

异麦芽酮糖及其生产方式的研究进展

刘娜, 彭丹丹, 刘亚楠, 王敏, 张明丹, 黄继红

河南工业大学生物工程学院, 河南 郑州 450001

摘要:随着人们对健康生活重视程度的不断提升,寻求健康型甜味剂以满足消费者的需求显得至关重要。异麦芽酮糖是一种安全的蔗糖替代品,具有水解速度慢、低GI(血糖生成指数)、抗龋齿和益生元特性等生理功能,已应用于巧克力、谷类早餐、冰淇淋等各类食品中。异麦芽酮糖主要通过蔗糖异构酶转化蔗糖生成,反应中的副产物给工业生产带来困扰。综述了异麦芽酮糖的物理特性和生物活性,系统阐述近年来异麦芽酮糖的生产方式——微生物转化法和蔗糖异构酶催化法,包括菌体发酵法、固定化细胞、固定化酶及新兴的表面展示系统等技术的生产工艺及生产中存在的问题。详细介绍了微生物转化法中改造菌株的方式及优缺点,酶催化合成法的应用前景及限制因素,为异麦芽酮糖的工业化生产提供参考。

关键词:异麦芽酮糖;生产方式;蔗糖异构酶;固定化;表面展示系统

中图分类号:TS201.2

文献标志码:A

文章编号:1673-2383(2021)05-0123-08

DOI:10.16433/j.1673-2383.2021.05.016

Research progress of isomaltulose and its production methods

LIU Na, PENG Dandan, LIU Yanan, WANG Min, ZHANG Mingdan, HUANG Jihong

College of Biological Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China

Abstract: As people attach great importance to healthy life, it is very important to seek healthy sweeteners to meet the needs of consumers. Isomaltulose is a safe sucrose substitute and a natural isomer of sucrose. It has physiological functions such as slow hydrolysis, low GI value (glycemic index), anti-caries, islet protection, and prebiotic properties. As a new food additive, it has been used in chocolate, cereal breakfast, ice cream and other foods. Isomaltulose is mainly produced through the conversion of sucrose by sucrose isomerase, and the by-products of the reaction bring trouble to industrial production. The physical characteristics and biological activities of isomaltulose were reviewed, and the production methods of isomaltulose in recent years, such as microbial transformation and sucrose isomerase catalysis, including bacterial fermentation, immobilized cells, immobilized enzyme and the emerging surface display system, and the problems existed in the production were systematically described. In this review, the methods of bacterial strain modifications and their advantages and disadvantages were introduced in detail, respectively. The application prospect and limiting factors of the enzyme-catalyzed synthesis method were also introduced, so as to provide a reference for the industrial production of isomaltulose.

Key words: isomaltulose; production methods; sucrose isomerase; immobilized; surface display system

近年来,随着消费者对高糖、高热量饮食的偏好度持续走低,低热量、低糖食品逐渐成为消费趋势。此外,肥胖、糖尿病和龋齿等问题导致消费者对蔗糖替代品的需求升高。有研究表明,

收稿日期:2021-01-20

基金项目:中国工程科技发展战略河南研究院战略咨询研究项目(2020HENZT13);中原院士基金(192101510004);河南省小麦深加工产业科技特派员服务团项目(豫科(2020)86号)

作者简介:刘娜(1978—),女,河南周口人,博士,教授,研究方向为食品微生物资源利用,E-mail:liuna3456@163.com。

低糖、低热量的饮食方式不仅能改善高血脂,降低机体患糖尿病、心血管疾病的风险,还有助于维持长时间的饱腹感和持续的能量释放,从而进一步影响身体和精神状况^[1-3],这使得功能性甜味剂得到广泛关注。异麦芽酮糖(6-O- α -D-吡喃葡萄糖基-D-呋喃果糖, Isomaltulose)具有与蔗糖相似的感官品质和营养、功能特性,因此,优于其他替代性碳水化合物。

异麦芽酮糖作为蔗糖的同分异构体,存在于蜂蜜、甘蔗汁等物质中^[4],能选择性促进人体肠道内双歧杆菌的生长,具有低热量、防龋齿、抑制肥胖等功能特性,能很大程度上满足功能性甜味剂的要求^[5],可供糖尿病患者和肥胖人士食用。异麦芽酮糖可完全水解于人体小肠中,大剂量摄入后无副作用(如胀气或腹泻)^[6],食用安全性高,美国FDA将其认证为GRAS(公认安全)级食品添加剂,2005年被欧盟批准为新资源食品^[7]。目前,异麦芽酮糖可作为食品添加剂广泛应用于食品行业,也可作为聚合物和表面活性剂等生物产品的原材料^[8],还可添加于烟草中掩盖杂味。

1 异麦芽酮糖的物理特性

异麦芽酮糖是一种由葡萄糖与果糖以 α -1,6糖苷键结合而成的还原性双糖,还原性约为葡萄糖的52%,分子式为 $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$,相对分子质量为360.32,能产生 $+97^\circ \sim 98^\circ$ (α_D^{20})的旋光度^[9]。外观和味道与蔗糖相似,呈白色结晶,甜度约为蔗糖的42%,不随环境变化而改变。溶解度在室温下仅为蔗糖的50%,温度升高时,溶解度急剧增加,80℃时达到蔗糖的85%。与蔗糖的熔点(160~185℃)相比,异麦芽酮糖的更低(123~124℃)^[10]。异麦芽酮糖还具有高稳定性,主要表现:(1)耐酸水解性良好,pH 2.0时,20%的异麦芽酮糖溶液沸腾1h也不发生水解反应^[11],因此,在酸性食品中比蔗糖更稳定;(2)异麦芽酮糖添加到等渗或低渗饮料中能保持渗透压的稳定;(3)异麦芽酮糖对大多数细菌和酵母有抗性^[10],不易被利用,因而添加异麦芽酮糖的产品更易保持甜味。

2 异麦芽酮糖的生物活性

2.1 消化吸收特性

体外研究表明:异麦芽酮糖经肠道中的蔗糖

酶-异麦芽糖酶复合催化水解为单糖,由于异麦芽酮糖中存在更强的 α -1,6糖苷键,导致其虽能在小肠中完全水解,但水解速度慢,仅为蔗糖水解速度的20%~25%^[12]。这意味着当等量蔗糖的消化和吸收全部完成时,异麦芽酮糖仍在水解,为人体提供葡萄糖和能量。Lina等^[13]已证实异麦芽酮糖的消化吸收可在小肠内基本完成。大鼠的体内放射性标记实验^[14]表明,单次口服异麦芽酮糖后,在大鼠尿液和粪便中只检测到极少量的异麦芽酮糖。因此,异麦芽酮糖既可作为可消化碳水化合物(糖和淀粉:16.74 kJ/g)为人体提供相同能量,也可作为有良好耐受性的食品添加剂应用于食品行业。

2.2 抗龋齿特性

龋齿是当人体摄入较多糖分时,形成牙菌斑的细菌(如变形链球菌)发酵蔗糖产酸使牙釉质中的钙溶解,从而引起蛀蚀。异麦芽酮糖本质上是非致龋性的,这主要归功于双糖的高微生物稳定性。因其前身蔗糖结构中葡萄糖和果糖分子之间的 α -1,2糖苷键被酶重排为更加稳定的 α -1,6糖苷键^[15],因此不被口腔微生物(包括致龋细菌)发酵利用,即不产生损害牙齿的胞外多糖和酸。使用大鼠模型进行的实验性龋齿研究证实了异麦芽酮糖的抗龋齿特性^[16],喂养异麦芽酮糖大鼠的龋齿率显著低于喂养蔗糖和乳糖的大鼠。

2.3 胰岛保护及对血糖参数的影响

胰岛素在调节人体血糖平衡和新陈代谢中起关键作用,它通过“打开”葡萄糖进入细胞的“门”来降低血糖水平^[17]。摄入异麦芽酮糖后,由于其水解速度缓慢,使得葡萄糖、果糖的释放和吸收延迟,导致血糖和胰岛素水平的升高速率比蔗糖引起的要慢。

异麦芽酮糖对血糖水平的影响较低,有利于糖代谢和保护胰岛。Maeda等^[18]对10位健康男性进行摄入研究,对比受试者服用50g异麦芽酮糖和蔗糖前后血糖指标和胰岛素的变化,结果显示摄入15、30、60min后,异麦芽酮糖引起的血糖反应更平缓,胰岛素值更低。此外,糖耐量受损的人定期摄入含异麦芽酮糖的配方奶粉有利于改善代谢综合征^[19]。

2.4 脂肪氧化

异麦芽酮糖不仅能维持血糖稳态,还能保持更高的脂肪氧化率^[20-21],从而减少人体对碳水化合物氧化的依赖。一种添加异麦芽酮糖的配方

奶粉具有减肥作用^[22],能更好地抑制餐后血糖水平,减少内脏脂肪堆积,这可能是由于异麦芽酮糖刺激了肝脏中的 PPAR- α (过氧化物酶体增殖激活受体)和脂肪细胞 PPAR- γ 基因的表达上调所致。这种特性使异麦芽酮糖成为糖尿病患者和糖尿病前期疾病(如胰岛素抵抗或代谢综合征)患者以及肥胖人士可以安全食用的糖。

3 异麦芽酮糖的生产方式

由于异麦芽酮糖在自然界中含量低,使用化学方法合成难度较大,因此,主要利用微生物转化及酶异构化蔗糖 2 种方式生产。其中酶异构化蔗糖是一种利用蔗糖异构酶(SIase, EC5.4.99.11)催化蔗糖生成异麦芽酮糖的酶促反应,具有极大的商业潜力。

3.1 微生物转化法

早期一般采用微生物转化法来生产异麦芽酮糖,主要包括菌体发酵转化蔗糖与菌体细胞固定化两种方式。迄今已发现多种微生物能发酵蔗糖转化异麦芽酮糖,如沙雷氏杆菌属(*Serratia plymuthica* ATCC15928^[23])、欧文氏杆菌属(*Erwinia rhapontici* NX-5^[24])、克雷伯氏杆菌属(*Klebsiella* sp. LX-3^[25])等,均有产异麦芽酮糖的能力。

3.1.1 菌体发酵法

菌体发酵蔗糖生成异麦芽酮糖的方法实质

是靠微生物体内表达的 SIase 催化蔗糖的转化来完成的。基于菌株性质的不同,可将其分为原始菌株发酵、诱变菌株发酵及重组菌株发酵 3 种。Kawaguti 等^[26]采用间歇法研究 *Erwinia* sp. D12 菌株生产异麦芽酮糖的影响因素,得出最佳条件下 35% 的蔗糖溶液转化 15 min,即可得到 72.11% 的异麦芽酮糖产率。Cho 等^[27]首次从韩国传统食品大豆酱和酒曲中分离到 1 株高产异麦芽酮糖的肠杆菌 FMB-1 菌株,通过 PCR 证实肠杆菌 FMB-1 中存在新的 SIase 基因,转化蔗糖 48 h 后主产物为异麦芽酮糖和海藻酮糖,其中异麦芽酮糖占总糖的 90% ($\pm 4\%$)。

为得到更高产量的异麦芽酮糖,同时达到优化产物分离度的目的,考虑改造菌株以提高蔗糖转化率并降低产物黏度。其中诱变是得到性状优良菌株的一种普遍方法。诱变法虽烦琐耗时,但易操作、成本低且效益高。合适的筛选方法对获得目的菌株至关重要。目前一般采用自动化、微型化、高灵敏度的高通量筛选系统,有利于提高筛选效率,增加寻找理想突变体的可能性。全自动生长曲线分析仪(Bioscreen C)是一种自动化、小型化的系统,能实现细胞质量和产物的自动分析,但因其规模小、分辨率低,一般与其他方法结合形成多层次筛选体系,更利于分离出改良突变体。典型菌株常见的突变及筛选方法如表 1 所示。

表 1 典型菌株常见的突变及筛选方法

Table 1 Common mutations and screening methods of typical strains

菌株	突变方式	筛选方法	诱变结果
<i>Protaminobacter rubrum</i> ^[28]	0.2 mg/mL NTG 处理 60 min	班氏试剂初筛、HPLC 复筛	得到酶活力为 1 230 U/g, 蔗糖转化率达 87.7% 的菌株 PR-H32
<i>Serratia</i> sp. KCTC2865 ^[29]	100 μ g/mL NTG 处理 30 min	Bioscreen C(全自动生长曲线分析仪)、DNS 法及 TLC 法筛选	得到 <i>Serratia</i> sp. M1 菌株,3% 海藻酸钠固定,在 60% 蔗糖介质中经 30 个循环后蔗糖转化率仍保持在 70%
<i>Klebsiella</i> sp. LX3 ^[30]	ARTP 诱变处理 25 s	DNS 法、TLC 法及 HPLC 法筛选	得到遗传性状稳定的突变株 LX3-1,酶活 106.88 U/mL,异麦芽酮糖产量 2.898 g/L
<i>E. coli</i> 重组菌 R-W ^[31]	定点突变	HPLC 法	获得突变菌株 R-M1,转化蔗糖生产异麦芽酮糖比例由 90.28% 升至 93.16%
<i>Erwinia rhapontici</i> ATCC 29283 ^[32]	100 mg/L NTG 处理 30 min	Bioscreen C、DNS 法及 TLC 法 筛选	得到突变体 <i>E. rhapontici</i> BN68089,蔗糖转化率为 90%,异麦芽酮糖产率 194 g \cdot L ⁻¹ \cdot h ⁻¹

菌株经优化培养条件或诱变处理后均能达到较高蔗糖转化率,但这种菌体发酵转化蔗糖的方法一般存在生产周期长、发酵液成分复杂、分离纯化目标产物成本高等缺点^[33],无法实现工业化生产,因此应用较少。实际工业生产中,

多采用代谢工程的手段构建 SIase 生产菌株,这种方法是将某种产异麦芽酮糖菌株中编码 SIase 的基因导入另一种微生物,再利用工程菌在生长代谢过程中不断产异麦芽酮糖。目前,最常用作 SIase 表达载体的是大肠杆菌(*E. coli*)。Li

等^[34]克隆了菌株 *Erwinia rhapontici* NX-5 的 SIase 基因在 *E. coli* 中高效表达,得到重组菌株转化 550 g/L 蔗糖溶液 90 min 后,异麦芽酮糖产率为 87%。Zhang 等^[35]合成来自 *Erwinia* sp. Ejp617 的 SIase 基因,基因组挖掘技术鉴定为新的 SIase 基因后,在 *E. coli* BL21(DE3) 中表达。蔗糖异构化反应结果表明,底物浓度 300 g/L 时,经 180 min 生物反应,获得 240.9 g/L 异麦芽酮糖,产率达 80.3%。

在 *E. coli* 中异源表达已得到较高的异麦芽酮糖产量,但存在内毒素和细胞热原影响产物分离^[36]。为避免这个问题,现有研究将 SIase 基因导入除 *E. coli* 外的非侵袭性和非致病性宿主,如 Zhang 等^[37]为生产食品级的异麦芽酮糖并提高产量,将 *Pantoea dispersa* UQ68 J 的 SIase 基因在非致病性酵母菌 *Yarrowia lipolytica* (解脂耶氏酵母)中超表达,工程菌 S47 以 600 g/L 蔗糖底物浓

度发酵后,异麦芽酮糖最高质量浓度达 572.1 g/L,且单糖副产物葡萄糖等转化为细胞内脂类,不良化合物产生减少。除 *Yarrowia lipolytica* 外,也有使用 *Lactococcus lactis* (乳酸乳球菌)^[38]、*Saccharomyces cerevisiae* (酿酒酵母)^[39] 和 *Bacillus subtilis* (枯草芽孢杆菌)^[40] 等作 SIase 异源表达的宿主构建工程菌。

3.1.2 固定化细胞转化

固定化细胞生产异麦芽酮糖的工艺已日趋成熟。与菌体发酵法相比,固定化细胞技术既利于细胞的循环使用、增强细胞机械强度,又利于提高蔗糖转化率、降低分离下游产物的成本。用于固定化的载体种类繁多,典型的如海藻酸钠、壳聚糖、聚乙烯醇等。利用海藻酸钠作包埋剂,CaCl₂ 作交联剂的固定化细胞稳定性好、可操作性强且成本低廉。常用的固定化细胞的相关工艺如表 2 所示。

表 2 常用固定化细胞材料及工艺

Table 2 Commonly used materials and processes for cell immobilization

菌株	固定化材料及工艺
<i>Erwinia</i> sp. D12, <i>Klebsiella</i> sp. K18, <i>P. rubrum</i> CBS 574. 77 ^[41-44]	细胞悬浮液与 2% (m/V) 海藻酸钠按体积比 1:2 混合,将细胞/海藻酸钠混合物逐滴挤压固定至 2% (m/V) CaCl ₂ 溶液中形成固定化珠
<i>Erwinia</i> sp. D12 ^[45]	40% (m/V) 湿细胞悬浮液与 5% (m/V) 壳聚糖-乙酸溶液等比例混合,逐滴挤出至 3% (m/V) Na ₄ P ₂ O ₇ 中形成固定化珠
<i>E. rhapontici</i> NCPB 1578 ^[46]	5% (m/V) 海藻酸钠与 15 g/L 细胞悬液混合后挤出至 0.1 mol/L CaCl ₂ 溶液,制备直径 2.25 mm 的固定化微球
<i>P. rubrum</i> CBS574. 77 ^[47]	6% (m/m) 细胞与添加了 25% (m/m) Eudragit NM PMMA 黏合剂的 69% (m/m) 二氧化硅 320 混合

3.2 酶催化合成法

微生物转化法中蔗糖底物浓度有限,蔗糖既是 SIase 的底物又是细胞生长所需的碳源,即使能转化蔗糖生成异麦芽酮糖,也无法避免细胞利用产生额外的蔗糖消耗^[25],而且细胞壁的存在进一步增大细胞传质阻力,导致反应速度大幅降低。此外,这些异麦芽酮糖生产菌株缺乏食品级遗传背景,各种未经认证的胞外产物的存在又使异麦芽酮糖的回收过程复杂化^[48]。因此,直接利用 SIase 进行异构化反应更适用于底物浓度较高及发酵产物难以分离的异麦芽酮糖生产过程。

3.2.1 固定化酶生产异麦芽酮糖

通常来说,野生菌株分泌的 SIase 活性低,不能满足异麦芽酮糖的生产。考虑到固定化酶有良好的操作性和存储稳定性,现已尝试固定化 SIase 以实现酶的重复利用。Contesini 等^[49]首次

将 2 种不同的载体——硅藻土(吸附法)和低甲氧基果胶微胶囊(包埋法)用于 SIase 的固定化,但这 2 种方法制备的固定化酶稳定性差、酶活和蔗糖转化率低,转化率分别为 60% 和 30%。Wu 等^[50]采用经 ϵ -poly-L-lysine 修饰的介孔二氧化钛 M-TiO₂ (EPL-M-TiO₂) 作为固定 SIase 的载体,固定后酶活为 39.41 U/g,连续反应 16 批后蔗糖转化率仍保持在 95% 左右。但这种新型生物材料属于一种纳米晶体,成本过高,不宜用于大规模工业化生产。因此,选择一种成本经济、操作稳定性好、酶活力及回收率高的固定化载体势在必行。

耿梦华等^[51]报道了一种利用天然碱性多糖——壳聚糖微球为载体、戊二醛为交联剂,采用对来源于重组短小芽孢杆菌的 SIase 固定的方法,最终得到固定化 SIase 转化蔗糖的产物得率

为 87.8%,连续转化 16 次产物得率无明显降低。以壳聚糖为载体通过吸附交联法制备的固定化酶具有广阔前景,但这种固定化方法目前仅限于实验室研究阶段,工业生产应用仍有待研究。

3.2.2 细胞表面展示系统

异源蛋白质在革兰氏阴性细菌^[52]、革兰氏阳性细菌^[53]和具有锚定基序蛋白质的真菌^[54]外膜上的细胞表面展示系统已被广泛关注。细胞表面展示系统本质上是酶应用技术的延伸,这种技术的最大特点是微生物细胞表面酶分子的生成与自固定可同步进行,同时因活体全细胞生物催化剂易制备,不需进一步纯化或固定酶,因此极具研究价值。Zhan 等^[55]为提高食品级菌株工业化酶促合成异麦芽酮糖的速率,将蔗糖异构酶基因 *pall* 与分子载体 *cotX* 构建为基因融合体,建立基于枯草芽孢杆菌 168 孢子的表面展示系统,获得孢子表面的活性 SIase,以 UBM(未经处理的甜菜糖蜜)和 SP(豆粉)为碳源和氮源,在最佳转化条件下,产孢 6 h 后转化率达 92%。以农业废料为底物,利用该系统生产异麦芽酮糖不仅能提高 SIase 酶活性和稳定性,有助于克服遗传背景的问题,还具有成本效益高、环境友好等特点。这对食品工业生产异麦芽酮糖和其他工业生物催化反应具有一定的参考价值。

虽然表面展示系统生产技术显现出良好的性能和应用前景,但仍存在一些不确定因素影响此技术的普及:由于膜面积的限制,酶的产生量有限,展示的酶数量通常在 $10^3 \sim 10^4$ 之间^[56-57];部分催化反应需要内源性辅酶的参与才能进行酶促反应,限制了酶的种类^[58]。因此,开发工业化的展示酶技术,必须考虑酶的种类、结构和应用等因素。

4 展望

异麦芽酮糖已被 40 多个国家和地区应用于食品、化工、化妆品等行业,市场需求逐步扩大。SIase 是利用蔗糖生产异麦芽酮糖的关键酶,然而,SIase 异构化蔗糖产物中除异麦芽酮糖外,还存在一些副产物如海藻酮糖、葡萄糖等影响蔗糖转化,无法实现异麦芽酮糖的连续高效生产,不能在低成本前提下保证产品纯度,为异麦芽酮糖的生产带来困扰。目前虽有固定化细胞和酶、基因重组、表面展示系统等方法改进异麦芽酮糖的生产方式,但生产技术和生产规模仍有较大提升

空间。因此,还可从以下几个方面加强研究开发,以提高异麦芽酮糖的生产水平:(1)选育高产 SIase 的菌株,可利用传统诱变方法结合新型诱变系统如 ARTP(常压室温等离子体诱变)等手段,筛选出底物专一性强、酶活性高的菌株。(2)鉴于异麦芽酮糖在食品工业中的应用,研究 SIase 在食品级微生物中的异源表达,尤其是表面展示系统及展示表达后的产物分泌具有重要意义。(3)进一步优化异麦芽酮糖的生产条件,加强下游工艺的研究,开发低成本、高效率的分离纯化技术。

参考文献:

- [1] WONG S H S, SIU P M, LOK A, et al. Effect of the glycaemic index of pre-exercise carbohydrate meals on running performance [J]. *European journal of sport science*, 2008, 8(1): 23-33.
- [2] YOUNG H, BENTON D. The effect of using isomaltulose (Palatinose™) to modulate the glycaemic properties of breakfast on the cognitive performance of children [J]. *European journal of nutrition*, 2015, 54(6): 1013-1020.
- [3] SIU P M, WONG S H S. Use of the glycemic index: effects on feeding patterns and exercise performance [J]. *Journal of physiological anthropology and applied human science*, 2004, 23(1): 1-6.
- [4] LOW N I H, SPORNS P E. Analysis and quantitation of minor di- and trisaccharides in honey, using capillary gas chromatography [J]. *Journal of food science*, 1988, 53(2): 558-561.
- [5] GRENBY T H. Dental aspects of the use of sweeteners [J]. *Pure and applied chemistry*, 1997, 69(4): 709-714.
- [6] CHHETHAM P S J, GARRETT C, CLARK J. Isomaltulose production using immobilized cells [J]. *Biotechnology and bioengineering*, 1985, 27(4): 471-481.
- [7] HOLUB I, GOSTNER A, THEIS S, et al. Novel findings on the metabolic effects of the low glycaemic carbohydrate isomaltulose

- (Palatinose) [J]. The British journal of nutrition, 2010, 103(12): 1730-1737.
- [8] LICHTENTHALER F W, PETERS S. Carbohydrates as green raw materials for the chemical industry [J]. Comptes rendus chimie, 2004, 7(2): 65-90.
- [9] KAWAGUTI H Y, SATO H. Effect of concentration and substrate flow rate on isomaltulose production from sucrose by *Erwinia* sp. cells immobilized in calcium-alginate using packed bed reactor [J]. Applied biochemistry and biotechnology, 2010, 162(1): 89-102.
- [10] 杨文雄. 功能性甜味剂帕拉金糖研究进展 [C]//中国食品添加剂生产应用工业协会甜味剂专业委员会 2007 年年会, 2007.
- [11] BARILLO D J, PATHAK V, SPILLERT C R, et al. Traumatic cholecystoduodenal fistula—a case report [J]. Injury, 1985, 16(9): 634.
- [12] OOSTHUYSE T, CARSTENS M, MILLEN A M. Ingesting isomaltulose versus fructose-maltodextrin during prolonged moderate-heavy exercise increases fat oxidation but impairs gastrointestinal comfort and cycling performance [J]. International journal of sport nutrition and exercise metabolism, 2015, 25(5): 427-438.
- [13] LINA B A R, JONKER D, KOZIANOWSKI G. Isomaltulose (Palatinose®): a review of biological and toxicological studies [J]. Food and chemical toxicology, 2002, 40(10): 1375-1381.
- [14] MACDONALD I, DANIEL J W. The bio-availability of isomaltulose in man and rat [J]. Nutrition reports international, 1983, 28(5): 1083-1090.
- [15] GODSHALL M A. The expanding world of nutritive and non-nutritive sweeteners [J]. Sugar journal, 2007(69): 12-20.
- [16] MATSUKUBO T, TAKAZOE I. Sucrose substitutes and their role in caries prevention [J]. International dental journal, 2006, 56(3): 119-130.
- [17] SAWALE P D, SHENDURSE A M, MOHAN M S, et al. Isomaltulose (Palatinose): an emerging carbohydrate [J]. Food bioscience, 2017, 18: 46-52.
- [18] MAEDA A, MIYAGAWA J I, MIUCHI M, et al. Effects of the naturally-occurring disaccharides, palatinose and sucrose, on incretin secretion in healthy non-obese subjects [J]. Journal of diabetes investigation, 2013, 4(3): 281-286.
- [19] OIZUMI T, DAIMON M, JIMBU Y, et al. A palatinose-based balanced formula improves glucose tolerance, serum free fatty acid levels and body fat composition [J]. The Tohoku journal of experimental medicine, 2007, 212(2): 91-99.
- [20] KÖNIG D, THEIS S, KOZIANOWSKI G, et al. Postprandial substrate use in overweight subjects with the metabolic syndrome after isomaltulose (Palatinose™) ingestion [J]. Nutrition, 2012, 28(6): 651-656.
- [21] KAWAI K, YOSHIKAWA H, MURAYAMA Y, et al. Usefulness of palatinose as a caloric sweetener for diabetic patients [J]. Hormone and metabolic research, 1989, 21(6): 338-340.
- [22] MATSUO K, ARAI H, MUTO K, et al. The anti-obesity effect of the palatinose-based formula inslow is likely due to an increase in the hepatic PPAR-alpha and adipocyte PPAR-gamma gene expressions [J]. Journal of clinical biochemistry and nutrition, 2007, 40(3): 234-241.
- [23] VÉRONÈSE T, PERLOT P. Mechanism of sucrose conversion by the sucrose isomerase of *Serratia plymuthica* ATCC 15928 [J]. Enzyme and microbial technology, 1999, 24(5/6): 263-269.
- [24] XU Z, LI S, LI J, et al. The structural basis of *Erwinia rhapontici* isomaltulose synthase [J]. PLoS one, 2013, 8(9): e74788.
- [25] LI X, ZHAO C, AN Q, et al. Substrate induction of isomaltulose synthase in a newly isolated *Klebsiella* sp. LX3 [J]. Journal of applied microbiology, 2003, 95(3): 521-527.

- [26] KAWAGUTI H Y, BUZZATO M F, SATO H H. Isomaltulose production using free cells: optimisation of a culture medium containing agricultural wastes and conversion in repeated-batch processes [J]. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 2007, 34 (4): 261-269.
- [27] CHO M H, PARK S E, LIM J K, et al. Conversion of sucrose into isomaltulose by *Enterobacter* sp. FMB1, an isomaltulose-producing microorganism isolated from traditional Korean food [J]. *Biotechnology letters*, 2006, 29(3): 453-458.
- [28] 卢汉浪, 许黎明, 吕军, 等. 亚硝基胍诱变选育高转化率异麦芽酮糖菌株 [J]. *中国食品添加剂*, 2012(6): 102-106.
- [29] KIM Y, KOO B S, LEE H C, et al. Improved production of isomaltulose by a newly isolated mutant of *Serratia* sp. cells immobilized in calcium alginate [J]. *Canadian journal of microbiology*, 2015, 61 (3): 193-199.
- [30] 张洪达, 杨帆, 薛婷婷. 常压室温等离子体诱变及高效筛选异麦芽酮糖高产菌株 [J]. *大连工业大学学报*, 2018, 37(4): 235-238.
- [31] 滕菲, 肖华, 王宁鹤, 等. 蔗糖异构酶突变菌株的构建及其应用研究 [J]. *食品研究与开发*, 2015, 36(17): 143-147.
- [32] AHN S J, YOO J H, LEE H C, et al. Enhanced conversion of sucrose to isomaltulose by a mutant of *Erwinia rhapontici* [J]. *Biotechnology letters*, 2003, 25 (14): 1179-1183.
- [33] 薛蓓, 梁甲元. 海藻酮糖的研究进展 [J]. *食品与发酵工业*, 2012, 38 (11): 127-130.
- [34] LI S, CAI H, QING Y J, et al. Cloning and characterization of a sucrose isomerase from *Erwinia rhapontici* NX-5 for isomaltulose hyperproduction [J]. *Applied biochemistry and biotechnology*, 2011, 163(1): 52-63.
- [35] ZHANG F, CHENG F, JIA D X, et al. Characterization of a recombinant sucrose isomerase and its application to enzymatic production of isomaltulose [J]. *Biotechnology letters*, 2021, 43(1): 261-269.
- [36] CHA J, JUNG J H, PARK S E, et al. Molecular cloning and functional characterization of a sucrose isomerase (isomaltulose synthase) gene from *Enterobacter* sp. FMB-1 [J]. *Journal of applied microbiology*, 2009, 107(4): 1119-1130.
- [37] ZHANG P, WANG Z P, SHENG J, et al. High and efficient isomaltulose production using an engineered *Yarrowia lipolytica* strain [J]. *Bioresource technology*, 2018, 265: 577-580.
- [38] PARK J Y, JUNG J H, SEO D H, et al. Microbial production of palatinose through extracellular expression of a sucrose isomerase from *Enterobacter* sp. FMB-1 in *Lactococcus lactis* MG1363 [J]. *Bioresource technology*, 2010, 101(22): 8828-8833.
- [39] ZHANG P, WANG Z P, LIU S, et al. Over-expression of secreted sucrose isomerase in *Yarrowia lipolytica* and its application in isomaltulose production after immobilization [J]. *International journal of biological macromolecules*, 2019, 121: 97-103.
- [40] WU L T, WU S S, QIU J J, et al. Green synthesis of isomaltulose from cane molasses by *Bacillus subtilis* WB800-pHA01-PaII in a biologic membrane reactor [J]. *Food chemistry*, 2017, 229: 761-768.
- [41] KAWAGUTI H Y, SATO H H. Palatinose production by free and Ca-alginate gel immobilized cells of *Erwinia* sp [J]. *Biochemical engineering journal*, 2007, 36 (3): 202-208.
- [42] ORSI D C, KAWAGUTI H Y, SATO H H. Glucosyltransferase production by *Klebsiella* sp. K18 and conversion of sucrose to palatinose using immobilized cells [J]. *Publication of the Brazilian society for microbiology*, 2009, 40(1): 66-72.
- [43] KAWAGUTI H Y, SATO H H. Production of isomaltulose obtained by *Erwinia* sp. cells submitted to different treatments and immobilized in calcium alginate [J]. *Ciência e tec-*

- nologia de alimentos, 2011, 31(1): 257-263.
- [44] DE OLIVA-NETO P, MENÃO P T P. Iso-maltulose production from sucrose by *Protaminobacter rubrum* immobilized in calcium alginate [J]. Bioresource technology, 2009, 100(18): 4252-4256.
- [45] KAWAGUTI H Y, CELESTINO É M, MORAES A L L, et al. Characterization of a glucosyltransferase from *Erwinia* sp. D12 and the conversion of sucrose into isomaltulose by immobilized cells [J]. Biochemical engineering journal, 2010, 48(2): 211-217.
- [46] MUNDRA P, DESAI K, LELE S S. Application of response surface methodology to cell immobilization for the production of palatinose [J]. Bioresource technology, 2007, 98(15): 2892-2896.
- [47] HELLMERS F, TAKORS R, THUM O. Robust enzyme immobilizates for industrial isomalt production [J]. Molecular catalysis, 2018, 445: 293-298.
- [48] MU W M, LI W J, WANG X, et al. Current studies on sucrose isomerase and biological isomaltulose production using sucrose isomerase [J]. Applied microbiology and biotechnology, 2014, 98(15): 6569-6582.
- [49] CONTESINI F J, IBARGUREN C, GROSSO C R F, et al. Immobilization of glucosyltransferase from *Erwinia* sp. using two different techniques [J]. Journal of biotechnology, 2012, 158(3): 137-143.
- [50] WU L T, LIU Y, CHI B, et al. An innovative method for immobilizing sucrose isomerase on ϵ -poly-L-lysine modified mesoporous TiO_2 [J]. Food chemistry, 2015, 187: 182-188.
- [51] 耿梦华, 陈晟, 吴敬, 等. 吸附交联法固定化蔗糖异构酶及其在异麦芽酮糖制备中的应用 [J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(4): 104-110.
- [52] KIM D, KU S. *Bacillus* cellulase molecular cloning, expression, and surface display on the outer membrane of *Escherichia coli* [J]. Molecules, 2018, 23(2): 503.
- [53] LIU Y, LI S, XU H, et al. Efficient production of d-tagatose using a food-grade surface display system [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2014, 62(28): 6756-6762.
- [54] LEE G Y, JUNG J H, SEO D H, et al. Iso-maltulose production via yeast surface display of sucrose isomerase from *Enterobacter* sp. FMB-1 on *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Bioresource technology, 2011, 102(19): 9179-9184.
- [55] ZHAN Y J, ZHU P, LIANG J F, et al. Economical production of isomaltulose from agricultural residues in a system with sucrose isomerase displayed on *Bacillus subtilis* spores [J]. Bioprocess and biosystems engineering, 2020, 43(1): 75-84.
- [56] KURODA K, MATSUI K, HIGUCHI S, et al. Enhancement of display efficiency in yeast display system by vector engineering and gene disruption [J]. Applied microbiology and biotechnology, 2009, 82(4): 713-719.
- [57] MICHAEL F, ROBERT S. Methods in molecular biology [M]. Totowa, NJ: Humana Press, 2004.
- [58] ZHENG Y, WANG Z P, JI X F, et al. Display of a sucrose isomerase on the cell surface of *Yarrowia lipolytica* for synthesis of isomaltulose from sugar cane by-products [J]. 3 biotech, 2019, 9(5): 1-7.