

曲酒丢糟培养白地霉生产富硒饲料蛋白的研究

李新社, 陆步诗, 黎小武

(邵阳学院生物与化学工程系, 湖南 邵阳 422000)

摘 要: 将白地霉接种在添加亚硒酸钠的培养液中进行驯化, 以大曲丢糟为主要原料, 以富硒白地霉为菌种, 适当添加纤维素酶进行富硒饲料蛋白的发酵生产, 通过正交试验得到最佳的饲料生产工艺条件为: Na_2SeO_3 添加量为 0.50 mg/kg, 富硒白地霉接种量为 15 %, 纤维素酶添加量为 0.03 %, 培养时间 4 d。所生产得的富硒饲料粗蛋白和有机硒含量分别达到了 18.9 %、0.18 mg/kg。

关键词: 综合利用; 曲酒丢糟; 白地霉; 纤维素酶; 富硒饲料蛋白

中图分类号: TS262.3; TS261.1; X797 文献标识码: B 文章编号: 1001- 9286(2007) 08- 0144- 02

Study on *Geotrichum candidum* link Cultured by Daqu Distiller's Grains to Produce Se- enriched Feed Protein

LI Xin-she, LU Bu-shi and LI Xiao-wu

(Department of Biology and Chemistry Engineering, Shaoyang College, Shaoyang, Hu'nan 422000, China)

Abstract: *Geotrichum candidum* link was inoculated in the culture solution (Na_2SeO_3 was added) for domestication, then Daqu distiller's grain was used as the main raw materials and Se-enriched *geotrichum candidum* link was used as microbial species to produce Se-enriched feed protein by the addition of cellulase. The best technical conditions were summed up through orthogonal test as follows: the addition level of Na_2SeO_3 was 0.50 mg/kg, the inoculating quantity of Se-riched *Geotrichum candidum* link was 15 %, the addition level of cellulase was 0.03 % and the culture time was 4 d. The content of rough protein and organic-Se in the produced feed protein increased up to 18.9 % and 0.18 mg/kg respectively.

Key words: comprehensive utilization; distiller's grain; *Geotrichum candidum* link; cellulase; Se-riched feed protein

硒是畜禽生长必需的微量元素, 当饲料中的硒含量低于 0.05 mg/kg 时, 幼龄畜会出现牛羊白肌病、仔猪肝营养不良、桑椹心、犊牛和幼驹腹泻、雏鸡脑软化、胰腺纤维化等病症。成年畜禽则表现为繁殖机能障碍, 繁殖力低下等。因此开发含硒饲料具有非常重要的意义。

白酒酿造行业是耗粮大户, 每年粮耗都在 1500 万 t 以上, 由此产生的废弃酒糟(丢糟)每年超过 2500 t。丢糟含水量高, 易霉烂, 不便贮存, 造成了污染与浪费, 由于丢糟中含有淀粉(10 %左右)、粗纤维(20 %左右)、粗蛋白(7 %~9 %)、氨基酸、有机酸、低碳糖、杂醇等有机成分^[1]。利用纤维素酶对丢糟中的残余粗纤维进行分解产生可发酵性糖, 通过对蛋白质转化能力强的菌株进行富硒驯化后, 对添加有无机硒的丢糟进行再发酵, 可以获得富硒丢糟蛋白饲料。

本试验通过对白地霉进行富硒驯化, 利用纤维素酶对丢糟进行分解, 以富硒白地霉为发酵菌, 进行丢糟发

酵生产富硒蛋白饲料的工艺条件进行探讨, 以期获得一种营养丰富、易被动物吸收的富硒生物活性蛋白饲料。为丢糟利用探索一条新途径, 为饲料生产提供一种新的富硒蛋白质来源。

1 材料与方法

1.1 材料、设备仪器

1.1.1 材料

丢糟: 邵阳市酒厂提供;

菌种: 白地霉(*Geotrichum candidum* link)GIM2.69, 由广东省微生物研究所菌种保存中心提供;

纤维素酶: 酶活性 ≥ 10000 u/g, 由国药集团化学试剂有限公司生产。

试剂: 亚硒酸钠等化学试剂均为市售分析纯。

1.1.2 培养基

麦芽汁培养基^[2]: 用于菌种活化及扩大培养。

基金项目: 湖南省教育厅资助科研项目(编号 04C606)。

收稿日期: 2007- 04- 25

作者简介: 李新社(1965-), 女, 副教授, 主要从事应用微生物教学与研究工作。

丢糟培养基: 以丢糟为主要原料, 适量添加亚硒酸钠、麸皮等辅料。

1.1.3 主要仪器设备

超净工作台、恒温培养箱、高压灭菌锅、鼓风干燥箱、紫外可见分光光度计、分析天平等。

1.2 方法

1.2.1 测定方法

1.2.1.1 总氮的测定

采用凯氏定氮法^[3]。

1.2.1.2 还原糖的测定

直接滴定法^[3], 以葡萄糖计。

1.2.1.3 硒含量的测定

采用 3,3'-氨基联苯胺比色法^[4,5]。

硒含量标准曲线的绘制: 硒标准溶液: 准确称取 0.1000 g 硒, 置于 50 mL 小烧杯中, 加入 1.1 盐酸 10 mL, 加热溶解, 冷却并转移至 100 mL 容量瓶中定容。此溶液 1 mL 含 1 mg 硒, 用时可稀释成相当于 1 mL 含 1 μg 硒。

标准溶液曲线绘制: 准确吸取 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的硒标准溶液 0.0 mL、0.2 mL、0.4 mL、0.6 mL、0.8 mL 和 1.0 mL, 分别加入分液漏斗中, 加水至 35 mL, 再分别加入 5% EDTA-2Na 溶液 1 mL, 摇匀, 并用 1.1 盐酸调节溶液 pH 至 2~3, 各加 0.5% 的 3,3'-氨基联苯胺(DAB)溶液 4 mL, 摇匀, 置于暗处 30 min, 再用 5% 的 NaOH 溶液调节至中性, 加入 10 mL 甲苯振摇 2 min, 静置分层, 弃去水层。甲苯层通过棉花栓过滤于 100 mL 容量瓶中, 甲苯定容。分别取适量于比色皿中, 置于分光光度计 420 nm 波长处测定吸光度。绘制标准曲线。

残留无机硒含量的测定: 取适量样品, 10000 r/min 高速离心 30 min, 取 20 mL 上清液, 加水至 35 mL, 加入 2 mL 5% EDTA-2Na 溶液, 下同标准曲线。根据样品测得的吸光度, 从标准曲线中查得相应的硒含量, 则为无机硒含量。

有机硒含量 = 总硒含量 - 残留无机硒含量

有机硒转化率 = $\frac{\text{有机硒含量}}{\text{总硒含量}} \times 100\%$

1.2.1.4 白地霉含量检测

显微镜视野计数法^[6]。

1.2.2 操作要点

1.2.2.1 菌种的活化

麦芽汁固体培养基斜面 → 接种白地霉 → 培养(恒温 30、72 h)

1.2.2.2 菌种的扩大培养

麦芽汁液体培养基 → 分装三角瓶 → 灭菌 → 接种(活化菌) → 培养(30、72 h)

1.2.2.3 种子的驯化

将白地霉按 10% 的接种量接种在 Na_2SeO_3 浓度依次为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的麦芽汁培养基中, 于 29~30 下进行硒浓度梯度驯化, 每代驯化时间为 72 h。

1.2.2.4 丢糟发酵试验

配制丢糟培养基(称取一定量丢糟置三角瓶中, 补充少量蔗糖、麸皮、KCl、 MgSO_4 、 NaNO_3 、 K_2HPO_4 、 FeSO_4 , 用石灰水调节 pH 值) → 灭菌 → 适当添加纤维素酶和 Na_2SeO_3 → 接种(驯化种) → 发酵 → 检测

2 结果与分析

2.1 驯化效果检测

每代驯化完成后, 对驯化液进行白地霉的含量及富硒率检测, 以确定驯化效果, 结果见表 1。

表 1 驯化效果检测结果

驯化代数	驯化液硒浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	白地霉细胞数 (个/mL)	富硒率 (%)
1	10	5.3×10^4	36.2
2	15	7.1×10^4	59.8
3	20	3.6×10^5	70.3
4	25	4.8×10^5	84.7
5	30	4.3×10^5	84.8
6	35	4.0×10^5	85.0
7	40	2.9×10^5	84.9

由表 1 可知, 随着驯化液硒浓度的提高, 驯化代数增加, 白地霉细胞数和富硒率均逐渐增加, 当驯化液中, 硒浓度达到 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 白地霉细胞数达到或接近最高。硒浓度继续提高, 细胞数与富硒率增加缓慢或呈减少趋势。因此, 选择在硒浓度为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 中驯化了 4 代的白地霉(含菌量 4.8×10^5 个/mL, 富硒率为 84.7%)作为发酵菌种。

2.2 最佳工艺条件的确定

确定 Na_2SeO_3 添加量、富硒白地霉接种量、纤维素酶添加量、发酵时间为 4 个变量, 进行四因素三水平的 $L_9(3^4)$ 正交试验^[7](见表 2), 通过有机硒含量的检测, 确定最佳发酵条件, 结果见表 3。

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验设计

水平	A: Na_2SeO_3 添加量 (mg/kg)	B: 富硒白地 霉接种量 (%)	C: 纤维素酶 添加量 (%)	D: 发酵 时间 (d)
1	0.25	5	0.01	4
2	0.50	10	0.02	5
3	0.75	15	0.03	6

由表 3 的 K 值大小可知, 试验的最佳组合是 $A_2B_3C_3D_{10}$ 。由极差值看, $R_A > R_B > R_C > R_D$, 因此, 各因素

(下转第 149 页)

D-葡萄糖苷酶的催化作用。因此确定葡萄和葡萄酒中 β -D-葡萄糖苷酶的测定方法将对今后进一步研究葡萄酒中香气成分和香气形成的机理具有促进作用。目前,国内茶叶中 β -葡萄糖苷酶活性的检测方法研究比较成熟,但是条件各不相同^[5-6,8-9]。

本试验采用分光光度计法研究了检测霞多丽葡萄浆果中的 β -葡萄糖苷酶活性测定条件,从而得出,检测波长选择在 405 nm 最为理想,粗酶提取液中 PVP 加入量为 3%,反应温度和时间选择 37℃,90 min 的条件检测酶活性最为理想,且酶反应缓冲液体系为柠檬酸-磷酸氢二钠 pH 为 6.0 时酶活性最大,选用酶活反应温度、时间和缓冲液 pH 的正交试验,得出霞多丽葡萄浆果酶活测定的最佳检测条件是 37℃,在磷酸-柠檬酸 pH6.0 缓冲液中反应 90 min。

参考文献:

- [1] Gueguen.Y, Chemardin .P, Janbon. G, Arnaud. A, and Galzy. P. A very efficient β -Glucosidase catalyst for the hydrolysis of flavor precursors of wines and precursors of wines and fruit juices. [J]. J.Agric Food Chem,1996,44: 2336- 2340.
- [2] 江昌俊,李叶云.茶叶中 β -D-葡萄糖苷酶活性测定条件的研

究[J].安徽农业大学学报,1999,26(2): 212- 215.

- [3] Robinson.D. The fluorimetric determination of β -Glucosidase: its occurrence in the tissues of animals ,including insects[J]. Biochemistry Journal,1956,63: 39- 42.
- [4] 梁华正,刘富梁,彭玲西,等.京尼平苷为底物测定 β -葡萄糖苷酶活力的方法[J].食品科学,2006,27(4): 182- 185.
- [5] 王华夫,游小清.茶叶中 β -葡萄糖苷酶活的测定[J].中国茶叶,1996,(3): 16- 17.
- [6] 董尚胜,童启庆,渡边修治,等.茉莉花中 β -D-葡萄糖苷酶活性测定条件的探讨[J].福建茶业,1997,(4): 23- 25.
- [7] Gunata Z, Blondeel C, Vallier MJ,Lepoutre JP,Sapis JC,and Watanabe N.An endoglycosidase from grape berry skin of Cv. M.Alexandria hydrolyzing potentially aromatic disaccharide glycosides[J].Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998,46: 2748- 2753.
- [8] 董尚胜,童启庆,渡边修治,等.茉莉花粗酶液提取条件对 β -D-葡萄糖苷酶活性的影响[J].中国茶叶加工,1997,(2): 32- 33.
- [9] 江昌俊,李叶云.茶叶鲜叶中 β -葡萄糖苷酶提取条件的研究[J].南京农业大学学报,2000,23(2): 93- 96.
- [10] Van den Brecht.K, Delvaux F.R., Verachtert. H, and Derdelinckx .G.1Biongeneration of Flavors: Performance of Candida methanolovescens strains in nonalcoholic beer[J]. American Society of Brewing Chemist,Inc,2001,80- 83.

(上接第 145 页)

表 3 正交试验结果及数据处理

试号	A	B	C	D	有机硒含量 (mg/kg)
1	1	1	1	1	0.07
2	1	2	2	2	0.08
3	1	3	3	3	0.10
4	2	1	2	3	0.09
5	2	2	3	1	0.17
6	2	3	1	2	0.16
7	3	1	3	2	0.11
8	3	2	1	3	0.12
9	3	3	2	1	0.13
K ₁	0.25	0.27	0.35	0.37	
K ₂	0.42	0.36	0.30	0.35	
K ₃	0.36	0.39	0.38	0.31	
R	0.17	0.12	0.08	0.06	

的次要关系是 A> B> C> D。即以大曲丢糟生产白地霉富硒蛋白饲料的最优生产条件是: Na₂SeO₃ 添加量为 0.50 mg/kg, 富硒白地霉接种量为 15%, 纤维素酶添加量为 0.03%, 培养时间 4 d。

2.3 发酵前后丢糟成分的比较

将最佳水平条件下获得的富硒丢糟蛋白饲料与未经发酵的丢糟进行粗蛋白、有机硒、还原糖等主要指标的比较,检测结果见表 4。

从表 4 中可知, 经发酵后的丢糟饲料的粗蛋白、有

表 4 发酵前后丢糟成分

项 目	粗蛋白(%)	有机硒(mg/kg)	还原糖(%)
发酵前	8.30	0.01	0.63
发酵后	18.90	0.18	2.57

机硒及还原糖含量都有明显提高。

3 结论

丢糟经白地霉发酵后,其蛋白质、有机硒和还原糖含量明显增加,因此经转化后的丢糟饲料营养价值大幅提高,是一种较为理想的富硒饲料蛋白质资源,具有明显的社会效益、经济效益和环保效益。

参考文献:

- [1] 王贞富.白酒厂酒糟的利用[J].酿酒, 1990, (1): 32- 34.
- [2] 无锡轻工业学院, 华南工学院, 天津轻工业学院, 等.微生物学[M]. 北京: 轻工业出版社, 1996.
- [3] 天津轻工业学院, 大连轻工业学院, 无锡轻工业学院, 等.工业发酵分析[M].北京: 轻工业出版社, 2000.
- [4] 侯少范, 王五一.微量硒的测定方法简介[J].分析化学, 1998, (2): 183.
- [5] 宋照军, 王树宁, 潘润淑, 等.富硒乳酸菌的分离、筛选、驯化及富硒研究[J].中国酿造, 2004, (11): 5- 6.
- [6] 黄秀梨.微生物学实验指导[M].北京: 高等教育出版社, 2001.
- [7] 钟平安.生物统计[M].长沙: 湖南科学技术出版社, 1983.