

吡咯伯克霍尔德氏菌 B1213 产葡聚糖酶条件的优化

魏 莱¹, 程睿文¹, 王富强¹, 徐一人¹, 马景浩¹, 崔梓豪¹, 马艳莉³, 徐江琪⁴,
田进英¹, 范光森^{1,2*}

¹北京工商大学食品与健康学院 北京 100048

²北京工商大学 北京市食品添加剂工程技术研究中心 北京 100048

³南阳理工学院 河南省工业微生物资源与发酵技术重点实验室 河南南阳 473004

⁴北京工商大学 食品风味化学北京市重点实验室 北京 100048

摘要 以吡咯伯克霍尔德氏菌 B1213 为研究对象,优化其发酵产葡聚糖酶条件。首先,通过单因素实验对其培养条件(碳源种类、碳源粒度、碳源质量浓度、氮源种类、氮源质量浓度、转速、温度、装液量、接种量、初始 pH 值、表面活性剂种类、表面活性剂质量浓度和时间)进行初步优化,然后通过 Plackett-Burman 试验,筛选出 4 个显著影响 B1213 产葡聚糖酶的因素,再利用最陡爬坡试验确定其产葡聚糖酶的最大响应区域,最后通过 Box-Behnken 试验设计确定其最优产葡聚糖酶条件为:40~60 目麦麸质量浓度 50 g/L,酵母浸粉质量浓度 8 g/L,初始 pH 6.6,装液量 30 mL/250 mL,接种量 0.15%,曲拉通 100 质量浓度 25 g/L,温度 30 ℃,转速 160 r/min 和培养时间 83 h。在此培养条件下 B1213 产葡聚糖酶活力达到 1 230 U/mL。研究结果为细菌 B1213 在白酒酿造中的应用提供理论基础。

关键词 吡咯伯克霍尔德氏菌; 葡聚糖酶; 响应面法; 发酵条件; 麦麸

文章编号 1009-7848(2023)04-0168-13 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.04.017

葡聚糖酶是一类重要的水解酶,能降解谷物细胞壁等结构中葡聚糖的 β -葡萄糖苷键,在食品、酿造、饲料等行业具有广泛应用,可以制备功能性低聚糖,提高啤酒酿造的过滤效率,改善动物对谷物营养的吸收率等^[1-3]。在动物、植物和微生物中都有葡聚糖酶,其中微生物是葡聚糖酶的主要生产者^[4]。产葡聚糖酶的菌株种类丰富,包括细菌、霉菌、放线菌和酵母^[5-8]。筛选新颖微生物菌株是获取具有新颖酶学特性葡聚糖酶资源的重要途径。

我国白酒酿造环境是一个富含细菌、霉菌、放线菌和酵母的特殊自然态生境,其以富含丰富微生物的酒曲为专用糖化发酵剂,以高粱等谷物为原料,采用开放式的固态发酵酿制而成,在这一酿造过程中,形成了稳定且极具特色的菌系和酶系^[9-10]。白酒酿造的原料高粱、小麦、大麦等谷物的细胞壁中含有丰富的葡聚糖,因此,白酒酿造环境中不乏有降解葡聚糖的菌株,是筛选获得新颖葡

聚糖酶的优良生境^[11]。另外,探究白酒酿造环境中高产葡聚糖酶的优良菌株,通过对其适当强化来改善高粱等原料细胞壁的降解速率,从而实现原料中淀粉快速、充分地释放,提高原料的利用率,增加出酒率^[9,12]。然而,有关白酒酿造环境微生物产葡聚糖酶的相关研究较少,有待进一步挖掘^[9,11,13]。

前期,本研究团队从白酒酿造环境中获得 1 株新颖细菌,经鉴定为吡咯伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia pyrrocinia*),通过基因组分析发现该菌株含有 1 个第 8 家族葡聚糖酶,以麦麸为碳源,对其产葡聚糖酶进行初步发酵分析,结果发现该菌所产葡聚糖酶活力达到 674 U/mL,并实现了该酶的克隆和表达,是该菌产葡聚糖酶的首次报道^[12]。基于此,本文将对该菌产葡聚糖酶条件进行系统优化,为其产葡聚糖酶及在白酒中更好的应用提供理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 菌株与试剂

吡咯伯克霍尔德氏菌 B1213 为北京工商大学食品与健康学院食品微生物及酶技术研究团队自白酒酿造环境中筛选,并保存。

收稿日期: 2022-04-05

基金项目: 2021 年大学生科研与创业行动计划项目(G029);
北京市自然科学基金青年项目(6164029)

第一作者: 魏莱,男,本科生

通信作者: 范光森 E-mail: fanguangsen@btbu.edu.cn

大麦葡聚糖和葡萄糖标品,美国 Sigma 公司;其它试剂如未做特殊说明,均为国产生物或分析纯试剂;麦麸、玉米芯、甘蔗渣、酒糟、稻壳、大麦粉、玉米秸秆、咖啡渣、荞麦粉和棉花籽(均已粉碎至 20~40 目),河南新乡地区。

1.2 培养基

Luria-Bertani(LB)培养基:胰蛋白胨 10 g/L,氯化钠 10 g/L,酵母浸粉 5 g/L,自然 pH 值,115 °C 条件下灭菌 20 min。

初始发酵培养基:大麦粉 40 g/L,硫酸铵 1.3 g/L,磷酸二氢钾 0.37 g/L,七水硫酸镁 0.25 g/L,二水氯化钙 0.07 g/L,氯化铁 0.02 g/L,酵母浸粉 1.0 g/L,初始 pH 值为 6.0,分装于 250 mL 三角瓶中(每瓶 30 mL),121 °C 灭菌 15 min。

1.3 仪器和设备

YQX-SG46-280S 高压蒸汽灭菌器,上海博迅实业有限公司医疗设备厂;BCN-1360 型生物洁净工作台,北京东联哈尔仪器公司;电子天平、pH 计,赛多利斯科学仪器有限公司;HZQ-F160 全温振荡培养箱,太仓实验设备厂;DK-98-II A 电热

恒温水浴锅,天津市泰斯特仪器有限公司;TU-19 紫外-可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;Microfuge 2R 离心机,北京田林恒泰科技有限公司。

1.4 试验方法

1.4.1 吡咯伯克霍尔德氏菌 B1213 产葡聚糖酶条件优化

1.4.1.1 单因素实验 将吡咯伯克霍尔德氏菌 B1213 接种于 LB 液体培养基中,30 °C,120 r/min 活化培养 2 次,在 600 nm 波长下测得浊度为 1.1 时,按照 0.5%(V/V)接种量接种于初始发酵培养基中,30 °C,120 r/min 培养 96 h,发酵结束后于 4 °C,10 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,测定其葡聚糖酶活力。采用单因素考察碳源种类、碳源粒度、碳源质量浓度、氮源种类、氮源质量浓度、初始 pH、接种量、装液量、转速、温度、表面活性剂种类及质量浓度和时间等因素对吡咯伯克霍尔德氏菌 B1213 产葡聚糖酶的影响,具体因素与水平见表 1。每组试验做 3 个平行。

表 1 单因素及其试验水平

Table 1 Factors and levels of single factor design

因素	水平
碳源种类	麦麸、稻壳、荞麦粉、大麦粉、玉米芯、棉花籽、咖啡渣、酒糟、玉米秸秆、甘蔗渣
麦麸粒度/目	>10, 10~20, 20~40, 40~60, 60~80, 80~100 和 <100
麦麸质量浓度/g·L ⁻¹	20, 30, 40, 50, 60, 70
氮源种类	酵母浸粉、牛肉蛋白胨、硫酸铵、尿素、氯化铵、硝酸钠、胰蛋白胨、初始氮源(硫酸铵与酵母浸粉)
酵母浸粉质量浓度/g·L ⁻¹	2, 4, 8, 16, 32
初始 pH 值	3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10
接种量(V/V)/%	0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0
装液量/mL·(250 mL) ⁻¹	30, 60, 90, 120, 150
转速/r·min ⁻¹	120, 140, 160, 180, 200, 220
温度/°C	20, 25, 30, 35, 40
表面活性剂种类	吐温 20、吐温 40、吐温 60、吐温 80、曲拉通 100、曲拉通 114、丙三醇
曲拉通 100 质量浓度/g·L ⁻¹	2.5, 5, 10, 20, 40
时间/h	24, 48, 72, 96, 120, 144

1.4.1.2 PB 试验 结合单因素试验结果,本试验选用 N=15 的 PB 设计对 8 个因素进行考察,每个因素取+1 和-1 两个水平,响应值为葡聚糖酶活力(U/mL),试验设计的因素及其水平如表 2 所示。

1.4.1.3 最陡爬坡试验 根据单因素实验及 PB 试验结果,选取对葡聚糖酶活力有显著影响的因素进行最陡爬坡试验,因素的步移方向和步长依据 PB 试验获得的回归模型和试验经验进行设

定,共设置6个梯度,每个梯度3个平行(表3)。

1.4.1.4 响应面试验 根据PB和最陡爬坡试验结果,确定时间(h)、接种量(%、V/V)和初始pH值3个因素进行响应面试验,中心点为最陡爬坡试验中葡聚糖酶活力最高组(第2组)对应因素及其水平。响应面试验采用软件Design-Expert 11设计的Box-Behnken进行(如表4)。

1.4.2 葡聚糖酶活力及生物量测定 葡聚糖酶活力采用3,5-二硝基水杨酸(DNS)方法进行测定^[12],具体如下:摇瓶发酵液离心后(4℃,10 000 r/min,10 min),用pH 6.0的磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲液(50 mmol/L)适当稀释后,将25 μL稀释后的酶液与225 μL 1%的大麦葡聚糖溶液混合,于45℃反应10 min,然后加入250 μL DNS终止反应,沸水浴中15 min,再加入250 μL 40%的酒石酸钾钠溶液,冷却后于540 nm波长处测定吸光度值,以葡萄糖标准溶液绘制的标准曲线计算葡聚糖酶活力。

葡聚糖酶活力单位定义为:在上述反应条件下,每min生产1 μmol葡萄糖所需要的酶量为一个酶活单位(U/mL)。

生物量采用分光光度计于600 nm波长处测定吸光度值(OD_{600nm}值)。

1.4.3 数据分析 采用SPSS 24.0对试验数据进行差异显著性检验分析;利用Excel 2019和Design-Expert 11绘图软件绘制图表。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 碳源种类对B1213产葡聚糖酶的影响 葡聚糖酶是一种诱导酶,不同的碳源因所含有的组成成分、结构不同,而具有不同的诱导效果^[14]。本研究选用了麦麸、稻壳、荞麦粉等10种富含纤维素等成分的天然有机物,分别作为单一碳源进行诱导B1213产葡聚糖酶,如图1所示。可见,麦麸是B1213高产葡聚糖酶最佳碳源,产量达到624 U/mL。这可能是由于麦麸中不仅含有丰富的纤维素成分,诱导其高产葡聚糖酶,而且,还含有一定量的淀粉和蛋白质,为菌株B1213的生长和繁殖提供了必要的生长物质,促进菌体产酶。合适的碳源种类有利于诱导产生葡聚糖酶,而不同的菌株

表2 PB试验设计的因素水平

Table 2 Factors and levels of the variables in PB design for glucanase activity

因素	水平	
	-1	+1
X_1 (麦麸质量浓度)/g·L ⁻¹	30	70
X_2 (酵母浸粉质量浓度)/g·L ⁻¹	4	12
X_3 (接种量)/%	0.1	0.3
X_4 (装液量)/mL·(250 mL) ⁻¹	15	45
X_5 (曲拉通100质量浓度)/g·L ⁻¹	10	30
X_6 (时间)/h	60	132
X_7 (温度)/℃	25	35
X_8 (初始pH值)	6	8

表3 最陡爬坡试验设计及结果

Table 3 Experimental designs and the results of steepest ascent for glucanase activity

试验次数	接种量/%	曲拉通100质量浓度/g·L ⁻¹	时间/h	初始pH值	葡聚糖酶活力/U·mL ⁻¹
1	0.1	30	72	6	655
2	0.15	25	84	6.5	1219
3	0.2	20	96	7	907
4	0.25	15	108	7.5	548
5	0.3	10	120	8	447

表4 Box-Behnken试验因素及编码水平

Table 4 Factors and levels for the Box-Behnken design

因素	水平	
	-1	+1
A(时间)/h	72	96
B(接种量)/%	0.10	0.20
C(初始pH值)	6	7

其所产葡聚糖酶最佳的碳源种类可能有所不同,如枯草芽孢杆菌ZJF-1A5产葡聚糖酶的最佳碳源与本研究一致,为麦麸,黑曲霉突变株An08-752产葡聚糖酶最佳碳源种类为麦麸或大麦粉,而泡盛曲霉CAU33则以玉米芯作为碳源时葡聚糖酶活力最高^[15-17]。这一现象与碳源原料之间的差异以及菌株本身生理特性有关,如菌株所产生的酶系不同,利用相同碳源的能力则存在差异,从而

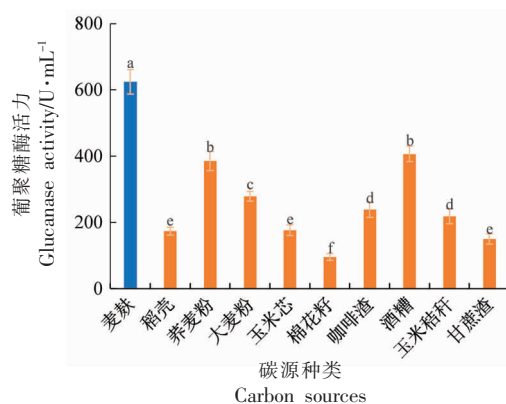
引起所产葡聚糖酶活力不同,即其所产酶的最佳碳源不尽相同。基于不同碳源种类对菌株 B1213 所产葡聚糖酶活力影响的结果,本研究选择麦麸作为后续优化其发酵产葡聚糖酶的碳源。

2.1.2 麦麸粒度对 B1213 产葡聚糖酶的影响 碳源粒度会影响微生物对碳源的附着、营养物质的利用率及发酵过程中的溶氧水平和剪切力大小,从而对微生物生长代谢产生一定的影响。由图 2 可见,随着麦麸粒度的减小,菌株 B1213 所产葡聚糖酶活力先增加后降低,在粒度为 40~60 目时,酶活力最高,达到 687 U/mL,为此,后续发酵选择 40~60 目的麦麸。麦麸粒度过大时,虽有利于细菌吸附,但两者接触的比表面积小,不利于营养物质的吸收利用,且溶氧量较低,剪切力相对较大,因此,不利于菌株 B1213 产葡聚糖酶;而粒度过小,细菌与麦麸接触的比表面积增大,剪切力降低,不利于细菌吸附,且溶氧量也较低,同样会降低其对麦麸中营养物质的吸收利用,影响其生长和产酶。一般而言,微生物发酵适合的碳源目数在 20~80 目,且细菌发酵产酶的碳源粒度略小于酶解,这主要是由于细菌细胞较小,较小粒度的碳源有利于细菌细胞对营养物质的吸收利用^[18-20]。

2.1.3 麦麸质量浓度对 B1213 产葡聚糖酶的影响

确定麦麸为最适碳源后,进一步考察麦麸质量浓度对菌株 B1213 产葡聚糖酶的影响。结果表明(图 3),麦麸质量浓度对产酶影响显著,随着质量浓度的增加,葡聚糖酶活力呈现先升高后略有降低的趋势,在麦麸质量浓度为 50 g/L 时,菌株 B1213 所产葡聚糖酶活力最高,为 727 U/mL。较低麦麸质量浓度,碳源不足,对微生物的生长和产酶有影响,而较高麦麸质量浓度,则会引起发酵培养基粘稠而影响溶氧量,从而对菌株产酶产生一定抑制作用。一般而言,采用农业废弃物作为碳源发酵产酶时,农业废弃物的质量浓度范围在 40~70 g/L 之间,此范围质量浓度的碳源不仅可以保证充足的能源需求和诱导产酶,而且具有较好的分散性,保障发酵所需溶氧量。如,泡盛曲霉 CAU33 发酵产葡聚糖酶最适玉米芯质量浓度为 55 g/L,黑曲霉 AN-13 产木聚糖酶最佳麦麸质量浓度为 54.2 g/L^[16,21]。

2.1.4 氮源种类对 B1213 产葡聚糖酶的影响 氮



注:相同的字母表示采用 Tukey test 检验时,组间没有显著差异($P>0.05$),下同。

图 1 不同碳源种类对菌株 B1213 产葡聚糖酶的影响

Fig.1 Effect of different carbon sources on the glucanase production by *B. pyrocinia* B1213

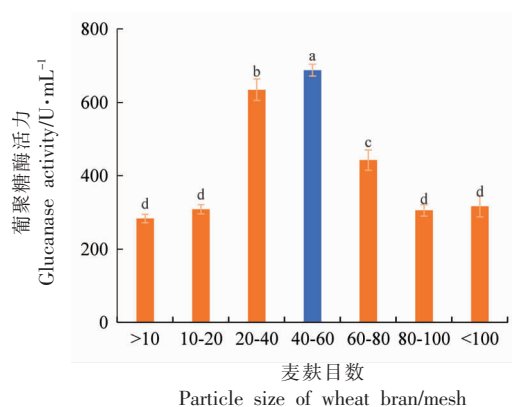


图 2 不同麦麸目数对菌株 B1213 产葡聚糖酶的影响

Fig.2 Effect of particle size of wheat bran on the glucanase production by *B. pyrocinia* B1213

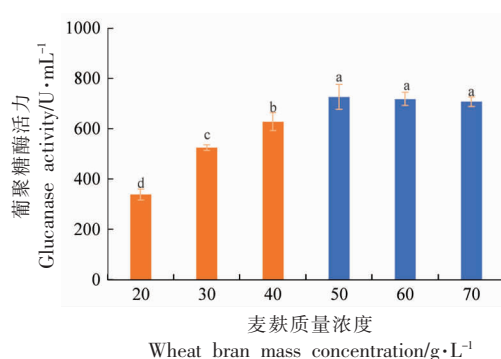


图 3 麦麸质量浓度对菌株 B1213 产葡聚糖酶的影响

Fig.3 Effect of wheat bran mass concentration on the glucanase production by *B. pyrocinia* B1213

源是微生物生长所需的重要营养物质,也是合成相应酶制剂的重要前体来源,对酶的合成影响很

大^[22]。不同氮源种类所含蛋白质结构、氨基酸组成或有效氮的存在形式不同,从而影响微生物对其利用情况,影响其生长和代谢及诱导产酶水平。通过试验发现(图4),细菌 B1213 可以较好的利用有机氮源或无机氮源合成葡聚糖酶,并且,在有效氮质量浓度一致时(0.366 g/L),以有机氮源所产葡聚糖酶活力优于无机氮源,这与大多数研究结果类似^[16,22]。然而,也存在少量菌株以无机氮源所产酶活力优于有机氮源^[4],这可能是由于不同种类微生物在利用氮源的效率方面存在一定差异。针对细菌 B1213 而言,以酵母浸粉、牛肉蛋白胨和胰蛋白胨分别作为单一氮源时,所产葡聚糖酶活力较高,尤其是酵母浸粉,这是因为这些氮源中不仅含有对应浓度的蛋白质,还含有其它生长因子,对细菌生长、繁殖和产酶具有一定促进作用。

2.1.5 酵母浸粉质量浓度对 B1213 产葡聚糖酶的影响 适量的氮源浓度有利于微生物产酶,浓度偏低则会影响到微生物的生长和新陈代谢,从而不利于微生物产酶,而浓度过高则因微生物快速生长和繁殖而消耗大量的其它营养物质,造成产酶阶段的营养失衡以及产生较多蛋白酶,也会对微生物产酶造成不利影响。结果表明,随着酵母浸粉质量浓度的提高,细菌 B1213 合成葡聚糖酶活力不断增加,当质量浓度超过 8 g/L 时,葡聚糖酶活力变化不明显,相比其它研究报道氮源浓度偏低,这可能是由于不同微生物对氮源的需求量不同,另外,本研究采用的碳源为麦麸,其含有一定量的氮源,这也是该菌株合成葡聚糖酶时所需氮源质量浓度偏低的原因之一^[4,16]。

2.1.6 pH 值对 B1213 产葡聚糖酶的影响 pH 值是调控微生物生长代谢重要的参数之一,其通过影响微生物细胞结构,尤其是细胞膜的通透性,微生物合成酶种类和组成以及营养物质的状态影响微生物代谢活动^[4]。由图 6 可知,随着初始 pH 值的增加,B1213 所产葡聚糖酶不断增加,当 pH 值为 5.0~9.0 时,酶活力较高,继续增加初始 pH 值,酶活力有所降低,这与 pH 值对该菌生长的影响结果一致。

2.1.7 接种量对 B1213 产葡聚糖酶的影响 接种量影响微生物的生长周期,是发酵产酶的关键因素之一。由图 7 所示,不同接种量对细菌 B1213 产

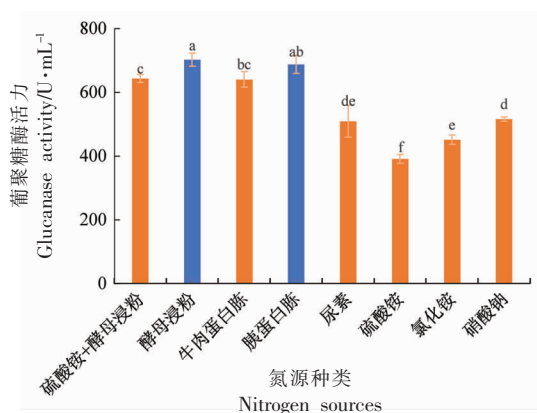


图4 氮源种类对细菌 B1213 产葡聚糖酶的影响
Fig.4 Effect of different nitrogen sources on the glucanase production by *B. pyrrocinia* B1213

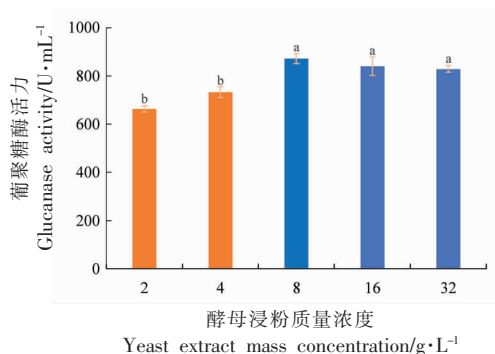


图5 酵母浸粉质量浓度对细菌 B1213 产葡聚糖酶的影响
Fig.5 Effect of yeast extract mass concentration on the glucanase production by *B. pyrrocinia* B1213

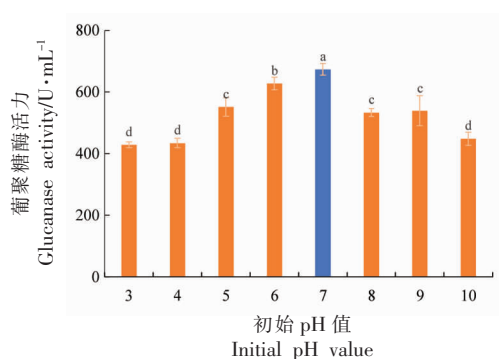


图6 初始 pH 值对细菌 B1213 产葡聚糖酶的影响
Fig.6 Effect of initial pH value on the glucanase production by *B. pyrrocinia* B1213

葡聚糖酶具有一定影响,随着接种量的增加,其所产葡聚糖酶活力呈现下降趋势。当接种量为 0.2%~0.5%时,酶活力最高,与大多数研究报道的细菌接

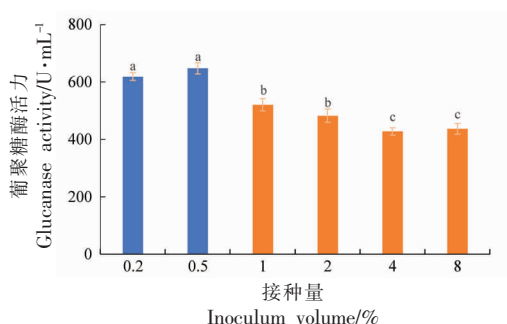


图 7 接种量对细菌 B1213 产葡聚糖酶的影响

Fig.7 Effect of inoculum volume on the glucanase production by *B. pyrrocinia* B1213

种量(一般控制在 1%~5%)相比偏低,然而也有少量研究报道的接种量与本文相似^[23-24]。不同的微生物细胞生长情况存在差异,细菌 B1213 经 2 次活化后,细胞生长代谢活跃,在低接种量时,便能快

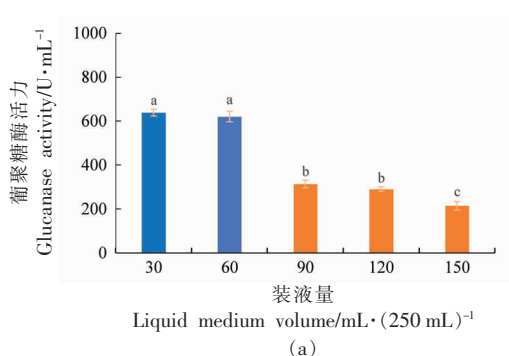


图 8 装液量(a)与转速(b)对细菌 B1213 产葡聚糖酶的影响

Fig.8 Effect of liquid medium volume (a) and shaking speed (b) on the glucanase production by *B. pyrrocinia* B1213

2.1.9 温度对 B1213 产葡聚糖酶的影响 温度是影响微生物生长和发酵的重要参数之一,通过温度的控制可以调控微生物代谢能力。由图 9 可知, B1213 产葡聚糖酶的最适温度为 30 ℃,这与该菌的最适生长温度一致,过低或过高的温度都会影响菌株的生长和繁殖,从而抑制其发酵产葡聚糖酶。一般而言,微生物生长和代谢产酶的最佳温度因种类不同而有所差异,如泡盛曲霉 CAU33 最适产葡聚糖酶温度为 35 ℃,而链霉菌 BRC1 和 BRC2 的最适产葡聚糖酶温度为 26 ℃^[16,26]。

2.1.10 表面活性剂种类及其浓度对 B1213 产葡聚糖酶的影响 表面活性剂是一种两亲物质,不同表面活性剂会在不同程度上影响微生物细胞膜

速适应发酵培养基环境而高产酶,在高接种量时,则因菌株快速大量的生长繁殖而消耗较多营养物质导致产酶水平下降。

2.1.8 装液量与转速对 B1213 产葡聚糖酶的影响

溶氧关系着微生物的生长代谢和发酵产物含量,是调控微生物发酵合成代谢产物的重要参数^[25]。适宜的溶氧量有助于微生物发酵产酶,而过低或过高则会影响微生物呼吸作用而影响微生物的生长或代谢,对微生物产酶产生抑制作用。在摇瓶发酵水平上,通常采用装液量和转速来调控溶氧量,装液量少,转速高,则溶氧量高,反之,则溶氧量低。由图 8 所示,随着装液量的增加, B1213 所产葡聚糖酶活力不断降低,而随着转速的增加,其所产葡聚糖酶活力先略有升高后降低,综合可见, B1213 需要较高的溶氧量,细胞相对比较敏感,难以承受高剪切力。

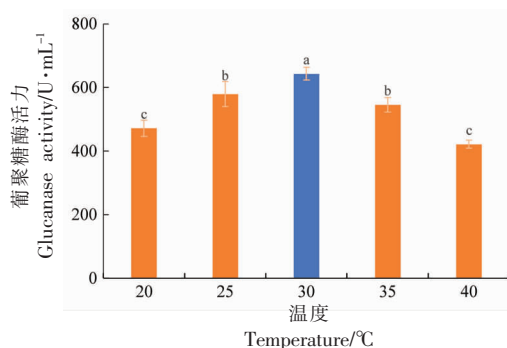
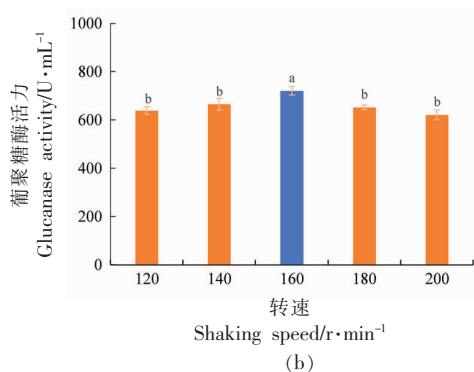


图 9 温度对细菌 B1213 产葡聚糖酶的影响

Fig.9 Effect of incubating temperature on the glucanase production by *B. pyrrocinia* B1213

的结构,引起细胞膜通透性发生变化而产生差异,从而使微生物细胞吸收营养物质、利用氧气及分

泌酶的能力产生变化,影响微生物产酶水平^[27]。由图 10 可知,除吐温 40 对 B1213 产葡聚糖酶有一定抑制外,吐温系列的表面活性剂对其产酶没有显著影响,曲拉通 114 对其产酶也未有显著差异,而曲拉通 100 则对其产酶具有促进作用,另外,甘油对其产酶有一定抑制作用。不同表面活性剂对微生物产酶的影响有一定差异,这与对应微生物细胞膜中成分和组成有关。确定曲拉通 100 对菌株 B1213 产葡聚糖酶具有促进作用后,考察其质量浓度对菌株 B1213 产葡聚糖酶的影响,结果如图 11 所示,在较低质量浓度时,其对产酶影响不显著,当质量浓度为 20 g/L 时,能够显著促进 B1213 产葡聚糖酶,质量浓度继续增大,则对细胞膜有一定的破坏,使细胞膜通透性过大,引起细胞内电解质外渗,导致各种代谢失调而引起产酶水平降低^[27]。

2.1.11 时间对 B1213 产葡聚糖酶的影响 在发酵前期,微生物主要进行生长和繁殖,在中后期进行主发酵产生代谢物和酶。不同微生物其对应的最佳产酶时间有所不同。由图 12 可知,随着培养时间的延长,细菌 B1213 发酵产葡聚糖酶水平升高,在培养 96 h 时,产葡聚糖酶活力最高,为 636 U/mL,继续延长培养时间,葡聚糖酶活力有所降低,这可能是由于其产生的蛋白酶对其降解速率高于其合成葡聚糖酶速率所致。一般而言,细菌最佳产酶时间略短于霉菌,如泡盛曲霉 CAU33 和裂褶菌产葡聚糖酶的最佳时间都为 144 h^[16,28]。

2.2 PB 试验

根据单因素实验结果,选取麦麸为碳源(粒度为 40~60 目),酵母浸粉为氮源,采用 PB 试验设计进一步分析麦麸质量浓度(X_1)、酵母浸粉质量浓度(X_2)、接种量(X_3)、装液量(X_4)、曲拉通 100 质量浓度(X_5)、时间(X_6)、温度(X_7)和初始 pH 值(X_8)8 个因素对细菌 B1213 产葡聚糖酶的影响,依据单因素优化实验结果,并考虑实验经济因素确定各因素中心值和高低水平,共设计 $N=15$ 的 PB 试验(表 5)。

通过对试验结果进行分析,得到最优回归方程为:

$$Y = 609.64 - 31.43X_1 + 42.66X_2 + 140.88X_3 + 24.80X_4 - 95.59X_5 + 205.28X_6 + 41.87X_7 + 115.96X_8$$

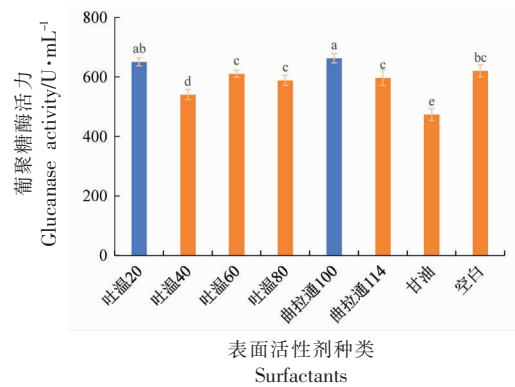


图 10 表面活性剂种类对细菌 B1213 产葡聚糖酶的影响
Fig.10 Effect of different surfactants on the glucanase production by *B. pyrocinia* B1213

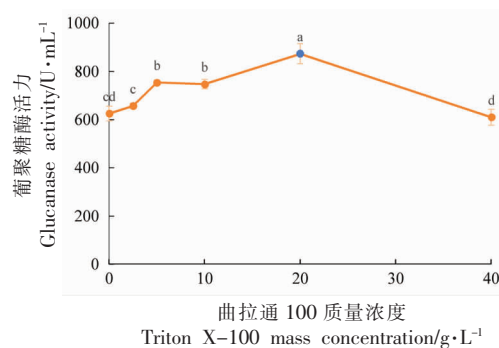


图 11 曲拉通 100 质量浓度对细菌 B1213 产葡聚糖酶的影响

Fig.11 Effect of Triton X-100 mass concentration on the glucanase production by *B. pyrocinia* B1213

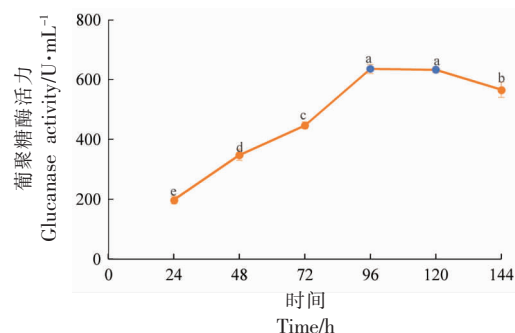


图 12 时间对细菌 B1213 产葡聚糖酶的影响

Fig.12 Effect of fermentation time on the glucanase production by *B. pyrocinia* B1213

通过方差分析(表 6)可以看出,回归模型极显著,相关系数 $R^2=0.9530$ 表明该模型能够很好的预测细菌 B1213 发酵合成葡聚糖酶活力。从表 7 可以看出,接种量、曲拉通 100 质量浓度、时间

和 pH 值对该菌产葡聚糖酶影响显著,因此,选择 PB 试验中的中心值。此 4 个因素进行后续爬坡试验,其它因素,则选取

表 5 PB 试验设计及结果

Table 5 Experimental design of PB and the results for glucanase activity

试验号	因素								葡聚糖酶活力/ $U \cdot mL^{-1}$
	X_1 (麦麸质量浓度)/ $g \cdot L^{-1}$	X_2 (酵母浸粉质量浓度)/ $g \cdot L^{-1}$	X_3 (接种量)/%	X_4 (装液量)/ $mL \cdot (250 mL)^{-1}$	X_5 (曲拉通 100 质量浓度)/ $g \cdot L^{-1}$	X_6 (时间)/h	X_7 (温度)/ $^{\circ}C$	X_8 (初始 pH 值)	
1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	856
2	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	406
3	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	772
4	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	976
5	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1 076
6	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	805
7	0	0	0	0	0	0	0	0	929
8	0	0	0	0	0	0	0	0	992
9	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	100
10	0	0	0	0	0	0	0	0	965
11	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	429
12	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	515
13	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	844
14	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	170
15	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	365

表 6 PB 试验回归方程方差分析

Table 6 Regression equation analysis of variance in PB design

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	1.077×10^6	8	1.346×10^5	12.67	0.0062
误差	53 128.74	5	10 625.75		
总离差	1.428×10^6	14			

$R^2=0.9530$

表 7 PB 试验模型偏回归系数与显著性检验分析

Table 7 Model partial regression coefficient and significance analysis in PB design

模型项	回归系数	标准误差	F 值	P 值	显著性
截距	609.64	-	-	-	-
麦麸质量浓度	-31.43	11 854.00	1.12	0.3392	
酵母浸粉质量浓度	42.66	21 842.77	2.06	0.2111	
接种量	140.88	238 154.82	22.41	0.0052	**
装液量	24.80	7 380.37	0.6946	0.4426	
曲拉通 100 质量浓度	-95.59	109 651.50	10.32	0.0237	*
时间	205.28	505 682.65	47.59	0.001	**
温度	41.87	21 039.21	1.98	0.2184	
初始 pH 值	115.96	161 361.95	15.19	0.0114	*

注:**. $P < 0.01$ 差异高度显著;*. $P < 0.05$ 差异显著;a. 可信度($\%$)= $(1-P \text{ 值}) \times 100$ 。

2.3 最陡爬坡试验

最陡爬坡试验设计及结果见表3,试验结果表明葡聚糖酶活力呈“抛物线”变化趋势,并且以第二组试验所获得的葡聚糖酶活力最高,即接种量为0.15%,曲拉通100质量浓度为25 g/L,诱导时间为84 h,pH=6.5时,葡聚糖酶活力为1 219 U/mL。因此,结合PB中因素显著性,选择第二组中的时间、接种量和初始pH值3个因素及其对应水平作为响应面试验的因素和中心点。

2.4 Box-Behnken 试验

根据Box-Behnken设计方法对时间、接种量和初始pH值进行响应面试验,结果如表8所示,利用Design-Expert软件处理试验结果,获得多元二次回归拟合方程如下:

$$Y = 1166.08 - 38.27A + 28.70B + 33.84C - 84.95AB - 17.74AC + 18.20BC - 269.39A^2 - 198.45B^2 - 127.03C^2$$

由方差分析(表9)的模型和失拟项P值显著可知,该方程拟合程度良好,可以利用该方程对菌株B1213产葡聚糖酶活力进行很好的预测,另外,

回归方程决定系数($R^2=0.9915$),也表明采用该二阶回归方程获得的预测值与真实值间具有很高的相关性。

方差分析结果(表9)表明,一次项A、B和C显著($P<0.05$),且3因素对葡聚糖酶活力的影响顺序为:时间>初始pH值>接种量,这与PB试验结果略有差异,可能是两者分析的因素数量及运算方法不同有关;另外, A^2 、 B^2 和 C^2 显著,表明这3个因素对菌株B1213产葡聚糖酶具有极显著的曲面效应;时间和接种量交互极显著,而其它交互作用不显著。由响应面图(图13)更为直观的看出,随各因素水平的增加,葡聚糖酶活力呈先上升后下降的趋势,拟合曲线均为凸形,有最大值,通过Design-Expert软件求解方程,得到预测最优条件:时间83 h、接种量0.15%和初始pH值6.6,在该条件下,葡聚糖酶活力的预测值为1 172 U/mL。按照上述条件进行验证,试验结果为1 230 U/mL,与模型预测值基本吻合,表明模型可靠。在该优化结果条件下,B1213所产葡聚糖酶活力相比单因素最高发酵水平(873 U/mL)提升了41%。

表8 Box-Behnken 试验设计及产葡聚糖酶活力结果

Table 8 The Box-Behnken design and the responses of the dependent variables

标准序号	试验序号	A(时间)/h	B(接种量)/%	C(初始pH值)	葡聚糖酶活力/U·mL ⁻¹
8	1	72	0.1	6.5	638
9	2	96	0.1	6.5	721
5	3	72	0.2	6.5	845
13	4	96	0.2	6.5	589
6	5	72	0.15	6	758
3	6	96	0.15	6	727
12	7	72	0.15	7	848
10	8	96	0.15	7	746
4	9	84	0.1	6	780
14	10	84	0.2	6	821
2	11	84	0.1	7	824
15	12	84	0.2	7	938
11	13	84	0.15	6.5	1 132
7	14	84	0.15	6.5	1 161
1	15	84	0.15	6.5	1 206

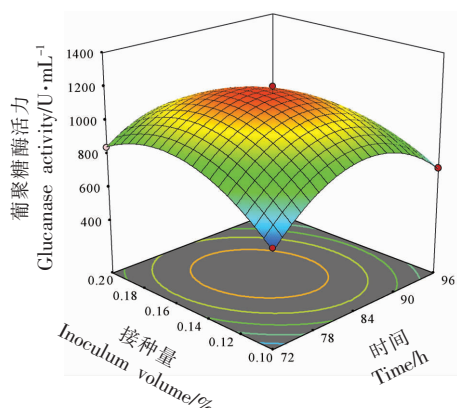
表9 Box-Behnken 试验设计回归方程方差分析

Table 9 Experimental design regression equation analysis of variance of the Box-Behnken design

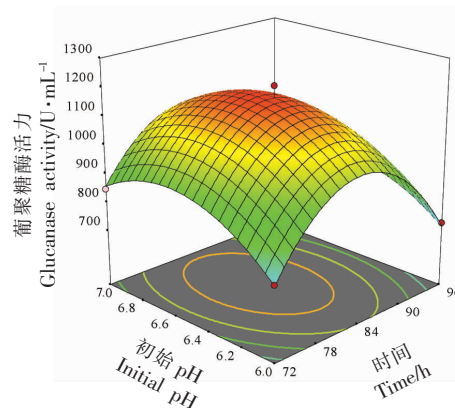
来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	4.769×10 ⁵	9	52 989.97	64.70	0.0001	***
A	11 719.04	1	11 719.04	14.31	0.0129	*
B	6 591.24	1	6 591.24	8.05	0.0364	*
C	9 159.81	1	9 159.81	11.18	0.0205	*

(续表 9)

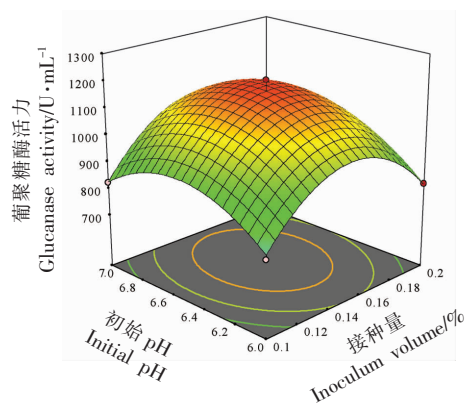
来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
AB	28 864.31	1	28 864.31	35.24	0.0019	***
AC	1 258.12	1	1 258.12	1.54	0.2702	
BC	1 325.69	1	1 325.69	1.62	0.2592	
A ²	2.680×10 ⁵	1	2.680×10 ⁵	327.15	<0.0001	***
B ²	1.454×10 ⁵	1	1.454×10 ⁵	177.53	<0.0001	***
C ²	59 584.11	1	59 584.11	72.75	0.0004	***
残差	4 095.25	5	819.05			
失拟值	1 334.43	3	444.81	0.32	0.8140	
纯误差	2 760.82	2	1 380.41			
相关系数	R ² =0.9915	R ² _{Adj} =0.9762				

注:***. $P < 0.001$ 差异极显著;**. $P < 0.01$ 差异高度显著;*. $P < 0.05$ 差异显著。

(a)时间与接种量之间的交互作用



(b)时间与初始 pH 值之间的交互作用



(c)接种量与初始 pH 值之间的交互作用

图 13 各因素间相互作用影响葡聚糖酶活力的响应曲面及其等高线图

Fig.13 The response surface interaction of variable and its contour plots on the glucanase activity response using the Box-Behnken design

3 结论

吡咯伯克霍尔德氏菌是 1 株白酒源功能微生物菌株,其在白酒酿造中可能发挥着重要的作用。本文基于前期研究发现,该菌株具有葡聚糖酶活性,故对其产葡聚糖酶活性进行研究,以期为其在

白酒中的应用提供理论价基础。首先,通过单因素实验考察了碳源种类、碳源质量浓度、碳源粒度、氮源种类、氮源质量浓度、初始 pH 值、接种量、装液量、转速、温度、表面活性剂种类、表面活性剂质量浓度和时间,分别对细菌 B1213 产葡聚糖酶活

力的影响,从中确定了对葡聚糖酶活力影响较大的潜在因素及其对应的因素水平;然后采用PB试验进一步确定了4个对葡聚糖酶活力影响较大的关键因素:接种量、曲拉通100质量浓度、时间和初始pH值;利用最陡爬坡试验对以上4个因素进行组合优化,获得Box-Behnken试验设计的中心值,最后采用响应面优化获得细菌B1213产葡聚糖酶的最佳条件为:麦麸粒度为40~60目,麦麸质量浓度为50g/L,酵母浸粉质量浓度为8g/L,初始pH值为6.6,装液量为30mL/250mL,接种量为0.15%,曲拉通100质量浓度为25g/L,在温度为30℃,转速为160r/min下,培养83h。在此培养条件下,其产葡聚糖酶活力达到1230U/mL,较优化前酶活力提高了41%。该研究有助于菌株B1213更好的在白酒酿造中发挥作用。

参 考 文 献

- [1] GAO M J, YANG G S, LI F F, et al. Efficient endo- β -1,3-glucanase expression in *Pichia pastoris* for co-culture with *Agrobacterium* sp. for direct curdolan oligosaccharide production [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 182: 1611-1617.
- [2] CANALES A M, GARZA R, SIERRA J A, et al. The application of a beta-glucanase with additional side activities in brewing [J]. Technical Quarterly, Master Brewers' Association of the Americas, 1988, 25(1): 27-31.
- [3] LAMP A E, EVANS A M, MORITZ J S. The effects of pelleting and glucanase supplementation in hulled barley based diets on feed manufacture, broiler performance, and digesta viscosity[J]. Journal of Applied Poultry Research, 2015, 24(3): 295-303.
- [4] 刘璐, 陈洲, 陈瑶瑶, 等. 黄曲霉产胞外 β -1,3-1,4-葡聚糖酶的发酵条件优化[J]. 食品科学技术学报, 2019, 37(1): 28-35.
LIU L, CHEN Z, CHEN Y Y, et al. Optimization of fermentation conditions for β -1, 3-1, 4-glucanase production by *Aspergillus flavus*[J]. Journal of Food Science and Technology, 2019, 37(1): 28-35.
- [5] WANG L L, RUAN H, ZHANG H E, et al. Characterization of a thermostable and acidic-tolerable beta-glucanase from aerobic fungi *Trichoderma koningii* ZJU-T[J]. Journal of Food Science, 2007, 72(9): C452-C456.
- [6] QIAO J Y, ZHANG B, CHEN Y Q, et al. Codon optimization, expression and characterization of *Bacillus subtilis* MA139 beta-1,3-1,4-glucanase in *Pichia pastoris*[J]. Biologia, 2010, 65(2): 191-196.
- [7] VAN RENSBURG P, VAN ZYL W H, PRETORIUS I S. Over-expression of the *Saccharomyces cerevisiae* exo-beta-1,3-glucanase gene together with the *Bacillus subtilis* endo-beta-1,3-1,4-glucanase gene and the *Butyrivibrio fibrisolvens* endo-beta-1,4-glucanase gene in yeast [J]. Journal of Biotechnology, 1997, 55(1): 43-53.
- [8] FAYAD K P, SIMAO-BEAUNOIR A M, GAUTHIER A, et al. Purification and properties of a beta-1,6-glucanase from *Streptomyces* sp EF-14, an actinomycete antagonistic to *Phytophthora* spp[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001, 57(1/2): 117-123.
- [9] 汪凌旭, 易卓林, 罗惠波, 等. 来源于不同表达菌株的 β -葡聚糖酶酶学性质比较[J]. 应用与环境生物学报, 2022(3): 1-10.
WANG L X, YI Z L, LUO H B, et al. Comparison of enzymatic properties of β -glucanase from different expression strains[J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2022(3): 1-10.
- [10] 范光森, 吴秋华, 刘朋肖, 等. 脂肪酶在白酒酯类化合物合成中的作用研究进展[J]. 中国食品学报, 2021, 21(1): 351-360.
FAN G S, WU Q H, LIU P X, et al. Research progress on the role of lipase in the synthesis of esters in *Baijiu*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(1): 351-360.
- [11] HUANG Y H, YI Z L, JIN Y L, et al. Metatranscriptomics reveals the functions and enzyme profiles of the microbial community in Chinese Nong-flavor liquor starter[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1747.
- [12] HU X Q, FAN G S, LIAO H, et al. Optimized soluble expression of a novel endoglucanase from *Burkholderia pyrrocinia* in *Escherichia coli*[J]. 3 Biotech, 2020, 10(9): 387.
- [13] ALI B, YI Z L, FANG Y, et al. Characterization of a fungal thermostable endoglucanase from Chinese Nong-flavor daqu by metatranscriptomic method[J].

- International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 121: 183–190.
- [14] TOBISCH S, GLASER P, KRUGER S, et al. Identification and characterization of a new beta-glucoside utilization system in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Bacteriology, 1997, 179(2): 496–506.
- [15] TANG X J, HE G Q, CHEN Q H, et al. Medium optimization for the production of thermal stable beta-glucanase by *Bacillus subtilis* ZJF-1A5 using response surface methodology[J]. Bioresource Technology, 2004, 93(2): 175–181.
- [16] 刘二伟, 杨绍青, 闫巧娟, 等. 泡盛曲霉液体发酵产 β -1,3-1,4-葡聚糖酶的条件优化[J]. 食品科学, 2017, 38(16): 29–35.
- LIU E W, YANG S Q, YAN Q J, et al. Optimization of liquid-state fermentation conditions for β -1,3-1,4-glucanase (lichenase) production by *Aspergillus awamori* [J]. Food Science, 2017, 38(16): 29–35.
- [17] 刘德海, 何蔚菀, 王红云, 等. 饲用葡聚糖酶高产菌株的选育及发酵条件研究[J]. 河南科学, 2010, 28(11): 408–411.
- LIU D H, HE W H, WANG H Y, et al. Screening of strain with high yield of β -glucanase on feeding and studies on fermentation conditions [J]. Henan Science, 2010, 28(11): 408–411.
- [18] 杨然, 张笑雨, 刘朋肖, 等. 耐热木聚糖酶菌株的筛选鉴定及发酵条件分析[J]. 食品科学, 2019, 40(18): 101–107.
- YANG R, ZHANG X Y, LIU P X, et al. Screening and identification of heat-resistant xylanase-producing strain and investigation of fermentation conditions[J]. Food Science, 2019, 40(18): 101–107.
- [19] 滕超, 范园园, 曲玲玉, 等. 嗜热真菌 *Talaromyces thermophilus* F1208 产木聚糖酶条件优化[J]. 中国食品学报, 2015, 15(8): 85–93.
- TENG C, FAN Y Y, QU L Y, et al. Optimization of high-producing xylanase by thermophilic fungi *Talaromyces thermophilus* F1208[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2015, 15(8): 85–93.
- [20] 朱运平, 褚文丹, 李秀婷, 等. 一株产木聚糖酶放线菌的液体发酵条件优化及水解特性研究[J]. 食品科学, 2012, 33(21): 177–182.
- ZHU Y P, CHU W D, LI X T, et al. Optimization of liquid fermentation conditions for xylanase production by a *Actinomyces* and characterization of the enzyme[J]. Food Science, 2012, 33(21): 177–182.
- [21] CAO Y, MENG D J, LU J, et al. Statistical optimization of xylanase production by *Aspergillus niger* AN-13 under submerged fermentation using response surface methodology[J]. African Journal of Biotechnology, 2008, 7(5): 631–638.
- [22] 范光森. 樟绒枝霉耐热木聚糖酶的纯化、性质和应用研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2014.
- FAN G S. Purification, characterization, and application of thermostable xylanases from *Malbranchea cinnamomea*[D]. Beijing: China Agricultural University, 2014.
- [23] 毛婷, 朱瑞清, 牛永艳, 等. 纤维素降解芽孢菌的筛选及产酶条件优化[J]. 中国酿造, 2020, 39(1): 71–76.
- TING M, ZHU R Q, NIU Y Y, et al. Screening and enzyme production conditions optimization of cellulose-degrading *Bacillus*[J]. China Brewing, 2020, 39(1): 71–76.
- [24] 陈朋, 朱玥明, 韩文佳, 等. 产褐藻胶裂解酶菌种的筛选、鉴定及发酵条件优化[J]. 食品科学, 2015, 36(15): 105–111.
- CHEN P, ZHU Y M, HAN W J, et al. Screening and identification of a *Bacterial* strain and optimization of medium composition and culture conditions for the production of alginate lyase[J]. Food Science, 2015, 36(15): 105–111.
- [25] FAN G S, LIU P X, CHANG X, et al. Isolation and identification of a high-yield ethyl caproate-producing yeast from *Daqu* and optimization of its fermentation[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 663744.
- [26] CHELLAPANDI P, JANI H M. Production of endoglucanase by the native strains of *Streptomyces* isolates in submerged fermentation[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2008, 39(1): 122–127.
- [27] 范光森, 杨绍青, 闫巧娟, 等. 嗜热棉毛菌固体发酵产木聚糖酶条件的优化[J]. 食品工业科技, 2012, 33(6): 219–224.
- FAN G S, YANG S Q, YAN Q J, et al. Optimization of xylanase production from *Thermomyces lanuginosus* CAU44 by solid-state fermentation [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(6): 219–224.
- [28] 熊云霞, 赵旭, 郑必胜. 裂褶菌发酵产 β -1,3-葡聚

糖酶条件的优化[J]. 现代食品科技, 2011, 27(6): 643-646, 633.
XIONG Y X, ZHAO X, ZHENG B S. Optimization

of fermentation conditions for producing β -1, 3-glucanase by *Schizophyllum commune*[J]. Modern Food Science and Technology, 2011, 27(6): 643-646, 633.

Optimization of Conditions of Glucanase Production by *Burkholderia pyrrocinia* B1213

Wei Lai¹, Cheng Ruiwen¹, Wang Fuqiang¹, Xu Yiren¹, Ma Jinghao¹, Cui Zihao¹, Ma Yanli³,
Xu Jiangqi⁴, Tian Jinying¹, Fan Guangsen^{1,2*}

¹*School of Food and Health, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048*

²*Beijing Engineering and Technology Research Center of Food Additives,
Beijing Technology & Business University, Beijing 100048*

³*Henan Key Laboratory of Industrial Microbial Resources and Fermentation Technology,
Nanyang Institute of Technology, Henan 473004, Nanyang*

⁴*Beijing Key Laboratory of Flavor Chemistry, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048*

Abstract In this study, the fermentation condition of glucanase production by *Burkholderia pyrrocinia* B1213 has been optimized. Firstly, cultural conditions (variety of carbon sources, particle size and mass concentration of carbon source, variety of nitrogen sources, mass concentration of nitrogen sources, shaking speed, temperature, liquid medium volume, inoculum volume, initial pH, variety of surfactants, mass concentration of surfactant and fermentation time) of B1213 were optimized by single-factor experiments. Then, four factors, signally affect production of glucanase by B1213 fermentation, were obtained by Plackett-Burman tests. The maximum response area of glucanase activity was determined by steepest ascent. Finally, Box-Behnken Design were used to ascertain the optimal condition of glucanase production. The optimal condition were: 40-60 mesh of wheat bran 50 g/L, yeast extract 8 g/L, initial pH 6.6, liquid medium volume 30 mL/250 mL, inoculum volume 0.15%, Triton X-100 25 g/L, incubating temperature 30 °C, shaking speed 160 r/min and fermentation time 83 h. Under the optimal condition, the activity of glucanase produced by B1213 were achieved 1 230 U/mL. This study provides academic value for application of bacteria B1213 in Baijiu brewing from the aspect of enzymes related to degradation of raw material for Baijiu brewing.

Keyword *Burkholderia pyrrocinia*; glucanase; response surface methodology; fermentation condition; wheat bran