

# 一株产环糊精葡萄糖基转移酶的地衣芽孢杆菌 的选育、产酶条件及酶学特性

陈龙然<sup>1</sup> 袁康培<sup>1\*</sup> 冯明光<sup>1</sup> 王雅芬<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 浙江大学微生物研究所 杭州 310029)

(<sup>2</sup> 浙江工商大学食品与生物工程学院 杭州 310035)

**摘 要** :从土壤分离物中筛选到一株环糊精葡萄糖基转移酶(CGTase)产生菌 403,96h 发酵酶活为 0.95U/mL。经紫外辐射和硫酸二乙酯复合诱变而获得突变株 CLS403,96h 发酵酶活达 1.36 U/mL,提高 43%。该突变菌株被鉴定为地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)。产 CGTase 的最佳碳源为可溶性淀粉,最佳氮源为硝酸铵,最适初始 pH 为 6.5,最适培养温度为 35℃,发酵期间 CGTase 的产生高峰(第 96h)滞后于菌体生物量高峰(第 48h)2d。菌株所产 CGTase 的最适反应 pH 为 6.0,最适温度为 55℃,在 pH 6.0~7.5 间和 50℃下保持 1h 后的剩余酶活均达 90%以上,酶液中适量添加 Ca<sup>2+</sup> 能大幅提高 CGTase 在 55℃下的稳定性。经高效液相色谱分析,CGTase 作用于淀粉后的产物以  $\alpha$ -环糊精为主, $\beta$ -环糊精为次,二者比例为 2.47:1,环糊精总产率达 29.8%,但产物中不含  $\gamma$ -环糊精。

**关键词** 地衣芽孢杆菌 菌种选育 环糊精葡萄糖基转移酶 酶学特性

中图分类号:Q936 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2005)01-0097-05

环糊精(Cyclomaltodextrin, CD)是由 D-吡喃葡萄糖基以  $\alpha$ -1,4 葡萄糖苷键连接而成的环形低聚糖,因环连的葡萄糖基数的不同而分为  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -环糊精(葡萄糖基数分别为 6、7、8 个)。环糊精可将许多化学物质包结在其环形疏水空隙内,改善其理化性质,在制药、食品、农业及化妆品等领域应用广泛<sup>[1,2]</sup>。

环糊精是由环糊精葡萄糖基转移酶(Cyclomaltodextrin glucanotransferase, CGTase)作用于淀粉后使葡萄糖基发生转移反应而获得,该转移酶能进行环化、偶合、歧化、水解等 4 种反应,酶的催化产物除  $\alpha$ -、 $\beta$ -及  $\gamma$ -环糊精外,还含有葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖及其他线形糊精等多种物质<sup>[3]</sup>。由于环糊精的分离工艺比较复杂,因而寻找到利用淀粉产生特定环糊精的微生物菌株非常重要,这方面的研究多集中在  $\beta$ -环糊精生产菌株上,而有关  $\alpha$ -及  $\gamma$ -环糊精生产菌的研究报道很少<sup>[4]</sup>。本研究自赣中地区土壤中分离筛选到一株以产  $\alpha$ -环糊精为主的菌株 CLS403,通过对其产酶条件、酶学性质等的摸索,为利用该菌株生产  $\alpha$ -环糊精奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 土壤样品 :从江西省中部地区的粮站、变性

淀粉厂、酒厂等附近土壤中采集土样 20 份,从中分离微生物菌种。

**1.1.2 培养基** :菌种分离和筛选用培养基的组成:每升培养基含可溶性淀粉 10g,蛋白胨 5g,酵母膏 5g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.2g, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5g, 酚酞 0.3g, 甲基橙 0.1g, 琼脂 15g, 121℃ 灭菌 15min, 自然 pH。产酶用液体培养基的组成:每升培养基含可溶性淀粉 10g, 蛋白胨 5g, 酵母膏 5g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.2g, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.2g, pH 7.0, 121℃ 灭菌 15min。

**1.1.3 试剂** :标准  $\alpha$ -、 $\beta$ -及  $\gamma$ -环糊精购自 Sigma 公司,可溶性淀粉、玉米淀粉由浙江湖州食品化工联合公司生产;马铃薯淀粉购自中国医药集团上海化学试剂公司;红薯淀粉为自制; $\alpha$ -淀粉酶购自上海丽珠东风生物有限公司;其它化学试剂均为分析纯。

#### 1.2 环状糊精葡萄糖基转移酶产生菌的筛选

取 5g 土样放入 45mL 无菌水的三角瓶中,80℃ 水浴处理 5min,静置 30min,取上清液稀释后涂布于筛选培养基平板上,于 38℃ 恒温培养 120h。选取平板上黄色透明圈较大的菌落作为产生 CGTase 的菌株,进一步用产酶培养基接种进行摇瓶发酵复筛,测定发酵液中 CGTase 的酶活。从中选出酶活最高的菌株作为出发菌株进行紫外辐射及硫酸二乙酯(DES)双重诱变处理<sup>[5]</sup>,诱变后的菌株用上述同样

基金项目 浙江省科技计划项目(2002C22009)

\* 通讯作者。Tel:86-571-86971707; E-mail:yuankp@zju.edu.cn

作者简介 陈龙然(1974-)男,硕士研究生,主要从事微生物酶工程研究。E-mail:chenlongran@zju.edu.cn

收稿日期 2004-06-09,修回日期 2004-09-18

方法进行初筛和复筛,选出酶活最高的菌株。

### 1.3 菌种的鉴定

菌种鉴定的相关试验参考文献[6]进行。

### 1.4 生物量测定

1mL 发酵液中加蒸馏水至 10mL,650nm 波长比浊。

### 1.5 酶液制备

三角瓶(250mL)装产酶培养基 40mL,接种后于 38℃ 恒温振荡培养 96h 后,4000r/min 离心 20min,上清液即为粗酶液。

### 1.6 酶活测定

应用甲基分光光度法,在 pH 1.1~1.4 的酸性条件下,由于甲基橙和  $\alpha$ -环糊精形成包结复合物而使溶液吸光度下降,在一定浓度范围内吸光度下降值( $\Delta A$ )与  $\alpha$ -环糊精浓度之间存在着线性关系<sup>[7]</sup>。取 1%(W/V)可溶性淀粉溶液 1mL 和 50mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  缓冲液(pH 7.0)2mL,与 0.1mL 适当稀释的粗酶液混匀,40℃ 水浴中反应 10min 后,立即冰浴中止反应;再加入 1.2mol/L HCl 溶液 0.1mL 及 0.035mmol/L 甲基橙溶液 2mL,15℃ 静置 30min,在 507nm 下测定吸光度。一个酶活单位定义为在上述条件下每分钟生成  $1\mu\text{mol}$   $\alpha$ -环糊精所需的酶量。

### 1.7 酶的初步纯化

在 20mL 粗酶液中分别加入 2g 变性淀粉和 3g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,8℃ 下振荡 24h,然后 4500r/min 离心 10min,弃上清液,沉淀中加入 5mL 含 1mmol/L  $\alpha$ -环糊精的 50mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  缓冲液(pH 7.0),再低温搅拌 1h 后离心 10min。重复 2 次,共收到 10mL 酶洗脱液,放入 50mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  缓冲液(pH 7.0)中透析即得初步纯化的酶<sup>[8]</sup>,用于以下酶学性质的研究。

### 1.8 酶作用产物分析

采用高效液相色谱法(HPLC)进行酶产物分析。色谱条件:Waters 600HPLC 色谱仪,Waters 自动进样器,色谱柱 ZORBAX  $\text{NH}_2$ (4.6mm  $\times$  150mm),Waters 2410 示差检测器,流动相(V/V)为 70% 乙腈水溶液,流速 1.0mL/min;柱温 30℃。处理样品时,粗酶液 0.5mL 与 5.0%(W/V)淀粉溶液(50mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ ,pH 7.0)5mL 混匀后在 50℃ 反应 24h 后,4500r/min 离心 15min,弃沉淀,上清液中加入 0.1mL  $\alpha$ -淀粉酶液作用 1h,0.45 $\mu\text{m}$  超滤膜过滤后取 20 $\mu\text{L}$  上机分析<sup>[9]</sup>。

## 2 结果和分析

### 2.1 产 CGTase 的菌株筛选

采集的土壤样品经水浴后,涂布在分离培养基平板上培养期间,凡产 CGTase 的菌株在其菌落周围可形成黄色透明的水解圈。这是因为菌株所产的 CGTase 作用于培养基中的淀粉而形成了环糊精,后者分子与甲基橙和酚肽染料反应形成包结复合物,故呈现黄色透明圈。此圈越大,菌株产 CGTase 越多,据此从 20 份土壤样品的分离物中筛选出 115 个产 CGTase 的菌株。对黄色透明圈直径与菌落直径之比较大的菌株进一步分离纯化和点接筛选,挑选出 40 个菌株进行发酵培养。根据发酵液的酶活测定,获得 CGTase 酶活最高(0.95U/mL)的菌株 403,作为后续诱变的出发菌株。

### 2.2 菌种选育

采用紫外辐射和硫酸二乙酯复合诱变方法对 403 菌株进行诱变。选取致死率为 98% 的紫外辐射剂量和致死率为 95% 的硫酸二乙酯剂量,经复合诱变获得其突变株 CLS403,发酵酶活性为 1.36U/mL,为出发菌株酶活的 1.43 倍。菌株 CLS403 在牛肉膏蛋白胨培养基上连续 4 代发酵,测定 CGTase 酶活分别为 1.32U/mL、1.40U/mL、1.37U/mL 和 1.35U/mL,表现出良好的稳定性。

### 2.3 菌种鉴定

菌株 CLS403 在牛肉膏蛋白胨平板培养基上菌落呈圆形,表面光滑,边缘较整齐,半透明,革兰氏阳性,杆状,形成芽孢,芽孢柱状,端生,孢囊未见膨大;过氧化氢酶反应阳性,甲基红反应阳性,产淀粉酶,能使明胶液化,能将硝酸盐还原为亚硝酸盐,不能利用甘油产生二羟基丙酮,石蕊牛奶反应不产酸,水解酪素,酪氨酸水解反应阴性,苯丙氨酸脱氨基反应阴性,可利用柠檬酸盐和丙酸盐,能形成结晶糊精,能在 pH 5.7 的营养肉汤中生长,能在含 7% NaCl 肉汤营养液中生长,最高生长温度 55℃。结合菌株的形态和生理生化特征,根据细菌鉴定手册初步鉴定该菌株为地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)。

### 2.4 不同碳、氮源对菌株 CLS403 产生 CGTase 的影响

在上述培养条件下,在产酶培养基基础上改用不同碳源,浓度均为 1%(W/V),考查不同碳源对菌株 CLS403 产 CGTase 的影响。表 1 结果显示,可溶性淀粉最有利产酶,马铃薯淀粉次之,玉米淀粉再次,甘薯淀粉和糊精作碳源也能产酶,但产酶水平远

低于前述碳源,而葡萄糖、蔗糖、乳糖、甘露醇及柠檬酸钾等则不能作为该菌株产 CGTase 的碳源。同样,改用不同有机氮或无机氮作为唯一氮源,各自含氮量相当于 5g/L 蛋白胨,结果发现硝酸铵作为氮源最有利于菌株产酶,其它较好或较差氮源见表 1,但尿素不能为该菌株产 CGTase 的氮源。

表 1 菌株 CLS403 在不同碳源和氮源条件下所产环糊精葡萄糖基转移酶的活力比较

Table 1 Effect of different carbon and nitrogen sources on the activity of cyclomaltoextrin glucanotransferase produced by the strain CLS403 in liquid cultures			
Carbon source	CGTase activity $\pm$ SD( U/mL )	Nitrogen source	CGTase activity $\pm$ SD( U/mL )
Soluble starch	1.32 $\pm$ 0.04a	Ammonium nitrate	1.55 $\pm$ 0.03a
Potato starch	1.17 $\pm$ 0.03b	Corn meal	1.34 $\pm$ 0.01b
Corn starch	0.94 $\pm$ 0.02c	Peptone	1.28 $\pm$ 0.03bc
Sweet potato starch	0.66 $\pm$ 0.01d	Soya bean cake	1.25 $\pm$ 0.05c
Dextrin	0.17 $\pm$ 0.02e	Fish meal	1.12 $\pm$ 0.01d
Glucose	--	Ammonium sulfate	1.09 $\pm$ 0.02d
Sucrose	--	Casein	0.89 $\pm$ 0.02e
Lactose	--	Urea	--
Mannitol	--		
Citrate kalium	--		
F-test	$F_{4,8} = 4787.8, P < 0.01$	F-test	$F_{6,12} = 187.5, P < 0.01$

Means with different lowercase letters in column differed significantly( Tukey 's HSD ,  $P < 0.05$  ).

2.5 培养温度和初始 pH 值对产酶的影响

在最佳碳源和氮源的基础上,以 0.1mol/L 柠檬酸或氢氧化钠调节培养基初始 pH 4.0 ~ 9.0,培养 96h 后测定酶活。结果显示,初始 pH 5.5 ~ 7.5 有利于菌株 CLS403 产酶,酶活在 pH 6.5 时最高。这说明中偏酸性环境有利于酶分泌。在最佳碳源、氮源和最适产酶 pH 值条件下,在 20 ~ 50℃ 范围恒温振荡培养,结果显示 35 ~ 40℃ 的培养温度有利于菌株产酶,尤以 35℃ 最适该菌株产酶。

2.6 生物量和产酶高峰

在最佳碳、氮源、最适 pH 和发酵温度条件下,40mL 发酵培养液中接入含孢量为 10<sup>8</sup> 个/mL 的种子菌液 1mL,菌株 CLS403 的生物量和酶活动态变化如图 1 所示。生物量高峰出现在液培养第 48h,而后

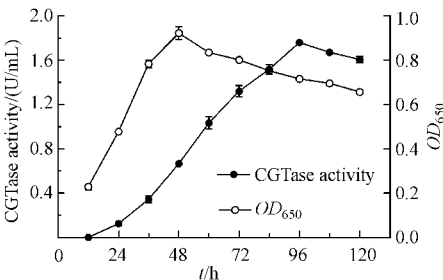


图 1 菌株 CLS403 液培过程中的生物量及其相应 CGTase 酶活变化

Fig.1 Trends in the biomass of the strain CLS403 and CGTase activity during incubation

缓慢下降,部分菌体成粘液状,不易分散,可能影响测定值。CGTase 的产生始于液培第 24h,产酶高峰发生在第 96h,达 1.76U/mL,在此后 24h 期间产酶水平略有下降。在历时 120h 液培过程中,培养液 pH 变化不明显,平均为 6.6  $\pm$  0.3。

2.7 菌株 CLS403 的 CGTase 酶学特性

粗酶液经过( NH<sub>4</sub> )<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 沉淀,淀粉吸附洗脱后所得酶液的比活达 5.72U/mg,而原酶的比活仅为 0.93U/mg,纯化倍数为 6.2,下述酶学特性的研究均用初步纯化后的酶液。

2.7.1 pH 对酶活的影响:在标准反应条件下,在 50mmol/L 不同缓冲液条件下测定酶液的 CGTase 酶活(图 2-A)。在 pH 4.0 ~ 7.0( Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-柠檬酸缓冲液) 7.5 ~ 9.0( Tris-HCl 缓冲液)以及 9.5 ~ 11.0 ( Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub> 缓冲液)范围内,即时酶活最高峰出现在 pH 6.0 处,显示此 pH 最适宜该酶发生作用;此外酶活在 pH 9.5 处还出现一小高峰。将酶液与不同 pH 缓冲液混合,室温放置 1h 后再测定剩余酶活。结果显示该酶在 pH6.0 ~ 7.5 范围内比较稳定,剩余酶活均在 90% 以上。

2.7.2 温度对酶活性的影响:在标准反应条件下,在不同温度下测定酶液的 CGTase 酶活(图 2-B)。结果表明,该酶在 50 ~ 60℃ 范围内的即时酶活较高,最适酶活温度为 55℃。在 pH 为 7.0 的 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 缓冲液中,将酶液在不同温度下保温 1h 后,按常规方法测定剩余酶活,显示该酶在 50℃ 下相当稳定,保温 1h 后的剩余酶活达 90% 以上。

另外,在标准反应条件下,在酶液中加入一定量的 CaCl<sub>2</sub>,使其中的 Ca<sup>2+</sup> 浓度分别为 10mmol/L 和

20mmol/L,55℃ 下保温不同时间后测剩余酶活,用来恒量 Ca<sup>2+</sup> 对酶热稳定性的影响(图 2-C)。显然,Ca<sup>2+</sup> 明显增强 CGTase 酶活的热稳定性,未加 Ca<sup>2+</sup> 的酶液在上述条件下保温 1h 后酶活只剩 30%,而当在高 Ca<sup>2+</sup> 浓度下保温 3h 后剩余酶活还达 80.8%。

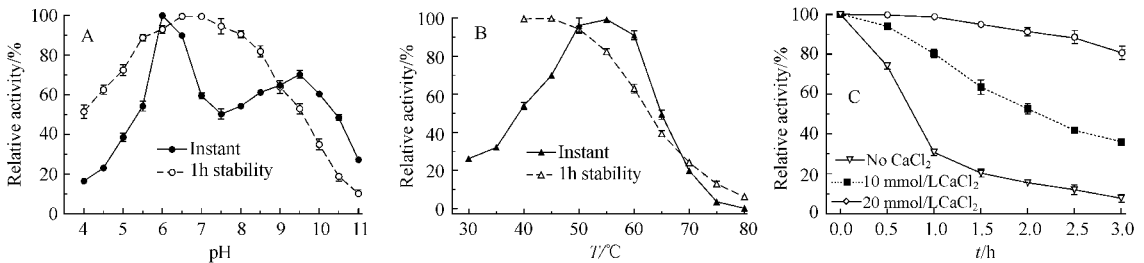


图 2 菌株 CLS403 的 CGTase 酶学特性  
Fig. 2 Characteristics of the strain CLS403 CGTase

A : Instant and 1h activity at varying pH ; B : Instant and 1h activity at varying temperature ; C : Effect of varying Ca<sup>2+</sup> concentrations on the activity.

2.8 CGTase 作用淀粉后的水解产物

以 70% 乙腈 (V/V) 水溶液为流动相,地衣芽孢杆菌 CLS403 菌株的 CGTase 粗酶液能够将不同类型淀粉中混合的环糊精有效地分离出来。在高效液相色谱分析中, $\alpha$ -环糊精的保留时间为 17.587min,而  $\beta$ -环糊精的保留时间为 23.994min,二者差距较大,区分明显(图 3)。酶作用于淀粉后只产生  $\alpha$ -和  $\beta$ -环糊精,未见  $\gamma$ -环糊精产生。所产  $\alpha$ -及  $\beta$ -环糊精的含量及总的环糊精产率在不同类型淀粉之间有所不同(表 2)。作用于可溶性淀粉时, $\alpha$ -与  $\beta$ -环糊精比例为 2.47,而作用于马铃薯淀粉时,环糊精总产率达 29.8%。

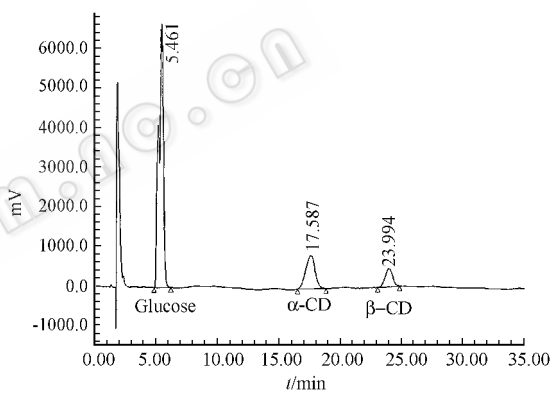


图 3 CLS403 菌株 CGTase 反应产物高效液相图谱  
Fig. 3 HPLC chromatography of the products from the reaction of the strain CLS403 CGTase

表 2 菌株 CLS403 利用不同淀粉产生的环糊精比较

Starch solution (5% W/V)	( $\alpha$ -CD)		( $\beta$ -CD)		Ratio of $\alpha$ -CD over $\beta$ -CD	CD yield/%
	Peak area	Concentration( mg/mL )	Peak area	Concentration( mg/mL )		
Soluble starch	1434314	10.32	437662	4.18	2.47	29.0
Corn starch	1191092	8.57	434521	4.15	2.10	27.4
Potato starch	1405128	10.11	512002	4.79	2.11	29.8
Sweet potato starch	1049329	7.55	347392	3.25	2.32	26.0

3 讨论

据现有研究报道<sup>[10,11]</sup>,多种细菌可产生 CGTase,但多数菌种的 CGTase 作用淀粉后产生  $\alpha$ -、 $\beta$ -和  $\gamma$ -环糊精的混合物,不同来源的 CGTase 所产 3 种环糊精的比例差别较大,但多以  $\beta$ -环糊精为主。CGTase 的酶活评价,国内学者主要考查酶的糊精化活性,即用碘色法测定底物的消耗,而较少从其环化

活性出发,往往造成许多偏差,原因是所消耗淀粉并非全部形成环糊精,当酶液不纯,尤含有  $\alpha$ -淀粉酶时将引起更大误差。本文从 CGTase 的环化活性出发,用甲基分光光度法直接测量环糊精含量,能较直观地评价其活性高低。研究中诱变获得的地衣芽孢杆菌 CLS403 菌株所产的 CGTase 可利用多种常见淀粉后生成环糊精,其中以  $\alpha$ -环糊精为主,无  $\gamma$ -环糊精生成,这为利用该菌株生产  $\alpha$ -环糊精的后续研究奠

定了良好基础。虽然菌株 CLS403 所产 CGTase 的酶活和最近 Mori 等<sup>[12]</sup>报道的 *Brevibacterium* sp. No. 9605 酶活有些差距,但前者所产的 CGTase 热稳定性明显高于后者。比较而言,CLS403 菌株产酶活性较高,酶作用淀粉后只产生  $\alpha$  和  $\beta$  两种环糊精,且以  $\alpha$ -环糊精为主,使  $\alpha$ -环糊精的分离相对较为容易,因而具有较大开发应用潜力。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Bender H. Production, characterization and application of cyclodextrins. *Adv Biotechnol Process*, 1986, **6**: 31 – 71.
- [ 2 ] Horikoshi K. Production and industrial applications of beta cyclodextrin. *Process Biochem*, 1979, **14**: 26 – 30.
- [ 3 ] Schmid G. Cyclodextrin glycosyltransferase production: yield enhancement by overexpression of cloned genes. *Trends Biotechnol*, 1989, **7**: 244 – 248.
- [ 4 ] Starnes R. Industrial potential of cyclodextrin glycosyl transe. *Cereal Food World*, 1990, **35**: 1094 – 1099.
- [ 5 ] 钱存柔,黄仪秀. 微生物学实验教程. 北京:北京大学出版社,1999.

- [ 6 ] Buchanan R E, Gibbons N E. 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组译. 伯杰细菌鉴定手册. 第八版. 北京:科学出版社,1984.
- [ 7 ] Lejuene A, Sakaguchi K, Imanaka T. A spectrophotometric assay for the cyclization activity of cyclomaltohexaose (  $\alpha$ -cyclodextrin ) glucanotransferase. *Anal Biochem*, 1989, **181**: 6 – 11.
- [ 8 ] Rita F, Martins R. A new cyclodextrin glycosyltransferase from an alkaliphilic *Bacillus agaradhaerens* isolate: purification and characterization. *Enzyme Microb Technol*, 2002, **30**: 116 – 124.
- [ 9 ] Sato M, Yagi Y, Ishikura T. Determination of CGTase from *Bacillus ohbensis* and its option pH using HPLC. *Agr Biol Chem*, 1995, **49**: 1189 – 1191.
- [ 10 ] Akimaru K, Yamamoto S. Purification and properties of *Bacillus coagulans* cyclomaltoextrin glucanotransferase. *J Ferm Bioeng*, 1997, **71**: 322 – 328.
- [ 11 ] Tomita K, Kaneda M. Purification and properties of a cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus autolyticus* 11149 and selective formation of cyclodextrin. *J Ferm Bioeng*, 1993, **75**: 89 – 92.
- [ 12 ] Mori S, Hirose S, Oya T, *et al.* Purification and properties of cyclodextrin glucanotransferase from *Brevibacterium* sp. No. 9605. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2002, **58**: 1968 – 1972.

## Breeding, optimized fermentation and enzymatic properties of a *Bacillus licheniformis* mutant producing cyclomaltoextrin glucanotransferase

CHEN Long-ran<sup>1</sup> YUAN Kang-pei<sup>1\*</sup> FENG Ming-guang<sup>1</sup> WANG Ya-fen<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Microbiology, College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China )

(<sup>2</sup> School of Food Science and Bio-engineering, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310035, China )

**Abstract**: A bacterial strain 403 selected from various soil was found to produce cyclomaltoextrin glucanotransferase (CGTase) with an activity of 0.95 U/mL after 96h submerged incubation. A mutant, *Bacillus licheniformis* CLS403, obtained by means of ultraviolet radiation and diethyl sulfate, enhanced CGTase production by 43%(1.36U/mL). The optimized conditions for CGTase production of mutant were soluble starch as carbon source, ammonium nitrate as nitrogen source, 35°C and pH6.5 for incubation. Under these conditions, the production of CGTase by the mutant in submerged peaked at the period of 96h incubation, two days later than bacterial biomass peak. The resultant CGTase reacted best at 55°C and pH 6.0, and had activities > 90% after 1h maintenance at 50°C with pH 6.0 ~ 7.5. Addition of Ca<sup>2+</sup> in the reaction largely enhanced stability of the CGTase activity at 55°C. Based on HPLC analysis, the products of starch hydrolyzed by the CGTase of *B. licheniformis* CLS403 included much more  $\alpha$ -cyclodextrin than  $\beta$ -cyclodextrin but no  $\gamma$ -cyclodextrin. The total yield of cyclodextrin from starch reached 29.8% with the ratio of the two cyclodextrins 2.47:1.

**Key words**: *Bacillus licheniformis*, Breeding, Cyclomaltoextrin glucanotransferase, Enzymatic properties

Foundation item: Zhejiang Science and Technology Program( 2002C22009 )

\* Corresponding author. Tel: 86-571-86971707; E-mail: yuankp@zju.edu.cn

Received date: 06-09-2004