

Thermobifida fusca 异淀粉酶的作用机制分析

许晶晶, 李由然, 张 梁, 石贵阳*

(粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122)

摘要: 异淀粉酶可水解支链淀粉的 α -1,6 糖苷键, 为淀粉彻底水解所必须。使用仪器分析方法推断此类酶作用机制的研究国内未见报道。*Thermobifida fusca* 异淀粉酶经镍离子亲和色谱纯化, 以玉米支链淀粉 (maize amylopectin, AP) 为底物, 结合体积排阻色谱、高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测器及氢谱核磁共振等仪器分析方法研究其作用机制。结果表明: AP 分子的相对分子质量为 2 812 000, 水解反应 2 h 后生成两类葡聚糖组分, 相对分子质量分别为 760 000 和 7.2 000, 比例为 1:4.4; IAM 随机水解支链淀粉分子的 α -1,6 糖苷键, 并可切断带有 2~3 个葡萄糖残基的侧链分支点生成麦芽糖和麦芽三糖, 而对 α -1,4 糖苷键无作用。完全水解支链淀粉生成具有 α 或 β 型还原末端的直链淀粉链或麦芽寡糖, 产物聚合度 (degree of polymerization, DP) 主要在 15~35 之间。IAM 作用机理的研究可为其工业化应用奠定基础。

关键词: 支链淀粉; 异淀粉酶; 体积排阻色谱; 高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测器; 氢谱核磁共振

中图分类号: Q 819 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2014)07—0690—06

Mechanism Analysis of *Thermobifida fusca* Isoamylase

XU Jingjing, LI Youran, ZHANG Liang, SHI Guiyang*

(National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Isoamylase is able to cleave α -1,6-linkages in amylopectin, which is essential for starch saccharification. Research on mechanism of *Thermobifida fusca* isoamylase (IAM) by instrumental analysis methods has not been reported. In this study, IAM was purified by affinity chromatography and used to hydrolyze amylopectin from maize (AP). Results of size exclusion chromatography (SEC) indicated that IAM hydrolyzed both inner and outer branching linkages of amylopectin. The polymer structure was completely destroyed by IAM and the mean molecular weight (Mw) decreased from 2 812 000 to 760 000 and 7.2 000 after 2 h, the ratio of large glucans to the small ones was 1:4.4. The population of starch fragments released was characterized by high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detector (HPAEC -PAD), the degree of polymerization (DP) of final hydrolysates distributed mainly in 15~35, released maltose and maltotriose demonstrated that the smallest units hydrolysed by IAM were side chains with 2~3

收稿日期: 2014-02-15

基金项目: 国家 863 计划项目 (2012AA021201)。

* 通信作者: 石贵阳 (1963—), 男, 浙江新昌人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师。主要从事再生资源生物转化、发酵过程控制及酶技术研究。E-mail: gyshi@jiangnan.edu.cn

glucose residues. ^1H nuclear magnetic resonance (^1H -NMR) spectrum showed that IAM specifically and completely cleaved α -1,6 glycosidic linkages and produced amylose chains or maltoligosaccharides with α - or β -anomeric reducing ends. The mechanism analysis of IAM could lay the foundation for its applications.

Keywords: amylopectin, isoamylase, SEC, HPAEC-PAD, ^1H -NMR

淀粉脱支酶(普鲁兰酶和异淀粉酶)可切断支链淀粉的 α -1,6 糖苷键,通常与仪器分析方法相结合用于研究淀粉的组成、结构和性质等^[4-8]。常用的仪器分析方法有:体积排阻色谱(size exclusion chromatography, SEC)常用作淀粉相对分子质量及聚合度(degree of polymerization, DP)分布的测定^[4,9];高效阴离子交换色谱-脉冲安培法(high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detector, HPAEC-PAD)具有无需衍生及在强碱性条件下灵敏度高等特点^[10],可用来分析支链淀粉平均 DP 值、平均链长(葡萄糖残基数量)及不同长度葡聚糖链的比例^[7,11];核磁共振(^1H -NMR)敏感度高,可在不破坏淀粉样品的结构和性质的条件下,根据淀粉分子异头碳质子(H-1)共振,有效区分 α -1,4 和 α -1,6 糖苷键,还可确定淀粉分支度即 α -1,6 糖苷键(分支点)占 α -1,4 糖苷键和 α -1,6 糖苷键总和的百分比^[8,12]。

20 世纪 80 年代国外就有关于异淀粉酶作用机制的研究^[13],我国对异淀粉酶研究起步较晚,大多研究产异淀粉酶菌株的筛选、异淀粉酶纯化及酶学性质等,对作用机制方面涉及不多。虽然脱支酶都能够切割大分子支链葡聚糖的 α -1,6 糖苷键,但不同来源脱支酶的结构及催化功能的差异性,使得它们的作用键型、作用方式和产物成分等亦有所不同。如 Park HS 等^[14]报道的 *Sulfolobus solfataricus* 异淀粉酶不能切下支链分子中带有 2~3 个葡萄糖残基的侧链,但 Imanaka T 等^[15]研究 *Bacillus stearothermophilus* 普鲁兰酶的作用方式,发现此酶既可作用于 α -1,6 键,又可作用于 α -1,4 键;Choi JH 等^[16]在 *Nostoc punctiforme* 中也发现一种可同时作用于两种糖苷键,并生成葡萄糖的脱支酶。本实验用玉米支链淀粉(maize amylopectin, AP)为底物,结合上述仪器方法分析嗜热放线菌 *Thermobifida fusca* 异淀粉酶水解 AP 的作用机制,包括水解键

型、水解特点、底物生成方式和种类等,为这一新型酶制剂应用的开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

提取 *Thermobifida fusca* 染色体基因组,以其为模板扩增出异淀粉酶基因,酶切后与载体 pET-28a(+)相连,将重组质粒导入 *E. coli* BL21 (DE3)获得重组大肠杆菌。

玉米支链淀粉、标准 DP 麦芽寡糖、标准分子量葡聚糖均购于美国 Sigma 公司;其余试剂均为市售国产试剂。

1.2 粗酶液制取、分离及纯化

将重组菌接入含有 30 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素的 LB 培养基中,添加异丙基- β -D-硫代半乳糖苷诱导产酶。收集菌体超声波破碎后离心获得的粗酶液,经镍离子亲和色谱柱收集活性组分。色谱条件:HisTrap HP 柱, D 0.7 cm $\times$ 2.5 cm;流量 1 mL/min;缓冲液, 0~0.5 mol/L 咪唑+0.5 mol/L NaCl+50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, pH 7.5 线性梯度洗脱。亲和层析所得活性组分超滤除盐后经 SDS-PAGE^[17]检测纯度。

1.3 IAM 酶活测定

在 300 μL 质量分数 1% AP 溶液(pH 5.5)中加入 10 μL 酶液, 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 30 min,取出 100 μL 反应液,加入 2.5 mL 5 mmol/L 的稀碘液后迅速测定 $A_{600\text{nm}}$,以未反应的酶液和底物混合物作为空白^[18]。酶活定义:上述条件下作用 30 min,每分钟生成直链淀粉造成底物于 600 nm 下吸光值增加 0.01 的酶活定义为一个酶活单位(U)。蛋白质质量分数测定采用 Bradford 法^[19],用牛血清白蛋白做标准。

1.4 HPSEC 分析相对分子质量分布

将 5 μL 纯化酶液(173 U/mL)加入 4.5 mL 1% 的支链淀粉溶液中, 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温,分别于 0, 0.5, 1 和 2 h 取样测定。样品经沸水煮 5 min 使 IAM 失活, 12 000 r/min 离心 3 min, 上清液过 0.22 μm 滤

膜去除杂质后,用 HPSEC 系统分析相对分子质量分布^[20]。

HPSEC 体系是一套 Waters 600 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司产品),配备 2410 示差折光检测器和 Empower 工作站。分析条件:色谱柱, Ultrahydrogel™ Linear 300 mm×7.8 mm;流动相, 0.1 mol/L NaNO₃;流速:0.9 mL/min;柱温:45 ℃;进样量:20 μL。用葡聚糖标准物(相对分子质量范围 2 500~2 000 000, Sigma)。

1.5 HPAEC-PAD 分析 DP 分布

将 10 μL IAM 纯化液加入 1 mL 质量分数 1% AP 溶液,50 ℃水浴反应 6 h 后,样品与碘液反应所得 $A_{600\text{ nm}}$ 值及相对分子质量分布情况随时间增长不再变化,说明 IAM 作用完全。样品稀释至 1 mg/mL,沸水煮 5 min 使 IAM 失活,离心除蛋白,过 0.22 μm 滤膜去除杂质后,用 Cairns 方法^[21]推断样品 DP 分布。

HPAEC-PAD 系统为美国 Dionex 公司的 ICS-5000 离子色谱仪,配备 GP 40 梯度泵、ED 40 电化学检测器和 Chromeleon 6.8 色谱工作站。色谱条件:色谱柱, CarboPac PA-200(3 mm×150 mm)分析柱和 CarboPac PA-200(3 mm×30 mm)保护柱;流量, 0.5 mL/min;进样 20 μL。流动相:0.25 mol/L NaOH(A), 1 mol/L NaAc+0.1 mol/L NaOH(B)+H₂O(C),流动相比例如表 1 所示。用标准 DP 2~7 的麦芽寡糖(Sigma)做标准物, Peaknet(Dionex)软件分析数据。

表 1 HPAEC 流动相组成

Table 1 Composition of mobile phase of HPAEC

t/min	$\varphi_A/\%$	$\varphi_B/\%$	$\varphi_C/\%$
0	38.4	4.0	57.6
40.0	24	40	36
40.1	38.4	4.0	57.6
60.0	38.4	4.0	57.6

1.6 ¹H-NMR 分析分支度及糖苷键

过量 IAM 将 AP 完全脱枝后,混合液沸水除蛋白,上清液冻干成粉状。取 20 mg 样品溶于 500 μL D₂O 中沸水浴 30 min 交换羟基质子。依据 Nilsson 等描述的方法可以确定支链淀粉糖苷键和分支度^[2]。

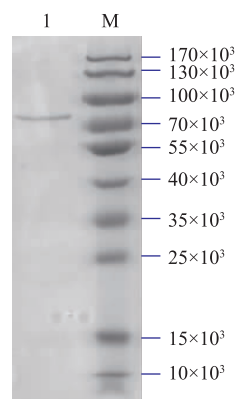
¹H-NMR 方法用 AVANCE III 400 MHz 全数字化核磁共振谱仪(德国 Bruker 公司产品)完成。温度:60 ℃;5 mm 探头定量;使用每个样品调谐探头以保证最优信噪比(S/N)和实验过程的连贯性,

Bruker UXNMR 软件处理原始一维数据经傅里叶变换得到的图谱。

2 结果与分析

2.1 IAM 的分离纯化

工程菌经破碎、亲和层析纯化后获得 IAM 蛋白纯品,经体积分数 12% SDS-PAGE 电泳检测得出 IAM 相对分子质量大小约为 79 000,纯度达到 95% 以上(图 1),可用于后续试验。由表 2 可知,使用镍离子亲和层析纯化效果非常明显,纯度提高了 49.7 倍,去除了大部分杂蛋白,最终 IAM 发酵液经纯化比活达到 1 460 U/mg,活力回收为 53.1%。



1: IAM; M: protein marker

图 1 SDS-PAGE 分析纯化的 IAM

Fig. 1 Purification of IAM analyzed by SDS-PAGE

表 2 纯化得率及比活力测定

Table 2 Purification yield and enzyme activity analysis

成分	总蛋白 质/mg	总酶 活/U	酶活/ (U/mg)	产率/%	Purification (fold)
Supernatant	93.2	2 754	29.5	100.0	1.0
Histrap HP	1.0	1 460	1 460	53.1	49.7

2.2 HPSEC 分析相对分子质量分布

由图 2 可知,聚合态 AP 洗脱出单一峰, M_w 为 2 812 000。IAM 作用 0.5 h 后即出现两个洗脱峰,一个峰仍是聚合态 AP, M_w 为 1 716 000;一个峰是小分子线性葡聚糖和小分子寡糖(M_w 为 3.6 000),两峰之间可能是大分子线性葡聚糖和支链葡聚糖(M_w 为 10 000~500 000)。随着时间变化,大相对分子质量洗脱峰面积逐渐减小而小相对分子质量洗脱峰面积逐渐增大,说明聚合态 AP 逐渐被分解,大分子线性葡聚糖和支链葡聚糖以及小分子线性葡聚糖和小分子寡糖的量也在增加。反应 1 h 后,聚合态

AP 水解生成大量大分子线性葡聚糖和支链葡聚糖,而聚合态 AP 与线性葡聚糖和小分子寡糖的峰面积比由 0.5 h 时的 5.3:1 变为 1.9:1;水解反应 2 h 后两个洗脱峰的 M_w 分别为 760 000 和 7.2 000,与底物相比分别减小了 3.7 倍及 390 倍,两峰面积比为 1:4.4,此时 IAM 基本将聚合态 AP 及带有分支点的葡聚糖水解完全,生成大量小分子线性葡聚糖和寡糖。

Harada T 等^[13] 使用凝胶排阻层析法分析 *Pseudomonas* 异淀粉酶和 *Klebsiella* 普鲁兰酶对支链淀粉的剪切方式。将 0.01 mg 异淀粉酶或 1.3 mg 普鲁兰酶加入含 1 g 玉米支链淀粉的溶液中,不同时间取样分析底物变化。水解反应 8 h 后,异淀粉酶作用的底物中聚合态支链淀粉消失,出现两个峰,一个是线性葡聚糖峰另外一个可能是线性葡聚糖和支链葡聚糖,而普鲁兰酶作用底物中仍有聚合态支链淀粉存在,将普鲁兰酶用量增加到 13 mg/g 玉米支链淀粉,12 h 后支链淀粉水解完全。水解过程中,支链淀粉经 *Pseudomonas* 异淀粉酶作用所得产物中有线性葡聚糖和支链葡聚糖存在,而经 *Klebsiella* 普鲁兰酶作用的产物中没有此类聚合物,由此推测出异淀粉酶从支链淀粉外部和内部随机水解分支点处 α -1,6 糖苷键,而普鲁兰酶虽可有效地从外侧水解支链淀粉,但对内侧分支点的作用相当微小。

本实验中 IAM 使用量为 0.22 mg/g AP,反应 2 h 即可将聚合态 AP 基本水解完全,由图 3 中各曲线的变化规律可推测出 IAM 切割分支点处 α -1,6 糖苷键的方式与 *Pseudomonas* 异淀粉酶类似,均为从 AP 分子的外侧和内侧随机水解 α -1,6 糖苷键。

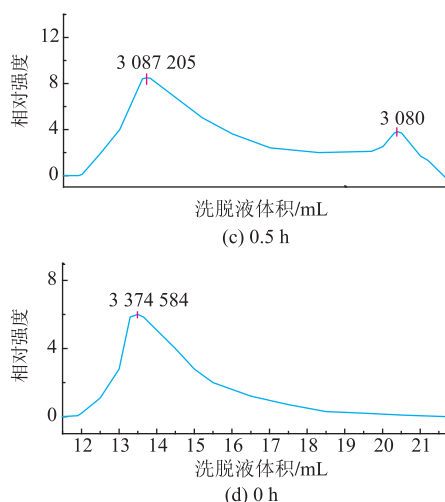
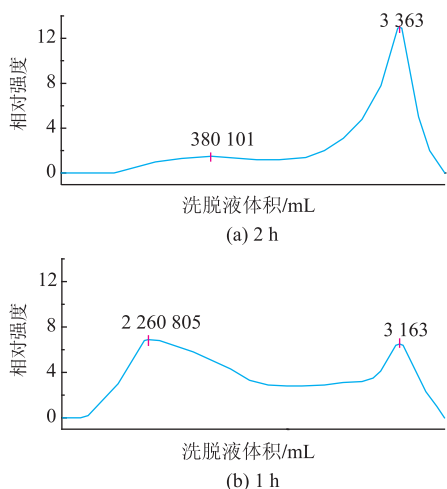


图 2 AP 水解前后的 HPSEC 图谱

Fig. 2 Size exclusion HPLC of AP. Native amylopectin (time zero) was compared with the glucan products of 0.5, 1 and 2 h digestions. Values show the molecular weight of peaks

2.3 HPAEC-PAD 分析产物聚合度

HPAEC-PAD 可对 DP 值 <65 的葡聚糖混合物进行定性分析,对于 DP 值 >15 的葡聚糖, PAD 检测器响应值与 DP 值的线性关系良好,可用 PAD 信号峰面积定量分析 DP 值大于 15 的葡聚糖链的比例关系^[22]。由图 3 可看出 AP 完全脱枝后生成的小分子线性葡聚糖和寡糖的 DP 分布在 2~65 之间,主要生成 DP 值 15~35 的较短葡聚糖链,DP 值分布在 40~60 之间的长链所占比例较小,与已有报道相符^[23-25]。按照每个葡萄糖残基相对分子质量 162 000 计算,完全脱枝后的葡聚糖相对分子质量主要分布在 2.4~5.7 kDa 间,与 HPSEC 结果一致。产物中有麦芽糖、麦芽三糖等,说明 IAM 可水解带有 2~3 个葡萄糖残基侧链的分支点。

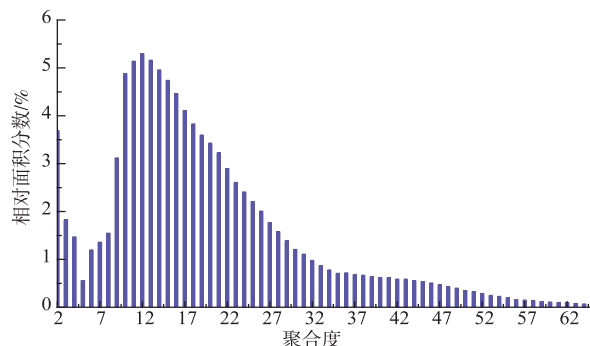


图 3 AP 链长分布

Fig. 3 Bar graph showing the chain length distribution of AP on a relative area basis

2.4 ^1H -NMR 分析糖苷键变化

图 4 为淀粉和淀粉水解物 ^1H -NMR 图谱, $\text{H}-1(1\rightarrow4)$, $\text{H}-1(\alpha\text{-r})$, $\text{H}-1(1\rightarrow6)$ 和 $\text{H}-1(\beta\text{-r})$ 的化学位移分别位于 δ 5.35, 5.21, 4.94 和 4.65×10^{-6} 处。图 4 中 a 图与 b 图分别为 AP 与 AP 完全水解后的 ^1H -NMR 图谱。分析可知 AP 中 α -1,4 糖苷键与 α -1,6 糖苷键比例为 22.5:1, 分支度为 4.2%, 符合已有文献报道^[1-2]。IAM 几乎可将 AP 分支点处的 α -1,6 糖苷键全部切断, 生成具有 α 型或 β 型还原末端的葡聚糖或小分子寡糖, 分解前后 $\text{H}-1(1\rightarrow4)$ 量变化微小, 推测 IAM 对 α -1,4 糖苷键无作用。Takashi K 等^[26]分析了淀粉酶水解糖苷键生成不同异头碳产物的机制。基于立体选择性, 异头碳保留酶(生成具有 α 型还原末端的产物)的可能催化机制:(a)形成碳正离子中间体的 SN1 反应(b)通过一个共价键形成糖基酶复合体的 SN2 反应; 异头碳转置酶(生成具有 β 型还原末端的产物)的可能作用机制:(a)形成碳正离子中间体的 SN1 反应 (b) 亲核置换的 SN2 反应。IAM 具体是通过哪种类型的亲核反应生成 α 型或 β 型产物的机制有待研究。

3 讨论

脱枝酶有两种类型: 普鲁兰酶和异淀粉酶。脱枝酶可专一地切开支链淀粉或糖原分支点的 α -1,6 键, 将小单位支链分解, 从而切下整个侧枝。普鲁兰酶可作用于 2 个麦芽糖基间的 α -1,6 键, 异淀粉酶的最小作用单位是含有一个 α -1,6 键的麦芽三糖基或麦芽四糖基, 不能水解带有麦芽糖基的分支

点。使用仪器分析方法可以推测出 IAM 水解 AP 的可能作用模式如图 5 所示: IAM 从 AP 分子内部或外部随机地、专一地作用于分支点处的 α -1,6 糖苷键, 生成具有 α 或 β 构型还原末端的直链淀粉链或麦芽寡糖; IAM 可切下带有 2~3 个葡萄糖残基的侧链生成麦芽糖或麦芽三糖, 并在短时间内完全水解 AP 分子。

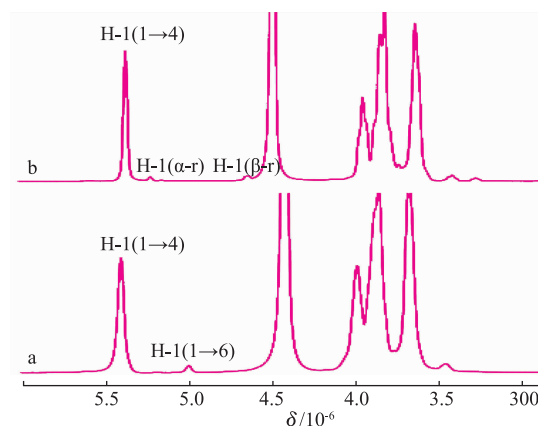


图 4 AP 水解前后的 ^1H -NMR 图谱

Fig. 4 ^1H -NMR spectrum for maize amylopectin. a) native maize amylopectin; b) debranched maize amylopectin.

目前, 国内从事异淀粉酶研究较少, 所开发得到的异淀粉酶由于种种原因, 不能大规模地进行工业化生产, 从而使得它们的应用得不到推广。作者旨在了解异淀粉酶作用机理, 在此基础上为异淀粉酶作为辅助糖化酶应用于制备高葡萄糖浆或酒精发酵工艺提供一定的参考依据。

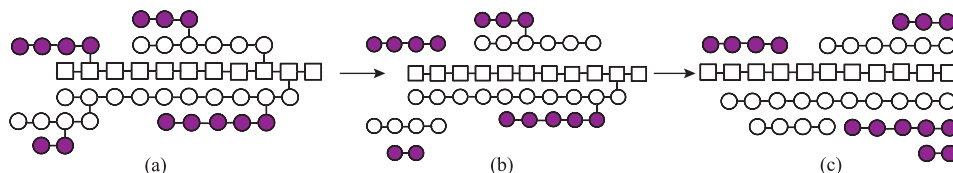


图 5 IAM 水解 AP 的可能作用模式

Fig. 5 Proposed hydrolytic action modes of IAM

参考文献:

- [1] Gidley M J. Quantification of the structural features of starch polysaccharides by N.M.R spectroscopy [J]. *Carbohydr Res*, 1985, 139: 85-93.
- [2] Nilsson G S, Bergquist K E, Nilsson U, et al. Determination of the degree of branching in normal and amylopectin type potato starch with ^1H -NMR spectroscopy improved resolution and two-dimensional spectroscopy[J]. *Starch/Starke*, 1996, 48: 352-357.
- [3] Peat S, Whelan W J, Thomas G J. Evidence of multiple branching in waxy maize starch [J]. *J Chemical Soc, Chem Commun*, 1952, 11: 4546-4548.

- [4] Zhang H X, Tian T Q, Bai Y X, et al. Structure and properties of maize starch processed with a combination of α -amylase and pullulanase[J]. **Int J Biol Macromol**, 2013, 52:38–44.
- [5] Bertoft E, Koch K, Aman P. Structure of building blocks in amylopectins[J]. **Carbohydr Res**, 2012, 361:105–113.
- [6] Zhu F, Corke H, Bertoft E. Amylopectin internal molecular structure in relation to physical properties of sweetpotato starch[J]. **Carbohydr Polym**, 2011, 84:907–918.
- [7] Bertoft E, Piyachomkwan K, Chatakanonda P, et al. Internal unit chain composition in amylopectins [J]. **Carbohydr Res**, 2008, 74:527–543.
- [8] Richardson S, Nilsson G S, Bergquist K E, et al. Characterisation of the substituent distribution in hydroxypropylated potato amylopectin starch[J]. **Carbohydr Res**, 2000, 328:365–373.
- [9] Syahariza Z A, Sar S, Hasjim J, et al. The importance of amylose and amylopectin fine structures for starch digestibility in cooked rice grains[J]. **Food Chem**, 2013, 136:742–749.
- [10] 牟世芬, 于泓, 蔡亚岐. 糖的高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测法分析[J]. 2009, 27(5):667–674.
MOU Shifen, YU Hong, CAI Yaqi. Analysis of sugars by high performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection[J]. **Chin J Chromatogr**, 2009, 27(5):667–674. (in Chinese)
- [11] Xu J, Zhao WX, Ning YW, et al. Comparative study of spring dextrin impact on amylose retrogradation [J]. **J Agric Food Chem**, 2012, 60:4970–4976.
- [12] Tizzotti M J, Sweedman M C, Tang D, et al. New ^1H NMR procedure for the characterization of native and modified food-grade starches[J]. **J Agric Food Chem**, 2011, 59(13):6913–6919.
- [13] Harada T. Isoamylase and its industrial significance in the production of sugars from starch [J]. **Biotechnol Genet Eng**, 1984, 1:39–63.
- [14] Park H S, Park J T, Kang H K, et al. TreX from *sulfolobus solfataricus* ATCC 35092 displays isoamylase and 4- α -glucanotransferase activities[J]. **Biosci Biotechnol Biochem**, 2007, 71(5):1348–1352.
- [15] Imanaka T, Kuriki T. Pattern of action of *Bacillus stearothermophilus* neopullulanase on pullulan [J]. **J Bacteriol**, 1989, 135:1521–1528.
- [16] Choi J H, Lee H, Kim Y W, et al. Characterization of a novel debranching enzyme from *Nostoc punctiforme* possessing a high specificity for long branched chains[J]. **Biochem Biophys Res Commun**, 2009, 378:224–229.
- [17] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. **Nature**, 1970, 227:680–685.
- [18] Urluab H, Wober G. Identification of isoamylase, a glycogen-debranching enzyme, from *Bacillus amyloliquefaciens* [J]. **FEBS Lett**, 1975, 57:1–4.
- [19] Bradford M M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. **Anal Biochem**, 1976, 72:248–254.
- [20] Case S E, Capitani T, Whaley J K, et al. Physical properties and gelation behavior of a low-amylopectin maize starch and other high-amylose maize starches[J]. **J Cereal Sci**, 1998, 27:289–299.
- [21] Cairns A J, Nash R, Machado De Carvalho M-A, et al. Characterisation of the enzymatic polymerization of 2,6-linked fructan by leaf extracts from Timothy grass (*Phleum pratense*) [J]. **New phytol**, 1999, 142:79–91.
- [22] Koch K, Andersson R, Aman P. Quantitative analysis of amylopectin unit chains by means of high performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection[J]. **J Chromatogr A**, 1998, 800:199–206.
- [23] Manners D J. Recent developments in our understanding of amylopectin structure[J]. **Carbohydr Polym**, 1989, 11:87–112.
- [24] Atwell W A, Hoseney R C, Lineback D R. Debranching of wheat amylopectin[J]. **Cereal Chem**, 1980, 57:12–16.
- [25] Inouchi N, Glover D V, Takaya T, et al. Development changes in fine structure of starches of several endosperm mutants of maize [J]. **Starch/Starke**, 1983, 35:371–376.
- [26] Kuriki T, Imanaka T. The concept of the α -amylase family: structural similarity and common catalytic mechanism [J]. **J Biosci Bioeng**, 1999, 87(5):557–565.