

α -淀粉酶的蛋白质工程及其主要应用研究进展

冯 勇^{1,2} 任政伟³

(1. 重庆商务职业学院烹饪与食品学院, 重庆 401331; 2. 冯勇中式烹调师首席技师工作室, 重庆 401331;

3. 四川旅游学院烹饪与食品科学工程学院, 四川 成都 610100)

摘要: α -淀粉酶是一类高效催化淀粉水解反应的糖苷水解酶, 被广泛应用于食品、纺织、造纸等多个工业领域, 尤其在淀粉液化、烘焙改良和果汁澄清等食品加工过程中发挥着关键作用。然而, 天然 α -淀粉酶普遍存在热稳定性差、耐酸性弱及钙离子依赖性强等问题, 严重制约其在复杂工业环境中的应用。近年来, 蛋白质工程技术(包括定向进化、理性设计和半理性设计)被广泛应用于 α -淀粉酶的结构优化与性能提升。文章系统综述了蛋白质工程在提升 α -淀粉酶热稳定性和耐酸性方面的研究进展, 并概括了其在高温淀粉液化、抗回生面包烘焙和低 pH 饮料澄清等场景中的应用成效。

关键词: α -淀粉酶; 蛋白质工程; 热稳定性; 耐酸性

Research progress on protein engineering of α -amylase and its major applications

Feng Yong^{1,2} Ren Zhengwei³

(1. Culinary and Food College, Chongqing Business Vocational College, Chongqing 401331, China;

2. Feng Yong Chinese Cooking Skills Master Studio, Chongqing 401331, China; 3. College of Culinary and Food Science Engineering, Sichuan Tourism University, Chengdu, Sichuan 610100, China)

Abstract: Alpha-Amylase is a glycoside hydrolase that efficiently catalyzes the hydrolysis of starch and is widely applied in various industrial fields such as food, textile, and paper industries. It plays a pivotal role particularly in food processing processes such as starch liquefaction, baking improvement, and juice clarification. However, natural α -amylases generally exhibit poor thermal stability, weak acid tolerance, and strong calcium ion dependency, which severely restrict their application in complex industrial environments. In recent years, protein engineering technologies, including directed evolution, rational design, and semi-rational design, have been extensively employed to the structural optimization and performance improvement of α -amylases. This article systematically reviews the research progress of protein engineering in enhancing the thermal stability and acid tolerance of α -amylases, and summarizes their application outcomes in high-temperature starch liquefaction, anti-staling bread baking, and low-pH beverage clarification.

Keywords: α -amylase; protein engineering; thermostability; acid tolerance

α -淀粉酶隶属于糖苷水解酶 GH13 家族, 是一种内切型、钙离子依赖的金属酶, 能够高效断裂底物分子内部的 α -1,4-糖苷键, 是淀粉液化工艺中的核心生物催化剂。从结构上看, α -淀粉酶普遍由 3 个结构组成(见图 1): A 结构域为典型的 $(\beta/\alpha)_8$ 桶状结构(即 TIM 桶)构成催化核心; B

结构域通常为连接 A 域的可变环区, 参与底物识别与稳定性调节; C 结构域位于 C 端, 为 β 折叠结构, 主要影响分泌与酶的整体稳定性^[1]。其催化中心包含 3 个保守残基组成: 天冬氨酸(Asp)作为亲核试剂, 谷氨酸(Glu)作为质子供体, 另一天冬氨酸协助过渡态稳定, 三者协同实现淀

基金项目: 全国餐饮行指委计划项目(编号: CYHZW-YB2025097); 川菜发展研究中心科研项目(编号: CC24Z25); 重庆市教育委员会教改项目(编号: Z2253315)

通信作者: 任政伟(1985—), 男, 四川旅游学院高级实验师。E-mail: fengyonggl23@163.com

收稿日期: 2025-09-22 **改回日期:** 2026-03-12

引用格式: 冯勇, 任政伟. α -淀粉酶的蛋白质工程及其主要应用研究进展[J]. 食品与机械, 2026, 42(9): 243-248.

Citation: Feng Yong, Ren Zhengwei. Research progress on protein engineering of α -amylase and its major applications[J]. Food & Machinery, 2026, 42(9): 243-248.

粉、糖原等底物的高效断裂,生成麦芽糖、葡萄糖与糊精等产物^[1-2]。凭借其高效、温和、可再生等特点, α -淀粉酶在纺织^[3]、洗涤剂^[4]、食品^[5]、医药^[6]、造纸^[7]和生物修复^[8]等多个行业中被广泛使用。在食品安全方面,欧洲食品安全局(EFSA)已确认,来自非转基因 *Aspergillus niger* 等菌株生产的 α -淀粉酶在规定使用条件下可安全用于食品工业^[2]。

然而,不同行业对酶的性能要求存在显著差异。例如,淀粉液化普遍采用喷射熟化工艺,要求酶制剂能在 105~110 °C、高剪切、pH 5.8~6.5 条件下短时高效液化^[9],而烘焙行业则需要 α -淀粉酶在淀粉糊化阶段(约 60 °C)保持活性,并在后期外壳温度接近 100 °C 时迅速失活,以避免过度水解导致面包塌陷和组织破坏^[10]。在此类苛刻工艺条件下,天然 α -淀粉酶常表现出热稳定性差、酸耐受性弱、钙离子依赖性强等不足,严重限制其工业适用性与经济性。因此,筛选或构建更高效、稳定的 α -淀粉酶,以适应严苛的工业反应条件、降低生产成本,成为工业界的重要目标。考虑到从自然界中直接筛选兼具耐热性与耐酸性的 α -淀粉酶存在高度不确定性及效率瓶颈,研究重心正逐步向蛋白质工程方向转移。近年来,通过定向进化挖掘协同突变组合,辅以计算驱动的理性或半理性设计,围绕 TIM 桶核心、B 区柔性环及酶表面电荷网络等关键结构进行精准改造,成功获得了一系列在高温、酸性环境中仍保持高活性与高稳定性的 α -淀粉酶突变体,为严苛的工业条件下的淀粉深加工提供了高效可靠的生物催化解决方案^[11]。

1 蛋白质工程

在实际工业生产中,天然酶的催化活性、选择性、稳定性及溶解性等特性往往难以满足严苛的工艺要求。为此,以定向进化、理性设计和半理性设计为代表的蛋白质工程技术,被广泛用于优化 α -淀粉酶的催化性能。定向进化模拟自然进化过程,无需对酶结构和功能有深入的

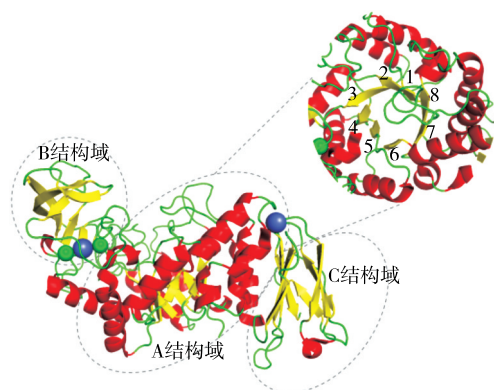
解,通过随机诱变(如易错 PCR、DNA 改组等)创造大量突变体,随后进行高通量筛选获得具有优异性能的酶。然而,该方法突变体库庞大、筛选效率低,因而建立高效筛选体系至关重要^[12]。理性设计则基于对蛋白质结构和功能关系的深入理解,借助生物信息学和计算机辅助分析,精确定位关键氨基酸残基并进行定点突变,从而改善酶的理化性质^[13]。该方法能够有针对性地提升酶的特性(如热稳定性或催化效率),但前期需要较高的结构信息依赖度和计算预测精度。理性设计的优势在于目标明确、试验量小,适合进行结构机制明确的精确改造。半理性设计综合了前两种方法的优点。通过对酶序列与结构信息的分析,确定关键功能位点后在这些“热点”区域进行饱和突变或组合突变,从而减少突变体数量并显著提高筛选效率。常见策略包括基于序列保守性分析的位点筛选以及基于结构建模的活性中心重设计^[14-16]。半理性设计在提升 α -淀粉酶的热稳定性、pH 耐受性及底物亲和力等方面取得了广泛应用。然而,随着 α -淀粉酶结构-功能关系的不断深入解析,理性设计逐渐成为近年来 α -淀粉酶改造研究的主要发展方向。

1.1 提高热稳定性

在众多影响 α -淀粉酶工业应用性能的因素中,热稳定性是制约其广泛应用的核心瓶颈。由于 α -淀粉酶常用于淀粉液化、高麦芽糖浆制备等高温工艺,其对热的不稳定性不仅限制了催化效率,还增加了细菌污染风险和能耗成本^[17]。因此,提升其热稳定性成为当前研究的重点方向。

蛋白质工程为此提供了两大思路:通过定向进化进行随机突变和通过理性设计进行精准改造。定向进化策略不依赖酶的三维结构信息,通过构建大规模突变库并结合高通量筛选,能够发掘出非预期的有益突变。例如 Ruan 等^[18]利用易错 PCR 和三轮筛选,在 *Bacillus licheniformis* R-53 α -淀粉酶包含 8 000 个突变体的文库中获得了双突变体 V296F/K418I。其最适温度由 60 °C 提升至 65 °C,比活性提高了 2.16 倍。结构分析显示,新增的氢键和疏水相互作用增强了酶的刚性和热稳定性。类似地,Pouyan 等^[19]对 *Bacillus cereus* GL96 α -淀粉酶进行定向进化得到突变体 D162K,其最适温度提高了 5 °C,并在 80 °C 下仍能保持 40% 初始活性(而野生型在 70 °C 时几乎完全失活)。此外,Wang 等^[20]通过定向进化改造嗜真菌 *Malbranchea cinnamomea* 的 α -淀粉酶,获得突变体 T226S,不仅最适温度提高了 5 °C,55~65 °C 下的半衰期也延长了 2.2~3.3 倍。机制分析显示,突变后改善了酶表面疏水-亲水平衡,结构更加稳定,底物结合模式得到优化。这些案例共同凸显了定向进化的强大探索能力,即便是对于无结构信息的酶,也能通过模拟自然选择找到提升稳定性的有效位点。然而,该方法的成功高度依赖于庞大的筛选工作量,其主要挑战在于构建高效的筛选体系。

相较于定向进化的随机性,理性设计策略可借助结



上角为 $(\alpha/\beta)_8$ TIM 桶状结构示意图

图 1 *B. paralicheniformis* α -amylase α -淀粉酶(PDB ID: 6TP1)的三维晶体结构

Figure 1 The 3D crystal structure of *Bacillus paralicheniformis* α -amylase (PDB ID: 6TP1)

构与序列信息,有针对性地特定区域进行优化。从结构层面看, α -淀粉酶的TIM桶结构具有“功能分工”特性,稳定性相关突变多集中在TIM桶的“稳定面”、B结构域以及中央 β 链区域^[11,21-22]。例如,Cui等^[23]将*Bacillus licheniformis*来源 α -淀粉酶TIM桶核心的极性残基Q360替换为疏水性Cys,成功增强了局部疏水作用。突变体Q360C在70℃、pH 8.5下孵育30 min后残余活性提升16%,比活性为野生型的3倍。Wang等^[24]通过理性设计对*Bacillus subtilis* α -淀粉酶的TIM桶中央保守 β 链位点V260进行疏水性优化,获得突变体V260I,将最适温度从63.2℃提高到70.3℃,半失活温度提升4.9℃。该突变通过增强疏水核心范德华力网络,提高了蛋白分子的结构刚性和整体耐热性。Zhu等^[25]通过理性设计在嗜热菌*Geobacillus stearothermophilus*的 α -淀粉酶的结构核心A区域中引入二硫键,获得突变体D125C/G192C,使其最适温度提高至95℃,半衰期延长近40倍。机制分析表明,二硫键的引入增强了酶分子的构象刚性和整体热稳定性,有效抑制了热诱导的变性过程。除了基于三维结构,从序列层面分析嗜热与中温蛋白的差异也为理性设计提供了宝贵线索。Gangadharan等^[10]研究发现,在嗜热蛋白中,赖氨酸(K)、精氨酸(R)等带电或构象刚性的氨基酸含量更高。例如,Li等^[26]对*Pseudoalteromonas haloplanktis*来源的冷适应性 α -淀粉酶进行双点突变S255K/S340P,其熔融温度提升4.77℃,在40℃孵育80 min后残余活性提升2.6倍,且不影响酶的最适温度和pH,体现出良好的热稳定性与催化性能兼容性。Zhai等^[27]通过理性设计获得双突变体N31R/T213R,使*Parageobacillus thermoglucosidarius* α -淀粉酶在80℃下的半衰期延长4.3倍,比活性提高59%,其热稳定性增强主要归因于氢键网络加强与表面电荷分布优化。

综上,提升 α -淀粉酶热稳定性的策略各具特点且互为补充。定向进化可以挖掘意料之外的协同突变位点,而理性设计则能基于结构或序列信息进行精准改造。无论是增强疏水作用、引入二硫键,还是优化表面电荷网络,这些策略都在分子层面揭示了蛋白质热稳定性的根本机制,为获得能胜任高温工业场景的工程化 α -淀粉酶提供了坚实的理论支撑。

1.2 增强耐酸性

天然 α -淀粉酶往往缺乏良好的酸稳定性,限制了其在酸性食品体系等生产环境中的直接应用。调整工艺pH不仅增加操作复杂度与生产成本,也可能影响最终产品风味。因此,通过蛋白质工程提升 α -淀粉酶的酸耐受性具有重要的工业价值。从分子机制上来看, α -淀粉酶的pH-活性谱主要受以下因素调控:①带电基团所引起的静电效应;②活性位点的动态构象变化;③蛋白内部的疏水作用^[28]等。作为典型的糖苷水解酶, α -淀粉酶遵循双取代“保留”机制,其催化效率高度依赖催化位点中亲核体与质子供体残基的pKa值^[9,29]。因此,提升酶在酸性条

件下性能的策略可归纳为两大方向:直接优化催化中心的质子环境,以及间接增强酶在酸性条件下的结构稳定性。直接调控催化位点周围微环境是最核心的策略。作为遵循双取代“保留”机制的糖苷水解酶, α -淀粉酶的催化效率高度依赖亲核体与质子供体残基的pKa值。Wang等^[30]结合结构比对和pKa预测,精准定位了*Bacillus subtilis* α -淀粉酶催化口袋附近的3个关键位点(Arg172、Ala270和Asn271),构建的双突变体A270K/N271H成功将最适pH从6.5降至4.5,且催化效率提高近4倍。证明通过精确修饰 α -淀粉酶催化残基的化学微环境,可以调控其pKa值,使其在更低的pH下仍能保持高效的质子传递和催化功能,这是提升酸性条件下酶活性的最直接途径。另一方面,增强酶分子在低pH下的整体或局部结构稳定性,是保证其在酸性环境中维持活性的基础。低pH环境易导致蛋白表面质子化,破坏原有的盐桥和氢键网络,从而引起结构失稳和变性。对此,Huang等^[31]结合易错PCR与高通量筛选技术,对*Bacillus licheniformis* α -淀粉酶进行随机突变,从2300个突变体中筛选获得了具备更高酸稳定性和热稳定性的突变体G81R。在pH 4.5孵育40 min后该突变体仍保留10%活性,而野生型已完全失活,且催化效率提升了1.4倍。结构分析显示,突变体G81R通过引入正电荷残基,不仅增强了局部 α -螺旋的稳定性,还间接降低了催化残基pKa值,同时提升了热稳定性与酸稳定性。Song等^[32]则将*Rhizopus oryzae* α -淀粉酶中关键位点替换为耐酸/耐热型 α -淀粉酶中常见的正电荷残基,增强了蛋白表面在极端酸性条件下的静电稳定性,使酶最适pH由5.5降至4.5,pH 4.5下的半衰期延长了2.55倍,55℃下的热稳定性提高了2.52倍,同时催化效率提升1.61倍。结构分析表明,突变体V174R的缬氨酸突变为带正电荷的精氨酸引入了新的氢键和盐桥,增强了局部结构稳定性,从而显著提升了耐酸性和热稳定性。此外,Nie等^[33]针对*Bacillus velezensis* α -淀粉酶的C结构域进行了定点突变,构建的突变体在pH 2.0下的酶活性提高了2倍。突变引入了更多负电荷残基,增强了蛋白表面的静电稳定性,从而提升了极端酸性条件下的结构完整性与催化活性。

综上,通过调控关键催化残基的pKa值以适应酸性催化环境,同时优化分子内氢键网络、盐桥及表面电荷分布以抵抗酸诱导的变性,可显著拓展 α -淀粉酶的应用pH范围,为突破其在复杂工业环境中的应用限制提供了清晰的理论依据和实践路径。

2 α -淀粉酶在食品工业中的应用

目前, α -淀粉酶在食品行业中的主要应用有淀粉液化^[34]、面包抗老化^[35]和饮料澄清^[11]等。然而,天然酶的热稳定性、pH耐受性及对钙离子的依赖性等固有缺陷,严重制约了其在现代食品工业严苛工艺条件下的应用效能。

为此,蛋白质工程提供了强有力的改造工具,通过对酶分子进行精准设计,不仅显著提升了其催化活性与工艺收率,更赋予了其多重优良特性,极大地拓展了其应用边界。

2.1 淀粉液化

在淀粉糖工业中,液化是核心步骤,其工艺正朝着 105~110 °C 的超高温、连续化生产方向发展^[21]。这一趋势对 α -淀粉酶提出了三大核心要求:良好的热稳定性、高效的催化能力以及对钙离子的非依赖性。早期工业常依赖于从自然界筛选菌株,如 Ullah 等^[36]从土壤中分离了 *Pseudomonas aeruginosa* IR-9 α -淀粉酶,Al-Dhabi 等^[37]从沙特阿拉伯贾赞地区分离了 *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-46 α -淀粉酶,Kohli 等^[38]报道了源自 *Bacillus subtilis* S113 的酸性 α -淀粉酶。这些天然酶在温和条件(40~80 °C, pH 4.0~6.5)下表现出一定活性,但面对高温液化工艺则迅速失活,无法满足现代工业需求。为此,蛋白质工程改造成为提升 α -淀粉酶性能的关键手段。例如,Zhu 等^[25]构建的 α -淀粉酶双点突变体 D125C/G192C,成功引入二硫键,显著增强了酶的结构刚性与稳定性,使其在 100 °C 下连续反应 80 min 后仍能保持高活性和稳定构象。在玉米淀粉的液化试验中,其液化产物浓度较野生型提高了 5.1 倍,显著增强了液化效率,并展现出工业高温液化所需的优异耐热性能。此外,高温连续化生产不仅要求耐热,还要求摆脱对稳定剂(如 Ca^{2+})的依赖以降低成本。Liao 等^[39]开发的 α -淀粉酶突变体 K152H/A166C/E168H 通过多位点协同突变,不仅使酶的最适温度从 90 °C 提升至 95~100 °C,且可在 90 °C、以 1% 玉米淀粉为底物反应 120 min 时,突变体产生的麦芽低聚糖浓度较野生型提高约 1.1~1.7 倍。这些结果表明,该突变体不仅在 105 °C 下能够长期维持高活性、实现高效液化和高糖产率,同时因其 Ca^{2+} 非依赖特性,可显著降低工业生产中钙盐沉积带来的设备清洗和维护成本,充分满足现代高温连续液化工艺的严苛要求。综上,随着淀粉液化工艺不断向高温、高效、连续化方向发展,构建兼具热稳定性、催化效率和操作适应性的工程化 α -淀粉酶,将成为未来淀粉加工领域的研究重点和产业发展趋势。

2.2 面包抗老化

在面包工业中, α -淀粉酶通常在和面阶段添加,通过促进淀粉水解,生成糊精和低聚糖,为酵母提供发酵底物,从而加快发酵速率、增强面团活性。更重要的是, α -淀粉酶具备显著的延缓面包老化(抗回生)作用,可改善面包组织结构、提升柔软度并延长保质期,因此被誉为理想的“面包改良剂”^[40]。虽然添加天然 α -淀粉酶能有效改善面包品质。如 Trabelsi 等^[41]从 *Bacillus subtilis* US586 中提取的酸性 α -淀粉酶能显著提升低筋小麦面团的延展性与面包的蓬松度、弹性和风味,使面包硬度降低约 28%;弹性与内聚性提高约 20%。Sondhi 等^[42]研究发现,在面粉中添加 α -淀粉酶可显著改善烘焙特性,面包比容约提高

2 倍、面包高度约增加 15%,同时硬度下降 32%、咀嚼性降低 31%,使面包更加松软可口,风味与消费者接受度显著提升。但工程化改造的 α -淀粉酶通过更精准的催化特性调控,展现出更为卓越和可控的抗老化效果。例如,Zhu 等^[25]通过理性设计开发的热稳定性突变体 D125C/G192C 能够在面团整个加工与烘焙阶段保持稳定,持续降解淀粉,有效改善面包终产品品质并延缓硬化过程。在面包贮藏期间,还能持续保持良好的弹性和口感,使面包弹性保持率在贮藏 4 d 后提高约 35%,可食期延长 2~3 d,整体口感与新鲜度显著优于对照组。同样,Wang 等^[20]开发的突变体 T226S 拥有更长的半衰期,能够在淀粉糊化过程中持续水解,生成更多具有保湿性和抗老化作用的麦芽三糖,从而有效限制直链淀粉的回生并减少水分迁移。结果表明,添加该突变体的面包比容提高 17.8%,硬度降低 35.6%,贮藏 4 d 后的感官评分显著高于对照组,整体柔软性与保鲜性均得到明显改善。此类改造的优势在于“全程护航”,确保酶在关键的淀粉糊化和凝胶形成阶段仍能发挥作用。面包老化的根本原因是淀粉分子重结晶。更精细的策略是调控酶的水解产物,生成特定的功能性低聚糖。此外,Ruan 等^[18]构建的双突变体 V296F/K418I 则代表了另一种高效策略。该突变体能够在高温阶段持续催化淀粉水解,生成短链麦芽低聚糖,从而抑制淀粉分子的重新结晶(回生)过程,显著延缓面包老化。与对照组相比,添加突变体酶的面包样品表现出显著的品质提升:比容提高 21.3%,硬度降低 35.8%,贮藏 72 h 后回生率下降 32%,含水率提高约 2.4%,整体柔软度与保湿性均得到明显改善。综上, α -淀粉酶及其突变体在改善面包品质、延长货架期方面展现出显著优势,未来研究可进一步聚焦于 α -淀粉酶结构功能优化及其热稳定性提升,以推动其在现代烘焙工业中的深度应用。

2.3 果汁澄清

在果汁工业中,淀粉是继果胶之后的第二大浑浊因子,尤其在苹果、梨等原料中。 α -淀粉酶的应用正从单纯作为果胶酶的补充,扩展为果汁酶解体系中发挥协同作用的关键酶之一^[11]。早期应用中,Fincan 等^[11]将 α -淀粉酶应用于红苹果汁和绿苹果汁的处理,70 °C 反应 60 min 后,分别实现了 86% 和 83% 的淀粉降解率,显著提升了果汁澄清度。Hossain 等^[22]于 50 °C 下向苹果汁中添加 α -淀粉酶处理 150 min 后,苹果汁的浊度(OD)下降了 54.18%,展现出良好的果汁澄清效果。虽然证明了单独添加 α -淀粉酶即可显著降低苹果汁浊度,证实了其作为澄清助剂的有效性。然而,这种单一酶处理方式效率有限,且游离酶难以回收,增加了成本。为此,Ozyilmaz 等^[43]将 α -淀粉酶、果胶酶和纤维素酶 3 种酶共固定于活化硅胶载体上,形成具有协同作用的固定化酶体系。3 种酶协同作用,分别降解淀粉、果胶和纤维素,使苹果、葡萄等果汁的浊度降低幅度高达 57%~73%,远超单一酶制剂的效果。同时,

固定化处理不仅提高了酶的热稳定性和操作稳定性,更关键的是实现了酶的重复使用。该体系在连续使用5~6次后仍能保持约75%的活性,显著降低了生产成本,为连续化生产奠定了基础。未来研究可进一步聚焦于与其他酶类的协同作用机制及其固定化策略优化,开发更高效、低成本的共固定化技术,构建适用于连续化澄清工艺的稳定生物反应器。

3 结论

蛋白质工程技术为 α -淀粉酶的性能优化提供了强有力的工具。文章系统概述了针对 α -淀粉酶TIM桶结构、B结构域柔性环及表面电荷网络等关键区域的研究思路与典型成果,阐明了其在提升酶的热稳定性与酸稳定性方面的作用机制。该系列研究为 α -淀粉酶在高温淀粉液化、面包烘焙及酸性食品加工等严苛工艺条件下的应用推广提供了理论依据。此外,通过消除钙离子依赖及构建多酶协同催化体系等策略,工程化 α -淀粉酶的工业适应性与经济性也得到了进一步提升。尽管成果显著,但面对未来工业4.0时代对生物催化剂提出的更高要求, α -淀粉酶的性能仍需持续迭代与突破。未来的研究重点可聚焦于以下方面:首先,人工智能与生物信息学(如AlphaFold、Rosetta)的深度融合,将加速从序列到结构再到功能的预测,实现酶的“从头设计”与精准改造。其次,深入解析 α -淀粉酶关键结构域与功能残基的动态构效关系,将为理性设计提供更清晰的靶点。再者,固定化技术、模块化酶系的构建以及与其他酶的协同催化体系,将是推动 α -淀粉酶在连续化、智能化生产中发挥更大作用的关键方向,进一步促进其在食品工业中的绿色、经济与高效应用。

参考文献

- [1] 柯涛. α -淀粉酶的分子定向进化及其突变体结构与功能研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2006: 27-30.
- [2] Ke T. The directed molecular evolution of α -amylase and the analysis of the mutants[D]. Wuhan: Huazhong University Science and Technology, 2006: 27-30.
- [3] Cep, Lambré C, Baviera J M B, et al. Safety evaluation of the food enzyme α -amylase from the non-genetically modified *Aspergillus niger* strain AS 29-286[J]. EFSA Journal, 2023, 21(6): e08090.
- [4] Aggarwal R, Dutta T, Sheikh J. Extraction of amylase from the microorganism isolated from textile mill effluent via a vis desizing of cotton[J]. Sustainable Chemistry and Pharmacy, 2019, 14: 100178.
- [5] Zafar A, Masood A, Rahman Z, et al. Cloning, purification, and functional characterization of recombinant pullulanase from *Bacillus cereus* ATCC 14579 for improved detergent performance[J]. Journal of Surfactants and Detergents, 2025, 28(2): 263-276.
- [6] 张花, 宋晓凡, 李岩, 等. α -淀粉酶降低青稞快消化淀粉含量工艺优化[J]. 食品与机械, 2022, 38(12): 199-204.
- [7] Zhang H, Song X F, Li Y, et al. Study on the process of α -amylase reduces the content of rapidly digestion starch in highland barley[J]. Food & Machinery, 2022, 38(12): 199-204.
- [8] Fan P, Yuan Y Z, Zhang J, et al. Software engineering implementation and e-commerce model design based on neural digestive system monitoring and rapid prediction of amylase[J]. Highlights in Science, Engineering and Technology, 2024, 85: 1 238-1 244.
- [9] Elyasi Far B, Ahmadi Y, Yari Khosroshahi A, et al. Microbial α -amylase production: progress, challenges and perspectives[J]. Advanced Pharmaceutical Bulletin, 2020, 10(3): 350-358.
- [10] Pinto É S M, Dorn M, Feltes B C. The tale of a versatile enzyme: α -amylase evolution, structure, and potential biotechnological applications for the bioremediation of n-alkanes[J]. Chemosphere, 2020, 250: 126202.
- [11] Lim S J, Oslan S N. Native to designed: microbial α -amylases for industrial applications[J]. PeerJ, 2021, 9: e11315.
- [12] Gangadharan D, Jose A, Nampoothiri K M. Recapitulation of stability diversity of microbial α -amylases[J]. Amylase, 2020, 4(1): 11-23.
- [13] Fincan S A, Özdemir S, Karakaya A, et al. Purification and characterization of thermostable α -amylase produced from *Bacillus licheniformis* So-B3 and its potential in hydrolyzing raw starch[J]. Life Sciences, 2021, 264: 118639.
- [14] Markel U, Essani K D, Besirlioglu V, et al. Advances in ultrahigh-throughput screening for directed enzyme evolution[J]. Chemical Society Reviews, 2020, 49(1): 233-262.
- [15] 毛杨, 杜怡萱, 高向东. 酶的分子改造及其在医药领域的应用[J]. 生命的化学, 2024, 44(7): 1 240-1 248.
- [16] Mao Y, Du Y X, Gao X D. Enzyme molecular modification and its application in medicine[J]. Chemistry of Life, 2024, 44(7): 1 240-1 248.
- [17] Ali M S, Ishqi H M, Husain Q. Enzyme engineering: reshaping the biocatalytic functions[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2020, 117(6): 1 877-1 894.
- [18] 李巧玲, 胡阳, 周慧灵, 等. 基于分子改造手段提高D-来苏糖异构酶酸性条件异构催化活力[J]. 食品与机械, 2025, 41(4): 1-7.
- [19] Li Q L, Hu Y, Zhou H L, et al. Enhancing the acidic activity of D-lyxose isomerase by molecular modification methods[J]. Food & Machinery, 2025, 41(4): 1-7.
- [20] Kikani B A, Singh S P. Amylases from thermophilic bacteria: structure and function relationship[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2022, 42(3): 325-341.
- [21] 李才明, 陈双娣, 顾正彪, 等. 嗜热 α -淀粉酶热稳定性的决定因素及提高策略[J]. 食品与机械, 2018, 34(9): 6-10.
- [22] Li C M, Chen S D, Gu Z B, et al. Determinants factors and the strategies of improving thermostability of thermophilic α -amylase[J]. Food & Machinery, 2018, 34(9): 6-10.
- [23] Ruan Y Q, Zhang R Z, Xu Y. Directed evolution of maltogenic amylase from *Bacillus licheniformis* R-53: enhancing activity

- and thermostability improves bread quality and extends shelf life[J]. Food Chemistry, 2022, 381: 132222.
- [19] Pouyan S, Lagzian M, Sangtarash M H. Enhancing thermostabilization of a newly discovered α -amylase from *Bacillus cereus* GL96 by combining computer-aided directed evolution and site-directed mutagenesis[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 197: 12-22.
- [20] Wang Y C, Ma J W, Liu H J, et al. Simultaneous improvement of thermostability and maltotriose-forming ability of a fungal α -amylase for bread making by directed evolution[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 264: 130481.
- [21] Paul J S, Gupta N, Beliya E, et al. Aspects and recent trends in microbial α -amylase: a review[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2021, 193(8): 2 649-2 698.
- [22] Hossain K M, Khan U, Mahbubur Rahman S M, et al. Potential antimicrobial and fruit juice clarification activity of amylase enzyme from *Bacillus* strains[J]. Biotechnology Reports, 2024, 44: e00861.
- [23] Cui X, Yuan X, Li S Y, et al. Simultaneously improving the specific activity and thermostability of α -amylase BLA by rational design[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2022, 45(11): 1 839-1 848.
- [24] Wang C H, Lu L H, Huang C, et al. Simultaneously improved thermostability and hydrolytic pattern of alpha-amylase by engineering central beta strands of TIM barrel[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2020, 192(1): 57-70.
- [25] Zhu M Y, Zhai W X, Song R F, et al. Enhanced thermostability of *Geobacillus stearothermophilus* α -amylase by rational design of disulfide bond and application in corn starch liquefaction and bread quality improvement[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(48): 18 928-18 942.
- [26] Li Q B, Yan Y R, Liu X Q, et al. Enhancing thermostability of a psychrophilic alpha-amylase by the structural energy optimization in the trajectories of molecular dynamics simulations[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 142: 624-633.
- [27] Zhai W X, Zhu M Y, Lin L, et al. Computer-aided protein surface modification strategy to improve the thermostability of α -amylase[J]. Starch-Stärke, 2025, 77(1): 2300288.
- [28] Sharma A, Satyanarayana T. Microbial acid-stable α -amylases: characteristics, genetic engineering and applications[J]. Process Biochemistry, 2013, 48(2): 201-211.
- [29] Nielsen J E, Borchert T V. Protein engineering of bacterial α -amylases[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology, 2000, 1543(2): 253-274.
- [30] Wang C H, Liu X L, Huang R B, et al. Enhanced acidic adaptation of *Bacillus subtilis* Ca-independent alpha-amylase by rational engineering of pKa values[J]. Biochemical Engineering Journal, 2018, 139: 146-153.
- [31] Huang L, Shan M Y, Ma J Y, et al. Directed evolution of α -amylase from *Bacillus licheniformis* to enhance its acid-stable performance[J]. Biologia, 2019, 74(10): 1 363-1 372.
- [32] Song L, Yang Q, Tang B. Improving the thermostability and acid resistance of *Rhizopus oryzae* α -amylase by using multiple sequence alignment based site-directed mutagenesis[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2020, 67(4): 677-684.
- [33] Nie M, Khalid F, Hu Q, et al. Site-directed mutagenesis: improving the acid resistance and thermostability of *Bacillus velezensis* α -amylase and its preliminary feed application[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(18): 10 487-10 496.
- [34] Lim S J, Hazwani-Oslan S N, Oslan S N. Purification and characterisation of thermostable α -amylases from microbial sources[J]. BioResources, 2020, 15(1): 2 005-2 029.
- [35] Samanta S. Enhancement of characteristics and potential applications of amylases: a brief review[J]. Am J Pure Appl Sci, 2020, 2(2): 24-35.
- [36] Ullah I, Khan M S, Khan S S, et al. Identification and characterization of thermophilic amylase producing bacterial isolates from the brick kiln soil[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2021, 28(1): 970-979.
- [37] Al-Dhabi N A, Ali Esmail G, Ghilan A M, et al. Isolation and purification of starch hydrolysing amylase from *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-46 obtained from the Jazan region of Saudi Arabia with industrial applications[J]. Journal of King Saud University - Science, 2020, 32(1): 1 226-1 232.
- [38] Kohli I, Joshi N C, Varma A. Production, purification and applications of raw starch degrading and calcium-independent α -amylase from soil rich in extremophile[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 162: 873-881.
- [39] Liao M, Dong R Y, Li L X, et al. High production of maltooligosaccharides in the starch liquefaction process: a study on the hyperthermophilic mechanism of α -amylase[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(16): 6 480-6 489.
- [40] Gayathri V M, Preetha S. Review on scaling up α -amylase production by bacterial strains through solid state fermentation[J]. International Journal on Science and Technology, 2025, 16: 1 877.
- [41] Trabelsi S, Ben Mabrouk S, Kriaa M, et al. The optimized production, purification, characterization, and application in the bread making industry of three acid-stable alpha-amylases isoforms from a new isolated *Bacillus subtilis* strain US586[J]. Journal of Food Biochemistry, 2019, 43(5): e12826.
- [42] Sondhi S, Sahib Kaur P, Kant S, et al. Improvement of bread quality by inclusion of alpha amylase from *Bacillus licheniformis*[J]. CGC International Journal of Contemporary Technology and Research, 2022, 4(2): 280-285.
- [43] Ozyilmaz G, Gunay E. Clarification of apple, grape and pear juices by co-immobilized amylase, pectinase and cellulase[J]. Food Chemistry, 2023, 398: 133900.