

利用环糊精糖基转移酶转化合成 AA-2G 的研究

单丽媛^{1,2}, 刘 龙^{1,2}, 李江华^{1,2}, 堵国成^{*1,2}, 陈 坚^{1,2}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 利用环糊精糖基转移酶 (CGT-SL) 对转化合成 2-O- α -D-吡喃葡萄糖基-L-抗坏血酸 (AA-2G) 的条件进行考察。反应产物通过 HPLC/LC-MS 分析确定含有 AA-2G。以便宜易得的可溶性淀粉和 VC 作为底物, 在初始反应条件下 AA-2G 的产量为 1.23 g/L。通过转化条件优化初步确定了转化反应的最优条件: 最适温度 15 $^{\circ}\text{C}$, 最适 pH 4.0, 转化反应时间 32 h, 底物 VC 和可溶性淀粉的比例为 2:4, VC 质量浓度为 16 g/L, 酶浓度为 79 U/mL 时, AA-2G 的产量达到 6.23 g/L, VC 转化率为 19.93%。

关键词: 环糊精葡萄糖基转移酶; L-抗坏血酸; 2-O- α -D-吡喃葡萄糖基-L-抗坏血酸

中图分类号: O 636.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2018)01-0027-06

Enzyme Synthesis of AA-2G by Cyclodextrin Glycosyltransferase

SHAN Liyuan^{1,2}, LIU Long^{1,2}, LI Jianghua^{1,2}, DU Guocheng^{*1,2}, CHEN Jian^{1,2}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The enzymatic synthesis condition of 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid (AA-2G) was studied in this dissertation. AA-2G was synthesized by using cyclodextrin glycosyltransferase (CGT-SL, support by Amano), and soluble starch and VC as the substrate. Under the initial condition, AA-2G production was 1.23 g/L. The best conditions for the synthesis of AA-2G: time 32 h, temperature 15 $^{\circ}\text{C}$, pH 4.0, concentration of VC 16 g/L, the proportion of VC and soluble starch is 2:4, the concentration of CGT-SL 79 U/mL. Under these conditions, the final production of AA-2G was 6.23 g/L, and the transformation rate of VC reached 19.93%.

Keywords: cyclodextrin glycosyltransferase, VC, 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid

维生素 C (VC), 又名 L-抗坏血酸 (L-AA), 是人体无法合成但却必需的营养元素^[1]。在制药、食品、化妆品等行业有重要应用前景。由于 VC 很容易受

到光照、热、金属离子等环境因素的影响而发生氧化反应, 导致其本身化学结构极不稳定^[2]。因此, 寻找一种 VC 代替品能够行使 VC 功能的同时提高其

收稿日期: 2015-11-27

基金项目: 江苏省科技支撑计划项目 (BE2011624)。

* 通信作者: 堵国成 (1965—), 男, 江苏常州人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事发酵过程优化与控制、酶工程与技术研究。

E-mail: gedu@jiangnan.edu.cn

引用本文: 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(01): 27-32.

稳定性具有重要意义。而 2-O- α -D-吡喃葡萄糖基-L-抗坏血酸(AA-2G)作为 VC 的衍生物具有以下优点:稳定性强:AA-2G 在水溶液中特别稳定,能抵抗各种氧化条件。具有较高的耐热性和抗氧化性^[3-4]。安全性高:在各种 VC 糖基衍生物中,AA-2G 没有细胞毒性,安全性最佳,并且没有直接还原性^[5-7]。能保持 VC 的生物功能:在 α -糖苷酶等酶的作用下 AA-2G 水解,逐步释放维生素 C 和葡萄糖,有效保护维生素 C 的生物活性^[8]。生物合成容易:AA-2G 可以通过生物酶法转化得到,操作过程简单、易于控制、污染少^[9]。

环糊精糖基转移酶(CGTase, EC 2.4.1.19)属于糖基水解酶家族,被认为是催化合成 AA-2G 的最佳酶^[10]。CGTase 能够催化 4 种反应:水解反应,环化反应,耦合反应以及歧化反应^[11]。CGTase 通过歧化作用可以催化低聚糖和 VC 反应生成葡萄糖基维生素 C^[12]。

目前, α -环糊精和 β -环糊精在 CGTase 催化合成 AA-2G 的过程中凭借它们较高的转化率,常被用作糖基供体^[13]。张子臣^[14]等利用 β -环糊精作为糖基供体得到 AA-2G 的产量为 9.76 g/L。日本林原生化和冈山大学^[15]曾首次以 α -环糊精作为糖基供体通过生物转化法合成 AA-2G,AA-2G 的纯度可达 97%。Hong^[13]等以环糊精为糖基供体利用从泡菜中获得的 CGT 酶转化合成 AA-2G,最终得到 AA-2G 产量最高为 2.98 g/L。但是, α -环糊精和 β -环糊精这两种糖基供体同时也存在如下缺陷: α -环糊精价格比较昂贵,以此作为糖基供体时,生产成本比较高; β -环糊精虽然价格比 α -环糊精低一些,但是 β -环糊精在水溶液中的溶解度较低,经常以固体颗粒形式存在。所以, α -和 β -环糊精均不具有大规模生产 AA-2G 的潜力^[16]。因此,选择一种价格低廉又易溶的底物,代替 α -和 β -环糊精作为 CGTase 催化生产 AA-2G 的糖基供体,将会大大降低生产成本。

韩瑞枝^[16]等通过对 CGT 与淀粉酶碳水化合物结合区域进行融合表达,以可溶性淀粉为底物最终得到 AA-2G 的最高产量为 3.03 g/L。作者通过几种糖基供体的比较,选择具有较大优势的可溶性淀粉作为糖基供体。可溶性淀粉具有溶解度高、价格低廉等优势,在转化率、成本等各方面也都优于其它糖基供体。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 酶液来源 环糊精糖基转移酶(CGT-SL),酶活(α -环化活力)为 476 U/mL;日本天野公司提供。

1.1.2 主要试剂 VC:中国医药集团上海化学试剂公司产品;麦芽糊精:山东西王食品有限公司产品; β -环糊精:Sigma-Aldrich(上海)公司产品;AA-2G 标准品:和光纯药工业株式会社(日本)产品;其它各种试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 α -环化活力的测定 采用甲基橙法测定 α -环化活力^[17]。具体步骤为:0.9 mL 3 g/dL 的可溶性淀粉溶液在 40 °C 下预先保温 10 min。将适当稀释的酶液(对照用 pH 6.0 的磷酸缓冲液代替)0.1 mL 加入到 0.9 mL 3 g/dL 的可溶性淀粉溶液中,在 40 °C 下反应 10 min,之后加入 1.0 mL 1.0 mol/L 盐酸停止反应。然后再加入 1.0 mL 0.1 mmol/L 甲基橙溶液显色,20 °C 条件下保温 20 min,最后在 505 nm 下测定样品吸光度。一个酶活单位(U)定义为在上述条件下每分钟生成 1 μ mol/L α -环糊精所需的酶量^[18]。作者所述酶活均为 α -环化活力。

1.2.2 AA-2G 合成反应的初始条件 反应体系:CGT-SL 酶液 2 mL(酶液适当稀释,终浓度为 47.6 U/mL),糖基供体 0.5 mL(终质量浓度 10 g/L),维生素 C 0.5 mL(终质量浓度 10 g/L)。反应条件:初始 pH 4.2,28 °C,转速 220 r/min,避光避氧条件下反应 24 h^[19]。

1.2.3 反应液样品处理方法 将反应结束后的反应液样品 12 000 r/min 离心 10 min,然后用 0.22 μ m 微孔过滤膜过滤。

1.2.4 AA-2G 检测方法 高效液相色谱法^[20]。色谱柱:Amethyst C18-H;检测器:Variable Wavelength Detector(UV);检测波长:240 nm;柱温:25 °C;进样量:10 μ L;流动相: $V(\text{KH}_2\text{PO}_4):V(\text{甲醇})=99.5:0.5$,用磷酸调 pH 至 2.0。

2 结果

2.1 转化产物的确定

为了对转化产物进行确定,对在初始反应条件下得到的转化反应液进行 LC-MS 鉴定。HPLC 结果显示,转化反应液样品中在 1.12 min 出现峰(图

1B)和 AA-2G 标准样品出峰时间 1.11 min(图 1A)基本一致,初步判断为 AA-2G。为了进行进一步确认,对 AA-2G 标准样品和转化液样品进行 MS 鉴定。AA-2G 的相对分子质量为 338.27。如图 1D,转

化反应样品 $m/z=339.2(M+1)$ 和 $m/z=337.2(M-1)$,推断其相对分子质量为 338.2,与标准样品 MS(图 1C)结果一致,可确定转化液样品中含有 AA-2G。

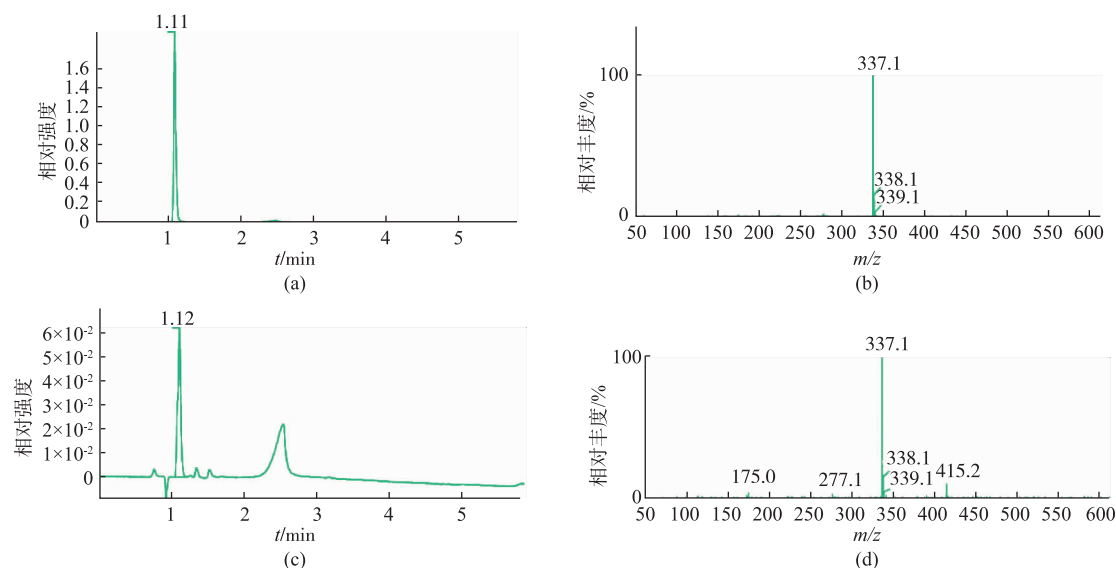


图 1 AA-2G 标准样品及转化反应液 LC-MS 图

Fig. 1 LC/MS result of the biotransformation product and standard sample of AA-2G

2.2 糖基供体种类对 CGT-SL 转化合成 AA-2G 的影响

CGT 酶可以利用多种寡聚糖合成 AA-2G。为了找到合适的糖基供体作为 CGT-SL 转化合成 AA-2G 的底物,作者选取了 6 种不同的糖基供体来源:β-环糊精、麦芽糖、可溶性淀粉、玉米糊精、蔗糖及葡萄糖。如图 2,该酶不能利用蔗糖和葡萄糖合成 AA-2G。在初始反应条件下,β-环糊精和可溶性淀粉作为糖基供体时 AA-2G 的产量分别为 1.24 g/L 和 1.23 g/L,明显优于其他糖基供体。考虑到可溶性淀粉与 β-环糊精相比具有可溶性强、便宜易得等优点,作者选用可溶性淀粉作为糖基供体进行后续优化研究。

2.3 酶浓度对 CGT-SL 转化合成 AA-2G 的影响

酶浓度对 AA-2G 的产量有重要的影响。在初始反应条件下,以可溶性淀粉为糖基供体,考察不同的酶浓度对 AA-2G 产量的影响。如图 3,随着酶浓度的增加,AA-2G 的产量随之增加。当酶浓度达到 79 U/mL 时,AA-2G 的产量最高,达到 3.53 g/L。当酶浓度高于 79 U/mL 时,AA-2G 的产量逐渐降低。所以,选择酶浓度为 79 U/mL 作为后续研究。

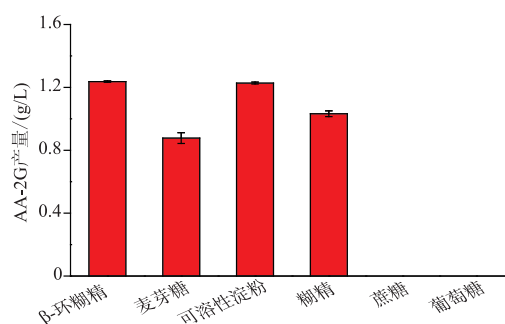


图 2 糖基供体对 CGT-SL 转化合成 AA-2G 的影响

Fig. 2 Effect of different glycosyl donors on AA-2G production

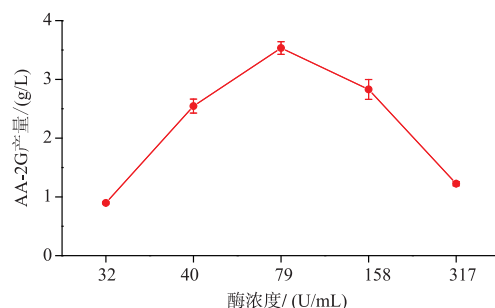


图 3 不同的加酶量对 AA-2G 产量的影响

Fig. 3 Influence of different enzyme concentrations on AA-2G production

2.4 底物质量浓度对 CGT-SL 转化合成 AA-2G 的影响

底物质量浓度对 CGT-SL 转化合成 AA-2G 有重要影响。在酶浓度为 79 U/mL, 其它条件和初始反应条件一致的情况下, 考察不同的底物质量浓度对 CGT-SL 转化合成 AA-2G 的影响。如图 4, 随着底物质量浓度的不断增加, AA-2G 的产量也随之增加。当底物质量浓度达到 16 g/L 时, AA-2G 的产量达到最高 4.36 g/L。当底物质量浓度超过 16 g/L 时, AA-2G 的产量反而有下降趋势。所以选择底物质量浓度 16 g/L 进行后续条件优化研究。

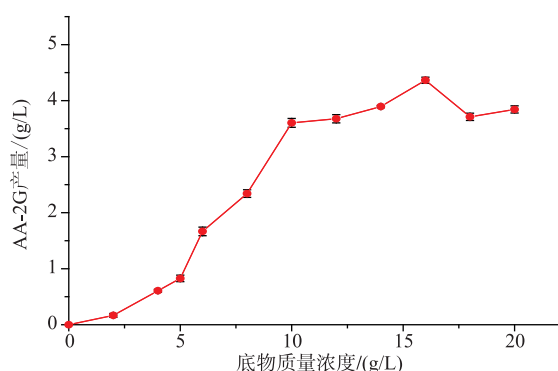


图 4 底物浓度对 CGT-SL 转化合成 AA-2G 的影响

Fig. 4 Effect of substrate concentration on synthesis of AA-2G

2.5 底物 VC 与可溶性淀粉的比例对 CGT-SL 转化合成 AA-2G 的影响

VC 与可溶性淀粉的比例不同对 AA-2G 的产量有不同的影响。采用酶浓度为 79 U/mL, 其它条件和初始反应条件一致, 考察 VC 与可溶性淀粉的质量比对 CGT-SL 转化合成 AA-2G 的影响。如图 5, 当 VC 与可溶性淀粉的比例为 2:4 时, AA-2G 的产量最高达到 0.826 g/L, VC 转化率为 21.06%。当 VC 与可溶性淀粉的质量比为 1:5 时, VC 转化率为 25.08%, 高于 VC 与可溶性淀粉的比例为 2:4 时 VC 的转化率。但 AA-2G 的产量只有 0.48 g/L, 较 VC 与可溶性淀粉的比例为 2:4 低。所以, 作者选择 VC 与淀粉的质量比为 2:4 进行后续优化研究。

2.6 转化反应时间对 CGT-SL 转化合成 AA-2G 的影响

为了考察 CGT-SL 转化合成 AA-2G 的最适反应时间, 选择酶浓度为 79 U/mL, VC 质量浓度为 16 g/L, VC 和淀粉的质量比为 2:4, 转化温度为 25 °C 进

行转化时间优化。反应过程中分别在不同的时间取样检测 AA-2G 的含量。如图 6, 随着转化时间的延长, AA-2G 的产量随之增加。当转化反应时间为 32 h 时, AA-2G 的产量达到最高, 为 4.66 g/L。对应 VC 转化率为 14.90%。当反应时间超过 32 h 时, AA-2G 的产量反而略有下降。所以, 作者选择转化时间为 32 h 进行后续研究。

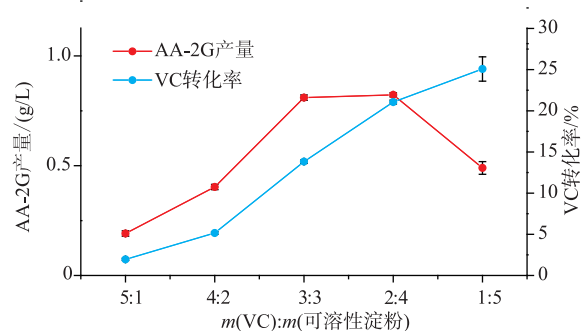


图 5 VC 与可溶性淀粉的比例对 CGT-SL 转化合成 AA-2G 的影响

Fig. 5 Effect of substrate proportion on the synthesis of AA-2G

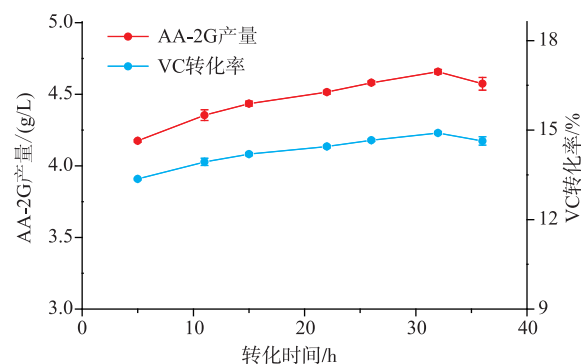


图 6 转化反应时间对 CGT-SL 合成 AA-2G 的影响

Fig. 6 Effect of time on AA-2G synthesis

2.7 温度对 CGT-SL 转化合成 AA-2G 的影响

反应温度对 CGT-SL 转化合成 AA-2G 具有重要影响。选择酶浓度为 79 U/mL, VC 质量浓度为 16 g/L, VC 和淀粉的质量比为 2:4, 反应时间为 32 h 进行转化温度优化。作者选取 8 个不同的温度, 考察温度对 CGT-SL 转化合成 AA-2G 的影响。如图 7, 当反应温度为 15 °C 时, AA-2G 的产量为 5.953 g/L, 明显高于其它温度下的产量, VC 转化率为 19.05%。当温度低于或高于 15 °C 时, AA-2G 的产量明显下降。所以, 作者选择转化反应温度为 15 °C。

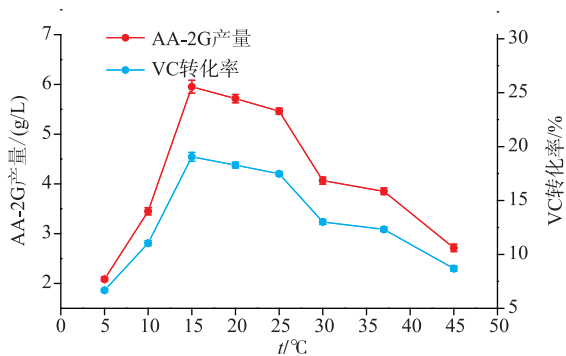


图7 温度对 CGT-SL 转化合成 AA-2G 的影响

Fig. 7 Effect of temperature on AA-2G synthesis

2.8 反应初始 pH 对 CGT-SL 转化合成 AA-2G 的影响

不同的反应初始 pH 对 CGT-SL 转化合成 AA-2G 具有不同的影响, pH 过高或过低都可能会造成 CGT-SL 酶活力损失甚至丧失, 进而在转化反应中导致 AA-2G 的产量下降甚至完全没有。选择酶浓度为 79 U/mL, VC 质量浓度为 16 g/L, VC 和淀粉的质量比为 2:4, 温度为 15 °C, 反应时间为 32 h, 改变初始 pH (2.0、3.0、4.0、5.0、6.0), 考察不同 pH 对 CGT-SL 转化合成 AA-2G 产量的影响。由图 8 可以看出, 初始 pH 为 4.0 时, AA-2G 的产量最高, 达到 6.23 g/L, VC 转化率为 19.93%。当初始 pH 低于或高于 4.0 时, AA-2G 的产量有所下降。当初始 pH 超过 6.0 时, 不再有 AA-2G 生成, 可能是 CGT-SL 在超过 pH 6.0 的条件下已经完全失去活力。所以, 选择最佳 pH 4.0 进行转化反应。

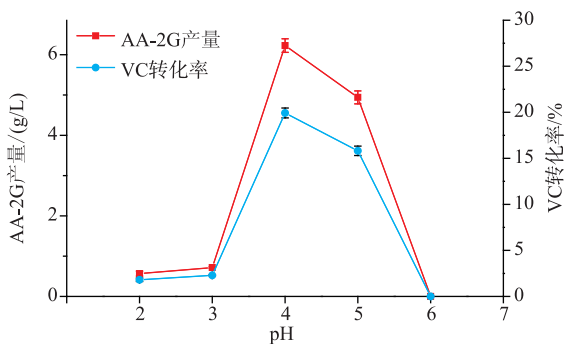


图8 pH 对 CGT-SL 转化合成 AA-2G 的影响

Fig. 8 Effect of pH on AA-2G synthesis

2.9 正交试验设计

选取单因素优化中影响相对较大的因素: 酶浓度、底物(VC)浓度、pH、温度 4 个因素, 以 AA-2G 的产量为指标, 选用 $L_9(3^4)$ 正交表进行正交试验, 各

水平因素见表 1。

设计 9 组试验, 各组试验结果及方差分析表见表 2。由正交试验结果可知, 最佳组合为: 酶浓度 79 U/mL, 底物 VC 为 14 g/L, pH 4.0, 反应温度 20 °C, 得到 AA-2G 产量为 6.20 g/L, 与单因素组合优化的产量相比相差不大。

表 1 各因素水平表

Table 1 Level of various factors

水平	酶浓度/ (U/mL)	底物 VC 质量 浓度/(g/L)	pH	温度/°C
1	40	14	3.5	10
2	79	16	4.0	15
3	158	18	4.5	20

表 2 AA-2G 产量正交试验结果

Table 2 Orthogonal test and the production of AA-2G

试验号	因素				
	酶浓度/ (U/mL)	底物 VC 质量 浓度/(g/L)	pH	温度/°C	AA-2G 产量/ (g/L)
1	1	1	1	1	1.82
2	1	2	2	2	2.93
3	1	3	3	3	2.71
4	2	1	2	3	6.20
5	2	2	3	1	2.87
6	2	3	1	2	5.29
7	3	1	3	2	4.56
8	3	2	1	3	5.24
9	3	3	2	1	3.08

3 结 语

作者利用日本田野公司提供的环糊精糖基转移酶(CGT-SL), 通过几种不同的糖基供体(β -环糊精、麦芽糖、可溶性淀粉、玉米糊精、蔗糖及葡萄糖)比较研究, 发现其不能利用葡萄糖和蔗糖。在初始反应条件下, β -环糊精和可溶性淀粉作为糖基供体, AA-2G 的产量分别为 1.24 g/L 和 1.23 g/L。相比于其他糖基供体具有较大优势。从节约成本、糖基供体的溶解度和产量方面考虑, 作者最终选择可溶性淀粉作为糖基供体。以可溶性淀粉和 VC 为底物转化合成 AA-2G, 产物通过 HPLC/LC-MS 分析, 确定了转化反应液中含有 AA-2G。在初始反应条件下, CGT-SL 利用可溶性淀粉和 VC 转化合成 AA-2G 的产量为 1.23 g/L。通过转化条件优化确定了 CGT-SL 转化合成 AA-2G 的最佳反应条件: 酶浓度

为 79 U/mL, VC 质量浓度为 16 g/L, 底物 VC 和可溶性淀粉的质量比为 2:4, 最适温度 15 °C, 最适 pH 4.0, 转化反应时间 32 h, 最终 AA-2G 的产量达到

6.23 g/L, VC 转化率为 19.93%。与初始条件下相比, AA-2G 的产量提高了 4.06 倍。

参考文献:

- [1] NAIDU KA. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview[J]. **Nutrition Journal**, 2003, 2(1):7.
- [2] YAMAMOTO I, TAI A. The current state on development of novel vitamin derivatives [J]. **Nihon rinsho. Japanese Journal of Clinical Medicine**, 1999, 57(10):2332-2338.
- [3] KOUKI M, NORIO M, KYOKO F, et al. Comparison of ascorbic acid and ascorbic acid 2-O- α -glucoside on the cytotoxicity and bioavailability to low density cultures of fibroblasts[J]. **Biochemical Pharmacology**, 1992, 44(11):2191-2197.
- [4] YAMAMOTO I, SUGA S, MITOH Y, et al. Antiscorbutic activity of L-ascorbic acid 2-glucoside and its availability as a vitamin C supplement in normal rats and guinea pigs[J]. **Journal of Pharmacobiodynamics**, 1990, 13(11):688-695.
- [5] TATEMOTO H, OOTAKI K, SHIGETA K, et al. Enhancement of developmental competence after in vitro fertilization of porcine oocytes by treatment with ascorbic acid 2-O- α -glucoside during in vitro maturation [J]. **Biology of Reproduction**, 2001, 65(6):1800-1806.
- [6] WAKAMIYA H, SUZUKI E, YAMAMOTO I, et al. In situ intestinal absorption of 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid in guinea pigs[J]. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, 1995, 41(2):265-272.
- [7] YAMASAKI H, NISHI K, MIYAKE T. Process for producing high 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid. US, 6576446[P]. 2003-05-10.
- [8] YAMAMOTO I, TANAKA M, MUTO N. Enhancement of in vitro antibody production of murine splenocytes by ascorbic acid 2-O- α -glucoside[J]. **International Journal of Immunopharmacology**, 1993, 15(3):319-325.
- [9] ZHENG M, ENDO T, ZIMMERMANN W. Synthesis of large-ring cyclodextrins by cyclodextrin glucanotransferases from bacterial isolates[J]. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, 2002, 44(1-4):387-390.
- [10] TANAKA M, MUTO N, YAMAMOTO I. Characterization of *Bacillus stearothermophilus* cyclodextrin glucanotransferase in ascorbic acid 2-O- α -glucoside formation[J]. **Biochim Biophys Acta**, 1991, 1078(2):127-132.
- [11] Van der Veen BA, Van Alebeek GJ, Uitdehaag JC, et al. The three transglycosylation reactions catalyzed by cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* (strain 251) proceed via different kinetic mechanisms [J]. **European Journal of Biochemistry**, 2000, 267(3):658-665.
- [12] MANDAI T, YONEYAMA M, SAKAI S, et al. The crystal structure and physicochemical properties of L-ascorbic acid 2-glucoside[J]. **Carbohydrate Research**, 1992, 232(2):197-205.
- [13] JUN H K, BAE K M, KIM S 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.
- [14] ZHANG Z C, LI J H, 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 and Bioengineering**, 2011, 16(1):107-113.
- [15] 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]. **Agricultural and Biological Chemistry**, 1991, 55(7):1751-1756.
- [16] 韩瑞枝. *Paenibacillus macerans* 环糊精葡萄糖基转移酶的分子改造及其合成糖基化维生素 C 的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2013.
- [17] LI Z, LI B, GU Z, et al. Extracellular expression and biochemical characterization of α -cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus macerans*[J]. **Carbohydrate Research**, 2010, 345(7):886-892.
- [18] 李兆丰. 软化类芽孢杆菌 α - 环糊精葡萄糖基转移酶在大肠杆菌中的表达及其产物特异性分析[D]. 无锡: 江南大学, 2009.
- [19] RUIZHI H. Molecular engineering of cyclodextrin glycosyltransferase and its application on glycoyl Vitamin C synthesis[D]. Wu Xi: jiangnan university, 2013.
- [20] 张子臣. 酶法转化合成 2- 氧 - α -D- 吡喃葡萄糖基抗坏血酸[D]. 无锡: 江南大学, 2010.