

文章编号:1673-1689(2008)04-0097-06

# 高产环糊精葡萄糖基转移酶的枯草芽孢杆菌 选育、产酶与酶学特性

胡静<sup>1,2</sup>, 陈育如<sup>\*1,2</sup>, 魏霞<sup>1,2</sup>, 刘友芬<sup>1,2</sup>

(1. 江苏省资源生物技术重点实验室, 江苏南京 210046; 2. 南京师范大学微生物工程重点实验室, 江苏南京 210046)

**摘要:**选育了一株高产环糊精葡萄糖基转移酶(CGTase)的芽孢杆菌 Sx 菌株,经 16S rRNA 测序分析,结合菌体及菌落的形态特征,鉴定该菌株为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。对其产酶条件与酶学特性进行了研究。结果表明,以 1 g/dL 玉米淀粉和 2 g/dL 豆粕粉为碳氮源,pH 6.5, 30 ℃,220 r/min,60 h 的条件下,菌株所产 CGTase 酶活性可达 5 596 U/mL;该酶在 30~50 ℃, pH 5.5~9.0 下保持稳定,在 50 ℃,180 r/min, pH 6.5,CGTase 酶活力为 1 107 U/mL 的条件下对 20 mg/mL 甜菊甙转化 48 h,甜菊甙溶液中的莱鲍迪甙与甜菊甙的比值(RA/SS)从转化前的 0.45 上升到 0.53。

**关键词:**环糊精葡萄糖基转移酶;甜菊甙;莱鲍迪甙;16S rRNA;枯草芽孢杆菌

中图分类号:Q 93

文献标识码:A

## Screening, Optimized Fermentation and Enzymatic Properties of a *Bacillus subtilis* Producing Cyclomaltodextrin Glucanotransferase

HU Jing<sup>1,2</sup>, CHEN Yu-ru<sup>\*1,2</sup>, WEI Xia<sup>1,2</sup>, LIU You-fen<sup>1,2</sup>

(1. Jiangsu Key Laboratory for Bioresource Technology, Nanjing 210046, China; 2. Key Laboratory for Microbial Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

**Abstract:** A *Bacillus subtilis* with high cyclomaltodextrin glucanotransferase (CGTase) activity was screened and identified on the basis of physical characterization, 16S rRNA sequence analysis and neighbour-joining tree. The optimized conditions of CGTase production were obtained: 1 g/dL maize starch, 2 g/dL defatted soybean, 30 ℃, pH 6.5, 60 h. 5 596 U/mL CGTase activity was achieved using submerged fermentation. The CGTase activity remained stabilization at the temperature 30~50 ℃. After stevioside (20 mg/mL) was incubated 48 h with 1 119 U/mL CGTase under the condition of 50 ℃, 180 r/min, pH 6.5, the ratio of RA/SS increase from 0.45 to 0.53.

**Key words:** cyclomaltodextrin glucanotransferase; stevioside; rebaudioside; 16S rRNA; *Bacillus subtilis*

收稿日期:2007-10-12.

基金项目:国家 973 计划项目(2003CB716004).

作者简介:胡静(1983-),女,安徽广德人,应用微生物专业硕士研究生.

\*通讯作者:陈育如(1965-),男,江西丰城人,工学博士,副教授,主要从事应用微生物方面的研究. Email: chen-uru@njnu.edu.cn

甜菊甙是一种从多年生菊科植物甜叶菊(*Stevia rebaudiana Bertonii*)中提取出来的一种强甜味成分<sup>[1]</sup>,主要由甜菊甙(简称SS)、莱鲍迪甙A(简称RA)等8种甙类糖组成,总称甜菊总甙,其中以甜菊甙(SS)的含量最高<sup>[2]</sup>,甜菊甙因其有后苦味道而影响味质,而含量仅居其次的莱鲍迪甙A(RA)仅与SS相差一个葡萄糖基,见图1,可以通过环糊精葡萄糖基转移酶(CGTase)将SS转化为RA<sup>[3-4]</sup>。

在产环糊精葡萄糖基转移酶的微生物中,以芽

孢杆菌的研究最为活跃<sup>[5-7]</sup>,主要有软腐芽孢杆菌(*Bacillus macerans*),嗜热芽孢杆菌(*Bacillus thermophilus*),巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterum*)和嗜碱芽孢杆菌(*Bacillus alkalophilic*)等,其中已用于工业化生产的主要有软腐芽孢杆菌和嗜碱芽孢杆菌<sup>[8-11]</sup>。作者在进行批量菌株筛选的基础上,选育了一株高产环糊精葡萄糖基转移酶(CGTase)的芽孢杆菌,并对其培养及产酶特性进行了研究。

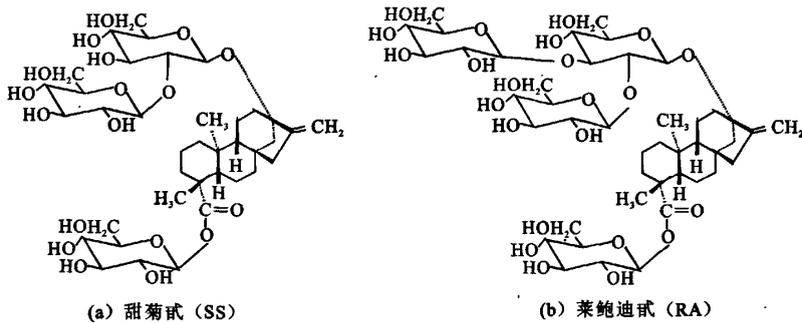


图1 甜菊甙(SS)与莱鲍迪甙A(RA)分子结构  
Fig.1 Chemical structure of stevioside and Rebaudioside A

## 1 菌株与培养基

### 1.1 菌株

芽孢杆菌 Sx, Xb, Nx, Nx2, Bl, Yxb, Jx, 902, 903, Xy, X6, 作者所在实验室分离、选育与保存。

### 1.2 培养基

斜面保藏培养基:可溶性淀粉 1 g/dL, 蛋白胨 0.5 g/dL, 酵母膏 0.5 g/dL, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1 g/dL, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.02 g/dL, 琼脂 2 g/dL; pH 7.0。

发酵基础培养基:玉米淀粉 1 g/dL, 蛋白胨 0.5 g/dL, 酵母膏 0.5 g/dL, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1 g/dL, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.02 g/dL; pH 7.0。

## 2 材料与方法

### 2.1 材料

2.1.1 甜菊甙(SS>50%) 由赣州菊隆高科技有限公司提供。

2.1.2 细菌通用引物 细菌通用引物 K1, K2; 南京金思特科技有限公司提供; 试剂盒 K713; 上海申能博彩生物科技有限公司提供。

### 2.2 方法

2.2.1 菌种鉴定 经传代培养基培养 15 h 的菌液用 K713 细菌试剂盒提取 DNA。用于 16S rRNA

基因扩增的细菌通用引物为 K1: 5'-aactgaagagt-ttgatcctgctc-3', K2: 5'-tacggttacctgttagactt-3', 分别位于大肠杆菌 16S rDNA 的 2~25 nt 和 1479~1500 nt。

PCR 反应体系 (50 μL): 10×PCR 缓冲液 5 μL, dNTP (5 mmol/L) 1 μL, 10 μmol/L 引物 ITS4 和 ITS5 各 1 μL, 模板 DNA 2 μL (20 ng), Taq 酶 1.5 U, 加水补至 50 μL。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 5 min 后, 94℃ 变性 1 min, 59℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 共 30 个循环, 72℃ 延伸 10 min。

2.2.2 酶液制备 250 mL 的三角瓶装产酶培养基 50 mL, 接种后于 30℃, 220 r/min 恒温振荡培养, 定时取样 1 mL, 6000 r/min 离心 10 min, 上清液为粗酶液。

2.2.3 CGTase 酶活性测定 取 10 μL 适当稀释的酶液, 加入 0.2 mol/L 甘氨酸-NaOH-NaCl 缓冲液 (pH 9.0) 0.2 mL, 再加入马铃薯淀粉液 0.2 mL, 振荡, 于 40℃ 水浴 10 min, 立即加入 0.5 ml/L 醋酸 0.5 mL 终止反应, 然后加入 0.005% 碘液显色<sup>[12]</sup>。同时以蒸馏水为空白, 以不加酶液为对照, 在 700 nm 波长下测定吸光度 (OD), 一个酶活性单位定义为使吸光度下降 10% 的酶量。按下式计算:

$$\text{一个酶活性单位 (U/mL)} = (a-b)/a \times 1000 \times$$

酶液稀释倍数

式中:*a* 为对照的吸光度,*b* 为样品的吸光度。

**2.2.4 CGTase 酶的转化** 取甜菊甙与可溶性淀粉溶液各 20 mL 混合,用缓冲溶液调至 pH 6.5,加入发酵后经离心去除菌体的酶液 10 mL(此时 CGTase 酶活力测定为 5 536 U/mL,甜菊甙质量浓度为 20 mg/mL),50 °C 下 180 r/min 转化 48 h。转化结束后,取 1 mL 反应液加入 4 mL 乙醇,振荡 5 min,放置 2 min 后过滤除去不溶性的剩余淀粉及糊精等,用于 HPLC 检测<sup>[13]</sup>。

**2.2.5 甜菊甙的检测** Agilent 1100 高效液相色谱仪,Kromasil-NH<sub>2</sub> (4.6 mm × 250 mm) 色谱柱,紫外检测波长 210 nm,流动相为体积分数 80% 的乙腈水溶液,流速为 1.0 mL/min。

3 仪器与设备

CA-1390-1 垂直层流洁净工作台,上海净化设备有限公司制造;GNP-9080 隔水式恒温培养箱:上海精宏实验设备有限公司制造;HD-930 型组合式全温摇床:江苏太仓市博莱特实验仪器厂制造;ES-315 高压蒸汽灭菌锅:日本 TOMY 公司制造;UV-9200 型紫外可见分光光度计:北京瑞利分析仪器公司制造;FA1004 电子分析天平:上海天平仪器厂制造;HH-2 数显恒温水浴锅:常州国华实验仪器厂制造;Agilent 1100 高效液相色谱仪:Agilent 公司制造;日立 H600 型透射电镜:日本 Hitachi 公司制造。

4 结果与讨论

4.1 产酶菌株的筛选

**4.1.1 CGTase 酶活的测定** 在前期工作的基础上选育了一批芽孢杆菌,在初步筛选的基础上将选择出的 Sx, Xb, Nx, Nx2, Bl, Yxb, Jx, 902, 903, Xy, X 各菌株在含淀粉的鉴别培养基上选育,根据所产生透明圈的大小,再筛选出 4 株产酶能力高的芽孢杆菌: Sx, Nx2, Jx, 903, 将该 4 株菌接种到产酶培养基中培养,定时取样测定 CGTase 酶活性,结果见表 1。

表 1 4 株芽孢杆菌产 CGTase 酶的活性

Tab.1 CGTase activities of four *Bacillus sp.* strains

菌种	CGTase 酶活力/(U/mL)	
	24 h	48 h
Sx	543	3 983
Nx2	732	2 896
903	388	1 226
Jx32	360	3 174

由表 1 可见,这 4 株芽孢杆菌均有产 CGTase 酶的能力,其中以 Sx 菌株的培养速度最快,产酶活性最高,经涂片观察,SX 菌体呈长杆状。在淀粉培养基上培养时的菌落颜色为米黄色,菌落较小,表面具褶皱。Sx 菌株在透射电镜下的细胞形态见图 2。

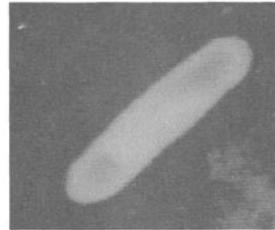


图 2 芽孢杆菌 Sx (×6000) 形态特征

Fig.2 Morphological characteristics of *Bacillus Sx*

鉴于 Sx 菌株的产酶能力最好,后续实验以 Sx 菌株作为研究对象并对其进行 16S rRNA 鉴定。

**4.1.2 16S rRNA 序列分析及其系统发育** 经测序得到 Sx 菌株 16S rRNA 序列长度为 1 407 bp, GenBank 上比对结果表明,该菌与枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 序列同源性达到 99%。由 N-J 系统发育树(见图 3)可见,该菌(Sx)与枯草芽孢杆菌汇聚成同一分支。

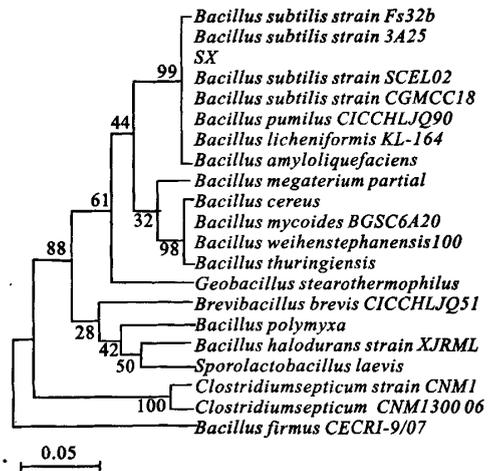


图 3 芽孢杆菌属部分菌株基于 16SrRNA 序列的 N-J 系统发育树

Fig.3 Neighbour-Joining tree based on internal transcription sequence some *Bacillus* strains

从 GenBank 中调取 4 株枯草芽孢杆菌和芽孢杆菌属的 16 个其他种的 16s rRNA 序列用于构建系统发育树。该菌与 4 株枯草芽孢杆菌汇聚成同一分支,结合菌株生理生化分析、菌体及菌落形态分析,鉴定该菌为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。

## 4.2 菌株产酶特性

**4.2.1 菌株的产酶** 环糊精葡萄糖基转移酶(CGTase)能将淀粉或环糊精的葡萄糖基经转葡萄糖作用转移给其它糖元,因此可用它催化淀粉或环状糊精在甜菊甙(SS)的糖基上引入新糖元<sup>[14-15]</sup>,达到将甜菊甙进行味质改性的目的。

将 Sx 菌株接种到以玉米淀粉为碳源的培养基中培养,定时取样测定 CGTase 酶活性,结果见图 4。

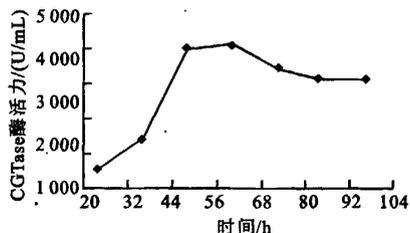


图4 Sx 菌株的产酶能力随时间的变化曲线

Fig. 4 Time course of CGTase production by *Bacillus subtilis* Sx

由图 4 可知,芽孢杆菌 Sx 在培养 24 h 后即有 CGTase 酶的活性,在 60 h 之前酶活快速上升,在 60 h 处产酶水平达到高峰(4 152 U/mL)。之后酶活性有所下降,但在此后的 24 h 内仍能稳定在 3 000~3 500 U/mL 左右,说明该菌所产酶的稳定性较高。

目前,国内外有关产 CGTase 酶的菌种大多为嗜碱芽孢杆菌,产酶水平大多在 2 000~4 000 U/mL<sup>[16]</sup>。曹新志等用紫外线诱变等得到的高产菌株 7-12,经摇瓶发酵 40 h 后,产酶活力为 5 400 U/mL。在 10 L 罐发酵时酶活性可达 5 820 U/mL<sup>[17]</sup>。作者选育菌株在初步实验中的产酶达到 4 152 U/mL,因此有较大的潜力。

**4.2.2 碳源对菌株产酶的影响** 在发酵基础培养基的基础上,分别以可溶性淀粉、马铃薯淀粉、玉米淀粉以及葡萄糖、蔗糖、糖蜜为碳源,接种 Sx 菌株培养 60 h,取样测定菌量及酶活性,结果见表 2。

表2 不同碳源对 Sx 菌株产酶的影响

Tab. 2 Effect of the carbon source on the CGTase activity of Sx strain

碳源	CGTase 活力/(U/mL)	菌量/( $\times 10^8$ 个/mL)
可溶性淀粉	3 639	31.52
马铃薯淀粉	464	4.86
玉米淀粉	4 152	40.60
葡萄糖	3 904	28.23
蔗糖	4 106	27.62
糖蜜	4 024	32.23

由表 2 可知,碳源对 Sx 的产酶能力有显著的影响。培养 60 h 后,以玉米淀粉、蔗糖和糖蜜为碳源培养时得到的酶活性较高。糖蜜是一种成本较低的碳源,在资源丰富的地区可以考虑使用。

**4.2.3 氮源对菌株产酶的影响** 在发酵基础培养基的基础上,分别以 2 g/dL 的蛋白胨、酵母膏、黄豆粉、玉米浆、豆粕粉、鱼粉为氮源,接种 Sx 菌株培养 60 h 后测定菌量及酶活性,结果见表 3。

由表 3 可见,以豆粕粉为氮源时,菌株的产酶能力最高。而用硫酸铵和尿素作为氮源时,则产酶量大为减少,因此后续实验以豆粕粉为氮源。

表3 不同氮源对菌株产酶的影响

Tab. 3 Effect of the different nitrogen source on the production of CGTase

碳源	CGTase 活力/(U/mL)	菌量/( $\times 10^8$ 个/mL)
蛋白胨	901	12.75
酵母膏	2 015	17.65
豆粕粉	4 201	30.75
玉米浆	690	15.05
硫酸铵	371	2.89
尿素	97	0.02

**4.2.4 温度对菌株产酶的影响** 在发酵基础培养基的基础上,以 1 g/dL 的玉米淀粉和 2 g/dL 的豆粕粉为碳源和氮源,接种 Sx 菌株,在 25, 30, 35, 40 °C 下培养,60 h 后取样测定酶活力,结果见表 4。

表4 温度对菌株产酶的影响

Tab. 4 Effect of temperature on CGTase activity of Sx

温度/°C	CGTase 活力/(U/mL)
25	4 764
30	5 233
35	3 490
40	2 163

由表 4 可见,菌株 Sx 在 30 °C 条件下培养,酶活性最高,达 5 233 U/mL。随着温度的升高,酶活力下降明显,在 40 °C 时的酶活性降至 2 163 U/mL,说明温度过高对产酶不利,后续培养均在 30 °C 进行。

**4.2.5 初始 pH 值对菌株产酶的影响** 在发酵基础培养基的基础上,以 1 g/dL 的玉米淀粉和 2 g/dL 的豆粕粉为碳源和氮源,将菌株在不同初始 pH 值的培养基中培养,以上述适宜的碳、氮源及培养温度下发酵 60 h,取样测定酶活力,结果见表 5。

表5 初始 pH 值对菌株产酶的影响

Tab.5 Effect of pH on CGTase activity of strain Sx

pH 值	CGTase 活力/(U/mL)
5.5	3 665
6.5	5 596
8.0	4 207
9.0	2 846

由表5可见,当培养基初始 pH 值为 6.5 时,所产 CGTase 酶的活性最高,为 5 596 U/mL。

#### 4.3 菌株所产 CGTase 酶的特性

**4.3.1 温度稳定性** 为考察该菌所产 CGTase 酶在不同温度下的稳定性,将其所产酶液在不同温度下保温 30 min,测定剩余酶活性,结果见图 5。

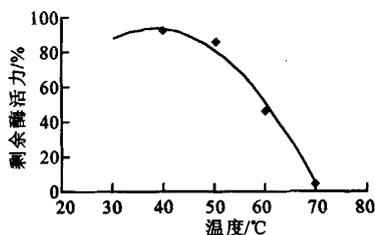


图5 温度对酶稳定性的影响

Fig.5 Effect of temperature on CGTase stability

由图5可见,该菌所产 CGTase 酶在 30~50 °C 的温度范围内基本保持稳定,温度继续升高时,酶活力下降较快。

**4.3.2 pH 值对 CGTase 酶活性的影响** 将酶液在不同 pH 值的缓冲液中于 40 °C 保温 30 min,测定剩余酶活性,结果见图 6。

由图6可知,CGTase 在 pH 5.5~9.0 的较宽范围内都较稳定,说明 CGTase 对 pH 值适应范围较广,因此应用有较大的灵活性。

#### 4.4 CGTase 酶对底物的转化

对转化液取样进行 HPLC 分析,甜菊甙溶液中的 RA/SS 比值从转化前的 0.45 上升为 0.53,提高

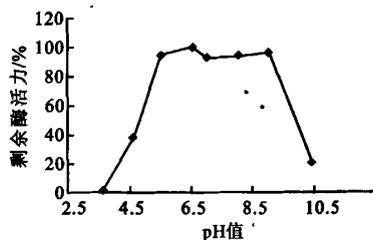


图6 pH 值对酶活力的影响

Fig.6 Effect of pH on CGTase stability

了 17%,说明酶液对溶液中 RA 的比例的增加有促进作用。史作清等用南开大学合成科技发展公司提供的葡萄糖基转移酶 GT-1 催化甜菊糖的转化,以高 SS 含量的甜菊糖为转化底物,在 pH 6.5,温度 55 °C,转速为 200 r/min 的条件下催化 12 h,在酶活力相近的情况下,RA/SS 的比值可以从转化前的 0.29 上升至转化后的 1.06<sup>[13]</sup>。本研究中芽孢杆菌 Sx 所产的 CGTase 酶可能由于未经纯化以及所用底物为高 RA 含量的甜菊糖,因此转化率有待提高。

## 5 结 语

1) 结合菌体及菌落的形态特征、经 16S rRNA 鉴定和系统发育树分析,鉴定本工作筛选的高产 CGTase 酶的芽孢杆菌 Sx 菌株为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。

2) 在 1 g/dL 玉米淀粉,2 g/dL 豆粕粉,30 °C, pH 6.5,发酵 60 h 的条件下,该菌产 CGTase 酶的量可达 5 596 U/mL,培养条件简单,可以在自然 pH 值的条件下进行。

3) 所产 CGTase 酶在 30~50 °C, pH 5.5~9.0 的范围内基本保持稳定的活性,温度高于 50 °C 时,酶活力下降明显。

4) 经 50 °C,180 r/min, pH 6.5 下转化 48 h,甜菊甙溶液中的 RA/SS 比值从转化前的 0.45 上升为 0.53。

## 参考文献(References):

- [1] 葛文光,高福成,于秋生. 甜菊甙研制中改进絮凝研究工艺的研究[J]. 无锡轻工大学学报,1987,6(3):10-17.  
GE Wen-guang, GAO Fu-cheng, YU Qiu-sheng. A study of flocculation technology in the isolation of stevioside[J]. *Journal of Wuxi University of Light Industry*, 1987,6(3):10-17. (in Chinese)
- [2] Eriko K, Norfumi S, Yuji O. et al. Absorption and metabolism of glycosidic sweeteners of stevia mixture and their aglycone, steviol, in rats and humans[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2003, 41: 875-883.
- [3] Kochikyan T, Markosyan A A, Abelyan L A. et al. Combined enzymatic modification of stevioside and rebaudioside A [J]. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2006, 42(1): 31-37.

- [4] 曹新志, 金征宇. 环糊精糖基转移酶(CGTase)的化学修饰[J]. 食品科学, 2004, 25(12):64-68.  
CAO Xing-zhi, JIN Zheng-yu. Study on effects of protein modification reagents on CGTase[J]. *Food Science*, 2004, 25(12):64-68. (in Chinese)
- [5] QI Qing-sheng, SHE Xiao-yan, Endo T, et al. Effect of the reaction temperature on the transglycosylation reactions catalyzed by the cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus macerans* for the synthesis of large-ring cyclodextrins[J]. *Tetrahedron*, 2004, 60:799-806.
- [6] Kazumi F, Kazue T, Yasuko M. et al. A novel cyclic isomaltooligosaccharide (cycloisomaltodecaose, CI-10) produced by *Bacillus circulans* T-3040 displays remarkable inclusion ability compared with cyclodextrins[J]. *Journal of Biotechnology*, 2007, 130:188-192.
- [7] Paulo W, Tardioli, Gisella M. et al. Characterization of *Thermoanaerobacter* cyclomaltodextrin glucano-transferase immobilized on glyoxylagarose[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 39: 1270-1278.
- [8] Vassileva A, Burhan N, Bechkov V, et al. Cyclodextrin glucanotransferase production by free and agar gelimmobilized cells of *Bacillus circulans* ATCC 21783[J]. *Process Biochemistry*, 2003, 38: 1585-1591.
- [9] 王雁萍, 谈重芳, 梁秋霞, 等. 应用 02-5-71 菌株葡萄糖基转移酶制备  $\beta$ -糊精的研究[J]. 郑州工程学院学报, 2003, 24(4): 52-55.  
WANG Yan-ping, TAN Chong-fang, LIANG Qiu-xia, et al. Preparation of  $\beta$ -cyclodextrin using glucano-transferase produced by 02-5-71 strain[J]. *Journal of Zhengzhou Institute of Technol.*, 2003, 24(4): 52-55. (in Chinese)
- [10] Roshanida A R, Rosli M I, Mohd G M N, et al. Optimisation of growth medium for the production of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus* HR1 using response surface methodology[J]. *Process Biochemistry*, 2004, 39: 2053-2060.
- [11] Ablyan V A, Balayan A M, Ghochikyan V T. et. al. Transglycosylation of stevioside by cyclodextrin glucanotransferases of various groups of microorganisms[J]. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2004, 40(2): 129-134.
- [12] 段宇珩, 王雁萍, 秦广雍, 等. 离子束诱变产生的 CGTase 高产菌株发酵规律研究[J]. 河南农业科学, 2005(5): 15-17.  
DUAN Yu-heng, WANG Yan-ping, QIN Guang-yong, et al. Studies on ferment rule of the cyclodextrin glucanotransferase high-performance strain mutated by ion beam[J]. *Journal Agricultural Sciences*, 2005(5): 15-17. (in Chinese)
- [13] 史作清, 朱伯儒, 施荣富, 等.  $\alpha$ -葡萄糖基-甜菊甙的酶促合成反应研究(1)[J]. 高等学校化学学报. 1996, 17(11):1800-1803.  
SHI Zuo-qing, ZHU Bo-ru, SHI Rong-fu, et al. Synthesis of  $\alpha$ -glycosyl-stevia-sugar catalyzed by glycosyltransferase(I) [J]. *Chemical Research in Chinese University*, 1996, 17(11):1800-1803. (in Chinese)
- [14] 朱海霞, 郑健仙. 甜菊糖的酶法改性[J]. 中国食品添加剂, 2004(1): 54-60.  
Zhu Hai-xia, ZHENG Jian-xian. Enzymatic Modification of Stevia Sugar[J]. *China Food Additives*, 2004(1): 54-60. (in Chinese)
- [15] 朱伯儒, 史作清, 何炳林. 环糊精葡萄糖基转移酶的性质、应用与固定化研究进展[J]. 氨基酸和生物资源, 1997, 19(1):36-39.  
ZHU Boru, SHI Zuo-qing, He Bing-lin. The progress in the study on the property, applications and immobilization of cyclodextrin glycosyltransferase[J]. *Amino Acids & Boitic Resources*, 1997, 19(1):36-39. (in Chinese)
- [16] 王雁萍, 谈重芳, 段宇珩, 等. *Bacillus sp.* HA-1 产环糊精葡萄糖基转移酶发酵工艺研究[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(2):12-15.  
WANG Yan-ping, TAN Zhong-fang, DUAN Yu-heng. et al. Studies on zymotechnique of cyclodextrin glucanotransferase by *Bacillus sp.* HA-1[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2006, 32(2):12-15. (in Chinese)
- [17] 曹新志, 金征宇. 嗜碱芽孢杆菌产环糊精葡萄糖基转移酶发酵条件的优化[J]. 食品科学, 2005, 26(2):122-126.  
CAO Xin-zhi, JIN Zheng-yu. Optimization study on cyclodextrin glycosyltransferase production by *Bacillus alkalophilus* [J]. *Food Science*, 2005, 26(2):122-126. (in Chinese)

(责任编辑:李春丽)