

何亚妹, 刘振杨, 郑婉, 等. 环糊精葡萄糖基转移酶合成 AA-2G 反应条件初探 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(15): 203–212. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022090140

HE Yamei, LIU Zhenyang, ZHENG Wan, et al. Preliminary Study of Reaction Conditions for the Synthesis of AA-2G by Cyclodextrin Glucosyltransferase[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(15): 203–212. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022090140

· 工艺技术 ·

环糊精葡萄糖基转移酶合成 AA-2G 反应条件初探

何亚妹, 刘振杨, 郑婉, 苏瑞阳, 吴华伟*
(长江大学生命科学学院, 湖北荆州 434025)

摘要: 为了探究重组菌株 pET-28a(+)-cgt-T1/BL21 (DE3) 产生的环糊精葡萄糖基转移酶 (Cyclodextrin glucosyltransferase, CGTase) 催化合成 2-O- α -D-吡喃葡萄糖基-L-抗坏血酸 (Ascorbic acid 2-glucoside, AA-2G) 的效果, 用 LB 发酵培养基表达重组蛋白 CGTase-T1, 经亲和和纯化柱纯化并浓缩后, 测定其 β -环化活性和歧化活性。以维生素 C (Vitamin C, V_C) 和 β -环糊精为底物, 酶法合成 AA-2G, 并通过单因素优化实验, 进一步探究了不同糖基供体、底物浓度、pH、温度、底物比例、蛋白浓度以及反应时间对 AA-2G 产量的影响, 对酶合成 AA-2G 的动力学进行了分析。结果表明: 此酶具有合成 AA-2G 的能力, 未优化前 AA-2G 的产量为 0.67 g/L。优化后, 考虑到低成本和经济效益, 选择可溶性淀粉和麦芽糊精为糖基供体, 当糖基供体为可溶性淀粉时, 底物浓度为 70 g/L, 反应 pH4.5, 反应温度 37 $^{\circ}$ C, 底物比例 3/3 (V_C /糖基供体), 蛋白浓度 5.0 mg/mL, 反应时间为 42 h 时, 该重组 CGTase 催化合成 AA-2G 的产量最高能达到 12.68 g/L; 当糖基供体为麦芽糊精时, 底物浓度为 30 g/L, 反应 pH5.0, 反应温度 37 $^{\circ}$ C, 底物比例 4/2, 蛋白浓度 5.0 mg/mL, 反应时间为 30 h 时, 该重组 CGTase 催化合成 AA-2G 的产量最高能达到 4.96 g/L。在最适条件下, AA-2G 的产量分别是未优化反应条件下的 18.93 倍和 7.40 倍。经动力学分析发现可溶性淀粉作为糖基供体的催化效率高于麦芽糊精, 因此, 可溶性淀粉作为糖基供体比麦芽糊精更具有优势, 合成得到 AA-2G 的产量更高。本研究成功将重组 CGTase-T1 用于 AA-2G 的合成, 通过优化酶法合成的反应条件, 使 AA-2G 的产量得到了大幅提高, 为实现 AA-2G 的工业生产提供参考意义。

关键词: 环糊精葡萄糖基转移酶, 2-O- α -D-吡喃葡萄糖基-L-抗坏血酸, 生物酶法, β -环化活性, 歧化活性

中图分类号: Q814.9

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2023)15-0203-10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022090140

本文网刊:



Preliminary Study of Reaction Conditions for the Synthesis of AA-2G by Cyclodextrin Glucosyltransferase

HE Yamei, LIU Zhenyang, ZHENG Wan, SU Ruiyang, WU Huawei*

(College of Life Sciences, Yangtze University, Jingzhou 434025, China)

Abstract: To investigate the effect of cyclodextrin glucosyltransferase (CGTase) produced by the recombinant strain pET-28a(+)-cgt-T1/BL21 (DE3) on the synthesis of 2-O- α -D-glucoside (AA-2G), the recombinant protein CGTase-T1 was expressed in the fermentation medium LB, purified by affinity chromatography and concentrated, followed by the determination of β -cyclization and disproportionation activity. AA-2G was synthesized using vitamin C and β -cyclodextrin as substrates. The effects of different glycan donors, substrate concentration, pH, temperature, substrate ratio, protein concentration and reaction time on AA-2G yield were further explored by single-factor optimization experiments, and the kinetics of CGTase were also analyzed. The results showed that CGTase could synthesize AA-2G, and the yield of AA-2G was 0.67 g/L before optimization of reaction conditions. Considering low cost and economic benefits, soluble starch and maltodextrin were selected as sugar donors in reaction condition optimization. When soluble starch was used as glycan

收稿日期: 2022-09-15

作者简介: 何亚妹 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 酶工程, E-mail: hym1788nacy@163.com。

* 通信作者: 吴华伟 (1977-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 酶工程, E-mail: wuhuawei-2000@163.com。

donor, the yield of AA-2G catalyzed by the recombinant CGTase could reach up to 12.68 g/L under the condition as follows: The concentration of soluble starch at 70 g/L, the amount of V_C : glycosyl at 3:3, CGTase-T1 used at 5.0 mg/mL, pH4.5 at 37 °C for 42 h reaction. While maltodextrin was used as glycan donor, the yield of AA-2G catalyzed by the recombinant CGTase could reach up to 4.96 g/L under the condition as follows: the concentration of soluble starch at 30 g/L, the amount of V_C : glycosyl at 4:2, CGTase-T1 used at 5.0 mg/mL, pH5.0 at 37 °C for 30 h reaction. Under the optimal conditions, the yield of AA-2G was 18.93 times and 7.40 times higher than those of the unoptimized reaction conditions respectively. Through the kinetic analysis of CGTase-T1, it was found that the catalytic efficiency of soluble starch as sugar donor was higher than that of maltodextrin. Therefore, soluble starch as sugar donor was better than maltodextrin, resulting in a higher yield of AA-2G synthesis. In this study, the recombinant CGTase-T1 was successfully applied in the synthesis of AA-2G. By optimizing the reaction conditions of enzymatic catalysis, the output of AA-2G was greatly increased, providing a reference for the industrial production of AA-2G.

Key words: cyclodextrin glucosyltransferase; 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid; biological enzyme method; β -cyclization activity; disproportionation activity

维生素 C(Vitamin C, V_C)广泛存在于水果蔬菜中,是人类和少数生物体内不可或缺的营养元素。它能保护人体免受氧化剂伤害、预防疾病和治疗坏血病等^[1]。但 V_C 在氧气、pH、金属和热量中容易降解,难以长期保存^[2],故限制了其他领域的应用。为改善 V_C 的稳定性,许多 V_C 衍生物被相继合成,如 V_C 金属盐, V_C 脂类和 V_C 糖苷类等^[3]。其中 V_C 糖苷类是对 V_C 的 C2、C3、C5 和 C6 原子上进行糖基化修饰后获得的 V_C 衍生物^[4]。2-O- α -D-吡喃葡萄糖基-L-抗坏血酸(Ascorbic acid 2-glucoside, AA-2G)是 V_C 的 C2 原子上连接了一个吡喃葡萄糖苷而形成的衍生物,在所有的 V_C 糖苷类衍生物之中,以 AA-2G 的药理学研究最多,应用也十分广阔,因为 AA-2G 是最理想的 V_C 衍生物,是 V_C 最好的替代品^[5],市场需求量较大。它除了具有与 V_C 相同的活性外^[6],还具有良好的稳定性和安全性,优异的抗氧化性,容易被人体吸收,可用于化妆品、医药、食品等领域^[7],具有巨大的开发价值。

目前,AA-2G 的合成以生物酶法为主,与化学法相比生物法更高效,反应条件温和,可用于连续生产,更适合工业化生产^[8]。用于合成 AA-2G 的酶有 α -葡萄糖苷酶^[9]、环糊精葡萄糖基转移酶^[10](Cyclodextrin glucosyltransferase, CGTase)、淀粉酶^[11]、蔗糖磷酸化酶^[12]和 α -异麦芽糖基葡萄糖形成酶^[13]。其中,CGTase 是一种多功能酶,且作为一种工业用酶,因其具有底物特异性高和转化率高等优点,被认为是合成 AA-2G 最高效的酶,是催化合成 AA-2G 的酶中应用最广、研究最多的一种酶,已被广泛用于 AA-2G 工业生产^[14]。其合成原理是将糖基供体的糖苷键转移至糖基受体的 C2 位点上生成中间产物 AA-2Gn($n \leq 6$),然后添加糖化酶水解混合物产生 AA-2G 和其他副产物^[15]。CGTase 能将多种糖基供体用于 AA-2G 的合成,但产量受糖基供体的影响较大^[16]。目前 CGTase 催化合成 AA-2G 存在转化率低、酶产量低等问题,导致 AA-2G 的生产成本高,限制了其广泛应用^[17]。所以优化 AA-2G 的合成是目前研究的热点,如利用分子伴侣共表达^[18],增加异源

蛋白的可溶性表达,从而提高合成产量;余磊等^[19]用全细胞催化方法生产 AA-2G,产量达到了 35.7 g/L;郭娇梅^[20]对 CGTase 进行固定化后制备 AA-2G,使酶可以重复利用并增强其稳定性;对 CGTase 进行分子改造^[21-26],提高酶的热稳定性和对底物的特异性,提高合成产物的特异性和产量;为了提高 AA-2G 作为抗氧化剂的有效性,Viola 等^[27]研究了 AA-2G 和辅助抗氧化剂的协同作用。此外,有研究表明环糊精为 AA-2G 合成的最优糖基供体^[28],但由于环糊精价格昂贵导致生产成本过高,不适于大规模的工业生产,故选择成本低的糖基供体对 AA-2G 的生产具有重要意义。

目前国内缺少可用于 AA-2G 工业化生产的酶,市场上的两种商品化 CGTase 仅由国外提供,价格十分昂贵,特别是在化妆品领域中,AA-2G 大部分来源于日本林原国际有限公司,占据垄断地位。因此需要挖掘和改造适合生产 AA-2G 的 CGTase,本实验室以前期构建的重组表达菌株为研究对象,首次将其用于 AA-2G 的合成,探究其合成效果,同时,对合成 AA-2G 的反应条件进行单因素优化,选择合适且成本低的糖基供体,确定最适的合成条件,以提高 AA-2G 的产量,为寻找合适的工业用酶,加快工业化生产提供参考意义。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

重组菌株 pET-28a(+)-cgt-T1/BL21(DE3) 为本实验室构建保存^[29];4,6-亚乙基-对硝基苯- α -D-麦芽七糖苷(4,6-Ethylidene-p-nitrobenzene- α -D-maltopeptide, EPS)、异丙基- β -D-硫代半乳糖糖苷(Isopropyl-beta-D-thiogalactoside, IPTG)、AA-2G 和 V_C 标准品 上海源叶生物科技有限公司;甲醇 色谱纯,美国 TEDDIA 公司; V_C 、可溶性淀粉和葡萄糖 国药集团化学试剂有限公司;考马斯亮蓝 R250、酚酞 天津天力化学试剂有限公司; α -环糊精(Cyclodextrin, α -CD)、 β -环糊精(Cyclodextrin, β -CD)、 γ -环糊精(Cyclodextrin, γ -CD) 梯希爱化成工业发展有限公司; α -葡萄糖苷酶、糖化酶(100 U/mg)、牛血清白蛋

白 北京索莱宝科技有限公司; 硫酸卡那霉素(Kanamycin sulfate, Kana)、麦芽糊精、麦芽糖 上海麦克林生化科技有限公司; 酵母提取物、胰蛋白酶 英国 OXOID 公司; 所用无机试剂和有机溶剂均为国产分析纯; LB 培养基: 酵母提取物 5.0 g, 胰蛋白酶 10.0 g, 氯化钠 10.0 g 溶解到 1 L 去离子水, 使用 NaOH 调节 pH 至 7.0~7.2, 121 °C 灭菌 20 min。

TE3102S, TE124S 电子分析天平 德国赛多利斯公司; MJ-54A 高压灭菌锅 美国施都凯公司; TU1900 紫外分光光度计 北京普析公司; IS-RDS3 恒温摇床 美国 Crystal 公司; SPX-250B-Z 生化培养箱 上海博迅实业有限公司; 5417R 超速冷冻离心机 德国 Fritsch 公司; SCIENTZ-IIID 超声波细胞粉碎机 宁波新芝生物科技股份有限公司; DYCZ-24DN 双垂直电泳槽、DYY-8C 型电泳仪电源 北京市六一仪器厂; Gel Doc EZ 凝胶图像仪 美国 BIO-RAD 公司; Ni-NTA His Bind Resin 亲和纯化柱 上海七海复泰生物科技有限公司; Millipore 超滤离心管 上海羽令过滤器材有限公司; PB-10 pH 计 德国赛多利斯公司; HH-4 水浴锅 金坛市杰瑞尔电器有限公司; X-30R 离心机 美国 Beckman 公司; Water e2695 HPLC 高效液相仪 美国 Water 公司; Enspire 酶标仪 铂金埃尔默企业管理(上海)有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 重组菌株诱导表达及粗酶纯化 在前期研究中确定了最佳诱导条件^[29], 把重组菌株接种至 30 mL 含终浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ Kana 的 LB 液体培养基中, 37 °C, 200 r/min 过夜培养, 然后按 1% 接种量转接至 1 L 含终浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ Kana 的 LB 液体培养基中, 当菌体浓度 OD_{600} 达到 0.80 时, 添加终浓度为 0.30 mmol/L 的 IPTG 溶液, 25 °C, 200 r/min 条件下, 培养 10 h。在 4 °C, 10000 r/min 离心 5 min, 用 0.01 mol/L PBS 缓冲液悬浮细胞, 得到菌悬液, 冰浴中超声破碎, 参数设置 75% 功率(总功率 500 W), 工作 3 s, 间歇 6 s, 总时长 35 min。4 °C, 10000 r/min 离心 15 min, 收集上清, 即为粗酶液。

使用 Ni-NTA His Bind Resin 亲和纯化柱, 参照七海生物产品说明书对粗酶液进行纯化。然后将目的蛋白流出液置于超滤离心管中, 4 °C, 5000 r/min, 离心 40 min, 进行除盐和蛋白浓缩, 得到纯化酶, 于 -20 °C 保存。用 SDS-PAGE 分析纯化酶, 使用 10% 的分离胶和 5% 的浓缩胶, 取适量纯化酶加入上样缓冲液, 混匀, 煮沸 10 min, 8000 r/min 离心 6 min, 取上清液 10 μL 上样, 5 μL Marker, 80 V 电泳 25 min, 调电压至 120 V, 电泳 1 h 左右, 然后将凝胶用考马斯亮蓝 R250 染色液染色, 再用脱色液脱色, 最后用凝胶图像仪观察结果。采用 Bradford 法^[30]测定纯化酶浓度, 用于后续比酶活的测定。

1.2.2 纯化酶 β -环化活性的测定 参考 Tesfai 等^[31]

的方法, 对其稍加修改, 测定其酶活与比酶活。取 0.10 mL 适当稀释的纯化酶液(0.01~0.03 mg/mL), 加入 1.00 mL 的 4%(w/v)淀粉溶液(使用 pH6.0 的 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液配置), 混匀, 65 °C 水浴反应 10 min, 加入 3.50 mL 30 mmol/L NaOH 溶液终止反应, 再向混合物中加入 0.50 mL 0.02%(w/v)酚酞溶液, 室温静置 15 min, 550 nm 处测量吸光度。以蒸馏水为空白调零, 灭活酶液为对照。一个酶活单位(U)的定义为上述条件下每分钟生成 1 μmol β -环糊精的酶量。

1.2.3 纯化酶歧化活性的测定 参考 Vanderveen 等^[32]的方法, 对其稍加修改, 测定其酶活与比酶活。取 1.00 mL 6 mmol/L 的 EPS 和 10 mmol/L 的麦芽糖(用 10 mmol/L pH6.0 磷酸盐缓冲液配制)的混合底物, 65 °C 预热 10 min 后, 加入 0.10 mL 适当稀释的纯化酶液(0.01~0.03 mg/mL), 65 °C 反应 10 min, 取 0.10 mL 混合反应物, 加入 20 μL 1.20 mol/L 的 HCl 溶液(4 °C), 60 °C 孵育 10 min 失活, 再加入 20 μL 1.20 mol/L 的 NaOH 溶液中和后, 添加 60 μL α -葡萄糖苷酶(1 U, 使用 10 mmol/L pH7.0 磷酸缓冲液溶解), 37 °C 反应 1 h, 最后加入 1.00 mL 1 mol/L Na_2CO_3 溶液(调 pH 至 8 以上), 401 nm 测定吸光度。以蒸馏水为空白调零, 灭活酶液为对照。一个酶活单位(U)的定义为上述条件下每分钟转化 1 μmol EPS 的酶量。

1.2.4 AA-2G 的酶法合成 参考韩瑞枝^[33]的方法, 将纯化后的环糊精葡萄糖基转移酶用 10 mmol/L 乙酸-乙酸钠缓冲液(pH5.0)稀释到蛋白质浓度为 1.00 mg/mL, 以 5%(w/v)的纯化酶液加入底物终浓度均为 10 g/L 的 V_C 和 β -CD(糖基供体)的等比例(V_C /糖基供体)混合的底物中(底物溶液使用 10 mmol/L pH5.0 乙酸钠缓冲液配制, V_C 溶液使用 20% NaOH 溶液调 pH 至 5.0), 混合均匀, 反应 pH 为 5.0。将混合物置于 37 °C(反应温度)、黑暗、无氧的条件下恒温反应 24 h(反应时间)。最后将 10 U 糖化酶(使用与配制底物相同的缓冲液进行配制)加入到反应混合物中, 在 60 °C 的条件下静置 24 h, 使中间体 AA-2Gn(其中 n 是连接到 L-抗坏血酸的糖基的数目)水解, 最终得到 AA-2G。

1.2.5 AA-2G 的标准曲线及定性与定量检测 取 5.00 mg AA-2G 标准品用 pH2.5 的 0.01 mmol/L 磷酸缓冲液定容至 5 mL 容量瓶中, 配制成 1.00 g/L 的标准品溶液。再用标准品溶液和 pH2.5 的 0.01 mmol/L 磷酸缓冲液配制浓度分别为 0、0.025、0.05、0.10、0.20、0.40、0.60 和 0.80 g/L 的 AA-2G 溶液。采用 HPLC 色谱法检测 AA-2G^[33], 色谱柱: Inertsil ODS-3 C_{18} 柱(5 μm , 250 $\times$ 4.60 mm); 紫外检测波长: 238 nm; 流动相: 2% 的甲醇和 98% 0.01 mmol/L 磷酸缓冲液(85% 磷酸调 pH 至 2.5); 流速: 0.60 mL/min, 进样量: 10 μL ; 柱温: 25 °C。HPLC 图谱中 AA-2G 的峰

面积($\mu\text{V}\cdot\text{S}$)和浓度(g/L)成正比,以 AA-2G 的峰面积为纵坐标,AA-2G 浓度为横坐标,绘制标准曲线。得到标准曲线公式: $y=25901377x+24727$,回归系数 $R^2=0.9994$,可信度较高。

将反应结束后的反应混合物适当稀释,8000 r/min,离心 10 min,取上清液,并使用 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤,得到反应液样品,与 AA-2G 和 V_C 的标准品同时进行 HPLC 检测,参数同上。根据得到的色谱图数据,对比标准品与反应液样品出峰时间是否一致,对 AA-2G 进行定性分析;将反应液样品 AA-2G 的峰面积代入标准曲线公式,得出 AA-2G 的浓度,对 AA-2G 进行定量分析。

1.2.6 AA-2G 的酶法合成条件初探 各因素的实验水平设计均参考宋凯^[34]的方法,对其稍加修改。

1.2.6.1 糖基供体对反应的影响 将 AA-2G 酶法合成的糖基供体 β -CD 分别更换为 α -CD, β -CD, γ -CD, 可溶性淀粉,麦芽糊精,麦芽糖和葡萄糖,其他条件与 1.2.4 相同,反应产物使用 HPLC 色谱法检测 AA-2G 的含量。

1.2.6.2 底物浓度对反应的影响 将 AA-2G 酶法合成的底物终浓度分别更换为 10、30、50、70、90 和 110 g/L 的 V_C 和糖基供体(可溶性淀粉和麦芽糊精),其他条件与 1.2.4 相同,反应产物使用 HPLC 色谱法检测 AA-2G 的含量,计算 AA-2G 生成率。由于底物浓度不同,无法进行 AA-2G 含量的比较,故选用 AA-2G 生成率作为此优化因素的比较依据。

AA-2G 生成率计算公式:

$$A(\%) = \frac{c}{a} \times 100 \quad \text{式(1)}$$

式中: A: 不同底物浓度下 AA-2G 生成率,%; c: 对应条件下生成 AA-2G 的含量, g/L; a: 对应条件下底物 V_C 的含量, g/L。

1.2.6.3 pH 对反应的影响 在最适底物浓度下,将 AA-2G 酶法合成的反应 pH 分别更换为 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0(用 10 mmol/L 的乙酸-乙酸钠缓冲液配制底物溶液)6.0、6.5、7.0(用 0.01 mmol/L 磷酸缓冲液配制底物溶液),其他条件与 1.2.4 相同,反应产物使用 HPLC 色谱法检测 AA-2G 的含量。

1.2.6.4 温度对反应的影响 在最适底物浓度和 pH 下,将 AA-2G 酶法合成的反应温度分别更换为 23、30、37、44 和 51 $^{\circ}\text{C}$,其他条件与 1.2.4 相同,反应产物使用 HPLC 色谱法检测 AA-2G 的含量。

1.2.6.5 底物比例对反应的影响 在最适 pH 和温度下,将 AA-2G 酶法合成的底物比例(V_C /糖基供体)分别更换为 1/5、2/4、3/3、4/2、5/1,其他条件与 1.2.4 相同,反应产物使用 HPLC 色谱法检测 AA-2G 的含量。

1.2.6.6 蛋白浓度对反应的影响 在最适 pH, 温度和底物比例下,将 AA-2G 酶法合成的蛋白浓度分别更换为 1.0、5.0、10.0、15.0 和 20.0 mg/mL,其他条件与 1.2.4 相同,反应产物使用 HPLC 色谱法检测

AA-2G 的含量。

1.2.6.7 时间对反应的影响 在最适 pH, 温度, 底物比例和蛋白浓度下,将 AA-2G 酶法合成的反应时间分别更换为 0、6、12、18、24、30、36 和 42 h,其他条件与 1.2.4 相同,反应产物使用 HPLC 色谱法检测 AA-2G 的含量。

1.2.7 AA-2G 的酶法合成动力学分析 将糖基供体的不同底物浓度(2.0、4.0、8.0、16.0 g/L)进行固定,测定其不同浓度下 V_C (4.0、8.0、16.0、20.0、32.0 g/L)合成 AA-2G 的产量,在最适反应温度和 pH 下,反应 6 h,根据下面的公式^[33],计算出合成 AA-2G 的动力学参数。

乒乓反应机制:

$$V = \frac{V_{\max} \times a \times b}{K_{\text{mA}} \times b + K_{\text{mB}} \times a + a \times b} \quad \text{式(2)}$$

底物抑制反应机制:

$$V = \frac{V_{\max} \times a \times b}{K_{\text{mB}} \times a + K_{\text{mA}} \times b \times \frac{1+b}{K_{\text{IB}}} + a \times b} \quad \text{式(3)}$$

式中: V: 不同底物浓度下的反应速率(每毫克酶每小时催化生成 AA-2G 的量), g/L/mg/h; $V_{\max}$: 反应的最大速率, g/L/mg/h; a: 受体(V_C)的浓度, g/L; b: 糖基供体(麦芽糊精/可溶性淀粉)的浓度, g/L; K_{mA} : V_C 的亲合常数; K_{mB} : 糖基供体的亲合常数; K_{IB} : 底物糖基供体的抑制常数。

1.3 数据处理

酶活性测定实验每个反应重复 3 次,单因素优化实验每个反应设置 2 个平行,数据以平均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示。利用 Excel 2019 进行数据处理和绘图,利用 SPSS 19.0 软件进行数据统计分析,显著性水平 $P<0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 CGTase-T1 的纯化

CGTase-T1 经纯化和脱盐浓缩后,得到了分子量为 75 kDa 的单一一条带(图 1),与大多数 CGTase 的分

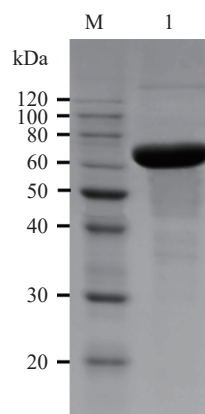


图 1 纯化 CGTase-T1 的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.1 SDS-PAGE electropherogram of purified CGTase-T1

注: M: 蛋白 marker; 1: 纯化的 CGTase-T1。

子量相符^[35], 说明得到了纯化的环糊精葡萄糖基转移酶。

2.2 酶活性测定

分别测定了纯化酶的 β -环化活性和歧化活性, 测得纯化酶的浓度为 7.368 mg/mL, 经计算得出其酶活与比酶活。如表 1 所示, β -环化反应的酶活性最高, 比酶活可达 1169.40 U/mg。大多数的 CGTase 以环化反应为主活性, 与本文结果相同, 可能是由于 CGTase 更喜欢吸附淀粉分子内部的 α -1,4 链, 然后转移新形成的寡聚糖的还原端到自身的非还原端, 产生 α -1,4 环^[36]。而且环化反应是 CGTase 的特征反应, 是一种分子内转糖基反应, 原理是将直链麦芽低聚糖上非还原末端的 O-4 或 C-4 转移到同一直链上还原末端的 C-1 或 O-1 上, 形成 6-8 个糖基的环状结构^[37]。

表 1 酶反应的环化和歧化反应的活性
Table 1 Activity of cyclization and disproportionation reactions of enzymatic reactions

酶活活性	酶活性(U)	比酶活(U/mg)
β -环化反应	2.62±0.33	1169.40±5.88
歧化反应	1.74±0.28	189.60±0.42

2.3 AA-2G 的定性与定量测定

使用 HPLC 色谱法分析 AA-2G 的含量, 由于 V_C 与 AA-2G 的结构相似度较高, 在 238 nm 处均有吸光度, 由图 2 所示, 反应样品 AA-2G 和 V_C 的出峰时间分别为 9.6 min 和 8.9 min, 与标准品的出峰时间一致, 表明 CGTase-T1 具有合成 AA-2G 的能力。

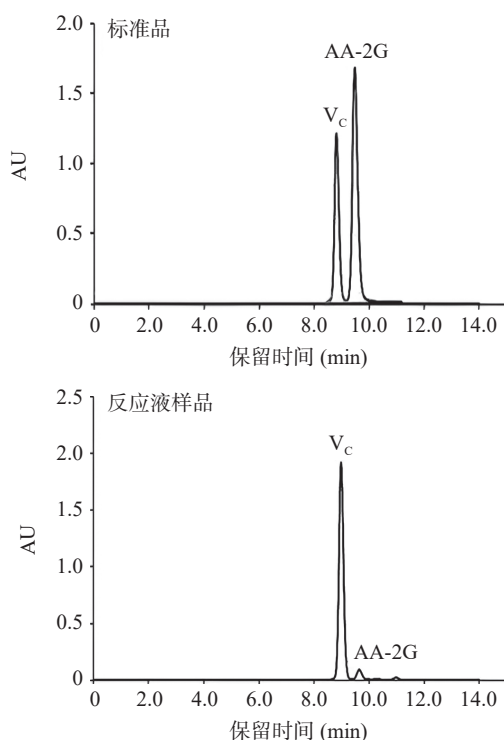


图 2 标准品和反应样品的 HPLC 图

Fig.2 HPLC profile of standard and reaction samples

根据 AA-2G 标准曲线, 计算所得反应样品中 AA-2G 含量为 0.67 g/L, 合成产量较低, 剩余大量的 V_C 未被消耗, 说明糖基受体 V_C 未得到来自糖基供体的糖苷键, 未生成大量中间体合成产物。据报道, 经反应条件优化后, 来源于 *Bacillus alkalophilus* 7-12^[38]、*Paenibacillus* sp.^[39]、*Bacillus* sp. SK 13.002^[40]、*Bacillus agaradhaerens* Y112^[41]、*Paenibacillus macerans* 154^[42]、*Anaerobranca gottschalkii*^[43]、*Bacillus circulans* 251^[43] 和 *Thermoanaerobacter* sp.^[44] 的 CGTase 合成产量分别为 0.095、2.98、5.50、10.60、17.50、28.90、35.70 和 143.00 g/L, 与大多用于合成 AA-2G 的 CGTase 相比, CGTase-T1 的合成产量较低, 所以对其反应条件进行优化, 探究其合成 AA-2G 的潜力。

2.4 AA-2G 酶法合成条件初探

2.4.1 糖基供体对反应的影响 CGTase 可与不同糖基供体生成 AA-2G, 故寻找合适的糖基供体可增加 AA-2G 的产量。由图 3 所示, 最适糖基供体为 α -CD, 其次为 γ -CD、可溶性淀粉和麦芽糊精。据报道, 可用于合成 AA-2G 的大多数 CGTase 的最适糖基供体为 α -CD, 它与 CGTase 有着较高的专一性, 致使其转化率高于其他糖基供体^[45], 而 γ -CD 虽然有较高的溶解度和较大的空腔能包接较大的分子^[36], 但当 α -CD 和 γ -CD 用于 AA-2G 合成时, 会导致生产成本过高, 不利于 AA-2G 的大规模工业生产。各组之间均存在显著性差异, 根据结果, 为降低生产成本, 故选用价格便宜的可溶性淀粉和麦芽糊精作为糖基供体, 用于后续实验。

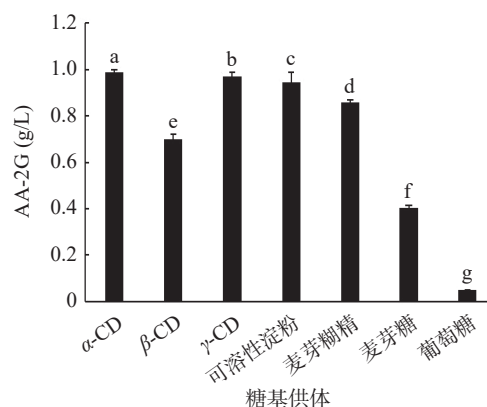


图 3 不同糖基供体对合成反应的影响

Fig.3 The effect of different glycosyl donors on the synthesis reaction

注: 图中不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

2.4.2 底物浓度对反应的影响 为考察底物浓度对 AA-2G 合成的影响, 选用了不同底物浓度用于 AA-2G 的合成。由图 4 所示, 当糖基供体为可溶性淀粉时, 最适底物浓度为 70 g/L, AA-2G 的生成率最高; 当糖基供体为麦芽糊精时, 最适底物浓度为 30 g/L, AA-2G 的生成率最高。同时, 发现在底物浓度过高, 如麦芽糊精的浓度超过 30 g/L 时, 会抑制 AA-2G 的合成, 导致 AA-2G 生成率下降, 可能与底物抑制反

应机制有关^[33]。各组之间只有可溶性淀粉作为糖基供体时, 110 g/L 组与 30、90 g/L 两组之间没有显著性差异, 根据结果, 最终选择可溶性淀粉反应的最适底物浓度为 70 g/L, 麦芽糊精反应的最适底物浓度为 30 g/L。

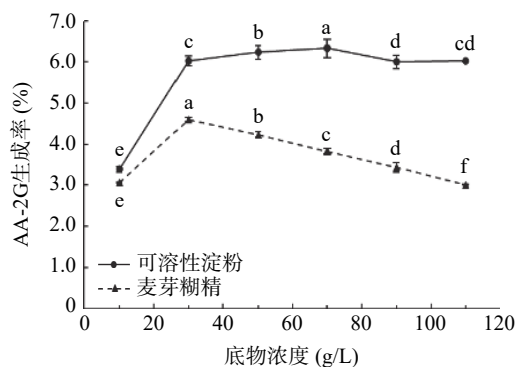


图4 不同底物浓度对合成反应的影响

Fig.4 Effects of different substrate concentrations on the synthesis reaction

注: 图中不同小写字母表示相同糖基供体在不同处理梯度下差异显著($P<0.05$); 图5~图9同。

2.4.3 pH 对反应的影响 为考察 pH 对 AA-2G 合成的影响, 选用了不同 pH 的缓冲液用于 AA-2G 的合成。由图 5 所示, 当可溶性淀粉为糖基供体时, 最适 pH 为 4.5, 当 pH 大于 4.5 之后, AA-2G 的产量近乎直线下降; 当麦芽糊精为糖基供体时, 最适 pH 为 5.0, 当 pH 大于 5.0 之后, AA-2G 的产量减少到与 pH 4.5 时基本相同。结果表明, 该酶是一种酸性 CGTase, 随着 pH 的增加, 对 AA-2G 的合成影响增大, 与宋凯^[34]的研究结果相一致。可能是 V_C 在高 pH 下不稳定^[17], 在不同 pH 条件下底物分子和酶分子的带电状态不同, 从而影响酶和底物的结合, 影响酶的稳定性^[46], 导致 AA-2G 的产量变低。各组之间均存在显著性差异, 根据结果, 最终选择可溶性淀粉的最适反应 pH 为 4.5, 麦芽糊精的最适反应 pH 为 5.0。

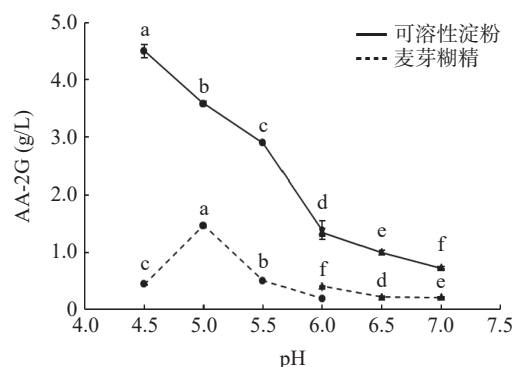


图5 不同 pH 对合成反应的影响

Fig.5 The effect of different pH on the synthesis reaction

注: ●: 乙酸钠缓冲液; ▲: 磷酸盐缓冲液。

2.4.4 温度对反应的影响 为考察温度对 AA-2G 合成的影响, 选用了不同温度用于 AA-2G 的合成。由图 6 所示, 当可溶性淀粉和麦芽糊精为糖基供体

时, 最适温度均为 37 °C。当温度低于 37 °C 时, AA-2G 产量随温度的上升而增加, 而当温度高于 37 °C 时, AA-2G 的产量明显下降。可能是温度过低不利于 CGTase 的活性反应, 而当温度过高时 V_C 会降解^[17], AA-2G 在高温时也会容易分解^[47], 均导致 AA-2G 产量降低。而单丽媛等^[48]以可溶性淀粉和 V_C 为底物, 其反应最适温度为 15 °C, 相比而言, 其最适温度较低, 可能是由于酶的来源不同, 在低温下其活性较高。各组之间均存在显著性差异, 根据结果, 最终选择可溶性淀粉和麦芽糊精的最适反应温度均为 37 °C。

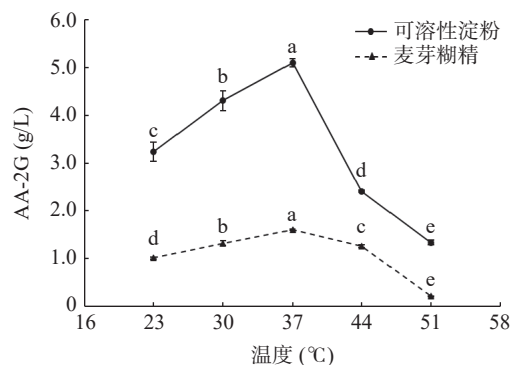


图6 不同温度对合成反应的影响

Fig.6 The effect of different temperatures on the synthesis reaction

2.4.5 底物比例对反应的影响 为考察底物比例对 AA-2G 合成的影响, 选用了不同底物比例用于 AA-2G 的合成。由图 7 所示, 当可溶性淀粉为糖基供体时, 最适底物比例为 3/3 (V_C /糖基供体, w/w), 为等比例; 当麦芽糊精为糖基供体时, 最适底物比例为 4/2 (V_C /糖基供体, w/w), 为倍比例。结果表明, 不同的糖基供体用于 AA-2G 合成时, 它们的底物比例会有所差异, 可能是因为酶对底物的特异性不同, 且底物比例过高或过低都容易造成低含量底物供应不足, 而不利 AA-2G 的合成, 与黄燕等^[49]对底物比例优化的结果一致。各组之间均存在显著性差异, 根据结果, 最终选择可溶性淀粉反应的最适底物比例为 3/3, 麦芽糊精反应的最适底物比例为 4/2。

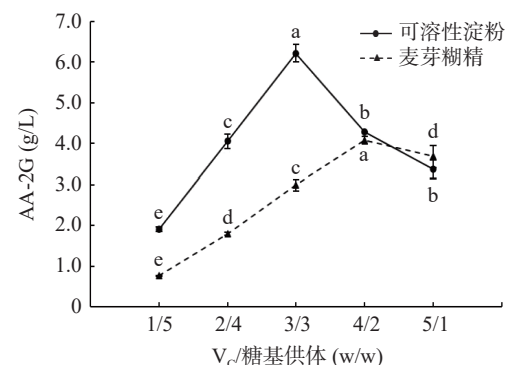


图7 不同底物比例对合成反应的影响

Fig.7 The effect of different substrate ratios on the synthesis reaction

2.4.6 蛋白浓度对反应的影响 为考察蛋白浓度对

AA-2G 合成的影响, 选用了不同蛋白浓度用于 AA-2G 的合成。由图 8 所示, 当可溶性淀粉和麦芽糊精为糖基供体时, 最适蛋白浓度均为 5.0 mg/mL。当蛋白浓度超过 5.0 mg/mL 时, AA-2G 的产量逐渐下降, 表明过高的蛋白浓度不利于 AA-2G 的合成。随着加酶量的增加, AA-2G 的产量并没有增加, 可能是因为 CGTase 是一种多功能酶, 可以催化 4 种反应, 其中歧化反应和耦合反应可以降解糖基供体产生小分子糖, 随着加酶量的增加, 这 2 种反应强度增强, 小分子糖增多, 而小分子糖的存在会使得该酶的耦合反应加剧, 使小分子糖无法与受体结合, 从而降低 AA-2G 的产量^[32]。各组之间均存在显著性差异, 根据结果, 最终选择可溶性淀粉和麦芽糊精反应的最适蛋白浓度均为 5.0 mg/mL。

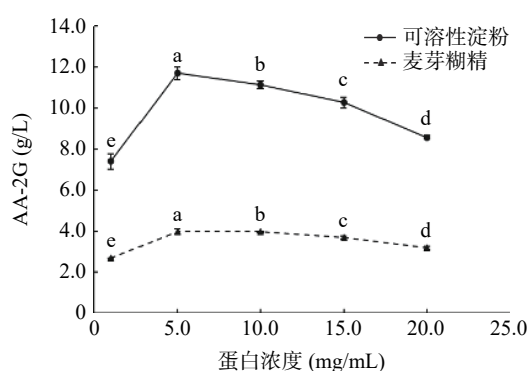


图 8 不同蛋白浓度对合成反应的影响

Fig.8 The effect of different protein concentrations on the synthesis reaction

2.4.7 时间对反应的影响 为考察时间对 AA-2G 合成的影响, 选用了不同的反应时间合成 AA-2G。由图 9 所示, AA-2G 的产量随着反应时间的增加而逐渐增加。当可溶性淀粉为糖基供体时, 反应 42 h 后 AA-2G 的产量达到最高 (12.68 g/L); 当麦芽糊精为糖基供体时, 反应 30 h 后 AA-2G 的产量达到最高 (4.96 g/L), 它们分别是未优化反应条件产量的 18.93 倍和 7.40 倍。在反应初期处于消耗底物的快速反应期, 6 h 后开始逐渐变得平缓, 反应后期随着底物和酶的消耗反应逐渐停止, 可溶性淀粉作为糖基供体时,

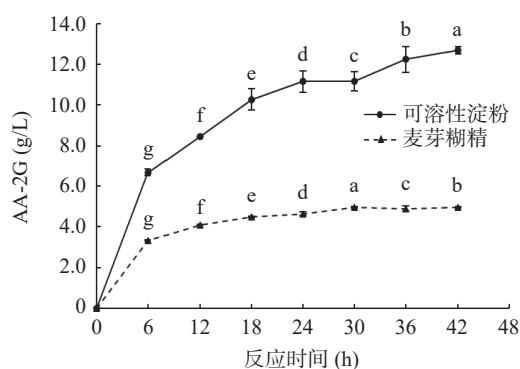


图 9 不同反应时间对合成反应的影响

Fig.9 The effect of different reaction times on the synthesis reaction

初始合成速度更快, 合成产量更高, 可能是由于不同糖基供体对酶的亲和力不同而影响了反应的快慢和合成的产量^[45], 而且较少的反应时间和较高的产量有利于降低生产成本, 提高反应效率。各组之间均存在显著性差异, 根据结果, 最终选择可溶性淀粉的最适反应时间为 42 h, 麦芽糊精的最适反应时间为 30 h。

2.5 AA-2G 的酶法合成动力学分析

为考察 CGTase-T1 合成 AA-2G 的动力学, 选用了不同浓度的底物用于 AA-2G 的合成。经数据拟合后, 得到 CGTase-T1 合成 AA-2G 反应的 Lineweaver-Burk 曲线 (图 10)。线性拟合结果符合底物抑制反应机制, 表明底物会对 AA-2G 的合成产生抑制作用。带入其公式中, 得到酶法合成 AA-2G 的动力学参数, 由表 2 所示, 可溶性淀粉的 K_{cat} 值高于麦芽糊精, 表明可溶性淀粉合成 AA-2G 反应中的催化效率较高, 致使其合成 AA-2G 的产量高于麦芽糊精。而且可溶性淀粉的 K_{mA} 高于麦芽糊精, 表明在不同糖基供体合成时, 酶对不同底物的特异性不同, 会影响 CGTase-T1 与底物的亲和力, 可能与底物作用力有关^[50], 故选用合适的糖基供体有利用 AA-2G 的产量的增加。

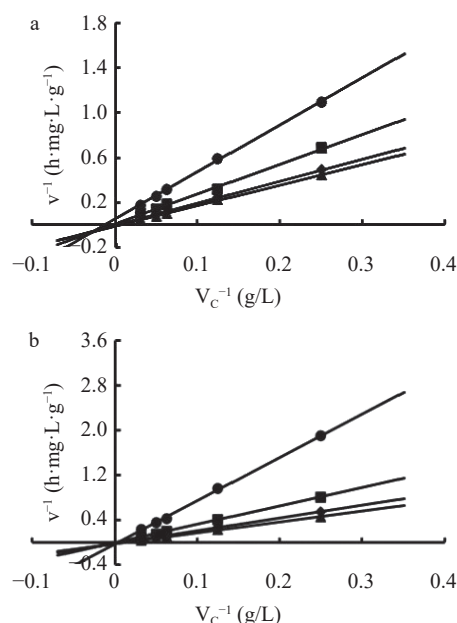


图 10 麦芽糊精(a)和可溶性淀粉(b)合成 AA-2G 反应的 Lineweaver-Burk 曲线

Fig.10 Lineweaver-Burk curve of maltodextrin (a) and soluble starch (b) synthesis of AA-2G

注: 糖基供体浓度 (g/L): ●: 2.0; ■: 4.0; ◆: 8.0; ▲: 16.0。

3 结论

本研究将异源表达的 CGTase-T1 用于合成 AA-2G, 经高效液相色谱法分析后, 得到含量为 0.67 g/L 的 AA-2G, 合成量较少。为增加 CGTase-T1 合成 AA-2G 的产量, 依次对糖基供体、底物浓度、反应 pH、反应温度、底物比例、蛋白浓度和反应时间进行了单因素优化。当糖基供体为可溶性淀粉时, AA-

表 2 动力学参数

Table 2 Kinetic parameters

底物	$V_{\max}$ (g/L/mg/h)	K_{cat} (1/h)	K_{mA} (g/L)	$K_{\text{cat}}/K_{\text{mA}}$	K_{mB} (g/L)	$K_{\text{cat}}/K_{\text{mB}}$	K_{IB} (g/L)
麦芽糊精	49.26±0.01	4678.20±0.01	182.78±0.03	25.59±0.01	6.94±0.05	674.48±0.01	26.85±0.02
可溶性淀粉	102.04±0.02	9690.50±0.04	629.47±0.01	15.39±0.01	1.91±0.01	5051.42±0.01	19.56±0.01

注: A: V_{C} ; B: 糖基供体(麦芽糊精或可溶性淀粉)。

2G 最优合成条件是: 底物浓度 70 g/L, 反应 pH4.5, 反应温度 37 ℃, 底物比例 3/3(V_{C} /糖基供体), 蛋白浓度 5.0 mg/mL, 反应时间 42 h; 当糖基供体为麦芽糊精时, AA-2G 最优合成条件是: 底物浓度 30 g/L, 反应 pH5.0, 反应温度 37 ℃, 底物比例 4/2, 蛋白浓度 5.0 mg/mL, 反应时间 30 h。在最适条件下, AA-2G 的最高产量分别为 12.68 g/L 和 4.96 g/L, 是未优化反应条件下的 18.93 倍和 7.40 倍。同时, 对其合成 AA-2G 的动力学分析进行分析, 发现糖基供体可溶性淀粉的催化效率高于麦芽糊精, 致使其 AA-2G 的产量较高, 表明此酶对可溶性淀粉的特异性优于麦芽糊精, 可溶性淀粉更适合作为此酶的糖基供体合成 AA-2G。

CGTase 是 AA-2G 工业生产中主要用酶, 但生产成本和转化率限制了大规模 AA-2G 的工业生产, 导致其价格昂贵。而本研究以可溶性淀粉和麦芽糊精作为 AA-2G 合成的底物, 降低了生产成本, 可为其 AA-2G 的工业化生产提供参考。但本研究仍存在蛋白可溶性表达量不足, 产物特异性差异大、底物转化率低、合成产量不足等问题, 后续可将 CGTase-T1 进行分子改造, 改善酶的稳定性和底物特异性, 进一步提高 AA-2G 的产量。

参考文献

- [1] 苏桂棋, 黄和林, 蒋娜, 等. 维生素 C 的作用及常见不良反应[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(8): 120-121, 125. [SU G Q, HUANG H L, JIANG N, et al. The role of vitamin C and common adverse reactions[J]. World Latest Medical Information Digest, 2019, 19(8): 120-121, 125.]
- [2] NAIDU K A. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview[J]. Nutrition Journal, 2003, 2(1): 7.
- [3] 饶建华, 韩璐, 张自萍. 维生素 C 糖苷类衍生物的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2012, 21(7): 761-766. [RAO J H, HAN L, ZHANG Z P. Research progress of vitamin C glycoside derivatives[J]. China Journal of New Drugs, 2012, 21(7): 761-766.]
- [4] HAN R, LIU L, LI J, et al. Functions, applications and production of 2-O-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 95(2): 313-320.
- [5] 李标, 唐双焱. 2-O- α -D-吡喃葡萄糖基抗坏血酸研究进展[J]. 广西科学, 2017, 24(1): 48-53. [LI B, TANG S Y. Research progress of 2-O- α -D-glucopyranosyl-ascorbic acid[J]. Guangxi Science, 2017, 24(1): 48-53.]
- [6] WAKAMIYA H, SUZUKI E, YAMAMOTO I, et al. Vitamin C activity of 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid in guinea pigs[J]. Journal of Nutritional Science & Vitaminology, 1992, 38(3): 235-245.
- [7] ZHANG W, HUANG Q, YANG R, et al. 2-O-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid: Properties, production, and potential applica-

tion as a substitute for L-ascorbic acid[J]. Journal of Functional Foods, 2021, 82(7): 104481.

[8] TOYODAONO Y, MAEDA M, NAKAO M, et al. 2-O-(beta-D-glucopyranosyl) ascorbic acid, a novel ascorbic acid analogue isolated from *Lycium* fruit[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(7): 2092-2096.

[9] YAMAMOTO I, MUTO N, NAGATA E, et al. Formation of a stable L-ascorbic acid alpha-glucoside by mammalian alpha-glucosidase-catalyzed transglucosylation[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1990, 1035(10): 44-50.

[10] TANAKA M. Characterization of *Bacillus stearothermophilus* cyclodextrin glucanotransferase in ascorbic acid 2-O-alpha-glucoside formation[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1991, 1078(2): 127-132.

[11] LEE S, LIM J, LEE J H, et al. Ascorbic acid 2-glucoside stably promotes the primitiveness of embryonic and mesenchymal stem cells through ten-eleven translocation and cAMP-responsive element-binding protein-1-dependent mechanisms[J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2004, 32(1): 35-59.

[12] GUDIMINCHI R K, NIDETZKY P. Walking a fine line with sucrose phosphorylase: efficient single-step biocatalytic production of 1-ascorbic acid 2-glucoside from sucrose[J]. ChemBiochem: a European Journal of Chemical Biology, 2017, 18(14): 1387-1390.

[13] MUKAI K, TSUSAKI K, KUBOTA M, et al. Process for producing 2-O-alpha-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid: Europe, EP20030741243[P]. 2003-07-07.

[14] 黄敏, 袁娟萍. 生物转化法生产 2-O- α -D-吡喃型葡萄糖基 L-抗坏血酸的研究进展[J]. 工业微生物, 2004(2): 41-44. [HUANG M, QIU J P. Advances in research of preparing 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid by biological transformation[J]. Industrial Microbiology, 2004(2): 41-44.]

[15] ZHANG Z, LI J, LIU L, et al. Enzymatic transformation of 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid by α -cyclodextrin glucanotransferase from recombinant *Escherichia coli*[J]. Biotechnology & Bioengineering, 2011, 16(1): 107-113.

[16] TAO X, SU L, WU J. Current studies on the enzymatic preparation 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid with cyclodextrin glycosyltransferase[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2018, 39(2): 1-9.

[17] 陶秀梅. *Bacillus stearothermophilus* NO2 环糊精葡萄糖基转移酶的分子改造及制备 AA-2G 的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2020. [TAO X M. Molecular modification of *Bacillus stearothermophilus* NO2 cyclodextrin glucosyltransferase and research on the preparation of AA-2G[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2020.]

[18] 李晓涵, 郝建华, 郭姣梅, 等. 环糊精葡萄糖基转移酶高效异源表达研究进展[J]. 微生物学通报, 2020, 47(2): 615-622. [LI X H, HAO J H, GUO J M, et al. Advance in high-level heterologous expression of cyclodextrin glucosyltransferase[J]. Bulletin of Microbiology, 2020, 47(2): 615-622.]

[19] 余磊, 李骥璇, 王忆茗, 等. 蔗糖磷酸化酶全细胞催化 AA-2G 的条件优化[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(14): 2601-2605.

- [YU L, LI J X, WANG Y M, et al. Optimization of whole-cell synthesis of AA-2G by sucrose phosphorylase[J]. *Advances in Modern Biomedicine*, 2017, 17(14): 2601–2605.]
- [20] 郭姣梅. 海洋环糊精葡萄糖基转移酶的固定化及其性能研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2020. [GUO J M. Study on immobilization of marine cyclodextrin glucosyltransferase and its properties[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020.]
- [21] 郑丹妮. *Bacillus* sp. FJAT-44876 γ -环糊精葡萄糖基转移酶的表达及热稳定性提升研究[D]. 无锡: 江南大学, 2020. [ZHENG D N. Characterization and thermostability improved of γ -CGTase from *Bacillus* sp. FJAT-44876[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2020.]
- [22] 王蕾. 环糊精葡萄糖基转移酶的产物特异性分子改造及发酵制备研究[D]. 无锡: 江南大学, 2018. [WANG L. Product specificity engineering and fermentation of cyclodextrin glucosyltransferase[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2018.]
- [23] 李晓涵, 郭姣梅, 宋凯等. *Bacillus* sp. Y112 环糊精葡萄糖基转移酶位点 R81 定点突变提高产物特异性[J]. *食品科学*, 2021, 42(10): 133–138. [LI X H, GUO J M, SONG K, et al. Improvement of the product specificity of *Bacillus* sp. Y112 cyclodextrin glucosyltransferase by site-directed mutagenesis of arginine 81[J]. *Food Science*, 2021, 42(10): 133–138.]
- [24] 左方圆. *Bacillus stearothermophilus* NO2 环糊精葡萄糖基转移酶的分子改造及制备 α -环糊精的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2022. [ZUO F Y. Molecular modification of *Bacillus stearothermophilus* NO2 cyclodextrin glucosyltransferase and preparation of α -cyclodextrin[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2022.]
- [25] 柴宝成. 分子改造环糊精葡萄糖基转移酶合成糖基化染料木素[D]. 无锡: 江南大学, 2021. [CHAI B C. Engineering of cyclodextrin glucosyltransferase for the synthesis of glycosylated genistein[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021.]
- [26] 花敬涵. β -环糊精糖基转移酶的催化机制及理性改造研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2019. [HUA J H. Catalytic mechanism and rational transformation of β -cyclodextrin glucosyltransferase[D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2019.]
- [27] VIOLAINE, GERARD, EMEL, et al. Ascorbic acid derivatives as potential substitutes for ascorbic acid to reduce color degradation of drinks containing ascorbic acid and anthocyanins from natural extracts. [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(43): 12061–12071.
- [28] AGA H, YONEYAMA M, SAKAI S, et al. Synthesis of 2-O- α -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid by cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus*[J]. *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan*, 1991, 55(7): 1751–17556.
- [29] LIU Z, WU G, WU H. Molecular cloning, and optimized production and characterization of recombinant cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus* sp. T1[J]. *3 Biotech*, 2022, 12(3): 58.
- [30] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical biochemistry*, 1976, 72: 248–254.
- [31] TESFAI B T, WU D, CHEN S, et al. Effect of organic solvents on the yield and specificity of cyclodextrins by recombinant cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) from *Anaerobranca gottschalkii*[J]. *Journal of Inclusion Phenomena & Macrocyclic Chemistry*, 2013, 77(1-4): 147–153.
- [32] VANDERVEEN B A, VANALEBEEK G J, UITDEHAAG J C, et al. The three transglycosylation reactions catalyzed by cyclodextrin glucosyltransferase from *Bacillus circulans* (strain 251) proceed via different kinetic mechanisms[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2001, 267(3): 658–665.
- [33] 韩瑞枝. 环糊精葡萄糖基转移酶的分子改造及合成糖基化 L-抗坏血酸[D]. 无锡: 江南大学, 2013. [HAN R Z. Molecular modification of cyclodextrin glucosyltransferase and synthesis of glycosylated L-ascorbic acid[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2013.]
- [34] 宋凯. 海洋环糊精葡萄糖基转移酶的表达、酶学性质及 AA-2G 制备的研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2021. [SONG K. Heterogeneous expression, enzyme properties and preparation of AA-2G of cyclodextrin glucosyltransferase[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2021.]
- [35] 张国超, 王岁楼, 吴晓宗. 环糊精葡萄糖基转移酶的研究进展[J]. *生物学杂志*, 2008(2): 55–58. [ZHANG G C, WANG S L, WU X Z. Research progress on cyclodextrin glucotransferase[J]. *Journal of Biology*, 2008(2): 55–58.]
- [36] 王月明, 孙万刚, 张斌等. 环糊精及环糊精葡萄糖基转移酶特性研究[J]. *安徽农业科学*, 2007(27): 8430–8431, 8434. [WANG Y M, SUN W G, ZHANG B, et al. Study on the characteristics of cyclodextrin and cyclodextrin glucosyltransferase[J]. *Anhui Agricultural Science*, 2007(27): 8430–8431, 8434.]
- [37] 张国宁, 冯婧娴, 杨颖博等. 环糊精葡萄糖基转移酶在天然产物糖基化修饰中的应用[J]. *生物技术通报*, 2022, 38(3): 246–255. [ZHANG G N, FENG J X, YANG Y B, et al. Application of cyclodextrin glucosyltransferase in the glycosylation modification of natural products[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2022, 38(3): 246–255.]
- [38] 曹新志, 刘芳, 明红梅等. 酶法合成葡萄糖基-L-抗坏血酸的产酶条件及转化条件优化[J]. *农产品加工(学刊)*, 2008(1): 19–22, 28. [CAO X Z, LIU F, MING H M, et al. Optimization of enzyme production and transformation conditions for enzymatic synthesis of glucosyl-L-ascorbic acid[J]. *Agricultural Products Processing (Journal)*, 2008(1): 19–22, 28.]
- [39] HONG K J, KYUNG M B, SUNG K K. Production of 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid using cyclodextrin glucanotransferase from *Paenibacillus* sp. [J]. *Biotechnology Letters*, 2001, 23(21): 1793–1797.
- [40] EIBAID A, MIAO M, BASHARI M, et al. Biosynthesis of 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid from maltodextrin catalyzed by cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus* sp. SK13.002[J]. *Journal of Food and Nutrition Research*, 2014, 2(4): 193–197.
- [41] 黄立萍, 郝建华, 王伟, 等. 2-氧- α -D-葡萄糖基-L-抗坏血酸酶法合成工艺优化[J]. *食品与机械*, 2018, 34(11): 7. [HUANG L P, HAO J H, WANG W, et al. Optimization of enzymatic synthesis of 2-O- α -D-glucosyl-L-ascorbate acid[J]. *Food and Machinery*, 2018, 34(11): 7.]
- [42] 邢琳, 张秀华, 刘倩倩, 等. α -环糊精葡萄糖基转移酶的高效表达及酶法制备 AA-2G 条件优化[J]. *中国生化药物杂志*, 2016, 36(11): 5–8. [XING L, ZHANG X H, ZHAO Q Q, et al. High-efficiency expression of α -cyclodextrin glucosyltransferase and optimization of conditions for enzymatic preparation of AA-2G[J]. *China Biochemical Medicine*, 2016, 36(11): 5–8.]
- [43] CHEN S, XIONG Y, SU L, et al. Position 228 in *Paenibacillus macerans* cyclodextrin glucosyltransferase is critical for 2-O-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid synthesis[J]. *Journal of Biotechnology*, 2017, 247.
- [44] GUDIMINCHI R K, TOWNS A, VARALWAR S, et al. Enhanced synthesis of 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid from α -cyclodextrin by a highly disproportionating CGTase[J]. *Acs Catalysis*, 2016, 6(3): 1606–1615.
- [45] 许乔艳, 韩瑞枝, 李江华等. 亚位点+1 处突变提高软化类芽

- 胞杆菌环糊精糖基转移酶底物麦芽糊精特异性[J]. *生物工程学报*, 2014, 30(1): 98-108. [XU Q Y, HAN R Z, LI J H, et al. Mutation at subsite+1 improves the specificity of maltodextrin as a substrate of cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus softening*[J]. *Chinese Journal of Biological Engineering*, 2014, 30(1): 98-108.]
- [46] 张兴荣, 李峰, 贺连智等. 高产 β -环糊精葡萄糖基转移酶菌株的筛选、产酶条件优化及酶学性质研究[J]. *中国酿造*, 2020, 39(11): 85-91. [ZHANG X R, LI F, HE L Z, et al. Screening and enzyme production condition optimization of high-yield β -CGTase strain and enzymatic property[J]. *China Brewing*, 2020, 39(11): 85-91.]
- [47] 丛远华, 朱沁, 冯春波. 高含量烟酰胺与AA-2G复配体系的水溶液的稳定性研究[J]. *化学与生物工程*, 2019, 36(11): 52-57, 63. [CONG Y H, ZHU Q, FENG C B. Stability of aqueous solution of high content nicotinamide and AA2G mixed system[J]. *Chemical and Biological Engineering*, 2019, 36(11): 52-57, 63.]
- [48] 单丽媛, 刘龙, 李江华等. 利用环糊精糖基转移酶转化合成AA-2G的研究[J]. *食品与生物技术学报*, 2018, 37(1): 27-32. [SHAN L Y, LIU L, LI J H, et al. Enzyme synthesis of AA-2G by cyclodextrin glycosyltransferase[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2018, 37(1): 27-32.]
- [49] 黄燕, 杨玉路, 夏伟等. 重组 β -环糊精葡萄糖基转移酶生产偶合糖的工艺优化[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(4): 1415-1424. [HUANG Y, YANG Y L, XIA W, et al. Optimization of maltotriosyl fructofuranosides production by recombinant β -cyclodextrin glycosyltransferase[J]. *Chinese Journal Biotechnology*, 2021, 37(4): 1415-1424.]
- [50] 柴宝成, 姜钰琳, 倪晔等. 环糊精葡萄糖基转移酶182位点定点改造催化合成糖基化染料木素[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(2): 749-759. [CHAI B C, JIANG Y L, NI Y, et al. Engineering the 182 site of cyclodextrin glucosyltransferase for glycosylated genistein synthesis[J]. *Chinese Journal of Biological Engineering*, 2022, 38(2): 749-759.]