

外源纤维酶制剂对青贮玉米体外发酵特性以及甲烷生成的影响

陈兴 茅慧玲 王佳堃 吴晨晖 刘建新*

(浙江大学动物科学学院, 杭州 310058)

摘要: 本试验旨在探究添加外源纤维酶制剂对青贮玉米体外(瘤胃)发酵的影响。试验采用单因素试验设计, 利用压力读取式体外产气系统, 添加 11 种纤维酶制剂, 包括 5 种纤维素酶 (CEL-1、CEL-2、CEL-3、CEL-4、CEL-5) 和 6 种木聚糖酶 (XYL-1、XYL-2、XYL-3、XYL-4、XYL-5、XYL-6), 对照组不添加酶制剂, 纤维素酶组添加水平为 30 U/g, 木聚糖酶组添加水平为 40 U/g。结果表明: 与对照组相比, 添加纤维素酶显著降低了底物的潜在产气量 ($P < 0.05$), 但是显著提高了产气速率 ($P < 0.05$), 其中添加 CEL-1 提升产气速率达 82.5%; 但除 XYL-3 显著降低了潜在产气量 ($P < 0.05$) 外, 添加木聚糖酶对其他产气参数均无显著影响 ($P > 0.05$)。除了 XYL-4 对酸性洗涤纤维降解率效果不显著 ($P > 0.05$) 外, 酶制剂组的干物质、中性洗涤纤维和酸性洗涤纤维降解率都显著提高 ($P < 0.05$)。添加 XYL-1、XYL-4 和 CEL-5 显著提高了总挥发性脂肪酸的产量 ($P < 0.05$), XYL-3 和 XYL-4 均显著降低了乙酸摩尔比和乙酸:丙酸 ($P < 0.05$), 显著提高了丙酸摩尔比 ($P < 0.05$), 但仅 XYL-4 显著提高了丁酸摩尔比 ($P < 0.05$)。体外培养 6 和 12 h 时, 不同酶制剂对甲烷生成的影响呈现较大的变异性, 培养到 24 h 时, 酶制剂对甲烷生成的影响变得不显著 ($P > 0.05$)。由此可知, 添加外源纤维酶制剂可提高青贮玉米的干物质、中性洗涤纤维和酸性洗涤纤维的降解率, 并可在培养前期改变甲烷的生成量。

关键词: 外源纤维酶制剂; 体外发酵; 青贮玉米; 反刍动物

中图分类号: S816.7

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2013)01-0214-08

粗饲料是反刍动物营养的主体。但是植物坚硬复杂的细胞壁成为了粗饲料利用的关键性障碍, 直接导致粗饲料的利用率低于 65%^[1]。同时, 反刍动物通过嗝气等方式排放了大量甲烷等温室气体, 1970 年到 2004 年, 全球的温室气体排放增加了 70%, 并且预计 2030 年又将比 2000 年升高 25% ~ 90%^[2]。按照目前畜牧业的增长趋势, 2030 年畜牧业排放的甲烷将增长 60%^[3]。利用酶制剂来改善反刍动物对于粗饲料利用率以及降低甲烷生成成为研究热点。酶制剂应用于反刍动物的效果变异较大^[4-6]。有体外试验表明添加外

源酶制剂可改善产气参数、纤维素降解率和底物的降解速率^[7-12], 但也有试验表明酶制剂对于底物降解没有显著影响^[13]。在奶牛试验中, 酶制剂可提高动物对饲料的消化力^[14], 改善动物的营养水平, 但是产奶量有些试验提高, 有些试验没有变化。同时添加酶制剂对甲烷排放的作用也受到试验条件、动物状况、饲料等诸多因素的影响^[15-20], 一方面, 添加酶制剂提高了甲烷的绝对产量^[14]; 另一方面, 考虑到生产性能的提升, 每单位产品的甲烷相对产量有可能降低^[14-15, 20]。

粗纤维消化是一个涉及到多种酶参与的复杂

收稿日期: 2012-07-07

基金项目: 国际原子能机构 (IAEA) 项目 (RC-16327-R0)

作者简介: 陈兴 (1986—), 男, 河南林州人, 硕士研究生, 从事饲料资源开发研究。E-mail: chenxing23@126.com

* 通讯作者: 刘建新, 教授, 博士生导师, E-mail: liujx@zju.edu.cn

水解过程^[21-23],反刍动物因为日龄或者健康状况有时不能提供足够的酶。目前我国生产的酶制剂从纯度到活力都有很大的改进,木聚糖酶(xylanase,XYL)活力能达到40 000 U/g以上,内切纤维素酶(cellulase,CEL)活力也能达到1 000 U/g左右。全面调查中国主要的纤维酶制剂产品,并参考国外的酶制剂,对比体外(瘤胃)发酵作用显得非常必要。为此,本试验旨在通过对9种国产纤维酶制剂(5种木聚糖酶和4种纤维素酶)和2种美国公司提供的酶制剂(1种纤维素酶和1种木聚糖酶)进行酶活比较测定,并用青贮玉米作为底物,评价其对体外发酵的影响,以期酶制剂在反刍动物上的应用提供参考依据。

1 材料与方 法

1.1 纤维酶制剂以及蛋白质浓度、酶活测定

11种纤维酶制剂包括5种纤维素酶(CEL-1、CEL-2、CEL-3、CEL-4、CEL-5)和6种木聚糖酶(XYL-1、XYL-2、XYL-3、XYL-4、XYL-5、XYL-6)。使用Super-Bradford蛋白质定量试剂盒(Cat. No. CW-0013)测定酶制剂的蛋白质浓度,用多功能微孔板检测系统(酶标仪)(SpectraMax M-5, Molecular Devices),在595 nm处检测吸光度,绘制标准曲线,计算出样品的蛋白质浓度。在pH 6.6和温度39℃下测定所有酶制剂的木聚糖酶活、内切葡聚糖酶活和外切葡聚糖酶活^[24-27]。

1.2 底物以及体外试验设计

采用压力读取式体外产气法(reading pressure technique, RPT)^[28],单因素试验设计;底物为青贮玉米,春玉米(8月15日收获)带穗青贮,贮存时间在4个月左右,65℃烘干后粉碎,样品经过0.45 mm筛过滤。干物质(dry matter, DM)、粗蛋白质(crude protein, CP)、中性洗涤纤维(neutral detergent fiber, NDF)和酸性洗涤纤维(acid detergent fiber, ADF)含量分别为96.0%、8.13%、59.2%和41.2%。称取0.5 g(DM)的青贮玉米于120 mL的产气瓶中,将酶制剂溶解后,在4℃下20 000 × g离心10 min,取上清液加入到底物中。纤维素酶的添加水平为30 U/g底物(DM),木聚糖酶的添加水平为40 U/g底物(DM)。酶和

底物在室温下充分反应3 h^[7]后,加入40 mL的厌氧人工瘤胃缓冲液,39℃的隔水式恒温培养箱放置21 h,每个处理6个重复。

晨饲前,抽取3头瘰管奶牛的瘤胃液,混合后4层纱布过滤,在每个产气瓶接种10 mL的瘤胃液,置于(39.0 ± 0.5)℃的恒温箱中培养。

1.3 试验测定指标

产气量:在培养3、6、9、12、24、48 h时用压力传感器读取产气瓶的气体压力,将压力转换成产气量。利用各培养时间点(t, h)累计产气量(P, mL),按下式计算产气参数: $P = a + b(1 - e^{-ct})$ [式中:P为培养t h的累计产气量(mL),a为目标成分的快速降解部分的产气量(mL),b为目标成分的慢速降解部分的产气量(mL);c为b部分的降解速率(mL/h)]。

甲烷产量:在培养6、12、24 h时,吸取1 mL气体样品,用气相色谱仪(GC-2010, Shimadzu)分析气体的甲烷含量。

挥发性脂肪酸(volatile fatty acid, VFA)产量:终止培养后,取上清液1 mL,混合0.2 mL的8.2%偏磷酸,在4℃下20 000 × g离心10 min,用气相色谱仪(GC-2010, Shimadzu)分析乙酸、丙酸、丁酸以及总VFA产量。

DM、NDF、ADF降解率:培养底物经称重后过300目尼龙袋,清水洗涤至无色,65℃烘干48 h,测定残渣的DM、NDF、ADF含量^[29],计算目标降解率。

1.4 试验数据统计分析及处理

试验数据采用SAS 9.2软件处理,采用单因素方差分析进行统计分析,各平均值之间用Duncan氏法进行多重比较, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结 果

2.1 蛋白质浓度和酶活测定

在pH 6.6和温度39℃下的试验所用酶的木聚糖酶活、内切葡聚糖酶活和外切葡聚糖酶活被重新测定,结果表明各厂家所提供的酶制剂酶活差异很大,酶的蛋白质浓度也有较大的差异(表1)。

表 1 试验所用 11 种外源纤维酶制剂的木聚糖酶活、内切葡聚糖酶活和外切葡聚糖酶活

Table 1 Activities of xylanase, endoglucanase and exoglucanase in 11 kinds of exogenous fibrolytic enzymes used in this study

外源纤维酶制剂 Exogenous fibrolytic enzymes ¹⁾	蛋白质浓度 Protein concentration/ (mg/g) ²⁾	活力 Activity/(U/g) ³⁾		
		木聚糖酶 Xylanase	内切葡聚糖 Endoglucanase	外切葡聚糖酶 Exoglucanase
CEL-1	61.2	21 166	332	16
CEL-2	14.2	594	200	4
CEL-3	18.1	1 041	867	17
CEL-4	77.5	4 126	520	14
CEL-5	69.9	3 656	1 090	16
XYL-1	55.3	24 349	1 056	6
XYL-2	8.2	29 862	1	1
XYL-3	9.3	28 961	0	4
XYL-4	8.3	1 291	76	3
XYL-5	17.1	47 765	165	12
XYL-6	69.5	48 665	1 020	29

¹⁾ 试验用酶为市售的商业酶制剂,XYL = 木聚糖酶,CEL = 纤维素酶。The enzymes used in this study were commercial enzymes. XYL = xylanase, and CEL = cellulase.

²⁾ 蛋白质浓度是指 1 g 酶制剂中含有蛋白质毫克数。Protein concentration was expressed as mg of protein per g of the enzyme products.

³⁾ 酶活力单位是指在 39 °C、pH 6.6 情况下,在 1 min 内能产生 1 μmol 还原糖的所需要的酶量(g 或者 mL)。Enzyme activities were expressed as μmol of sugar released per min per g or mL of the enzyme products at 39 °C and pH 6.6.

2.2 产气量和产气参数

与对照组相比,纤维素酶组的 48 h 产气量有降低趋势(表 2),其中 CEL-1、CEL-2、CEL-5 组达到了显著水平($P < 0.05$);潜在产气量(a + b)均显著下降($P < 0.05$),其中 CEL-1、CEL-2 组下降程度最大,潜在产气量分别下降了 25.3% 和 21.3%;但是,产气速率(c)均显著加快($P < 0.05$),添加 CEL-1 时可提高产气速率达 82.5%。除 XYL-3 组潜在产气量显著低于对照组($P < 0.05$)外,木聚糖酶组其他产气参数均与对照组无显著差异($P > 0.05$)。

除 XYL-4 对 ADF 降解率效果不显著($P > 0.05$)外,其他酶制剂均显著提高了青贮玉米 DM、NDF、ADF 的降解率($P < 0.05$),其中 CEL-2 组的 DM、NDF 和 ADF 降解率分别达到 65.4%、60.4% 和 61.0%,分别比对照提高了 17.6%、21.5%、19.8%。

2.3 VFA 和甲烷产量

与对照组相比,XYL-1、XYL-4 和 CEL-5 的添加显著提高了总 VFA 产量($P < 0.05$,表 3),但其他酶制剂对总 VFA 产量均无显著影响($P > 0.05$)。添加 XYL-3 和 XYL-4 均显著降低了乙酸

摩尔比和乙酸:丙酸($P < 0.05$),显著提高了丙酸摩尔比($P < 0.05$),但仅 XYL-4 显著提高了丁酸摩尔比($P < 0.05$),其他酶制剂对各种脂肪酸比例的影响均不显著($P > 0.05$)。总体而言,酶制剂对各种脂肪酸的比例影响不大。

由表 4 可知,酶制剂对甲烷产量的影响呈现了较大的变化,在培养 6 h 时,添加 XYL-5、XYL-6 显著降低了甲烷产量($P < 0.05$),而添加 CEL-1、CEL-2 则显著增加了甲烷产量($P < 0.05$)。随着培养时间的延长,到 12 h 时,仅添加 CEL-1 显著影响了甲烷产量($P < 0.05$),而到 24 h 时,酶制剂对甲烷生成的影响变得不再显著($P > 0.05$)。

3 讨论

市面上的酶制剂除了用于饲料添加剂外,有些是设计用于果汁生产、造纸、染料和一些化学工业的^[6],而应用在不同动物上的酶制剂的最适条件也有较大差异,如国外公司提供的纤维素酶活和木聚糖酶活是在 pH 4.8、50 °C 下测得的,而反刍动物瘤胃环境是 pH 6.6 和 39 °C,所以我们测得的酶活比公司提供的酶活略低。在不同的温度和条件下,纤维素酶活和木聚糖酶活有很大的变

化^[23]。因此在利用酶制剂作为动物添加剂时,有必要根据动物消化道的环境条件来测定酶活。

表 2 添加 11 种外源纤维酶制剂对以青贮玉米为底物体外培养试验产气参数以及 DM、NDF、ADF 降解率的影响
Table 2 Effects of 11 kinds of exogenous fibrolytic enzymes on gas production parameters and the degradation rates of DM, NDF and ADF in the *in vitro* test of corn silage as a substrate ($n=3$)

组别 Groups	添加水平 Supplemental level/ (U/g)	产气参数 Gas production parameters			降解率 Degradation rate/%		
		48 h 产气量 48 h gas production/ (mL/g)	潜在产气量 Potential gas production/mL	产气速率 Rate of gas production/ (mL/h)	干物质 DM	中性洗涤纤维 NDF	酸性洗涤纤维 ADF
对照 Control	0	185 ^a	225 ^a	4.0 ^c	55.6 ^d	49.7 ^c	50.9 ^c
XYL-1	40	182 ^a	215 ^{ab}	4.3 ^c	61.2 ^{bc}	59.1 ^{abcd}	59.2 ^{ab}
XYL-2	40	179 ^{ab}	222 ^a	3.7 ^c	59.6 ^c	56.2 ^d	54.6 ^{cd}
XYL-3	40	178 ^{ab}	207 ^b	4.5 ^{de}	60.5 ^{bc}	56.4 ^{cd}	55.8 ^{bc}
XYL-4	40	178 ^{ab}	215 ^{ab}	4.0 ^c	58.8 ^c	57.0 ^{bcd}	51.4 ^{de}
XYL-5	40	181 ^a	225 ^a	3.8 ^c	63.8 ^{ab}	63.0 ^a	60.7 ^a
XYL-6	40	185 ^a	213 ^{ab}	4.6 ^{de}	62.3 ^{abc}	61.0 ^{ab}	57.3 ^{abc}
CEL-1	30	168 ^c	168 ^f	7.3 ^a	61.8 ^{bc}	60.8 ^{ab}	57.5 ^{abc}
CEL-2	30	166 ^c	177 ^{ef}	5.8 ^{bc}	65.4 ^a	60.4 ^{abc}	61.0 ^a
CEL-3	30	182 ^a	192 ^{cd}	6.2 ^b	63.2 ^{ab}	60.7 ^{ab}	58.3 ^{abc}
CEL-4	30	178 ^{ab}	195 ^c	5.3 ^{cd}	63.5 ^{ab}	61.0 ^{ab}	58.7 ^{ab}
CEL-5	30	172 ^{bc}	182 ^{de}	6.1 ^{bc}	62.4 ^{abc}	59.6 ^{abcd}	57.4 ^{abc}
P 值 P-value		0.000 2	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1
SEM		2.7	3.8	0.27	1.09	1.30	1.29

同列数据肩标不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。下表同。

Values in the same column with different small letter superscripts differ differently ($P < 0.05$). The same as below.

表 3 添加 11 种外源纤维酶制剂对青贮玉米为底物体外培养试验 48 h 总 VFA 及单个 VFA 产量的影响
Table 3 Effects of 11 kinds of exogenous fibrolytic enzymes on total and individual VFA yields at 48 h in the *in vitro* test of corn silage as a substrate ($n=3$)

组别 Groups	添加水平 Supplemental level/(U/g)	总 VFA Total VFA/ (mmol/L)	摩尔比 Molar proportion/(mmol/100 mol)			乙酸:丙酸 A:P
			乙酸 Acetate	丙酸 Propionate	丁酸 Butyrate	
对照 Control	0	21.2 ^{cd}	69.3 ^a	22.4 ^c	8.3 ^{bc}	3.10 ^{ab}
XYL-1	40	47.1 ^a	66.2 ^{ab}	25.4 ^{bc}	8.4 ^{bc}	2.61 ^{bcd}
XYL-2	40	24.7 ^{cd}	68.3 ^a	23.4 ^c	8.4 ^{bc}	2.92 ^{abc}
XYL-3	40	29.7 ^{bc}	62.6 ^{bc}	27.9 ^{ab}	9.5 ^{ab}	2.34 ^{cd}
XYL-4	40	37.6 ^b	59.7 ^c	30.2 ^a	10.1 ^a	2.04 ^d
XYL-5	40	16.2 ^d	69.7 ^a	21.9 ^c	8.4 ^{bc}	3.20 ^{ab}
XYL-6	40	17.7 ^d	67.4 ^{ab}	25.0 ^{bc}	7.6 ^c	2.79 ^{abc}
CEL-1	30	20.1 ^d	70.5 ^a	21.2 ^c	8.4 ^{bc}	3.51 ^a
CEL-2	30	19.9 ^d	68.4 ^a	22.3 ^c	9.3 ^{ab}	3.14 ^{ab}
CEL-3	30	21.2 ^{cd}	69.4 ^a	21.4 ^c	9.3 ^{ab}	3.27 ^{ab}
CEL-4	30	24.2 ^{cd}	69.9 ^a	21.1 ^c	9.1 ^{ab}	3.33 ^{ab}
CEL-5	30	49.9 ^a	67.1 ^{ab}	24.2 ^{bc}	8.7 ^{bc}	2.79 ^{abc}
P 值 P-value		<0.000 1	0.000 4	0.000 4	0.001 1	0.000 8
SEM		2.70	1.40	1.25	0.32	0.20

表 4 添加 11 种外源纤维酶制剂对青贮玉米为底物体外培养试验在 6、12、24 h 时甲烷累计产量的影响

Table 4 Effects of 11 kinds of exogenous fibrolytic enzymes on cumulative methane production at 6, 12 and 24 h in the *in vitro* test of corn silage as a substrate ($n=3$)

mL/g

组别 Groups	添加水平 Supplemental level/(U/g)	培养时间 Incubation time/h		
		6	12	24
对照 Control	0	10.0 ^{bc}	27.0 ^{bcd}	59.6 ^{abc}
XYL-1	40	13.1 ^b	33.3 ^{ab}	61.8 ^{abc}
XYL-2	40	11.2 ^{bc}	27.1 ^{bcd}	53.8 ^{bc}
XYL-3	40	10.8 ^{bc}	25.6 ^{cd}	52.6 ^{bc}
XYL-4	40	10.5 ^{bc}	26.7 ^{bcd}	51.3 ^c
XYL-5	40	5.8 ^e	24.1 ^d	60.7 ^{abc}
XYL-6	40	6.3 ^{de}	26.1 ^{cd}	52.6 ^{bc}
CEL-1	30	19.5 ^a	37.1 ^a	65.8 ^{ab}
CEL-2	30	18.2 ^a	33.6 ^{ab}	59.8 ^{abc}
CEL-3	30	13.1 ^b	32.1 ^{abc}	68.9 ^a
CEL-4	30	11.8 ^{bc}	24.6 ^d	56.6 ^{abc}
CEL-5	30	9.1 ^{cd}	25.7 ^{cd}	55.0 ^{bc}
P 值 P-value		<0.000 1	0.003 3	0.119 9
SEM		0.90	2.14	3.75

有试验表明,外源酶制剂添加水平在 0.5 ~ 1.5 mg/g 底物 (DM) 的时候,添加效果最好^[7,9-11,24,30]。根据我们所测得的木聚糖酶活折算,1.5 mg/g 的添加水平酶活大约在 40 U/g,纤维素酶则根据国外酶制剂公司的推荐值以及之前的试验所报道的用量^[31],即 30 U/g 的水平添加。

之前的体外试验证明,纤维酶制剂可以提高苜蓿干草以及青贮玉米的产气量以及 DM、NDF 降解率^[7,10-11,32],但也有试验表明添加酶制剂没有作用,产气量变化也不大^[33],Giraldo 等^[13]利用热带地区干草为底物开展产气试验,结果表明木聚糖酶对产气参数没有任何作用。Beauchemin 等^[6]曾讨论过试验结果缺乏一致性的原因,指出要获得较好的效果,酶与底物的匹配是一个重要的前提,而不仅仅只考虑到酶活大小。Colombatto 等^[24]在 2003 年测量了 23 种酶制剂的蛋白质浓度和 17 种酶活指标,以及酶对青贮玉米和苜蓿干草降解的还原糖产量,对还原糖产量和酶活指标的回归分析显示,酶的蛋白质浓度能解释 60% 左右的还原糖变化,但是酶活只能解释 1/3 的体外 DM 降解率。Eun 等^[10]用 2 种不同的手段证明了影响苜蓿干草和青贮玉米这 2 种底物的体外产气参数的主要酶是外切葡聚糖酶和内切葡聚糖酶。因为青贮玉米中半纤维素含量较少,所以木聚糖酶对青贮玉米的作用较小不难理解,在本试验中,

木聚糖酶一方面对产气量和产气速率没有显著影响,另一方面却提高了 DM、NDF 以及 ADF 降解率,可能的原因是木聚糖酶降解了部分 DM 生成五碳糖,但是五碳糖在微生物体内利用率要显著低于六碳糖^[34],这一推测有待进一步试验验证。

近期的体内试验结果表明,添加酶制剂可降低乙酸:丙酸^[10,32-33,35]。Tirado-Estrada 等^[36]在 2011 年给以玉米干草为基础饲料的 40 只羊羔 [(20 ± 1.6) kg] 的饲料中添加酶制剂,持续饲喂 55 d 后,2 种酶均显著提高了总 VFA 产量,其中纤维素酶显著提高了丙酸百分比,显著降低了丁酸百分比,而且使得乙酸:丙酸显著下降。酶制剂提高发酵 VFA 的产量的原因可能在于改变了瘤胃微生物数量和区系,Chung 等^[14]利用 9 头安装瘤胃瘘管的荷斯坦奶牛,根据 3 × 3 拉丁方试验设计,添加低水平和高水平的酶制剂,在第 15 天和第 19 天采集瘤胃内容物后,利用特异性 16S-rRNA 分析显示,高水平的酶制剂处理中嗜淀粉瘤胃杆菌数量显著上升,产琥珀酸丝状杆菌数量有上升趋势,反刍月形单胞菌的数量随着酶制剂添加水平的增加呈线性递增,低水平的酶处理中牛链球菌数量趋于降低^[14]。产琥珀酸丝状杆菌是瘤胃内主要的纤维素降解菌,反刍月形单胞菌具有琥珀酸脱羧基作用,而反刍动物主要靠微生物的琥珀酸脱羧作用获得丙酸。因此,丙酸比例上升有可能是因

为反刍月形单孢菌数量的上升所导致。此外,考虑到瘤胃原虫也是影响纤维降解的重要因素,所以需要进一步研究酶制剂对原虫的影响。

本试验中,在培养 6 和 12 h 时,酶制剂对甲烷生成呈现不同的变异性,在 24 h 时的甲烷生成似乎不再受到酶制剂的影响(表 4)。Beauchemin 等^[19-20]提到添加酶制剂一方面会增加甲烷的绝对产量,另一方面有可能会降低每千克 DM 或者生产每千克牛奶所生成的甲烷量。但是 Chung 等^[14]的动物试验表明,按全混合日粮 DM 的 0.5 或 1.0 mL/kg 添加酶制剂,无论是每千克饲料 DM 的甲烷排放量还是每千克牛奶所排放的甲烷量都有显著上升;Zhou 等^[37]利用实时定量 PCR 技术分析产奶牛瘤胃内甲烷菌区系发现,加入酶制剂可改变甲烷菌区系,同时增加甲烷产量。本试验中,XYL-5、XYL-6 在培养 6 h 时降低了甲烷生成;但是随着发酵时间延长,甲烷生成逐渐升高的原因还并不很清楚,可能是酶制剂通过改变瘤胃内部微生物数量和比例来提高瘤胃内饲料的利用率,同时也增加甲烷产量。酶制剂的效果还需要通过更为长期的动物试验来验证。

4 结 论

① 体外试验表明,添加外源酶制剂可提高青贮玉米的 DM、NDF、ADF 的降解率,其中添加纤维素酶显著提高了青贮玉米的产气速率,显著降低了潜在产气量,但是木聚糖酶对产气参数影响不显著。

② 在培养前期,添加不同的酶制剂对甲烷生成的影响存在差异性,培养后期无显著影响。

致谢:

本试验在浙江大学奶业科学研究所完成,感谢浙江大学奶业科学研究所的全体师生对此试验的支持以及提出的宝贵意见。试验所用的酶制剂由 4 家酶制剂生产企业提供,在此一并向他们致谢。

参考文献:

- [1] VAN SOEST P J. Nutritional ecology of the ruminant [M]. Ithaca: Cornell University Press, 1994.
- [2] IPCC. Summary for policymakers [M]//METZ B, DAVIDSON O R, BOSCH P R, et al. Climate change 2007: Mitigation. Contribution of Working Group III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge: Cambridge University Press, 2007: 3 - 23.
- [3] BRUINSMA J. World agriculture: towards 2015/2030; an FAO perspective [M]. London: Earthscan/James & James, 2003.
- [4] BEAUCHEMIN K A, COLOMBATTO D, MORGAVI D P, et al. Mode of action of exogenous cell wall degrading enzymes for ruminants [J]. Canadian Journal of Animal Science, 2004, 84(1): 13 - 22.
- [5] BEAUCHEMIN K A, COLOMBATTO D, MORGAVI D P. A rationale for the development of feed enzyme products for ruminants [J]. Canadian Journal of Animal Science, 2004, 84(1): 23 - 36.
- [6] BEAUCHEMIN K A, COLOMBATTO D, MORGAVI D P, et al. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants [J]. Journal of Animal Science, 2003, 81: E37 - E47.
- [7] YANG H E, SON Y S, BEAUCHEMIN K A. Effects of exogenous enzymes on ruminal fermentation and degradability of alfalfa hay and rice straw [J]. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2011, 24(1): 56 - 64.
- [8] HOLTSHAUSEN L, CHUNG Y H, GERARDO-CU-ERVO H, et al. Improved milk production efficiency in early lactation dairy cattle with dietary addition of a developmental fibrolytic enzyme additive [J]. Journal of Dairy Science, 2011, 94(2): 899 - 907.
- [9] COLOMBATTO D, BEAUCHEMIN K A. A protease additive increases fermentation of alfalfa diets by mixed ruminal microorganisms *in vitro* [J]. Journal of Animal Science, 2009, 87(3): 1097 - 1105.
- [10] EUN J S, BEAUCHEMIN K A, SCHULZE H. Use of exogenous fibrolytic enzymes to enhance *in vitro* fermentation of alfalfa hay and corn silage [J]. Journal of Dairy Science, 2007, 90(3): 1440 - 1451.
- [11] EUN J S, BEAUCHEMIN K A, SCHULZE H. Use of an *in vitro* fermentation bioassay to evaluate improvements in degradation of alfalfa hay due to exogenous feed enzymes [J]. Animal Feed Science and Technology, 2007, 135(3/4): 315 - 328.
- [12] NSEREKO V L, MORGAVI D P, RODE L L M, et al. Effects of fungal enzyme preparations on hydrolysis and subsequent degradation of alfalfa hay fiber by mixed rumen microorganisms *in vitro* [J]. Animal Feed Science and Technology, 2000, 88(3/4): 153 - 170.
- [13] GIRALDO L A, RANILLA M J, TEJIDO M L, et al.

- Effect of exogenous fibrolytic enzymes on *in vitro* rumen fermentation of tropical forages [J]. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 2004, 13 : 67 - 70.
- [14] CHUNG Y H, ZHOU M, HOLTSHAUSEN L, et al. A fibrolytic enzyme additive for lactating Holstein cow diets; ruminal fermentation, rumen microbial populations, and enteric methane emissions [J]. *Journal of Dairy Science*, 2012, 95 (3) : 1419 - 1427.
- [15] GRAINGER C, BEAUCHEMIN K A. Can enteric methane emissions from ruminants be lowered without lowering their production? [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2011, 166/167 : 308 - 320.
- [16] BUDDLE B M, DENIS M, ATTWOOD G T, et al. Strategies to reduce methane emissions from farmed ruminants grazing on pasture [J]. *The Veterinary Journal*, 2011, 188 (1) : 11 - 17.
- [17] MARTIN C, MORGAVI D, DOREAU M. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale [J]. *Animal*, 2010, 4 (3) : 351 - 365.
- [18] ECKARD R J, GRAINGER C, DE KLEIN C A M. Options for the abatement of methane and nitrous oxide from ruminant production: a review [J]. *Livestock Science*, 2010, 130 (1/2/3) : 47 - 56.
- [19] BEAUCHEMIN K, MCALLISTER T, MCGINN S. Dietary mitigation of enteric methane from cattle [J]. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 2009, 4 (9) : 1 - 18.
- [20] BEAUCHEMIN K A, KREUZER M, O' MARA F, et al. Nutritional management for enteric methane abatement: a review [J]. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 2008, 48 (2) : 21 - 27.
- [21] GUIN B P, AUBERT J P. The biological degradation of cellulose [J]. *Fems Microbiology Reviews*, 1994, 13 (1) : 25 - 58.
- [22] BIDLACK J, MALONE M, BENSON R. Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992, 72 : 51 - 56.
- [23] BHAT M, HAZLEWOOD G. Enzymology and other characteristics of cellulases and xylanases [C] // BEDFORD M R, PARTRIDGE G G. *Enzymes in farm animal nutrition*. Wallingford; CABI, 2001 : 11 - 60.
- [24] COLOMBATTO D, MORGAVI D P, FURTADO A F, et al. Screening of exogenous enzymes for ruminant diets; relationship between biochemical characteristics and *in vitro* ruminal degradation [J]. *Journal of Animal Science*, 2003, 81 (10) : 2628 - 2638.
- [25] MILLER G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. *Analytical Chemistry*, 1959, 31 (3) : 426 - 428.
- [26] WOOD T M, BHAT K M. Methods for measuring cellulase activities [M] // WILLIS A, WOOD S T K, ed. *Methods in enzymology*. New York: Academic Press, 1988 : 87 - 112.
- [27] BAILEY M J, BIELY P, POUTANEN K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity [J]. *Journal of Biotechnology*, 1992, 23 (3) : 257 - 270.
- [28] MAURICIO R M, MOULD F L, DHANOA M S, et al. A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 1999, 79 (4) : 321 - 330.
- [29] GOERING H K, VAN SOEST P J. Forage fiber analyses (apparatus, reagent, procedure, and some application) [M]. Washington, D. C. : United States Department of Agriculture, 1970 : 1 - 20.
- [30] EUN J S, BEAUCHEMIN K A, HONG S H, et al. Exogenous enzymes added to untreated or ammoniated rice straw; effects on *in vitro* fermentation characteristics and degradability [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2006, 131 (1/2) : 86 - 101.
- [31] GIRALDO L A, TEJIDO M L, RANILLA M J, et al. Effects of exogenous cellulase supplementation on microbial growth and ruminal fermentation of a high-forage diet in Rusitec fermenters [J]. *Journal of Animal Science*, 2007, 85 (8) : 1962 - 1970.
- [32] EUN J S, BEAUCHEMIN K A. Assessment of the potential of feed enzyme additives to enhance utilization of corn silage fibre by ruminants [J]. *Canadian Journal of Animal Science*, 2008, 88 (1) : 97 - 106.
- [33] EUN J S, BEAUCHEMIN K A. Enhancing *in vitro* degradation of alfalfa hay and corn silage using feed enzymes [J]. *Journal of Dairy Science*, 2007, 90 (6) : 2839 - 2851.
- [34] STROBEL H J, DAWSON K A. Xylose and arabinose utilization by the rumen bacterium *butyrivibrio-fibrosolvens* [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1993, 113 (3) : 291 - 296.
- [35] EUN J S, BEAUCHEMIN K A. Assessment of the efficacy of varying experimental exogenous fibrolytic enzymes using *in vitro* fermentation characteristics [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2007, 132 (3/4) : 298 - 315.

- [36] TIRADO-ESTRADA G, MENDOZA-MARTINEZ G D, PINOS-RODRIGUEZ J M, et al. Effects of two fibrolytic enzyme mixtures on growth performance, digestion and ruminal fermentation in lambs fed corn stover based diets[J]. *Journal of Applied Animal Research*, 2011, 39(2): 158 – 160.
- [37] ZHOU M, CHUNG Y H, BEAUCHEMIN K A, et al. Relationship between rumen methanogens and methane production in dairy cows fed diets supplemented with a feed enzyme additive[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2011, 111(5): 1148 – 1158.

Exogenous Fibrolytic Enzymes: Effects on *in Vitro* Fermentation and Methane Production of Corn Silage

CHEN Xing MAO Huiling WANG Jiakun WU Chenhui LIU Jianxin*

(College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: The aim of this study was to investigate the effects of exogenous fibrolytic enzymes on *in vitro* (rumen) fermentation of corn silage. Corn silage as a substrate was added without (control) or with 5 different cellulases (CEL-1, CEL-2, CEL-3, CEL-4 and CEL-5) at 30 units endoglucanase per g of substrate or 6 different xylanases (XYL-1, XYL-2, XYL-3, XYL-4, XYL-5 and XYL-6) at 40 units xylanase per g of substrate using reading pressure technique in a single factor experiment. The results showed as follows: the addition of cellulases resulted in the decreased potential gas production ($P < 0.05$) but the increased rate of gas production ($P < 0.05$) with the highest improvement of the rate of gas production being 82.5% observed in CEL-1 compared with the control group. The addition of xylanase did not affect the gas production parameters ($P > 0.05$) except that the addition of XYL-3 significantly decreased potential gas production ($P < 0.05$). Degradation rates of dry matter, neutral detergent fibre and acid detergent fibre were enhanced by the addition of exogenous fibrolytic enzymes ($P < 0.05$) except that the addition of XYL-4 did not significantly affect the degradation rate of acid detergent fibre ($P > 0.05$). Total volatile fatty acid concentration was increased by the addition of XYL-1, XYL-4 and CEL-5 ($P < 0.05$), the molar proportion of acetate and the ratio of acetate to propionate were significantly decreased ($P < 0.05$), and the molar proportion of propionate was significantly increased ($P < 0.05$), but only the addition of XYL-4 significantly increased the molar proportion of butyrate ($P < 0.05$). The enzymes showed various effects on methane production after 6 and 12 h of incubation, but no effects after 24 h of incubation. It is indicated that addition of exogenous fibrolytic enzymes can increase the degradation rates of dry matter, neutral detergent fiber and acid detergent fiber of corn silage, and change methane production at the earlier stage of incubation. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2013, 25(1): 214-221]

Key words: exogenous fibrolytic enzymes; *in vitro* fermentation; corn silage; ruminant