

蔗糖异构酶催化生产异麦芽酮糖研究进展

唐文竹 陈放 李宪臻*

(大连工业大学 生物工程学院 辽宁 大连 116034)

摘要: 作为蔗糖的一种异构体, 异麦芽酮糖具有许多独特的生理功能, 例如非致龋齿性、益生元特性、适合糖尿病患者使用以及对大多数细菌和酵母的抗性等, 因而受到广泛关注。异麦芽酮糖主要是通过蔗糖异构酶催化蔗糖转化形成, 反应中同时生成的海藻酮糖以及少量的葡萄糖和果糖, 给工业生产带来困扰。简要论述异麦芽酮糖的特性、生理功能及其生产中存在的问题, 重点论述蔗糖异构酶催化蔗糖转化的机理, 为异麦芽酮糖在食品工业中的开发利用提供参考。

关键词: 异麦芽酮糖, 蔗糖异构酶, 催化机理

Advances in isomaltulose production catalyzed by sucrose isomerase

TANG Wen-Zhu CHEN Fang LI Xian-Zhen*

(School of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian, Liaoning 116034, China)

Abstract: Isomaltulose as a functional isomer of sucrose has attracted much more attention in the industrial application due to its attractive features such as non-cariogenic, prebiotic and diabetics-acceptable nutrient and resistance to most bacteria and yeasts. It has been proved that sucrose isomerase not only transforms sucrose to isomaltulose and trehalulose, but also produce a small amount of glucose and fructose as by-products, which is a considerable industrial problem because elaborate purification are necessary to remove them. In this paper, we discuss the characteristics and functions of isomaltulose as well as potential problems in its production.

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31101227)

*通讯作者: Tel: 86-411-86323717; 信箱: xianzhen@dlpu.edu.cn

收稿日期: 2011-12-22; 接受日期: 2012-02-14

Particularly, we focus on the catalytic mechanism of sucrose conversion by sucrose isomerase, which is in favour of developing isomaltulose in the application of foodstuff.

Keywords: Isomaltulose, Sucrose isomerase, Catalytic mechanism

异麦芽酮糖(α -D-吡喃葡萄糖基-1,6-D-果糖, Isomaltulose), 又称帕拉金糖, 是一种葡萄糖和果糖以 α -1,6 糖苷键结合形成的还原性二糖, 天然存在于蜂蜜^[1]、甘蔗汁, 及其工业制成品糖蜜、糖浆中^[2], 但是含量都非常少。作为蔗糖的异构体, 其口感和物理性质与蔗糖非常相似, 而甜度只有蔗糖的一半; 两者水溶液的粘度也很接近, 而异麦芽酮糖的熔点较蔗糖低, 并且在酸性条件下更稳定, 研究表明, 异麦芽酮糖由于其特殊的生理功能, 作为一种健康食品添加剂, 可以作为蔗糖的替代品应用于食品工业^[3]。目前, 全世界已有 40 多个国家和地区使用异麦芽酮糖, 用作食品添加剂的产品已近千种, 在中国也被批准用于糖果、面包、糕点、饮料、果酱等食品。近年来, 异麦芽酮糖的销量在欧美和日本呈直线上升趋势, 2009 年已达 10 万 t 左右, 在中国的年产量也近 5 000 t。

1 异麦芽酮糖的生理功能

最初人们对异麦芽酮糖生理功能的研究是发现其具有防龋齿活性, 因为它几乎不能被牙菌斑形成细菌尤其是可变链球菌(*S. mutans*)所利用, 并且能减少不溶性的葡聚糖以及酸的生成, 从而防止可变链球菌吸附到牙齿表面并减少牙釉质的局部脱钙作用^[4]。最早的临床试验证实食用含有异麦芽酮糖的食物, 能有效减少牙菌斑以及唾液中的可变链球菌数量^[5]。进一步研究发现, 异麦芽酮糖进入人体后, 可在小肠处由蔗糖酶-异麦芽糖酶复合催化水解成与蔗糖分解物相同的葡萄糖和果糖, 从而被完全消化、吸收。但由于其分解速度比蔗糖慢得多, 摄入异麦芽酮糖后, 能

长时间使血中葡萄糖和胰岛素保持在一定浓度, 而不会引起血中葡萄糖和胰岛素的急速上升, 从而成为糖尿病患者的健康食品^[6]。同时, 健康人或者糖尿病患者服用 1 g/kg 体重或者 50 g 异麦芽酮糖不会引起任何胃肠不适^[7]。最近的临床试验证实, 在 4 周内成人每天摄入 50 g 异麦芽酮糖可被完全吸收, 同时也不会引起血脂的变化^[8]。另外, 动物实验表明, 食用异麦芽酮糖还能抑制肥胖^[9]。除了这些生理功能以外, 异麦芽酮糖的还原性使其可以用来生产功能性食品添加剂异麦芽酮糖醇以及具有生物相容性的高聚物等^[10]。

2 异麦芽酮糖的生产及存在的问题

实践证明异麦芽酮糖难以使用化学方法合成, 因此微生物转化蔗糖生产异麦芽酮糖逐渐引起人们的重视。迄今已发现某些微生物能够将蔗糖转化为异麦芽酮糖, 如 *Serratia*、*Erwinia*、*Protaminobacter* 和 *Klebsiella* 等几个细菌属中的微生物种, 具代表性的菌种主要包括 *P. rubrum*、*S. plymuthica* 和 *K. planticola*。关于自然界微生物转化蔗糖为异麦芽酮糖的原因, 目前普遍认为异麦芽酮糖是在碳源过量时作为储藏物质存在的。因为微生物生活在“时贫时富”的环境中, 在营养过量时, 需要储存一部分营养物质, 而在营养受限时, 这些储藏物就显得至关重要了。之所以以异麦芽酮糖为储藏物是因为这种蔗糖转化物只能被产生它的微生物自身所利用, 而其它竞争者, 例如宿主或者其它微生物是无法利用这种糖类的^[11]; 同时异麦芽酮糖在高渗环境中还能起到渗透压稳定剂的作用, 利于微生物的生存^[12]。

研究生产异麦芽酮糖的方法多为基于固定化微生物细胞的蔗糖异构化,其中使用壳聚糖包埋的 *S. plymuthica* 细胞可以转化浓度为 40% 的蔗糖,最高能得到占总产物 94% 的异麦芽酮糖^[13],而使用藻酸钙固定的 *P. rubrum* 细胞可以在蔗糖浓度高达 70% 的条件下,以每克颗粒每小时转化生成 1.6 g 异麦芽酮糖的速率,24 h 最高获得含量为 89%–94% 的异麦芽酮糖^[14]。Börnke 等试图用转基因植物生产异麦芽酮糖,将来源于 *E. rhapsodici* 的蔗糖异构酶基因转入土豆中,结果发现,土豆中出现了蔗糖转化而来的异麦芽酮糖,并且土豆生长也没受到任何影响^[15],这也为异麦芽酮糖的生产提供了另一可能的途径。

研究发现,微生物细胞之所以能将蔗糖转化为异麦芽酮糖,是由蔗糖异构酶(EC. 5.4.99.11)催化蔗糖转化形成的(图 1),蔗糖分子中的 α -1,2-糖苷键在酶活性中心内被水解并转位后,葡萄糖单体再与果糖单体形成 α -1,6-或 α -1,1-糖苷键,并从酶分子中脱落而产生 2 种蔗糖异构体,而断开的 α -1,2-糖苷键也可与水分子反应形成葡萄糖和果糖。已经发现的酶中多数催化产物以异麦芽酮糖为主(75%–80%),另外也有少数催化产物以海藻

酮糖为主(90%)^[10]。因此蔗糖异构酶根据其蔗糖转化产物的不同又分别被称为异麦芽酮糖合成酶和海藻酮糖合成酶。本文作者分离到一株异麦芽酮糖生产新菌 *Klebsiella* sp. LX3, 其蔗糖转化产物主要为异麦芽酮糖和少量的海藻酮糖,几乎检测不到葡萄糖和果糖,并且几种含有果糖基的底物对蔗糖异构酶具有诱导作用^[16–17],同时蔗糖转化率和速度很高,非常适于工业生产。现在使用完整微生物细胞进行蔗糖转化的异麦芽酮糖最高得率为 90%^[18],使用纯化的酶得到异麦芽酮糖转化率最高为 91%^[19],即使采用固定化细胞的方法得到 94% 的异麦芽酮糖产率^[14],转化产物中仍然有一定量的海藻酮糖以及葡萄糖和果糖存在,甚至有残余的未转化蔗糖,这就为生产中异麦芽酮糖的纯化造成了困扰。

目前国内外异麦芽酮糖生产普遍采用蔗糖异构酶催化蔗糖转化,再经离子交换树脂分离、浓缩和结晶等步骤得到。尽管已经发现某些微生物能够将蔗糖转化为异麦芽酮糖,但无论是工业用菌(例如 *P. rubrum*)还是研究用菌(例如 *S. plymuthica*),在蔗糖转化过程中,除了异麦芽酮糖,还伴有较高比例(2%–7%)的葡萄糖以及果糖等副产

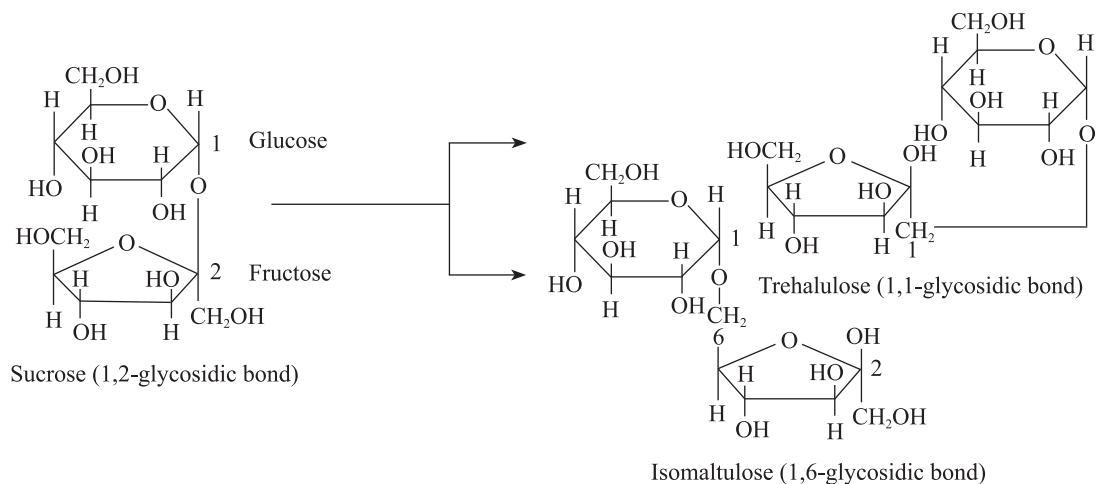


图 1 蔗糖异构化生产异麦芽酮糖的化学反应式

Fig. 1 The chemical reaction of isomaltulose production by sucrose isomerization

物的形成,严重影响异麦芽酮糖的结晶和产品质量,因此结晶之前必须通过离子交换树脂反吸附分离除去单糖,致使这一过程需要使用大量的树脂以及大量的水,从而使生产成本(每吨 1.3 万元左右)居高不下,严重影响了异麦芽酮糖的生产应用。

因此,蔗糖异构酶催化蔗糖生成产物的多样性成为异麦芽酮糖工业生产的主要障碍。理想的用于异麦芽酮糖工业生产的蔗糖异构酶应该是既能转化高浓度的蔗糖,又有绝对的产物专一性,即只生成异麦芽酮糖。要想获得具有这种绝对专一性的蔗糖异构酶,就必须弄清楚酶催化反应中形成不同产物的机理,即酶分子中哪些结构可以控制产物中新糖苷键的形成及种类。但是目前对于蔗糖异构酶催化生成不同产物的分子基础仍然不是很清楚。为了推动健康食品中异麦芽酮糖的应用,必须提高蔗糖异构酶转化产物的纯度,从而降低其生产成本,这也是目前研究的热点问题。要想很好地解决这一问题,必须要从分子水平上对蔗糖异构酶的催化机理有一个详细的了解,找出其中控制产物特异性或者与之有关的各种结构,并深入到氨基酸水平进行分析,通过改变相应的氨基酸或者活性基团来达到控制产物特异性的目的。

3 蔗糖异构酶催化机理

3.1 蔗糖异构化过程

关于蔗糖异构酶催化机理的研究始于 20 世纪 80 年代, Cheetham 最早提出蔗糖异构化过程包括蔗糖与酶的结合,蔗糖水解,葡萄糖非选择性地与果糖 C-6 和 C-1 羟基的结合从而形成 α -(1 \rightarrow 6) 和 α -(1 \rightarrow 1) 键。同时他认为异麦芽酮糖的形成需要果糖基旋转 180°,而海藻酮糖的形成不需要,所以需要的能量比较低,应该在异麦芽酮糖形成之前就产生了^[20]。后来 Véronèse 将蔗糖异构化过

程分为了四部分。(1) 竞争性抑制,即葡萄糖或者其它糖类作为蔗糖的竞争性抑制剂可以与蔗糖异构酶的活性部位相结合,从而抑制了蔗糖的结合。(2) 通过分子内机制形成异麦芽酮糖和海藻酮糖。蔗糖结合并水解之后成为葡萄糖和呋喃果糖,其中葡萄糖与酶紧密结合,而呋喃果糖仅通过离子键结合于酶的活性位点。呋喃果糖与葡萄糖结合形成异麦芽酮糖,而呋喃果糖通过互变异构形成吡喃果糖进而与葡萄糖结合形成海藻酮糖。(3) 果糖形成。因为果糖基与酶的结合力较弱,所以很容易从酶的活性部位脱出,其中低温使其结合较稳定,产物中果糖减少,高温增加果糖基活性,产物中果糖增加。(4) 通过分子间机制形成其它转化产物。果糖释放之后,形成了葡萄糖基-酶中间体,它可以将能量转移给其它受体。最初形成的葡萄糖就是以水分子为受体形成的转化产物,当葡萄糖量达到极值时,它本身可以作为受体形成异麦芽糖。这也是反应物中添加葡萄糖可以增加产物中异麦芽糖量的原因。与之类似的,反应物中添加的果糖也可以少量增加产物中海藻酮糖量,因为果糖在水溶液中是以 2 种互变异构体形式存在的——呋喃果糖和吡喃果糖,并以后者为主,而将葡萄糖基-酶中间体中的葡萄糖基转移至吡喃果糖即可生成海藻酮糖。另外,作者认为蔗糖异构酶催化反应符合 Ping-Pong Bi Bi 机制,即酶结合第 1 个底物——蔗糖,释放第 1 个产物——果糖,然后形成第 2 种酶形式(葡萄糖基-酶中间体)并结合第 2 个底物(水分子或者葡萄糖),最后形成第 2 种产物(葡萄糖或者异麦芽糖)^[21]。接着 Véronèse 又研究了蔗糖与酶的结合机理,通过抑制剂结构分析发现蔗糖分子中葡萄糖基的 1-OH、2-OH、3-OH 以及 4-OH 的存在及方向都对葡萄糖基与酶的结合至关重要,而通过受体分子结构分析推测蔗糖分子中果糖基的 2-OH、3-OH、4-OH 以及 6-OH 起到与酶结合的

作用。并最终得出了蔗糖异构酶活性位点完整的生化反应路径(图 2)。反应 1: 抑制剂的结合; 反应 2: 蔗糖结合; 反应 3: 蔗糖水解; 反应 4: 异麦芽酮糖形成; 反应 5: 呋喃果糖开环; 反应 6: 呋喃果糖互变异构为吡喃果糖; 反应 7: 海藻酮糖形成; 反应 8: 吡喃果糖释放(葡萄糖基-酶中间体形成); 反应 9: 呋喃果糖释放(葡萄糖基-酶中间体形成); 反应 10: 以水分子为受体, 葡萄糖形成; 反应 11: 其它受体进入活性位点, 异麦芽糖等转化产物形成^[22]。

3.2 蔗糖异构酶基因序列分析

随着人们对不同蔗糖异构酶基因序列的研究, 关于其催化机理的研究也深入到了分子水平。本文作者分离到异麦芽酮糖生产新菌 *Klebsiella* sp. LX3, 与其它已发现蔗糖异构酶不同, 在较宽的范围内改变温度和 pH 等反应条件不影响产物组成, 但却与蔗糖异构酶的存在形态紧密相关。研究发现此酶是一种细胞壁结合蛋白, 而由细胞碎片中的蔗糖异构酶催化形成的异麦芽酮糖比例要远高于游离酶的比例, 由此推测与细胞壁结合产生的空间障碍是决定产物比例的重要因素。这一蔗糖异构酶特别区别于已发现的各种酶, 是研究蔗糖异构化变位机制的优秀材料。Zhang 等通过对 *Klebsiella* sp. LX3 的蔗糖异构酶基因 *PalI* 的克隆和序列分析, 发现蔗糖异构酶与来源于 *Bacillus thermoglucosidasius* 的寡-1,6-葡萄糖苷酶和来源于 *Bacillus* sp. 的 α -葡萄糖苷酶都有 40% 以上的同源性。通过比对发现 *PalI* 中存在与寡-1,6-葡萄糖苷酶相似的由含有羧基的氨基酸构成的催化三元体以及维持酶活性必需的 2 个组氨酸形成的活性中心。因此认为蔗糖异构酶属于糖苷水解酶 13 家族。另外, 将蔗糖异构酶基因分别与热敏感和热稳定的寡-1,6-葡萄糖苷酶基因序列比对后, 选择出 2 个特定位置的氨基酸进行脯氨酸替代, 结果不仅可以提高酶的热稳定

性, 还可以增加葡萄糖基-酶中间体的稳定性, 减少单糖释放量^[23]。接着又将 *PalI* 与来源于 *B. cereus* 的寡-1,6-葡萄糖苷酶和来源于 *N. polysaccharea* 的淀粉蔗糖酶基因序列比对发现了蔗糖异构酶活性位点附近存在一段普通糖苷水解酶中没有的氨基酸序列 325RLDRD329。这段序列中含有糖苷转移酶家族中的 DxD 基序, 并且包含 4 个带电荷的氨基酸, 通过对这 4 个氨基酸分别进行定点突变, 发现所有突变体酶催化蔗糖转化产物中异麦芽酮糖均有不同程度的减少, 而海藻酮糖却有相应增加, 因此推测其可能是与蔗糖异构化以及产物特异性有关的“异构化”序列^[24]。

随后很多学者都对 RLDRD 这段序列进行了研究, 但是尚未形成统一的定论。例如纯化的 *Pantoea dispersa* UQ68J 蔗糖异构酶 SI 转化蔗糖生成异麦芽酮糖的含量高达 91%, 但是其一级结构中含有 324RLDRY328 而非 RLDRD, 并且在底物结合结构域等关键位置也存在许多特异性的氨基酸残基。由此可以推测蔗糖异构酶的产物特异性存在多种调控序列^[19]。Aroonnuan 等通过对来源于 *K. pneumoniae* NK33-98-8 蔗糖异构酶 *PalI* NK33 中 325RLDRD329 分别进行定点突变, 突变体酶 L326Y、D329A、以及 325RYDRA329 转化蔗糖形成异麦芽酮糖的量与野生型类似, 同时海藻酮糖的量也没有增加。其中突变体酶 325RYDRA329 恰好与 *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45 的蔗糖异构酶 *MutB* 中的序列一致, 而后者转化蔗糖以生成海藻酮糖为主, 因此可以肯定蔗糖异构酶的产物特异性绝不仅仅是这一段序列单独决定的, 而是存在多个调控区域^[25]。与之对应的, 来源于 *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45 的蔗糖异构酶 *MutB* 转化蔗糖的主要产物为海藻酮糖, 其一级结构中含有与 325RLDRD329 不同的一段序列 311RYDRA315, 但其突变体 *MutB* R311C 的异构化活性远远小于

水解活性,只能生成很少的海藻酮糖和异麦芽酮糖,却生成了大量的单糖。通过随机突变发现除这段序列外的其它区域也对产物特异性有影响,如活性位点附近的氨基酸残基以及与底物结合有关的氨基酸残基等^[10]。

后来通过对来源于 *P. rubrum* 的蔗糖异构酶 SI 的结构预测, Lee 认为特异性的 325RLDRD329 是作为果糖基结合位点(FBS),通过 O-6 氢键与果糖基相互作用。对 2 个 Arg 分别进行定点突变,蔗糖转化产物中异麦芽酮糖的含量均有不同程度的降低,海藻酮糖略有增加,单糖明显增加,并且出现了野生型中不存在的异麦芽糖。对这一现象的解释为突变造成原 Arg 与果糖基间的氢键距离加大,同时电荷排斥作用增加,从而导致熵值增加,使得酶底物复合物稳定性降低。因此作者认为果糖基与 FBS 结合的稳定性对蔗糖异构化至关重要^[26]。

3.3 蔗糖异构酶晶体结构研究

为了进一步找出蔗糖异构酶催化异构化反应所需的特定结构,对于蔗糖异构酶结晶的研究越来越引起关注。Zhang 等通过对 PalI 晶体进行 X-射线衍射分析,发现 PalI 包含 3 个结构域,分别是 N 末端催化(α/β)₈ 结构域,一个亚结构域和 C 末端结构域。如果将活性中心的 5 个氨基酸(His145、Asp241、Glu295、Asp369 和 His368)分别突变为丙氨酸,结果酶活性损失严重,说明这些保守氨基酸是蔗糖异构酶保持活性所必需的。通过与淀粉蔗糖酶结构的比较,推测 Glu295 是作为酸催化剂,使糖苷键中的 O 质子化从而引发底物水解的; Asp241 则是作为亲核试剂攻击异头碳形成葡萄糖基-酶中间体的,同时 Asp369 与葡萄糖基 O2 和 O3 形成氢键;类似的, His145 与 O6, His368 与 O2 也分别形成了氢键。蔗糖异构酶与淀粉蔗糖酶在底物结合,水解以及共价中间体的形成中存在类似的机理^[27]。

Ravaud 通过对底物及抑制物与蔗糖异构酶的共结晶研究发现, MutB 的活性中心由 14 个氨基酸组成,其中含糖苷水解酶 13 家族保守的 6 个氨基酸,还有与淀粉蔗糖酶和寡-1,6-葡萄糖苷酶共有的 5 个氨基酸,以及蔗糖异构酶特有的 3 个氨基酸。蔗糖结合于活性中心的底部,并且氨基酸与葡萄糖基结合形成较多的氢键。同时证明在活性位点侧翼通道的 2 个苯丙氨酸形成的芳香环夹子决定了酶的异构化活性与水解活性的比值;并提出距离活性位点较远的氨基酸残基也可能会影响底物结合位点的形状和稳定性^[28]。

目前获得结晶的蔗糖异构酶除了前面提到的来源于 *Klebsiella* sp. LX3 的 PalI,来源于 *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45 的 MutB,还有来源于 *P. rubrum* 的 SmuA,其中 MutB 催化产物以海藻酮糖为主,另外两者以异麦芽酮糖为主。对三者表面电荷的比较发现在活性位点入口处, MutB 较另外两者带有更多的负电荷。另外通过一系列的对比发现蔗糖异构酶的产物决定因素是很复杂的,例如酶活性位点附近大量存在的精氨酸,它们或者参与酶与底物、中间体、产物的氢键形成,或者在催化口袋形成盐桥。如果破坏了这一电荷平衡,就会影响相互作用的网络以及催化口袋几何结构,从而影响酶活。其中 Arg298 和 Arg306 起到稳定蔗糖水解后的果糖基的作用,可以阻止果糖的互变异构,有利于异麦芽酮糖的形成^[29]。

4 展望

因为异麦芽酮糖具有蔗糖无可比拟的特性,可以广泛用于儿童食品、保健食品、糖尿病人食品和运动饮料,所以越来越受到世界各国消费者的欢迎。异麦芽酮糖是糖尿病患者最理想的蔗糖替代糖,而我国有超过 9 000 万糖尿病患者,每年还在以较高的速度递增,这部分群体可以保证异

麦芽酮糖的基本消费市场。目前,异麦芽酮糖生产基本为德国和日本的两家公司所垄断。国内生产能力相对较低,异麦芽酮糖产品主要依赖进口,其市场售价为每吨 1.5 万元左右,因此具有巨大的市场开发潜力。

在异麦芽酮糖生产行业,各种现有微生物产糖的主要缺点有两个:(1)产物中葡萄糖和果糖等副产品的比例过高,导致后续过程的提纯成本过高;(2)酶活力还比较低,使设备的使用效率下降。要打破这些生产限制,就要研究清楚蔗糖异构酶催化蔗糖转化的分子基础,从而通过各种现代生物学技术,构建转化产物单一并且酶活力高的基因工程菌以满足生产的需要。但是现阶段对于蔗糖异构酶催化生成不同产物的分子基础仍然不是很清楚,国外一系列研究发现蔗糖异构酶的产物特异性绝不仅仅是某一段序列单独决定的,而是存在多个调控区域的协同作用。因此对于异麦芽酮糖生产和开发的研究重点是进一步通过各种新技术找出酶分子中决定产物特异性的结构与序列。今后可以将蔗糖异构酶作为一个整体进行研究,采用 DNA shuffling 等各种定向进化策略,构建蔗糖异构酶突变体库,并从中筛选以异麦芽酮糖为单一转化产物的突变株。然后通过对改组前后酶分子的性质、DNA 序列以及蛋白质结构的对比分析,找出这些差异序列并推测其各自的功能以及相互关系。通过这种方法最终获得的突变体酶可能不仅仅包含某一个位点氨基酸的改变,而是由于酶分子内多个位点改变后出现的整体协同作用而形成的。这样就不仅会发现活性位点、“异构化位点”等关键位点的作用,还可能会找到研究人员一直忽略的相对“不重要”位点的作用,从而为大规模高效生产异麦芽酮糖奠定基础。总之,蔗糖异构酶催化机理的研究对于扩大异麦芽酮糖的生产,推动我国无糖食品的发展具有良好的指导意义和社会价值。

参考文献

- [1] Low NH, Sporns PE. Analysis and quantitation of minor di- and trisaccharides in honey, using capillary gas chromatography[J]. Journal of Food Science, 1988, 53(2): 558-561.
- [2] Takazoe I. New trends on sweeteners in Japan[J]. International Dental Journal, 1985, 35(1): 58-65.
- [3] Lina BAR, Jonker D, Kozianowski G. Isomaltulose (palatinose): a review of biological and toxicological studies[J]. Food and Chemical Toxicology, 2002, 40(10): 1375-1381.
- [4] Ooshima T, Izumitani A, Sobue S, et al. Non-cariogenicity of the disaccharide palatinose in experimental dental caries of rats[J]. Infection and Immunity, 1983, 39(1): 43-49.
- [5] Ooshima T, Izumitani A, Takei T, et al. Plaque formation of dietary isomaltulose in humans[J]. Caries Research, 1990, 24(1): 48-51.
- [6] 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.
- [7] MacDonald I, Daniel JW. The bio-availability of isomaltulose in man and rat[J]. Nutrition Reports International, 1983, 28(5): 1083-1090.
- [8] Holub I, Gostner A, Theis S, et al. Novel findings on the metabolic effects of the low glycaemic carbohydrate isomaltulose (palatinose)[J]. British Journal of Nutrition, 2010, 103(12): 1730-1737.
- [9] Sato K, Arai H, Mizuno A, et al. Dietary palatinose and oleic acid ameliorate disorders of glucose and lipid metabolism in Zucker fatty rats[J]. The Journal of Nutrition, 2007, 137(8): 1908-1915.
- [10] Watzlawick H, Mattes R. Gene cloning, protein characterization, and alteration of product selectivity for the trehalulose hydrolase and trehalulose synthase from "*Pseudomonas mesoacidophila*" MX-45[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(22): 7026-7036.
- [11] Börnke F, Hajirezaei M, Sonnewald U. Cloning and characterization of the gene cluster for palatinose metabolism from the phytopathogenic bacterium

- Erwinia rhapontici*[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(8): 2425–2430.
- [12] de Costa DM, Suzuki K, Yoshida K. Structural and functional analysis of a putative gene cluster for palatinose transport on the linear chromosome of *Agrobacterium tumefaciens* MAFF301001[J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(7): 2369–2373.
- [13] Krastanov A, Blazheva D, Yanakieva I, et al. Conversion of sucrose into palatinose in a batch and continuous processes by immobilized *Serratia plymuthica* cells[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 39(6): 1306–1312.
- [14] de Oliva-Neto P, Menão PTP. Isomaltulose production from sucrose by *Protaminobacter rubrum* immobilized in calcium alginate[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(18): 4252–4256.
- [15] Börnke F, Hajirezaei M, Sonnewald U. Potato tubers as bioreactors for palatinose production[J]. Journal of Biotechnology, 2002, 96(1): 119–124.
- [16] Li XZ, Zhang DH, Chen F, et al. *Klebsiella singaporensis* sp. nov., a novel isomaltulose-producing bacterium[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54(6): 2131–2136.
- [17] Li XZ, Zhao CX, An QD, Zhang DH. Substrate induction of isomaltulose synthase in a newly isolated *Klebsiella* sp. LX3[J]. Journal of Applied Microbiology, 2003, 95(3): 521–527.
- [18] Cho MH, Park SE, Lim JK, et al. Conversion of sucrose into isomaltulose by *Enterobacter* sp. FMB1, an isomaltulose-producing microorganism isolated from traditional Korean food[J]. Biotechnology Letters, 2007, 29(3): 453–458.
- [19] Wu LG, Birch RG. Characterization of the highly efficient sucrose isomerase from *Pantoea dispersa* UQ68J and cloning of the sucrose isomerase gene[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(3): 1581–1590.
- [20] Cheetham PSJ. The extraction and mechanism of a novel isomaltulose-synthesizing enzyme from *Erwinia rhapontici*[J]. Biochemical Journal, 1984, 220(1): 213–220.
- [21] 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.
- [22] Veronese T, Perlot P. Proposition for the biochemical mechanism occurring in the sucrose isomerase active site[J]. FEBS Letters, 1998, 441(3): 348–352.
- [23] Zhang DH, Li XZ, Zhang LH. Isomaltulose synthase from *Klebsiella* sp. strain LX3: gene cloning and characterization and engineering of thermostability[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(6): 2676–2682.
- [24] Zhang DH, Li N, Swaminathan K, et al. A motif rich in charged residues determines product specificity in isomaltulose synthase[J]. FEBS Letters, 2003, 534(1/3): 151–155.
- [25] Aroonnuan A, Nihira T, Seki T, et al. Role of several key residues in the catalytic activity of sucrose isomerase from *Klebsiella pneumoniae* NK33-98-8[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 40(5): 1221–1227.
- [26] Lee HC, Kim JH, Kim SY, et al. Isomaltulose production by modification of the fructose-binding site on the basis of the predicted structure of sucrose isomerase from “*Protaminobacter rubrum*”[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(16): 5183–5194.
- [27] Zhang DH, Li N, Lok SM, et al. Isomaltulose synthase (PalI) of *Klebsiella* sp. LX3[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(37): 35428–35434.
- [28] Ravaut S, Robert X, Watzlawick H, et al. Trehalulose synthase native and carbohydrate complexed structures provide insights into sucrose isomerization[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(38): 28126–28136.
- [29] Ravaut S, Robert X, Watzlawick H, et al. Structural determinants of product specificity of sucrose isomerases[J]. FEBS Letters, 2009, 583(12): 1964–1968.