

三种不同来源的 α -葡糖苷酶合成 L-抗坏血酸 2-葡糖苷的比较

丁伟秋^{1,2,3}, 周伟杰^{1,2,3}, 谢春芳⁴, 刘大岭⁴, 姚冬生^{1,2,3}

1 暨南大学 生物医药研究院, 广东 广州 510632

2 暨南大学 基因工程药物国家工程研究中心, 广东 广州 510632

3 暨南大学 广东省生物工程药物重点实验室, 广东 广州 510632

4 暨南大学 生物工程学系, 广东 广州 510632

丁伟秋, 周伟杰, 谢春芳, 刘大岭, 姚冬生. 三种不同来源的 α -葡糖苷酶合成 L-抗坏血酸 2-葡糖苷的比较. 生物工程学报, 2022, 38(7): 2523-2533.

DING WQ, ZHOU WJ, XIE CF, LIU DL, YAO DS. Comparison of three α -glucosidases from different sources in the synthesis of L-ascorbic acid 2-glucoside. Chin J Biotech, 2022, 38(7): 2523-2533.

摘 要: L-抗坏血酸 2-葡糖苷 (L-ascorbic acid 2-glucoside, AA-2G) 是 L-抗坏血酸 (L-ascorbic acid, L-AA) 的衍生物, 相比 L-AA, 其稳定性极好, 并且容易被人体利用。 α -葡糖苷酶 (α glucosidase, AG) 是最早发现可以产生 AA-2G 的酶, 但合成效率很低。本研究的目的是通过系统评价来源于黑曲霉、梗稻以及大鼠的 AG 合成 AA-2G 的活性, 为进一步分子改良提高 AG 合成 AA-2G 功能筛选候选 AG 出发酶。人工合成黑曲霉、梗稻以及大鼠来源的 AG 基因, 构建重组工程菌, 表达和纯化 3 种重组酶 (AAG, JrAG, RAG), 并对它们产生 AA-2G 的条件进行优化, 在最适反应条件下, 比较这 3 种酶的活力、合成 AA-2G 的产量和转糖率等。研究结果显示, JrAG 的比活力为 1.9 U/mg、生成 AA-2G 的量为 2 577.2 mg/L、转糖率为 7.6%; AAG 的比活力为 1.0 U/mg、生成 AA-2G 的量为 153.10 mg/L、转糖率为 0.5%; RAG 的比活力为 0.4 U/mg、生成 AA-2G 的量为 861.0 mg/L、转糖率为 2.5%; 在这 3 种来源的 AG 重组酶中, JrAG 的比活力和转糖率最高。JrAG 具有较高转麦芽糖合成 AA-2G 的活性, 是进一步分子改良提高合成 AA-2G 产量的良好出发酶, 本研究结果也可开展 AG 在 AA-2G 合成的相关研究提供参考。

关键词: α -葡糖苷酶; L-抗坏血酸 2-葡糖苷; 酶法合成; 麦芽糖; 梗稻

Comparison of three α -glucosidases from different sources in the synthesis of L-ascorbic acid 2-glucoside

DING Weiqiu^{1,2,3}, ZHOU Weijie^{1,2,3}, XIE Chunfang⁴, LIU Daling⁴, YAO Dongsheng^{1,2,3}

1 Institute of Biomedicine, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong, China

2 National Engineering Research Center of Genetic Medicine, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong, China

3 Guangdong Provincial Key Laboratory of Bioengineering Medicine, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong, China

4 Department of Bioengineering, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong, China

Abstract: L-ascorbic acid 2-glucoside (AA-2G) is a derivative of L-ascorbic acid (L-AA). Compared with L-AA, it has good stability and is easily decomposed by enzyme in the human body. α -Glucosidase (AG) was the first enzyme found capable of producing AA-2G. However, researches on this enzyme is still in infancy. We took AG derived from *Aspergillus niger* (AAG), *Japanese rice* (JrAG) and *Rattus rattus* (RAG), and compared their specific enzymatic activity and transglycosidation rate, with the aim to improve the synthesis of AA-2G by the transglycosidation of AG. The genes encoding these three different AG were cloned and expressed in engineered yeast. The conditions for the transglycosidation reaction of these three enzymes were optimized and the transglycosidation efficiency and yield of AA-2G under the optimized conditions were compared. The specific activity of AAG reached 1.0 U/mg, while the yield of AA-2G reached 153.1 mg/L with a transglycosidation rate of 0.5%. The specific activity of RAG reached 0.4 U/mg, while the yield of AA-2G reached 861.0 mg/L with a transglycosidation rate of 2.5%. JrAG showed the highest specific activity and transglycosidation rate. The enzyme specific activity of JrAG reached 1.9 U/mg, while the yield of AA-2G reached 2 577.2 mg/L with a transglycosidation rate of 7.6%, much higher than that of the other two glucosidases. JrAG may thus have potential to improve the synthesis of AA-2G.

Keywords: α -glucosidase; L-ascorbic acid 2-glucoside; enzymatic synthesis; maltose; japonica rice

L-抗坏血酸 (L-ascorbic acid, L-AA) 又称维生素 C, 在药品、食品和化妆品领域有广泛的应用^[1]。但是, 由于 L-AA 二号碳上的羟基非常容易被氧化使 L-AA 降解失活, 所以严重限制了 L-AA 的应用^[2]。L-抗坏血酸 2-葡萄糖苷 (L-ascorbic acid 2-glucoside, AA-2G)^[3-4]是 L-AA 性质最为稳定的糖类衍生物, 相比 L-AA, 其对热、氧化剂、金属离子具有显著的抗性^[5-7]。同

时, AA-2G 保留着 L-AA 的生物学功能。目前 AA-2G 广泛应用于化妆品、食品、医疗保健、畜牧业、水产养殖等行业^[8]。

目前, 生物合成法是制备 AA-2G 的主要方法^[9]。 α -葡萄糖苷酶 (α glucosidase, AG) 是最早发现能催化麦芽糖转糖基合成 AA-2G 的酶, AG 水解麦芽糖非还原端的糖苷键, 释放一个离子化的葡萄糖, 然后游离的葡萄糖以 α -1,6-糖

苷键转移到 L-AA 二号位碳的羟基上形成糖苷化合物 AA-2G^[10-11]。来源于曲霉、酿酒酵母、芽孢杆菌、粳稻、小鼠的 AG 同时具有水解活性和转糖苷活性^[12-13]。有文献报道,黑曲霉来源的 AG (*Aspergillus niger* α -D-glucosidase, AAG)^[14-16]、粳稻来源的 AG (*Japanese rice* α -D-glucosidase, JrAG)^[17]以及大鼠来源的 AG (*Rattus rattus* α -D-glucosidase, RAG)^[18]具有较好的转糖苷活性且生成的中间副产物较少,但 AA-2G 的产率很低。我们发现关键的问题是在 AG 催化 L-AA、麦芽糖合成 AA-2G 的转糖苷反应中,实际上存在一个级联反应: (a) L-抗坏血酸+麦芽糖 $\xrightarrow{\alpha\text{-葡萄糖苷酶}}$ L-抗坏血酸 2-葡萄糖苷+葡萄糖 (b) L-抗坏血酸 2-葡萄糖苷+葡萄糖 $\xrightarrow{\alpha\text{-葡萄糖苷酶}}$ L-抗坏血酸+葡萄糖。AG 既能转糖苷反应合成 AA-2G, 同时也能水解 AA-2G, 所以导致 AG 合成 AA-2G 的效率很低。

麦芽糖是一个廉价的糖基供体,如果能优选一个 AG,进行分子改造,使其更趋向于转糖苷反应,而更低的糖苷水解作用将有助于 AG 催化廉价麦芽糖合成 AA-2G 的工业化生产。由于不同来源的 AG 的分子量、最适反应温度、底物专一性以及催化效率稍有差异,文献报道 AG 合成 AA-2G 效率的研究^[17-18],未对反应条件进行优化,有些没有报道转糖率,无法比较和评价各个来源 AG 合成 AA-2G 效率的优劣。因此,本研究选择了 AAG、JrAG 和 RAG 进行研究,首先,构建 AG 工程菌,纯化制备 AG,摸索了各个酶的最适反应条件,最后定量分析 AAG、JrAG 和 RAG 在最适条件下的活力、比活力和转糖率,比较和评价不同来源的 AG 转糖苷合成 AA-2G 的能力,优选出转麦芽糖合成 AA-2G 活性相对较高的 AG,为进一步对该酶进行分子改造选择优秀的出发酶。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株

毕赤酵母 GS115,由本实验室保存;大肠杆菌感受态细胞,购自广州鼎国生物技术公司。*pGAP-ss1-aag-ppic3.5k* 和 *pGAP-ss1-jrag-ppic3.5k* 质粒由上海捷瑞生物工程有限公司合成;*pGAP-ss1-rag-ppic3.5k* 质粒由华大基因股份有限公司合成。

1.1.2 主要试剂和培养基

限制性核酸内切酶 (*EcoR* I-HF、*Sac* I-HF、*Sal* I-HF)、琼脂糖凝胶回收试剂盒等均购自 NEB 公司;聚合酶类 PrimeSTAR 购自 TaKaRa 公司;质粒小提试剂盒购自 TIANGEN 公司;Quick Start Bradford 蛋白测定试剂盒购自 Bio-Rad 公司;SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒和酵母基因组提取试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司;L-抗坏血酸(分析纯)购自 Sigma 公司;AA-2G(色谱纯)购自 Macklin 公司;磷酸二氢钾(色谱纯)购自 Macklin 公司;85%磷酸(色谱纯)购自科密欧公司。

LB 液培养基:酵母提取物 5.0 g,细菌学蛋白胨 10.0 g,氯化钠 10.0 g。LB 固体培养基中加琼脂粉 15.0 g。

MD 固体培养基:丙三醇 10.0 g,无氨基酵母氮源 13.4 g,生物素 0.4 mg/L,琼脂粉 15.0 g。YPG 液体培养基:酵母提取物 10.0 g,大豆蛋白胨 20.0 g,丙三醇 10.0 g。

1.1.3 仪器与器材

ECM399 电转仪, BTX 公司;Mini Spin 台式离心机, Eppendorf;Sigma 4K-15 高速冷冻离心机, BECKMAN 公司;Mini 蛋白质电泳仪, Bio-Rad 公司;UV-2600 紫外可见分光光度计, 岛津公司。AKTA pure 纯化仪, GE Healthcare 公

司；多功能酶标仪，美谷分子仪器（上海）有限公司；Ultimate 3000 高效液相色谱仪，Thermo Scientific。

1.2 方法

1.2.1 目的基因的获取

本研究选取了 3 种不同来源的 AG，分别来源于黑曲霉的 AAG (*aag* 的核酸序列，GenBank 登录号：XM_001402016.2)、来源于粳稻的 JrAG (*jrag* 的核酸序列，GenBank 登录号：XM_015787634.2) 和来源于大鼠的 RAG (*rag* 的核酸序列，GenBank 登录号：XM_032912099.1)。将目的基因序列进行毕赤酵母密码子优化，去除其本身信号肽基因序列，在目的基因前端加上 *ssI* 基因序列实现产物的分泌型表达，在目的基因末尾添加组氨酸标签，方便后续蛋白的分离纯化。*aag* 和 *jrag* 由上海捷瑞生物工程有限公司进行全基因合成，*rag* 由华大基因股份有限公司成进行全基因合成。

1.2.2 AG 工程菌的构建

活化带有目的基因质粒（分别是 *pgap-ssI-aag-ppic3.5k*、*pgap-ssI-jrag-ppic3.5k* 和 *pgap-ssI-rag-ppic3.5k*）的大肠杆菌，提取质粒。用限制性内切酶 *Sal* I 对质粒进行线性化，使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后切胶回收目的片段，并将目的片段分别电击转入毕赤酵母 GS115 感受态细胞中，目的基因将以同源重组的形式整合入酵母的染色体实现复制和表达。将电转后的

感受态细胞涂布于 MD 固体培养基平板，置于 28 ℃ 恒温培养箱中培养，待长出单菌落。挑取平板上单克隆提取重组菌的基因组进行阳性克隆鉴定（鉴定引物见表 1）。

1.2.3 阳性重组菌的扩大培养和目的蛋白纯化

将验证成功的阳性重组菌分别接于 YPG 培养基中，28 ℃、200 r/min 培养 72 h。

上清液经硫酸铵沉淀（100 mL 的发酵液加入 56.1 g 的硫酸铵，使溶液硫酸铵饱和度达到 80%）处理后进行 Ni Sepharose 6 Fast Flow 镍柱亲和层析，用截留分子量为 50 kDa 的超滤管对洗脱峰收集液进行浓缩。用缓冲液（PBS 缓冲液或柠檬酸- Na_2HPO_4 ）置换洗脱缓冲液，反复置换 3 次并浓缩至 2–3 mL。浓缩后的洗脱峰收集液测蛋白浓度，进行 SDS-PAGE 分析，剩余的浓缩蛋白质溶液置于 4 ℃ 保存备用。

1.2.4 AG 酶活力测定

*p*NPG 会被 AG 分解为对硝基苯酚 (*p*-nitrophenol, *p*NP)，*p*NP 在碱性溶液中显黄橙色且在 405–420 nm 处有特征吸收峰，在一定的范围内吸光值和 *p*NP 的浓度呈线性相关。

酶活力定义：在 pH 为 5.0、40 ℃ 的条件下，以 5 mmol/L *p*NPG 为底物，每分钟产生 1 μmol 的 *p*NP 所需的酶量为 1 个酶活力单位 (U/mL)。酶比活力定义：将每毫克蛋白质中酶的单位数，定义为比活力 (U/mg)。

表 1 本研究使用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primers name	Sequences (5'→3')	Size (bp)
<i>aag</i> primer1	CCGGAATTCCGGTCCGCTCAATTGATTGCTAAC	33
<i>aag</i> primer 2	ATTCGCGCGCGTTTATCAATGATGATGATGATG	34
<i>jrag</i> primer 1	GGATACAACGTTGCTTCCGTTGCTGGTTCT	30
<i>jrag</i> primer 2	TTAATGATGATGATGATGATGGTAAGT	27
<i>rag</i> primer 1	ATGCTGAACAATTGAGAGCTGTTCCAAC	29
<i>rag</i> primer 2	TTTCAACCATCAACAAGGAACTGGAAT	28

酶活力测定：取 *p*NPG 缓冲液 400 μ L，再加入 10 mmol/L 的 *p*NPG 溶液 380 μ L，向离心管加入酶液 20 μ L，以灭活的酶液作为对照组，每组 3 个重复。40 $^{\circ}$ C 反应 15 min，反应结束后加入预冷的 1 mol/L Na_2CO_3 溶液 200 μ L 终止反应。室温静置 5 min，酶标仪测定 OD_{405} 吸光值。根据标准曲线计算 *p*NP 的浓度，再根据活力公式^[19]计算酶活力和酶比活力。

1.2.5 AG 转糖苷反应条件的优化

本实验依据单一变量原则，找出各个 AG 合成 AA-2G 转糖苷反应的最适温度、最适 pH 以及最适底物浓度。

(1) 研究温度对 AG 反应的影响。分别在 30、35、40、45、50、55 和 60 $^{\circ}$ C 反应条件下，其他反应条件不变（温度为 50 $^{\circ}$ C、麦芽糖浓度为 200 mmol/L、L-AA 浓度为 100 mmol/L），进行反应，探索各工程酶的最优反应温度。

(2) 研究 pH 对 AG 反应的影响。控制其他条件不变，分别将 3 种 AG (AAG、JrAG、RAG) 转糖苷反应条件中的 pH 值设为 3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5 和 6.0，探索各工程酶的最优反应 pH。

(3) 研究底物麦芽糖浓度对 AG 反应的影响。分别在麦芽糖浓度为 50、100、200、300、400、500、600 mmol/L 反应条件下，其他反应条件不变，进行 3 种不同来源的 AG 的合成 AA-2G 反应，探索各工程酶最优的麦芽糖反应浓度。

(4) 探究底物 L-AA 浓度对 AG 反应的影响。分别在 L-AA 浓度为 10、20、30、40、50、100、150、200、250 mmol/L 反应条件下，其他反应条件不变，进行 3 种不同来源的 AG 的合成 AA-2G 反应，探索各工程酶最优的 L-AA 反应浓度。

1.2.6 各 AG 在最适反应条件下转糖苷产生 AA-2G 能力的比较

各工程酶在最适反应条件进行反应后，对其产生的 AA-2G 产量进行 HPLC 检测，检测条件参照文献报道方法^[14]优化后进行，优化后的条件为：高效液相色谱仪：Ultimate 3 000；色谱柱：Acclaim 120 C18 (5 μ m, 4.6 mm \times 250 mm)；柱温：25 $^{\circ}$ C；检测波长：238/243 nm；上样量：10 μ L；流动相组成： KH_2PO_4 (0.075 mol/L, pH 2.0)。计算且比较各酶合成的 AA-2G 产量、转糖率和酶活力。

转糖率为在转糖苷反应中 L-AA 二号碳糖苷化形成 AA-2G 的百分比。

$$\text{转糖率} = \frac{\text{生成AA-2G的物质的量}}{\text{加入L-AA的物质的量}} \times 100\%。$$

2 结果与分析

2.1 目的基因的获取

活化携带目的基因的甘油菌，提取质粒，双酶切质粒 *pgap-ssl-aag-ppic3.5k*、*pgap-ssl-jrag-ppic3.5k*、*pgap-ssl-rag-ppic3.5k*，用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳，鉴定结果如图 1 所示。载体大小为 8 200 bp，目的基因 *pgap-ssl-aag* 片段大小为 3 660 bp，*pgap-ssl-jrag* 片段大小为 3 340 bp，*pgap-ssl-rag* 片段大小为 3 440 bp。核酸电泳结果如图 1 所示，结果显示酶切产物片段大小符合预期。

2.2 三种 AG 重组阳性菌的鉴定

提取各单克隆的基因组，使用表 1 的引物对单克隆的基因组进行 PCR 扩增，PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳分析，各重组菌能扩增出目的基因，说明所获的单克隆即为阳性重组菌，鉴定结果如图 2 所示。

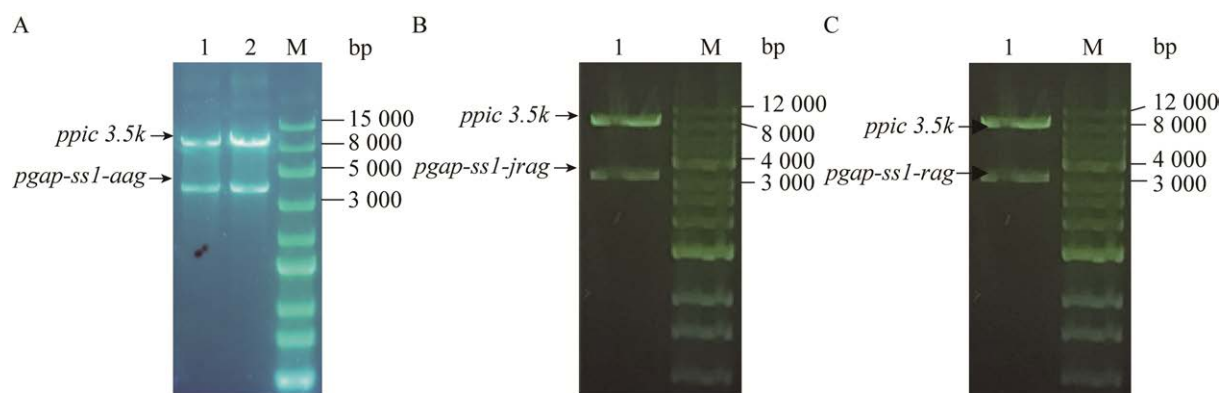


图1 重组子质粒双酶切产物核酸电泳鉴定图

Figure 1 Restriction enzyme digestion products of recombinant plasmid. Lane 1–2: the product of selected plasmid digested with double enzyme; lane M: DNA marker DL2504; double-enzyme digestion products of recombinant plasmid *pgap-ssl-aag-ppic3.5k* (A), *pgap-ssl-jrag-ppic3.5k* (B), and *pgap-ssl-rag-ppic3.5k* (C).

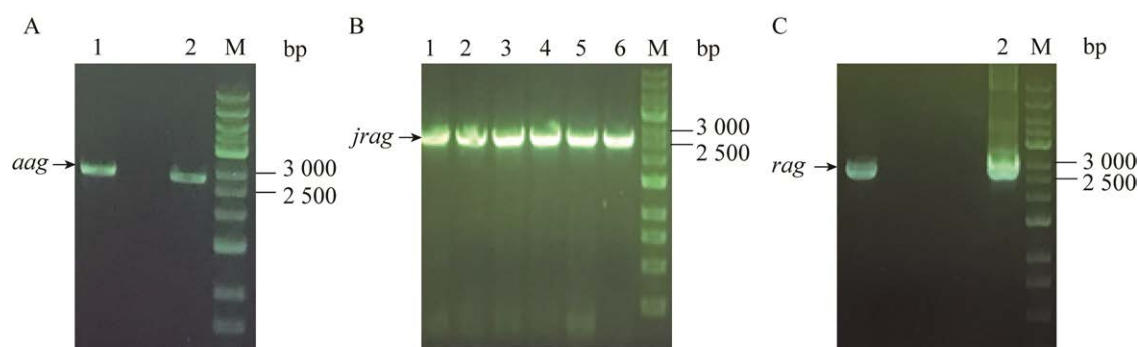


图2 重组菌的PCR鉴定结果

Figure 2 Single-colony PCR analysis of recombinant *Pichia pastoris*. Lane 1–6: the selected single-clonal recombinants; lane M: DNA marker DL2504 and the arrow indicates the target band. (A) *aag*. (B) *jrag*. (C) *rag*.

2.3 酶蛋白的纯化

据预测 AAG 和 JrAG 的蛋白大小均为 150 kDa, RAG 的大小为 120 kDa。镍柱亲和层析收集的各洗脱液经浓缩后, SDS-PAGE 鉴定结果如图 3 所示, 洗脱峰 2 收集液有大量的目的蛋白, 说明镍柱亲和层析能高效纯化目的蛋白和去除杂蛋白。后续选取洗脱峰 2 进行实验。经测量工程酶 AAG 的浓度为 0.91 mg/mL, 工程酶 JrAG 的浓度为 0.34 mg/mL, 工程酶 RAG 的浓度为 0.70 mg/mL。

2.4 各工程酶活力的测定

*p*NP 浓度的标准曲线方程为 $y=8.600\ 8x-0.005\ 1$ ($R^2=0.999\ 7$), 经计算 AAG、JrAG 和 RAG 比活力大小分别为 1.010 U/mg、1.945 U/mg、0.367 U/mg, JrAG 的比活力最高。

2.5 各工程酶转糖苷反应条件的优化

不同的温度条件下 (30 °C、35 °C、40 °C、45 °C、50 °C、55 °C 和 60 °C), 3 种 AG 转糖苷产生 AA-2G 的量如图 4 所示。AAG、RAG 在 50 °C 条件下 AA-2G 的产量最高, JrAG 在 40 °C 条件下 AA-2G 的产量最高。

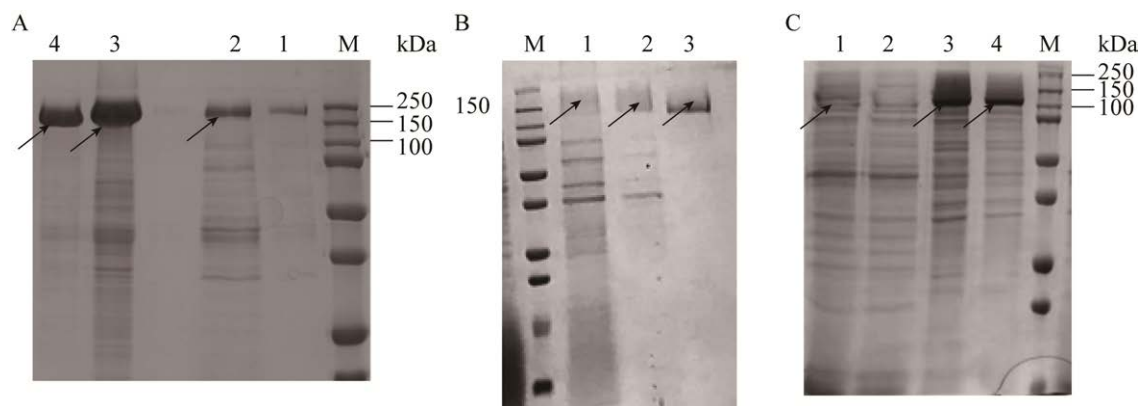


图 3 SDS-PAGE 检测粗酶液和镍柱纯化洗脱峰收集液

Figure 3 SDS-PAGE analysis of crude enzyme solution and elution peak collection solution for nickel column purification. Lane M: the standard protein; (A) Lane 1: the collection solution of AAG elution peak 2; lane 2: the crude enzyme solution of AAG; lane 3: the collection solution of AAG elution peak 1; lane 4: the collection solution of AAG elution peak 2. (B) Lane 1: the crude enzyme solution of JrAG; lane 2: the collection solution of JrAG elution peak 1; lane 3: the collection solution of JrAG elution peak 2. (C) Lane 1: the crude enzyme solution of RAG; lane 2: the collection solution of JrAG sample peak; lane 3: the collection solution of RAG elution peak 1; lane 4: the collection solution of RAG elution peak 2. The arrow-indicated band is the target protein.

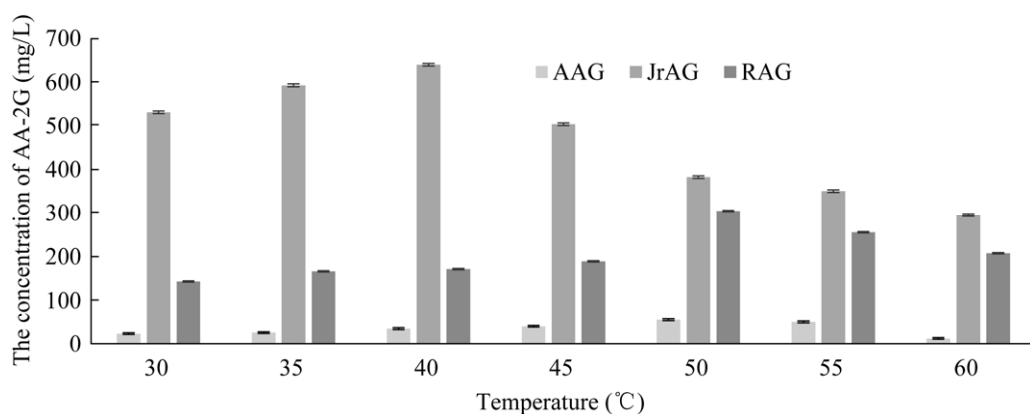


图 4 不同温度条件下 3 种 AG 转糖苷产生 AA-2G 的量

Figure 4 Yield of AA-2G catalyzed by different α -glucosidases under different temperature.

不同 pH 条件下 (3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5 和 6.0), 3 种 AG 转糖苷产生 AA-2G 的量如图 5 所示。AAG、JrAG、RAG 均在 pH 5.0 时产量最高。

在不同的麦芽糖浓度 (0–600 mmol/L) 下,

3 种 AG 转糖苷产生 AA-2G 的量如图 6 所示。AAG 在麦芽糖为 200 mmol/L 时产量最高, JrAG 在麦芽糖为 400–500 mmol/L 时产量最高(后续实验取 500 mmol/L 麦芽糖浓度)、RAG 在麦芽糖为 80 mmol/L 下产量最高。

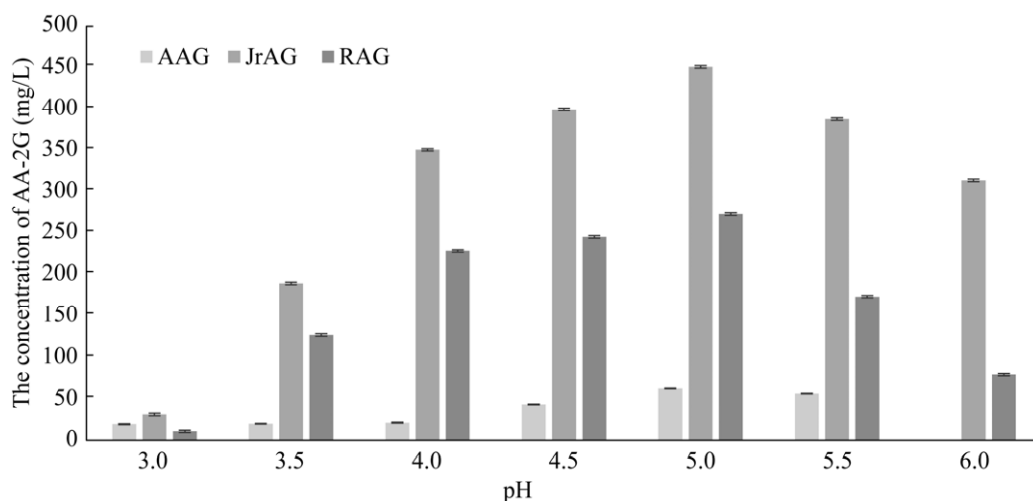


图5 不同 pH 下 3 种 AG 转糖苷产生 AA-2G 的量

Figure 5 Yield of AA-2G catalyzed by different α -glucosidases under different pH.

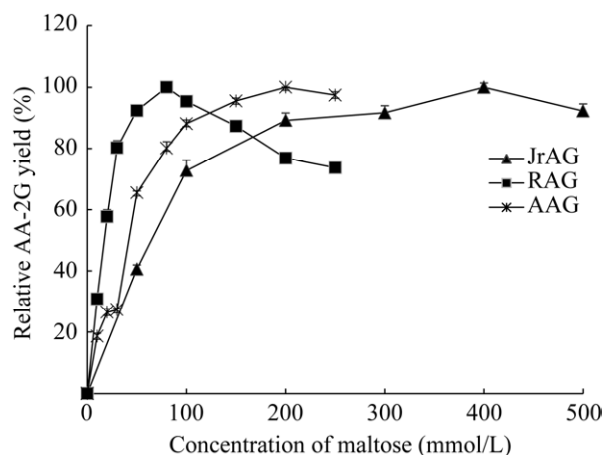


图6 各工程酶在不同麦芽糖浓度下的 AA-2G 产量

Figure 6 Yield of AA-2G catalyzed by different α -glucosidases under different maltose concentration.

在不同 L-AA 浓度 (0–300 mmol/L) 下, 3 种 AG 转糖苷产生 AA-2G 的量如图 7 所示。AAG 在 L-AA 为 80 mmol/L 下产量最高。JrAG、RAG 在 L-AA 为 100 mmol/L 下产量最高。有趣的是, 我们还发现在其他条件不变的情况下, 反应液中 L-AA 浓度达到一定量后, AG 催化合成 AA-2G 产率并不是进入平台, 而是随 L-AA

浓度增加, AA-2G 合成产率反而下降。这种现象的机理尚未清楚, 有待进一步研究。

2.6 各工程酶在最适条件下生成 AA-2G 产量和转糖率

3 种 AG 按照最优转糖苷反应条件进行反应。反应后的样品检测的 AA-2G 产量结果如表 2 所示, 比较发现 JrAG 合成 AA-2G 的产量最高。

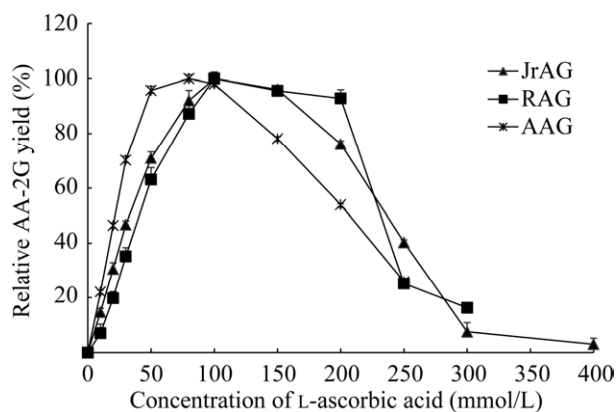


图7 各工程酶在不同 L-AA 浓度下的 AA-2G 产量

Figure 7 Yield of AA-2G catalyzed by different α -glucosidases under different L-AA concentration.

3 讨论

AA-2G 是 L-AA 的一种糖类衍生物^[20]。相较于 L-AA, AA-2G 的性质更加稳定, 不易被氧化, 同时兼具 L-AA 的活性功能。目前工业上使用环糊精葡聚糖转移酶 (cyclodextrin glucan transferase, CGTase) 合成 AA-2G, 当利用 α -环糊精作为底物时, 有较高的合成效率, 但是成本过高是其不容忽视的缺点。CGTase 利用其他底物时, 产生 AA-2G 的效率大幅度下降^[21-23]。虽然开展了许多关于环糊精葡聚糖转移酶分子改造的

研究, 但效果依旧不理想。除了 CGTase 外, 其他的酶类也可以合成 AA-2G。使用廉价的麦芽糖作为糖基供体的 AG 是一个具有工业化潜力的酶。本研究工作构建工程菌, 系统比较了黑曲霉、粳稻以及大鼠来源的 AG 的活力以及转糖率, 筛选进一步进行分子改造的 AG 候选酶。

在 AA-2G 的合成反应中, 温度、pH 及底物浓度是重要的反应参数。L-AA 在碱性或高温的条件下易分解, 合适的温度和 pH 有助于 L-AA 的稳定以及酶促反应的发生, 合适的底物浓度可以实现酶促反应效率的最大化。从表 3 可

表 2 最适条件下各工程酶的 AA-2G 产量和转糖率

Table 2 Yield and transglycosidation rate of AA-2G catalyzed by different α -glucosidases under optimal conditions

Engineered enzymes	AAG	JrAG	RAG
Temperature (°C)	50.0	40.0	50.0
pH	5.0	5.0	5.0
Concentration of L-ascorbic (mmol/L)	80.0	100.0	100.0
Concentration of maltose (mmol/L)	200.0	500.0	80.0
Specific activity (U/mg)	1.0	1.9	0.4
Concentration of produced AA-2G (mg/L)	153.1±1.2	2 577.2±32.1	861.0±5.0
Transglycosidation rate (%) [*]	0.5±0.0	7.6±0.1	2.5±0.1

*: the ratio of the amount of added L-ascorbic acid to the amount of AA-2G produced.

表 3 各个来源 AG 转糖苷产生 AA-2G 能力的比较

Table 3 Production of AA-2G by different α -glucosidases

Source	Reaction conditions	Yield of AA-2G (μ mol)	Transglycosidation rate ^a	Reference
<i>A. niger</i>	178 mmol maltose, 178 mmol L-AA. Na, pH 5.3, 50 °C, 5 h ^b	1.35 ^b	—	[17]
Rice seed	178 mmol maltose, 178 mmol L-AA. Na, pH 5.3, 50 °C, 5 h ^b	1.09 ^b	—	[17]
Rat intestine	178 mmol maltose, 178 mmol L-AA. Na, pH 5.3, 50 °C, 5 h ^b	0.30 ^b	—	[17]
<i>A. niger</i>	355 μ mol maltose, 355 μ mol AA. Na, pH 5.3, 50 °C, 5 h ^c	—	7.4%	[18]
Rat kidney	355 μ mol maltose, 355 μ mol AA. Na, pH 5.3, 50 °C, 5 h ^c	—	2.6%	[18]
<i>A. niger</i>	200 μ mol maltose, 80 μ mol L-AA, pH 5.0, 50 °C, 16 h ^d	0.09 ^d	0.5%	This work
Rice seed	500 μ mol maltose, 100 μ mol L-AA, pH 5.0, 40 °C, 16 h ^d	1.52 ^d	7.6%	This work
Rat	80 μ mol maltose, 100 μ mol L-AA, pH 5.0, 50 °C, 16 h ^d	0.51 ^d	2.5%	This work

^a: transglycosidation rate: the amount of AA-2G (mol)/the amount of L-AA (mol)×100%; ^b: total reaction mixture volume is 200 μ L; ^c: total reaction mixture volume is 2 mL; ^d: total reaction mixture volume is 1 mL; —: not mentioned.

看出,文献报道 3 种 AG 的各反应参数不完整,其中只有 Yamamoto 等^[18]报道的黑曲霉和大鼠来源的 AG 提及转糖率。本研究经过反应条件优化后,系统评价了 AAG、JrAG 和 RAG 合成 AA-2G 的条件、产量和转糖率,表明 JrAG 合成 AA-2G 的产量和转糖率表现最好。从 AA-2G 的产量分析,在最适条件下的 JrAG 和 RAG 合成 AA-2G 的浓度分别为 2 577.2 mg/L 和 861.0 mg/L,在 1 mL 的反应体系中,AA-2G 的产量分别达到 1.52 μmol 和 0.51 μmol ,转糖率分别达到 7.6% 和 2.5%。

JrAG 以廉价的麦芽糖作为糖基供体合成 AA-2G,虽然转糖率不及环糊精葡聚糖转移酶,但其合成 AA-2G 的副产物少,下游产物分离简便。未来可以以 JrAG 为出发酶,通过理性设计、非理性设计和蛋白质工程等手段,对该酶进行分子改造构建水解活性减弱或者缺失的突变体,从而进一步提高 AA-2G 的产率,用于工业化应用。本研究也为开展 AG 在合成 AA-2G 的相关研究提供了有意义的参考。

REFERENCES

- [1] Liang WJ, Johnson D, Jarvis SM. Vitamin C transport systems of mammalian cells. *Mol Membr Biol*, 2001, 18(1): 87-95.
- [2] Jacob RA, Sotoudeh G. Vitamin C function and status in chronic disease. *Nutr Clin Care*, 2002, 5(2): 66-74.
- [3] Sung YK, Hwang SY, Cha SY, et al. The hair growth promoting effect of ascorbic acid 2-phosphate, a long-acting vitamin C derivative. *J Dermatol Sci*, 2006, 41(2): 150-152.
- [4] Watanabe Y, Fang X, Minemoto Y, et al. Suppressive effect of saturated acyl L-ascorbate on the oxidation of linoleic acid encapsulated with maltodextrin or gum Arabic by spray-drying. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(14): 3984-3987.
- [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-alpha-glucoside during *in vitro* maturation. *Biol Reprod*, 2001, 65(6): 1800-1806.
- [6] Miyai E, Yanagida M, Akiyama J, et al. Ascorbic acid 2-O-alpha-glucoside, a stable form of ascorbic acid, rescues human keratinocyte cell line, SCC, from cytotoxicity of ultraviolet light B. *Biol Pharm Bull*, 1996, 19(7): 984-987.
- [7] 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 Pharmacobiodyn*, 1990, 13(11): 688-695.
- [8] Huang WY, Lee PC, Huang LK, et al. Stability studies of ascorbic acid 2-glucoside in cosmetic lotion using surface response methodology. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23(6): 1583-1587.
- [9] Toyoda-Ono Y, Maeda M, Nakao M, et al. 2-O-(beta-D-glucopyranosyl) ascorbic acid, a novel ascorbic acid analogue isolated from lycium fruit. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(7): 2092-2096.
- [10] 岳振峰, 陈小霞, 彭志英. α -葡萄糖苷酶研究现状及进展. *食品与发酵工业*, 2000, 26(3): 63-67, 98.
Yue ZF, Chen XX, Peng ZY. Status quo and advance of research on α -glucosidase. *Food Ferment Ind*, 2000, 26(3): 63-67, 98 (in Chinese).
- [11] 王框. 表面展示 α -葡萄糖苷酶毕赤酵母的固定及其在低聚异麦芽寡糖合成中的应用[D]. 广州: 华南理工大学, 2018.
Wang K. Immobilization of *Pichia pastoris* surface displayed with α -glucosidase and its application in the synthesis of isomaltooligosaccharides[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2018 (in Chinese).
- [12] 于岚. 黑曲霉 α -葡萄糖苷酶基因在大肠杆菌中的克隆与表达[D]. 南宁: 广西大学, 2006.
Yu L. Cloning and expression of an α -glucosidase gene from *Aspergillus niger* in *Escherichia coli*[D]. Nanning: Guangxi University, 2006 (in Chinese).
- [13] 毕金峰, 李春红, 陈天金. α -转移葡萄糖苷酶的纯化及酶学特性研究. *食品与发酵工业*, 2004, 30(8): 60-63.
Bi JF, Li CH, Chen TJ. Purification of α -transglucosidase and its characteristics. *Food Ferment Ind*, 2004, 30(8): 60-63 (in Chinese).
- [14] Han RZ, Liu L, Li JH, et al. Functions, applications and production of 2-O-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 95(2): 313-320.
- [15] Yamamoto I, Muto N, Miyake T. Alpha-glycosyl-

- L-ascorbic acid, preparation and uses: US, 5767149. 1998-06-16.
- [16] Li ZJ, Han HJ, Wang B, et al. Transglucosylation of ascorbic acid to ascorbic acid 2-glucoside by a truncated version of α -glucosidase from *Aspergillus niger*. J Food Biochem, 2017, 41(6): e12432.
- [17] Muto N, Suga S, Fujii K, et al. Formation of a stable ascorbic acid 2-glucoside by specific transglucosylation with rice seed α -glucosidase. Agric Biol Chem, 1990, 54(7): 1697-1703.
- [18] Yamamoto I, Muto N, Nagata E, et al. Formation of a stable L-ascorbic acid α -glucoside by mammalian α -glucosidase-catalyzed transglucosylation. Biochim Biophys Acta, 1990, 1035(1): 44-50.
- [19] 刘宇, 刘畅, 刘石生. 变性剂对橡胶籽中 β -葡萄糖苷酶结构及酶活的影响. 现代食品科技, 2016, 32(12): 120-124, 19.
- Liu Y, Liu C, Liu SS. Effect of denaturants on the structure and enzyme activity of β -glucosidase from rubber seeds. Mod Food Sci Technol, 2016, 32(12): 120-124, 19 (in Chinese).
- [20] Jun HK, Bae KM, Kim SK. Production of 2-O- α -d-glucopyranosyl L-ascorbic acid using cyclodextrin glucanotransferase from *Paenibacillus* sp.. Biotechnol Lett, 2001, 23(21): 1793-1797.
- [21] 盛露菲. *Lactobacillus fermentum* 4,6- α -葡萄糖基转移酶的克隆表达、酶学性质及应用研究[D]. 无锡: 江南大学, 2021.
- Sheng LF. Cloning expression, enzyme properties and application of *Lactobacillus fermentum* 4,6- α -glucanotransferase[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021 (in Chinese).
- [22] Cheng J, Wu D, Chen S, et al. High-level extracellular production of α -cyclodextrin glycosyltransferase with recombinant *Escherichia coli* BL21 (DE3). J Agric Food Chem, 2011, 59(8): 3797-3802.
- [23] Tao XM, Su LQ, Wu J. Current studies on the enzymatic preparation 2-O- α -d-glucopyranosyl-L-ascorbic acid with cyclodextrin glycosyltransferase. Crit Rev Biotechnol, 2019, 39(2): 249-257.

(本文责编 郝丽芳)