

环糊精葡萄糖基转移酶的筛选及其定向改造

金征宇^{1,2}, 柏玉香^{1,2}, 王金鹏^{1,2}

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 环糊精因其特殊性质得到了食品、化妆品、医药等行业的青睐, 全球消费量逐年稳步增加。环糊精的巨大需求也使其生产中所必需的环糊精葡萄糖基转移酶(CGT 酶, EC 2.4.1.19)成为研究热点。目前, 对该酶的研究多集中在作用机制、产物专一性机理等, 鲜见从菌株筛选出发的系统性报道。因此, 作者从野生 CGT 酶菌株的筛选出发, 立足未来环糊精工业的商业诉求, 综述了优质 CGT 酶获取的多种途径。同时结合国内外对 CGT 酶的大量研究工作以及我国的资源优势, 对该领域未来的研究提出更高的期望。

关键词: 环糊精; 环糊精葡萄糖基转移酶; 菌株筛选

中图分类号: TS 201.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2012)02-0113-11

Screen and Modification of Cyclodextrin Glycosyltransferase

JIN Zheng-yu^{1,2}, BAI Yu-xiang^{1,2}, WANG Jin-peng^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In recent years, since the special properties of the cyclodextrin (CDs), it has won more and more favors from different industries, such as food, cosmetic, pharmaceutical and so on. The CDs were in a great demand and also consumed with a stable speed around the world. As the most important factor in cyclodextrin industry, the cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase, EC 2.4.1.19) became one of the hot points in CDs investigations. Today, less systematic work which related to the screening of CGTase strains had been done besides the catalysis mechanism and product specificity. This paper plans to directly describe the comprehensive means of obtaining the superior CGTase based on the future appeal of CD industry. Simultaneously, combine the former research results and the advantageous resources of our own country, in order to put forward expect of this field

Key words: cyclodextrin (CD), cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase), strain screening

环糊精(CDs)是由多个葡萄糖单元通过 α -1,4 糖苷键连接而成的环状超分子多糖^[1]。自 1891 年 Villers 发现环糊精以来, 环糊精的发展经历了发现

阶段、系统研究阶段及工业化生产应用阶段。20 世纪 30 年代中期, Frenenberg 分离得到纯环糊精, 并表征了环糊精的物理化学性质^[2]。这一时期虽

收稿日期: 2012-01-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(20976070)。

作者简介: 金征宇(1960-), 男, 江苏扬州人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事碳水化合物研究。E-mail: jinlab2008@yahoo.com

已建立实验室制备工艺,但由于对毒性的判断尚存在争议,并没有大规模的工业化生产。从20世纪70年代初开始,有法定资格的单位出示毒理学研究结果后,消除了人们的疑虑,从此环糊精开始迈向工业化生产阶段,并显示出了迅猛的发展势头(图1)。目前,环糊精已经在食品、化妆品、医药、农药、纺织和生物技术等多个领域得到广泛的应用^[3]。据统计,截止目前,有关环糊精研究报道(不包括专利)全球共有27 495篇,其中近5年来的研究报道有12 309篇。

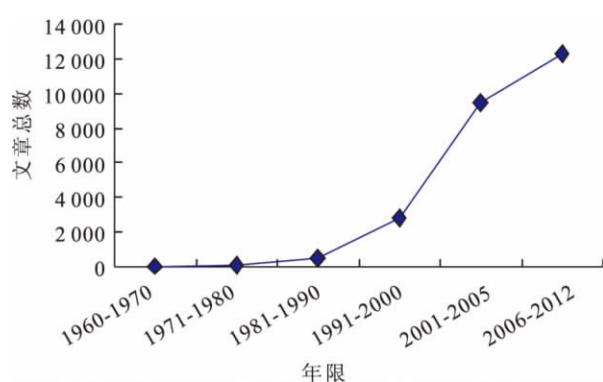


图1 不同年限环糊精相关文献

Fig. 1 Articles about cyclodextrin in various years

进一步对所有有关环糊精的英文报道进行学科类别归类分析(表1),结果表明有关环糊精的研究报道主要集中在化学、生化与分子生物学、药学

与制药等学科领域(表1)。

对比分析近5年国内外关于环糊精研究所在领域的研究报道情况(表1),化学、制药、生物学等领域开展环糊精相关研究是国内外的研究热点;此外,国内及国际上关于环糊精的研究也存在不同的侧重点:从统计的近5年SCI环糊精相关文章及中文相关环糊精文章来看,国际上关于环糊精的研究更多的集中在生物学、医学、聚合物科学及材料科学等方面,而国内在药学、轻工业手工业及环境科学等方面的研究报道较为热门。针对当前国内外关于环糊精研究存在的差异,作者以本研究团队多年的环糊精研究为基础,围绕环糊精糖基转移酶的筛选及定向改造展开综述,以期把握环糊精领域发展动向、开展环糊精相关研究提供参考。

在化学、分子生物学及生物学领域,作为生产环糊精的最为关键的生物催化剂——环糊精葡萄糖基转移酶(CGT酶, EC 2.4.1.19)受到了研究者们热捧。自人类首次发现可利用淀粉代谢生产环糊精的CGT酶菌株至今,对环糊精糖基转移酶的研究愈来愈热,涉及了新菌株的筛选、产酶工艺优化、产酶基因的克隆表达及蛋白质工程改造等多个方面。作者总结了CGT酶的最新研究,系统归纳了优质CGT酶的获取途径,分析各种途径中存在的问题,并结合现有资源与技术,对CGT酶研究的未来提出更高的期望。

表1 环糊精相关文章的学科分类

Tab. 1 Classify of articles related to cyclodextrin subjects

环糊精相关英文文章				环糊精相关中文文章	
学科领域	所有相关文章	近5年相关文章	近5年文章所占比例/%	学科领域	近5年相关文章
化学	13484	5968	44.26	有机化工	1857
生物化学和分子生物学	11765	4313	36.66	化学	1284
药学及制药	6593	2737	41.51	药学	817
医学	3673	1419	38.63	轻工业手工业	630
细胞生物学	2489	1020	40.98	中药学	494
聚合物科学	1270	730	57.48	环境科学与资源利用	187
材料科学	1078	712	66.04	生物学	164

1 CGT酶菌株的筛选

选择合适的研究对象是CGT酶的研究最为关键的部分。总结现有的报道,CGT酶获取方式可以大致归纳为以下3种:从自然界中筛选野生菌株;根据基因文库进行克隆表达或对已知目的基因片段进行蛋白质工程改良。其中野生菌株筛选不仅最为直接有效,而且也是后两种方式的基础。自1903年从自然界中分离出第一株产CGT酶的*B. macerans*至今,被鉴定出的CGT酶菌株已经超过50种,且随着技术的成熟,发现高产CGT酶菌株的步伐也逐渐加快,其中近10年发现的高效野生菌株的数量已与上世纪发现的总量持平^[4]。

CGT酶的研究已经跨越了一个世纪,人们在关注高产环糊精的野生菌株的同时也逐步提出了更高的要求—更高的产物专一性;更高的耐热性;更稳定的耐碱性;甚至更强的抗有机试剂性能。因此,综合生产实际需求以及野生菌的自然特性,制定合理的筛选策略就显得尤为重要。

1.1 采集地点的选择

各种微生物由于生理特性不同,在土壤中的分布也随着地理条件、养分、水分、土质、季节而有很大的变化。因此,在分离菌株前要分析分离筛选的目的,再有针对性的去特定的环境和地区采集样品。截止2011年,在世界各地的不同角落都陆续的发现可以产环糊精的菌株,现将近10年报道的具有代表性的筛选地所在国家或地区总结如图2。



图2 最新CGT酶菌株的产地汇总

Fig. 2 The producing areas of all the novel strains which secrete the CGTase.

根据采样地点的特性可以将它们细分为4种:

(1)碱性环境,如碳酸泉、碱性土壤和湖泊等。2011

年,Kitayaska等人于保加利亚含矿物水的砂土样本中筛出的*Bacillus pseudocaliphilus* 8SB^[5]; Ibrahim等人于埃及瓦迪纳特伦的埃及苏打湖中分离到的*Bacillus agaradhaerens* WN-I^[6]; 2008年, Atanasova等人从保加利亚碱性土壤中获取的*alkaliphilic Bacillus pseudocaliphilus* 20RF^[7]; 2003年, Martins等人从埃塞俄比亚的苏打湖中得到*Bacillus agaradhaerens* LS-3C^[8]。通常认为可以在pH>9条件下生长且10-12区间内生长状况最佳的微生物称为嗜碱微生物,之所以嗜碱菌得到如此的重视,主要由于它具备着很高的商业价值,它的生长所适pH值可以有效的抑制真菌的生长,且由嗜碱菌分泌的蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶和普鲁兰酶可以广泛用于洗涤剂、纸浆漂白、农业和食品废弃物处理^[6]。同时从中性甚至酸性环境中筛选嗜碱菌降低了实验的要求、减少了大量的人力成本。(2)高温地域。这些地域有利于嗜热菌的生长,主要来源可以是油井、温泉、火山泥、粪便等。该类菌株已经逐步取代嗜碱菌成为CGT酶野生菌株筛选的最热研究对象,它们的生长过程伴随着孢子的生成,使得耐热性能显著提高。环糊精的工业生产中,嗜热CGT酶可以在液化过程中加入,取代 α -淀粉酶,参与淀粉原料的液化过程,大大降低用酶成本、提高商业利润^[9]。例如,2009年, Avci等从土耳其的一口油井中获取了一株*Thermophilic anaerobic bacteria strain* P4^[10]; 2007年, Charoensakdi等于泰国北部的温泉砂中分离出了*Paenibacillus* sp. T16^[9]; 2004年, Thiemann等在肯尼亚热苏打湖的碱水中筛出的*Anaerobranca gottschalkii*^[11]。(3)底物原料富集地。从含高浓度底物的土壤中分离筛选目的菌株一直都是野生菌筛选常用的方法,而对于CGT酶来说,最好的土样莫过于淀粉含量高的土壤,如玉米、木薯、大豆、土豆、甘蔗、黄豆、或南瓜等的种植地以及淀粉工厂原料废弃物^[12]。2010年, Ramli等从西米地中获取*Bacillus* sp. NR5 UPM^[13]; 2008年, Menocci等刮取巴西木薯表层土样并从中筛出目的菌株*Bacillus* sp. BA-CAR^[14]; 2006年, Yampayont等在泰国淀粉厂废弃物中发现了*Paenibacillus* sp^[15]; 2004年, de Freitas等抽样巴西木薯淀粉厂废弃物进行筛选,获得了*Bacillus alkaliphilic* CGII^[16]。(4)富含有机物的土样。2003年, Doukyu等在日本的关东地区分

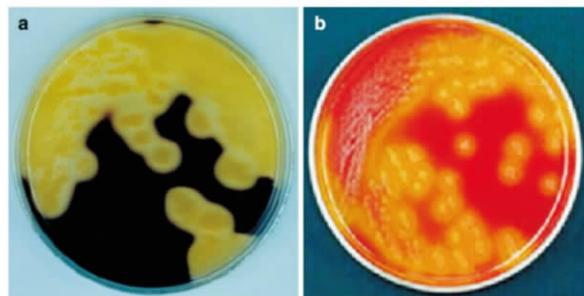
离出了一株分泌抗有机溶剂 CGT 酶的菌株 *Paenibacillus illinoisensis*, 这种独特的 CGT 酶不仅有利于有机环境下酶活性的检测, 还可以用于有机溶剂环境下的不溶性黄酮的转糖苷反应^[17]。

1.2 CGT 酶菌株的筛选及鉴定

选取合适的土样后, 下一步的工作重点就是如何从中筛选出合适的菌株。对于近期大量筛选出具备商业潜在价值的嗜碱、嗜热菌种通常可以通过调节控制培养基酸碱度以及培养温度去除大量的非目的菌株。而对于没有明显特征的或特征相近的同属菌的优化筛选就必须借助适用于 CGT 酶检测的特殊培养基。

由于水解、环化这两种催化活性同时存在于 CGT 酶中, 因此在评价 CGT 酶的活性时研究者们一般会将这两种活性参数作为指标。在此基础上就引入了经典的淀粉-碘复合显色法(图 3(a))。将采集的土样处理后涂布至含一定浓度淀粉底物的碘液固态平板上, 此时由于碘与底物淀粉发生复合作用, 平板呈深蓝色。再将涂布后的平板置于恒温培养箱中培养足够长时间后发现平板上会出现颜色的变化, 原本均一的深蓝色上会出现淡浅的色圈, 这正是由于淀粉水解为糊精后与碘的络合作用减弱的结果^[5]。浅色圈半径越大说明水解作用越强, 继而可以挑取水解性强的菌落进一步筛选。另外, 还可以依据 CGT 酶特有的环化活性筛选出目的菌株, 这需要借助以环糊精-酚酞络合显无色原理下的 Horikoshi 平板法, 该方法是将淀粉加入含有酚酞与甲基橙的 Horikoshi 培养基中配成固体平板, 在将处理后的土样涂布至平板上恒温培养, 一段时间后发现甲基橙和酚酞背景下的平板内出现淡黄色且近无色的斑点, 究其原因在于酚酞在环糊精的疏水空腔内会形成无色的二价阴离子^[18]。同样, 浅色斑点的半径也可以作为环化活性的直观展现, 从而挑取较大半径的菌落进行下一步的研究(图 3(b))。

成功获取水解及环化活性较强的菌株后, 研究者们通常还会借助透射电镜或光学显微镜等物理方法鉴定细菌的形态(如图 4)^[6,9]。当然, 利用分子生物学的手段测定 16sRNA 来辅助鉴定目的菌的种属也是该领域的常用方法之一^[5]。



(a) 固态碘液平板测 CGT 酶的糊精化活性。浅色部分表示淀粉的降解。深色部分为淀粉与碘液的复合物。(b) 含酚酞固态 Horikoshi 平板测环化活力。浅色部分为甲基橙背景下 CD-酞的无色复合物。深色为甲基橙与酞背景色^[14]

图 3 CGT 酶菌株的筛选

Fig. 3 Screening of CGTase producing strains

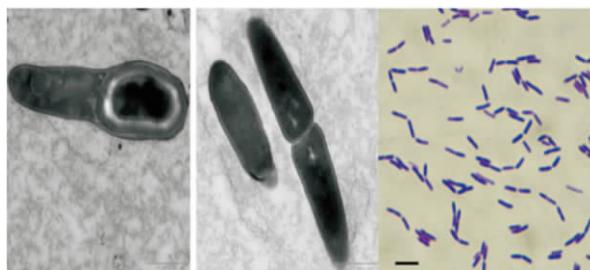


图 4 CGT 酶菌株的形态鉴定

Fig. 4 The morphology identification of the CGTase strain

2 CGT 酶的定向改造

通过上述方法从野生菌株中获取到 CGT 酶往往都具备一定的工业应用缺陷, 如酶活过低、专一性较差、耐热性不强、稳定性差等。因此, 为了解决这一系列的问题, 研究者们就想到了通过一些现有的技术手段改造他们以期获得工业生产的最佳要求。

2.1 物理化学的手段

在 CGT 酶研究初期, DNA 重组技术还未诞生, 为了分析 CGT 酶的性质, 通常都会利用一系列可以与特定氨基酸残基发生反应的化学试剂对酶进行修饰, 再通过产物的变化进行表征。如此不仅可以判定出 CGT 酶中的关键氨基酸残基, 而且能够大致分析出每种氨基酸残基对应的 CGT 酶催化功能, 经修饰后的 CGT 酶活性及相关性质都发生了不同程度的改变, 详见表 2。

表 2 不同来源的 CGT 酶的化学修饰位点及效果

Tab. 2 The chemical modified sites and effects of diverse CGTase

来源	修饰位点及方式	效果	研究者
<i>Bacillus circulans</i> DF 9R	His 的 DEPC 修饰	水解、环化活性下降	Costa 等,2009 ^[19]
<i>Thermoanaerobacter sp.</i> 501	45% 氨基酸琥珀酰化	转糖基作用增强	Alcalde 等,2001 ^[20]
	Lys 侧链乙酰化	水解活性增强	Alcalde 等,1999 ^[21]
	Asp、Glu 羧基的亲核修饰	4 种活性均下降	Alcalde 等,2003 ^[22]
<i>Bacillus circulans</i> <i>var. alkalophilus</i>	His-98, 140, 233, 327 的天门冬酰胺取代	环化、水解活性下降	Mattsson 等,1995 ^[23]
	His-177 的脯氨酸取代	热稳定性、pH 适用范围受到制约	

再者,通过一定的化学修饰,可以在维持 CGT 酶活性的情况下改变酶的晶体结构,使得它可以应用于一些极端的反应环境,甚至得到一些新型环糊精产物,如 Kaulpiboon 等人利用分子印迹的手段对分别来源于 *Bacillus macerans* 与 *Paenibacillus sp.* A11 的 CGT 酶进行改造,使它们具备了新的 γ -

CGT 酶功能^[24]。

由于 CGT 酶较为昂贵,工业上除适用化学改性的方法外,还会结合酶的固定化技术将 CGT 酶固载到一些特殊的颗粒材料上。这样不仅大大提高了酶的重复利用率,发挥了酶的最大价值,还有利于其提高在工业生产中的稳定性。详见表 3。

表 3 不同来源 CGT 酶固定化的固载材料、固载方式及效果评价

Tab. 3 The immobilized materials, methods and effects of diverse CGTase

CGT 酶来源	固载材料	固定化方式	效果	研究者
<i>Alkaliophilic Bacillus agaradhaerens</i> LS-3C	聚乙烯醇(PVA)复合凝胶	包合菌体	产 92-94% 的 β -CD	Martins 等,2003 ^[25]
<i>Bacillus macerans</i> ATCC 8244	海藻酸钠凝胶球	共价结合(戊二醛)	7 个周期后酶活保留 75%	Arya 等,2006 ^[26]
<i>Bacillus circulans</i> DF 9R	高活化乙醛酰基琼脂糖	共价结合(戊二醛)	连接后酶活保留 90%	Ferrarotti 等,2006 ^[27]
<i>Thermoanaerobacter sp.</i>	Eupergit C	共价结合(戊二醛)	10 个周期后酶活保留 40%	Martin 等,2003 ^[28]
<i>Paenibacillus macerans</i> NRRL B-3186	聚氯乙烯(PVC)	共价结合(戊二醛)	14 个周期后酶活保留 85%	Abdel-Naby 等,1999 ^[29]
<i>Alkalophilic Bacillus sp.</i> No. 38-2	合成吸附树脂	共价结合(戊二醛)	14 h 内酶活无显著变化,淀粉转化率达 63%	Kato 等,2004 ^[30]
<i>Thermoanaerobacter</i>	氨基环氧树脂衍生物	共价结合(戊二醛)	22 h 后,酶活保留 60%	Vieira 等,2009 ^[31]
<i>Bacillus circulans</i> ATCC 21783	二氧化硅为基质海砂	共价结合(戊二醛)	8 个周期后酶活保留 80%	Iyer 等,2003 ^[32]
未知	CNBr 活化 Sepharose 4B	共价结合(戊二醛)	连接后酶活下降了 71%	Martin 等,2002 ^[33]
	EAH Sepharose 4B		连接后酶活仅为 2.4%	

2.2 分子生物学手段

自人类首次成功获得 *Bacillus macerans* 中的 CGT 酶基因片段至今,约 38 种不同来源的

CGT 酶基因片段相继得到了证实。同期,蛋白质工程技术的引入给分子生物学研究带来了革命性的变化。因此,大量的研究工作开始从对酶的化学修

饰分析转向了更为精确的基因改造研究。通过定点突变或定向进化的方法获取高专一性、强适应性的酶就成为了 21 世纪 CGT 酶领域研究的热点。

通过 CGT 酶与底物结合的机制分析,在亚位点处结合的氨基酸残基被确定为研究的对象。通常会将该类酶的竞争性抑制物与其作用后分析复合物晶体结构,找出关键氨基酸位点,再利用基因改造的方法替换关键位点的氨基酸残基,分析产物特异性变化。由于活性催化区域的氨基酸残基数目较大,因此所选突变氨基酸残基对象相对集中在位于保守性较差的亚位点处,如 *Bacillus circulans*

(strain 251) 中的亚位点-3,-7^[34]。此外,一些维持催化区域空间结构的关键氨基酸残基可以使麦芽低聚糖底物在进入活性位点时发生构象扭曲,缩短了还原末端与非还原末端的距离,形成有利于环化反应的中间体,直接影响了环糊精的生成效率。因此该类氨基酸残基也被列为了研究重点^[35]。迄今为止,已经完成 10 种不同来源 CGT 酶的部分定向改造工作(表 4),结果发现,仅少数改造对酶的活力及产物的特异性产生的影响是积极的。因此,利用蛋白质工程手段对 CGT 酶产物专一性的改良还有待进一步的研究。

表 4 不同来源 CGT 酶的定向改造

Tab. 4 The directed mutation on diverse CGTase

菌种	目的位点	原残基	突变体残基	产生的影响	文献
<i>Bacillus circulans</i> 251	257	E	A, Q	适宜酸性催化	Kelly 等, 2009 ^[36]
	47	R, K, H, T	W, L, Q	环化活力下降	
	326	D, S	D, Q, L	环化和总酶活下降	
	183	F, W	N, S, L	环化、水解活力下降	
	259	F, Y	L, N, I, E, H, R	环化、水解活力下降	
	194	L	T	环化活力下降	
	145	S, M, L, D, E	A, E	产物专一性变化	
	146	S, E, V, F, L	P		
	147	T, D, N	W		
	232	K, A	L, E	影响总酶活	
	233	H	D, N, R		
	100	Y	F, S		
	140	H	D, N, R		
	227	R	A, K		
	327	H	D, N, R		
	98	H	D		
	371	D	G, N, R	影响总酶活, α -CD 产量下降	
	89	Y, D, S, Q, A, G	F, S, D, G	总酶活和产物 特异性发生变化	
	328	D	N, A	影响总酶活	
	76	S, T	P	水解活性下降	
	135	D	N, A	影响 E257 和 R227 构象	

续表 4

菌种	目的位点	原残基	突变体残基	产生的影响	文献
	21	F,V	L	抑制水解活性	
	196	D,N,G	H	总酶活下降, α -CD 产量增加	
	167	Y	F	底物的选择性 发生变化	
	179	G	L		
	180	G,N	L		
	193	N	L,G		
	94	N,S,Y,E	S,Q	酶活变化不大	
	230	A	V	影响转糖基特异性	
<i>Bacillus clarkii</i> 7364	223	A	K,R,H	中性条件下 γ -CD 环化活力增强	Nakagawa 等,2006 ^[34]
	255	G	K,R,H	γ -CD 产量下降	
<i>Thermococcus sp.</i> B1001	100	Y	W	无显著影响	Yamamoto 等, 2000 ^[34]
	191	W	Y,F	无显著影响	
	267	Y	W,F	Y267W 增加了 β , γ -CD 产量	
	283	Y	L	环化活力下降	
<i>T. hermosulfurigenes</i> EM1	196	F	G	变换最佳 pH 条件下 α -CD 产量增加	Kelly 等,2008 ^[34] Wind 等,1998 ^[35]
	197	D	H	γ -CD 产量增加, 环化、耦合活力下降	Leemhuis 等, 2002 ^[34]
	284	F	K	β -CD 产量增加,环化、 耦合活力下降	
	327	N	D	α -CD 产量增加,环化、 耦合活力下降	
	371	D	R	γ -CD 产量增加,环化、耦 合活力下降,最佳 pH 发生变	
<i>Alkalophilic Bacillus sp.</i> I-5	94	N	S	α -CD 产量增加	Shim 等,2004 ^[34]
	89	Y	F	β -CD 产量增加	
	100	Y	F	β -CD 产量增加	
<i>Bacillus sp.</i> G1	47	H	T	γ -CD 产量增加	Goh 等,2009 ^[34]
<i>P. macerans</i> JFB05-01	89	Y	K,R	α -CD 产量增加	Li 等,2009 ^[37] Li 等,2009 ^[38]
	371	D	K	α -CD 产量增加	
	47	K	R,H,T,S,L	α -CD 产量下降, β -CD 产量增加	

为满足 CGT 酶的工业需求,除改良酶的产物专一性外,还需要考虑酶的稳定性。有研究表明,从 *Thermococcus sp.* 中获取的 CGT 酶有着较强的热稳定性。根据相应的基因片段,研究者对 *Bacillus circulans* 251 来源的 CGT 酶基因进行目的性改造,改良后,酶的热稳定性显著提高,分析可能的原因是在酶的 B 区域表面形成了新的盐桥^[39]。然而,耐热菌分泌出的 CGT 酶的水解活性也相对较高,会在反应后期与耦合活性协同导致反应产物 CD 降解为短链麦芽低聚糖,因此,在保留 CGT 酶热稳定性的同时,通过基因改造的方法抑制其水解及耦合活性可以为环糊精的工业生产提供便利^[40]。

3 辅助提高CGT酶的效率

目前工业生产中,原料转化率都局限在 50%~60%之间,很难有进一步的提高,究其原因,除了 CGT 酶本身的特性缺陷外,应用过程中的系列影响因素也不容忽视^[41]。

首先,环糊精葡萄糖基转移酶由于其受空间位阻以及催化特性的制约,无法水解原料淀粉中的 α -1,6 键,导致溶液中存在大量的极限糊精无法降解^[42],所以在添加 CGTase 的同时会辅助加入异淀粉酶或普鲁兰酶处理淀粉原料中的 α -1,6 键使反应得以持续进行。其次,CGTase 在环化麦芽低聚糖的同时,还具备了水解、耦合、歧化等特性。这些功能在反应进行过程中会将生成的环糊精降解为麦芽低聚糖^[43],因此在挑选生产用酶时,选择一种低水解活性的 CGTase 有利于避免产物的降解。再次,除了反应体系中一些特定的金属离子会影响酶活力外,环化产物也会对 CGTase 的活性产生竞争性抑制。如 α -CD 竞争性的抑制 *Bacillus circulans* DF 9R CGTase 活性^[44],针对这一问题,可以在反应的过程中加入一些复合剂与环糊精产物共沉淀,或使用其他特定的手段及时取出产物,维持体系中较低的环糊精浓度,推进反应向正反应方向进行。此外,温度、pH 值、淀粉种类等其他反应参数都是影响环糊精产率的重要因素,在研究 CGTase 时也不容忽视^[45, 46]。

4 CGT酶的其他工业用途

环糊精葡萄糖基转移酶同时具备了水解、歧

化、耦合和环化四种催化活性,因此,它不仅适用于环糊精的生产,还可以催化其他反应类型。早在上世纪 90 年代,Kometani 等人就利用了 CGT 酶耦合与歧化活性,将葡萄糖基连接至橘皮苷上^[47]。自此,立足 CGT 酶的转糖基活性所进行的研究也越来越多,近年来,葡萄糖基甜菊苷的合成尤为突出,现已成为一种成功的商品甜味剂,葡萄糖基的引入不仅降低了主体物质本身的苦涩感,增加其甜度,还极大的改善了其溶解度,满足了消费者的不同需求^[48]。近年来,在食品领域外,研究者们还利用 CGT 酶成功的合成了烷基糖苷,该物质表面活性较强且无毒副作用,是一种性能优良的可生物降解洗涤剂^[49]。

利用具备水解活性的 CGT 酶处理的淀粉会产生较为特殊的极限糊精,这种 CGT 酶极限糊精已被运用到造纸工业中以改善纸张的表面上胶与涂层性能。经过处理,纸张的光泽度、书写性能等都得到了很大程度的提升^[50]。此外,CGT 酶不仅凭借其独特的水解性能为焙烤产品品质及贮藏性能提供了帮助,而且它作用淀粉底物所产生的环糊精对淀粉老化也起到了抑制作用^[51-52]。

5 CGT酶工业展望

当今,分离获取具备特殊性质从而更好的满足工业生产的 CGT 酶菌株已经取代了传统的单以专一性和高酶活作为评价指标的理念。我们应该多倚靠地大物博的国内资源,借鉴国际学者筛选目的菌株的经验,着眼于耐碱性、耐热性等有利工业应用的优势性能,发掘出更为优质的 CGT 酶菌株。如广西武鸣县是我国木薯种植重镇,同时地处我国南段亚热带地区,无论从原料产地因素还是耐热性能的角度都具备采样的潜质;西藏冈底斯山脉-带青唐古拉山脉以北的藏北高原盐湖区的碱湖同样可以方便获取耐碱性强的目的菌株;同时,海南地区淀粉厂废弃物中也是寻找挖掘耐热 CGT 酶菌株的较好的土壤资源。

在筛选野生菌株的同时,仍然不可忽视改良现有菌株的重要性。但在基于原有的专一性及高产率等常规立足点外,要多考虑工业生产的实际需求,增加对目的基因片段非保守区域的定向改造研究,以期获得更具潜力的优势菌株,拓宽环糊精产

业空间,满足市场的不同需求。

参考文献(References):

- [1] 金征宇,顾正彪,童群义. 碳水化合物化学:原理与应用[M]. 北京:化学工业出版社,2007.
- [2] 金征宇,徐学明,陈寒青. 环糊精化学:制备与应用[M]. 北京:化学工业出版社,2008.
- [3] 曹新志,金征宇. 环糊精包合物的制备方法[J]. 食品工业科技,2003,24(10):158-160.
CAO Xin-zhi, JIN Zheng-yu. Preparation methods of cyclodextrin inclusion complexes[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2003, 24(10):158-160. (in Chinese)
- [4] Leemhuis H, Kelly R, Dijkhuizen L. Engineering of cyclodextrin glucanotransferases and the impact for biotechnological application[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2010, 85:823-835.
- [5] Kitayska T. Purification and properties of a new thermostable cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus pseudocaliphilus* 8SB[J]. **Appl Biochem and Biotech**, 2011, 165(5-6):1285-1295.
- [6] Ibrahim A, Al-Salamah A, Bahl H. An alkaliphilic cyclodextrin glycosyltransferase from a new *Bacillus agaradhaerens* WN-I strain isolated from an Egyptian soda lake: Purification and properties[J]. **Afr J Biotechnol**, 2011, 10(32):6107-6119.
- [7] Atanasova N. Isolation of novel alkaliphilic *Bacillus* strains for cyclodextrin glucanotransferase production[J]. **Appl Biochem and Biotech**, 2008, 149(2):155-167.
- [8] Martins R F, Hatti-Kaul R. *Bacillus agaradhaerens* LS-3C cyclodextrin glycosyltransferase: activity and stability features [J]. **Enzyme MicrobTech**, 2003, 33(6):819-827.
- [9] Avci A, Donmez S. A novel thermophilic anaerobic bacteria producing cyclodextrin glycosyltransferase[J]. **Process Biochem**, 2009, 44(1):36-42.
- [10] Charoensakdi R. Cloning and expression of cyclodextrin glycosyltransferase gene from *Paenibacillus* sp T16 isolated from hot spring soil in northern Thailand[J]. **J Biochem Mol Biol**, 2007, 40(3):333-340.
- [11] Thiemann V. Characterisation of a thermoalkali-stable cyclodextrin glycosyltransferase from the anaerobic thermoalkali-philic bacterium *Anaerobranca gottschalkii*[J]. **Arch Microbiol**, 2004, 182(2-3):226-235.
- [12] Higuti M H. Isolation of alkaliphilic CGTase-producing bacteria and characterization of cyclodextrin-glycosyltransferase [J]. **Braz J Microbiol**, 2003, 46(2):183-186.
- [13] Ramli N. Potential cyclodextrin glycosyltransferase producer from locally isolated bacteria[J]. **Afr J Biotechnol**, 2010, 9(43):7317-7321.
- [14] Menocci V. Cyclodextrin Glycosyltransferase production by new bacillus Sp strains isolated from brazilian soil[J]. **Braz J Microbiol**, 2008, 39(4):682-688.
- [15] Yampayont P. Isolation of cyclodextrin producing thermotolerant *Paenibacillus* sp from waste of starch factory and some properties of the cyclodextrin glycosyltransferase[J]. **J Incl Phenom Macro**, 2006, 56(1-2):203-207.
- [16] de Freitas, Monti R, Contiero J. Production of CGTase by a *Bacillus alkalophilic* CGII strain isolated from wastewater of a manioc flour industry[J]. **Braz J Microbiol**, 2004, 35(3):255-260.
- [17] Doukyu N, Kuwahara H, Aono R. Isolation of *Paenibacillus illinoisensis* that produces cyclodextrin glucanotransferase resistant to organic solvents[J]. **Biosci Biotechnol Biochem**, 2003, 67(2):334-340.
- [18] 曹新志,金征宇. 环糊精糖基转移酶高产菌株的快速筛选[J]. 中国粮油学报,2003,18(6):53-55.
CAO Xin-zhi, JIN Zheng-yu. A rapid screen method for cyclodextrin glycosyltransferase producer[J]. **Journal of the Chinese Cereals and Oils Association**, 2003,18(6):53-55. (in Chinese)
- [19] Costa H, del Canto S, Ferrarotti S. Structure-function relationship in cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* DF 9R [J]. **Carbohydr Res**, 2009, 344:74-79.
- [20] Alcalde M, Plou F, Teresa M. Succinylation of cyclodextrin glycosyltransferase from *Thermoanaerobacter* sp. 501 enhances its transferase activity using starch as donor [J]. **J Biotechnol**, 2001, 86:71-80.
- [21] Alcalde M, Plou F, Andersen C. Chemical modification of lysine side chains of cyclodextrin glycosyltransferase from *Thermoanaerobacter* causes a shift from cyclodextrin glycosyltransferase to α -amylase specificity [J]. **FEBS Lett**, 1999, 445:333-337.
- [22] Alcalde M, Plou F, Pérez-Boada M. Chemical modification of carboxylic residues in a cyclodextrin glucanotransferase and

- its implication in the hydrolysis/transglycosylation ratio of the α -amylase family [J]. **J Mol Catal B-Enzym**, 2003, 26: 57–67.
- [23] Mattsson P, Battchikova N, Sippola K, Korpela T. The role of histidine residues in the catalytic act of cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus circulans* var. *alkalophilus*[J]. **Biochim Biophys Acta**, 1995, 1247: 97–103.
- [24] Kaulpiboon J, Pongsawadi P, Zimmermann W. Molecular imprinting of cyclodextrin glycosyltransferases from *Paenibacillus* sp. A11 and *Bacillus macerans* with gamma-cyclodextrin [J]. **FEBS J**, 2007, 274:1001–1010.
- [25] Martins R, Plieva F, Santos A. Integrated immobilized cell reactor-adsorption system for β -cyclodextrin production: a model study using PVA-cryogel entrapped *Bacillus agaradhaerens* cells [J]. **Biotechnol Lett**, 2003 25: 1537–1543.
- [26] Arya K, Srivastava S. Kinetics of immobilized cyclodextrin glucanotransferase produced by *Bacillus macerans* ATCC 8244 [J]. **Enzyme Microb Technol**, 2006, 39: 507–510.
- [27] Ferrarotti S, Bolivar J, Mateo C. Immobilization and stabilization of a cyclodextrin glycosyltransferase by covalent attachment on highly activated glyoxyl-agarose supports[J]. **Biotechnol Prog**, 2006, 22: 1140–1145.
- [28] Martin M, Plou F, Alcalde M. Immobilization on Eupergit C of cyclodextrin glucosyltransferase (CGTase) and properties of the immobilized biocatalyst[J]. **J Molecul Catalysis B: Enzymatic**, 2003, 21: 299–308.
- [29] Abdel-Naby, Mohamed A. Immobilization of *Paenibacillus macerans* NRRL B-3186 cyclodextrin glycosyltransferase and properties of the immobilized enzyme[J]. **Process Biochem**, 1999, 34(4): 399–405.
- [30] Kato T, Horikoshi K. Immobilized cyclomaltodextrin glucanotransferase of *alkaliphilic Bacillus* sp. No. 38-2 [J]. **Biotechnol Bioeng**, 1984, 26(6): 595–598.
- [31] Vieira A, Vieira M, Tardioli P. Immobilization and stabilization of cyclodextrin glycosyltransferase using reversible and irreversible attachments on agarose matrix [J]. **New Biotechnol**, 2009, 25: 1.
- [32] Iyer J, Shetty P, Pai J. Immobilization of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus circulans* ATCC 21783 on purified seasand[J]. **J Incl Microbiol Biotechnol**, 2003, 30(1): 47–51.
- [33] Martin M, Alcalde M, Plou F. Covalent immobilization of cyclodextrin glucosyltransferase (CGTase) in activated silica and Sepharose[J]. **Indian J Biochem Bio**, 2002, 39(4): 229–234.
- [34] Penninga D, van der Veen B, Knegtel R. The raw starch binding domain of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251[J]. **J Biol Chem**, 1996, 271: 32777–32784.
- [35] Wind R, Uitdehaag J, Buitelaar R. Engineering of cyclodextrin product specificity and pH optima of the thermostable cyclodextrin glycosyltransferase from *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1 [J]. **J Biol Chem**, 1998, 273(10): 5771–5779.
- [36] Kelly R, Dijkhuizen L, Leemhuis H. The evolution of cyclodextrin glucanotransferase product specificity [J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2009, 84: 119–133.
- [37] Li Z, Zhang J, Wang M. Mutations at subsite-3 in cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus macerans* enhancing α -cyclodextrin specificity [J]. **Appl Microbiol Biot**, 2009, 83(3): 483–490.
- [38] Li Z, Zhang J, Sun Q. Mutations of lysine 47 in cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus macerans* enhance β -cyclodextrin specificity[J]. **J Agr Food Chem**, 2009, 57(18): 8386–8391.
- [39] Leemhuis H, Rozeboom H, Dijkstra B. Improved thermostability of *bacillus circulans* cyclodextrin glycosyltransferase by the introduction of a salt bridge [J]. **Protein**, 2004, 54(1): 128–134.
- [40] Kelly R, Dijkhuizen L, Leemhuis H. Starch and α -glucan acting enzymes, modulating their properties by directed evolution [J]. **J Biotechnol**, 2009, 140:184–193.
- [41] van der Maarel, van der Veen, Uitdehaag J. Properties and applications of starchconverting enzymes of the α -amylase family[J]. **J Biotechnol**, 2002, 94:137–155.
- [42] Rendleman J A. Enhancement of cyclodextrin production through use of debranching enzymes[J]. **Biotechnol Appl Biochem**, 1997, 26(1):51–61.
- [43] Martin M T, Alcalde M, Plou F J. Synthesis of malto-oligosaccharides via the acceptor reaction catalyzed by cyclodextrin glycosyltransferases[J]. **Biocatal Biotransform**, 2001, 19:21–35.
- [44] Gaston J, Szerman N, Costa H. Cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* DF 9R: activity and kinetic

- studies[J]. *Enzyme Microb Technol*, 2009, 45:36-41.
- [45] Kamaruddin K, Illias RM, Aziz SA. Effects of buffer properties on cyclodextrin glucanotransferase reactions and cyclodextrin production from raw sago (*Cycas revoluta*) starch[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2005, 41:117-125.
- [46] Alves-Prado H F, Carneiro A A, Pavezzi F C. Production of cyclodextrins by CGTase from *Bacillus clausii* using different starches as substrates [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2008, 146:3-13.
- [47] Kometani T, Terada Y, Nishimura T. Transglycosylation to hesperidin by cyclodextrin glucanotransferase from an *alkalophilic Bacillus* species in alkaline pH and properties of hesperidin glycosides[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1994, 58: 1990-1994.
- [48] Pedersen S, Dijkhuizen L, Dijkstra B. A better enzyme for cyclodextrins[J]. *Chemtech*, 1995, 25: 19-25.
- [49] Chotipanang K, Bhunthumnavin W, Prousoontorn M. Synthesis of alkyl glycosides from cyclodextrin using cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus sp RB01*[J]. *J Incl Phenom Macro*, 2011, 70: 359-368.
- [50] van der Veen B, Uitdehaag J, Dijkstra B. Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity [J]. *BBA*, 2000, 1543, 336-360.
- [51] Tian Y, Xu X, Li Y. Effect of β -cyclodextrin on the long-term retrogradation of rice starch[J]. *Eur Food Res Technol*, 2009, 228, 743-748.
- [52] Tian Y, Li Y, Manthey F. Influence of β -cyclodextrin on the short-term retrogradation of rice starch [J]. *Food Chem*, 2009, 116: 54-58.

杰能科生化品发酵研发中心在无锡成立

美国杜邦集团新近收购了工业生物领域领先者杰能科公司,2012年2月17日在中国无锡宣布成立新的发酵研发中心。该研发中心的设立,表明了杜邦集团在工业生物技术领域的信心和决心。

中国发酵工业正在迅速崛起,由发酵过程生产的生化品总量已处于世界领先地位,其中氨基酸,特别是味精、赖氨酸产量已居世界第一,处于主导地位;有机酸中柠檬酸产量也居世界第一,乳酸发展也非常快;在新能源产品方面,燃料酒精的发展也非常迅速,由淀粉类原料生产酒精的技术水平也仅次于美国。

中国是一个发酵大国,大宗发酵产品在国民经济中占有较高的比重,生产企业5000多家,年产值2500亿元,相关产业超过2万亿元,而且仍然在快速增长。中国离发酵强国仍有一定的距离,需要继续提高生产水平,降低经济和环境成本。因此,国家和地方政府也大力支持“生物制造”行业,使其发展为真正的绿色产业。

在这种大环境下,作为杜邦工业事业部旗舰的杰能科公司也加大在中国的研发投入,最近两年在公司的大力支持下,在无锡投入的研发费用超过2000万元。公司不仅取得一系列知识产权和开发了许多新产品,并且在实际生产应用中也取得了卓越的成就。

新的发酵研发中心的建立旨在加强在中国的研发力量。该中心作为杜邦的工业生物科技部的一部分,不仅为公司内部的技术发展提供了一个强有力的平台,同时也通过更好地了解和模拟生化品的真实生产过程,为行业提供更好的产品及服务,最终使中国的生化品生产在质和量上均居世界领先地位。通过研发中心的产品和服务,帮助客户进一步提高生产效率,减少能源消耗、减少废物排放,走可持续发展的道路。研发中心的发酵设备齐全,发酵罐、反应器和分离设备种类多样。更重要的是,精密的分析仪器和新型的分析方法将发酵研究水平进一步提高。中心配有医药行业最先进的毛细管电泳分析仪,液相色谱-质谱连用设备,高端离子色谱分析仪及各种高压液相色谱。这些先进设备用于糖液、发酵液的精密分析、发酵过程监督跟踪以及确定发酵过程中可发酵糖的利用情况和非发酵糖的积累及如何转化成可发酵糖的过程。在原料的测试仪器中,有近红外光谱仪、元素全分析仪、蛋白质、脂肪和不同纤维素的快速分析仪等。针对酒精行业的各种粘度仪和微型反应器也为该行业新产品的开发提供了快速而切合实际的方法。

发酵研发中心由段钢博士领导,现有科学家和工程师12人。中心拥有美国、欧洲等多个授权专利,还有多项专利正在申请中;中心发表学术论文超过百篇,出版学术著作数部。中心期盼和工业界与学术界的同仁合作,一起为中国和世界生化品发酵科技水平进步而努力!

本刊编辑部应邀出席了研发中心开幕式。