

环糊精葡萄糖基转移酶的分子改造及其在合成 α -熊果苷中的应用

刘嘉琦^{1,2}, 谭明^{2*}, 董钧^{1,2}, 刘以银², 刘珊娜^{1*}, 吴洽庆²

1 天津农学院食品科学与生物工程学院, 天津 300392

2 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308

刘嘉琦, 谭明, 董钧, 刘以银, 刘珊娜, 吴洽庆. 环糊精葡萄糖基转移酶的分子改造及其在合成 α -熊果苷中的应用[J]. 生物工程学报, 2024, 40(6): 1845-1855.

LIU Jiaqi, TAN Ming, DONG Jun, LIU Yiyin, LIU Shanna, WU Qiaqing. Molecular modification of cyclodextrin glucosyltransferase and its application in the synthesis of α -arbutin[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(6): 1845-1855.

摘要: α -熊果苷在化妆品和医药领域具有重要应用价值, 但从植物组织中提取产率低, 极大地限制了其应用。本研究利用戈特沙尔克厌氧分支杆菌(*Anaerobranca gottschalkii*)来源的环糊精葡萄糖基转移酶(cyclodextrin glucosyltransferase, CGTase), 以麦芽糊精为供体, 对苯二酚为受体, 催化合成 α -熊果苷。通过定点饱和突变和定点突变筛选到突变体 AgCGTase-F235G-N166H, 活力是野生型的 3.48 倍。通过优化反应 pH、温度、对苯二酚添加量, 转化率在最优反应条件下达到 63%。综上所述, 本研究成功构建了一株能高效合成 α -熊果苷并具有较高苯二酚转化率的菌株, 对于降低 α -熊果苷工业化的生产成本, 提高产物的转化率方面具有重要的应用潜力。

关键词: 环糊精葡萄糖基转移酶; α -熊果苷; 定点突变; 麦芽糊精; 对苯二酚

Molecular modification of cyclodextrin glucosyltransferase and its application in the synthesis of α -arbutin

LIU Jiaqi^{1,2}, TAN Ming^{2*}, DONG Jun^{1,2}, LIU Yiyin², LIU Shanna^{1*}, WU Qiaqing²

1 College of Food Science and Bioengineering, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300392, China

2 Tianjin Institute of Industrial Biology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

Abstract: α -arbutin has important applications in cosmetics and medicine. However, the extraction yield from plant tissues is relatively low, which restricts its application value. In this

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFC2102000)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2102000).

*Corresponding authors. E-mail: TAN Ming, tan_m@tib.cas.cn; LIU Shanna, lsn_nxy@aliyun.com

Received: 2023-10-11; Accepted: 2024-01-17

study, we investigated the synthesis of α -arbutin using maltodextrin as the donor and hydroquinone as the acceptor, using a cyclodextrin glucosyltransferase (CGTase) from *Anaerobranca gottschalkii*. We performed site-saturated and site-directed mutagenesis on AgCGTase. The activity of the variant AgCGTase-F235G-N166H was 3.48 times higher than that of the wild type. Moreover, we achieved a conversion rate of 63% by optimizing the reaction pH, temperature, and hydroquinone addition amount. Overall, this study successfully constructed a strain with improved conversion rate for the synthetic production of α -arbutin and hydroquinone. These findings have significant implications for reducing the industrial production cost of α -arbutin and enhancing the conversion rate of the product.

Keywords: cyclodextrin glucosyltransferase; α -arbutin; site-directed mutagenesis; maltodextrin; hydroquinone

熊果苷,是葡萄糖和对苯二酚(hydroquinone, HQ)通过糖苷键连接而成的一种糖苷类化合物,主要存在于熊果属的灌木植物熊果叶子中^[1]。熊果苷能够显著地抑制酪氨酸酶活性,从而阻断多巴及多巴醌的合成,抑制黑色素的合成,达到美白的效果^[2],广泛应用于化妆品和医药领域^[3-7]。根据熊果苷构型的差异可分为 α 和 β 两种类型,由于 α -熊果苷的美白效果以及安全性都优于 β -熊果苷,因此 α -熊果苷应用更加广泛^[5-7]。目前 α -熊果苷的制备方法主要有植物提取法、化学合成法、酶合成法等。植物提取法面临提取产率低等问题,不适合工业化生产^[8]。化学合成 α -熊果苷比较难,易形成 α -熊果苷和 β -熊果苷的混合物,分离难度大^[9]。而酶合成法具有高效、绿色环保等特点,成为 α -熊果苷合成的主要研究方向。

酶转化法主要是利用糖基转移酶的转糖基作用,应用较广泛的酶有环糊精糖基转移酶(cyclodextrin glucosyltransferase, CGTase)、蔗糖磷酸化酶(sucrose phosphorylase, SPase)和淀粉蔗糖酶(amylosucrase, AS)^[10-12]。CGTase^[13]可以进行环化、歧化、偶合和水解反应等多种反应^[14-16],常被用于催化转糖基反应,该酶能特异性地以麦芽糊精和对苯二酚作为底物,合成 α -熊果苷。

相比其他用于催化合成 α -熊果苷的酶,环糊精葡萄糖基转移酶底物专一性较广,转葡萄糖基过程不需要耗能^[17]。而CGTase研究中存在的主要问题是发酵产酶水平偏低,酶的热稳定性较差,而且酶的应用性研究工作较为薄弱^[18]。SPase是第一个被用于研究生物转化合成 α -熊果苷的酶,在催化过程中,SPase并不需要使用二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)、二磷酸尿苷(uridine diphosphate, UDP)这类昂贵的物质作为前体^[19],该酶的催化活力也不依赖于辅因子^[20]。但大部分野生菌株来源的SPase转对苯二酚合成 α -熊果苷的转化效率较低,且蛋白质在异源表达时的表达水平较低^[21]。使用AS可以在低浓度对苯二酚的情况下获得更高的 α -熊果苷摩尔产率^[22],但淀粉蔗糖酶活较低、 α -熊果苷产量低^[23]。

本研究通过同源建模、分子对接等技术,对戈特沙尔克厌氧分枝杆菌(*Anaerobranca gottschalkii*)来源的CGTase酶的活性中心中能够与受体结合的氨基酸位点进行分子改造,以期提高CGTase酶的催化效率^[24-25],通过改造获得突变体AgCGTase-F235G-N166H催化合成 α -熊果苷产量为15.4 g/L,对苯二酚转化率达到了63%。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂

酵母粉、蛋白胨、琼脂粉、麦芽糊精[葡萄糖值(dextrose equivalent, DE) 13–17, 聚合度(degree of polymerization, DP) 6.5–8.5]、对苯二酚、考马斯亮蓝 G250、乙醇、牛血清蛋白和磷酸等购自国药控股上海生物医药有限公司。*Taq* DNA 聚合酶、Phanta Max Super-Fidelity DNA 聚合酶和 One Step Cloning Kit 试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司。PCR Clean Up 试剂盒和质粒小提试剂盒购自 Axygen (上海)公司。T4 DNA 连接酶购自 Thermo (上海)公司。限制性内切酶和 *Dpn* I 购自 New England Biolabs (上海)公司。

1.2 菌株及质粒

环糊精葡萄糖基转移酶 CGTase 基因 (GenBank 登录号: WP_091349751.1)由苏州金唯智生物科技有限公司进行密码子优化及合成, 表达质粒载体为 pET-28a(+), 克隆位点为 *Nco* I 和 *Xho* I, 将重组质粒 pET-28a(+)-AgCGTase 转化至大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21(DE3) 中。测序验证的菌株储存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中。

1.3 突变文库的构建

以重组质粒 pET-28a(+)-AgCGTase 为出发质粒, 对 141、235、300、301、302、327 和 330 位点进行定点饱和突变, 对 166、522、529、385 和 700 进行定点突变, 采用全质粒 PCR 方法进行突变, 将 PCR 产物使用 *Dpn* I 进行模板质粒的切除, 然后加入到 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞中, 冰浴 30 min, $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中热激 90 s, 冰浴 2 min, 加入 600 μL 的 LB 培养基, 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 摇床中培养 1 h; 涂布于含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素抗性的 LB 平板, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下培养过夜。挑取单菌落接种到 LB 液体培养基中, 培养 8 h, 交由苏州金唯智生物科技有限公司进行测序。

1.4 CGTase 野生型及突变体的表达

将获得的 CGTase 野生型及突变体接种至 5 mL 含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素抗性的 LB 液体培养基, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 12 h, 再以 1% (体积分数) 接种量接种至 100 mL 含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄霉素抗性的 LB 液体培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养至菌体 OD_{600} 达 0.6–0.8, 加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 16 h 后, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 20 min, 弃去上清液, 收集菌体沉淀, 用 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 6.5) 洗涤 2 次, 即获得含 CGTase 野生型或突变体的湿菌体, 将湿菌体采用 25 mL 100 mmol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH 6.5) 进行重悬, 在冰水混合物上超声破碎 5 min, 超声破碎条件: 功率为 200 W, 破碎 1 s, 暂停 2 s, 获得粗酶液。

1.5 CGTase 野生型及突变体的酶活测定

酶活反应体系: 1 mL 反应体系中包括 250 μL 的 60 g/L 麦芽糊精, 250 μL 的 10 g/L 对苯二酚, 250 μL 环糊精葡萄糖基转移酶粗酶液及 250 μL 0.1 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 6.5), $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应 2 h, 终止反应, 样品离心稀释进行 HPLC 分析。

HPLC 检测方法: 色谱柱采用 Innoval ODS-2 C18 柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm), 流动相由体积比为 15:85 (体积比) 的甲醇:水溶液组成, 流速为 1.0 mL/min, 紫外检测波长为 287 nm, 柱温为 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 进样量为 10 μL 。取粗酶液进行纯化, 采用 Ni 柱一步亲和层析法。采用 Bradford 法^[26] 测定蛋白浓度, 使用牛血清蛋白作为标准品。

一个酶活单位 U 定义为: 在 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、pH 6.5 条件下每分钟每生成 1 μmol 的 α -熊果苷所需要的酶量。环糊精葡萄糖基转移酶比酶活定义为每 mg 蛋白质的酶活。比酶活计算公式如式(1)所示。

$$\text{比酶活} = \frac{\text{酶活力}}{\text{蛋白浓度}} \quad (1)$$

式(1)中: 比酶活 (U/mg), 酶活力 (U/mL), 蛋白浓度 (mg/mL)。

1.6 同源建模与分子对接

通过在蛋白质数据库(protein data bank, PDB) 中进行搜索,以来源于 *Evansella clarkii* 的 CGTase (PDB ID: 4JCM) 的晶体结构作为模板,使用 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 进行同源建模^[27]。使用 Autodock 进行底物与 CGTase 结构的对接。结构图片展示采用 Pymol。

1.7 反应体系的优化

测定 AgCGTase 野生型及突变体在不同 pH 值(磷酸钠盐缓冲液, pH 6.0–8.0)的缓冲液中、不同反应温度下(40–70 °C)及不同对苯二酚的添加量中(与麦芽糊精的质量比 12:1、10:1、8:1、6:1、4:1)的反应体系中 α -熊果苷。

1.8 底物特异性分析

为了探究环糊精葡萄糖基转移酶突变体对不同底物的活力,以催化合成 2-O- α -D-吡喃葡萄糖基-L-抗坏血酸(2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid, AA-2G)为研究目标,可溶性淀粉为糖基供体,维生素 C 为受体,催化合成 AA-2G。1 mL 反应体系分别包括 250 μ L 的 50 g/L 可溶性淀粉, 250 μ L 的 50 g/L 维生素 C, 适量的环糊精葡萄糖基转移酶粗酶液及 0.1 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.0)。40 °C 反应 2 h, 终止反应, 样品离心稀释进行 HPLC 分析, 检测方法同 1.5。

2 结果与分析

2.1 CGTase 突变位点的选择

将同源建模获得的 CGTase 的晶体结构与麦芽糊精、对苯二酚进行分子对接, 得到麦芽糊精、对苯二酚附近的一些氨基酸位点, 并通过与不同来源的 CGTase 比对, 排除掉一些保守及功能性氨基酸^[28-29]位点, 最终选择 141、235、300、301、302、327 和 330 位点进行定点饱和突变, 如图 1 所示。同时, 通过 PROSS 策略

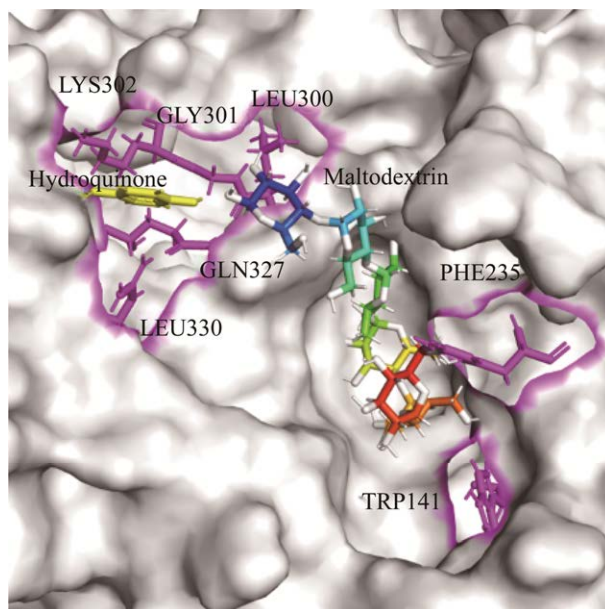


图 1 突变位点的选择

Figure 1 Selection of mutation sites.

(<http://PROSS.weizmann.ac.il>), 预测出温度稳定性提高的突变体 N166H、I522L、I529V、G385A 和 Q700E, 对这些位点进行定点突变。

2.2 AgCGTase 突变文库的筛选

对 141、235、300、301、302、327 和 330 进行定点饱和突变, 对 N166H、I522L、I529V、G385A 和 Q700E 进行定点突变, 如图 2 所示, 通过对这些位点的筛选, 最终筛选到突变体 F235G、N166H 酶活力最高, 其粗酶液中酶蛋白浓度分别为 1.69 mg/mL 和 1.84 mg/mL, 对应其比酶活力分别为 431.0 U/mg 和 204.0 U/mg, 分别是原始酶(175.9 U/mg)的 2.45 倍和 1.16 倍。如图 3 所示, 通过将 F235G、N166H 进一步地组合突变, 最终获得的突变体 AgCGTase-F235G-N166H 粗酶液中蛋白浓度为 1.55 mg/mL, 比酶活力为 612.1 U/mg, 是原始酶的 3.48 倍。

2.3 反应体系的优化

2.3.1 pH 对反应体系的影响

pH 的变化可能导致酶分子表面结构的变

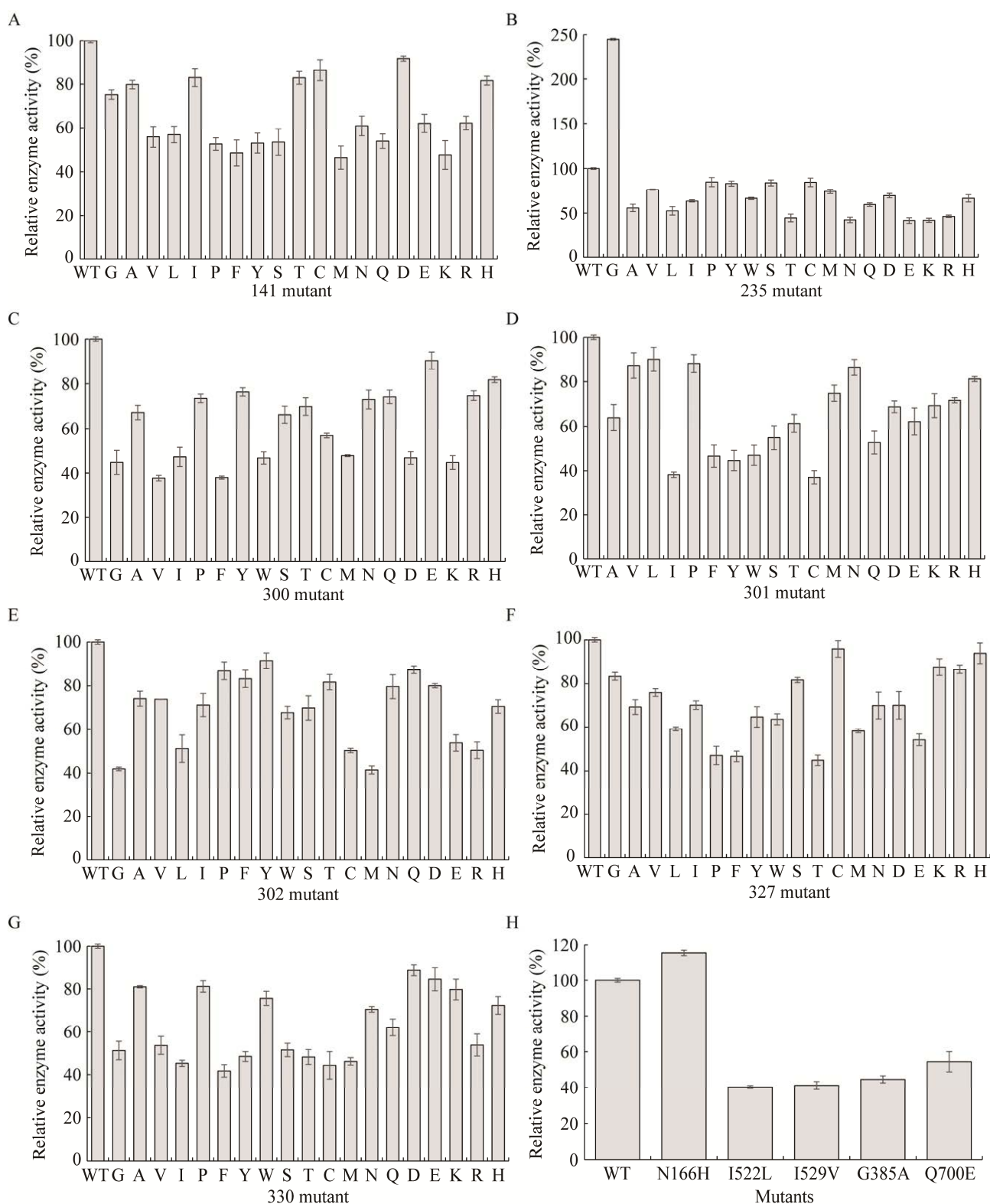


图 2 定点饱和突变(A-G)及定点突变(H)结果

Figure 2 Site-saturation mutation (A-G) and site-directed mutation (H) results.

化, 进而导致酶催化能力的变化, 为了研究突变体 AgCGTase-F235G-N166H 的最适反应 pH, 在不同 pH 值(6.0–8.0)磷酸钠盐缓冲液中, 测定突变体的活力, 结果如图 4 所示, AgCGTase-F235G-N166H 最适的反应 pH 为 6.5, 随着 pH 的升高和下降, AgCGTase-F235G-N166H 酶活力均呈下降趋势, 所以确定 AgCGTase-F235G-N166H 最适反应 pH 为 6.5。

2.3.2 温度对反应体系的影响

设置了不同的反应温度(40–70 °C), 研究温

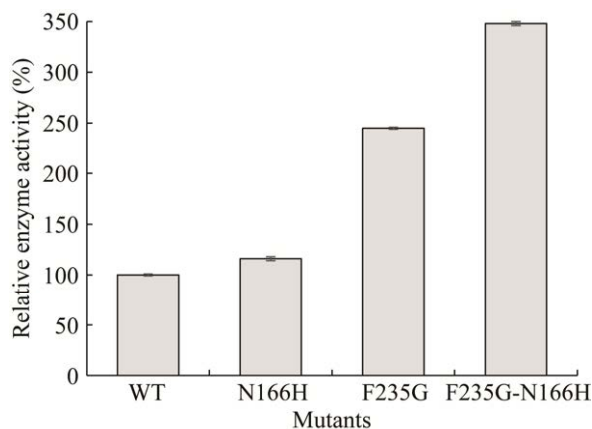


图 3 不同突变体酶活的比较

Figure 3 Comparison of the enzyme activity of different mutants.

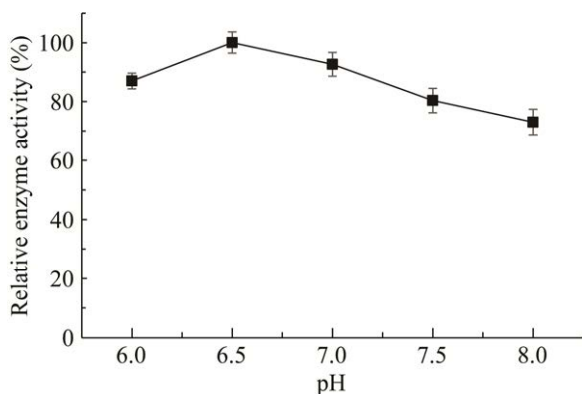


图 4 pH 对突变体 AgCGTase-F235G-N166H 反应的影响

Figure 4 Effect of pH on the AgCGTase-F235G-N166H reaction.

度对 AgCGTase-F235G-N166H 酶活的影响。结果如图 5 所示, AgCGTase-F235G-N166H 的最适反应温度为 60 °C, 当温度低于 60 °C 时, 突变体酶活力逐渐降低, 当温度为 50 °C 时, 突变体酶活力降为 60 °C 的 60% 左右, 随着温度的升高, 当温度高于 60 °C 时, 突变体酶活力逐渐降低, 主要原因是温度升高, 酶的空间结构会遭到破坏, 当温度为 70 °C 时, 突变体酶活力降为 60 °C 的 50% 左右, 并且温度过高会导致对苯二酚发生氧化, 影响反应的进行。

2.3.3 对苯二酚的添加量对反应体系的影响

对苯二酚作为反应过程中的糖基受体, 其添加量对反应转化率起到至关重要的作用, 为了研究反应体系中最适对苯二酚添加量, 设计对苯二酚添加浓度梯度, 结果如图 6 所示, 随着对苯二酚添加量的增加, 酶活力呈上升趋势。当对苯二酚与麦芽糊精的摩尔比为 6:1 时, 酶活力最高, 如果继续加大对苯二酚的浓度, 转化率反而下降。可能是对苯二酚浓度过高会对酶的结构产生一定的影响, 进而影响酶的活力。

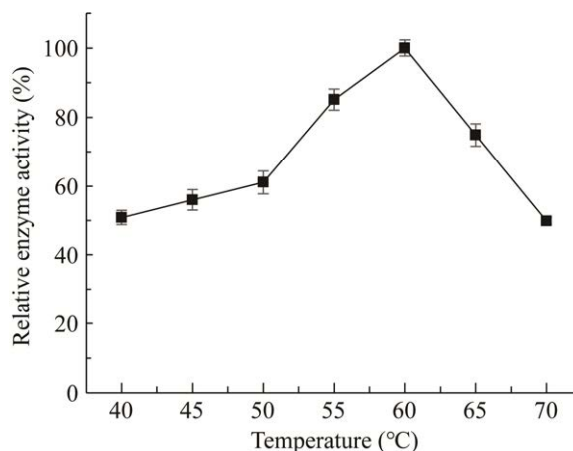


图 5 温度对突变体 AgCGTase-F235G-N166H 反应的影响

Figure 5 Effect of temperature on the AgCGTase-F235G-N166H reaction.

2.4 AgCGTase 野生酶与突变体的底物特异性分析

为了验证突变体 AgCGTase-F235G-N166H 对不同底物的催化能力,以催化合成 AA2G 为研究目标,以 50 g/L 可溶性淀粉、50 g/L 维生素 C 作为底物,分别以 234 μ L 突变体粗酶液(酶蛋白浓度 1.55 mg/mL)和 250 μ L 原始酶粗酶液(酶蛋白浓度 1.45 mg/mL)作为催化剂,40 $^{\circ}$ C 反应 2 h,结果如图 7 所示,突变体 AgCGTase-F235G-N166H 催化合成 AA2G 的活力是野生型的 2.1 倍。突变体 AgCGTase-F235G-N166H 对

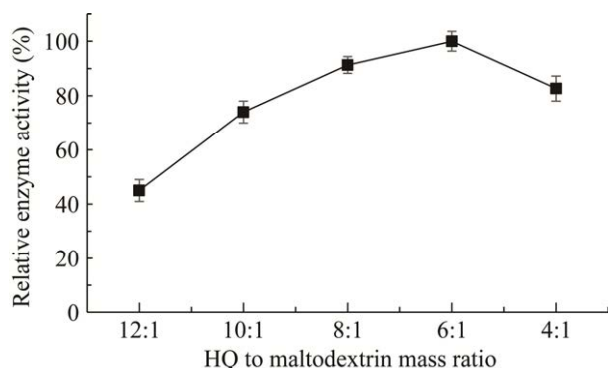


图 6 对苯二酚添加量对突变体 AgCGTase-F235G-N166H 反应的影响

Figure 6 Effect of hydroquinone addition on the AgCGTase-F235G-N166H reaction.

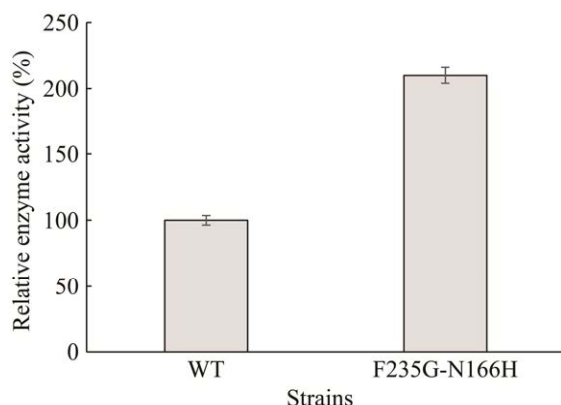


图 7 对 AA2G 的酶活比较

Figure 7 Comparison of enzyme activity of AA2G.

于催化可溶性淀粉和维生素 C 生成 AA2G 也表现出明显的优势。

2.5 AgCGTase 突变体在合成 α -熊果苷中的应用

野生型 AgCGTase 和突变体 AgCGTase-F235G-N166H 的对苯二酚转化率结果如图 8 所示,在 60 $^{\circ}$ C 下反应 24 h,突变体 AgCGTase-F235G-N166H 产 α -熊果苷的产量达到了 15.4 g/L,同时,相比于野生型 AgCGTase 只有 21% 的反应转化率,AgCGTase-F235G-N166H 反应转化率达到 63%,突变体 AgCGTase-F235G-N166H 催化效率较野生型有了显著的提高。

2.6 AgCGTase 突变体与麦芽糊精、对苯二酚的分子对接

同源建模与分子对接结果如图 9 所示,235 位点位于活性催化中心附近,235 位点苯丙氨酸突变为甘氨酸,侧链空间结构变小,因此推测突变位点氨基酸残基的改变与空间位阻有关,突变体的改变导致位阻较少,底物麦芽糊精更方便进出催化口袋。N166H 突变位点催化效率提高原因可能是因为蛋白质温度稳定性增

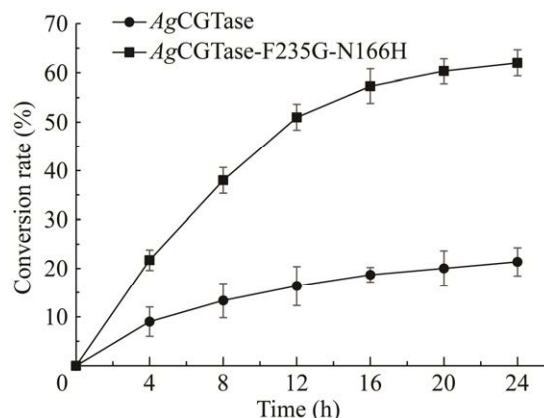


图 8 AgCGTase 和 AgCGTase-F235G-N166H 催化合成 α -熊果苷反应进程

Figure 8 Conversion profile of AgCGTase and AgCGTase-F235G-N166H catalyzed synthesis of α -arbutin.

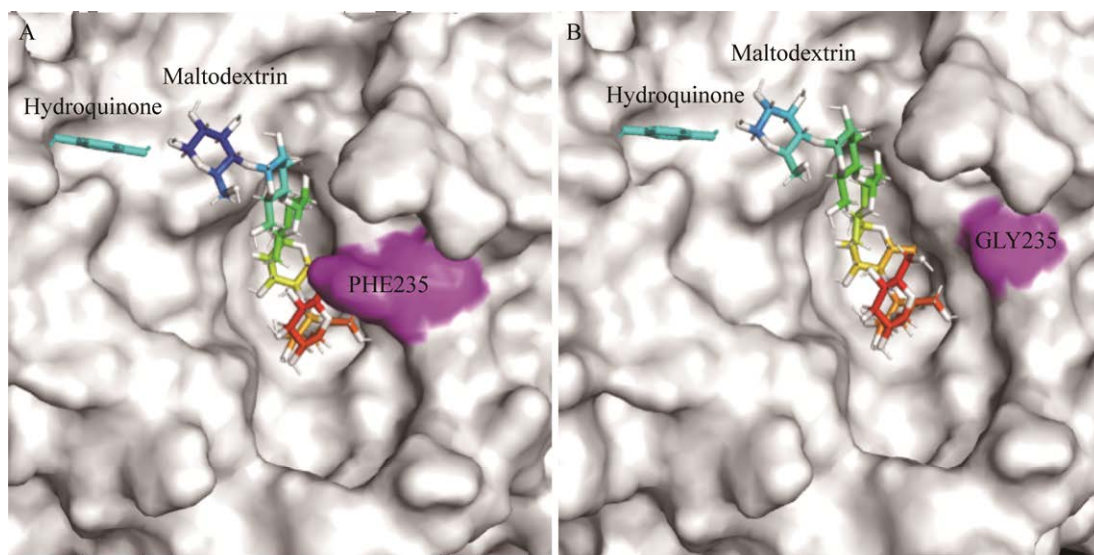


图9 AgCGTase (A)和AgCGTase-F235G-N166H (B)与底物分子对接结果及分析图

Figure 9 Molecular docking results of substrates with AgCGTase (A) and AgCGTase-F235G-N166H (B).

强, 蛋白质折叠的自由能(ΔG)是反映蛋白质热稳定性的一般指标, 酶突变体的 ΔG 越小, 稳定性越高。对 166 点处突变后折叠自由能的变化值 [$\Delta\Delta G = \Delta G(N166H) - \Delta G(WT)$] = -1.46 进行分析, 发现当 166 点 N 突变为 H 时, ΔG 变小, 表明稳定性增强。

3 讨论与结论

近年来, CGTase 酶常用于生产 α -熊果苷, 可以通过筛选、诱变、选育等多种方式获得野生型高产菌株, 也可在获取 CGTase 酶的序列的基础上利用基因工程构建高产 CGTase 酶的重组大肠杆菌, 通过该技术可得到酶活力高、稳定性好的 CGTase 酶, 同时有助于下游催化反应的进行。经由突变等方式, 也可使酶活得到有效的提高。通过对构建好的菌株利用定点突变技术来研究 CGTase 酶, 对酶结构及其与底物的作用机理进一步研究或通过分子结构的改造使其具有更高的效率及应用前景。郭永华^[30]通过易错 PCR 技术和 96 孔板筛选系统得到两株

可溶性表达和胞外酶活性明显提高的 CGTase 突变体, 其中 ep-9 突变体胞外酶活是原来的 2.18 倍。凌凯^[31]对来源于 *Bacillus cereus* 的 CGTase 的 43 位氨基酸进行定点突变, 其中 H43W 突变体酶活力是原始酶的 2.38 倍。

本研究采用提高催化活性和温度稳定性相结合的策略, 采用定点饱和突变和定点突变的方法对来源于 *Anaerobranca gottschalkii* 的 CGTase 酶进行蛋白质工程改造, 筛选得到活性和稳定性提升的双突变体 AgCGTase-F235G-N166H。通过优化反应体系, 确定突变体最适反应温度为 60 °C, 最适 pH 为 6.5, 对苯二酚最适添加量是与麦芽糊精的质量比为 6:1。在最适反应条件下, 催化合成 α -熊果苷产量为 15.4 g/L, 对苯二酚转化率达到 63%, 这一结果表明 AgCGTase-F235G-N166H 在合成 α -熊果苷方面具有巨大的潜力。酶工程法作为立体选择性较高的合成 α -熊果苷的新型技术, 工艺简单、合成效率较高、流体选择性好, 发展前景较好^[32]。已有多项研究表明, 通过分子改造或优化反应

条件可以有效提高 α -熊果苷的产量及对苯二酚的转化率。赵如奎等^[17]通过 CGTase 酶来催化合成 α -熊果苷, 通过优化催化条件, α -熊果苷的产量为 3.17 g/L, 对苯二酚转化率为 7.77%。张文蕾等^[33]利用定点突变技术对 *A. gottschalkii* CGTase 进行分子改造, 得到 1 个突变体 Y299A, 在最优的反应条件下突变体的对苯二酚转化率可达 40%。陈显玲等^[34]分离筛选出一株高产 SPase 的菌株 SLLSM2, 在最优条件下, α -熊果苷合成摩尔转化率达 44.09%。王秀捧等^[35]采用细胞催化法生产 α -熊果苷, 在温度 25 °C, 对苯二酚浓度 30 mmol/L, 蔗糖和对苯二酚摩尔比为 20:1, 反应时间为 45 h, 转速为 160 r/min, 细胞浓度为 85 g/L, 缓冲溶液为 pH 8.0、25 mmol/L 的磷酸缓冲溶液的条件下, α -熊果苷转化率达 86.7%, 这种方法具有含杂质少, 分离纯化步骤少, 生产成本低的优点。也有研究表明, 采用发酵罐发酵, 且在最优试验条件下, α -熊果苷的产量可达到 30.6 g/L, 摩尔转化率达到 93.6%, 是可以实现大规模生产 α -熊果苷的有效且廉价的方法^[36]。除对菌株中的酶的特性进行试验外, 未来还可采用细胞催化法、发酵罐等多种方式进一步提高 α -熊果苷的产量及转化率, 为进一步实现大规模工业化生产 α -熊果苷提供方法。本研究所得菌株, 在合成 α -熊果苷及对苯二酚的转化率方面具有一定的优势。通过多种方式获得具有高酶活且稳定的 CGTase 对降低 α -熊果苷工业化生产成本, 提高产物的转化率具有重要的作用。

REFERENCES

- [1] 孙雷, 姚德立, 姚德坤, 吴海龙. α -熊果苷的研究进展[J]. 中国林副特产, 2016(3): 87-90.
SUN L, YAO DL, YAO DK, WU HL. Research progress of alpha arbutin[J]. Forest by-Product and Speciality in China, 2016(3): 87-90 (in Chinese).
- [2] 胡美荣, 彭颖, 陶勇. 产 α -熊果苷的基因工程菌及其构建方法和应用: CN201510171160.7[P]. 2019-05-28.
HU MR, PENG Y, TAO Y. Genetically engineered bacteria producing α -arbutin, construction method and application thereof: CN201510171160.7[P]. 2019-05-28 (in Chinese).
- [3] 刘晓婷, 王鑫璇. 熊果苷的药理作用及机制研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(2): 309-316.
LIU XT, WANG XX. Research progress on the pharmacological action and mechanism of arbutin[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(2): 309-316 (in Chinese).
- [4] MA J, CHEN S, LI YY, WU X, SONG ZH. Arbutin improves gut development and serum lipids via *Lactobacillus intestinalis*[J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 948573.
- [5] FAHIM NH, MONTAZER M, HEMMATINEJAD N, TOLIYAT T, RAD MM. Microbial cellulosic pad encompassing alpha-arbutin in Tragacanth gum as the controlled delivery system[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 232: 123292.
- [6] HATEM S, ELKHESHEN SA, KAMEL AO, NASR M, MOFTAH NH, RAGAI MH, ELEZABY RS, EL HOFFY NM. Functionalized chitosan nanoparticles for cutaneous delivery of a skin whitening agent: an approach to clinically augment the therapeutic efficacy for melasma treatment[J]. Drug Delivery, 2022, 29(1): 1212-1231.
- [7] LIU F, QU LK, LI H, HE JX, WANG L, FANG YM, YAN XQ, YANG QS, PENG B, WU W, JIN LB, SUN D. Advances in biomedical functions of natural whitening substances in the treatment of skin pigmentation diseases[J]. Pharmaceutics, 2022, 14(11): 2308.
- [8] 张明光, 胡立松, 王石发. 熊果苷的合成方法及其检测研究进展[J]. 化工时刊, 2006, 20(12): 61-64.
ZHANG MG, HU LS, WANG SF. Development of arbutin synthesis and its determination[J]. Chemical Industry Times, 2006, 20(12): 61-64 (in Chinese).
- [9] 陈彩霞, 晏礼明, 陶勇, 葛书华. 一种从 α -熊果苷发酵液中分离 α -熊果苷的方法: CN106317136B[P]. 2018-12-25.
CHEN CX, YAN LM, TAO Y, GE SH. Method for separating alpha-arbutin from alpha-arbutin broth: CN106317136B[P]. 2018-12-25 (in Chinese).
- [10] LI J, LI ZY, GONG H, MA MY, LI SL, YANG HL, ZHANG HL, LIU JG. Identification and characterization of a novel high-activity amylosucrase from *Salinispirillum*

- sp. LH10-3-1[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2023, 107(5): 1725-1736.
- [11] AGARWAL N, RAI AK, SINGH SP. Biotransformation of hydroquinone into α -arbutin by transglucosylation activity of a metagenomic amylosucrase[J]. 3 Biotech, 2021, 11(8): 362.
- [12] AO JW, PAN XW, WANG Q, ZHANG HW, REN KX, JIANG A, ZHANG X, RAO ZM. Efficient whole-cell biotransformation for α -arbutin production through the engineering of sucrose phosphorylase combined with engineered cell modification[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(5): 2438-2445.
- [13] GO YH, KIM TK, LEE KW, LEE YH. Functional characteristics of cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. BL-31 highly specific for intermolecular transglucosylation of bioflavonoids[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2007, 17(9): 1550-1553.
- [14] SAINI K, GUPTA R. Cell surface expression of γ -CGTase from *Evansella caseinilytica* on *E. coli*: application in the enzymatic conversion of starch to γ -cyclodextrin[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2022, 159: 110066.
- [15] SONG W, ZHANG MJ, LI XJ, ZHANG YJ, ZHENG JY. Heterologous expression of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus stearothersophilus* in *Bacillus subtilis* and its application in glycosyl rutin production[J]. 3 Biotech, 2023, 13(3): 84.
- [16] TAO XM, SU LQ, CHEN S, WANG L, WU J. Producing 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid by modified cyclodextrin glycosyltransferase and isoamylase[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2023, 107(4): 1233-1241.
- [17] 赵如奎, 吴剑荣, 詹晓北, 朱莉. α -环糊精葡萄糖基转移酶催化合成 α -熊果苷[J]. 生物加工过程, 2015, 13(4): 36-41.
- ZHAO RK, WU JR, ZHAN XB, ZHU L. α -arbutin synthesis by α -cyclodextrin glycosyltransferase[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2015, 13(4): 36-41 (in Chinese).
- [18] 陈龙然. 产 α -环糊精葡萄糖基转移酶的菌株分离、产酶条件优化与酶学特性研究[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2005.
- CHEN LR. Breeding and optimized fermentation of an α -glucanotransferase producing strain and its enzymatic characteristics[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2005 (in Chinese).
- [19] ZHANG W, LIU ZM, GONG MY, LI N, LV XQ, DONG XM, LIU YF, LI JH, DU GC, LIU L. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of lacto-N-neotetraose (LNnT)[J]. Systems Microbiology and Biomanufacturing, 2021, 1(3): 291-301.
- [20] GOEDL C, SAWANGWAN T, WILDBERGER P, NIDETZKY B. Sucrose phosphorylase: a powerful transglucosylation catalyst for synthesis of α -D-glucosides as industrial fine chemicals[J]. Biocatalysis and Biotransformation, 2010, 28(1): 10-21.
- [21] 郑婉. 蔗糖磷酸化酶基因的挖掘, 性质表征及合成 α -熊果苷的研究[D]. 荆州: 长江大学硕士学位论文, 2023.
- ZHENG W. Gene discovery, characterization of sucrose phosphorylase and its research in α -arbutin biosynthesis[D]. Jingzhou: Master's Thesis of Yangtze University, 2023 (in Chinese).
- [22] YU SH, WANG YC, TIAN YQ, XU W, BAI YX, ZHANG T, MU WM. Highly efficient biosynthesis of α -arbutin from hydroquinone by an amylosucrase from *Cellulomonas carboniz*[J]. Process Biochemistry, 2018, 68: 93-99.
- [23] 陈君妮, 田宇, 虞恒, 张保国. 一种淀粉蔗糖酶的突变体及其在生产 α -熊果苷中的应用: CN115261350A[P]. 2022-11-01.
- CHEN JN, TIAN Y, YU H, ZHANG BG. Mutant of amylosucrase and application of mutant in production of alpha-arbutin: CN115261350A[P]. 2022-11-01 (in Chinese).
- [24] 柴宝成, 姜钰琳, 倪晔, 韩瑞枝. 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 BC, JIANG YL, NI Y, HAN RZ. Engineering the 182 site of cyclodextrin glycosyltransferase for glycosylated genistein synthesis[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(2): 749-759 (in Chinese).
- [25] QING R, HAO SL, SMORODINA E, JIN D, ZALEVSKY A, ZHANG SG. Protein design: from the aspect of water solubility and stability[J]. Chemical Reviews, 2022, 122(18): 14085-14179.
- [26] BRADFORD MM. 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(1/2): 248-254.
- [27] ARNOLD K, BORDOLI L, KOPP J, SCHWEDE T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling[J]. Bioinformatics, 2006, 22(2): 195-201.
- [28] 张国宁, 冯婧娴, 杨颖博, 陈万生, 肖莹. 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 GN, FENG JX, YANG YB, CHEN WS, XIAO Y. Application of cyclodextrin glucosyltransferase in the glycosylation modification of natural products[J]. Biotechnology Bulletin, 2022, 38(3): 246-255 (in Chinese).
- [29] 陶秀梅. *Bacillus stearothersophilus* 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: 江南大学硕士学位论文, 2020.
- TAO XM. Molecular modification of *Bacillus stearothersophilus* NO2 CGTases and preparation of AA-2G[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2020 (in Chinese).
- [30] 郭永华. 嗜热环糊精葡萄糖基转移酶的分子改造[D]. 福州: 福建农林大学硕士学位论文, 2016.
- GUO YH. Molecular modification of thermophilic cyclodextrin glucosyltransferase[D]. Fuzhou: Master's Thesis of Fujian Agriculture and Forestry University, 2016 (in Chinese).
- [31] 凌凯. 环糊精糖基转移酶分子改造、产物特异性及其酶学性质研究[D]. 合肥: 合肥工业大学硕士学位论文, 2016.
- LING K. Molecular modification, product specificity and enzymatic properties of cyclodextrin glucosyltransferase[D]. Hefei: Master's Thesis of Hefei University of Technology, 2016 (in Chinese).
- [32] 李晓娇, 刘忆明. α -熊果苷合成研究进展[J]. 保山学院学报, 2014, 33(2): 18-21.
- LI XJ, LIU YM. Development in synthesis of α -arbutin[J]. Journal of Baoshan University, 2014, 33(2): 18-21 (in Chinese).
- [33] 张文蕾, 宿玲恰, 陶秀梅, 吴敬. 环糊精葡萄糖基转移酶生产 α -熊果苷的反应条件优化及分子改造[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(6): 49-53.
- ZHANG WL, SU LQ, TAO XM, WU J. Optimization of conditions for production of α -arbutin by cyclodextrin glucosyltransferase and its molecular modification[J]. Food and Fermentation Industries, 2017, 43(6): 49-53 (in Chinese).
- [34] 陈显玲, 宋连萍, 周燕妮, 王海芳, 谭夏云, 苏龙. 蔗糖磷酸化酶产生菌的筛选及其催化合成 α -熊果苷条件优化[J]. 中国酿造, 2022, 41(3): 117-124.
- CHEN XL, SONG LP, ZHOU YN, WANG HF, TAN XY, SU L. Screening of sucrose phosphorylase producing strain and enzymatic synthesis conditions optimization of α -arbutin[J]. China Brewing, 2022, 41(3): 117-124 (in Chinese).
- [35] 王秀捧, 张淑荣, 刘春巧, 刘春颖, 张鹏. 嗜麦芽黄单胞菌游离细胞催化合成 α -熊果苷[J]. 微生物学通报, 2007, 34(3): 417-420.
- WANG XP, ZHANG SR, LIU CQ, LIU CY, ZHANG P. The biosynthesis of α -arbutin by *Xanthomona maltophilia* BT-112[J]. Microbiology, 2007, 34(3): 417-420 (in Chinese).
- [36] LIU CQ, DENG L, ZHANG P, ZHANG SR, LIU L, XU T, WANG F, TAN TW. Screening of high α -arbutin producing strains and production of α -arbutin by fermentation[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2013, 29(8): 1391-1398.

(本文责编 陈宏宇)