

2-O- α -D-吡喃葡萄糖基抗坏血酸研究进展* Current Progress in Biosynthesis and Applications of 2-O- α -D-Glucopyranosyl-L-Ascorbic Acid

李 标,唐双焱**

LI Biao, TANG Shuangyan

(中国科学院微生物研究所,微生物生理与代谢工程重点实验室,北京 100101)

(CAS Key Laboratory of Microbial Physiological and Metabolic Engineering, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100101, China)

摘要:维生素C(又称抗坏血酸)是一种水溶性维生素,对人体健康有重要作用。抗坏血酸在食品、医疗、化妆品等行业上有广泛的应用价值,但由于自身的不稳定性,易被氧化降解,严重影响其应用。为解决这个问题,对稳定的抗坏血酸衍生物的研究成为国内外专家学者的研究热点。抗坏血酸的一种重要衍生物——2-O- α -D-吡喃葡萄糖基抗坏血酸(AA-2G),作为抗坏血酸的替代品,稳定性显著提高,具有很好的开发应用价值。国内外针对该物质进行了诸多的研究,本文就AA-2G生物合成和应用的国内外最新研究进展进行总结概括。

关键词:抗坏血酸 2-O- α -D-吡喃葡萄糖基抗坏血酸(AA-2G) 稳定性 酶法合成 功能应用

中图分类号:TS202.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-9164(2017)01-0048-06

Abstract: Vitamin C (ascorbic acid) is a kind of water-soluble vitamin which plays an important role in human health. Ascorbic acid has broad applications in food, pharmaceutical and cosmetics industries. However, ascorbic acid is unstable and highly susceptible to oxidative degradation, which seriously limits its applications. To solve this problem, generating stable ascorbic acid derivatives has become a hotspot of experts and scholars at home and abroad. 2-O- α -D-Glucopyranosyl-L-ascorbic acid (AA-2G) is an important ascorbic acid derivative with significantly improved stability, so it has a good development and application value. This paper reviews the recent progresses in biosynthesis and applications of AA-2G.

Key words: ascorbic acid, AA-2G, stability, enzymatic synthesis, functional application

0 引言

L-抗坏血酸是一种常见的水溶性维生素,广泛分布于新鲜蔬菜、水果、绿色植物中。L-抗坏血酸也是

人体内必需的营养元素,但由于人体内缺少古洛糖酸内酯氧化酶,无法合成抗坏血酸^[1],必须通过体外摄取^[2]。

L-抗坏血酸在日常生产生活中有着广泛的应用。在医疗卫生方面,L-抗坏血酸具有抑制黑色素形成、促进胶原蛋白的合成^[3]、抑制癌细胞增殖^[4]、防治坏血病和传染病、促进创伤愈合等作用,是辅助治疗的保健药品^[5]。在畜牧和水产养殖方面,L-抗坏血酸可提高种猪精子活力^[6]、改善动物的健康状况、促进幼龄动物生长等^[7]。在化妆品中L-抗坏血酸可作为还原剂、紫外线吸收剂和黑色素形成抑制剂来使用^[3]。

由于L-抗坏血酸分子中存在极不稳定的连烯二

收稿日期:2017-01-18

作者简介:李 标(1990—),男,在读硕士研究生,主要从事酶工程研究。

* 国家自然科学基金面上项目(21472234)资助。

** 通信作者:唐双焱(1973—),女,研究员,主要从事以蛋白质工程为基础的微生物酶的改造与应用研究,E-mail:tangsy@im.ac.cn。

醇结构,极易被热和氧化剂破坏,尤其是光、重金属和荧光物质都能促进其氧化,使其应用受到很大限制^[8]。2-O- α -D-葡萄糖基抗坏血酸(AA-2G)是L-抗坏血酸的衍生物,分子式为C₁₂H₁₈O₁₁,该物质是在糖基转移酶的作用下,由吡喃型葡萄糖苷和L-抗坏血酸缩合而成,其中抗坏血酸分子上2位碳上的羟基被吡喃型葡萄糖苷所取代,吡喃型葡萄糖苷以 β -1,4-糖苷键连接。因为2位碳上有葡萄糖基掩蔽,所以AA-2G具有非还原性,与抗坏血酸相比,稳定性更高,同时更易于吸收和利用。AA-2G与抗坏血酸相比,有以下几个特点:AA-2G具有非还原性,不易发生氧化反应,其水溶液特别稳定^[9];AA-2G具有较好的耐光性和耐热性^[9];AA-2G能被 α -葡萄糖苷酶水解生成抗坏血酸和葡萄糖,因此可以发挥抗坏血酸的功效^[10];AA-2G对于清除自由基,促进胶原合成具有更为持久的作用效果。

多种知名品牌的化妆品都使用AA-2G这种新型稳定的抗坏血酸衍生物作为美白添加剂^[3],如法国欧莱雅、德国兰蔻、日本资生堂等。目前市场上的AA-2G主要由日本林原国际有限公司合成,该公司申报若干相关专利对相关合成技术加以保护,形成市场垄断。近年来国内对AA-2G的合成也有很多研究报道,如Han等^[11]、邵双等^[12]、Xu等^[13]、夏亚穆等^[14]对AA-2G生物合成进行许多酶学改造研究和生产条件工艺优化。本文就近年来AA-2G生物合成和应用等方面的国内外最新研究进展进行综述。

1 AA-2G酶法合成

AA-2G作为人工合成的抗坏血酸衍生物,生物转化是其现今唯一的生产方式。其化学合成的方法也有学者进行过探究^[15],但结果表明该方案合成过程复杂、成本过高,与工业化生产差距甚远。

AA-2G的生物转化最早由日本林原生物化学研究所和冈山大学药学系实现^[16-17],以可溶性淀粉和抗坏血酸为底物,在环糊精葡聚糖转移酶的作用下进行AA-2G的生产。近年来国内外学者也对其合成方法进行不断研究,取得一系列的研究成果。目前,环糊精糖基转移酶(CGTase, EC 2.4.1.19)^[18]、 α -淀粉酶(EC 3.2.1.1)^[19]、 α -葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.20)^[17]、 α -异麦芽糖基葡萄糖形成酶^[20]、蔗糖磷酸化酶(EC 2.4.1.7)^[21]是常用的5种合成AA-2G的酶。

1.1 环糊精葡聚糖转移酶

环糊精葡聚糖转移酶最早由日本林原生物化学研究所和冈山大学药学系开发应用于AA-2G的生产^[16-17],其作为最早被开发应用于AA-2G生产的

酶,一直以来是工业化生产AA-2G最佳的酶源。*Klebsiella*和*Bacillus*属是该酶的主要来源。该酶具有底物专一性强、酶活力高的优势,但在催化转化过程中如只单独使用该酶的话,会生成大量多聚糖基化中间产物AA-2G_n,因此需要经过葡糖淀粉酶(glucoamylase)的再次作用,将AA-2G_n水解生成AA-2G。江南大学Eibaid等^[22]利用超声波辅助CGTase合成AA-2G,使得AA-2G产量提高,达到7.05 g/L。

另外,为提高CGTase酶的利用率,降低生产成本,Prousoontorn等^[23]尝试将*Paenibacillus* sp. A11来源的CGTase利用氧化铝共价连接法实现固定化,提高CGTase的利用率。国内对固定化酶的方案也有一些报道,如张子臣等^[24]将*P. macerans*来源的CGTase用分子筛吸附、戊二醛交联、海藻酸钠包埋的方法固定化,使得AA-2G产量达到21 g/L,为游离酶生产AA-2G产量的2.15倍。

2013年,Han等^[25]对*P. macerans*来源的环糊精葡聚糖基转移酶进行改造,进行3个位点突变:Y195S、Y260R、Q265K,使得AA-2G的生产能力相对于野生型提高60%,达到1.92 g/L;同时,对其底物特异性提高的原理进行研究,结果表明上述3个位点氨基酸残基和底物之间氢键的改变提高了底物特异性。Han等^[11]还将来源于*Alkalimonas amylolytica*的 α -淀粉酶CBM_{Amy}的碳水化合物结合结构域(CBM)融合在上述来源的环糊精葡聚糖基转移酶的C末端或取代该酶的E结构域与酶其他部分进行融合,得到两个融合酶CGT-CBM_{Amy}和CGT Δ E-CBM_{Amy},优化反应条件后,这两种融合酶的AA-2G产量分别达到3.03 g/L和2.01 g/L,为野生型产量的5.94倍和3.94倍;进一步研究发现融合蛋白相对于野生型酶,其环化能力减弱,水解和转糖基能力明显增强,作者推测这些改变是由于底物和酶之间结合力的改变造成的。上述研究结果为提高CGTase生产AA-2G的效率提供了一个新的思路和方法,有利于推进AA-2G的工业化生产。Han等进一步对*P. macerans*来源的CGTase进行饱和突变,得到包含Y167S、G179R、N193R、G180R的突变体,其合成AA-2G的产量达到2.12 g/L^[26];2014年,他们还将自组装多肽(SAPs)与CGTase进行融合表达,得到SAP5-CGTase和SAP6-CGTase,使得AA-2G产量分别提高2.33倍和3.36倍,是进行CGTase优化的又一重要突破^[27]。

2013年,Liu等^[28]对*P. macerans*来源的CGTase继续进行定点饱和突变,最终获得优良突变体K47L/Y89F/N94P/D196Y,其生产AA-2G的产量

达到 2.23 g/L,比野生型提高 85.8%。

2016 年,江南大学毛婷等^[29]尝试利用信号肽来增强 CGTase 酶生产 AA-2G 的能力。将 CGTase 酶分别克隆到 6 种含有不同信号肽(estA、bpr、vpr、yncM、yvgO 和 ywbN)的穿梭质粒中,通过条件优化,最终 AA-2G 产量提高 2.16 倍,反应转化率达到 21.9%。

2016 年,Gudiminchi 等^[30]将转化生产 AA-2G 的工艺流程进行优化,利用 *Thermoanaerobacter* sp. 来源的商业化高转糖基能力的 CGTase,以 α -环糊精和抗坏血酸为底物,得到产量为 143 g/L 的 AA-2G,这也是迄今为止报道的最高产量。

1.2 α -葡萄糖苷酶

Yamamotoi 等^[10]发现来自小鼠肠或玉米种子中的 α -葡萄糖苷酶能催化合成 AA-2G。其在合成 AA-2G 的过程中,有产物专一性高、只产生 AA-2G 的优势,没有中间产物 AA-2G_n 和其他副产物的生成,有效降低了后期产物分离纯化过程中的困难。但其作为一种水解酶,既可以生成 AA-2G,也会水解 AA-2G,导致其转化率低下,是工业化生产的一大障碍。近几年的研究中也鲜见该酶的报道。

1.3 蔗糖磷酸酶

长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*) 来源的磷酸化酶作为一种转化生产 AA-2G 的新酶来源,在 2007 年被韩国研究者发现^[21]。其以蔗糖为糖基供体生产 AA-2G,对于该酶的研究尚在实验室阶段,离实现工业化还有一定距离,但其提供的新思路和研究方案对于工业化生产有一定的促进作用,目前国内外也在针对该酶进行研究。近期尚未见该酶生产 AA-2G 的报道。

1.4 α -淀粉酶

该酶生产 AA-2G 的过程中也会有 AA-2G_n 中间产物的生成,n 数量相对于环糊精葡萄糖基转移酶较少,但其本身底物专一性与 CGTase 相去甚远^[19]。

1.5 α -异麦芽糖基葡萄糖基糖形成酶

该酶在 2001 年被 Kubota 等^[31]发现报道,2006 年日本研究者在对 AA-2G 生产工艺的改善研究中发现其对生产 AA-2G 有着独特的优势,在生产过程中不会有副产物 AA-5G 和 AA-6G 的生成,使得后期分离纯化的难度极大降低,提高了生产效率^[20]。

2 AA-2G 的分离纯化

在 AA-2G 的酶反应阶段完成后,AA-2G 的有效分离纯化成为提高 AA-2G 产量的又一个重要环节。

在酶反应完成后,一般都会有底物抗坏血酸和葡

萄糖基供体的剩余,且在反应过程中也会生成小分子单糖多糖、AA-5G 以及 AA-6G 等副产物,因此需要进一步的分离纯化,才能得到高纯度的 AA-2G 产品。

在最初研究阶段,日本学者利用强酸性阳离子交换树脂分离反应液,通过柱层析方式将 AA-2G 和底物抗坏血酸以及其他副产物进行分离。但该方法也存在一定的问题,即难以分离去除反应过程中的副产物 AA-5G 和 AA-6G。为解决这一问题,在进行离子交换分离之前,可先进行氧化处理,将具有还原性的 AA-5G 和 AA-6G 直接氧化去除,提高 AA-2G 的纯度。

2001 年,阴离子交换树脂也被应用到 AA-2G 的分离纯化中来,并获得纯度达到 90% 的 AA-2G 溶液,提供 AA-2G 的又一分离纯化方案^[32]。

另外,电渗析法也被应用于 AA-2G 的分离纯化^[33],然后利用不同截留量大小的阴离子交换膜分别处理反应液,达到纯化 AA-2G 的目的。

3 AA-2G 的功能和应用

3.1 食品行业的应用

AA-2G 本身有很强的稳定性,能抵抗光、氧、重金属等不利条件,且其可以被人体吸收,然后缓慢水解,持续地补充人体抗坏血酸。因此,其可以作为稳定剂、抗坏血酸补充剂等食品中发挥作用,改善食品质量。

2013 年,小川智史等^[34]以亚油酸和三价铁的反应来检测抗氧化剂的抗氧化能力,分别加入抗坏血酸和 AA-2G 后进行实验,结果表明 AA-2G 有抑制亚油酸过氧化的作用,而 AA-2G 和海藻酸钠的混合物是一种行之有效的食品抗氧化剂。

3.2 化妆品行业的应用

AA-2G 具有促进胶原蛋白的合成,提高皮肤弹性,延缓衰老的功效,在化妆品中应用广泛。

1998 年,Kumamo 等^[3]分别用 AA-2G、抗坏血酸、抗坏血酸磷酸酯处理人成纤维细胞和黑色素瘤细胞,检测胶原合成和黑色素形成情况,结果表明 AA-2G 能更有效地促进胶原合成并抑制黑色素的形成;另外,紫外线辐射实验表明 AA-2G 能有效抵制紫外线对细胞的损伤。

2012 年,Barus 等^[35]利用伏安法和恒电位电解法探究亲水和亲脂抗氧化剂的相互作用,并利用该方法进行抗氧化剂的优化筛选,结果表明 N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)和 AA-2G 有最强的协同能力,抗氧化力提高 35%,为 AA-2G 在医学护肤品的应用起到一

定的推进作用。

2013年, Huang等^[36]利用表面响应法对AA-2G的稳定性进行探究, 结果表明: AA-2G在53.3℃和pH值6.4状态下的稳定性最佳。他们还利用1,1-二苯基-2-苦基肼(DPPH)和2,2'-二氮-双(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)(ABTS)对AA-2G的自由基清除能力进行检测, 实验表明AA-2G有良好的清除自由基能力。这些研究为AA-2G的性质检测提供了一个行之有效的方案。

3.3 医疗卫生行业的应用

AA-2G作为一种抗坏血酸的替代品治疗坏血病, 提高了药物自身的稳定性, 使其运输保存都安全便捷。

AA-2G的抗氧化作用有利于提高人体免疫力, 抑制病毒和细菌的感染, 治疗受伤和手术后的感染, 预防和治疗感冒等。另外, 有报道表明, AA-2G可以降低癌症发生的几率, 保护部分慢性疾病。因此, AA-2G被广泛应用于医药领域^[2]。

Taniguchi等^[37]利用AA-2G和抗坏血酸分别处理人类真皮成纤维细胞, 然后利用H₂O₂进行氧化处理, 结果发现AA-2G对人体真皮成纤维细胞增殖促进作用以及抵抗H₂O₂的伤害作用可以维持72h, 而抗坏血酸处理后仅能维持24h, 表明AA-2G的作用更加持久有效。AA-2G对于人体成纤维细胞中与衰老相关的β-半乳糖苷酶的生成有着明显强于抗坏血酸的抑制效果。在经过H₂O₂处理后的人体成纤维细胞中, 抗坏血酸预处理组抗衰老因子SIRT1明显下降, 而AA-2G预处理组能有效抑制SIRT1的下降, 表明AA-2G有着突出的抗衰老能力。

2015年, Kobashigawa等^[38]研究表明, AA-2G能持续抵抗辐射对人体成纤维细胞的伤害, 并且经AA-2G作用过的细胞对辐射的抵抗能力更强。因此, AA-2G能有效保护细胞, 避免细胞的损伤和死亡。

2014年, Hanada等^[39]利用2,2'-偶氮(2-脒基丙烷)二氯化氢(AAPH)对人体成纤维细胞进行处理, 研究AA-2G清除自由基的能力和原理, 结果表明: AA-2G能有效的抑制AAPH对细胞的毒害作用, 清除自由基, 且在其未水解为AA的情况下本身就存在清除自由基、抗氧化的能力。

3.4 畜牧业和水产养殖产业的应用

AA-2G在畜牧业和水产养殖业中也有着诸多的应用。抗坏血酸由于自身的不稳定性, 作为饲料、鱼饵等中的添加剂难以稳定存在, 很快就会被降解失活, 而AA-2G良好的自身稳定性弥补了这一缺陷。

AA-2G可以促进动物的生长发育, 改善动物的健康状况^[40]。2012年, Xia等^[6]研究发现AA-2G能提高种猪精子的活力。对于水产品, AA-2G也可以加快水产动物骨骼的发育, 使其成活率和繁殖率提高。AA-2G的摄入对于预防鱼类内出血、皮肤发黑、烂鳍、不活泼、眼突出、腹水、贫血、生长不良等有着积极意义^[7]。

4 展望

AA-2G作为抗坏血酸最佳的替代品, 有效弥补了抗坏血酸自身稳定性差、易被氧化分解的缺陷, 极大提高其应用价值。

AA-2G在食品、医药、化妆品以及畜牧业等方面的重要作用使其有着非常大的市场需求和应用范围, 国内外研究团队对其有着浓厚的兴趣, 展开了诸多研究。鉴于AA-2G优秀的特性, 针对AA-2G进行的分子设计也在进行, 如Tai等^[41]合成的2-O-α-D-葡萄糖基-6-O-(2-戊基庚酰)-L-抗坏血酸也有着一定的效果。

我国对于AA-2G的研究正在不断推进, 但离工业化生产仍有一定的距离, 成本过高是困扰我们的一大难题。一方面是由于CGTase酶本身的酶活力较低, 导致生产成本提高; 另一方面, 底物转化率低、分离纯化手段不够完善也是阻碍其工业化生产的另一重要原因。对于以上这些问题, 我们一方面可以采取固定化酶的方式提高酶的使用效率, 降低成本; 另一方面, 可以通过定向进化、诱变等方式提高酶的产量、酶的单位比活力或者转化率。高效、低耗的分离纯化手段也会为AA-2G的工业化生产奠定基础。

参考文献:

- [1] RUMSEY S C, LEVINE M. Absorption, transport, and disposition of ascorbic acid in humans[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 1998, 9(3): 116-130.
- [2] LAVRENOV S N, PREOBRAZHENS KAYA M N. L-ascorbic acid: Properties and ways of modification(a review)[J]. Pharmaceutical Chemistry Journal, 2005, 39: 251.
- [3] KUMANO Y, SAKAMOTO T, EGAWA M, et al. In vitro and in vivo prolonged biological activities of novel vitamin C derivative, 2-O-α-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid (AA-2G), in cosmetic fields[J]. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 1998, 44(3): 345-359.
- [4] YURTCU E, ISERI O D, SAHIN F I. Effects of ascorbic acid and β-carotene on HepG2 human hepatocellular carcinoma cell line[J]. Molecular Biology Reports, 2011, 38(7): 4265-4272.

- [5] 饶建华,韩璐,张自萍. 维生素C糖苷类衍生物的研究进展[J]. 中国新药杂志,2012,21(7):761-766.
RAO J H, HAN L, ZHANG Z P. Research progress of ascorbyl glucoside derivatives[J]. Chinese Journal of New Drugs,2012,21(7):761-766.
- [6] XIA C M, XIA W, YANG S, et al. Effect of antioxidant supplementation on function and fertility of sex-sorted boar spermatozoa [J]. Animal Reproduction Science, 2012,136(1/2):108-114.
- [7] WAAGBØ R. Water-soluble vitamins in fish ontogeny [J]. Aquaculture Research,2010,41(5):733-744.
- [8] YAMAMOTO T A, TAI A. The current state on development of novel vitamin derivatives[J]. Nippon Rinsho, 1997,57(10):170-176.
- [9] HUANG M, QIU J P, ZHONG L. The optimization of the enzyme producing condition and the transformation condition to prepare AA-2G[J]. China Food Additives, 2006(2):100-104.
- [10] YAMAMOTO I, MUTO N, MURAKAMI K, et al. L-ascorbic acid α -glucoside formed by regioselective transglucosylation with rat intestinal and rice seed α -glucosidases: Its improved stability and structure determination[J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 1990, 38(11):3020-3023.
- [11] HAN R Z, LI J H, SHIN H D, et al. Carbohydrate-binding module-cyclodextrin glycosyltransferase fusion enables efficient synthesis of 2-O-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid with soluble starch as the glycosyl donor [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013,79(10):3234-3240.
- [12] 邵双,丁淼,关丽杰. 生物法合成 AA-2G 的菌种产酶条件及转化方法研究[J]. 沈阳化工大学学报,2012,26(4):322-326.
SHAO S, DING M, GUAN L J. Production conditions of CGTase and biotransformation of AA-2G[J]. Journal of Shenyang Institute of Chemical Technology, 2012,26(4):322-326.
- [13] XU Q Y, HAN R Z, LI J H, et al. Improving maltodextrin specificity by site-saturation engineering of subsite +1 in cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus macerans* [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2014,30(1):98-108.
- [14] 夏亚穆,李晨晨. 环糊精葡萄糖基转移酶的基因改造与高效表达[J]. 中国生物工程,2015,35(2):105-110.
XIA Y M, LI C C. Genetic modification and high expression of cyclodextrin glycosyltransferase [J]. China Biotechnology, 2015,35(2):105-110.
- [15] 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]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(7):2092-2096.
- [16] MUTO N, SUGA S, FUJII K, et al. Formation of a stable ascorbic acid 2-glucoside by specific transglucosylation with rice seed α -glucosidase [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1990,54(7):1697-1703.
- [17] YAMAMOTO I, MUTO N, NAGATA E, et al. Formation of a stable L-ascorbic acid α -glucoside by mammalian α -glucosidase-catalyzed transglucosylation [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 1990,1035(1):44-50.
- [18] 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.
- [19] 郭显章. 酶的工业生产技术 [M]. 吉林科学技术出版社, 1988:366.
WU X Z. Technologies for industrial enzyme production [M]. Jilin Science and Technology Press, 1988:366.
- [20] KAZUHISSAM M, TSUSAKI K, KUBOTA M, et al. Process for producing 2-O-alpha-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid; US8759030B2 [P]. 2014-1-24.
- [21] KWON T, KIM C T, LEE J H. Transglucosylation of ascorbic acid to ascorbic acid 2-glucoside by a recombinant sucrose phosphorylase from *Bifidobacterium longum* [J]. Biotechnology Letters, 2007, 29(4):611-615.
- [22] EIBAID A I, MIAO M, JIANG B, et al. Improvement of 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid biosynthesis using ultrasonic radiation [J]. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2015,14(4):599-604.
- [23] 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]. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 2007, 57(1/2/3/4):39-46.
- [24] 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, 2010:1-37.
ZHANG Z C. Enzymatic synthesis of 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2010:1-37.
- [25] HAN R Z, LIU L, SHIN H D, et al. Systems engineering of tyrosine 195, tyrosine 260, and glutamine 265 in cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus macerans* to enhance maltodextrin specificity for 2-O-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid synthesis [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(2):672-677.
- [26] HAN R Z, LIU L, SHIN H D, et al. Iterative saturation mutagenesis of 6-subsite residues in cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus macerans* to improve maltodextrin specificity for 2-O-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid synthesis [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(24):7562-7568.
- [27] HAN R Z, LI J H, SHIN H D, et al. Fusion of self-assembling amphipathic oligopeptides with cyclodextrin glycosyltransferase improves 2-O-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid synthesis with soluble starch as the glycosyl donor [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(15):4717-4724.

- [28] LIU L, XU Q Y, HAN R Z, et al. Improving maltodextrin specificity for enzymatic synthesis of 2-O-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid by site-saturation engineering of subsite-3 in cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus macerans* [J]. *Journal of Biotechnology*, 2013, 166(4):198-205.
- [29] 毛婷, 李江华, 刘龙, 等. 信号肽对 *Bacillus subtilis* 表达环糊精葡萄糖基转移酶的影响[J]. *食品与生物技术学报*, 2016, 35(2):173-179.
- MAO T, LI J H, LIU L, et al. Effects of signal peptides on extracellular expression of cyclodextrin glycosyltransferase in *Bacillus subtilis* [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2016, 35(2):173-179.
- [30] GUDIMINCHI R K, TOWNS A, VARALWAR S, et al. Enhanced synthesis of 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid from α -cyclodextrin by a highly disproportionating CGTase [J]. *ACS Catalysis*, 2016, 6(3):1606-1615.
- [31] KUBOTA M, TSUSAKI K, HIGASHIYAMA T, et al. Alpha isomaltosylglucosaccharide synthase, process for producing the same and use thereof; EP2463378B1 [P]. 2001-07-25.
- [32] YAMASAKI H. Process for producing high 2-O-alpha-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid; US20010051711A1 [P]. 2001-12-13.
- [33] AGA H, YONEYAMA M, SAKAI S. Process for preparing high α -glycosyl-L-ascorbic acid, and separation system for the process; US5338420 [P]. 1994-8-16.
- [34] OGAWA S, MICHIDA M, KIMURA H, et al. Synergistic stimulation of anti-oxidant action of L-ascorbic acid 2-glucoside with trehalose [J]. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 2013, 60(4):193-197.
- [35] BARUS C, WETZ-TOROND F, BRUNEL Y, et al. Electrochemical study of antioxidant regeneration mechanisms-application in dermocosmetics [J]. *International Journal of Electrochemical Science*, 2012, 7(6):5429-5441.
- [36] HUANG W Y, LEE P C, HUANG L K, et al. Stability studies of ascorbic acid 2-glucoside in cosmetic lotion using surface response methodology [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2013, 23(6):1583-1587.
- [37] TANIGUCHI M, ARAI N, KOHNO K, et al. Anti-oxidative and anti-aging activities of 2-O- α -glucopyranosyl-L-ascorbic acid on human dermal fibroblasts [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2012, 674(2/3):126-131.
- [38] KOBASHIGAWA S, KASHINO G, SUZUKI K, et al. Ionizing radiation-induced cell death is partly caused by increase of mitochondrial reactive oxygen species in normal human fibroblast cells [J]. *Radiation Research*, 2015, 183(4):455-464.
- [39] HANADA Y, IOMORI A, ISHII R, et al. Protection of free radical-induced cytotoxicity by 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid in human dermal fibroblasts [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2014, 78(2):301-306.
- [40] 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.
- [41] TAI A, IKEDA S, YAZAMA F, et al. Intramolecular acyl migration and enzymatic hydrolysis of 2-O- α -D-glucopyranosyl-6-O-(2-pentylheptanoyl)-L-ascorbic acid [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2012, 113(4):545-548.

(责任编辑:米慧芝)

(上接第 47 页 Continue from page 47)

- [36] MATSUSHIMA Y, HIRASAWA T, SHIMIZU H. Enhancement of 1,5-diaminopentane production in a recombinant strain of *Corynebacterium glutamicum* by Tween 40 addition [J]. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2016, 62(1):42-45.
- [37] OH Y H, CHOI J W, KIM E Y, et al. Construction of synthetic promoter-based expression cassettes for the production of cadaverine in recombinant *Corynebacterium glutamicum* [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015, 176(7):2065-2075.
- [38] BRAUTASET T, JAKOBSEN Ø M, DEGNES K F, et al. *Bacillus methanolicus* pyruvate carboxylase and homoserine dehydrogenase I and II and their roles for L-lysine production from methanol at 50°C [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87(3):951-964.
- [39] NÆRDAL I, PFEIFENSCHNEIDER J, BRAUTASET T, et al. Methanol-based cadaverine production by genetically engineered *Bacillus methanolicus* strains [J]. *Microbial Biotechnology*, 2015, 8(2):342-350.
- [40] MÜLLER J E N, LITSANOV B, BORTFELD-MILLER M, et al. Proteomic analysis of the thermophilic methylotroph *Bacillus methanolicus* MGA3 [J]. *Proteomics*, 2014, 14(6):725-737.
- [41] IRLA M, HEGGESET T M B, NÆRDAL I, et al. Genome-based genetic tool development for *Bacillus methanolicus*; Theta- and rolling circle-replicating plasmids for inducible gene expression and application to methanol-based cadaverine production [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7:1481.

(责任编辑:陆雁)