

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2018 年 11 月 22 日 (22.11.2018)



(10) 国际公布号
WO 2018/210232 A1

(51) 国际专利分类号:
C12P 19/20 (2006.01) **C12P 19/04** (2006.01)
C12P 19/18 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/086869

(22) 国际申请日: 2018 年 5 月 15 日 (15.05.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201710343350.1 2017年5月16日 (16.05.2017) CN

(71) 申请人: 江南大学(JIANGNAN UNIVERSITY) [CN/
CN]; 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号
耿晓岳, Jiangsu 214122 (CN)。

(72) 发明人: 柏玉香(BAI, Yuxiang); 中国江苏省无锡
市蠡湖大道1800号耿晓岳, Jiangsu 214122 (CN)。
金征宇(JIN, Zhengyu); 中国江苏省无锡市蠡湖大
道1800号耿晓岳, Jiangsu 214122 (CN)。夏柳溪

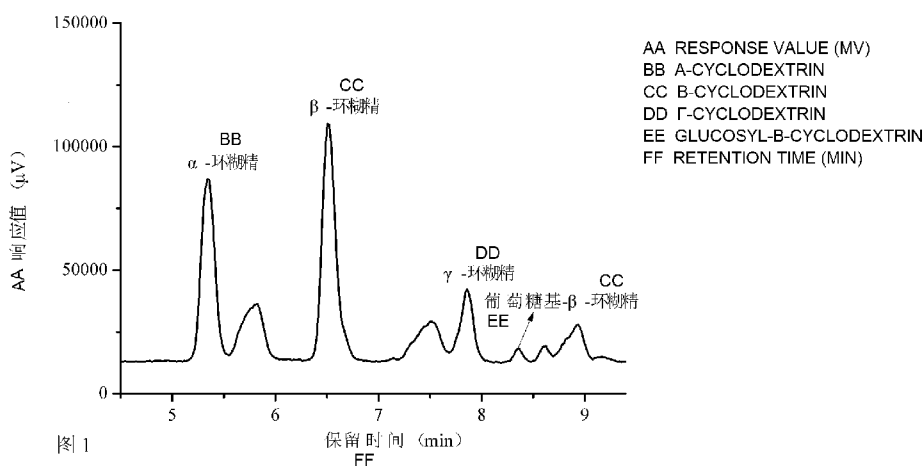
(XIA, Liuxi); 中国江苏省无锡市蠡湖大道1800号
耿晓岳, Jiangsu 214122 (CN)。吴云(WU, Yun);
中国江苏省无锡市蠡湖大道1800号耿晓岳, Jiangsu
214122 (CN)。徐学明(XU, Xueming); 中国江苏
省无锡市蠡湖大道1800号耿晓岳, Jiangsu 214122
(CN)。谢正军(XIE, Zhengjun); 中国江苏省无锡
市蠡湖大道1800号耿晓岳, Jiangsu 214122 (CN)。
王金鹏(WANG, Jinpeng); 中国江苏省无锡市蠡
湖大道1800号耿晓岳, Jiangsu 214122 (CN)。周
星(ZHOU, Xing); 中国江苏省无锡市蠡湖大道
1800号耿晓岳, Jiangsu 214122 (CN)。

(74) 代理人: 哈尔滨市阳光惠远知识产权代
理有限公司(HARBIN SHINEIP INTELLECTUAL
PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国黑龙江省
哈尔滨市松北区科技一街99号18栋E501耿
晓岳, Heilongjiang 150028 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家
保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,

(54) Title: METHOD FOR PREPARING BRANCHED CYCLODEXTRIN AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种制备分支环糊精的方法及其应用



(57) Abstract: Disclosed are a method for preparing a branched cyclodextrin and the use thereof. The method comprises the following steps: (1) maltodextrin is dissolved in a phosphate buffer solution, and a CGTase enzyme is added and reacted; (2) a physical method is used to decrease the activity of the enzyme; and (3) a saccharifying enzyme is added to the reaction system of step (2) and reacted, a high-temperature enzyme deactivation is performed, and the branched cyclodextrin is obtained. Also disclosed is the use of the method in the fields of foods, the preparation of drugs, chemical industry and cosmetics.

(57) 摘要: 一种制备分支环糊精的方法及其应用。方法包括如下步骤: (1) 将麦芽糊精溶于磷酸盐缓冲液中, 加入CGTase酶进行反应; (2) 采用物理方法降低酶活; (3) 将步骤(2)的反应体系加入糖化酶进行反应, 高温灭酶, 制得分支环糊精。上述方法在食品、制备药物、化工、化妆品领域的应用。

BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。

一种制备分支环糊精的方法及其应用

技术领域

本发明涉及一种制备分支环糊精的方法及其应用，属于分支环糊精的合成技术领域。

背景技术

环糊精也称作环麦芽寡糖，是由若干 α -D 吡喃葡萄糖单元通过 α -1,4 糖苷键链接而成的一类低聚糖的总称。环糊精因其水溶性较差、具有较高的溶血性和肾毒性导致其应用收到严重的限制，因此对环糊精的改性十分必要。

环糊精的改性方法有化学法或生物酶的方法来修饰环糊精，将某些特定的取代基接枝到环糊精上，这种在保留环糊精空腔结构基本不变的情况下引入取代基团而得到的改性产物，通常称之为修饰环糊精，或改性环糊精，或环糊精衍生物。当取代基为糖基时，通常将其称之为分支环糊精，如葡萄糖基环糊精、麦芽糖基环糊精、半乳糖基环糊精和甘露糖环糊精等。

相比于环糊精，分支环糊精具有更好的水溶性、更低的肾毒性及溶血性而被广泛应用于食品、医药、化工和化妆品领域。

目前分支环糊精的制备方法主要有以下两种：一种为利用 CGTase 作用于淀粉或淀粉衍生物，制备得到分支环糊精，此方法制备得到的分支环糊精的产量低且纯度也较低；

另一种方法为以高浓度的环糊精（ α -环糊精、 β -环糊精和 γ -环糊精）和麦芽糖/麦芽三糖为底物在普鲁兰酶的作用下制备得到分支环糊精，所得到的混合物中环糊精的剩余量较大，一般采用结晶的方法初步去除环糊精，然后利用柱分离的方法分离得到纯度较高的分支环糊精，此方法制备得到的含有分支环糊精的混合物中仍含有大量的环糊精，且环糊精与分支环糊精的分子量接近很难将分支环糊精分离。

发明内容

针对现有技术存在的上述问题，本发明申请人提供了一种酶法制备分支环糊精的方法。本发明方法首先利用环糊精葡萄糖基转移酶（Cyclodextrin Glycosyltransferase，简称 CGTase）的环化活力从麦芽糊精制备得到含有分支环糊精、环糊精和长分支环糊精的混合物（或者是直接使用通过普鲁兰酶逆向合成方法制备得到的含分支环糊精的混合物，或者是，通过 α -半乳糖苷酶作用于环糊精和蜜饯二糖得到的混合物），然后控制 CGTase 的活力、利用 CGTase 的偶合作用，使 0.1-0.4U/g 混合物干重的 CGTase 和糖化酶共同作用于上述混合物，最终得到目的产物中仅存在分支环糊精和葡萄糖，因分支环糊精与葡萄糖的分子量相差较大利于后续的分离纯化。

此外，本发明方法可延伸应用至普鲁兰酶制备分支环糊精方法的分离步骤。

本发明的第一个目的是提供一种制备分支环糊精的方法，所述方法包括：利用 CGTase 酶和糖化酶处理含有分支环糊精的混合物，反应的时间为 1-24h；其中，控制初始反应体系中 CGTase 的用量为 0.1-0.4U/g 混合物干重。

可选地，所述的混合物为原料麦芽糊精经 CGTase 处理得到的混合物；或者是，通过普鲁兰酶逆向合成方法制备得到的含分支环糊精的混合物；或者是，通过 α -半乳糖苷酶作用于环糊精和蜜饯二糖得到的混合物。

在一些实施方式中，所述含分支环糊精的混合物具体是：原料麦芽糊精溶于缓冲液中，加入 CGTase 反应 12-24h。

在一些实施方式中，所述缓冲液的 pH 在 3.5-8.0，可选的为磷酸盐缓冲液。

在一些实施方式中，所述原料麦芽糊精溶于缓冲液中后，麦芽糊精的质量浓度为 1%-5%。

在一些实施方式中，所述 CGTase 的用量为 0.3U/g 混合物干重。

在一些实施方式中，所述方法，具体包括：

(1) 将麦芽糊精溶于磷酸盐缓冲液中，加入 CGTase 酶反应 12-24h，得到含有分支环糊精的混合物；

(2) 采用物理的方法降低 CGTase 酶活；

(3) 向步骤(2)的反应体系中加入糖化酶反应 12-24h，高温灭酶，可制得分支环糊精。

在一些实施方式中，步骤(2)中所述物理方法为 70-100℃水浴加热。

在一些实施方式中，所述方法，还包括在糖化酶处理反应结束后对反应产物进行分离纯化。

在一些实施方式中，所述分离纯化，是采用液相色谱进行。

在一些实施方式中，所述 CGTase 可以是 α -CGTase、 β -CGTase、 γ -CGTase 中的任意一种或者多种。利用 α -CGTase、 β -CGTase、 γ -CGTase 进行反应后，对应的分支环糊精目标产物分别包括葡萄糖基- α -环糊精、葡萄糖基- β -环糊精、葡萄糖基- γ -环糊精。

在另一些实施方式中，所述含有分支环糊精的混合物为通过普鲁兰酶逆向合成方法制备得到的含分支环糊精的混合物。

在一些实施方式中，通过普鲁兰酶逆向合成方法制备得到的含高浓度的环糊精、麦芽糖/麦芽三糖及少量的分支环糊精的混合物，其具体方法是：以高浓度的环糊精和麦芽糖/麦芽三糖为底物，在普鲁兰酶的作用下制备得到含有环糊精、麦芽糖/麦芽三糖和麦芽糖基/麦芽三糖基-环糊精的混合物（比如，参见王少杰，金征宇. 普鲁兰酶逆向合成麦芽糖基 β -CD 的工艺研

究[J]. 食品工业科技, 2005, 26(9):105-107.)。

在一些实施方式中, 所述方法, 包括:

(a) 取通过普鲁兰酶逆向合成方法制备得到的含分支环糊精的混合物粉末, 溶于缓冲液中;

(b) 将步骤(a)所得溶液置于 0℃-20℃条件下, 结晶 12-24h (采用冷却结晶的方法初步除去混合物中的部分环糊精);

(c) 将步骤(b)所得溶液离心, 取上清液加入 pH 4.5-8.0 缓冲溶液中, 充分溶解;

(d) 向反应体系中同时加入 CGTase 和糖化酶, 45℃的条件下反应 1-10h;

在一些实施方式中, 所述步骤(a)的缓冲液可以是 pH 4.5 的磷酸盐缓冲液。

在一些实施方式中, 所述步骤(d)中 CGTase 的添加量为 0.1-0.4U/g 混合物干重, 可选地, 为 0.3U/g 混合物干重。

在一些实施方式中, 所述方法还包括步骤(e): 通过膜分离的方法对步骤(d)的反应产物进行分离纯化, 即得单一分支环糊精。

在一些实施方式中, 含有分支环糊精的混合物为通过 α -半乳糖苷酶作用于环糊精和蜜饯二糖得到的混合物; 加入对应的 CGTase 和糖化酶, 可以分别得到葡萄糖基-环糊精和半乳糖苷基-环糊精。

在一些实施方式中, 含有分支环糊精的混合物为普鲁兰酶以环糊精和麦芽糖为底物制备得到的混合物; 加入对应的 CGTase 和糖化酶, 可以分别得到葡萄糖基-环糊精和麦芽糖基-环糊精。

本发明还要求保护上述方法在食品、医药、化工和化妆品领域的应用。

本发明有益效果:

(1) 本发明可以以麦芽糊精为出发原料, 经采用两步法制备分支环糊精; 首先利用 CGTase 的环化活力作用于麦芽糊精制备得到含有环糊精、分支环糊精、长分支环糊精等的混合物, 然后利用 CGTase 微弱的活力复配糖化酶作用于上述混合物, 得到的分支环糊精的产率和纯度均有所提高。

(2) 本发明的关键步骤在于控制 CGTase 的添加量为 0.1-0.4U/g 的混合物干重与糖化酶进行复配。

(3) 本发明少量的 CGTase 添加量与糖化酶共同作用于含有环糊精、分支环糊精、长分支环糊精等的混合物时, 糖化酶可以将长分支环糊精水解为分支环糊精, CGTase 的偶合活力可以选择性的优先打开环糊精的环状结构, 然后在糖化酶的协同作用下将打开的环状结构水

解为葡萄糖，进而得到的分支环糊精和葡萄糖，利于后续的分离纯化。

附图说明

图 1 为本发明实施例 3 中步骤（1）产物的高效液相色谱图；

图 2 为本发明实施例 3 中步骤（3）产物的高效液相色谱图；

图 3 为本发明实施例 6 步骤（3）、（4）产物的高效液相色谱图；

图 4 为本发明实施例 9 步骤（4）、（5）产物的高效液相色谱图。

具体实施方案

实施例 1

一种酶法处理麦芽糊精制备葡萄糖基- α -环糊精的方法，所述方法包括如下具体步骤：

（1）取 10 mg 的麦芽糊精 2 mL 离心管中，加入 1 mL pH 4.5（20 mM）的磷酸盐缓冲溶液，加入 0.36 U 的 α -CGTase，在 60℃反应条件下反应 12 h；得到含有分支环糊精葡萄糖基- α -环糊精的混合物；

（2）80℃水浴加热 10min，使 α -CGTase 的酶活至 0.003 U（即保证后续反应体系中 α -CGTase 的初始酶活约 0.3U/g 混合物干重）；

（3）向反应体系中加入 0.72 U 糖化酶，45℃的反应条件下反应 12h，在 100℃的条件下保温 15min，制得含有葡萄糖基- α -环糊精的混合物；

（4）利用高效液相的方法对步骤（3）所得产物进行分离纯化，最终得到 0.44mg 葡萄糖基- α -环糊精，且葡萄糖基- α -环糊精占主产物（ α -环糊精、 β -环糊精、 γ -环糊精和葡萄糖基- β -环糊精）的比例为 20%。

其中，高效液相条件为：色谱仪：岛津 LC-20A，检测器：示差检测器，分析柱：APS-2 HYPERSIL 柱（250 mm × 4.6 mm, 5 μ m），流动相：乙腈:水=75:25（v/v），柱温：30℃，流速：1 mL/min，进样量：200 μ L。

实施例 2

发明人还尝试了分别采用下列方法制备分支环糊精：

方案一：省略实施例 1 中的步骤（2）中的 CGTase 酶活的控制，即不进行物理降酶活处理、使体系中 CGTase 酶活仍然维持在 0.36 U 左右，其他步骤和参数与实施例 1 一致；具体是：

（1）取 10 mg 的麦芽糊精 2 mL 离心管中，加入 1 mL pH 4.5（20 mM）的磷酸盐缓冲溶液，加入 0.36 U 的 α -CGTase，在 60℃反应条件下反应 12 h；得到含有分支环糊精葡萄糖基- α -环糊精的混合物；

(2) 向反应体系中加入 0.72 U 糖化酶, 45℃的反应条件下反应 12h, 在 100℃的条件下保温 15min, 制得含有葡萄糖基- α -环糊精的混合物;

结果显示, 含有葡萄糖基- α -环糊精的混合物中葡萄糖基- α -环糊精的百分含量为 0%。

方案二: 将实施例 1 的步骤 (2) 中 α -CGTase 的酶活降低至 0.006 U (即保证后续反应体系中 α -CGTase 的初始酶活约 0.6U/g 混合物干重); 其他步骤和参数与实施例 1 一致; 具体是:

(1) 取 10 mg 的麦芽糊精 2 mL 离心管中, 加入 1 mL pH 4.5 (20 mM) 的磷酸盐缓冲溶液, 加入 0.36 U 的 α -CGTase, 在 60℃反应条件下反应 12 h; 得到含有分支环糊精葡萄糖基- α -环糊精的混合物;

(2) 80℃水浴加热 10min, 使 α -CGTase 的酶活至 0.006 U (即保证后续反应体系中 α -CGTase 的初始酶活约 0.6U/g 混合物干重);

(3) 向反应体系中加入 0.72 U 糖化酶, 45℃的反应条件下反应 12h, 在 100℃的条件下保温 15min, 制得含有葡萄糖基- α -环糊精的混合物。

结果显示, 含有葡萄糖基- α -环糊精的混合物中葡萄糖基- α -环糊精的百分含量为 10%。

方案三、将实施例 1 的步骤 (2) 中 α -CGTase 的酶活降低至 0.0006 U (即保证后续反应体系中 α -CGTase 的初始酶活约 0.06U/g 混合物干重), 其他步骤和参数与实施例 1 一致; 具体是:

(1) 取 10 mg 的麦芽糊精 2 mL 离心管中, 加入 1 mL pH 4.5 (20 mM) 的磷酸盐缓冲溶液, 加入 0.36 U 的 α -CGTase, 在 60℃反应条件下反应 12 h; 得到含有分支环糊精葡萄糖基- α -环糊精的混合物;

(2) 80℃水浴加热 10min, 使 α -CGTase 的酶活至 0.0006 U (即保证后续反应体系中 α -CGTase 的初始酶活约 0.06U/g 混合物干重);

(3) 向反应体系中加入 0.72 U 糖化酶, 45℃的反应条件下反应 12h, 在 100℃的条件下保温 15min, 制得含有葡萄糖基- α -环糊精的混合物。

结果显示, 含有葡萄糖基- α -环糊精的混合物中葡萄糖基- α -环糊精的百分含量为 14%。

方案四

将实施例 1 的步骤 (2) 中 α -CGTase 的酶活降低至 0U (即保证后续反应体系中 α -CGTase 的初始酶活为 0), 其他步骤和参数与实施例 1 一致; 具体是:

(1) 取 10 mg 的麦芽糊精 2 mL 离心管中, 加入 1 mL pH 4.5 (20 mM) 的磷酸盐缓冲溶

液，加入 0.36 U 的 α -CGTase，在 60℃反应条件下反应 12 h；得到含有分支环糊精葡萄糖基- α -环糊精的混合物；

(2) 80℃水浴加热 10min，使 α -CGTase 的酶活至 0；

(4) 向反应体系中加入 0.72 U 糖化酶，45℃的反应条件下反应 12h，在 100℃的条件下保温 15min，制得含有葡萄糖基- α -环糊精的混合物。

结果显示，含有葡萄糖基- α -环糊精的混合物中葡萄糖基- α -环糊精的百分含量为 3.5%。

实施例 3

一种酶法处理麦芽糊精制备葡萄糖基- β -环糊精的方法，所述方法包括如下具体步骤：

(1) 取 50 mg 的麦芽糊精 2 mL 离心管中，加入 1 mL pH 3.0 (20 mM) 的磷酸盐缓冲溶液，加入 0.36 U 的 β -CGTase，在 60℃反应条件下反应 12 h；

(2) 90℃水浴加热 5min，使 β -CGTase 的酶活至 0.011 U (即保证后续反应体系中 β -CGTase 的初始酶活约 0.22U/g 混合物干重)；

(3) 向反应体系中加入 0.72 U 糖化酶，45℃的反应条件下反应 12 h，在 100℃的条件下保温 15 min，制得含有葡萄糖基- β -环糊精的混合物；

(4) 利用高效液相的方法对步骤 (3) 所得产物进行分离纯化，终得到 0.56mg 葡萄糖基- β -环糊精。

将本实施例中步骤 (1) 和 (3) 的样品进行高效液相分析测试，测试结果分别如图 1、2 所示。

由图 1 可以看出，以麦芽糊精为底物加入 β -CGTase 有葡萄糖基- β 环糊精的生成，但产量仅有 0.19mg，占主产物 (α -环糊精、 β -环糊精、 γ -环糊精和葡萄糖基- β -环糊精) 的比例仅为 2.4%。

由图 2 为可以看出，以麦芽糊精为底物加入 β -CGTase 后，产物在 β -CGTase 和糖化酶的共同作用下，所得到的葡萄糖基- β 环糊精的含量为 0.42mg，占主产物的比例为 24.0%。

实施例 4

一种酶法处理麦芽糊精制备葡萄糖基- γ -环糊精的方法，所述方法包括如下具体步骤：

(1) 取 50 mg 的麦芽糊精 2 mL 离心管中，加入 1 mL pH 3.0 (20 mM) 的磷酸盐缓冲溶液，加入 0.36 U 的 γ -CGTase，在 60℃反应条件下反应 12 h；

(2) 90℃水浴加热 5min，使 γ -CGTase 的酶活至 0.011 U；

(3) 向反应体系中加入 0.72 U 糖化酶, 45℃ 的反应条件下反应 12 h, 在 100℃ 的条件下保温 15 min, 制得含有葡萄糖基- γ -环糊精的混合物;

(4) 利用高效液相的方法对步骤 (3) 所得产物进行分离纯化, 终得到 0.37mg 葡萄糖基- γ -环糊精。

实施例 5

一种酶法制备单一麦芽糖基- α -环糊精的方法, 所述方法包括如下具体步骤:

(1) 取 0.1g 通过普鲁兰酶逆向合成方法制备得到的含有麦芽糖、 α -环糊精和麦芽糖基- α -环糊精的混合物, 溶于 300 μ L pH4.5 磷酸盐缓冲液中;

(2) 将上述溶液置于 4℃ 条件下, 低温结晶 12h;

(3) 将步骤 (2) 所得溶液在 4℃ 条件下离心, 取上清液加入 600 μ L pH4.5 缓冲溶液中, 充分溶解;

(4) 向反应体系中同时加入 150 μ L (即 0.03U) CGTase 和 150 μ L (即 0.72U) 糖化酶, 45℃ 的条件下反应 4h, 即可得到麦芽糖基- α -环糊精、麦芽糖和葡萄糖的混合物;

(5) 通过膜分离的方法对混合物进一步进行分离纯化, 即可得所述麦芽糖基- α -环糊精。

此部分的关键是将混合物中 α -环糊精水解为葡萄糖, 利于麦芽糖基- α -环糊精的分离, 因为 α -环糊精与麦芽糖基- α -环糊精的分子量相差 342, 不利于分子 (分子量接近), 而葡萄糖与麦芽糖基- α -环糊精的分子量相差 972。此类物质的分离方法的原理一般是根据物质的尺寸的大小, 两种物质相差越大越容易进行分离, 反之则不容易分离。

实施例 6

一种酶法制备单一麦芽糖基- β -环糊精的方法, 所述方法包括如下具体步骤:

(1) 取 0.1g 通过普鲁兰酶逆向合成方法制备得到的含有麦芽糖、 β -环糊精和麦芽糖基- β -环糊精的混合物, 溶于 300 μ L pH4.5 磷酸盐缓冲液中;

(2) 将上述溶液置于 4℃ 条件下, 低温结晶 12h;

(3) 将步骤 (2) 所得溶液在 4℃ 条件下离心, 取上清液加入 600 μ L pH4.5 缓冲溶液中, 充分溶解;

(4) 向反应体系中同时加入 150 μ L (即 0.03U) CGTase 和 150 μ L (即 0.72U) 糖化酶, 45℃ 的条件下反应 4h, 即可得到麦芽糖基- β -环糊精、麦芽糖和葡萄糖的混合物;

(5) 通过膜分离的方法对混合物进一步进行分离纯化, 即可得所述麦芽糖基- β -环糊精。

将本发明实施例中步骤（3）和（4）的产物用高效液相进行分析测试，测试结果如图 3 所示，虚线酶处理前样品，实线为酶处理后样品。由图 3 可以看出，以普鲁兰酶逆向合成的含有麦芽糖、 β -环糊精和麦芽糖基- β -环糊精混合物，在 CGTase 和糖化酶共同作用的条件下可以将 β -环糊精水解掉，最终可得到含有麦芽糖基- β -环糊精、麦芽糖和葡萄糖的混合物，通过膜分离的方法即可得到麦芽糖基- β -环糊精。

实施例 7

一种酶法制备单一麦芽糖基- γ -环糊精的方法，所述方法包括如下具体步骤：

（1）取 0.1g 通过普鲁兰酶逆向合成方法制备得到的含有麦芽糖、 γ -环糊精和麦芽糖基- γ -环糊精的混合物，溶于 300 μ L pH4.5 磷酸盐缓冲液中；

（2）将上述溶液置于 4℃ 条件下，低温结晶 12h；

（3）将步骤（2）所得溶液在 4℃ 条件下离心，取上清液加入 600 μ L pH4.5 缓冲溶液中，充分溶解；

（4）向反应体系中同时加入 150 μ L（即 0.03U/g 混合物）CGTase 和 150 μ L（即 0.72U/g 混合物）糖化酶，45℃ 的条件下反应 4h，即可得到麦芽糖基- γ -环糊精、麦芽糖和葡萄糖的混合物；

（5）通过膜分离的方法对混合物进一步进行分离纯化，即可得到所述麦芽糖基- γ -环糊精。

实施例 8

一种酶法制备单一半乳糖基- β -环糊精的方法，所述方法包括如下具体步骤：

（1）取 0.1g 通过 α -半乳糖苷酶合成方法制备得到的含有蜜二糖、 β -环糊精和半乳糖基- β -环糊精的混合物，溶于 300 μ L pH4.5 磷酸盐缓冲液中；

（2）将上述溶液置于 4℃ 条件下，低温结晶 12h；

（3）将步骤（2）所得溶液在 4℃ 条件下离心，取上清液加入 600 μ L pH4.5 缓冲溶液中，充分溶解；

（4）向反应体系中同时加入 150 μ L（0.03U/g 混合物）CGTase 和 150 μ L（0.72U/g 混合物）糖化酶，45℃ 的条件下反应 4h，即可得到半乳糖基- β -环糊精与蜜二糖和葡萄糖的混合物；

（5）通过膜分离的方法对混合物进一步进行分离纯化，即可得到所述半乳糖基- β -环糊精。

实施例 9

一种酶法制备单一葡萄糖基- β -环糊精的方法，所述方法包括如下具体步骤：

- (1) 取 0.1g 通过普鲁兰酶逆向合成方法制备得到的含有麦芽糖、 β -环糊精和麦芽糖基- β -环糊精的混合物，溶于 300 μ L pH4.5 磷酸盐缓冲液中；
- (2) 将上述溶液置于 4 $^{\circ}$ C 条件下，低温结晶 12h；
- (3) 将步骤 (2) 所得溶液在 4 $^{\circ}$ C 条件下离心，取上清液加入 600 μ L pH4.5 缓冲溶液中，充分溶解；
- (4) 向反应液中加入 100 μ L (即 0.72U) 糖化酶，45 $^{\circ}$ C 的条件下反应 10h，100 $^{\circ}$ C 条件下保温 15min，可以得到含有麦芽糖、葡萄糖、 β -环糊精和葡萄糖基- β -环糊精的混合物；
- (5) 向反应体系中同时加入 150 μ L CGTase (即控制体系中 CGTase 为 0.03U/g 混合物) 和 150 μ L (即 0.72U/g 混合物) 糖化酶，45 $^{\circ}$ C 的条件下反应 4h，即可得到含有葡萄糖基- β -环糊精、葡萄糖和麦芽糖的混合物；
- (6) 通过膜分离的方法对混合物进一步进行分离纯化，即可得到所述葡萄糖基- β -环糊精。

将本发明实施例中步骤 (4) 和 (5) 的产物用高效液相进行分析测试，测试结果如图 4 所示，虚线酶处理前样品，实线为酶处理后样品。由图 4 可以看出，以普鲁兰酶逆向合成的含有麦芽糖、 β -环糊精和麦芽糖基- β -环糊精混合物，在糖化酶的作用下得到麦芽糖、葡萄糖、 β -环糊精和葡萄糖基- β -环糊精的混合物；在 CGTase 和糖化酶共同作用的条件下可以将 β -环糊精水解掉，最终可得到含有葡萄糖基- β -环糊精、麦芽糖和葡萄糖的混合物，通过膜分离的方法即可得到葡萄糖基- β -环糊精。

权 利 要 求 书

1、一种制备分支环糊精的方法，其特征在于，所述方法包括：利用环糊精葡萄糖基转移酶（简称 CGTase）和糖化酶处理含有分支环糊精的混合物，反应的时间为 1-24h；其中，控制初始反应体系中 CGTase 的用量为 0.1-0.4U/g 混合物干重。

2、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述混合物为原料麦芽糊精经 CGTase 处理得到的混合物；或者是，通过普鲁兰酶逆向合成方法制备得到的含分支环糊精的混合物；或者是，通过 α -半乳糖苷酶作用于环糊精和蜜饯二糖得到的混合物。

3、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述混合物具体是：原料麦芽糊精溶于缓冲液中，加入 CGTase 反应 12-24h。

4、根据权利要求 3 所述的方法，其特征在于，所述原料麦芽糊精溶于缓冲液中后，麦芽糊精的质量浓度为 1%-5%。

5、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述方法，具体包括：

（1）将麦芽糊精溶于磷酸盐缓冲液中，加入 CGTase 酶反应 12-24h；即得到含有分支环糊精的混合物；

（2）采用物理的方法降低 CGTase 酶活；

（3）向步骤（2）的反应体系中加入糖化酶反应 12-24h，高温灭酶，可制得分支环糊精。

6、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述方法，还包括在糖化酶处理反应结束后对反应产物进行分离纯化。

7、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述 CGTase 酶可以是 α -CGTase 酶、 β -CGTase 酶、 γ -CGTase 酶中的任意一种或者多种。

8、根据权利要求 2 所述的方法，其特征在于，所述方法，包括：

（a）取通过普鲁兰酶逆向合成方法制备得到的含分支环糊精的混合物粉末，溶于缓冲液中；

（b）将步骤（a）所得溶液置于 0℃-20℃条件下，结晶 12-24h；

（c）将步骤（b）所得溶液离心，取上清液加入 pH 4.5-8.0 缓冲溶液中，充分溶解；

（d）向反应体系中同时加入 CGTase 和糖化酶，45℃的条件下反应 1-10h；

9、根据权利要求 2 所述的方法，其特征在于，所述方法还包括步骤（e）：通过膜分离的方法对步骤（d）的反应产物进行分离纯化，即得单一分支环糊精。

10、权利要求 1-9 任一所述方法在食品、制备药物、化工、化妆品领域的应用。

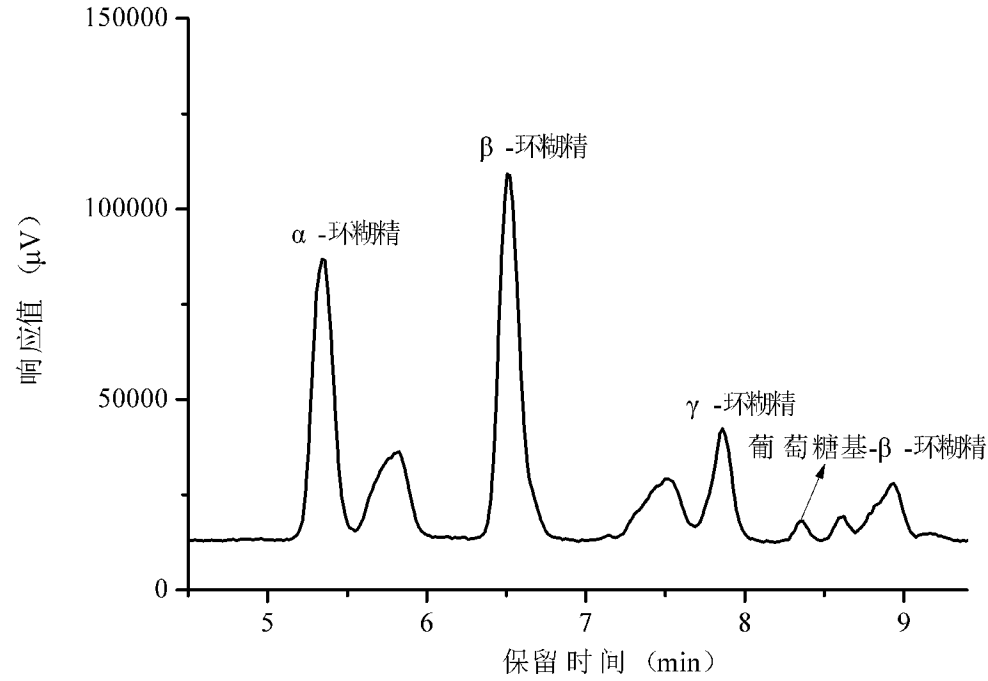


图 1

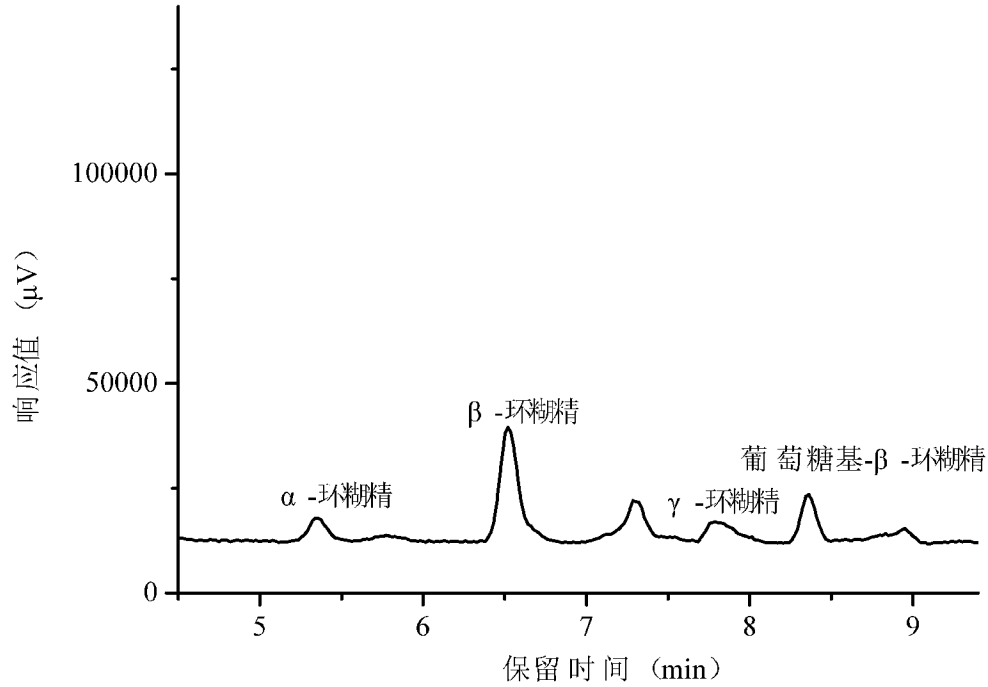


图 2

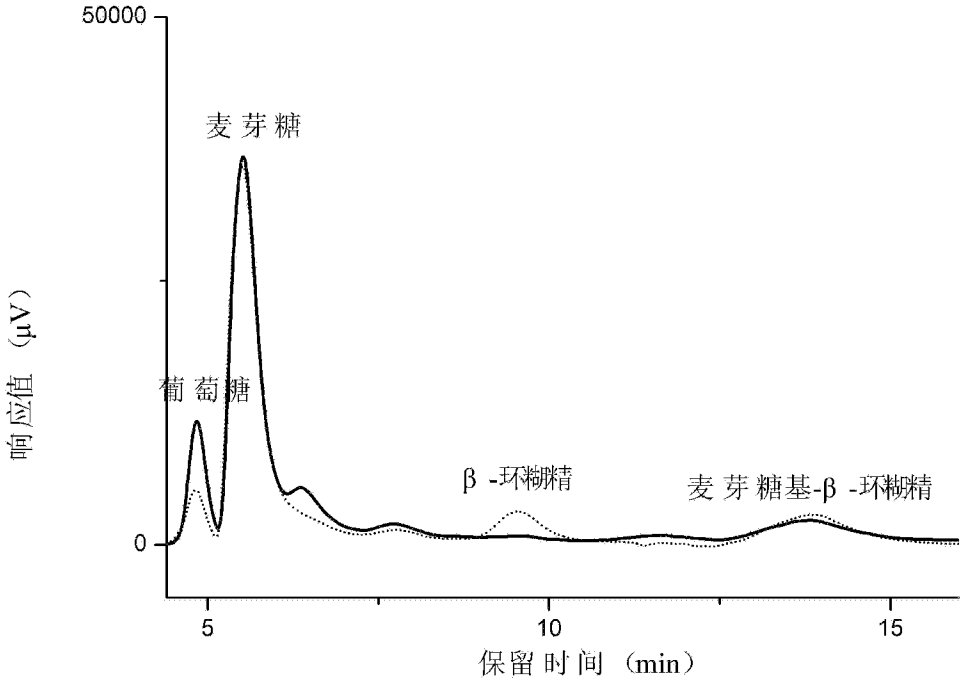


图 3

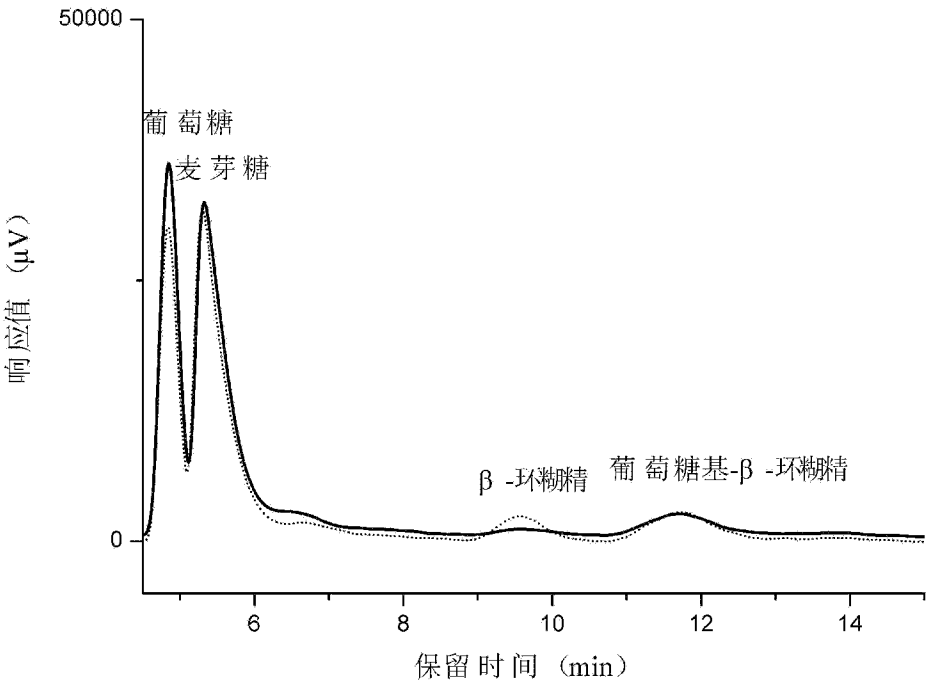


图 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2018/086869

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P 19/20 (2006.01) i; C12P 19/18 (2006.01) i; C12P 19/04 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

DWPI, CNABS, CNKI: 环糊精, CD-糖基, 分支, 转移酶, 糖化酶, 麦芽糊精, CGTase, 酶解, 分离, 纯化, branched cyclodextrin, glucosyl-alpha-cyclodextrin, enzymolysis, cyclodextrin, glycosyl transferase, maltogenic amylase, separate, purify

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 107177647 A (JIANGNAN UNIVERSITY), 19 September 2017 (19.09.2017), claims 1-9, embodiment 1, and description, paragraph 106	1-10
PX	CN 106967766 A (JIANGNAN UNIVERSITY), 21 July 2017 (21.07.2017), description, paragraphs 8-18, and embodiment 3	1-10
X	CN 103243140 A (JIANGNAN UNIVERSITY), 14 August 2013 (14.08.2013), claim 1	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“&” document member of the same patent family
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 11 June 2018	Date of mailing of the international search report 12 July 2018
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer WANG, Jianbin Telephone No. 62411184

International application No.
PCT/CN2018/086869

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/086869

A. 主题的分类

C12P 19/20(2006.01)i; C12P 19/18(2006.01)i; C12P 19/04(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

DWPI, CNABS, CNKI, 环糊精, CD-糖基, 分支, 转移酶, 糖化酶, 麦芽糊精, CGTase, 酶解, 分离, 纯化, branched cyclodextrin, glucosyl-alpha-cyclodextrin, enzymolysis, cyclodextrin, glycosyl transferase, maltogenic amylase, separate, purify

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 107177647 A (江南大学) 2017年 9月 19日 (2017 - 09 - 19) 权利要求1-9, 实施例1, 说明书第106段	1-10
PX	CN 106967766 A (江南大学) 2017年 7月 21日 (2017 - 07 - 21) 说明书第8-18段, 实施例3	1-10
X	CN 103243140 A (江南大学) 2013年 8月 14日 (2013 - 08 - 14) 权利要求1	1-10

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2018年 6月 11日

国际检索报告邮寄日期

2018年 7月 12日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

受权官员

汪建斌

传真号 (86-10)62019451

电话号码 62411184

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/086869

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	107177647	A	2017年 9月 19日	无			
CN	106967766	A	2017年 7月 21日	无			
CN	103243140	A	2013年 8月 14日	CN	103243140	B	2014年 6月 25日