

DOI: 10.11829/j.issn.1001-0629.2020-0664

李玉玉, 牟怡晓, 张硕, 马聪慧, 雷晓青, 朱鸿福, 张欢, 张桂杰. 青贮专用复合酶制剂调控苜蓿发酵品质及营养成分. 草业科学, 2021, 38(7): 1402-1410.

LI Y Y, MU Y X, ZHANG S, MA C H, LEI X Q, ZHU H F, ZHANG H, ZHANG G J. Silage-specific compound enzyme regulate alfalfa silage quality and nutrient components. Pratacultural Science, 2021, 38(7): 1402-1410.



青贮专用复合酶制剂调控苜蓿发酵品质及营养成分

李玉玉^{1,2}, 牟怡晓^{1,2}, 张 硕^{1,2}, 马聪慧^{1,2}, 雷晓青³,
朱鸿福^{1,2}, 张 欢^{1,2}, 张桂杰^{1,2}

(1. 宁夏大学农学院动物科学系, 宁夏 银川 750021; 2. 宁夏草牧业工程技术研究中心, 宁夏 银川 750021;
3. 天津云力之星生物科技有限公司, 天津 300354)

摘要: 为探究青贮专用复合纤维素酶对紫花苜蓿 (*Medicago sativa*) 青贮品质及营养成分的影响, 按单因素完全随机设计 4 个处理组, 每个处理 6 个重复。试验所用青贮专用复合酶制剂中纤维素酶活力 $\geq 60\ 000\ \text{U}\cdot\text{g}^{-1}$, 木聚糖酶活力 $\geq 2\ 500\ \text{U}\cdot\text{g}^{-1}$, 淀粉酶活力 $\geq 300\ 000\ \text{U}\cdot\text{g}^{-1}$, β -葡聚糖酶活力 $\geq 300\ 000\ \text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ 。4 个处理组的青贮专用复合纤维素酶添加量分别为 0 (T₁ 组)、2.5‰ (T₂ 组)、5.0‰ (T₃ 组) 和 7.5‰ (T₄ 组)。结果表明: 青贮 60 d 后, 青贮专用复合纤维素酶显著提高 T₄ 组粗蛋白含量 ($P < 0.05$); T₃ 组和 T₄ 组的酸性洗涤纤维极显著低于 T₁ 组 ($P < 0.01$), 其相对饲喂价值极显著高于 T₁ 组 ($P < 0.01$); 青贮专用复合纤维素酶显著降低了苜蓿的青贮 pH ($P < 0.01$); T₂ 组和 T₃ 组乳酸含量及乳酸/乙酸值显著高于 T₁ 组 ($P < 0.05$); T₂ 组和 T₃ 组有氧暴露稳定时间显著低于 T₁ 组和 T₄ 组 ($P < 0.05$)。综上, 在本研究条件下, 添加青贮专用复合纤维素酶可改善苜蓿青贮饲料发酵品质, 提高苜蓿青贮饲料的营养价值, 适宜添加量为 5.0‰。

关键词: 苜蓿青贮; 营养成分; 发酵品质; 微生物; 有氧稳定性; 复合纤维素酶; V-score

文献标志码: A 文章编号: 1001-0629(2021)07-1402-09

Silage-specific compound enzyme regulate alfalfa silage quality and nutrient components

LI Yuyu^{1,2}, MU Yixiao^{1,2}, ZHANG Shuo^{1,2}, MA Conghui^{1,2}, LEI Xiaoping³,
ZHU Hongfu^{1,2}, ZHANG Huan^{1,2}, ZHANG Guijie^{1,2}

(1. Department of Animal Science, Ningxia University, Yinchuan 750021, Ningxia, China;

2. Ningxia Grassland and Animal Husbandry Engineering Technology Research Center, Yinchuan 750021, Ningxia, China;

3. Winning of Tianjin Biotechnology Industry Company, Tianjin 300354, China)

Abstract: This study aimed at evaluating the effects of silage-specific mixed cellulase on alfalfa silage quality and nutrient components. We designed four treatments with six replicates per treatment according to completely random single factors. The cellulase, xylanase, amylase, and β -glucanase activities were $\geq 60\ 000$, $\geq 2\ 500$, $\geq 300\ 000$, and $\geq 300\ 000\ \text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ of the silage cellulase used in the experiment. These factors were added to alfalfa silage in four different treatment concentrations: 0 (T₁), 2.5‰ (T₂), 5.0‰ (T₃), and 7.5‰ (T₄). The results showed that after 60 days, the supplementation of the silage-specific compound enzyme improved the content of crude protein content in group T₄ ($P < 0.05$). The contents of acidic detergent fiber in groups T₃ and T₄ were significantly lower than those in group T₁ ($P < 0.01$), whereas the relative

收稿日期: 2020-12-09 接受日期: 2021-04-06

基金项目: 国家自然科学基金 (31660694); 宁夏高等学校一流学科建设 (草学学科) 资助 (NXYLXK2017A01)

第一作者: 李玉玉 (1998-), 女, 陕西横山人, 在读本科生. E-mail: 1756773805@qq.com

通信作者: 张桂杰 (1983-), 男, 山东德州人, 教授, 博士, 研究方向为动物营养与饲料科学. E-mail: Guijiezhang@nxu.edu.cn

feeding values of T_3 and T_4 were significantly higher than those of T_1 ($P < 0.01$). The pH of the silage significantly reduced on adding cellulases ($P < 0.01$); the lactic acid and lactic acid/acetic acid contents of groups T_2 and T_3 were significantly higher than those of group T_1 ($P < 0.05$), and the stable aerobic exposure times of T_2 and T_3 were significantly lower than those of T_1 and T_4 ($P < 0.05$). In summary, under the conditions of this study, the silage-specific cellulase improved the fermentation quality and nutritional value of alfalfa silage, and the optimum supplementation level of silage-specific cellulase was 5.0‰.

Keywords: alfalfa silage; nutritional composition; fermentation quality; microbial; aerobic stability; complex cellulase; V-score

Corresponding author: ZHANG Guijie E-mail: Guijiezhang@nxu.edu.cn

紫花苜蓿 (*Medicago sativa*) 是一种优质高产的豆科牧草,其蛋白质含量高,且含有动物所需的多种矿物质和维生素,因其优良的饲用特性,被称为“牧草之王”^[1]。目前,我国苜蓿主要加工方式是干草制作,调制过程中苜蓿自然晒干较为困难,易发霉变质,且干草饲喂营养损失较大^[2]。因此,将苜蓿制成青贮饲料,不仅可以延长贮存时间,还可以有效减少营养损失,提高其适口性和消化率。对于牧场来说,青贮苜蓿是可靠又经济的蛋白质饲料,提升青贮饲料品质、提高青贮饲料用量是中小型牧场降本增效的有效措施之一。因而,越来越多从事苜蓿生产的企业开始关注苜蓿青贮的调制,青贮饲料的制备也趋于机械化和自动化^[3]。在国家“振兴奶业苜蓿发展行动”计划支持下,宁夏大力发展苜蓿产业,建设高产优质苜蓿示范区,使得优质苜蓿种植面积不断扩大。宁夏地区第 2 茬至第 4 茬(6 月至 8 月)苜蓿收割期,正值雨热同期,这为调制干草带来了挑战。随着牧场对苜蓿青贮的认可度越来越高,宁夏苜蓿青贮生产空间巨大,可有效促进苜蓿产业和奶业的发展^[4]。

由于紫花苜蓿刈割时水分含量较高,可溶性碳水化合物含量少,附着的乳酸菌较少,缓冲能较高,因此难以单独青贮^[5]。已有研究证实^[6-10],生物添加剂如乳酸杆菌和纤维素酶等可以有效改善青贮品质。其中,纤维素酶可以降解植物细胞壁,将多糖水解为单糖,增加青贮发酵底物,产生大量乳酸和少量乙酸,降低 pH,提高发酵品质^[11];研究表明,纤维素酶能够降低中性洗涤纤维浓度且对未成熟植株作用效果更强^[12];纤维素酶还可改善饲料青贮品质^[13-14]。目前关于纤维素酶调控青贮品质的研究主要集中在单一纤维素酶对饲草青贮品质的影响^[15-17],为此,本研究选择青贮专用复合纤维素酶,探究其对苜蓿

青贮的营养成分、发酵品质、微生物数量及有氧稳定性的影响,为提高苜蓿青贮品质和拓宽草食家畜优质饲草料来源提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验原料

试验选用宁夏茂盛草业公司种植的“中苜 4 号”紫花苜蓿,于 2018 年 5 月 19 日现蕾期—始花期刈割,留茬高度 7 cm。刈割后,苜蓿阴干,由 Aurora 型手持式近红外光谱仪,确定水分含量下降至 65% 左右进行青贮。苜蓿营养成分含量分别为干物质 37.40%,粗蛋白 19.33%,粗脂肪 1.90%,可溶性碳水化合物 2.03%,中性洗涤纤维 48.54%,酸性洗涤纤维 37.32%,酸性洗涤木质素 6.12%,纤维素 31.33%,相对饲喂价值为 114.65。

1.1.2 试验添加剂

试验所用青贮复合纤维素酶由天津云力之星生物科技有限公司馈赠,是一种专用于苜蓿青贮的复合酶制剂,其中纤维素酶活力 $\geq 60\,000\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$,木聚糖酶活力 $\geq 2\,500\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$,淀粉酶活力 $\geq 300\,000\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$, β -葡聚糖酶活力 $\geq 300\,000\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

1.2 试验设计

采用单因素完全随机设计,对照组(T_1 组)不添加青贮专用复合纤维素酶, T_2 组、 T_3 组、 T_4 组分别添加 2.5‰、5.0‰和 7.5‰青贮专用复合纤维素酶,每个处理 6 个重复。苜蓿原料用铡刀铡成 2 cm 的小段,将纤维素酶均匀地拌于原料之中,装于单向气阀的青贮袋(20 cm × 30 cm)中进行真空压缩密封,密封后密度为 705~725 kg·m⁻³,室温 25 ℃,青贮时间 60 d。

1.3 测定指标与方法

1.3.1 营养成分

分别取适量液氮中苜蓿和 500 g 青贮料置于冻干机中冻干, 冻干后再次称量, 计算干物质 (dry matter, DM) 经粉碎机粉碎, 过 0.425 mm 孔径筛, 装袋置干燥处保存。粗蛋白 (crude protein, CP)、粗脂肪 (ether extract, EE)、可溶性碳水化合物 (water soluble carbohydrate, WSC)、中性洗涤纤维 (neutral detergent fiber, NDF)、酸性洗涤纤维 (acid detergent fiber, ADF)、酸性洗涤木质素 (acid detergent lignin, ADL)、粗纤维 (crude fiber, CF) 含量参照《饲料分析及饲料质量检测技术》^[18] 进行测定。相对饲喂价值 (relative feed value, RFV) 计算方法为:

$$RFV = [(88.9 - 0.779ADF) \times 120 / NDF] / 1.29. \quad (1)$$

1.3.2 发酵品质

pH 测定方式: 称取 5 g 样品于锥形瓶中, 加入 45 mL 蒸馏水, 振荡 30 min, 并使样品完全浸入水中, 用封口膜封口, 于 4 °C 下保存 24 h, 用 4 层纱布过滤取上清液, 使用雷磁 PHS-3G 精密 pH 计进行测定。

氨态氮/总氮 ($\text{NH}_3\text{-N/TN}$) 采用苯酚-次氯酸钠比色法测定; 乳酸 (lactic acid, LA) 使用试剂盒测定, 试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

挥发性脂肪酸 (volatile fatty acid, VFA) 的测定: 取滤液 0.5 mL, 加入等体积的 8.2% 偏磷酸, 13 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液加入内标巴豆酸, 使用 GCMS-TQ8040 型气相色谱仪 (日本岛津公司), Rtx®-Wax 毛细管色谱柱, 分析测定上清液中丙酸、乙酸及丁酸的含量。

1.3.3 微生物和有氧稳定性

乳酸菌、酵母菌、霉菌数量的测定使用稀释涂布平板法, 选用 MRS 培养基培养乳酸菌, 马铃薯葡萄糖琼脂 (potato dextrose agar, PDA) 培养基培养酵母菌和霉菌。乳酸菌选择培养基上光滑、圆形的白色菌落进行计数, 酵母菌计数选择培养基上湿润、光滑、不透明、大而厚的菌落进行计数。霉菌选择为培养基上菌丝细长、菌落疏松呈绒毛状面絮状的菌落进行计数, 菌落计数单位用 $\lg \text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 表示。

有氧稳定性的测定: 在发酵 60 d 后打开全部发酵袋青贮, 将温度记录仪 (HOBO Pendant Temperature/Light, USA) 放入发酵袋几何中心处, 封口并在青贮袋上刺小孔, 置于室温 (26 °C) 下保存, 使空气可以自由进入袋中。同时在室内不同位置放置 3 个温度

记录仪。若青贮袋中的温度高于室温 2 °C, 则说明青贮开始腐败变质, 计算开袋至腐败变质的时间。

1.4 数据分析

使用 Excel 对数据预处理, 再使用 SPSS 23.0 统计软件进行 ANOVA 方差分析比较均值, 并采用 Duncan's 法进行多重比较。 $P < 0.05$ 为显著差异, $P < 0.01$ 为极显著差异。

2 结果与分析

2.1 青贮专用复合纤维素酶对苜蓿青贮营养成分的影响

T_2 、 T_3 和 T_4 组 CP 含量均高于 T_1 组, T_4 组的 CP 含量最高 (表 1), 显著高于 T_1 组 ($P < 0.05$); 各组间 EE 无显著性差异 ($P > 0.05$); T_3 组 WSC 含量极显著高于其他处理组 ($P < 0.01$); 纤维素酶处理青贮中 CF 含量极显著低于 T_1 组, 且 T_3 组极显著低于 T_2 组 ($P < 0.01$); T_3 组 NDF 含量极显著低于其他处理组 ($P < 0.01$); T_3 组与 T_4 组的 ADF 含量与 RFV 值极显著低于或高于 T_1 组和 T_2 组 ($P < 0.01$); 纤维素酶处理组 ADL 含量极显著高于 T_1 组 ($P < 0.01$), 但处理组间差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.2 青贮专用复合纤维素酶对苜蓿青贮发酵品质的影响

如表 2 所列, 添加纤维素酶可极显著降低青贮 pH ($P < 0.01$), 其中 T_2 组最低, 为 4.43, 酶处理组间差异不显著 ($P > 0.05$)。纤维素酶处理组氨态氮含量极显著低于 T_1 组 ($P < 0.01$)。添加纤维素酶的 3 个处理组中, 乳酸含量随纤维素酶添加量的增加而降低, T_2 组与 T_3 组均极显著高于 T_1 组 ($P < 0.01$), T_4 组与 T_1 组差异不显著 ($P > 0.05$)。 T_2 组和 T_3 组的乙酸含量极显著低于 T_1 组 ($P < 0.01$), 而 T_4 组与 T_1 组差异不显著。 T_3 、 T_4 组的丙酸含量极显著高于处理 T_1 、 T_2 组 ($P < 0.01$), 但 T_1 、 T_2 组之间丙酸含量差异不显著 ($P > 0.05$), T_3 、 T_4 组之间丙酸含量差异亦不显著 ($P > 0.05$)。丁酸含量在 T_3 组未检测到, 其余各组含量较少且各组无差异。

2.3 青贮专用复合纤维素酶对苜蓿青贮微生物的影响

如表 3 所列, 乳酸菌、霉菌数量随开袋时间增长

表 1 青贮专用复合纤维素酶对苜蓿青贮营养成分的影响
Table 1 Effect of silage-specific compound cellulase on alfalfa silage nutrition components

处理 Treatment	干物质 Dry matter/%	粗蛋白 Crude protein/%	粗脂肪 Ether extract/%	可溶性碳水化合物 Water soluble carbohydrate/%	中性洗涤纤维 Neutral detergent fiber/%
T ₁	33.55 ± 0.39B	21.35 ± 0.53bA	3.83 ± 0.01aA	0.82 ± 0.06bB	40.24 ± 0.43aA
T ₂	33.73 ± 0.78AB	22.75 ± 0.51bA	3.77 ± 0.02aA	0.94 ± 0.02bB	39.22 ± 0.20abAB
T ₃	34.02 ± 0.22A	22.14 ± 0.54bA	3.80 ± 0.02aA	1.21 ± 0.02aA	37.01 ± 0.09cC
T ₄	33.62 ± 0.53AB	23.14 ± 0.27aA	3.83 ± 0.03aA	0.89 ± 0.05bB	38.50 ± 0.39bB

处理 Treatment	酸性洗涤纤维 Acid detergent fiber/%	酸性洗涤木质素 Acid detergent lignin/%	粗纤维 Crude fiber/%	相对饲喂价值 Relative feeding value
T ₁	38.15 ± 0.41aA	7.03 ± 0.31bB	33.15 ± 0.45aA	136.86 ± 2.18bB
T ₂	37.82 ± 0.38aA	8.19 ± 0.09aA	29.62 ± 0.35bB	141.05 ± 1.39bB
T ₃	35.61 ± 0.53bB	7.82 ± 0.32aA	27.79 ± 0.20cC	153.79 ± 1.35aA
T ₄	35.41 ± 0.30bB	7.76 ± 0.14aA	28.68 ± 0.39bcBC	148.16 ± 0.94aA

同列不同小写字母和不同大写字母分别表示不同处理组间差异显著($P < 0.05$)和极显著($P < 0.01$); 无字母或相同小写字母表示差异不显著($P > 0.05$); T₁、T₂、T₃和T₄分别添加0、2.5‰、5.0‰和7.5‰青贮专用复合纤维素酶; 下表同。

Different lowercase and capital letters within the same column indicate significant differences between different treatment groups at 0.05 and 0.01 level, respectively, and no letter or the same letter superscripts indicate no significant differences at the 0.05 level; T₁、T₂、T₃、T₄ indicated the concentrations of added silage-specific mixed cellulase were 0, 2.5‰, 5.0‰, 7.5‰; this is applicable for the following tables as well.

表 2 青贮专用复合纤维素酶对苜蓿青贮发酵品质的影响
Table 2 Effect of silage-specific compound cellulase on alfalfa silage fermentation quality

处理 Treatment	pH	氨态氮/总氮 Ammonium nitrogen/Nitrogen/%	乳酸 Lactic acid/%	乙酸 Acetic acid/%
T ₁	4.86 ± 0.05aA	2.67 ± 0.04aA	5.38 ± 0.15bB	1.49 ± 0.03aA
T ₂	4.43 ± 0.03bB	2.27 ± 0.03bB	6.73 ± 0.30aA	1.15 ± 0.08cC
T ₃	4.44 ± 0.04bB	2.43 ± 0.04bB	6.41 ± 0.18aA	1.19 ± 0.05bB
T ₄	4.45 ± 0.03bB	2.07 ± 0.03cC	5.00 ± 0.15bB	1.42 ± 0.02aA

处理 Treatment	乳酸/乙酸 Lactic acid/Acetic acid	丙酸 Propionic acid/%	丁酸 Butyric acid/%
T ₁	3.61 ± 0.14cBC	0.20 ± 0.01bB	0.01 ± 0.00
T ₂	5.85 ± 0.13aA	0.16 ± 0.02bB	0.01 ± 0.00
T ₃	5.39 ± 0.03bB	0.22 ± 0.01aA	
T ₄	3.52 ± 0.10cC	0.29 ± 0.01aA	0.01 ± 0.00

呈现增加趋势, 酵母菌在开袋第 3 天数量下降, 然后升高。开袋后第 1 天 T₃ 组乳酸菌含量显著低于其他 3 组 ($P < 0.05$); T₁ 组中的酵母菌数量极显著高于其他 3 个组 ($P < 0.01$), 霉菌数量最低, 为 $3.30 \lg \text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 。第 3 天 T₄ 组的乳酸菌数量显著高于其他 3 个组 ($P < 0.05$), 达 $7.46 \lg \text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$, 4 个处理组的霉菌数量差异不显著 ($P > 0.05$), T₂ 组的酵母菌数量极显著低于 T₁ 组和 T₃ 组 ($P < 0.01$)。开袋第 6 天 T₄ 组

乳酸菌数量显著高于其他 3 个组 ($P < 0.05$), T₁ 组的酵母菌数量极显著高于其他 3 个组 ($P < 0.01$), 且 T₂ 组的酵母菌数量最低。

2.4 青贮专用复合纤维素酶对苜蓿青贮有氧稳定性的影响

在有氧暴露后, 青贮料的有氧稳定性时间表现 T₃ 组最长 (53.5 h), T₁ 组最短 (51 h)。T₁ 和 T₄ 组有氧

表 3 不同处理组间苜蓿青贮开袋后微生物动态变化 (干物质基础)
Table 3 Dynamic changes between different treatments on microbial populations after opening days of alfalfa silage (DM basis)

开袋时间 Opening time/d	处理组 Treatment	微生物含量 Microbe content/(lg cfu·g ⁻¹)		
		乳酸菌 Lactobacillus	霉菌 Mould	酵母菌 Saccharomycetes
1	T ₁	6.03 ± 0.83bA	3.30 ± 0.15cB	6.05 ± 0.34aA
	T ₂	6.45 ± 0.31abA	3.85 ± 0.64bB	3.50 ± 0.67cC
	T ₃	5.77 ± 0.49cA	5.15 ± 0.86aA	5.30 ± 0.56bB
	T ₄	6.68 ± 0.33aA	4.85 ± 0.35aA	5.41 ± 0.82bB
3	T ₁	7.25 ± 0.14bA	4.50 ± 0.50aA	3.35 ± 0.17bB
	T ₂	7.25 ± 0.25bA	4.47 ± 0.24aA	2.75 ± 0.36cC
	T ₃	7.32 ± 0.55bA	5.15 ± 0.68aA	3.90 ± 0.24aA
	T ₄	7.46 ± 0.18aA	4.49 ± 0.31aA	3.08 ± 0.38bcBC
6	T ₁	7.27 ± 0.34bB	6.25 ± 0.22aA	6.91 ± 0.23aA
	T ₂	7.30 ± 0.59bB	5.02 ± 0.14bB	5.30 ± 0.10cC
	T ₃	7.65 ± 0.41bAB	5.97 ± 0.57aA	6.08 ± 0.42bB
	T ₄	8.07 ± 0.98aA	5.94 ± 0.18aA	6.05 ± 0.35bB

暴露时间显著低于 T₂ 和 T₃ 组 ($P < 0.05$) (图 1)。

2.5 苜蓿青贮发酵品质 V-score 评分分析

采用 V-score 评分体系对 4 组青贮的品质进行综合分析 (表 4)。结果表明, 各组的青贮饲料总体评价均为良好 (> 80 分), 其中 T₃ 组的得分最高。

3 讨论

3.1 青贮专用复合纤维素酶对苜蓿青贮营养成分的影响

纤维素酶可以将青贮原料中的结构性糖类降解为单糖或双糖, 为乳酸的生成提供可利用发酵底物, 同时纤维素酶中含有氧化还原酶, 可以加快氧气的消耗, 为青贮提供厌氧环境, 抑制腐败菌的生长^[19-21]。纤维素酶属于青贮发酵促进剂, 利用纤维

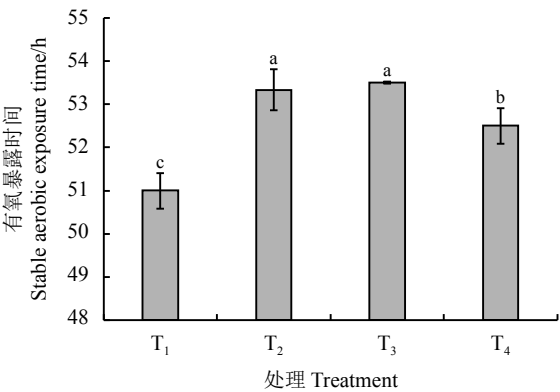


图 1 青贮专用复合纤维素酶对苜蓿青贮有氧稳定性的影响
Figure 1 Effect of silage-specific compound cellulase on alfalfa silage aerobic stability

不同小写字母表示不同处理组间差异显著 ($P < 0.05$)。
Different lowercase letters indicate significant differences between different treatment groups at the 0.05 level.

表 4 不同处理组间苜蓿青贮 V-score 评分
Table 4 V-score of different treatments on microbial populations

组别 Group	氨态氮/总氮 NH ₃ -N/TN (YN)	乙酸 + 丙酸 AA + PA (YAP)	丁酸 BA (YB)	V-score (YN + YAP + YB)
T ₁	50.0	0	39.2	89.20
T ₂	50.0	1.46	39.2	90.66
T ₃	50.0	0.69	40.0	90.69
T ₄	50.0	0	39.2	89.20

素酶对青贮纤维素进行分解,增加可溶性碳水化合物含量,为乳酸菌活动提供能源,纤维素酶不引起蛋白质的分解,不降低粗蛋白含量^[22],这与本研究中处理组粗蛋白含量均高于对照组粗蛋白含量的结果一致。而T₃组氨态氮较高且乳酸菌含量较少,有害微生物快速生长,蛋白质的降解作用增强^[23],由此可解释添加纤维素酶的3个处理组中T₃组粗蛋白含量相对最低。本研究中添加青贮专用复合纤维素酶有效降低苜蓿青贮中NDF和ADF含量,这与徐然等^[14]对光叶紫花苕(*Vicia villosa* Roth)的研究结果一致。木质素是一种结构复杂的高分子聚合物,真菌、细菌、放线菌等微生物和其他酶类物质可以有效降解木质素,但木质素在厌氧条件下很难被降解。由于添加纤维素酶使得苜蓿青贮中氧气消耗加快,有效抑制好氧微生物和其他酶类对木质素的降解,所以在本研究中添加纤维素酶并没有起到降低木质素的作用^[24-26]。T₃组可溶性碳水化合物含量最高,且NDF含量显著低于其他3组,说明纤维素酶水解植物细胞壁产生的过量可溶性碳水化合物未被微生物完全利用^[27]。T₄组开袋第1天乳酸菌含量高于其他3组,其他微生物含量也偏高,故T₄组可溶性碳水化合物含量低于T₃组。

3.2 青贮专用复合纤维素酶对苜蓿青贮发酵品质的影响

pH和氨态氮是评定青贮发酵品质的重要指标。各处理的乳酸含量均高于其他有机酸,乙酸含量高于丙酸和丁酸。因此,苜蓿青贮发酵属于乳酸发酵与醋酸发酵相结合的混合型发酵,乳酸含量高是造成青贮pH低的主要原因^[28]。当苜蓿青贮中pH迅速降至4.7以下时,抑制了有害菌丁酸梭菌的生长,乳酸菌成为优势菌群进行繁殖,加速乳酸的积累,并产生少量的乙酸。可溶性碳水化合物的含量取决于乳酸菌的繁殖速度和酶解产糖之间的平衡,发酵过程中部分糖会转化成乙醇,使青贮具有酒香味。纤维素酶的添加增加了乳酸的产量^[29],然而,在纤维素酶一定作用范围内,过多的纤维素酶不利于乳酸菌与发酵底物的接触^[13],导致乳酸含量下降。这也是本研究中纤维素酶3个处理组乳酸含量依次下降的原因之一,这与陈鑫珠等^[13]对常规水分和低水分稻草青贮品质的影响研究结果一致。

丙酸在3种有机酸中抗真菌能力较强,但酸性

最弱,其抑菌作用随pH降低而增强^[30]。Hristov^[31]研究表明,添加纤维素酶、半纤维素酶等添加剂可以降低燕麦(*Avena sativa*)和普通黄耆(*Astragalus propinquus*)混合青贮饲料中氨态氮的生成量,这与本研究结果相反,可能是由于本研究以苜蓿为原料,青贮中蛋白含量高所引起。苜蓿青贮中丁酸梭菌可以产生丁酸,也可以分解蛋白质产生氨态氮,影响青贮气味,降低适口性,影响采食^[32-34],T₃组的青贮中并未检测到丁酸,且氨态氮显著高于其他3组,是由于蛋白自身过度降解所致。

3.3 青贮专用复合纤维素酶对苜蓿青贮微生物和有氧稳定性的影响

乳酸菌是青贮中起主要发酵作用的有益微生物,可以在厌氧条件下利用碳水化合物产生乳酸。在厌氧条件下,酵母菌可以利用青贮中的糖类繁殖并产生乙醇和二氧化碳,使其具有酒香味,但酵母菌的剧烈活动会引起青贮的二次发酵,不利于贮藏^[35]。本研究中,无添加组的乳酸菌含量最低,酵母菌的含量最高,添加复合纤维素酶的青贮料中酵母菌含量降低,这与侯美玲等^[36]对羊草(*Leymus chinense*)青贮品质研究结果相同,说明纤维素酶的添加降低青贮料pH是有效抑制了酵母菌的繁殖所致。

在青贮开袋后,由于青贮料与空气接触,导致青贮中的好氧微生物开始活跃,使得青贮料变质进程开始,其中好氧微生物利用青贮中的营养物质进行大量繁殖^[37]。随着有氧暴露时间的增加,霉菌和酵母菌数量迅速上升,乳酸菌数量增长缓慢,与刘立山等^[38]研究中乳酸菌数量降低的结果相反,这可能是因为好氧菌的快速繁殖消耗青贮中的氧气,使厌氧菌进行缓慢繁殖。苜蓿青贮在开袋51~53 h后已经开始变质,说明好氧微生物的霉菌和酵母菌开始快速繁殖。较低的pH为青贮提供了稳定的发酵环境,可以更好地抑制腐败菌的生长,使有氧稳定时间延长,而酵母菌可以利用乳酸产生酒精,并发生有氧变质^[36]。添加酶制剂的3个组的有氧稳定性高于对照组,其中T₃组的有氧稳定性最好;此外T₂组和T₃组的乳酸含量较高,乳酸具有一定的抗菌性,因此T₂组和T₃组的苜蓿青贮有氧稳定性显著提高。

4 结论

本研究对 4 组添加不同浓度青贮专用复合纤维素酶的苜蓿青贮营养成分、发酵品质、微生物和有氧稳定性等指标进行了研究,结果表明,各组苜蓿青贮品质评定均能达到良好青贮品质标准。添加复合纤维素酶降低了青贮苜蓿中性洗涤纤维和酸性

洗涤纤维的含量,减少了干物质损失,提高了苜蓿青贮营养价值;添加复合纤维素酶还可降低苜蓿青贮 pH 和乙酸含量,提高乳酸含量和有氧稳定性,改善苜蓿青贮发酵品质。研究结果表明,4 个处理组的青贮品质表现为 T₃ 组 (5.0‰) > T₂ 组 (2.5‰) > T₄ 组 (7.5‰) > T₁ 组 (0),即添加 5.0‰ 的青贮专用复合纤维素酶青贮效果最好。

参考文献 References:

- [1] 杨玉玺,王木川,玉柱,于奕东.不同添加剂和原料含水量对紫花苜蓿青贮品质的互作效应. *草地学报*, 2017, 25(5): 1138-1144.
YANG Y X, WANG M C, YU Z, YU Y D. Interaction effects of different additives and moisture on the quality of alfalfa silage. *Acta Agrestia Sinica*, 2017, 25(5): 1138-1144.
- [2] 魏晓斌,殷国梅,薛艳林,王波,刘思博,孙林,周天荣.添加乳酸菌和纤维素酶对紫花苜蓿青贮品质的影响. *中国草地学报*, 2019, 41(6): 86-90.
WEI X B, YIN G M, XUE Y L, WANG B, LIU S B, SUN L, ZHOU T R. Effect of addition of lactic acid bacteria and cellulase on quality of alfalfa silage. *Chinese Journal of Grassland*, 2019, 41(6): 86-90.
- [3] 段珍,李晓康,张红梅,张建华,李霞.苜蓿青贮技术研究现状. *草学*, 2018(2): 9-15.
DUAN Z, LI X K, ZHANG H M, ZHANG J H, LI X. Research status on alfalfa silage. *Journal of Grassland and Forage Science*, 2018(2): 9-15.
- [4] 冯骁骋,曾洁,王伟,王志军,尹强.我国苜蓿产业发展现状及存在的问题. *黑龙江畜牧兽医*, 2018(2): 135-137.
FENG X C, ZENG J, WANG W, WANG Z J, YIN Q. The present situation and existing problems of alfalfa industry development in our country. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2018(2): 135-137.
- [5] 钟书,张晓娜,杨云贵,杨雨鑫.乳酸菌和纤维素酶对不同含水量紫花苜蓿青贮品质的影响. *动物营养学报*, 2017, 29(5): 1821-1830.
ZHONG S, ZHANG X N, YANG Y G, YANG Y X. Effects of lactic acid bacteria and cellulase on alfalfa silage quality with different moisture. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2017, 29(5): 1821-1830.
- [6] 王木川,杨玉玺,于奕东,玉柱.不同添加剂和青贮密度对紫花苜蓿青贮品质的影响. *草业学报*, 2018, 27(2): 156-162.
WANG M C, YANG Y X, YU Y D, YU Z. Interactions between additives and ensiling density on quality of *Medicago sativa* silage. *Acta Prataculturae Sinica*, 2018, 27(2): 156-162.
- [7] 薛春胜,刘瑞生,徐建峰,张金林.不同添加剂对陇东紫花苜蓿青贮品质的影响. *草业科学*, 2018, 35(2): 456-462.
XUE C S, LIU R S, XU J F, ZHANG J L. Effect of different additives on the silage quality of Longdong alfalfa. *Pratacultural Science*, 2018, 35(2): 456-462.
- [8] 赵苗苗,玉柱.添加乳酸菌及纤维素酶对象草青贮品质的改善效果. *草地学报*, 2015, 23(1): 205-210.
ZHAO M M, YU Z. Effects of lactic acid bacteria and cellulase on napier grass silages. *Acta Agrestia Sinica*, 2015, 23(1): 205-210.
- [9] 侯鑫狄,侯美玲,贾玉山,卢强,格根图.添加乳酸菌和纤维素酶对黄花苜蓿青贮品质的影响. *中国草地学报*, 2017, 39(6): 95-98, 105.
HOU X D, HOU M L, JIA Y S, LU Q, Gegentu. The present status and suggestions of collection and preservation of forage germplasm resources in China. *Chinese Journal of Grassland*, 2017, 39(6): 95-98, 105.
- [10] 张诗,林芝,余豪闯,罗宗志,庄益芬.酶制剂和绿汁发酵液对巨菌草青贮品质的影响. *草业科学*, 2017, 34(8): 1755-1761.
ZHANG S, LIN Z, YU H C, LUO Z S, ZHUANG Y F. Effects of enzyme and fermented green juice on silage quality of *Pennisetum* sp. *Pratacultural Science*, 2017, 34(8): 1755-1761.
- [11] 孙文君,马向丽,毕玉芬,徐震,毛文娅.乳酸菌与纤维素酶在青贮中的应用研究. *草学*, 2017(6): 12-15, 20.

- SUN W J, MA X L, BI Y F, XU Z, MAO W Y. Research on the application of lactic acid bacteria and cellulase in silage. *Journal of Grassland and Forage Science*, 2017(6): 12-15, 20.
- [12] NADEAU E M G, BUXTON D R, RUSSELL J R. Enzyme, bacterial inoculant, and formic acid effects on silage composition of orchardgrass and alfalfa. *Journal of Dairy Science*, 2000, 83(7): 1487-1502.
- [13] 陈鑫珠, 邹长连, 张文昌, 庄益芬, 刘景. 纤维素酶对常规水分和低水分稻草青贮品质的影响. *草地学报*, 2018, 26(2): 453-458.
CHEN X Z, ZOU C L, ZHANG W C, ZHUANG Y F, LIU J. The effects of cellulase on silage quality of rice straw with normal and low moisture contents *Acta Agrestia Sinica*, 2018, 26(2): 453-458.
- [14] 徐然, 陈鹏飞, 白史且, 于友民, 杨富裕. 乳酸菌和纤维素酶对光叶紫花苕青贮发酵品质的影响. *草地学报*, 2014, 22(2): 420-425.
XU R, CHEN P F, BAI S Q, YU Y M, YANG F Y. Effects of lactic acid bacteria and cellulase on the fermentation quality of smooth vetch silage. *Acta Agrestia Sinica*, 2014, 22(2): 420-425.
- [15] 张金霞, 乔红霞, 刘雨田. 水分和添加剂对紫花苕青贮品质的影响. *草业科学*, 2014, 31(4): 766-770.
ZHANG J X, QIAO H X, LIU Y T. Effects of moisture and additives on feed quality of alfalfa silage. *Pratacultural Science*, 2014, 31(4): 766-770.
- [16] 侯美玲, 格根图, 孙林, 周天荣, 张颖超, 贾玉山. 甲酸、纤维素酶、乳酸菌剂对典型草原天然牧草青贮品质的影响. *动物营养学报*, 2015, 27(9): 2977-2986.
HOU M L, Gegentu, SUN L, ZHOU T R, ZHANG Y C, JIA Y S. Effects of formic acid, cellulose and lactic acid bacteria on silage quality of natural forage of typical steppe. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2015, 27(9): 2977-2986.
- [17] 张丽英. 饲料分析及饲料质量检测技术. 北京: 中国农业大学出版社, 2007.
ZHANG L Y. *Feed Analysis and Feed Quality Testing Technology*. Beijing: China Agricultural University, 2007.
- [18] 韩瑞宏, 赵大华, 陈晶晶, 卢少云, 郭振飞. 不同苜蓿种质资源苗期耐热性综合评价. *中国草地学报*, 2015, 37(3): 48-54.
HAN R H, ZHAO D H, CHEN J J, LU S Y, GUO Z F. Comprehensive evaluation of heat tolerance of 30 *Medicago* germplasm resources. *Chinese Journal of Grassland*, 2015, 37(3): 48-54.
- [19] 李光耀, 陈建华, 张力君. 添加剂在苜蓿青贮中的应用进展. *饲料研究*, 2014(7): 14-16.
LI G Y, CHEN J H, ZHANG L J. Application progress of additives in alfalfa silage. *Feed Research*, 2014(7): 14-16.
- [20] 刘辉, 卜登攀, 吕中旺, 李发弟, 刘士杰. 乳酸菌和化学保存剂对窖贮紫花苕青贮品质和有氧稳定性的影响. *畜牧兽医学报*, 2015, 46(5): 784-791.
LIU H, BU D P, LYU Z W, LI F D, LIU S J. Effect of lactic acid bacteria or a chemical preservative on the quality and aerobic stability of alfalfa silage produced in farm-scale silos. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2015, 46(5): 784-791.
- [21] TOMODA Y, TOKUDA H, NAKSNISHI K. Effect of a cellulase preparation originated from *acremonium cellulolyticus* Y-94 on the release of sugar from alfalfa powder. *Journal of Japanese Society of Grassland Science*, 1996, 42(2): 159-162.
- [22] 夏明, 王育青, 吴洪新, 赵青山, 段俊杰. 不同添加剂处理对苜蓿青贮品质的影响. *家畜生态学报*, 2014, 35(10): 30-35.
XIA M, WANG Y Q, WU H X, ZHAO Q S, DUAN J J. Effects of different additive treatments on quality of alfalfa silage. *Journal of Domestic Animal Ecology*, 2014, 35(10): 30-35.
- [23] 李顺, 陈东, 穆麟, 曾宁波, 张志飞. 添加剂对籽粒苋与麦麸混合青贮品质的影响. *中国草地学报*, 2019, 41(4): 173-178.
LI S, CHEN D, MU L, ZENG N B, ZHANG Z F. Effects of additives on the quality of mixed silage with amaranth and wheat bran. *Chinese Journal of Grassland*, 2019, 41(4): 173-178.
- [24] 李海涛, 姚开, 何强, 贾冬英. 木质素的生物降解及其应用. *皮革科学与工程*, 2010, 20(6): 27-31.
LI H T, YAO K, HE Q, JIA D Y. Biodegradation and applications of lignin. *Leather Science and Engineering*, 2010, 20(6): 27-31.
- [25] 唐振华, 侯宇, 邹彩霞, 夏中生, 韦升菊. 甲酸、乙酸对甘蔗尾青贮发酵、营养品质和有氧稳定的影响. *饲料工业*, 2015, 36(19): 15-18.
TANG Z H, HOU Y, ZOU C X, XIA Z S, WEI S J. Effects of formic acid and acetic acid on silage fermentation, nutritional quality and aerobic stability of sugarcane tail. *Feed Industry*, 2015, 36(19): 15-18.
- [26] 曹熙, 刘慧, 赵欢. 微生物降解木质素的研究. *南方农机*, 2019, 50(3): 88.

- CAO X, LIU H, ZHAO H. Microbial degradation of lignin. *China Southern Agricultural Machinery*, 2019, 50(3): 88.
- [27] 蒋红琴, 李十中, 仇磊, 祖旭, 李习龙. 添加剂对甜高粱秆酒糟与麸皮混合青贮品质的影响. *中国畜牧杂志*, 2016, 52(23): 34-38.
JIANG H Q, LI S Z, JI L, ZU X, LI X L. Effects of additives on efficiency of mixed silage of sweet sorghum stalk vinasse and wheat bran silage. *Chinese Journal of Animal Science*, 2016, 52(23): 34-38.
- [28] LI M, ZI X J, ZHOU H L, HOU G Y, CAI Y M. Effects of sucrose, glucose, molasses and cellulase on fermentation quality and in vitro gas production of king grass silage. *Animal Feed Science and Technology*, 2014, 197: 206-212.
- [29] 王继成, 晏和平. 不同水平纤维素酶和木聚糖酶对青贮高粱品质的影响. *饲料研究*, 2006(5): 57-61.
WANG J C, YAN H P. Effects of different levels of cellulase and xylanase on the quality of sorghum silage. *Feed Research*, 2006(5): 57-61.
- [30] 尉小强, 罗仕伟, 哈志刚, 毛洪川, 万宇. 不同添加剂对全株玉米青贮品质、微生物数量和有氧稳定性的影响. *中国奶牛*, 2018(12): 8-12.
WEI X Q, LUO S W, HA Z G, MAO H C, WAN Y. Effects of adding different additives on the quality, microbial quantity and aerobic stability of whole-crop corn silage. *China Dairy Cattle*, 2018(12): 8-12.
- [31] HRISTOV A N. Effect of a commercial enzyme preparation on alfalfa silage fermentation and protein degradability. *Animal Feed Science and Technology*, 1993, 42(3/4): 273-282.
- [32] 霍迪. 补充过瘤胃蛋氨酸最优化以苜蓿和玉米青贮为基础的奶牛日粮赖氨酸比. *饲料与畜牧*, 2016(11): 65-66.
HUO D. Optimization of dairy cow diet and egg ratio based on alfalfa and corn silage by supplementation with rumen Methionine. *Feed and Animal Husbandry*, 2016(11): 65-66.
- [33] LYNCH J P, JIN L, LARA E C, BAAH J, BEAUCHEMIN K A. 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. *Animal Feed Science and Technology*, 2014, 193: 21-31.
- [34] ZHANG J, GUO G, CHEN L, LI J F, YUAN X J. Effect of applying lactic acid bacteria and propionic acid on fermentation quality and aerobic stability of oats-common vetch mixed silage on the Tibetan Plateau. *Animal Science Journal*, 2015, 86(6): 595-602.
- [35] LI D X, NI K K, ZHANG Y C, LIN Y L, YANG F Y. Influence of lactic acid bacteria, cellulase, cellulase-producing *Bacillus pumilus* and their combinations on alfalfa silage quality. *Journal of Integrative Agriculture*, 2018, 17(12): 2768-2782.
- [36] 侯美玲, 杜珠梅, 范文强, 王伟, 格根图. 乳酸菌与纤维素酶对草甸草原天然牧草青贮品质的影响. *畜牧兽医学报*, 2017, 48(5): 871-880.
HOU M L, DU Z M, FAN W Q, WANG W, Gegentu. The effects of treating with lactic acid bacteria and cellulase on silage fermentation of natural grasses in meadow steppe. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2017, 48(5): 871-880.
- [37] 王旭哲, 张凡凡, 唐开婷, 马春晖. 密度对玉米青贮发酵品质、微生物和有氧稳定性的影响. *中国草地学报*, 2018, 40(1): 80-86.
WANG X Z, ZHANG F F, TANG K T, MA C H. Effect of density on fermentation quality, microbial quantity and aerobic stability of corn silage. *Chinese Journal of Grassland*, 2018, 40(1): 80-86.
- [38] 刘立山, 郎侠, 周瑞, 王彩莲, 宋淑珍. 模拟降雨和风干对玉米青贮营养品质及有氧暴露期微生物数量的影响. *中国饲料*, 2019(3): 18-22.
LIU L S, LANG X, ZHOU R, WANG C L, SONG S Z. Effects of simulated rainfall and air drying on the quality of corn silage and microbe quantity after aerobic exposure. *China Feed*, 2019(3): 18-22.

(责任编辑 王芳)