

低温乳酸菌复合系的构建、培养条件优化及在玉米干秸秆微贮中的应用

王翠¹ 洪秀杰² 李振国¹ 常艳艳¹ 张鸿雁¹ 刘权¹ 晏磊¹ 王彦杰^{1*} 王伟东^{1*}

(1. 黑龙江八一农垦大学 生命科学技术学院 黑龙江 大庆 163319)

(2. 大庆市农业技术推广中心 黑龙江 大庆 163411)

摘 要: 【目的】研究筛选得到的低温乳酸菌复合菌系(LAC-1)的最佳培养条件及应用于玉米干秸秆微贮的效果。【方法】通过连续限制性培养的方法,以 pH 为指标进行低温乳酸菌复合系的筛选;利用单因素试验、Box-Behnken 试验设计和响应面的分析方法对低温乳酸菌复合系的培养条件进行优化。【结果】筛选获得培养液 pH 下降迅速、变化稳定及接种干玉米秸秆后可降低发酵体系 pH、提高发酵饲料感官品质的低温乳酸菌复合菌系 LAC-1。培养时间对 LAC-1 的 pH 降低速度影响最大,温度次之,接种量影响最小;响应面分析 LAC-1 最佳的培养条件为培养温度 9.5 °C、接种量 3.3%和培养时间 139 h。经过优化,LAC-1 培养过程中 pH 下降到 4.0 的时间比优化前缩短 48 h,乳酸菌数提高了 20.5%。LAC-1 接种于干玉米秸秆发酵 5 d 时,秸秆发酵体系 pH 降至 4.1;与对照相比,秸秆发酵饲料可散发出甜酸香味,外观质地松散、色泽鲜亮,可溶性碳水化合物含量降低了 46.3%,霉菌、恶臭醋酸杆菌和酵母菌数量显著降低,乳酸菌数量提高了 33.3%。【结论】接种 LAC-1 可促进干玉米秸秆低温微贮进程,提高饲料品质。

关键词: 干玉米秸秆,低温乳酸菌复合系,培养条件优化,发酵饲料

基金项目: 黑龙江省教育厅面上项目(No. 12531449); 黑龙江省高校创新团队建设计划项目(No. 2012TD006)

*通讯作者: Tel: 86-459-6819298

✉: 王彦杰: wangyanjie1972@163.com; 王伟东: wwdcyy@126.com

收稿日期: 2012-09-19; 接受日期: 2012-11-15

Construction and optimization the culture conditions for the micro storage of corn straw by lactic acid bacteria community at low temperature

WANG Cui¹ HONG Xiu-Jie² LI Zhen-Guo¹ CHANG Yan-Yan¹
ZHANG Hong-Yan¹ LIU Quan¹ YAN Lei¹ WANG Yan-Jie^{1*} WANG Wei-Dong^{1*}

(1. College of Life Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University,
Daqing, Heilongjiang 163319, China)

(2. Daqing Agricultural Technology Extension Center, Daqing, Heilongjiang 163411, China)

Abstract: [Objective] To optimize the culture conditions of lactic acid bacteria community (LAC-1) screened at low temperature, and investigate the micro storage effects of cornstalk inoculated with LAC-1. [Methods] The LAC-1 was screened by continuous restricted cultivation, using system pH as the only indicator. The single factor experiment, Box-Behnken design and response surface methodology were used to optimize the culture conditions of LAC-1. [Results] A community which could decrease pH rapidly was screened and named as LAC-1. LAC-1 could keep the pH and fermentation system stable, which could improve the sensory quality of fermented silage. Results showed that the pH reduction speed of LAC-1 was greatly influenced in this order: culture time, temperature and inoculated quantity. The optimal culture parameters were: culture temperature at 9.5 °C, inoculated quantity at 3.3% and culture time at 139 h. Under the optimal conditions, the fermentation time was shortened by 48 h and the number of lactic acid bacteria was increased by 20.5%. When the dry cornstalk was inoculated with LAC-1 by 5 days, the system pH fell to 4.1. The silage smelled sweet, flavor and sour, the texture was loose in appearance and bright in color. The following determination indicated the content of water-soluble carbohydrate was declined by 46.3% and the number of lactic acid bacteria was improved by 33.3%. [Conclusion] The application of LAC-1 could promote the conversion of dry cornstalk into micro storage and improve the quality of silage.

Keywords: Dry cornstalk, Low temperature lactic acid bacteria community, Optimization of culture conditions, Silage

在中国由于得不到合理利用而焚烧的秸秆约 2.15 亿 t/年, 这不仅严重污染环境, 还浪费了大量宝贵的资源^[1-2]。另一方面, 我国对牧草的需求量缺口达到 800 万 t/年^[3], 秸秆饲料化可解决牧草不足的问题。我国每年约 30.7% 的秸秆用作饲料, 目前推广应用的一些秸秆饲料技术主要有青贮、

氨化、装袋保鲜等, 用低温微生物方法处理干黄玉米秸秆发酵饲料至今还没有在生产应用上取得实质性的进展^[4]。

玉米干黄秸秆虽可以直接作为牲畜饲粮, 但粗蛋白含量低, 粗纤维含量高, 质地粗硬, 适口性差, 消化率低, 代谢利用率较差^[5]。寒区玉米收

获后气温较低,低温成为干玉米秸秆微贮处理的限制因素。可促进低温条件下玉米干秸秆微贮进程的微生物筛选和应用成为玉米干秸秆低温饲料化亟待解决的问题。因此笔者实验室利用微生物之间的协同关系,通过长期定向筛选获得一组可用于玉米秸秆微贮的低温乳酸菌复合菌系^[6]。本文在已有的研究基础上,从青贮饲料中筛选出一组实用性更强的低温乳酸菌复合菌系,利用单因素和响应面分析的方法对该低温乳酸菌复合系培养条件进行优化,评价其在玉米干秸秆发酵的接种效果,为低温条件下进行玉米干秸秆微贮提供指导。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 供试玉米秸秆来源及性质:供试玉米秸秆取自黑龙江八一农垦大学玉米试验基地,主要性质为 pH 6.4、干物质(Dry matter, DM) 90%、水溶性碳水化合物(Water-soluble carbohydrates, WSC) 59.1 g/kg。

1.1.2 培养基:低温乳酸菌复合菌系的筛选及培养采用 MRS-S 培养基^[7],霉菌、恶臭醋酸杆菌和酵母菌有效活菌数的测定分别采用高盐察氏培养基、恶臭醋酸杆菌培养基和马铃薯葡萄糖培养基(PDA)^[8]。

1.2 方 法

1.2.1 低温乳酸菌复合系的筛选:将取自不同地点的青贮玉米饲料样品 1 g 分别接种于装有 9 mL MRS-S 培养基的 15 mL 螺口试管中,10 °C 静置培养。以 pH 为指标,淘汰 pH 下降缓慢的培养物,将 pH 下降迅速、pH 达到 4.0 以下的培养物进行混合组配,以 5% (V/V)的接种量接种于 MRS-S 培养基中做连续继代培养,将 pH 变化稳定的培养物以 10% (V/V)的接种量接种于粉碎至 1 cm–2 cm 的玉米干秸秆中,调节含水量为 60%–70% (W/W),装

满并压实于 100 mL 的蓝盖螺口瓶中,密封后 10 °C 静置培养 15 d,以 pH 和感官为指标确定适合于玉米干秸秆低温微贮的乳酸菌复合系。

1.2.2 低温乳酸菌复合系培养条件的单因素试验:将 MRS-S 培养基 13 mL 装入 15 mL 的螺口试管中,接种后静置培养 7 d,在培养的第 0、6、12、18、24、36、48、72、96、120、144、168 h 时取样测定 pH。

在培养温度 10 °C、初始 pH 为 6.2 的条件下,分别设定接种量为 1%、3%、5%、10% 和 15%,静置培养 7 d,定时取样测定 pH,每个处理 3 次重复。

在初始 pH 为 6.2、接种量为 5% 的条件下,分别设定培养温度为 2 °C、6 °C、10 °C、15 °C 和 20 °C,静置培养 7 d,定时测定 pH,每个处理 3 次重复。

在培养温度为 10 °C、接种量为 5% 的条件下,分别设定初始 pH 为 4、5、6、7、8、9,静置培养 7 d,定时测定 pH,每个处理 3 次重复。

1.2.3 低温微贮复合菌系的响应面分析因素水平的选取:在单因素试验基础上,利用 Box-Behnken 试验设计原理,选取温度、接种量和时间作为变量,pH 为响应值,采用三因素三水平的 Box-Behnken 试验设计方法进行试验设计,试验因素水平编码值见表 1。

1.2.4 低温乳酸菌复合系优化前后生化指标与乳酸菌数量的比较:在通过优化获得的响应面预测的最佳培养条件下,每 24 h 测定乳酸菌复合系发酵液的 pH,培养 144 h 时测定发酵液的 OD_{600} 、WSC 和乳酸菌数量,以优化前培养条件的处理作对照。

1.3 接种效果试验

在获得最佳培养条件下,采用 1 L 的蓝盖螺口瓶扩大培养低温乳酸菌复合系,10 °C 静置培养 5 d 后用于接种试验。

将粉碎至 1 cm–2 cm 的干玉米秸秆的含水量

表 1 响应面三因素三水平试验设计
Table 1 The experiment design of 3 factors and 3 levels of response surface method

因素 Factors	编码 Encode	水平 Levels		
		+1	0	-1
温度 Temperature (°C)	Z ₁	2	6	10
时间 Time (d)	Z ₂	1	4	7
接种量 Inoculated quantity (%)	Z ₃	1	3	5

调节为 60%–70% (W/W), 接种 3% 的低温乳酸菌复合系, 装满并压实于 100 mL 的蓝盖螺口瓶中, 密封后 10 °C 培养, 以等量的 MRS-S 培养基处理作对照, 每处理 18 个重复, 分别在发酵的 0、3、5、10、20、30 d 各取出 3 瓶样品进行生化指标和乳酸菌、霉菌、恶臭醋酸杆菌和酵母菌有效活菌数的测定。

1.4 测定方法

培养液和发酵体系的 pH 采用 HORIBA B-212 型 pH 计进行测定, 将玉米干秸秆发酵饲料稀释 10 倍, 振荡后静置 20 min, 上清液用于 pH 和有效活菌数测定, 发酵体系的霉菌、恶臭醋酸杆菌和酵母菌有效活菌数测定采用平板计数法^[9]。乳酸菌复合系发酵液及发酵体系中乳酸菌的测定参照文献[10]。微贮饲料质量感官评价采用德国农业协会青贮质量感官评分标准^[11]。经过 60 °C、48 h 烘干后测定乳酸菌发酵液和玉米秸秆饲料的 DM 和 WSC^[12]。

1.5 数据统计分析方法

采用 Design Expert 7.1.3 软件进行 Box-Behnken 试验设计, 通过响应面回归过程 (RSREG) 进行数据分析, 建立培养条件对 LAC-1 培养液 pH 的二次回归模型。

采用 SPSS 19.0 软件对数据进行统计分析, 运用 Origin 8.0 软件作图。

2 结果与分析

2.1 低温乳酸菌复合系的获得及特性

通过继代培养获得一组接种于玉米干秸秆后

pH 下降迅速而稳定的低温乳酸菌复合系, 将该复合系命名为 LAC-1。LAC-1 培养液在培养第 6 天时, pH 和可溶性糖分别降到 4.0 和 44.3 g/kg, 乳酸菌数达到 8.2 lgCFU/g。将 LAC-1 接种于玉米干秸秆, 发酵 15 d 后可使发酵体系的 pH 降至 4.0, 提高了发酵饲料的感官品质(图 1)。

2.2 单因素实验结果

2.2.1 温度对 LAC-1 培养液 pH 的影响: pH 下降速度与程度是指示秸秆进入发酵状态迅速与否的关键指标之一, pH 在 3.9–4.1 则说明秸秆发酵良好^[13]。如图 2 所示, 不同培养温度处理的 LAC-1 发酵液 pH 均呈下降趋势, 10 °C、15 °C 和 20 °C 的处理在培养第 120 h pH 均可下降到 4.0 以下, 6 °C 的处理在培养结束时 pH 达到 4.2, 2 °C



图 1 LAC-1 接种玉米干秸秆发酵感官品质

Fig. 1 The fermented silage sensory quality of dry cornstalk with LAC-1

注: CK: 对照; Inoculated treatment: LAC-1 的接种处理。

Note: CK: Control; Inoculated treatment: The dry cornstalk treated by the LAC-1.

的处理在培养结束时 pH 也未下降到 4.2 以下, 表明在供试培养温度范围内, 培养温度越高 LAC-1 培养液的 pH 下降越迅速; 与较高的处理温度相比, 10 °C 处理同样可以达到较为理想的 pH。

2.2.2 初始 pH 对 LAC-1 培养液 pH 的影响: 环境的 pH 值通过引起细胞膜电荷变化, 改变其通透性, 从而影响乳酸菌对营养物质的吸收和生长^[14]。如图 3 所示, 在 pH 为 4.0 和 9.0 时, LAC-1 培养液的 pH 下降的速度缓慢, 在 pH 为 5.0–8.0 之间

时, pH 下降的速度较快, 发酵结束时, pH 均下降到 4.0 左右, 表明适于 LAC-1 生长的初始 pH 范围较广。

2.2.3 接种量对 LAC-1 培养液 pH 的影响: 接种量对 LAC-1 培养液 pH 的影响见图 4, LAC-1 培养液在不同接种量处理条件下, pH 均呈下降趋势, 随着接种量的提高, LAC-1 培养液的 pH 下降速度加快, 但在培养的第 144 h 时, pH 均降到 4.0, 表明较小的接种量也可使培养液的 pH 快速下降并达到较低的 pH。

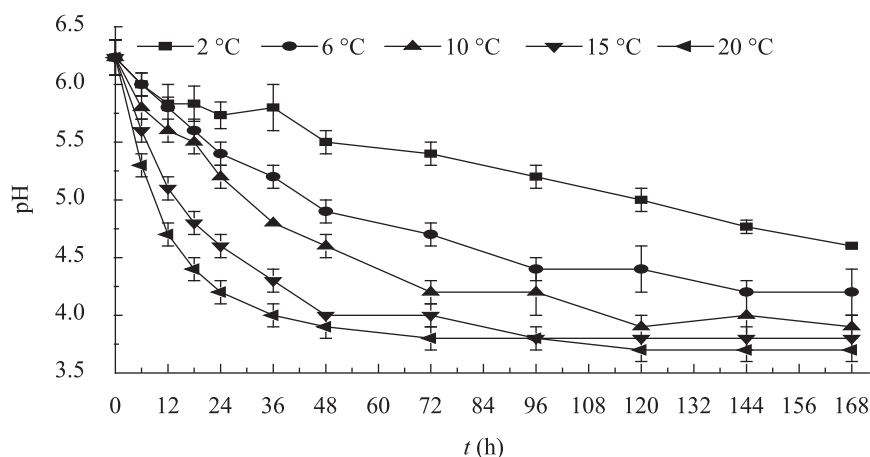


图 2 不同培养温度对 LAC-1 培养液 pH 影响

Fig. 2 The influence of different temperatures to the pH of LAC-1 culture fluid

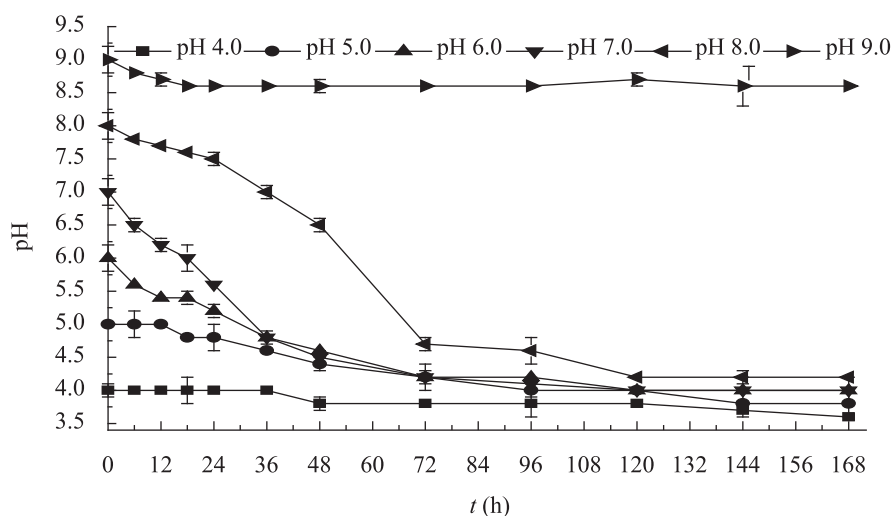


图 3 不同初始 pH 对 LAC-1 培养液 pH 的影响

Fig. 3 The influence of different initial pH to the pH of LAC-1 culture fluid

2.3 响应面分析试验

2.3.1 响应面分析方案与试验结果：根据 Box-Benhknen 中心组合试验设计原理，在单因素试验基础上，采用三因素三水平的响应面分析方法，对培养温度 Z_1 、培养时间 Z_2 和接种量 Z_3 作变换

如下： $X_1=(Z_1-6)/4$, $X_2=(Z_2-4)/3$, $X_3=(Z_3-3)/2$ 。以 X_1 、 X_2 、 X_3 为变量，以 pH 值为响应值(Y)，利用 Design Expert 7.0 软件对试验结果进行统计分析，试验方案及结果见表 2。

采用 Design Expert 7.0 软件对各个试验条件

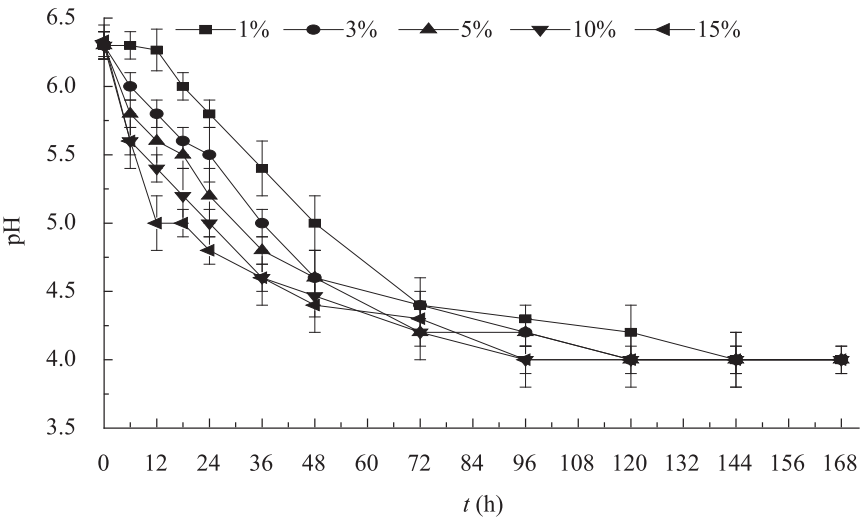


图 4 不同接种量对 LAC-1 培养液 pH 影响

Fig. 4 The influence of different inoculated quantity to the pH of LAC-1 culture fluid

表 2 响应面分析方案与试验结果				
Table 2 Experimental result and scheme of response surface method				
序号 No.	因素 Factors			pH
	温度 Temperature (X_1)	时间 Time (X_2)	接种量 Inoculated quantity (X_3)	
1	-1.00	-1.00	0.00	6.1
2	1.00	-1.00	0.00	5.9
3	-1.00	1.00	0.00	5.4
4	1.00	1.00	0.00	4.0
5	-1.00	0.00	-1.00	6.0
6	1.00	0.00	-1.00	4.2
7	-1.00	0.00	1.00	5.4
8	1.00	0.00	1.00	4.0
9	0.00	-1.00	-1.00	6.2
10	0.00	1.00	-1.00	4.4
11	0.00	-1.00	1.00	5.8
12	0.00	1.00	1.00	4.0
13	0.00	0.00	0.00	4.7
14	0.00	0.00	0.00	4.5
15	0.00	0.00	0.00	4.8
16	0.00	0.00	0.00	4.3
17	0.00	0.00	0.00	4.6

的结果进行二次多项式回归拟合,得到二次多元回归方程: $Y=8.020\ 56-0.301\ 25X_1-0.539\ 44X_2-0.227\ 50X_3-0.025\ 000X_1X_2+0.012\ 550X_1X_3+1.387\ 78E-017X_2X_3+0.017\ 813X_1^2+0.053\ 889X_2^2+8.75\ 000E-003X_3^2$

对上述回归模型进行方差分析(表3),结果表明,回归模型显著($P=0.001\ 4<0.050\ 0$),回归模型的决定系数为 $0.943\ 1$,说明该模型能解释 94.31% 的变化。失拟项 $P=0.106\ 6>0.05$,差异不显著,说明回归方程具有较好的拟合度,该模型能够反应响应值变化,试验误差小,因此,可用此模型对 LAC-1 不同条件下的生长情况进行分析和预测。依据系数估计值 $X_1=34.00$ 、 $X_2=56.72$ 和 $X_3=3.78$,可知影响因子的主效应主次顺序为:培养时间(X_2)>培养温度(X_1)>接种量(X_3)。

2.3.2 低温乳酸菌复合系生长条件优化: 利用 Design Expert 7.0 软件对表 2 的数据进行二次多元回归拟合,所得到的二次回归方程的响应面和等高线见图 5、6、7。从中可见,温度和时间以及温度和接种量对 LAC-1 培养液 pH 的交互作用

显著,时间和接种量对低温乳酸菌复合系的交互作用不显著。

2.4 验证试验

为检验试验的可靠性,采用响应面预测的最佳条件进行 LAC-1 培养试验,3 次重复。由表 4 可知,结果显示发酵结束时 LAC-1 的 pH 为 4.0,与此条件下的预测值相差 0.2,实际值与预测值的相对偏差仅为 0.5%,说明试验结果与模型复合良好,并达到试验过程中的最低 pH,说明此响应面模型具有可行性,通过此模型优化 LAC-1 培养条件后,能够有效地降低培养液 pH。

2.5 LAC-1 优化前后生化指标的比较

对 LAC-1 培养条件优化前后的发酵产物进行比较,LAC-1 的发酵产物经优化处理 144 h 后的乳酸菌的数量和 OD_{600} 分别比优化前提高了 20.5%和 13.4%,而 WSC 比优化前降低了 31.8%,pH 降低到 4.0 的时间比优化前缩短了 48 h。

2.6 接种效果分析

2.6.1 秸秆发酵过程中感观品质评定变化: 发酵

表 3 回归模型方差分析
Table 3 Analysis of variance with regression model

变异来源 Source	平方和 SS	自由度 DF	均方 MS	F 值 F value	P 值(显著水平) P value (significance level)
模型 Model	9.830	9	1.090	12.890	0.001 4**
A	2.880	1	2.880	34.000	0.000 6**
B	4.800	1	4.800	56.720	0.000 1**
C	0.320	1	0.320	3.780	0.093 0
AB	0.360	1	0.360	4.250	0.078 2
AC	0.040	1	0.040	0.470	0.514 1
BC	0.000	1	0.000	0.000	1.000 0
A ²	0.340	1	0.340	4.040	0.084 5
B ²	0.990	1	0.990	11.690	0.011 1*
C ²	5.158E-003	1	5.158E-003	0.061	0.812 2
失拟项 Lack of fit	0.450	3	0.150	4.010	0.106 6
纯误差 Pure error	0.150	4	0.037		
残差 Residual	0.590	7	0.085		
总变异 Cor total	10.420	16			

Note: $R^2=0.943\ 1$, Adj $R^2=0.869\ 9$; *: Stand for significant level variance.

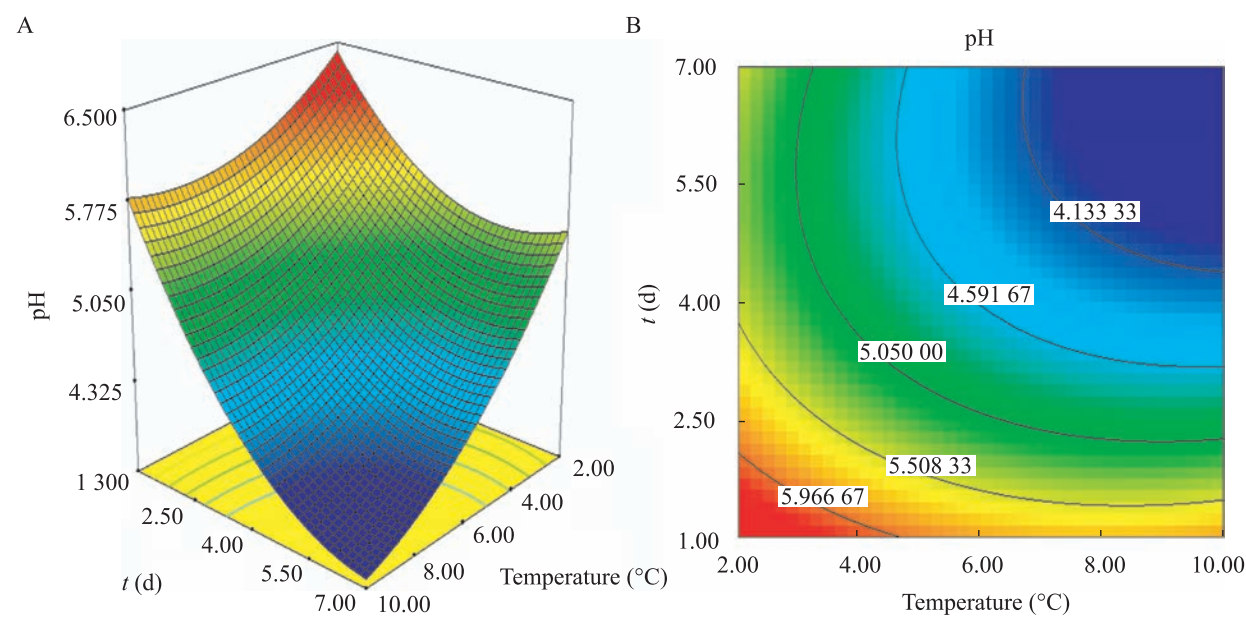


图 5 培养时间和培养温度交互影响的三维曲面图(A)和等高线图(B)

Fig. 5 Surface (A) and contour plots (B) of mutual-influence for the culture time and temperature

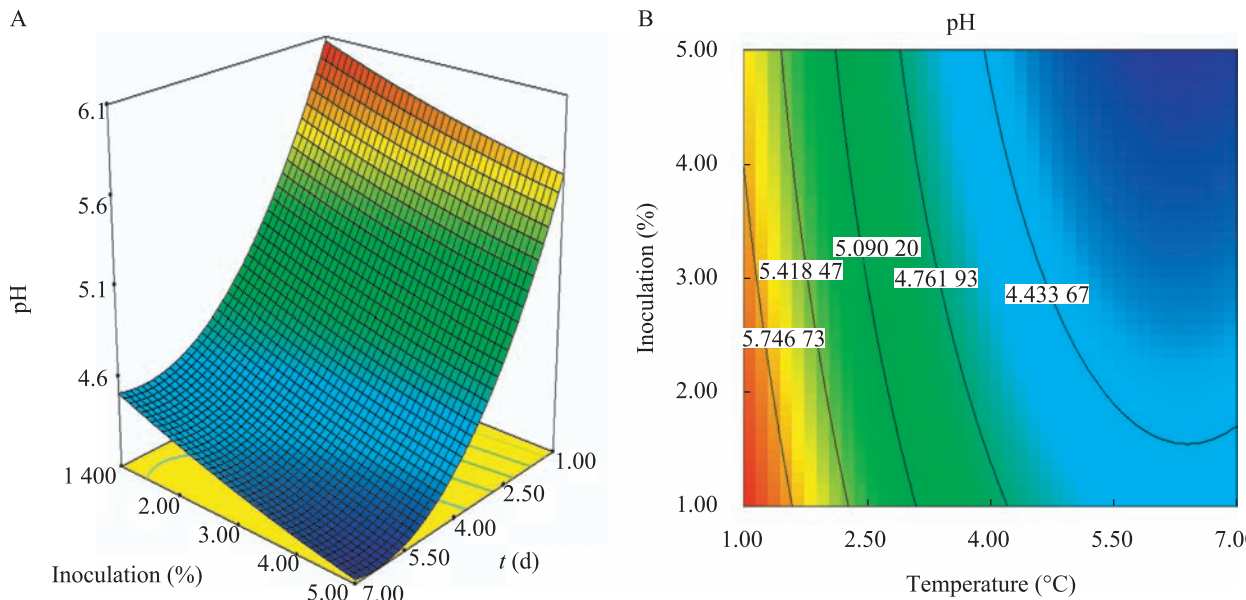


图 6 培养时间和接种量交互影响的三维曲面图(A)和等高线图(B)

Fig. 6 Surface (A) and contour plots (B) of mutual-influence for the culture time and inoculated quantity

表 4 试验结果的验证				
Table 4 Result of demonstration tests				
试验条件	温度	时间	接种量	pH
Experiment condition	Temperature (°C)	Time (h)	Inoculated quantity (%)	
响应面预测最佳条件	9.5	139	3.3	3.8
Best predicted condition				
验证响应面预测最佳条件	9.5	139	3.3	4.0
Best condition				

5 d后, 玉米干秸秆饲料发酵品质评定如下: 气味有甜酸香味、质地较松散、色泽鲜亮, 发酵质量评分分别为 10、4、2, 得分共计为 16, 其评定等级为一等优良。

2.6.2 秸秆发酵过程中化学成分和微生物变化: 玉米秸秆饲料发酵前后化学成分和微生物变化见表 5。随着发酵时间的进行, 不同处理的 pH、DM、WSC 和霉菌、恶臭醋酸杆菌、酵母菌的数

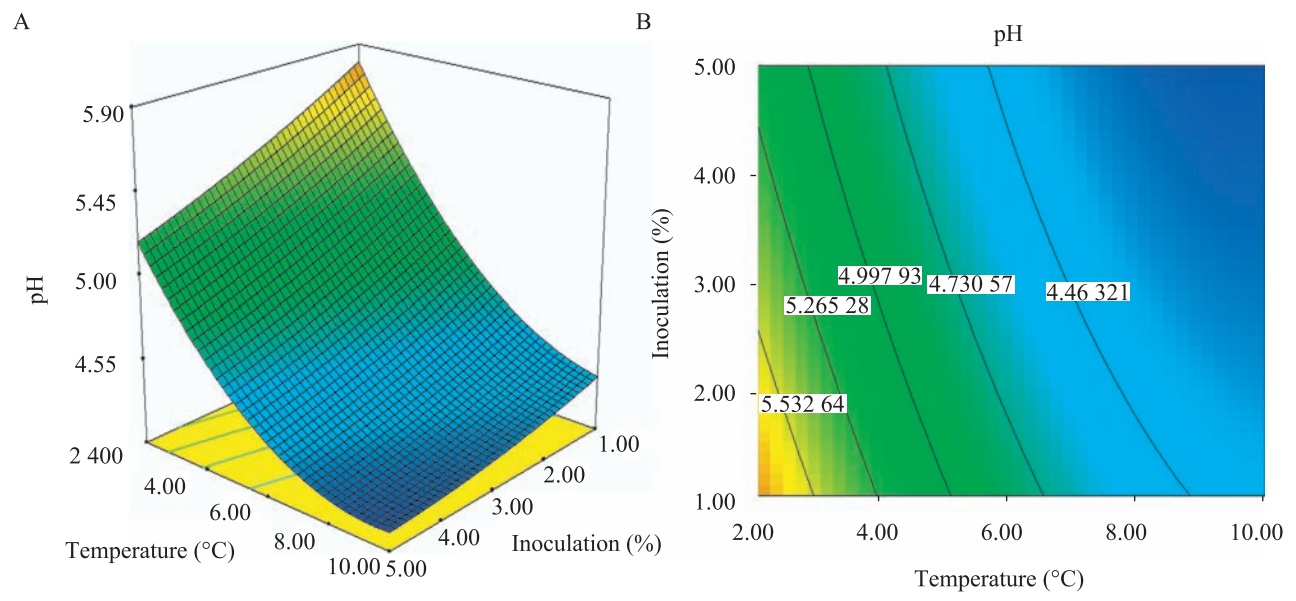


图 7 培养温度和接种量交互影响的三维曲面图(A)和等高线图(B)

Fig. 7 Surface (A) and contour plots (B) of mutual-influence for the culture temperature and inoculated quantity

表 5 玉米秸秆发酵前后化学成分和微生物分析(基于干物质基础)							
Table 5 Microorganism and chemical compositions of the corn straw before and after fermentation (DM basis)							
检测项目 Inspection items	处理 Treatment	培养时间 Culture time (d)					
		0	3	5	10	20	30
pH	CK	6.1Ae	5.9Ad	5.7Ac	5.3Ab	4.9Aa	4.8Aa
	LAC-1	6.0Ab	4.3Ba	4.1Ba	4.1Ba	4.1Ba	4.1Ba
干物质	CK	35.1Af	34.4Ae	33.3Ad	32.4Ac	31.4Ab	31.4Aa
DM (%)	LAC-1	34.9Ae	33.5Bd	32.2Bc	31.3Bb	30.4Ba	30.3Ba
可溶性糖	CK	59.7Af	54.5Ae	47.6Ad	32.6Ac	21.2Ab	19.9Aa
WSC (g/kg)	LAC-1	60.6Ae	47.4Bd	25.6Bc	14.2Bc	8.8Bb	5.4Ba
酵母菌的数量	CK	5.9Ae	5.9Ad	5.8Ac	5.7Ac	4.9Ab	4.7Aa
The number of saccharomycetes (lgCFU/g)	LAC-1	5.9Af	5.6Be	5.4Bd	4.7Bc	4.6Bb	4.1Ba
霉菌的数量	CK	4.9Ad	4.8Ac	4.7Ac	3.9Ab	3.8Ab	1.9Aa
The number of mould (lgCFU/g)	LAC-1	4.8Af	3.7Be	3.4Bd	1.8Bc	1.7Bb	0.7Ba
恶臭醋酸杆菌的数量	CK	5.8Ae	5.0Ad	4.8Ac	4.1Ab	4.0Aab	3.9Aa
The number of Acetobacter rancens (lgCFU/g)	LAC-1	5.9Af	4.9Ae	3.6Bd	2.9Bc	2.3Bb	1.9Ba
乳酸菌的数量	CK	6.1Ad	6.8Ac	6.8Ac	7.5Ab	8.1Aa	8.1Aa
The number of LAB (lgCFU/g)	LAC-1	6.2Ac	8.9Bb	9.0Bab	9.0Bab	9.2Ba	9.0Bb

注: 不同的大写字母表示不同处理的同一检测项目之间的显著性差异($P<0.05$); 不同的小写字母表示同一检测项目不同发酵时间之间的显著性差异($P<0.05$).

Note: Different capital letters mean significant difference ($P<0.05$) among treatments of the same property. Different small letters mean significant difference ($P<0.05$) among treatments of composting time.

量均呈下降的趋势, 发酵 3 d 后, CK 和 LAC-1 处理的 pH 值、DM、WSC 和霉菌、恶臭醋酸杆菌、酵母菌的数量均显著低于发酵起始的数值; 而乳酸菌(LAB)的数量随发酵的进行呈上升的趋势, CK 和 LAC-1 处理在发酵 3 d 后的 LAB 数量均显著高于发酵起始的数量。接种处理在发酵第 5 天时, pH 降低至 4.1, 而 CK 在发酵结束后也未达到秸秆饲料 pH 4.1 良好的指标。

与对照相比, 接种处理的 pH 值、DM、WSC 和霉菌、酵母菌的数量发酵 3 d 后均显著降低, 而乳酸菌的数量显著升高, 接种处理的恶臭醋酸杆菌数量在发酵 5 d 后显著降低。

3 结论与讨论

秸秆饲料发酵生产过程中, 秸秆上携带的乳酸菌和 WSC 含量的不足往往使其不能自行发酵, 需要额外添加乳酸菌和含糖量高的物质^[10,15-16]。添加乳酸菌可改善微贮料的适口性^[17-19], 抑制腐生菌等不利于微贮微生物的生长^[20]。但将纯培养物接种到未灭菌的发酵体系中往往达不到预期的效果^[21]。利用微生物之间的协同关系筛选获得的常温乳酸菌复合系接种于水稻秸秆、玉米秸秆和苜蓿中获得成功^[15,22-23]。低温微生物复合系可促进含糖量为 7% (W/W)的水稻干秸秆发酵^[13], 笔者所在实验室曾构建的低温复合菌系需要接种到含 4%蔗糖的玉米干秸秆发酵体系才会保障发酵的正常进行。玉米秸秆收获后随时间的延长, 风干的秸秆 WSC 含量减少^[24-25], 可溶性糖的添加可促进接种微生物的定殖和加快微贮进程。本文通过连续限定性筛选获得培养液 pH 下降迅速、变化稳定及接种干玉米秸秆后可降低发酵体系 pH、提高发酵饲料感官品质的低温乳酸菌复合菌系 LAC-1。LAC-1 接种处理的玉米干秸秆发酵体系不需要添加葡萄糖或蔗糖就可实现微贮, 降低了成本, 提高了应用的可行性。

响应面分析法已经广泛用于优化培养条件和工艺条件等领域^[26-27], 但对乳酸菌复合系培养条件的优化还未见报道。LAC-1 培养条件优化试验结果表明, 培养温度、培养时间和接种量均可影响 LAC-1 培养液 pH 的变化, 影响因子的主效应主次顺序为培养时间>培养温度>接种量。Gassem 等^[28]报道较低的培养温度导致乳酸菌生长缓慢, 培养温度 10 °C 的处理与 20 °C、15 °C 处理的 LAC-1 培养液 pH 下降速度与程度相同, 表明较低的培养温度也可在短时间降低培养液的 pH 值。pH 下降的速度直接影响着乳酸菌复合菌系 LAC-1 应用的可行性和发酵效果, LAC-1 条件优化后培养液的 pH 在 139 h 下降到 4.0, 30 °C 乳酸菌复合系在 18 h pH 即下降到 3.8^[29], LAC-1 培养液 pH 下降速度较慢的原因可能与较低的培养温度有关。随着接种量的提高, LAC-1 前期培养液的 pH 下降速度加快, 但供试接种量的处理在 144 h 时 LAC-1 培养液的 pH 均降到 4.0, 表明接种量可影响 LAC-1 培养液的 pH 下降速度, 对最终的 pH 没有影响。

接种 LAC-1 于玉米干秸秆后, 发酵体系的 pH、DM 和 WSC 均呈现下降的趋势, 在发酵第 5 天时, 接种 LAC-1 的秸秆饲料的 pH 降到 4.1, 达到了秸秆饲料良好的标准, 表明在发酵过程中 LAC-1 利用发酵体系中的可溶性糖, 将 WSC 转化为乳酸等可挥发性物质。玉米和苜蓿青贮发酵体系中 DM 先下降后上升^[30], 复合真菌处理的玉米秸秆 DM 随发酵的进行始终呈上升趋势^[31], 本研究中 DM 在发酵进程中呈下降趋势, DM 变化的不同可能与发酵菌种类型、发酵温度和原料种类有关。

恶臭醋酸杆菌、酵母菌和霉菌可降低秸秆饲料的品质和营养价值, 霉菌还可产生对动物有毒的物质^[24]。常温发酵秸秆饲料中酵母菌、醋酸菌和霉菌均呈现先上升后下降的趋势, 发酵后期的

厌氧条件和较低的 pH 限制了酵母菌、醋酸菌和霉菌的生长^[15,19,32],而本研究中的霉菌、恶臭醋酸杆菌和酵母菌数量在发酵过程中逐渐降低,可见较低的培养温度在发酵起始阶段就限制了霉菌、恶臭醋酸杆菌和酵母菌的生长,促进了乳酸菌数量和秸秆饲料品质的提高。

参 考 文 献

- [1] 农业部新闻办公室. 全国农作物秸秆资源调查与评价报告[J]. 农业工程技术(新能源产业), 2011(2): 3-5.
- [2] 王晓明, 唐兰, 赵黛青, 等. 中国生物质资源潜在可利用量评估[J]. 三峡环境与生态, 2010, 32(5): 38-43.
- [3] 孟淑红, 杨生, 天堂. 内蒙古草地资源及草业发展现状、问题与对策[J]. 中国草地, 2004, 26(5): 69-74.
- [4] 师建芳, 刘清, 刘晶晶, 等. 连续式秸秆发酵饲料制备机的研制与试验[J]. 农业工程学报, 2012, 28(10): 33-38.
- [5] 何川, 陈艳乐, 蒋林树, 等. 农作物秸秆饲料处理技术的研究现状[J]. 畜牧与饲料科学, 2010, 31(10): 26-27.
- [6] 王彦杰, 荆瑞勇, 高亚梅, 等. 低温复合菌系的构建及其在秸秆饲料发酵中的应用[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2008, 20(1): 54-58.
- [7] De Man JC, Rogosa M, Sharpe ME. A medium for the cultivation of Lactobacilli[J]. Journal of Applied Microbiology, 1960, 23(1): 130-135.
- [8] 王小芬. 苜蓿青贮接种菌复合系的构建及其在青贮过程中的作用机理[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2006.
- [9] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 92-95.
- [10] 高丽娟, 王小芬, 杨洪岩, 等. 乳酸菌复合系 SFC-2处理水稻秸秆的效果[J]. 环境科学, 2007, 28(6): 1392-1396.
- [11] 蔡敦江, 周兴民, 朱廉, 等. 苜蓿添加剂青贮、半干青贮与麦秸混贮的研究[J]. 草地学报, 1997, 5(2): 123-127.
- [12] Broderica GA, Kang JH. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and *in vitro* media[J]. Journal of Dairy Science, 1980, 63(1): 64-75.
- [13] 杨洪岩, 袁旭峰, 刘小平, 等. 水稻秸秆低温复合菌系多样性及发酵动态[J]. 微生物学报, 2011, 51(9): 1248-1255.
- [14] 熊素玉, 姚新奎, 谭小海, 等. 不同温度及 pH 条件对乳酸菌生长影响的研究[J]. 新疆农业科学, 2006, 43(6): 533-538.
- [15] 高丽娟. 乳酸菌复合系 SFC-2的筛选及其秸秆发酵过程中的协同作用机理[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2007.
- [16] 许能祥, 丁成龙, 顾洪如, 等. 稻秆与玉米秸、杂交狼尾草及象草混合青贮的研究[J]. 中国草地学报, 2012, 34(2): 93-98.
- [17] 李静, 高兰阳, 沈益新. 乳酸菌和纤维素酶对稻草青贮品质的影响[J]. 南京农业大学学报, 2008, 31(4): 86-90.
- [18] 许能祥, 丁成龙, 顾洪如, 等. 添加乳酸菌和米糠对水稻秸秆青贮品质的影响[J]. 江苏农业学报, 2010, 26(6): 1308-1312.
- [19] Aksu T, Baytok E, Bolat D. Effects of a bacterial silage inoculant on corn silage fermentation and nutrient digestibility[J]. Small Ruminant Research, 2004, 55(1/3): 249-252.
- [20] 华金玲, 张永根, 王德福, 等. 添加乳酸菌制剂对水稻秸青贮品质的影响[J]. 东北农业大学学报, 2007, 38(4): 473-477.
- [21] McAllister TA, Feniuk R, Mir Z, et al. Inoculants for alfalfa silage: effects on aerobic stability, digestibility and the growth performance of feedlot steers[J]. Livestock Production Science, 1998, 53(2): 171-181.
- [22] 高丽娟, 王小芬, 杨洪岩, 等. 秸秆发酵乳酸菌

- 复合系 SFC-2的构建及其组成多样性研究[J]. 环境科学, 2007, 28(5): 1088–1094.
- [23] Wang XF, Haruta S, Wang P, et al. Diversity of a stable enrichment culture which is useful for silage inoculant and its succession in alfalfa silage[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2006, 57(1): 106–115.
- [24] 余汝华. 玉米秸秆青贮前后营养成分变化规律的研究[D]. 北京: 中国农业大学硕士学位论文, 2004.
- [25] 王富生, 马俊孝, 任红卫, 等. 微生物青贮剂在玉米秸秆黄贮中的作用[J]. 山东大学学报: 理学版, 2004, 39(2): 113–114.
- [26] Li DQ, Jia X, Wei Z, et al. Box-Behnken experimental design for investigation of microwave-assisted extracted sugar beet pulp pectin[J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 88(1): 342–346.
- [27] Ray S, Lalman JA. Using the Box-Behnken design (BBD) to minimize the diameter of electrospon titanium dioxide nanofibers[J]. Chemical Engineering Journal, 2011, 169: 116–125.
- [28] Gassem MA, Schmidt KA, Frank JF. Exopolysaccharide production from whey lactose by fermentation with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*[J]. Journal of Food Science, 1997, 62(1): 171–173.
- [29] 王小芬, 高丽娟, 杨洪岩, 等. 乳酸菌复合系 A12 的多样性及对苜蓿青贮的效果[A]. 第八次全国环境微生物学术研讨会论文集[C]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 685–688.
- [30] 韩吉雨. 青贮发酵体系中乳酸菌多样性的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学博士学位论文, 2009.
- [31] 杨连玉, 冀凤杰, 白彩霞, 等. 复合真菌发酵对干玉米秸秆营养价值的影响[J]. 中国草地学报, 2006, 28(3): 62–65.
- [32] 王小芬, 高丽娟, 杨洪岩, 等. 苜蓿青贮过程中乳酸菌复合系 A12的接种效果及菌群的追踪[J]. 农业工程学报, 2007, 23(1): 217–222.

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 应包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势, 即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: (1) 我刊要求作者投稿时在正文前写上主要作者的简介, 并指出自己的工作(已发表的文章)在综述中的体现, 同时请在稿件中用不同颜色标出来。(2) 在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。