

酱油发酵过程中的耐盐乳酸菌筛选 及对低盐固态酱油品质的影响

赵国忠,王梦颖,姚云平,韩俊燕,陈卫*

(江南大学食品学院,食品科学与技术国家重点实验室,江苏无锡 214122)

摘要:本文通过对酱醪中耐盐乳酸菌的筛选,成功分离出一株耐 18% 盐度的乳酸菌,经过 16S rDNA 测序鉴定,确定为一株植物乳杆菌。在酱油酿造过程中添加该耐盐植物乳杆菌,无盐固形物、氨基酸态氮、还原糖和总酸含量等理化指标都有所上升。经过液相测定,发现酱油中乳酸含量比空白增加 2 倍左右。挥发性风味物质中酮类和酚类物质增加 2 倍左右,醇类物质稍有增加。本研究为进一步安全有效提高酱油风味物质奠定理论依据。

关键词:酱油,乳酸菌,筛选,发酵

Screening of salt tolerant lactic acid bacteria in soy sauce fermentation and its effect on the quality of soy sauce

ZHAO Guo-zhong, WANG Meng-ying, YAO Yun-ping, HAN Jun-yan, CHEN Wei*

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Salt-tolerant lactic acid bacteria were screened from the fermented soy sauce paste in this study. One kind of lactic acid bacteria grew normally in the solution of 18% salt. 16S rDNA of this strain was sequenced and identified as a *Lactobacillus plantarum* finally. The physical indicators of soy sauce which fermented by adding the salt-tolerant *Lactobacillus plantarum* were better than the control, such as the non-salt soluble solids, amino acid nitrogen, reducing sugar and total acid. In addition, the content of lactic acid was increased about two times than the control by HPLC. The ketone and phenol volatile flavor compounds were increased about two times, and alcohols increased slightly. The research in this paper laid a theoretical basis in order to improve the flavors and safety of soy sauce.

Key words: soy sauce; lactic acid bacteria; screening; fermentation

中图分类号: TS264.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)13-0184-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.13.030

酱油是一种日常调味品,被人们广泛用于烹饪各种美食,酱油中的风味物质直接对美食的口感产生影响。风味物质的形成与发酵菌株代谢息息相关,这些菌株产生的酶以催化剂的形式促进物质的分解和转化^[1]。低盐固态发酵工艺的优势是成本低、周期短^[2],它是适合我国特殊国情的产物,新中国成立以后,我国粮食资源短缺,为了节约粮食且更快地把产品投入到市场,采用了豆粕和麸皮在短时间内酿造酱油,称为低盐固态酱油。解决了我国粮食副产物再利用和酱油需求量大的实际问题。

在酱油低盐固态发酵过程中,大曲发酵阶段主要由米曲霉、酱油曲霉等微生物产生各种胞外酶,包括分解寡糖和多肽的酶,将淀粉和蛋白质原料分解

为小分子物质,从而制成酱油大曲。后期发酵过程中添加浓度为 10% (含水量:约 50%) 的盐水,45℃ 发酵 10d,35℃ 发酵 20d,周期一共 30d^[3]。向酱油大曲中添加盐水后,耐盐酵母和乳酸菌在厌氧条件下发酵,消耗剩余的糖和氨基酸。各种醇类和酸类物质在特殊的酶的催化作用下,合成酯香味物质,对酱油风味有更独特的贡献。酮、醛和氨基酸也参与一些通过美拉德反应产生香味化合物的生成过程^[4]。酵母菌和乳酸菌的厌氧发酵也发挥着不可磨灭的作用。

随着酱油工业化的发展,酱油酿造仅仅使用单一主发酵菌株,如米曲霉、酵母菌,而忽略了乳酸菌的作用,从而造成酱油风味口感上的不足。王夫

收稿日期:2014-09-09

作者简介:赵国忠(1983-),男,博士研究生,讲师,研究方向:食品微生物学。

*通讯作者:陈卫(1966-),男,博士,教授,研究方向:食品生物技术。

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(31401682);第 55 批中国博士后科学基金面上资助(2014M551503)。

杰^[5-9]等人开展了耐盐乳酸菌产酸特性的研究,并且通过分离耐盐乳酸菌研究其在不同盐浓度下的生长情况和对酱油酿造的影响。本文是从古老酱油厂酱醪中分离筛选出一株耐盐乳酸菌,对其生理生化指标测定及16S rDNA测序鉴定后应用于传统的低盐固态发酵实验,对比了添加该乳酸菌和对照组的酱油理化指标,发现添加耐盐乳酸菌发酵的酱油,各项指标都优于空白对照组,从而为该耐盐乳酸菌在酱油酿造实际生产中的应用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

分析实验所用试剂均为市售分析纯,液相有机酸检测所用试剂为市售色谱纯。

紫外可见分光光度计 上海光谱仪器有限公司;PHSJ-4A型实验室pH酸度计 美国奥立龙公司;BX51光学显微镜 日本OLYMPUS公司;LC-20AT高效液相色谱仪 日本岛津公司;GCMS-QP2010plus气相色谱-质谱联用仪 日本岛津公司;固相微萃取 上海市实验仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 乳酸菌的分离鉴定 收集酱醪样品,取样品25g,并用225mL无菌生理盐水加蒸馏水进行10倍系列梯度稀释,分别稀释为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 稀释度溶液。选择2~3个适宜稀释度,各以0.1mL加入到添加了7% NaCl的碳酸钙平板中进行涂布,置于培养箱中培养(厌氧, $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$, $(48 \pm 2)\text{h}$),之后进行乳酸菌菌落计数,挑取乳酸菌单菌落接种于碳酸钙琼脂平板, 37°C 恒温过夜培养。观察培养基上长出的单菌落,并挑取不同形态、大小的菌落进一步划线分离,重复三次划线。待长出菌后,挑选单一菌落的菌株进行革兰氏染色镜检,确定菌株形态。并将镜检后的菌株接种于MRS液体管中进行传代培养,甘油管保存于 4°C 冰箱,备用。

将需要鉴定的菌株活化过夜培养2次,离心收集菌体。提取该乳酸菌基因组DNA。设计引物。通用引物序列:上游引物27F序列:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCA-3',下游引物1492R序列:5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'。按照PCR流程进行聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)。体系50 μL :10 \times buffer, 5 μL ;三磷酸脱氧核糖核苷(deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP)5 μL ;上游引物(25 $\mu\text{mol/L}$), 0.5 μL ;下游引物(25 $\mu\text{mol/L}$)0.5 μL ;Taq DNA聚合酶(250U), 0.5 μL ;模板DNA, 1.5 μL ;ddH₂O 37 μL 。PCR扩增条件为: 95°C , 3min; 95°C , 10s; 55°C , 30s; 72°C , 1min; 72°C , 5min, 2~4步进行25个循环。琼脂糖凝胶电泳检测其产物纯度,条带大小为1500bp左右。送测序。测序结果与NCBI上的物种进行Blast物种比对,找出与其相似度最高的种属。

1.2.2 耐盐能力测定 将筛选的各菌株分别接种于添加了7%、10%、12%、16%、20% NaCl的MRS培养基中,于 37°C 培养箱中培养24h,之后检测其在600nm波长下的吸光度,观察其生长情况。

1.2.3 三角瓶种曲 用接种环从培养米曲霉的米曲汁斜面培养基上挑取3环或4环的米曲霉孢子于灭过菌的三角瓶种曲培养基(约50%含水量的麸皮)中,混匀,在 30°C 恒温培养箱中堆积培养。培养大约15h,待种曲培养基表面出现断断续续的白点状的时候,进行第一次摇瓶,使米曲霉实现二次接菌,这时候将培养基平铺,放入 30°C 培养箱中继续培养。再培养8h以后,直到发现种曲培养基全部变白色,进行第二次摇瓶,防止曲料过热和结块,继续平铺培养。培养到种曲培养基变绿,扣瓶培养直至全部变绿,孢子成熟。将种曲培养基装入牛皮纸袋中, 50°C 烘干6h左右,种曲制成,放入 4°C 冰箱备用。取出测定其孢子数,并测定孢子出芽率。

1.2.4 竹匾大曲制作 将已经制好的三角瓶种曲按照0.3%的质量接种于灭过菌的大曲培养基(豆粕:麸皮=6:4)上,混匀,堆积培养,用湿布盖好,放入 30°C 恒温培养箱中培养。培养大约15h,待大曲培养基表面出现白点状的时候,进行第一次翻曲,使米曲霉实现二次接菌,这时候平铺培养,放入 30°C 培养箱中继续培养。培养箱温度可以适当降低 $1\sim 2^\circ\text{C}$ 。再培养8h以后,直到发现大曲培养基全部变白色,进行第二次翻曲,防止曲料过热和结块,继续平铺培养。培养到种曲培养基变为黄绿色,大曲即制成。

1.2.5 低盐固态后期发酵 将制好的大曲按照原料质量1:1的比例,拌入12%盐度的温盐水(50°C 左右),一起装入干燥的磨口瓶中,表面铺上塑料,将盐铺在其表面隔绝氧气,添加耐盐乳酸菌,使其乳酸菌的数量达到 $1 \times 10^5/\text{mL}$,放入 40°C 发酵10d,然后 35°C 发酵20d。对发酵过程中的酱醪按照不同的时间点取样测定理化指标。称取10g酱醪装入100mL的三角瓶中,加入50mL蒸馏水,煮沸5min,过滤,用100mL容量瓶定容。酱醪中各指标的测定均采用国标法。无盐固形物的测定按照国标SB/T 10326-1999执行。氨基酸态氮含量的测定按照国标GB/T 5009.39-2003执行。pH变化和总酸含量的测定按照国标GB/T 5009.39-2003执行。还原糖含量的测定按照国标GB/T 15038-2006执行。

1.2.6 有机酸测定液相色谱条件 酱油样品用C₁₈萃取小柱纯化脱色。有机酸的检测通过特定有机酸的标准曲线标定,从而计算其含量。色谱柱:HydrospHere C₁₈柱(250mm \times 4.6mm I.D.);流动相:0.02mol/L KH₂PO₄,流速0.5mL/min;进样量20 μL ;紫外检测器,检测波长215nm;柱温 30°C 。

1.2.7 气相色谱条件 称量酱油样品10g于顶空瓶中, 50°C 水浴平衡0.5h, 50°C 水浴吸附30min。色谱柱:VF-5MS毛细管柱(30m \times 0.25mm, 0.25 μm);升温程序:起始温度 40°C ,保持30min,以 $4^\circ\text{C}/\text{min}$ 升至 150°C ,保持1min, $8^\circ\text{C}/\text{min}$ 升到 250°C ,保持6min;载气(He)流速1.0mL/min,进样量0.5 μL ;分流比:5:1。

1.2.8 质谱条件 电子轰击离子源;电子能量70eV;传输线温度 280°C ;离子源温度 220°C ;激活电压1.5V;质量扫描范围m/z 43~500。采用面积归一化法分别计算各物质所占总量的百分比。

1.2.9 数据分析 每个发酵酱油样品各指标均测定

三次。方差(ANOVA)分析采用SAS9.0软件进行,在 $p < 0.05$ 水平下进行分析,origin8.0软件作图。

2 结果与分析

2.1 酱醪中耐盐乳酸菌的分离鉴定及其耐盐能力测定

2.1.1 乳酸菌分离及鉴定 从碳酸钙盐培养基上长出的菌落中,挑选形态大小不同的6株菌,进行划线纯化,菌株在平板上的形态见图1,其表面光滑湿润,呈圆形凸起状、边缘整齐、无色、不透明、周围有明显溶钙圈。之后对这6株菌进行革兰氏染色,菌体呈长杆状、弯曲杆状或短杆状,无芽孢,呈革兰氏阳性,染色图片见图2。提取该6株菌的基因组,PCR扩增16S rDNA片段(图3),PCR产物测序,将序列在NCBI数据库中进行Blast基因相似度比较,发现分离得到的6菌株为植物乳杆菌,同源相似度大于99%。

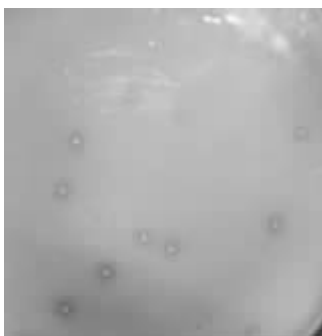


图1 乳酸菌菌落形态

Fig.1 The colony morphology of lactic acid bacteria



图2 乳酸菌个体形态(100×10)

Fig.2 Gram stain of Lactic acid bacteria(100×10)

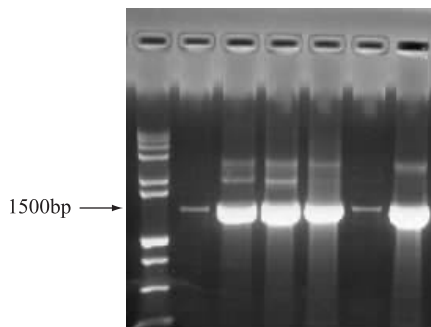


图3 菌株16S rDNA基因经PCR扩增后的电泳图

Fig.3 The agarose gel electrophoresis picture of PCR amplification of 16S rDNA genes

2.1.2 乳酸菌耐盐能力测定 经测定得出一株编号

为A3的植物乳杆菌具有最好的耐盐能力,其在不同盐分培养基中生长状况如图4所示,随着盐度的增加,其生长变慢,当盐浓度达到16%的时候,乳酸菌只有很少的生长量,而盐浓度为20%时候,乳酸菌几乎不生长,同时在酱油低盐固态发酵所处的12%的盐分下,其仍然保持相对较好的生长状况。

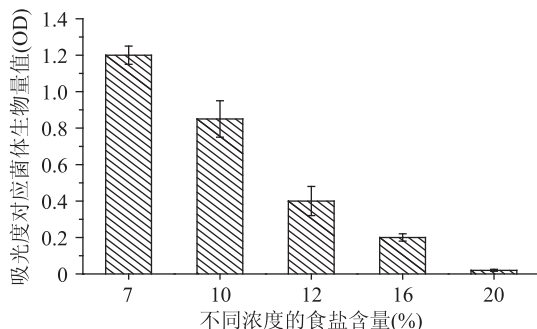


图4 盐浓度对乳酸菌生物量的影响

Fig.4 Effect of salt concentration on lactic acid bacteria biomass

2.2 添加乳酸菌发酵酱油实验

选择筛选出的具有最好耐盐能力的植物乳杆菌A3辅助进行酱油发酵,比较添加植物乳杆菌发酵酱油与普通发酵酱油两者之间的各种理化指标,分析添加植物乳杆菌发酵对酱油品质的影响。

2.2.1 两种发酵过程中无盐固形物含量测定 无盐固形物是酱油发酵过程中的一个重要指标,它代表着发酵过程中原料物质的分解、转化产生各种小肽、氨基酸、还原糖类物质的水平,是评价酱油好坏的一个重要指标^[10]。由图5可以看出,两组发酵酱油中无盐固形物的含量都随时间的变化而呈线性增加,其中添加植物乳杆菌发酵酱油中无盐固形物的含量从发酵开始到发酵结束均高于普通发酵酱油,说明植物乳杆菌的添加有助于酱油发酵中淀粉质原料向氨基酸、多肽类物质的转化。转化越多,无盐固形物含量越高。

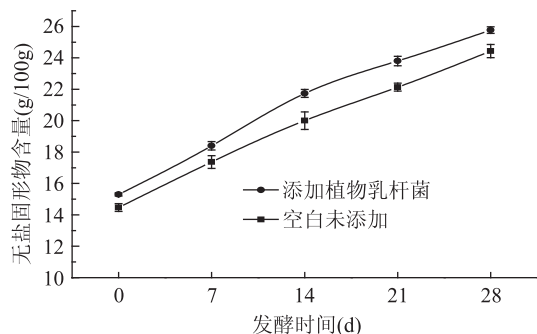


图5 无盐固形物含量的比较

Fig.5 Comparison of the solid materials content without NaCl

2.2.2 两种发酵过程中氨基态氮含量测定 氨基态氮反应了酱醪中产生氨基酸的多少,这个指标也很重要,是评价酱油质量好坏的标准之一^[11]。从图6中可以看出,随着时间的变化,两种发酵酱油中氨基态氮均呈现先快速增加后逐渐平稳的趋势,同时添加植物乳杆菌发酵酱油中氨基态氮明显高于普通发

酵酱油,在发酵结束的第30d时,前者氨基态氮达到1.3g/100g,高于普通发酵酱油的1.1g/100g,说明植物乳杆菌能够在一定程度上增加酱油发酵过程中蛋白质的转化率,提高氨基态氮的含量,增加酱油风味。植物乳杆菌分泌的酶能有效促进蛋白质向氨基酸转变,从而提高酱油中的氨基酸含量。

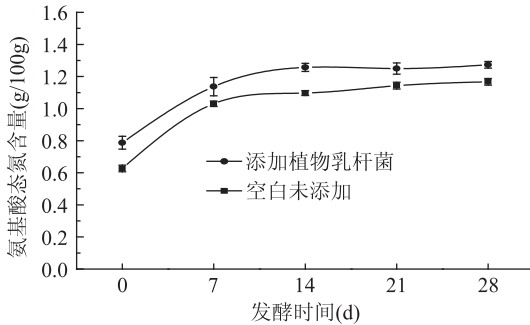


图6 氨基酸态氮含量的比较

Fig.6 Comparison of the amino acid nitrogen content

2.2.3 两种发酵过程中还原糖含量测定 还原糖主要是由淀粉质原料在酶的作用下分解产生的^[12],从图7中可以看出随着时间的变化,它的含量是逐渐增高的,两种发酵方式之间,其含量没有显著变化,说明植物乳杆菌的添加对淀粉质转化为糖类没有太大影响。

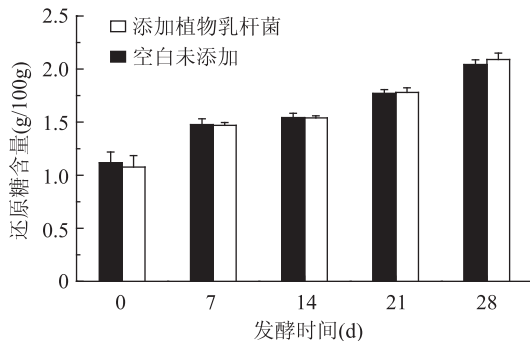


图7 还原糖含量的比较

Fig.7 Comparison of the reducing sugar content

2.2.4 两种发酵过程中 pH 变化和总酸含量测定 从图8和图9中可以看到,随着发酵时间的延长,两种发酵酱油中的pH均呈下降趋势,酸含量呈上升趋势,原因是由于有机酸等酸类物质在微生物代谢中的不断产生,导致酸类物质种类和含量增加,pH降低。同时,在酱油发酵全程中添加植物乳杆菌发酵后的pH明显低于普通发酵酱油,同时总酸含量高于普通发酵酱油,说明植物乳杆菌在发酵过程中产生了较多的酸,使发酵体系处于相对较高的酸度下,进而可抑制腐败菌的生长,减少不良代谢产物,保证酱油产品品质安全。

2.2.5 两种发酵酱油产品中风味物质比较 添加植物乳杆菌发酵的酱油的理化指标优于未添加乳酸菌发酵的酱油,有明显的差异。为了进一步分析其风味口感上的差异,对酱油有机酸和挥发类风味物质进行了检测。液相分析结果表明,有机酸中乳酸含量有较大差异(表1),添加植物乳杆菌后发酵的酱油,乳酸含量由空白的0.29g/100mL增加为

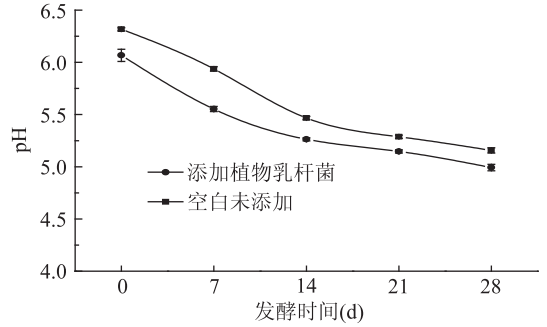


图8 发酵酱醪 pH 变化

Fig.8 Comparison of the pH of soy sauce mash

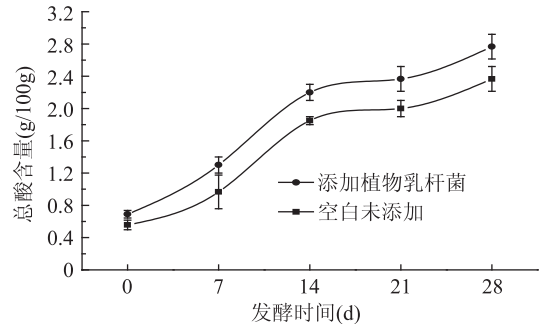


图9 酱醪总酸含量的比较

Fig.9 Comparison of the total acid

0.82g/100mL,增加了1.8倍,变化显著($p < 0.05$)。酒石酸、甲酸、苹果酸含量增加,变化显著($p < 0.05$)。相应的草酸、乙酸、柠檬酸、丙酸有所下降。乳酸在食品中具有相容性,它具有柔和的酸味,不掩盖食品中其它柔和的芳香味^[13]。乳酸含量的增加,使得酱油入口感更加柔和,不刺激,后口留香。有机酸含量之间的变化,是因为耐盐植物乳杆菌的作用,促进了糖酵解和三羧酸途径的发生,消耗糖类,形成有机酸。乳酸的形成则是植物乳杆菌无氧呼吸利用丙酮酸而形成的。

表1 酱油有机酸含量测定结果

Table 1 The contents of organic acids in soy sauce

种类	空白(g/100mL)	添加植物乳杆菌(g/100mL)
草酸	0.19 ± 0.03	0.15 ± 0.02
酒石酸	0.13 ± 0.02	0.25 ± 0.02
甲酸	0.09 ± 0.02	0.21 ± 0.03
苹果酸	0.16 ± 0.02	0.28 ± 0.02
乳酸	0.29 ± 0.03	0.82 ± 0.04
乙酸	0.50 ± 0.02	0.32 ± 0.02
柠檬酸	0.42 ± 0.02	0.35 ± 0.01
琥珀酸	0.69 ± 0.03	0.65 ± 0.02
丙酸	1.39 ± 0.04	1.27 ± 0.03

通过气相色谱-质谱联用仪分析检测酱油中的挥发性风味物质(表2)。添加该耐盐植物乳杆菌发酵后,整体风味物质成分都有所上升。其中最明显的是,酮类物质、酚类物质和醇类物质的增加,变化显著($p < 0.05$)。酯类物质稍有升高,变化不显著($p > 0.05$)。由此可见,植物乳杆菌对酱油风味物质的形成贡献很大,通过其体内的物质代谢,促进了发酵

向有益的方向发展。挥发性酸类、醛类和酯类物质基本持平。酚类物质能赋予食品一种特征明显的甜香、酱香及烟熏气味,使得酱油口感有发酵酱油特有的滋味,对风味贡献较大^[14]。醇类物质扮演着香味物质合成底物的作用,对酱油风味物质的形成具有间接作用。酮类物质阈值较低,能提供酱香味,使酱油风味更加丰满醇厚^[15]。

表2 酱油风味物质成分检测结果

Table 2 The results of the flavors in soy sauce

峰面积($\times 10^6$)	醇类	酸类	醛类	酮类	酚类	酯类
未添加乳酸菌	5.25	9.86	13.88	1.67	2.32	37.31
添加植物乳杆菌	7.34	10.21	14.19	5.75	6.16	38.24

3 结论

乳酸菌在酱油的发酵过程中起到重要的作用,本文从老厂酱醪中筛选出耐盐植物乳杆菌,其中一株植物乳杆菌 A3 在 12% 的盐分下依然能够良好的生长,添加到酱油发酵阶段,研究其理化指标变化情况以及各种风味物质的比例。结果显示添加这株耐盐植物乳杆菌发酵的酱油较普通酱油而言,无盐固形物、氨基态氮、总酸的含量都有显著提高($p < 0.05$),其中乳酸含量大大增加,变化差异显著($p < 0.05$)。其他有机酸含量略有下降,此外气相色谱-质谱检测结果也显示添加植物乳杆菌发酵酱油中酮类物质、酚类物质和醇类物质显著增加。结果表明植物乳杆菌有助于酱油发酵过程中大分子物质的转化,生成更多的氨基酸、还原糖、乳酸等小分子物质,这些物质能增加酱油的鲜味,并使其口感更醇厚圆润。这株耐盐植物乳杆菌的筛选应用为酱油的工业化及产品品质改良打下良好理论基础。

参考文献

[1] 孙常雁,李德海,孙莉洁.传统酿造普及酱油中酶系的作

(上接第 183 页)

[4] 王媛,王荫榆,郭本恒,等.表达环糊精葡基转移酶基因的重组大肠杆菌发酵条件的研究[J].工业微生物,2007,37(3):10-14.

[5] Rimphanitachayakit V, Tonzuka T, Sakano Y. Construction of chimeric cyclodextrin glucanotransferases from *Bacillus circulans* A11 And *Paenibacillus macerans* IAM1243 and analysis of their product specificity [J]. Carbohydr Res, 2005, 340 (14): 2279-2289.

[6] 王荫榆,王媛,张红发,等.来源嗜碱性芽孢杆菌 N-227 β -环糊精葡基转移酶基因分析及在大肠杆菌中的诱导表达[J].工业微生物,2007,37(3):1-4.

[7] Shin Hyun-Dong, Tae-Hyung Park, Yong-Hyun Lee, et al. Site-directed mutagenesis and functional analysis of maltose-binding site of β -cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus firmus* var. *alkalophilus* [J]. Biotechnology Letters 2000, (22): 115-121.

[8] Leemhuis H. Engineering cyclodextrin glycosyltransferase into a starch hydrolase with a high exo-specificity [J]. J Biotechnol, 2003, 103(3): 203-212.

用[J].中国食品添加剂,2009,(3):164-169.

[2] Zhang YF, Wang LJ, Tao WY. Biochemical changes in low-salt fermentation of solidstate soy sauce [J]. African Journal of Biotechnology, 2011, 8(24): 7028-7034.

[3] 周秉辰.论低盐固态酿制酱油生产工艺的改革[J].中国酿造,2005,24(1):1-3.

[4] Zhao GZ, Yao YP, Wang XH, et al. Functional properties of soy sauce and metabolism genes of strains for fermentation [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2013, 48(5): 903-909.

[5] 王夫杰,鲁绯,渠岩,等.3株风味乳酸菌生长及产酸特性的研究[J].中国酿造,2010,29(9):58-61.

[6] 张庆,林凯,袁春红,等.低盐固态发酵酱油酱醪中乳酸菌的分离与鉴定[J].食品与发酵科技,2014,50(2):1-4.

[7] 黄丹,梁源,左勇,等.酱油发酵酱醪中耐盐乳酸菌的分离筛选及产酸特性[J].食品与生物技术学报,2014,33(6):652-656.

[8] 杨汝德,潘力,郭迪.耐高压乳酸菌在酱油酿造中的应用研究[J].现代食品科技,2005,21(4):37-40.

[9] 陈伯林.耐盐乳酸菌在酱油发酵中的应用[J].现代食品科技,2011,27(11):1340-1343.

[10] 王冬洁,曹小红.我国 14 种市售酱油的关键品质指标评价与分析[J].天津农业科学,2006,12(3):62-64.

[11] 郭峰,王斌,陆洋.酱油中总酸和氨基酸态氮成分的快速检测及研究[J].食品科学,2006,27(12):699-703.

[12] 史龙君,杨铎,孙岩.多菌种稀发酵酱油的对照实验[J].中国酿造,2004,23(10):22-24.

[13] 刘彤节.乳酸[J].中国乳品工业,1994,22(4):177-178.

[14] 冯杰,詹晓北,周朝晖.两种膜过滤生产的纯生酱油风味物质比较[J].食品与生物技术学报,2010,29(1):33-39.

[15] 苗志伟,官伟,刘玉平.酱中挥发性风味物质的研究进展[J].食品工业科技,2012,33(8):390-397.

[9] 王宏梅,赵心清.一步 PCR 法对拟南芥 ATPK64 基因的快速定点突变[J].华中农业大学学报,2008,27(1):19-21.

[10] Ho S N, Hunt H D, Horton R M, et al. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction [J]. Gene, 1989, 77(1): 51-59.

[11] 朱大兴,周清华,王艳萍,等.利用 Pyrobrest DNA 聚合酶一步法进行大片段基因的定点突变[J].生物技术通讯,2007,18(4):590-593.

[12] 曹新志,金征宇.环糊精糖基转移酶的分离纯化及性质[J].食品科学,2004,5(4):43-46.

[13] 王俊英,关东明,钞亚鹏,等.环糊精糖基转移酶的酶学性质及转化特性[J].生物技术,2008,18(2):26-29.

[14] Lee MH, Yang S J, Kim J W. Characterization of a thermostable cyclodextrin glucanotransferase from *Pyrococcus furiosus* DSM3638 [J]. Extremophiles, 2007, 11(3): 537-541.

[15] Martins Rita F, Hatti-Kaul Rajni. A new cyclodextrin glycosyltransferase from an alkaliphilic *Bacillus agaradhaerens* isolate: purification and characterization [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 30: 116-124.