微生物学通报
Microbiology China
http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn

Jan. 20, 2022, 49(1): 61−71
DOI: 10.13344/j.microbiol.china.210466
Copyright ©2022 Microbiology China All Rights Reserved

研究报告

复合菌与复合酶联合处理对大豆皮营养成分及品质的影响

李英英[#1]，朱崇淼[#2]，朱平华[2]，丁立人[3]，曹新华[1]，李琪[1]，李艳[1]，杭苏琴[*1]

1 南京农业大学动物科技学院 国家动物消化道营养国际联合研究中心，江苏 南京 210095
2 南京致润生物科技有限公司，江苏 南京 211200
3 南京农业大学动物科技学院 动物科学类国家级实验教学中心，江苏 南京 210095

李英英, 朱崇淼, 朱平华, 丁立人, 曹新华, 李琪, 李艳, 杭苏琴. 复合菌与复合酶联合处理对大豆皮营养成分及品质的影响[J]. 微生物学通报, 2022, 49(1): 61-71
Li Yingying, Zhu Chongmiao, Zhu Pinghua, Ding Liren, Cao Xinhua, Li Qi, Li Yan, Hang Suqin. Effects of multiple strains fermentation and enzymatic hydrolysis on nutrient composition and quality of soybean hulls[J]. Microbiology China, 2022, 49(1): 61-71

摘　要：【背景】大豆皮纤维含量较高，而且含有多种抗营养因子如脲酶和抗原蛋白等，限制了大豆皮的利用。【目的】通过菌酶联合处理以进一步降低大豆皮中的纤维和抗营养因子含量，利用此方法在实验室进行大豆皮的袋装处理，评价大豆皮的营养价值及品质，为大豆皮的产业化利用奠定基础。【方法】实验分为 4 组，对照组(未经菌株发酵和酶解处理的大豆皮)、菌株发酵组(乳酸杆菌、芽孢杆菌和酵母菌复合发酵组)、酶解组(纤维素酶和木聚糖酶酶解组)及酶解+菌株发酵组(乳酸杆菌、芽孢杆菌和酵母菌+纤维素酶、木聚糖酶，菌酶发酵组)，研究复合酶和复合菌联合处理对大豆皮营养价值及品质的影响，筛选袋装处理的最佳时间。【结果】与对照组相比，发酵组的 pH 值、还原糖、脲酶活性、球蛋白和 β-伴大豆球蛋白含量下降(P<0.05)；酶解组的还原糖、粗蛋白、真蛋白含量显著提高(P<0.05)，中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维显著下降(P<0.05)；菌酶发酵组的还原糖、粗蛋白和真蛋白的含量显著提高(P<0.05)，pH 值、中性洗涤纤维和酸性洗涤纤维的含量显著降低(P<0.05)。与发酵组相比，菌酶发酵组的乳酸浓度和活菌数较高，pH 值、脲酶活性、球蛋白和 β-伴大豆球蛋白显著降低(P<0.05)；与酶解组相比，菌酶发酵组还原糖浓度、中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维和半纤维素显著下降(P<0.05)。袋装实验中，在最佳发酵时间 5 d 时，菌酶发酵

基金项目：江苏省农业科技自主创新项目[CX(19)1006]；中央高校基本科研业务费专项基金项目(KYZ202110)
#对本文贡献相同
Supported by: Independent Innovation of Agricultural Science and Technology of Jiangsu Province (CX(19)1006); Fundamental Research Funds for the Central Universities (KYZ202110)
#These authors equally contributed to this work
***Corresponding author:** E-mail: suqinhang69@njau.edu.cn
Received: 2021-05-26; **Accepted:** 2021-06-17; **Published online:** 2021-09-26

组的 pH 值为 4.87，显著低于其他组(P<0.05)；与发酵组相比，菌酶发酵组的还原糖、粗蛋白、真蛋白含量显著提高(P<0.05)，脲酶活性、球蛋白、β-伴大豆球蛋白、中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维和半纤维素显著下降(P<0.05)。与酶解组相比，菌酶发酵组的还原糖、中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维和半纤维素含量显著降低(P<0.05)，菌酶发酵组中霉菌含量仅为 0.89 lg(CFU/mL)，显著低于其他组(P<0.05)。【结论】菌酶结合处理大豆皮可通过提高粗蛋白、真蛋白的含量，降低纤维和抗营养因子含量，抑制大豆皮中霉菌的产生，显著改善大豆皮的营养价值及品质。

关键词：纤维素酶；木聚糖酶；抗营养因子；微生物发酵；菌酶结合；袋装实验；营养价值

Effects of multiple strains fermentation and enzymatic hydrolysis on nutrient composition and quality of soybean hulls

LI Yingying[#1], ZHU Chongmiao[#2], ZHU Pinghua[2], DING Liren[3], CAO Xinhua[1], LI Qi[1], LI Yan[1], HANG Suqin[*1]

1 National Center for International Research on Animal Gut Nutrition, College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China
2 Nanjing Zhirun Biotechnology Company Limited, Nanjing 211200, Jiangsu, China
3 National Experimental Teaching Center for Animal Science, College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China

Abstract: [Background] Soybean hulls as a crude feed have high digestibility, but their fiber content is high, and contains a variety of anti-nutritional factors such as urease and antigen protein, which limits its application in monogastric animal feed. **[Objective]** The aims of this study to reduce the content of fiber and anti-nutritional factors in soybean hulls by combination of bacteria fermentation and enzymatic hydrolysis. The packaging treatment of soybean hulls by using this method was conducted in the laboratory to evaluate the number of molds and the nutritional value and quality of soybean hulls for the foundation of future industrial application of soybean hulls. **[Methods]** The experiment was divided into four groups: control group (soybean hulls without fermentation and enzymatic hydrolysis group), strain fermentation group (*Lactobacillus*, *Bacillus*, and *Saccharomyces* mixture fermentation), enzymatic hydrolysis group (cellulase and xylanase enzymatic hydrolysis), and enzymatic hydrolysis + strain fermentation group (*Lactobacillus*, *Bacillus* and *Saccharomyces* compound fermentation + cellulase and xylanase enzymatic hydrolysis). The optimal time for packaging treatment was selected. **[Results]** Compared with the control group, the pH value, reducing sugar content, urease activity, globulin, and β-conglycinin of the fermentation group were decreased (P<0.05). The reducing sugar, crude protein, and true protein content in the enzymatic hydrolysis group was increased (P<0.05), while the neutral detergent fiber and acid detergent fiber were decreased (P<0.05). The pH value, the contents of neutral detergent fiber, and acid detergent fiber were decreased (P<0.05), while the reducing sugar content, crude protein, and true protein contents were increased (P<0.05) in the bacteria fermentation and enzymatic hydrolysis group. Compared with the fermentation group, lactic acid concentration, and

viable bacteria number were higher, while pH value, urease activity, globulin, and β-conglycinin were decreased in the bacteria fermentation and enzymatic hydrolysis group (P<0.05). Compared with the enzyme hydrolysis group, the reducing sugar concentration, the neutral detergent fiber, acid detergent fiber, and hemicellulose in the bacteria fermentation and enzymatic hydrolysis group were decreased (P<0.05). In the bag experiment, the pH value of the enzyme fermentation group was 4.87 at the optimal fermentation time of 5 d, which was lower than that of the other groups (P<0.05). Compared with the fermentation group, the reducing sugar content, crude protein, and true protein in the bacteria fermentation and enzymatic hydrolysis group were increased (P<0.05), while the urease activity, globulin, β-conglycinin, neutral detergent fiber, acid detergent fiber and, hemicellulose in the bacteria fermentation and enzymatic hydrolysis group were decreased (P<0.05). Compared with the enzymatic hydrolysis group, the reducing sugar content, neutral detergent fiber, acid detergent fiber and, hemicellulose in the bacteria fermentation and enzymatic hydrolysis group were decreased (P<0.05). The content of mold in the bacterial enzyme fermentation group was only 0.89 lg(CFU/mL), which was lower than that in the other groups (P<0.05). **[Conclusion]** The combination of bacteria and enzymes can increase the crude protein and true protein content, reduce the content of fiber and anti-nutritional factors, inhibit the production of mold in soybean hulls, and finally improve the nutritional value and quality of soybean hulls.

Keywords: cellulase; xylanase; anti-nutritional factors; microbial fermentation; combination of bacteria and enzyme; bag experiment; nutritional value

大豆皮(soybean hull，SBH)因粗纤维含量高达 32%−38%而具有在动物饲料中作为能量来源的潜力[1]，其中纤维素占 46%−51%、半纤维素占 16%−18%、木质素占 1.4%−2%[2]，它们都属于难以降解的复杂碳水化合物，严重阻碍了机体对大豆皮的降解、消化与吸收。

酶解法和微生物发酵法是目前生产中常用的改善饲料营养价值的方法。酶制剂如纤维素酶、果胶酶等酶类可将大豆皮中难以消化的碳水化合物降解为易被机体吸收的小分子物质，但在酶解过程中产生的糠醛类苦味物质会影响饲料的适口性[3]。微生物发酵法是通过微生物发酵产生的酶发挥作用，在发酵过程中还会产生乳酸等有机酸及各种活性物质，可以改善饲料适口性，微生物进入机体肠道后还可以调节肠道健康[4]。在此过程中，由于微生物产生的酶不足或酶活较低，无法较大程度地改善饲料品质[5]。有研究报道，纤维素酶水解后的菜籽粕能够促进酵母菌的发酵[6]。Christensen 等[7]也发现，在混合饲料中添加纤维素酶降低了饲料中不溶性膳食纤维的含量，并且在酶解后添加乳酸杆菌降低了饲料的 pH 值。然而，纤维素酶与益生菌联合处理大豆皮的相关研究还非常少。

前期在使用植物乳杆菌、纳豆芽孢杆菌和酿酒酵母菌复合发酵大豆皮的实验中发现，大豆皮的中性洗涤纤维从原来的 65.16%下降到 54.49%，酸性洗涤纤维从原来的 45.94%下降到 38.54%，大豆皮中的抗营养因子脲酶活性降低至 0.1 U/g，大豆球蛋白和 β-伴大豆球蛋白分别降低了 23.29%和 24.20%[8]。发酵后中性洗涤纤维和酸性洗涤纤维虽有一定程度下降，但与大豆皮本身所含纤维的量相比，复合菌发酵仍不能使大豆皮的营养价值得到显著改善[8]。为此，本研究在前期复合菌发酵基础上，探讨纤维素酶与木聚糖酶复合酶解结合植物乳杆菌、纳豆芽孢杆菌和酿酒酵母菌复合菌共同处理对大豆皮

营养成分和品质的改善效果，再通过袋装实验明确大豆皮的最佳处理时间，分析最适条件下大豆皮各成分的变化，评价其发酵效果，以期为大豆皮的开发利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆皮、麸皮由江苏省南通市青禾杂粮合作社提供，粉碎后过 40 目筛备用。

纤维素酶(酶活力为 25 万 U/g)、木聚糖酶(酶活力为 10 万 U/g)为南京致润生物科技有限公司惠赠。

植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) LY19、纳豆芽孢杆菌(*Bacillus natto*) ND1 和酿酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*) NJ 为实验室保存。培养基 MRS、LB 和 YPD，青岛海博生物有限公司。尿素，上海源叶生物科技有限公司；蛋白酶联免疫分析(ELISA)试剂盒，南京奥青生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株活化

将实验室−20 °C 保存的 3 株菌按 1% (体积分数)接种量分别接种于 MRS、LB 和 YPD 培养基中，37 °C、150 r/min 活化 24 h 后按照同样方式进行二次活化，获得植物乳杆菌、纳豆芽孢杆菌和酿酒酵母的菌种液，备用。

1.2.2 菌酶结合处理大豆皮

实验分为 4 组，对照组(未经发酵和酶解处理的大豆皮组)、菌株发酵组(植物乳杆菌 LY19、纳豆芽孢杆菌 ND1 和酿酒酵母菌 NJ 这 3 株菌复合发酵组)、酶解组(纤维素酶和木聚糖酶复合酶解组)、酶解+菌株发酵组(简称菌酶发酵组，3 株复合菌+复合酶)。将 10.0 g 大豆皮、1.0 g 麸皮和 0.1 g 尿素混匀加入 160 mL 发酵瓶中，加水 20 mL 混匀，灭菌后备用。将活化的 3 株菌液分别以 1% (体积分数，10^8 CFU/mL)接种量接种至大豆皮中，再将实验室前期确定的纤维素酶和木聚糖酶分别以 100 U/g 和 250 U/g 添加至发酵瓶中，将发酵瓶移入 37 °C 培养箱进行 48 h 的培养，每组设置 4 个重复。发酵结束后测定大豆皮的发酵特性及成分的变化。

1.2.3 大豆皮的袋装发酵

实验分组同 1.2.2，分别为对照组、菌株发酵组、酶解组及菌酶发酵组，200 g 大豆皮、20 g 麸皮和 2 g 尿素混匀加入发酵袋中，加水 400 mL 混匀。然后将活化的 3 株菌液、纤维素酶和木聚糖酶根据 1.2.2 描述的接种量和添加量添加至发酵袋中，来回翻动混匀，将发酵袋移入 37 °C 培养箱，每组设置 4 个重复，分别在发酵的第 1、3、5、7 天进行取样，并在第 7 天停止发酵。对大豆皮的发酵特性及营养成分等进行测定，确定袋装大豆皮的最佳发酵时间，并在最佳发酵时间下测定发酵前后大豆皮各成分的变化，为生产提供参考。

1.3 测定指标与方法

DNS 法检测可溶性还原糖含量[9]；乳酸试剂盒测定乳酸含量；稀释涂布平板法检测活菌数[10]；凯氏定氮法测定粗蛋白、真蛋白含量；中性洗涤纤维(neutral detergent fiber，NDF)和酸性洗涤纤维(acid detergent fiber，ADF)使用滤袋法[11]测定，抗原蛋白(大豆球蛋白和 β-伴大豆球蛋白)采用蛋白酶联免疫分析(ELISA)试剂盒快速测定。

1.4 统计分析

数据以 mean±SD 表示，采用 GraphPad Prism 7.0 软件作图，通过 SPSS 22.0 统计软件进行双因素(two-way ANOVA)模型分析，Tukey’s-b 法进行显著性检验，$P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 复合酶和复合菌联合处理对大豆皮特性的影响

复合酶和复合菌联合处理大豆皮，发酵特性如图 1 所示，酶解与发酵之间存在相互作用，与发酵组相比，菌酶发酵组的乳酸浓度和活菌数较高，pH 值较低($P<0.05$)；酶解组的还原糖浓度为 45.76 mg/g，显著高于对照组(10.91 mg/g) ($P<0.05$)和菌酶发酵组(36.63 mg/g) ($P<0.05$)。说明复合酶酶解大豆皮可促进复合菌株的发酵。

2.2 复合酶和复合菌联合处理对大豆皮营养成分及品质的影响

如表 1 所示，与对照组相比，酶解组显著提高了大豆皮中还原糖的含量，并且提高了粗蛋白、真蛋白的含量($P<0.05$)，显著降低了中性

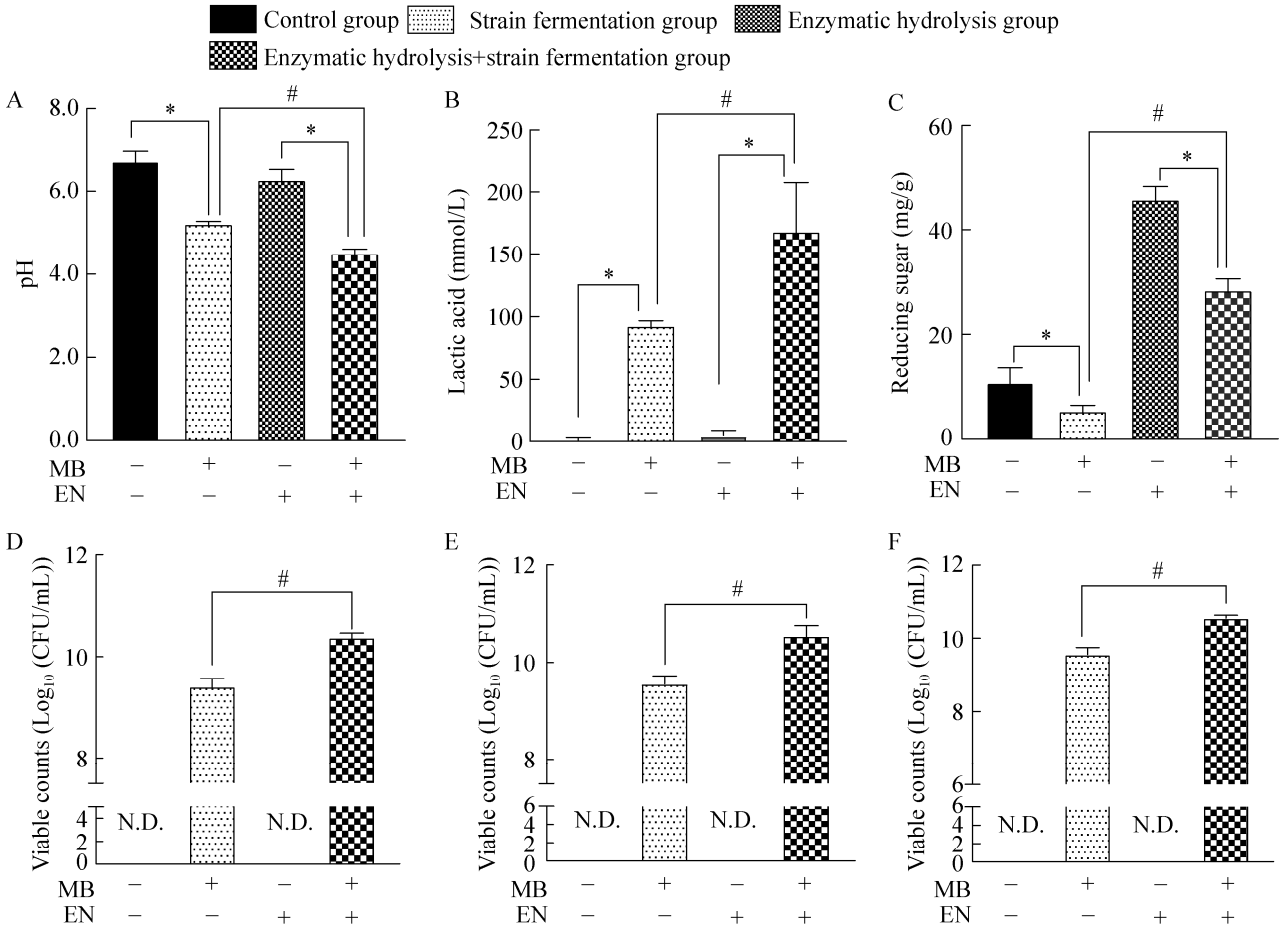

图 1 菌酶结合发酵对大豆皮 pH (A)、乳酸(B)、还原糖(C)和活菌数(D−F)的影响(n=4) D：植物乳杆菌活菌数；E：纳豆芽孢杆菌活菌数；F：酿酒酵母菌活菌数。MB：复合菌发酵；EN：复合酶酶解；+：发酵阳性；−：发酵阴性；#：复合酶组与无酶组之间差异显著；*：复合菌组与无菌组之间差异显著

Figure 1 Effects of combined fermentation with bacteria and enzyme on pH (A), lactic acid (B), reducing sugar (C) and viable count (D−F) of soybean hulls (n=4). D: Viable counts of *Lactobacillus plantarum* LY19; E: Viable counts of *Bacillus natto* ND1; F: Viable counts of *Saccharomyces cerevisiae* NJ. MB: SBH fermented by mixed bacteria; EN: SBH hydrolyzed by enzymes; +: The fermentation of positive; −: The fermentation of negative; #: There was significant difference between compound enzyme group and no enzyme group; *: There was significant difference between the compound bacteria group and the sterile group.

表 1 复合菌与复合酶结合发酵对大豆皮成分的影响(*n*=4)

Table 1 Effects of combined fermentation with mix bacteria and complex enzymes on the composition of soybean hulls (*n*=4)

项目 Items	未加酶 Without enzyme		加酶 Enzyme		SEM	*P* 值		
	未加菌 CON	加菌 MB	未加菌 EN	加菌 EN+MB		酶解 EN	发酵 MB	酶解×发酵 EN×MB
粗蛋白 Crude protein (%)	9.25c	10.93b	11.64b	12.51a	0.39	<0.05	<0.05	<0.05
真蛋白 True protein (%)	6.50d	7.68c	8.18b	8.79a	1.76	<0.05	<0.05	<0.05
中性洗涤纤维 [1] NDF[1] (%)	65.50a	54.45b	45.73c	41.75d	2.35	<0.05	<0.05	<0.05
酸性洗涤纤维 [2] ADF[2] (%)	45.71a	37.81b	31.46c	27.79d	1.28	<0.05	<0.05	<0.05
半纤维素 [3] Hemicellulose[3] (%)	19.79a	16.64b	14.27c	13.96c	1.09	<0.05	<0.05	<0.05
脲酶活性 Urease activity (U/g)	0.71a	0.25c	0.41b	0.09d	0.12	0.09	<0.05	0.07
球蛋白降解率 Degradation rate globulin (%)	0.00d	21.56b	5.32c	30.23a	2.37	0.12	<0.05	0.17
β-伴大豆球蛋白降解率 Degradation rate of β-conglycinin (%)	0.00d	24.26b	6.81c	35.84a	1.34	0.08	<0.05	0.23

注：[1]：中性洗涤纤维；[2]：酸性洗涤纤维；[3]：半纤维素=中性洗涤纤维–酸性洗涤纤维；a、b、c、d：不同组间有显著差异，下同

Note: [1]: Neutral detergent fiber; [2]: Acid detergent fiber; [3]: Hemicellulose=NDF–ADF; a, b, c, d: Significant difference level among different groups, the same below.

洗涤纤维、酸性洗涤纤维和半纤维素的含量(P<0.05)；与对照组相比，发酵组显著降低了脲酶活性、球蛋白和 β-伴大豆球蛋白的含量(P<0.05)。与发酵组相比，菌酶发酵组的粗蛋白提高了 35.24%，真蛋白提高了 35.23% (P<0.05)，中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维分别降低了 36.26%和 39.20%，半纤维素降低了 29.35% (P<0.05)，脲酶活性为 0.09 U/g，球蛋白和 β-伴大豆球蛋白分别降低了 30.23%和 35.84% (P<0.05)。与酶解组相比，菌酶发酵组粗蛋白提高了 25.84%，真蛋白提高了 25.85% (P<0.05)，还原糖浓度降低了 38.49% (45.76 mg/g *vs* 28.30 mg/g)，中性洗涤纤维和酸性洗涤纤维分别降低了 30.18%和 31.17%，半纤维素降低了 28.14% (P<0.05)。说明酶解和发酵之间有互作效应，但对脲酶活性、球蛋白和 β-伴大豆球蛋白等抗营养因子无互作效应(P>0.05)。

2.3 袋装处理时间对大豆皮 pH、乳酸及还原糖的影响

如表 2 所示，不同处理组和发酵时间对大豆皮的 pH、乳酸及还原糖均有显著影响，而且二者存在互作效应(P<0.05)。第 7 天时，大豆皮的 pH 值为 5.25，显著低于其他时间点(P<0.05)；比较各组发现，菌酶发酵组的 pH 值为 5.07，显著低于其他组(P<0.05)；乳酸含量随发酵时间的延长而升高，第 5 天时达到 70.68 mmol/L，显著高于第 1 天和第 3 天(P<0.05)，与第 7 天时的乳酸浓度差异不显著(P>0.05)；菌酶发酵组乳酸浓度为 128.01 mmol/L，显著高于对照组和发酵组，还原糖含量低于酶解组(P<0.05)。说明菌酶结合处理大豆皮的最佳时间为 5 d。

表 2 袋装发酵对大豆皮 pH、乳酸及还原糖的影响(*n*=4)

Table 2 Effect of bag fermentation on pH, lactic acid and reducing sugar of soybean hulls (*n*=4)

Items	Time	pH	乳酸 Lactic acid (mmol/L)	还原糖 Reducing sugar (mg/g)
对照组 Control group		6.05a	8.74c	10.28c
菌株发酵组 Strain fermentation group		5.49c	79.96b	7.49d
酶解组 Enzymatic hydrolysis group		5.82b	12.18c	32.50a
菌酶发酵组 Strain fermentation+enzymatic hydrolysis group		5.07d	128.01a	20.31b
	Day 1	5.93A	27.96C	17.64AB
	Day 3	5.72B	57.73B	16.31B
	Day 5	5.53C	70.68A	17.82AB
	Day 7	5.25D	75.50A	18.82A
标准误 SEM		0.02	1.26	0.35
P value for group		<0.05	<0.05	<0.05
P value for time		<0.05	<0.05	0.10
P value for group×time		<0.05	<0.05	<0.05

注：a、b、c、d：不同组间 $P<0.05$ 有显著差异；A、B、C、D：不同处理时间 $P<0.05$ 有显著差异，下同

Note: a, b, c, d: Significant difference at $P<0.05$ level among different groups; A, B, C, D: Significant difference at $P<0.05$ level among different times, the same below.

2.4 袋装处理时间对大豆皮蛋白及纤维含量的影响

如表 3 所示，不同处理组和发酵时间对大豆皮的粗蛋白、真蛋白、中性洗涤纤维及酸性洗涤纤维均有显著影响，而且二者存在互作效应($P<0.05$)。菌酶发酵组第 1 天的粗蛋白和真蛋白含量与其他时间点均有显著差异($P<0.05$)，但第 3、5、7 天之间无显著差异($P>0.05$)；菌酶发酵组粗蛋白和真蛋白含量分别提高了 32.39%和 32.25% ($P<0.05$)；菌酶发酵组的中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维含量降低了 45.85%和 29.61% ($P<0.05$)。在第 5 天时中性洗涤纤维含量下降至 53.69%，显著低于第 1 天和第 3 天的含量($P<0.05$)，但与第 7 天的中性洗涤纤维含量之间无显著差异($P>0.05$)，酸性洗涤纤维结果类似。说明酶解与发酵结合袋装处理大豆皮 5 d 时，可显著提高粗蛋白和真蛋白的含量，降低纤维含量。

2.5 最适袋装处理时间下，菌酶结合对大豆皮发酵特性、营养成分及品质的影响

结合表 2 和表 3，大豆皮的最佳发酵时间为 5 d，对大豆皮营养成分及品质分析见表 4，菌酶发酵组的 pH 值为 4.87，显著低于其他组($P<0.05$)，乳酸浓度显著低于其他组($P<0.05$)，还原糖含量显著高于发酵组而低于酶解组($P<0.05$)。与对照组相比，菌酶发酵组粗蛋白、真蛋白显著提高($P<0.05$)，中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维和半纤维素显著下降，抗营养因子显著下降($P<0.05$)。与发酵组相比，菌酶发酵组的粗蛋白、真蛋白显著提高($P<0.05$)，菌酶发酵组显著降低了大豆皮中的抗营养因子($P<0.05$)，其中大豆球蛋白降低了 32.71%，β-伴大豆球蛋白降低了 37.06%，脲酶活性降低至 0.1 U/g。与酶解组相比，菌酶发酵组的真蛋白提高了 5.38%

表 3 袋装发酵对大豆皮蛋白及纤维含量的影响(*n*=4)

Table 3 Effect of bag fermentation on protein and fiber of soybean hulls (*n*=4)

Items	时间 Time	粗蛋白 Crude protein (%)	真蛋白 True protein (%)	中性洗涤纤维 NDF (%)	酸性洗涤纤维 ADF (%)
对照组 Control group		9.17d	6.45d	64.51a	45.64a
发酵组 Strain fermentation group		10.48c	7.37c	58.23b	41.19b
酶解组 Enzymatic hydrolysis group		11.43b	8.03b	52.61c	35.73c
菌酶发酵组 Strain fermentation+enzymatic hydrolysis group		12.14a	8.53a	45.85d	29.61d
	Day 1	9.64B	6.78B	60.08A	42.16A
	Day 3	11.13A	7.82A	54.69B	37.84B
	Day 5	11.15A	7.84A	53.69BC	36.42C
	Day 7	11.30A	7.94A	52.70C	35.74C
标准误 SEM		0.04	0.28	0.24	0.19
P value for group		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
P value for time		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
P value for group×time		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

表 4 袋装最适处理时间下大豆皮各成分分析(*n*=4)

Table 4 Analysis of soybean hulls components under optimum fermentation time (*n*=4)

项目 Items	未加酶 Without enzyme		加酶 Enzyme		SEM	*P* 值		
	未加菌 CON	加菌 MB	未加菌 EN	加菌 MB+EN		加酶 EN	加菌 MB	加酶×加菌 EN×MB
pH	6.14a	5.28c	5.86b	4.87d	0.63	0.43	<0.05	<0.05
乳酸 Lactic acid (mmol/L)	10.86c	93.27b	12.94c	165.66a	0.26	0.21	<0.05	<0.05
还原糖 Reducing sugar (mg/g)	11.27c	6.52d	36.40a	17.08b	2.53	<0.05	<0.05	<0.05
粗蛋白 Crude protein (%)	9.29c	10.91b	12.17a	12.82a	1.33	<0.05	<0.05	<0.05
真蛋白 True protein (%)	6.53d	7.67c	8.55b	9.01a	0.79	<0.05	<0.05	<0.05
中性洗涤纤维 ADF (%)	64.71a	56.31b	49.81c	41.92d	6.83	<0.05	<0.05	<0.05
酸性洗涤纤维 NDF (%)	45.12a	40.42b	36.14c	30.00d	3.37	<0.05	<0.05	<0.05
半纤维素 Hemicellulose (%)	19.59a	15.89b	13.67c	11.92d	1.23	<0.05	<0.05	<0.05
大豆球蛋白降解率 Degradation rate globulin (%)	0.00d	23.36b	5.16c	32.71a	2.37	0.21	<0.05	0.32
β-伴大豆球蛋白降解率 Degradation rate of β-conglycinin (%)	0.00d	26.49b	7.41c	37.06a	3.21	0.26	<0.05	0.09
脲酶活性 Urease activity (U/g)	0.72a	0.21c	0.43b	0.1d	0.11	0.07	<0.05	0.26
霉菌 Mold (lg(CFU/mL))	3.31a	1.02b	3.06a	0.89c	0.34	0.06	<0.05	<0.05

(P<0.05)，中性洗涤纤维和酸性洗涤纤维分别降低了 15.84%和 16.99%，半纤维素降低了 12.80% (P<0.05)。然而酶解对大豆皮中的抗营养因子无显著影响(P>0.05)，菌酶发酵组中霉菌含量仅为 0.89 lg(CFU/mL)，低于其他组。说明袋装菌酶结合处理大豆皮 5 d 可改善大豆皮营养价值，抑制霉菌的产生，延长储存时间。

3 讨论

3.1 复合酶促进复合菌发酵大豆皮

与单独发酵组相比，菌酶发酵组具有更高的乳酸含量、活菌数及更低的 pH 值，说明酶解能够促进菌的发酵。菌酶发酵组还原糖含量更低，说明酶解产生的还原糖被菌株利用[12]。芽孢杆菌利用还原糖可分泌酶类降解纤维素和半纤维素；酵母菌可通过发酵将纤维类物质转化为自身菌体蛋白；同时，芽孢杆菌和酵母菌的生长也消耗了环境中的氧气，使得乳酸杆菌得以快速利用还原糖生长发酵，产生乳酸，从而降低发酵基质中的 pH 值[13]。说明高浓度的还原糖累积是酶解促进复合菌生长和发酵的根本原因。类似的研究表明，纤维素酶酶解玉米芯水解产物能够促进乙醇的发酵[14]。Wang 等[5]发现酶解花生粕能够促进芽孢乳杆菌产生乳酸，这可能是酶解过程中释放的营养物质能够被微生物所利用。

3.2 复合酶与复合菌联合处理提高了大豆皮的营养价值

大多数微生物不能直接消化利用大豆皮中的纤维素和半纤维素，因为它们缺乏分解纤维素和半纤维素所必需的酶[15]。研究表明，复合益生菌和酶制剂在青贮过程中联合添加可进一步提高青贮发酵品质，促进纤维降解[16-17]。因此，在对纤维含量较高的底物进行发酵时，外源纤维素酶的应用能够促进对发酵基质的充分利用。纤维素酶是降解纤维类饲料中纤维最常用的外源酶[18]，大豆皮纤维的主要成分是纤维素和半纤维素，因此，添加复合酶如纤维素酶和木聚糖酶后显著降低了大豆皮中纤维的含量。谢凤莲等[19]利用复合益生菌(干酪乳杆菌、产朊假丝酵母和枯草芽孢杆菌)发酵艾草，对纤维的降解不显著，添加纤维素酶后能够降低艾草中半纤维素和中性洗涤纤维的含量。在本研究中，菌酶发酵组中大豆皮粗蛋白显著高于对照组，这可能与复合菌利用酶解大豆皮纤维释放的糖类导致氮元素相对含量的升高有关[20]，而真蛋白的提高则可能是与微生物的增殖促进自身蛋白质合成有关。

3.3 袋装处理对大豆皮营养成分及品质的影响

许多研究报道，通过酶处理[21]和微生物发酵不仅降低了抗营养因子的水平，还改善了饲料的营养价值，提高了饲料的利用率[22-25]。本研究中，与对照组相比，菌酶发酵组处理 5 d 后，大豆皮粗蛋白提高了 37.79%，中性洗涤纤维和酸性洗涤纤维分别降低了 33.67%和 42.38%，可能是复合酶酶解和微生物的产酶能力共同作用降解纤维的结果。有研究报道，枯草芽孢杆菌和米曲霉发酵 72 h 后，豆粕中的粗蛋白分别增加 8.61%和 8.42%，可溶性蛋白分别增加 32.98%和 24.15%[26]；微生物发酵提高饲料粗蛋白含量是由于发酵过程中的物料损失[27]，增加的蛋白质与菌体利用外源氮合成自身蛋白质的绝对增长有关[28]。微生物发酵降低了大豆皮中球蛋白和 β-伴大豆球蛋白和脲酶活性，可能是微生物产生的酶类对其降解的结果[29]。然而复合酶酶解大豆皮时，抗营养因子含量无显著变化，说明纤维素酶只能降解大豆皮中的纤维，但不能降解抗营养因子。有研究表明，枯草芽孢杆菌发酵可降低豆粕中的胰蛋白酶抑制剂、植酸及

脲酶活性等抗营养因子[30]。微生物生长时产生的乳酸可抑制大豆皮中霉菌和病原微生物的生长和存活，从而使大豆皮具有较长的存储时间，利于解决霉变问题。有类似的研究表明，乳酸杆菌发酵可降低玉米中的黄曲霉毒素，使玉米的品质得到改善[31]。本实验中，袋装菌酶发酵组的大豆皮含有较高的蛋白质和较低的纤维及抗营养因子含量，并且抑制了霉菌的产生，说明大豆皮的营养价值及品质得到了改善，该处理可能使大豆皮成为饲料资源。

4 结论

纤维素酶和木聚糖酶复合酶与植物乳杆菌、纳豆芽孢杆菌和酿酒酵母菌复合菌联合使用可降解大豆皮中的纤维素和半纤维素，产生还原糖，促进乳酸杆菌、芽孢杆菌与酵母菌的生长增殖，进一步促进对大豆皮的发酵，提高蛋白含量、降低纤维和抗营养因子如脲酶活性、球蛋白和β-伴大豆球蛋白含量；袋装处理 5 d 时菌酶联合处理大豆皮，营养价值最高，品质最优，粗蛋白、真蛋白分别达到 12.82%和 9.01%，中性洗涤纤维降低了 35.22%，酸性洗涤纤维降低了 33.51%，半纤维素降低了 39.15%，抗营养因子脲酶活性降低至 0.1 U/g，大豆球蛋白减少了 32.71%，β-伴大豆球蛋白减少了 37.02%，并且无霉菌生长，显著提高了大豆皮的营养价值和品质，使大豆皮成为潜在的饲料资源。

REFERENCES

[1] Corredor DY, Sun XS, Salazar JM, Hohn KL, Wang D. Enzymatic hydrolysis of soybean hulls using dilute acid and modified steam-explosion pretreatments[J]. Journal of Biobased Materials and Bioenergy, 2008, 2(1): 43-50

[2] Tabibloghmany FS, Mazaheri Tehrani M, Koocheki A. Optimization of the extrusion process through response surface methodology for improvement in functional and nutritional properties of soybean hull[J]. Journal of Food Science and Technology, 2020, 57(11): 4054-4064

[3] Cho MJ, Unklesbay N, Hsieh FH, Clarke AD. Hydrophobicity of bitter peptides from soy protein hydrolysates[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(19): 5895-5901

[4] Drewnowski A, Gomez-Carneros C. Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review[J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 2000, 72(6): 1424-1435

[5] Wang RH, Shaarani SM, Godoy LC, Melikoglu M, Vergara CS, Koutinas A, Webb C. Bioconversion of rapeseed meal for the production of a generic microbial feedstock[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2010, 47(3): 77-83

[6] Harith ZT, Charalampopoulos D, Chatzifragkou A. Rapeseed meal hydrolysate as substrate for microbial astaxanthin production[J]. Biochemical Engineering Journal, 2019, 151: 107330

[7] Christensen P, Glitsø V, Pettersson D, Wischmann B. Fibre degrading enzymes and *Lactobacillus plantarum* influence liquid feed characteristics and the solubility of fibre components and dry matter *in vitro*[J]. Livestock Science, 2007, 109(1/2/3): 100-103

[8] 李英英. 菌酶结合发酵改善大豆皮营养价值及品质的研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2021
Li YY. Combination of enzymatic hydrolysis and bacteria fermentation to improve the nutritional values and quality of soybean hulls[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2021 (in Chinese)

[9] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. Analytical Chemistry, 1959, 31(3): 426-428

[10] 叶磊, 杨学敏. 微生物检测技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2009
Ye L, Yang XM. Microbial Detection Technology[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2009 (in Chinese)

[11] 张丽英. 饲料分析及饲料质量检测技术[M]. 3 版. 北京: 中国农业大学出版社, 2007
Zhang LY. Feed Analyses and Quality Test Technology[M]. 3rd ed. Beijing: China Agricultural University Press, 2007. (in Chinese)

[12] Spagnuolo M, Crecchio C, Pizzigallo MDR, Ruggiero P. Synergistic effects of cellulolytic and pectinolytic enzymes in degrading sugar beet pulp[J]. Bioresource Technology, 1997, 60(3): 215-222

[13] Koo B, Kim JW, Nyachoti CM. Nutrient and energy digestibility, and microbial metabolites in weaned pigs fed diets containing *Lactobacillus*-fermented wheat[J]. Animal Feed Science and Technology, 2018, 241: 27-37

[14] Gao K, Rehmann L. ABE fermentation from enzymatic hydrolysate of NaOH-pretreated corncobs[J]. Biomass and Bioenergy, 2014, 66: 110-115

[15] Chen J, Stokes MR, Wallace CR. Effects of enzyme-inoculant systems on preservation and nutritive value of haycrop and corn silages[J]. Journal of Dairy Science, 1994, 77(2): 501-512

[16] Chilson JM, Rezamand P, Drewnoski ME, Price W, Hunt CW. Effect of homofermentative lactic acid bacteria and exogenous hydrolytic enzymes on the ensiling characteristics and rumen degradability of alfalfa and corn silages[J]. The Professional Animal Scientist, 2016, 32(5): 598-604

[17] Kuo CH, Huang CY, Shieh CJ, Wang HMD, Tseng CY. Hydrolysis of orange peel with cellulase and pectinase to produce bacterial cellulose using *Gluconacetobacter xylinus*[J]. Waste and Biomass Valorization, 2019, 10(1): 85-93

[18] Juhász T, Szengyel Z, Réczey K, Siika-Aho M, Viikari L. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources[J]. Process Biochemistry, 2005, 40(11): 3519-3525

[19] 谢凤莲, 常娟, 尹清强, 王平, 吕战旗, 张红英, 杨明凡, 宁长申. 复合益生菌和纤维素酶发酵对艾草营养品质和微观结构的影响[J]. 动物营养学报, 2020, 32(4): 1768-1777
Xie FL, Chang J, Yin QQ, Wang P, Lyu ZQ, Zhang HY, Yang MF, Ning CS. Effects of compound probiotics and cellulase fermentation on nutritional quality and microstructure of *Artemisia argyi*[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2020, 32(4): 1768-1777 (in Chinese)

[20] Shi CY, He J, Yu J, Yu B, Huang ZQ, Mao XB, Zheng P, Chen DW. Solid state fermentation of rapeseed cake with *Aspergillus niger* for degrading glucosinolates and upgrading nutritional value[J]. Journal of Animal Science and Biotechnology, 2015, 6(1): 13

[21] Cheng W, Chiu CS, Guu YK, Tsai ST, Liu CH. Expression of recombinant phytase of *Bacillus subtilis* E20 in *Escherichia coli* HMS 174 and improving the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, juveniles by using phytase-pretreated soybean meal-containing diet[J]. Aquaculture Nutrition, 2013, 19(2): 117-127

[22] Yamamoto T, Iwashita Y, Matsunari H, Sugita T, Furuita H, Akimoto A, Okamatsu K, Suzuki N. Influence of fermentation conditions for soybean meal in a non-fish meal diet on the growth performance and physiological condition of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*[J]. Aquaculture, 2010, 309(1/2/3/4): 173-180

[23] Zhou F, Song WX, Shao QJ, Peng X, Xiao JX, Hua Y, Owari BN, Zhang TZ, Ng WK. Partial replacement of fish meal by fermented soybean meal in diets for black sea bream, *Acanthopagrus schlegelii*, juveniles[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2011, 42(2): 184-197

[24] Shiu YL, Wong SL, Guei WC, Shin YC, Liu CH. Increase in the plant protein ratio in the diet of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone), using *Bacillus subtilis* E20-fermented soybean meal as a replacement[J]. Aquaculture Research, 2015, 46(2): 382-394

[25] Shiu YL, Hsieh SL, Guei WC, Tsai YT, Chiu CH, Liu CH. Using *Bacillus subtilis* E20-fermented soybean meal as replacement for fish meal in the diet of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*, Hamilton)[J]. Aquaculture Research, 2015, 46(6): 1403-1416

[26] Chiu ST, Wong SL, Shiu YL, Chiu CH, Guei WC, Liu CH. Using a fermented mixture of soybean meal and earthworm meal to replace fish meal in the diet of white shrimp, *Penaeus vannamei* (Boone)[J]. Aquaculture Research, 2016, 47(11): 3489-3500

[27] 王旭明, 倪永珍, 李维炯, 陈宗泽, 袁毅. 有效微生物群(EM)对饲料 pH 值及营养价值的影响[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2002, 28(4): 431-434
Wang XM, Ni YZ, Li WJ, Chen ZZ, Yuan Y. Effects of EM on pH value and nutritive value of feed[J]. Journal of Zhejiang Agricultural University: Agric& Life Sci, 2002, 28(4): 431-434 (in Chinese)

[28] Barbosa C, Mendes-Faia A, Mendes-Ferreira A. The nitrogen source impacts major volatile compounds released by *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation[J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 160(2): 87-93

[29] 肖连冬, 马红霞. 活菌益生高蛋白饲料的生产及应用[J]. 饲料工业, 2007, 28(13): 52-54
Xiao LD, Ma HX. Production and application of probiotic high protein feed[J]. Feed Industry, 2007, 28(13): 52-54 (in Chinese)

[30] Bi H, Zhao HZ, Lu FX, Zhang C, Bie XM, Lu ZX. Improvement of the nutritional quality and fibrinolytic enzyme activity of soybean meal by fermentation of *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2015, 39(6): 1235-1242

[31] Assohoun MCN, Djeni TN, Koussémon-Camara M, Brou K. Effect of fermentation process on nutritional composition and aflatoxins concentration of *Doklu*, a fermented maize based food[J]. Food and Nutrition Sciences, 2013, 4(11): 1120-1127