

# $\alpha$ -淀粉酶催化甜菊糖的改性研究

李乐, 袁莹, 马双

(重庆化工职业学院环境与质量检测学院, 重庆 401228)

**摘要:** 在本文中, 通过筛选三种  $\alpha$ -淀粉酶, 以甜菊苷的转化率为指标, 选用一种耐酸性的中温  $\alpha$ -淀粉酶, 其商品名称为高峰淀粉酶, 将供体可溶性淀粉水解为葡萄糖基引入甜菊苷中对甜菊糖进行酶法改性以改善其味质。经试验后, 对酶法催化工艺进行优化, 最佳工艺条件为: 供体淀粉浓度为 100 g/L, 底物比例(甜菊糖:淀粉)为 1:10 (*m/m*), 反应温度为 60 °C, 加酶量为 1.5 U/mL。改性后的甜菊糖产品采用高效液相色谱(HPLC)法测定甜菊苷的转化率, 结果为 42.5%。最后对酶法改性后甜菊糖产品进行感官味质评定, 结果表明经酶法改性后的甜菊糖, 味质得到显著的改善, 甜味变得清淡且味道柔和, 有微弱的苦味, 但低浓度下基本无后苦味。经  $\alpha$ -淀粉酶催化甜菊糖后能达到预期的味质效果, 且大大降低了酶成本, 为甜菊糖提供了理论与工业化基础。

**关键词:** 甜菊糖; 高峰淀粉酶; 可溶性淀粉; 酶法改性

文章编号: 1673-9078(2019)02-202-208

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.2.028

## Optimization of Enzymatic Modification of Steviosides by Alpha-amylases

LI Le, YUAN Ying, MA Shuang

(Department of Environmental and Quality Inspection, Chongqing Chemical Industry Vocational College, Chong Qing 401228, China)

**Abstract:** In order to improve taste quality, enzymatic modification of stevia by grafting glucose was investigated using soluble starch as glucose donor. The hydrolysis was catalyzed by acid-resistant mesophilic  $\alpha$ -amylase, whose trade name is Taka-diaxase, that was screened from three different  $\alpha$ -amylases. Using stevioside conversion rate as an indicator, the enzymatic processes were optimized and the optimum conditions obtained were donor starch concentration 100 g/L, substrate ratio 1:10 (*m/m*), reaction temperature 60 °C, and enzyme concentration 1.50 U/mL. The conversion rate of the modified stevioside was determined as 42.5% by high performance liquid chromatography (HPLC). The organoleptic evaluation results showed that the enzymatic modification improved the taste quality of stevia significantly. The sweetness became mild and soft, and a slight bitter taste still remains at high concentration, but disappears at low concentration. Desirable taste quality with significantly reduced production cost could be achieved by enzymatic modification of stevia.

**Key words:** steviosides; taka-diaxase; soluble starch; enzymatic modification

甜菊糖 (Steviosides) 为一种高效的天然甜味剂, 来源于菊科草本植物甜叶菊。甜度远高于蔗糖, 热量仅为蔗糖的 0.003 倍<sup>[1]</sup>。其具有丰富药理功效, 对“三高”类疾病有较好辅助治疗效果<sup>[2]</sup>。甜菊糖是目前世界上公认的最接近蔗糖口味的天然低热值甜味剂, 并经我国卫生部批准使用。是继甘蔗、甜菜糖之外第三种国内外公认的理想的健康替代蔗糖新糖源, 被誉为“世界第三糖源”<sup>[3,4]</sup>。目前新型低热量天然甜味剂已受到广泛研究, 甜菊糖一般用于低卡食品和保健医药中。

甜菊糖主要是八种二萜糖苷的混合物, 它们具有相同的糖苷单元, 不同之处在于连接在 C19 和 C13 位

收稿日期: 2018-11-03

基金项目: 重庆市人力资源和社会保障局技能专家工作室项目 (渝人社发[2012]236号)

作者简介: 李乐 (1978-), 女, 副教授, 研究方向: 天然产物提取和食品分析

上的糖基数目和种类, 不同甜菊糖各组分的结构及其性质如图 1 和表 1 所示<sup>[5]</sup>。其中, 主要成分为甜菊苷 (Stevioside, 简称 St), 其含量占甜菊糖的 60%以上。St 入口即有些许苦涩味且具有令人不悦的余味<sup>[6]</sup>, 造成了甜菊糖的不佳口感且限制了甜菊糖更广泛的应用。

目前, 甜菊糖不良味质的改善主要通过酶法修饰改性, 以提高甜菊糖的综合价值。归纳起来有以下几种: 将淀粉作为供体用环糊精葡萄糖基转移酶对 St 进行修饰以改善口感; 以蔗糖为供体利用  $\beta$ -呋喃果糖苷酶在糖基引入果糖基进行改性; 在其糖基基团上酶法合成半乳糖使其成为更佳的甜菊糖配糖体<sup>[7-9]</sup>。以上的酶虽高效但价格高昂, 来源不足, 且其中的糖基供体 (如蔗糖、乳糖) 也增加了成本, 大大地超过了甜菊糖本身的价值, 应用到工业生产不切实际, 这极大地限制了甜菊糖的广泛应用。但也有部分学者利

用大宗商品酶  $\alpha$ -淀粉酶进行酶法改性。有报道<sup>[10]</sup>采用高峰淀粉酶将改性 St, 得到的产品口感更似蔗糖; 另有报道<sup>[11]</sup>将  $\alpha$ -淀粉酶分散在柱子中, 再使甜菊糖循环缓缓流过, 大大降低了其苦味; 叶发银等人<sup>[12]</sup>利用马铃薯淀粉为供体采用  $\alpha$ -淀粉酶 BAN 480L 对其进行改性也得到更佳的甜菊糖产品。综上所述,  $\alpha$ -淀粉酶也可能应用于酶法改性甜菊糖中。

高峰淀粉酶是从微生物米曲酶培养液中提取的消化酶的混合物, 是一种耐酸性中温淀粉酶。该酶溶液热至 85 °C 以上失去糖化力; 在酸或碱存在下, 糖化力减弱。能催化淀粉水解的同时表现出转糖基活性, 水解淀粉的能力是一般淀粉酶的 1.5~2.0 倍, 最适 pH

4~6。本文通过筛选三种  $\alpha$ -淀粉酶, 选用工业化的大宗商品酶高峰淀粉酶, 同时立足于价格低廉且来源广泛的淀粉为配比底物, 为改善甜菊糖的总体味质, 并寻求一套经济的工艺参数。

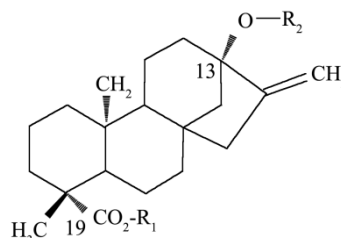


图1 甜菊糖苷的基本结构

Fig.1 The basic structure of stevia glycosides

表1 甜菊糖中各糖苷的含量和味质特性

Table 1 Sweet components of stevia glycosides

组分名称	-R <sub>1</sub>	-R <sub>2</sub>	含量/%	相对甜度	味质特性
甜菊苷 (St)	$-\beta\text{-G}$	$-\beta\text{-G}^2\text{-}\beta\text{-G}^1$	55-65	250-300	后苦味
莱鲍迪苷 A	$-\beta\text{-G}$	$-\beta\text{-G}^2\text{-}\beta\text{-G}^1$   $\beta\text{-G}^1$	22-28	350-450	最接近蔗糖
莱鲍迪苷 B	-H	$-\beta\text{-G}^2\text{-}\beta\text{-G}^1$   $\beta\text{-G}^1$	0.08-0.5	300-350	后苦味
莱鲍迪苷 C	$-\beta\text{-G}$	$-\beta\text{-G}^2\text{-}\beta\text{-R}^1$   $\beta\text{-G}^1$	4-7	50-120	强苦味
莱鲍迪苷 D	$-\beta\text{-G}^2\text{-}\beta\text{-G}^1$	$-\beta\text{-G}^2\text{-}\beta\text{-G}^1$   $\beta\text{-G}^1$	0.3-0.8	200-300	后苦味
莱鲍迪苷 E	$-\beta\text{-G}^2\text{-}\beta\text{-G}^1$	$-\beta\text{-G}^2\text{-}\beta\text{-G}^1$	<0.05	250-300	强苦味
杜尔可甙 A	$-\beta\text{-G}$	$-\beta\text{-G}^2\text{-}\beta\text{-R}^1$	0.8-1.6	50-120	后苦味
斯替维伯甙	-H	$-\beta\text{-G}^2\text{-}\beta\text{-G}^1$	<0.05	100-125	后苦味

注: G-葡萄糖基, R-鼠李糖基。

## 1 试验材料与方法

### 1.1 试验材料与设备

#### 1.1.1 材料

甜菊糖, 河南省兴源化工产品公司; 高峰淀粉酶、Fungamyl® 2500 BG、BAN 480L(均为  $\alpha$  淀粉酶的商品名称)均购自诺维信(中国)生物制剂有限公司; 食品级可溶性淀粉, 广东省升讯化工有限公司。

#### 1.1.2 主要仪器设备

真空冻干机; 分光光度计; 酶标仪、高效液相色谱仪等。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 淀粉酶的选择及工艺

参照文献<sup>[13]</sup>报道的方法, 先用供体(如可溶性淀

粉)悬浮液煮沸 5 min, 再与底物甜菊糖混合, 后加入适量高峰、中温、BAN 480L 淀粉酶, 控制反应体系体积为 100 mL, 反应时间 8 h。最后高温下灭活 15 min 终止酶法改性。使用水相滤膜过滤反应体系得到澄清滤液, HPLC 测定滤液中 St 含量。其转化率换算如下式:

$$\text{St的转化率}/\% = \frac{\text{反应前St的含量} - \text{反应后St的含量}}{\text{反应前St的含量}}$$

具体工艺条件如下: 酶添加量 0.50% (相对于甜菊糖的质量百分比); 甜菊糖与供体(可溶性淀粉)比例为 1:10; 调节体系 pH 为 6.0, 45 °C 下反应 4 h。

#### 1.2.2 酶活的测定

根据 3,5-二硝基水杨酸法测定所选取酶活性<sup>[14]</sup>。在 pH 为 6.0, 温度 60 °C 的条件下, 1 min 内释放相当于 1  $\mu\text{mol}$  麦芽糖的还原糖所需的酶量, 定义为 1 个酶活单位。

### 1.2.3 甜菊糖酶法改性工艺的优化

首先,从供体淀粉浓度、底物比例、反应温度和加酶量四个方面进行单因素试验设计。其中,供体淀粉浓度设置为25、50、100、150、200 g/L;底物比例(甜菊糖:淀粉质量比)为1:1、1:5、1:10、1:15、1:20;反应温度为30、40、50、60、70 °C;加酶量为0.5、1.0、2.0、3.0、5.0 U/mL。按1.2.1的方法进行操作,考察各因素对甜菊糖中St的转化率。再根据单因素试验结果,分别选择四个因素的三个较优的水平,进行L9(3<sup>4</sup>)的正交试验。

### 1.2.4 甜菊糖酶法改性产物的制备

按最终优化的工艺条件,扩大反应体系为1 L,灭酶活后冷却至室温,纱布过滤除去絮凝物和沉淀,真空抽滤,得到澄清糖液。参照文献<sup>[13,14]</sup>方法,选择DM301作为柱层析用填料。将澄清糖液过柱后除去残留淀粉,再用80%乙醇洗脱,65 °C下使用旋转蒸发器除去洗脱液中的乙醇。最后通过真空冻干机获得酶改性甜菊糖的粉末。

### 1.2.5 甜菊糖的感官评定

甜味强度的测定目前没有适合的甜度仪器测定方法,通常选择感官尝味评价的方法来进行。参照文献报道<sup>[15,16]</sup>的方法稍加改动,将蔗糖和改性后的甜菊糖溶液制成不同浓度溶液。室温条件下,评定小组(男

女各5名)分别对两种溶液进行品尝,找出甜菊糖溶液甜度相匹配的蔗糖溶液,并对改性后的产品作出味质评价。

## 1.3 数据处理分析

利用SPSS软件进行数据分析,及origin软件进行图形绘制。单因素方差分析比较组间数据,显著性差异以 $p < 0.05$ 表示,结果以平均值±标准偏差表示。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同的 $\alpha$ -淀粉酶筛选的结果

从表2得知,不同的 $\alpha$ -淀粉酶虽作用相同的底物和供体,但其对甜菊糖中St的转化率大有不同。其中高峰淀粉酶的转化率最高,达到30.7%的转化率;Fungamyl® 2500 BG酶的转化率最低,仅为8.6%。因此我们选择高峰淀粉酶为酶法改性甜菊糖的催化酶。

源自米曲霉高峰淀粉酶其分子质量约为51 ku,是一种多功能液化型 $\alpha$ -淀粉酶。它可以水解淀粉中的 $\alpha$ -1,4糖苷键,并且将淀粉转化为糊精和具有转移葡萄糖基的能力<sup>[17]</sup>。据相关文献<sup>[6]</sup>报道,味质可能会产生较大变化,来源于将糖基(不同种类或数量)连接在甜菊糖分子不同C位上(C13位或C19位)。

表2 不同的 $\alpha$ -淀粉酶转化St的结果

Table 2 Results of different St-amylases converting St

淀粉酶种类	来源	供体	St的转化率/%
高峰淀粉酶	<i>Aspergillus oryzae</i>	可溶性淀粉	30.72±1.05
BAN 480L	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	可溶性淀粉	19.48±0.87
Fungamyl® 2500 BG	<i>Aspergillus sp.</i>	可溶性淀粉	8.61±0.66

注:表中结果以平均值±标准偏差表示。

### 2.2 高峰淀粉酶改性甜菊糖的产物分析

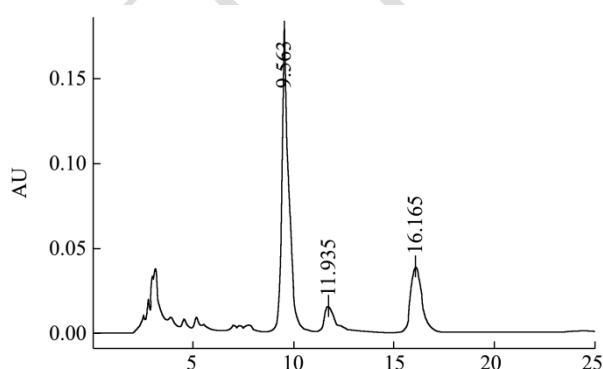


图2 高峰淀粉酶改性前甜菊糖的HPLC图

Fig.2 HPLC chromatogram of steviosides before modification

根据标样的液相色谱图结合图2可知,当 $t_R=9.563$ 为St, $t_R=11.935$ 为莱鲍迪昔C, $t_R=16.083$

为莱鲍迪昔A,三者面积百分比例约为10:1:3.3,大致符合已知文献呈现的比例。

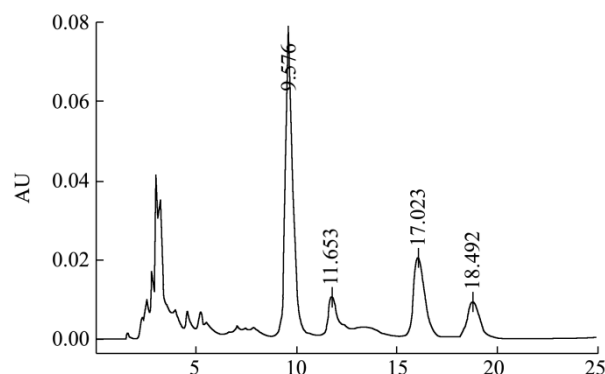


图3 高峰淀粉酶改性后甜菊糖的HPLC图

Fig.3 HPLC chromatogram of steviosides after modification

如图3所示,莱鲍迪昔C(5.02%)和A(17.19%)与图2情况相一致,St的占比出现下降(至38.50%)。

这说明甜菊糖经酶法改性后, 淀粉提供了葡萄糖基经高峰淀粉酶处理后使部分 St 转化形成新的衍生物(即  $tR=18.492$  出现的峰), 改性后的产品风味得到改良。

## 2.3 单因素试验结果

### 2.3.1 供体淀粉浓度对酶法改性甜菊糖的影响

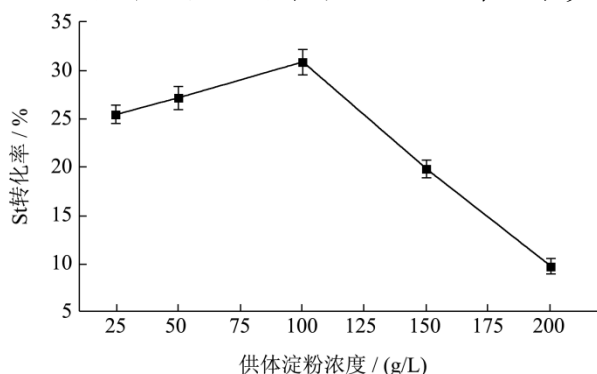


图4 供体淀粉浓度对酶法改性甜菊糖的影响

Fig.4 Effect of donor starch concentration on stevioside modified by enzymatic method

从图4中可以看出, 低浓度供体溶液对甜菊糖改性工艺更有促进作用; 供体浓度增加, St 转化率呈现明显的降低趋势。在 25 g/L 至 200 g/L 浓度范围内, 甜菊糖苷的总体转化率指标在供体淀粉浓度为 100 g/L 达到最高值。St 转化率在淀粉浓度高于 100 g/L 后发生大幅度的下降, 这是由于淀粉的水溶性差, 造成整个酶促体系的总体粘度大, 使酶与底物分子难以接触, 反应从而得到限制, 同时增加了淀粉溶液浓度也造成淀粉和甜菊糖扩散受到限制。因此确定供体淀粉浓度最优水平为 100 g/L。

### 2.3.2 底物比例对酶法改性甜菊糖的影响

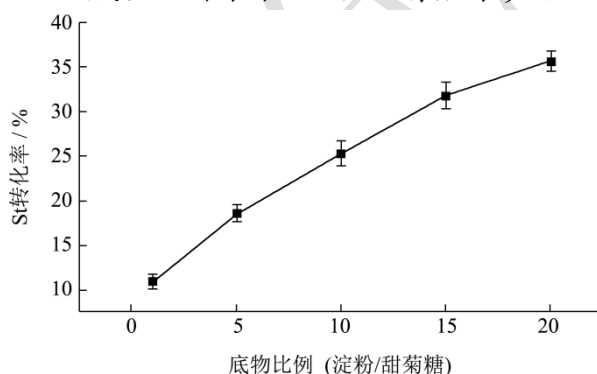


图5 底物比例对酶法改性甜菊糖的影响

Fig.5 Effect of Substrate Ratio on Enzymatic Modification of Stevia

在固定的酶法改性工艺体系中, 底物比例(即为甜菊糖/淀粉的质量比)对酶法改性甜菊糖的影响见图5, 可能由于淀粉提供了整个酶法改性体系的溶液中游离的葡萄糖基, 当淀粉比例的增加时 St 的转化率呈上

升的趋势。从图中还可以看出, 转化率最高为 36.9%, 此时底物比例已为 1:20。结合实际考虑进一步提高比例, 体系的粘度将会很大, 反而酶催化效果不好, 随后的分离纯化的工作量增加, 因此底物的比例确定为甜菊糖:淀粉=1:20(m/m), 不再继续扩大底物比例造成工艺成本的增加。

### 2.3.3 反应温度对酶法改性甜菊糖的影响

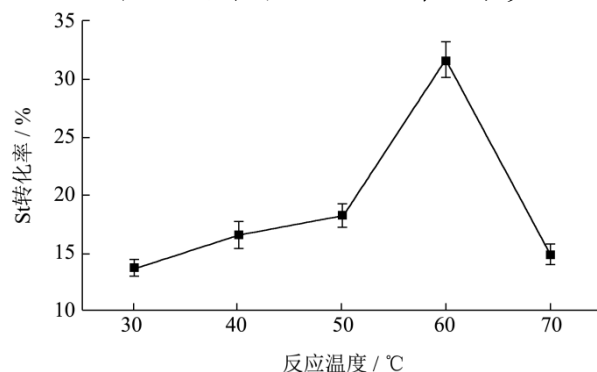


图6 反应温度对酶法改性甜菊糖的影响

Fig.6 Effect of reaction temperature on enzymatic modification of stevia

在一般的酶促反应中, 反应体系的温度往往对酶的活性产生直接的影响且对整个反应至关重要。在固定的酶法改性工艺体系中, 分别考察了 30、40、50 及 60 °C 下的高峰淀粉酶对 St 转化率, 见图6。如一般的酶促反应一样, 反应体系温度过高或过低均不利于酶促反应, 因此该酶在整个酶法改性工艺中设置温度为 60 °C, 此时 St 转化率相对来说最快。

### 2.3.4 加酶量对酶法改性甜菊糖的影响

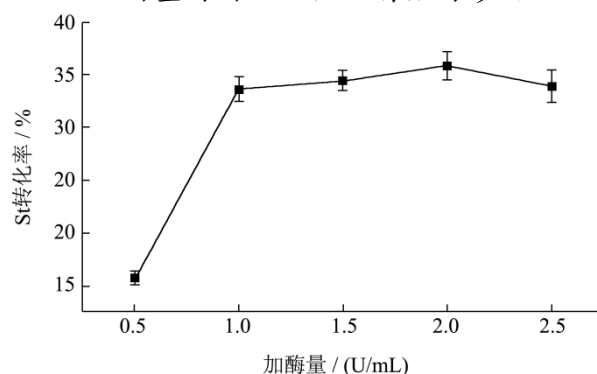


图7 加酶量对酶法改性甜菊糖的影响

Fig.7 Effect of enzyme addition on stevia sugar modified by enzyme

在酶促反应中, 酶的使用量对酶促反应速率产生较明显的影响, 在实际的工业生产中, 也与经济成本息息相关。本文所用的高峰淀粉酶(酶活力经测量为 1.83 U/mg), 在此基础上探究了加酶量对酶法改性甜菊糖的影响。从图7可知, 随着酶用量的增加, 新形成的产物得率也升高, 当酶用量由 1 U/mL 增加到 1.5

U/mL 时, 整个体系最终的 St 转化率无明显变化, 趋于不变的值, 这说明整个酶促反应已为平衡点, 加酶量的增加已无效果。结合实际的生产成本以及绿色节约的角度来说, 加酶量控制 1.0 U/mL 即可达到理想的效果。

### 2.4 正交试验结果

在进行单因素试验的基础上, 总结各个因素产生的作用效果并进行综合考虑, 进行  $L_9(3^4)$  的正交试验。正交试验因素水平表如表 3 所示。

从表 4 正交试验结果的极差分析可以看出, 四个单因素影响高峰淀粉修饰甜菊糖的主次顺序为供体淀粉浓度>加酶量>反应温度>加酶量。最后通过极差分

析获得最佳配方, 结果为 A2B1C2D3, 即供体淀粉浓度为 100 g/L, 底物比例(甜菊糖:淀粉)为 1:10 (m/m), 反应温度为 60 °C, 加酶量为 1.5 U/mL。St 的转化率达 42.5%。

表 3 正交试验因素水平表

**Table 3 Table of factors and levels of orthogonal design**

水平	因素			
	A 供体淀粉浓度/(g/L)	B 底物比例	C 反应温度/°C	D 加酶量/(U/mL)
1	50	1:10	50	0.5
2	100	1:15	60	1.0
3	150	1:20	70	2.0

表 4 正交试验结果与分析

**Table 4 Results of orthogonal experiment for steviolosides crystallization**

编号	因素				St 的转化率/%
	A 供体淀粉浓度/(g/L)	B 底物比例	C 反应温度/°C	D 加酶量/(U/mL)	
1	1	1	1	1	32.91
2	1	2	2	2	35.27
3	1	3	3	3	33.45
4	2	1	2	3	42.52
5	2	2	3	1	36.28
6	2	3	1	2	36.70
7	3	1	3	2	31.91
8	3	2	1	3	28.58
9	3	3	2	1	29.03
K <sub>1</sub>	101.63	107.34	98.19	98.22	-
K <sub>2</sub>	115.50	100.13	106.82	103.88	-
K <sub>3</sub>	89.52	99.18	101.64	104.55	-
R	25.98	8.16	8.63	6.33	-

表 5 改性前后甜菊糖与蔗糖相等甜度及相对甜度的关系

**Table 5 The relationship between steviolosides' sweetness and sucrose**

名称	数值							
改性前甜菊糖浓度/%	0.02	0.04	0.05	0.06	0.08	0.10	0.15	0.20
相当的蔗糖浓度/%	6.00	9.00	11.00	14.00	18.00	19.00	26.00	34.00
改性前甜菊糖相对甜度	300 <sup>a</sup>	225 <sup>a</sup>	220 <sup>A</sup>	233 <sup>A</sup>	225 <sup>A</sup>	190 <sup>A</sup>	183 <sup>A</sup>	170 <sup>A</sup>
名称	数值							
改性后甜菊糖浓度/%	0.02	0.04	0.05	0.06	0.08	0.10	0.15	0.20
相当的蔗糖浓度/%	6.00	9.00	10.00	12.00	14.00	17.00	25.00	33.00
改性后甜菊糖相对甜度	300 <sup>a</sup>	225 <sup>a</sup>	200 <sup>a</sup>	200 <sup>a</sup>	175 <sup>a</sup>	170 <sup>a</sup>	166 <sup>a</sup>	165 <sup>a</sup>

注: 上标字母不同显示为改性前后甜菊糖相对甜度差异具有显著性 ( $p < 0.05$ )。

### 2.5 酶法改性甜菊糖的味质评价

每种甜味剂都有其特征的甜味出现时间和持续的时间, 甜菊糖类似的高倍甜味剂有很明显的特征。在

甜味出现时间上, 甜菊糖比蔗糖引起舌头感应甜味的出现时间慢; 在持续时间上, 甜菊糖比蔗糖在口腔内持续甜度的时间长, 因此最容易引起不愉快的甜味, 这对于甜菊糖来说都是需要改变的方面<sup>[18]</sup>。

按照供体淀粉浓度为 100 g/L, 底物比例(甜菊糖:淀粉)为 1:10 (m/m), 反应温度为 60 °C, 加酶量 1.5 U/mL 的工艺对甜菊糖进行酶法改性。经大孔树脂洗脱纯化后, 对最终甜菊糖溶液进行真空冷冻干燥, 得到精制的改性甜菊糖产品。由实验确定的改性前后甜菊糖与蔗糖相等甜度及相对甜度的关系如表 5 所示, 表中对应的数值均为 10 个品尝成员评价结果的所得到的平均值。

改性前后的甜菊糖均在低浓度时相对甜度较大, 而随着浓度增高相对甜度降低。经酶法改性后的甜菊糖, 不论是高浓度还是低浓度下其相对甜度与原甜菊糖相比均有一定的下降。这与李培等人<sup>[5]</sup>酶法改性甜菊糖产品的研究结果一致。改性后的甜菊糖产品相对甜度降低可以有效减缓不愉快的后味, 使改性后甜菊糖更接近蔗糖。

类似于甜菊糖类的甜味剂物质溶于水时, 低浓度条件下, 其味质更好且相对甜度同样较高(相对于高浓度来说)。特别是在高浓度的甜菊糖溶液最容易出现后苦味及令人不愉快的金属异味, 因此甜菊糖这种的高度甜味剂应用受到极大的限制<sup>[19]</sup>。改性后的甜菊糖经品尝后, 后苦味基本消除, 后余味尚可接受, 且在低浓度时完全可以被接受。

### 3 结果与讨论

3.1 采用高峰淀粉酶为中心突破点, 研究高峰淀粉酶催化甜菊糖改性的酶促工艺。结果可知, St 经转糖基化反应生成新的衍生化产物, 使改性后的甜菊糖口感更接近蔗糖, 无明显的苦味及金属异味, 给人尚可接受的味质。通过优化工艺试验, 得到优化条件: 供体淀粉浓度为 100 g/L, 底物比例(甜菊糖:淀粉)为 1:10 (m/m), 反应温度为 60 °C, 加酶量为 1.5 U/mL。甜菊糖转化率为 42.52%。

3.2 高峰淀粉酶的具体作用机制还需要进一步讨论。未来的研究工作中可利用制备液相收集酶法改性后的新物质出峰, 再通过使用 EI-MS、红外光谱分析以及核磁共振光谱等精确的技术, 来鉴定识别新物质的结构, 从而推断高峰淀粉酶的作用机理。甜菊糖有望成为一种高热低卡的高度甜味剂并广泛应用在生产中, 本文通过高峰淀粉酶对甜菊糖进行酶法改性, 大大地去除了不愉快的后味和苦味, 大大地降低成本, 并为甜菊糖提供了理论与工业化基础。

### 参考文献

[1] 娄力行. 甜菊糖及其衍生物的研究进展[J]. 中国糖料, 2008, 2: 70-72

- LOU Li-xing. Research progress of stevioside and steviol [J]. Sugar Crops of China, 2008, 2: 70-72
- [2] Jentzer J B, Alignan M, Vacagarcia C, et al. Response surface methodology to optimise accelerated solvent extraction of steviol glycosides from stevia rebaudiana Bertoni leaves [J]. Food Chemistry, 2015, 166: 561-567
- [3] Genus J M C. Molecules of interest stevioside [J]. Phytochemistry, 2003, 64(5): 913-921
- [4] Prakash I, Dubois G E, Clos J F, et al. Development of rebiana, a natural, non-caloric sweetener [J]. Food & Chemical Toxicology, 2008, 46(7): S75-S82
- [5] 李培. 甜菊糖的重结晶分离及酶法改性[D]. 无锡: 江南大学, 2009
- LI Pei. Recrystallization separation and enzymatic modification of stevioside [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2009
- [6] 万会达, 蔡亚, 校秋燕, 等. 甜菊糖的酶法改性及其生物活性研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2011, 5: 188-196
- WAN Hui-da, CAI Ya, XIAO Qiu-yan, et al. Recent advance in steviol glucosides modification and bioactivities [J]. China Food Additives, 2011, 5: 188-196
- [7] Suzuki K, Fukumura T, Shibasaki-Kitakawa N, et al. Kinetic model for synthesis of fructosyl-stevioside using suspended  $\beta$ -fructofuranosidase [J]. Biochemical Engineering Journal, 2002, 10(3): 207-215
- [8] Pól J, Ostrá E V, Karásek P, et al. Comparison of two different solvents employed for pressurised fluid extraction of stevioside from stevia rebaudiana: methanol versus water [J]. Analytical & Bioanalytical Chemistry, 2007, 388(8): 1847-1857
- [9] 王贵民, 董振红, 郝再彬. 甜叶菊糖苷的应用和安全性的研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2007, 6: 65-69
- WANG Gui-ming, DONG ZHEN-hong, HAO Zai-bin. Application and safety of steviol glycoside in leaves of stevia rebaudiana (bertoni) bertoni [J]. China Food Additives, 2007, 6: 65-69
- [10] Kaneda N, Kasai R, Yamasaki K, et al. Chemical studies on sweet diterpene-glycosides of stevia rebaudiana: Conversion of stevioside into rebaudioside-A [J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 1977, 25(9): 2466-2467
- [11] Kitahata S, Ishikawa H, Miyata T, et al. Production of rubusoside derivatives by transgalactosylation of various  $\alpha$ -galactosidases (Biological Chemistry) [J]. Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, 1989, 53(11): 2923-2928

- [12] 叶发银,杨瑞金,华霄,等.中温  $\alpha$ -淀粉酶改性甜菊糖的研究[J].食品与发酵工业,2012,38(6):57-60  
YE Fa-yin, YANG Rui-jin, HUA Xiao, et al. Enzymatic modification of steviol glycosides by medium-temperature  $\alpha$ -amylase [J]. Food Science & Technology, 2012, 38(6): 57-60
- [13] 徐仲伟,李娜,宁正祥,等.酶法改质甜菊糖的研究[J].食品科技,2008,33(12):35-39  
XU Zhong-wei, LI Na, NING Zheng-xiang, et al. Study on enzymatic modification of stevioside [J]. Food Science & Technology, 2008, 33(12): 35-39
- [14] 赵露,孙颖.甜菊糖酶法改性的工艺研究[J].粮食与食品工业,2013,20(4):67-70  
ZHAO Lu, SUN Ying. Technical research on enzymatic modification of stevia sugar [J]. Cereal & Food Industry, 2013, 20(4): 67-70
- [15] Zimmermann B F. Tandem mass spectrometric fragmentation patterns of known and new steviol glycosides with structure proposals [J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2011, 25(11): 1575-1582
- [16] Kochikian V T, Markosian A A, Abelian L A, et al. Combined enzymatic modification of stevioside and rebaudioside A [J]. Applied Biochemistry & Microbiology, 2006, 42(1): 31-37
- [17] 王德骥.关于甜菊糖苷的甜度,甜味和苦涩后味的成因机理[J].中国食品添加剂,2007,3:46-53  
WANG De-ji. Sweetness and mechanism of picric in stevioside [J]. China Food Additives, 2007, 3: 46-53
- [18] 叶发银.高纯度莱鲍迪苷 A 的制备和甜菊苷的酶法改性研究[D].江南大学,2013  
YE Fa-yin. Preparation of high-purity rebaudioside a and enzymatic modification of stevioside [D]. Jiangnan University, 2013
- [19] 徐仲伟,邵佩霞,陈华勇,等. $\beta$ -呋喃果糖苷酶催化甜菊糖的改性研究[J].现代食品科技,2008,24(11):1108-1110  
XU Zhong-wei, SHAO Pei-xia, CHEN Hua-yong, et al. Optimization of enzymatic modification of steviosides [J]. Modern Food Science & Technology, 2008, 24(11): 1108-1110