淀粉基未来食品及其制备方法研究进展

宿玲恰[1,2]，　吴　敬[*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 生物工程学院，江苏 无锡 214122）

摘要：随着现代社会经济的快速发展，人们生活水平显著提高，饮食需求从吃饱求生存转变为吃好求健康，未来食品成为食品领域学术界和产业界关注的热点。以淀粉基食品为代表的碳水化合物为人体主要能量来源，但淀粉基食品在人体内易消化后造成能量过剩，带来一系列亚健康问题。在加工过程中可通过改变淀粉及其部分降解产物分子结构或键型来降低其热量，同时还兼具益生功能，这有利于迎合未来大众消费者对营养健康的需求，已成为未来食品领域研究的重要组成部分。作者概述了淀粉改性产品种类及其生化特征和生理功能，并重点阐述了其制备方法研究进展，可为进一步开发和生产淀粉基未来食品提供理论基础和技术指导。

关键词：淀粉；淀粉加工；酶；健康食品

中图分类号：TS 236.9　**文章编号：**1673-1689(2021)12-0005-12　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.12.002

Research Progress of Starchy-Based Future Food and Its Preparation Methods

SU Lingqia[1,2]，　*WU Jing*[*1,2]

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

Abstract: With the rapid development of economy in modern society, people's living standard has been significantly improved, and the dietary demand has shifted from survival to health. Future food has been a focus of attention in the academia and industryin food field. Carbohydrates, represented by starchy-based food, are the main energy sources of human body, however, starchy foods are easy to digest in human body, resulting in excess energy and a series of sub-health problems. Caloric reduction and prebiotic functions can be obtained by changing the molecular structures or bond types of starch and its partial degradation products.These new products are conducive to meet the nutrition and health needs of public consumers in the future, becoming an important part of future research in food field. This paper summarizes the types, biochemical characteristics and physiological functions of modified starch products, and the research progress of their preparation methodsis emphasized. This paper could provide theoretical basis and technical guidance for the further development and production of starch-based future food.

Keywords: starch, starch processing, enzymes, healthy food

收稿日期：2021-08-10

基金项目：国家自然科学基金项目(31730067,31771916)。

作者简介：宿玲恰(1987—)，女，博士，教授，硕士研究生导师，主要从事酶工程研究。E-mail：sulingqia@jiangnan.edu.cn

*** 通信作者：**吴　敬(1969—)，女，博士，教授，博士研究生导师，主要从事食品生物技术研究。E-mail：jingwu@jiangnan.edu.cn

民以食为天,食物是人类生存和发展的首要需求。在人类文明历程中,一直在为吃饱肚子而奋斗。自农耕文明时期,人们从食物的采集者转变为生产者。中国早期的农业格局主要表现为,在北方主要是种植粟的旱作农业,在南方则是以种植水稻为主的水田农业,此外,人们还种植了谷、黍、粱、大豆、小豆、大麻、小麦、瞿麦等多种作物[1]。根据环境适应性好、产量高且稳定、收集加工方便、耐储存、易消化、口感佳、营养好等需求,通过物竞人择,逐渐形成了南稻北麦的格局,并一直流传至今[2]。稻麦的主要组分为淀粉(碳水化合物),占据了 60%~80%的比例[3-4]。目前,人们还常食用以淀粉组分为主的玉米、红薯、马铃薯、山药、绿豆、豌豆、燕麦等食品,通常称这些食品为淀粉类食品。淀粉类食品经过加工烹饪后可直接食用,淀粉还可以进一步被加工为各类糊精及糖浆,其结构、物化性质和风味得到改善,广泛用于饮料、烘焙、奶制品、罐头、糖果、啤酒等食品工业[3,5-6]。

现代经济和社会发展迅速,人民生活水平发生了翻天覆地的变化,也形成了一些过量饮食及高热量饮食的习惯,造成体内能量过剩,导致肥胖人数快速上升,并带来一系列亚健康问题。为了应对这些问题,我国各级相关部门提出合理膳食行动,鼓励全社会“减盐、减油、减糖”。对于“减糖”而言,应减少蔗糖、葡萄糖、果糖等游离糖摄入量,同时还需关注隐形糖。淀粉类食品即为一种隐形糖,因为淀粉及其降解产物可被人体消化酶降解成葡萄糖[7]。《中国食物成分表标准版》数据显示,淀粉类食品的升糖指数普遍较高,以标准食物葡萄糖计为 100,比如大米饭(精米)为 90、大米饭(糙米)为 78、馒头(富强粉)为 88、馒头(全麦粉)为 82、麦芽糖为 105 等。升糖指数还与淀粉来源、淀粉结构和加工烹饪方法有关[8-9]。这些升糖指数高的食物进入肠道后消化快、吸收好,易导致高血糖和高血压等问题产生,增加罹患肥胖、糖尿病和心血管疾病等的风险[10-11]。

鉴于淀粉类食品(碳水化合物)带来的诸多问题,引发了低碳水化合物饮食的热潮,甚至取消一切碳水化合物,以减少能量摄入量。事实上,摄入一定量的碳水化合物对人体健康是必需的。从生理角度来讲,人体 50%的能量建议由碳水化合物提供,并且葡萄糖是大脑的主要能量来源,葡萄糖代谢的严格调节是大脑生理机能的关键[12-13]。从心理需求来讲,自古以来人们已经习惯于以淀粉为主食,难以接受长期不吃碳水化合物的生活。

基于人类生存环境和饮食需求的转变,传统食品行业面临巨大挑战。为了解决食物供给、食物质量、食品安全和营养等问题,未来食品行业将开发和利用多学科前沿颠覆性技术,根据营养与功能的多元化需求,实现未来食品高效、智能、定制化生产[14-15]。淀粉基未来食品为未来食品技术发展的重要组成部分,开展淀粉基未来食品科技创新和产业协同发展,高效生产出更加营养、健康、美味的新型淀粉加工食品,对我国食品工业健康可持续发展具有重大意义。目前,已有多种方法可以适当改变淀粉类食品性质,获得低热量且具有益生作用的淀粉改性产品。这些产品主要包括抗性淀粉、环糊精、抗性糊精和低聚异麦芽糖等。作者介绍了其生化特征和生理功能,重点阐述了各产品的制备方法,列举和分析了相关案例,并对其发展趋势提出了建议。

1 抗性淀粉

抗性淀粉(resistant starch,RS)是不被健康个体小肠所吸收的淀粉及其降解物的总称,是一种不可溶膳食纤维,存在于多种淀粉类食品中。抗性淀粉具有许多优良的理化特性,如溶胀性、增黏性和成胶性好、持水性低、粒径小、颜色浅、口感舒适,可在食品加工过程中有效改善加工工艺和产品质构[16-17]。抗性淀粉可以在大肠中被肠道微生物发酵产生多种短链脂肪酸(如乳酸和琥珀酸等)以及多种气体。抗性淀粉及其代谢产物能够在人体内发挥多种生理功能,如改善胃肠道功能、预防多种肠道疾病、防控糖尿病、降低血糖指数和胆固醇、抗肿瘤、调节免疫、增加有益菌、促进矿物质的吸收等,从而促进人体健康[18-19]。因此,抗性淀粉作为一种新型膳食纤维,其性质和功能优于传统膳食纤维,已成为食品领域研究的热点,引起了食品企业、营养学家和消费者的广泛关注。

根据来源和性质差异,抗性淀粉可分为 5 种类型 (见表 1)。其中,RS1 和 RS2 主要来源于天然淀粉,其晶体结构紧密,并且由于颗粒大导致比表面积小;同时,淀粉颗粒表面的光滑致密层能够阻碍淀粉与酶分子接触,因此消化率低[20]。RS3、RS4 和 RS5 均需经过淀粉加工改性生成。RS3 是目前研究和应用最广泛的抗性淀粉类型,它是一种在加工过

程中通过老化回生作用由直链淀粉形成的短直链晶体;RS4 是在化学作用下通过改变淀粉分子结构或引入新的化学基团,从而限制其被酶解并且也不能被微生物发酵利用的淀粉;RS5 是一种新型抗性淀粉,是由直链淀粉与脂质结合形成的具有螺旋结构的复合物[18,21]。

表 1 抗性淀粉的分类、来源和特征[16,22]

Table 1 Classification, sources and characteristics of resistant starch

名称	类型	来源	抗消化机制	小肠内消化情况	加工过程的影响
RS1	物理包埋淀粉	部分粉碎的种子、豆类、谷物	细胞壁或蛋白质等物理结构阻碍淀粉消化	消化缓慢、部分被消化	降低颗粒大小影响含量
RS2	生淀粉颗粒	生豌豆、生土豆、生香蕉、高直链玉米淀粉	紧密的直链淀粉结构,形成 B-型晶体	消化缓慢、几乎不被消化	加热并增加直链淀粉比例以增加含量
RS3	回生淀粉	糊化和冷却后的回生淀粉	老化的直链淀粉	难消化	加热或巴氏杀菌处理增加含量
RS4	化学改性淀粉	经化学修饰形成的淀粉	交联或合成衍生物改变淀粉结构	难消化	化学修饰提高含量
RS5	淀粉-脂肪复合物	含淀粉和脂质的谷物、食品	直链淀粉和脂质组成的难以消化的螺旋结构	难消化	高温处理提高含量

抗性淀粉含量受到淀粉来源、颗粒结构、晶体类型、直链淀粉和支链淀粉组分比例、加工工艺、储存条件等多种因素的影响。鉴于抗性淀粉优良的功能特性和市场需求,越来越多的研究人员致力于通过改进传统的改性方法和技术创新来提高抗性淀粉产量,以促进抗性淀粉的工业化生产。目前,抗性淀粉(主要指 RS3、RS4 和 RS5)主要是通过物理法、化学法、生物法的单一工艺或多种工艺组合进行制备,通过改变分子组成和结构,达到抗消化的作用。

RS3 可通过热处理、挤压处理、微波处理、超声波处理等物理法以及淀粉脱支酶和 α-淀粉酶等酶解法制备。RS3 的制备过程通常分为两步:第一步为淀粉水化和糊化,将淀粉浆在高温下处理使淀粉颗粒溶胀、分裂,直链淀粉作为一种无规则的螺旋聚合物被浸出到溶液中,淀粉脱支酶和 α-淀粉酶等能够通过部分水解淀粉聚合物促进该过程发生;第二步淀粉回生,柔性直链淀粉聚合物以双螺旋的形式重结晶,形成通过氢键连接的更紧密结晶结构(见图 1)。

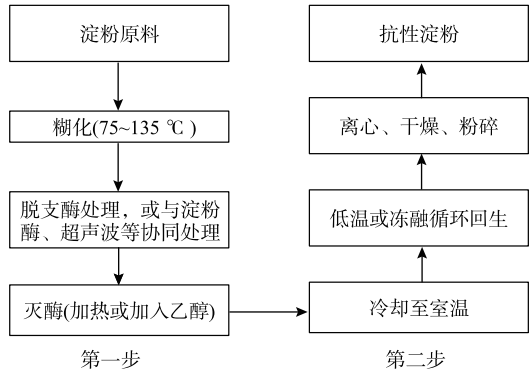


图 1 RS3 制备流程

Fig. 1 Production process of RS3

由于 RS3 主要是由直链淀粉老化回生生成,因此,直链淀粉的含量对 RS3 的制备至关重要。天然淀粉分子中主要含 α-1,4 糖苷键和 α-1,6 糖苷键,其中 α-1,6 糖苷键使淀粉分子形成分支结构。淀粉脱支酶能够水解分支点的 α-1,6 糖苷键,产生直链淀粉。早在 1986 年,Berry 等报道了在不同来源淀粉中加入淀粉脱支酶对淀粉进行脱支处理提高了抗性淀粉含量[23]。随后,已有大量研究考察并优化了淀粉脱支酶处理条件并联合多种工艺来进一步提升抗性淀粉质量分数(见表 2)。研究表明,提高加酶量和延长反应时间有利于支链淀粉充分脱支,提升结晶程度和抗性淀粉含量,如当以糯米淀粉为底物,经普鲁兰酶处理 4 h 和 24 h 时,抗性淀粉质量分数分别达到 30%和 44%[24]。以蜡质高粱淀粉为底物,经异淀粉酶处理 8 h 和 12 h,抗性淀粉质量分数分别达到 32.1%和 74.4%[25]。压热—冷却及其重复处理、变温循环、超声波处理等是与淀粉脱支酶结合促进淀粉回生和提高抗性淀粉含量的常用方法。Babu 等研究了压热处理、脱支时间和回生温度对甘薯淀粉组分的影响,发现脱支处理 21 h 和 4 ℃回生 24 h 后可使抗性淀粉质量分数最高达到 63%[26];Li

等将小麦淀粉经普鲁兰酶脱支处理和 3 次湿热处理后,形成了更有序的结构,抗性淀粉质量分数达到 80.50%[27]。当脱支后的葛根淀粉和糯米淀粉在 4 ℃和-20 ℃交替温度（每隔 24 h 变温）循环处理 4 d 后,结晶量均达到最大,分别为 78.80%和 82.78%,有利于生成更多的抗性淀粉[28-29]。此外,考虑到较短的直链淀粉有利于分子接触并形成结晶结构,采用 α-淀粉酶或 β-淀粉酶对淀粉进行一定降解可以降低聚合度,增加淀粉分子的流动性,从而增强制备效果,如 Zhou 等发现经普鲁兰酶处理的籼稻淀粉的抗性淀粉质量分数为 35.2%,当 α-淀粉酶进行预处理,淀粉分子链长减小,抗性淀粉质量分数增加到47.0%[30]。

表 2　淀粉脱支处理协同其他工艺制备抗性淀粉

Table 2　Preparation of resistant starch by starch debranching treatment and other processes

底物	脱支酶	其他主要处理方法		抗性淀粉质量分数/%	参考文献
糯米淀粉	诺和诺德公司普鲁兰酶	压热处理(121 ℃, 30 min); 冷却 1 ℃		44.0	[24]
非糯性大米淀粉				50.0	
蜡质高粱淀粉	Sigma 公司异淀粉酶(处理 8 h)	1 ℃, 3 d		32.1	[25]
	Sigma 公司异淀粉酶(处理 12 h)			74.4	
蜡质玉米淀粉	诺维信公司普鲁兰酶	25 ℃,24 h		70.7	[31]
甘薯淀粉	Sigma 公司普鲁兰酶	压热处理(120 ℃, 30 min); 回生(4 ℃, 24 h)		63.1	[26]
小麦淀粉	天野公司普鲁兰酶	室温 24 h; 100 ℃, 3 h; 45 ℃, 24 h, 循环 3 次		80.5	[27]
马铃薯淀粉	温泉宏基因组获得的普鲁兰酶	121 ℃, 30 min; 4 ℃过夜		45.0	[32]
水山药淀粉	Megazyme 公司异淀粉酶	湿热处理重复 5 次		96.5	[33]
蜡质玉米淀粉	Megazyme 公司异淀粉酶	50 ℃热处理		83.2	[34]
早籼米淀粉	Sigma 普鲁兰酶	Sigma 公司 α-淀粉酶	4 ℃过夜	47.0	[30]
玉米淀粉	杰能科公司普鲁兰酶	Sigma 公司 α-淀粉酶	4 ℃过夜	58.9	[35]
马铃薯淀粉	*Bacillus acid pullulyticus* 普鲁兰酶	*Bacillus cereus* β-淀粉酶	室温 20 min; 4 ℃, 16 h	36.3	[36]
		A. oryzae α-淀粉酶		36.8	
葛根淀粉		*Bacillus cereus* β-淀粉酶		47.5	
		A. oryzae α-淀粉酶		53.4	
玉米淀粉	*Bacillus lentus* 异淀粉酶	诺维信公司 α-淀粉酶;121 ℃,1 h;4 ℃过夜		53.8	[37]
玉米淀粉 (25%直链淀粉)	日本林原公司异淀粉酶	Megazyme 公司 β-淀粉酶; 135 ℃, 30 min; 95 ℃, 24 h; 133 ℃, 30 min; 95 ℃, 24 h; 重复 1 次; 50 ℃, 48 h		55.5	[38]
Hylon V (50%直链淀粉)				70.7	
Hylon VII (70%直链淀粉)				67.9	
甘薯淀粉	Sigma 公司普鲁兰酶	Sigma 公司 α-淀粉酶	121 ℃, 30 min; 4 ℃, 24 h	65.0	[39]
		诺维信麦芽糖淀粉酶		60.4	
		诺维信麦芽糖淀粉酶		68.0	
豌豆淀粉	Sigma 公司普鲁兰酶	超声波处理;118 ℃, 30 min;4 ℃, 14 d		25.0	[40]

RS4 主要是通过添加化学试剂使淀粉分子发生酯化、磷酸化、醚化、羟丙基化等作用而制得,由于化学基团的引入,淀粉分子结构改变,空间位阻增大,淀粉与消化酶的结合位点减少,抗酶解能力增强[41-43]。如 Sha 等采用乙酰化法对早籼稻进行化学改性,当乙酰基质量分数在 0.59%~5.30%时,RS4 质量分数均高于 53%,并且发现乙酰化淀粉的抗酶解性取决于淀粉颗粒的取代度和完整性[44]。Wu 等首次采用真空、微波和红外照射方法合成了柠檬酸酯化的芭蕉淀粉,并研究了淀粉分子结构、理化性质和体外消化情况的变化,当取代度达到 0.273 时,耐热性的抗性淀粉最高质量分数达到 86.5%[43]。王步枢等采用柠檬酸处理甘薯淀粉,通过酯化反应使淀粉分子交联,以获得柠檬酸甘薯淀粉酯,并且抗性淀粉含量随着柠檬酸甘薯淀粉酯取代度的增加而增加,到一定程度时完全不被酶解。同时,研究发现淀粉酯化过程中发生一定降解,聚合度降低,并且适当取代度的柠檬酸淀粉酯白度增加[45]。Sang 等通过在碱性条件下加入三偏磷酸钠使小麦淀粉被磷酸化,从而得到高度交联的淀粉,经检测发现,二淀

粉单磷酸酯水平与 RS4 含量正相关(R=0.96),并且与膳食总纤维水平正相关(R=0.90)[46]。Falsafi 等也发现提高交联剂三偏磷酸钠/三聚磷酸钠浓度、增大 pH 值和运用超声处理能够提高抗性淀粉含量[42]。牛博文等将红薯淀粉进行了醋酸酯化、羧甲基醚化以及磷酸酯交联化,得到的 3 种抗性淀粉抗酶解性均比原淀粉显著提高,并且酯化和醚化淀粉略高于交联淀粉[47]。Lyu 等将甘薯淀粉经过羧甲基化和槲皮素共价修饰,获得了一种抗氧化性和耐热性强的新型 RS4-槲皮素-羧甲基甘薯淀粉酯[48]。

RS5 通常是由直链淀粉和脂质形成的复合物,脂质的烷基链部分包含在直链淀粉螺旋空腔中,而极性基团在外部[49]。Hasjim 等采用高直链玉米淀粉 VII(HA7)与棕榈酸复合制备了该种新型抗性淀粉,并采用热处理、异淀粉酶脱支处理以促进淀粉-脂质复合物形成,获得的抗性淀粉质量分数为 52.7%,显著高于原淀粉(35.4%),这主要归因于脱支淀粉回生和淀粉-脂质复合物的形成[50]。随后,多项研究表明,淀粉-脂质复合物可由各种来源的淀粉制备,并且适当水平的脱支处理可以产生更多长度合适的线性链,从而促进淀粉-脂质复合物的形成[51-54]。当制备木薯、水稻和鹰嘴豆的淀粉-月桂酸复合物时,与未脱支淀粉相比,经普鲁兰酶脱支处理后,复合物含量增加了 2~9 倍,并且随着支链淀粉含量和脱支生成的短链比例的增加而增加[51]。随着脱支时间延长(从 2 h 到 24 h),高直链玉米淀粉-月桂酸复合物从 3.22 g/hg(以干淀粉计)增加到 3.71 g/hg,抗性淀粉质量分数从 25.3%增加到 45.6%[54]。除了淀粉种类和脱支处理等影响外,不同脂质对于复合物的形成也具有一定影响。Okumus 等研究了棕色小扁豆淀粉和不同脂质复合对抗性淀粉质量分数的影响,发现在生淀粉和熟淀粉中添加脂质均能显著增加抗性淀粉质量分数,其中在熟淀粉中添加氢化葵花油获得的抗性淀粉质量分数最高,比原淀粉增加了 67.7%[55]。Lu 等研究表明,以普鲁兰酶脱支后的糯玉米淀粉与不同碳链长度的饱和脂肪酸(C6 至 C18)形成复合物时,碳原子数与复合指数值呈线性负相关(R^2=0.94)。可能是由于随着碳链长度增加,空间位阻增大,溶解度降低,并且脱支淀粉的相对分子质量和螺旋结构长度都低于直链淀粉,不利于碳原子数较高的饱和脂肪酸进入淀粉空腔。同时,与脱支淀粉相比,复合物相对结晶度提高了 2~3 倍,并且与脂肪酸碳链长度呈正相关,长链脂肪酸形成的抗性淀粉质量分数也高于短链脂肪酸,由己酸的 33.06%增加到硬脂酸的 47.43%[56]。然而,也有研究发现长链脂肪酸更有利于与普鲁兰酶脱支后的小麦淀粉形成复合物,这可能与不同的制备工艺和淀粉来源有关[57]。

2 环糊精

环糊精是由 α-1,4-糖苷键连接形成的环状低聚糖。常见的 α-、β-以及 γ-环糊精分别由 6 个、7 个或 8 个葡萄糖单元组成[58]。其中,α-环糊精空腔最小,具有化学性质稳定、溶解度高、难消化等优势,并且还能够预防和改善糖尿病、调整肠胃功能、改善便秘、减肥等。因此,α-环糊精被认为是一种新型的膳食纤维[59-60]。

环糊精通常由环糊精葡萄糖基转移酶(cyclodextrin glycosyltransferase,CGTase)催化淀粉或其衍生物发生环化反应(分子内转糖基化反应)产生[61]。根据 CGTase 主产物类型,CGTase 可分为α-、β-及 γ-CGTase,以及混合型 α/β-和 β/γ-CGTase[62]。然而,CGTase 的产物特异性差,天然来源的 CGTase 转化淀粉生成的产物均为不同质量分数的 α-、β-、γ-环糊精混合物,导致下游分离提取成本高。为了提高 CGTase 产物特异性,研究者开展了CGTase 结构解析和分子改造的工作[63]。基于CGTase 晶体结构以及底物或底物类似物的复合物晶体结构分析和定点突变研究表明,位于活性中心附近的底物结合凹槽通常存在 9 个亚位点,分别为供体底物结合亚位点-7~-1 以及受体底物结合亚位点+1 和+2,每个亚位点结合一个葡萄糖单元[64-65]。研究表明,-7、-6和-3 亚位点是影响 CGTase 催化制备环糊精产物特异性的关键区域,相关氨基酸突变会使各环糊精生成比率发生显著变化[66-68]。目前已有一些 α-CGTase 分子改造提升 α-环糊精质量分数的研究(见表 3)。当底物糖链的非还原端在 CGTase 的-7 或-6 亚位点结合时,经过环化反应可分别生成产物 β-环糊精或 α-环糊精。通过分子改造可减弱-7 亚位点糖单元与酶的相互作用,使 *P. macerans* CGTase 产 β-环糊精能力降低,从而提升 α-环糊精比率[68]。-3 亚位点对于线性或环状糖链的构象具有显著影响,因此也可通过优化-3 亚位点提升 CGTase 的产物特异性。将-3 亚位点 Asp372 和

表 3 α-CGTase 分子改造提升 α-环糊精质量分数

Table 3 Molecular modification of α-CGTase to increase α-cyclodextrin mass ratio

位点	酶	突变体	α-环糊精质量分数/%	参考文献
-7 亚位点	*P. macerans* CGTase	野生型	63.2	[68]
		R146A	68.1	
		D147A	68.8	
		R146P	71.4	
		D147P	73.0	
		R146A/D147P	75.1	
		R146P/D147A	76.1	
		R146P/D147P	76.8	
-6 亚位点	*Bacillus* sp. 602-1 CGTase	野生型	77.0	[70]
		Y167H	87.0	
		Y167HH	90.0	[71]
		Y167HHH	93.0	
-3 亚位点	*P. macerans* JFB05-01 CGTase	野生型	41.8	[72]
		D372K	54.3	
		Y89R	58.2	
		D372K/Y89R	65.0	

Tyr89 进行定点突变,可获得 α-环糊精产物比率提升的突变体,这可能与稳定环化反应过程中间态有关[69]。

改进 CGTase 催化工艺也是一种提高 α-环糊精比率的有效手段。根据 CGTase 催化制备环糊精的过程中是否添加有机试剂,该过程可分为非溶剂控制过程和溶剂控制过程。前者主要是基于 3 种环糊精的不同溶解度进行分离,但该法主要适用于溶解度较低的 β-环糊精的制备[61];后者是添加有机试剂,选择性与某种环糊精形成不溶于水的复合物沉淀,阻碍环糊精与 CGTase 活性中心结合并削弱产物抑制效应,促使反应向生成特定环糊精的方向进行,从而提高特定环糊精的产量[73]。可通过添加醇类分子作为复合剂提高 α-环糊精产量,如 Gawande 等在 *Klebsiella pneumonia* α-CGTase 催化反应体系中添加了体积分数为 2% 的正丁醇,α-环糊精产量提高了 2.8 倍,α-环糊精质量分数达到 95.6%[74]。Li 等系统研究了 25 种醇对环糊精产率和环糊精配比的影响,发现线性一元醇对 α-环糊精合成的影响大于碳原子数相近的支链一元醇和二醇。线性醇对 α-环糊精选择性的影响最大,大于 8 个碳原子的线性饱和一元醇最能提高 α-环糊精的选择性[75]。此外,研究者发现正己烷和环己烷等饱和烃试剂也可作为复合剂提升 α-环糊精产量[76]。

CGTase 催化制备 α-环糊精还存在底物转化率低的问题,研究表明,3 种环糊精的总转化率普遍低于 60%[70,72,77]。其原因是天然淀粉底物中存在 α-1,4 糖苷键和 α-1,6 糖苷键,但 CGTase 不能水解 α-1,6-糖苷键,导致分支糊精不能被利用[78]。为了提高底物利用率,需要 CGTase 与淀粉脱支酶(普鲁兰酶或异淀粉酶)进行协同催化。然而,由于环糊精会抑制常见淀粉脱支酶(如普鲁兰酶)的催化活性[70],脱支与环化过程需分步进行,第一步为淀粉脱支酶水解淀粉 α-1,6 糖苷键,第二步为 CGTase 催化环化反应生成环糊精。Rendleman 采用普鲁兰酶和 CGTase 分步催化制备环糊精,转化率提升至 84%,但由于淀粉脱支后的短直链淀粉产物容易形成结晶沉淀,后续的环化反应缓慢,反应周期长达数天[80]。Duan 等鉴定了一种不受环糊精抑制的异淀粉酶,当其与 α-CGTase 同步作用于淀粉制备环糊精时,转化率达到 84.6%,并且由于脱支反应产生的短直链淀粉能够及时被 α-CGTase 环化,产生的结晶沉淀量有限,因此反应周期大大缩短,只有 24 h[78]。

3 抗性糊精

抗性糊精,又称难消化糊精、异麦芽糊精、改性

糊精,是一类含有耐人体消化酶消化的 α-1,6、α-1,3 和 α-1,2 糖苷键的麦芽糊精(此处也包括可溶性 α-葡聚糖),其不易被人体内消化酶降解,能够进入大肠并促进益生菌增殖;同时它还具有水溶性好、饱腹感强、耐热、耐酸、低褐变等特点,作为一种优质水溶性膳食纤维在保健品、烘焙、饮料、乳制品等行业应用广泛[81-82]。

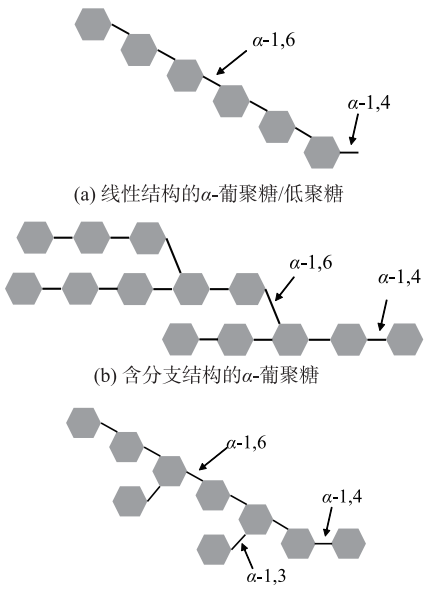
抗性糊精的传统制备方法主要是高温酸解化学法,其过程为将淀粉在高温酸性条件下处理形成含有不同键型的焦糊精,然后进一步采用 α-淀粉酶降解其中易消化的 α-1,4 糖苷键,并通过色谱分离纯化获得抗性糊精产品[81,83]。然而,该方法原料利用率低、能源消耗大,并且易产生糠醛类有害成分。采用 α-葡萄糖基转移酶催化制备抗性糊精能够作为一种高效、绿色、节能、安全的替代方法,改进抗性糊精生产工艺,显著提高产品品质。

α-葡萄糖基转移酶能够水解淀粉或麦芽糊精等糖基供体的 α-1,4 糖苷键,然后将活化的糖基转移到糖基受体上从而形成特异的糖苷键,主要包括分支酶、α-葡萄糖苷酶、麦芽糖淀粉酶、4,6-α-葡萄糖基转移酶、4,3-α-葡萄糖基转移酶等[84-85]。其中,4,6-α-葡萄糖基转移酶和 4,3-α-葡萄糖基转移酶是近几年发现的 GH70 家族酶的新分支,能够分别催化生成 α-1,6 和 α-1,3 糖苷键,并且具有作用底物谱较宽、产物形式多样、抗性成分及产率较高等优势[84]。

根据其产物类型结构,主要分为两种形式,第一种是线性结构的 α-葡聚糖/低聚糖(见图 2(a)),主要由多个连续的 α-1,6 糖苷键连接葡萄糖单元而成,其还原端含有少量 α-1,4 糖苷键连接的葡萄糖单元[86]。由于该种产物 α-1,6 糖苷键含量高,因此具有高度抗消化能力。例如,Gangoiti 等鉴定了 *Exiguobacterium sibiricum* 255-15 来源的酶 GtfC,其能够催化麦芽四糖到麦芽七糖以及直链淀粉制备的异麦芽/麦芽寡糖(isomalto/malto-oligoside,IMMO),产物中 α-1,6 糖苷键的比例与底物链长呈现正相关,当以直链淀粉为底物时,产物中 α-1,6 糖苷键的比例最高,为 52%[87]。Leemhuis 等以 *Lactobacillus reuteri* 121 GTFB 酶催化 30 种不同来源的淀粉、麦芽糊精、α-葡聚糖底物制备异麦芽/麦芽多糖(isomalto/malto-polysaccharides,IMMPs),发现 GTFB 单独催化富含直链淀粉且分支度低的底物时,α-1,6 糖苷键的比例最高,而当 GTFB 反应前或反应时,底物经过脱支处理,基本上所有底物均可被利用。通过底物选择、添加脱支酶、调整反应时间和 GTFB 酶浓度,可以控制 IMMP 产品中 α-1,6 糖苷键的比例为 0~92%[86]。

第二种是含分支结构的 α-葡聚糖(见图 2(b)),主要是以含有 1~5 个由 α-1,4 糖苷键连接的麦芽低聚糖为结构单元,通过 α-1,6 和 α-1,3 糖苷键连接而成,α-1,6 或 α-1,3 糖苷键位于糖链末端或分支点[88-89]。由于 α-1,6 糖苷键和 α-1,3 糖苷键不是连续出现的,其含量普遍低于上述第一种产物。有研究者鉴定了 *Azotobacter chroococcum* NCIMB 8003 来源的一种新型 4,6-α-葡聚糖转移酶 GtfD,其催化淀粉的产物为具有交替 α-1,4 和 α-1,6 糖苷键的高相对分子质量支链 α-葡聚糖,与 *Lactobacillus reuteri* 葡聚糖酶以蔗糖为底物合成的产物非常相似[90]。随后,鉴定了 4 个 GtfD 酶,并发现 *Paenibacillus beijingensis* DSM 24997 来源的 GtfD 能够分别合成高相对分子质量(2.7×10^7)和低相对分子质量(1.9×10^4)的 α-葡聚糖,其 α-1,4 和 α-1,6 糖苷键的比例分别为 71:29 和 77:23。该 α-葡聚糖消化性与其 α-1,4 和 α-1,6 糖苷键比例呈负相关[88]。该课题组还鉴定了 *Lactobacillus fermentum* NCC 2970 来源的 4,3-α-葡萄糖基转移酶,该酶为目前发现的惟一一个能够催化淀粉类底物合成含α-1,3 糖苷键的 α-葡聚糖酶。当以麦芽七糖和直链淀粉为底物时,产物中以 α-1,4 糖苷键和 α-1,3 糖苷键连接的葡萄糖残基的摩尔比分别为 86:14 和 81:19[89]。

由于上述含 α-1,4 和 α-1,6 糖苷键的产物仍可被人体消化酶部分消化,因此,在此基础上继续引入 α-1,3 糖苷键,作为进一步降低其消化性的有效途径。分支葡聚糖蔗糖酶、4,6-α-葡萄糖基转移酶和 4,3-α-葡萄糖基转移酶同属于 GH70 家族,能够分别以蔗糖为供体和右旋糖苷为受体引入 α-1,2 或 α-1,3 糖苷键[91-92]。有研究表明 *L. kunkeei* DSM 12361 分支葡聚糖蔗糖酶 GtfZ-CD2 还能够以 IMMP 为受体,生成含 α-1,3 糖苷键的 α-葡聚糖(见图 2(c))。体外消化研究结果表明,随着 α-1,3 糖苷键比例增加,经过修饰的 IMMP 产物的消化率显著降低,高支化的聚合物基本不被消化[93]。



(a) 线性结构的α-葡聚糖/低聚糖

(b) 含分支结构的α-葡聚糖

(c) α-1,3糖苷键修饰的线性结构的α-葡聚糖/低聚糖

图 2　含 α-1,6 糖苷键的不同产物结构示意图

Fig. 2　Structural diagrams of different products including α-1,6 glycosidic bonds

4 低聚异麦芽糖

低聚异麦芽糖(isomalto-oligosaccharides,IMOs)主要是以 α-1,6 糖苷键连接的异麦芽糖、潘糖、异麦芽三糖及异麦芽四糖等低聚糖，具有不易被消化、甜度低、耐热耐酸性强、保湿性好等特征,并且还具有促进益生菌增殖、防龋齿、增强机体免疫力等生理功能,已在食品行业得到广泛应用[94-95]。

低聚异麦芽糖通常是采用 α-淀粉酶、β-淀粉酶和普鲁兰酶等将淀粉部分降解后,再通过 α-葡萄糖转苷酶催化转苷反应生成[94,96]。Niu 等以玉米淀粉为底物，通过 *Bacillus amyloliquefaciens* α-淀粉酶，barley bran β-淀粉酶、*Bacillus naganoensis* 普鲁兰酶和 *Aspergillus niger* α-葡萄糖苷酶复配催化制备 IMOs，经过反应条件优化,IMOs 质量分数达到 49.09%(以异麦芽糖、异麦芽三糖和潘糖计)[96]。Lee 等采用 *Bacillus stearothermophilus* 麦芽糖淀粉酶和 *Thermotoga maritime* α-葡萄糖苷酶催化液化后的玉米淀粉时,得到的 IMOs 质量分数达到 68%[97]。陈董力以 *Aspergillus niger* α-葡萄糖苷酶催化麦芽糖制备IMOs 的转化率为 60%[98]。在 IMOs 组分中,异麦芽三糖为促进双歧杆菌增殖的主要组分,而上述方法获得的异麦芽三糖含量较低。易子玲提出了使用 4,6-α-葡萄糖基转移酶催化淀粉合成右旋糖酐,再使用异麦芽三糖右旋糖酐酶降解右旋糖酐制备 IMOs 的两步法工艺,获得的异麦芽三糖质量分数达 65.2%[99]。

5 展　望

在食品组分中,碳水化合物是人体热量的主要来源，淀粉基食品为食用碳水化合物的主要组分。降低淀粉基食品总热量是防控肥胖等亚健康问题的有效膳食干预手段。通过新型淀粉加工工艺,提高其抗消化性能,降低其热量,从而生产出各类适应于人类健康需求的新型食品。酶是淀粉基未来食品高效生产的生物芯片,还需进一步开发具有自主知识产权的催化性能更优的淀粉加工关键酶,并实现其低成本规模化发酵制备,基于淀粉转化过程中多组分多反应类型特征,实现各种酶合理高效的复配催化应用，推动淀粉基未来食品的工业化生产,降低生产成本,提升产品品质,从而走进消费者的餐桌。同时,阐明淀粉改性产品的结构对益生功效的影响规律,并通过功能计算设计开发适合不同人群生理需求的系列产品,为实现其精准应用指明方向,助力健康中国建设。

参考文献:

[1] 吴昊.《齐民要术》中的农业与饮食文化研究[D]. 武汉:华中师范大学,2015.

[2] 林之光. 南稻北麦,南甜北咸,川湘爱辣 - 气候对我国古代饮食文化的影响[J]. 气象知识,2011(4):68-72.

[3] SHEVKANI K,SINGH N,BAJAJ R,et al. Wheat starch production,structure,functionality and applications - a review[J]. **International Journal of Food Science and Technology**,2017,52(1):38-58.

[4] 魏西根,许琳,刘建伟. 大米淀粉回生的研究进展[J]. 农产品加工(学刊),2007(10):32-34.

[5] GUZMANMALDONADO H,PAREDESLOPEZ O. Amylolytic enzymes and products derived from starch - a review[J]. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**,1995,35(5):373-403.

[6] WANG S J,COPELAND L. Effect of acid hydrolysis on starch structure and functionality:a review[J]. **Critical Reviews in Food**

Science and Nutrition,2015,55(8):1079-1095.
[7] TAKAHAMA U,HIROTA S. Interactions of flavonoids with α-amylase and starch slowing down its digestion[J]. **Food and Function**,2018,9(2):677-687.
[8] FITZGERALD M A,RAHMAN S,RESURRECCION A P,et al. Identification of a major genetic determinant of glycaemic index in rice[J]. **Rice**,2011,4(2):66-74.
[9] BEENISH G,DUTT P,PANDA B P. Effect of cooking and ageing on total glycemic index of rice,under *in vitro* conditions[J]. **International Journal of Chemical Studies**,2018,6(5):603-606.
[10] AUGUSTIN L S,FRANCESCHI S,JENKINS D J,et al. Glycemic index in chronic disease:a review[J]. **European Journal of Clinical Nutrition**,2002,56(11):1049-1071.
[11] LEEDS A R. Glycemic index and heart disease[J]. **American Journal of Clinical Nutrition**,2002,76(1):286-289.
[12] MERGENTHALER P,LINDAUER U,DIENEL G A,et al. Sugar for the brain:the role of glucose in physiological and pathological brain function[J]. **Trends in Neurosciences**,2013,36(10):587-597.
[13] MCARDLE P D,MELLOR D,RILSTONE S,et al. The role of carbohydrate in diabetes management[J]. **Practical Diabetes**,2016,33(7):237-242.
[14] 周景文,张国强,赵鑫锐,等. 未来食品的发展:植物蛋白肉与细胞培养肉[J]. 食品与生物技术学报,2020,39(10):1-8.
[15] 李兆丰,徐勇将,范柳萍,等. 未来食品基础科学问题[J]. 食品与生物技术学报,2020,39(10):9-17.
[16] RAIGOND P,EZEKIEL R,RAIGOND B. Resistant starch in food:a review[J]. **Journal of the Science of Food and Agriculture**,2015,95(10):1968-1978.
[17] 李辰,李坚斌,聂卉. 抗性淀粉及其在食品工业中的应用[J]. 中国粮油学报,2017,32(1):141-146.
[18] JIANG F,DU C,JIANG W,et al. The preparation,formation,fermentability,and applications of resistant starch[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**,2020,150:1155-1161.
[19] KEENAN M J,ZHOU J,HEGSTED M,et al. Role of resistant starch in improving gut health,adiposity,and insulin resistance[J]. **Advances in Nutrition**,2015,6(2):198-205.
[20] 刘霞,黄雅萍,卢旭,等. 抗性淀粉的结构性质与功能关系研究进展[J]. 食品与发酵工业,2020,46(18):279-286.
[21] SAJILATA M G,SINGHAL R S,KULKARNI P R. Resistant starch - a review[J]. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**,2006,5(1):1-17.
[22] TIAN S,SUN Y. Influencing factor of resistant starch formation and application in cereal products:a review[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**,2020,149:424-431.
[23] BERRY C S. Resistant starch:formation and measurement of starch that survives exhaustive digestion with amylolytic enzymes during the determination of dietary fibre[J]. **Journal of Cereal Science**,1986,4(4):301-314.
[24] GURAYA H S,JAMES C,CHAMPAGNE E T. Effect of enzyme concentration and storage temperature on the formation of slowly digestible starch from cooked debranched rice starch[J]. **Starch–Stärke**,2001,53(3/4):131-139.
[25] SHIN S I,CHOI H J,CHUNG K M,et al. Slowly digestible starch from debranched waxy sorghum starch:preparation and properties[J]. **Cereal Chemistry**,2004,81(3):404-408.
[26] BABU A S,PARIMALAVALLI R. Structural and functional characterization of RS III produced from gelatinized,enzyme-hydrolyzed and retrograded sweet potato starch[J]. **Journal of Food Measurement and Characterization**,2017,11(2):792-800.
[27] LI M,ZHANG B,XIE Y,et al. Effects of debranching and repeated heat-moisture treatments on structure,physicochemical properties and *in vitro* digestibility of wheat starch[J]. **Food Chemistry**,2019,294:440-447.
[28] ZENG F,LI T,ZHAO H,et al. Effect of debranching and temperature-cycled crystallization on the physicochemical properties of kudzu(*Pueraria lobata*) resistant starch[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**,2019,129:1148-1154.
[29] ZENG F,MA F,GAO Q,et al. Debranching and temperature-cycled crystallization of waxy rice starch and their digestibility[J]. **Carbohydrate Polymers**,2014,113:91-96.
[30] ZHOU Y,MENG S,CHEN D,et al. Structure characterization and hypoglycemic effects of dual modified resistant starch from indica rice starch[J]. **Carbohydrate Polymers**,2014,103:81-86.
[31] SHI J L,SWEEDMAN M C,SHI Y C. Structural changes and digestibility of waxy maize starch debranched by different levels of pullulanase[J]. **Carbohydrate Polymers**,2018,194:350-356.
[32] THAKUR M,SHARMA N,RAI A K,et al. A novel cold-active type I pullulanase from a hot-spring metagenome for effective

debranching and production of resistant starch[J]. **Bioresource Technology**,2021,320:1-10.

[33] TRINH K S,CHOI S J,MOON T W. Structure and digestibility of debranched and hydrothermally treated water yam starch[J]. **Starch – Stärke**,2013,65(7/8):679-685.

[34] LEE D J,KIM J M,LIM S T. Characterization of resistant waxy maize dextrins prepared by simultaneous debranching and crystallization[J]. **Food Hydrocolloids**,2021,112:1-7.

[35] ZHANG H,JIN Z. Preparation of products rich in resistant starch from maize starch by an enzymatic method[J]. **Carbohydrate Polymers**,2011,86(4):1610-1614.

[36] VILLAS-BOAS F,FRANCO C M L. Effect of bacterial β-amylase and fungal α-amylase on the digestibility and structural characteristics of potato and arrowroot starches[J]. **Food Hydrocolloids**,2016,52:795-803.

[37] LI Y,XU J,ZHANG L,et al. Investigation of debranching pattern of a thermostable isoamylase and its application for the production of resistant starch[J]. **Carbohydrate Research**,2017,446-447:93-100.

[38] LUCKETT C R,WANG Y J. Effects of β-amylolysis on the resistant starch formation of debranched corn starches[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2012,60(18):4751-4757.

[39] VILLAS-BOAS F,FACCHINATTO W M,COLNAGO L A,et al. Effect of amylolysis on the formation,the molecular, crystalline and thermal characteristics and the digestibility of retrograded starches[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**,2020,163:1333-1343.

[40] LU Z H,BELANGER N,DONNER E,et al. Debranching of pea starch using pullulanase and ultrasonication synergistically to enhance slowly digestible and resistant starch[J]. **Food Chemistry**,2018,268:533-541.

[41] WOO K S,SEIB P A. Cross-linked resistant starch:preparation and properties[J]. **Cereal Chemistry**,2002,79(6):819-825.

[42] FALSAFI S R,MAGHSOUDLOU Y,AALAMI M,et al. Physicochemical and morphological properties of resistant starch type 4 prepared under ultrasound and conventional conditions and their *in-vitro* and *in-vivo* digestibilities[J]. **Ultrason Sonochemistry**,2019,53:110-119.

[43] WU C,SUN R,ZHANG Q,et al. Synthesis and characterization of citric acid esterified canna starch (RS4) by semi-dry method using vacuum-microwave-infrared assistance[J]. **Carbohydrate Polymers**,2020,250:1-9.

[44] SHA X S,XIANG Z J,LI B,et al. Preparation and physical characteristics of resistant starch (type 4) in acetylated indica rice[J]. **Food Chemistry**,2012,134(1):149-154.

[45] 王步枢,邬应龙. 柠檬酸甘薯淀粉酯制备工艺优化及性质研究[J]. 食品科学,2012,33(24):86-91.

[46] SANG Y,PRAKASH O,SEIB P A. Characterization of phosphorylated cross-linked resistant starch by 31P nuclear magnetic resonance(31P NMR) spectroscopy[J]. **Carbohydrate Polymers**,2007,67(2):201-212.

[47] 牛博文,徐薇,张彧. 不同化学方法制备的抗性淀粉理化性质及表征研究[J]. 食品工业科技,2020,41(17):19-23.

[48] LYU X,YE F,LI J,et al. Synthesis and characterization of a novel antioxidant RS4 by esterifying carboxymethyl sweetpotato starch with quercetin[J]. **Carbohydrate Polymers**,2016,152:317-326.

[49] MA Z,BOYE J I. Research advances on structural characterization of resistant starch and its structure-physiological function relationship:a review[J]. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**,2018,58(7):1059-1083.

[50] HASJIM J,LEE S O,HENDRICH S,et al. Characterization of a novel resistant-starch and its effects on postprandial plasma-glucose and insulin responses[J]. **Cereal Chemistry**,2010,87(4):257-262.

[51] WONGPRAYOON S,TRAN T,GIBERT O,et al. Pullulanase debranching of various starches upgrades the crystalline structure and thermostability of starch-lauric acid complexes[J]. **Starch – Stärke**,2018,70(7/8):1-11.

[52] REDDY C K,LEE D J,LIM S T,et al. Enzymatic debranching of starches from different botanical sources for complex formation with stearic acid[J]. **Food Hydrocolloids**,2019,89:856-863.

[53] WANG R,LIU P,CUI B,et al. Effects of pullulanase debranching on the properties of potato starch-lauric acid complex and potato starch-based film[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**,2020,156:1330-1336.

[54] ZHANG B,HUANG Q,LUO F X,et al. Structural characterizations and digestibility of debranched high-amylose maize starch complexed with lauric acid[J]. **Food Hydrocolloids**,2012,28(1):174-181.

[55] OKUMUS B N,TACER-CABA Z,KAHRAMAN K,et al. Resistant starch type V formation in brown lentil (*Lens culinaris* Medikus) starch with different lipids/fatty acids[J]. **Food Chemistry**,2018,240:550-558.

[56] LU H,YANG Z,YU M,et al. Characterization of complexes formed between debranched starch and fatty acids having different

carbon chain lengths[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**,2021,167:595-604.
[57] LEE M H,KIM H R,LIM W S,et al. Formation of debranched wheat starch-fatty acid inclusion complexes using saturated fatty acids with different chain length[J]. **LWT–Food Science and Technology**,2021,141:1-8.
[58] ASTRAY G,GONZALEZ-BARREIRO C,MEJUTO J C,et al. A review on the use of cyclodextrins in foods[J]. **Food Hydrocolloids**,2009,23(7):1631-1640.
[59] SUZUKI M,SATO A. Nutritional significance of cyclodextrins:indigestibility and hypolipemic effect of α-cyclodextrin [J]. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**,1985,31(2):209-223.
[60] ARTISS J D,BROGAN K,BRUCAL M,et al. The effects of a new soluble dietary fiber on weight gain and selected blood parameters in rats[J]. **Metabolism**,2006,55(2):195-202.
[61] BIWER A,ANTRANIKIAN G,HEINZLE E. Enzymatic production of cyclodextrins[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2002,59(6):609-617.
[62] KELLY R M,DIJKHUIZEN L,LEEMHUIS H. The evolution of cyclodextrin glucanotransferase product specificity[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2009,84(1):119-133.
[63] VEEN B A,UITDEHAAG J C,PENNINGA D,et al. Rational design of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 to increase α-cyclodextrin production[J]. **Journal of Molecular Biology**,2000,296(4):1027-1038.
[64] LAWSON C L,VANMONTFORT R,STROKOPYTOV B,et al. Nucleotide-sequence and X-ray structure of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 in a maltose-dependent crystal form[J]. **Journal of Molecular Biology**,1994,236(2):590-600.
[65] UITDEHAAG J C,ALEBEEK G J V,VEEN B A,et al. Structures of maltohexaose and maltoheptaose bound at the donor sites of cyclodextrin glycosyltransferase give insight into the mechanisms of transglycosylation activity and cyclodextrin size specificity [J]. **Biochemistry**,2000,39(26):7772-7780.
[66] HANS L,JOOST C M,et al. The remote substrate binding subsite 6 in cyclodextrin-glycosyltransferase controls the transferase activity of the enzyme via an induced-fit mechanism[J]. **Journal of Biological Chemistry**,2001,277(2):1113-1119.
[67] VEEN B A,UITDEHAAG J C M,PENNINGA D,et al. Rational design of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 to increase α-cyclodextrin production[J]. **Journal of Molecular Biology**,2000,296(4):1027-1038.
[68] WANG L,DUAN X G,WU J. Enhancing the α-cyclodextrin specificity of cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus macerans* by mutagenesis masking subsite-7[J]. **Applied and Environmental Microbiology**,2016,82(8):2247-2255.
[69] LI Z F,ZHANG J Y,WANG M,et al. Mutations at subsite-3 in cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus macerans* enhancing α-cyclodextrin specificity[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2009,83(3):483-490.
[70] SONG B,YUE Y,XIE T,et al. Mutation of tyrosine167 histidine at remote substrate binding subsite-6 in α-cyclodextrin glycosyltransferase enhancing α-cyclodextrin specificity by directed evolution[J]. **Molecular Biotechnology**,2014,56(3):232-239.
[71] YUE Y,SONG B,XIE T,et al. Enhancement of α-cyclodextrin product specificity by enriching histidines of α-cyclodextrin glucanotransferase at remote subsite-6[J]. **Process Biochemistry**,2014,49(2):230-236.
[72] LI Z,ZHANG J,WANG M,et al. Mutations at subsite-3 in cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus macerans* enhancing α-cyclodextrin specificity[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2009,83(3):483-490.
[73] BLACKWOOD A D,BUCKE C. Addition of polar organic solvents can improve the product selectivity of cyclodextrin glycosyltransferase - solvent effects on CGTase[J]. **Enzyme and Microbial Technology**,2000,27(9):704-708.
[74] GAWANDE B,PATKAR A. α-cyclodextrin production using cyclodextrin glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* AS-22[J]. **Starch – Stärke**,2001,53(2):75-83.
[75] LI C,YOU Y,LU Z,et al. Alcohol complexing agents influence bacterial α-cyclodextrin production[J]. **LWT–Food Science and Technology**,2021,135:1-9.
[76] SHIEH W J,HEDGES A R. Process for producing α-cyclodextrin using cyclomaltodextrin glucanotransferase in presence of cyclohexane. US19930028628[P]. 1993-03-09.
[77] 王宁,吴丹,陈晟,等. 利用来源于 *Paenibacillus macerans* 的 α-CGTase 突变体 Y89D 制备 α-环糊精[J]. 食品科学,2011,32(3):165-170.
[78] DUAN X,CHEN S,CHEN J,et al. Enhancing the cyclodextrin production by synchronous utilization of isoamylase and

α-CGTase[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2013,97(8):3467-3474.
[79] LI X X,BAI Y X,JI H Y,et al. The binding mechanism between cyclodextrins and pullulanase:a molecular docking,isothermal titration calorimetry,circular dichroism and fluorescence study[J]. **Food Chemistry**,2020,321:1-7.
[80] RENDLEMAN J A. Enhancement of cyclodextrin production through use of debranching enzymes[J]. **Biotechnology and Applied Biochemistry**,1997,26:51-61.
[81] HUANG Z,WANG J J,CHEN Y,et al. Effect of water-soluble dietary fiber resistant dextrin on flour and bread qualities[J]. **Food Chemistry**,2020,317:1-8.
[82] 王六强,张新武,马飞飞,等. 抗性糊精的生产应用现状研究与展望[J]. 农产品加工,2020,6:75-77.
[83] LAURENTIN A,CARDENAS M,RUALES J,et al. Preparation of indigestible pyrodextrins from different starch sources[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2003,51(18):5510-5515.
[84] GANGOITI J,PIJNING T,DIJKHUIZEN L. Biotechnological potential of novel glycoside hydrolase family 70 enzymes synthesizing α-glucans from starch and sucrose[J]. **Biotechnology Advances**,2018,36(1):196-207.
[85] MAAREL M J E C,LEEMHUIS H. Starch modification with microbial alpha-glucanotransferase enzymes[J]. **Carbohydrate Polymers**,2013,93(1):116-121.
[86] LEEMHUIS H,DOBRUCHOWSKA J M,EBBELAAR M,et al. Isomalto/malto-polysaccharide,anovel soluble dietary fiber made via enzymatic conversion of starch[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2014,62(49):12034-12044.
[87] GANGOITI J,PIJNING T,DIJKHUIZEN L. The *Exiguobacterium sibiricum* 255-15 GtfC enzyme represents a novel glycoside hydrolase 70 subfamily of 4,6-α-glucanotransferase enzymes [J]. **Applied and Environmental Microbiology**,2016,82(2):756-766.
[88] GANGOITI J,LAMOTHE L,VAN LEEUWEN S S,et al. Characterization of the *Paenibacillus beijingensis* DSM 24997 GtfD and its glucan polymer products representing a new glycoside hydrolase 70 subfamily of 4,6-α-glucanotransferase enzymes[J]. **Plos One**,2017,12(4):1-26.
[89] GANGOITI J,LEEUWEN S S,GERWIG G J,et al. 4,3-α-Glucanotransferase,a novel reaction specificity in glycoside hydrolase family 70 and clan GH-H[J]. **Scientific Reports**,2017,7(1):1-15.
[90] GANGOITI J,LEEUWEN S S,VAFIADI C,et al. The gram-negative bacterium *Azotobacter chroococcum* NCIMB 8003 employs a new glycoside hydrolase family 70 4,6-α-glucanotransferase enzyme (GtfD) to synthesize a reuteran like polymer from maltodextrins and starch[J]. **Biochimica et Biophysica Acta**,2016,1860(6):1224-1236.
[91] PASSERINI D,VUILLEMIN M,UFART L,et al. Inventory of the GH70 enzymes encoded by *Leuconostoc citreum* NRRL B-1299-identification of three novel α-transglucosylases[J]. **The FEBS Journal**,2015,282(11):2115-2130.
[92] YAN M,WANG B H,XU X,et al. Molecular and functional study of a branching sucrase-like glucansucrase reveals an evolutionary intermediate between two subfamilies of the GH70 enzymes[J]. **Applied and Environmental Microbiology**,2018,84(9):1-13.
[93] POELE E T,CORWIN S,HAMAKER B R,et al. Development of slowly digestible starch derived α-glucans with 4,6-α-glucanotransferase and branching sucrase enzymes[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2020,68(24):6664-6671.
[94] SORNDECH W,NAKORN K N,TONGTA S,et al. Isomalto-oligosaccharides:recent insights in production technology and their use for food and medical applications[J]. **LWT-Food Science and Technology**,2018,95:135-142.
[95] OJHA S,MISHRA S,CHAND S. Production of isomalto-oligosaccharides by cell bound α-glucosidase of *Microbacterium* sp.[J]. **LWT-Food Science and Technology**,2015,60(1):486-494.
[96] NIU D,QIAO J,LI P,et al. Highly efficient enzymatic preparation of isomalto-oligosaccharides from starch using an enzyme cocktail[J]. **Electronic Journal of Biotechnology**,2017,26:46-51.
[97] LEE H S,AUH J H,YOON H G,et al. Cooperative action of α-glucanotransferase and maltogenic amylase for an improved process of isomaltooligosaccharide(IMO) production[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2002,50(10):2812-2817.
[98] 陈董力. 黑曲霉 α- 葡萄糖苷酶的基因克隆,表达与定性[D]. 无锡:江南大学,2010.
[99] 易子玲. *Brevibacterium fuscum* 异麦芽三糖右旋酐酶的重组表达、外切特征研究及其应用[D]. 无锡:江南大学,2021.