

2-氧- α -D-葡萄糖基-L-抗坏血酸酶法合成工艺优化

Optimization of enzymatic transformation of 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid

黄立萍^{1,2} 郝建华^{1,3} 王伟¹ 孙晶晶¹ 刘均忠¹

HUANG Li-ping^{1,2} HAO Jian-hua^{1,3} WANG Wei¹ SUN Jing-jing¹ LIU Jun-zhong¹

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所农业农村部极地渔业开发重点实验室, 山东 青岛 266071;

2. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306; 3. 江苏省海洋生物产业技术协同创新中心, 江苏 连云港 222005)

(1. The Yellow Sea Fisheries Research Institute of Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Sustainable Development of Polar Fishery, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao, Shandong 266071, China; 2. College of Food Science & Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Jiangsu Collaborative Innovation Center for Exploitation and Utilization of Marine Biological Resource, Lianyungang, Jiangsu 222005, China)

摘要:以 L-抗坏血酸和 β -环糊精为底物, 利用海洋微生物 Y112 所产的环糊精葡萄糖基转移酶(CGTase)催化合成 2-氧- α -D-葡萄糖基-L-抗坏血酸(AA-2G)。在单因素试验的基础上应用 Plackett-Burman 试验设计筛选出 3 个对 AA-2G 产量有显著影响的因素(pH、底物浓度、加酶量), 然后应用 Box-Behnken 方法进行三因素三水平的试验设计优化 AA-2G 酶法合成工艺。结果表明, 最佳工艺条件为: 加酶量 90.78 U/g \cdot β -环糊精, pH 9.07, 底物浓度 56.81 g/L, 底物配比 1:1 (体积比), 转化时间 24 h, 温度 45 $^{\circ}$ C。该条件下, AA-2G 的产量为 10.62 g/L。

关键词: L-抗坏血酸; 2-氧- α -D-葡萄糖基-L-抗坏血酸; 环糊精葡萄糖基转移酶; 海洋微生物

Abstract: 2-O- α -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid (AA-2G) was transformed by marine microorganism cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) using L-ascorbic acid and β -cyclodextrin (β -CD) as substrate. The qualitative and quantitative analyses of AA-2G were undertaken by LC-MS and HPLC. On the basis of single factor experiment Plackett-Burman design was carried out to determine three main effective factors (pH, substrate concentration, enzyme concentration). Then Box-Behnken design using three factors and three levels was applied to optimize synthesis conditions of AA-2G. The

results indicated that the optimum conditions were pH 9.07, enzyme concentration 90.78 U/g \cdot β -CD, substrate concentration 56.81 g/L, the ratio of substrate 1:1 (volume ratio), reacting for 24 h, at 45 $^{\circ}$ C. Under this condition the yield of AA-2G was 10.62 g/L.

Keywords: L-ascorbic acid; 2-O- α -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid; cyclodextrin glucanotransferase; marine microorganism

L-抗坏血酸(L-ascorbic acid, L-AA)又名 V_C, 是一种人体不可缺少的营养素, 人体自身无法合成 V_C, 必须从食物中获得。V_C在多种生理活动中均起到重要作用, 如胶原蛋白合成、改善脂肪代谢、提高免疫力等^[1]。V_C可广泛应用于食品、化妆品、医疗等行业^[2-4], 然而 V_C分子结构中具有特殊的连烯二醇结构, 容易被氧化失去生理活性, 限制了它在各领域中的应用^[5]。因此, 人们一直致力于开发稳定性好的 V_C衍生物。

2-氧- α -D-葡萄糖基-L-抗坏血酸(AA-2G)是一种 V_C糖苷类衍生物, 被认为是 V_C的最佳替代品, 具有稳定性好、安全性高、生理活性与 V_C最接近等优势。由于 AA-2G 进入人体后可被缓慢分解成 V_C与 D-葡萄糖, 能持续提供 V_C^[6], 因此可添加到食品中作为抗氧化剂、V_C补充剂等。此外还可应用于医疗保健、化妆品、畜牧、水产养殖等领域^[7]。

AA-2G 主要通过酶法合成, 即利用环糊精葡萄糖基转移酶(CGTase)的转糖基作用, 将葡萄糖基以 α -1,4 糖苷键接于 L-抗坏血酸的 C2 上, 取代原有的羟基。近年来中国对 AA-2G 的合成已有很多研究报道, 高爱伟等^[8]利用 CGTase、麦芽糊精和 V_C合成 AA-2G, 在最优条件下产量为 3.13 g/L; Eibaid 等^[9]利用 CGTase 转化合成 AA-2G, 最高产量为 7.05 g/L; 单丽媛^[10]用游离 CGTase 合成 AA-2G, 经条

基金项目:国家重点研发计划(编号:2018YFC0311106); 青岛海洋科学与技术试点国家实验室-鳌山科技计划(编号:2016ASKJ14); 青岛市市南区科技发展计划(编号:2018-4-002-ZH)

作者简介:黄立萍, 女, 上海海洋大学在读硕士研究生。

通信作者:郝建华(1976—), 男, 黄海水产研究所研究员, 博士。

E-mail: haojh@ysfri.ac.cn

收稿日期:2018-02-09

件优化后产量为 6.02 g/L。但均未达到工业化生产水平,一方面是由于底物的转化率较低,另一方面是单位酶活低,导致生产成本高。

海洋中有着极为丰富的微生物资源,随着海洋资源的进一步开发,与海洋微生物酶相关的研究逐渐增多,海洋微生物已成为开发新型酶制剂的重要来源。目前来自深海和极地的极端微生物作为产酶资源也成为研究热点,低温酶、碱性酶和耐盐酶等结构和功能新颖的极端酶以其独特的催化作用大大拓宽了微生物酶的应用范围。但是,目前报道的从海洋环境中分离的产 CGTase 的菌株只有本课题组所筛选到的 Y112 菌株^[11],该菌株所产的酶稳定性好,单位酶活较高,在转化淀粉制备 α -环糊精方面有一定的优势^[12],未见其他海洋来源的产 CGTase 菌株。因此本研究继续探讨其在海洋生物酶法合成 AA-2G 方面的应用潜力,以 V_c 和 β -环糊精(β -CD)为底物,采用单因素试验和响应面分析法对合成条件进行优化,以期提高 AA-2G 的产量,为今后的合成工艺研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

AA-2G 标准品:色谱纯,美国 Sigma 公司;

V_c 标准品:色谱纯,国药集团化学试剂有限公司;

海洋微生物环糊精葡萄糖苷转移酶酶粉:电泳纯,酶活力 80 U/g,本研究室发酵制备;

β -环糊精、 V_c :分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

磷酸:色谱纯,天津科密欧化学试剂有限公司;

甲醇:色谱纯,德国默克医药生物科技有限公司;

甲酸:色谱纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

全温摇床:Modle 481 型,美国赛默飞世尔科技公司;

台式高速离心机:H1650-W 型,长沙湘仪离心机仪器有限公司;

电子天平:HANGPING FA1004 型,上海精密科学仪器有限公司;

高效液相色谱仪:Ultimate 3000 型,美国戴安公司;

高分辨质谱仪:maXis Q-TOF 型,美国布鲁克·道尔顿公司;

色谱柱:Symmetry C₁₈ 型,5 μ m (2.1 mm \times 150 mm),美国沃特世科技有限公司;

高效液相色谱仪:2695 型,美国沃特世科技有限公司;

检测器:2996 型,美国沃特世科技有限公司;

色谱柱:SB-Aq 型,5 μ m (250 mm \times 4.6 mm),美国安捷伦科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 环糊精葡萄糖基转移酶酶活测定方法

(1) 试验组:用 0.2 mol/L 的 NaOH-甘氨酸缓冲液(pH 8.5)配制 4 g/100 mL 可溶性淀粉液做为底物,取 0.9 mL 底物于试管中,50 $^{\circ}$ C 水浴预热 5 min,然后加入适当

稀释倍数的酶液 0.1 mL 混合均匀,50 $^{\circ}$ C 水浴准确反应 10 min,再加入 1 mL 盐酸溶液(1 mol/L)终止反应,最后加入 4 mL 甲基橙溶液(8 mg/L)混匀,室温静置 20 min。

(2) 对照组:取底物 0.9 mL 于试管中,50 $^{\circ}$ C 水浴预热 5 min。随试验组一起 50 $^{\circ}$ C 水浴反应 10 min,加入 1 mL 盐酸溶液混合均匀后,再加入与试验组相同的酶液,其他处理与试验组相同。最后用紫外分光光度计在 507 nm 下测定试验组与对照组的吸光度。1 个酶活力单位定义为上述条件下 1 min 生成 1 μ mol α -环糊精所需要的酶量^[13]。

1.2.2 AA-2G 的鉴定 通过 LC-MS 检测转化产物中是否含有 AA-2G,检测条件:柱温 45 $^{\circ}$ C,流速 0.3 mL/min,流动相为 95% 的甲酸(浓度为 2%)和 5% 的乙腈,离子方式 ESI+,锥孔电压 4.5 kV,碰撞能量 8 eV,质量范围 50~1 500 m/z 。

1.2.3 AA-2G 含量测定 根据文献[14],修改如下,HPLC 条件为:检测波长 254 nm,流动相 20 mmol/L 稀磷酸,流速 0.8 mL/min,柱温 35 $^{\circ}$ C,进样量 10 μ L。用超纯水配制浓度为:250,500,1 000,1 500,2 000,3 000 mg/L 的 AA-2G 标准液,通过 HPLC 分析,以 AA-2G 浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,利用软件 Empower pro 制作 AA-2G 的标准曲线。经 HPLC 分析得出反应液中 AA-2G 峰面积后,在软件 Empower pro 中处理可直接得出 AA-2G 浓度。

1.2.4 单因素试验设计 酶法转化合成 AA-2G 条件中主要包括转化时间、温度、pH、底物浓度、底物配比、加酶量 6 个关键因素。设计单因素试验考察这 6 个因素对酶法合成 AA-2G 产量的影响,所有试验均重复 3 次。初始转化条件:反应总体积为 2 mL,配制浓度均为 100 g/L 的 β -环糊精溶液和 V_c 溶液,各取 1 mL 加入反应容器中作为底物(终浓度均为 50 g/L),以及 0.2 g Na₂SO₃ 作为抗氧化剂,调节 pH 至 9,按照 100 U/g \cdot β -环糊精的比例加入 CGTase,在 35 $^{\circ}$ C,150 r/min 反应 24 h。

(1) 转化时间:按照初始转化条件,其他条件不变,转化时间分别设为 6,12,18,24,36,42,48 h 进行反应。

(2) 温度:按照初始转化条件,其他条件不变,反应温度分别设为 15,25,30,35,40,45,50,55 $^{\circ}$ C 进行反应。

(3) pH 值:按照初始转化条件,其他条件不变,调节 pH 值分别至 4,5,6,7,8,9,10,11 进行反应。

(4) 底物浓度:按照初始转化条件,其他条件不变, β -环糊精溶液和 V_c 溶液的终浓度相同,均分别设置为 10,20,30,40,50 g/L。

(5) 底物配比:按照初始转化条件,其他条件不变,分别设置 β -环糊精溶液与 V_c 溶液的比例(体积比)为 1:4,2:3,1:1,3:2,4:1 作为底物进行反应。

(6) 加酶量:按照初始转化条件,分别按照 0,50,100,150,200,250,300 U/g \cdot β -环糊精的比例加入 CGTase 进行反应。

1.2.5 Plackett-Burman 试验设计 在单因素试验的基础上,通过 Plackett-Burman 试验对转化时间、温度、pH、底物浓度、底物配比、加酶量 6 个因素进行筛选,从中选出对酶法

合成 AA-2G 具有显著影响的因素,采 Design-Expert.8.0.6 软件进行试验设计及结果分析,每组试验均重复 3 次。

1.2.6 Box-Behnken 试验设计 根据 Plackett-Burman 筛选出的 3 个显著影响因素,每个因素取 3 个水平,进行三因素三水平的试验,所有试验均重复 3 次,以获得酶法转化合成 AA-2G 的最佳工艺条件。

2 结果与讨论

2.1 LC-MS 鉴定转化液中 AA-2G

为了确认反应液中是否有 AA-2G 生成,对 AA-2G 标准品和反应液进行质谱鉴定。AA-2G 的分子量为 338.27。AA-2G 标准品[图 1(a)] $m/z = 339 (M + H^+) = m/z 361 (M + Na^+)$,反应液[图 1(b)] $m/z = 361.07 (M + Na^+)$,推断其分子量为 338.07,与标准样品 MS 图一致,由此可说明反应液中含有 AA-2G。

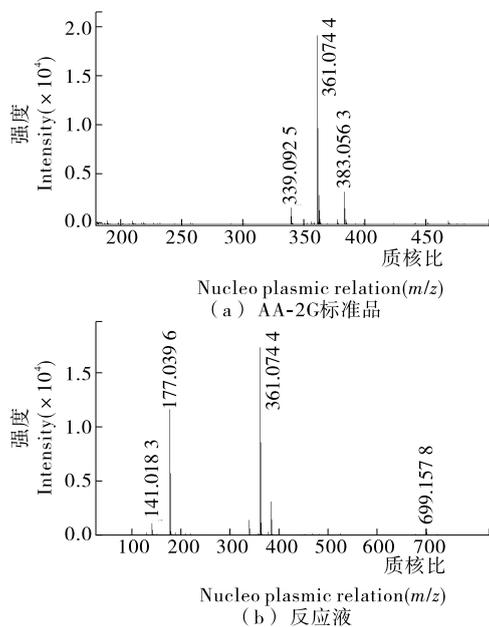


图 1 AA-2G 标准品及反应液 MS 图

Figure 1 MS analysis of AA-2G standard sample and biotransformation product

2.2 HPLC 检测反应液中 AA-2G 含量

通过 HPLC 检测分析 AA-2G 标准品、 V_c 标准品和反应液,结果表明, V_c 标准品的保留时间是 5.08 min[图 2(b)], AA-2G 标准品保留时间是 5.6 min[图 2(a)],与反应液在 5.6 min 处出现的峰保留时间[图 2(c)]一致。通过 HPLC 检测梯度浓度 AA-2G 标准液,以 AA-2G 浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,利用软件 Empower pro 制作 AA-2G 标准曲线,方程为 $Y = 7.09E + 003X + 1.33E + 006 (R^2 = 0.98)$,经 HPLC 分析得出反应液样品中 AA-2G 峰面积后,在软件 Empower pro 中处理可直接得出其 AA-2G 浓度。

2.3 酶法转化合成 AA-2G 的单因素试验

2.3.1 转化时间对酶法合成 AA-2G 的影响 由图 3 可知,随着转化时间的延长,AA-2G 的产量大幅度增加,当时间达到 24 h 时,AA-2G 的产量最高,超过 24 h 后,AA-2G 产量开

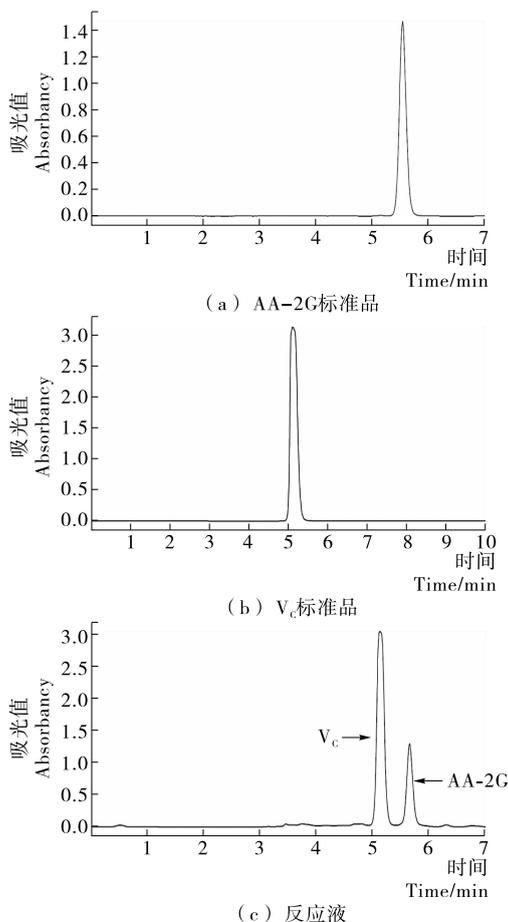


图 2 AA-2G 标准品、 V_c 标准品及反应液 HPLC 图

Figure 2 HPLC analysis of AA-2G standard sample and V_c standard sample and biotransformation product

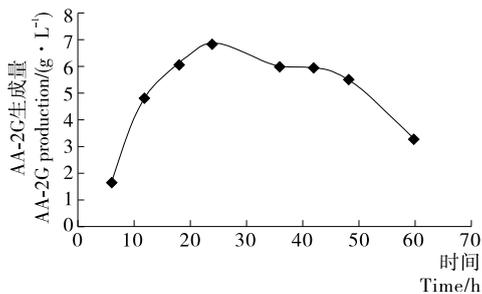


图 3 转化时间对合成 AA-2G 的影响

Figure 3 Effect of time on the synthesis of AA-2G

始减少,可能是随反应时间的延长有其他 V_c 衍生物生成。所以选择 24 h 进行后续酶法转化合成 AA-2G 条件优化进行研究。

2.3.2 温度对酶法合成 AA-2G 的影响 由图 4 可知,随着反应温度的升高,酶法转化合成 AA-2G 的产量也在不断增加,45 °C 时达到最大,随着温度的继续升高,AA-2G 的产量反而逐渐下降,可能是 β -环糊精溶解度较小,温度太低造成 β -环糊精析出,而温度过高会导致部分酶活损失。所以选择 45 °C 进行后续酶法转化合成 AA-2G 条件优化研究。

2.3.3 pH 对酶法合成 AA-2G 的影响 由图 5 可知,当 pH 达到 9 时,酶法转化合成 AA-2G 的产量最高,为 8.03 g/L;

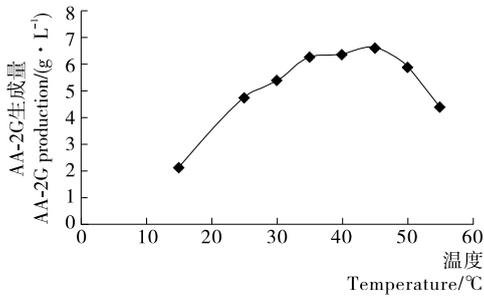


图4 温度对合成 AA-2G 的影响

Figure 4 Effect of temperature on the synthesis of AA-2G

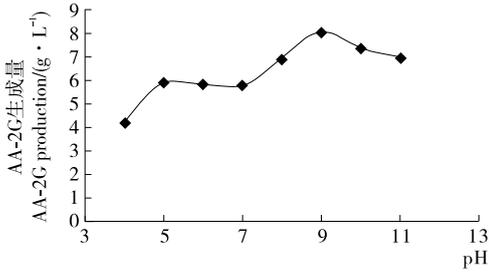


图5 pH对合成 AA-2G 的影响

Figure 5 Effect of pH on the synthesis of AA-2G

当 pH 再升高时, AA-2G 的产量反而下降, 可能是本实验室制备的 CGTase 最适 pH 为碱性, pH 太低造成酶失活, 而 pH 过高使 V_C 氧化速度加快, 因此合成 AA-2G 的产量下降。所以选择 pH 9 进行后续酶法转化合成 AA-2G 条件优化研究。

2.3.4 底物浓度对酶法合成 AA-2G 的影响 由图 6 可知, 随着底物浓度的不断增加, AA-2G 的产量也随之增加。当底物浓度达到 50 g/L 时, AA-2G 的产量达到最高(6.6 g/L)。当底物浓度超过 50 g/L 时, AA-2G 的产量反而略有下降, 可能是高浓度底物降低了水的有效浓度, 降低了分子扩散性, 从而降低了酶促反应速度。所以选择底物浓度为 50 g/L 进行后续酶法转化合成 AA-2G 条件优化研究。

2.3.5 底物比对酶法合成 AA-2G 的影响 由图 7 可知, 当 β-环糊精溶液的比例逐渐增大时, AA-2G 产量缓慢增加, 当 β-环糊精溶液与 V_C 溶液体积比达到 1:1 时, AA-2G 的产量最大, 可能由于 β-环糊精是糖基供体的提供者, 其所占比例过大使得小分子糖类副产物生成量太多, 与 V_C 竞争 CGTase

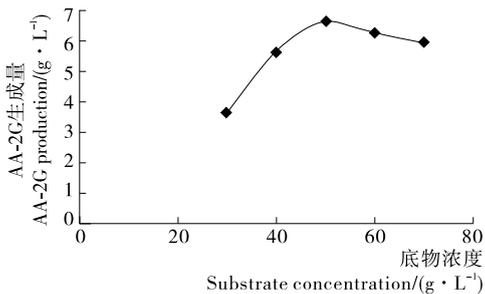


图6 底物浓度对合成 AA-2G 的影响

Figure 6 Effect of substrate concentration on the synthesis of AA-2G

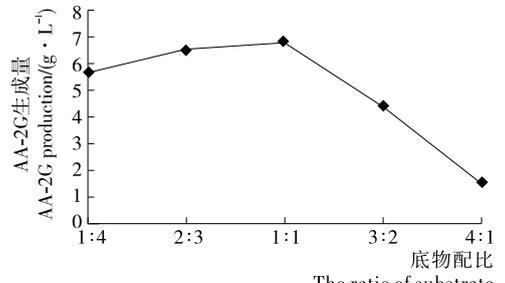


图7 底物比对合成 AA-2G 的影响

Figure 7 Effect of the ratio of substrate on the synthesis of AA-2G

的受体位点从而抑制了 AA-2G 生成^[14], 所占比例过小则糖基供体不足, 都不利于 AA-2G 的合成, 所以选择 β-环糊精溶液与 V_C 溶液的体积比为 1:1 进行后续酶法转化合成 AA-2G 条件优化研究。

2.3.6 加酶量对酶法合成 AA-2G 的影响 由图 8 可知, 在一定范围内随着酶浓度的增高, AA-2G 的产量随之增加。当酶浓度达到 100 U/g · β-环糊精时, AA-2G 的产量最高, 达到 7.6 g/L。酶浓度继续升高, AA-2G 的产量反而逐渐降低, 可能是加酶量过大导致反应过程中过多小分子糖类副产物产生, 制约了 AA-2G 的产量。所以选择酶浓度为 100 U/g · β-环糊精进行后续酶法转化合成 AA-2G 条件优化研究。

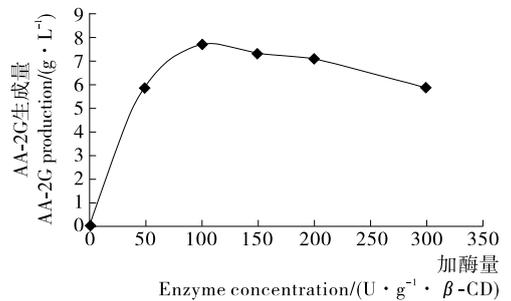


图8 加酶量对合成 AA-2G 的影响

Figure 8 Effect of the enzyme concentration on the synthesis of AA-2G

2.4 Plackett-Burman 试验

在单因素试验的基础上, 通过 Plackett-Burman 试验对 6 个因素进行筛选, 每个因素取 2 水平, PB 试验因素水平见表 1, 试验设计及结果见表 2。

用 Design-Expert 8.0.6 数据分析软件对 Plackett-Burman 试验结果进行处理, 得到 PB 试验结果分析见表 3, pH、底物浓度、加酶量 3 个因素的 P 值 < 0.05, 是显著因素, 因此确定这 3 个因素为 AA-2G 产量的主要影响因子。

2.5 Box-Behnken 试验

Box-Behnken 试验因素水平见表 4, 试验设计及结果见表 5。

用 Design-Expert V8.0.6 数据分析软件对数据进行回归分析, 分析结果见表 6, P 值 < 0.000 1, 说明该模型是显著的, 失拟项 P = 0.127 3 > 0.05, 表明该模型的失拟项不显著。方

表 1 Plackett-Burman 试验因素水平

Table 1 Level of experiment factor of Plackett-Burman

水平	A pH	B 温度/ °C	C 加酶量/ (U · g ⁻¹ · β -CD)	D 转化时间/ h	E 底物配比	F 底物浓度/ (g · L ⁻¹)
-1	8	40	50	20	2 : 3	30
1	10	55	200	28	3 : 2	70

程的 $R^2=0.9769$, 说明模型拟合度较好, 能较好地预测 AA-2G 产量变化。二次多项式回归方程:

$$Y=10.25-0.99A-0.41B+2.06C-0.90AB+0.74AC+1.60BC-2.18A^2-2.02B^2-3.01C^2 \quad (1)$$

2.6 响应面图分析

用 Design-Expert V8.0.6 数据分析软件进行分析, 各因素的交互作用对酶法转化 AA-2G 产量的影响见图 9~11。

表 2 Plackett-Burman 试验设计及结果

Table 2 Design of Plackett-Burman and results

序号	A	B	C	E	D	F	AA-2G 产量/ (g · L ⁻¹)
1	1	1	-1	1	1	1	2.560
2	-1	1	1	-1	1	1	5.212
3	1	-1	1	1	-1	1	8.280
4	-1	1	-1	1	1	-1	0.644
5	-1	-1	1	-1	1	1	5.192
6	-1	-1	-1	1	-1	1	0.489
7	1	-1	-1	-1	1	-1	0.560
8	1	1	-1	-1	-1	1	6.340
9	1	1	1	-1	-1	-1	6.876
10	-1	1	1	1	-1	-1	3.028
11	1	-1	1	1	1	-1	4.112
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0.944

表 3 Plackett-Burman 试验结果分析

Table 3 The analysis of the results of Plackett-Burman

因素	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
pH	14.56	1	14.56	9.35	0.028 2	显著
温度	2.15	1	2.15	1.38	0.292 7	
加酶量	37.32	1	37.32	23.96	0.004 5	显著
底物配比	3.01	1	3.01	1.93	0.223 2	
转化时间	4.91	1	4.91	3.15	0.136 0	
底物浓度	11.82	1	11.82	7.59	0.040 1	显著

表 4 Box-Behnken 试验因素水平

Table 4 Level of experiment factor of Box-Behnken

水平	A 加酶量/(U · g ⁻¹ · β -CD)	B pH	C 底物浓度/(g · L ⁻¹)
-1	50	8	30
0	100	9	50
1	200	10	70

由图 9 可知, 响应面变化明显, 随着 pH 的升高, AA-2G 产量先缓慢增加后减小, 随着加酶量的增大, AA-2G 产量呈现先增加后降低的趋势。等高线图表明, 等高线呈椭圆形, 说明交互作用较强。由表 6 可知, 其交互作用对 AA-2G 产

表 5 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 5 Design of Box-Behnken and results

序号	A	B	C	AA-2G 产量/(g · L ⁻¹)
1	-1	-1	0	7.027
2	1	1	0	6.287
3	-1	1	0	7.610
4	1	0	0	3.290
5	-1	0	-1	4.590
6	1	0	-1	1.683
7	-1	0	1	6.968
8	1	0	1	7.010
9	0	-1	-1	4.823
10	0	1	-1	1.219
11	0	-1	1	6.036
12	0	1	1	8.803
13	0	0	0	10.109
14	0	0	0	10.435
15	0	0	0	10.708
16	0	0	0	9.954
17	0	0	0	10.032

表 6 响应面模型方差分析表[†]

Table 6 The analysis of variance of Box-Behnken

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	142.36	9	15.82	76.09	<0.000 1	显著
A	7.85	1	7.85	37.77	0.000 5	**
B	1.33	1	1.33	6.39	0.039 4	*
C	34.00	1	34.00	163.57	<0.000 1	**
AB	3.20	1	3.20	15.41	0.005 7	**
AC	2.17	1	2.17	10.46	0.014 4	*
BC	10.18	1	10.18	48.95	0.000 2	**
A ²	19.95	1	19.95	95.99	<0.000 1	**
B ²	17.13	1	17.13	82.42	<0.000 1	**
C ²	38.10	1	38.10	183.25	<0.000 1	**
残差	1.06	7	0.21			
失拟项	3.47	3	0.35	3.53	0.127 3	不显著
纯误差	0.40	4	0.10			
合计	143.82	16				

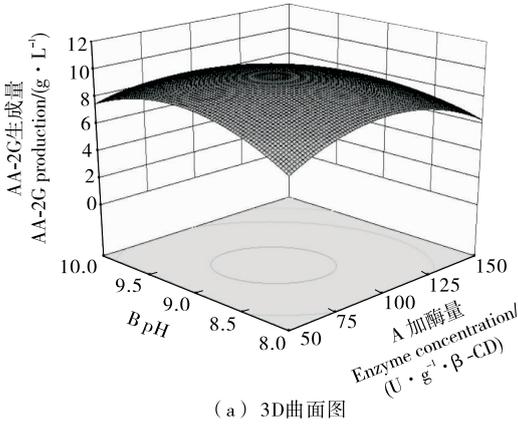
[†] ** 表示极显著 ($P < 0.01$); * 表示显著 ($0.01 < P < 0.05$)。

量影响极显著。由图 10 可知,响应面变化明显,随着底物浓度和加酶量的增大,AA-2G 产量先增加后减小。等高线图表明,沿底物浓度轴向的等高线变化密集,加酶量的轴向等高线变化比较稀疏,说明底物浓度对 AA-2G 产量的影响比加酶量大,等高线呈椭圆形,说明交互作用强,由表 6 可知,其交互作用对 AA-2G 产量影响显著。由图 11 可知,响应面变化明显,随着底物浓度和 pH 的增加 AA-2G 产量先升高再逐渐降低。等高线图表明,沿底物浓度轴向的等高线变化

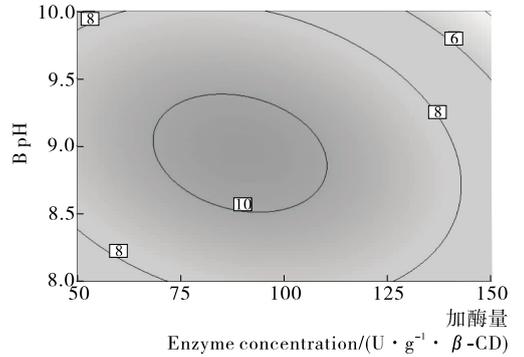
密集,pH 的轴向等高线变化相对稀疏,说明底物浓度对 AA-2G 产量的影响比 pH 大,等高线呈椭圆形,说明交互作用强,由表 6 可知,其交互作用对 AA-2G 产量影响极显著。

2.7 验证实验

对回归方程进行分析,得到理论最优条件组合:加酶量 90.78 U/g · β-环糊精,pH 9.07,底物浓度为 56.81 g/L,底物配比 1:1(体积比),转化时间 24 h,温度 45 °C,该条件下 AA-2G 达到最高产量为 10.67 g/L。在此条件下进行验证实



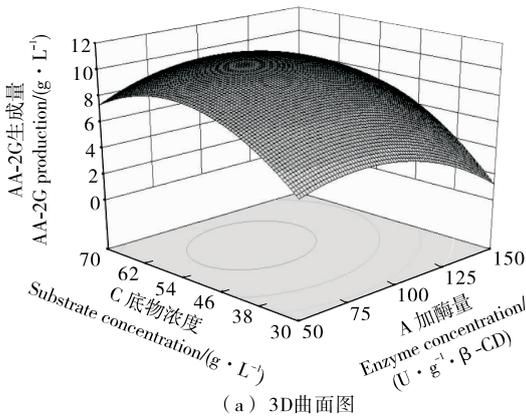
(a) 3D曲面图



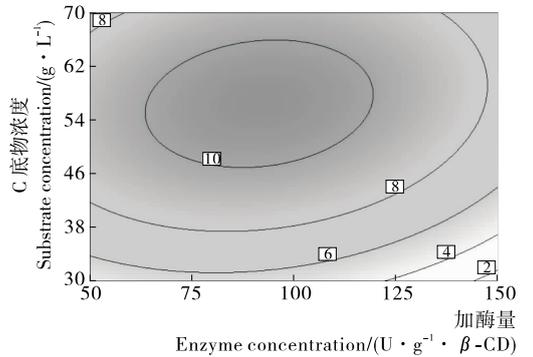
(b) 等高线图

图 9 加酶量与 pH 对 AA-2G 产量的交互作用

Figure 9 Interaction effects of enzyme concentration and pH



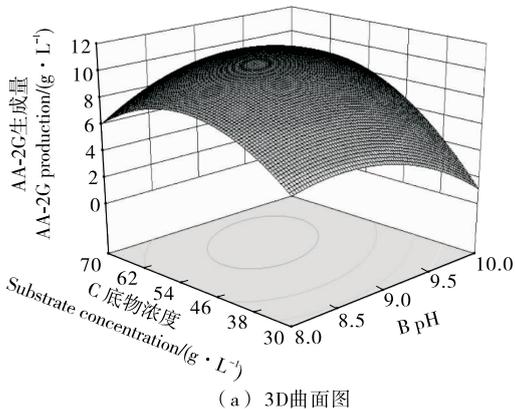
(a) 3D曲面图



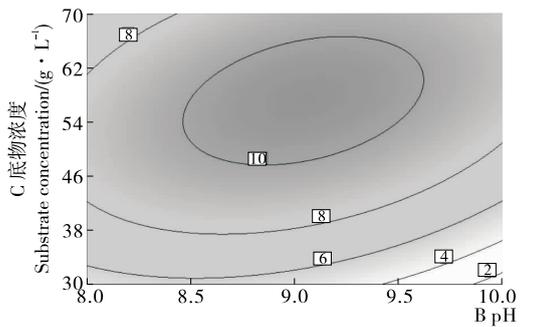
(b) 等高线图

图 10 加酶量和底物浓度对 AA-2G 产量的交互作用

Figure 10 Interaction effects of enzyme concentration and substrate concentration



(a) 3D曲面图



(b) 等高线图

图 11 pH 和底物浓度对 AA-2G 产量的交互作用

Figure 11 Interaction effects of pH and substrate concentration

验,3次实验 AA-2G 平均产量为 10.62 g/L,与模型预测值基本吻合,说明该试验选用的模型是合理的。

3 结论

本研究采用单因素试验设计及响应面分析法对 CGTase 酶法合成 AA-2G 的条件进行优化,得到了最优工艺条件为加酶量 90.78 U/g $\cdot\beta$ -环糊精,pH 9.07,底物浓度 56.81 g/L,底物配比 1:1(体积比),转化时间 24 h,温度 45 $^{\circ}$ C,在此条件下 AA-2G 产量为 10.62 g/L。相较于之前的研究^[15],AA-2G 产量达到较高水平。CGTase 酶被认为是合成 AA-2G 的最佳酶源,但该酶价格昂贵,本实验室利用海洋微生物 Y112 发酵制备的 CGTase 酶粉单位酶活较高,有利于降低生产成本。然而游离酶存在难以回收利用的缺点,后续将对固定化 CGTase 合成 AA-2G 进行研究,进一步提高 AA-2G 产量及固定化 CGTase 的利用次数。

参考文献

- [1] NAIDU K A. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview[J]. Nutr J, 2003, 2(7): 1-10.
- [2] 彭家泽,刁杰. 抗坏血酸的生理功能及其在食品中的应用[J]. 食品与机械, 1994(4): 29.
- [3] FUCHS J, KERN H. Modulation of UV-light-induced skin inflammation by D-alpha-tocopherol and L-ascorbic acid: A clinical study using solar simulated radiation[J]. Free Radic Biol and Med, 2016, 37(9): 1 006-1 012.
- [4] VERRAX J, CADROBBI J, DELVAUX M, et al. The association of vitamins C and K3 kills cancer cells mainly by autophagy, a novel form of cell death basis for their potential use as adjuvants in anticancer therapy[J]. Eur J Med Chem, 2003, 38(5): 451-457.
- [5] YAMAMOTO I, TAI A. The current state on development of

novel vitamin derivatives[J]. Nihon Rinsho, 1999, 57(10): 2 332-2 338.

- [6] PROUSOONTORN M H, PANTATAN S. Production of 2-O- α -glucopyranosyl L-ascorbic acid from ascorbic acid and β -cyclodextrin using immobilized cyclodextrin glycosyltransferase[J]. J Incl Phenom Macrocycl Chem, 2007, 57(1/4): 39-46.
- [7] 邢琳,张秀华,钊倩倩,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.
- [8] 高爱伟,李江华,刘龙,等. 酶法合成 2-氧- α -D-葡萄糖基-L-抗坏血酸(AA-2G)条件的研究[J]. 工业微生物, 2014, 44(1): 45-50.
- [9] EIBAID A I, BASHARI M O, MUSA A. Improvement of 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid biosynthesis using ultrasonic radiation[J]. Trop J Pharm Res, 2015, 14(4): 599-604.
- [10] 单丽媛. 固定化 CGTase 生物转化合成 AA-2G 及转化过程优化研究[D]. 无锡: 江南大学, 2016: 16-21.
- [11] HAO Jian-hua, HUANG Li-ping, CHEN Xiao-tong, et al. Identification, cloning and expression analysis of an alpha-CGTase produced by strain Y112[J]. Protein Express Purif, 2017, 140: 8-15.
- [12] CHEN Xiao-tong, HUANG Li-ping, SUN Jing-jing, et al. Production and characterization of a new α -Cyclodextrin glycosyltransferase from a marine strain of Bacillus sp. Y112[J]. J Biobased Mater Bio, 2017, 11(3): 236-241.
- [13] 张晓磊,郝建华,郑鸿飞,等. 1株产 α -环糊精葡萄糖基转移酶菌株的产酶条件优化[J]. 中国海洋药物, 2015(5): 63-70.
- [14] 熊艳军,宿玲恰,王蕾,等. 环糊精葡萄糖基转移酶的酿酒酵母表面展示及其生产 2-O- α -D-吡喃葡萄糖基抗坏血酸[J]. 微生物学报, 2015, 55(10): 1 305-1 313.
- [15] 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.

(上接第 182 页)

- [51] 孙昱,马晓斌,刘建勋. 野菊花心血管活性部位化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(1): 61-64.
- [52] 陈琼,顾仁樾,周端. 藏红花对冠心病心绞痛患者血流变学的作用[J]. 辽宁中医杂志, 1997, 24(8): 372.
- [53] 周达. 玫瑰花黄酮类化合物的提取、分离及生物活性研究[D]. 天津: 天津商业大学, 2010: 40-46.
- [54] 谢新华,董军,付咏梅,等. 金银花解热作用及其机制的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(9): 2 071-2 073.
- [55] 章李军,凌霜,陈刚领,等. 菊花提取物舒张血管及抗炎机制研究[J]. 上海中医药杂志, 2009, 43(5): 60-63.
- [56] 张星海. 不同来源菊花化学成分、抗炎作用及其机理的研究[D]. 南京: 南京中医院大学, 2014: 85-100.
- [57] 刘剑刚,张大武,李姝,等. 藏红花对冠心病心绞痛患者血流变学的作用[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(2): 189-193.
- [58] 陈剑峰. 红花对大鼠急性脊髓损伤后保护机制的实验研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2014: 4-9.

- [59] SONG Li-juan, ZHU Yu, JIN Ming, et al. Hydroxysafflor yellow a inhibits lipopo-lysacchaide induced inflammatory signal transduction in human alveolar epithelial A549 cell[J]. Fitoterapia, 2013(84): 107-114.
- [60] AKHONDZADEH S, FALLAH-POUR H, AFKHAML K, et al. Comparison of Crocus sativus L. and imipramine in the treatment of mild to moderate depression: a pilot double-blind randomized trial[J]. BMC Complem Alternat Med, 2004(10): 4-12.
- [61] AKHONDZADEH S, TAHMACEBI-POUR N, NOORBALAL A A, et al. Crocus sativus L. in the treatment of mild to moderate depression: A double-blind, randomized and placebo-controlled trial[J]. Phytother Res, 2005, 19(2): 148-151.
- [62] YANG Lin-a, QIAN Zhi-yu, JI Hui, et al. Inhibitory effect on protein kinase C by Crocetin attenuates palmitate induced insulin insensitivity in 3T3-L1 adipocytes[J]. Eur J Pharmacol, 2010, 642(1/2/3): 47-55.