

تقدير فعالية إنزيم سايكلودكسترين غليكوزيل ترانسفيراز (CGTase) المنتج من بكتريا *Bacillus spp.* معزولة من ترب محلية في سوريا

صفا الكرمي¹، د. هدى حبال²، د. لينة الأمير³
¹ طالبة ماجستير في قسم علوم الأغذية- كلية الزراعة- جامعة دمشق.
² أستاذ مساعد في قسم علوم الأغذية- كلية الزراعة- جامعة دمشق.
³ أستاذ مساعد في الهيئة العامة للتقانة الحيوية- دمشق.

الملخص:

جمعت 50 عينة عشوائية من ترب مناطق مختلفة من محافظة دمشق واللاذقية وريفها، وزرعت معلقاتها على وسط انتقائي من (Horikoshi II). عزلت 56 عزلة بكتيرية من 24 عينة مدروسة، وأجريت الغرلة الأولية بعد التأكد من نقاوتها وتحديد كفاءتها في إنتاج إنزيم cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase)، أظهرت نتائج الغرلة الأولية بأن كفاءة العزلات لإنتاج إنزيم CGTase تراوحت ما بين 1.1-4. انتخب من العزلات السابقة 5 عزلات (1-15، 7-25، 7-26، 1-46، 1-50). وأجريت الغرلة الثانوية لتحديد العزلة الأكثر كفاءة في إنتاج β -سايكلودكسترين (β -CD) بتقدير الفعالية الإنزيمية للعزلات الخمس كل 24 ساعة ولمدة 3 أيام عند 30 م°. بينت النتائج أن العزلة (7-25) أعطت فعالية أعلى (26.29 وحدة/مل) وذلك بعد 24 ساعة، بينما أعطت العزلة (1-46) فعالية أقل (2.16 وحدة/مل) بعد 72 ساعة. أظهرت نتائج التشخيص بأن العزلة الأكفأ (7-25) تنتمي إلى النوع *Bacillus licheniformis*.

الكلمات المفتاحية: إنزيم cyclodextrin glycosyltransferase، CGTase، الدكستريينات الحلقية، β -CD، β -سايكلودكسترين، الفعالية الإنزيمية، *Bacillus licheniformis*، Horikoshi II

تاريخ الإيداع: 2022/6/30

تاريخ القبول: 2022/9/4



حقوق النشر: جامعة دمشق -
سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق
النشر بموجب الترخيص
CC BY-NC-SA 04

Determination of cyclodextrin glycosyltransferase activity (CGTase) produced by *Bacillus spp.* isolated from Syrian soils

Safa Al-Karmi¹, Dr. Hoda Habbal², Dr. Lina Al-Amir³

¹ MSc student, Dept, Food science, Agricultural Collage, Damascus University.

² Assistant Professor, Food Science Department, Faculty Agriculture.

³ Assistant Professor, NCBT, Damascus.

ABSTRACT:

Fifty soil samples were collected from different areas of Damascus city and its suburb. They were suspended in Horikoshi II selective medium. Bacterial was isolated from 24 soil samples and 56 isolates were obtained and purified for primary screening and detection for their efficiency in cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) production which ranged between 1.1-4. Five isolates were chosen accordingly (15-1, 25-7, 26-7, 46-1, 50-1) and the secondary screening was performed to estimate the enzyme activity of the five chosen isolates every 24 hours for 3 days at 30°C to determine the highest isolate efficiency in β - Cyclodextrin (β -CD) production. Results showed that isolate (25-7) revealed the highest activity in enzyme production of 26.29 U/ml after 24 hours of incubation, while isolate (46-1) revealed the lowest activity of 2.16 U/ml after 72 hours. The most efficient isolate (25-7) was identified as *Bacillus licheniformis*.

Keyword: Cyclodextrin Glycosyltransferase Enzyme, Cgtase, Cyclodextrins, B-Cd, B-Cyclodextrin, Enzyme Activity, Horikoshi Ii, *Bacillus Licheniformis*.

Received: 30/6/2022

Accepted: 4/9/2022



Copyright: Damascus University- Syria, The authors retain the copyright under a CC BY- NC-SA

المقدمة:

يعد إنزيم السايكلودكسترين غليكوزيل ترانسفيراز (CGTase) Cyclodextrin glycosyl transferase عامل محفز بيولوجي مُصنّف تحت عائلة 13 glycoside hydrolase أو عائلة α -amylase ورقمه الإنزيمي (EC 2.4.1.19) (Lim et al., 2021,1)، وهو متعدد الاستخدامات تنتج بعض الكائنات الحية الدقيقة القدرة على تمثيل النشاء وبعض الكربوهيدرات. تعمل إنزيمات (CGTase) على تحليل النشاء في تفاعلات ما بين الجزيئات، كما تعمل على تحليل الرابطة الغليكوزيدية α (4-1) للنشاء وينتج عن هذه العملية دكستريانات حلقيّة غير مُرجعة (CD) Cyclodextrin (CD) ودكستريانات غير حلقيّة متوسطة الحجم (Astray et al., 2009, 1632). يُنتج إنزيم (CGTase) من قبل أجناس وأنواع مختلفة من بكتريا التربة أهمها: *Bacillus spp.* (Singh and Kumar, 2019, 23)، *Bacillus alcalophilus subsp.* (Gomes et al., 2018, 1476)، *Halodurans* (More et al., 2012, 92)، *Gracilibacillus*، *Paenibacillus*، ومجموعة *Bacillus cereus* (Kulshreshtha, 2020, 161). وتعرّف الدكستريانات الحلقيّة بأنها قليلات سكر حلقيّة متجانسة من ثمالات الغلوكوز تتكون من ست أو سبع أو ثمان وحدات من D-غلوكوز مرتبطة بروابط غليكوزيدية α (4-1) تسمى بـ α -CD و β -CD و γ -CD على التوالي وتشارك جميعها بكونها جزيئات متبلورة، متجانسة وغير محبة للرطوبة، ويمكن إنتاجها بشكل نقي صناعياً (Singh and Kumar, 2019, 23; Ji et al., 2020, 116)، وهي جزيئات ذات شكل مخروطي مجوف ترتبط فيها جزيئات الغلوكوز بروابط تساهمية بواسطة الأوكسجين، وتحفظ بشكلها عن طريق الروابط الهيدروجينية بين مجموعات الهيدروكسيل المتوضعة على الوحدات المتجاورة عند القطر الواسع والضيق للتجويف (Crini et al., 2018, 3)، يتميز هذا التجويف بأنه ذو سطح داخلي كاره للماء وسطح خارجي محب للماء بمنحها القدرة على كبسلة جزيئات مختلفة مما يعطيها أهمية للاستخدام وخاصة β -CDs الذي يدخل في مجالات صناعية متعددة مثل صناعة مواد التجميل، البلاستيك، المنسوجات، الصناعات الدوائية، الطبية، البيئية والغذائية (Di Cagno, 2017, 6).

تدخل الدكستريانات الحلقيّة في الكثير من الصناعات الغذائية فتعمل على حماية الجزيئات المحاطة بها من العوامل الحيوية والطبيعية الخارجية كالضوء والحرارة والتحلل الميكروبي، وتسهل عملية ذوبان الفيتامينات والملونات في الغذاء، كما تسهم في تثبيت المنكهات والزيوت العطرية وحمايتها من التغيير حيث تحافظ على لون ورائحة هذه المركبات واستقرارها وقابليتها للذوبان ودخولها في التفاعلات الكيميائية، بالإضافة إلى أهميتها في إزالة الروائح والنكهات غير المرغوبة، والتحكم بتحرير بعض أنواع المركبات الغذائية (Kulshreshtha, 2020,159, Astray et al.,2009).

يعد مركب β -CD أقل ذوباناً في الماء وأكثر ثباتاً من باقي أنواع الدكستريانات الحلقيّة (α -CD و γ -CD)، ويعزى ذلك إلى التسلسل المتتالي للروابط الهيدروجينية في تجويف جزيئة β -السايكلودكسترين، في حين أن هذا التسلسل غير مكتمل في مركب α -CD بسبب وجود وحدة غلوكوبيرانوز في وضع غير منتظم مما يؤدي إلى ارتباط أربع جزيئات هيدروجين بروابط متسلسلة بدلاً من ستة، أما مركب γ -CD فهو عبارة عن هيكل مرن غير مترابط البنية مما يجعله أكثر أنواع الدكستريانات الحلقيّة ذوباناً في الماء (Astray et al., 2009, 1632; Hadaruga, et al., 2018, 161).

إن قدرة إنزيم CGTase على إنتاج أكثر من نوع من الدكستريانات الحلقيّة (α -CD، β -CD، γ -CD) تؤدي إلى زيادة في تكلفة فصل وتنقية الدكسترين الحلقي المطلوب، ويمكن التغلب على هذه المشكلة جزئياً بالبحث عن سلالات جديدة عالية الإنتاج من

CGTase معزولة من بيئات طبيعية وتحسين وسط الإنتاج الذي قد يزيد من الكفاءة الإنتاجية لهذه السلالات (Kulshreshtha *et al.*, 2020, 159).

تعتمد الطريقة الأكثر دقة وحساسية لقياس فعالية الإنزيم في تشكيل مركب β -سايكلودكسترين على القياس الطيفي اللوني للمعقد الناتج عن ارتباط (فينول فتالين - β -سايكلودكسترين) حيث تتناسب شدة اللون عكساً مع فعالية الإنزيم (Higuti *et al.*, 2004, 136).

ونظراً لأهمية هذا الإنزيم في الصناعات الغذائية ولقلة الدراسات المحلية التي تتعلق بإنتاج إنزيم CGTase من عزلات محلية فقد هدف هذا البحث إلى عزل البكتريا من ترب محلية في سوريا والتحري عن قدرتها في إنتاج إنزيم CGTase، للحصول على عزلة ذات كفاءة عالية في إنتاج إنزيم CGTase.

مواد البحث و طرائقه:

مواد البحث:

1. جمع عينات التربة:

جُمعت 50 عينة عشوائية من ترب محافظة دمشق وريفها ومحافظة اللاذقية بين عامي 2019 - 2020 م (الجدول، 1). تنوعت عينات الترب من أشجار حراجية (سرو، صنوبر) وأشجار مثمرة (توت، مشمش، زيتون) وحقول درنات بطاطا وبقوليات وحدائق عامة. أخذت عينات الترب بعمق 10-15 سم لتجنب مسببات التلوث الخارجي التي قد تتواجد في الطبقة السطحية المعرضة للهواء، وجمعت كمية تتراوح بين 100-300 غ تربة من كل موقع وحفظت في أكياس من البولي اتيلين في جو المختبر إلى حين استخدامها لعزل البكتريا (Rajput and Panchal, 2016,334).

الجدول (1): مصدر وعدد العينات العشوائية من الترب السورية

مصدر التربة	عدد العينات	مصدر التربة	عدد العينات
رنكوس	9	قارة	1
برزة	6	القدموس	1
جديدة عرطوز	5	مصيف	1
العدوي	4	دير حجر	1
مساكن برزة	4	الريوة	1
الغزلانية	2	قرحنا	1
عسال الورد	2	التل	1
محافظة اللاذقية	2	دوبلعة	1
التجارة	1	الضاحية	1
الزاهرة	1	الصبورة	1
ركن الدين	1	دمر	1
حتينة	1	الضمير	1
مجموع العينات = 50 عينة			

2. الكواشف والمحاليل المستخدمة:

- محلول السترات المنظم (0.1 M، pH 6.0): الذي يتكون من المحلولين (محلول (A) حمض الستريك ، ومحلول (B) سترات الصوديوم المائية) وفق طريقة (Stoll and Blanchar, 1990, 31-32).
- محلول الفوسفات المنظم تركيز (0.05 M، pH 6.0): الذي يتكون من المحلولين (محلول (A) فوسفات الصوديوم، ومحلول (B) فوسفات ثنائية الصوديوم) وفق طريقة (Stoll and Blanchar, 1990, 34).
- محلول اليود 4 μM (Kaur et al., 2014, 348).
- كاشف فينول فتالين 4 μM : خُفّف المحلول الأم بنسبة 10:1 بالماء المقطر للحصول على محلول العمل بتركيز 0.04 μM (Makela et al., 1988, 83).
- محلول كربونات الصوديوم (M 1) (Makela et al., 1988, 83).
- β -سايكلودكسترين: 500 مكروغرام/مل (Sigma-Aldrich)

3. الأوساط المستخدمة :

• وسط العزل: Horikoshi-phenolphthalein agar (Horikoshi II) (pH 10.0)

حُضِرَ وسط (Horikoshi II) الانتقائي بإذابة المكونات التالية في الماء المقطر: 1 غ نشاء، 0.5 غ مستخلص خميرة، 0.5 غ بيتون، 0.1 غ فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين KH_2PO_4 ، 0.02 غ كبريتات المغنسيوم المائية $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، 0.02 غ فينول فتالين، 1 غ كربونات الصوديوم Na_2CO_3 ، 1.5 غ آغار، وإكمال الحجم حتى 100 مل بالماء المقطر. عُقِمَ الوسط الناتج في الصاد الموصل عند 121 م° لمدة 15 دقيقة (Nakamura and Horikoshi, 1976,753).

• وسط تنشيط وإنتاج إنزيم CGTase: مرق (Horikoshi II) (pH 10.0)

حضر هذا الوسط من نفس مكونات وسط Horikoshi II آغار دون إضافة صبغة فينول فتالين وآغار، وعقم في الصاد الموصل عند 121 م° لمدة 15 دقيقة (Nakamura and Horikoshi, 1976,753).

• وسط حفظ العزلات:

استخدم وسط المرق المغذي Nutrient agar مضافاً له الغليسيرول بنسبة 40% وعقم في الصاد الموصل عند 121 م° لمدة 15 دقيقة (Rajput and Panchal, 2016,334).

• وسط آغار النشاء 1%:

حُضِرَ وسط آغار النشاء بإذابة 1 غ من النشاء في 100 مل من وسط الأغار المغذي (pH: 7.2 - 7.6). عُقِمَ الوسط الناتج في الصاد الموصل عند 121 م° لمدة 15 دقيقة (Anokhe and Kalia, 2021 a,64).

طرائق البحث:

1. الغرلة الأولية للعزلات المنتجة لإنزيم CGTase:

أُجريت الغرلة وفق الطريقة المذكورة من قبل Higuti وآخرون (2003، 184) مع تعديل درجة حرارة التحضين، حيث تم تعليق 1 غ من التربة في 9 مل محلول ملحي NaCl (0.85%) وزُرعت بطريقة النشر باستخدام ناشر زجاجي بوضع حجم (200 مكرو لتر) من المزرعة البكتيرية على وسط آغار Horikoshi II وحُضِنَت عند 30 م° لمدة 72 ساعة مع المراقبة اليومية للأطباق. عُدَّ تشكل

الهالات الصفراء واختفاء لون كاشف فينول فتالين دليلاً إيجابياً على قدرة العزلات البكتيرية في إنتاج إنزيم CGTase. أُخذت المستعمرات البكتيرية المشكلة للهالات (خلال 24, 48, 72 ساعة) بصورة منفردة وتُميت في 2 مل من وسط مرق Horikoshi II وحُصنت عند 30 م° لمدة 24 ساعة، أُعيد بعد ذلك زراعتها بالنشر (بحجم 100 ميكرو لتر) من التخفيف السادس 10^{-6} على وسط آغار Horikoshi II وحُصنت عند 30 م°. أُجريت مقارنة بين كفاءة العزلات الناتجة (بمعدل مكررين لكل عزلة) وذلك بحساب النسبة بين قطر الهالة وقطر المستعمرة البكتيرية من خلال القانون التالي:

$$\text{كفاءة إنتاج الإنزيم} = \frac{\text{قطر الهالة (مم)}}{\text{قطر المستعمرة (مم)}}$$

وذلك لكل عزلة مزروعة على وسط آغار Horikoshi II لمقارنة كفاءة إنتاجها في الأزمنة المدروسة وانتخاب 5 عزلات منها لمتابعة الدراسة عليها (Florencio *et al.*, 2012, 2; Gomes *et al.*, 2018, 1474)

2. الغربة الثانوية للعزلات المنتجة لإنزيم CGTase:

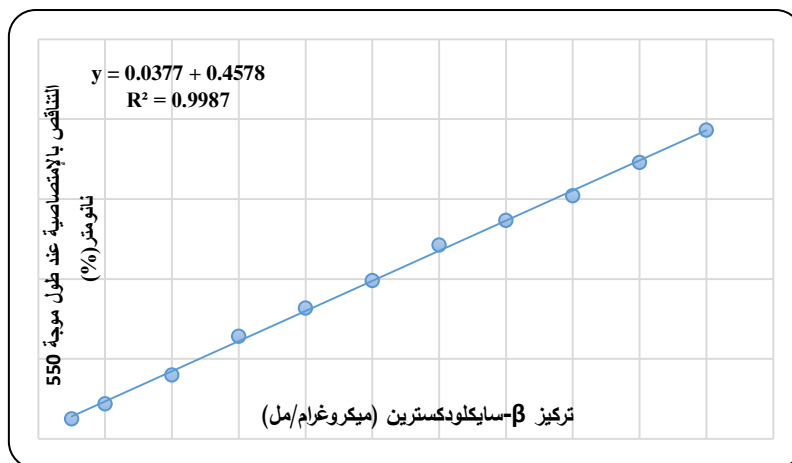
انتُخبت 5 عزلات بكفاءات متباينة وتمت إعادة زراعتها على وسط آغار Horikoshi II عدة مرات حتى التأكد من الحصول على مستعمرة نقية ومنتجة للإنزيم بنفس الكفاءة وحفظت عند 4 م° (Kamble and Gupte, 2014, 2755). اختبرت قدرة العزلات على التبوغ بوضع أنابيب المزارع السائلة للعزلات المنتخبة في حمام مائي عند 80 م° ولمدة 15 دقيقة وزرعت على أطباق الآغار المغذي وحُصنت عند 37 م° (Bergey *et al.*, 2011, 29). أُفحّت كل عزلة منتخبة في دوارق بحجم 100 مل حاوية على 20 مل من وسط مرق Horikoshi II (pH 10)، وبنسبة حجم للقاحة 1% ويعمر 24 ساعة (Kamble and Gupte, 2014, 2755)، ثم حُصنت في حاضنة هزازة عند 30 م° وسرعة دوران 150 دورة/دقيقة، ودرس زمن التحضين الأمثل للإنتاج بإجراء عملية سحب 1 مل من الوسط المزروع في ثلاثة أزمنة 24 و 48 و 72 ساعة. تُقَل الحجم المسحوب بسرعة 5000 دورة/دقيقة لمدة 30 دقيقة عند 4 م° للحصول على الجزء الطافي الحاوي على الإنزيم وقيس كل من الدكسترين (الناتج عن تفكك النشاء) والدكسترين الحلقي الذي يدل على فعالية إنزيم الـ CGTase (Kaur *et al.*, 2014, 384).

3. قياس فعالية تشكيل الدكستريانات (Dextrinizing activity assay):

قيست فعالية تشكيل الدكستريانات وفق الطريقة المتبعة من قبل Kaur وزملاؤه (2014، 384) وذلك من خلال استخدام نشاء البطاطا كركيزة وقياس الانخفاض في شدة تلون اليود. مُزج 0.1 مل من الجزء الطافي الحاوي على الإنزيم في أنبوب اختبار مع 0.5 مل من محلول النشاء (1%) و0.4 مل من محلول السترات المنظم، وحُصن أنبوب التفاعل في حمام مائي عند 50 م° لمدة 10 دقائق وبعد ذلك تم إنهاء التفاعل بإضافة 0.5 مل من HCl (1 M)، ثم أُضيف 0.1 مل من محلول اليود (4 μM)، حُضر الشاهد (Blank) الحاوي على جميع المواد ما عدا محلول الإنزيم، وقُرأت الامتصاصية للأنايب باستخدام جهاز المطياف الضوئي (Spectrophotometer) UV-VIS عند طول موجة 620 نانومتر. عُرِف وحدة النشاط الدكستريني للإنزيم بأنها كمية الإنزيم التي ينتج عنها انخفاض في الامتصاصية بنسبة 10% عند طول موجة 620 نانومتر.

2-4 قياس فعالية الإنزيم في تشكيل β -سايكلودكسترين (Cyclizing activity assay):

قيس نشاط تشكيل السايكلودكسترين الحلقي لكل عذلة باستخدام الفينول فتالين وفق الطريقة المذكورة في Makela وآخرون (1988، 83) وذلك بمزج 0.1 مل من الجزء الطافي الحاوي على الإنزيم في أنبوب اختبار مع 1 مل من الركيزة (50 ملغ نشاء مُحضَّر في 0.05 M محلول الفوسفات المنظم (pH 6.0)، وحضن مزيج التفاعل في حمام مائي عند 60 م° واستمر التفاعل مدة 30 دقيقة، ثم أوقف التفاعل مباشرةً بوضع الأنابيب في الثلج لمدة 5 دقائق، وأضيف 0.2 مل من محلول الفينول فتالين (محلول العمل) و 0.25 مل كربونات الصوديوم Na_2CO_3 بتركيز 1 M قبل القياس مباشرةً وأكمل الحجم بالماء المقطر إلى 2.5 مل. قيست الإمتصاصية للمحلول باستخدام جهاز المطياف الضوئي (Spectrophotometer) عند طول موجة 550 نانومتر، وحضرت عينة الشاهد (Blank) بنفس المكونات باستثناء محلول الجزء الطافي الحاوي على الإنزيم الذي تم الاستعاضة عنه بالمحلول المنظم وبنفس الحجم، وتم تقدير كمية β -CD المنتجة باستخدام المنحنى القياسي لـ β -CD النقي المحضَّر بتركيز تراوحت بين 50 - 500 ميكروغرام/مل حسب (Kamble and Gupte, 2014, 2755) حيث قيست الإمتصاصية على طول موجة 550 نانومتر.

الشكل (1): المنحنى القياسي β -سايكلودكسترين

عُرفت وحدة النشاط الإنزيمي في تشكيل الدكسترين الحلقي بأنها كمية الإنزيم الذي يحفز إنتاج ميكرومول واحدة من β -سايكلودكسترين في الدقيقة الواحدة تحت ظروف التجربة، وقدرت فعالية الإنزيم في تشكيل β -CD (وحدة / مل) (Thombre and Kanekar, 2012, 183) وفق القانون التالي:

$$\text{فعالية إنزيم } CGTase = \frac{\text{التناقص في الإمتصاصية (\%)} \times \text{كمية } \beta\text{-CD المنتجة} \times \text{مقلوب التخفيف}}{\text{الوزن الجزيئي لـ } \beta\text{-CD القياسي} \times \text{مدة التفاعل (دقيقة)}}$$

5. تشخيص العزلة البكتيرية الأكفأ في إنتاج إنزيم CGTase:

زرعت العزلة التي أعطت أعلى فعالية إنزيمية على وسط الأغار المغذي ودرست صفاتها الشكلية (قوام المستعمرات، الحواف، اللون، والشكل). وأجريت صبغة غرام وصبغة أخضر المالاكايت للعزلة الناتجة واختبرت قدرتها على النمو عند 55 م°، مع تقدير الإختبارات البيوكيميائية التالية:

- اختبار أحمر الميثيل: للدلالة على التخمر الكامل فيتحول الغلوكوز كلياً إلى حمض وتنخفض درجة الحموضة إلى أقل من 4.4 ويتحول اللون الأصفر إلى الأحمر مما يدل على إيجابية الإختبار في حين أن بقاء اللون الأصفر يدل على سلبية الإختبار (Anokhe and Kalia, 2021 b,41).
- اختبار فوكس بروسكاور: للكشف عن قدرة البكتريا على تخمير الغلوكوز (تخمر جزئي) واستقلاب حمض البيروفيك لإنتاج أستيل ميثيل كاربينول الذي يتحول إلى ثنائي أسيتيل بإضافة 0.5 مل من هيدروكسيد البوتاسيوم بتركيز 40% وبوجود الأكسجين الجوي، وتحول ثنائي الأسيتيل إلى مركب أحمر اللون الذي يظهر بشكل حلقة بسبب العمل التحفيزي للألفا نافثول 5% مما يدل على إيجابية الإختبار بينما يبقى اللون الأصفر حين تكون النتيجة سلبية (Anokhe and Kalia, 2021 b,41).
- القدرة على النمو بتركيز ملح NaCl (2% - 5% - 7% - 10%) المضاف إلى وسط الأغار المغذي.
- اختبار السترات: للكشف عن قدرة البكتريا على استهلاك السترات كمصدر وحيد للكربون مما يؤدي إلى زيادة القلوية الناتجة عن تحول أملاح الأمونيوم إلى أمونيا فيتحول اللون الأخضر إلى الأزرق باستخدام وسط (MacWilliams, Simmon Citrate 2009. 2).
- القدرة على تحليل النشاء: يعد وسط آغار النشاء وسط غذائي بسيط، يشكل النشاء مصدر الكربون الوحيد فيه، يتم زرع المعلق البكتيري على طبق آغار النشاء وتحضينه مدة 48 ساعة عند 37 م°، ويضاف محلول اليود على المزروع النامي لمدة 30 ثانية وفحص الطبق لملاحظة وجود مناطق شفافة حول النمو البكتيري دليل على إيجابية الإختبار أو بقاء اللون الأزرق دليل على سلبية البكتريا لتحليل النشاء (Anokhe and Kalia, 2021 a,64).
- قدرة العزلة على تخمير عدد من السكريات: D-غلوكوز، D-غالاكتوز، D-فركتوز، D-مانيتول، D-زليلوز، D-مانوز، L-أرابينوز، D-رافينوز، D-سكروز، D-مانوز في وسط ماء البيتون المكون من 1 غ بيتون، 0.5 غ ملح كلور الصوديوم NaCl، 0.0018 غ أحمر الفينول، وأضيف كل سكر بتركيز 1%، مع إجراء شاهد إيجابي حاوي على سكر الغلوكوز الذي يعطي اللون الأصفر نتيجة للتخمير، وشاهد سلبى أحمر اللون (Bergey et al., 2011, 66).

6. التحليل الإحصائي:

حُسبت متوسطات الفعالية الإنزيمية وانحرافات المعيارية للعزلات الخمس خلال ثلاث أزمنة 24 - 48 - 72 ساعة وبمكررين وذلك على مستوى ثقة (P ≤ 5) باستخدام البرنامج الإحصائي Minitab الإصدار 14 (Minitab statistical software for windows, Version 14.0).

النتائج والمناقشة:

1. الغرلة الأولية للعزلات المنتجة لإنزيم CGTase:

يبين الجدول (2) العزلات البكتيرية المنتجة لإنزيم CGTase خلال الغرلة الأولية حيث يلاحظ بأن 56 عزلة بكتيرية منتجة لإنزيم CGTase من 24 عينة تربة. وأعطت جميع العزلات هالات صفراء اللون حول المستعمرات بعد نموها على الوسط الإنتقائي Horikoshi II وذلك نتيجة سحب كاشف الفينولفتالين وتشكيل معقد (β -CD - فينول فتالين)، وقد يعزى ذلك أيضاً إلى تغير pH الوسط (Gomes *et al.*, 2018, 1478). أظهرت النتائج وجود اختلاف في زمن تشكل الهالات الصفراء للعزلات المختلفة وكان عدد العزلات التي أعطت هالة بعد 24 ساعة 29 عزلة بكتيرية، و 17 عزلة بعد 48 ساعة، و 10 عزلات فقط أعطت الهالات بعد 72 ساعة من التحضين عند 30 م°، كما يلاحظ أيضاً اختلاف في عدد وطبيعة العزلات الناتجة من عينات التربة المختلفة وقد يعود ذلك إلى تباين خصائص التربة والمواد العضوية الموجودة فيها ومحتواها من الرطوبة وحجم جزيئاتها ولونها وموقعها الجغرافي (Ravinder *et al.*, 2012, 408).

الجدول (2): العزلات البكتيرية المنتجة لإنزيم CGTase خلال الغرلة الأولية

الرقم التسلسلي	رقم عينة التربة	العزلات المعطية للهالات خلال		
		24 سا	48 سا	72 سا
1	3	-	1	-
2	5	2	-	-
3	14	3	2	-
4	15	3	1	-
5	16	1	-	-
6	18	-	-	1
7	19	-	-	1
8	20	-	1	-
9	22	-	-	1
10	23	2	1	-
11	25	6	2	1
12	26	4	5	2
13	30	-	-	1
14	35	1	-	-
15	36	1	2	2
16	42	1	-	-
17	43	1	-	-
18	44	1	-	-
19	45	-	1	-
20	46	1	-	-
21	47	1	-	-
22	48	-	1	-
23	49	-	-	1
24	50	1	-	-
المجموع		29	17	10

يبين الجدول (3) كفاءة العزلات في إنتاج إنزيم CGTase على وسط Horikoshi II حيث يلاحظ بأن متوسط قطر الهالات للبكتريا المعزولة بين 1 و 8 ميلليمتر وبكفاءة إنتاجية تراوحت بين 1.1 و 4، وقد تفوقت كفاءة السلالات المعزولة في هذه الدراسة في إنتاج (الهالات) بالمقارنة مع ماوجده Ravinder وآخرون (2012، 411) والتي تراوحت كفاءة عزلاتهم في إنتاج هالات اقطارها بين 0.12 – 0.98 بعد التحضين عند درجة حرارة 30 م° لمدة 24 ساعة، في حين تقاربت النتائج المتحصل عليها مع ما وجده Gomes وآخرون (2018، 1474) الذي أشار إلى أن كفاءة إنتاج العزلات للإنزيم (الهالات) تراوحت بين 2.4 - 5.5 بعد التحضين لمدة 24، 48 و 72 ساعة بدرجة حرارة 30 م°. إن التفاوت بين العزلات في أقطار الهالات وبالتالي في كفاءة العزلة قد يعزى إلى اختلاف خصائص الإنزيمات الخارجية ونسبة إنتاجها للدكسترين الحلقي من النشاء الموجود في الوسط كركيزة (Pongsawasdi and Yagisawa, 1987, 463).

الجدول (3): كفاءة العزلات في إنتاج إنزيم CGTase على وسط Horikoshi II

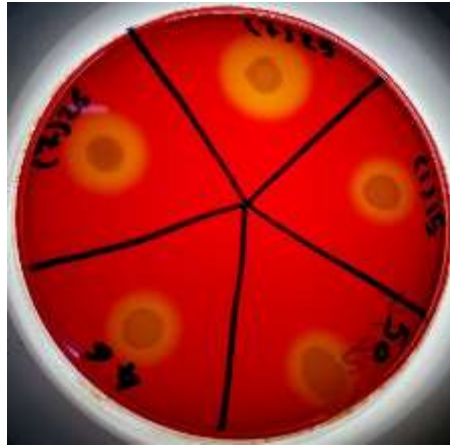
زمن التحضين (سا)									رمز العزلة
72			48			24			
كفاءة العزلة	متوسط قطر المستعمرة	متوسط قطر الهالة	كفاءة العزلة	متوسط قطر المستعمرة	متوسط قطر الهالة	كفاءة العزلة	متوسط قطر المستعمرة	متوسط قطر الهالة	
			1.6	0.7	1.1				1-3
						2.2	1.8	4.0	1-5
						2.0	1.0	2.0	2-5
						1.7	0.7	1.2	1-14
						1.7	1.2	2.0	3-14
			1.6	0.5	0.8				4-14
			1.7	1.2	2.0				7-14
						2.9	1.2	3.5	8-14
						3.3	1.2	4.0	1-15
						2.5	1.2	3.0	2-15
						2.1	1.8	3.8	3-15
			1.7	0.9	1.5				4-15
						2.7	1.1	3.0	1-16
1.3	0.9	1.2							1-18
1.2	0.9	1.1							1-19
			1.5	4.0	6.0				1-20
1.25	0.8	1.0							1-22
			1.5	2.0	2.9				1-23
						2.0	1.0	2.0	2-23
						3.0	1.0	3.0	3-23
						2.7	1.5	4.0	1-25
						3.9	1.8	7.0	2-25
						1.8	1.0	1.5	3-25
			1.5	1.0	1.5				4-25
			1.8	1.2	2.1				5-25
1.2	1.0	1.2							6-25
						4.0	2.0	8.0	7-25
						3.0	1.0	3.0	8-25
						3.2	1.1	3.5	9-25
						2.5	1.0	2.5	1-26

			1.7	0.9	1.5				2-26
			1.6	0.7	1.1				3-26
						2.0	1.0	2	4-26
			1.5	1.0	1.5				5-26
1.3	1.2	1.5							6-26
						3.0	1.0	3.0	7-26
						2.0	0.3	0.6	8-26
1.1	0.8	0.9							9-26
			1.4	0.7	1				10-26
			1.3	1.1	1.5				11-26
1.1	0.8	0.9							1-30
						2.2	0.6	1.3	1-35
						2.1	0.9	1.9	1-36
1.3	1.5	2.0							1-36
			1.5	1.3	1.9				1-36
1.3	0.8	1							4-36
			1.6	1.1	1.8				5-36
						2.3	1.3	3.0	1-42
						1.8	1.0	1.8	1-43
						2.0	1.0	2.0	1-44
			1.4	1.8	2.5				1-45
						1.9	0.9	1.7	1-46
						2.0	0.5	1.0	1-47
			1.6	0.8	1.3				1-48
1.3	0.7	0.9							1-49
						3.0	1.0	3.0	1-50

أظهرت بعض العزلات المدروسة كفاءة كبيرة في إنتاج الإنزيم واختزال لون كاشف فينول فتالين، ويتضح من الجدول (3) اختلاف العزلات في زمن إنتاجها لإنزيم CGTase، وقد تفوقت العزلة (7-25) في كفاءة إنتاج الإنزيم حيث بلغت 4 بعد التحضين لمدة 24 ساعة. كما يلاحظ في نفس الجدول أن أعلى كفاءة للعزلات ظهرت عند التحضين لمدة 24 ساعة حيث بلغت نسبتها 51.78 %، في حين بلغت نسبة العزلات التي أظهرت كفاءة بعد التحضين لمدة 48 و 72 ساعة 30.35 % و 17.85 % على التوالي، وهذا يوافق ما أشار إليه Sivakumar و Banu (2011، 104)، ويخالف ما أشار إليه Kaur وآخرون (2014، 385) بأن أفضل كفاءة ظهرت بعد التحضين لمدة 48 ساعة، وقد يعزى هذا الاختلاف إلى طبيعة العزلة وظروف تواجدها في الطبيعة.

2. الغرلة الثانوية للعزلات المنتجة لإنزيم CGTase:

انتخبت العزلات (1-15، 7-25، 7-26، 1-46، 1-50) بغرض المقارنة بينها في فعالية تشكيل كل من الدكستريانات والدكستريانات الحلقية في الأزمنة الثلاث المدروسة (24، 48 و 72 ساعة)، حيث لوحظ أن العزلات (1-15)، (7-25)، (1-50) فقط لها القدرة على التبوغ، ويبين الشكل (2) التفاوت في أقطار كل من المستعمرات والهالات بين العزلات البكتيرية المنتجة وبالتالي الاختلاف في كفاءة إنتاج الإنزيم CGTase. وقد أشار Gomes وآخرون (2018، 1474) إلى أن ظهور الهالات يعود إلى نشاط الإنزيم في تحليل النشاء وتشكيل معقد (فينول فتالين - β -CD).



الشكل (2): ظهور الهالات الناتجة بعد زرع العزلات البكتيرية المنتخبة على وسط Horikoshi II آغار

1-2 فعالية تشكيل الدكستريانات (Dextrinizing activity):

يبين الجدول (4) فعالية إنزيم CGTase في تشكيل الدكستريانات من العزلات البكتيرية المنتخبة حيث يلاحظ تفوق العزلة (7-25) في تشكيل الدكستريانات بفعالية بلغت 9.359 وحدة/مل بعد 48 ساعة من التحضين، بينما لوحظت أقل فعالية 1.290 وحدة/مل في العزلة ذاتها بعد 24 ساعة من التحضين، وقد تقاربت هذه النتيجة من ما توصل إليه Stanković وآخرون (2016، 52) حيث أشاروا أن فعالية تشكيل الدكسترين لبكتريا *Bacillus spp.* قد بلغت 9.7 وحدة/مل بعد التحضين لمدة 48 ساعة. ويُظهر التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية بين فعالية العزلات المنتخبة باختلاف كل من العزلة وزمن التحضين، وقد تقاربت هذه النتيجة من ما توصل إليه Stanković وآخرون (2016، 52) حيث أشاروا أن فعالية تشكيل الدكسترين لبكتريا *Bacillus spp.* قد بلغت 9.7 وحدة/مل بعد التحضين لمدة 48 ساعة.

الجدول (4): فعالية إنزيم CGTase في تشكيل الدكستريانات من العزلات البكتيرية المنتخبة

الفعالية (وحدة/مل)					زمن التحضين
1-50	1-46	7-26	7-25	1-15	
4.026±0.092 ^{dA}	5.508±0.042 ^{cA}	5.349±0.014 ^{cA}	1.290±0.028 ^{bA}	3.469±0.042 ^{aA}	24 ساعة
5.081±0.035 ^{dB}	7.009±0.018 ^{cB}	7.096±0.015 ^{cB}	9.359±0.008^{bB}	5.751±0.052 ^{aB}	48 ساعة
4.213±0.049 ^{eA}	6.221±0.019 ^{dC}	5.786±0.004 ^{cC}	7.562±0.039 ^{bC}	3.859±0.026 ^{aC}	72 ساعة

* تدل الأحرف (الصغيرة) المتشابهة في السطر الواحد على عدم وجود فروق معنوية عند مستوى 5%

* تدل الأحرف (الكبيرة) المتشابهة في العمود الواحد على عدم وجود فروق معنوية عند مستوى 5%

حيث يلاحظ من الجدول (4) أن فعالية إنتاج الإنزيم ازدادت بشكل معنوي ($p \leq 0.05$) مع زيادة زمن التحضين من 24 إلى 48 ساعة ومن ثم انخفضت الفعالية بشكل معنوي ($p \leq 0.05$) مع زيادة زمن التحضين إلى 72 ساعة، إن أعلى فعالية إنزيمية لجميع العزلات المنتخبة كانت بعد 48 ساعة من التحضين وهذا يتوافق مع Kaur وآخرون (2014، 385) حيث أشاروا الباحثون إلى ازدياد الفعالية بشكل تدريجي باستمرار فترة التحضين حتى 48 ساعة وعودتها للتناقص بعد ذلك، وقد يعود ذلك إلى تحول جزء من هذه الدكستريانات إلى دكستريانات حلقيّة بفعل نشاط الأنزيم.

2-2 فعالية الإنزيم في تشكيل β -سايكلودكسترين (Cyclizing activity):

يبين الجدول (5) فعالية إنزيم CGTase في تشكيل الدكستريانات الحلقية من العزلات البكتيرية المنتخبة بعد 24، 48 و 72 ساعة من التحضين في وسط مرق Horikoshi II. يُظهر التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية بين فعالية العزلات المنتخبة باختلاف كل من العزلة وزمن التحضين، حيث تفوقت العزلة (7-25) في تشكيل β -CD بفعالية بلغت 26.285 وحدة/مل بعد 24 ساعة من التحضين، بينما لوحظت أقل فعالية في تشكيل β -CD بعد 72 ساعة من التحضين وذلك لجميع العزلات وقد تقاربت هذه النتائج مع ما توصل إليه Kulshreshtha وآخرون (2020، 162) حيث أشاروا أن فعالية تشكيل الدكسترين لبكتريا *Bacillus spp. SS₂* قد بلغت 27.45 وحدة/مل بعد التحضين لمدة 24 ساعة.

الجدول (5): فعالية إنزيم CGTase في تشكيل β -CD من العزلات البكتيرية المنتخبة (وحدة/مل)

الفعالية (وحدة/مل)					زمن التحضين
1-50	1-46	7-26	7-25	1-15	
10.930±0.05 ^{dA}	10.824±0.099 ^{dA}	18.233±0.065 ^{cA}	26.285±0.078^{bA}	20.687±0.069 ^{aA}	24 ساعة
5.483±0.139 ^{eB}	4.257±0.092 ^{dB}	12.891±0.107 ^{cB}	19.625±0.262 ^{bB}	14.482±0.170 ^{aB}	48 ساعة
3.889±0.059 ^{eC}	2.158±0.066 ^{dC}	7.832 ±0.084 ^{cC}	11.613±0.051 ^{bC}	5.640±0.142 ^{aC}	72 ساعة

* تدل الأحرف (الصغيرة) المتشابهة في السطر الواحد على عدم وجود فروق معنوية عند مستوى 5%

* تدل الأحرف (الكبيرة) المتشابهة في العمود الواحد على عدم وجود فروق معنوية عند مستوى 5%

حيث يُلاحظ من الجدول (5) أن فعالية الإنزيم في تشكيل β -CD تنخفض بازدياد مدة التحضين من 24 إلى 72 ساعة، وكان أفضل إنتاج لـ β -سايكلودكسترين بعد 24 ساعة من التحضين عند العزلات الخمس، وقد يعزى ذلك إلى استهلاك β -CD من قبل البكتريا كمصدر للكربون خلال نموها في الوسط (Higuti *et al.*, 2004, 136; Sivakumar and Banu, 2011, 104).

3. تشخيص العزلة الأكثر كفاءة في إنتاج إنزيم CGTase:

شخصت العزلة (7-25) المعزولة من تربة قلووية (pH 8.8) أعطت أعلى فعالية إنزيمية (26.285) وحدة/مل، وعند دراسة صفاتها الشكلية لوحظ أنها بكتريا لمساء، ذات لون كريمي، عصوية، موجبة غرام، متبوعة بأبواغ طرفية داخلية، وبالتالي فهي تابعة لجنس *Bacillus* حسب تصنيف Bergey (Bergey *et al.*, 2011, 66). كما لوحظ عند دراسة الخواص البيوكيميائية لهذه العزلة أنها بكتريا موجبة لاختبار السترات وأحمر الميتيل وتحليل النشاء، وسالبة لاختبار فوكس بروسكاور، وقادرة على النمو بتراكيز NaCl (2% - 5% - 7% - 10%)، بالإضافة إلى قدرتها على النمو بدرجة حرارة 55 م° كما هو موضح في الجدول رقم (6) لنتائج الإختبارات البيوكيميائية في قدرة العزلة المنتخبة على تخمير السكريات:

الجدول (6): اختبارات تشخيص العزلة (7-25) الأعلى فعالية في إنتاج β -CD

السكر	القدرة على التخمر	السكر	القدرة على التخمر
D-غلوكوز	+	D-كزابلوز	+
-D-غالاكتوز	+	D-مانوز	+
-D-فركتوز	+	L-أرابينوز	+
-D-مانيتول	+	D-رافينوز	-
-D-سكروز	+	D-مانوز	+

وبمقارنة النتائج مع تصنيف Bergey وجد أن العزلة تنتمي لنوع *Bacillus licheniformis* (Bergey et al., 2012, 75) وتوافقت هذه النتائج مع Sivakumar و Banu (2011, 103).

الاستنتاجات:

1. إمكانية عزل العديد من العزلات البكتيرية القادرة على إنتاج β -CD من الترب المحلية ذات خصائص مختلفة.
2. وجود علاقة طردية بين نتائج العزلة الأولية والعزلة الثانوية عند مقارنة أقطار الهالات حول المستعمرات المنتجة للإنزيم وفعالية الإنزيم في إنتاج β -CD
3. بينت النتائج إمكانية الحصول على إنتاجية عالية من β -CD بعد تحضين بكتريا *Bacillus licheniformis* لمدة 24 ساعة مع تشكل الدكستريانات بأعلى فعالية بعد 48 ساعة.
4. شُخصت العزلة 7-25 بأنها *Bacillus licheniformis* وفعاليتها إنزيمية 26.285 وحدة/مل.

التوصيات:

أمثلة ظروف نمو العزلة البكتيرية المنتجة لإنزيم CGTase والتي أعطت أعلى إنتاج من β -سايكلودكسترين، ودراسة مدى فعالية وثباتية β -سايكلودكسترين في المنتجات الغذائية والدوائية.

التمويل : هذا البحث ممول من جامعة دمشق وفق رقم التمويل (501100020595).

References:

1. Anokhe, A. and Kalia, V. (2021) a. Biochemical Characterisation of Starch Hydrolysing Bacteria. *AgriCos e-Newsletter*, 2 (11), 63-65.
2. Anokhe, A. and Kalia, V. (2021) b. Determination of Fermentation Pathway by Methyl Red and Voges Proskauer (MRVP) Test. *AgriCos e-Newsletter*, 2 (11), 41-43.
3. Astray, G., Gonzalez-Barreiro, C., Mejuto, J. C., Rial-Otero, R. and Simal-Gndara, J. (2009). A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocolloids*, vol.23 (7), pp: 1631-1640.
4. Bergey, W., Aidan, P., Michael, G., Peter, K., Hans, J. B., Martha, E. T. and Wolfgang, L. K., S. (2011). *Bergey's manual of systematic bacteriology. The Firmicutes (Vol. 3). Second Edition.* London. New York. Springer Science & Business Media. pp:1422
5. Crini, G., S. Fourmentin, et al. (2018). *Fundamentals and Applications of Cyclodextrin. Cyclodextrin Fundamentals, Reactivity and Analysis.* S. Fourmentin, G. Crini and E. Lichtfouse. Cham, Springer International Publishing 1-55.
6. Di Cagno, M. P. (2017). The potential of cyclodextrins as novel active pharmaceutical ingredients: a short overview. *Molecules*, 22, (1), 1-14.
7. Florencio, C., Couri, S. and Farinas, C. S. (2012). Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by *Trichoderma* strains. *Enzyme research*, pp:1-8
8. Gomes, A. C., Santos, S. R., Ribeiro, M. C., Cravo, P. V., Vieira, J. D. G., Souza, K., & Amaral, A. C. (2018). Is there still room to explore cyclodextrin glycosyltransferase-producers in Brazilian biodiversity?. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 90, 1473-1480.
9. Hadaruga, N. G., G. N. Bandur, et al. (2018). Thermal analyses of cyclodextrin complexes. *Cyclodextrin fundamentals, reactivity and analysis.* S. Fourmentin, G. Crini and E. Lichtfouse. Cham, Springer. 16: 155-221.
10. Higuti, I. H., Grande, S. W., Sacco, R. and Nascimento, A. J. D. (2003). Isolation of alkalophilic CGTase-producing bacteria and characterization of cyclodextrin-glycosyltransferase. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 46, (2), 183-186.
11. Higuti, I. H., Silva, P. A. D., Papp, J., Okiyama, V. M. D. E., Andrade, E. A. D., Marcondes, A. D. A. and Nascimento, A. J. D. (2004). Colorimetric determination of alpha and beta-cyclodextrins and studies on optimization of CGTase production from *B. firmus* using factorial designs. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47, 837-841.
12. Ji, H., Bai, Y., Li, X., Zheng, D., Shen, Y. and Jin, Z. (2020). Structural and property characterization of corn starch modified by cyclodextrin glycosyltransferase and specific cyclodextrinase. *Carbohydrate polymers*, vol. 237, pp: 116-137.
13. Kamble, R. and Gupte, A. (2014). Cyclodextrin glycosyltransferase production by alkaliphilic bacillus sp. Isolated from rice cultivated soil and media optimization using taguchi method. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 5, (7), 2754-2762.
14. Kaur, S., Kaur, S. and Kaur, K. (2014). Studies on β -cyclodextrin production from CGTase producing bacteria and its effect on drug solubility. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6, (10), 383-387.
15. Kulshreshtha, N. M., Upadhyay, D., Shrivastava, D., Chauhan, A. and Singh, N. K. (2020). Production And Optimization Of Cyclodextrin Glucanotranferase From Bacillus Sp. Ss2. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*, 10, (2), 159-165.
16. Lim, C. H., Rasti, B., Sulisty, J. and Hamid, M. A. (2021). Comprehensive study on transglycosylation of CGTase from various sources. *Heliyon*, vol. 7(2), e06305.

17. MacWilliams, M. P. (2009). Citrate test protocol. American Society for Microbiology Laboratory Protocols. Available online: <https://www.asmscience.org/content/education/protocol/protocol,3203>.
18. Makela, M. J., Korpela, T. K., Puisto, J. and Laakso, S. V. (1988). Nonchromatographic cyclodextrin assays: evaluation of sensitivity, specificity, and conversion mixture applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36, (1), 83-88.
19. More, S. S., Niraja, R., Evelyn, C., M Byadgi, A., Shwetha, V., & Das Mangaraj, S. (2012). Isolation, purification and biochemical characterization of CGTase from *Bacillus halodurans*. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, 7(1-2), 90-97.
20. Nakamura, N. and Horikoshi, K. (1976). Characterization and some cultural conditions of a cyclodextrin glycosyltransferase-producing alkalophilic *Bacillus* sp. *Agricultural and Biological Chemistry*. 40: (4). pp:753-757.
21. Pongsawasdi, P., & Yagisawa, M. (1987). Screening and identification of a cyclomalto-dextrin glucanotransferase-producing bacteria [*Bacillus circulans*]. *Journal of Fermentation and Bioengineering*.
22. Rajput, K. and Panchal, R. R. Rajput, K. (2016). Isolation of cyclodextrin glucanotransferase producing alkalophilic bacteria and optimization of culture Conditions for its production. *International Journal of pharma and Bio Science*. 8 (1). pp:333-338.
23. Ravinder, K., Prabhakar, T., Prasanthkumar, K., Venkata, G., Bhushan, P., & Venuka, N. (2012). Screening, isolation and characterization of cyclodextrin glycosyl transferase producing bacteria from soil samples. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3, 408-414.
24. Singh, P. and Kumar, S. (2019). Microbial enzyme in food biotechnology. In: Kuddus, M. *Enzymes in food biotechnology*. Academic Press. Indian Institute of Technology. Gandhinagar. India. pp: 19-23.
25. Sivakumar, N. and Banu, S. (2011). Standardization of optimum conditions for cyclodextrin glycosyltransferase production. *Food Engineering and Biotechnology*. Vol 6. pp:102-109
26. Stanković, S., BERIĆ, T., SIMIĆ, D., & PEŠIĆ, D. (2016). Determination of cyclodextrin production by cyclodextrin glycosyltransferase from alkalophilic *Bacillus circulans* strain B-65. *Botanica Serbica*, 40(1).
27. Stoll, V. S. and Blanchard, J. S. (1990). *Methods in Enzymology*. International Journal of Food Microbiology, 463. 24-38
28. Thombre, R. S. and Kanekar, P. P. (2012). Studies On Production of Cyclodextrin Glycosyl Transferase (CGTase) Enzyme Using Alkaphilic Bacteria Microbiology. Faculty of Science. University of Pune. Pune. India. 208.