

接种植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)对小规模 饲料稻青贮品质的影响

敖晓琳^{1*} 蔡义民² 胡爱华¹ 陈岑¹ 蒲彪¹

(1. 四川农业大学 食品学院 四川 雅安 625014)

(2. Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS), Ibaraki 305-8686, Japan)

摘要: 【目的】研究接种植物乳杆菌对小规模饲料稻品质的影响。【方法】以自然发酵的样品为对照,接种不同来源植物乳酸菌发酵饲料稻,发酵 30 d 后对饲料稻的感官进行评价;通过选择性平板对饲料稻青贮中的不同微生物进行计数;并采用 V-Score 评价法对发酵品质进行评定。【结果】相对自然发酵的样品而言,接种植物乳杆菌的青贮样品感官评分等级达到优良;乳酸菌为优势菌株,引起腐败变质的好氧菌、霉菌、大肠杆菌等受到抑制;接种发酵的样品中乳酸含量明显增加,氨态氮的产生量为对照的 1/2 左右, V-Score 评分为满分。【结论】供试的植物乳杆菌,尤其是从青饲料和青贮材料中分离的菌株能有效改善饲料稻青贮的品质,可考虑用作青贮饲料稻发酵剂。

关键词: 植物乳杆菌, 饲料稻, 青贮, 品质

Effect of inoculating *Lactobacillus plantarum* on the quality of small-scale forage paddy rice silage

AO Xiao-Lin^{1*} CAI Yi-Min² HU Ai-Hua¹ CHEN Cen¹ PU Biao¹

(1. Food College, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China)

(2. Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS), Ibaraki 305-8686, Japan)

Abstract: [Objective] We evaluated the effect of inoculating *Lactobacillus plantarum* on the quality of small-scale forage paddy rice silage. [Methods] We analyzed the forage paddy rice inoculated with *L. plantarum* by comparing with the naturally fermented samples in sensory qualities, microflora and fermentation qualities (using V-Score evaluation method). [Results] *L. plantarum* was dominant, and harmful and pathogenic bacteria were inhibited in inoculated samples. [Conclusion] Inoculating *L. plantarum* can improve the qualities of silage, and they can be considered as starter culture for forage paddy rice silage.

Keywords: *Lactobacillus plantarum*, Forage paddy rice, Silage, Quality

基金项目: 教育部春晖计划项目(No. Z2011101)

*通讯作者: Tel: 86-835-2882311; ✉: huavslin@163.com

收稿日期: 2013-11-14; 接受日期: 2014-01-23; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-02-18

青贮(Silage)是一种为了保存青绿多汁的越冬饲料而对饲料作物进行发酵保存的方法,我国常用于青贮的原料主要有玉米秸秆、水稻秸秆等。在自然发酵的青贮中常因腐败微生物的滋生而导致青贮饲料发酵失败,因此许多研究者开始筛选发酵性能好的乳酸菌用于人工接种发酵青贮饲料的研究。而植物乳杆菌作为发酵植物样品中的优势菌株,被证实能改善发酵产品的品质,提高发酵效率,当其被用于接种发酵青贮时,能有效提高青贮的发酵品质以及有氧稳定性,减少青饲料干物质的损失^[1-4]。

饲料稻(Forage rice)是以动物利用为目的,以饲料价值相关的指标为选择对象而培育的水稻品种。与糙米相比具有粗蛋白质含量高,出糙率高等特点^[5]。日本较早开始种植饲料稻,并采用全株青贮的方式提高饲料稻的饲喂品质和利用价值。在我国南方地区牲畜用饲料不能自给自足,需向外地购买,然而该地区非常适合早籼稻的种植,因此许多学者开始研究从早籼稻中选育优良的品种用于饲料稻的生产,以解决饲料不足的问题^[6-8]。

由于青贮原料不同,营养成分会有较大的差异,因此筛选用于发酵全株饲料稻的乳酸菌菌株具有较大的实用价值。本文以全株饲料稻作为研究对象,考察接种来源于四川牧场环境中分离筛选出的产酸速度快、适应能力强的不同植物乳杆菌菌株对饲料稻感官品质、发酵品质及微生物品质(耐贮藏性及安全性)的影响,以期对我国饲料稻青贮菌种的选育以及发酵品质的分析奠定一定的研究基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 饲料稻(*Oryza sativa* L.cv., *Hamasari*): 全株饲料稻采集于日本埼玉县,黄熟期采集。

1.1.2 乳酸菌供试菌株: 植物乳杆菌菌株来源于四川农业大学微生物实验室(表 1)。

1.1.3 试剂及培养基: 马铃薯培养基、营养琼脂培养基、MRS 培养基,参照文献[9]中介绍的材料和方法配制; Clostriia Count Agar、Blue Light Agar 购于日本 Nissui。

1.2 实验方法

1.2.1 小规模饲料稻青贮的制作: 饲料稻全株收割后用机器切割成 5 cm 左右小节,混匀后称取 100 g 于塑料包装袋中(180×260 mm),添加 100 μL 过夜培养的 MRS 菌体培养液(菌液浓度 10⁸ CFU/mL),无菌条件下混匀,抽真空,封口。未接种乳酸菌的饲料稻作为对照,每株菌接种样品 3 个,25 °C 发酵。饲料稻青贮样品于 30 d 后开封进行品质分析。

1.2.2 感官质量评定标准: 感官分析主要从青贮饲料稻的气味、结构和色泽三方面来进行,总分为 20 分(表 2)。

1.2.3 饲料稻青贮中微生物分析: 开袋后,无菌条件下混匀青贮,称取 10 g 样品加入 90 mL 无菌水,用振荡仪拍打振荡 1 min,吸取 1 mL 液体到 9 mL 无菌水中梯度稀释样品至 10⁻⁵,吸取 20 μL 10⁻¹、10⁻³和 10⁻⁵ 稀释度的液体均匀涂布于不同培养基上培养相应的微生物。培养芽孢杆菌和丁酸菌的稀释液在

表 1 不同来源植物乳杆菌菌株列表			
Table 1 List of the <i>Lactobacillus plantarum</i> isolated from different habitats			
菌株编号	生境	分离地点	NCBI 登录号
Strain	Habitat	Location	NCBI accession number
NT1-1	牛粪	雅安奶牛场	AB863735
NR1-2	青饲料	阿坝州红原县	GU299081
NQ1-2	青贮	雅安奶牛场	AB863736
NQ2-1	青贮	洪雅奶牛场	AB863737
SCA7	酸奶	红原县城边	AB602937

75℃水浴中加热 15 min 后再涂平板。培养 48 h 后分别计数^[11]。不同微生物的作用及培养条件见表 3。

优质的青贮饲料中乳酸菌占绝对优势,引起腐败的微生物如丁酸菌、芽孢杆菌、大肠杆菌和霉菌等均被有效抑制。如果霉菌和好氧菌占优势,则证

明青贮品质低劣。

1.2.4 青贮发酵品质评定: 发酵品质评定采用 V-Score 评分体系^[12]。根据评分结果将青贮饲料品质分为良好(80–100 分)、中等(60–80 分)和不良(低于 60 分) 3 个等级。V-Score 评分标准见表 4。

表 2 青贮饲料感官评定标准				
Table 2 Standards on sensory quality of silage				
项目 Item	评分标准 Standard for evaluation			分数 Score
气味 Odour	无丁酸臭味,有芳香果味或明显的面包香味			14
	有微弱的丁酸臭味,较强的酸味,芳香味弱			10
	顶酸味颇重,或有刺鼻的焦糊臭或霉味			4
结构 Texture	有很强的丁酸臭或氨味,或几乎无酸味			2
	茎叶结构保持良好			4
	叶子结构保持较差			2
	茎叶结构保存极差或发现有轻度霉菌或轻度污染			1
	茎叶腐烂或严重污染			0
色泽 Colour	与原料相似,烘干后呈淡褐色			2
	略有变色,呈淡黄色或带褐色			1
	变色严重,墨绿色或褪色呈黄色			0
总分 Total	16–20	10–15	5–9	0–4
等级 Grade	优良	较好	中等	腐败

注:摘自德国农业协会(DLG)青贮质量感官评分标准^[10]。

Note: Standards on sensory quality of silage from DLG^[10].

表 3 微生物作用及培养条件				
Table 3 Functions and cultural conditions of the microorganisms				
微生物 Microorganism	主要作用 Main function	培养基 Culture media	培养温度 Culture temperature (°C)	条件 Culture condition
乳酸菌 Lactic acid bacteria	产生乳酸,抑制杂菌	MRS agar	30	厌氧
丁酸菌 Butylic acid bacteria	分解糖,有机酸,蛋白质	Clostridia count agar	30	厌氧
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	分解糖,蛋白质	Blue light agar	37	好氧
好氧菌 Aerobic bacteria	腐败	Nutrient agar	37	好氧
芽孢杆菌 Bacillus	分解蛋白质	Nutrient agar	37	好氧
霉菌 Mould	分解糖分,乳酸,霉变	Potato dextrose agar	30	好氧
酵母菌 Yeast	产气,产生酒精	Potato dextrose agar	30	好氧

表 4 青贮饲料 V-Score 评分标准					
Table 4 V-Score standards for evaluation of silage					
项目		V-Score 分数分配和计算公式			
Item		V-Score distribution and calculation formula			
A=氨态氮/总氮 (%)	A	5	5-10	10-20	>20
A=Ammoniacal nitrogen/Total nitrogen (%)					
点数 A' Count A'	50		60-2A	80-4A	0
B=醋酸+丙酸	B	0.2	0.2-1.5	>1.5	
B=Acetic acid+Propionic acid					
点数 B' Count B'	10		(150-100B)/13	0	
C=丁酸	C	0	0-0.5	>0.5	
C=Butyric acid					
点数 C' Count C'	40		40-80C	0	
V-Score=A'+B'+C'					

氨态氮测定时样品处理同 1.2.3。振荡后过滤，吸取 10 mL 滤液，于自动分析仪 (Kjeltec 2400/2600 Auto Sampler System ,Tecator)测定样品 VBN 的含量。测定方法为水蒸气蒸馏法^[13]。总氮的测定按照 GB/T 6432-1994 饲料中粗蛋白的测定方法进行^[14]。

有机酸测定时样品处理同氨态氮的测定。吸取滤液 1.5 mL 加入少量交换树脂，振荡器上充分混匀，于 12 000 r/min 离心 5 min，离心后的上清液用 0.2 μm 的滤膜过滤，10 μL 滤液用 HPLC (LC-200plus，日本分光株式会社，日本)分析有机酸。分析柱为 Shodex Rspak KC-811 (8×300 mm，昭和电工株式会社，日本)，流动相为 3 mmol/L HClO₄，发色液为 BTB 溶液 (0.2 mmol/L Bromothymol blue，8 mmol/L Na₂HPO₄，2 mmol/L NaOH)，流速 1.2 mL/min，柱温 60 °C，检测器波

长 UV 450 nm^[12]。

2 结果与分析

2.1 饲料稻青贮感官评定结果与分析

饲料稻青贮的感官品质对饲料的适口性影响较大，一般认为气味酸香、色泽鲜亮、无异味有助于提高饲料的饲喂率，从而增加牲畜的采食量。从表 5 可看出，接种 *L. plantarum* 的青贮样品感官评分都达到优良，而对照(自然发酵)无论在气味、结构还是色泽方面分值都较接种的样品低。乳酸菌对青贮感官品质的影响主要来自于其产生的乳酸以及其他抑菌成分对引起腐败微生物生长的抑制，从而在色泽和气味上影响青贮饲料的感官品质^[15]。植物乳杆菌属于一类产酸和适应能力都很强的乳酸菌，饲料稻中接种植物乳杆菌之后，乳酸菌在数量上占有很大的优势，能够在发酵初期竞争性生

表 5 饲料稻青贮感官评定结果						
Table 5 Sensory quality of forage paddy rice silage						
项目 Item	Control	NT1-1	NR1-2	NQ1-2	NQ2-1	SCA7
气味 Oudour	10	13	14	14	14	14
结构 Textrue	2	4	4	4	4	4
色泽 Colour	1	2	2	2	2	2
总分 Total	13	19	20	20	20	20
等级 Grade	较好	优良	优良	优良	优良	优良

长,并开始大量产酸,从而抑制饲料稻中腐败微生物的作用,防止因其生长而导致的色泽变暗、霉变等现象的发生,因此具有较好的改善青贮感官品质的作用^[16]。

2.2 饲料稻青贮微生物组成分析

饲料稻青贮中的微生物组成将直接影响到青贮的贮存性和安全性。与对照相比,接种不同植物乳杆菌的样品在微生物组成和数量上呈现出较大的差异(图 1)。从乳酸菌来看,所有样品的数量都达到 10⁸ CFU/g 以上,不过从平板的菌落形态上看(数据未提供),接种乳酸菌的样品菌落纯度较高,乳酸菌种类较单一;好氧细菌的数量,因接种不同的植物乳杆菌差异较显著。抑菌效果最好的菌株为 NR1-2,与对照相比细菌数量降低了 4 个数量级,菌株 NT1-1、NQ1-2 和 NQ2-1 也比对照降低了 3

个数量级;菌株 NQ2-1 和 NQ1-2 表现出了极好的抑制霉菌的能力,在发酵结束时没有霉菌被检出。由于霉菌在青贮发酵过程中对青贮的品质影响较大,容易形成霉斑,引起青贮发黏,最终导致青贮发酵失败,因此能有效抑制青贮中霉菌生长的乳酸菌,对提高青贮饲料的发酵品质及耐贮性具有很好的作用;菌株 NR1-2、NQ2-1 和 NQ1-2 均能有效降低大肠杆菌的数量,与对照相比降低了近 5 个数量级,抑菌效果明显;所有样品中酵母菌和芽孢杆菌的数量没有明显差异,而丁酸菌在所有样品中都未检出。

2.3 饲料稻青贮发酵品质分析

发酵品质是评价青贮的重要指标,从饲料稻青贮的发酵品质评定结果(表 6)来看,对照得分为 75.82 分,品质一般。而接种 5 株植物乳杆菌的青

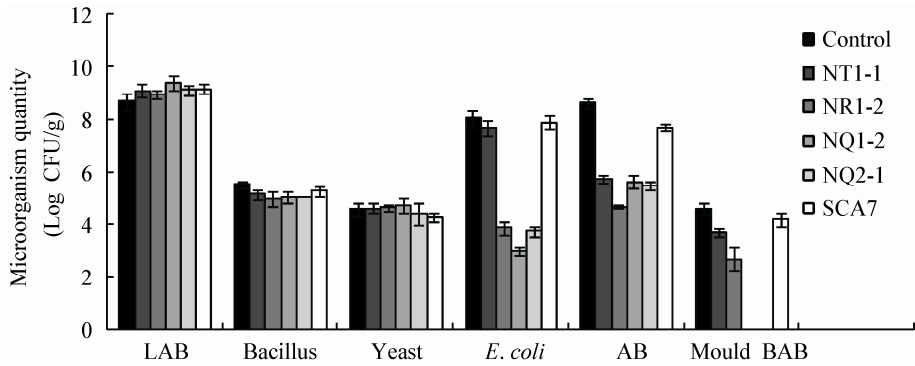


图 1 接种不同植物乳杆菌对饲料稻青贮微生物种类及数量的影响

Figure 1 Microorganism composition of forage paddy rice silage inoculated with *L. plantarum* (log CFU/g FM)
Note: LAB: Lactic acid bacteria; *E. coli*: *Escherichia coli*; AB: Aerobic bacteria; BAB: Butylic acid bacteria.

表 6 饲料稻青贮发酵品质评定结果						
Table 6 Fermentation quality of forage paddy rice silage						
项目 Item	Control	NT1-1	NR1-2	NQ1-2	NQ2-1	SCA7
Lactic acid (%)	0.12	0.73	0.88	0.97	0.77	0.66
Acetic acid (%)	0.15	0.10	0.10	0.12	0.01	0.13
Propionic acid (%)	0.01	ND	ND	ND	ND	ND
Butyric acid (%)	0.11	ND	ND	ND	ND	ND
VBN (‰)	0.25	0.11	0.12	0.12	0.11	0.10
TN (%)	1.96	2.16	2.29	2.10	2.05	2.07
V-Score	75.82	100	100	100	100	100

贮均得到了满分,说明接种后饲料稻发酵品质得到较大改善。V-Score 评价法主要依据微生物发酵产生的有机酸组成以及挥发性氨态氮与总氮比例来计算。有机酸中乳酸含量是最主要的评价指标,含量越高,分值越高,而其他酸含量越高,分值越低。接种发酵的样品,虽然在有机酸的含量上有一定差异,但是与对照相比,乳酸含量明显增加,醋酸、丙酸和丁酸的含量明显降低,其中 NQ2-1 产生的乳酸量最大,达到 0.97%。氨态氮与总氮的比值是反映青贮中含氮物质分解程度的指标,比值越大,蛋白质分解越多,品质越差。接种发酵的样品,氨态氮的产生量为对照的 1/2 左右。

3 讨论

将全株饲料稻用于青贮不仅解决了秸秆、米糠等副产物的利用问题,而且通过发酵改善了饲料稻的品质,增加了饲料的适口性和营养特性。但由于全株饲料稻可溶性糖和乳酸菌较少,自然发酵品质不佳,所以一般通过添加乳酸菌来提高青贮发酵品质^[17]。从本实验结果来看,接种植物乳杆菌发酵青贮的样品在感官品质、微生物组成和发酵品质方面都存在一定的内在联系,核心主要体现在植物乳杆菌的产酸能力和抑菌能力^[18]。接种植物乳杆菌后在发酵初期乳酸菌就成为优势菌,随着发酵的进行,植物乳酸菌不断产酸,其他分解蛋白质产生挥发性氨态氮的微生物,比如好氧菌、大肠杆菌、霉菌等生长受乳酸及乳酸菌其他代谢产物的抑制,因此氨态氮及丁酸等含量有所降低,青贮综合品质得到提高。

不同来源的植物乳杆菌发酵饲料稻青贮表现出了不一样的品质。分离至青贮和青饲料中的 3 株植物乳杆菌表现出较好的发酵性能,不仅杂菌的数量比其他菌株更低(图 1),而且产生的乳酸量也比较大(表 6),因此较适合用于接种发酵饲料稻。分析原因可能有两点:第一,菌株分离自植物源材料,饲料稻中的成分比较适合其生长代谢所需,能够在饲料稻的发酵过程中更好地发挥作用。第二,菌株可能产生一定数量的细菌素类物质,能

够抑制杂菌的污染。

我国对饲料稻的品种繁育及应用推广正在进行深入研究,随着饲料稻种植面积的扩大及产量的提高,对其综合应用技术的需求将显得更加迫切^[19]。本文的研究仅限于接种乳酸菌对全株饲料稻青贮品质的影响,后续试验还应针对不同菌株发酵青贮后样品的适口性及对饲喂动物的消化、吸收、生长速度、产肉量、产奶量等指标进行深入研究;而且还可根据工艺的需要,加入一些酶制剂来提高青贮的发酵品质,也可通过不同菌株的组合来提高发酵剂的发酵性能,从而开发出能用于饲料稻青贮发酵的直投式发酵剂,加速全株饲料稻青贮发酵的应用和推广。

4 结论

接种青饲料和青贮来源的植物乳杆菌用于饲料稻青贮的发酵能够有效提高青贮饲料稻的感官质量和发酵品质,乳酸菌成为优势菌群,乳酸含量明显增加,表现出良好的抑菌效果,从而使青贮饲料稻的耐贮藏性和安全性均得到提高。

致谢:本文中饲料稻的小规模青贮以及分析测试是在日本畜产草地研究所完成,在此对研究所所有工作人员的帮助表示感谢。

参考文献

- [1] 张慧杰, 玉柱, 王林, 等. 青贮饲料中乳酸菌的分离鉴定及优良菌株筛选[J]. 草地学报, 2011, 19(1): 137-141.
- [2] 敖晓琳, 张小平, 史令, 等. 四川泡菜中两株优良乳酸菌的鉴定及不同发酵条件对其发酵泡菜品质的影响[J]. 食品科学, 2011, 32(11): 152-156.
- [3] Cai Y, Benno Y, Ogawa M, et al. Effect of applying lactic acid bacteria isolated from forage crops on fermentation characteristics and aerobic deterioration of silage[J]. Journal of Dairy Science, 1999, 82: 520-526.
- [4] Weinberg ZG, Shatz O, Chen Y, et al. Effect of lactic acid bacteria inoculants on *in vitro* digestibility of wheat and corn silages[J]. Journal of Dairy Science, 2007, 90: 4754-4762.
- [5] 青先国. 饲料稻的研究与开发[J]. 饲料天地, 2006(11): 49-50.
- [6] 王学会, 熊忠炯, 陈再高, 等. 早籼饲料稻综合技术研

- 究[J]. 畜牧与饲料科学, 2011, 32(2): 68-69.
- [7] 丁士银, 王学会, 钱立礼, 等. 早籼饲料稻品种的筛选研究[J]. 畜牧与饲料科学, 2009, 30(6): 21.
- [8] 刘朝干, 贺建华, 张佩华, 等. 添加乳酸菌对不同生长期全株早籼饲料稻青贮品质的影响[J]. 中国奶牛, 2010, 2: 12-16.
- [9] 李平兰, 贺稚非. 食品微生物学实验原理与技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2011.
- [10] 张子仪. 中国饲料学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 89-90.
- [11] Ohyama Y, Hara S. Growth of yeasts isolated from silages on various media and its relationship to aerobic deterioration of silage[J]. Japan Journal Zootech Science, 1975, 46(12): 713-721.
- [12] Cai YM. Appraisalment on fermentation quality of silage[J]. Research on Livestock Products (Japan), 2009, 63(3): 339-344.
- [13] Kobayashi H, Cai Y, Uegaki R, et al. Microorganism composition, chemical composition and fermentation characteristics of the mixed sowing silage of timothy and orchardgrass at different cutting number[J]. Nihon Chikusan Gakkaiho, 2010, 81(3): 345-352.
- [14] Nkosi BD, Meeske R, Merwe HJ, et al. Effects of homofermentative and heterofermentative bacterial silage inoculants on potato hash silage fermentation and digestibility in rams[J]. Animal Feed Science and Technology, 2010, 157: 195-200.
- [15] 王富生. 微生物青贮剂及其在玉米秸秆微贮中的作用[D]. 济南: 山东大学硕士学位论文, 2004.
- [16] Weinberg ZG, Szakacs G, Ashbell G, et al. The effect of *Lactobacillus buchneri* and *L. plantarum*, applied at ensiling, on the ensiling fermentation and aerobic stability of wheat and sorghum silages[J]. Journal of Indian Microbiology Biotechnology, 1999, 23: 218-222.
- [17] 吴晓杰, 韩鲁佳. 乳酸菌制剂对早籼稻青贮饲料品质的影响[J]. 中国农业大学学报, 2005, 10(3): 35-39.
- [18] 程建军, 李想, 郭明若. 植物乳杆菌素抑菌机理的研究[J]. 中国乳品工业, 2001, 39(5): 31-34.
- [19] 张建国, 刘向东, 曹致中, 等. 饲料稻研究现状及发展前景[J]. 草业学报, 2008, 17(5): 151-155.

征订启事

欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于1974年,是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办,国内外公开发行,以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括:基础微生物学研究,农业微生物学研究,工业微生物学研究,医学微生物学研究,食品微生物学研究,环境微生物学研究,微生物功能基因组研究,微生物蛋白组学研究,微生物模式菌株研究,微生物工程与药物研究,微生物技术成果产业化及微生物教学研究改革等。

本刊为中国自然科学核心期刊。曾获国家优秀科技期刊三等奖,中国科学院优秀科技期刊三等奖,北京优秀科技期刊奖,被选入新闻出版总署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

自2008年本刊已经全新改版,由双月刊改为月刊,发表周期缩短,内容更加丰富详实。欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买,2014年每册定价58元,全年696元,我们将免邮费寄刊。

邮购地址:(100101)北京朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所 《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: M413