup>1</sup>, 宋云飞<sup>2</sup>, 李元元<sup>2</sup>, 李典鹏<sup>1\*</sup>

(1. 广西植物功能物质研究与利用重点实验室, 广西植物研究所, 广西 桂林 541006;

2. 桂林莱茵生物科技股份有限公司, 广西 桂林 541199)

**摘要:** 罗汉果皂苷 II 是罗汉果嫩果的主要皂苷成分, 味道极苦, 在罗汉果生产季节的末期大量滞长果(苦果)因为天气原因而产生, 这些滞长果因体内的苦味皂苷尚未转化为甜味皂苷而被丢弃; 另外, 在罗汉果甜苷提取行业中, 脱苦工艺同样会产生大量的苦味罗汉果皂苷 II。但在化学结构上, 罗汉果苦味皂苷与甜味皂苷拥有完全相同的苷元部分, 仅存在葡萄糖残基数目和位置的差别。该研究通过酶催化糖基转移反应将新的葡萄糖基团引入苦味的罗汉果皂苷 II 中, 可以延长其糖链, 从而达到改善其口味的目的。该研究从原料选择、糖源选择以及反应温度等多方面考察了反应条件, 最终确定的反应最佳条件为纯度在 50% 以上的罗汉果皂苷 II、2 倍于皂苷重量的淀粉、60 U·g<sup>-1</sup> 罗汉果苦味皂苷的酶、60~65 °C 反应 24 h。经实际罗汉果苦果样品验证了方法的可行性, 所获得的产品可以完全消除苦味, 并且带有淡淡的甜味, 经 HPLC-MS 确定了所获得的微甜产物为 3~6 个糖的皂苷混合物。该方法对于目前罗汉果生产中大量出现并被遗弃的嫩果、苦果以及脱苦工艺中产生的罗汉果皂苷 II 而言, 是一种潜在的实现废物利用的方法。

**关键词:** 罗汉果皂苷; 葡萄糖转移酶; 酶应用**中图分类号:** Q814.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2015)06-0782-04

## Improve the taste of bitter mogroside by enzymatic glycosylation method

WANG Lei<sup>1,2</sup>, LIU Jin-Lei<sup>1</sup>, LU Feng-Lai<sup>1</sup>, SONG Yun-Fei<sup>2</sup>,  
LI Yuan-Yuan<sup>2</sup>, LI Dian-Peng<sup>1\*</sup>(1. *Guangxi Key Laboratory for Functional Phytochemicals Research and Utilization, Guangxi Institute of Botany, Guilin 541006, China*; 2. *Guilin LAYN Natural Ingredients Corp., Guilin 541199, China*)

**Abstract:** Mogroside II is a bitter mogroside and the main saponin component of unripe *Siraitia grosvenorii* (Luohan-guo) fruit. Due to the existence of bitter mogroside, there are numerous bitter fruits (growth arrest) which are discarded on the branches in the late harvest season. The only difference between bitter and sweet mogrosides on the molecular structure is the number of glucose groups. Therefore, it can be achieved the purpose of improving the taste of bitter mogroside by introducing new glucose residues on its chemical structure. In this paper, glycosyltransferase enzyme-catalyzed reaction was applied to extend the sugar chains of bitter mogroside II. The optimum reaction conditions were determined to be more than 50% purity mogroside II, 2 times of starch in weight, 60 U·g<sup>-1</sup> enzyme according to mogroside II in weight, 60—65 °C reaction temperature, and 24 hours reaction time. Based on above reation condtions, bitter *S. grosvenorii* fruits were collected and used to confirm feasibility of this method. The resul-

收稿日期: 2014-11-06 修回日期: 2015-05-15

基金项目: 国家自然科学基金(81160518); 桂林市科技攻关项目(20120105-6, 2110112-16, 20120118-6); 广西植物功能物质研究与利用重点实验室项目(ZRJJ2012-7, ZRJJ2013-5)。

作者简介: 王磊(1983-), 男, 广西柳州人, 博士, 助理研究员, 研究方向为天然产物修饰, (E-mail) ww8304@163.com。

\*通讯作者: 李典鹏, 博士, 研究员, 研究方向为植物化学及药物化学, (E-mail) phytoldp@hotmail.com。

ted product was no longer bitter but slightly sweet, By HPLC-MS detection, the components of the final mixture were determined to be saponins containing 3–6 sugars. This method can improve the taste of mogroside II, and it is a potential approach to utilize resources of abandoned mogroside II in industrial production and bitter *S. grosvenorii* fruit in agriculture.

**Key words:** mogroside; gluconeogenesis; application of enzymes

罗汉果皂苷具有诸多保健功效,已有的研究指出罗汉果皂苷或其苷元具有抗氧化、防癌及降血糖等功效(Shi *et al.*, 2014; Di *et al.*, 2011; Murata *et al.*, 2010; Zou *et al.*, 2015; Jin *et al.*, 2012; Chiu *et al.*, 2013)。罗汉果皂苷是一类葫芦烷型的四环三萜皂苷,目前已从罗汉果中提取出 20 多种不同的皂苷成分,它们的区别主要是苷元 3 位和 24 位连接的葡萄糖链不同。考察罗汉果皂苷的结构与味觉的关系可以发现,其口味的苦与甜是由苷元所连接的葡萄糖残基数目所决定的,而糖链上葡萄糖残基相互连接的不同位置只能改变皂苷的相对甜度。苷元本身是苦味的,而苷元的 3 位和 24 位连接的葡萄糖残基总数为 1~3 个时是苦味的(苦苷),连接 4~6 个葡萄糖的皂苷则都是强甜味的(甜苷),从罗汉果中提取作为甜味剂使用的罗汉果总皂苷正是这部份含有 4~6 个葡萄糖的皂苷的混合物(Li *et al.*, 2007; Jia *et al.*, 2009; Murata *et al.*, 2006; Xia *et al.*, 2008)。其中尤其以罗汉果皂苷 V 含量最高,一般为总量的 30%~40%,因而使其成为衡量罗汉果品质的标准(苏小建等, 2008)。

在罗汉果皂苷生产中不可避免地会有少量含葡萄糖残基较少的苦味皂苷产生,并被做为废弃物遗弃,同时受天气及植株营养消耗等因素影响每年采收季末会有大量罗汉果无法成熟,成为所谓的滞长果或苦果,这部份果实含有大量以罗汉果皂苷 II<sub>E</sub> 为主的苦味皂苷。为了解决罗汉果生产中的苦果问题,目前主要是从新品种培育和田间管理入手,希望能减少苦果和落果产生,但这并不能从根本上解决问题,因为苦苷是罗汉果自身生物合成甜苷过程中所必须经历的一个阶段。因此需要适当转变研究思路,探索新的方法,如果能够直接将苦苷作为资源利用起来,将会从根本上解决苦果和苦苷的问题。

## 1 实验部分

### 1.1 材料及试剂

罗汉果(青皮果)均采自永福县龙江乡,所用乙腈、甲醇为色谱纯,其它试剂均为分析纯,环糊精葡

糖基转移酶购自阿玛诺天野酶制剂公司。

### 1.2 仪器及测试条件

HPLC 使用仪器为 Agilent 1200 分析型高效液相色谱仪。色谱条件:色谱柱为 ZORBAX SBC18 柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm);柱温 30 °C;流动相为水-乙腈(梯度洗脱 0~25 min, 13.5%~35% 乙腈);检测时间 25 min;流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>;检测波长 203 nm;进样量 10 μL。LC-MS 使用的仪器为 Agilent 1100 LC/MSD 液质联用仪,色谱条件同上。核磁共振试验使用 Bruker Avance III 500 MHz 核磁共振波谱仪。

## 2 制备方法

### 2.1 苦味皂苷的制备

取罗汉果苦果或落地果,破碎,加水或加 45%~55% 体积的乙醇提取,提取液过大孔树脂柱层析,水洗树脂柱至流出液无色,用 70%~90% 体积的乙醇洗脱,洗脱液回收乙醇,干燥,得罗汉果苦味皂苷。

### 2.2 反应条件

取罗汉果苦味皂苷溶于水中,加入罗汉果苦味皂苷重量 1~4 倍的淀粉,按 40~60 U·g<sup>-1</sup> 罗汉果苦味皂苷的量加入环糊精葡萄糖基转移酶,在 60~65 °C 条件下酶催化反应至完全,灭酶活,反应液过滤,收集滤液;所得滤液直接过大孔树脂柱或反相硅胶柱层析,水洗,乙醇梯度洗脱,收集 30%~40% 体积的乙醇洗脱液;将收集的这些乙醇洗脱液或流出液浓缩、干燥,得罗汉果甜味皂苷混合物。

### 2.3 罗汉果皂苷含量测试

样品溶液的配制:准确称取样品粉末 0.1 g,置于 100 mL 具磨口塞锥形瓶中,精确加入 25 mL 甲醇,摇匀,称定重量;超声处理 1 h,冷却,再重新称重,甲醇补足损失的重量;摇匀,以 0.45 μm 微孔滤膜过滤,滤液作为供试品溶液。

标准溶液的配制:分别精确称取罗汉果苷对照品 5 mg,置于 5 mL 的容量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,即得 1 mg·mL<sup>-1</sup> 标准溶液。

HPLC 的条件同 1.2, 采用标准曲线法, 计算罗汉果的皂苷含量。

### 3 结果与分析

#### 3.1 原料要求

环糊精葡萄糖基转移酶催化淀粉水解并将葡萄糖残基转移至罗汉果苦味皂苷上是一个竞争性的反应, 理论上化合物中只要含有羟基就有可能成为潜在的葡萄糖受体。但是, 通过对实际样品多次不同条件下反应所获得的产物进行<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR 及 HSQC 核磁试验, 发现罗汉果皂苷元部分的 3 个羟基始终没有参与反应, 新生成的葡萄糖基团均处在原皂苷的糖链部分, 也就是说葡萄糖链更适合成为反应的受体。因而在准备原料苦味皂苷时只需考虑果实中的多糖、寡糖和其他带糖的苷类物质的影响。通过研究我们发现使用大孔树脂直接处理果实的水提液, 富集皂苷即可除掉大部分干扰物。

在酶催化下底物淀粉同时发生水解、分子内糖转移和分子间糖转移等多种反应, 因而在多种反应竞争情况下必需尽量提高原料苦味皂苷含量才能保证反应的产率。通过 HPLC 检测反应中罗汉果皂苷 II<sub>E</sub> 的减少情况 (表 1), 可发现随着原料纯度提高, 反应物减少越多。经大孔树脂处理过的罗汉果皂苷 II<sub>E</sub> 原料中残余的杂质主要是以黄酮(苷)为主的一些小分子化合物, 因而必需保证反应物中罗汉果皂苷 II<sub>E</sub> 的含量达到 50% 才能获得较好的收率。

表 1 不同纯度罗汉果皂苷 II<sub>E</sub> 反应 24 h 后的剩余情况

Table 1 Remaining amount of mogroside II<sub>E</sub> after 24 h by using different purity reactants

项目 Item	皂苷 II <sub>E</sub> 含量 Content of mogroside II <sub>E</sub> (%)				
	23	36	50	67	93
反应前 Before reaction	23	36	50	67	93
反应后 After reaction	11	10	7	8	8
相对减少量 Relative reduction	52	72	86	88	91

注: 反应条件为 2 倍重量的淀粉, 60 U · g<sup>-1</sup> 罗汉果苦味皂苷的酶, 60 °C。

Note: Reaction conditions are 2 times of the starch (weight), 60 U · g<sup>-1</sup> enzyme (by the weight of mogroside), 60 °C.

#### 3.2 淀粉的选择和用量

做为反应的底物和糖源, 淀粉的选择十分重要, 通过 HPLC 检测罗汉果皂苷 II<sub>E</sub> 的消耗量, 对比测试了包括水溶性淀粉、土豆淀粉、糊精、玉米淀粉等多种来源的淀粉 (表 2)。由表 2 可知, 不同的淀粉

对反应的影响并不大, 虽然反应初始阶段各种淀粉的速率略有不同, 但最终都能使 90 % 左右的罗汉果皂苷 II<sub>E</sub> 发生反应。

表 2 不同淀粉作为糖源对罗汉果皂苷 II<sub>E</sub> 消耗情况的影响

Table 2 Remaining amount of mogroside II<sub>E</sub> by using different amounts starchs

反应时间 Reaction time (h)	水溶性淀粉 Water-soluble starch	土豆淀粉 Potato starch	糊精 Dextrin	玉米淀粉 Corn starch
3	0.63	0.47	0.55	0.46
12	0.91	0.89	0.90	0.87
24	0.93	0.90	0.91	0.89

注: 反应液中减少的罗汉果皂苷 II<sub>E</sub> 的量与反应前的比值; 反应条件为含量 93 % 的罗汉果皂苷 II<sub>E</sub>、2 倍重量的淀粉, 60 U · g<sup>-1</sup> 罗汉果苦味皂苷的酶, 60 °C。下同。

Note: Ratio between reduction amount and the original amount of mogroside II<sub>E</sub>; Reaction conditions are content of mogroside II<sub>E</sub> is 93 %, 2 times the weight of starch, 60 U · g<sup>-1</sup> enzyme (by the weight of mogroside), 60 °C. The same below.

当固定使用水溶性淀粉为底物考察不同淀粉用量对反应的影响时, 发现淀粉的用量会对反应造成很大影响。由表 3 可知, 当加入的淀粉为罗汉果皂苷 II<sub>E</sub> 质量的 2~4 倍时反应率最高, 过多或过少的淀粉都会影响糖基向罗汉果皂苷 II<sub>E</sub> 的转移反应。

表 3 淀粉用量对罗汉果皂苷 II<sub>E</sub> 消耗情况的影响

Table 3 Remaining amount of mogroside II<sub>E</sub> by using different amounts of starch

反应时间 Reaction time (h)	1 倍量 1 time	2 倍量 2 times	4 倍量 4 times	6 倍量 6 times	8 倍量 8 times
	3	0.55	0.64	0.62	0.51
12	0.77	0.89	0.90	0.68	0.61
24	0.85	0.91	0.90	0.77	0.69

表 4 反应温度对罗汉果皂苷 II<sub>E</sub> 消耗情况的影响

Table 4 Remaining amount of mogroside II<sub>E</sub> by using different temperature

反应时间 Reaction time (h)	反应温度 Reaction temperature (°C)						
	40	45	50	55	60	65	70
3	0.39	0.37	0.35	0.42	0.63	0.67	0.64
12	0.66	0.65	0.68	0.83	0.92	0.92	0.86

#### 3.3 反应温度

酶催化反应受温度的影响很大, 如表 4 所示, 随着反应温度的提高反应速率明显加快, 尤其在 60~65 °C 范围内罗汉果皂苷 II<sub>E</sub> 的消耗速度最快, 而更高的温度则会影响酶的稳定性, 所以 70 °C 时反应速率反而下降。因此反应最佳温度为 60~65 °C。

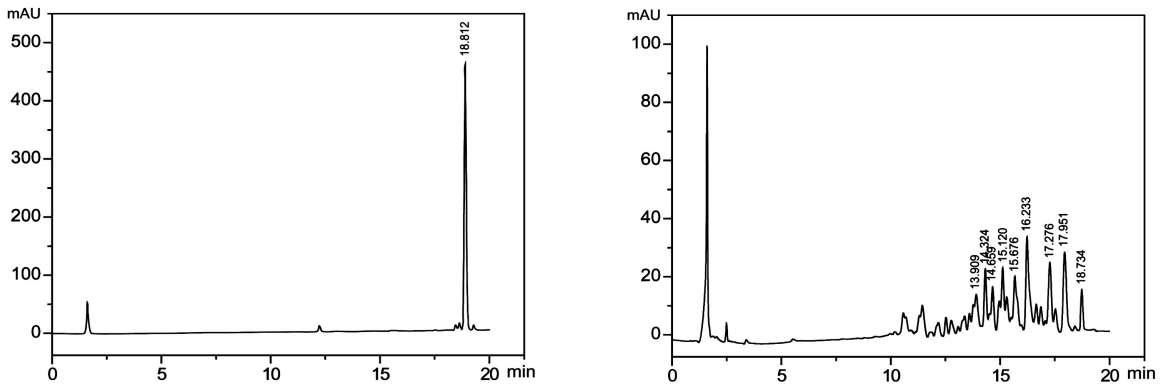


图 1 酶催化反应前(上)后(下)的高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC spectra of enzymatic reaction (upper: before reaction, lower: after reaction)

### 3.4 反应条件验证和产物的鉴定

确定反应最佳条件后,我们用收集的罗汉果苦果实际样品进行验证。将 100 个罗汉果苦果(未成熟的滞长果,重约 3 kg)打碎、水提、大孔树脂 D<sub>101</sub> 及 D<sub>900</sub> 分别精制后获得罗汉果皂苷 63 g(罗汉果皂苷 II 含量 67%),将此原料置于如下条件反应:皂苷重量 2 倍的水溶性淀粉,60 U·g<sup>-1</sup> 罗汉果皂苷的环糊精葡萄糖基转移酶,60~65 °C 下搅拌反应 29 h。产物经大孔树脂 D101 吸附后的洗脱液浓缩干燥得淡黄色固体 59 g,经 HPLC-ESIMS 鉴定,产物中除少量未反应的罗汉果皂苷 II<sub>E</sub> 外,生成了大量 3~6 个糖的皂苷,其液相色谱图见图 1。由图 1 可以看出,13~18 min 的色谱峰均为罗汉果皂苷 II<sub>E</sub> 增加葡萄糖的产物,其中部分含量较高的色谱峰在图中标出:罗汉果皂苷 II<sub>E</sub> (HPLC:18.734 min,MS:799.7)、三糖苷(HPLC:17.951,17.276 min,MS:961.8)、四糖苷(HPLC:16.233, 15.676 min,MS:1124.0)、五糖苷(HPLC:15.120, 14.659, 14.324, 13.909 min,MS:1286.1)。作为糖基受体的罗汉果皂苷 II<sub>E</sub> 的 3-和 24-的葡萄糖上各有 4 个游离的羟基,因而存在众多可能的反应产物,因此在色谱图上显示出了极其复杂的产物,其具体的化学结构仍需继续研究。

综上所述,利用酶催化糖基化反应处理罗汉果苦味皂苷是一种可行的方法,利用该方法制备的罗汉果皂苷可以完全消除苦味,并且带有淡淡的甜味,虽然无法与天然罗汉果皂苷 V 相比,但它仍保留与天然皂苷相同的化学结构特征,提供了一种低甜度的选择,对于罗汉果提取行业中脱苦工艺产生的苦味皂苷废弃物,以及农业生产上不能自然成熟的罗汉果苦果问题都是较好的解决办法。

### 参考文献:

- Chiu CH, Wang R, Lee CC, *et al.* 2013. Biotransformation of mogrosides from *Siraitia grosvenorii* Swingle by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *J Argic Food Chem*, **61**(29): 7 127-7 134
- Di R, Huang MT, Ho CT. 2011. Anti-inflammatory activities of mogrosides from *Momordica grosvenori* in murine macrophages and a murine ear edema model [J]. *J Argic Food Chem*, **59**(13): 7 474-7 481
- Jia Z, Yang X. 2009. A minor, sweet cucurbitane glycoside from *Siraitia grosvenorii* [J]. *Nat Prod Commun*, **4**(6): 769-772
- Li DP, Ikeda T, Nohara T, *et al.* 2007. Cucurbitane glycosides from unripe fruits of *Siraitia grosvenorii* [J]. *Chem Pharm Bull*, **55**(7): 1 082-1 086
- Murata Y, Ogawa T, Suzuki Y, *et al.* 2010. Digestion and absorption of *Siraitia grosvenorii* triterpenoids in the Rat [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, **74**(3): 673-676
- Murata Y, Yoshikawa S, Suzuki Y, *et al.* 2006. Sweetness characteristics of the triterpene glycosides in *Siraitia grosvenorii* [J]. *J Jpn Soc Food Sci Technol*, **53**(10): 527-533
- Shi DF, Zheng MZ, Wang YM, *et al.* 2014. Protective effects and mechanisms of mogroside V on LPS-induced acute lung injury in mice [J]. *Pharm Biol*, **52**(6): 729-734
- Su XJ (苏小建), Huang LJ (黄丽娅), Liang QD (梁琼丹), *et al.* 2008. The content distributing of mogroside V and its relations with fruit density and water-soluble matter (罗汉果甜甙 V 含量分布及与果实密度和水溶物含量关系) [J]. *Food Res Dev* (食品研究与开发), **29**(7): 13-16
- Jin J, Lee J. 2012. Phytochemical and pharmacological aspects of *Siraitia grosvenorii*, *luo han kuo* [J]. *Orient Pharm Exp Med*, (12): 233-239
- Toshihiro A, Yosuke H, Harukuni T, *et al.* 2007. Cucurbitane glycosides from the fruits of *Siraitia grosvenorii* and their inhibitory effects on Epstein-Barr virus activation [J]. *J Nat Prod*, **70**(5): 783-788
- Xia Y, Rivero-Huguet ME, Hughes BH, *et al.* 2008. Isolation of the sweet components from *Siraitia grosvenorii* [J]. *Food Chem*, **107**(3): 1 022-1 028
- Zou J, Wang C, Liu Y, *et al.* 2015. Antioxidant activity of mogroside extract of *Siraitia grosvenorii* fruits [J]. *Food Sci Technol*, **40**(3): 225-231