

蔗糖异构酶在异麦芽酮糖生产中的研究进展

陈宁^{1,2}, 张佳钰^{1,2}, 郑明强^{1,2}, 路福平^{1,2}, 刘夫锋^{*1,2}

(1. 天津科技大学 工业发酵微生物教育部重点实验室/天津市工业微生物重点实验室/工业酶国家工程实验室, 天津 300457; 2. 天津科技大学 生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 异麦芽酮糖是一种多功能的新型甜味剂,同时也是国际上公认安全的蔗糖替代品,在医药、食品等行业中具有广阔的应用前景。蔗糖异构酶(sucrose isomerase, SIase)是生物转化生产异麦芽酮糖最有效的生物酶制剂。作者简要论述了异麦芽酮糖的生理特性及其在生产中现存的问题,详细阐述了SIase的来源、三维结构、催化机制、高效酶分子理性改造及其异源高效表达等。随后介绍了细胞及酶固定化在异麦芽酮糖生产中的广泛应用,并展望了蔗糖异构酶在生产异麦芽酮糖中的应用。

关键词: 蔗糖异构酶;固定化;异麦芽酮糖;异源表达;理性设计

中图分类号:Q 558 文章编号:1673-1689(2023)01-0055-11 DOI:10.3969/j.issn.1673-1689.2023.01.004

Research Progress of Sucrose Isomerase in Isomaltulose Production

CHEN Ning^{1,2}, ZHANG Jiayu^{1,2}, ZHENG Mingqiang^{1,2}, LU Fuping^{1,2}, LIU Fufeng^{*1,2}

(1. Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education/ Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology/National Engineering Laboratory for Industrial Enzymes, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China; 2. College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Isomaltulose is a new multifunctional sweetener and an internationally recognized safe sucrose substitute. Isomaltulose has wide application prospects in the medicine and food industries. Sucrose isomerase (SIase) is the most effective biological enzyme reagent for the production of isomaltulose by biological transformation. This review briefly presents the physiological characteristics of isomaltulose as well as the existing problems in its production. The source, three-dimensional structure, catalysis mechanism, rational design of high efficient enzymes and heterologous efficient expression of SIase were discussed in detail. In addition, the wide application of cell and enzyme immobilization in the production of isomaltulose was then introduced. Finally, the application of SIase in isomaltulose production was prospected.

Keywords: sucrose isomerase, immobilization, isomaltulose, heterologous expression, rational design

收稿日期: 2022-05-15

基金项目: 国家重点研发计划项目(2021YFC2102700);国家自然科学基金项目(32272269);天津市区域创新项目(21ZYQCSY00050)。

* 通信作者: 刘夫锋(1977—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事工业酶分子理性设计研究。E-mail: fufengliu@tust.edu.cn

随着社会经济的提高与健康意识的发展,人们越来越关注高质量的健康生活,低热量及零蔗糖食品饮料逐渐成为重要的消费产品。此外,肥胖、高血糖、龋齿等健康问题也增加了消费者对低糖食品的消费倾向,异麦芽酮糖作为替代蔗糖的功能性甜味剂而受到广泛关注^[1-3]。异麦芽酮糖(isomaltulose),即6-O- α -D-吡喃葡萄糖基-D-果糖,又称帕拉金糖,是蔗糖的一种异构体,与蔗糖有着相似的物理性质和口感^[4]。异麦芽酮糖是通过果糖和葡萄糖以 α -1,6糖苷键相连后得到的右旋双糖。自然状态下,异麦芽酮糖是以白色结晶状态存在的。异麦芽酮糖的甜度大约是蔗糖的50%,且无任何异味,甜味稳定,将异麦芽酮糖放在高温环境(120℃)中熬煮一段时间,甜味几乎没有变化^[2]。异麦芽酮糖易溶于水,且随着温度的升高其溶解度逐渐变大^[3]。与蔗糖相比,异麦芽酮糖的耐酸性较强,将20 g/dL的蔗糖和异麦芽酮糖在酸性条件下的沸水浴中处理一定时间后,蔗糖全部水解,而异麦芽酮糖几乎没有变化^[5]。由于异麦芽酮糖的吸湿性较差,不易降解,尤其是在柠檬酸的存在下,其可在室温条件下长时间的保存。

异麦芽酮糖还有一定的保健功能。研究发现,当摄入的食物中添加了异麦芽酮糖时,可有效减少口腔疾病的发生^[5],且唾液中可变链球菌的数量也明显减少^[6],且异麦芽酮糖可在小肠内完全消化、吸收,由于异麦芽酮糖的分解速度很慢,体内胰岛素和血糖可长时间保持在一定范围内,不会造成血液中葡萄糖水平极速上升,可有效预防糖尿病,适合糖尿病患者摄入^[7-8]。另外,异麦芽酮糖还可通过加氢反应生产糖醇^[9],其可作为无糖替代品应用于食品中。异麦芽酮糖以其良好的酸稳定性、极低的吸湿性和较高的安全性^[10-11],在食品中具有广阔的市场应用前景。异麦芽酮糖广泛的优势和适用人群,使其具有重要的开发价值。甜菜和蜂蜜中存在天然的异麦芽酮糖,但其含量较少且提取困难,难以满足市场需求。因此,为了满足市场供给需要,亟须提高异麦芽酮糖的生产效率。

目前,异麦芽酮糖的制备方法主要有化学转化法和生物转化法。由于化学转化法存在耗能高、污染性强等问题^[12],而且技术不够成熟,使得制备异麦芽酮糖变得非常困难。因此,包括酶转化法和微生物转化法在内的生物转化法在国内外得到了广泛的应用。生物转化法是基于蔗糖异构化法转化生成

异麦芽酮糖,即利用微生物合成的蔗糖异构酶(sucrose isomerase, SIase, EC 5.4.99.11)将蔗糖分子中葡萄糖和果糖之间的 α -1,2糖苷键异构化为 α -1,6糖苷键形成异麦芽酮糖和 α -1,1糖苷键形成海藻酮糖^[13]。因此,蔗糖异构酶是生物催化生成异麦芽酮糖和海藻酮糖最有效的生物酶制剂,通过蔗糖异构酶生物转化法实现异麦芽酮糖产业化受到人们越来越多的关注。作者综述了蔗糖异构酶的研究进展,详细介绍了SIase的来源、三维结构、催化机制、理性改造和异源表达等,以及在异麦芽酮糖制备中细胞固定化和酶固定化的固定化技术,最后展望了蔗糖异构酶在异麦芽酮糖工业化生产中的广阔市场前景。

1 蔗糖异构酶概述

1.1 蔗糖异构酶的来源

20世纪50年代,南德公司首次在甜菜厂的废水中分离得到能够分泌蔗糖异构酶的红色精肱杆菌(*Protaminobacter rubrum*),进而发明了采用微生物酶转化法制备异麦芽酮糖。经过几十年的发展,科研人员已经分离获得多种能够合成蔗糖异构酶的微生物,且绝大部分蔗糖异构酶都来源于细菌。能产蔗糖异构酶的代表细菌有:普城沙雷氏菌^[14]、放射性土壤杆菌^[15]、大黄欧文菌^[16]、分散泛菌^[17]、克雷伯氏肺炎菌^[18]以及嗜中酸假单胞菌^[19]。根据酶催化的主要产物,蔗糖异构酶分为:主要生产异麦芽酮糖型(转化率为60%~90%)和主要生产海藻酮糖型(转化率为85%~89%)。此外,一种来源于昆虫*Silverleaf whitefly*的蔗糖异构酶^[20]催化蔗糖只生成海藻酮糖。

1.2 蔗糖异构酶的酶学性质

蔗糖异构酶的pI小于7,属于酸性蛋白质,最适pH在5.5~7.0。当pH超过此范围时,其活性显著降低。同时,催化口袋的电荷对催化反应的最终产物影响显著。当反应的pH高于酶的最适pH时,最终产物中海藻酮糖的比例上升;而当反应的pH低于酶的最适pH时,催化产物中葡萄糖和果糖的产量增加^[21]。大多数蔗糖异构酶的最适温度在20~40℃,且蔗糖异构化产物的比例受温度影响很大。高温条件有利于异麦芽酮糖的形成,而较低的反应温度则有利于海藻酮糖的生成。一般来说,反应温度的升

高加快了反应速度。然而,高温条件($> 50\text{ }^{\circ}\text{C}$)会加剧蔗糖的水解,并生成葡萄糖和果糖。不同来源的蔗糖异构酶的动力学参数不同,其底物亲和力和识别能力也是不同,如嗜中酸假单胞菌(*Pseudomonas mesoacidophila*)中蔗糖异构酶 K_m 值为 19.2 mmol/L ^[22],大黄欧文菌(*Erwinia rhapontici*)中蔗糖异构酶的 K_m 值是其 10 倍左右,达到 222 mmol/L ^[23]。同样的,红色精脛杆菌 *P. rubrum* CBS574.77 的 K_{cat}/K_m 值为 $1\ 301\text{ L}/(\text{s}\cdot\text{mmol})$ ^[24],而 *P. mesoacidophila* MX-45 的 K_{cat}/K_m 值仅为 $36\text{ L}/(\text{s}\cdot\text{mmol})$ ^[25]。此外,不同的金属离子对蔗糖异构酶的影响也存在差异, Mn^{2+} 和 Mg^{2+} 的存在可促进酶活力的提升, Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 的存在会使酶活力受到微弱抑制,而当 Ag^+ 、 Hg^+ 存在时酶完全失活。同时,蔗糖异构酶对蔗糖具有高度的底物特异性,当反应体系中存在葡萄糖和果糖时,葡萄糖和果糖则变为该酶的竞争性抑制剂,使酶的底物亲和力降低^[26]。

1.3 蔗糖异构酶的三维结构

在蛋白质数据库(PDB)里,目前利用 X 射线衍射法已成功解析了 4 种蔗糖异构酶的三级结构,分别是来源于 *Klebsiella* sp. LX3 (PDB:1M53)^[18]、*Protaminobacter rubrum* CBS574.77 (PDB:3GBD)^[27]、*Pseudomonas mesoacidophila* MX-45 (PDB:1ZJA)^[22] 和 *Erwinia rhapontici* NX-5 (PDB:4HOW)^[28] 的蔗糖异构酶。其中,*P. mesoacidophila* MX-45 和 *E. rhapontici* NX-5 蔗糖异构酶突变体的结构以及其抑制剂结合体的结晶结构也得到全面解析^[19,28]。作为单亚基分子的蔗糖异构酶,其分子结构和糖苷酶 13(GH13)家族的酶分子结构类似,如寡-1,6-葡萄糖苷酶和 α -葡萄糖苷酶^[29],而且不同来源的蔗糖异构酶的三级结构同源性也很高^[25]。与 GH13 家族酶相比,蔗糖异构酶也是由 3 个结构域组成,包括 C 端结构域、N 端结构域和亚结构域^[30]。其中,N 端结构域是一个 $(\beta/\alpha)_8$ 桶状结构,是由 8 个 α 螺旋与 8 个 β 折叠组成,包括氨基酸残基 16~119 和 190~493,构成了蔗糖异构酶的催化活性中心,具有与糖苷酶 13 家族相似的底物结合和催化机制,同时连接着 C 端结构域和亚结构域^[26];C 端结构域由两个反平行 β -折叠组成,与 N 端结构域以及亚结构域之间形成离子键和氢键,用以确保酶活性中心所在区域的稳定性,氨基酸残基包括 494~573;亚结构域则由多个 loop 结构组成,参与底物的结合^[21],包括

氨基酸残基 120~190。

在对多种蔗糖异构酶氨基酸序列的多重比对发现,通常在 N 端结构域中存在一段包括 5 个氨基酸的特定序列。以来源于 *P. mesoacidophila* MX-45 的蔗糖异构酶 MutB 晶体结构为例(见图 1),Asp200、Glu254、Asp327、Phe256 和 Phe280 为高度保守序列,其中 Asp200、Glu254 和 Asp327 构成催化活性中心,位于蔗糖异构酶的催化口袋中,负责酶与底物的结合和催化^[19,21]。Phe256 和 Phe280 相距约 0.6 nm,在催化域入口形成一对芳香钳,将该位点对其进行特异性定点突变后,发现产物中仅含有葡萄糖和果糖,且没有生成海藻酮糖和异麦芽酮糖,说明突变后的酶失去了异构活性,表明这两个氨基酸在底物识别和产物特异性中起着重要作用^[21,31]。与 GH13 家族其他酶不同的是,由 5 个氨基酸组成的特定序列是蔗糖异构酶所特有的,并且该段独特的序列参与了酶的异构化反应^[32]。

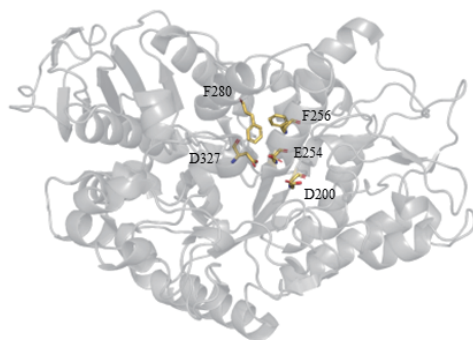


图 1 *P. mesoacidophila* MX-45 MutB 催化口袋示意图
Fig. 1 Schematic diagram of *P. mesoacidophila* MX-45 MutB catalytic pocket

1.4 蔗糖异构酶催化机理

蔗糖异构酶以蔗糖为底物时,催化过程包括异构化反应和水解反应。蔗糖通过异构化反应生成异麦芽酮糖和海藻酮糖,通过水解反应将蔗糖水解为葡萄糖和果糖(见图 2)。

Cheetham 在 20 世纪 80 年代提出了蔗糖异构酶的催化机理^[33]。以来源于 *E. rhapontici* 的蔗糖异构酶作为研究对象,探讨了蔗糖异构酶整个的催化反应过程。认为在催化反应中首先发生了水解反应,生成葡萄糖和果糖,然后葡萄糖基与果糖基的 C1 和 C6 位的羟基非选择性地结合,形成具有 α -1,6 糖苷键的异麦芽酮糖和 α -1,1 糖苷键的海藻酮糖。且在这个过程中,优先生成海藻酮糖,主要是由

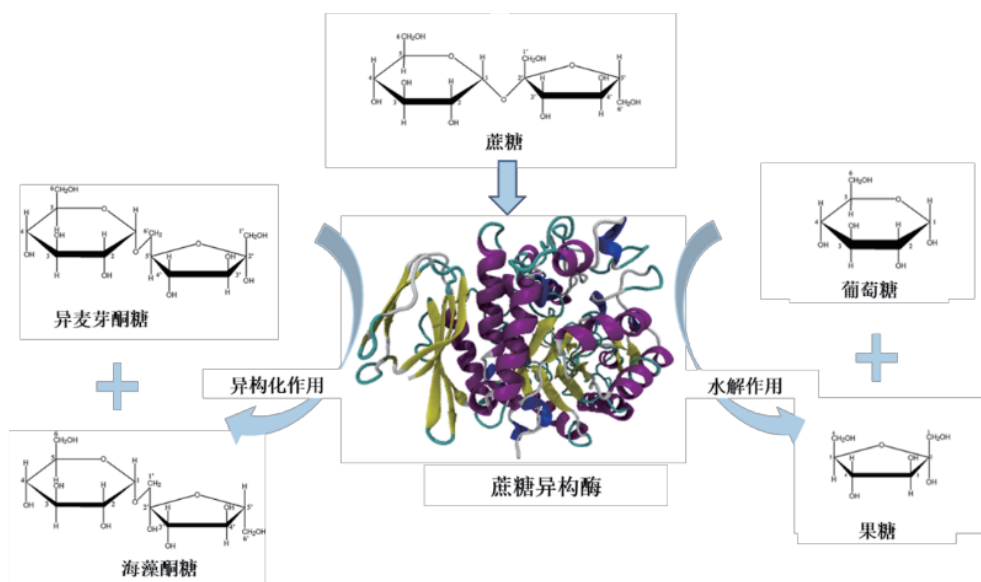


图2 蔗糖异构酶的水解和异构化作用

Fig. 2 Hydrolysis and isomerization of sucrose isomerase

于海藻酮糖产生过程中不需要果糖基进行 180° 旋转,其生成所需能量更低。

以源于 *S. plymuthica* ATCC 15928 的蔗糖异构酶为研究对象,有研究者提出了蔗糖异构酶的分子内重排^[14]。在催化的过程中,蔗糖异构酶将底物水解为葡萄糖和果糖,蔗糖异构酶与葡萄糖基紧密相连,而与果糖基仅通过离子键结合,致使果糖基可自由旋转和改变其位置,形成异麦芽酮糖和海藻酮糖。此外,通过实验发现,在反应体系中加入果糖会增加产物中海藻酮糖的比例,而在底物中加入一定量的葡萄糖会提高异麦芽酮糖的产率,从而验证了海藻酮糖和异麦芽酮糖的生成比例取决于底物蔗糖的互变异构率。

在上述研究的基础上,Zhang 等将来源于 *Klebsiella* sp. LX3 的蔗糖异构酶作为研究对象,提出了异构化反应和水解反应的两步催化机制,同时发现了蔗糖异构酶的保守序列,325RLDRD329^[18]。随后在 *P. mesoacidophila* MX-45^[34]和 *P. rubrum*^[31]来源的蔗糖异构酶的基因中也发现了此保守序列。在对 *P. rubrum* 蔗糖异构酶的 Arg325 和 Arg328 位置进行定点突变后,发现突变体生成异麦芽酮糖的比例出现不同程度的下降,且突变导致产物中有异麦芽糖的形成。研究发现,突变的这两个氨基酸是结合果糖基的两个重要位点,而突变导致酶对果糖基亲和力下降,容易与酶脱离;与此同时,体系中的葡

萄糖会充当底物迅速与酶结合,最终生成异麦芽糖。

近年来,Ravaud 等提出了新的蔗糖异构酶的催化机制,两步双位移催化机制^[21]。在蔗糖异构酶催化蔗糖生成异麦芽酮糖和海藻酮糖过程中,酶-糖基中间复合物共价键的形成与断裂是通过羧基离子过渡态来完成的。活性中心的谷氨酸作为酸性催化剂提供质子使底物糖苷键上的氧质子化,后通过天冬氨酸对蔗糖上 C1 位的氢原子进行亲核攻击,使其去质子化并生成酶- β -葡萄糖基复合物,最终果糖基通过互变异构生成异麦芽酮糖和海藻酮糖。

2 蔗糖异构酶的异源表达

利用基因工程等方法已将多种来源的蔗糖异构酶在大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和酵母菌等工程菌株中实现了异源表达。大肠杆菌(*Escherichia coli*)是生产目标产品的理想工业菌株之一,来源于 *Klebsiella planticola* 的 *SIase* 基因成功克隆并在 *E. coli* 中表达,所得蔗糖异构酶的水解活性随 pH 的升高而降低,异麦芽酮糖成为主要产物。Zhang 等克隆了菌株 *Erwinia* sp. Ejp617 的 *SIase* 基因在 *E. coli* BL21 (DE3) 中异源表达,经生物催化后,重组 *SIase* 可将 300.0 g/L 的蔗糖转化为 240.9 g/L 异麦芽酮糖^[35]。然而,大肠杆菌由于细胞壁热原和内毒素的合成,不适用于异麦芽酮糖的合成。因此,在安全的食

品级宿主中异源表达 SIase 受到越来越多的关注。乳酸乳杆菌(*Lactococcus lactis*)由于其非致病性、无侵染性的特性被认为是重组蛋白质生产和分泌的高效表达菌株^[36]。Park 等将来源于 *Enterobacter* sp. FMB-1 的 SIase 基因在 *L. lactis* MG1363 中异源表达,并将所得 SIase 用于异麦芽酮糖生产,其转化率为 72%^[37]。同样,枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)也

是常用菌株之一。将来源于 *E. rhapsontici* NX-5 的 SIase 基因在工程菌 *B. subtilis* WB800 中过表达,有效解决了异麦芽酮糖生产中的食品安全问题^[38]。另外,解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)具有 GRAS 认证,是一种公认安全的微生物,来源于 *P. dispersa* UQ68J 的 SIase 基因可在此酵母中进行高效表达^[39]。蔗糖异构酶的异源表达见表 1。

表 1 蔗糖异构酶的异源表达

Table 1 Heterologous expression of sucrose isomerase

SIase 基因来源	宿主	转化率/%	表达量	参考文献
<i>E. rhapsontici</i> NX-5	<i>B. subtilis</i> WB800	92	5.2 U/mL	[38]
<i>P. dispersa</i> UQ68J	<i>Y. lipolytica</i>	95	7.43 U/mL	[39]
<i>E. rhapsontici</i> NX-5	<i>B. subtilis</i> 168	92	0.218 U/L	[40]
<i>P. dispersa</i> UQ68J	<i>Y. lipolytica</i>	93	2.7 U/mg	[41]
<i>Enterobacter</i> sp. FMB-1	<i>S. cerevisiae</i> EBY100	7.4	NR	[42]

注:NR 代表未报道。

3 蔗糖异构酶的理性改造

虽然天然蔗糖异构酶可用于异麦芽酮糖的生物合成,但在工业应用过程中仍存在热稳定性差、转化率低等问题。基于结构信息的蛋白质工程可以

提高天然酶的应用性,因此出现了多种蛋白质工程方法(见表 2)。目前蔗糖异构酶的分子改造主要集中在提高热稳定性、提高异麦芽酮糖的产率以及减少副产物这 3 个方面。

表 2 蔗糖异构酶的分子改造

Table 2 Molecular modification of sucrose isomerase

来源	SIase	突变体	转化率/%	提高率 %/	参考文献
<i>Klebsiella</i> sp.	Pal I	E498P	84.1	27	[43]
		E498P/R310P	84.8	35	
<i>S.plymuthica</i> AS9	Pal I	E175N	77.8	2.0	[44]
		K576D	76.8	1.0	
		E175N/K576D	78.4	2.8	
<i>S.plymuthica</i>	SmuA	V465E	93.7	17.3	[45]
<i>S.plymuthica</i>	SmuA	T219L/V465E	94.7	18.4	
		D398G/V465E			
		Y219L/D398G/V465E			
<i>P.dispersa</i>	Sim1	Q299E	94.2	3.9	[46]
<i>Rhizobium</i> sp.	MutB	F164L	21.1	55.1	[47]

注:提高率表示突变型酶与野生型酶相比,异麦芽酮糖产量增加的百分比。

来源于 *Klebsiella* sp. LX3 菌株的 SIase (Pal I) 在 50 °C 条件下的半衰期只有 1.8 min, 这严重限制了该酶的工业化应用。为了提高其热稳定性,通过定点诱变对其进行分子改造,利用脯氨酸取代 Glu498 和 Arg310 后所得的突变酶,在 50 °C 条件下的半衰期是天然酶的 11 倍,显著提高了热稳定性,

与此同时异麦芽酮糖的转化率提高了 27%^[43]。在此基础上,Zhang 等又对 *Klebsiella* sp.LX3 来源的蔗糖异构酶的保守序列进行了大量的突变。结果发现,将保守序列中的精氨酸或天冬氨酸(Arg325、Arg328、Asp325 和 Asp329)突变为中性氨基酸或相反电荷的氨基酸时,生成产物中异麦芽酮糖占比下

降 26%~67%，而海藻酮糖的比例增加 17%~61%。上述结果表明，突变点并不影响酶活性，而仅影响其产物特异性，由高产量的异麦芽酮糖转化为高产量的海藻酮糖^[18]。

来源于 *Serratia plymuthica* AS9 的蔗糖异构酶是另一种研究较多的蔗糖异构酶。但前期研究结果表明来源于 *S.plymuthica* AS9 的蔗糖异构酶的热稳定性较差。为了获得热稳定较高的突变体，利用 B 因子位点选择结合定点突变技术构建了 3 种突变体，E175N、K576D 和 E175N/K576D。在 45 °C 培养条件下，突变体的半衰期分别是天然酶半衰期的 1.38、1.04、1.19 倍，热稳定性提高，同时异麦芽酮糖的得率也分别提高了 2.0%、1.0%、2.8%^[44]。此外，为了减少由 *S.plymuthica* AS9 蔗糖异构酶在生物合成过程中产生的副产物，Pilak 等采用了类似于“战舰策略”的半模拟蛋白质工程策略，对来源于 *S.plymuthica* 的 SIase 进行了 7 次循环突变，共涉及 55 个位点，最终获得了一株三重突变体 Y219L/D398G/V465E。该突变体的最适反应温度从 30 °C 提高到 35 °C，热稳定性和催化效率都明显提高^[45]。

而来源于 *P.dispersa* UQ68J 的 SIase 却表现出对异麦芽酮糖的产物特异性较低。为了克服上述缺点，研究者以靠近底物结合位点的 299 位氨基酸为目标，利用定点突变技术获得突变体 Q299E，其底物转化率从 (90.3±0.8)% 提高到 (94.2±0.4)%^[46]。此外，Lipski 等将来源于 *Rhizobium* sp. 的 SIase 进行随机突变，获得的 F164L 突变体将底物转化率提高了 55.1%^[47]。

4 生物催化生产异麦芽酮糖中蔗糖异构酶的固定化应用

异麦芽酮糖在自然界中的含量微乎其微，且提取困难，与其市场需求相去甚远。化学合成制备异麦芽酮糖难度较大，并且容易污染环境。因此，对于异麦芽酮糖的生产，国内外大都采用生物转化法，主要包括微生物转化法和酶转化法。作为生物转化异麦芽酮糖中重要酶制剂，蔗糖异构酶的固定化有助于提高其催化性能及稳定性，实现生物酶的回收或重复使用。

4.1 固定化细胞

微生物转化法是利用整个微生物细胞来生产异麦芽酮糖，也包括游离细胞转化法和固定化细胞

转化法。有研究者将 *Enterobacter* sp. FMB1 菌体与蔗糖混合发酵，48 h 后的产物得率高达 90%，然而由于其发酵环境复杂、成本较高，给后期分离造成困难，不适用于工业放大^[48]。随着固定化技术的提高，通过化学或物理手段将微生物细胞固定于某一区域内，在保持菌体催化活性的同时还可进行回收再利用。因此，与游离细胞生产异麦芽酮糖相比，固定化细胞具有简化下游工艺、连续操作生产、提高催化剂稳定性和操作稳定性、可重复使用性等优点。

近年来，已报道的固定化细胞转化法主要有海藻酸盐包埋法和壳聚糖-戊二醛交联法，所得的固定化细胞不仅可以提高异麦芽酮糖的产率还可改善其应用性能。Cheetham 等最早将 *E. rhapsodici* NCPPB 1578 细胞包埋进海藻酸盐凝胶颗粒，所得固定化细胞的异麦芽酮糖产率是 0.2 g/(h·g)，且与游离细胞相比，其操作稳定性提高^[33]。随后 Mundra 等将相同来源的细胞利用响应面分析法优化了该固定化过程，在海藻酸盐质量浓度为 5 g/dL、细胞载量为 5 g/L 时，达到异麦芽酮糖最大产率，且将异麦芽酮糖的产量提高了 40%^[49]。有研究者利用海藻酸钙对 *Erwinia* sp.D12 细胞进行固定化，采用响应面法优化了固定化工艺，同时评估了明胶和谷氨酰胺转氨酶的添加对海藻酸钙固定的 *Erwinia* sp.D12 细胞颗粒网状化的影响^[50]。结果表明，用 3 g/dL 海藻酸钠固定细胞，细胞固定化质量浓度为 47 g/dL，添加 0.3 mol/L 氯化钙、1.7 g/dL 的明胶和 0.15 g/dL 的谷氨酰胺转氨酶所得的固定化细胞，在连续生产 7 次后其蔗糖转化率还能保持 50%~60%。随后又利用海藻酸钙超声固定 *Erwinia* sp.D12 细胞颗粒填充床柱，其蔗糖最大转化率为 53%~59%，且能够在 480 h 内保持较高活性。降低温度对所得异麦芽酮糖结晶后，结晶纯度高达 96.5%^[51]。Li 等将表达 SIase 基因的重组 *E.coli* 细胞用戊二醛处理后，重悬于海藻酸钠溶液中，并加入氯化钙溶液制备固定化细胞微球。所得固定化细胞在 1.5 h 内的蔗糖转化率为 87%，且能够在酶反应器中连续 30 d 保持稳定^[16]。

为了提高重组 *E.coli* 细胞的重复使用性，Li 等又优化了其固定化条件，得出 2 g/dL 的海藻酸钠和 3 g/dL 的氯化钙为最优固定化条件，且在重复使用 30 次后其稳定性良好，采用柱式反应器连续生产 40 d 后，异麦芽酮糖产率(转化率)还可高达 83%^[52]。除此之外，还有其他一些微生物用于海藻酸盐固定

化细胞生产异麦芽酮糖,比如 *Klebsiella* sp.^[53-54]、*P. rubrum*^[55]、*S. plymuthica* ATCC15928^[56-58]等。用海藻酸钙、戊二醛和聚乙烯亚胺对 *P. rubrum* 细胞进行固定化,得到稳定的固定化细胞微球,可重复使用 24 个批次,异麦芽酮糖产率(转化率)高达 89%~94%^[55]。Krastanov 等利用中空纤维膜反应器固定化 *S. plymuthica* ATCC15928 细胞,固定化细胞的催化活性随操作时间的延长缓慢下降,在连续操作 90 d 后活性仅丧失了 11%,且在生物反应器的循环模式下,质量浓度 40~60 g/dL 的底物在 36~48 h 内的转化率均能达到 90%以上^[56]。随后又利用壳聚糖-戊二醛交联法将 *S. plymuthica* ATCC15928 细胞进行固定,所得固定化细胞的底物转化率高达 94%^[57]。

4.2 固定化酶

细胞固定化具有细胞自溶、细胞代谢导致产物浓度低等缺点。同时,固定化细胞生产异麦芽酮糖,存在菌体浓度低、生产强度弱的缺陷^[54],因此,酶转化法受到越来越多的关注。酶转化法是指将蔗糖异构酶从微生物中分离出来,通过游离酶或固定化酶转化制备异麦芽酮糖。常用的 SIase 的固定化方法

包括交联、包埋和吸附。Contesini 等将来源于 *Erwinia* sp. D12 的 SIase 分别利用低甲氧基果胶和脂肪微胶囊包埋和铁铝酸四钙吸附两种方法制备固定化 SIase,所得固定化 SIase 的异麦芽酮糖转化率分别为 30%和 60%^[59]。随后又将铁铝酸四钙吸附的固定化条件进行了优化,所得的固定化 SIase 的异麦芽酮糖转化率提高到 63%^[60]。Zhang 等将重组 SIase 纯化后利用聚乙烯醇-海藻酸钠进行固定,该酶的稳定性显著提高,在循环使用 13 个批次后还能保持 96%的高转化率^[61]。与包埋和吸附方法相比,交联法固定化酶更加稳定,酶不易脱落,重复使用性好。Wu 等将 SIase 交联固定到聚赖氨酸修饰的介孔二氧化钛上,其酶活力回收率高达 93%,且具有良好的操作稳定性,在连续反应条件下其半衰期可达 114 h,使用 16 个批次后仍能保持 95%的蔗糖转化率^[13]。此外,作者也以来源于 *Pantoea dispersa* 的蔗糖异构酶为模型酶,分别采用了硅球-戊二醛吸附交联法和戊二醛-葡聚糖醛交联法制备了交联酶聚集体,大幅提高了固定化酶的催化性能^[62-63]。目前关于固定化细胞或酶生产异麦芽酮糖的研究见表 3。

表 3 固定化细胞或酶生产异麦芽酮糖

Table 3 Isomaltulose production by immobilized cells or enzymes

	来源	方法	转化率/%	稳定性	参考文献
固定化细胞	Recombinant <i>E. coli</i>	海藻酸盐包埋	87	30 d 内保持活性	[16]
	<i>E. rhapsontici</i> NCPPB 1578	海藻酸盐包埋	75	半衰期 8 625 h	[33]
	<i>Erwinia</i> sp. D12	海藻酸盐包埋	50~60	循环 7 次后仍稳定	[50]
	<i>Erwinia</i> sp. D12	海藻酸盐包埋	53~59	480 h 保持活性	[51]
	Recombinant <i>E. coli</i>	海藻酸盐包埋	>83	40 d 内保持活性	[52]
	<i>Klebsiella</i> sp. LX3	海藻酸盐包埋	>87	-	[53]
	<i>Klebsiella</i> sp. K18	海藻酸盐包埋	62.5	-	[54]
	<i>P. rubrum</i> CBS574.77	海藻酸盐包埋	89~94	-	[55]
	<i>S. plymuthica</i> ATCC15928	中空纤维膜	>90	半衰期 42 d	[56]
	<i>S. plymuthica</i> ATCC15928	戊二醛交联壳聚糖	94	半衰期 155 d	[57]
<i>S. plymuthica</i> ATCC15928	海藻酸盐包埋	>70	半衰期 7 d	[58]	
固定化酶	<i>E. rhapsontici</i> NX-5	聚赖氨酸改性介孔交联	95	半衰期 114 h	[13]
	<i>Erwinia</i> sp. D12	硅藻土吸附	60	-	[59]
	<i>Y. lipolytica</i>	聚乙烯醇-海藻酸盐包埋	96	-	[61]
	<i>Pantoea dispersa</i>	硅球-戊二醛吸附交联	-	循环 15 次后仍稳定	[62]
	<i>Pantoea dispersa</i>	戊二醛-葡聚糖醛交联	88.4	循环 10 次仍保持 61%活性	[63]
	<i>Klebsiella</i> sp. LX3	海藻酸盐包埋	-	-	[64]
	<i>Klebsiella</i> sp. LX3	戊二醛交联	-	-	
	<i>B. pumilus</i>	壳聚糖吸附戊二醛交联	87.8	-	[65]

5 展望

异麦芽酮糖具有优良的理化性质和保健功效,是蔗糖的理想替代物,在减糖等健康食品中拥有广阔的市场前景。蔗糖异构酶是生物转化异麦芽酮糖最有效的生物酶制剂,近年来围绕菌株的筛选、酶的异源表达、酶分子改造以及固定化细胞/酶等领域,进行了大量且系统的研究,使人们对 SIase 有了更深入的认识,然而作为一种具有重要应用价值的工业酶,仍存在一些问题亟待解决。

现有的食品安全级菌株存在分泌量低、热稳定性差、应用性能差等缺陷,要解决这些问题,可以从

菌株和酶两方面进行改造。选育 SIase 高产菌株,优化工程菌株的发酵工艺,构建高效的基因工程产酶菌株;或在 SIase 结构的研究基础上,首先确定了影响酶活性的关键区域,通过理性设计改造酶分子,改善酶的催化特性,如提高热稳定性和 pH 耐受性、增加产物特异性等。另外,部分 SIase 的热稳定较差,在进行了相关蛋白质工程修饰后,效果并不是很明显,可进一步对其进行固定化,而现今的固定化细胞或固定化酶的技术相对不成熟,为了提高 SIase 在工业生产中的应用性能,还需要对 SIase 的关键位点进行进一步的探索和修饰。

参考文献:

- [1] LIU L, BILAL M, LUO H, et al. Studies on biological production of isomaltulose using sucrose isomerase: current status and future perspectives[J]. **Catalysis Letters**, 2021, 151(7): 1868-1881.
- [2] LI L, WANG H, CHENG H, et al. Isomaltulose production by yeast surface display of sucrose isomerase from *Pantoea dispersa* on *Yarrowia lipolytica*[J]. **Journal of Functional Foods**, 2017, 32: 208-217.
- [3] MU W, LI W, 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.
- [4] SAWALE P D, SHENDURSE A M, MOHAN M S, et al. Isomaltulose (palatinose) : an emerging carbohydrate[J]. **Food Bioscience**, 2017, 18: 46-52.
- [5] MU W, LI W, WANG X, et al. Current studies on sucrose isomerase and biological isomaltulose production using sucrose isomerase[J]. **Applied Microbiology Biotechnology**, 2014, 98(15): 6569-6582.
- [6] MINAMI T, FUJIWARA T, OOSHIMA T, et al. Interaction of structural isomers of sucrose in the reaction between sucrose and glycosyltransferases from mutans streptococci[J]. **Molecular Oral Microbiology**, 2010, 5(4): 189-194.
- [7] LINA B R, JONKER D, KOZIANOWSKI G. Isomaltulose (palatinose) : a review of biological and toxicological studies[J]. **Food & Chemical Toxicology**, 2002, 40(10): 1375-1381.
- [8] 张伟伟, 梁磊, 周正雄, 等. 蔗糖异构化生产新型甜味剂异麦芽酮糖的研究现状与前景展望[J]. **甘蔗糖业**, 2014, (4): 6.
- [9] 陈建新, 刘军昌, 段作营, 等. 异麦芽酮糖的氢化反应过程[J]. **无锡轻工大学学报**, 2001, 20(2): 142-145.
- [10] SHYAM S, RAMADAS A, CHANG S K. Isomaltulose: recent evidence for health benefits[J]. **Journal of Functional Foods**, 2018, 48: 173-178.
- [11] 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.
- [12] LI S, XU H, YU J, et al. Enhancing isomaltulose production by recombinant *Escherichia coli* producing sucrose isomerase: culture medium optimization containing agricultural wastes and cell immobilization[J]. **Bioprocess & Biosystems Engineering**, 2013, 36(10): 1395-1405.
- [13] WU L, LIU Y, CHI B, et al. An innovative method for immobilizing sucrose isomerase on epsilon-poly-L-lysine modified mesoporous TiO₂[J]. **Food Chemistry**, 2015, 187: 182-188.
- [14] VERONESE T, PERLOT P. Mechanism of sucrose conversion by the sucrose isomerase of *Serratia plymuthica* ATCC 15928[J]. **Enzyme & Microbial Technology**, 1999, 24(5): 263-269.
- [15] NAGAI-MIYATA Y, TSUYUKI K I, SUGITANI T, et al. Isolation and characterization of a trehalulose-producing strain of

- Agrobacterium*[J]. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 1993, 57(12):2049-2053.
- [16] LI S, CAI H, QING Y, 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.
- [17] WU L, BIRCH R G. Characterization of *Pantoea dispersa* UQ68J: producer of a highly efficient sucrose isomerase for isomaltulose biosynthesis[J]. **Journal of Applied Microbiology**, 2010, 97(1):93-103.
- [18] ZHANG D, LI N, LOK S M, et al. Isomaltulose synthase (Pal I) of *Klebsiella* sp. LX3: crystal structure and implication of mechanism[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2003, 278(37):35428-35434.
- [19] RAVAUD S, WATZLAWICK H, HASER R, et al. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of the trehalulose synthase MutB from *Pseudomonas mesoacidophila* MX [J]. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications**, 2005, 61(1):100-103.
- [20] SALVUCCI M E. Distinct sucrose isomerases catalyze trehalulose synthesis in whiteflies, *Bemisia argentifolii*, and *Erwinia rhapontici*[J]. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, 2003, 135(2):385-395.
- [21] RAVAUD S, ROBERT X, WATZLAWICK H, et al. Trehalulose synthase native and carbohydrate complexed structures provide insights into sucrose isomerization[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2007, 282(38):28126-28136.
- [22] NAGAI Y, SUGITANI T, TSUYUKI K I. Characterization of alpha-glucosyltransferase from *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45[J]. **Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan**, 1994, 58(10):1789-1793.
- [23] REN B, LI S, XU H, et al. Purification and characterization of a highly selective sucrose isomerase from *Erwinia rhapontici* NX-5 [J]. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 2011, 34(5):629-637.
- [24] LEE H C, KIM J H, KIM S Y, et al. Isomaltose 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.
- [25] 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.
- [26] YONG K P, UEKANE R T, PUPIN A M. Conversion of sucrose to isomaltulose by microbial glucosyltransferase[J]. **Biotechnology Letters**, 1992, 14(7):547-551.
- [27] RAVAUD S, WATZLAWICK H, HASER R, et al. Overexpression, purification, crystallization and preliminary diffraction studies of the *Protaminobacter rubrum* sucrose isomerase SmuA[J]. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, 2006, 62(1):74-76.
- [28] ZHENG X, SHA L, JIE L, et al. The structural basis of *Erwinia rhapontici* isomaltulose synthase[J]. **Plos One**, 2013, 8(9):1-11.
- [29] MACGREGOR E A, JANECEK S, SVENSSON B. Relationship of sequence and structure to specificity in the α -amylase family of enzymes[J]. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure and Molecular Enzymology**, 2001, 15(1):1-20.
- [30] RAVAUD S, ROBERT X, WATZLAWICK H, et al. Structural determinants of product specificity of sucrose isomerases [J]. **FEBS Letters**, 2009, 583(12):1964-1968.
- [31] LEE H C, KIM J H, KIM S Y, et al. Isomaltose 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.
- [32] ZHANG D, LI N, SWAMINATHAN K, et al. A motif rich in charged residues determines product specificity in isomaltulose synthase[J]. **FEBS Letters**, 2003, 534(16):151-155.
- [33] CHEETHAM P S J. The extraction and mechanism of a novel isomaltulose-synthesizing enzyme from *Erwinia rhapontici* [J]. **Biochemical Journal**, 1984, 220:213-220.

- [34] YUKIE M, TOSHIKI S, KEN-ICHIROU T, et al. Isolation and characterization of *Pseudomonas mesoacidophila* producing trehalulose[J]. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 1992, 56(16): 1680-1681.
- [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] MORELLO E, BERMU D L G, LLULL D, et al. *Lactococcus lactis*, an efficient cell factory for recombinant protein production and secretion[J]. **Journal of Molecular Microbiology & Biotechnology**, 2008, 14(1): 48-58.
- [37] 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.
- [38] WU L, WU S, QIU J, et al. Green synthesis of isomaltulose from cane molasses by *Bacillus subtilis* WB800-pHA01-pal I in a biologic membrane reactor[J]. **Food Chemistry**, 2017, 229(15): 761-768.
- [39] 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.
- [40] 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.
- [41] LI L J, WANG H W, CHENG H R, et al. Isomaltulose production by yeast surface display of sucrose isomerase from *Pantoea dispersa* on *Yarrowia lipolytica*[J]. **Journal of Functional Foods**, 2017, 32: 208-217.
- [42] LEE G Y, JUNG J H, SEO D H, et al. Isomaltulose production via yeast surface display of sucrose isomerase from *Enterobacter* sp. FMB-1 on *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Bioresource Technology**, 2011, 102(19): 9179-9184.
- [43] ZHANG D H, LI X Z, ZHANG L H. Isomaltulose synthase from *Klebsiella* sp. strain LX3: gene cloning and characterization and engineering of thermostability[J]. **Applied Environment Microbiology**, 2002, 68(6): 2676-2682.
- [44] DUAN X G, CHENG S, AI Y X, et al. Enhancing the thermostability of *Serratia plymuthica* sucrose isomerase using B-factor-directed mutagenesis[J]. **Plos One**, 2016, 11(2): 1-16.
- [45] PILAK P, SCHIEFNER A, SEIBOTH J, et al. engineering a highly active sucrose isomerase for enhanced product specificity by using a "battleship" strategy[J]. **ChemBioChem**, 2020, 21(15): 2161-2169.
- [46] LIU H J, XING X, LU F P, et al. Functional modification of the substrate-binding site for isomaltulose production based on predicted structure of sucrose isomerase from *Pantoea dispersa* UQ68J[J]. **International Conference on Applied Biotechnology**, 2016, 16(2): 59-68.
- [47] LIPSKI A, WATZLAWICK H, RAVAUD S, et al. Mutations inducing an active-site aperture in *Rhizobium* sp. sucrose isomerase confer hydrolytic activity[J]. **Acta Crystallographica Section D**, 2013, 69(2): 298-307.
- [48] CHO M H, PARK S E, JIN K L, 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.
- [49] 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.
- [50] KAWAGUTI H Y, CARVALHO P H, FIGUEIRA J A, et al. Immobilization of *Erwinia* sp. D12 cells in alginate-gelatin matrix and conversion of sucrose into isomaltulose using response surface methodology[J]. **Enzyme Research**, 2011, 2011: 1-8.
- [51] KAWAGUTI H Y, SATO H H. Production of isomaltulose obtained by *Erwinia* sp. cells submitted to different treatments and immobilized in calcium alginate[J]. **Food Science and Technology**, 2011, 31: 257-263.
- [52] LI S, XU H, YU J, et al. Enhancing isomaltulose production by recombinant *Escherichia coli* producing sucrose isomerase: culture medium optimization containing agricultural wastes and cell immobilization[J]. **Bioprocess Biosystems Engineering**, 2013, 36(10): 1395-1405.
- [53] 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.

- [54] 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]. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2009, 40:66-72.
- [55] DE OLIVA-NETO P, MENAO P T. Isomaltulose production from sucrose by *Protaminobacter rubrum* immobilized in calcium alginate[J]. **Bioresource Technology**, 2009, 100(18):4252-4256.
- [56] KRASTANOV A, BLAZHEVA D, STANCHEV V. Sucrose conversion into palatinose with immobilized *Serratia plymuthica* cells in a hollow-fibre bioreactor[J]. **Process Biochemistry**, 2007, 42(12):1655-1659.
- [57] 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.
- [58] DANIELA C O, HELIA H S. Isomaltulose production using free and immobilized *Serratia plymuthica* cells[J]. **African Journal of Biotechnology**, 2016, 15(20):835-842.
- [59] 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.
- [60] CONTESINI F J, DE OLIVEIRA P C, GROSSO C R F. Single-step purification, characterization and immobilization of a sucrose isomerase from *Erwinia* sp.[J]. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2013, 2(4):322-327.
- [61] ZHANG P, WANG Z P, LIU S, et al. Overexpression of secreted sucrose isomerase in *Yarrowia lipolytica* and its application in isomaltulose production after immobilization[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2018, 121:97-103.
- [62] 陈宁, 常保根, 施念, 等. 硅纳米粒子吸附交联固定化蔗糖异构酶的制备及其酶学性能研究[J]. **食品与发酵工业**, 2022, 48(19):9-15.
- [63] CHEN N, CHANG B, SHI N, et al. Robust and recyclable cross-linked enzyme aggregates of sucrose isomerase for isomaltulose production[J]. **Food Chemistry**, 2023, 399:1-8.
- [64] 王兵兵, 张永吉, 李宪臻, 等. 蔗糖异构酶 Pal I 包埋和交联固定化方法比较[J]. **食品科学技术学报**, 2019, 37(1):36-40.
- [65] 吴丹, 耿梦华, 陈晟, 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.

科技信息

澳大利亚将 7 种新食品纳入基于合规的干预计划

2022 年 12 月 9 日, 澳大利亚农业、渔业和林业部将辣椒粉等 7 种新食品产品纳入基于合规的干预计划 (CBIS), 具体名单如下: 1) 来自墨西哥的新鲜芦笋 (0709.20.00); 2) 来自各国的干柑橘皮 (0814.00.00); 3) 来自所有国家的粉碎或磨碎的辣椒粉 (0904.22.00.04); 4) 来自所有国家的压碎或磨碎的香草 (0905.20.00); 5) 来自所有国家的干、腌或煮香草豆 (0905.10.00); 6) 来自泰国的半加工菠萝 (0804.30.00); 7) 来自中国或韩国的半加工大蒜 (0703.20.00.42)。农业、渔业和林业部表示, 要获得 CBIS 下基于风险的干预资格, 进口商需要提供以下材料: 符合关税进口条件的产品、以行模式提交条目、满足其货物的进口条件、满足重复合规要求, 如有需要, 需提交带有正确的 AQIS 商品代码 (ACC) 的条目。此外, 符合 CBIS 条件的商品仍需要满足其他生物安全和进口食品要求。所有进口食品必须符合 1992 年进口食品管制法, 通过进口食物检验计划进行监察。

[信息来源] 中华人民共和国海关总署. 澳大利亚将 7 种新食品纳入基于合规的干预计划 [EB/OL]. (2022-12-20). <http://www.tbt.org.cn/warningDetail.html?id=xQw6q4LFCuwTzmHbRYmBJCopFOvT5RxRUpz6HMB>