

环糊精系列综述之二

环糊精制备过程的催化机制及其影响因素

金征宇, 王金鹏, 柏玉香

(食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122)

摘要: 环糊精主要是由环糊精葡萄糖基转移酶(CGT 酶, EC 2.4.1.19)作用淀粉制备而得。除受 CGT 酶的来源及种类的影响之外, 影响环糊精产率及产物特异性的因素还有很多, 诸如酶作用时间、作用温度、pH、加酶量、添加物、底物种类、底物浓度、原料预处理程度等; 此外, 这些因素还将影响环糊精的制备工艺过程。然而, 目前尚未有环糊精制备过程影响因素的系统报道。作者从环糊精糖基转移酶的催化机理分析入手, 阐述影响环糊精产率及产物特异性的影响因素, 同时结合环糊精的制备工艺, 对环糊精制备相关研究进展进行综述, 以期在环糊精制备相关领域开展研究提供参考。

关键词: 环糊精; 环糊精糖基转移酶; 催化机制; 环糊精制备; 影响因素

中图分类号: TS 201.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2013)01—0001—08

Catalytic Mechanisms and Influence Factors on Cyclodextrin Preparation

JIN Zheng-yu, WANG Jin-peng, BAI Yu xiang

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Cyclodextrins (CDs) are mainly prepared from starch by the catalyzation of cyclodextrin glucosyltransferase (CGTase). In addition to the source of CGTase, many factors influence the ratio and specificity of CDs, such as reaction time, reaction temperature, pH, enzyme quantity, additive, type of substrate, substrate concentration, pretreatment of raw material et al. The CDs preparation processes are also effected by these factors. However, no system reports focused on the influence factors for CDs preparation. In this paper, we described the catalytic mechanisms of CDs preparation, and a review on the influence factors in CDs preparation process was presented, in order to provide reference for CDs preparation.

Keywords: cyclodextrin (CD), cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase), catalytic mechanisms, cyclodextrin preparation, influence factors

环糊精的工业化生产主要是由环糊精糖基转移酶催化淀粉制备而得。自从日本率先在 20 世纪

70 年代实现环糊精工业化生产之后, 美国、德国、荷兰、匈牙利及中国相继发展了工业化生产环糊精的

收稿日期: 2012-10-27

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(31230057)。

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

技术。目前为止,欧美在产量上已与日本不相上下,世界上主要生产环糊精的厂商有匈牙利的 Cyclolab、法国的 Cerestar、德国的 Wacker Biochem 以及日本的 Ensui Sugar。据调查统计,近几年环糊精国际市场产量呈 25% 的趋势增长。如图 1 显示,环糊精世界生产量由 2007 年的 16.38 万吨已迅速增长至 2011 年的 40 万吨,并且随着环糊精在医药、食品、化妆品及其它行业的应用面的不断扩大,世界环糊精市场将会保持超高速增长,预计年增长率将高达 20%~25%。

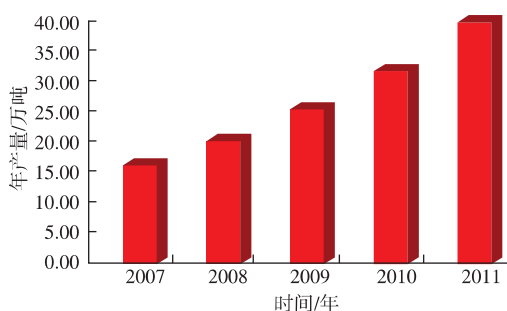


图 1 世界环糊精生产量趋势图

Fig. 1 Trendency of cyclodextrin yield in the world

然而,正如笔者在文献[1]中所提,在目前 β -CD 的工业化生产中,原料转化率都局限在 50%~60% 之间,很难有进一步的提高^[1], α -CD 及 γ -CD 的转化率则更低,长期以来取得的突破非常有限,究其原因,主要由于环糊精制备过程影响因素众多且难以掌握。研究者集中了大量的精力对环糊精糖基转移酶(CGTase)进行高效、高专一性的筛选,并在此基础上对酶本身进行专一性改造^[1],取得了很好的进展,但在实际生产过程中,除了筛选一种低水解活性的高效生产用酶,以达到高效生产环糊精的目的外,通过控制反应过程影响因素,从而增加环糊精产率的方法更有实际价值^[2-4]。

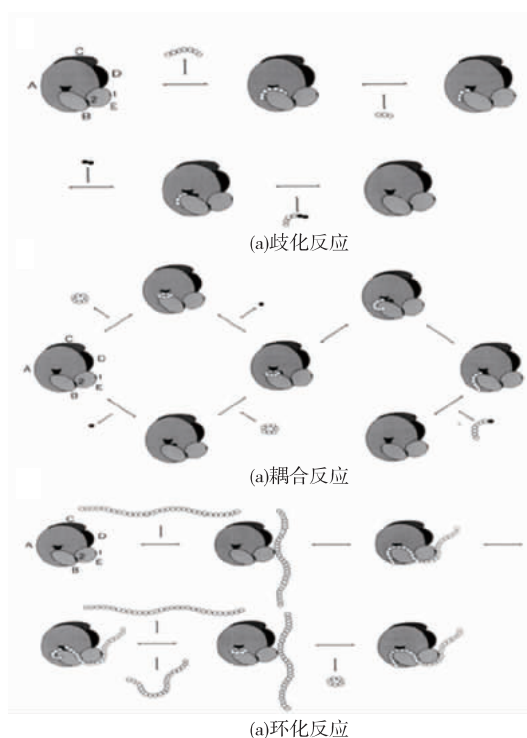
作者从 CGTase 作用淀粉的催化机理分析入手,总结了 CDs 制备过程中的影响因素,结合现有 CDs 制备工艺,对环糊精制备过程研究提出展望。

1 CGTase 的结构与催化机制

荷兰格罗宁根大学的 Dijkhuizen 小组通过对来源于 *Bacillus circulans* (strain 251) 的 CGTase 晶体结构的分析研究,以及与他人的研究结果进行对比,发现 CGTase 大致包括 A、B、C、D、E 5 个活性区域(见图 2)^[5]。其中 A 区域为 α 淀粉酶家族成员共

有的 TIM 筒状区域;B、C 区域负责酶的活性中心的架构以及酶与底物的结合;D 区域是 CGTase 特有的区域,作用机理尚不明确,有研究认为它负责辅助 E 区域的定位,间接影响整体酶活;而 E 区域则携带了多个麦芽糖基结合位点(MBS),在整个催化过程中起到结合反应底物并引导直链糊精进入 B 域活性中心的作用^[6]。

研究者以底物麦芽低聚糖中的葡萄糖基为参照,标记了酶与底物的结合亚位点,分别为+2、+1、-1、-2、-3、-4、-5、-6、-7 这 9 个亚位点。其中+2、+1 为受体亚位点,-1 为催化亚位点,-2~-7 为受体亚位点,且受体亚位点与-1~-7 之间以共价中间体的形态存在。只有当环化前伴随耦合反应时,才会产生+2~-7 或+1~-7 的 8 个或 9 个葡萄糖单元的环状糊精。由于耦合活性远低于环化活性,故来源于 *Bacillus circulans* (strain 251) 的 CGTase 的主要产物为-1~-7 构成的 β -CD^[7]。



A、B、C、D、E 分别表示 CGTase 的 5 个活性区域。E 区域的 1,2 位点为麦芽糖结合位点(MBS)。其中(▼)指示的是麦芽糊精的断裂位点。(○)表示葡萄糖单元,(●)为受体葡萄糖单元。

图 2 CGTase 的 3 种催化反应

Fig. 2 Three reaction of CGTase

然而,一些不同来源的 CGTase 可能会具有不同个数的供体、受体亚位点,以及多个活性催化位

点,会导致主要产物为其他聚合度的单一环糊精(例如,来源于 *Alkalophilic Bacillus* sp. G-825-6 的 CGTase 主要产物为 γ -CD; 以及来源于 *Thermococcus* sp. B1001 的 CGTase 主要产物为 α -CD)或多个聚合度的环糊精(例如,来源于 *Bacillus circulans* DF 9R 的 CGTase 主要产物为 α - β -CD; 以及来源于 *Bacillus firmus* 290-3 的 CGTase 主要产物为 β - γ -CD)^[8-9]。

除常规的水解活性外,CGTase 还具备了 3 种重要的催化活性:歧化、耦合和环化。其中,歧化现象只发生在 CGTase 催化的双底物反应中。根据酶与底物的结合模型分析,供体线性糊精与受体麦芽糖间的结合位点存在一定程度的重合。因此,在受体麦芽糖与亚位点+1、+2 结合之前,供体中占据该亚位点的部分会在活性位点处开链以保证歧化反应的进行(图 2A)^[5]。耦合反应本质上是环化反应的逆反应,它遵循乒乓机制中的三元复合原则。通过来源于 *Bacillus circulans* (strain 251) 的 CGTase 与 γ -CD 的复合物晶体以及来源于 *Bacillus circulans* (strain 8) 的 CGTase 与 β -CD 的复合物晶体的 X-衍射实验,证明了环糊精与亚位点+2 结合的氢键作用力小于相同条件下直链底物与该位点的氢键作用力,而且,环糊精结合至亚位点+2 处时会挤占亚位点+1 的空间,使得单糖受体无法结合到催化位点+1,只能通过三元复合的方式与 CGTase 以及环糊精相结合,等待环糊精解链完成后耦合至 n 个葡萄糖单元的直链糊精末端形成新的 $n+1$ 个葡萄糖单元的直链糊精(图 2B)^[10-11]。作为 CGTase 诸多功能中最为重要的部分,环化反应必须由 B、E 两个区域协同完成。如图 2C 所示,E 区域有两个麦芽糖结合位点(MBS1, 2),当直链淀粉进入酶体系时,它首先与 MBS1 位点结合,后期通过延伸的方式到达 MBS2 位点,再经由 MBS2 将其引导至 B 域的活性中心进行环化^[12]。根据三元复合机制理论,由于反应体系中活性位点附近其他的环状或直链麦芽低聚糖会与待环化底物发生耦合,所以由 MBS2 位点输送的直链淀粉底物不需要为环糊精成环预留出足够的单元数。随着反应的进行,环糊精产物脱离酶的活性中心区域,底物淀粉链后续延伸至活性位点参与重复反应,再者,未参与反应的直链淀粉底物可以随机取代与 MBS1 位点结合的已反应淀粉链,维持环糊精产物的不断生成^[5]。

2 环糊精制备过程中的影响因素

环糊精工业生产流程大致可分为原料预处理、环糊精合成以及混合产物的分离纯化 3 个步骤,影响这 3 个步骤中任一环节的影响因素都将影响环糊精产物的特异性及环糊精得率。流程简图见图 3。

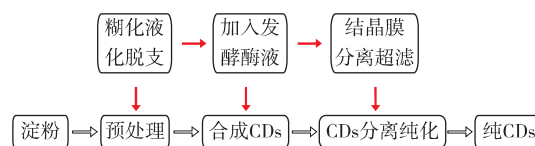


图3 环糊精生产流程简图

Fig. 3 Flow diagram of CD

2.1 反应底物

在相同的反应条件下,不同来源底物制备环糊精的得率及产物特异性不尽相同。Prado 等人报道指出,来自 *B.clausii* E16 的 CGTase 作用麦芽糊精的主要产物是 α -CD、 β -CD、 γ -CD 3 种环糊精的混合物,而作用可溶性淀粉时的主要产物为 β -CD 和 γ -CD^[13]。由于淀粉主要由直链淀粉和支链淀粉组成,两者均可作为反应底物,但是,由于直链淀粉更容易和脂质形成不易被酶作用的复合物,且支链淀粉与直链淀粉相比具有更多的还原性末端且具有缓慢回生的特性,以支链淀粉为底物时环糊精的得率高于以直链淀粉为底物时的得率^[14]。玉米淀粉和小麦淀粉中的脂质含量及小分子糖含量较高,不是理想的反应底物;蜡质玉米淀粉中支链淀粉含量高达 100%,是比较理想的反应底物,但价格较贵,亦不常使用;木薯淀粉和马铃薯淀粉常作为工业用反应底物^[15]。但在研究过程中,该结论尚存在争议。例如曹新志等探索研究了来自 *B.alcalophilus* 的 CGTase 作用玉米淀粉、木薯淀粉、马铃薯淀粉、蕉藕淀粉和甘薯淀粉等对 γ -CD 的影响,发现以蕉藕淀粉和木薯淀粉为底物时, γ -CD 的产量最高^[16];另有报道表明,来自 *B.alcalophilus* NK231 的 CGTase 作用玉米淀粉的转化率高于马铃薯淀粉和甘薯淀粉^[17]。Goh 等人在报道中指出,底物类型-缓冲溶液组合对于环糊精的生产具有重要作用,他们采用经基因突变的 CGTase 分别作用不同缓冲溶液体系的木薯淀粉、马铃薯淀粉、可溶性淀粉、玉米淀粉、直链淀粉、糖原等,最终发现在醋酸缓冲体系中的木薯淀粉转化环糊精的转化率最高,且产生 γ -CD 的比率最高^[18]。

底物质量分数对环糊精的生成也有较大影响。

通常,在低底物质量分数下,环糊精的转化率随着底物质量分数的增加呈现上升趋势,然而由于淀粉本身具有低溶解度、高粘度等特性,当底物质量分数超过 10% 时,容易造成反应过程中搅拌困难、反应不均匀等导致环糊精转化率下降,因此,对淀粉底物进行预处理也将影响最终环糊精的得率。最初,研究者采用淀粉酶对淀粉进行部分降解,以增加其底物质量分数,减小底物粘度。CGTase 发生环化反应的最小作用底物是聚合度为 8 的低聚麦芽糖,仅以低相对分子质量的麦芽低聚糖为底物时环糊精的得率很小,例如,以来自 *B.megaterium* 的 CGTase 催化葡萄糖和麦芽糖底物时,仅能产生质量分数 0.8%~2.0% 的环糊精。Pishtiyski 报道了 DE 值小于 10 时环糊精的得率,见表 1。由表 1 可以看出,随着 DE 值的升高,环糊精的得率明显下降^[14]。

表 1 淀粉预处理对环糊精得率的影响^[14]Table 1 Effect of starch treatment with α -amylase on CD production

水解 时 间/h	DE 值/%	CD 质量浓度/(mg/mL)						CD 得率/%	
		α -CD		β -CD		γ -CD			
		反应时间/h							
		20	44	20	44	20	44	20	44
玉米淀粉									
0	0.10	7.13	6.89	16.72	15.00	1.16	0.97	50.02	45.72
0.5	1.94	6.42	6.36	15.22	14.97	1.09	0.87	45.72	44.40
1.0	3.54	6.90	6.54	15.20	14.78	1.05	0.90	46.30	44.44
2.0	6.50	6.50	6.40	11.72	10.35	0.87	0.71	38.18	34.92
3.0	7.87	6.42	5.40	11.00	9.90	0.86	0.72	36.56	32.04
4.0	8.69	6.70	4.00	10.50	9.40	0.62	0.56	31.64	27.92
6.0	9.44	4.51	3.55	10.03	8.98	0.58	0.48	30.24	26.02
马铃薯淀粉									
0	0.12	7.37	6.24	16.25	15.11	1.27	1.10	49.78	44.90
0.5	1.90	7.97	6.41	15.17	14.90	1.09	0.91	48.46	44.44
1.0	3.78	7.79	5.42	15.30	14.82	1.08	0.76	48.34	42.00
2.0	6.70	7.50	6.63	11.48	10.40	0.90	0.86	39.76	35.78
3.0	8.13	6.48	4.57	11.12	9.85	0.76	0.71	36.76	30.26
4.0	9.02	5.50	3.62	10.44	9.37	0.60	0.58	33.08	27.14
6.0	10.84	5.22	2.95	9.77	8.60	0.54	0.59	31.06	24.28

环糊精得率除了受底物的浓度影响及小分子糖的影响外,还受淀粉底物分子中直链淀粉及支链淀粉比例的影响。曹新志等采用普鲁兰酶处理淀粉

底物后,发现 γ -CD 的产量增加了 5.3%, β -CD 的产量增加了 10.5%,但进一步增加普鲁兰酶的使用量时, β -CD 及 γ -CD 的产量均有所下降。Goh 的报道也支撑这一结论^[18],然而,Pishtiyski and Zhekova^[14],Szejtli^[19]和 Saha and Zeikus^[20]等将普鲁兰酶与 CGTase 同时作用淀粉时,并未发现对 γ -CD 的产量有增加效果。这些争议的报道结论表明普鲁兰酶用于提高环糊精产量时,普鲁兰酶的用量是关键。

为实现对淀粉进行预处理,降低淀粉粘度的同时不减少环糊精的得率,研究者又发现,直接采用 CGTase 在高温状态下对淀粉进行预处理,随后降低温度使其进行催化反应,可以降低淀粉底物的粘度,增加环糊精的得率^[20-21],该方法目前在工业中得到广泛应用。此外,采用挤压、研磨、超声等物理手段对淀粉进行预处理,亦可增加环糊精的得率^[22-24],但工业化应用程度不高。淀粉底物的预处理过程中,糊化是关键。Kim 等人筛选到了耐高温的 CGTase (来自 *Thermoanaerobacter* sp.),分别以未经任何预处理的玉米淀粉及适度热处理的玉米淀粉为底物,控制反应温度为 65 °C,使淀粉在反应过程中边糊化边参与反应,简化了环糊精的制备过程^[25-26]。然而,对于常规的 CGTase 来说,淀粉原料的糊化程度直接影响环糊精的得率。

2.2 反应条件

由于不同菌株产生的 CGTase 的酶学性质不同,其最适 pH、最适温度、pH 稳定范围、温度稳定范围等各有差异,且反应时间也会影响环糊精的转化率和产量^[27],工业生产过程中,对于固定来源的菌株,通常固定反应条件,反应时间也控制在 30 h 以内。然而在反应过程中的温度波动,对环糊精的产量也将产生极大地影响。通常 CGTase 的反应温度在 55~70 °C 之间,耐热酶类的反应温度可以高达 85 °C (见表 2)^[28-30]。

2.3 有机溶剂

环糊精制备过程中,由于水解、耦合、歧化等作用的存在,能够形成系列小分子低聚糖,这些糖的存在,对环糊精的得率产生了极大的影响。前人研究中多采用添加环己烷、甲苯、乙醇、丙醇、丙酮等有机溶剂复合剂的办法来提高环糊精的得率。但是添加极性有机溶剂与添加非极性有机溶剂对环糊精得率提高的机理不尽相同。Blackwood 等人报道添加极性有机溶剂,不仅可以增加环糊精的得率,

而且可以增加 CGTase 的选择性^[31](表 3),王亮等人的报道与此相符,但尚未有对该现象进行明晰解释的机理^[32,33]。具推测,反应体系中生成的环糊精易和 CGTase 中 E 区的第二个麦芽糖键合区域 MBS2 (Tyr633) 发生键合,而 MBS2 专门负责将淀粉分子链送往 CGTase 中 A 区的催化活性位点,环糊精的键合作用将阻止反应的进一步进行。加入有机溶剂,一方面可以使有机溶剂与环糊精形成包合物,从而改变环糊精的构象,从而脱离 MBS2 的键合位点;另一方面,可能改变酶分子表面及活性中心水分质量分数、淀粉分子表面水分质量分数等,从而改变反应平衡;也有推断认为,有机溶剂作为催化剂可以直接参与到催化反应过程。在工业上,可以通过选择有机溶剂的类型,来提高环糊精产品的选择性。

表 2 不同来源 CGTase 的最适反应条件下产物比例

Table 2 Ratio variation of serious CD under optimum reaction condition of different CGTase resource

菌株	最适 pH 值	最适温度/℃	CDs
<i>B. macerans</i> BIO-2m	6.5	50	$\beta > \alpha > \gamma$
<i>B. circulans</i> BIO-3m	5.5-5.8	60	$\beta > \alpha > \gamma$
<i>B. coagulans</i> -13m	6.0-6.5	70	$\beta > \alpha > \gamma$
<i>B. licheniformis</i> BIO-9m	5.0-6.0	60	$\beta > \alpha > \gamma$
<i>B. stearothermophilus</i> B-4006	8.5	60	$\alpha > \beta > \gamma$
<i>B. circulans</i> B-4018	5.5-7.0	75	$\beta > \alpha > \gamma$
<i>B. licheniformis</i> B-4025	5.0-6.5	65	$\beta > \alpha > \gamma$
<i>B. alcalophilus</i> B-3103	8.5	85	$\beta \gg \gamma$
<i>B. alcalophilus</i> BA-4229	8.0-9.0	60	$\beta \gg \gamma$
<i>B. halophilus</i> BIO-12H	6.5-7.0	50	$\beta \gg \gamma$
<i>B. halophilus</i> BIO-13H	6.0-7.0	55	$\beta \gg \gamma$
<i>Th. vulgaris</i> Tac-3554	6.0-7.0	80	$\alpha > \beta > \gamma$
<i>B. macerans</i>	5.2-5.7	55	$\alpha > \beta = \gamma$
<i>B. megaterium</i>	5.2-6.2	55	$\beta > \alpha = \gamma$
<i>B. ohbensis</i>	5.5	50	β
<i>B. sp</i> HA 3-2-2	6.5-8.5	60	β
<i>B. sp</i> BE 101	6.0-6.5	45	β
<i>B. sp</i> AL-6	8.0	60	β
<i>B. circulans</i>	5.5	60	$\beta > \alpha > \gamma$
<i>B. amyloliquefaciens</i>	6.0	70	α
<i>B. lentus</i>	6.5-7.5	55	β
<i>B. firmus</i>	7.5-8.5	65	$\beta > \gamma > \alpha$
<i>Brevibacterium</i> sp 9065	10.0	45	$\beta > \gamma$
<i>Alkalophilic Bacillus</i> sp	4.5-4.7	45	β
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6.9	40	$\beta > \alpha > \gamma$

表 3 有机溶剂添加对环糊精产率及比率的影响

Table 3 Effect of organic solvent on the CD ratio variation

有机溶剂	转化率/%	产率/%			菌株来源
		α	β	γ	
无添加	40±2	30	50	20	<i>Thermoanaerobacter</i>
二甲亚砜	50±3	24	66	10	
N,N-二甲基甲酰胺	47±3	32	57	10	
乙腈	54±2	58	32	10	
乙醇	66±4	51	39	10	
四氢呋喃	57±3	48	43	9	
1-丁醇	57±3	21	69	10	
无添加	40±3	15	65	20	
二甲亚砜	45±4	11	77	12	<i>B. Circulans</i>
N,N-二甲基甲酰胺	51±3	9	77	14	
乙腈	45±3	7	76	16	
乙醇					
四氢呋喃	42±4	10	76	14	
1-丁醇	44±4	9	82	9	

工业上,制备 α -CD 常用的复合剂是正癸醇,制备 β -CD 常用的复合剂是环己烷,制备 γ -CD 常用的复合剂是十二元环以上的有机溶剂,如环十四碳-7-烯-1-酮和环十六碳-8-烯-1-酮等。

3 环糊精制备工艺改进

传统的环糊精制备工艺多采用有机溶剂法制备,大致的操作工艺为将淀粉经初步液化后加入反应酶液,同时加入有机溶剂进行反应,反应结束后,高温蒸馏去除有机溶剂,低温结晶制备得到环糊精,再经进一步纯化精制得到纯的环糊精。但在实际生产中,有机溶剂往往具有毒性,不仅对环境造成污染,而且容易引起安全隐患,并且限制了所制备得到环糊精的应用范围。替代有机溶剂的膜分离、超滤、反渗透、色谱分离等方法显示出了巨大的优势。目前关于膜分离及超滤装置的使用,主要有两种方法,一种是将膜分离/超滤装置用于环糊精的制备过程中,使得膜分离起到及时分离去除反应过程中的环糊精及小分子物质,持续反应平衡向生成环糊精的方向进行,同时起到固定化 CGTase 的作用,从而达到 CGTase 循环使用,并且能够帮助实现

连续化生产。Sakinah 等人将膜的分离和酶的反应过程结合起来,制成酶膜反应器(EMR),用于环糊精制备过程,未转化的淀粉及酶液可以被膜截留,而经反应转化的环糊精可以渗透通过薄膜,由此可实现环糊精连续化生产^[34-35]。他们设计的制备环糊精流程图见图 4。

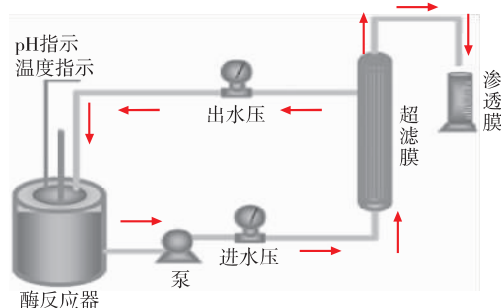


图 4 环糊精制备酶膜反应器示意图

Fig. 4 SEM diagram for CDs preparation

另一种方法是将膜分离/超滤装置与反渗透装置结合起来,用于后期环糊精的收集及分离。

Slominska 等人设计的超滤连续化制备环糊精的过程图见图 5^[36]。

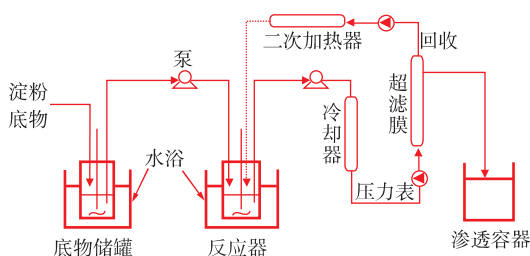


图 5 超滤反应器示意图

Fig. 5 Schematic diagram of UF reactor system

膜分离在工业化应用过程中,膜分离效率受到溶液中成分的严重影响。例如淀粉底物的预处理程度、反应温度等影响体系粘度的反应条件,需要严格控制,否则反应体系中高粘度不溶物的堆积容易堵塞膜的滤孔,造成越来越高的跨膜压力,使得环糊精的产率下降。

4 环糊精的分离纯化

环糊精制备过程中,利用 β -CD 溶解度小的特性,采用高温溶解、低温结晶的手段,可以使得 β -CD 得到纯化,纯度达到 99%以上。然而,对于有机溶剂法制备得到的 β -CD 来说,环糊精的疏水空腔

对有机溶剂具有很强的吸附力,尽管制备过程采用了有机溶剂脱除的处理技术,但由于环糊精空腔的疏水作用,使得最终有机溶剂存在部分残留,导致环糊精的空腔无法完全释放,最终将降低环糊精的溶解特性及包埋特性。关于此方面的研究报道较少,但涉及工业生产过程中环糊精品质,是目前造成国内外环糊精品质差异的主要原因之一。在此方面加强研究,对于国内环糊精的生产将具有非常重要的指导意义。

对于相对高水溶性的 α -CD 及 γ -CD 来说,工业化过程中常采用膜分离/过滤及柱色谱的方法^[14]。工业色谱技术的发展促进了附加值更高的 α -CD 及 γ -CD 的生产。日本环糊精工业生产中,将硬脂酸键合到壳聚糖上制成的亲和柱色谱,用于特异性分离 α -CD^[37]。离子交换色谱也常用于工业化 α -CD 及 γ -CD 的分离制备^[38-40]。工业生产中,为得到纯度较高的单一环糊精,通常将膜分离技术和色谱技术联合使用,具有很好的分离效果,但同时也增加了成本,目前 γ -CD 的价格是 β -CD 价格的 100 倍左右,极大地限制了其在工业中大批量的使用。因此,探索快速、高效、便捷的环糊精分离技术,将是环糊精工业一直努力的方向。

如上所述,环糊精制备过程中,分离纯化技术在一定程度上增加了环糊精的生产成本,然而在环糊精的某些应用领域中(如食品),由于客体分子的复杂性导致单一环糊精主体存在局限性,不同比例环糊精混合物从而显出绝对优势。目前国内尚无此类产品生产,而日本已经有大量的环糊精混合物用于食品、药品及化妆品等方面。

5 展望

环糊精的制备过程,是一个复杂的生物转化过程,转化过程中涉及到的底物、酶、环境、反应条件、工艺流程等因素的变化,都将最终影响到环糊精的得率及产物专一性。从酶作用淀粉底物的作用机理入手,分析导致产物产率及专一性变化的内在原因,着眼影响反应条件的因素进行研究,进而调整工艺路线及工艺步骤,不仅能够更加深入地探索 CGTase 作用淀粉产生环糊精的作用模式,掌握其作用规律,而且将为环糊精工业的蓬勃发展提供强有力的参考。

参考文献:

- [1] 金征宇,柏玉香,王金鹏. 环糊精葡萄糖基转移酶的筛选及其定向改造[J]. 食品与生物技术学报,2012,31(2):113-123.
JIN Zheng-yu,BAI Yu-xiang,WANG Jin-peng. Screen and modification of cyclodextrin glycosyltransferase[J]. **Journal of Food Science and Technology**,2012,31(2):113-123.(in Chinese)
- [2] 金征宇,徐学明,陈寒青,等. 环糊精化学——制备与应用[M]. 北京:化学工业出版社,2008.
- [3] French D,Levine M L,Norberg E,et al. Studies on the Schardinger dextrans. VII. Co-substrate specificity in the coupling reaction of Maltotetraose amylase[J]. **J Am Chem Soc**,1954,76:2387-2390.
- [4] Qi Q,Zimmermann W. Cyclodextrin glucanotransferase:from gene to application[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**,2005,66:475-485.
- [5] van der Veen B,van Alebeek G,Uitdehaag J,et al. The three transglycosylation reactions catalyzed by cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* (strain 251) proceed via different kinetic mechanisms[J]. **Eur J Biochem**,2000,267:658-665.
- [6] 赵新帅,王占坤,祁庆生. 环糊精葡萄糖基转移酶产物专一性改造:难题与挑战[J]. 生物工程学报,2007,23(2):181-188.
ZHAO Xin-shuai,WANG Zhan-kun,QI Qing-sheng. The product specificity evolution of cyclodextrin glucanotransferase: problems and challenges[J]. **Chinese Journal of Biotechnology**,2007,23(2):181-188.(in Chinese)
- [7] Strokopytov B,Knegtel R M,Penninga D,et al. Structure of cyclodextrin glycosyltransferase complexed with a maltotetraose inhibitor at 2.6 angstrom resolution. Implications for product specificity[J]. **Biochem**,1996,35:4241-4249.
- [8] Marechal L,Rosso A,Marechal M,et al. Some properties of a cyclomaltodextrin-glucanotransferase from *Bacillus circulans* DF 9R type[J]. **Cell Mol Biol**,1996,42:659-664.
- [9] Englbrecht A,Harrer G,Lebert M. Biochemical and genetic characterization of a CGTase from an *alkalophilic bacterium* forming primarily γ -cyclodextrin. In:Szejtli HO(ed) Proceedings of the fourth international symposium on cyclodextrins[M]. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers,1988.
- [10] Uitdehaag J,Kalk K,van der Veen B,et al. The cyclization mechanism of cyclodextrin glycosyltransferase as revealed by a γ -cyclodextrin-CGTase complex at 1.8 Å resolution[J]. **J Biol Chem**,1999,274:34868-34876.
- [11] Schmidt A,Cottaz S,Driguez H,Schulz G,Structure of cyclodextrin glycosyltransferase complexed with a derivative of its main product β -cyclodextrin[J]. **Biochem**,1998,37:5909-5915.
- [12] Penninga D,van der Veen B,Knegtel R,et al. The raw starch binding domain of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251[J]. **J Biol Chem**,1996,271:32777-32784.
- [13] Alves-Prado H F,Carneiro A A,Pavezzi F C,et al. Production of cyclodextrins by CGTase from *Bacillus clausii* using different starches as substrates[J]. **Appl Biochem Biotechnol**,2008,146:3-13.
- [14] Pishtiyski I,Zhekova B. Effect of different substrates and their preliminary treatment on cyclodextrin;Enzymatic production of cyclodextrins[J]. **World J Microbiol Biotechnol**,2006,22:109-114.
- [15] Biver A,Antranikian G,Heinze E. Enzymatic production of cyclodextrins[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**,2002,59:609-617.
- [16] 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)
- [17] 张新平,张蓓,李翠玲. 环状糊精葡萄糖基转移酶的性质及环糊精的转化条件[J]. 南开大学学报:自然科学版,1994(4):63-67.
ZHANG Xin-ping,ZHANG Bei,LI Cui-ling. Properties of cyclomaltodextrin Glucanotransferase and production of cyclodextrin [J]. **Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis**,1994(4):63-67.(in Chinese)
- [18] Goh KM,Mahadi N M,Hassan O. The effects of reaction conditions on the production of γ -cyclodextrin from tapioca starch by using a novel recombinant engineered CGTase[J]. **J Mol Catal B:Enzymatic**,2007,49:118-126.
- [19] Szejtli J. Utilization of cyclodextrins in industrial products and processes[J]. **J Mater Chem**,1997,7(4):575-587.
- [20] Saha B C,Zeikus J G. Novel highly thermostable pullulanase from thermophiles[J]. **Tibtech**,1989,7:234-239.
- [21] Masanobu K,Masamitsu M,Nobuyuki N,et al. Process for producing cyclodextrins [P]. 日本专利:Japanese patent:52-25043A,1977.

- [22] Hitoshi H, Kozo H, Nobuhiron K, et al. Process for producing cyclodextrins[P]. 日本专利: Japanese patent: 60-188088A, 1985.
- [23] Yoshinao I, Nobuhiro H, Kazumasa S. Process for producing cyclodextrins[P]. 日本专利: Japanese patent: 1-168295A, 1989.
- [24] Lee Y D, Kim H S. Enzymatic production of cyclodextrins from unliquefied corn starch in an attrition bioreactor [J]. **Biorechnol Bioeng**, 1991, 37: 795.
- [25] Kim T J, Kim B C, Lee H S. Production of cyclodextrin using raw corn starch without a pretreatment [J]. **Enzyme Microb Technol**, 1997, 20: 506-509.
- [26] Kim T J, Kim B C, Lee H S. Production of cyclodextrins using moderately heat-treated cornstarch[J]. **Enzyme Microb Technol**, 1995, 17: 1057-1061.
- [27] 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.
- [28] Yim D G, Sato H H, Park Y H. Production of cyclodextrin from starch by cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus firmus* and characterization of purified enzyme[J]. **J Indust Microbiol Biotechnol**, 1997, 18: 402-405.
- [29] Abelyan V A, Balayan A M, Manukyan L S. Characteristics of cyclodextrin production using cyclodextrin glucanotransferases from various groups of microorganisms[J]. **Appli Biochem and Microbiol**, 2002, 38(6): 527-535.
- [30] Zhekova B Y, Pishtiyski I G, Stanchev V S. Investigation on cyclodextrin production with cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus megaterium*[J]. **Food Technol. Biotechnol**, 2008, 46(3): 328-334.
- [31] Blackwood A D, Bucke C. Addition of polar organic solvents can improve the product selectivity of cyclodextrin glycosyltransferase Solvent effects on CGTase[J]. **Enzyme Microbial Technolo**, 2000, 27: 704-708.
- [32] 王亮, 顾正彪, 程力. 乙醇对环糊精葡萄糖基转移酶催化作用影响的研究[J]. 高等学校化学学报, 2010(6): 1190-1194.
WANG Liang, GU Zheng-biao, CHENG Li. Studies on the effect of ethanol on the catalysis of CGTase [J]. **Chemical Journal of Chinese Universities**, 2010(6): 1190-1194. (in Chinese)
- [33] Lee Y D, Kim H S. Enhancement of enzymatic production of cyclodextrins by organic solvents [J]. **Enzyme Microb Technol**, 1991, 13(6): 499-503.
- [34] Sakinah M M, Ismail A F, Hassan O. Influence of starch pretreatment on yield of cyclodextrins and performance of ultrafiltration membranes[J]. **Desalination**, 2009, 239: 317-333.
- [35] Sakinah M M, Ismail A F, Illias R M, et al. Cyclodextrin production in hollow fiber membrane reactor system: Effect of substrate preparation[J]. **Sep Purif Technol**, 2008, 63: 163-171.
- [36] Slominska L, Szostek A, Grzeskowiak A. Studies on enzymatic continuous production of cyclodextrins in an ultrafiltration membrane bioreactor[J]. **Carbohydr Polym**, 2002, 50: 423-428.
- [37] Liese A, Seelbach K, Wandrey C. Industrial Biotransformations[M]. **Weinheim: VCH**, 2000.
- [38] Horikoshi K, Yamamoto M, Nakamura N, et al. Process for recovering cyclodextrins[P]. US Patent 4303787, 1981.
- [39] Okabe M, Tsuchiyama Y, Okamoto R. Development of a cyclodextrin production process using specific adsorbents[J]. **Bioprocess Technol**, 1993, 16: 109.
- [40] Sato M, Watanabe M, Nagano H. Selective degradation of β -cyclodextrin and γ -cyclodextrin by co-digestion using a CGTase from *Bacillus ohbensis* and α -glucosidase for efficient α -cyclodextrin recovery[J]. **Biotechnol Lett**, 1994, 16: 703-708.