

文章编号:1009-038X(2004)03-0001-04

微生物接种剂和酶制剂对黑麦草 青贮发酵品质的影响

何依群, 乐国伟*, 施用晖, 李永富, 王海梅

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘 要: 通过在室温 23 ± 2 °C 条件下添加乳杆菌、乳球菌和纤维素酶青贮黑麦草, 以评价其单独或联合应用对黑麦草青贮发酵品质的影响。试验分为 4 组: 对照组、乳杆菌组、乳杆菌和乳球菌复合添加组及乳杆菌和纤维素酶复合添加组。结果表明: 单独添加乳杆菌、乳杆菌与乳球菌复合添加对黑麦草 pH 值无明显影响 ($P > 0.05$), 但发酵质量较对照组有所改善。与对照组相比, 乳杆菌和纤维素酶的复合添加明显降低了 pH 值 ($P < 0.05$), 增加了发酵产物乳酸 ($P < 0.01$) 的含量, 明显降低了 $\text{NH}_3\text{-N}$ ($P < 0.05$)、NDF ($P < 0.01$) 和 ADF ($P < 0.05$) 的含量, 蛋白质损失减少约 8%, 但丁酸含量略高于其他组。因此, 乳杆菌和纤维素酶联合添加可显著改善黑麦草青贮发酵品质。

关键词: 黑麦草; 乳酸菌; 纤维素酶; 青贮品质

中图分类号: S 816.6

文献标识码: A

Effects of Microbial Inoculants and Enzyme Preparation Applied to Ryegrass at Ensiling on Silage Fermentation Quality

HE Yi-qun, LE Guo-wei, SHI Yong-hui, LI Yong-fu, WANG Hai-mei

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Ryegrass was ensiled at 23 ± 2 °C in greenhouse to evaluate the effects of *lactobacillus*, *lactococcus* and cellulose enzyme on fermentation quality. Ryegrass were treated with additional of single *lactobacillus*, *lactobacillus* plus *lactococcus* and *lactobacillus* plus cellulose enzyme, respectively, silage with no additives served as a control. The results showed that supplementation of single *lactobacillus* and *lactobacillus* plus *lactococcus* did not influence pH ($P > 0.05$) of silage, but fermentation quality were improved slightly compared with that of control group. The pH of *Lactobacillus* plus cellulose enzyme group decreased ($P < 0.05$) significantly during the whole silage fermentation, compared with that of control group. The lactic acid content was increased greatly ($P < 0.01$), the contents of $\text{NH}_3\text{-N}$ ($P < 0.05$), NDF ($P < 0.01$) and ADF ($P < 0.05$) were reduced significantly, protein loss was decreased about 8%, but the concentration of butyric acid was a little higher in *lactobacillus* plus cellulose enzyme group than those in other groups. It was concluded that additional of *lactobacillus* plus cellulose enzyme may improve the fermentation quality of ryegrass silage significantly.

收稿日期: 2003-07-03; 修回日期: 2003-09-15.

基金项目: 国家“十五”科技攻关计划项目(编号: 2002BA514A-11-3)资助课题.

作者简介: 何依群(1978-), 女, 安徽青阳人, 粮食、油脂与植物蛋白工程硕士研究生; * 通讯作者.

Key words: ryegass; *Lactobacillus*; cellulose enzyme; silage quality

近 10 年来,随着生物技术在饲料行业的不断渗透,国内外对微生物接种剂和酶制剂在全株玉米及牧草青贮中的应用进行了大量的研究^[1~3].但目前我国有关微生物接种剂和酶制剂用于牧草青贮的报道甚少.一年生黑麦草具有营养价值丰富、生长分蘖快、再生力强、产量高的优点,但由于黑麦草对酸的缓冲力较高而可溶性糖含量较低,因此用黑麦草青贮时需要使用添加剂才能保证有良好的发酵质量^[4].作者利用两种微生物添加剂以及一种纤维素酶,单独或联合应用处理黑麦草,旨在探讨其对黑麦草青贮发酵品质的影响.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 青贮原料 黑麦草:一年生黑麦草,二茬刈割,无锡市马山奶牛厂栽培.

1.1.2 菌种 L-1 乳杆菌(*Lactobacillus* L-1),作者所在实验室筛选并制备.乳酸乳球菌乳酸亚种(*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*),江南大学食品学院谷物科学实验室提供.

1.1.3 酶制剂 纤维素酶(Spezyme CP),由无锡杰能科生物工程有限公司生产,最低酶活力为 90 GCU/mL. Spezyme CP 酶活力 GCU: 50 ℃下每毫升酶制剂培养液中 60 min 内释放葡萄糖的单位量.

1.2 实验方法

1.2.1 青贮试验设计 试验分为 4 个处理组:对照组(以下简称 CON 组),L-1 乳杆菌组(L1 组),L-1 乳杆菌+乳酸乳球菌乳酸亚种组(LL1 组),L-1 乳杆菌+纤维素酶组(EL1 组).其中添加菌数每克鲜样为 3.0×10^5 CFU,纤维素酶的添加量为每公斤鲜样 2.5 mL.在青贮后的 0,1,3,7,20,40 d,每组随机取 3 袋进行取样,以测定发酵过程中 pH 值和干物质(Dry matter,DM)的变化,其中第 40 天的青贮料还用于测定发酵品质.

1.2.2 黑麦草的调制 将预干的黑麦草用铡刀切割至 2~5 cm 长.按设计量取添加剂,将其移入喷壶中,加入适量的水,混匀后均匀喷洒在黑麦草上,称取 600 g 装入 33 cm×47 cm 塑料袋中(每组 3 个重复).对照组喷洒等量的水,装袋后的黑麦草经真空封口机封口后,将其在 23 ± 2 ℃ 温室中避光贮藏.

1.2.3 样品处理 用四分法取鲜样 10 g,用 100

mL 蒸馏水浸提 5 min,经 4 层纱布过滤,立即测定水浸液 pH 值.另取鲜样 10 g,用 100 mL 0.05 mol/L 的 H₂SO₄ 溶液浸提 1 min,水浸液经 4 层纱布过滤,3 000 r/min 离心后于 -20 ℃ 下冷冻保存,用于测定乳酸、乙酸、丙酸、丁酸、NH₃-N 的含量.最后取一定数量的鲜样,经风干粉碎后用于 DM、粗蛋白(Crude protein,CP)、中性洗涤纤维(Neutral detergent fiber,NDF)、酸性洗涤纤维(Acid detergent fiber,ADF)和可溶性碳水化合物(Water soluble carbohydrate,WSC)的测定.

1.2.4 分析方法 青贮前后黑麦草的 DM 按文献[5]的方法测定;可溶性碳水化合物用蒽酮比色法测定;用 Barker 和 Sommerson 的方法^[6]测定乳酸;用 PBS-3B 型 pH 计测定 pH 值;用气相色谱法测定乙酸、丙酸、丁酸;用范氏纤维分析法测定 NDF、ADF;用半微量凯氏定氮法测定 CP;用氧化镁蒸馏法测定 NH₃-N.

1.3 数据处理

用 SAS 数据处理系统 Anova 过程进行方差分析和 Duncan 多重比较.

2 结果与分析

2.1 青贮前材料草的化学组成

材料草的化学组成见表 1.

表 1 黑麦草的化学成分

Tab. 1 Chemical analysis of the fresh ryegrass

指 标	质量分数/(g/kg)
干物质	251.1
粗蛋白	248.0
粗灰分	147.4
可溶性碳水化合物	97.1
中性洗涤纤维	462.5
酸性洗涤纤维	272.8

2.2 青贮过程中 pH 值变化和 DM 损失

图 1,2 分别表示黑麦草青贮过程中 pH 值和 DM 损失的变化.青贮前 3 d,CON 组、L1 组和 LL1 组的 pH 值变化不大,而 EL1 组在青贮 1 d 后 pH 值开始逐渐下降,青贮 7 d 后 EL1 组的 pH 值已降至 4.2 左右.对照组 DM 损失最高,青贮 40 d 后,DM 损失为 174.8 g/kg. EL1 组前期 DM 损失很

低,但后期明显增加,其原因可能是青贮料中残存的WSC较高,从而使酵母增殖,而酵母将部分WSC发酵成乙醇和 CO_2 所致,LL1组DM损失最低,约为CON组的1/2。

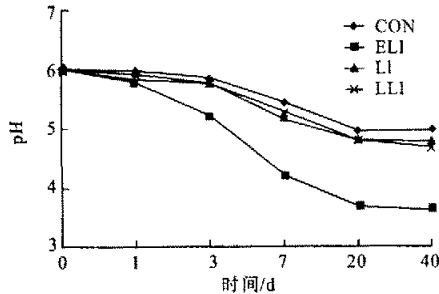


图1 不同处理对黑麦草青贮发酵 pH 值的影响

Fig.1 Effect of different treatments on pH in ryegrass silage fermentation

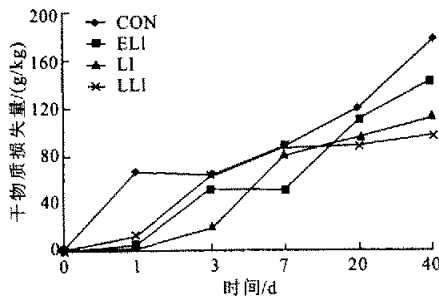


图2 不同处理对黑麦草青贮过程中 DM 损失的影响

Fig.2 Effect of different treatments on DM loss during ryegrass silage fermentation

2.3 不同处理对青贮料发酵品质的影响

青贮料发酵 40 d 的化学分析见表 2。结果表明:青贮料的 DM 质量分数为 207.15~226.55 g/kg,各处理组间无明显差异($P>0.05$)。除对照组外,EL1 组的 DM 质量分数最低,为 215.25 g/kg,这与发酵期间的 DM 损失较高有关。各处理组之间 WSC 的质量分数差异显著($P<0.01$),EL1 组 WSC 质量分数最高,L1 组 WSC 质量分数最低。EL1 处理组显著降低了 NDF($P<0.01$)和 ADF($P<0.05$)的质量分数,而单独添加乳杆菌(L1 组)或乳杆菌和乳球菌复合添加(LL1 组)只降低了 NDF($P<0.05$)的质量分数,对 ADF 的影响不显著($P>0.05$)。各处理并不影响发酵产物丙酸($P>0.05$)和丁酸($P>0.05$)的质量分数。但乳杆菌和纤维素酶复合添加(EL1 组)提高了乙酸($P<0.05$)和乳酸($P<0.01$)的质量分数。EL1 组粗蛋白质量分数最

高,而 L1 组($P<0.05$)和 LL1 组的蛋白质质量分数低于对照组。EL1 组与对照组相比, $\text{NH}_3\text{-N}$ 质量分数明显降低($P<0.05$),而 L1 组和 LL1 组的 $\text{NH}_3\text{-N}$ 质量分数与对照组和 EL1 组相比差异都不显著($P>0.05$),介于两者之间。

3 讨论

试验结果表明:添加乳杆菌(L1 组)和乳杆菌乳球菌复合添加(LL1 组)显著减少了青贮料 DM 损失($P<0.05$),但两个处理组蛋白质损失都较高,这可能是因为发酵初期 pH 值下降较慢,植物酶的活性没有得到很好地抑制,导致粗蛋白降解成非蛋白氮,增加了蛋白质的损失。同时这两个处理组的中性洗涤纤维(NDF)比对照组显著降低($P<0.05$),但酸性洗涤纤维降低不显著($P>0.05$),说明青贮发酵过程中可能有可分解半纤维素的酶产生。单独添加乳杆菌(L1 组)和乳杆菌乳球菌复合添加(LL1 组)对其他发酵产物的影响均不显著($P>0.05$)。

刘建新(1995)^[7]将乳酸菌和纤维素酶的混合物添加到青贮物中,与对照组相比,青贮物的 pH 值低,乳酸和乙酸质量分数增加, $\text{NH}_3\text{-N}$ 质量分数减少,WSC 质量分数增加,而 NDF 和 ADF 的质量分数降低,无丁酸发酵,并且还可减少干物质损失。Jaakkola 等^[7]报道,当乳酸菌和酶混合使用时,青贮料中的干物质质量分数高于对照组,而 NDF 和 ADF 的质量分数比对照组低。为乳酸菌和纤维素酶共同作用(EL1 组)时,添加的纤维素酶有助于植物细胞壁的分解,为乳酸菌提供丰富的碳源,使乳酸菌能快速主导发酵并加速发酵,产生更多的乳酸,pH 值快速下降;同时,添加的纤维素酶通过对植物细胞壁的水解降低了纤维含量,提高了青贮料的消化率^[8]。与对照组相比,EL1 组最终乳酸质量分数提高了约 8.5 倍,NDF、ADF 降解率分别提高约 30%和 13.4%,蛋白质损失减少约 8%。但 EL1 组发酵产物中丁酸质量分数略高于其他组,这是由于丁酸是酪酸菌分解蛋白质和葡萄糖、乳酸生成的产物^[9],说明发酵过程中占优势的乳酸菌可能并没有抑制酪酸菌的增殖。发酵结束时,EL1 组的 DM 损失虽低于对照组,但却高于其他两个处理组,这可能是青贮料中残存的 WSC 较高,EL1 组酵母生长将部分 WSC 发酵成乙醇和 CO_2 ,增加了干物质的损失。

表 2 黑麦草青贮料的化学组成分析(发酵 40 d)

Tab. 2 Chemical analysis of ryegrass silages

g/kg

指 标	对照组 CON	乳杆菌组 L1	乳杆菌+乳球 菌组 LL1	乳杆菌+酶组 EL1	标准误差 SE
干物质(DM)	207.15 ^a	223.30 ^a	226.55 ^a	215.25 ^a	3.41
pH	4.98 ^a	4.77 ^a	4.69 ^a	3.60 ^b	0.25
可溶性碳水化合物(WSC)	63.6 ^b	21.40 ^d	31.70 ^c	76.10 ^a	10.16
中性洗涤纤维(NDF)	458.50 ^a	439.55 ^b	420.40 ^c	321.20 ^d	25.19
酸性洗涤纤维(ADF)	266.65 ^a	254.60 ^a	255.15 ^a	231.05 ^b	5.79
乳 酸	3.2 ^b	3.90 ^b	5.50 ^b	27.4 ^a	4.70
乙 酸	3.535 ^b	5.535 ^{ab}	7.515 ^{ab}	10.05 ^a	1.10
丙 酸	0.162 ^a	0.106 ^a	0.150 ^a	0.160 ^a	0.013
丁 酸	0.085 ^a	0.0445 ^a	0.097 ^a	0.116 ^a	0.016
粗蛋白(CP)	201.80 ^{ab}	185.25 ^c	197.25 ^{bc}	216.20 ^a	7.24
氨态氮(NH ₃ -N)	4.30 ^a	3.30 ^{ab}	2.40 ^{ab}	2.10 ^b	0.40
干物质损失(DM loss)	174.8 ^a	110.7 ^c	97.6 ^d	142.6 ^b	13.5

注:表中同行相同字母表示差异不显著($P>0.05$);不同字母表示差异显著($P<0.05$)或差异极显著($P<0.01$).

由上述可见,单独添加乳杆菌或添加乳杆菌和乳球菌的混合物对黑麦草青贮发酵品质略有改善,而纤维素酶和乳杆菌联合使用时,可显著地改善黑麦草青贮发酵品质,但对减少发酵产物中丁酸质量分数没有作用,具体原因尚需进一步探究.

参考文献:

- [1] Hristov A R, T A McAllister. Effect of inoculation whole-crop barley silage fermentation and dry matter disappearance in situ[J]. *J Anim Sci*, 2002, 80: 510—516.
- [2] Chen J, Stokes M R, Wallace. Effects of enzyme - inoculant system on preservation and nutritive value of hay crop and corn silage[J]. *J Dairy Sci*, 1994, 77: 501—512.
- [3] 韩继福,王建兵,高宏伟.应用微生物接种剂和酶制剂调制玉米秸的研究[J].安徽农业大学学报, 2002, 29(2): 173—177.
- [4] 孔凡德.黑麦草的研究与利用前景[J].四川草原, 2002, (2): 29—31.
- [5] Whiter A G, L Kung Jr. The effect of a dry or liquid application of *Lactobacillus plantarum* MTD1 on the fermentation of alfalfa silage[J]. *J Dairy Sci*, 2001, 84: 2195—2202.
- [6] Barker S B, Sommersom W H. The colorimetric determination of lactic acids in biological material [J]. *J Bio Chem*, 1941, 138: 535—554.
- [7] 郭金双,孔祥浩.发酵促进剂在青贮中饲料制作中的应用[J].中国饲料, 1997, (15): 13—15.
- [8] 杨雪霞,陈洪章,李佐虎.添加纤维素酶的青贮研究进展[J].生物技术通报, 2001, (1): 37—41.
- [9] 陈震林,李文彬.青贮技术研究进展[J].甘肃畜牧兽医, 1996, (增刊): 60—74.

(责任编辑:李春丽)