

# 米曲霉固态发酵青稞酒糟的研究

杨延玲<sup>1</sup>, 杨刚<sup>2</sup>

(1. 南阳市动物疫病预防控制中心, 河南 南阳 47300; 2. 河南工业大学生物工程学院, 郑州 450001)

**摘要:** [目的] 试验用米曲霉对青稞酒糟进行固态发酵, 以提高青稞酒糟的营养价值。 [方法] 通过正交实验对固态发酵培养基进行优化, 并对米曲霉固体发酵青稞酒糟时酶活和营养成分的变化进行研究。 [结果] 结果表明青稞酒糟的最优培养基组合为玉米粉 5%、麸皮 2.5%、豆粕 5% 和无机盐 4%, 其中无机盐对青稞酒糟纤维素降解的影响最大。米曲霉固体发酵青稞酒糟时, 羧甲基纤维素酶活在 1~6 d 逐渐增加, 在第 7 天大幅降低; 蛋白酶酶活在 7 d 内明显上升; 青稞酒糟中的可溶性糖含量、中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维、纤维素和半纤维素的含量均呈下降的趋势; 氨基酸和蛋白含量上升。 [结论] 试验表明米曲霉固态发酵青稞酒糟可使其营养价值提升, 粗蛋白含量上升, 纤维素含量降低。

**关键词:** 青稞酒糟; 米曲霉; 酶活; 粗纤维

**中图分类号:** S816.6

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1001-9111(2021)06-0000-00

青稞酒是青藏高原的传统饮品, 在酿造青稞酒的过程中会有大量的青稞酒糟产生<sup>[1]</sup>, 青稞酒糟价格便宜, 粗蛋白含量超过 20%, 蛋白质品质优良, 可溶性蛋白高, 能被瘤胃快速降解吸收, 碳水化合物瘤胃利用效率高于其他酒糟, 瘤胃降解率较高, 对于牛羊饲养效果明显<sup>[2]</sup>。但青稞酒糟中纤维素含量较高, 直接饲喂动物时, 畜禽消化率低。研究表明, 青稞酒糟通过微生物发酵可以显著提高其粗蛋白含量<sup>[3]</sup>, 将其应用于饲料工业, 可有效避免青稞酒糟的浪费, 降低养殖成本。青贮发酵的青稞酒糟用于育肥牛中, 可以显著提高粗饲料的品质、减少精饲料的使用<sup>[4-5]</sup>。

米曲霉是食品和饲料工业常用的微生物菌种之一, 用于多种饲料资源的发酵, 可以显著提高发酵饲料的营养价值<sup>[5]</sup>, 但米曲霉用于青稞酒糟的研究尚未见报道。因此, 本试验使用米曲霉发酵青稞酒糟, 对其发酵过程中营养成分的变化规律进行研究, 为青稞酒糟资源的开发利用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 原料及试剂

米曲霉 (*Aspergillus oryzae*), 实验室保存。玉米

粉、麸皮、豆粕为市售, 其他试剂使用国产分析纯。

### 1.2 试验方法

1.2.1 米曲霉孢子液制备 先将保藏的米曲霉分离纯化, 然后在 PDA 培养基中划线接种, 30 ℃ 条件下静置培养 72 h, 灭菌生理盐水冲洗平板, 平板计数法调整最终孢子液浓度为  $1 \times 10^8$  /mL 左右。

1.2.2 青稞酒糟固态发酵培养基优化 以青稞酒糟为主要原料, 加入不同含量的玉米粉 (0、2.5%、5.0%)、麸皮 (0、2.5%、5.0%)、豆粕 (0、2.5%、5.0%)、无机盐 (0、2%、4%), 设计四因素三水平正交试验, 共 9 个处理组 (表 1), 每个处理组设 3 个重复, 并设空白对照。其中, 无机盐的配比为: 尿素 25%、磷酸二氢钾 12.5%、硫酸镁 12.5%、硫酸锰 10%、硫酸锌 10%、氯化钴 5%。

表 1 青稞酒糟培养基优化正交实验设计

| 水平 | A(玉米粉)<br>/% | B(麸皮)<br>/% | C(豆粕)<br>/% | D(无机盐)<br>/% |
|----|--------------|-------------|-------------|--------------|
| 1  | 0.0          | 0.0         | 0.0         | 0.0          |
| 2  | 2.5          | 2.5         | 2.5         | 2.0          |
| 3  | 5.0          | 5.0         | 5.0         | 4.0          |

收稿日期: 2021-05-06 修回日期: 2021-05-30

基金项目: 河南工业大学博士基金项目。

作者简介: 杨延玲 (1969-), 女, 副高级兽医师, 本科, 主要从事动物疫病预警预报工作。

将青稞酒糟和其他培养基混合均匀后,用  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  调整 pH 值为 7.0,放入高压灭菌锅,121℃ 高压 20 min 后,接种 4% 的米曲霉孢子液,保持固液比为 1:1.5,30℃ 下静置培养 5 d,检测发酵后青稞酒糟中羧甲基纤维素酶活力和各种纤维素降解率。

1.2.3 米曲霉固体发酵青稞酒糟过程中酶活和营养物质变化规律 根据上述优化的培养基,加入 4% 的米曲霉孢子液进行发酵,持续 7 d,每隔 24 h 取样检测,测定不同时间青稞酒糟中羧甲基纤维素酶活力和蛋白酶活力、青稞酒糟可溶性糖含量、纤维素含量的变化,每个处理 3 个重复。根据实验结果,选取发酵第 5 天的青稞酒糟,测定其中氨基酸含量,并与空白样品进行对比。

1.2.4 青稞酒糟中酶活和营养物质的检测方法 羧甲基纤维素(CMC)酶活力测定采用 DNS 法<sup>[7]</sup>。酶活力单位定义为:在本试验条件下酶活力定义为以对催化底物水解反应 1 h 形成 1 μmol 葡萄糖的酶量为 1U。蛋白酶活力测定采用 Folin 酚法<sup>[8]</sup>。水解液中还原糖含量测定采用 3,5-二硝基水杨酸比

色法<sup>[9]</sup>。粗纤维成分测定采用 Van Soest 分析方法<sup>[10]</sup>。氨基酸含量使用氨基酸自动分析仪测定。

1.3 数据统计和分析

采用 SAS 统计软件进行方差分析和多重比较,试验数据均以平均值 ± 标准差表示, $P < 0.05$  为差异显著。

2 结果与分析

2.1 青稞酒糟发酵培养基的优化

2.1.1 以纤维素降解为指标的发酵培养基优化 以纤维素含量为指标,青稞酒糟优化培养基的正交试验结果见表 2。说明在青稞酒糟中添加 5% 玉米粉,2.5% 麸皮,5% 豆粕,4% 无机盐时,青稞酒糟中纤维素降解情况最好。R 值结果表明,培养基中无机盐、麸皮、豆粕和玉米粉对纤维素降解影响依次减小,其中最主要的因素是无机盐。

表 3 为纤维素降解培养基优化的方差分析表。从表 3 结果可知,无机盐、豆粕和玉米粉对青稞酒糟的纤维素降解影响极显著( $P < 0.01$ ),麸皮对纤维素降解没有明显影响。

表 2 以纤维素降解为指标的培养基优化

| 编号 | 试验因素   |        |        |        | 试验结果                          |       |       |        |
|----|--------|--------|--------|--------|-------------------------------|-------|-------|--------|
|    | A      | B      | C      | D      | 组 1                           | 组 2   | 组 3   | Tt     |
| 1  | 1      | 1      | 1      | 1      | 2.95                          | 2.56  | 3.12  | 8.64   |
| 2  | 1      | 2      | 2      | 2      | 40.76                         | 42.36 | 38.05 | 121.17 |
| 3  | 1      | 3      | 3      | 3      | 55.76                         | 56.20 | 51.49 | 163.45 |
| 4  | 2      | 1      | 2      | 3      | 48.50                         | 54.20 | 49.06 | 151.76 |
| 5  | 2      | 2      | 3      | 1      | 12.21                         | 8.06  | 16.36 | 36.63  |
| 6  | 2      | 3      | 1      | 2      | 29.48                         | 29.26 | 29.30 | 88.04  |
| 7  | 3      | 1      | 3      | 2      | 49.02                         | 41.57 | 45.96 | 136.55 |
| 8  | 3      | 2      | 1      | 3      | 46.48                         | 55.73 | 63.63 | 165.84 |
| 9  | 3      | 3      | 2      | 1      | 8.70                          | 12.32 | 13.72 | 34.74  |
| k1 | 293.26 | 197.03 | 262.52 | 80.00  | A3B2C3D3<br>RD > RB > RC > RA |       |       |        |
| k2 | 276.43 | 323.64 | 307.67 | 345.76 |                               |       |       |        |
| k3 | 337.13 | 286.23 | 336.63 | 481.06 |                               |       |       |        |
| x1 | 97.75  | 65.68  | 87.51  | 26.67  |                               |       |       |        |
| x2 | 92.14  | 107.88 | 102.56 | 115.25 |                               |       |       |        |
| x3 | 112.38 | 95.41  | 112.21 | 160.35 |                               |       |       |        |
| R  | 20.24  | 42.20  | 24.70  | 133.68 |                               |       |       |        |

表 3 纤维素降解为指标培养基优化的方差分析

| 方差来源 | 平方和       | 自由度 | 均方       | F      | P        |
|------|-----------|-----|----------|--------|----------|
| 校正模型 | 9 877.39  | 10  | 987.73   | 63.09  | <0.000 1 |
| A    | 218.25    | 2   | 109.12   | 6.97   | 0.006 7  |
| B    | 82.48     | 2   | 41.24    | 2.63   | 0.102 6  |
| C    | 310.06    | 2   | 155.03   | 9.90   | 0.001 6  |
| D    | 9 250.84  | 2   | 4 625.42 | 295.43 | <0.000 1 |
| 误差   | 250.51    | 16  | 16.65    |        |          |
| 总变异  | 10 127.89 | 26  |          |        |          |

2.1.2 以羧甲基纤维素酶活为指标的发酵培养基优化 以羧甲基纤维素酶活力为指标,青稞酒糟培养基优化正交试验结果如表 4 所示。由表 4 可知,在青稞酒糟中添加玉米粉 2.5%,麸皮 2.5%,豆粕 5%,无机盐 4% 时,羧甲基纤维素酶活力最高。R 值大小从小到大排序为麸皮,玉米粉,豆粕,无机盐,说明培养基中无机盐、豆粕、玉米粉和麸皮对羧甲基纤维素酶产生的影响程度依次降低,其中对于羧甲基纤维素酶活最重要的因素是无机盐。

以羧甲基纤维素酶为指标的培养基优化的方差分析表见表 5。由表 5 可知,豆粕、玉米粉、无机盐和麸皮 4 个因素均对羧甲基纤维素酶的影响极为显著( $P<0.01$ )。

表 4 以羧甲基纤维素酶酶活为指标的培养基优化

| 编号 | 试验因素    |         |         |         | 试验结果                    |        |        |        |
|----|---------|---------|---------|---------|-------------------------|--------|--------|--------|
|    | A       | B       | C       | D       | 组 1                     | 组 2    | 组 3    | Tt     |
| 1  | 1       | 1       | 1       | 1       | 35.48                   | 42.71  | 49.94  | 128.12 |
| 2  | 1       | 2       | 2       | 2       | 163.61                  | 205.66 | 218.15 | 587.41 |
| 3  | 1       | 3       | 3       | 3       | 270.71                  | 252.97 | 265.46 | 789.13 |
| 4  | 2       | 1       | 2       | 3       | 254.94                  | 238.52 | 251.00 | 744.45 |
| 5  | 2       | 2       | 3       | 1       | 183.32                  | 193.18 | 172.81 | 549.30 |
| 6  | 2       | 3       | 1       | 2       | 179.38                  | 179.38 | 174.78 | 533.53 |
| 7  | 3       | 1       | 3       | 2       | 208.95                  | 204.35 | 222.75 | 636.04 |
| 8  | 3       | 2       | 1       | 3       | 210.92                  | 168.21 | 205.01 | 584.13 |
| 9  | 3       | 3       | 2       | 1       | 139.96                  | 136.67 | 105.79 | 382.41 |
| K1 | 1504.69 | 1421.90 | 1245.80 | 1059.85 | RD>RC>RA>RB<br>D3C3A2B2 |        |        |        |
| K2 | 1827.31 | 1720.86 | 1714.29 | 1757.00 |                         |        |        |        |
| K3 | 1602.59 | 1705.09 | 1974.49 | 2117.73 |                         |        |        |        |
| x1 | 501.56  | 473.97  | 415.27  | 353.28  |                         |        |        |        |
| x2 | 609.10  | 573.62  | 571.43  | 585.67  |                         |        |        |        |
| x3 | 534.20  | 568.36  | 658.16  | 705.91  |                         |        |        |        |
| R  | 107.54  | 99.65   | 242.89  | 352.63  |                         |        |        |        |

表 5 以羧甲基纤维素酶活为指标的培养基优化的方差分析

| 方差来源 | 平方和        | 自由度 | 均方        | F      | P       |
|------|------------|-----|-----------|--------|---------|
| 校正模型 | 103 867.20 | 10  | 10 386.72 | 40.25  | <0.0001 |
| A    | 6 080.07   | 2   | 3 040.03  | 11.78  | 0.0007  |
| B    | 3 106.91   | 2   | 1 553.45  | 6.02   | 0.0112  |
| C    | 30 302.81  | 2   | 1 5151.40 | 58.72  | <0.0001 |
| D    | 64 268.67  | 2   | 32 134.33 | 124.53 | <0.0001 |
| 误差   | 4 128.62   | 16  | 258.03    |        |         |
| 总变异  | 107 995.82 | 26  |           |        |         |

2.1.3 纤维素降解最优培养基的确定 青稞酒糟中纤维素含量较高,有效利用其中的纤维素,将其转化为微生物蛋白和糖类等营养物质,是米曲霉固态发酵青稞酒糟的首要目的,因此,试验中将纤维素的降解和纤维素酶活力作为评价培养基的技术指标。通过正交试验对比,A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>D<sub>3</sub> 是降解纤维素效果最好的组合,A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>D<sub>3</sub> 是羧甲基纤维素酶酶活最高的组合。综合以上结果,青稞酒糟生物降解的最优培养基组合为 A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>D<sub>3</sub>,即 5% 的玉米粉、2.5% 的麸

皮、5% 的豆粕和 4% 的无机盐。

2.2 米曲霉固态发酵过程中青稞酒糟酶活力及营养成分变化

2.2.1 酶活力变化 由表 6 可知,米曲霉发酵青稞酒糟过程中,羧甲基纤维素酶活随着时间的增加,1~6 天整体呈上升趋势,而在第 7 天随着纤维素浓度降低则大幅降低( $P<0.05$ )。在发酵期内,前 3 d 蛋白酶酶活上升显著( $P<0.05$ ),之后基本保持稳定。

表 6 米曲霉发酵青稞酒糟过程中羧甲基纤维素酶活力、蛋白酶活力和可溶性糖含量变化

| 发酵天数<br>/d | 羧甲基纤维素酶活力<br>/(U·g <sup>-1</sup> ) | 蛋白酶活力<br>/(U·g <sup>-1</sup> ) | 可溶性糖含量<br>/(mg·g <sup>-1</sup> ) |
|------------|------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| 1          | 1 869.58 ± 381.14 <sup>A</sup>     | 591.94 ± 93.86 <sup>C</sup>    | 27.04 ± 3.62 <sup>A</sup>        |
| 2          | 1 929.37 ± 107.78 <sup>A</sup>     | 749.04 ± 37.64 <sup>BC</sup>   | 24.44 ± 4.27 <sup>AB</sup>       |
| 3          | 2 097.14 ± 20.04 <sup>A</sup>      | 946.24 ± 25.07 <sup>AB</sup>   | 22.08 ± 1.37 <sup>BC</sup>       |
| 4          | 1 963.32 ± 149.12 <sup>A</sup>     | 1 030.63 ± 128.90 <sup>A</sup> | 20.78 ± 0.74 <sup>BCD</sup>      |
| 5          | 2 050.49 ± 56.51 <sup>A</sup>      | 1 041.21 ± 87.21 <sup>A</sup>  | 17.30 ± 2.20 <sup>D</sup>        |
| 6          | 2 066.70 ± 43.77 <sup>A</sup>      | 1 009.00 ± 202.69 <sup>A</sup> | 20.59 ± 1.89 <sup>BCD</sup>      |
| 7          | 1 497.24 ± 304.57 <sup>B</sup>     | 1 072.30 ± 123.25 <sup>A</sup> | 18.15 ± 0.98 <sup>CD</sup>       |

注:同一列内字母相同,则差异不显著;反之差异显著。

2.2.2 可溶性糖含量及纤维成分变化 由表 6 可知,随着发酵时间的推移,青稞酒糟中可溶性糖含量基本呈现下降趋势,前 3 d 下降趋势显著( $P<0.05$ ),之后基本稳定。

由表 7 可知,青稞酒糟中的中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维、纤维素和半纤维素的含量随着时间的推移逐渐降低,发酵 3 d、5 d 和 7 d 时差异显著( $P<0.05$ ),整个发酵过程中木质素降低不显著( $P>$

0.05)。

2.2.3 米曲霉发酵过程中氨基酸含量变化 选取第 5 天的发酵酒糟进行氨基酸含量测定,结果如表 8 所示。结果表明,米曲霉发酵青稞酒糟后,其中的纤维素被米曲霉利用,转化为蛋白质和氨基酸,氨基酸总量、蛋氨酸和赖氨酸等必需氨基酸含量得以提升。

表 7 不同发酵时间青稞酒糟的纤维成分变化(以干物质为基础,% )

| 发酵时间/d | 中性洗涤纤维                     | 酸性洗涤纤维                                | 纤维素                        | 半纤维素                      | 木质素                      |
|--------|----------------------------|---------------------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 0      | 60.94 ± 0.34 <sup>A</sup>  | 51.12 ± 1.12 <sup>A</sup>             | 37.80 ± 0.40 <sup>A</sup>  | 9.92 ± 0.86 <sup>A</sup>  | 7.97 ± 1.21 <sup>A</sup> |
| 1      | 59.12 ± 1.85 <sup>A</sup>  | 53.02 ± 1.51 <sup>A</sup>             | 34.11 ± 0.85 <sup>B</sup>  | 8.04 ± 0.53 <sup>B</sup>  | 9.54 ± 0.49 <sup>A</sup> |
| 3      | 58.59 ± 0.48 <sup>AB</sup> | 50.47 ± 0.09 <sup>AB</sup>            | 32.67 ± 0.49 <sup>BC</sup> | 7.82 ± 0.50 <sup>B</sup>  | 9.22 ± 0.06 <sup>A</sup> |
| 5      | 56.02 ± 0.90 <sup>B</sup>  | 49.99 ± 1.40 <sup>AB</sup>            | 31.24 ± 0.92 <sup>CD</sup> | 6.04 ± 0.52 <sup>C</sup>  | 9.74 ± 0.37 <sup>A</sup> |
| 7      | 52.76 ± 2.36 <sup>C</sup>  | 47.2 <sup>8</sup> ± 3.75 <sup>B</sup> | 29.78 ± 2.90 <sup>D</sup>  | 7.06 ± 1.03 <sup>BC</sup> | 9.54 ± 0.97 <sup>A</sup> |

表 8 发酵 5 d 青稞酒糟氨基酸含量%

| 氨基酸  | 初始    | 发酵    |
|------|-------|-------|
| 天冬氨酸 | 1.34  | 1.79  |
| 苏氨酸  | 0.78  | 0.91  |
| 丝氨酸  | 1.61  | 1.69  |
| 谷氨酸  | 3.40  | 3.53  |
| 甘氨酸  | 1.31  | 1.50  |
| 丙氨酸  | 1.09  | 1.29  |
| 胱氨酸  | 0.95  | 1.04  |
| 缬氨酸  | 1.05  | 1.26  |
| 蛋氨酸  | 0.25  | 0.32  |
| 异亮氨酸 | 0.69  | 0.89  |
| 亮氨酸  | 1.89  | 2.19  |
| 酪氨酸  | 0.89  | 1.06  |
| 苯丙氨酸 | 0.85  | 1.14  |
| 组氨酸  | 0.60  | 0.72  |
| 赖氨酸  | 0.55  | 0.80  |
| 精氨酸  | 1.21  | 1.47  |
| 脯氨酸  | 1.78  | 1.96  |
| 总计   | 20.26 | 23.57 |

3 结论

试验结果表明,米曲霉固体发酵青稞酒糟的最佳培养基成分配比为 5% 的玉米粉、2.5% 的麸皮、5% 的豆粕和 4% 的无机盐。通过发酵,可以降低青

稞酒糟中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维、纤维素和半纤维素的含量,提高粗蛋白和氨基酸含量,增加了青稞酒糟作为饲料的营养价值。

参考文献:

[1] 包雪梅,谢惠春. 青稞主要成分及其应用的研究进展[J]. 现代食品,2019(2):43-47.

[2] 李倩,裴朝曦,王之盛,等. 不同类型酒糟营养成分组成差异的比较研究[J]. 动物营养学报,2018,30(6):2369-2376.

[3] 李长慧. 青稞酒糟—SCP 固体发酵技术研究[J]. 青海大学学报(自然科学版),2001(4):3-6.

[4] 蔡生胜,张志平. 青贮青稞酒糟替代部分精料育肥肉牛效果[J]. 当代畜牧,2009(2):29-30.

[5] 曹亚男. 青贮青稞酒糟替代部分育肥牛日粮的增重试验[J]. 黑龙江畜牧兽医,2011(1):63-64.

[6] 刘丽萍,刘丽华. 米曲霉研究进展与应用[J]. 中国调味品,2008,4(4):25-28.

[7] 李国伟,何静,郭坤杰,等. 双峰驼源纤维素降解菌的筛选及其对酒糟的降解效果[J]. 中国农业科技导报,2021,23(4):64-75.

[8] 郑东影,陈玮,张卫卫,等. 福林酚法测定酿酒白曲酸性蛋白酶活力的条件试验[J]. 酿酒,2020,47(2):63-66.

[9] 冉淦侨,殷红,韩姗姗,等. 含酶饲料中 DNS 法测定还原糖的影响因素统计分析[J]. 饲料研究,2019,42(7):61-63.

[10] 李博,张丹丹,程景,等. 不同方法测定饲料中的中性洗涤纤维与酸性洗涤纤维含量分析[J]. 中国畜牧杂志,2020,56(12):187-190.

Research of Solid StateFermentation of *Aspergillus oryzae* in Distillers of Highland Barley

YANG Yan-ling<sup>1</sup>, YANG Gang<sup>2</sup>

(1. Animal Disease Prevention and Control Center of Nanyang, Nanyang, Henan473000;  
2. College of Biological Engineering, Henan University of Technology, Zhenzhou450001)

**Abstract:** [Objective] The improvement of nutritional value of distilers of highland barley was studiedwhen it was fermented with *Aspergillus oryzae* in solid state. [Method] The solid-state fermentation medium was optimized by orthogonal experiment and the changes of enzyme activity and nutrient components during solid fermentation of highland barley distiller’s grains by *Aspergillus oryzae* were studied. [Result] The results showed that the optimal mediumof distillers of highland barley fermentation was corn flour 5% , bran 2.5% , soybean meal 5% and inorganic salt 4% ,which the inorganic salt had more impact on fiber degradation of the distillers of highland barley. During the solid-fermentation, the carboxymethyl cellulase activity gradually was increased from 1 to 6 days and decreased significantly on the 7th day, which the protease enzyme activity was increased significantly within 7 days. The contents of soluble sugar, neutral detergent fiber, acid detergent fiber, cellulose and hemicellulose were decreased, while the amino acid and total protein content was increased. [Conclusion] The experiment showed that the nutritional value of highland barley distiller’s grains was improved in solid-state fermentation by *Aspergillus oryzae*, with protein increasing and fiber decreasing.

**Key words:** distilers of highland barley; *Aspergillus oryzae*; enzyme activity; crude fiber