

刘蓓一, 韦青, 田吉鹏, 等. 羊瘤胃液中产阿魏酸酯酶乳酸菌的筛选及对水稻秸秆青贮品质的影响[J]. 江苏农业学报, 2022, 38(5):1306-1314.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2022.05.018

羊瘤胃液中产阿魏酸酯酶乳酸菌的筛选及对水稻秸秆青贮品质的影响

刘蓓一^{1,2}, 韦青^{1,2}, 田吉鹏^{1,2}, 程云辉^{1,2}, 许能祥^{1,2}, 张文洁^{1,2}, 顾洪如^{1,2}, 路庆鹏³, 刘翔⁴, 丁成龙^{1,2}

(1.江苏省农业科学院畜牧研究所, 江苏 南京 210014; 2.江苏省农业科学院农业农村部种养结合重点实验室, 江苏 南京 210014; 3.江苏绿科生物技术有限公司, 江苏 扬州 225600; 4.睢宁县飞翔牧业有限公司, 江苏 睢宁 221243)

摘要: 为了进一步降解水稻秸秆青贮饲料中的纤维, 提高青贮饲料品质, 从湖羊瘤胃液中筛选产阿魏酸酯酶的乳酸菌, 鉴定菌株特性, 并将其接种到水稻秸秆青贮中, 研究其对青贮水稻秸秆纤维降解率和化学成分的影响。结果表明, 从湖羊瘤胃液中共筛选出 2 株高产阿魏酸酯酶的乳酸菌, 菌株 SR1 与鼠李糖乳杆菌的同源性最高, SR2 与香肠乳杆菌的同源性最高; SR2 的产酸速度比 SR1 快, 培养 24 h 后培养液的 pH 值为 3.83; 2 株乳酸菌在 pH 值 4.0~7.0、温度 25~37 °C、3.0% NaCl 条件下的生长状况良好, 都能利用多种糖源物质。与 CK 相比, 接种菌株 SR2 组的水稻秸秆青贮饲料中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维和纤维素含量均显著降低 ($P < 0.05$), 而接种菌株 SR1 对水稻秸秆青贮饲料纤维含量的影响不大; 接种菌株 SR2 组的水稻秸秆青贮饲料 pH 值、铵态氮含量最低, 乳酸含量最高。综上, 香肠乳杆菌 SR2 可作为水稻秸秆青贮的备选菌株。

关键词: 瘤胃液; 阿魏酸酯酶; 乳酸菌; 水稻秸秆; 青贮饲料

中图分类号: S826.8⁺9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2022)05-1306-09

Screening of ferulic acid esterase-producing lactic acid bacteria from rumen fluid of sheep and their effects on silage quality of rice straw

LIU Bei-yi^{1,2}, WEI Qing^{1,2}, TIAN Ji-peng^{1,2}, CHENG Yun-hui^{1,2}, XU Neng-xiang^{1,2}, ZHANG Wen-jie^{1,2}, GU Hong-ru^{1,2}, LU Qing-peng³, LIU Xiang⁴, DING Cheng-long^{1,2}

(1. Institute of Animal Science, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Key Laboratory of Crop and Livestock Integrated Farming, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanjing 210014, China; 3. Jiangsu Luke Biotechnology Co., Ltd., Yangzhou 225600, China; 4. Suining Feixiang Animal Husbandry Co., Ltd., Suining 221243, China)

Abstract: In order to further degrade the fiber in rice straw silage and improve the quality of silage, ferulic acid esterase-

收稿日期: 2022-05-19

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(20)3156]; 扬州市现代农业项目(YZ2020050); 江苏省苏北科技专项(XZ-SZ202017); 江苏现代农业产业技术体系建设专项资金项目[JATS(2022)440]

作者简介: 刘蓓一(1984-), 女, 江苏武进人, 博士, 副研究员, 从事饲草调制与草食动物营养研究。(E-mail) byliu@jaas.ac.cn。韦青为共同第一作者。

通讯作者: 丁成龙, (E-mail) dingcl@jaas.ac.cn

producing lactic acid bacteria were isolated from rumen fluid of Hu sheep, and their characteristics were identified. The strains were inoculated into rice straw silage to study their effects on fiber degradation rate and chemical composition of rice straw silage. The results showed that two strains of lactic acid bacteria with high ferulic acid esterase were isolated from rumen fluid of Hu sheep. Strain SR1 had the highest homology with *Lactobacillus rhamnosus*, and SR2 had the highest homology with *Lactobacillus farcinis*. The acid produc-

tion rate of strain SR2 was faster than that of strain SR1, and the final pH value was 3.83. The two strains of lactic acid bacteria grew well under the conditions of pH 4.0–7.0, temperature 25–37 °C and 3.0% NaCl, and they could use various sugar sources. Compared with CK, the contents of neutral detergent fiber, acid detergent fiber and cellulose in the inoculated strain SR2 group decreased significantly ($P<0.05$), but the inoculated strain SR1 had little effect on the fiber content of rice straw silage. The pH value and ammonium nitrogen content of rice straw silage in the inoculated strain SR2 group were the lowest, and the lactic acid content was the highest. In conclusion, *Lactobacillus farciminis* SR2 can be used as an alternative strain for rice straw silage.

Key words: rumen fluid; ferulic acid esterase; lactic acid bacteria; rice straw; silage

中国的秸秆资源丰富,每年产量达 $8\times 10^8\sim 9\times 10^8$ t,且有逐年增加的趋势^[1],但是秸秆中的纤维素、木质素含量较高,限制了秸秆在家畜养殖中的高效利用。秸秆中的木质纤维素主要由纤维素、半纤维素及木质素通过阿魏酸酯键交联在一起^[2],而利用产阿魏酸酯酶(FAE)乳酸菌在青贮过程中产生的FAE使木质素与多糖之间的化学键断裂,进而有效降低秸秆青贮过程中木质纤维素含量,提高木质纤维素结构性多糖在体外的酶解消化率。此外,乳酸菌在青贮过程中一直被视为有益微生物,能够适应青贮过程的厌氧环境,是青贮体系中启动乳酸发酵的关键因子。由此可见,筛选出具有较高阿魏酸酯酶活性的乳酸菌非常重要。

反刍动物瘤胃中含有大量纤维分解菌^[3],能够将难以消化的粗饲料降解成挥发性脂肪酸(如乙酸、丙酸、丁酸等),从而为反刍动物提供能量^[4]。反刍动物瘤胃内的纤维降解菌主要是产琥珀酸丝状杆菌、黄色瘤胃球菌、白色瘤胃球菌等^[5],但是这些都是严格厌氧的细菌,而青贮是从有氧期进入厌氧期的过程,筛选兼性厌氧纤维降解菌意义较大。李君风等^[6]从西藏地区牦牛瘤胃液中分离到1株能降解水稻秸秆纤维素、半纤维素的兼性厌氧纤维降解菌,经鉴定为粪肠球菌。目前,还未见从动物瘤胃液中筛选出产阿魏酸酯酶乳酸菌的报道。

将筛选到的产阿魏酸酯酶的乳酸菌应用到秸秆青贮中,既可以发挥乳酸菌自身的优势,又能利用阿魏酸酯酶的特性进一步降解秸秆纤维,从而提高青贮秸秆的综合品质和利用率。本试验拟从湖羊瘤胃液中筛选产阿魏酸酯酶的乳酸菌,并鉴定菌株特性,进而将其接种到水稻秸秆青贮中,研究其对青贮水稻秸秆纤维降解率及青贮饲料品质的影响。

1 材料与方法

1.1 样品处理

选择健壮的湖羊,用瘤胃导管从胃部预留孔中

采集瘤胃液并置于无菌保温瓶中,随后将采集的瘤胃液迅速带回实验室,在超净工作台上用无菌纱布过滤,进而进行梯度稀释。

1.2 羊瘤胃液中乳酸菌的筛选

选择3个合适梯度的瘤胃液稀释液,各取100 μ l,按照3点法添加到MRS(Man Rogosa Sharpe)培养基平板上,均匀涂布后,置于37 °C培养箱中倒置厌氧培养48 h。挑选形态各异的菌落,继续在MRS培养基上反复划线,直至得到纯化的单菌落,继续进行革兰氏染色和H₂O₂酶试验。

1.3 产阿魏酸酯酶乳酸菌的初筛

用无菌牙签挑取单菌落,点接在筛选培养基^[7]上,于30 °C培养12~72 h,观察单菌落是否在平板上出现明显的透明圈。若出现透明圈,可初步认为该菌株具有产阿魏酸酯酶的能力。

1.4 产阿魏酸酯酶乳酸菌的复筛

1.4.1 阿魏酸(FA)标准曲线的绘制 取5个100 ml的容量瓶,按1~5编号,反式阿魏酸标准液和蒸馏水的体积参照表1,每组设3个平行。将反式阿魏酸标准液和蒸馏水混匀,分别得到质量浓度为50 μ g/ml、100 μ g/ml、150 μ g/ml、200 μ g/ml、250 μ g/ml的反式阿魏酸标准液。将标准液过0.22 μ m滤膜后,进行高效液相色谱(HPLC)测定,用测得的数值绘制阿魏酸标准曲线。

表1 反式阿魏酸标准液的配方

Table 1 Preparation of trans-ferulic acid standard solution

| 编号分组 | 反式阿魏酸标准液 (ml) | 蒸馏水 (ml) |
|------|---------------|----------|
| 1 | 5 | 95 |
| 2 | 10 | 90 |
| 3 | 15 | 85 |
| 4 | 20 | 80 |
| 5 | 25 | 75 |

1.4.2 发酵液的准备 将初筛获得的产阿魏酸酯

酶的乳酸菌接种到 MRS 液体培养基中,于 37 ℃ 过夜培养,将菌体用 0.9% 无菌生理盐水洗涤 2~3 次并重置于去离子水中。按 5% 接种量接种菌悬液于新鲜的产酶液体培养基中进行发酵^[7],再于 37 ℃ 培养 48 h,测定初筛获得的乳酸菌的阿魏酸酯酶活性。将发酵培养液于 10 000 r/min 离心 5 min,获得上清液。

1.4.3 酶活性的测定 取 2 支试管,参照表 2 配方加入各试剂,每组设 3 个平行,混匀后于 30 ℃ 水浴 30 min,沸水浴 10 min 后终止反应,再于 10 000 r/min 离心 5 min,取上清液过滤并进行 HPLC 测定。根据标准曲线计算阿魏酸的质量浓度,将 1 min 内分解阿魏酸甲酯产生 1 μmol 阿魏酸需要的酶量定义为 1 个酶活性单位(U),计算公式:

酶活性(mU/ml)=反应液中阿魏酸的平均含量(μg)/阿魏酸摩尔质量×反应时间(min)。

表 2 阿魏酸酯酶活性测定的反应体系

Table 2 Reaction system for measuring ferulic acid esterase activity

| 组别 | 发酵液 (ml) | 1%阿魏酸甲酯溶液 (ml) | 煮沸失活粗酶液 (ml) |
|-----|-------------|-------------------|-----------------|
| 试验组 | 2.5 | 2.5 | 0 |
| 对照组 | 0 | 2.5 | 2.5 |

1.4.4 HPLC 色谱条件 C18 色谱柱为 Synergi Hydro-RP80 (250.0 mm×4.6 mm, 4 μm)。流动相 A(甲醇):流动相 B(1%冰乙酸)=28:72。流速为 0.6 ml/min,柱温为 40 ℃,检测波长(UV)为 320 nm,进样量为 10 μl。

1.5 产阿魏酸酯酶乳酸菌的复筛

1.5.1 形态学鉴定 将分离获得的优势菌株在 MRS 固体培养基上划线,于 37 ℃ 厌氧培养 48 h,观察菌落的形状、颜色、大小及边缘等特征,同时挑取单菌落,进行革兰氏染色,观察镜检结果。

1.5.2 生长曲线的测定 取 1 环乳酸菌接种至 MRS 液体培养基中,于 37 ℃ 培养 48 h。取菌悬液,按 5% 接种量分别接种至液体培养基中,于 37 ℃ 培养 0~24 h,每隔 2 h 取 1 管,测定其 OD_{600} 和 pH 值,绘制菌株生长曲线。

1.5.3 生长特性的鉴定

1.5.3.1 耐酸试验 取 1 环乳酸菌接种至 MRS 液体培养基中,于 37 ℃ 培养 48 h。取菌悬液,按 5% 接种量分别接种至不同 pH 值(2.5、3.0、3.5、4.0、

4.5、7.0)的 MRS 液体培养基中,于 37 ℃ 培养 48 h,目测菌株生长情况^[8]。

1.5.3.2 耐高温、低温试验 取 1 环乳酸菌接种至 MRS 液体培养基中,于 37 ℃ 培养 48 h。取菌悬液,按 5% 接种量分别接种至 MRS 液体培养基中,分别在 5 ℃、25 ℃、30 ℃、37 ℃、45 ℃ 下培养,其中在 5 ℃、15 ℃ 下培养 120 h,在 25 ℃、35 ℃ 下培养 48 h,在 45 ℃ 下培养 96 h^[8]。

1.5.3.3 耐盐试验 取 1 环乳酸菌接种至 MRS 液体培养基中,于 37 ℃ 培养 48 h。取菌悬液,按 5% 接种量分别接种至含有 3.0%、6.5%、10.0%、15.0% NaCl 的 MRS 液体培养基中,于 37 ℃ 培养 48 h,目测菌株生长情况^[8]。

1.5.4 生化鉴定 分别挑取乳酸菌的单菌落进行生化检测,使用细菌生化鉴定管(购自杭州天和微生物试剂有限公司)进行测定,按反应管试剂盒中的说明书进行操作,随后培养 2~3 d,记录菌株反应情况,并结合凌代文^[9]的方法推测菌株所属类型。

1.5.5 16S rDNA 测序鉴定 优势菌株培养 48 h 后,取细菌培养液于 10 000 r/min 离心 1 min,弃去上层澄清液,收集底层菌体以备提取样品 DNA,DNA 提取方法参照 TIANGEN 细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书,然后进行 PCR 扩增,将 PCR 产物送至南京擎科生物科技有限公司测序。将测序返回的有效序列拼接后在 NCBI 网站上进行序列比对,利用 Mega 11.0 软件,选择 Neighbor-Joining 法构建系统进化树。

1.6 稻草青贮的调制、青贮品质及营养品质的分析

1.6.1 水稻秸秆青贮的调制 在 2021 年 10 月收割水稻,以去穗梗稻秸秆作为青贮原料。水稻秸秆原料 pH 值为 6.13,营养成分:干物质(DM)含量 372.99 g/kg,粗蛋白含量 47.06 g/kg(DM),可溶性碳水化合物含量 36.84 g/kg(DM),中性洗涤纤维含量 632.41 g/kg(DM),酸性洗涤纤维含量 399.58 g/kg(DM),酸性洗涤木质素含量 36.86 g/kg(DM),纤维素含量 362.72 g/kg(DM),半纤维素含量 232.83 g/kg(DM),乳酸含量 7.78 g/kg(DM),乙酸含量 0.72 g/kg(DM),1 g 水稻秸秆(以鲜质量计)含乳酸菌数量 4.76 lg、好氧细菌数 6.64 lg、酵母菌数量 4.55 lg,霉菌数量 3.02 lg。在水稻秸秆中分别添加鼠李糖乳杆菌(SR1)、香肠乳杆菌(SR2),添加量均为 5×10^5 CFU/g,将菌剂喷洒于水稻秸秆上,对

照组喷洒相应体积的水。将处理后的水稻秸秆装入青贮袋中,使用真空封口机抽气封口,每袋质量 300 g。室温发酵 60 d 后开袋取样,进行青贮品质的检测。

1.6.2 水稻秸秆青贮发酵品质及微生物数量的测定 取 20 g 原水稻秸秆样品或青贮样品,加入 180 ml 灭菌蒸馏水,于 4 ℃ 冰箱中浸提 24 h,再用 4 层纱布过滤,随后用 pH 计测定滤液 pH 值。将滤液用 0.22 μm 滤膜过滤后用高效液相色谱仪测定乳酸、乙酸、丙酸、丁酸含量^[10]。用苯酚-次氯酸钠比色法测定铵态氮含量^[11]。

取 10 g 原水稻秸秆样品或青贮样品装入含有 90 ml 0.90% 生理盐水的 6 号自封袋中,置于摇床上,于 120 r/min 振荡 1 h,取上清菌悬液进行不同梯度的稀释。将具有连续稀释度的菌液涂布于营养琼脂培养基上,于 37 ℃ 培养 24 h,计算好氧细菌的数量;将具有连续稀释度的菌液涂布于虎皮琼脂培养基上,于 30 ℃ 培养 48 h,计算酵母菌、真菌的数量;将具有连续稀释度的菌液灌注于 MRS 琼脂培养基中,于 37 ℃ 培养 48 h,计算乳酸菌数量^[12]。

1.6.3 水稻秸秆青贮饲料营养品质的测定 每袋称取 250 g 原水稻秸秆样品(原料)或青贮样品,于 105 ℃ 杀青 1 h 后,再于 65 ℃ 烘干至恒质量,计算干物质含量。用 ANKOM -A2000i 型全自动滤袋技术测定样品、原料的中性洗涤纤维(NDF)、酸性洗涤纤维(ADF)和酸性洗涤木质素(ADL)含量,并计算纤维素、半纤维素含量^[13];用丹麦产全自动凯氏定氮仪测定粗蛋白质含量^[14];用蒽酮-硫酸比色法测定可溶性碳水化合物含量^[15];用体外胃蛋白酶-纤维素酶消化法测定干物质体外消化率^[16]。

1.7 数据分析

用 Excel 2019、SPSS 26 软件统计并分析试验数据,用 Duncan's 法进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 产阿魏酸酯酶乳酸菌菌株的筛选

本试验从湖羊瘤胃液中分离到 156 株乳酸菌,在以阿魏酸乙酯为唯一碳源的筛选平板上培养 12 h 后发现,仅 SR1 菌株、SR2 菌株产生较大透明圈,可以初步判断 SR1 菌株、SR2 菌株能利用碳源阿魏酸乙酯,可能具有产阿魏酸酯酶的活性,其中 SR1 菌株、SR2 菌株的透明圈直径分别为 8.00 mm、12.00

mm,与 SR1 菌株相比,SR2 菌株的透明圈直径更大,表明该菌株降解阿魏酸乙酯的性能更好。

由表 3 可以看出,SR1 菌株、SR2 菌株都具有产阿魏酸酯酶的活性,SR1 产阿魏酸酯酶的活性为 7.23 mU/ml,菌株 SR2 产阿魏酸酯酶的活性高于 SR1,为 10.36 mU/ml。

表 3 SR1 菌株、SR2 菌株的透明圈大小及其产阿魏酸酯酶的活性
Table 3 Transparent ring size and its enzyme biometric determination of strains

| 菌株编号 | 透明圈直径 (mm) | 产酶活性 (mU/ml) |
|------|---------------|-----------------|
| SR1 | 8.00±0.21 | 7.23±0.42 |
| SR2 | 12.00±0.46 | 10.36±0.12 |

2.2 形态学鉴定

将 SR1 菌株、SR2 菌株分别划线接种于含琼脂的 MRS 培养基上,于 37 ℃ 厌氧培养 48 h 后,发现 SR1 菌株在平板上形成乳白色、圆形、边缘规则、中心凸起且表面有光泽的菌落;SR2 菌株为中心稍凸起的乳白色菌落,边缘不整齐,表面湿润,呈扁平状。培养 48 h 后进行涂片染色,SR1 菌株、SR2 菌株的镜检结果均为 G⁺ 短杆菌。

2.3 菌株的生长曲线

由图 1A 可知,随着菌株 SR1 的生长,培养液的 pH 值逐渐下降。从 OD₆₀₀ 看出,培养 0~2 h,SR1 菌株生长缓慢,处在停滞期;培养 2~16 h,SR1 菌株步入对数生长期,生长速率最快;培养 16 h 后,SR1 菌株的生长步入平缓期,生长逐渐稳定;培养 24 h 时,SR1 菌株培养液的 pH 值为 3.94。

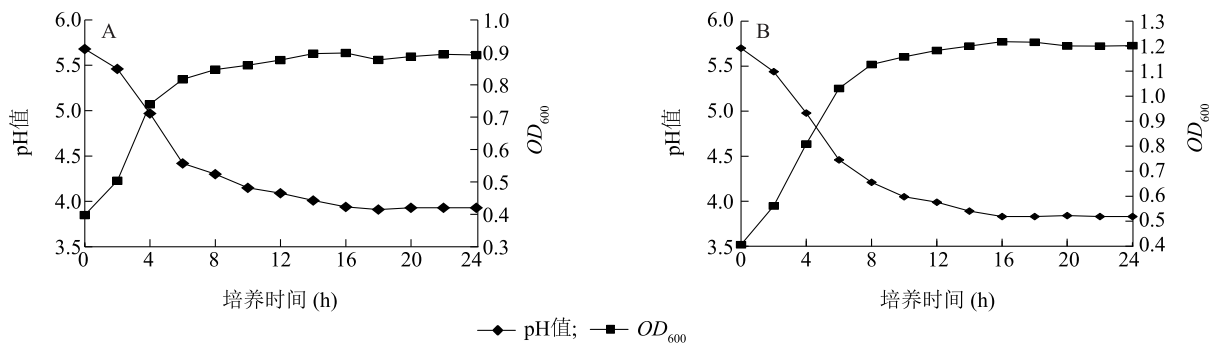
由图 1B 中 SR2 菌株的 OD₆₀₀、pH 值随培养时间的变化可以看出,SR2 菌株在培养 2 h 后的繁殖速度加快,步入对数生长期,同时产酸能力也相应提高,pH 值快速下降;培养 18 h 后,SR2 菌株的生长逐渐趋于稳定,pH 值缓慢降低;培养 24 h 时,SR2 菌株培养液的 pH 值为 3.83。综合分析可知,SR2 菌株的产酸速度比 SR1 菌株快。

2.4 菌株的生长特性

由表 4 可知,在 pH 值为 2.5 的条件下,2 株菌均不能生长;当 pH 值为 3.0 时,SR1 菌株表现为微弱生长,SR2 菌株的生长表现一般;当 pH 值为 3.5~7.0 时,SR2 菌株的生长情况良好。2 株菌在 5 ℃ 条件下均不能生长;在 25~37 ℃ 条件下,2 株菌的生长

状况良好;当温度为 45 ℃ 时,2 株菌的生长情况均较微弱。2 株菌都能在含有 3.0%~10.0% NaCl 的培养液中生长。当 NaCl 含量达到 15.0% 时,SR1 菌株、SR2 菌株均不生长。由此可见,SR1 菌株能够在 pH 值为 4.0~7.0、温度为 25~37 ℃、NaCl 含量为

3.0% 的 MRS 培养液中良好生长;SR2 菌株的耐酸能力比 SR1 菌株高,能够在 pH 值为 3.5~7.0、温度为 25~37 ℃、NaCl 含量为 3.0% 的 MRS 培养液中很好地生长。



A:SR1 菌株;B:SR2 菌株。

图 1 SR1 菌株和 SR2 菌株的生长曲线

Fig.1 Growth curves of the strain SR1 and SR2

表 4 菌株在不同条件下的生长情况

Table 4 Growth of strains under different conditions

| 特性 | 指标 | 菌株 | |
|----------|-----------|-----|-----|
| | | SR1 | SR2 |
| 耐酸性 | pH 值 2.5 | - | - |
| | pH 值 3.0 | + | ++ |
| | pH 值 3.5 | ++ | +++ |
| | pH 值 4.0 | +++ | +++ |
| | pH 值 4.5 | +++ | +++ |
| | pH 值 7.0 | +++ | +++ |
| 耐高温性、低温性 | 5 ℃ | - | - |
| | 25 ℃ | +++ | +++ |
| | 30 ℃ | +++ | +++ |
| | 37 ℃ | +++ | +++ |
| | 45 ℃ | + | + |
| 耐盐性 | 3.0%NaCl | +++ | +++ |
| | 6.5%NaCl | ++ | ++ |
| | 10.0%NaCl | + | + |
| | 15.0%NaCl | - | - |

-:不生长;+:微弱生长;+:一般生长;+:良好生长。

2.5 菌株的生化反应

由表 5 可以看出,SR1 菌株、SR2 菌株在乳糖、蔗糖和葡萄糖生化管中的反应结果表现为阳性,硝酸盐还原和接触酶反应结果均表现为阴性,表明 SR1 菌株在葡萄糖发酵产气试验中表现为产气,

SR2 菌株发生精氨酸产氨现象;SR1 菌株在阿拉伯糖、核糖、甘露醇和山梨醇生化管中的反应结果表现为阳性,SR2 菌株则相反。结合凌代文^[9]的研究结果,初步判断 SR1 菌株为鼠李糖乳杆菌,SR2 菌株为香肠乳杆菌。

表 5 不同菌株的生化反应结果

Table 5 Biochemical reactions of strains

| 项目 | SR1 | SR2 | 项目 | SR1 | SR2 |
|-------|-----|-----|-------|-----|-----|
| 木糖 | - | - | 果糖 | + | + |
| 乳糖 | + | + | 蔗糖 | + | + |
| 葡萄糖 | + | + | 核糖 | + | - |
| 麦芽糖 | + | + | 山梨醇 | + | - |
| 半乳糖 | + | + | 棉籽糖 | - | - |
| 甘露糖 | + | + | 鼠李糖 | + | - |
| 甘露醇 | + | - | 蜜二糖 | - | - |
| 阿拉伯糖 | + | - | 纤维二糖 | + | + |
| 苦杏仁苷 | + | + | 精氨酸产氨 | - | + |
| 葡萄糖酸盐 | + | - | 硝酸盐还原 | - | - |
| 革兰氏染色 | + | + | 接触酶试验 | - | - |

+:阳性;-:阴性。

2.6 16S rRNA 鉴定

由表 6、图 2 可知,SR1 菌株与 *Lactobacillus rhamnosus* strain NBRC 3425 最接近,同源性达 99.79%;SR2 菌株与 *Lactobacillus farciminis* strain

BCRC 14043 最接近, 同源性达 99.00% 以上。综合 SR1 菌株、SR2 菌株的形态学、理化特征及 16S rRNA 测序结果, 最终鉴定 SR1 菌株为鼠李糖乳杆菌, SR2 菌株为香肠乳杆菌。

表 6 基于 16S rRNA 序列的 NCBI 比对结果

Table 6 NCBI alignment results based on 16S rRNA sequence

| 菌株 | 相似菌株 | 同源性 (%) |
|-----|---|---------|
| SR1 | <i>Lactobacillus rhamnosus</i> strain NBRC 3425 | 99.79 |
| SR2 | <i>Lactobacillus farciminis</i> strain BCRC 14043 | 99.45 |

2.7 接种产阿魏酸酯酶乳酸菌对水稻秸秆青贮饲料发酵品质的影响

由表 7 可以看出, 水稻秸秆青贮发酵 60 d 后,

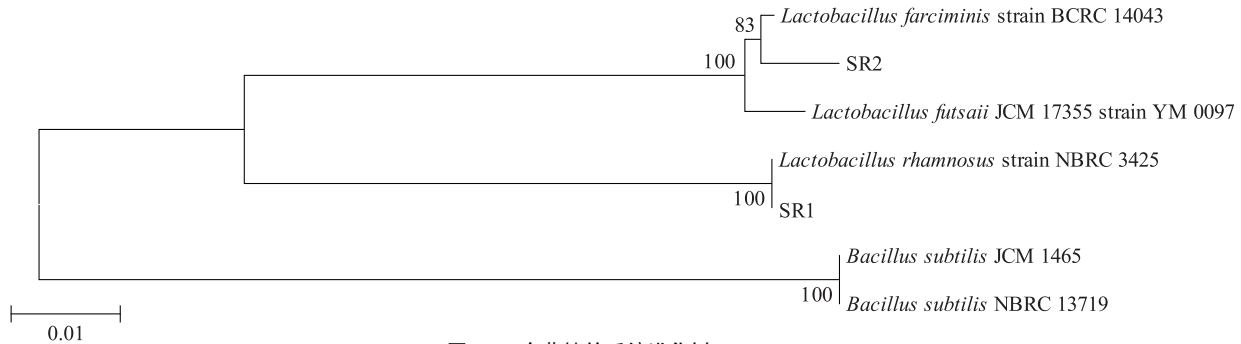


图 2 2 个菌株的系统进化树

Fig.2 Phylogenetic tree of two strains

表 7 接种乳酸菌对水稻秸秆青贮发酵品质指标的影响

Table 7 Effects of lactic acid bacteria on fermentation quality indices of rice straw silage

| 指标 | 处理 | | |
|-----------------|-------------|-------------|-------------|
| | CK | SR1 | SR2 |
| pH 值 | 4.49±0.04a | 4.25±0.02a | 3.91±0.04b |
| 乳酸含量(g/kg) | 32.28±1.87b | 35.05±1.44b | 69.25±0.72a |
| 乙酸含量(g/kg) | 5.81±0.33b | 6.85±0.12a | 1.88±0.12c |
| 乳酸/乙酸 | 5.59±0.42b | 5.18±0.27b | 37.15±1.96a |
| 铵态氮含量(g/kg) | 3.15±0.11a | 2.91±0.33a | 1.24±0.01b |
| 丙酸含量(g/kg) | - | - | - |
| 丁酸含量(g/kg) | - | - | - |
| 乳酸菌数量(lg, 1 g) | 5.91±0.08c | 6.03±0.02bc | 6.29±0.01a |
| 好氧细菌数量(lg, 1 g) | 4.38±0.11a | 4.32±0.12a | 2.99±0.20b |
| 酵母菌数量(lg, 1 g) | 3.30±0.16a | 3.25±0.01a | 2.53±0.12b |
| 霉菌数量(lg, 1 g) | - | - | - |

同行数据后标有不同小写字母表示不同菌剂处理间差异显著($P < 0.05$)。乳酸含量、乙酸含量、丙酸含量、丁酸含量为干物质含量; 乳酸菌数量、好氧细菌数量、酵母菌数量、霉菌数量为鲜质量的含菌量; 铵态氮含量以总氮计。“-”表示未检测到。

与 CK 相比, SR2 组的 pH 值显著低于 CK ($P < 0.05$), 且 SR2 组的 pH 值最低, SR1 组的 pH 值与 CK 间的差异不显著。SR2 组的乳酸含量显著高于 CK、SR1 组 ($P < 0.05$); 与 CK 相比, SR2 组的乙酸含量显著降低 ($P < 0.05$), 而 SR1 组的乙酸含量显著升高 ($P < 0.05$)。SR2 组的乳酸与乙酸含量的比值比 CK 高 564.58%, 并且差异显著 ($P < 0.05$)。SR2 组的铵态氮含量比 CK 减少了 60.63%, 并且显著低于 SR1 组 ($P < 0.05$)。SR1 组与 CK 的铵态氮含量差异不显著。SR2 组的乳酸菌数量显著高于 CK ($P < 0.05$), SR1 组的乳酸菌数量与 CK 间的差异不显著; SR2 组的好氧细菌数量和酵母菌数量显著低于 CK、SR1 组 ($P < 0.05$)。所有处理组中均未检测出丙酸、丁酸或霉菌。

2.8 接种产阿魏酸酯酶乳酸菌对水稻秸秆青贮饲料营养品质的影响

由表 8 可以看出, 青贮 60 d 后 SR2 组的干物质含量显著高于 CK、SR1 组 ($P < 0.05$), SR1 组的干物质含量与 CK 间无显著差异; SR1 组的粗蛋白质含量显著高于 CK ($P < 0.05$)。SR2 组的可溶性碳水化合物含量比 CK 增加了 42.67%, 并且差异显著 ($P < 0.05$)。SR2 组的中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维、纤维素含量显著低于 CK ($P < 0.05$), 分别降低了 3.03%、4.74%、4.90%, SR1 组的中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维、纤维素含量与 CK 之间的差异不显著; SR2 组的干物质体外消化率最高, 但与 CK 相比差异不显著, 仅提高了 2.26%。

3 讨论

3.1 羊瘤胃液中产阿魏酸酯酶乳酸菌的筛选与鉴定

有报道显示, 反刍动物瘤胃中近 50% 的纤维素

被分解,是瘤胃中细菌、真菌、原虫协同作用的结果^[17]。而在分解过程中,80%左右是由细菌完成的,反刍动物瘤胃中的细菌可以产生木聚糖酶、纤维素酶等能降解纤维素的活性物质。由此进一步推测,反刍动物瘤胃中可能存在独特的具有阿魏酸酯酶活性的资源。阿魏酸酯酶在一定程度上具有降解纤维素的能力,能够反映反刍动物对纤维素的利用程度。由此可见,从反刍动物瘤胃中筛选具有阿魏酸酯酶活性的细菌并测定其产酶能力的强弱,对于判断反刍动物瘤胃中纤维素被分解的程度具有参考意义。

表 8 接种乳酸菌对水稻秸秆青贮饲料营养品质指标的影响

Table 8 Effects of lactic acid bacteria on nutritional quality indices of rice straw silage

| 指标 | 处理 | | |
|------------------|--------------|--------------|--------------|
| | CK | SR1 | SR2 |
| 干物质含量(g/kg) | 296.56±1.69b | 297.80±2.25b | 315.49±1.04a |
| 粗蛋白质含量(g/kg) | 48.53±0.47b | 51.18±0.75a | 49.91±0.67ab |
| 可溶性碳水化合物含量(g/kg) | 9.35±0.80b | 9.57±0.22b | 13.34±0.83a |
| 中性洗涤纤维含量(g/kg) | 641.03±3.13a | 634.73±2.82a | 621.63±2.59b |
| 酸性洗涤纤维含量(g/kg) | 404.12±3.06a | 403.97±3.53a | 384.96±2.98b |
| 纤维素含量(g/kg) | 367.78±1.21a | 367.78±3.90a | 349.77±3.52b |
| 半纤维素含量(g/kg) | 236.90±2.82a | 230.76±6.14a | 236.67±2.57a |
| 酸性洗涤木质素含量(g/kg) | 36.34±2.53a | 36.19±3.31a | 35.19±2.04a |
| 干物质体外消化率(g/kg) | 342.79±1.21a | 343.67±2.17a | 350.52±1.28a |

同行数据后标有不同小写字母表示不同菌株处理间差异显著($P < 0.05$)。除干物质含量外的其他营养指标含量均以干物质含量计。

反刍动物瘤胃中微生物分泌出的酶可以存在于瘤胃液中,也可以附着在饲料颗粒及微生物菌体上^[18],其中葡聚糖酶分布于细胞质或细胞表面,而阿魏酸酯酶、糖苷分解酶主要分布于瘤胃液中。由此可见,瘤胃中具有阿魏酸酯酶活性的微生物与植物细胞壁上附着的微生物对纤维素的降解极其重要。

在本试验中,研究人员从湖羊瘤胃液中筛选得到 2 株具有阿魏酸酯酶活性的菌株,并结合形态学、理化性质、基因测序鉴定结果,确定其中的 SR1 菌株、SR2 菌株均为乳杆菌属。通过产酶活性测定发现,这 2 株菌产阿魏酸酯酶的活性显著低于目前已知的具有产阿魏酸酯酶的真菌,与李干等^[19-20]报道的研究结果一致。但与其他细菌相比,菌株 SR2 的产阿魏酸酯酶的活性要高于乳酸片球菌(4.32

mU/ml)、短乳杆菌(7.56 mU/ml)、植物乳杆菌(8.34 mU/ml)^[21],表明本研究获得的 SR2 菌株具有降解阿魏酸甲酯的作用。综合这 2 株菌的透明圈大小及其产酶活性可知,菌株 SR2 对阿魏酸甲酯的分解能力要优于菌株 SR1。对 2 株菌的生长情况进行研究发现,菌株 SR2 的产酸能力较强,其在 MRS 培养液中培养 24 h 后,最终 MRS 培养液的 pH 值达到 3.83,而菌株 SR1 的产酸能力较弱,培养 24 h 后 MRS 培养液的 pH 值为 3.94。在对酸、盐和温度的耐受性上,SR1、SR2 这 2 株菌的生长受到 pH 值、盐浓度及温度的影响,2 株菌在低温(5℃)、高盐含量(15.0% NaCl)条件下不能生长,但在温度为 25~45℃、NaCl 含量为 3.0%~10.0% 的条件下能够微弱生长,并且 SR1、SR2 这 2 株菌能在 pH 值为 3.0 的 MRS 培养液中生长,与薛银刚等^[22-23]报道的结果相符,且 SR2(香肠乳杆菌)对酸的耐受性更强。Muck 等^[24]认为,适合用于青贮的微生物发酵剂应有一致的发酵途径,既可以利用糖来提高产酸量,使青贮饲料的 pH 值尽快降至 4.0,从而阻碍有害微生物活动,改善饲料品质,同时,这类微生物发酵剂需要具备一定的耐酸性。由此可见,产酸量和耐酸性是评价乳酸菌在青贮过程中发酵性能的重要指标。Zhou 等^[25]认为,参与青贮发酵的乳酸菌的最佳生长环境温度 20~37℃,过高或过低的温度都会影响乳酸菌的生长发育。本研究选用的 2 株乳酸菌在 pH 值为 3.0、温度为 25~37℃ 的环境中也能生长,在作为青贮料乳酸菌添加剂的生产中具有潜在价值。

3.2 功能性乳酸菌对水稻秸秆青贮饲料发酵品质的影响

pH 值下降速度是影响微生物活动和发酵损失的重要因素^[26]。添加乳酸菌能够促进青贮饲料酸化,使得 pH 值下降,发酵速度加快且发酵产物含量发生改变^[27]。贾婷婷等^[28]发现,外源添加鼠李糖乳杆菌后,会引起青贮水稻秸秆 pH 值降低、乳酸含量提高、有害菌数量减少,与本研究结果不一致。造成上述结果不一致的原因可能是水稻秸秆发酵 60 d 后,含水率、营养水平较低,阻碍了乳酸菌的生长繁殖,从而影响其发酵效果。而添加香肠乳杆菌的 SR2 组的 pH 值显著降低至 3.91,达到制备优质青贮料的要求。SR2 组水稻秸秆青贮 60 d 时,乳酸菌数量增加,好氧细菌、酵母菌数量减少,基本检测不到霉菌,说明香肠乳杆菌 SR2 的产酸能力较强,促

使青贮水稻秸秆的 pH 值迅速降低,不良微生物减少。

有机酸也是判定青贮水稻秸秆发酵品质的主要指标,尤其是乳酸含量与发酵品质高度相关。水稻秸秆青贮时,添加鼠李糖乳杆菌 SR1 后,乙酸含量显著高于其他处理组,可能与鼠李糖乳杆菌为异型发酵乳酸菌有关;添加香肠乳杆菌的 SR2 组与 CK 组、SR1 组相比,乳酸含量分别增加了 114.53%、97.57%,表明添加香肠乳杆菌 SR2 促进了乳酸的生成。产阿魏酸酯酶的香肠乳杆菌 SR2 的添加对青贮饲料中乙酸含量的影响较大,明显降低了乙酸含量,提高了乳酸/乙酸比值,这是添加同型乳酸菌后产生的典型反应^[29-30]。

铵态氮由腐败微生物(如梭菌)降解青贮原样中的粗蛋白产生,其含量越高,表明发酵效果越差。添加功能性乳酸菌会使青贮料中的乳酸菌数量增加,而乳酸菌可以产生拮抗物质,对一些不良菌的发育有阻碍作用。添加功能性乳酸菌后,铵态氮含量都有所降低,其中添加产阿魏酸酯酶的香肠乳杆菌 SR2 的效果最明显,铵态氮含量显著低于其他处理组,说明添加产阿魏酸酯酶的香肠乳杆菌 SR2 能有效减少腐败菌对水稻秸秆原料中粗蛋白的降解,进而改善青贮水稻秸秆饲料的品质,这与华金玲^[31]和荆佩欣^[21]的研究结果一致。

3.3 功能性乳酸菌对水稻秸秆青贮饲料营养品质的影响

粗蛋白含量体现了水稻秸秆饲料的饲用价值。在发酵过程中,植物酶和微生物的作用会影响粗蛋白含量。在本试验中,SR1 处理组的粗蛋白含量高于未加菌剂的 CK。

在水稻秸秆青贮过程中,纤维含量和结构的变化受酶活性的影响,进一步会影响水稻秸秆青贮饲料的营养价值^[32]。从营养品质来看,添加鼠李糖乳杆菌的 SR1 处理组的中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维含量与 CK 间基本无差异,与 Lynch 等^[33]报道的结果相似,Lynch 等在添加产阿魏酸酯酶乳酸菌苜蓿青贮试验中发现,接种产阿魏酸酯酶的乳酸菌没有提高青贮苜蓿发酵品质及纤维降解能力,可能是由于在单独添加鼠李糖乳杆菌 SR1 的条件下,水稻秸秆发酵 60 d 后的 pH 值仍偏高,鼠李糖乳杆菌 SR1 的阿魏酸酯酶未发挥作用,可溶性糖释放不及时,使得鼠李糖乳杆菌 SR1 在水稻秸秆表面不能很好地

生长。而在添加产阿魏酸酯酶的香肠乳杆菌 SR2 处理中,水稻秸秆饲料中的中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维和纤维素含量较 CK 显著降低,可溶性碳水化合物含量较 CK 显著增加。荆佩欣^[21]研究发现,加入产阿魏酸酯酶的植物乳杆菌 A1,可以导致苜蓿青贮饲料的纤维含量降低。Nsereko 等^[34]在禾本科牧草青贮过程中添加阿魏酸酯酶,促进了牧草饲料中中性洗涤纤维的降解,但对于物质体外消化率没有影响,表明阿魏酸酯酶能起到降解纤维的作用,与本研究结果一致。

4 结论

(1)接种产阿魏酸酯酶乳酸菌提高了水稻秸秆饲料发酵品质,产阿魏酸酯酶香肠乳杆菌 SR2 组发酵 60 d 后的 pH 值最低,为 3.91,乳酸含量最高,为 69.25 g/kg。所有菌剂处理组的铵态氮含量均低于 CK,其中产阿魏酸酯酶的香肠乳杆菌 SR2 组的铵态氮含量最低。(2)产阿魏酸酯酶香肠乳杆菌 SR2 组的中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维和纤维素含量分别为 621.63 g/kg、384.96 g/kg 和 349.77 g/kg,显著低于 CK,添加产阿魏酸酯酶的鼠李糖乳杆菌 SR1 对水稻秸秆纤维分解的影响不大。产阿魏酸酯酶的香肠乳杆菌 SR2 组的可溶性碳水化合物含量最高,为 13.34 g/kg。综上各项指标检测结果,得出产阿魏酸酯酶的香肠乳杆菌 SR2 组为发酵效果最优组。

参考文献:

- [1] 张晓庆,王梓凡,参木友,等.中国农作物秸秆产量及综合利用现状分析[J].中国农业大学学报,2021,26(9):30-41.
- [2] 李双双,赵辉.微生物阿魏酸酯酶性质及应用研究进展[J].食品与发酵科技,2020,56(5):75-80.
- [3] WILSON D B. Microbial diversity of cellulose hydrolysis[J]. Current Opinion in Microbiology, 2011, 14(3): 259-263.
- [4] CAO B B, WANG R, YANG H J, et al. *In situ* ruminal degradation of phenolic acid, cellulose and hemicellulose in crop brans and husks differing in ferulic and *p*-coumaric acid patterns[J]. Journal of Agricultural Science, 2015, 153(7): 1312-1320.
- [5] 马松成,陈静,毛华明.瘤胃微生态系统[J].中国畜牧兽医,2007,34(1):31-34.
- [6] 李君凤,原现军,董志浩,等.西藏地区牦牛瘤胃中兼性厌氧纤维素降解菌的分离鉴定[J].草业学报,2017,26(6):176-184.
- [7] DONAGHY J, KELLY P F, MCKAY A M. Detection of ferulic acid esterase production by *Bacillus* spp. and lactobacilli[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1998, 50(2):257-260.
- [8] 杨杨,石超,郭旭生.高寒草甸魏斯氏乳酸菌的分离鉴定

- 及理化特性研究[J]. 草业学报, 2014, 23(1): 266-275.
- [9] 凌代文. 乳酸菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 1-25.
- [10] LIU B Y, HUAN H L, GU H R, et al. Dynamics of a microbial community during ensiling and upon aerobic exposure in lactic acid bacteria inoculation-treated and untreated barley silages[J]. Biore-source Technology, 2019, 273: 212-219.
- [11] BRODERICK G A, KANG J H. 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.
- [12] 袁洁, 马冉冉, 张文洁, 等. 自然青贮多花黑麦草优良乳酸菌的筛选及对多花黑麦草青贮品质的影响[J]. 草业学报, 2021, 30(11): 132-143.
- [13] VAN SOEST P J, ROBERTSON J B, LEWIS B A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition[J]. Journal of Dairy Science, 1991, 74(10): 3583-3597.
- [14] Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis[Z]. 15th Ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, USA. 1990.
- [15] DUBOS M, GILLES K A, HAMILTON J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. Analytical Chemistry, 1956, 28(3): 350-353.
- [16] GOTO I, MINSON D J. Prediction of the dry matter digestibility of tropical grasses using a pepsin-cellulase assay[J]. Animal Feed Science and Technology, 1977, 2(3): 247-253.
- [17] RUSSELL J B, RYCHLIK J L. Factors that alter rumen microbial ecology[J]. Science, 2001, 292(5519): 1119-1122.
- [18] 买尔哈巴·艾合买提, 樊振, 李越中, 等. 瘤胃中纤维素分解菌的分离、鉴定及其产酶条件的优化[J]. 微生物学报, 2013, 53(5): 470-477.
- [19] 李干. 产阿魏酸酯酶菌筛选、培养条件及酶学性质研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2011.
- [20] 卢颖欣, 张宁, 欧仕益, 等. 产阿魏酸酯酶乳酸菌的乳杆菌筛选以及基因克隆[J]. 食品工业科技, 2013, 34(20): 199-203.
- [21] 荆佩欣. 产阿魏酸酯酶乳酸菌的筛选、酶学特性及其在苜蓿青贮中的应用研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2017.
- [22] 薛银刚. 鼠李糖乳杆菌的筛选、鉴定及加工特性研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2006.
- [23] 章德法, 徐为民, 徐幸莲. 香肠乳杆菌增殖培养基及培养条件的优化研究[J]. 食品工业科技, 2009, 30(1): 147-149.
- [24] MUCK R E, NADEAU E M G, MCALLISTER T A, et al. Silage review: recent advances and future uses of silage additives[J]. Journal of Dairy Science, 2018, 101(5): 3980-4000.
- [25] ZHOU Y, DROUIN P, LAFRENIRE C. Effect of temperature (5-25 °C) on epiphytic lactic acid bacteria populations and fermentation of whole-plant corn silage[J]. Journal of Applied Microbiology, 2016, 121(3): 657-671.
- [26] KUNG L, RANJIT N K. The effect of *Lactobacillus buchneri* and other additives on the fermentation and aerobic stability of barley silage[J]. Journal of Dairy Science, 2001, 84(5): 1149-1155.
- [27] FAN X M, ZHAO S S, YANG F Y, et al. Effects of lactic acid bacterial inoculants on fermentation quality, bacterial community, and mycotoxins of alfalfa silage under vacuum or nonvacuum treatment[J]. Microorganisms, 2021, 9(12): 2614.
- [28] 贾婷婷, 吴哲, 玉柱. 不同类型乳酸菌添加剂对燕麦青贮品质和有氧稳定性的影响[J]. 草业科学, 2018, 35(5): 1266-1272.
- [29] MUCK R E. Silage microbiology and its control through additives[J]. Revista Brasileira de Zootecnia, 2010, 39(Suppl special): 183-191.
- [30] FILYA I, MUCK R E, CONTRERAS-GOVEA F E. Inoculant effects on alfalfa silage: fermentation products and nutritive value[J]. Journal of Dairy Science, 2007, 90(11): 5108-5114.
- [31] 华金玲. 添加乳酸菌对整株水稻秸青贮发酵品质的影响[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2006.
- [32] TIAN J P, XU N X, LIU B Y, et al. Interaction effect of silo density and additives on the fermentation quality, microbial counts, chemical composition and *in vitro* degradability of rice straw silage[J]. Biore-source Technology, 2020, 297: 122412.
- [33] LYNCH J P, JIN L, LARA E C, et al. The effect of exogenous fibrolytic enzymes and a ferulic acid esterase-producing inoculant on the fibre degradability, chemical composition and conservation characteristics of alfalfa silage[J]. Animal Feed Science and Technology, 2014, 193: 21-31.
- [34] NSEREKO V L, SMILEY B K, RUTHERFORD W M, et al. Influence of inoculating forage with lactic acid bacterial strains that produce ferulate esterase on ensilage and ruminal degradation of fiber[J]. Animal Feed Science and Technology, 2008, 145(1): 122-135.

(责任编辑: 徐艳)