

网络出版时间:2017-03-07 11:17 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2017.04.027
网络出版地址:<http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20170307.1117.054.html>

柑橘皮渣青贮用优良乳酸菌的筛选及其青贮效果

潘小梅^a,彭 荣^a,殷钟意^b,刘雪松^a,郑旭煦^{a,b}

(重庆工商大学 a 环境与生物工程学院, b 催化与功能有机分子重庆市重点实验室,重庆 400067)

[摘要] 【目的】筛选出适合柑橘皮渣青贮的乳酸菌,以获得柑橘皮渣青贮制剂最佳菌株。【方法】采用平板划线法从自然发酵的柑橘皮渣和添加秸秆发酵的柑橘皮渣中初步分离乳酸菌,对其进行形态学和生理生化鉴定;再通过产酸性试验、耐酸耐碱性试验、生长曲线、产有机酸情况等进行优良菌的复筛及其种属鉴定。以直接青贮为对照,利用优良菌发酵青贮柑橘皮渣,分析测定皮渣品质。【结果】初选的12株乳酸菌中有7株为乳杆菌属(*Lactobacillus*)细菌,5株为片球菌属(*Pediococcus*)细菌。经过产酸性试验、耐酸耐碱性试验、产有机酸情况等筛选出1株优良菌株Q5,该菌株经16S rDNA鉴定为植物乳杆菌。该菌株产酸快(pH可下降到3.48),发酵2 h即可进入对数生长期,耐酸耐碱能力强,主要产乳酸和乙酸。利用该菌青贮的柑橘皮渣粗蛋白含量等有所提高,达到广谱青贮剂的水平,优于直接青贮。【结论】菌株Q5是适合青贮柑橘皮渣的优良菌,可作为柑橘皮渣青贮的菌种来源。

[关键词] 柑橘皮渣;青贮;乳酸菌;菌种筛选;有机酸

[中图分类号] S816.6;X712

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2017)04-0196-08

Screening of excellent lactic acid bacteria for silage with citrus peel residue and its silage effect

PAN Xiaomei^a, PENG Rong^a, YIN Zhongyi^b, LIU Xuesong^a, ZHENG Xuxu^{a,b}

(a Environmental and Biological Engineering Institute, b Chongqing Key Lab of Catalysis & Functional Organic Molecules, Chongqing Technology and Business University, Chongqing 400067, China)

Abstract: 【Objective】The aim of this paper was to screen the excellent *Lactobacillus* for silage with citrus peel residue.【Method】Lactic acid bacteria were isolated from natural ensilaged citrus residue and fermented citrus peel residue with straw by streak plate method. Based on morphological observation, physiological and biochemical tests of the strains isolated, strains were screened and compared through acid production, acid and alkali yield, and growth curve.【Result】7 of the 12 preliminarily screened strains were *Lactobacillus*, and the other 5 were *Pediococcus*. The excellent Q5 strain was *Lactobacillus plantarum*, which grew fast (could reach exponential stage within 2 h), produced acid quickly (pH could decrease to 3.48) and resisted acid and alkali strongly. The crude protein of citrus peel residue increased with Q5 strain. The composition of ensiled citrus peel had no significant difference and the quality was better than those with directly ensiled citrus peel.【Conclusion】The Q5 strain could be used as a source of bacterial species for ensiling citrus peel residue.

Key words: citrus peel residue; silage; lactic acid bacteria; bacterial species isolation; organic acid

[收稿日期] 2016-01-30

[基金项目] 国家级星火计划重点项目(2014GA81101);重庆市研究生创新型科研项目(CYS14173)

[作者简介] 潘小梅(1990—),女,四川平昌人,硕士,主要从事固体废物资源化利用研究。E-mail:panxiaomei0803@163.com

[通信作者] 郑旭煦(1964—),女,重庆南岸人,教授,博士,硕士生导师,主要从事生物质资源化利用研究。

E-mail:xuxuzheng@ctbu.edu.cn

柑橘加工行业的下脚料——柑橘皮渣含有丰富的营养物质、微量元素和大量的水分,处置不当的话,极易发生腐烂变质;若不加以综合利用,不仅会对环境造成极大污染,而且浪费了农业资源^[1]。另一方面,随着我国畜牧业的迅速发展,饲料原料严重不足,寻求“物美价廉”的饲料已成为研究的热点^[2]。国内外研究表明,柑橘皮渣除含有水分、纤维素、木质素外,还含有丰富的蛋白质、脂肪、碳水化合物、微量元素等营养物质,具有较高的综合利用价值^[3-5],尤其是柑橘皮渣可以解决反刍动物嗳气的问题,可作为饲料源。

目前,现有的关于柑橘皮渣制作饲料的研究主要集中在3个方面:一是用新鲜皮渣直接饲喂反刍动物,但存在适口性和短时间无法消耗大量皮渣的问题^[6];二是将柑橘皮渣直接干燥作为饲料,但存在干燥能耗高、成本高等问题;三是将柑橘皮渣发酵青贮为饲料,该法工艺简单,操作方便,且经微生物发酵青贮后,皮渣中的柠檬苦素等苦味物质含量会有所降低,适口性大大改善^[7],故将柑橘皮渣发酵青贮为饲料已成为短时间内大量处理柑橘皮渣最为有效的方法之一。一般而言,柑橘皮渣自身含有的乳酸菌较少,特别是榨汁后的皮渣,经水冲洗后,所含的乳酸菌更少,直接青贮效果不理想。因此,添加适合柑橘皮渣发酵的乳酸菌制剂尤为重要。乳酸菌可通过代谢发酵产生乳酸、乙酸等有机酸和细菌素,迅速降低pH,维持厌氧环境,抑制有害菌的生长,从而达到长期保存饲料营养品质的目的^[8-9]。

但不同于一般的稻草秸秆,柑橘皮渣由于含有柠檬酸等导致其pH值较低,故青贮柑橘皮渣的乳酸菌必须具有一定的耐酸性。另外,我国南方的夏橙多在4—5月份成熟,因甜度不高,多用来榨汁,产生的皮渣因环境温度适宜(15~30℃)而极易腐败,堆砌4 h后就开始发酵。而一般的乳酸菌需要4~6 h才进入对数生长期,尽管其用来青贮冬季柑橘皮渣有一定效果,但用来青贮夏橙皮渣的效果就不够理想,要想更好地保存青贮柑橘皮渣的品质,就需要找到生长速度快、产酸量高的优良乳酸菌,这既是生产柑橘皮渣湿性饲料的关键^[10],也是柑橘皮渣青贮饲料研究和应用的基础。本研究采用平板划线法,从柑橘发酵皮渣中初筛菌株,并对初筛菌株进行形态学和生理生化特征鉴定,复筛选出产酸性能好的菌株,分析该优良菌株的耐酸耐碱性、产酸能力,并对其进行分子鉴定,以期为开发新的柑橘皮渣发酵菌株提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

新鲜柑橘皮渣采自重庆市忠县某榨汁厂。参考菌株为嗜酸乳杆菌 *Lactobacillus acidophilus* (编号CICC 6005,简称S)和戊糖片球菌 *Pediococcus pentosaceus* (编号 CICC 22738,简称W),均购自中国工业微生物菌种保藏中心。广谱青贮菌剂由市场上购得(普通秸秆青贮剂)。

1.2 培养基与发酵液的配制

MRS液体培养基:蛋白胨10 g,牛肉浸粉10 g,酵母提取物5 g,柠檬酸二铵2 g,乙酸钠5 g, K_2HPO_4 2 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, $MnSO_4$ 0.25 g,葡萄糖20 g,吐温-80 1 mL,蒸馏水1 000 mL,自然pH为6.2~6.4,121℃灭菌20 min,用于乳酸菌菌悬液的培养^[11]。

MRS固体培养基:向MRS液体培养基中加入质量分数为1.8%的琼脂和2%的碳酸钙,摇匀后倒平板,用于乳酸菌的分离纯化^[12]。

乳酸菌青贮发酵液:葡萄糖10 g,蛋白胨3 g,牛肉浸粉1 g,盐溶液10 mL,蒸馏水1 000 mL。

1.3 主要仪器

AL104电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;DL-1万用电炉,北京中兴伟业仪器有限公司;YX280A手提式不锈钢压力蒸汽灭菌器,上海三中医疗器械有限公司;SHA-C水浴恒温振荡器,江苏金坛市中大仪器厂;V-1200可见分光光度计,上海美谱达仪器有限公司;pHS-3C+型酸度计,成都世纪方舟科技有限公司;Sorvall R RC-3C PLUS型台式冷冻高速离心机,美国KENDRO公司;1260型高效液相色谱仪,美国Agilent Technologies公司。

1.4 方法

1.4.1 菌株的自然驯化 将采集的新鲜柑橘皮渣分为2份,一份直接置于青贮池内自然发酵,另一份添加质量分数为40%的新鲜稻草混匀后再青贮。2种皮渣自然发酵青贮5个月后分别采样,采集后迅速置于无菌自封袋中,4℃条件下保存。

1.4.2 菌株的分离纯化 取上述2种皮渣各25 g于225 mL灭菌生理盐水中,振荡摇匀,分别取上清液按浓度梯度稀释至 10^{-9} ,各稀释度取液体0.1 mL均匀涂布于含有质量分数2% $CaCO_3$ 的MRS固体培养基中,将平板置于(36±1)℃恒温培养箱中培养48 h^[13]。选取溶钙圈明显且符合乳酸菌菌落形态特征的典型菌落,在MRS固体培养基上反

复划线纯化至单菌落^[14]。

1.4.3 乳酸菌的初步鉴定 (1)形态学鉴定。观察记录菌落形态,进行革兰氏染色镜检^[15]。

(2)生理生化鉴定。根据文献[16]的方法,对上述菌株进行运动性、明胶液化、吲哚、H₂S产生、硝酸盐还原试验,以及酸性环境(pH为4.5和9.6)生长试验、不同温度(10和45℃)生长试验、质量分数6.5%NaCl生长试验。最后采用糖微量发酵管法进行糖发酵试验^[17]。

1.4.4 优良乳酸菌的复筛 对初筛的乳酸菌进行如下复筛试验,以得到适合柑橘皮渣青贮的优良菌。

(1)产酸性试验。将筛选出的乳酸菌过夜培养,按5%(体积分数)的量接种菌悬液于MRS液体培养基中,于36℃下分别静置培养0,2,4,6,8,10,12,14,24和36 h,取出培养物,测定其pH值^[18]。

(2)耐酸耐碱性试验。将活化的乳酸菌按5%(体积分数)的量分别接入pH为2,4,6,8和10的MRS液体培养基中,每组设3个重复,37℃恒温培养15 h,测各组菌液在600 nm处的吸光度值(OD_{600 nm})。

(3)乳酸菌生长曲线。将筛选出的乳酸菌过夜培养,按5%(质量分数)的量接种菌悬液于MRS液体培养基中,于36℃下分别培养,每隔2 h取1次发酵液直至生长曲线趋于平稳,以MRS培养基为空白,用分光光度计测定发酵液和培养基在600 nm处的吸光度值(OD_{600 nm})^[8,17]。

(4)产有机酸试验。将培养24 h的菌悬液在8 000 r/min条件下离心15 min,取上清液,用高效液相色谱仪测定其中的乳酸、乙酸、柠檬酸、丙酸、丁酸含量。色谱条件:流动相为0.05 mol/L磷酸二氢钾与磷酸的混合液(pH2.6)和甲醇(混合液和甲醇的体积比为97:3),柱温20℃,流速0.8 mL/min,检测波长214 nm,进样量20 μL^[2]。

1.4.5 优良菌株的分子鉴定 为确定筛选得到的优良菌株的具体种属,将分离得到的优良菌株送至北京三博远志生物技术有限公司进行分子鉴定。其中用到的16S rDNA基因PCR扩增引物为细菌鉴定通用引物27F,正向引物序列为5'-AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG-3'^[19],反向引物序列为5'-CTACGGCTACCTTGTTACGA-3'^[20],然后进行PCR扩增,再对PCR产物进行测序。

1.4.6 优良菌株发酵青贮试验 将筛选得到的优良菌株Q5与广谱青贮剂,分别按5%(体积分数)的量接种于发酵液中,混匀后置于36℃下发酵36~

48 h,直至pH下降到4.0以下时结束。将取自榨汁厂的新鲜柑橘皮渣堆压在青贮池中,按体积分数0.5%的量逐层喷洒上述2种发酵液(A池添加Q5菌剂,B池添加广谱青贮剂),并逐层压实,最上层撒少量食盐。菌液喷洒上多下少,比例约为7:3。同时另一池皮渣不加任何青贮菌剂,直接青贮,作为对照(C池)。青贮60 d后,按GB/T 6435—2014测定柑橘皮渣青贮饲料的水分,按GB/T 6432—1994测定粗蛋白含量,按NY/T 2016—2011测定果胶含量;用pH计测定柑橘青贮皮渣饲料的pH,蒽酮比色法测定可溶性碳水化合物含量,凯氏定氮法测定并计算氮态氮占总氮比例(NH₃/TN),高效液相色谱法测定柑橘皮渣青贮饲料的有机酸组成。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌的分离

从含有CaCO₃的MRS平板上挑取溶钙圈大的菌落^[21],在MRS平板上纯化后保存。从自然发酵的柑橘皮渣中分离出4株菌株,分别命名为X1、X2、X3、X5;从添加秸秆发酵的柑橘皮渣中分离出8株菌株,第1次分离的3株菌分别命名为J1、J2、J3,第2次分离的5株菌分别命名为Q1、Q2、Q3、Q4、Q5。

2.2 乳酸菌的初步鉴定

2.2.1 形态学特征 由表1可知,筛选得到的12株菌株均为白色或者乳白色,边缘整齐,表面湿润,菌落形状均为圆形。其中J2、X1、X3菌落最小;Q2、Q4、J1、X2菌落较小,且形态较相似;Q1、X5菌落大小居中;Q3、Q5和J3菌落最大。12株菌株革兰氏染色均呈阳性,其形态学特征基本符合乳酸菌的要求。由镜检结果可知,12株菌株中X1、X3、J1呈现长链形态,Q5、J3、X2、X5呈现明显的单个、短杆状,其他均为杆状或球状。

2.2.2 生理生化特征 从表2可以看出,筛选得到的12株菌在pH 4.5、pH 9.6和6.5% NaCl(Q5除外)条件下均能生长,在10℃下均不生长,具有一定的耐酸性、耐碱性和耐盐性,但不耐低温;菌株Q1、Q2、Q3、Q4、Q5、J1、J2不同于其他几个菌株,在45℃下也能生长,与嗜酸乳杆菌在45℃条件下的生长情况基本一致,具有一定的耐高温性质;12株菌均无运动性;12株菌发酵过程中不能使明胶液化,说明不会分解青贮饲料中的蛋白质;12株菌发酵过程中不产生有毒有臭味的H₂S气体,不分解色氨酸,不会破坏青贮饲料的营养成分^[22];因此,本试验筛选的菌株有望成为青贮饲料的优良菌种。

属(*Lactobacillus*)细菌,其中菌株 Q4 发酵结果及生理生化鉴定结果均与嗜酸乳杆菌一致,因此被鉴定为嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*);菌株 X1、X2、X3、X5、J1 这 5 株菌株的糖醇发酵结果与戊糖片球菌较为相似,均不能利用乳糖、山梨醇、阿拉伯糖和木糖,因此被鉴定为片球菌属(*Pediococcus*)细菌;菌株 Q5 和 J3 较为相似,具有乳杆菌的特性,可以发酵利用大部分糖,不能发酵利用阿拉伯糖和鼠李糖,被鉴定为乳杆菌属(*Lactobacillus*)细菌^[23]。

表 3 柑橘皮渣中初步分离乳酸菌的糖醇发酵结果

Table 3 Sugar alcohol fermentation results of lactic acid bacteria

碳源 Carbohydrate	嗜酸乳杆菌 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	戊糖片球菌 <i>Pediococcus pentosaceus</i>	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	J1	J2	J3	X1	X2	X3	X5
D-葡萄糖 D-glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
麦芽糖 Maltose	+—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
菊糖 Inulin	+	+—	+	+	+	+	+	—	+	+	—	—	—	—
鼠李糖 Rhamnose	+	—	+	+	+	+	—	—	+	—	—	—	—	—
水杨苷 Salicin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
松三糖 Melezitose	—	—	—	—	—	—	+	—	—	+	—	—	—	—
蔗糖 Sucrose	+	—	+	+	+	+	+	—	+	+	—	+—	—	—
七叶苷 Esculoside	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
半乳糖 Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
果糖 Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
纤维二糖 Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
乳糖 Lactose	+	—	+	+	+	+	+	—	+	+	—	—	—	—
山梨醇 Sorbierite	—	—	—	—	—	—	+	—	—	+	—	—	—	—
阿拉伯糖 Arabinose	+	—	+	+	+	+	—	—	+	—	—	—	—	—
棉籽糖 Raffinose	—	—	+	+	+	—	+	—	+—	+	—	—	—	—
木糖 Xylose	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
蜜二糖 Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	—	—	—	—
苦杏仁甙 Amygdalin	—	+	+	+	+	+	—	+	+	+	—	+—	—	—
海藻糖 Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
甘露醇 Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	—	—	—	+—

注:“+”为阳性,“—”为阴性,“+—”为弱阳性。

Note: “+” indicates positive, “—” indicates negative, “+—” indicates weakly positive.

2.3 优良乳酸菌菌株的复筛

为进一步筛选适合柑橘皮渣青贮的优良菌株,对筛选得到的 12 株菌进行复筛,主要考察其产酸、耐酸耐碱性和生长情况等。

2.3.1 产酸性试验 乳酸菌产酸速率的快慢直接影响青贮饲料的品质,产生的乳酸越多,pH 下降越快,当 pH 下降到 4.2 以下后,青贮效果明显。表 4 为 12 个乳酸菌菌株的产酸试验结果。

表 4 复筛乳酸菌菌株的产酸试验结果

Table 4 Acid production results of isolated lactic acid bacteria(pH)

时间/h Culture time	S	W	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	X1	X2	X3	X5	J1	J2	J3
0	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
2	5.85	5.69	5.61	5.60	5.64	5.74	5.59	5.35	5.25	5.33	5.29	5.34	5.34	5.31
4	5.93	5.02	5.54	5.56	5.59	5.56	5.37	5.13	5.11	5.12	5.12	5.20	5.25	5.24
6	5.23	4.30	5.16	5.12	5.13	5.20	4.64	4.63	4.60	4.56	4.69	4.66	4.67	4.62
8	4.89	4.03	4.93	4.97	4.96	5.01	4.22	4.06	4.06	4.01	4.12	4.14	4.12	3.99
10	4.61	3.87	4.80	4.72	4.84	4.82	4.00	4.03	4.05	4.03	4.07	4.13	4.18	3.96
12	4.58	3.83	4.72	4.74	4.76	4.77	3.87	3.88	3.87	3.86	3.90	3.93	3.95	3.78
24	4.48	3.88	4.50	4.52	4.53	4.56	3.65	3.58	3.61	3.62	3.67	3.69	3.66	3.59
36	4.38	3.89	4.42	4.00	4.46	4.46	3.48	3.67	3.71	3.71	3.70	3.69	3.73	3.52

注:S. 嗜酸乳杆菌;W. 戊糖片球菌。

Note: S. *Lactobacillus acidophilus*; W. *Pediococcus pentosaceus*.

从表 4 可以看出,Q1、Q2、Q3、Q4 产酸能力不

强,24 h 后 pH 值未能下降到 4.2 以下;其余菌株在

培养8 h后,pH值均下降到4.2左右,12 h后pH值均下降到4以下,达到了预期要求。其中,以菌株J3产酸最快,培养8 h后pH值下降到4以下,36 h后pH值达到3.52,为青贮用的理想菌株;菌株Q5产酸量大,最终pH稳定在3.48,也可作为青贮用的理想菌株;菌株X1在培养24 h后pH值达到3.58,与J3相当;X2、X3和X5的产酸变化趋势大致相同,但以X3生长较好;J1和J2产酸情况相似,但培养24 h时J2 pH值较小。最终,综合产酸速率和产酸强度,选择Q5、X1、X3、J2和J3进行后续研究。

2.3.2 耐酸耐碱性试验 由于在实际发酵中,环境条件可能偏酸或偏碱,因此通过耐酸耐碱性试验进一步筛选优良乳酸菌,不同pH值下各菌液的OD_{600 nm}值如图1所示。

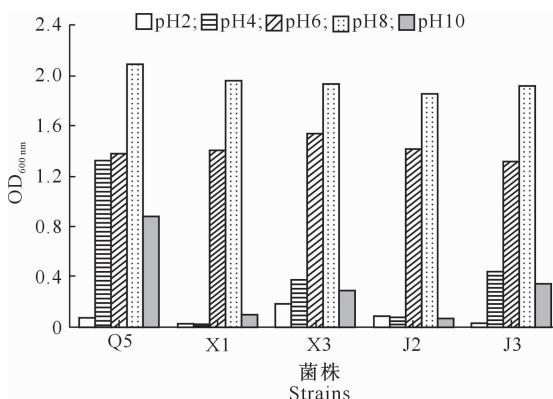


图1 复筛乳酸菌在不同pH条件下的生长情况

Fig. 1 Growth of strains with different pH values

从图1可知,5种菌株在pH为6~8的条件下均生长较好;X1和J2菌株在过酸或者过碱的条件下均不能生长;X3和J3类似,在过酸或者过碱条件下生长比较缓慢,具有一定的耐酸碱性,且菌株J3的耐酸碱能力大于菌株X3;Q5菌株表现出比较特别的性状,pH为10时仍然能生长,可能是由于该菌产生的乳酸等有机酸中和了培养环境中的碱,使其具有一定的耐碱性所致;pH为4时,Q5仍然能健康生长,说明Q5具有一定的耐酸性。由于柑橘皮渣含有柠檬酸等有机酸而呈现一定的酸性,故Q5、J3更适合用于发酵柑橘皮渣。

2.3.3 复筛优良乳酸菌的生长曲线 从图2可以看出,菌株Q5、J3的生长趋势大体一致。Q5菌株培养2 h后即进入对数生长期,12 h时OD_{600 nm}值达到最大1.892,最终稳定在0.9左右。J3菌株培养4 h后进入对数生长期,14 h时OD_{600 nm}值达到最大1.710,最终稳定在0.6左右。相比而言,Q5菌株生长更快,能够满足夏柑橘皮渣的青贮要求,更适合用

于柑橘皮渣的青贮处理。

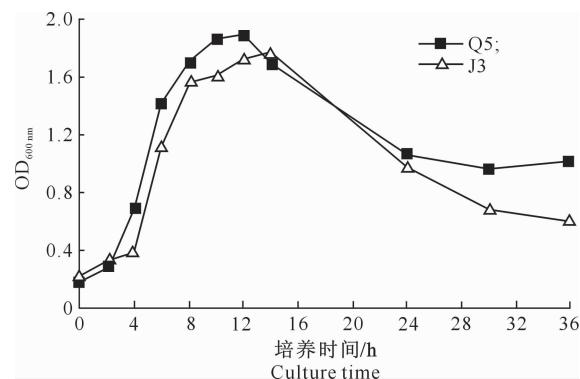


图2 复筛优良乳酸菌Q5和J3的生长曲线

Fig. 2 Growth curve of Q5 and J3 strains

2.3.4 Q5菌株产有机酸的能力 经高效液相色谱分析,Q5菌株主要产乳酸(18.14 g/L)和乙酸(3.96 g/L),且乳酸含量较高,不产丙酸、丁酸。乳酸是柑橘皮渣青贮发酵的有益酸,是乳酸菌的主要代谢产物;乙酸是青贮饲料中除乳酸外含量最多的有机酸,具有很强的抗真菌能力,能够提高青贮饲料的有氧稳定性;丙酸由丙酸菌发酵乳酸产生,发酵的同时会产生二氧化碳和乙酸;丁酸是酪酸菌、梭菌等不良微生物将青贮饲料中已生成的乳酸或原料中的糖分解生成的,同时伴随着蛋白质的分解和能量的损失,还会增加饲料的恶臭味,影响饲料的品质^[24]。菌株Q5产乳酸量大,且不产丙酸、丁酸等腐败酸,说明其是适合柑橘皮渣青贮的优良菌。

2.4 优良菌株Q5的分子学鉴定

将菌株Q5扩增后进行细菌16S rDNA全序列的鉴定,发现Q5与植物乳杆菌的同源性为100%,检测号(Accession No.)为KM577184,经鉴定菌株Q5为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)。

2.5 柑橘皮渣青贮饲料的品质

青贮60 d后,A池与B池中的柑橘皮渣均呈现金黄色,略带酒香味,橘皮、橘瓣保存原状,有韧性;C池皮渣呈现出暗黄色,池表面的皮渣略有腐烂,橘皮可见、橘瓣稍烂,有韧性^[25]。3池皮渣饲料的营养组成如表5所示。由表5可以看出,柑橘皮渣青贮处理后,由于果胶被果胶酶分解产生部分水分,使得果胶含量降低,同时水分含量增加;乳酸菌代谢产生了大量的有机酸,使得皮渣的pH降低;另外,乳酸菌在抑制其他腐败细菌增长的同时,利用柑橘皮渣原料合成了自身的菌体蛋白^[26],使得粗蛋白含量增加;可溶性碳水化合物部分随着青贮液体流失,部分被微生物利用,故其含量降低;部分有机含氮化合物

被分解利用,使得 NH_3/TN 值增加。

表 5 不同青贮方式下柑橘发酵皮渣的营养组成

Table 5 Composition of ensiled citrus peel residues

处理 Treatment	水分/ (g · hg ⁻¹) Moisture	pH	果胶/ (g · hg ⁻¹) Pectin	粗蛋白/ (g · hg ⁻¹) Crude protein	可溶性碳水 化合物/ (g · hg ⁻¹) Soluble carbohydrates	(NH_3/TN)/ (g · hg ⁻¹) (NH_3/TN)	乳酸/ (mg · g ⁻¹) Lactic acid	乙酸/ (mg · g ⁻¹) Acetic acid
鲜皮渣 Fresh citrus peel	80.04	4.19	15.28	5.99	38.34	3.28	2.07	1.70
A 池(Q5 菌剂) Ensiled citrus peel with Q5	83.42	3.19	9.82	7.40	10.52	3.31	7.75	2.58
B 池(广谱青贮剂) Ensiled citrus peel with common lactobacillus	82.65	3.25	11.64	6.94	7.80	4.59	8.89	2.85
C 池(直接青贮) Directly ensiled citrus peel	82.46	3.31	11.28	7.09	6.71	5.05	5.94	2.33

对比 3 种青贮方式可以发现,C 池中可溶性碳水化合物含量低,即可溶性成分损失多;有机酸含量低,pH 相对较高,同时 NH_3/TN 高达 5.05 g/hg,有机氮被大量分解,说明直接青贮效果不佳。A 池和 B 池的皮渣营养指标相差不大,说明 Q5 单菌株和广谱复合青贮剂的青贮能力相当。A 池中果胶含量低,说明 Q5 菌株具有一定的降解果胶的能力。

3 讨 论

尽管乳酸菌制剂在禾本科牧草、向日葵、苜蓿等植物的青贮中取得了可观的成就,但在柑橘皮渣中的应用较少。柑橘皮渣中含有的乳酸菌较少,直接青贮效果不理想。有试验表明,柑橘皮渣直接青贮 60 d 后,可溶性碳水化合物含量降到 7% 以下,因此要想长久维持营养品质,最有效的方法就是添加优质乳酸菌青贮剂,使乳酸菌成为柑橘皮渣青贮环境的优势菌,迅速降低皮渣饲料的 pH 值,抑制有害菌的生长^[27],从而达到长期保存饲料营养物质的目的。

但普通的乳酸菌生长较慢,需要 4~6 h 才能进入对数生长期,而夏柑橘皮渣堆砌 4 h 后就开始发酵,因此一般的乳酸菌青贮夏柑橘皮渣的效果不理想。本研究筛选得到的 Q5 菌株生长 2 h 即进入对数生长期,能满足夏柑橘皮渣青贮的要求。利用 Q5 单菌株青贮后的柑橘皮渣与用广谱复合青贮剂(普通秸秆青贮)青贮的效果相当,有机酸产量均较大,粗蛋白含量均有所提高,同时可溶性碳水化合物含量下降慢。另外,Q5 菌株还具有一定的降解果胶的能力。果胶是植物细胞壁的主要组成物质^[28],可阻止细胞中内容物的释放,对动物没有毒害作用,但在日粮中含量过高,将影响动物的采食量、减缓胃液 pH 值的下降和小肠 pH 值的上升速度,不利于食物

排空^[29-30],因此果胶组分得以适度降解的柑橘皮渣更有利于反刍动物的食用。

本研究从自然发酵和添加秸秆后发酵的柑橘皮渣中,初步分离筛选出 12 株乳酸菌;通过生理生化测试和糖醇发酵试验以及产酸试验、生长曲线测试等,筛选出产酸能力强、生长速率快的 5 株菌,分别为 Q5、X1、X3、J2 和 J3;通过耐酸耐碱性试验复筛发现,菌株 Q5 耐酸能力最强,适于在柑橘皮渣环境中生存。菌株 Q5 为植物乳杆菌,生长速度快(2 h 进入对数生长期),耐酸能力强(pH 为 4 时仍然能生长),产乳酸量大(pH 可下降到 3.48),不产丙酸、丁酸等腐败酸;Q5 菌剂青贮后的皮渣 pH 较低,粗蛋白、可溶性碳水化合物含量高,且降解果胶效果好,可见 Q5 菌剂青贮处理柑橘皮渣效果较好,值得进行推广应用,但如何复配为混合发酵菌剂还需要进一步研究。

[参考文献]

- [1] 闻学政. 混合菌种固态曲发酵柑橘皮渣及其青贮实验研究 [D]. 重庆:重庆工商大学,2011.
- [2] Wen X Z. Solid fermentation of orange peel residue with mixed strains and its ensiling study [D]. Chongqing:Chongqing Technology and Business University,2011.
- [3] 雷 星,彭 荣,郑旭煦,等. 柑橘皮渣发酵-青贮饲料中有机酸的 RP-HPLC 测定 [J]. 现代食品科技,2013,29(10): 2542-2546.
- [4] Lei X,Peng R,Zheng X X,et al. Determination of organic acids in fermentation-silage of citrus peel wastes by RP-HPLC [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29 (10): 2542-2546.
- [5] Diomi M,Paul C K. Biotransformation of citrus by-products into value added products [J]. Waste Biomass Valor, 2014(5): 529-549.
- [6] 付复华,李忠海,单 杨,等. 柑橘皮渣综合利用技术研究进展 [J]. 食品与机械,2009,25(5):178-184.

- Fu F H, Li Z H, Shan Y, et al. Research progress on the comprehensive utilization of citrus peel residues [J]. Food & Machinery, 2009, 25(5): 178-184.
- [5] 邵建明, 藏玉红. 柑橘皮渣有效成分的研究进展 [J]. 承德石油高等专科学校学报, 2011, 13(2): 28-34.
- Shao J M, Zang Y H. Research progress on effective ingredients of orange peel [J]. Chengde Petroleum College School Journal, 2011, 13(2): 28-34.
- [6] 杨飞云, 黄金秀, 姚焰础. 柑橘皮渣作畜禽饲料的研究进展 [M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2012: 306-314.
- Yang F Y, Huang J X, Yao Y C. Research progress of citrus peel fed for livestock and poultry [M]. Beijing: Agricultural Science and Technology Press, 2012: 306-314.
- [7] Hasegawa S, Bennett R D. Limonoid glucosides in citrus [J]. Phytochemistry, 1989, 28(6): 1717-1720.
- [8] 何轶群, 雷赵民, 吴润, 等. 青贮饲料中优良乳酸菌的分离鉴定及其生物学特性研究 [J]. 生物技术通报, 2013(5): 177-183.
- He Y Q, Lei Z M, Wu R, et al. Isolation and identification of excellent lactic acid bacteria from silage and its biological characteristics [J]. Biotechnology Bulletin, 2013(5): 177-183.
- [9] 孙磊. 乳酸菌青贮剂的研究 [D]. 济南: 山东大学, 2005.
- Sun L. Study on the lactic acid bacteria silage [D]. Jinan: Shandong University, 2005.
- [10] 侯霞霞, 来航线, 韦小敏. 青贮用乳酸菌的筛选及其生物学特性研究 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2015, 43(1): 183-192.
- Hou X X, Lai H X, Wei X M. Screening of lactic acid bacteria and its biological characteristic [J]. Journal of Northwest A&F University (Nat Sci Ed), 2015, 43(1): 183-192.
- [11] Diaz O, Fernández M. Effect of the addition of pronase on the proteolysis in dry fermented sausages [J]. Meat Science, 1993, 34(2): 205-216.
- [12] 张帆, 王建华, 刘立恒, 等. 嗜酸乳杆菌的培养条件及其生物学特性 [J]. 食品与发酵工业, 2005(3): 43-46.
- Zhang F, Wang J H, Liu L H, et al. Thermophilic lactobacillus acidophilus culture conditions and biological properties [J]. Food and Fermentation Industries, 2005(3): 43-46.
- [13] Min-Ju Kim, Keun-Sung Kim. Isolation and identification of γ -aminobutyric acid (GABA)-producing lactic acid bacteria from Kimchi [J]. J Korean Soc Appl Biol Chem, 2012(55): 777-785.
- [14] 罗欣, 王海燕, 张春江, 等. 发酵香肠中的菌种分离及鉴定 [J]. 食品与发酵工业, 2003(3): 5-9.
- Luo X, Wang H Y, Zhang C J, et al. Isolation and identification of strains in fermented sausages [J]. Food and Fermentation Industry, 2003(3): 5-9.
- [15] Yi H X, Zhang L W, Han X. Isolation and applied potential of lactic acid bacteria from Chinese traditional fermented food in specific ecological localities [J]. Food Sci Biotechnol, 2011, 20(6): 1685-1690.
- [16] 凌代文. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
- Ling D W. The classification and identification of lactic acid bacteria and experiment method [M]. Beijing: Chinese Light Industry Press, 1999.
- [17] 杨晓丹, 原现军, 郭刚, 等. 西藏豆科牧草青贮饲料中耐低温优良乳酸菌的筛选 [J]. 草业学报, 2015, 24(6): 99-107.
- Yang X D, Yuan X J, Guo G, et al. Isolation and identification of low temperature-tolerant lactic acid bacteria from legume silages in Tibet [J]. Acta Prataculturae Sinica, 2015, 24(6): 99-107.
- [18] 杨晓晖, 籍保平, 李博, 等. 泡菜中优良乳酸菌的分离鉴定及其发酵性能的研究 [J]. 食品科学, 2005, 26(5): 130-134.
- Yang X H, Ji B P, Li B, et al. Isolation and identification of lactic acid bacteria and its fermentation properties [J]. Food Science, 2005, 26(5): 130-134.
- [19] Mora B, Fortina M G, Nicastro G, et al. Genotypic characterization of thermophilic bacilli: a study on new soil isolates and several reference strains [J]. Research Microbiology, 1998, 149(10): 711-722.
- [20] Jensen M A, Webster J A, Strauss N. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms [J]. Applied Polymerase Environmental Microbiology, 1993, 59(4): 945-952.
- [21] 陈晓平, 刘华英, 魏小川, 等. 自然发酵酸菜汁中乳酸菌的分离筛选与鉴定研究 [J]. 食品科学, 2006, 27(2): 91-94.
- Chen X P, Liu H P, Wei X C, et al. Natural fermentation sauerkraut in isolation and identification of lactic acid bacteria from Chinese natural fermentation sauerkraut juice [J]. Food Science, 2006, 27(2): 91-94.
- [22] 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, 2009.
- Han J Y. Diversity of lactic acid bacteria in fermentation silage [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2009.
- [23] 栗永乐, 李秀丽, 李传娟, 等. 内蒙古东部地区农家酸菜中乳酸菌的分离与初步鉴定 [J]. 食品工业, 2012, 11(33): 132-134.
- Li Y L, Li X L, Li C J, et al. The separation and identification of lactic acid bacteria from the farm sauerkraut in eastern area of Inner Mongolia [J]. Food Industry, 2012, 11(33): 132-134.
- [24] 王保平, 董晓燕, 董宽虎, 等. 有机酸对全株玉米青贮有氧稳定性的影响 [J]. 草地学报, 2013, 21(5): 991-997.
- Wang B P, Dong X Y, Dong K H, et al. Effects of organic acids on the aerobic stability of whole plant corn silage [J]. Journal of Grassland, 2013, 21(5): 991-997.
- [25] 张石蕊, 周红丽. 鲜柑橘皮渣青贮方式及青贮皮渣饲料的质量评定 [J]. 动物科学与动物医学, 2003, 20(11): 35-36.
- Zhang S R, Zhou H L. Ways of fresh citrus peel residue and the quality evaluation of the citrus peel silage [J]. Journal of Animal Science and Animal Medicine, 2003, 20(11): 35-36.
- [26] 余伯良. 微生物饲料生产技术 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1993.
- Yu B L. Microbial fodder production technology [M]. Beijing: China Light Industry Press, 1993.

(下转第 212 页)

- [14] 李家科, 刘健, 秦耀民, 等. 基于 SWAT 模型的渭河流域非点源氮污染分布式模拟 [J]. 西安理工大学学报, 2008, 24(3): 278-285.
- Li J K, Liu J, Qin Y M, et al. Distributed simulation on nitrogen non-point source pollution in the Wei River Basin based on SWAT model [J]. Journal of Xi'an University of Technology, 2008, 24(3): 278-285.
- [15] 左德鹏, 徐宗学. 基于 SWAT 模型和 SUFI-2 算法的渭河流域月径流分布式模拟 [J]. 北京师范大学学报(自然科学版), 2012, 48(5): 490-496.
- Zuo D P, Xu Z X. Distribution hydrological simulation using SWAT and SUFI-2 in the Wei River basin [J]. Journal of Beijing Normal University (Natural Science), 2012, 48(5): 490-496.
- [16] 赵安周, 刘宪锋, 朱秀芳, 等. 基于 SWAT 模型的渭河流域干旱时空分布 [J]. 地理科学进展, 2015, 34(9): 1156-1166.
- Zhao A Z, Liu X F, Zhu X F, et al. Spatiotemporal patterns of droughts based on SWAT model for the Wei River Basin [J]. Progress in Geography, 2015, 34(9): 1156-1166.
- [17] 郭爱军, 畅建霞, 黄强, 等. 渭河流域气候变化与人类活动对径流影响的定量分析 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2014, 42(8): 212-219.
- Guo A J, Chang J X, Huang Q, et al. Quantitative analysis of the impacts of climate change and human activities on runoff change in Weihe Basin [J]. Journal of Northwest A&F University(Natural Sciences Edition), 2014, 42(8): 212-219.
- [18] 于延胜, 陈兴伟. 基于 Mann-Kendall 法的水文序列趋势成分比重研究 [J]. 自然资源学报, 2011, 26(9): 1585-1591.
- Yu Y S, Chen X W. Study on the percentage of trend component in a hydrological time series based on Mann-Kendall Method [J]. Journal of Natural Resources, 2011, 26(9): 1585-1591.
- [19] Nash J E, Sutcliffe J V. River flow forecasting through conceptual models, part I-a discussion of principles [J]. Journal of Hydrology, 1970, 10(3): 282-290.
- [20] Gupta H, Sorooshian S, Yapo P. Status of automatic calibration for hydrologic models: comparison with multilevel expert calibration [J]. Journal of Hydrological Engineering, 1999, 4: 135-143.
- [21] Tan M L, Ibrahim A L, Yusop Z, et al. Impacts of land-use and climate variability on hydrological components in the Johor River basin, Malaysia [J]. Hydrological Sciences Journal, 2015, 60(5): 873-889.
- [22] 欧阳威, 蔡冠清, 黄浩波, 等. 基于原位土壤观测的 SWAT 关键参数及模拟优化分析 [J]. 农业环境科学学报, 2014, 21(2): 87-93.
- Ouyang W, Cai G Q, Huang H B, et al. Optimization of key parameters for SWAT model based on field soil observation [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2014, 21(2): 87-93.
- [23] 喻丹, 董晓华, 李磊, 等. 清江流域 SWAT 模型多出口率定与单出口率定的比较 [J]. 水电能源科学, 2014, 32(5): 14-18.
- Yu D, Dong X H, Li L, et al. Comparison of multi-gage and single-gage calibration of SWAT model for runoff simulation in Qingjiang River Basin [J]. Water Resource and Power, 2014, 32(5): 14-18.

(上接第 203 页)

- [27] Schillinger U, Holzapfel W H. Guidelines for manuscripts on bacteriocins of lactic acid bacteria [J]. Journal Food Microbiology, 1996, 33(2/3): 3-5.
- Bampidis V A, Robinson P H. Citrus by-products as ruminant feeds: a review [J]. Animal Feed Science and Technology, 2006, 128: 175-217.
- [29] 戴余军, 石会军. 柑橘果胶提取工艺的优化 [J]. 中国食品添加剂, 2011(6): 85-89.
- Dai Y J, Shi H J. The optimization of process of extraction of citrus pectin [J]. China Food Additives, 2011(6): 85-89.
- [30] 姚焰础, 刘作华, 杨飞云, 等. 柑橘皮渣的营养组成及其在畜禽饲料中的应用研究进展 [J]. 养猪, 2013(1): 17-21.
- Yao Y C, Liu Z H, Yang F Y, et al. Nutrition composition of citrus peel and its application in poultry breeding [J]. Swine, 2013(1): 17-21.