

# 添加乳酸菌和纤维素酶对豆渣与桑叶混贮品质及体外瘤胃发酵特性的影响

赵超 马广明 吕静怡 姜鑫 张永根\*

(东北农业大学动物科学技术学院, 哈尔滨 150030)

**摘要:** 本试验旨在探究乳酸菌(LAB)和纤维素酶(CE)对豆渣(SR)与桑叶(ML)混贮发酵品质及体外瘤胃发酵特性的影响。试验采用单因素试验设计,设置4个组,分别为对照组(CON组)、LAB组、CE组及LAB+CE组,其中LAB和CE添加量分别为 $1 \times 10^6$  CFU/g和100 U/g。混贮56 d后收集样品并测定相关指标。结果表明:与CON组相比,LAB组和LAB+CE组pH均显著降低( $P < 0.05$ ),而各试验组乳酸和氨态氮含量均显著升高( $P < 0.05$ ),且LAB+CE组达到最高。LAB+CE组中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维和干物质含量均较CON组显著降低( $P < 0.05$ ),而粗蛋白质含量显著提高( $P < 0.05$ )。与CON相比,各试验组发酵液中总挥发性脂肪酸、乙酸、丙酸和丁酸含量均显著升高( $P < 0.05$ ),且LAB+CE组达到最高,而LAB组和LAB+CE组乙酸/丙酸显著降低( $P < 0.05$ )。由此可见,添加LAB或CE均能改善SR和ML混贮的发酵品质和体外瘤胃发酵特性,且LAB和CE混合添加时效果最优。

**关键词:** 豆渣;桑叶;乳酸菌;纤维素酶;混贮

**中图分类号:** S816

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1006-267X(2021)04-2168-10

豆渣(soybean residue, SR)是豆腐、豆浆、腐乳等豆制品加工过程中产生的副产品,在我国产量极为丰富,且非纤维碳水化合物和蛋白质含量高,因而具有很高的营养价值<sup>[1]</sup>。然而由于新鲜SR含水量大,导致其很难长期保存,因而限制了其在动物饲料中的应用<sup>[2]</sup>。目前,青贮发酵是对含水量较高饲料进行长期保存的一种经济有效的方式,这种方式不仅可以缓解废物处理问题,还可以提高动物饲料的利用<sup>[3]</sup>。但饲料含水量过高,导致青贮过程中不良微生物大量繁殖,进而影响饲料的发酵品质<sup>[4]</sup>。由于SR的含水量过高(大于80%),因而在青贮发酵时需将其与一些干物质(DM)含量较高的非常规饲料混合,以调整水分含量,进而达到最佳青贮条件。桑叶(mulberry leaf, ML)作为一种非常规饲料资源,在我国产量极为

丰富<sup>[5]</sup>,目前主要是将新鲜ML晒干、磨碎制成桑叶粉后用于动物饲料中,这种方式简单、方便、易操作。然而,ML高粗纤维含量和一些抗营养因子能抑制动物对营养物质的消化吸收<sup>[6]</sup>,从而限制其在动物饲喂中的应用。因此,将SR与ML进行混合青贮,既可以调整水分含量,延长保存时间,还可以改善饲料的营养价值,这对于提高我国饲料资源利用具有重要意义。

微生物青贮技术可以抑制不良微生物生长、延长贮存时间并减少氨态氮( $\text{NH}_3\text{-N}$ )的产生<sup>[7]</sup>。崔彦召<sup>[8]</sup>研究表明,添加乳酸菌(LAB)不仅可以有效地改善发酵全混合日粮青贮的发酵品质和风味,还能够有效降低其霉菌毒素的含量,从而提高发酵全混合日粮青贮的营养价值和饲喂安全性。王昆昆等<sup>[9]</sup>发现添加LAB可以降低不同比例苜

收稿日期:2020-09-17

基金项目:国家奶产业技术体系项目(CARS-36)

作者简介:赵超(1995—),男,黑龙江双鸭山人,硕士研究生,研究方向为反刍动物营养。E-mail: 37779939@qq.com

\*通信作者:张永根,教授,博士生导师,E-mail: zhangyonggen@sina.com

苜蓿和披碱草混贮的  $\text{NH}_3\text{-N}$  含量,提高水溶性碳水化合物(WSC)含量,从而提高其发酵品质。纤维素酶(cellulase, CE)是一种复合酶,可增加发酵糖的供应量,为 LAB 快速繁殖提供底物,加速 pH 降低,从而进一步提高青贮发酵品质。李春霞<sup>[10]</sup>发现在甘蔗梢青贮中添加纤维素酶、木聚糖酶和果胶酶均能降低中性洗涤纤维(NDF)和酸性洗涤纤维(ADF)含量,提高糖的生成量,进而大幅改善青贮发酵品质。Wang 等<sup>[11]</sup>发现将紫花苜蓿与全株玉米混合青贮可降低不良微生物数量,提高发酵品质及有氧稳定性。

然而,目前有关 LAB 与 CE 的组合添加对 SR 和 ML 混贮发酵品质的影响鲜有报道,需进一步研究。为此,本试验评价了 LAB 和 CE 添加对 SR 与 ML 混合青贮发酵品质及体外瘤胃发酵特性的影响,以期对 SR 和 ML 的合理饲用提供理论依据和技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 青贮饲料调制和样品采集

#### 1.1.1 试验材料

混贮原料:试验所用 SR 和 ML 均购自哈尔滨某股份有限公司。复合乳酸菌剂:由东北农业大学反刍动物营养研究所提供。CE:10 000 U/g,购于哈尔滨某生物技术有限公司。

#### 1.1.2 青贮饲料调制

将 SC 与 ML 按比例在玻璃盆中混合均匀,以鲜重为基础,调整含水量为 65%。试验设置 4 个组,分别为对照组(CON 组)、LAB 组、CE 组及 LAB+CE 组,每组 3 个重复,其中 LAB 和 CE 添加量分别为  $1 \times 10^6$  CFU/g 和 100 U/g。各组中各添加剂均充分溶解在 10 mL 蒸馏水中,随后用微型喷雾器喷洒在 2 kg 混合青贮上,CON 组只喷洒 10 mL 蒸馏水。混合均匀后,将饲料放入聚乙烯袋(40 cm×50 cm)中,并用食品真空封口机密封,置于室温( $28 \pm 3$ ) °C 下进行 8 周青贮发酵。

### 1.2 样品分析

#### 1.2.1 微生物分析

发酵完成后取出样品,采用平板计数法对混合青贮饲料进行微生物分析<sup>[12]</sup>。首先,取样品 10 g 加入 90 mL 灭菌生理盐水中进行提取。其次,将提取液稀释为 9 个梯度( $10^{-1} \sim 10^{-9}$ ),并选取 3 个最适稀释倍数进行细菌群落计数。最后,

取不同浓度的稀释液 100  $\mu\text{L}$  在 MRS 琼脂培养基和紫红色胆汁(VRB)琼脂培养基上均匀涂布,然后置于厌氧培养盒中 30 °C 恒温培养 48 h 后进行 LAB 计数。与上述操作方法一致,分别通过孟加拉红培养基(Rose Bengal agar)和 PDA 琼脂培养基培养后进行酵母菌和霉菌计数(在 28 °C 下培养 72 h)。

#### 1.2.2 发酵品质分析

取 20 g 样品置于 180 mL 蒸馏水中匀浆 1 min,经 4 层纱布过滤,制得青贮饲料并在 4 °C 下保存过夜,然后用定性滤纸过滤。所得滤液立即用 Sartorius PB-10 型 pH 测定仪测定 pH。滤液在 4 °C,12 000×g 条件下离心 10 min,取上清液用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后,用高效液相色谱仪(Waters-600,日本)进行乳酸(LA)含量测定。采用气相色谱仪(岛津 GC-2010,日本)分析滤液中乙酸(AA)含量。 $\text{NH}_3\text{-N}$  含量采用苯酚-次氯酸钠比色法进行测定<sup>[13]</sup>。

#### 1.2.3 化学成分分析

将取出的样品置于 65 °C 烘箱中干燥 48 h,然后用研磨机研磨过 1 mm 筛网。根据 AOAC (1990)中描述的方法,测定样品 DM 含量,并计算干物质回收率(DMR)。使用凯氏定氮仪(Foss, 2300 自动分析仪,瑞典)测定样品粗蛋白质(CP)含量<sup>[14]</sup>。按照 Van Soest 等<sup>[15]</sup>所描述的方法,采用纤维分析仪(ANKOM)测定样品 NDF 和 ADF 含量。WSC 含量采用 3,5-二硝基水杨酸比色法进行测定<sup>[16]</sup>。钙(Ca)和磷(P)含量分别参考国际标准 ISO 27085—2009(高锰酸钾法)和 GOST R 50852—1996(磷钒钼酸比色法)进行测定。

### 1.3 体外发酵

称取 0.5 g 样品放入经 105 °C 烘干 2 h 恒重后的 F75(北京正方兴达科技有限公司)滤袋中并进行封口。然后在早上饲喂前,从 3 头装有永久性瘤胃瘘管的奶牛瘤胃中收集新鲜瘤胃液(奶牛基础饲粮组成及营养水平见表 1),并迅速带回实验室,整个过程中瘤胃液一直处于 39 °C 下厌氧保存。根据 Menke 等<sup>[17]</sup>的报道配制缓冲溶液,并将饱和的二氧化碳( $\text{CO}_2$ )通入配制好的缓冲液中直至缓冲液呈无色透明,此期间缓冲液一直置于 39 °C 水浴锅中。随后将缓冲液与瘤胃液按 2:1 的比例混合均匀,配制发酵液。将装有样品的滤袋与 30 mL 发酵液放入对应编号的发酵瓶中,通入

CO<sub>2</sub>后拧紧瓶盖,并在盖口涂抹少许石蜡,以防出现漏气的情况。将产气记录装置(Cerabar T PMP131)和Alltech公司记录系统相连接,以准确记录产气量。发酵瓶在39℃条件下连续培养48h,且每个样品5个重复并设置3个空白,并在0、2、4、8、12、16、24、36和48h时记录产气数值。体外发酵结束后,立即使用pH测定仪测定发酵液pH,随后取20mL发酵液平均分装于2个15mL离心管中,并分别加入2mL 25%的偏磷酸,充分混匀后置于-20℃保存,直至用于挥发性脂肪酸(VFA)和NH<sub>3</sub>-N含量测定,测定方法与上述饲料测定相同<sup>[18]</sup>。将滤袋取出后立即冲洗至冲洗液清澈无味,随后置于烘箱内烘干(105℃,4h),恒重后称重,用于测定干物质回收率。

#### 1.4 产气量和产气参数计算

发酵后产气量计算公式如下:

$$GP_t = (V_t - V_0) / W$$

式中:GP<sub>t</sub>指混贮后样本在t时间共积累的产气量(mL/g);V<sub>t</sub>为混贮后样本在t时间段产气量(mL/g);V<sub>0</sub>为t时间段空白产气量(mL/g);W为发酵底物的质量(g)。

产气参数根据Ørskov等<sup>[20]</sup>提出的产气模型计算:

$$GP = a + b(1 - \exp^{-ct})$$

式中:GP表示t时间点的累计产气量(mL/g);a表示快速产气部分(mL/g);b表示慢速产气部分(mL/g);c表示产气速率(mL/h)。

#### 1.5 数据处理及统计分析

数据采用SAS软件包(Version 9.4)中的GLM程序进行分析。采用Turkey's作显著性检验,其中P<0.05表示差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 青贮原料化学组成

如表2所示,SR与ML的DM含量分别为16.52%和89.32%,且pH均大于6.0。SC中NDF和ADF含量均高于ML,但WSC含量较低,仅为2.5%。SR中检测到LAB和酵母菌菌落数分别为2.31和2.54 lg(CFU/g),但未检测到霉菌。ML中霉菌和酵母菌菌落数分别为2.17和4.47 lg(CFU/g),而SR和ML中大肠杆菌菌落数

均低于检测水平[<2.00 lg(CFU/g)]。

表1 基础饲料组成及营养水平(干物质基础)

Table 1 Composition and nutrient levels of the

basal diet (DM basis)

%

项目 Items	含量 Content
原料 Ingredients	
玉米 Corn	13.20
麦麸 Wheat bran	3.78
糖蜜 Molasses	0.99
豆粕 Soybean meal	3.16
干酒糟及其可溶物 Distillers dried grains with solubles	5.72
棉籽粕 Cottonseed meal	2.05
玉米纤维饲料 Corn gluten feed	7.42
玉米胚芽粕 Corn germ meal	4.51
预混料 Premix <sup>1)</sup>	0.49
玉米青贮 Corn silage	15.70
羊草 <i>Leymus chinensis</i>	42.98
合计 Total	100.00
营养水平 Nutrient levels <sup>2)</sup>	
泌乳净能 NE <sub>L</sub> /(MJ/kg)	5.44
粗蛋白质 CP	14.30
中性洗涤纤维 NDF	49.20
酸性洗涤纤维 ADF	3.05
钙 Ca	0.60
磷 P	0.40

1) 每千克预混料含有 One kg premix contained the following: Co 11 mg, Cu 577 mg, Fe 4 858 mg, I 51 mg, Mn 1 806 mg, Se 13 mg, Zn 1 694 mg, VA 115 240 IU, VD 46 100 IU, VE 576 IU。

2) 泌乳净能为计算值<sup>[19]</sup>,其他为实测值。NE<sub>L</sub> was a calculated value<sup>[19]</sup>, while the others were measured value.

### 2.2 青贮饲料化学成分分析

由表3可知,与CON组相比,CE组与LAB+CE组DM含量显著提高(P<0.05),而与LAB组相比无显著差异(P>0.05)。LAB组、CE组及LAB+CE组CP含量较CON组分别提高16.45%、11.30%、19.60%(P<0.05)。与CON组相比,各试验组ADF含量显著下降(P<0.05),且CE组和LAB+CE组NDF含量显著降低(P<0.05),但LAB组NDF含量无显著变化(P>0.05)。此外,各试验组间WSC含量差异并不显著(P>0.05),但均较CON组略微降低。

表 2 混合青贮前 SR 和 ML 的营养组成及微生物群落数(干物质基础)

Table 2 Nutrient composition and microbial community number of SR and ML before mixed silage (DM basis)

项目 Items	豆渣 Soybean residue	桑叶 Mulberry leaf
营养组成 Nutrient composition/%		
干物质 DM	16.52	89.32
粗蛋白质 CP	12.53	15.63
中性洗涤纤维 NDF	56.12	33.27
酸性洗涤纤维 ADF	30.25	27.83
水溶性碳水化合物 WSC	2.50	13.85
pH	6.62	6.53
微生物群落数 Microbial community number/[lg(CFU/g)]		
乳酸菌 LAB	2.31	<2.00
肠杆菌 CB	<2.00	<2.00
霉菌 Molds	ND	2.17
酵母菌 Yeast	2.54	4.47

ND 表示为未检出。下表同。ND mean not detected. The same as below.

表 3 LAB 和 CE 对 SR 与 ML 混贮的化学成分的影响(干物质基础)

Table 3 Effects of compound lactic acid bacteria and cellulase on chemical composition of mixed silage of soybean residue and mulberry leaves (DM basis)

项目 Items	组别 Groups				SEM	P 值 P-value
	CON	LAB	CE	LAB+CE		
干物质 DM	33.56 <sup>b</sup>	33.98 <sup>ab</sup>	35.85 <sup>a</sup>	34.58 <sup>a</sup>	0.47	<0.01
粗蛋白质 CP	13.01 <sup>a</sup>	15.15 <sup>b</sup>	14.48 <sup>b</sup>	15.56 <sup>b</sup>	0.43	<0.01
中性洗涤纤维 NDF	41.54 <sup>a</sup>	42.15 <sup>a</sup>	33.14 <sup>b</sup>	32.84 <sup>b</sup>	1.31	<0.01
酸性洗涤纤维 ADF	33.16 <sup>a</sup>	33.07 <sup>a</sup>	21.98 <sup>b</sup>	22.11 <sup>b</sup>	0.77	<0.01
水溶性碳水化合物 WSC	0.72	0.66	0.70	0.67	0.13	0.08

同行数据肩标不同字母表示差异显著( $P<0.05$ )。下表同。

Values with different letter superscripts within the same row differ significantly ( $P<0.05$ ). The same as below.

### 2.3 青贮饲料发酵品质分析

由表 4 可知,与 CON 组相比,LAB+CE 组干物质回收率显著提高( $P<0.05$ ),而 LAB 组和 CE 组间无显著差异( $P>0.05$ )。各试验组 pH 均较 CON 组显著降低( $P<0.05$ ),其中 LAB+CE 组达到最低,LAB 组和 LAB+CE 组之间差异不显著( $P>0.05$ )。与 CON 组相比,LAB 组和 LAB+CE 组  $\text{NH}_3\text{-N}$  含量均显著下降( $P<0.05$ ),与 CON 组相比,各试验组乳酸含量均显著提高( $P<0.05$ ),且 LAB+CE 组达到最高。各试验组乙酸含量均显著高于 CON 组( $P<0.05$ ),且 LAB+CE 组达到最高。

### 2.4 青贮饲料微生物群落变化

由表 5 可知,混贮后 CON 组、LAB 组、CE 组、LAB+CE 组的 LAB 菌落数分别为 7.33、8.02、7.98 和 8.75 lg(CFU/g)。大肠杆菌菌落数除 CON 组

为 2.21 lg(CFU/g) 外,其余各组均低于检测水平 [ $<2.00$  lg(CFU/g)]。酵母菌菌落数在各试验组中均低于检测水平 [ $<2.00$  lg(CFU/g)],但在 CON 组中检测值为 3.04 lg(CFU/g)。LAB 组和 LAB+CE 组均未检测到霉菌,且 CON 组和 CE 组霉菌菌落数均低于检测水平 [ $<2.00$  lg(CFU/g)]。

### 2.5 LAB 和 CE 对 SR 与 ML 混贮体外发酵产气量影响

由表 5 可知,随发酵时间延长各组产气量均呈现上升趋势。与 CON 组相比,发酵 2 h 时 LAB 组产气量显著升高( $P<0.05$ ),而其他组无显著变化( $P>0.05$ )。发酵 4 h 后,各试验组产气量均较 CON 组升高,且 LAB+CE 组产气量在各时间点均显著高于 CON 组( $P<0.05$ )。与 CON 组相比,各试验组快速发酵部分产气量(a)和慢速发酵部分

产气量 (b) 均较 CON 组显著增加 ( $P<0.05$ ), 且 LAB+CE 组达到最高。除 CE 组外, 其他各试验组潜在产气量 (a+b) 均显著高于 CON 组 ( $P<0.05$ ),

且 LAB+CE 组最高。此外, LAB 组和 CE 组有效产气速率 (c) 均较 CON 组显著降低 ( $P<0.05$ ), 但 LAB+CE 组无显著变化 ( $P>0.05$ )。

表 4 LAB 和 CE 对 SR 与 ML 混贮的发酵品质影响

Table 4 Effects of compound lactic acid bacteria and cellulase on fermentation quality of mixed silage of soybean residue and mulberry leaves

项目 Items	组别 Groups				SEM	P 值 P-value
	CON	LAB	CE	LAB+CE		
干物质回收率 DMR/%	94.51 <sup>a</sup>	94.10 <sup>a</sup>	96.65 <sup>ab</sup>	97.58 <sup>b</sup>	1.59	<0.01
pH	3.81 <sup>a</sup>	3.79 <sup>c</sup>	3.92 <sup>b</sup>	3.78 <sup>c</sup>	0.02	<0.01
氨态氮 NH <sub>3</sub> -N/(mmol/L)	7.82 <sup>a</sup>	5.83 <sup>b</sup>	6.93 <sup>a</sup>	5.39 <sup>c</sup>	0.01	<0.01
乳酸 Lactic acid/(mmol/L)	2.97 <sup>a</sup>	4.01 <sup>c</sup>	3.75 <sup>b</sup>	4.12 <sup>d</sup>	0.26	<0.01
乙酸 Acetic acid/(mmol/L)	1.40 <sup>a</sup>	1.64 <sup>b</sup>	1.51 <sup>b</sup>	1.69 <sup>b</sup>	0.25	<0.01

表 5 LAB 和 CE 对 SR 与 ML 混贮的微生物群落影响

Table 5 Effects of compound lactic acid bacteria and cellulase on microbial community of mixed silage of soybean residue and mulberry leaves lg(CFU/g)

项目 Items	组别 Groups				SEM	P 值 P-value
	CON	LAB	CE	LAB+CE		
乳酸菌 LAB	7.33 <sup>d</sup>	8.02 <sup>b</sup>	7.98 <sup>c</sup>	8.75 <sup>a</sup>	0.04	<0.01
肠杆菌 CB	2.21	<2.00	<2.00	<2.00	-	-
霉菌 Molds	<2.00	ND	<2.00	ND	-	-
酵母菌 Yeast	3.04	<2.00	<2.00	<2.00	-	-

表 6 LAB 和 CE 对 SR 与 ML 混贮的产气量及产气参数的影响

Table 6 Effects of compound lactic acid bacteria and cellulase on gas production and parameters of mixed silage of soybean residue and mulberry leaves

项目 Items	组别 Groups				SEM	P 值 P-value
	CON	LAB	CE	LAB+CE		
产气量 Gas production/(mL/g)						
2 h	13.12 <sup>b</sup>	14.15 <sup>a</sup>	13.26 <sup>b</sup>	14.38 <sup>b</sup>	1.18	0.01
4 h	19.96 <sup>a</sup>	21.77 <sup>b</sup>	20.90 <sup>ab</sup>	22.82 <sup>b</sup>	3.36	<0.01
8 h	50.91 <sup>a</sup>	52.63 <sup>a</sup>	51.97 <sup>a</sup>	54.97 <sup>b</sup>	3.47	<0.01
12 h	60.33 <sup>c</sup>	63.03 <sup>b</sup>	61.94 <sup>bc</sup>	64.30 <sup>a</sup>	2.59	<0.01
24 h	91.57 <sup>b</sup>	93.26 <sup>a</sup>	94.97 <sup>ab</sup>	98.23 <sup>a</sup>	2.85	<0.01
36 h	118.90 <sup>c</sup>	125.16 <sup>b</sup>	121.81 <sup>b</sup>	139.93 <sup>a</sup>	2.77	<0.01
48 h	136.15 <sup>c</sup>	141.62 <sup>b</sup>	138.31 <sup>c</sup>	147.77 <sup>a</sup>	2.60	<0.01
产气参数 Gas parameters						
a/(mL/g)	1.14 <sup>c</sup>	1.69 <sup>b</sup>	1.62 <sup>b</sup>	1.82 <sup>a</sup>	0.27	0.01
b/(mL/g)	157.63 <sup>d</sup>	165.57 <sup>c</sup>	158.10 <sup>b</sup>	179.43 <sup>a</sup>	1.91	<0.01
a+b/(mL/g)	158.67 <sup>b</sup>	167.18 <sup>c</sup>	155.62 <sup>b</sup>	181.91 <sup>a</sup>	2.06	<0.01
c/(mL/h)	0.04 <sup>ab</sup>	0.04 <sup>b</sup>	0.04 <sup>b</sup>	0.05 <sup>a</sup>	0.03	<0.01

a: 快速产气部分; b: 慢速产气部分; a+b: 潜在产气量; c: 产气速率。

a: gas production of the rapid fermentation fraction; b: gas production of the slow fermentation fraction; a+b: potentially gas production; c: the rate of gas production.

## 2.6 LAB 和 CE 对 SR 与 ML 混贮体外瘤胃发酵参数影响

由表 7 可知,LAB 组和 CE 组发酵液中乙酸、丙酸和丁酸含量均较 CON 组显著升高 ( $P<0.05$ ),但各试验间差异不显著 ( $P>0.05$ )。与 CON 组相

比,各试验组发酵液中总挥发性脂肪酸含量显著提高 ( $P<0.05$ ),且 LAB+CE 组产量最高。各试验组乙酸/丙酸均较 CON 组显著降低 ( $P<0.05$ ),且 LAB 组达到最低。

表 7 LAB 和 CE 对 SR 与 ML 混贮体外瘤胃发酵特性的影响

Table 7 Effects of compound lactic acid bacteria and cellulase on rumen fermentation characteristics *in vitro* of mixed silage of soybean residue and mulberry leaves

项目 Items	组别 Groups				SEM	P 值 P-value
	CON	LAB	CE	LAB+CE		
pH	6.72 <sup>a</sup>	6.68 <sup>a</sup>	6.60 <sup>b</sup>	6.56 <sup>b</sup>	0.02	<0.01
总挥发性脂肪酸 TVFA/(mmol/L)	46.83 <sup>a</sup>	55.13 <sup>b</sup>	53.03 <sup>b</sup>	56.51 <sup>b</sup>	0.01	<0.01
乙酸 AA/(mmol/L)	33.51 <sup>a</sup>	38.00 <sup>b</sup>	37.22 <sup>b</sup>	38.64 <sup>b</sup>	0.73	0.02
丙酸 PA/(mmol/L)	10.93 <sup>b</sup>	13.71 <sup>a</sup>	12.65 <sup>ab</sup>	14.13 <sup>a</sup>	0.79	<0.01
丁酸 BA/(mmol/L)	2.44 <sup>b</sup>	3.43 <sup>a</sup>	3.10 <sup>bc</sup>	3.61 <sup>a</sup>	0.13	0.01
乙酸/丙酸 AA/PA	3.06 <sup>a</sup>	2.77 <sup>b</sup>	2.94 <sup>c</sup>	2.73 <sup>b</sup>	0.05	0.02

## 3 讨论

### 3.1 LAB 和 CE 对 SR 与 ML 混贮饲料化学组成的影响

本试验中,LAB 组和 LAB+CE 组 DM 含量均较 CON 组显著升高,原因可能是由于 LAB 在混贮过程中能产生更多的乳酸,从而导致 pH 快速降低,抑制不良微生物生长,进而减小 DM 流失<sup>[21]</sup>。各试验组 WSC 含量均较 CON 组降低,原因可能是由于 LAB 在混贮发酵过程中会消耗大量的 WSC,从而促进 LAB 快速生长与繁殖,进而促进有机酸的产生。王力生等<sup>[22]</sup>研究指出添加微生物制剂能够显著降低笋壳青贮中 WSC 含量,与本研究结果一致。NDF 和 ADF 是反映饲料中纤维质量好坏的重要指标。由于 ADF 在动物体内很难消化吸收,所以 ADF 含量越低,说明混贮发酵质量越高<sup>[23]</sup>。本试验中,LAB+CE 组中 NDF 和 ADF 含量较 CON 组显著降低。一方面可能是由于 CE 添加促进了 SR 和 ML 混贮中纤维的降解;另一方面可能是由于 LAB 在混贮发酵过程中会降解碳水化合物产生 CO<sub>2</sub>,从而导致纤维含量降低。这与赵华等<sup>[24]</sup>试验结果相符。同时 Mu 等<sup>[25]</sup>指出,CE 与 LAB 混合添加对高水分苜菜和稻草混合青贮的化学成分、细菌群落及有氧稳定性均好于单一添加 LAB。以上研究结果表明 LAB 和 CE 添加能够提高 SR 和 ML 混贮的营养价值。

### 3.2 LAB 和 CE 对 SR 与 ML 混贮饲料发酵品质的影响

在混贮发酵过程中,梭菌等不良微生物的存在会抑制 LAB 生长,促进丁酸产生,引起乳酸发酵路线出现偏离,从而导致蛋白质降解为 NH<sub>3</sub>-N,进而引起饲料营养流失<sup>[26]</sup>。本试验中,LAB+CE 组 NH<sub>3</sub>-N 含量较 CON 组显著降低,原因可能是添加 CE 能够将纤维降解为 WSC,从而为 LAB 生长提供充足的营养物质,促进乳酸产生,进而抑制梭菌等不良微生物在混贮饲料中生长。此外,本研究中 LAB 组、CE 组和 LAB+CE 组均为未检测到丁酸也证实了这一假设。

pH 是评价青贮发酵质量好坏的重要指标,其变化取决于青贮 DM、化学成分和青贮周期。Nishino 等<sup>[27]</sup>研究发现添加 LAB 可显著降低全混合日粮青贮的 pH,从而提高其发酵品质和有氧稳定性。本试验中,各试验组间 pH 均低于 4.00,原因可能是接种 LAB 增加了初始乳酸菌数量,从而促进乳酸产生,进而导致 pH 下降<sup>[28]</sup>。Zhang 等<sup>[29]</sup>试验结果表明添加干酪乳杆菌能够降低羊草青贮的 pH,这与本研究结果相似。同时,Liu 等<sup>[30]</sup>评估了添加剂对全混合日粮青贮发酵品质的影响,发现添加干酪乳杆菌和纤维素酶的全混合日粮青贮中乳酸含量达到 3.8% (DM),这与本试验中添加 LAB 和 CE 混贮产生的乳酸含量 (4.12% DM) 相近。Nishino 等<sup>[31]</sup>在水分含量较高

(85.5%)的豚草青贮饲料中观察到较高的乙酸含量(5.64 g/kg DM)。与此不同,本研究中3个试验组的乙酸含量较低。这种差异可能是由于混贮饲料中的细菌群落来自不同的环境、自身特性或原料上的微生物数量不同所致<sup>[32]</sup>。然而,菌酶协同改善饲料混贮发酵品质的机理还有待进一步研究。

一般来说,是否需要向青贮饲料中加入添加剂取决于附着在青贮饲料上的微生物数量和种类<sup>[33]</sup>。对于保存较好的混贮饲料,混贮时 LAB 的菌落数至少达到  $1 \times 10^5$  CFU/g<sup>[34]</sup>。然而,在原料中观察到 SR 的 LAB 菌落数仅为 2.3 lg(CFU/g)。ML 的 LAB 菌落数低于 2.00 lg(CFU/g),且不良微生物数量较高,这可能影响发酵品质。为保证混贮饲料快速发酵并抑制有害微生物的生长,在青贮饲料发酵的早期阶段,需要通过加入添加剂,如 LAB 或 CE,提高 LAB 发酵能力,使其主导微生物发酵。

### 3.3 LAB 和 CE 对 SR 与 ML 混贮体外瘤胃发酵特性的影响

混贮经瘤胃微生物发酵后的产气量是评价混贮可发酵程度的重要指标,因为混贮后饲料产气量与养分可消化程度呈正相关<sup>[35]</sup>。本试验结果表明,LAB+CE 组体外产气量较对照组显著升高,说明 LAB 和 CE 添加具有提高 SR 和 ML 混贮体外瘤胃消化率的潜力。一般来说,稳定的内部环境是保证瘤胃功能正常的必要条件,而 pH 则是反映瘤胃内部环境的主要指标,当 pH 不在正常范围内时,瘤胃微生物的活性就会受到影响<sup>[36]</sup>。本试验中,LAB+CE 组和 CE 组发酵液 pH 显著降低,但仍处于正常范围内,说明瘤胃发酵环境处于稳定状态,能促进微生物的生长和代谢。本研究中瘤胃 pH 下降可能主要因为 VFA 的产生,且随着在混贮中添加 LAB 和 CE,VFA 含量显著提高,进而导致 pH 呈降低趋势。LAB+CE 组 VFA 含量增加的原因可能是由于 LAB 和 CE 添加促进了混贮饲料中碳水化合物在瘤胃中的降解,进而改善瘤胃发酵。

## 4 结 论

本试验结果表明,LAB 与 CE 组合添加可提高 SR 和 ML 混贮饲料乳酸和粗蛋白质含量,降低  $\text{NH}_3\text{-N}$  含量和 pH,从而提高其营养价值。此外,

SR 和 ML 混贮中添加 LAB 和 CE 后其体外瘤胃发酵特性也得到改善。因此,LAB 和 CE 混合添加可大幅改善 SR 和 ML 混贮品质,使其具有应用在奶牛生产中的潜力。

### 参考文献:

- [1] SHI M, YANG Y N, GUAN D, et al. Bioactivity of the crude polysaccharides from fermented soybean curd residue by *Flammulina velutipes* [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 89(4): 1268-1276.
- [2] CHEN Y, YE R, YIN L, et al. Novel blasting extrusion processing improved the physicochemical properties of soluble dietary fiber from soybean residue and *in vivo* evaluation [J]. Journal of Food Engineering, 2014, 120: 1-8.
- [3] LI B, QIAO M Y, LU F. Composition, nutrition, and utilization of Okara (soybean residue) [J]. Food Reviews International, 2012, 28(3): 231-252.
- [4] MCDONALD P, HENDERSON A R, HERON S J E. The biochemistry of silage [M]. 2nd ed. Marlow, Berkshire, UK: Chalcombe Publ., 1991.
- [5] 韩世玉. 桑树资源概况及其多元化利用 [J]. 贵州农业科学, 2006(3): 118-121.  
HAN S Y. Mulberry resources and its diversified utilization [J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2006(3): 118-121. (in Chinese)
- [6] 王熙涛, 何连芳, 张玉苍. 利用乳酸菌发酵桑树叶生产非常规饲料的研究 [J]. 饲料工业, 2010, 31(1): 49-52.  
WANG X T, HE L F, ZHANG Y C. Study on fermenting mulberry leaf to produce unconventional fodder by using lactic acid bacteria [J]. Feed Industry, 2010, 31(1): 49-52. (in Chinese)
- [7] 刘帅. 鼠李糖乳杆菌对全株玉米青贮和发酵全混合日粮品质的影响 [D]. 硕士学位论文. 哈尔滨: 东北农业大学, 2019.  
LIU S. Effect of supplementing *Lactobacillus rhamnosus* GG on the quality of whole plant corn silage and fermented total mixed ration [D]. Master's Thesis. Harbin: Northeast Agricultural University, 2019. (in Chinese)
- [8] 崔彦召. 乳酸菌剂对发酵全混合日粮品质及 6 种霉菌毒素含量的影响 [D]. 硕士学位论文. 南京: 南京农业大学, 2011.  
CUI Y Z. Effect of lactic acid bacteria inoculants on quality and the content of 6 mycotoxins in fermented total mixed ration [D]. Master's Thesis. Nanjing: Nan-

- jing Agricultural University, 2011. (in Chinese)
- [ 9 ] 王昆昆, 玉柱, 邵涛, 等. 乳酸菌制剂对不同比例苜蓿和披碱草混贮发酵品质的影响 [ J ]. 草业学报, 2010, 19(4) : 94-100.  
WANG K K, YU Z, SHAO T, et al. Effects of *Lactobacillus* on fermentation quality of mixed silage of *Medicago sativa* and *Elymus dahuricus* [ J ]. Acta Prataculturae Sinica, 2010, 19(4) : 94-100. (in Chinese)
- [ 10 ] 李春霞. 纤维酶制剂对甘蔗梢营养成分的影响 [ D ]. 硕士学位论文. 福州: 福建农林大学, 2010.  
LI C X. Effects of fiber enzymes on nutritions of sugarcane tip [ D ]. Master's Thesis. Fuzhou: Fujian Agriculture And Forestry University, 2010. (in Chinese)
- [ 11 ] WANG M S, FRANCO M, CAI Y M, et al. Dynamics of fermentation profile and bacterial community of silage prepared with alfalfa, whole-plant corn and their mixture [ J ]. Animal Feed Science and Technology, 2020, 270: 114702.
- [ 12 ] 张玲. 微生物学实验指导 [ M ]. 北京: 北京交通大学出版社, 2007: 54-56.  
ZHANG L. Guidance of microbiological experiment [ M ]. Beijing: Beijing Jiaotong University Press, 2007: 54-56. (in Chinese)
- [ 13 ] SALAWU M B, ACAMOVIC T, STEWART C S, et al. The use of tannins as silage additives: effects on silage composition and mobile bag disappearance of dry matter and protein [ J ]. Animal Feed Science and Technology, 1999, 82(3/4) : 243-259.
- [ 14 ] 张丽英. 饲料分析及饲料质量检测技术 [ M ]. 3 版. 北京: 中国农业大学出版社, 2007.  
ZHANG L Y. Feed analysis and feed quality detection technology [ M ]. 3rd ed. Beijing: China Agricultural University Press, 2007. (in Chinese)
- [ 15 ] VAN SOEST P J, ROBERTSON J B, LEWIS B A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition [ J ]. Journal of Dairy Science, 1991, 74(10) : 3583-3597.
- [ 16 ] 董志浩, 原现军, 闻爱友, 等. 添加乳酸菌和发酵底物对桑叶青贮发酵品质的影响 [ J ]. 草业学报, 2016, 25(6) : 167-174.  
DONG Z H, YUAN X J, WEN A Y, et al. Effect of lactic acid bacteria and fermentation substrates on the quality of mulberry (*Morus alba*) leaf silage. [ J ] Acta Prataculturae Sinica, 2016, 25(6) : 167-174. (in Chinese)
- [ 17 ] MENKE K H, STEINGASS H. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid [ J ]. Animal Research and Development, 1988, 28: 7-55.
- [ 18 ] MOSS A R, JOUANY J P, NEWBOLD J. Methane production by ruminants: its contribution to global warming [ J ]. Annales de Zootechnie, 2000, 49(3) : 231-253.
- [ 19 ] 陆治年, 冯仰廉. 奶牛营养需要和饲料成分 [ M ]. 北京: 中国农业大学出版社, 2007.  
LU Z N, FENG Y L. Nutrition requirement and feed composition of dairy cattle [ M ]. Beijing: China Agricultural University Press, 2007. (in Chinese)
- [ 20 ] ØRSKOV E R, MCDONALD I M. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighed according to rate of passage [ J ]. The Journal of Agricultural Science, 1979, 92(2) : 499-503.
- [ 21 ] CAI Y M, MURAI M, FUJITA Y, et al. Application of lactic acid bacteria (*Lactobacillus plantarum* Chikusol-1) for silage preparation of forage paddy rice [ J ]. Journal of Grassland Science, 2003, 49(5) : 477-485.
- [ 22 ] 王力生, 齐永玲, 陈芳, 等. 不同添加剂对笋壳青贮品质和营养价值的影响 [ J ]. 草业学报, 2013, 22(5) : 326-332.  
WANG L S, QI Y L, CHEN F, et al. Effect of different additives on the quality and nutritional value of bamboo shoot shell silage [ J ]. Acta Prataculturae Sinica, 2013, 22(5) : 326-332. (in Chinese)
- [ 23 ] 周娟娟, 魏巍, 秦爱琼, 等. 水分和添加剂对辣椒秸秆青贮品质的影响 [ J ]. 草业学报, 2016, 25(2) : 231-239.  
ZHOU J J, WEI W, QIN A Q, et al. Effect of moisture and additives on the quality of pepper straw silage [ J ]. Acta Prataculturae Sinica, 2016, 25(2) : 231-239. (in Chinese)
- [ 24 ] 赵华, 汤小朋, 汤加勇, 等. 复合生态菌固态发酵木薯渣工艺参数优化及混菌发酵对木薯渣营养品质的影响 [ J ]. 中国畜牧杂志, 2016, 52(5) : 55-59, 92.  
ZHAO H, TANG X P, TANG J Y, et al. Solid-state fermentation parameters optimization and nutritional improvement of cassava residue with complex culture of microbial strains [ J ]. Chinese Journal of Animal Science, 2016, 52(5) : 55-59, 92. (in Chinese)
- [ 25 ] MU L, XIE Z, HU L X, et al. Cellulase interacts with *Lactobacillus plantarum* to affect chemical composition, bacterial communities, and aerobic stability in mixed silage of high-moisture amaranth and rice straw

- [J]. *Bioresource Technology*, 2020, 315: 123772.
- [26] MUCK R. Recent advances in silage microbiology [J]. *Agricultural and Food Science*, 2013, 22(1): 3–15.
- [27] NISHINO N, HATTORI H. Resistance to aerobic deterioration of total mixed ration silage inoculated with and without homofermentative or heterofermentative lactic acid bacteria [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2010, 87(13): 2420–2426.
- [28] HEINRITZ S N, MARTENS S D, AVILA P, et al. The effect of inoculant and sucrose addition on the silage quality of tropical forage legumes with varying ensilability [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2012, 174(3/4): 201–210.
- [29] ZHANG Q, YU Z, YANG H, et al. The effects of stage of growth and additives with or without cellulase on fermentation and *in vitro* degradation characteristics of *Leymus chinensis* silage [J]. *Grass and Forage Science*, 2016, 71(4): 595–606.
- [30] LIU Q H, LI X Y, DESTA S T, et al. Effects of *Lactobacillus plantarum* and fibrolytic enzyme on the fermentation quality and *in vitro* digestibility of total mixed rations silage including rape straw [J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2016, 15(9): 2087–2096.
- [31] NISHINO N, LI Y, WANG C, et al. Effects of wilting and molasses addition on fermentation and bacterial community in guinea grass silage [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2012, 54(3): 175–181.
- [32] GUAN H, YAN Y H, LI X L, et al. Microbial communities and natural fermentation of corn silages prepared with farm bunker-silo in Southwest China [J]. *Bioresource Technology*, 2018, 265: 282–290.
- [33] CAI Y M, BENNO Y, OGAWA M, et al. Effect of applying lactic acid bacteria isolated from forage crops on fermentation characteristics and aerobic deterioration of silage [J]. *Journal of Dairy Science*, 1999, 82(3): 520–526.
- [34] YANG J S, TAN H S, CAI Y M. Characteristics of lactic acid bacteria isolates and their effect on silage fermentation of fruit residues [J]. *Journal of Dairy Science*, 2016, 99(7): 5325–5334.
- [35] MENKE K H, RAAB L, SALEWSKI A, et al. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro* [J]. *Journal of Agricultural Science*, 1979, 93(1): 217–222.
- [36] RUSSELL J B. The importance of pH in the regulation of ruminal acetate to propionate ratio and methane production *in vitro* [J]. *Journal of Dairy Science*, 1998, 81(12): 3222–3230.

## Effects of Adding Lactic Acid Bacteria and Cellulase on Quality of Mixed Silage of Soybean Residue and Mulberry Leaves and Rumens Fermentation Characteristics *In Vitro*

ZHAO Chao MA Guangming LYU Jingyi JIANG Xin ZHANG Yonggen\*  
(College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

**Abstract:** This study aimed to explore the effects of addition of lactic acid bacteria (LAB) and cellulase (CE) on silage quality and *in vitro* rumen fermentation characteristics of mixed silage of soybean residue (SR) and mulberry leaves (ML). The experiment was designed by a single factor experiment. Four groups were set, namely, control group (CON group), LAB group, CE group, and LAB+CE group. The amount of lactic acid bacteria added was  $1 \times 10^6$  CFU/g, and the amount of cellulase added was 100 U/g. After 56 days of mixed storage, the routine chemical composition, fermentation quality, *in vitro* gas production and rumen fermentation were measured. The results showed that the pH of both LAB and CE groups was significantly lower than that of the CON group ( $P < 0.05$ ), while the contents of lactic acid and ammonia nitrogen of each treatment groups were significantly higher than those of the CON group, and reached the highest level in LAB+CE group. Compared with CON group, the contents of neutral detergent fiber, acid detergent fiber and dry matter of LAB+CE group were significantly decreased ( $P < 0.05$ ), while the crude protein content was significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with the CON group, the contents of total volatile fatty acid (TVFA), acetic acid (AA), propionic acid (PA) and butyric acid (BA) of each treatment group were significantly increased ( $P < 0.05$ ) after 48 h *in vitro* fermentation, and reached the highest level in the LAB+CE group. The ratio of acetic acid to propionic acid was decreased significantly after adding LAB or CE ( $P < 0.05$ ). The results show that adding LAB or CE to SR and ML in mixed storage can effectively improve the quality of mixed storage and *in vitro* rumen digestibility, and the mixed addition of LAB and CE has a better effect. [ *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2021, 33(4):2168-2177 ]

**Key words:** soybean residue; mulberry leaf; lactic acid bacteria; cellulase; mixed silage