



一种植物乳杆菌及其应用、筛选检定方法

2021年04月25日 16:06

专利名称: 一种植物乳杆菌及其应用、筛选检定方法

专利号: ZL 201810093227.3

授权日期: 2019年1月29日

专利类别: 国家发明专利

专利权人: 四川农业大学

发明人: 张新全, 关皓, 闫艳红, 帅杨, 李小铃, 李小梅, 黄琳凯, 聂刚, 汪霞, 黄婷.

技术领域: 本发明涉及微生物技术领域, 具体涉及一种植物乳杆菌及其应用、筛选检定方法。

背景技术: 青贮是通过乳酸菌的增殖, 将原料中的发酵底物转化成乳酸等酸性物质, 维持酸性厌氧环境, 以利于青贮作物长期保存的一种贮藏方式。青贮饲料颜色黄绿、气味酸香、柔软多汁、适口性好, 在畜牧业生产中广泛应用, 尤其在反刍动物饲养中, 已成为重要的优质粗饲料来源。乳酸菌是近年来正在推广的青贮微生物添加剂, 其主要作用是调节青贮物料内微生物组成, 迅速成为优势菌群, 竞争抑制有害微生物生长转化有限的糖分, 降低青贮pH值, 从而提高青贮饲料的质量, 不同的青贮物料其发酵特性存在不同, 而目前适用于青贮的乳酸菌品种单一, 不能满足市场需求。

发明内容: 有鉴于此, 本发明提供了一种植物乳杆菌, 所述植物乳杆菌生长速率快, 产酸效率高; 植物乳杆菌作为牧草青贮添加剂, 发酵类型为同型发酵, 能快速降低牧草青贮pH值, 使乳酸菌成为优势菌群, 加快发酵成熟, 减少氨态氮的产生以及增加了有机酸含量, 提高了青贮饲料的发酵品质, 从而提高牧草青贮饲料干物质含量, 干物质回收率、粗蛋白含量、水溶性碳水化合物含量, 提升牧草青贮饲料的质量, 具有广泛的应用前景。

为解决以上技术问题, 本发明提供的技术方案是一种植物乳杆菌, 所述植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号, 中国科学院微生物研究所, 保藏编号为CGMCC No.15073, 保藏日期为2017年1月18日; 本发明还提供了上述戊糖片球菌的筛选检定方法, 包括以下步骤:

- 1) 取牧草样品, 稀释后吸取涂布至MRS固体培养基培养, 挑出单菌落继续培养后, 连续传代培养不少于2次, 得到纯化的菌落;
- 2) 将步骤1) 得到的所述纯化的菌落在乳酸菌固体培养基上恒温厌氧条件下培养后, 通过革兰氏染色和过氧化氢酶接触反应, 进行乳酸菌的鉴定, 将鉴定后的乳酸菌加入含灭菌甘油的液体营养培养基中, 并储存, 得到分离纯化的乳酸菌;
- 3) 将步骤2) 得到的所述分离纯化的乳酸菌进行菌种活化后, 接种到MRS液体培养基中培养, 得到菌液; 测定所述菌液pH与OD值, 根据测定结果进行筛选pH=3.64, OD值=1.732的菌液, 得到初步筛选后的菌株;
- 4) 将步骤3) 得到的所述初步筛选后的菌株进行厌氧培养后, 进行单株菌的DNA提取, 以提取的DNA为模板进行PCR扩增得到扩增产物, 所述扩增产物即为所述戊糖片球菌。

优选的, 所述步骤具体包括:

- 1) 取牧草样品, 加入无菌蒸馏水, 稀释成 10^{-1} , 10^{-3} 和 10^{-5} 三个稀释度的样品稀释液; 吸取样品稀释液涂布至MRS固体培养基培养, 连续传代培养2次, 得到纯化的菌落;
- 2) 将步骤1) 得到的所述纯化的菌落在乳酸菌固体培养基上37°C恒温厌氧条件下培养24 h后, 通过革兰氏染色和过氧化氢酶接触反应, 进行乳酸菌的鉴定, 将鉴定后的乳酸菌加入含灭菌甘油的液体营养培养基中, 并以-80°C储存, 得到分离纯化的乳酸菌;
- 3) 将步骤2) 得到的所述分离纯化的乳酸菌进行菌种活化后, 以3%的接种量接种到10 ml MRS液体培养基中, 以温度40~45°C, 湿度85%~98%培养12 h, 得到菌液; 测定所述菌液pH与OD值, 根据测定结果进行筛选pH=3.64, OD值=1.732的菌液, 得到初步筛选后的菌株;
- 4) 将步骤3) 得到的所述初步筛选后的菌株进行在温度37°C条件下厌氧培养48h后, 进行单株菌的DNA提取, 以提取的DNA为模板进行PCR扩增得到扩增产物, 所述扩增产物即为所述戊糖片球菌。

优选的, 所述以提取的DNA为模板进行PCR扩增得到扩增产物过程具体为: 以上游引物: 5', -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 下游引物: 5', -GGTTACCTGTACGACTT-3', 为特异性引物对提取的DNA为模板进行PCR扩增得到扩增产物, 所述PCR扩增反应条件为: 95°C预变性5min后, 95°C变性30 s, 55°C退火30s, 72°C延伸90s, 循环30次, 再72°C延长5 min。

优选的, 所述筛选检定方法还包括: 将步骤4) 得到的所述戊糖片球菌通过生理生化测定、耐盐试验、不同温度试验、耐酸试验和糖发酵试验评价试验进行分析。

优选的, 所述筛选检定方法还包括: 将步骤4) 得到的所述戊糖片球菌进行16S rDNA序列分析。

优选的, 所述狼尾草属牧草样品为桂牧1号杂交狼尾草鲜草、桂闽引象草鲜草、桂牧1号杂交狼尾草青贮样或桂闽引象草青贮样。

本发明的作用机理: 本发明提供的植物乳杆菌应用于牧草青贮时, 能快速转化有限的糖分, 显著地降低青贮pH值, 有效提高青贮饲料的质量, 具有较大潜力和广阔的发展前景。进一步的, 在牧草中, 狼尾草属牧草的可溶性碳水化合物含量相对较低, 水分含量较高, 缓冲度较大, 其茎秆中空存有大量空气, 所以狼尾草青贮的发酵慢, 导致青贮失败。牛鞭草属牧草自身附着的乳酸菌数量较少, 我国目前对牛鞭草属牧草研究报道较少。本发明提供的植物乳杆菌作为牧草青贮添加剂, 发酵类型为同型发酵, 能快速降低牧草青贮pH值, 使乳酸菌成为优势菌群, 加快发酵成熟, 减少氨态氮含量的产生以及增加有机酸含量, 提高青贮饲料的发酵品质, 从而提高牧草青贮饲料干物质含量, 干物质回收率、粗蛋白含量、中性洗涤纤维含量, 降低牧草青贮饲料酸性洗涤纤维含量, 提升牧草青贮饲料的质量, 具有广泛的应用前景。



联系人: 张新全 467199011@qq.com 李丹丹 446906865@qq.com

地址: 四川成都市温江区惠民路211号 四川农业大学成都校区草业科技学院 邮编: 611130