

重组 α -CGTase 产酶条件及转化合成 AA-2G 的条件优化

李梦娇, 刘玉敏, 王冠凤, 王瑞妍*

华熙生物科技股份有限公司 山东济南

【摘要】采用酶促转化方法,以维生素 C (VC) 和糖基供体为转化反应底物,重组 *E.coli* BL21 (DE3)-pET30a-*cgtI* 为产酶菌株,对产酶条件和转化合成 2-O- α -D-吡喃葡萄糖基-L-抗坏血酸 (AA-2G) 的条件进行考察。研究表明:反应产物通过 HPLC 分析确定含有 AA-2G。诱导温度为 25 °C,发酵培养基为 TB 液体培养基,诱导时长为 8 h,接种量为 4%,IPTG 诱导浓度为 50 μ M,诱导时菌体密度为 1.2-1.9,培养基初始 pH 值为自然 pH 值时,重组菌株酶表达量最高且终菌体密度最大。以 β -环糊精和 VC 作为反应底物,在初始反应条件下 AA-2G 的产量为 2.21 g/L,VC 转化率为 23.02%。通过对其转化反应条件进行优化,初步确定了转化反应的最佳条件:转化反应 pH 值为 5.0,转化反应时间为 48 h,转化反应温度为 30 °C,转化反应溶剂为纯水,粗酶液添加量与转化反应总体积比 v (粗酶液) : v (转化反应总体积) = 1 : 5,VC 与 β -环糊精的质量比 m (VC) : m (β -环糊精) = 1 : 2,葡萄糖淀粉酶添加量为 50U/mL,葡萄糖淀粉酶水解反应时间为 16h 时,AA-2G 的产量达到 68.61g/L,VC 转化率为 71.45%。

【关键词】 α -环糊精葡萄糖基转移酶 (α -CGTase); 2-O- α -D-吡喃葡萄糖基-L-抗坏血酸 (AA-2G); 酶促合成

【收稿日期】 2025 年 12 月 14 日

【出刊日期】 2026 年 1 月 5 日

【DOI】 10.12208/j.jer.20260001

The optimization of the α -CGTase producing condition and the transformation condition to synthesis AA-2G

Mengjiao Li, Yumin Liu, Guanfeng Wang, Ruiyan Wang*

Bloomage Biotechnology Corporation Limited, Jinan, Shandong

【Abstract】 The enzyme-induced transformation method was used, with vitamin C (VC) and glucose donor as the substrate, and recombinant *E.coli* BL21(DE3)-pET30a-*cgtI* as the enzyme-producing strain. The enzyme-producing conditions and the synthesis conditions of 2-O- α -D-glucopyranose-L-ascorbic acid (AA-2G) were investigated. The results showed that the reaction product was determined to contain AA-2G by HPLC analysis. The induction temperature was 25 °C, the fermentation medium was TB liquid medium, the induction time was 8 h, the inoculation amount was 4 %, the IPTG induction concentration was 50 μ M, the cell density of the recombinant strain was 1.2-1.9, the initial pH value of the medium was natural pH value, the enzyme expression of the recombinant strain was the highest and the terminal bacterial cell density was the highest. With β -cyclodextrin and VC as substrates, the yield of AA-2G was 2.21 g/L and the conversion of VC was 23.02 % under the initial reaction conditions. By optimizing the transformation reaction conditions, the optimum conditions for the transformation reaction were preliminarily determined: The pH value of the conversion reaction was 5.0, the conversion reaction time was 48 h, the conversion reaction temperature was 30 °C, the conversion reaction solvent was pure water, v (crude enzyme solution): v (total transformation reaction volume) = 1:5, m (VC): m (β -cyclodextrin)=1:2, and the addition amount of glucose amylase was 50 U/mL. When the hydrolysis time of glucose amylase was 16 h, the yield of AA-2G reached 68.61 g/L and the conversion rate of VC was 71.45 %.

【Keywords】 α -cyclodextrin glucosyltransferase(α -CGTase); 2-O-alpha-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid(AA-2G); Enzymatic synthesis

*通讯作者: 王瑞妍

维生素 C (Vitamin C, VC) 又名 L-抗坏血酸 (L-ascorbic acid, L-AA), 是一种常见的水溶性维生素。参与很多体内的生理活动, 在保持人体正常代谢、维持人体健康方面扮演着举足轻重的角色, 由于人体无法自身合成 VC, 只能通过膳食获得, 当体内缺乏 VC 时, 会造成坏血病, 导致毛细血管破裂^[1]。由于 VC 本身的理化特性和生理活性, 其作为酸味剂、还原剂、抗氧化剂、漂白剂及稳定剂应用于化妆品、食品、医药中; 但 VC 还原性强, 在水溶液中极不稳定, 极易被空气中的氧和其它氧化剂所氧化, 丧失 VC 原有的生理活性^[2]。因此寻找稳定性高的 VC 衍生物具有重要意义。

2-O- α -D-吡喃葡萄糖基-L-抗坏血酸(AA-2G)作为 VC 衍生物因其稳定性强、安全性高而备受关注。AA-2G 进入人体后可被体内 α -葡萄糖苷酶分解为 VC 和 D-葡萄糖, 产生的 VC 在体内发挥 VC 的多种生理功能^[3]。广泛应用于食品、化妆品、医疗保健等行业^[4]。AA-2G 最早由日本林原生物化学研究所与冈山大学共同发现的, 并确定了其合成方法。AA-2G 的化学合成过程复杂并且成本很高, 目前应用最广泛的是生物转化法, 即利用糖基转移酶, 如 α -环糊精葡萄糖基转移酶将供体上的吡喃型葡萄糖苷转移到抗坏血酸分子的 2 位碳上脱水生成 AA-2G^[5]。韩瑞枝^[6]利用 α -环糊精葡萄糖基转移酶转化生产 AA-2G 的产量为 2.12g/L。单丽媛^[7]利用环糊精葡萄糖基转移酶对其转化条件进行优化, 最终 AA-2G 的产量达到 6.23 g/L, VC 转化率为 19.93%。宋凯^[8]利用海洋微生物测序得到的 CGTase 基因 *my20* 异源表达于大肠杆菌 BL21 (DE3) 中, 对其进行酶表达和转化条件优化, AA-2G 的最大产量达到 28 g/L。陶秀梅^[9]通过对来源于嗜热脂肪芽孢杆菌 NO₂ 的 CGTase 基因进行定点突变, 酶表达和转化条件优化后, AA-2G 的最大产量可达 211 g/L, VC 转化率为 44%。本文旨在利用本实验室制备的 α -环糊精葡萄糖基转移酶粗酶液作为生物催化剂, 通过优化酶表达和转化合成条件, 提高 AA-2G 产量和 VC 转化率, 降低生产成本。通过对 CGTase 表达体系进行优化后, 所用诱导剂 IPTG 浓度仅为 50 μ M, α -CGTase 的可溶性表达占比提升 700%; 酶促转化合成反应条件优化后, AA-2G 的产量达到 68.61 g/L, VC 转化率达 71.45%, 为其后续放大生产与产业化应用提供了核心支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 α -CGTase 基因来源于 *Bacillus stearothermophilus* NO₂, GenBank accession no.

X59042.1, 由南京金斯瑞生物对其密码子优化后进行合成, 连接到 pET30a 载体上; 将其导入 *E.coli* BL21 (DE3) 转化态细胞中, 构建 *E.coli* BL21 (DE3) -pET30a-*cgt1* 表达菌株。

1.1.2 培养基 LB 液体培养基(g/L): 胰蛋白胨 10, 氯化钠 10, 酵母粉 5; LB 固体培养基在此基础上添加 2%琼脂粉。TB 液体培养基 (g/L): 胰蛋白胨 12, 酵母粉 24, 甘油 5, KH₂PO₄ 2.3, K₂HPO₄·3H₂O 16.4。

1.1.3 主要试剂 VC (郑州德旺化工产品有限公司); β -环糊精 (江苏丰园生物技术有限公司); 麦芽糊精 (诸城东晓生物科技有限公司); 其他试剂均为市售分析纯。

1.2 方法

1.2.1 α -CGTase 的表达

初始条件: 将构建的 *E.coli* BL21 (DE3) -pET30a-*cgt1* 表达菌株在 LB 培养基中进行培养, 按照 1%接种量接种至发酵培养基中, 37℃培养至 OD₆₀₀=0.6-0.8 时, 加 1 mM IPTG 在 37℃诱导培养 4h;

优化后条件: 将构建的 *E.coli* BL21 (DE3) -pET30a-*cgt1* 表达菌株在 TB 培养基中进行培养, 按照 4%接种量接种至发酵培养基中, 37℃培养至 OD₆₀₀=1.2-1.9 时, 加 50 μ M IPTG 在 25℃诱导培养 8h;

检测: 发酵培养结束后, 4℃, 7000 r/min 离心 10 min, 收集菌体; 加入 Tris-HCl (50 mM, pH7.5) 缓冲液调整 OD₆₀₀ 至 5, 进行超声破碎 (破碎条件: 功率 400 W, 超声 2s, 间歇 4s, 重复 90 次); 超声破碎后的部分裂解液于 4℃下 12000 rpm 离心 10min, 取上清液和全菌裂解液, 加入 loading buffer 后, 100℃煮 5min, 离心, 上样进行 SDS-PAGE 电泳分析。灰度值分析方法, 采用北京六一凝胶化学发光分析软件进行凝胶分析。最终最优条件下重复实验次数两次。

1.2.2 酶法转化合成 AA-2G

上述最优表达条件得到的菌泥, 以 OD₆₀₀=50 进行超声破碎, 12000 rpm 离心 10 min, 取上清液为转化反应所用粗酶液。

初始条件: 在试管中加入反应底物 5 g/L 维生素 C 和 10 g/L β -环糊精, 加入 1/10 的自制粗酶液, 用 Tris-HCl (50 mM, pH7.5) 补齐, 调 pH 在 5.0 左右, 37℃, 转速 200 r/min 反应 24h; 加入 1000 U/mL 反应液的葡萄糖淀粉酶, 60℃, 200 r/min 反应 24h 后, 煮沸 5 min 终止反应。10000 r/min 离心 10 min, 取上清, 稀释 5 倍后测定 AA-2G 含量。

优化后条件: 在试管中加入反应底物 50 g/L 维生

素 C, 1/5 纯水溶解后, 调 pH 在 5.0 左右, 加入 100g/L β -环糊精, 加入 1/5 的自制粗酶液, 用纯水补齐, 30°C, 转速 200 r/min 反应 48 h; 加入 50 U/mL 反应液的葡萄糖淀粉酶, 60°C, 200 r/min 反应 16 h 后, 煮沸 5 min 终止反应。10000 r/min 离心 10 min, 取上清, 稀释 100 倍后测定 AA-2G 含量。最终最优条件下重复实验次数两次。

1.2.3 AA-2G 检测方法

采用高效液相色谱法(HPLC)。色谱柱: CAPCELL PAK C18 MG II (S5); 柱温: 30°C; 检测波长: 238 nm; 进样量: 20 μ L; 流速: 0.4 mL/min; 流动相: A: B=95: 5, A: 50 mmol/L KH_2PO_4 , 三氟乙酸调 pH 至 3.0; B: 甲醇; 分别进样检测 AA-2G 各浓度溶液峰面积, 绘制标准曲线, 计算 R 值。

1.2.4 重组菌产 α -CGTase 条件优化

在 1.2.1 诱导产酶条件的基础上, 依次进行下列条件的单因素优化

(1) 诱导温度对酶表达量的影响: 诱导温度分别为 20°C、25°C、30°C、37°C。

(2) 发酵培养基和诱导时长对酶表达量的影响: 发酵培养基分别为 LB 和 TB 液体培养基; 诱导时长分别为 4 h、8 h、12 h、16 h、20 h。

(3) 接种量对酶表达量的影响: 接种量分别为 1%、2%、4%。

(4) 诱导剂浓度对酶表达量的影响: 诱导剂 IPTG 的浓度分别为 50 μ M、100 μ M、500 μ M、1000 μ M。

(5) 诱导时菌体密度对酶表达量的影响: 诱导时菌体密度分别为 0.314、0.390、0.667、1.196、1.90。

(6) 培养基初始 pH 值对酶表达量的影响: 初始 pH 值分别为 6.0、6.5、7.0、7.35、7.5、8.0。

1.2.5 酶法转化合成 AA-2G 条件优化

在 1.2.2 转化反应体系基础上, 依次进行下列条件的单因素优化。

(1) 糖基供体种类对酶法转化合成 AA-2G 的影响: 糖基供体分别选用 β -环糊精、麦芽糊精、麦芽糖、可溶性淀粉。

(2) 转化反应 pH 值对酶法转化合成 AA-2G 的影响: 反应 pH 值分别为 4.0、4.5、5.0、5.5。

(3) 转化反应时间对酶法转化合成 AA-2G 的影响: 反应时间分别为 16 h、24 h、40 h、48 h、72 h。

(4) 转化反应温度对酶法转化合成 AA-2G 的影响: 反应温度分别为 30°C、37°C、45°C。

(5) 转化反应溶剂对酶法转化合成 AA-2G 的影

响: 反应溶剂分别为纯水、Tris-HCl(50 mM, pH 7.5)、柠檬酸三钠(50 mM, pH 5.2)。

(6) 粗酶液添加量对酶法转化合成 AA-2G 的影响: v(粗酶液): v(转化反应总体积) 分别为 1: 10、1: 5、1: 2、9: 10。

(7) VC 和 β -环糊精比例对酶法转化合成 AA-2G 的影响: m(VC): m(β -环糊精) 分别为 1: 0.5、1: 1、1: 2、1: 3、1: 4。

(8) 葡萄糖淀粉酶添加量对酶法转化合成 AA-2G 的影响: 每毫升反应液中添加量分别为: 0 U、50 U、100 U、200 U、300 U、400 U、500 U、1000 U、1500 U。

(9) 葡萄糖淀粉酶水解反应时间对酶法转化合成 AA-2G 的影响: 水解反应时间分别为 4 h、8 h、16 h、24 h。

2 结果与分析

2.1 酶法转化合成 AA-2G

为了对转化产物进行确定, 将转化反应液和标准品一起进行高效液相检测分析, 结果如图 1 所示: AA-2G 标准品出峰时间在 7.813 min(图 1(a)), VC 标准品出峰时间在 8.949 min(图 1(b)), 样品在两处时间均有峰出现(图 1(c)), 7.894 min 处峰为 AA-2G, 说明利用自制粗酶液和反应底物制备的样品中含有 AA-2G; 9.025 min 处峰为 VC, 其余出峰时间有一小峰, 说明反应液中 VC 未能完全转化成 AA-2G, 且有一些杂质产生, 可在纯化过程中将其去除。

2.2 重组菌产 CGTase 条件优化

2.2.1 诱导温度对酶表达量的影响

在初始诱导产酶条件下, 考察不同诱导温度对酶表达量的影响。结果如图 2 所示: 随着诱导温度的升高, 破碎上清中的可溶性蛋白占全菌裂解液的比值逐渐减小; 终菌体密度与破碎上清中灰度值如表 1 所示: 诱导温度为 20°C 时, 诱导培养结束时菌体密度最低, 诱导温度为 25°C、30°C 和 37°C 时, 诱导培养结束时菌体密度相似。诱导温度为 20°C 和 25°C 时, 破碎上清中灰度值最高, 因此在后续实验中, 均以 25°C 作为诱导温度。

2.2.2 发酵培养基和诱导时长对酶表达量的影响

在上述优化产酶条件下, 考察不同发酵培养基和诱导时长对酶表达量的影响。结果如图 3 所示: 随着诱导时间的延长, 破碎上清中的可溶性蛋白占全菌裂解液的比值逐渐减小; 结合表 2 可知, LB 培养基的终菌体密度明显低于 TB 培养基, 且随着诱导时间的延

长, 差距越来越明显, LB 培养基的破碎上清中灰度值在诱导时间为 4h、8h、12h 时与 TB 培养基相似。综合

以上结果, 选取 TB 培养基为发酵培养基, 诱导时长为 8h。

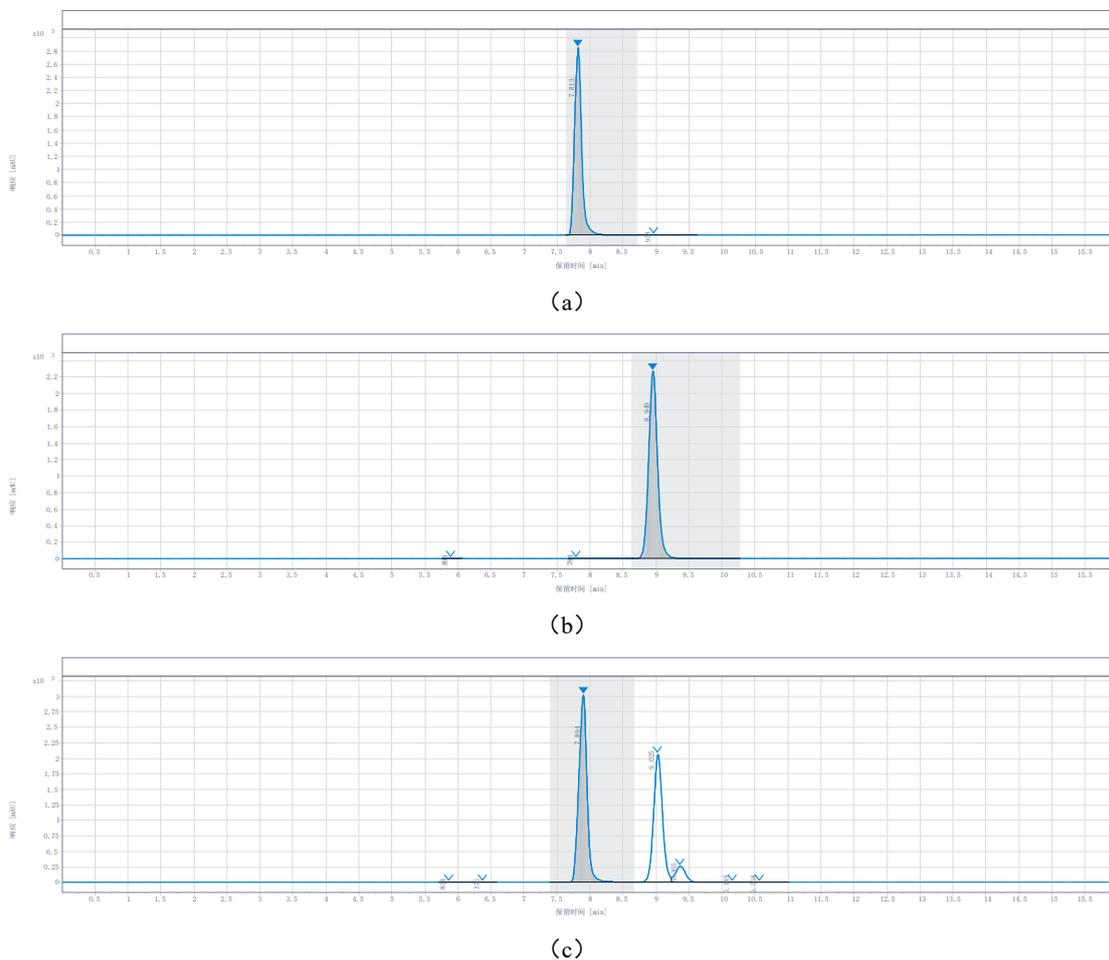


图1 AA-2G 和 VC 标准样品及反应液 HPLC 图谱

(a) AA-2G 标准品; (b) VC 标准品; (c) 反应液

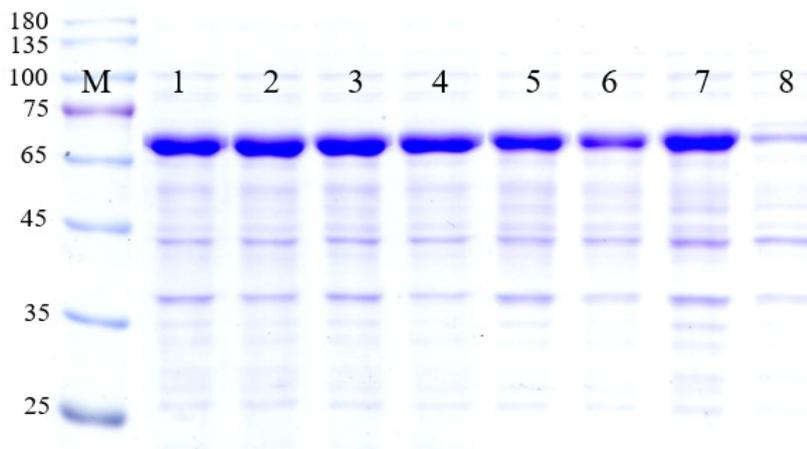


图2 诱导温度对酶表达量的影响

注: M: 蛋白质分子量标准品; 泳道 1、3、5、7: 分别为 20℃、25℃、30℃、37℃ 诱导后的菌体破碎总蛋白; 泳道 2、4、6、8: 分别为 20℃、25℃、30℃、37℃ 诱导后的破碎上清蛋白

表 1 不同诱导温度下终菌体密度和破碎上清中灰度值

诱导温度	20 °C	25 °C	30 °C	37 °C
终 OD ₆₀₀	3.39	4.31	4.38	4.18
破碎上清中灰度值	240.56	238.59	111.38	20.984

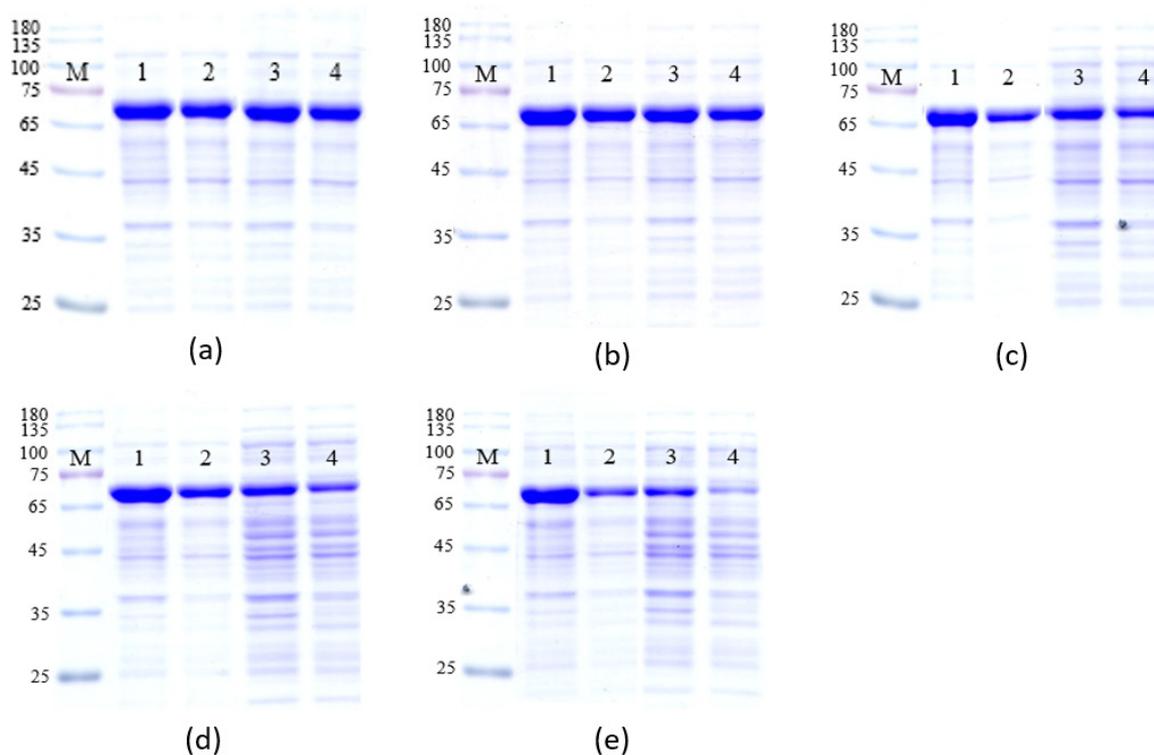


图 3 培养基和诱导时长对酶表达量的影响

注: M: 蛋白质分子量标准品; 图(a)、(b)、(c)、(d)、(e): 分别为 4、8、12、16、20 小时 CGTase 的表达情况; 泳道 1-2: LB 培养基; 泳道 3-4: TB 培养基; 泳道 1、3: 菌体破碎总蛋白; 泳道 2、4: 破碎上清蛋白

表 2 不同培养基和诱导时长下终菌体密度和破碎上清中灰度值

诱导时间	4 h	8 h	12 h	16 h	20 h
LB 终 OD ₆₀₀	3.80	5.34	6.18	7.04	7.4
LB 破碎上清中灰度值	180.39	177.98	118.54	134.23	83.372
TB 终 OD ₆₀₀	4.75	10.15	19.28	24.34	29.12
TB 破碎上清中灰度值	191.01	172.08	119.87	78.805	20.351

2.2.3 接种量对酶表达量的影响

在上述优化产酶条件下, 考察不同接种量对酶表达量的影响。结果如图 4 所示: 随着接种量的增加, 破碎上清中的可溶性蛋白占全菌裂解液的比值逐渐增加; 结合表 3 可知, 接种量为 2% 和 4% 的终菌体密度和破碎上清中灰度值差距不大。因此在后续实验中, 接种量均为 4%。

2.2.4 诱导剂浓度对酶表达量的影响

在上述优化产酶条件下, 考察不同诱导剂浓度对酶表达量的影响。结果如图 5 所示: 诱导剂 IPTG 浓度大于 50 μ M 时, 破碎上清中的可溶性蛋白占全菌裂解液的比值明显减小; 结合表 4 可知: 诱导剂 IPTG 浓度增加, 终菌体密度和破碎上清中灰度值减小, 初步猜测可能高浓度的 IPTG 对细胞有毒性, 抑制菌体生长。因此在后续实验中, 诱导剂 IPTG 的浓度为 50 μ M。



图 4 接种量对酶表达量的影响

注: M: 蛋白质分子量标准品; 泳道 1、3、5: 分别为接种量 1%、2%、4% 的菌体破碎总蛋白; 泳道 2、4、6: 分别为接种量 1%、2%、4% 的破碎上清蛋白

表 3 不同接种量下终菌体密度和破碎上清中灰度值

接种量	1 %	2 %	4 %
终 OD ₆₀₀	8.50	9.31	8.86
破碎上清中灰度值	78.752	166.12	178.27

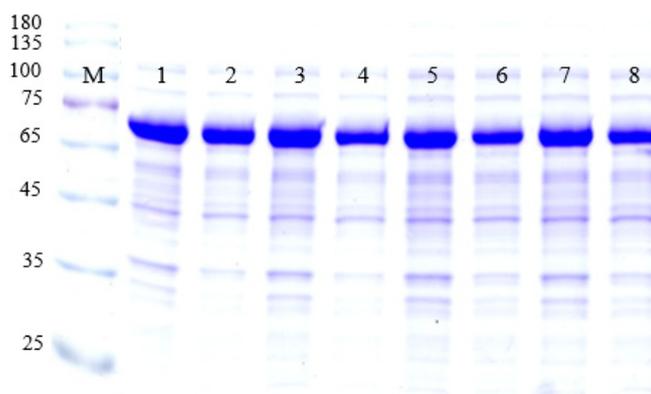


图 5 诱导剂浓度对酶表达量的影响

注: M: 蛋白质分子量标准品; 泳道 1、3、5、7: 分别为 IPTG 浓度 50 μ M、100 μ M、500 μ M、1000 μ M 时的菌体破碎总蛋白; 泳道 2、4、6、8: 分别为 IPTG 浓度 50 μ M、100 μ M、500 μ M、1000 μ M 时的破碎上清蛋白

表 4 不同诱导剂浓度下终菌体密度和破碎上清中灰度值

IPTG 浓度	50 μ M	100 μ M	500 μ M	1000 μ M
终 OD ₆₀₀	11.13	11.45	9.47	9.13
破碎上清中灰度值	200.97	180.28	155.86	161.33

2.2.5 诱导时菌体密度对酶表达量的影响

在上述优化产酶条件下, 考察诱导时不同菌体密度对酶表达量的影响。结果如图 6 所示: 随着诱导时菌体密度的增加, 破碎上清中的可溶性蛋白占全菌裂

解液的比值差距不大; 结合表 5 可知, 随着诱导时菌体密度的增加, 终菌体密度也随之增加, 破碎上清中灰度值差距不大。因此在后续实验中, 诱导时菌体密度在 1.2-1.9 最佳。

2.2.6 培养基初始 pH 值对酶表达量的影响

在上述优化产酶条件下, 考察不同培养基初始 pH 值对酶表达量的影响。结果如图 7 所示: 随着培养基初始 pH 值的改变, 破碎上清中的可溶性蛋白占全菌裂

解液的比值差距不大; 结合表 6 可知, 培养基初始 pH 值小于 7 时, 终菌体密度小, 培养基初始 pH 值大于 7 时, 终菌体密度相差不大。因此在后续实验中, 培养基初始 pH 值不需要调整 (pH 为 7.35)。

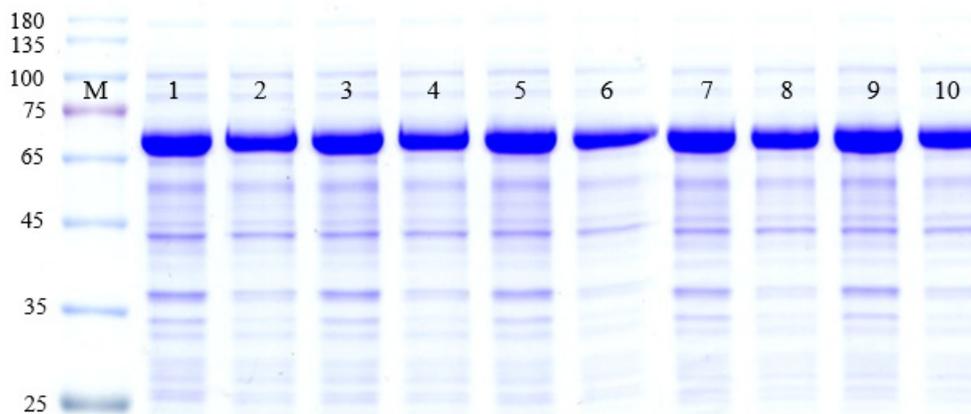


图 6 诱导时菌体密度对酶表达量的影响

注: M: 蛋白质分子量标准品; 泳道 1、3、5、7、9: 分别为 $OD_{600}=0.314$ 、 0.390 、 0.667 、 1.196 、 1.90 时诱导的菌体破碎总蛋白; 泳道 2、4、6、8、10: 分别为 $OD_{600}=0.314$ 、 0.390 、 0.667 、 1.196 、 1.90 时诱导的破碎上清蛋白

表 5 诱导时不同菌体密度下终菌体密度破碎上清中灰度值

诱导时 OD_{600}	0.314	0.390	0.667	1.196	1.90
终 OD_{600}	8.73	9.84	10.87	12.27	13.64
破碎上清中灰度值	198.54	208.28	183.07	190.78	212.93

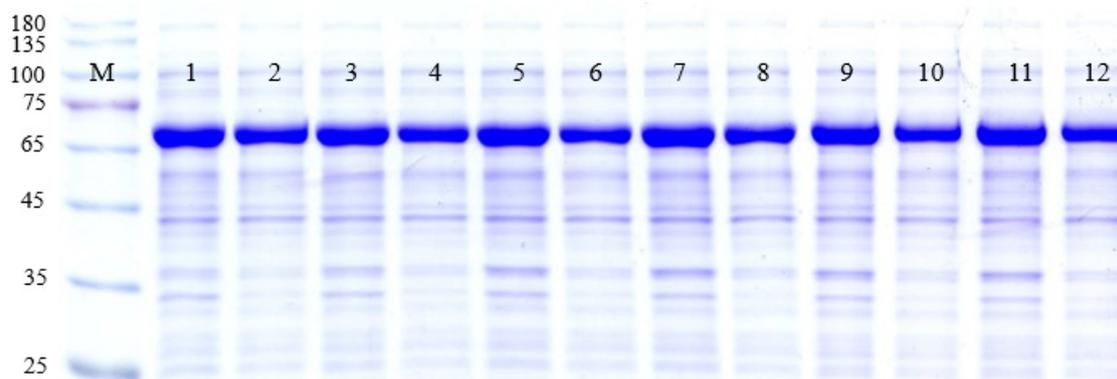


图 7 培养基初始 pH 值对酶表达量的影响

注: M: 蛋白质分子量标准品; 泳道 1、3、5、7、9、11: 分别为 pH 6.0、6.5、7.0、7.35、7.5、8.0 条件下的菌体破碎总蛋白; 泳道 2、4、6、8、10、12: 分别为 pH 6.0、6.5、7.0、7.35、7.5、8.0 条件下的破碎上清蛋白

表 6 培养基不同初始 pH 值下终菌体密度和破碎上清中灰度值

初始 pH 值	6.0	6.5	7.0	7.35	7.5	8.0
终 OD_{600}	8.65	10.24	11.08	11.30	11.21	11.75
破碎上清中灰度值	186.04	174.54	167.06	168.63	158.17	166.91

2.3 酶法转化合成 AA-2G 条件优化

2.3.1 糖基供体种类对酶法转化合成 AA-2G 的影响

在初始反应条件下, 利用自制粗酶液和反应底物进行转化反应, 考察糖基供体种类对 AA-2G 产量的影响。结果如图 8 所示: 当糖基供体为 β -环糊精时, AA-2G 的产量最高, 达到 2.21 g/L, VC 转化率为 23.02%; 其次为麦芽糊精和可溶性淀粉; 麦芽糖最低。因此在后续实验中, 均以 β -环糊精为糖基供体, 为提高 AA-2G 产量, 将底物 VC 浓度提升至 50 g/L, β -环糊精浓度提升为 100 g/L。

2.3.2 转化反应 pH 值对酶法转化合成 AA-2G 的影响

在上述优化反应条件下, 考察不同反应 pH 值对 AA-2G 产量的影响。结果如图 9 所示: 转化反应初始 pH 值为 5.0 时, AA-2G 的产量最高, 达到 36.91 g/L, VC 转化率为 38.44%。当初始 pH 值低于或高于 5.0 时, AA-2G 的产量均有所下降。猜测原因可能是: 当 pH 值高于 5.0 时, 不利于底物维生素 C 的稳定; 当 pH 值低于 5.0 时, CGTase 酶活有所降低。因此在后续实验中, 均以初始 pH 值为 5.0 进行转化反应。

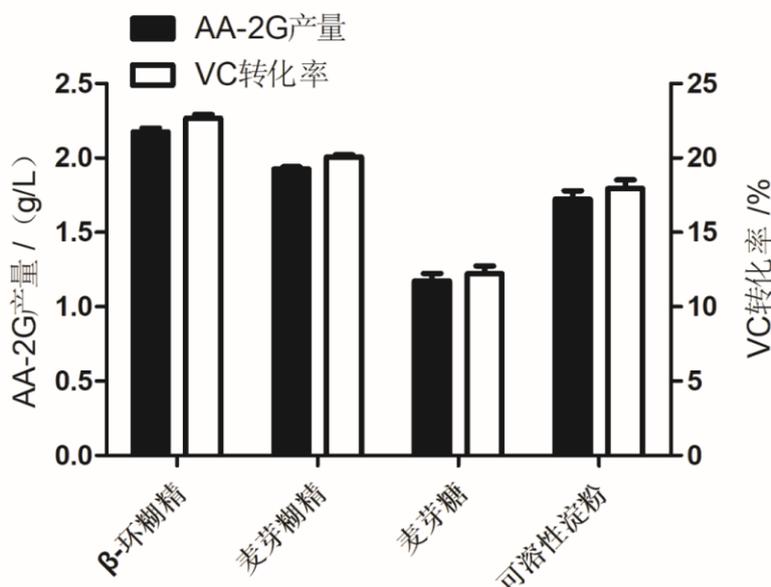


图 8 糖基供体对酶法转化合成 AA-2G 的影响

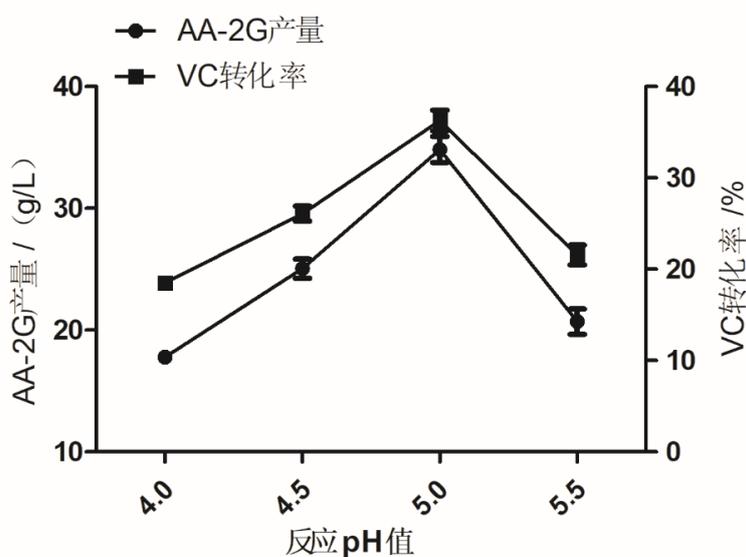


图 9 转化反应 pH 值对酶法转化合成 AA-2G 的影响

2.3.3 转化反应时间对酶法转化合成 AA-2G 的影响

在上述优化反应条件下, 考察不同转化反应时间对 AA-2G 产量的影响。结果如图 10 所示: 随着转化反应时间的延长, AA-2G 的产量也随之增加, 当转化反应时间为 48 h 时, AA-2G 的产量最高, 达到 45.32 g/L, VC 转化率为 47.20 %; 当转化反应时间超过 48 h 时, AA-2G 的产量反而有所下降, 猜测原因可能是随着反应时间的延长, CGTase 催化逆反应导致 AA-2G 产量

下降。因此, 在后续实验中, 转化反应时间均为 48 h。

2.3.4 转化反应温度对酶法转化合成 AA-2G 的影响

在上述优化反应条件下, 考察不同转化反应温度对 AA-2G 产量的影响。结果如图 11 所示: 随着转化反应温度的升高, AA-2G 的产量先增后减, 当转化反应温度为 30 °C 时, AA-2G 的产量最高, 达到 49.20 g/L, VC 转化率为 51.24 %。因此, 在后续实验中, 转化反应温度均为 30 °C。

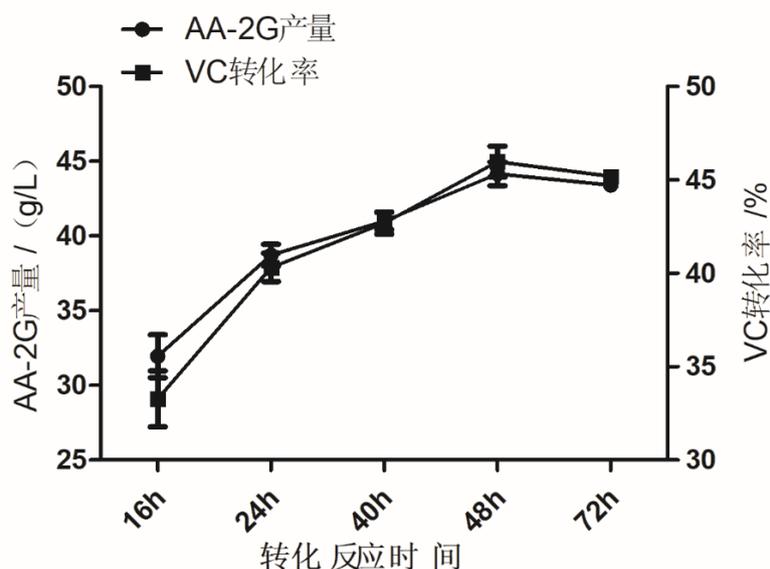


图 10 转化反应时间对酶法转化合成 AA-2G 的影响

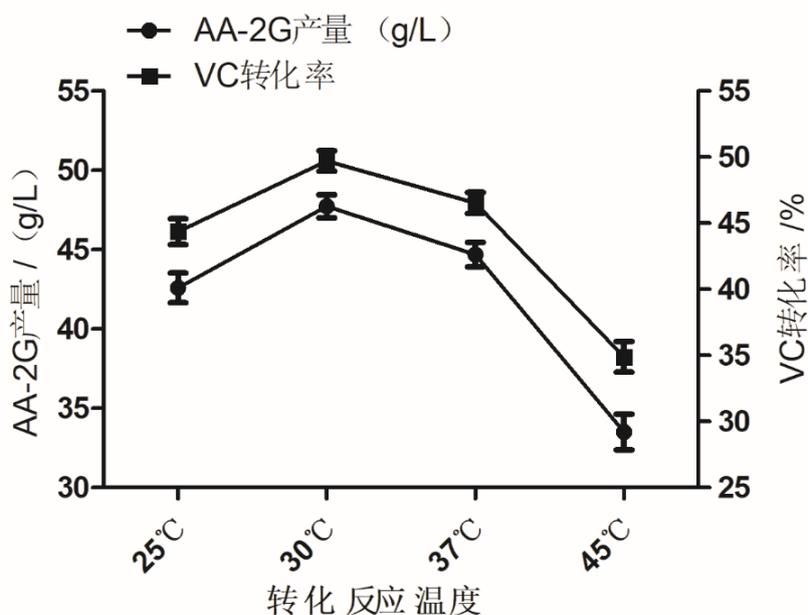


图 11 转化反应温度对酶法转化合成 AA-2G 的影响

2.3.5 转化反应溶剂对酶法转化合成 AA-2G 的影响

在上述优化反应条件下, 考察不同反应溶剂对 AA-2G 产量的影响。结果如图 12 所示: 转化反应溶剂为纯水或 Tris-HCl (50 mM, pH 7.5) 时, AA-2G 的产量相当, 达到 49.20 g/L, VC 转化率为 51.24%; 转化反应溶剂为柠檬酸三钠 (50 mM, pH 5.2) 时, AA-2G 产量较低。因此在后续反应实验中, 均以纯水为转化反应溶剂。

2.3.6 粗酶液添加量对酶法转化合成 AA-2G 的影响

在上述优化反应条件下, 考察不同粗酶液添加量对 AA-2G 产量的影响。结果如图 13 所示: 当粗酶液添加量: 转化反应反应总体积=1: 5 时, 催化合成 AA-2G 的产量最高, 达到 52.37 g/L, VC 转化率为 54.54%; 当添加量大于或小于 1/5 时, AA-2G 的产量均有所降低, 原因可能是粗酶液添加量高时会催化逆反应, 降低 AA-2G 的产量。因此, 在后续反应实验中, 均以粗酶液添加量为 1/5 作为转化反应酶浓度。

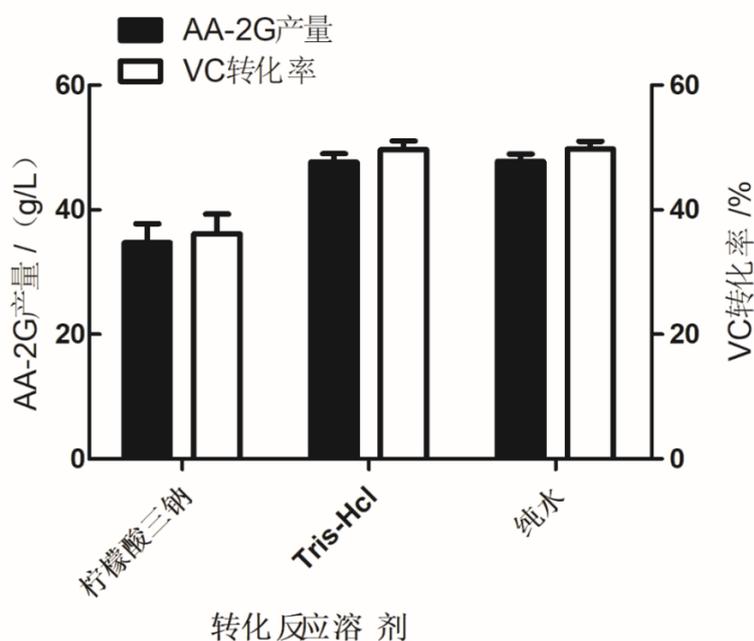


图 12 转化反应溶剂对酶法转化合成 AA-2G 的影响

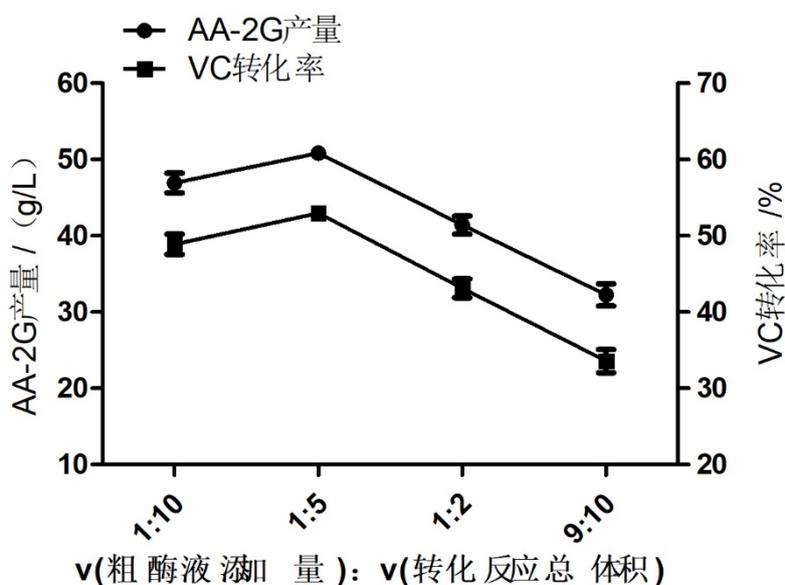


图 13 粗酶液添加量对酶法转化合成 AA-2G 的影响

2.3.7 VC 和 β -环糊精比例对酶法转化合成 AA-2G 的影响

在上述优化反应条件下, 考察不同底物比例对 AA-2G 产量的影响。结果如图 14 所示: 以底物 VC 的添加量为 50 g/L 时, 随着 β -环糊精添加量的增加, AA-2G 的产量逐渐增高, 达到 58.37 g/L, VC 转化率为 60.79%。由于 β -环糊精添加量是 VC 的 3 倍或 4 倍时, AA-2G 的产量增加趋势较缓。因此, 在后续反应实验中, VC 和 β -环糊精的质量比为 1: 2。

2.3.8 葡萄糖淀粉酶添加量对酶法转化合成 AA-2G 的影响

在上述优化反应条件下, 考察葡萄糖淀粉酶不同添加量对 AA-2G 产量的影响。结果如图 15 所示: 不添加葡萄糖淀粉酶时, 不能水解多余的糖苷键, 故 AA-2G 产量较低; 随着葡萄糖淀粉酶添加量的增加, AA-2G 的产量逐渐降低; 当葡萄糖淀粉酶添加量为 50 U/mL 时, AA-2G 的产量最高, 达到 62.03 g/L, VC 转化率为 64.60%。当葡萄糖淀粉酶添加量 > 1000 U/mL 时, AA-2G 产量明显下降, 这可能是因为葡萄糖淀粉酶水解 AA-2G 上的糖苷键, 导致 AA-2G 的产量下降明显。因此, 在后续反应实验中, 葡萄糖淀粉酶的添加量均为 50 U/mL。

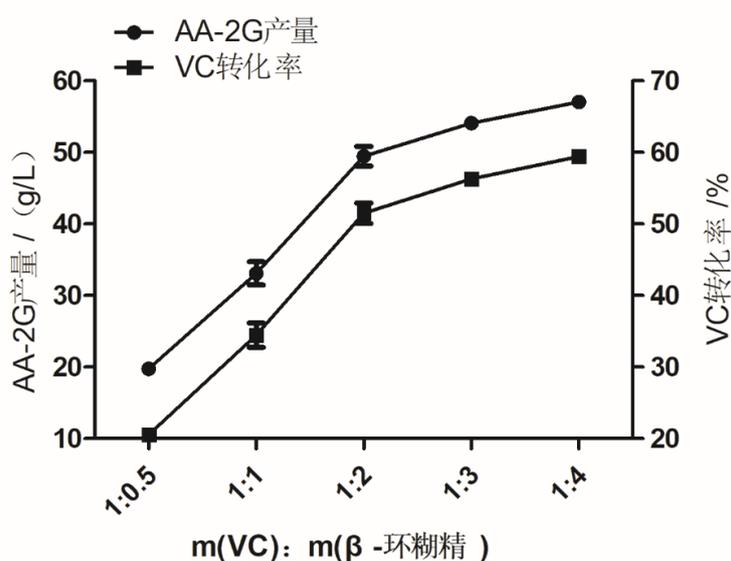


图 14 VC 和 β -环糊精比例对酶法转化合成 AA-2G 的影响

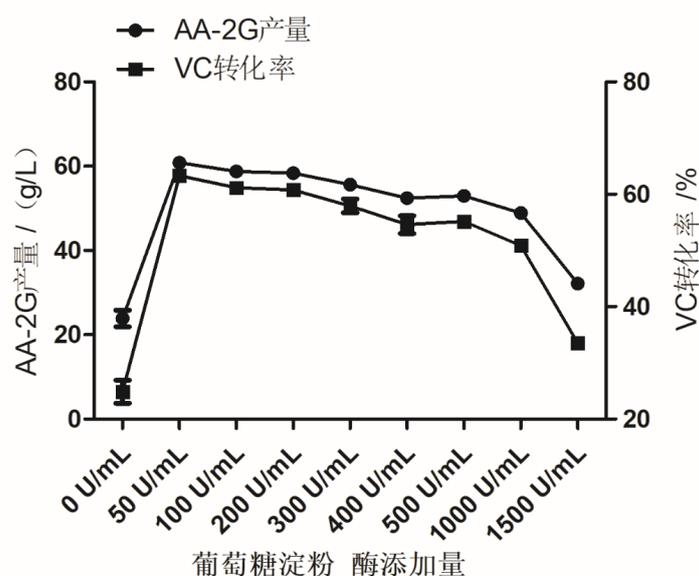


图 15 葡萄糖淀粉酶添加量对酶法转化合成 AA-2G 的影响

2.3.9 葡萄糖淀粉酶水解反应时间对酶法转化合成 AA-2G 的影响

在上述优化反应条件下, 考察葡萄糖淀粉酶不同水解反应时间对 AA-2G 产量的影响。结果如图 16 所示: 水解反应时间为 16 h 时, AA-2G 的产量最高, 达到 68.61 g/L, VC 转化率为 71.45%。水解反应时间低

于 16 h, AA-2G 的产量较低, 原因可能是葡萄糖淀粉酶不能完全水解多余的糖苷键; 水解反应时间高于 16 h, AA-2G 的产量较低, 原因可能是葡萄糖淀粉酶将 AA-2G 上第二位的糖苷键水解。因此, 在后续反应实验中, 葡萄糖淀粉酶的水解反应时间为 16 h。

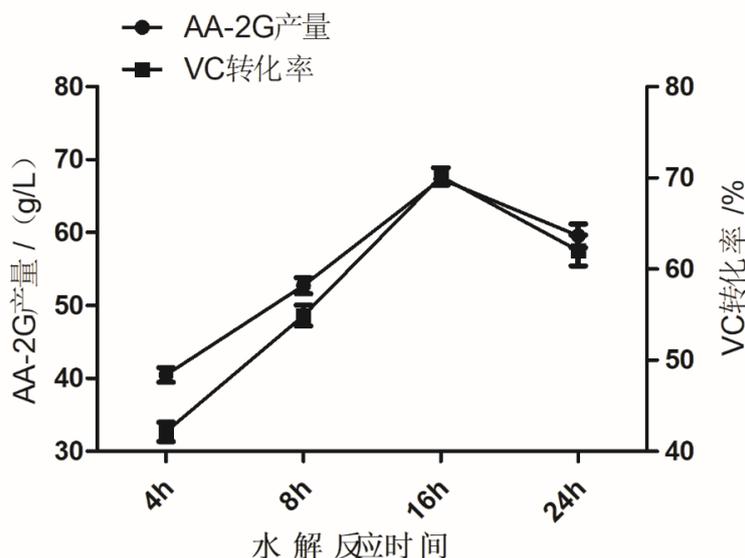


图 16 葡萄糖淀粉酶水解反应时间对酶法转化合成 AA-2G 的影响

3 结果与讨论

(1) 本研究利用重组 *E.coli* BL21 (DE3)-pET30a-cgt1 为产酶菌株, 通过对产酶条件进行优化, 确定最佳产酶条件为: 诱导温度为 25 °C, 发酵培养基为 TB 液体培养基, 诱导时长为 8 h, 接种量为 4%, 诱导剂 IPTG 浓度为 50 μ M, 诱导时菌体密度为 1.2-1.9, 培养基初始 pH 值自然, 破碎上清中的可溶性蛋白占全菌裂解液的比值较大, 且终菌体密度高。

(2) 利用实验室制备的 α -环糊精葡萄糖基转移酶粗酶液, 通过对几种不同的糖基供体 (β -环糊精、麦芽糊精、麦芽糖、可溶性淀粉) 进行比较研究, 发现在初始反应条件下, β -环糊精作为糖基供体, AA-2G 的产量为 2.21 g/L, 相较于其他糖基供体有较大优势, 因此选择 β -环糊精作为糖基供体。以 VC 和 β -环糊精为底物转化合成 AA-2G, 通过 HPLC 分析, 确定转化液中含有 AA-2G。通过对转化反应条件进行优化确定了自制粗酶液转化合成 AA-2G 的最佳反应条件: 转化反应 pH 值为 5.0, 转化反应时间为 48 h, 转化反应温度为 30 °C, 转化反应溶剂为纯水, v (粗酶液) : v (转化反应总体积) = 1: 5, m (VC) : m (β -环糊精) = 1:

2, 葡萄糖淀粉酶添加量为 50 U/mL, 葡萄糖淀粉酶水解反应时间为 16 h, 最终 AA-2G 的产量达到 68.61 g/L, VC 转化率为 71.45%。与初始条件相比, VC 转化率提高了 2.1 倍, 为工业化生产提供参考。

参考文献

- [1] 张子臣. 酶法转化合成 2-氧- α -D-吡喃葡萄糖基抗坏血酸. 无锡: 江南大学, 2010.
- [2] H Tatamoto, K Ootaki, 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):1800-6.
- [3] I Yamamoto, N Muto, et al. Collagen synthesis in human skin fibroblasts is stimulated by a stable form of ascorbate, 2-O-alpha-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid. *J Nutr*, 1992, 122(4):871-7.
- [4] Zhankun Wang, Qingsheng Qi, et al. Engineering of cyclodextrin glucanotransferase on the cell surface of

- Saccharomyces cerevisiae for improved cyclodextrin production. Appl Environ Microbiol, 2006 ,72(3):1873-7.
- [5] 邢琳,张秀华,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. 中国生化药物杂志,2016,36(11):5-8.
- [6] 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. 无锡: 江南大学 2013
- [7] 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. 食品与生物技术学报,2018,37(01): 27-32.
- [8] Kai Song, Jingjing Sun, et al. Heterologous expression of cyclodextrin glycosyltransferase my20 in Escherichia coli and Its application in 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic Acid production. Front Microbiol, 2021, 12:664339.
- [9] Xiumei Tao, Tian Wang, et al. Enhanced 2 O α D Glucopyranosyl L ascorbic Acid Synthesis through Iterative Saturation Mutagenesis of Acceptor Subsite Residues in Bacillus stearothermophilus NO2 Cyclodextrin Glycosyltransferase. J Agric Food Chem, 2018, 66(34):9052-9060.
- 版权声明:** ©2026 作者与开放获取期刊研究中心(OAJRC)所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。
<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

