

纤维素酶水解啤酒糟的研究

梁如玉 杨婉身 冯明镜

(四川农业大学 雅安 625014)

马清泉

(中科院兰州化物所 OSSO 国家重点实验室 兰州 730000)

摘要 研究了纤维素酶水解啤酒糟的适宜条件以及底物预处理方法对纤维素转化率和多糖水解率的影响。在适宜条件下, 100g 干啤酒糟可水解得 10.8g 还原糖。酶解液用于培养酵母菌提取麦角固醇, 残渣是生产含菌体蛋白饲料的原料。

关键词 纤维素酶, 啤酒糟

随着啤酒生产的快速增长, 其有害废弃物对环境的污染日益加剧。啤酒糟是啤酒生产的主要有害废弃物, 占总量的 80% 以上^[1], 每年约有 2000 多万吨。目前, 啤酒糟大多作低价饲料、肥料直接出售, 因其含水率高, 不能久贮、易霉烂, 造成资源浪费。

近几年来, 我们从开辟新资源和治理环境污染方面考虑, 利用纤维素酶在适宜条件下水解啤酒糟中的不溶性纤维素, 将酶解液和残渣分别进行有效利用, 大大提高了啤酒糟的经济、社会和环境效益。本文报道以不同方法预处理啤酒糟, 用纤维素酶水解啤酒糟提高纤维素转化率、多糖水解率的研究结果。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 产酶菌株: 里斯木霉 (*Trichoderma reesei*), 由四川农业大学农学院应用微生物系提供。

1.1.2 生产菌体蛋白饲料的菌株: 产朊假丝酵母 (*Candida utilis*)、热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 二株, 保存于麦芽汁琼脂斜面上, 由四川农业大学农学院应用微生物系提供。将它们分别接种于麦芽汁液体培养基中, 28℃ 摇床振荡培养 36h, 即成酵母菌悬液。

1.1.3 啤酒糟: 取自四川省雅安啤酒厂, 鲜糟经压榨烘干, 粉碎为 0.5~1mm 的小颗粒。

1.2 方法

1.2.1 纤维素酶曲的制备: 啤酒糟粉 3g, 麦麸 7g, 豆饼粉 0.6g, 10% (NH₄)₂SO₄ 溶液 0.8ml, 10%NaNO₃ 溶液 1.2ml, 痕量金属盐溶液 1ml, 料水比 1:2, pH6.0。混匀分装入 500ml 三角瓶中, 灭菌后接种里斯木霉斜面孢子 2~3 环, 28℃ 培养 96h 成曲。成曲置 38~40℃ 下烘干、粉碎成曲粉备用。

1.2.2 啤酒糟的预处理方法

①酸预处理: 分别取不同浓度的 H₂SO₄ 150ml 盛入三角瓶中, 各加 20g 啤酒糟粉, 置不同温度下温浴 12h 后中和至 pH4.85。过滤, 弃去滤液, 于滤渣中加 150ml pH4.85 柠檬酸缓冲液, 煮沸灭菌, 冷却后酶解。

②高温高压预处理: 20g 啤酒糟粉装入 500ml 三角瓶中, 加 150ml pH4.85 柠檬酸缓冲液, 1×10⁵Pa, 30min, 冷却后酶解。

1.2.3 纤维素酶曲水解啤酒糟: 待预处理的啤酒糟冷却后, 按纤维与底物为 1:10 的比例加入纤维, 酶浓度为 100u/g 底物。50℃ 摇床振荡酶解, 定时取样测定还原糖和总糖量, 过滤后测残渣的纤维素含量, 酶解液定容为

100ml.

1.2.4 酶活力测定: CMC 酶活力测定^[2]。本试验用的纤维素酶活力的 1084.4u/g 干曲。

1.2.5 啤酒糟成分的测定方法: 纤维素、半纤维素、木质素的测定^[3]。粗脂肪: 索氏提取法^[2]。粗蛋白: 凯氏定氮法^[2]。淀粉: 改良康-爱浓法^[9]。可溶性糖的测定^[5]。

1.2.6 纤维素转化率的计算^[4]。

1.2.7 多糖水解率的计算^[5]。

1.2.8 还原糖、总糖量测定^[6]。

1.2.9 菌体蛋白饲料酵母菌细胞数: 用血球计数板法^[8]测定。

2 结果与讨论

2.1 啤酒糟的成分

湿啤酒糟含 20% 的干物质, 其中纤维素

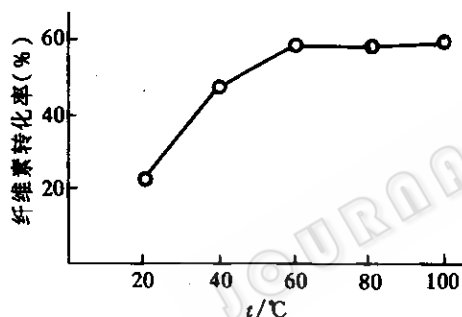


图1 不同温度下酸预处理对纤维素转化率的影响

17.1%、半纤维素 24.1%、淀粉 2.5%、可溶性糖 3.5%, 即总多糖占 47.2%, 另外含粗蛋白 29.1%、粗脂肪 8.4%、木质素 11.7%、灰分

表1 不同浓度 H_2SO_4 预处理啤酒糟酶解后释放出的总糖(TS)和多糖水解率

H_2SO_4 (mol/L)	上清液TS (mg/100ml)	酶解滤液TS (mg/100ml)	多糖水解率 (%)
CK	—	850	9.0
0.1	1292	2661	28.1
0.15	2030	4162	44.1
0.20	1935	4073	43.1
0.25	1862	4011	42.5

注: 本试验酸预处理后的上清液均弃去, 再加缓冲液进行酶解

3.6%。

2.2 啤酒糟的预处理

啤酒糟含植物纤维, 结构复杂, 结晶度和聚合度高, 对纤维素酶的水解表现很强的抗性^[4], 对啤酒糟进行预处理是为了提高底物对纤维素酶的作用敏感性, 以提高纤维素酶的酶解效率。

2.2.1 酸预处理: 由表1可见, 没有预处理的多糖水解率最小; 0.15mol/L H_2SO_4 预处理的多糖水解率最大; 在酸浓度小于 0.15mol/L 时, 多糖水解率随酸浓度增大而提高; 在浓度大于 0.15mol/L 后, 多糖水解率略有下降趋势, 故以 0.15mol/L 预处理啤酒糟效果最佳。

不同温度下进行酸预处理对底物纤维素转化率有影响(图1), 随酸预处理温度升高纤维素转化率呈上升趋势, 但 60℃ 之后, 基本上保持在同一水平上。从节约能源出发, 以 60℃ 进行酸预处理较理想。

2.2.2 高温高压预处理: 测定高温高压预处理啤酒糟的上清液及酶解液中的总糖(TS), 还原糖(RS)量, 并与 0.15mol/L H_2SO_4 预处理结果比较(表2)。酸预处理比高温高压预处理

表2 啤酒糟经预处理及酶解后所释放的还原糖(RS)、总糖(TS)量及多糖水解率

预处理	上清液		酶解滤液		多糖水解率 (%)
	RS	TS	RS	TS	
CK	—	—	425	850	9.0
H_2SO_4 (0.15mol/L)	1408	2030	2340	4162	44.1
高温高压	926	1710	2160	3832	40.6

注: 酸预处理的上清液弃去后再酶解; RS, TS均为 mg/100ml

释放出的 TS 和 RS 量高, 经这两种方法预处理后的啤酒糟, 酶解所释放出的 TS 和 RS 量都比未处理的(CK)高得多。表明预处理可大大促进底物纤维素的水解, 使多糖水解率提高 4~5 倍。

高温高压预处理后酶解效果虽不及酸处理, 但上清液不弃去, 其中的生物活性物质可供酵母菌利用, 有利于酵母细胞麦角固醇的积

累, 同时还可缩短工艺流程, 所以本试验采用高温高压预处理啤酒糟。

2.3 纤维素酶酶解啤酒糟的条件

2.3.1 酶解温度: 于不同温度下 (30、35、40、45、50、55、60、65℃) 进行酶解, 结果表明温度对酶作用影响较大, 最适温度为 50℃, 过高过低对酶的作用都不利。

2.3.2 酶解 pH: 用不同 pH 缓冲液使酶作用在相应的 pH 下 (pH3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5) 进行, 结果表明, 在 pH4.85 时酶活性最高, 底物纤维素转化率为 38.1%, 因此酶解的最适 pH 为 4.85。

2.3.3 酶解时间的影响: 试验结果表明 (图 2), 酶解作用净生成的还原糖量随时间的延长而增加, 12h 时每 100ml 酶解液中净增还原糖 2.16g, 在 12h 后还原糖量增加较少。因此, 12h 为经济有效的酶解时间。

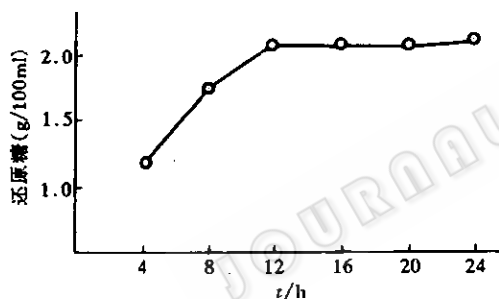


图 2 酶解时间对还原糖净生成量的影响

2.3.4 酶浓度的影响: 根据酶反应动力学, 在底物浓度足够高, 其它条件固定且不存在不利于酶发挥作用的情况下, 酶促反应速度和酶浓度成正比^[7]。本研究以固定底物量 (20g 经高温高压预处理的啤酒糟), 用不同酶浓度作酶解试验 (图 3), 随着酶浓度的增加, 净生成的还原糖量亦增加, 当酶浓度达到 100u/g 底物时, 100ml 酶解液净增还原糖 2.16g, 再加大酶浓度, 还原糖量增加甚少, 不完全符合酶动力学原理。主要原因是纤维素酶具有其它酶类很少有的特点, 如作用底物是结构不均一的水不溶性物质, 难以进行动力学研究; 纤维素酶是多组分酶系, 各组分间有协同作用, 形成多种终产物和涉及多种反馈抑制机理等。所以本试验

采用 100u/g 底物的酶浓度, 折合成酶曲, 酶曲量与底物的比例为 1: 10。

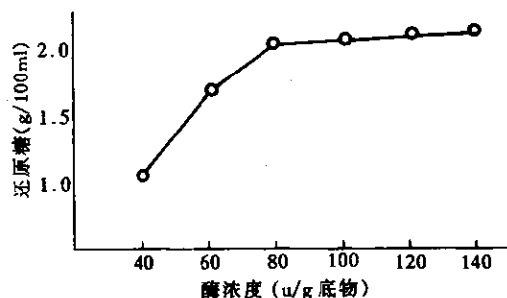


图 3 酶浓度对净生成还原糖量的影响

2.4 啤酒糟酶解液和残渣的利用

啤酒糟酶解液 12h 后过滤, 每 100ml 酶解液含还原糖 2.16g, 富含蛋白质、氨基酸、P、Ca 等矿质元素, 所以, 将酶解液用作培养酵母菌提取麦角固醇的培养基 (另文报道)。

酶解后的啤酒糟残渣, 营养丰富, 以残渣作主要原料, 加等量麸皮, 一定量的玉米面, 少量蔗糖、硫酸铵、尿素, 使其 pH 为 6, 测其蛋白质含量为 19.5%; 灭菌后, 按一定比例接种产阮假丝酵母、热带假丝酵母和二株酿酒酵母的菌悬液, 30℃ 培养 48h, 瞬时高温干燥, 即生产出菌体蛋白饲料。其酵母菌数 $70 \sim 80 \times 10^8$ 个/g 干重蛋白质含量由 19.5% 上升为 28.4%, 净增 8.9%, 略带酒香味, 提高了饲料品质和适口性。

综上所述, 以 0.15mol/L H_2SO_4 和高温高压预处理过的啤酒糟, 经纤维素酶水解净生成的还原糖量都比未预处理的高 4~5 倍, 多糖水解率亦提高 4~5 倍; 对含纤维素底物进行化学的或物理的预处理, 可大大提高底物对酶的敏感性, 减少底物的抗性, 提高纤维素转化率。纤维素酶水解啤酒糟的适宜条件为: pH4.85、温度 50℃、酶浓度为 100u/g 底物, 酶解 12h, 过滤得酶解液, 将此液用于培养酵母菌, 结果表明它既能满足酵母菌生长繁殖的需要, 有利于酵母细胞累积麦角固醇 (另文报道)。酶解后的残渣是生产菌体蛋白饲料的原料。

参 考 文 献

- [1] 冯霖, 江泉. 酿酒科技, 1995, 5: 33~34.
- [2] 文树基. 基础生物化学实验指导, 西安: 陕西科学技术出版社, 1994.
- [3] 王玉芳. 微生物学通报, 1987, 14(2): 81~84.
- [4] 王沁, 赵学慧. 微生物学杂志, 1992, 12(2): 6~9.
- [5] Beldman G, Henneken J, Voragen A G J. *Biotechnol Bioeng*, 1987, 30: 668~671.
- [6] 张龙翔. 生物生化实验方法和技术, 北京: 人民教育出版社, 1982.
- [7] 陈陶声. 酶制剂生产技术, 北京: 化学工业出版社, 1994, 439~449.
- [8] 冯清平, 葛瑞昌. 微生物应用技术, 兰州: 甘肃人民出版社, 1984, 86~87.
- [9] 朱懿德, 梁国庆. 工业发酵分析, 北京: 轻工业出版社, 1991.

STUDIES ON HYDROLYSIS OF BREWER'S GRAINS BY CELLULASE

Liang Ruyu Yang Wanshen Feng Mingjing

(Sichuan Agricultural University, Yaan 625014)

Ma Qingquan

(State Key Lab. for Oxo Synthesis and Selective Oxidation, Institute of Chemical Physics Academia Lanzhou, China 730000)

Abstract The optimum conditions of hydrolysis of brewer's grains by cellulase and the influence on the ratio of cellulose conversion and polysaccharide hydrolysis by means of pre treatment methods were studied. Under the optimum conditions, 10.8g reducing sugar(RS) could be produced from per 100g brewer's grains. The hydrolysate will be used to culture yeast to extract ergosterol, the residual lees is raw material of production of feed containing the fungal protein.

Key words Cellulase, Brewer's grains