

一株产纤维素酶枯草芽孢杆菌的麸曲制作 及其产酶特性研究

Study on the production of Fuqu and the characteristics of enzyme
about a cellulase producing *Bacillus subtilis*

郑自强^{1,2}

卫春会^{1,2}

邓杰^{1,2}

ZHENG Zi-qiang^{1,2}

WEI Chun-hui^{1,2}

DENG Jie^{1,2}

黄治国^{1,2}

ZHONG Ji-yu¹

任志强^{1,2}

HUANG Zhi-guo^{1,2}

REN Zhi-qiang^{1,2}

(1. 四川轻化工大学生物工程学院,四川 宜宾 644000;

2. 四川轻化工大学生酿酒生物技术及应用四川省重点实验室,四川 宜宾 644000)

(1. School of Biological Engineering, Sichuan University of Technology, Yibin, Sichuan 644000, China;

2. Sichuan University of Science & Engineering, Liquor Brewing Biotechnology and Application Key
Laboratory of Sichuan Province, Yibin, Sichuan 644000, China)

摘要:目的:为开发利用产纤维素酶菌种的资源利用率。

方法:采用产纤维素酶系齐全、活性高的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)XWS-A制作细菌麸曲,通过Box-Behnken响应面设计优化制曲工艺,并对其产酶特性进行探讨。**结果:**制曲最佳工艺为控制接种量7.5%,培养温度46℃,含水量46%,该工艺条件下生物量达到了(4.5±0.3)×10¹¹ CFU/g;成品麸曲具有3种纤维素酶活性,最佳测定条件下内切β-葡聚糖酶活力为(2 510±70) U/g,外切β-葡聚糖酶的活力为(15±2) U/g,β-葡萄糖苷酶的活力为(30±3) U/g。**结论:**制作麸曲有利于产纤维素枯草芽孢杆菌XWS-A获得有效增殖、提高产酶量及维持酶活性。

关键词:枯草芽孢杆菌;麸曲;工艺;纤维素酶;产酶特性

Abstract: Objective: In order to develop and utilize the resource utilization rate of cellulase producing strains. Methods: A *Bacillus subtilis* XWS-A with complete cellulase production system and high activity was used as the starting strain to make bac-

terial Fuqu. Box-Behnken response surface design was used to optimize the technology of Fuqu, and its enzyme production characteristics were explored. Results: The optimum conditions of Fuqu making were fixed inoculum amount of 7.5%, culture temperature of 46℃, water content of 46%. Under these conditions, *Bacillus subtilis* XWS-A was effectively proliferated, and the biomass reached (4.5±0.3)×10¹¹ CFU/g; Fuqu had three kinds of cellulase activities, and the best conditions for determination were endonuclease. The activity of endo-β-glucanase was (2 510±70) U/g. The activity of exo-β-glucanase was (15±2) U/g. The activity of β-glucosidase was (30±3) U/g. Conclusion: By making Fuqu, XWS-A can effectively proliferate and improve the enzyme production of the strain, and the Fuqu can maintain the enzyme activity of the strain. It provides an effective way for the efficient utilization of cellulase producing strains and the development and utilization of cellulose resources.

Keywords: *Bacillus subtilis*; Fuqu; process; cellulase; characteristics of enzyme production

基金项目:四川省科技厅应用基础研究项目(编号:2019YJ0462);四川省科技厅重点项目(编号:2018JY0509);自贡市科技创新项目(编号:2019CXMZ07);四川轻化工大学研究生创新基金项目(编号:y2020059)

作者简介:郑自强,男,四川轻化工大学在读硕士研究生。

通信作者:任志强(1985—),男,四川轻化工大学讲师,博士。

E-mail:zhiqren@foxmail.com

收稿日期:2021-07-07

纤维素在动植物中普遍存在,被称为最丰富的可再生能源之一,广泛应用于医药、食品、棉纺、环保行业,具有远大的经济开发前景^[1]。纤维素资源的利用经常需要进行降解处理,主要分为物理降解法、化学降解法和生物降解法,生物降解法因其绿色和低能耗的优点备受青睐,而生物降解法一般是通过利用产纤维素酶的微生物来实现的^[2]。纤维素酶是由细菌、真菌等微生物产生的能够

将纤维素降解成可发酵性糖的一系列酶类的总称,主要由内切 β -葡聚糖酶、外切 β -葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶3种酶构成,3种酶类的协同作用才能更好地将纤维素酶解^[3]。能够同时产内切 β -葡聚糖酶、外切 β -葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶菌株的酶系较为复杂,目前从自然界中筛选出的产纤维素酶菌株存在分解纤维素的酶解效率低,应用于实践生产难的局限性^[4]。

选育性能良好的产纤维素酶菌株是利用纤维素的基础。杨伟平等^[5]分离出一株能高效降解纤维素的细菌,鉴定为甲基营养型芽孢杆菌;黄玉兰等^[6]从土壤中筛选出一株纤维素酶高产菌株XW-1,其最佳的产酶条件下的酶活性为15.60 U/mL;胡丽娟等^[7]筛选出一株高产纤维素酶的突变株Y-9,经工艺优化后的酶活性可达28.62 U/mL。以往的研究大多只以羧甲基纤维素钠(CMC-Na)为底物测定内切 β -葡聚糖酶活力作为菌株纤维素酶活力参考,而少有对纤维素酶3种酶的酶活特性进行综合探讨,且对于纤维素生物降解的应用多采用直接接种的方式,造成酶生成量少、酶稳定性差、酶作用效率低等问题,无法满足现阶段工业上的应用需求。

鉴于目前的研究现状,在不降低产纤维素酶菌株的产酶特性条件下扩培菌种以及提高酶的稳定性变得尤为重要,产纤维素酶菌株的大规模应用首先需要扩大培养,制备麸曲是白酒行业比较常见的生产用菌扩培方式。麸曲一般以麸皮为原料,经处理后接种微生物培养产酶,工业上常通过制备麸曲的方式对纯种微生物进行扩培,提高经济效益^[7]。研究拟以一株产纤维素3种酶齐全、酶活性高的枯草芽孢杆菌——XWS-A^[8]为出发菌株制作细菌麸曲,利用Design-Expert 8.0.6软件设计试验优化工艺扩大菌种,并对成品麸曲的内切 β -葡聚糖酶、外切 β -葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶的活力进行测定,以期改善菌种应用价值,提高资源利用率,为开发利用纤维素资源提供一条新途径。

1 材料与方法

1.1 材料

XWS-A 菌种:酿酒生物技术及应用四川省重点实验室;

麸皮:市售;

羧甲基纤维素钠:淄博海澜化工有限公司;

微晶纤维素:河南德鑫化工实业有限公司;

水杨苷:上海源叶生物科技有限公司;

纤维素酶、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 KH_2PO_4 、DNS 试剂:分析纯,成都市科龙化工试剂厂。

1.2 仪器及设备

电子天平:CP214 型,奥豪斯仪器有限公司;

紫外可见分光光度计:UV-1200 型,翱艺仪器上海有

限公司;

高速冷冻离心机:5430R型,德国Eppendorf公司。

1.3 培养基

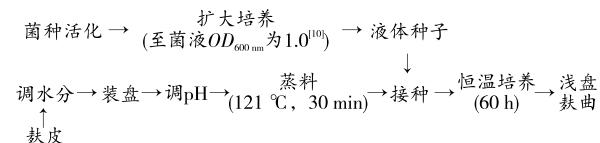
羧甲基纤维素钠(CMC-Na)培养基:羧甲基纤维素钠10 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4 g/L, NaCl 1.25 g/L, KH_2PO_4 1.0 g/L, MgSO_4 0.5 g/L, 琼脂粉 18 g/L, pH 7.0;

LB培养基:蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, NaCl 10 g/L, 琼脂粉 18 g/L, pH 7.0。

1.4 试验方法

1.4.1 麸曲枯草芽孢杆菌生物量测定 取 10 g 样品(麸曲)加入 90 mL 无菌水,作为 10⁻¹浓度,采用 LB 培养基稀释涂布计数^[9]。

1.4.2 麸曲工艺流程



1.4.3 枯草芽孢杆菌麸曲制作单因素试验 以芽孢杆菌生物量为指标,在前期预试验的基础上,确定原料采用全麸皮,固定培养时间为 60 h,分别考察不同接种量(1%, 3%, 5%, 7%, 9%, 11%)、培养温度(30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 °C)和含水量(30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%)对麸曲中 XWS-A 菌株生物量的影响。

1.4.4 枯草芽孢杆菌麸曲制作的响应面优化 根据单因素结果,运用 Design-Expert 8.0.6 软件设计试验 Box-Behnken 中心组合,以芽孢杆菌生物量为响应值,选取接种量、培养温度和含水量为试验因素,确定强化麸曲的工艺最优点^[11]。

1.4.5 麸曲纤维素酶活力的测定

(1) 标准曲线绘制:分别在比色管中加入 1.0 g/L 的葡萄糖标准溶液 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL, 各管分别补离子水至 1 mL, 再分别加入 1.5 mL DNS 试剂,沸水浴 5 min, 冷却后稀释至刻度线(25 mL),以不加葡萄糖标准溶液为空白,540 nm 处测定吸光值。

(2) 纤维素酶活力检测(DNS 法):分别在比色管中加入 0.5 mg/mL 酶液 0.1 mL 和质量分数为 1% 缓冲液 0.9 mL(内切 β -葡聚糖酶活力测定采用羧甲基纤维素钠柠檬酸缓冲液;外切 β -葡聚糖酶测定采用微晶纤维素柠檬酸缓冲液; β -葡萄糖苷酶测定采用水杨苷柠檬酸缓冲液),调节 pH,一定温度条件下水浴 10 min,加入 1.5 mL DNS 溶液终止反应,沸水浴 5 min,冷却后稀释至刻度线(25 mL),以先加入 DNS 溶液,后加入缓冲溶液和酶液作为空白,540 nm 处测定吸光值^[12]。

(3) 纤维素酶活力的定义:在 37 °C, pH 5.5 的条件下,每分钟从质量浓度为 4 mg/mL 的羧甲基纤维素钠溶

表 3 中心组合的回归方程方差分析

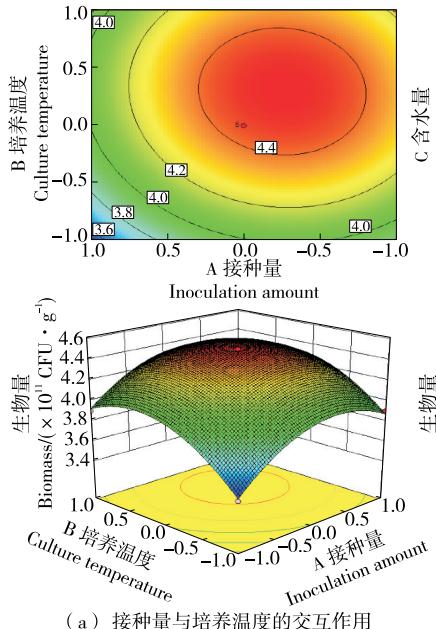
Table 3 Analysis of variance of regression equation of central combination

参数	平方和	自由度	平方均值	均值	P 值	显著性
模型	1.762	9	0.196	80.606	<0.000 1	显著
A	0.180	1	0.180	74.118	<0.000 1	
B	0.245	1	0.245	100.882	<0.000 1	
C	0.245	1	0.245	100.882	<0.000 1	
AB	0.003	1	0.003	1.029	0.344 1	
AC	0.062	1	0.062	25.735	0.001 4	
BC	0.022	1	0.023	9.265	0.018 7	
A^2	0.336	1	0.336	138.363	<0.000 1	
B^2	0.336	1	0.336	138.363	<0.000 1	
C^2	0.227	1	0.228	93.720	<0.000 1	
误差	0.017	7	0.002			
失拟	0.005	3	0.002	0.556	0.671 6	不显著
纯误差	0.012	4	0.003			
总和	1.778	16				

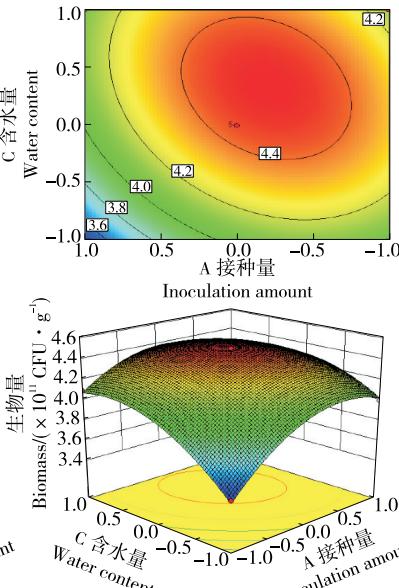
条件下即控制接种量 7.5%, 培养温度 46 ℃, 含水量 46%, 进行多次验证实验, 结果表明, 此条件下的成品曲生物量结果为 $(4.5 \pm 0.3) \times 10^{11}$ CFU/g, 与预测结果 4.5×10^{11} CFU/g 接近, 证明该响应面模型理想, 参数组合稳定可靠。

2.3 pH 及反应温度对枯草芽孢杆菌麸曲纤维素酶活性的影响

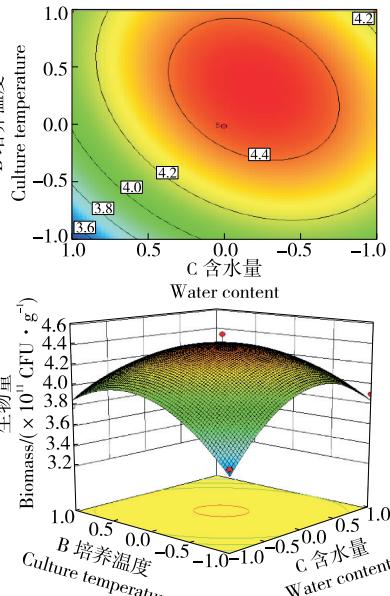
通过 Box-Behnken 响应设计优化制曲工艺, 成功对



(a) 接种量与培养温度的交互作用



(b) 接种量与含水量的交互作用



(c) 培养温度与含水量的交互作用

Figure 3 Interaction response analysis diagram

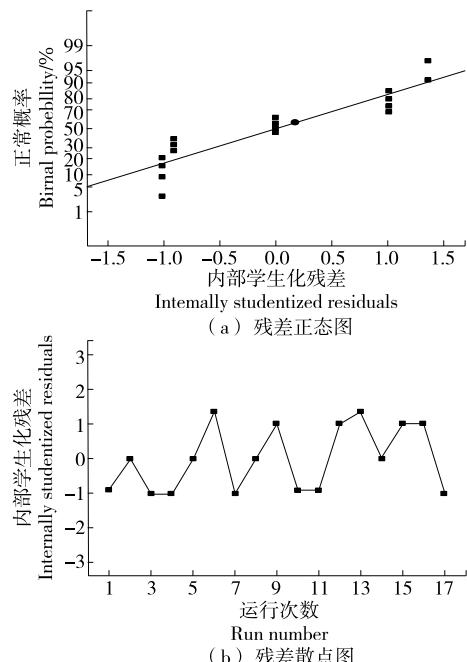


图 2 预测对应关系图

Figure 2 Prediction correspondence diagram

枯草芽孢杆菌 XWS-A 进行扩培, 而纤维素酶的测定没有具体的标准, 甚至同一种测定方法中, 处理条件的差异对酶活的测定结果也会产生较大影响^[16-17], 考虑到纤维素酶的酶学性质, 试验测定在不同 pH 及反应温度条件下枯草芽孢杆菌 XWS-A 麸曲的酶活, 结果见图 4。

由图 4 可知, 内切 β -葡聚糖酶、外切 β -葡聚糖酶与 β -葡萄糖苷酶在 pH 为 5.0 时, 酶活力达到最大值, 分别为

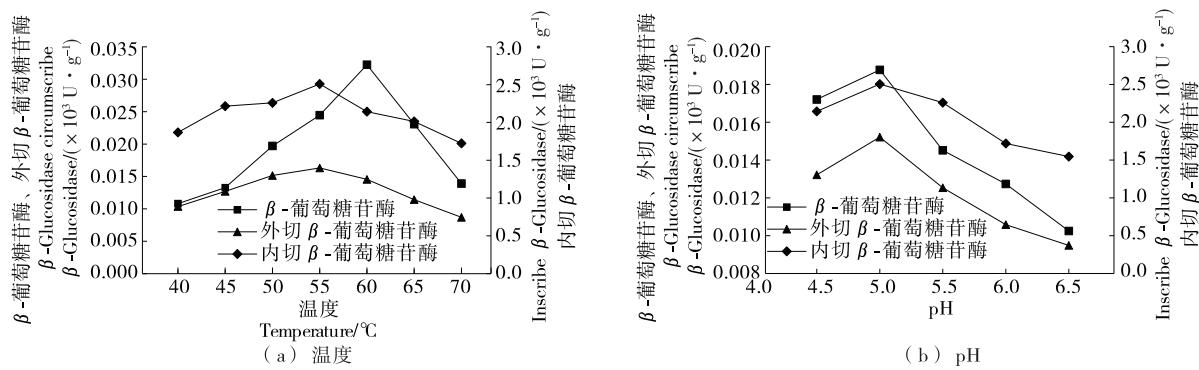


图 4 不同处理条件对纤维素酶活测定的影响

Figure 4 Effect of different treatment conditions on the determination of cellulase activity

(2 420±70), (15±1), (19±1) U/g; 酶是蛋白质, 高温会使蛋白质失活, 内切 β -葡聚糖酶活性在55℃时活力达到最大值(2 510±70) U/g; 外切 β -葡聚糖酶活性在55℃时活力达到最大值(15±2) U/g; β -葡萄糖苷酶活性在60℃时活力达到最大值(30±3) U/g。综合上述结果, 确定试验成品曲纤维素酶的酶活测定应控制pH为5.0, 内切 β -葡聚糖酶、外切 β -葡聚糖酶的反应温度为55℃, β -葡萄糖苷酶的反应温度为60℃。

3 结论

以XWS-A为出发菌株制作麸曲, 通过响应面设计优化制曲工艺, 并对成品曲的产酶特性进行了研究。其最佳工艺为: 控制接种量7.5%, 培养温度46℃, 含水量46%。该条件下XWS-A获得了有效的增殖, 其成品曲的生物量达到了(4.5±0.3)×10¹¹ CFU/g, 实现了XWS-A的扩培。

不同测定条件下内切 β -葡聚糖酶、外切 β -葡聚糖酶、 β -葡萄糖苷酶的活力皆有较大差异, 在最佳测定条件下内切 β -葡聚糖酶活力为(2 510±70) U/g, 外切 β -葡聚糖酶的活力为(15±2) U/g, β -葡萄糖苷酶的活力为(30±3) U/g。

但研究还存在部分待解决的问题, 如尚未大量开展中试及实际工业生产试验, 缺乏对纤维素资源的多种途径开发的实际生产数据, 下一步将计划从食品、环保、造纸等方向解决此问题, 以进一步完备理论支撑依据。

参考文献

- 陈嘉川, 颜家强, 张凯, 等. 微晶纤维素的制备及其在功能材料领域中的应用进展[J]. 中国造纸, 2021, 40(3): 63-70.
CHEN Jia-chuan, YAN Jia-qiang, ZHANG Kai, et al. Preparation of microcrystalline cellulose and its application in functional materials[J]. China Paper, 2021, 40(3): 63-70.
- 李鹏, 陈秀珍, 庄文颖. 高产纤维素酶的拟康宁木霉菌株 8985 固态发酵条件优化[J]. 菌物学报, 2021, 40(4): 743-758.
- LI Peng, CHEN Xiu-zhen, ZHUANG Wen-ying. Optimization of solid state fermentation conditions for the high cellulase producing strain Trichoderma koningiopsis 8985[J]. Journal of Fungi, 2021, 40(4): 743-758.
- KARIMI Avargani-mi. The promiscuous potential of cellulase in degradation of polylactic acid and its jute composite[J]. Chemosphere, 2021(1 526): 130443.
- 宫秀杰, 钱春荣, 于洋, 等. 近年纤维素降解菌筛选研究进展[J]. 纤维素科学与技术, 2021, 29(2): 68-77.
GONG Xiu-jié, QIAN Chun-rong, YU Yang, et al. Progress on screening of cellulose degrading strains in recent years[J]. Cellulose Science and Technology, 2021, 29(2): 68-77.
- 杨伟平, 郭雷锋, 赫倩. 纤维素分解菌的分离筛选及特性研究[J]. 中国畜牧杂志, 2019, 55(4): 110-114.
YANG Wei-ping, GUO Lei-feng, HE Qian. Isolation and characterization of cellulose decomposing bacteria[J]. Chinese Journal of Animal Husbandry, 2019, 55(4): 110-114.
- 黄玉兰, 李征, 刘晓宁, 等. 一株耐低温纤维素酶高产菌株的筛选、鉴定和产酶的初步试验[J]. 微生物学通报, 2010, 37(5): 637-644.
HUANG Yu-lan, LI Zheng, LIU Xiao-ning, et al. Screening and identification of a cold-adapted cellulase-producing bacteria[J]. Microbiology Bulletin, 2010, 37(5): 637-644.
- 胡丽娟, 薛高尚, 卢向阳, 等. 响应面法优化芽孢杆菌 25-2 产纤维素酶发酵条件[J]. 酿酒科技, 2012(4): 21-26.
HU Li-juan, XUE Gao-shang, LU Xiang-yang, et al. Optimization of fermentation conditions of Bacillus 25-2 for cellulase production by response surface methodology[J]. Brewing Technology, 2012(4): 21-26.
- 李永博, 黄治国, 赵阳, 等. 寨泥中产纤维素酶菌株的筛选鉴定及产酶特性的研究[J]. 食品科技, 2018, 43(2): 9-14.
LI Yong-bo, HUANG Zhi-guo, ZHAO Yang, et al. Screening, identification and characterization of production cellulase of the strain isolated from pit mud[J]. Food Science and Technology, 2018, 43(2): 9-14.
- 赵国俊, 范放, 傅晓琴. 电阻抗法检测食品中的细菌总数与平

- 板计数法的比较[J]. 广州食品工业科技, 1998(2): 63-65.
- ZHAO Guo-jun, FAN Fang. Comparison of the total number of bacteria in food detected by electrical impedance method and plate counting method[J]. Guangzhou Food Industry Science and Technology, 1998(2): 63-65.
- [10] 王晓勇, 荆旭, 赵恒山, 等. 应用响应面法对产糖化酶菌株 M1 制曲工艺的优化研究[J]. 酿酒, 2019, 46(5): 79-83.
- WANG Xiao-yong, JING Xu, ZHAO Heng-shan, et al. Optimization of koji-making process of strain M1 producing glucomylase based on response surface methodology[J]. Brewing, 2019, 46(5): 79-83.
- [11] 张旭姣, 闫裕峰, 周景丽, 等. 强化多微麸曲制备工艺优化及其在陈醋酒精发酵阶段的应用[J]. 中国酿造, 2020, 39(2): 129-134.
- ZHANG Xu-jiao, YAN Yu-feng, ZHOU Jing-li, et al. Optimization of preparation technology of fortified Fuqu with multi-microorganisms and its application in alcohol fermentation of aged vinegar [J]. Brewing in China, 2020, 39(2): 129-134.
- [12] ANWAR N, HASSAN N, Yusof N M, et al. High-titer bio-succinic acid production from sequential alkalic and metal salt pre-treated empty fruit bunch via simultaneous saccharification and fermentation [J]. Industrial Crops and Products, 2021, 166 (2): 113478.
- [13] 孙会刚, 徐慧敏, 黄天姿, 等. 产酸性纤维素酶细菌的筛选鉴定及其酶学性质[J]. 食品科技, 2021, 46(7): 55-59.
- 郑自强等:一株产纤维素酶枯草芽孢杆菌的麸曲制作及其产酶特性研究
SUN Hui-gang, XU Hui-min, HUANG Tian-zi, et al. Screening, identification and enzymatic properties of Acid Cellulase Producing Bacteria[J]. Food Science and Technology, 2021, 46(7): 55-59.
- [14] 郭燕, 钟迟迪, 董晓山, 等. 中高温大曲中酵母菌的分离及其在小曲酒中发酵性能初探[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(8): 78-84.
- GUO Yan, ZHONG Chi-di, DONG Xiao-shan, et al. Isolation and identification of yeast strains from near high temperature Daqu and characterization of their fermentation performance via brewing Baijiu by purebred rice Qu[J]. Food and Fermentation Industry, 2020, 46(8): 78-84.
- [15] 武顺, 王德良, 闫寅卓. 产吡嗪类细菌的麸曲制作工艺优化[J]. 中国酿造, 2016, 35(2): 13-17.
- WU Shun, WANG De-liang, YAN Yin-zhuo. Optimization of processing technology of Fuqu with pyrazine-producing bacteria[J]. China Brewing, 2016, 35(2): 13-17.
- [16] VARALAKSHMI K N, KUMUDINI B S, NANDINI B N, et al. Production and characterization of alpha-amylase from Aspergillus niger JGI 24 isolated in Bangalore[J]. Polish J Microbiol, 2009, 58 (1): 29-36.
- [17] 潘婉舒, 彭杨, 杜大钊, 等. 醋酸菌麸曲制备工艺的优化[J]. 食品与机械, 2018, 34(10): 206-211.
- PAN Wan-shu, PENG Yang, DU Da-zhao, et al. Optimization of preparation technology of acetic acid bacteria bran koji[J]. Food & Machinery, 2018, 34(10): 206-211.

中国油脂 (月刊)
国内邮发代号 52-129 国外发行代号 M5889
追踪学科发展动态 报道行业最新成果 关注油脂发展热点 共谋行业创新未来

<< 全国中文核心期刊 << 中国科技核心期刊
<< 中国科学引文数据库核心期刊 << 中国核心学术期刊
<< 中国精品科技期刊 << 中国期刊方阵双效期刊
<< 第二届国家期刊奖百种重点期刊 << 第三届国家期刊奖百种重点期刊

<< 美国《化学文摘》(CA) 收录期刊
<< 俄罗斯《文摘杂志》(AJ) 收录期刊
<< 美国《剑桥科学文摘》(CSA) 收录期刊
<< 日本《科学技术文献速报》(CBST) 收录期刊
<< 英国《农业与生物科学研究中心文摘》(CABA) 收录期刊

主要栏目
专题论述/油脂加工/油脂化学/油脂深加工/油料资源/油脂营养/油脂安全/综合利用/检测分析/应用技术/生物工程等。

各地邮局均可订阅, 我社常年办理邮购及逾期补订
A4开本 每本20元 全年240元
国际标准连续出版物号: ISSN 1003-7969 国内统一连续出版物号: CN 61-1099/TS
■银行转账: 开户单位: 中粮工科(西安)国际工程有限公司
账号: 607011580000004188 开户行: 西安银行劳动北路支行

地址: 陕西省西安市劳动路118号 邮编: 710082
电话: 029-88653157/88621360 传真: 029-88625310
E-mail: zyz@163.com 网址: www.chinaoils.cn

欢迎关注官方微博
 
微信号 新浪微博
微订网

《保鲜与加工》2022年征订征稿启事

中国科技核心期刊;RCCSE 中国核心学术期刊(A);中国农林核心期刊;中国北方优秀期刊;中国学术期刊(光盘版)收录期刊;《中文科技期刊数据库》(维普网)全文收录;万方数据-数字化期刊群全文上网;超星数据库全文收录;美国《化学文摘》(CA)收录期刊;英国《国际农业与生物科学研究中心》(CABI)收录期刊;英国《食品科技文摘》(FSTA)收录期刊
国际标准连续出版物号:ISSN 1009-6221
国内统一连续出版物号:CN 12-1330/S
邮发代号:6-146
月刊,每月20日出版,单价50元,全年600元。
在线投稿平台:www.bxyjg.com

《保鲜与加工》期刊是由天津市农业科学院主管主办的农产品采后技术研究领域的科技核心期刊,据中国知网的最新统计结果,复合影响因子为1.429。本刊主要报道农产品保鲜与加工相关领域基础理论、新技术、新工艺、新设备、新材料的研究成果及国内外相关行业的动态与信息。主要设置专家论坛、保鲜研究、加工研究、检测分析、信息与物流、专题论述、食品安全、技术指南、行业资讯、科普沙龙、科技前沿、政策法规等栏目。适于科技人员、农业技术推广人员、相关企业管理和技术人员、大专院校师生及广大从事保鲜与加工技术研发领域的人士参阅。

欢迎在全国各地邮局(所)或本编辑部订阅,欢迎广大读者踊跃投稿,并诚邀刊登公益广告。

通讯地址:天津市西青区津静公路17公里处《保鲜与加工》编辑部
邮编:300384 电话:022-27948711,联系邮箱:bxyjg@163.com