

# 蔗糖合成结构可控的功能性淀粉研究进展

张学文<sup>1,2</sup>, 孙媛霞<sup>\*1,2</sup>

(1. 中国科学院天津工业生物技术研究所 工业酶国家工程研究中心, 天津 300308; 2. 国家合成生物技术创新中心, 天津 300308)

**摘要:** 功能性淀粉的开发和应用是食品和医药工业的研究热点之一, 越来越受到消费者的青睐。酶法合成是获得功能性淀粉的有效途径, 因其具有绿色环保、安全健康等特点受到多个领域学者的广泛关注。作者概述了蔗糖人工合成直链淀粉和高支化淀粉的结构调控原理, 总结了淀粉蔗糖酶和糖原分支酶在功能性淀粉结构合成中的研究进展, 阐述了直链淀粉和高支化淀粉在功能食品和医药领域中研究动态及应用前景, 为功能性淀粉的进一步开发提供借鉴和参考。

**关键词:** 功能性淀粉; 淀粉蔗糖酶; 糖原分支酶; 结构调控

中图分类号: Q 814.9 文章编号: 1673-1689(2022)10-0037-12 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2022.10.003

## Controllable Synthesis of Functional Starch from Sucrose

ZHANG Xuewen<sup>1,2</sup>, SUN Yuanxia<sup>\*1,2</sup>

(1. National Engineering Center for Industrial Enzymes, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China; 2. National Technology Innovation Center of Synthetic Biology, Tianjin 300308, China)

**Abstract:** The development and application of functional starch are one of the hot research areas in food and medicine industries. Functional starch draws more and more attention from customs. It is an efficient method for the synthesis of functional starch by enzymatic catalysis. Due to its green environmental protection, safety and health characteristics, it has received extensive attention from scholars in many fields. In this paper, the structural regulation principle of artificial synthesis of amylose and highly branched starch using sucrose is summarized, and the research progress of amylosucrase and glycogen branching enzyme in the synthesis of functional starch is reviewed. The research trends and application prospects of starch in the field of functional food and medicine is illustrated, providing a reference for further development of functional starch.

**Keywords:** functional starch, amylosucrase, glycogen branching enzyme, structural regulation

随着消费者对功能食品和药物递送提出的更高需求, 采用酶法制备结构可控的功能性淀粉已成为一种发展趋势<sup>[1]</sup>。直链淀粉和高支化淀粉是功能

性淀粉的重要组成部分。虽然天然淀粉中存在直链淀粉, 但其分离难度大、纯度低、结构不均一, 限制了其在功能食品及医药等领域的应用<sup>[2-3]</sup>。高支化淀

收稿日期: 2022-05-23

基金项目: 天津市合成生物学创新能力提升项目(TSBICIP-CXRC-012); 中科院-广西 STS 项目(KFJ-STG-QYZD-200)。

\* 通信作者: 孙媛霞(1963—), 女, 博士, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事功能糖研究与开发方面研究。E-mail: sun\_yx@tib.cas.cn

粉是天然淀粉的衍生物,具有良好的水溶性、抗降解性等特性,使其在功能食品和药物递送等方面具有广阔应用前景。以淀粉为底物酶法合成直链淀粉和高支化淀粉具有结构调控性差的缺陷<sup>[4]</sup>,而以蔗糖为底物合成结构可控淀粉已成为功能性淀粉合成的新手段。作者旨在综述以蔗糖合成直链淀粉和高支化淀粉的研究进展及其在功能食品及医药等领域中的应用前景,为结构可控的功能性淀粉创新性研发提供参考。

## 1 直链淀粉的定向合成

### 1.1 蔗糖合成功能性多糖概况

蔗糖是由葡萄糖和果糖通过  $\alpha$ -1,2 糖苷键连接而成,再利用生物酶法进行深加工得到异麦芽酮糖、异麦芽糖、低聚果糖、低聚麦芽聚糖等具有高附加值的功能性糖<sup>[5-8]</sup>。近年来,以蔗糖为底物制备功能性多糖的报道逐渐增多,其中  $\beta$ -果聚糖、 $\beta$ -葡聚糖和  $\alpha$ -葡聚糖是食品工业中具有重要应用的功能性多糖(见图 1)。 $\beta$ -果聚糖是一类具有重要益生作用多糖,例如菊糖和果聚糖等。 $\beta$ -果聚糖可以促进肠道双歧杆菌增殖,改善肠道微环境,降低胆固醇和脂肪吸收<sup>[9]</sup>,还具有调节血糖、降低糖尿病引起的氧化应激反应、保湿与冷冻保护的功能<sup>[10-11]</sup>,已被广泛开发成稳定剂、表面形成剂、乳化剂、食品风味载体等应用于食品、医药和化工行业<sup>[12]</sup>。 $\beta$ -葡聚糖作为功能性食品原料,可作为食品增稠剂、膳食纤维、脂肪替代物等应用于食品工业中,同时还具有降低胆固醇、调节免疫力、改善肠道菌群等多种益生功能<sup>[13]</sup>。

蔗糖作为葡萄糖供体能够合成结构丰富的功能性  $\alpha$ -葡聚糖,包括直链淀粉、葡聚糖、Reuteran 和交替糖等。多种类型的糖苷键极大地提高了功能性  $\alpha$ -葡聚糖的结构多样性,使其具有抗消化、调节肠道微生物种群等益生作用。直链淀粉由  $\alpha$ -1,4 糖苷键连接的重复葡萄糖单元构成,是天然淀粉的重要组成部分。除作为能量来源之外,直链淀粉由于其高度可控的螺旋结构被开发为功能性高分子材料<sup>[4]</sup>。在水溶液中直链淀粉单链能够自发形成双螺旋结构,同时在内部空腔中结合客体分子形成超分子聚合物<sup>[15]</sup>。自然界中直链淀粉通常与支链淀粉相互交联形成淀粉颗粒,由于分离方法限制,高纯度

的直链淀粉很难从自然界中分离获得,酶法体外合成是获得结构可控直链淀粉的有效途径<sup>[16]</sup>。

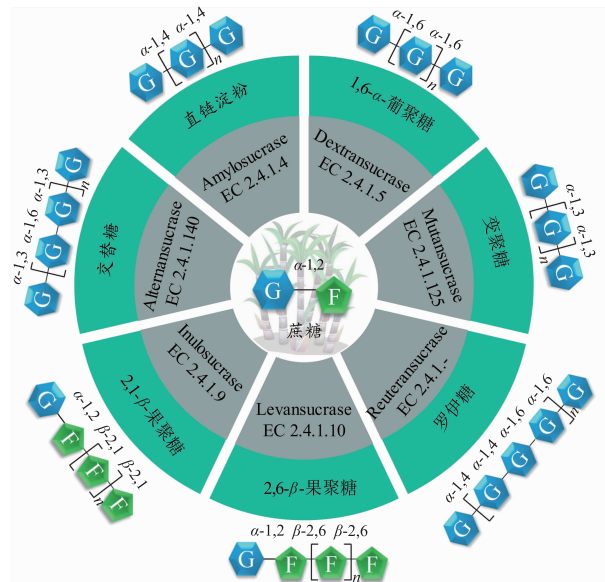


图 1 蔗糖制备多功能葡聚糖和果聚糖

Fig. 1 Enzymatic synthesis of functional glucans and fructosans from sucrose

### 1.2 蔗糖合成直链淀粉途径

蔗糖磷酸化酶(sucrose phosphorylase, SP)和葡聚糖磷酸化酶(glucan phosphorylase, GP)是催化蔗糖合成直链淀粉的典型磷酸化酶体系(见图 2)。SP以蔗糖为底物催化  $\alpha$ -D-葡萄糖-1-磷酸(Glc-1-P)的合成。GP利用 Glc-1-P 在引物非还原端进行糖链延伸,最终合成直链淀粉<sup>[17]</sup>。GP 合成直链淀粉的引物通常为麦芽寡糖,最短引物为麦芽四糖<sup>[18]</sup>。由于  $\alpha$ -1,4 糖苷键的断裂和 1-磷酸键的形成需要相似的能量,因此 GP 催化的反应为可逆反应,除催化糖链的延伸外还可以催化  $\alpha$ -1,4 葡聚糖从非还原端磷解生成游离 Glc-1-P<sup>[19]</sup>。调控蔗糖与引物的比例能在一定程度上实现直链淀粉长度的调控<sup>[20]</sup>,但直链淀粉的长度还受到两种酶的比例、引物浓度、蔗糖浓度等多因素影响,这给直链淀粉定向合成造成了很大困难。

淀粉蔗糖酶(amylosucrase, ASase)催化蔗糖合成直链淀粉是直链淀粉生物合成的新途径,此方法仅需要淀粉蔗糖酶且不需要添加引物。相比于磷酸化酶合成体系,淀粉蔗糖酶体系更为简洁高效,且直链淀粉的结构仅受酶催化特性和蔗糖浓度的影响。

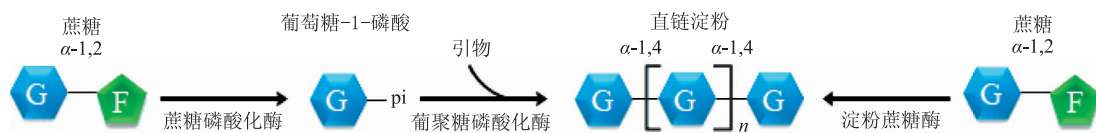


图2 蔗糖合成直链淀粉的酶促体系

Fig. 2 Enzymatic synthesis of amylose from sucrose

### 1.3 淀粉蔗糖酶学性质及催化机理

1974年,研究人员分析得到可产胞外酶的 *Neisseria polysaccharea* 菌株,而该酶可以将蔗糖催化为淀粉状聚合物<sup>[21]</sup>。1999年Montalk等报道了第一个来自 *N. polysaccharea* 的ASase基因序列(NpAS)<sup>[22]</sup>,是对ASase研究的新起点。随着研究的深入,多种来源的ASase被鉴定出来,其性质对比如表1所示<sup>[5,23-30]</sup>。ASase的最适温度为30~45℃,最

适pH为7.0~8.0。从表1可以发现ASase拥有较强的聚合活性,且均表现出一定的水解活性和异构活性。来自 *C. carbonis* 的CcAS产物中直链淀粉的质量分数达到84.0%,是目前已知最高水平,且水解产物葡萄糖和果糖的质量分数约7%,异构产物松二糖质量分数约10%。聚合产物直链淀粉链长分布差异较大,因此改变淀粉蔗糖酶催化特性能够实现淀粉长度的特异性调控。

表1 不同来源淀粉蔗糖酶性质对比

Table 1 Properties of amylomaltases from diverse resources

微生物来源	Genbank 登录号	温度/℃	最适 pH	产物中直链淀粉质量分数/%	直链淀粉组分相对含量 #			比活力 / (U/mg)	参考文献
					DP≤15	15<DP≤30	DP>30		
<i>Cellulomonas carbonis</i>	KGM11272.1	40	7.0	84.0	28	40	32	4.7	[5]
<i>Alteromonas machleodii</i>	BAG82876.1	45	8.0	—	40	55	5	—	[23]
<i>Arthrobacter chlorophenolicus</i>	ACL41561.1	45	8.0	78.4	—	—	—	1.15	[24]
<i>Deinococcus geothermalis</i>	ABF44874.1	50	7.0	76.0	35	50	15	5.13	[25]
<i>Deinococcus radiodurans</i>	NP_294657	30	7.0	56.9	—	—	—	4.00	[26]
<i>Deinococcus radiopugnans</i>	—	40~45	8.0	82.7	28	42	30	—	[27]
<i>Methylobacillus flagellatus</i>	ABE50875.1	45	8.5	75.5	35	41	24	—	[28]
<i>Neisseria polysaccharea</i>	CAA09772.1	30	6.4	80.1	25	40	35	0.72	[29]
<i>Neisseria subflava</i>	EFC51554.1	45	8.0	—	—	—	—	2.78	[30]

注:\*1 U表示一当量的酶1 min内生成1 μmol果糖(μmol/(min·mg)),#数值通过文献中HPAEC谱图峰面积估算获得。

淀粉蔗糖酶属于糖苷水解酶家族13(GH13),可以进行水解、聚合等催化多种反应。淀粉蔗糖酶和其他糖苷水解酶和糖苷转移酶拥有相似的反应机理(见图3)。首先,催化中心的质子供体(Asp)对蔗糖中糖苷键进行质子化,并对葡萄糖的异头碳进行亲核攻击,形成酶与底物分子共价连接中间体。中间体与水分子或糖受体反应完成水解或转苷催化。酶分子活性中的水分子和糖受体的浓度决定了水解和转苷活性。当蔗糖是唯一底物时,淀粉蔗糖酶前期水解蔗糖获得游离葡萄糖(转苷催化受体),通过转苷催化把蔗糖中葡萄糖单元连接到游离葡萄糖受体上合成麦芽二糖,此可继续作为受体实现糖链的不断延伸,最终合成直链淀粉。

### 1.4 淀粉蔗糖酶结构与直链淀粉合成调控机理

以蔗糖为底物时,实现ASase合成结构可控的

直链淀粉,需要对蛋白质结构和催化机理有深入认识。随着对ASase研究的深入,目前已有3种不同来源的ASase晶体结构被解析出来,分别为DgAS(PDB:3UCQ, *D. geothermalis*)、DrAS(PDB:4AYS, *D. radiodurans*)和NpAS(PDB:1G5A, *N. polysaccharea*)<sup>[31-33]</sup>。ASase的每个单亚基都含有5个结构域,分别为N结构域、A结构域、B结构域、B'结构域和C结构域(见图4(a))。A、B、C结构域在GH13家族中普遍存在,而N结构域和B'结构域是ASase的独有结构域。A结构域具有(β/α)<sub>8</sub>筒状结构,是具有催化能力的关键结构。N结构域和C结构域同源性非常低,研究表明N结构域和C结构域影响ASase是单体还是多聚体形态<sup>[33]</sup>。

2001年随着NpAS晶体结构被解析,位于活性中心的多个保守氨基酸(Asp144、Tyr147、His187、

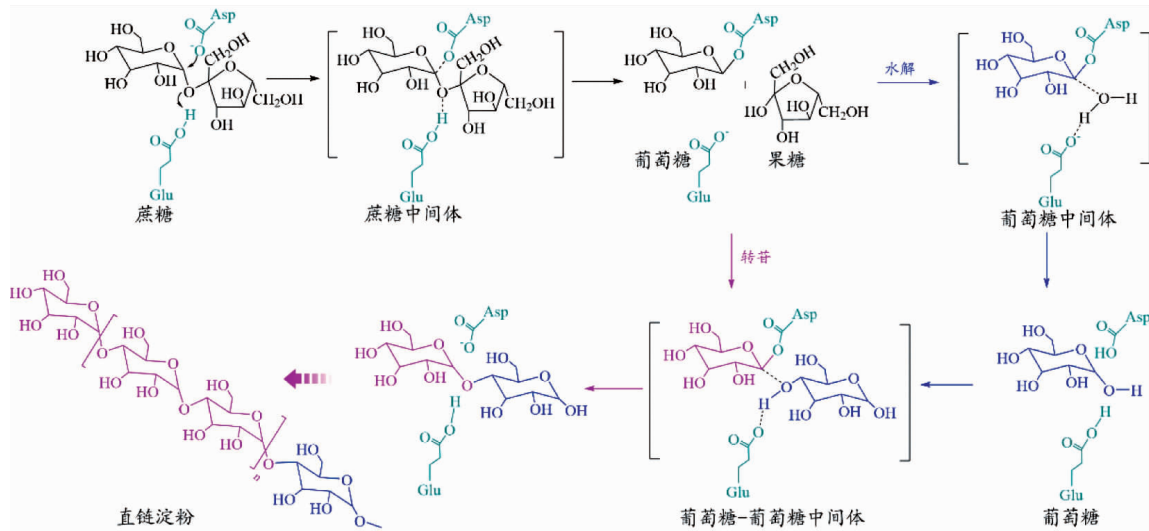


图3 淀粉蔗糖酶水解和转苷催化机理

Fig. 3 Reaction mechanism for hydrolysis and transglycosylation of amylosucrase

Arg284、Asp286、Glu328 和 His392) 被验证与 ASase 聚合活性有关<sup>[34]</sup>。2002 年 Skov 等利用酶与底物共结晶解析了 NpAS 的底物结合位点(见图 4(b)),并预测了 B 结构域和 B' 结构域对 ASase 活性有重要影响<sup>[35]</sup>。NpAS 活性中心含有两个催化残基(Asp286 和 Glu328)和 7 个底物结合亚位点(-1 到+6),其中-1

和+1 是底物结合亚位点,-1 亚位点包括 Asp144、His187、Arg284、His392、Asp393 和 Arg509,是蔗糖中葡萄糖结合位置;+1 亚位点包括 Arg394 和 Asp446,是蔗糖中果糖单元的的结合位置,也是麦芽寡糖中葡萄糖单元的的结合位置(见图 4(c))。

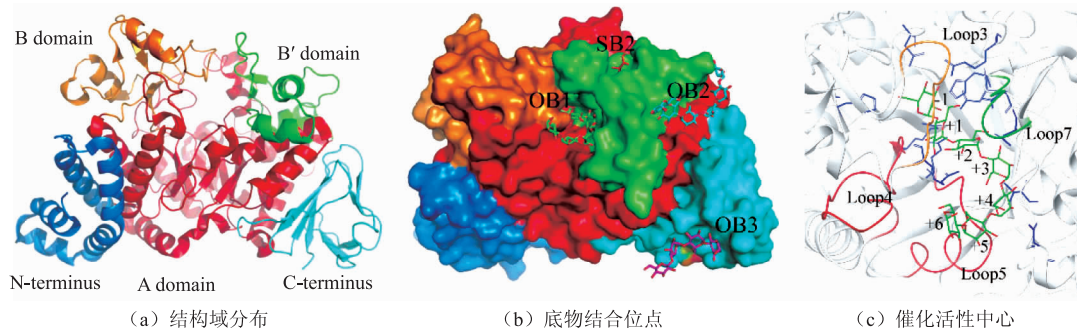


图4 淀粉蔗糖酶(NpAS:1G5A) 结构域分布、底物结合位点及催化活性中心

Fig. 4 Crystal structure of amylosucrase(NpAS:1G5A) with multi domains, substrate binding sites, and active site

ASase 最适温度通常为 35~45 °C, 熔融温度 ( $T_m$ ) 为 40~50 °C, 因此较低的热稳定性限制了 ASase 在工业中的应用。2005 年,有研究者开始对 NpAS 进行热稳定性改造,分子改造位点包含催化结构域 A 结构域、N 结构域、B 结构域和 B' 结构域。对 A 结构域中  $\beta$ -strand 上的 N387 位点突变为天冬氨酸,在 50 °C 时其催化活性从 0 增加到野生型的 60%<sup>[36]</sup>; 针对 N 结构域和 B' 结构域构建的 R20C/A451T 突变体,在 50 °C 下突变体半衰期从 3 min 提高到 32 min,是因为 R20C 和 A451T 之间形成盐

桥,同时 B' 结构域中的 T451 与 Loop8 中的 D488 形成氢键,显著增加了 NpAS 的热稳定性<sup>[37]</sup>;A 结构域-1 亚位点中 H392P 突变体  $T_m$  从 48 °C 提高到 50 °C<sup>[38]</sup>。综上,通过加强 B' 结构域的稳定性能显著提高 ASase 的热稳定性。

相较于 NpAS 的单亚基结构,DgAS 和 DrAS 拥有二聚体结构且表现出较高的热稳定性,主要原因是二聚体结构改善了疏水核心,延长了盐桥网络结构,增强了氢键相互作用<sup>[33]</sup>。其中位于二聚体接触面的 7 个区域对二聚体的形成和稳定有重要影响(见

图5)。Tian等通过比较DgAS与来自*Calidithermus timidus*的CtAS位于二聚体接触面7个区域的差异,并对区域4进行了截短或替换,发现突变体 $T_m$ 分别从74.47℃(野生型)降低到62.46℃和64.32℃,同时60℃下催化活性几乎完全丧失,说明区域4对二聚体的稳定性具有显著影响<sup>[39]</sup>,其他区域与二聚体稳定性的关系还需要进一步研究。

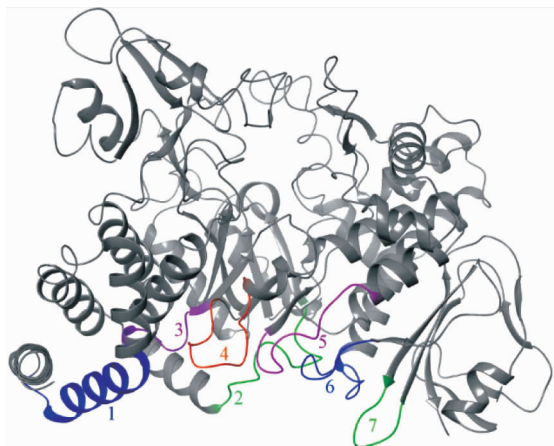


图5 DgAS二聚体结构中相互作用的7个区域

Fig. 5 Seven interaction regions between DgAS dimers

ASase含有3个低聚糖结合位点(OB1、OB2和OB3),其中,OB1位于催化活性中心,OB2位于B'结构域,OB3位于C结构域,OB1和OB2可能与聚合物的延伸有关<sup>[40]</sup>。随着DgAS晶体结构解析,并通过比较NpAS和DgAS的晶体结构推测ASase聚合酶活性受到催化活性中心的柔性影响,主要表现在多Loop结构的B结构域和B'结构域<sup>[33]</sup>。将DgAS和NpAS的B结构域和B'结构域互换后发现拥有来自NpAS的B结构域的DgAS不能合成DP大于12的直链淀粉,进一步确定了B结构域对聚合活性的影响<sup>[41]</sup>。通过对NpAS随机突变,位于B结构域的突变体(E227G),其聚合酶活性提高60%,产物中直链淀粉含量增加<sup>[36]</sup>。Seo等通过对DgAS位于B结构域Loop3上的3个氨基酸(P219、F225和A226)进行单点突变,P219Y突变体水解活性降低至60%,聚合活性提高1.3倍,但短直链淀粉(DP 6~15)含量增加<sup>[42]</sup>;A226N突变体产物中DP 16~40的直链淀粉含量显著增加,由此说明Loop3与底物的结合密切相关,且其自由度的改变影响直链淀粉聚合度<sup>[43]</sup>。

Vergès等对NpAS的活性中心进行了理性设计,并构建了多个位置的组合突变体30H3,其聚合活性提高6倍,且产物中仅含有低聚麦芽多糖(DP

3~20)<sup>[44]</sup>。另一个突变体39A8包含11个突变位点(位于+1和+2亚位点),其聚合产物仅为麦芽二糖和麦芽三糖。30H3与39A8相比,唯一的区别在于C445A和C445R。两个突变体与野生型相比其产物中仅含有可溶性低聚麦芽糖。在晶体结构中C445位于B'结构域中的Loop7上,因此推断Loop7的自由度可能与OB1和OB2亚位点的相互作用有关。30H3突变体中G369和T398位点与野生型一致,而39A8突变体此位点发生突变是引起两个突变体产物差异的直接原因。G369和T398分别位于+2和+3亚位点,39A8突变体对多糖受体的结合能力降低,因此导致突变体不能延伸长链<sup>[43]</sup>。综上,B'结构域影响葡聚糖结合到OB2亚位点,同时影响OB1和OB2的相互作用,最终影响产物中直链淀粉的长度。因此,通过对OB1和OB2亚位点进行理性设计,能够获得结构可控的直链淀粉。

## 2 高支化淀粉的定向合成

### 2.1 糖原分支酶的挖掘及催化特性

糖原分支酶(GBE)作为合成高支化淀粉的关键酶,能够特异性催化淀粉 $\alpha$ -1,4糖苷键连接的直链分子形成新的分支,从而增加淀粉中 $\alpha$ -1,6糖苷键含量,是一种极具有开发价值的新型淀粉酶<sup>[45]</sup>。在CAZy数据库中,依据序列同源性GBE被归类于GH13和GH57两个家族。

迄今,已有多个GH13家族GBE用于高支化淀粉合成的报道,但相关研究依然处在对GBE催化活性和产物结构表征阶段。现有研究表明,GBE能够催化直链淀粉或天然淀粉合成不同结构的高支化淀粉,且不同来源的GBE展现出显著的催化活性差异,如表2所示<sup>[46-60]</sup>。1998年Preiss团队报道了第一个来自*E. coli*的EcGBE,其活性为1.1 U/mg<sup>[46]</sup>;2009年Palomo等报道了来自*Deinococcus*的DgGBE和DrGBE,在最适温度50℃和30℃下其催化活性分别为7.2 U/mg和4.7 U/mg<sup>[47]</sup>。2020年Li等报道了来自*V. vulnificus*的VvGBE催化活性为10.24 U/mg,其最适温度为30℃<sup>[48]</sup>。

目前,4个GH57家族GBE被报道。2006年有研究者等报道了第一个GH57家族糖原分支酶(TkGBE,*T. kodakaraensis*),其最适温度为70℃,最适pH为7.0,催化活性为0.56 U/mg<sup>[49-50]</sup>。2011年Palomo等报道了第二个GH57家族GBE(TtGBE,

表 2 已报道糖原分支酶催化特性比较

Table 2 Catalytic properties of glycogen branching enzymes

GH 家族	来源	名称	催化活性/ (U/mg)	最适温 度/°C	最适 pH	产物相对 分子质量	分支度	参考 文献
GH13	<i>Escherichia coli</i>	EcGBE	1.1	30	7.5	—	—	[46]
GH13	<i>Petrotoga mobilis</i>	PmGBE13	6.0	50	7.0	500~2 000	12.2	[53]
GH13	<i>Aquabacterium</i> sp.	AsGBE	—	40	7.0	13~1 130	8.6	[54]
GH13	<i>Aquifex aeolicus</i>	AaGBE	4.9	80	7.2	—	9.2	[55]
GH13	<i>Bifidobacterium longum</i>	BlGBE	—	30	5.5~7.0	116~1 390	—	[56]
GH13	<i>Deinococcus geothermalis</i>	DgGBE	7.2	50	8.0	—	12.3	[47]
GH13	<i>Deinococcus radiodurans</i>	DrGBE	4.7	30	8.0	—	11.8	[47]
GH13	<i>Geobacillus thermoglucosidans</i>	GtGBE	0.2	60	7.5	—	8.0	[57]
GH13	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	MtGBE	1.4	25	7.0	—	—	[58]
GH13	<i>Rhodothermus marinus</i>	RmGBE	7.5	65	7.0	10~100	9.4	[51,59]
GH13	<i>Thermomonospora curvata</i>	TcGBE	—	55	8.5	650~9 360	9.6	[60]
GH13	<i>Vibrio vulnificus</i>	VvGBE	10.24	30	7.5	825~1 240	14.1	[48]
GH57	<i>Thermococcus kodakaraensis</i>	TkGBE	0.56	70	7.0	1~100	6.2	[49–50]
GH57	<i>Petrotoga mobilis</i>	PmGBE57	0.04	50	7.0	10	8.4	[53]
GH57	<i>Thermus thermophilus</i>	TtGBE	0.29	65	6.5	1~100	6.2	[51]
GH57	<i>Pyrococcus horikoshii</i>	PhGBE	3.4	50	6.5	—	—	[52]

*T. thermophilus*), 其催化活性为 0.29 U/mg, 最适温度为 65 °C<sup>[51]</sup>, 随后来源于 *P. horikoshii* 的 PhGBE 和 *P. mobilis* 的 PmGBE57 被报道, 其最适温度均为 50 °C, 催化活性分别为 3.4 U/mg 和 0.04 U/mg<sup>[52-53]</sup>。综合分析两个家族 GBE 发现, 限制 GBE 合成高支化淀粉应用的瓶颈是该酶的催化效率低且热稳定性差, GH13 家族 GBE 催化活性普遍高于 GH57 家族 GBE, 因此更具有工业应用潜力。

## 2.2 糖原分支酶结构与功能的关系

目前, 对糖原分支酶结构与功能的研究越来越深入, 蛋白质结构数据库 (Protein Data Bank, PDB) 收录了 7 个 GBE 晶体结构数据 (见图 6), 其中 GH57 家族 GBE 有 3 个晶体结构被解析, 分别来自古细菌 *P. horikoshii* (5WU7)、*T. kodakaraensis* (3N8T) 和细菌 *T. thermophilus* (见图 6(c))。GH57 家族 GBE 有 A、B、C 3 个结构域组成, 其中 A 结构域为催化结构域, 具有典型的 ( $\beta/\alpha$ )<sub>7</sub> 桶状结构; B 结构域由插入到催化结构域中的两个  $\alpha$ -螺旋结构组成, 功能不明确; C 结构域由  $\alpha$ -螺旋结构组成, 是底物结合域。目前, 关于 GH57 家族 GBE 研究较少, 深入活性中心内部的 Loop 区域影响催化活性, Loop 越短水解活性越高<sup>[61]</sup>; 位于 Loop 中的酪氨酸 (Tyr)

进行突变后, 分支活性显著降低, 水解活性显著增加<sup>[48,58]</sup>。

GH13 家族 4 个晶体结构被解析 (见图 6), 分别来自 *E. coli* (1M7X)、*M. tuberculosis* (3K1D)、*R. marinus* (见图 6(b)) 和 *C. subtropica* (5GQU)。GH13 家族 GBE 主要结构域为 C 结构域、A 结构域和 N 结构域, 其中 A 结构域为催化结构域, 具有典型的 ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> 桶状结构; C 结构域通常有 7 个  $\beta$ -strands 组成, 是底物结合结构域; N 结构域由一个或两个  $\beta$ -三明治结构单元组成, 其功能不明确<sup>[58]</sup>。

目前, 关于 GH13 家族 GBE 的研究主要集中在基因挖掘和产物结构鉴定, 尚不完全清楚 GBE 的催化机制。随着对高支化淀粉功能性的挖掘, 影响 GBE 催化活性的结构基础研究逐渐引起关注。2002 年 Abad 等报道了第一个来自 *E. coli* 的 EcGBE 晶体结构, 通过对 N 端 112 个氨基酸敲除发现突变体和野生型催化活性没有明显变化<sup>[62]</sup>; 2009 年 Palomo 等通过对来自 *Deinococcus* 的两个 GBE 进行了 N1 和 N2 结构域缺失或互换, 发现 N1 和 N2 结构域影响产物结构, 但并不影响催化活性<sup>[47]</sup>; 2010 年 Pal 等报道了来自 *M. tuberculosis* 的 MtGBE N1 结构域缺失突变体, 发现 N1 结构域缺失导致 MtGBE 催化活

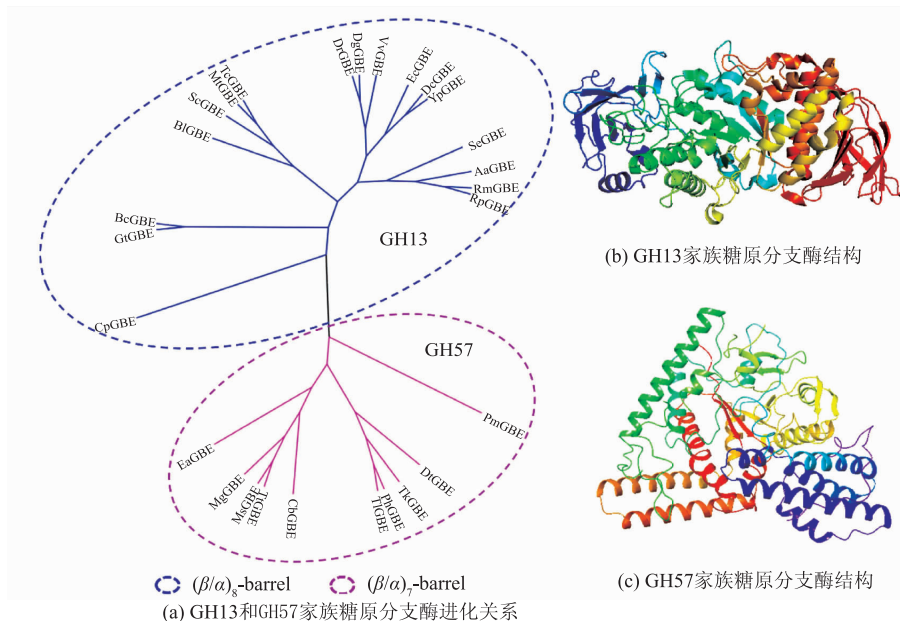


图6 糖原分支酶结构解析

Fig. 6 Structural analysis of glycogen branching enzyme

性从野生型 1.35 U/mg 降低到 0.62 U/mg,  $K_m$  从 0.56 mg/mL 降低到 0.33 mg/mL, 证明 N1 结构域对 GBE 催化活性有显著影响<sup>[58]</sup>。2015 年有研究者选取来自 *V. vulnificus* 的 VvGBE 进行了 N 结构域缺失实验, 发现 N 结构域与 GBE 转移链长有关<sup>[63]</sup>。2021 年 Jiang 等报道了来自 *R. marinus* 的晶体结构, 并对 N 结构域功能进行了研究, 发现 N 结构域的缺失显著降低了 RmGBE 的催化活性<sup>[59]</sup>。综上可以看出 N 结构域对 GBE 的催化活性或催化特异性有重要作用, 但对不同来源的 GBE 表现出明显差异。

### 2.3 糖原分支酶分子改造

探究酶与底物结合方式及途径是酶催化分子机制研究的突破口, 是实现高支化淀粉结构调控的基础。1998 年 Binderup 等通过对 *E. coli* GBE 氨基酸序列比对发现位于保守区域 CSRIII 上的 459 (*E. coli* numbering) 位点保守性较低, 对该位点进行突变后 E459D 突变体催化活性提高 1.6 倍, 但对产物特异性没有显著影响<sup>[46]</sup>。2017 年有研究者通过对来自 *G. thermoglucosidans* 的 GBE 的 M349 进行单点突变(M349T), 使突变体的催化活性提高了 35%, 同时提高了产物中  $\alpha$ -1,6 糖苷键的含量<sup>[64]</sup>。Hayashi 等解析了 *Cyanothecce* sp. 的分支酶与麦芽七糖复合体结构, 推测了分支酶可能的催化机理, 并明确了活性中心-1 到-7 的亚位点, 并对位于-7 亚位点的 W610 进行了突变, 突变体催化活性显著降低, 同时

产物中短链组分增加<sup>[65]</sup>。Ban 等对 RmGBE -7 亚位点中 G160 位点进行突变, G160R 突变体催化活性提高 60%, 且产物中短链组分(DP<13)质量分数从 49.16% 增加到 55.19%<sup>[66]</sup>。综上, 通过对糖原分支酶底物结合位点的改造, 可以在一定程度上实现产物结构的定向调控。

### 2.4 高支化淀粉的酶法合成

蔗糖合成高支化淀粉的经典途径是应用蔗糖磷酸化酶、葡聚糖磷酸化酶和糖原分支酶, 由于葡聚糖磷酸化酶需要引物进行聚合反应, 且此反应为可逆反应, 因此, 此途径合成高支化淀粉的效率较低。相较于经典途径, 利用 ASase 和 GBE 可提高高支化淀粉合成效率。有研究者利用 NpAS 和 RoGBE 探索了蔗糖质量浓度和双酶比例对高支化淀粉摩尔质量的影响, 结果表明蔗糖质量浓度越高产物摩尔质量越大 ( $3.7 \times 10^6 \sim 4.4 \times 10^7$  g/mol), 且 ASase 与 GBE 比活力比例为 1:2 时高支化淀粉摩尔质量最大, 当进一步降低 ASase 与 GBE 的比例时, 产物摩尔质量反而降低<sup>[67-68]</sup>。Lee 等利用不同来源的 ASase 和 GBE, 再次证明了通过双酶比例能够调控高支化淀粉的结构<sup>[69]</sup>, 高支化淀粉的摩尔质量为  $7.37 \times 10^5 \sim 1.94 \times 10^8$  g/mol, 分子粒径为 23.70 ~ 52.65 nm。目前, 仍然缺乏 ASase 突变体和 GBE 突变体合成高支化淀粉的研究。综上, ASase 和 GBE 体外催化蔗糖合成高支化淀粉, 通过调控蔗糖质量浓度、ASase 与

GBE 比例能够实现高支化淀粉摩尔质量的调控。

高支化淀粉的另一个重要合成途径是 GBE 修饰天然淀粉获得。Sorndech 等利用 RmGBE 修饰木薯淀粉制备高支化木薯淀粉,其抗性淀粉质量分数提高 20%<sup>[70]</sup>。Li 等利用 BIGBE 修饰支链淀粉制备高支化淀粉,慢消化淀粉组分提高 18%<sup>[56]</sup>。

### 3 功能性淀粉的应用

#### 3.1 功能性淀粉在功能食品中的应用

直链淀粉和高支化淀粉作为抗性淀粉添加到食品中可显著提高膳食纤维的含量。吴娜娜等利用含有不同直链淀粉含量的糙米淀粉制备糙米面包,发现随着直链淀粉质量分数的提高,面包中抗性淀粉质量分数增加<sup>[71]</sup>。有研究者在面包中分别添加质量分数为 10%、30%和 50%高直链小麦淀粉,面包硬度显著提高,且 50%(质量分数)添加量的面包体积显著降低<sup>[72-73]</sup>。Ortíz-fernández 等利用高直链淀粉含量的小麦淀粉制作饼干后,饼干中抗性淀粉的质量分数由 2.3%提高到 12.8%,显著提高了饼干的抗消化能力<sup>[74]</sup>。多项研究表明糖原分支酶制备的高支化淀粉显著增加其抗降解能力,作为食品添加剂能有效降低血糖水平<sup>[75-78]</sup>,因此功能性淀粉在调节碳水代谢紊乱,尤其对肥胖病人和糖尿病人有重要意义<sup>[79]</sup>。

#### 3.2 功能性淀粉在药物递送中的应用

直链淀粉可用于合成 V 型直链淀粉复合体(V-amylose complex)实现客体分子的缓释。V 型直链淀粉复合体通常应用于药物递送,实现药物分子缓释,提高治疗效果。有研究者制备了直链淀粉和槲皮素的复合体,显著延长了槲皮素在胃和小肠中的释放时间<sup>[80]</sup>。Zhang 等利用直链淀粉和布洛芬制备的不同直链淀粉含量的混合物,发现随着复合物中直链淀粉质量分数的增加布洛芬的释放速率显著

降低,实现了药物分子在人体内的缓释,提高治疗效果<sup>[81]</sup>。丙酰化直链淀粉与药物分子制备的螺旋纳米团簇展现出优良的膜渗透性和专一性,能有效克服血脑屏障,实现药物分子的快速转运,降低药物使用剂量<sup>[82]</sup>。

高支化淀粉与糖原具有相似的结构和特性,因此可替代糖原作为药物载体,实现药物的靶向递送和缓释。Besford 等开发了连接乳糖的糖原载体,此载体对前列腺癌细胞中花生凝集素具有较高亲和力并与半乳糖凝集素相互作用,实现了癌细胞的高清成像<sup>[83]</sup>。Wojnilowicz 等将糖原用于 siRNA 载体,实现了肿瘤细胞中特定基因的沉默<sup>[84]</sup>。Gálisová 等研究了糖原作为抗肿瘤药物递送载体,显著提高了药物释放的靶向性,同时有效延长了药物释放时间,显著提高了对肿瘤的治疗效果<sup>[85]</sup>。Gu 等制备高支化淀粉与抗坏血酸复合体,有效增加了抗坏血酸的稳定性,显著降低了抗坏血酸的释放速率<sup>[86]</sup>。以高支化淀粉作为药物载体的开发还处于起始阶段,高支化淀粉结构对药物载体特性的影响尚缺乏深入研究。

### 4 展望

酶法催化蔗糖合成直链淀粉和高支化淀粉具有结构可控、生产周期短、效率高等优点。将其应用在功能食品和药物载体中能有效改善食品功能和药物递送效率。围绕蔗糖合成结构可控的功能性淀粉研究,首先,需要进一步研究淀粉蔗糖酶和糖原分支酶定向合成直链淀粉和高支化淀粉的催化机制,提高酶的催化活性与热稳定性等应用特性,完善功能性淀粉结构调控的理论体系;其次,还必须研究直链淀粉和高支化淀粉结构对功能食品营养价值及药物载体特性等的影响,提高功能性淀粉在功能食品和药物递送中的创新与应用。

### 参考文献:

- [1] TAO K, LI C, YU W, et al. How amylose molecular fine structure of rice starch affects functional properties[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2019, 204: 24-31.
- [2] MCCREADY R, HASSID W. The separation and quantitative estimation of amylose and amylopectin in potato starch[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1943, 65(6): 1154-1157.
- [3] LEMOS P V F, BARBOSA L S, RAMOS I G, et al. Characterization of amylose and amylopectin fractions separated from potato, banana, corn, and cassava starches[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 132: 32-42.
- [4] LEE C K, LE Q T, KIM Y H, et al. Enzymatic synthesis and properties of highly branched rice starch amylose and amylopectin cluster[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(1): 126-131.



- [ 5 ] WANG Y, XU W, BAI Y, et al. Identification of an  $\alpha$ -(1,4)-glucan-synthesizing amylosucrase from *Cellulomonas carboniz* T26 [J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2017, 65(10):2110-2119.
- [ 6 ] CHEN X Y, GANZLE M G. Site directed mutagenesis of dextransucrase DsrM from *Weissella cibaria*; transformation to a reuteransucrase[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2016, 64(36):6848-6855.
- [ 7 ] ZHAO C, WU Y, LIU X, et al. Functional properties, structural studies and chemo-enzymatic synthesis of oligosaccharides[J]. **Trends in Food Science & Technology**, 2017, 66:135-145.
- [ 8 ] ÁLVARO-BENITO M, SAINZ-POLO M A, GONZÁLEZ-PÉREZ D, et al. Structural and kinetic insights reveal that the amino acid pair Gln-228/Asn-254 modulates the transfructosylating specificity of *Schwanniomyces occidentalis*  $\beta$ -fructofuranosidase, an enzyme that produces prebiotics[J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 2012, 287(23):19674-19686.
- [ 9 ] QUEIROZ E A, FORTES Z B, CUNHA M A, et al. Levan promotes antiproliferative and pro-apoptotic effects in MCF-7 breast cancer cells mediated by oxidative stress[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2017, 102:565-570.
- [10] SARILMISER H K, ATES O, OZDEMIR G, et al. Effective stimulating factors for microbial levan production by *Halomonas smyrnensis* AAD6T[J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2015, 119(4):455-463.
- [11] KIM K H, CHUNG C B, KIM Y H, et al. Cosmeceutical properties of levan produced by *Zymomonas mobilis* [J]. **Journal of Cosmetic Science**, 2005, 56(6):395-406.
- [12] SEZER A D, KAZAK H, ÖNER E T, et al. Levan-based nanocarrier system for peptide and protein drug delivery: optimization and influence of experimental parameters on the nanoparticle characteristics[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2011, 84(1):358-363.
- [13] MATHEWS R, SHETE V, CHU Y. The effect of cereal  $\beta$ -glucan on body weight and adiposity: a review of efficacy and mechanism of action[J]. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2021, 17:1-13.
- [14] PUTSEYS J, LAMBERTS L, DELCOUR J A, et al. Amylose-inclusion complexes: formation, identity and physico-chemical properties[J]. **Journal of Cereal Science**, 2010, 51(3):238-247.
- [15] KADOKAWA J I. Chemoenzymatic synthesis of functional amylosic materials[J]. **Pure and Applied Chemistry**, 2014, 86(5):701-709.
- [16] KADOKAWA J I. Precision synthesis of functional polysaccharide materials by phosphorylase-catalyzed enzymatic reactions[J]. **Polymers**, 2016, 8(4):138-158.
- [17] KADOKAWA J I. Enzymatic synthesis of functional amylosic materials and amylose analog polysaccharides[M]. Netherlands: Elsevier, 2019:189-213.
- [18] YANASE M, TAKATA H, FUJII K, et al. Cumulative effect of amino acid replacements results in enhanced thermostability of potato type *L*- $\alpha$ -glucan phosphorylase[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2005, 71(9):5433-5439.
- [19] NAKAI H, KITAOKA M, SVENSSON B, et al. Recent development of phosphorylases possessing large potential for oligosaccharide synthesis[J]. **Current Opinion in Chemical Biology**, 2013, 17(2):301-309.
- [20] YANASE M, TAKAHA T, KURIKI T.  $\alpha$ -Glucan phosphorylase and its use in carbohydrate engineering[J]. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2006, 86(11):1631-1635.
- [21] OKADA G, HEHRE E J. New studies on amylosucrase, a bacterial  $\alpha$ -D-glucosylase that directly converts sucrose to a glycogen-like  $\alpha$ -glucan[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 1974, 249(1):126-135.
- [22] MONTALK G P, REMAUD-SIMEON M, WILLEMOT R, et al. Sequence analysis of the gene encoding amylosucrase from *Neisseria polysaccharea* and characterization of the recombinant enzyme[J]. **Journal of Bacteriology**, 1999, 181(2):375-381.
- [23] HA S J, SEO D H, JUNG J H, et al. Molecular cloning and functional expression of a new amylosucrase from *Alteromonas macleodii*[J]. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 2009, 73(7):1505-1512.
- [24] SEO D H, JUNG J H, CHOI H C, et al. Functional expression of amylosucrase, a glucan-synthesizing enzyme, from *Arthrobacter chlorophenolicus* A6[J]. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2012, 22(9):1253-1257.
- [25] EMOND S, MONDEIL S, JAZIRI K, et al. Cloning, purification and characterization of a thermostable amylosucrase from *Deinococcus geothermalis*[J]. **FEMS Microbiology Letters**, 2008, 285(1):25-32.
- [26] PIZZUT-SERIN S, POTOCKI-VÉRONÈSE G, VANDERVEEN B A, et al. Characterisation of a novel amylosucrase from *Deinococcus radiodurans*[J]. **FEBS Letters**, 2005, 579(6):1405-1410.
- [27] KIM M D, SEO D H, JUNG J H, et al. Molecular cloning and expression of amylosucrase from highly radiation-resistant

- Deinococcus radiopugnans*[J]. **Food Science and Biotechnology**, 2014, 23(6):2007-2012.
- [28] JEONG J W, SEO D H, JUNG J H, et al. Biosynthesis of glucosyl glycerol, a compatible solute, using intermolecular transglycosylation activity of amylosucrase from *Methylobacillus flagellatus* KT[J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2014, 173(4):904-917.
- [29] BÜTTCHER V, WELSH T, WILLMITZER L, et al. Cloning and characterization of the gene for amylosucrase from *Neisseria polysaccharea*: production of a linear alpha-1,4-glucan[J]. **Journal of Bacteriology**, 1997, 179(10):3324-3330.
- [30] PARK M O, CHANDRASEKARAN M, YOO S H. Expression, purification, and characterization of a novel amylosucrase from *Neisseria subflava*[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2018, 109:160-166.
- [31] MIRZA O, SKOV L K, REMAUD-SIMEON M, et al. Crystal structures of amylosucrase from *Neisseria polysaccharea* in complex with D-glucose and the active site mutant Glu328Gln in complex with the natural substrate sucrose[J]. **Biochemistry**, 2001, 40(30):9032-9039.
- [32] SKOV L K, PIZZUT-SERIN S, REMAUD-SIMEON M, et al. The structure of amylosucrase from *Deinococcus radiodurans* has an unusual open active-site topology[J]. **Acta Crystallographica**, 2013, 69(9):973-978.
- [33] GUÉRIN F, BARBE S, PIZZUT-SERIN S, et al. Structural investigation of the thermostability and product specificity of amylosucrase from the bacterium *Deinococcus geothermalis*[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2012, 287(9):6642-6654.
- [34] ALBENNE C, DE MONTALK G P, MONSAN P, et al. Site-directed mutagenesis of key amino acids in the active site of amylosucrase from *Neisseria polysaccharea*[J]. **Biologia**, 2002, 57:119-128.
- [35] SKOV L K, MIRZA O, SPROGUE D, et al. Oligosaccharide and sucrose complexes of amylosucrase: structural implications for the polymerase activity[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2002, 277(49):47741-47747.
- [36] VAN DER VEEN B A, SKOV L K, POTOCKI-VÉRONÈSE G, et al. Increased amylosucrase activity and specificity, and identification of regions important for activity, specificity and stability through molecular evolution[J]. **FEBS Journal**, 2006, 273(4):673-681.
- [37] EMOND S, ANDRÉ I, JAZIRI K, et al. Combinatorial engineering to enhance thermostability of amylosucrase[J]. **Protein Science**, 2008, 17(6):967-976.
- [38] DAUDÉ D, TOPHAM C M, REMAUD-SIMÉON M, et al. Probing impact of active site residue mutations on stability and activity of *Neisseria polysaccharea* amylosucrase[J]. **Protein Science**, 2013, 22(12):1754-1765.
- [39] TIAN Y, XU W, GUANG C, et al. Thermostable amylosucrase from *Calditothermus timidus* DSM 17022: insight into its characteristics and tetrameric conformation[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2019, 67(35):9868-9876.
- [40] ALBENNE C, SKOV L K, MIRZA O, et al. Molecular basis of the amylose-like polymer formation catalyzed by *Neisseria polysaccharea* amylosucrase[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2004, 279(1):726-734.
- [41] SEO D H, JUNG J H, JUNG D H, et al. An unusual chimeric amylosucrase generated by domain-swapping mutagenesis[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2016, 86:7-16.
- [42] JUNG J H, JUNG T Y, SEO D H, et al. Structural and functional analysis of substrate recognition by the 250s loop in amyloamylase from *Thermus brockianus*[J]. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, 2011, 79(2):633-644.
- [43] SEO D H, JUNG J H, PARK C S. Improved polymerization activity of *Deinococcus geothermalis* amylosucrase by semi-rational design: effect of loop flexibility on the polymerization reaction[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2019, 130:177-185.
- [44] VERGÈS A, BARBE S, CAMBON E, et al. Engineering of an efficient mutant of *Neisseria polysaccharea* amylosucrase for the synthesis of controlled size maltooligosaccharides[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2017, 173:403-411.
- [45] JENSEN S L, ZHU F, VAMADEVAN V, et al. Structural and physical properties of granule stabilized starch obtained by branching enzyme treatment[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2013, 98(2):1490-1496.
- [46] BINDERUP K, PREISS J. Glutamate-459 is important for *Escherichia coli* branching enzyme activity[J]. **Biochemistry**, 1998, 37(25):9033-9037.
- [47] PALOMO M, KRALJ S, VAN DER MAAREL M, et al. The unique branching patterns of *Deinococcus* glycogen branching enzymes are determined by their N-terminal domains[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2009, 75(5):1355-1362.
- [48] LI L, SU L, HU F, et al. Recombinant expression and characterization of the glycogen branching enzyme from *Vibrio vulnificus*

- and its application in starch modification[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2020, 155: 987-994.
- [49] MURAKAMI T, KANAI T, TAKATA H, et al. A novel branching enzyme of the GH57 family in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1[J]. **Journal of Bacteriology**, 2006, 188(16): 5915-5924.
- [50] ZHANG X, LEEMHUIS H, VAN DER MAAREL M J. Synthesis of highly branched  $\alpha$ -glucans with different structures using GH13 and GH57 glycogen branching enzymes[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2019, 216: 231-237.
- [51] PALOMO M, PIJNING T, BOOIMAN T, et al. *Thermus thermophilus* glycoside hydrolase family 57 branching enzyme: crystal structure, mechanism of action, and products formed[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2011, 286(5): 3520-3530.
- [52] NA S, PARK M, JO I, et al. Structural basis for the transglycosylase activity of a GH57-type glycogen branching enzyme from *Pyrococcus horikoshii*[J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2017, 484(4): 850-856.
- [53] ZHANG X, LEEMHUIS H, VAN DER MAAREL M J. Characterization of the GH13 and GH57 glycogen branching enzymes from *Petrotoga mobilis* SJ95 and potential role in glycogen biosynthesis[J]. **PLoS One**, 2019, 14(7): 1-16.
- [54] CHENGYAO X, YAN Q, CHAONAN D, et al. Enzymatic properties of an efficient glucan branching enzyme and its potential application in starch modification[J]. **Protein Expression and Purification**, 2021, 178(10): 57-79.
- [55] VAN DER MAAREL M J E C, VOS A, SANDERS P, et al. Properties of the glucan branching enzyme of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*[J]. **Biocatalysis and Biotransformation**, 2003, 21(4/5): 199-207.
- [56] LI D, FEI T, WANG Y, et al. A cold-active 1,4- $\alpha$ -glucan branching enzyme from *Bifidobacterium longum* reduces the retrogradation and enhances the slow digestibility of wheat starch[J]. **Food Chemistry**, 2020, 324: 1-8.
- [57] BAN X F, LI C M, GU Z B, et al. Expression and biochemical characterization of a thermostable branching enzyme from *Geobacillus thermoglucosidans*[J]. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, 2016, 26(5): 303-311.
- [58] PAL K, KUMAR S, SHARMA S, et al. Crystal structure of full-length *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv glycogen branching enzyme: insights of N-terminal  $\beta$ -sandwich in substrate specificity and enzymatic activity[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2010, 285(27): 20897-20903.
- [59] JIANG H, XIE X, BAN X, et al. Flexible loop in carbohydrate-binding module 48 allosterically modulates substrate binding of the 1,4- $\alpha$ -glucan branching enzyme[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2021, 69(20): 5755-5763.
- [60] FAN Q, XIE Z, ZHAN J, et al. A glycogen branching enzyme from *Thermomonospora curvata*: characterization and its action on maize starch[J]. **Starch-Stärke**, 2016, 68(3/4): 355-364.
- [61] ZHANG X, LEEMHUIS H, JANECEK S, et al. Identification of *Thermotoga maritima* MSB8 GH57  $\alpha$ -amylase AmyC as a glycogen-branching enzyme with high hydrolytic activity[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2019, 103(15): 6141-6151.
- [62] ABAD M C, BINDERUP K, RIOS-STEINER J, et al. The X-ray crystallographic structure of *Escherichia coli* branching enzyme [J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2002, 277(44): 42164-42170.
- [63] JO H J, PARK S, JEONG H G, et al. *Vibrio vulnificus* glycogen branching enzyme preferentially transfers very short chains: N1 domain determines the chain length transferred[J]. **FEBS Letters**, 2015, 589(10): 1089-1094.
- [64] LIU Y, BAN X, LI C, et al. Met349 mutations enhance the activity of 1,4- $\alpha$ -glucan branching enzyme from *Geobacillus thermoglucosidans* STB02[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2017, 65(28): 5674-5680.
- [65] HAYASHI M, SUZUKI R, COLLEONI C, et al. Bound substrate in the structure of cyanobacterial branching enzyme supports a new mechanistic model[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2017, 292(13): 5465-5475.
- [66] BAN X, XI S, JIANG H, et al. The amino acid on the top of the active groove allosterically modulates product specificity of the 1,4- $\alpha$ -glucan branching enzyme[J]. **Food Chemistry**, 2022, 384: 1-7.
- [67] GRIMAUD F, LANCELON-PIN C, ROLLAND-SABATÉ A S, et al. *In vitro* synthesis of hyperbranched  $\alpha$ -glucans using a biomimetic enzymatic toolbox[J]. **Biomacromolecules**, 2013, 14(2): 438-447.
- [68] ROLLAND-SABATÉ A, GUILOIS S, GRIMAUD F, et al. Characterization of hyperbranched glycopolymers produced *in vitro* using enzymes[J]. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 2014, 406(6): 1607-1618.
- [69] LEE D, PARK S D, JUN S J, et al. Differentiated structure of synthetic glycogen-like particle by the combined action of glycogen branching enzymes and amylosucrase[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2022, 195: 152-162.
- [70] SORNDECH W, MEIER S, JANSOON A M, et al. Synergistic amyloamylase and branching enzyme catalysis to suppress cassava

- starch digestibility[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2015, 132:409-418.
- [71] 吴娜娜,李莎莎,谭斌,等. 糙米直链淀粉含量对其面包质构和体外消化性质的影响[J]. 中国粮油学报, 2018, 33(4):33-37.
- [72] GUO G, JACKSON D S, GRAYBOSCH R A, et al. Wheat tortilla quality: impact of amylose content adjustments using waxy wheat flour[J]. **Cereal Chemistry**, 2003, 80(4):427-436.
- [73] VAN HUNG P, YAMAMORI M, MORITA N. Formation of enzyme-resistant starch in bread as affected by high-amylose wheat flour substitutions[J]. **Cereal Chemistry**, 2005, 82(6):690-694.
- [74] ORTÍZ-FERNÁNDEZ M P, CASTILLO-RUIZ O, VELAZQUEZ G, et al. Digestibility and acceptability of wheat flour cookies partially substituted with high amylose maize starch[J]. **Plant Foods for Human Nutrition**, 2019, 74(3):446-447.
- [75] XIA C, ZHONG L, WANG J, et al. Structural and digestion properties of potato starch modified using an efficient starch branching enzyme AqGBE[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2021, 184:551-557.
- [76] ZHANG X, LEEMHUIS H, VAN DER MAAREL M J. Digestion kinetics of low, intermediate and highly branched maltodextrins produced from gelatinized starches with various microbial glycogen branching enzymes[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2020, 247:1-7.
- [77] SHIM Y E, LEE E S, HONG M G, et al. Highly branched  $\alpha$ -limit dextrins attenuate the glycemic response and stimulate the secretion of satiety hormone peptide YY[J]. **Food Hydrocolloids**, 2020, 108:1-7.
- [78] HIMAT A S, GAUTAM S, GARCIA J P C, et al. Starch-based novel ingredients for low glycemic food formulation[J]. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, 2021, 26:1-7.
- [79] International Diabetes Federation. Diabetes Atlas[M]. 7th ed. Belgium: International Diabetes Federation, 2015.
- [80] LYU R, QI L, ZOU Y, et al. Preparation and structural properties of amylose complexes with quercetin and their preliminary evaluation in delivery application[J]. **International Journal of Food Properties**, 2019, 22(1):1445-1462.
- [81] ZHANG L, CHENG H, ZHENG C, et al. Structural and release properties of amylose inclusion complexes with ibuprofen[J]. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, 2016, 31:101-107.
- [82] GAO W, LIU Y, JING G, et al. Rapid and efficient crossing blood-brain barrier: hydrophobic drug delivery system based on propionylated amylose helix nanoclusters[J]. **Biomaterials**, 2017, 113:133-144.
- [83] BESFORD Q A, WOJNILOWICZ M, SUMA T, et al. Lactosylated glycogen nanoparticles for targeting prostate cancer cells[J]. **ACS Applied Materials & Interfaces**, 2017, 9(20):16869-16879.
- [84] WOJNILOWICZ M, BESFORD Q A, WU Y L, et al. Glycogen-nucleic acid constructs for gene silencing in multicellular tumor spheroids[J]. **Biomaterials**, 2018, 176:34-49.
- [85] GÁLISOVÁ A, JIRÁTOVÁ M, RABYK M, et al. Glycogen as an advantageous polymer carrier in cancer theranostics: straightforward *in vivo* evidence[J]. **Scientific Reports**, 2020, 10(1):1-11.
- [86] GU Z, CHEN B, TIAN Y. Highly branched corn starch: preparation, encapsulation, and release of ascorbic acid[J]. **Food Chemistry**, 2021, 343:1-9.