

## 碱前处理白酒丢糟生物质转化苏云金芽胞杆菌培养基

沈小娟<sup>1</sup>, 何新新<sup>2</sup>, 王毅斌<sup>2</sup>, 丁海龙<sup>1</sup>, 关雄<sup>2\*</sup>, 邓波<sup>1\*</sup>

1. 泸州老窖股份有限公司, 四川 泸州 646000;

2. 福建农林大学, 生物农药与化学生物学教育部重点实验室, 福州 350002

**摘要:** 为了减少环境污染和资源浪费, 利用浓香型白酒丢糟作为原料生产还原糖用于培养苏云金芽胞杆菌(Bt)。采用不同浓度、温度、氢氧化钙和氢氧化钠前处理浓香型白酒丢糟, HPLC测定前处理液还原糖产量, 并利用前处理液培养Bt。结果表明, 用0.75% NaOH在100℃下处理1 h后, 还原糖产量最高(81 g/kg)。而芽胞产量最高的前处理条件为1% Ca(OH)<sub>2</sub>在50℃下处理1 h, 芽胞产量高达4.6×10<sup>7</sup> CFU/mL。利用白酒丢糟前处理液培养Bt, 既能有效的减少资源浪费和环境污染, 又能实现Bt制剂商业化。

**关键词:** 碱前处理; 白酒丢糟; 生物质; 苏云金芽胞杆菌

DOI: 10.3969/j.issn.2095-2341.2016.05.09

## Transition of Distillers' Grains Biomass by Alkali Pretreatment for *Bacillus thuringiensis* Cultivation

SHEN Xiao-juan<sup>1</sup>, HE Xin-xin<sup>2</sup>, WANG Yi-bin<sup>2</sup>, DING Hai-long<sup>1</sup>, GUAN Xiong<sup>2\*</sup>, DENG Bo<sup>1\*</sup>

1. Luzhou Laojiao Co., LTD., Sichuan Luzhou 646000, China;

2. Key Laboratory of Biopesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

**Abstract:** To minimize environmental contamination and waste of resource, distillers' grains (DG) from Chinese liquor industry was used to produce reducing sugars for *Bacillus thuringiensis* (Bt) cultivation. Ca(OH)<sub>2</sub> and NaOH were used to pretreat DG at different concentrations and temperatures. HPLC was used to determine the yield of reducing sugars, followed by cultivating Bt using distillers' grains extract. The results showed that the highest yield of reducing sugars were obtained by 0.75% NaOH for 1 h at 100℃ (81 g/kg). However, the highest spore count was obtained by 1% Ca(OH)<sub>2</sub> for 1 h at 50℃, and it was as high as 4.6×10<sup>7</sup> CFU/mL. DG methods could not only reduce industrial waste and environmental pollution, but also promote Bt industrialization.

**Key words:** alkali pretreatment; distillers' grains; biomass; *Bacillus thuringiensis*

木质纤维素是由纤维素、半纤维素和木质素组成, 农业及造纸业废弃物是木质纤维素的主要来源之一<sup>[1]</sup>。众所周知, 木质素作为物理屏障保护纤维素和半纤维素, 很难被降解<sup>[2]</sup>。因此, 为了增加纤维素和半纤维素的降解率, 需要对木质纤维素进行前处理<sup>[3]</sup>。前处理能破坏木质纤维素的复杂结构, 增加纤维材料表面孔径及数目, 使碳水化合物与相结合的木质素分离<sup>[4]</sup>。目前已经有很多前处理方法, 包括酸前处理<sup>[5]</sup>、氨爆炸

前处理和热水前处理等<sup>[6]</sup>。由于成本低、半纤维素转化率高, 酸前处理已被广泛应用于多种材料中。因为没有加入化学物质, 热水前处理能有效的避免污染问题且减少有毒物质产生。但酸前处理和热水前处理可能导致糠醛和脂肪酸的生成<sup>[7]</sup>。碱前处理能有效的去除木质素及水解半纤维素<sup>[8]</sup>, 且已有用氢氧化钠前处理小麦梗及水稻梗的报道<sup>[9,10]</sup>。

浓香型白酒丢糟是我国白酒行业的副产品,

收稿日期: 2016-05-30; 接受日期: 2016-06-24

基金项目: 四川省白酒酒糟窖泥 DGGE 和 PLFA 分析及酒糟发酵研究项目(ychx00018)资助。

作者简介: 沈小娟, 工程师, 主要从事科技项目管理工。E-mail: shenxj@lzlj.com。\* 通信作者: 关雄, 教授, 主要从事生物农药研究。

E-mail: guanxfafu@126.com。邓波, 高级工程师, 主要从事发酵工程研究。E-mail: dengbo@lzlj.com

年产量达 2 000 万 t<sup>[11]</sup>,且白酒丢糟产量呈每年递增趋势。白酒丢糟中含有蛋白质、脂肪、粗纤维等<sup>[12]</sup>,现已应用到多个产业,如生产饲料<sup>[13]</sup>、培养食用菌<sup>[14]</sup>和改良土壤<sup>[15]</sup>等,但始终存在着环境污染和资源浪费的严重问题。因此,我国白酒行业对白酒丢糟的处理和利用极为关注。浓香型白酒丢糟的主要成分是高粱和米糠,均含有丰富的木质纤维素,可以做为潜在的碳源以培养微生物。目前已有用酒糟发酵培养木霉和毛孢子菌生产生物油<sup>[16]</sup>、琥珀酸<sup>[17]</sup>的报道。因此,为充分利用白酒丢糟,避免造成环境污染及资源浪费,同时实现对 Bt 的扩大培养,本研究用氢氧化钙和氢氧化钠对白酒丢糟进行前处理,测定前处理后还原糖的产量,并利用还原糖发酵生产 Bt,进行 Bt 芽胞数的测定,以期对白酒丢糟的利用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试样品与菌株

白酒丢糟采集自四川省泸州市泸州老窖有限公司。所采集的白酒丢糟经 40℃ 烘箱烘干,用万能粉碎机粉碎,过 40 目筛,密封装袋,放置于-4℃ 备用。所用 Bt 菌株为本实验室分离菌株<sup>[18]</sup>。

### 1.2 培养基与试剂

液体 LB 培养基:5 g 酵母粉,10 g 胰蛋白胨,10 g 氯化钠,蒸馏水充分溶解,调 pH 至 7.2,定容至 1 L,分装后高压灭菌。

固体 LB 培养基:100 mL 液体 LB 培养基中加入 3 g 琼脂条,高压灭菌。

半乳糖醛酸、甘露糖、纤维二糖、鼠李糖、核糖、葡萄糖醛酸、半乳糖、葡萄糖、阿拉伯糖、木糖、乙醇、甲醇、氯仿及其他化学试剂均为分析纯,购自国药化学集团有限公司;乙腈(HPLC)、甲醇(HPLC)购自 MERCK 公司;醋酸铵(HPLC)购自 Solarbio 公司;3-甲基-1-苯基-5-吡啶啉酮(PMP)购自 SolarBio 公司。

### 1.3 白酒丢糟前处理

准确称取 5 g 烘干后的白酒丢糟粉末于 250 mL 锥形瓶中,加入 50 mL 蒸馏水,根据表 1 制成反应液,于对应的温度下反应 1 h。反应完毕后立即冰浴防止进一步反应,冷却后加入盐酸中和反应液。用 400 mL 蒸馏水分 4 次冲洗反应后的

白酒丢糟残渣,于 4℃、10 000 g 下离心 3 min,定容至 500 mL。取 20 mL 的溶液保存于-20℃,用于还原糖含量的测定。剩余的溶液每 100 mL 分装于 250 mL 三角瓶,高压灭菌,用于 Bt 的发酵培养。每处理设 3 次重复。

表 1 前处理条件

Table 1 Pretreatment conditions.

序号	处理方法	碱浓度(%)	温度(℃)
1		0.2	121
2		1.0	121
3	Ca(OH) <sub>2</sub>	2.0	121
4		4.0	121
5		1.0	100
6		1.0	50
7		0.5	121
8		0.75	121
9	NaOH	1.0	121
10		2.0	121
11		0.75	100
12		0.75	50

### 1.4 HPLC 还原糖的测定

分别精密称取核糖、半乳糖、鼠李糖、木糖、阿拉伯糖、葡萄糖、纤维二糖、甘露糖、半乳糖醛酸和葡萄糖醛酸各 0.036 g,加入 100 mL 10% 甲醇水溶液定容至刻度,摇匀,超声脱气 2 min,作为还原糖测定标准液保存于 4℃。柱前衍生的方法参照 Dai<sup>[19]</sup>的方法进行。色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C18 柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相为乙腈-0.5 mol/L 醋酸铵缓冲液(16:84);柱温 30℃;流速 1.0 mL/min;检测波长 250 nm;进样量 10 μL。

### 1.5 Bt 发酵和芽胞数的测定

培养液的准备方法参照 Yezza<sup>[20]</sup>的方法,转接 2%(V/V)的培养液于 100 mL 白酒丢糟培养基中,30℃ 培养 48 h。将发酵液稀释到适合的浓度,放置于 80℃ 水浴锅中水浴 10 min,用稀释涂布法进行芽胞数的测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 氢氧化钙前处理

由图 1 可知,获得最高还原糖产量的氢氧化钙前处理条件为 0.2% Ca(OH)<sub>2</sub>和 121℃,还原糖

产量为 56 g/kg。其次为 1%  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  和 50℃。在 121℃ 处理下,随着  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  浓度的提高,还原糖产量下降。这可能由于还原糖与高浓度的碱发生了进一步的反应,导致还原糖产量降低。

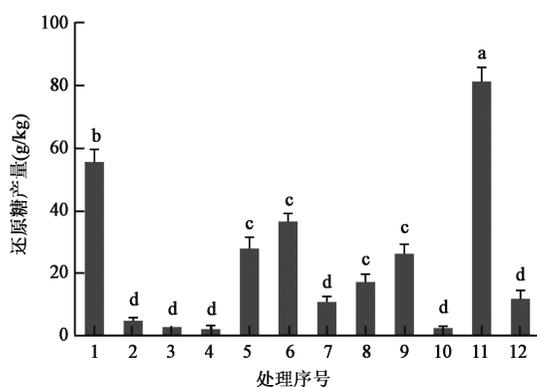


图 1 还原糖产量

Fig.1 Yield of reducing sugars.

注:不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

## 2.2 氢氧化钠前处理

如图 1 所示,当氢氧化钠浓度由 0.5% 开到 1.0% 时,还原糖产量与浓度成正比,但当 NaOH 浓度为 2.0% 时,还原糖产量显著降低。最高还原糖产量为 0.75% NaOH 100℃ 处理 1 h (81 g/kg)。这可能是由于随着浓度和温度的升高,NaOH 与还原糖进一步反应,将木糖和葡萄糖进一步降解为糠醛<sup>[21~23]</sup>。

## 2.3 芽胞产量

前处理液培养 Bt 后的芽胞产量如图 2 所示,在稀释倍数为  $10^7$  条件下,1%  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  和 50℃ 处理下芽胞产量最高 ( $4.6 \times 10^7$  CFU/mL),高于还

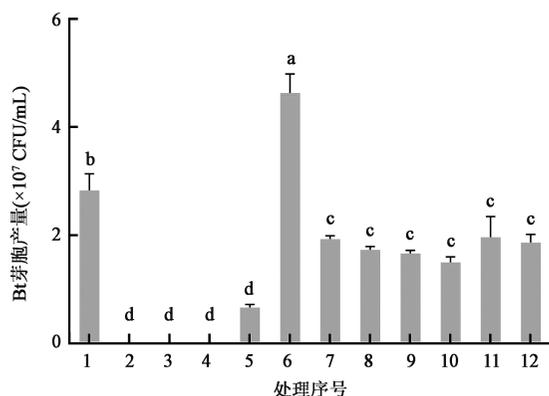


图 2 Bt 芽胞产量

Fig.2 Spore counts of Bt.

注:不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

原糖产量最高的前处理液。这一结果可能由两个因素造成,首先,由于 Bt 在一定碳氮比例下才能更好的生长,这一浓度的还原糖可能适合 Bt 的培养;其次,该处理条件为 Bt 提供了足够的钙离子,有利于 Bt 的生长。在 1%、2% 和 4% 的  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  前处理液中 Bt 芽胞产量为 0,这有可能是由于还原糖浓度过低及钙离子浓度过高而抑制了 Bt 的生长。

## 3 讨论

浓香型白酒丢糟营养丰富,含有大量的残余蛋白、维生素及微量元素等<sup>[24]</sup>,还含有丰富的发酵产物如酵母和活性因子等<sup>[25]</sup>。但白酒丢糟成酸性,含水量高,极易霉烂,若处理不当,会导致环境污染。虽然已有前人将生产乙醇的丢糟进行前处理,但很少有关白酒丢糟纤维素和半纤维素转化为还原糖的报道。由于乙醇发酵与白酒发酵的原材料不同<sup>[26]</sup>,乙醇发酵生产的原材料为玉米,但白酒发酵的主要原材料为高粱与米糠,因此,乙醇丢糟与白酒丢糟成分有很大的区别。木质纤维素作为世界上第二大再生资源<sup>[2,27]</sup>,若不加以利用,会造成资源浪费。为充分利用木质纤维素,前人通过不同的前处理方法去除木质素及半纤维素,并通过酶处理将纤维素转化为还原糖<sup>[4]</sup>。众所周知,纤维素酶价格高昂,而本研究仅用氢  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  前处理就能获得理想的 Bt 芽胞产量,极大地降低了 Bt 发酵培养的成本。因此,本研究用  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  和 NaOH 对白酒丢糟进行前处理,将白酒丢糟中的纤维素和半纤维素转化为还原糖,用于 Bt 的发酵培养,可有效防止白酒丢糟霉变污染环境,实现了资源的有效利用。

中国白酒种类繁多,按香味可分为浓香型、清香型、酱香型、米香型和其他香型,其中浓香型白酒以泸州老窖和五粮液为代表。虽然浓香型白酒的发酵工艺与其他香型白酒的发酵工艺有少量的区别,但主要原材料等大致相同,白酒丢糟的成分差异不大。因此,碱前处理可以应用于其他香型的白酒丢糟,但需要进行一些条件的摸索。

Bt 作为广泛应用于农业害虫防治的昆虫致病菌,对鳞翅目、鞘翅目、双翅目等多种昆虫有杀虫活性<sup>[28]</sup>。Bt 对生长繁殖所需的营养要求不太严格,在以农副产品为主要原料的培养基中即可

生长。且在前期研究中,已从白酒丢糟分离出一株 Bt,说明白酒丢糟环境可达到 Bt 发酵生产的要求<sup>[18]</sup>。因此,使用白酒丢糟浸提液对 Bt 进行发酵,一方面既满足了 Bt 扩大培养的需要,另一方面又实现了白酒丢糟资源的二次利用。且白酒丢糟价格低廉,处理简易,大大的降低了 Bt 发酵培养成本。综上所述,白酒丢糟发酵培养 Bt 应用于实际生产具有切实的可行性。

### 参 考 文 献

- [1] Behera S, Arora R, Nandhagopal N, *et al.*. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocelluloses biomass [J]. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 2014, 36: 91-106.
- [2] Huang D L, Zeng G M, Jiang X Y, *et al.*. Changes of microbial population structure related to lignin degradation during lignocellulosic waste composting [J]. *Bioresour. Technol.*, 2010, 101: 4062-4067.
- [3] Daorattanachai P, Viriya-empikul N, Laosiripojana N, *et al.*. Effects of kraft lignin on hydrolysis/dehydration of sugars, cellulosic and lignocellulosic biomass under hot compressed water[J]. *Bioresour. Technol.*, 2013, 144: 504-512.
- [4] Toquero C, Bolado S. Effect of four pretreatments on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of wheat straw. Influence of inhibitors and washing [J]. *Bioresour. Technol.*, 2014, 157: 68-76.
- [5] Nouredini H, Byun J. Dilute-acid pretreatment of distillers' grains and corn fiber [J]. *Bioresour. Technol.*, 2010, 101: 1060-1067.
- [6] Kim Y, Hendrickson R, Mosier N S, *et al.*. Enzyme hydrolysis and ethanol fermentation of liquid hot water and AFEX pretreated distillers' grains at high-solid loadings [J]. *Bioresour. Technol.*, 2008, 99: 5206-5215.
- [7] Hendriks A T, Zeeman G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass [J]. *Bioresour. Technol.*, 2009, 100: 10-18.
- [8] Kang K E, Jeong G T, Park D H. Pretreatment of rapeseed straw by sodium hydroxide [J]. *Bioproc. Biosyst. Engin.*, 2012, 35: 705-713.
- [9] Akhtar M S, Saleem M, Akhtar M W. Saccharification of lignocellulosic materials by the cellulases of *Bacillus subtilis* [J]. *Int. J. Agr. Biol.*, 2001, 3 (2): 199-202.
- [10] Oberoi H S, Babbar N, Sandhu S K, *et al.*. Ethanol production from alkali-treated rice straw via simultaneous saccharification and fermentation using newly isolated thermotolerant *Pichia kudriavzevii* HOP-1 [J]. *J. Ind. Microbiol. Biot.*, 2012, 39: 557-566.
- [11] 张 轩,赵述森,陈海燕,等. 酿酒酵母固态发酵白酒糟生产蛋白饲料的研究 [J]. *饲料工业*, 2012, 19: 27-31.
- [12] 袁 颢,邱树毅,彭正东,等. 固态白酒生产酒糟的资源化利用研究进展 [J]. *酿酒科技*, 2012, 5: 79-82.
- [13] 乔家运,冯占雨,王文杰,等. 利用白酒糟固态发酵生产猪用生物饲料的研究及应用 [J]. *养猪*, 2013, 11: 38-41.
- [14] 游 玲,王 涛,祝晓波,等. 浓香型白酒丢糟生产茶树菇的初步研究 [J]. *酿酒科技*, 2009, 6: 99-101.
- [15] 高 路. 酒糟的综合利用 [J]. *酿酒科技*, 2004, 5: 101-102.
- [16] Li X S, Lu B S, Tang W. Production of microbial oils cofermented by *Trichoderma koningii* Daqu distiller's grains [J]. *J. Central South Univ.*, 2011, 18: 1738-1743.
- [17] Zhou X B, Zheng P. Spirit-based distillers' grain 163177-181 as a promising raw material for succinic acid production [J]. *Biotechnol. Lett.*, 2013, 35: 679-684.
- [18] 郑 琦,邓 波,关 雄,等. 酒糟和窖泥中苏云金芽孢杆菌的分离及鉴定 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2014, 2: 293-298.
- [19] Dai J, Wu Y, Chen S W, *et al.*. Sugar compositional determination of polysaccharides from *Dunaliellasalina* by modified RP-HPLC method of precolumnderivatization with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone [J]. *Carbohydr. Polym.*, 2010, 82: 629-635.
- [20] Yezza A, Tygai R D, Valero J R, *et al.*. Bioconversion of industrial wastewater and wastewater sludge into *Bacillus thuringiensis* based biopesticides in pilot fermentor [J]. *Bioresour. Technol.*, 2006, 97: 1850-1857.
- [21] Kim I, Lee B, Park J Y, *et al.*. Effect of nitric acid on pretreatment and fermentation for enhancing ethanol production of rice straw [J]. *Carbohydr. Polym.*, 2014, 99: 563-567.
- [22] Kundu C, Lee J W. Optimization conditions for oxalic acid pretreatment of deacetylated yellow poplar for ethanol production [J]. *J. Ind. Engin. Chem.*, 2015, 32: 298-304.
- [23] Xu Y, Hanna M A. Optimum conditions for dilute acid hydrolysis of hemicellulose in dried distillers grains with solubles [J]. *Ind. Crops Prod.*, 2010, 32(3): 511-517.
- [24] 秦广利,郭坤亮,汪 强,等. 纤维素酶对白酒酒糟资源化利用研究 [J]. *酿酒科技*, 2009, 178: 34-35.
- [25] 徐 建,陈代文,毛 倩,等. 白酒糟的营养价值评定 [J]. *中国畜牧杂志*, 2012, 48: 47-50.
- [26] Kim Y, Mosier N S, Hendrickson R, *et al.*. Composition of corn dry-grind ethanol by-products; DDGS, wet cake, and thin stillage [J]. *Bioresour. Technol.*, 2008b, 99: 5165-5176.
- [27] Pérez A, Unwin R D, Evans C A, *et al.*. Eight-channel iTRAQ enables comparison of the activity of six leukemogenic tyrosine kinases [J]. *Mol. Cell. Proteom.*, 2008, 7(5): 853-863.
- [28] 林白容,章秋萍,王毅斌,等. 煤矿中苏云金芽孢杆菌 (Bt) 菌株的分离及其鉴定 [J]. *农业生物技术学报*, 2014, 22: 1402-1410.