

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (10) :1305 – 1313; 4 October 2015
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicroen
doi:10.13343/j.cnki.wsxb.20150020

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

熊艳军^{1,2}, 宿玲恰^{1,2}, 王蕾^{1,2}, 吴敬^{1,2}, 陈晟^{1,2*}

¹江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122

²江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122

摘要: 【目的】将环状芽孢杆菌 251 (*Bacillus circulans* 251) 来源的环糊精葡萄糖基转移酶 (Cyclodextrin Glycosyltransferase, CGTase) 展示在酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 细胞表面, 构建全细胞催化剂生产 2-O- α -D-吡喃葡萄糖基抗坏血酸 (2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid, AA-2G), 以提高 AA-2G 的产量。【方法】将 CGTase 编码基因 *cgt* 连接到载体质粒 pYD1 中的 α 凝集素 (α -agglutinin) Aga2p 亚基基因的下游构建表面展示重组质粒 pYD1-*cgt*, 转化酿酒酵母 EBY100 获得重组菌 EBY100-pYD1-*cgt*, 对发酵条件 (培养基、诱导温度和诱导剂半乳糖浓度) 进行优化; 同时先后对重组菌的发酵产酶以及表面展示 CGTase 的酶促合成 AA-2G 的条件进行了优化; 进一步又比较了表面展示的 CGTase 与 *E. coli* BL21 发酵所得的游离 CGTase 在酶促制备 AA-2G 过程中副产物的积累情况。【结果】展示 CGTase 的酿酒酵母重组菌株以 YPG 培养基作为发酵培养基, 诱导剂半乳糖初始添加浓度为 20 g/L, 经 25 °C 诱导 48 h 后, 表面展示 CGTase 最大酶产量为 0.5 U/mL; 表面展示 CGTase 40 °C 条件下的温度稳定性比游离酶有所提高, pH 稳定范围变宽。对表面展示的 CGTase 制备 AA-2G 转化条件的优化发现, 其最适温度最适 pH 分别为 30 °C 和 4.5, 转化 48 h 达到平衡, 表面展示的 CGTase 制备 AA-2G 的产量较游离酶提高了 37%。【结论】对于 CGTase, α 凝集素系统是一个有效的展示系统, 构建的酿酒酵母全细胞催化剂用于酶促制备 AA-2G 时, 产生的副产物葡萄糖可能被酵母细胞利用, 从而降低了葡萄糖与 VC 的竞争作用使 AA-2G 的产量增加, 该全细胞催化剂具有良好的应用前景。

关键词: 环糊精葡萄糖基转移酶, 酿酒酵母, 表面展示, 2-O- α -D-吡喃葡萄糖基抗坏血酸

中图分类号: Q935 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 10-1305-09

维生素 C (VC) 是一种人体自身不能合成的水溶性维生素, 参与体内多种生理活动, 在维持和促进人体健康中扮演着重要的角色^[1-2]。然而其 C-2 位上的羟基极不稳定, 在氧、热、光、重金属等条件下非常容易发生氧化降解, 从而限制了其应用^[3], 因此

开发稳定的 VC 衍生物成为研究的热点。目前主要的 VC 衍生物包括金属盐类衍生物、酯类衍生物及葡萄糖衍生物^[4-6]。与 VC 的其他衍生物相比, 2-O- α -D-吡喃葡萄糖基抗坏血酸 (AA-2G) 具有强稳定性, 高安全性, 进入人体后, 在 α -葡萄糖苷酶的作用

基金项目: 国家杰出青年基金 (31425020)

* 通信作者。Tel: +86-510-85326653; Fax: +86-510-85326653; E-mail: chensheng@jiangnan.edu.cn

作者简介: 熊艳军 (1990 -), 女, 辽宁人, 硕士研究生, 从事环糊精葡萄糖基转移酶生产 2-O- α -D-吡喃葡萄糖基抗坏血酸方面的研究。E-mail: xiongnice@sina.com

收稿日期: 2015-01-14; 修回日期: 2015-03-23

下缓慢分解成 VC 与 D-葡萄糖,长效保持 VC 在体内发挥正常的功能,因此作为 VC 的前体分子,AA-2G 既可保持 VC 分子的稳定性,又可在其在人体细胞中转化为活性功能的烯二醇结构,是最佳的 VC 替代品,目前广泛应用于化妆品、食品、医疗保健以及畜牧业和水产养殖等行业^[7]。

酶促转化法是目前合成 AA-2G 的主要途径,糖基转移酶将糖基供体上的葡萄糖苷转移到 VC 的 C-2 位上,根据连接的葡萄糖链长短的不同,得到产物为 AA-2G_n (n = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7),再经葡萄糖淀粉酶将 AA-2G_n 全部降解为 AA-2G。迄今,业已报道的用于 AA-2G 生物转化合成的酶共有 5 类:α-葡萄糖苷酶、α-淀粉酶、蔗糖磷酸酶、环糊精葡萄糖基转移酶和 α-异麦芽糖基葡萄糖基糖合成酶^[8-12],其中尤以环糊精葡萄糖基转移酶 (CGTase) 的特强底物特异性而成为目前 AA-2G 生物合成中使用最广泛的酶种^[13]。

由于使用 CGTase 生产 AA-2G 时用酶量较大,反应结束后难于回收,致使 AA-2G 的生产成本较高。为进一步降低 AA-2G 的生产成本,近年来,关于固定化 CGTase 的研究也有所报道^[14-15]。Prousoontorn MH 等利用氧化铝共价连接法将类芽孢杆菌 A11 (*Paenibacillus* sp. A11) 来源的 CGTase 固定化后,以 40 g/L 的维生素 C 钠和 40 g/L 的 β-环糊精 (β-cyclodextrin, β-CD) 为底物生产 AA-2G,反应 48 h 后,AA-2G 的产量为 0.5 g/L^[14]。Zichen Zhang 等用分子筛吸附、戊二醛交联、海藻酸钠包埋的方法将浸麻类芽孢杆菌 (*Paenibacillus macerans*) 来源的 CGTase 固定化,以 50 g/L 的 VC 和 50 g/L 的 β-CD 为底物用其生产 AA-2G,最高产量在第五天可达 21 g/L,为游离酶生产 AA-2G 产量的 2 倍^[15]。

限制 AA-2G 工业化生产的另一因素在于,CGTase 在合成 AA-2G 的过程中会生成葡萄糖、麦芽糖等小分子糖类副产物,而这些小分子糖是转糖苷反应的天然受体,与 VC 竞争 CGTase 的受体位点,从而制约了 AA-2G 的产量^[16]。Zhankun Wang 等利用表面展示 CGTase 生产环糊精,从而使副产物葡萄糖被酵母细胞利用从而降低了其对环化反应的抑制作用,其环糊精最终产量提高了 30%^[17]。由此可见,将 CGTase 进行表面展示是降低小分子副产物抑制的可行手段。

微生物表面展示技术是通过基因工程手段,将外源蛋白质以融合蛋白形式展示在微生物细胞的表面。近几年来在细胞催化剂、环境治理、蛋白质文库筛选、高亲和抗体、生物传感器、抗原/抗体库构建、癌症诊断等领域得到了迅猛发展。本酿酒酵母因具备安全、遗传背景较清晰、生长快、容易培养等优点成为最常用的表面展示宿主之一^[18]。本研究利用酿酒酵母表面蛋白 a 凝集素作为载体蛋白将 *B. circulans* 251 来源的 CGTase 展示于酿酒酵母表面,将 *cgt* 基因克隆至表面展示载体 pYD1 中 Aga2p 的 3'端,位于 GAL1 启动子下游,构建载体 pYD1-*cgt* 以实现半乳糖诱导下的表达。a 凝集素包括由 AGA1 编码的核心亚基 Aga1p 和由 AGA2 编码的小结合亚基 Aga2p 组成,亚基之间通过二硫键相连,而 Aga1p 通过糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 共价结合到细胞壁上,从而实现表面展示。另外,本研究使用的表面展示表达宿主酿酒酵母 EBY100 基因组中整合了一个 GAL1-AGA1 开放阅读框,以使 Aga2p-*cgt* 融合蛋白能与充足的 Aga1p 结合。这种展示系统通过共价键连接使目的蛋白与细胞壁的结合更为牢固,并且不会破坏蛋白质的活性,因而得到广泛应用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: *Escherichia coli* JM109 为本实验室保藏; *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 (aGAL1-AGA1::URA3 ura3-52 trp1 leu2Δ1 his3Δ200 pep4::HIS2 prb1Δ1.6R can1 GAL), 载体质粒 pYD1 购自美国 Invitrogen 公司,重组质粒 pET-20b (+) -*cgt* 以及携带该质粒的 *Escherichia coli* BL21 均由本实验室构建及保藏。

1.1.2 培养基: ①LB 培养基 (g/L): 蛋白胨 10, 酵母粉 5, NaCl 10, 氨苄青霉素 0.1, pH7.0。②YPD 培养基 (g/L): 蛋白胨 20, 酵母粉 10, 葡萄糖 20。③SD 培养基 (g/L): YNB 6.7, 葡萄糖 20, 亮氨酸 0.1。④YNB-CAA-Glc 培养基 (g/L): YNB 6.7, 酪蛋白氨基酸 5, 葡萄糖 20。⑤YPG 培养基 (g/L): 蛋白胨 20, 酵母粉 10, 半乳糖 20。⑥YNB-CAA-Gal 培养基: YNB 6.7, 酪蛋白氨基酸 5, 半乳糖 20。⑦淀粉检测平板培养基 (g/L): YNB 6.7, 酪蛋白氨基酸 5, 半乳糖 20, 可溶性淀粉 20, 琼脂 20。

1.1.3 试剂: 质粒小量提取试剂盒、氨苄青霉素 (Amp)、YNB 购自上海生工生物工程公司; 胶回收试剂盒、*EcoR* I、*Xho* I、T4 连接酶购自 TaKaRa 公司; 酪蛋白氨基酸、AA-2G 标样购自 Sigma 公司; 其他试剂为国产分析纯; 游离 CGTase 由本实验室保藏的大肠杆菌发酵所得。

1.2 表面展示重组质粒 pYD1-*cgt* 的构建

将携带目的基因的质粒 pET-20b (+)-*cgt* 经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切后, 酶切液经电泳并割胶回收目的基因片段, 采用 T4 连接酶将目的基因和同样酶切处理的载体质粒 pYD1 连接, 连接产物转化 *E. coli* JM109 感受态细胞, 并将适量转化液涂布在含 Amp 的选择培养基平板上, 37 °C 培养过夜后, 挑取单菌落进行液体培养、提取质粒和酶切鉴定。经双酶切验证的重组质粒 pYD1-*cgt* 送上海捷瑞公司测序, 以确证序列正确。

1.3 酵母转化及筛选

将上述构建成功的质粒 pYD1-*cgt* 转化酿酒酵母 EBY100, 转化采用 LiCl 法, 转化子利用不含色氨酸的选择性平板进行筛选; 将重组酿酒酵母 EBY100-pYD1-*cgt* 及对照 EBY100-pYD1 接种到淀粉平板上, 30 °C 培养 4 d 后, 喷洒碘液观察透明圈以确定 CGTase 是否展示成功。

1.4 表面展示 CGTase 诱导表达

将重组酿酒酵母 EBY100-pYD1-*cgt* 接种至 YNB-CAA-Glc 液体培养基中培养过夜, 离心后分别将菌体转移到 YPG 培养基以及 YNB-CAA-Gal 培养基中, 在 200 r/min, 25 °C 条件下诱导表达, 分别诱导 12、24、36、48、60 h 取样, 检测全细胞的表面展示酶活; 将重组酿酒酵母 EBY100-pYD1-*cgt* 接种至 YNB-CAA-Glc 液体培养基中培养过夜, 离心后分别将菌体转移到 YPG 培养基中, 分别在 20、25、28 °C 条件下诱导表达, 分别诱导 12、24、36、48、60 h 取样, 检测全细胞的表面展示酶活; 将重组酿酒酵母 EBY100-pYD1-*cgt* 接种至 YNB-CAA-Glc 液体培养基中培养过夜, 离心后分别将菌体转移到 YPG 培养基中, 培养基中分别添加 5、10、20、40 g/L 半乳糖在 200 r/min, 25 °C 条件下诱导表达, 分别诱导 12、24、36、48、60 h 取样, 检测全细胞的表面展示酶活; 将重组酿酒酵母 EBY100-pYD1-*cgt* 接种至 YNB-CAA-Glc 液体培养基中培养过夜, 离心后分别将菌体转移到添加 20 g/L 半乳糖 YPG 培养基中, 在 200 r/min, 25 °C

条件下诱导表达, 分别诱导 12、24、36、48、60、72 h 取样, 检测全细胞的表面展示酶活、发酵上清的游离酶活以及菌体干重。

1.5 CGTase 酶活测定

2% (W/V) 可溶性淀粉溶液 1 mL 与 50 mmol/L 柠檬酸- Na_2HPO_4 缓冲液 (pH5.5) 1 mL, 与 0.1 mL 适当稀释的酶液混合, 50 °C 水浴精确反应 10 min, 加入 3 mol/L HCl 溶液 0.2 mL 终止反应, 加入 0.1 mmol/L 甲基橙溶液 0.2 mL, 16 °C 静置 20 min, 在 505 nm 下测定吸光度。一个酶活单位 (U) 定义为在上述测定条件下 1 min 内生成 1 μmol α -环糊精所需要的酶量。

1.6 AA-2G 的生产以及含量测定

在反应器中加入终浓度 5 g/L 的 L-抗坏血酸、 β -环糊精和一定量的游离或表面展示 CGTase (利用表面展示 CGTases 生产 AA-2G 时反应体系加入终浓度 6.7 g/L 的酵母氮源 YNB), 用 NaOH 调节 pH 至 5.0, 35 °C 反应 24 h, 加入葡萄糖淀粉酶处理 6 h 后, 取样并加入同体积的三氯乙酸溶液 (10%, V/V) 终止反应并沉淀蛋白, 沉淀 4 h 后将样品 18000 \times g 离心 10 min, 取上清液适度稀释后用 0.45 μm 超滤膜过滤, 并进行 HPLC 分析, 通过外标法确定 AA-2G 的浓度 (AA-2G 的浓度 = 标样峰面积 \times AA-2G 标样浓度 (g/L) / AA-2G 标样峰面积)。色谱条件如下: Agilent 1200 HPLC 色谱仪, Agilent 自动进样器, Agilent SB-Aq 5 μm (4.6 mm \times 250 mm), LC-9A 紫外检测器; 流动相为 20 mmol/L 的稀磷酸, 流速 0.8 mL/min; 柱温 35 °C。

2 结果

2.1 CGTase 在酿酒酵母中表面展示的工程化

2.1.1 表面展示重组质粒 pYD1-*cgt* 的构建: 携带有目的基因 (*cgt*) 的重组质粒 pET-20b (+)-*cgt* 和酵母载体质粒 pYD1 分别经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切后, 将目的基因片段和 pYD1 胶回收, 然后连接, 转化导入 *E. coli* JM109 感受态细胞中, 抽提质粒。重组质粒经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切验证, 如图 1 所示, 在大概 5000 bp 和 2100 bp 处各有一条带, 分别和载体质粒 pYD1 及目的基因 *cgt* 片段的大小一致, 表明重组表达质粒 pYD1-*cgt* 构建成功。 *B. circulans* 251 CGTase 基因 *cgt* 被克隆到质粒 pYD1 中, 处于半乳

糖启动子的控制之下,当有诱导物半乳糖存在的条件下阻遏蛋白丧失功能,可实现下游 CGTase 与 α -凝

集素编码基因的共转录,并一起表达在酿酒酵母的胞外表面。

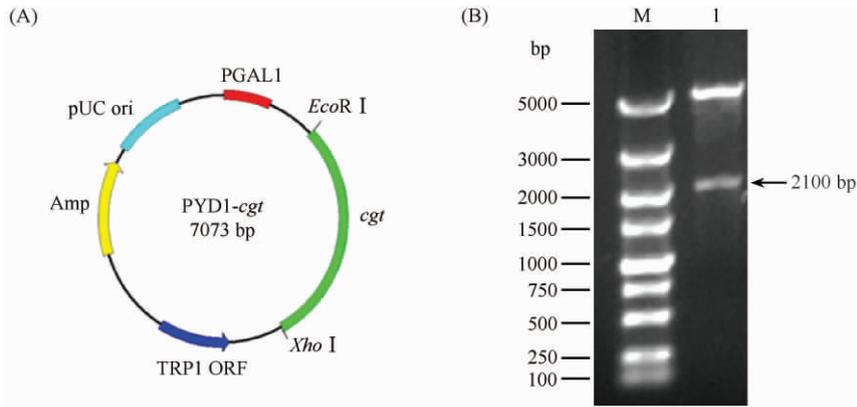


图 1. 表面展示重组质粒 pYD1-cgt 的构建及酶切验证

Figure 1. Construction and analysis of recombinant plasmid pYD1-cgt. M: 5000 bp DNA Ladder Marker; lane 1: recombinant plasmid pYD1-cgt double digested with *EcoR* I and *Xho* I.

2.1.2 表面展示重组酿酒酵母的筛选与鉴定:将重组质粒 pYD1-cgt 与酵母载体质粒 pYD1 分别转化进入酿酒酵母 EBY100 感受态细胞中,分别构建重组酵母菌 EBY100-pYD1-cgt 及无 *cgt* 的对照重组酵母菌 EBY100-pYD1,在 SD 平板培养基培养,挑取单菌落接种至 YNB-CAA-Glc 培养基培养过夜,再分别转接至淀粉检测平板上,培养 3 d 后喷洒碘液覆盖,如图 2 可以观察到重组菌 EBY100-pYD1-cgt 有明显的淀粉水解圈,而对照菌则无此水解圈,表明 CGTase 成功展示在酿酒酵母表面。



图 2. 表面展示酿酒酵母重组菌和对照菌在淀粉平板上的酶活检测

Figure 2. Halo assay of normal yeast and engineered yeast. The strains were incubated on YPG agar plates supplemented with 2% soluble starch for 3 days. Left panel: EBY100-pYD1; right panel: EBY100-pYD1-cgt.

2.2 表面展示 CGTase 诱导表达

2.2.1 发酵培养基的选择:据文献 [17, 19-20] 报道,用于表面展示重组酿酒酵母诱导发酵培养基有

YPG 培养基以及 YNB-CAA-Gal 培养基,本研究考查了两种培养基对发酵产酶的影响,如图 3 所示,用 YPG 培养基时表面展示 CGTase 酶活可达 0.5 U/mL,而用 YNB-CAA-Gal 培养基时表面展示 CGTase 酶活为 0.32 U/mL,因此本研究选择 YPG 培养基作为产酶发酵培养基。

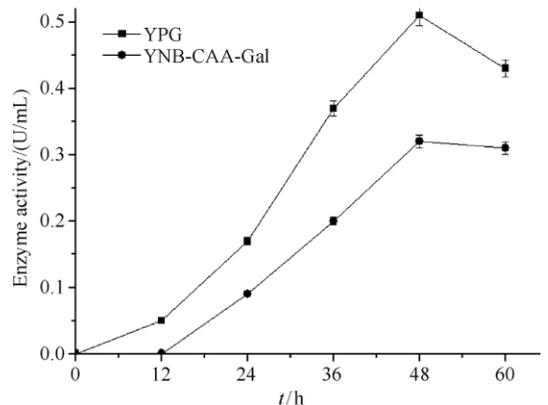


图 3. 培养基对酶活的影响

Figure 3. Influence of culture medium on enzyme activity.

2.2.2 最佳诱导温度的选择:根据 Invitrogen 操作手册,酵母的最佳培养温度为 28 °C,诱导温度为 20-25 °C,本研究采用 20、25、28 °C 优化重组酵母的诱导温度,结果如图 4 所示,诱导温度 25 °C 时,表面展示 CGTase 酶活最高为 0.5 U/mL;当诱导温度为 20 °C 时酶活最低,为 0.35 U/mL。

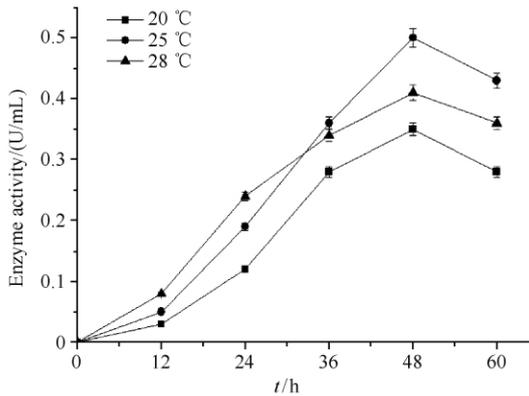


图 4. 诱导温度对酶活的影响

Figure 4. Influence of inductive temperature on enzyme activity.

2.2.3 最佳诱导剂浓度的选择: 半乳糖既是产酶阶段的诱导剂, 又是产酶阶段的唯一碳源, 在诱导初始阶段, 培养基中的半乳糖浓度对诱导产酶具有重要的影响, 结果如图 5 所示, 当初始半乳糖浓度为 20 g/L 时, 酶活可以达到 0.5 U/mL, 再提高诱导剂浓度酶活不再增加, 故选择初始半乳糖添加量为 20 g/L。

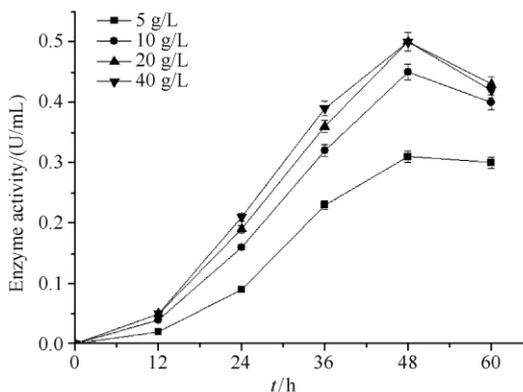


图 5. 半乳糖浓度对酶活的影响

Figure 5. Influence of initial concentration of galactose on enzyme activity.

2.2.4 最佳诱导时间点的选择: 如图 6 所示, 0 - 12 h 菌体生长缓慢, 菌体干重基本没有增长, 为延滞期; 12 - 48 h 菌体生长较快, 干重呈指数增加, 为指数增长期; 48 h 后随着时间的延长, 菌体干重基本没有增加, 菌体生长进入稳定期。诱导 48 h 时表面展示及游离酶活均达到最大, 表面展示的最大酶活为 0.5 U/mL, 发酵上清中的游离酶活为 0.2 U/mL。因此重组酵母发酵 48 h 为发酵产酶的最佳时间。

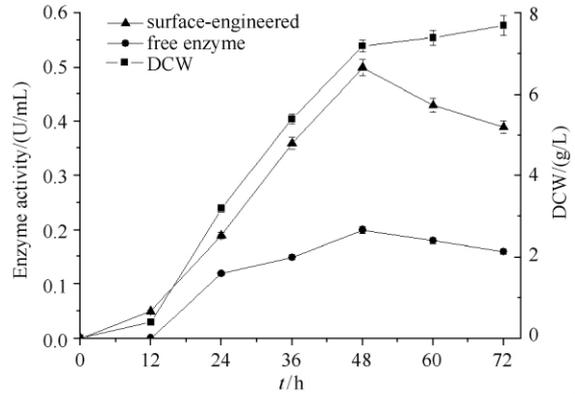


图 6. 诱导时间对酶活及菌体生长的影响

Figure 6. Influence of inductive time on enzyme activity and cell growth.

2.3 表面展示 CGTase 在 AA-2G 酶促合成中的应用

2.3.1 表面展示 CGTase 的热稳定性和酸碱稳定性: 如图 7-A 所示, 表面展示 CGTase 在 50 °C 下半衰期为 4 h, 在 40 °C 下保温 24 h 以后仍保持 75% 以上的活性, 而游离酶在 50 °C、40 °C 条件下半衰期分别为 6 h 和 10 h。结果表明表面展示 CGTase 在 40 °C 下的稳定性有所提高^[21]。图 7-B 显示, 该表面展示 CGTase 在 pH5.0 时半衰期只有 3 h, 而在 pH6.0 - 8.0 之间保温 24 h 残留酶活都保持在 80% 以上, 而游离酶经过 12 h 保温后, pH 在 5.5 到 7.0 之间残留酶活都保持在 80% 以上而在其他 pH 条件下, 残留酶活降至 30% 以下^[20], 表明表面展示 CGTase 的 pH 稳定范围变宽。

2.3.2 酶促制备 AA-2G 过程中, 反应温度对产量的影响: 考虑到酿酒酵母的最适生长温度, 以终浓度 10 g/L 的 β -CD 和 5 g/L VC (pH5.0) 用 20 U 表面展示的 CGTase 分别在 25、30、35、40、45、50 °C 水浴摇床中转化 48 h, HPLC 检测 AA-2G 生成量。如图 8 所示, 表面展示 CGTase 的最适转化温度为 30 °C, 30 - 40 °C 范围内 AA-2G 的产量均为最适转化温度下的 90% 以上。

2.3.3 酶促制备 AA-2G 过程中, 反应初始 pH 对产量的影响: 考虑到酿酒酵母的最适生长 pH, 以终浓度 10 g/L 的 β -CD 和 5 g/L VC 用 20 U 表面展示 CGTase 分别在 pH4.0、4.5、5.0、5.5、6.0 条件下在 35 °C 水浴摇床中转化 36 h, HPLC 检测 AA-2G 生成量。如图 9 所示, 表面展示 CGTase 的最适转化 pH 为 4.5, pH4.5 - 6.0 范围内 AA-2G 的产量均为其最

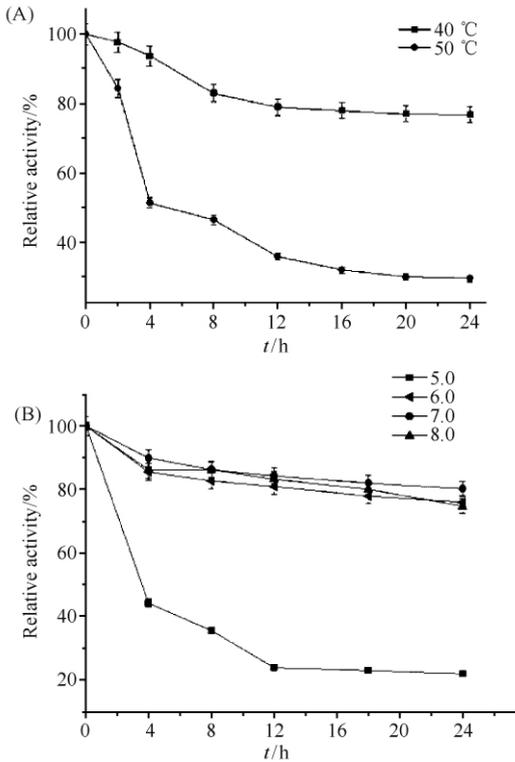


图 7. 表面展示 CGTase 的温度稳定性 (A) 以及 pH (B) 稳定性

Figure 7. Effect of temperature (A) and pH (B) on surface-engineered CGTase, respectively.

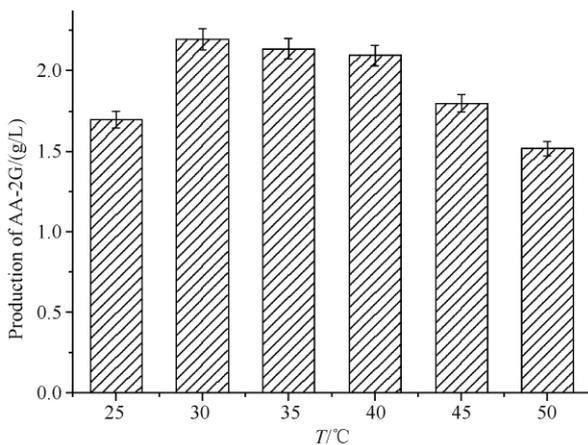


图 8. 温度对 AA-2G 产量的影响

Figure 8. Influence of temperature on the production of AA-2G.

适 pH 下的 80% 以上。

2.3.4 酶促制备 AA-2G 过程中, 反应时间对产量的影响: 以 10 g/L 的 β -CD 和 5 g/L VC 为底物, 加入 20 U 表面展示 CGTase, 置于 35 °C 水浴摇床, 定时取样, 检测 AA-2G 生成量。如图 10 所示, AA-2G

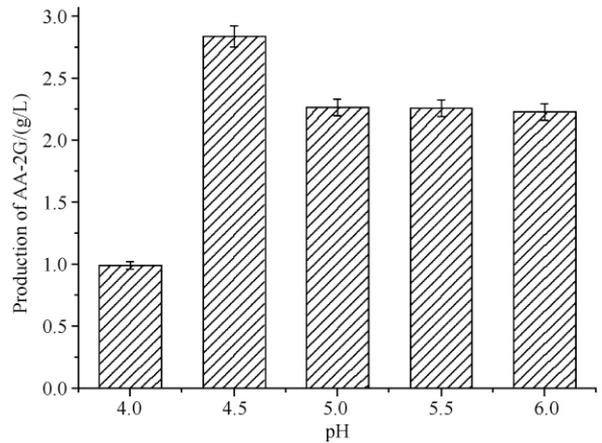


图 9. pH 对 AA-2G 产量的影响

Figure 9. Influence of pH on the production of AA-2G.

的产量随着转化时间的延长而增加, 转化在 48 h 达到平衡, 表面展示 CGTase 生产 AA-2G 的产量达到 2.93 g/L。

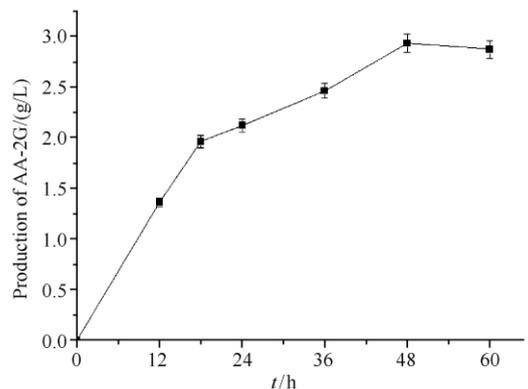


图 10. 反应时间对 AA-2G 产量的影响

Figure 10. Influence of reaction time on the production of AA-2G.

2.3.5 AA-2G 酶促合成过程中副产物的积累: 前期研究表明, 以 10 g/L 的 β -CD 和 5 g/L VC 为底物, 用 *E. coli* BL21 发酵所得的游离酶在其最适条件下生产 AA-2G, 48 h 反应平衡时 AA-2G 产量为 2.14 g/L, 而表面展示的 CGTase 在相同底物浓度下生产 AA-2G 的产量较游离酶提高了 37%。为分析原因, 对表面展示的 CGTase 以及游离 CGTase 生产 AA-2G 过程中生成的葡萄糖进行监测, 如图 11 所示, 利用游离 CGTase 做转化时葡萄糖含量随时间的延长而增加, 反应 48 h 时可达 3.15 g/L, 而利用表面展示 CGTase 做转化时葡萄糖含量一直低于 0.45 g/L。

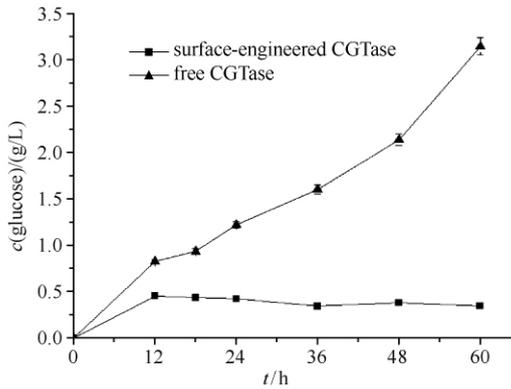


图 11. 表面展示 CGTase 与游离 CGTase 生产 AA-2G 副产物葡萄糖含量的比较

Figure 11. The content of glucose during the process of AA-2G production by surface-engineered CGTase and free CGTase, respectively.

3 讨论

本研究在酿酒酵母中进行 CGTase 的表面展示, 成功构建了 EBY100- ρ YD1-*cgt* 重组酿酒酵母, 其发酵的全细胞 CGTase 酶活只有 0.5 U/mL, 这可能是由于用于表面展示的 *cgt* 基因中含有酿酒酵母的稀有密码子, 严重制约了蛋白质的表达量。另一方面, CGTase 产量较低也可能由于半乳糖诱导效率不佳导致, 本研究所构建的重组质粒中, 编码 CGTase 的 *cgt* 基因在半乳糖启动子控制下被诱导转录和表达, 而培养基中的半乳糖既是碳源又是诱导物, 其加入时机、加入方式直接影响 CGTase 的表达量, 因此尚需兼顾细胞的生物量和高效诱导的酶蛋白表达量调整发酵策略。另外, 在发酵上清中仍可检测到 0.2 U/mL 的 CGTase 酶活, 具体原因不明尚需进一步研究。

本研究中表面展示 CGTase 温度稳定性以及 pH 稳定性均有所提高, 可能是由于酿酒酵母细胞壁表面结构对 CGTase 有保护作用^[19]。本研究对表面展示 CGTase 与游离 CGTase 转化生产 AA-2G 过程中产生的葡萄糖含量进行监测, 结果表明利用表面展示 CGTase 转化过程中葡萄糖一直维持在较低水平, 而用游离 CGTase 转化时随着时间的延长葡萄糖含量持续增加, 最终约为利用表面展示 CGTase 转化时的 7 倍, 这可能是因为表面展示 CGTase 转化过程中酿酒酵母利用葡萄糖, 从而使产生的葡萄糖副产物被

持续消耗, 低浓度的葡萄糖可降低与 VC 的竞争作用, 从而提高了 AA-2G 的产量^[17]。

利用酿酒酵母表面展示 CGTase 作为全细胞催化剂不仅具备传统固定化酶的诸多优点, 而且与传统固定化酶相比不需要复杂的纯化过程^[22], 同时其生产 AA-2G 的产量提高了 37%, 具有更好的工业化应用前景, 目前使用该方法生产 AA-2G 的研究未见报道。

参考文献

- [1] Jacob RA, Sotoudeh G. Vitamin C function and status in chronic disease. *Nutrition in Clinical Care: An Official Publication of Tufts University*, 2002, 5 (2) : 66-74.
- [2] Naidu KA. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? an overview. *Nutrition Journal*, 2003, 2 (1) : 7.
- [3] Yamamoto I, Muto N, Murakami K, Suga S, Yamaguchi H. L-ascorbic acid α -glucoside formed by regioselective transglucosylation with rat intestinal and rice seed α -glucosidases: its improved stability and structure determination. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1990, 38 (11) : 3020-3023.
- [4] Dresser GK, Wacher V, Wong S, Wong HT, Bailey DG. Evaluation of peppermint oil and ascorbyl palmitate as inhibitors of cytochrome P4503A4 activity *in vitro* and *in vivo*. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 2002, 72 (3) : 247-255.
- [5] Mead CG, Finamore FJ. The occurrence of ascorbic acid sulfate in the brine shrimp, *Artemia salina*. *Biochemistry*, 1969, 8 (6) : 2652-2655.
- [6] Mima H, Nomura H, Imai Y, Takashima H. Chemistry and application of ascorbic acid phosphate. *Vitamin*, 1970, 41 : 387-398.
- [7] Han RZ, Liu L, Li JH, Du GC, Chen J. Functions, applications and production of 2-O-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 95 (2) : 313-320.
- [8] Kwon T, Kim CT, Lee JH. Transglucosylation of ascorbic acid to ascorbic acid 2-glucoside by a recombinant sucrose phosphorylase from *Bifidobacterium longum*. *Biotechnology Letters*, 2007, 29 (4) : 611-615.
- [9] Lee SB, Nam KC, Lee SJ, Lee JH, Inouye K, Park KH. Antioxidative effects of glycosyl-ascorbic acids synthesized by maltogenic amylase to reduce lipid oxidation and volatiles production in cooked chicken meat. *Bioscience*,

- Biotechnology, and Biochemistry*, 2004, 68 (1) : 36-43.
- [10] Mukai K, Tsusaki K, Kubota M, Fukuda S, Miyake T. Process for producing 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid. US: 8759030. 2003-07-07.
- [11] Muto N, Nakamura T, Yamamoto I. Enzymatic formation of a nonreducing L-ascorbic acid α -glucoside: purification and properties of α -glucosidases catalyzing site-specific transglucosylation from rat small intestine. *Journal of Biochemistry*, 1990, 107 (2) : 222-227.
- [12] Tanaka M, Muto N, Yamamoto I. Characterization of *Bacillus stearothermophilus* cyclodextrin glucanotransferase in ascorbic acid 2-O- α -glucoside formation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1991, 1078 (2) : 127-132.
- [13] Aga H, Yoneyama M, Sakai S, Yamamoto I. Synthesis of 2-O- α -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid by cyclomalto-dextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1991, 55 (7) : 1751-1756.
- [14] Prousoontorn MH, Pantatan S. Production of 2-O- α -glucopyranosyl L-ascorbic acid from ascorbic acid and β -cyclodextrin using immobilized cyclodextrin glycosyltransferase. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 2007, 57 (1/4) : 39-46.
- [15] Zhang ZC, Li JH, Liu L, Sun J, Hua ZZ, Du GC, Chen JA. Enzymatic transformation of 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid (AA-2G) by immobilized α -cyclodextrin glucanotransferase from recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 2011, 68 (3/4) : 223-229.
- [16] van der Veen BA, Uitdehaag JCM, Dijkstra BW, Dijkhuizen L. Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, 1543 (2) : 336-360.
- [17] Wang ZK, Qi QS, Wang PG. Engineering of cyclodextrin glucanotransferase on the cell surface of *Saccharomyces cerevisiae* for improved cyclodextrin production. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72 (3) : 1873-1877.
- [18] Xiao CT, Fu Y, Tian Y. Newly progress in applications of *Saccharomyces cerevisiae* cell-surface engineering. *Acta Microbiologica Sinica*, 2005, 45 (5) : 812-816. (in Chinese)
肖朝庭, 傅衍, 田勇. 酿酒酵母细胞表面工程应用研究新进展. *微生物学报*, 2005, 45 (5) : 812-816.
- [19] Liu WS, Xu L, Zhao HY, Yang JK, Yan YJ. Cell surface display of *Yarrowia lipolytica* lipase Lip2 in *Saccharomyces cerevisiae* with a-agglutinin as carrier protein. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48 (11) : 1543-1548. (in Chinese)
刘文山, 徐莉, 赵鹤云, 杨江科, 闫云君. 利用 a 凝集素在酿酒酵母表面展示解脂耶氏酵母脂肪酶 Lip2. *微生物学报*, 2008, 48 (11) : 1543-1548.
- [20] Shim JH, Seo NS, Roh SA, Kim JW, Cha H, Park KH. Improved bread-baking process using *Saccharomyces cerevisiae* displayed with engineered cyclodextrin glucanotransferase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55 (12) : 4735-4740.
- [21] Yang YL, Wang L, Chen S, Wu J. Optimization of β -cyclodextrin production by recombinant β -cyclodextrin glycosyltransferase. *Biotechnology Bulletin*, 2014 (8) : 175-181. (in Chinese)
杨玉路, 王蕾, 陈晟, 吴敬. 重组 β -环糊精葡萄糖基转移酶生产 β -环糊精的工艺条件优化. *生物技术通报*, 2014 (8) : 175-181.
- [22] Kondo A, Ueda M. Yeast cell-surface display-applications of molecular display. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 64 (1) : 28-40.

Anchorage of cyclodextrin glycosyltransferase on outer membrane of *Saccharomyces cerevisiae* to produce 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid

YanJun Xiong^{1,2}, Lingqia Su^{1,2}, Lei Wang^{1,2}, Jing Wu^{1,2}, Sheng Chen^{1,2*}

¹ State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

² School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] Displaying cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) from *Bacillus circulans* 251 on the cell surface of *Saccharomyces cerevisiae* to improve 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid (AA-2G) production. [Methods] CGTase encoding gene *cgt* was inserted into the 3' terminal of Aga2p of vector pYD1 and the obtained recombinant plasmid pYD1-*cgt* was then transformed into *S. cerevisiae* EBY100 to produce surface displayed CGTase and culture conditions (culture medium, inductive temperature and concentration of inducer galactose) were optimized. Moreover, resulted CGTase displayed on the yeast cell surface was used for the AA-2G biosynthesis under the optimized condition. [Results] CGTase activity on the cell surface of recombinant yeast, *S. cerevisiae* EBY100-pYD1-*cgt*, reached 0.5 U/ml in 48 h fermentation using Yeast Peptone Galactose culture medium with 20% galactose as sole carbon source and inducer at 25 °C. The displayed CGTase exhibited better thermostability and pH stability than that of free CGTase. The concentration of AA-2G produced by the surface displayed CGTase was 37% higher than that produced by free CGTase at its optimal transformation conditions of 30 °C and pH4.5. [Conclusion] The cell surface display system based on a-agglutinin is an effective system for displaying CGTase. During AA-2G production by surface displayed CGTase, the by-product glucose might be consumed by yeast cell and thus facilitated AA-2G production. The whole cell EBY100-pYD1-*cgt* will have better prospects for applications.

Keywords: cyclodextrin glycosyltransferase, *Saccharomyces cerevisiae*, surface display, 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Science Fund for Distinguished Young Scholars (31425020)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-510-85326653; E-mail: chensheng@jiangnan.edu.cn

Received: 14 January 2015 / Revised: 23 March 2015