

doi:10.11733/j.issn.1007-0435.2026.08.035

引用格式:张艳威,毛玉青,王鹏,等.接种产阿魏酸酯酶罗伊氏乳杆菌对苜蓿裹包青贮发酵、抗氧化及消化率的影响[J].草地学报,2026,34(8):3131-3140

ZHANG Yan-wei, MAO Yu-qing, WANG Peng, et al. Effects of Inoculating Feruloyl Esterase-Producing *Lactobacillus reuteri* on the Fermentation, Antioxidant and Digestibility of Alfalfa Baled Silage[J]. Acta Agrestia Sinica, 2026, 34(8):3131-3140

接种产阿魏酸酯酶罗伊氏乳杆菌对苜蓿裹包青贮发酵、抗氧化及消化率的影响

张艳威¹, 毛玉青¹, 王 鹏¹, 陶有艳¹, 郭旭生², 李福厚^{1*}

(1. 吉林大学动物科学学院, 吉林 长春 130062; 2. 兰州大学生命科学学院, 甘肃 兰州 730000)

摘要:为探讨接种产阿魏酸酯酶的罗伊氏乳杆菌 A4-2 (*Lactobacillus reuteri* A4-2) 对裹包苜蓿青贮饲料发酵品质、抗氧化性能及体外消化率的影响, 本试验以切碎的初花期至盛花期紫花苜蓿 (*Medicago sativa* L.) 为原料, 随机分为 3 组进行裹包青贮: CON 组 (不接种乳酸菌)、YM13 组 (接种不产阿魏酸酯酶的 *L. reuteri* YM13) 和 A4-2 组 (接种产阿魏酸酯酶的 *L. reuteri* A4-2)。青贮至 20, 40 和 60 d 时测定其发酵特性、游离阿魏酸含量、抗氧化酶活性、化学成分及体外干物质消化率。结果表明: 与 CON 和 YM13 组相比, 接种 *L. reuteri* A4-2 能显著降低青贮饲料的 pH 值并提高乳酸和乙酸含量 ($P < 0.05$)。接种 *L. reuteri* YM13 和 *L. reuteri* A4-2 均较 CON 提高了青贮饲料中干物质含量, 并降低了氨态氮/总氮 ($P < 0.05$)。A4-2 处理组的游离阿魏酸含量、超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (Catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (Glutathione peroxidase, GPX) 活性及总抗氧化能力 (Total antioxidant capacity, T-AOC) 均显著高于其他两组 ($P < 0.05$)。此外, 接种 *L. reuteri* A4-2 显著降低了青贮饲料的中性洗涤纤维 (Neutral detergent fiber, NDF) 和酸性洗涤纤维 (Acid detergent fiber, ADF) 含量, 并最终使其体外干物质消化率显著高于其他两组 ($P < 0.05$)。综上, 接种 *L. reuteri* A4-2 不仅可改善裹包苜蓿青贮的发酵品质, 而且相较于 CON 和 YM13 处理组, 还能增强青贮饲料的抗氧化能力, 降低纤维含量并提高消化率, 具有显著的应用优势。

关键词: 苜蓿; 青贮; 阿魏酸; 抗氧化; 消化率

中图分类号: S816.53

文献标识码: A

文章编号: 1007-0435(2026)08-3131-10

Effects of Inoculating Feruloyl Esterase-Producing *Lactobacillus reuteri* on the Fermentation, Antioxidant and Digestibility of Alfalfa Baled Silage

ZHANG Yan-wei¹, MAO Yu-qing¹, WANG Peng¹, TAO You-yan¹, GUO Xu-sheng², LI Fu-hou^{1*}

(1. College of Animal Sciences, Jilin University, Changchun, Jilin Province 130062, China; 2. College of Life Sciences, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu Province 730000, China)

Abstract: This study investigated the effects of inoculation with feruloyl esterase-producing lactic acid bacteria *Lactobacillus reuteri* A4-2 on the fermentation quality, antioxidant status, and *in vitro* digestibility of baled alfalfa silage. Chopped fresh alfalfa (*Medicago sativa* L.) at the early to full-blossom flowering stage was randomly divided into three groups: CON (without inoculant), YM13 (inoculated with non-feruloyl esterase-producing *L. reuteri* YM13), and A4-2 (inoculated with *L. reuteri* A4-2). Samples were collected after 20, 40, and 60 d of ensiling to determine fermentation characteristics, free ferulic acid content, antioxidant enzyme activities, chemical composition, and *in vitro* dry matter digestibility. Compared with the CON and YM13,

收稿日期: 2025-11-17; 修回日期: 2025-12-16

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32301493) 资助

作者简介: 张艳威 (2002-), 男, 汉族, 山东聊城人, 硕士研究生, 主要从事饲草生产加工与反刍动物健康研究, E-mail: 19861208291@163.com; *通信作者 Author for correspondence, E-mail: lifh@jlu.edu.cn

inoculation with *L. reuteri* A4-2 significantly reduced pH but increased lactic and acetic acid contents ($P < 0.05$). Both inoculating *L. reuteri* YM13 and *L. reuteri* A4-2 in silage showed a higher dry matter content and lower ammonia nitrogen/total nitrogen than CON ($P < 0.05$). Inoculation with *L. reuteri* A4-2 in alfalfa silage markedly enhanced the levels of free ferulic acid, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX) activities, and total antioxidant capacity (T-AOC) ($P < 0.05$) relative to CON and YM13 during ensiling. In addition, inoculation with *L. reuteri* A4-2 effectively decreased neutral detergent fiber (NDF) and acid detergent fiber (ADF) contents, thereby improving *in vitro* DM digestibility compared with the other treatments ($P < 0.05$). Overall, inoculation with *L. reuteri* A4-2 not only improved the fermentation quality of silage, but also enhanced the antioxidant capacity, reduced its fiber content, and improved its *in vitro* DM digestibility compared with the CON and YM13 groups, demonstrating significant application advantages.

Key words: Alfalfa; Silage; Ferulic Acid; Antioxidant; Digestibility

随着畜牧业生产规模不断扩大与集约化水平的提升,奶山羊等小型反刍动物在高代谢负荷下极易发生氧化应激反应,从而对动物机体健康与生产性能构成威胁^[1,2]。氧化应激的本质是体内活性氧(Reactive oxygen species, ROS)的产生与清除失衡,过量的ROS攻击会损伤细胞膜、蛋白质与核酸结构,进而降低生产性能并增加疾病风险^[3]。为缓解这一问题,日粮中普遍添加化学合成抗氧化剂如乙氧基喹啉、二丁基羟基甲苯、丁基羟基茴香醚及维生素E等,这无疑会增加生产成本,且其代谢残留问题已引发广泛关注。近年来,随着消费结构升级,消费者对天然、高品质动物产品的需求不断增加,天然抗氧化饲料添加剂的开发逐渐成为畜牧行业研究热点^[4]。

青贮饲料作为反刍动物日粮的重要组成部分,其发酵品质、抗氧化性能及养分消化率直接关系到饲料利用效率和动物生产表现^[5]。紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)虽富含蛋白质和天然抗氧化物质(如黄酮类、酚酸类化合物),但由于可溶性碳水化合物(Water soluble carbohydrates, WSC)含量低、缓冲能力强等特性,导致其在厌氧发酵过程中的发酵品质下降和抗氧化成分保存不佳,限制了其在反刍动物高效养殖中的应用^[6-7]。此外,苜蓿细胞壁木质素含量高、结构致密,限制了瘤胃微生物对纤维的降解,从而降低体外消化率^[8]。

乳酸菌作为最常用的青贮接种剂,能通过促进乳酸生成、迅速降低pH值来改善发酵品质并抑制有害微生物生长,是改善青贮发酵品质的常规策略^[9]。近年来研究发现,部分乳酸菌还能提升青贮饲料的抗氧化性能^[10-12]。其中,具有产阿魏酸酯酶功能的乳酸菌展现出独特潜力,其不仅能通过水解植物细胞壁中阿魏酸与多糖间的酯键,破坏木质素-半纤维素复合结构,从而提高纤维可降解性与饲料

消化率,更能同步释放出具有强抗氧化活性的游离阿魏酸,从结构和成分双重层面改善青贮饲料的抗氧化稳定性^[13]。因此,产阿魏酸酯酶乳酸菌作为兼具发酵调控与酶解功能的益生菌,有望同时改善苜蓿青贮的消化率与抗氧化性能。

已有研究表明,产阿魏酸酯酶乳酸菌能够提高青贮饲料的纤维降解与抗氧化能力,但关于其在苜蓿裹包青贮实际生产中对发酵特性、游离阿魏酸释放、抗氧化性能调节及体外消化率提升的综合影响,尚缺乏系统研究^[11,13]。基于此,本研究以接种了产阿魏酸酯酶罗伊氏乳杆菌A4-2(*Lactobacillus reuteri* A4-2)的苜蓿裹包青贮饲料为研究对象,对其发酵品质、抗氧化特性及体外消化率进行了研究,旨在为开发高效青贮接种剂、提升苜蓿青贮饲料品质提供理论依据与技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用多年生紫花苜蓿种植于甘肃省定西市石泉镇彩梅种养殖农民专业合作社大田(35°34'11" N, 104°53'29" E;年均温5.5℃,年均降水量420 mm,海拔2050 m)。于2024年6月紫花苜蓿初花期至盛花期时,留茬10 cm进行刈割。经24 h田间萎蔫后,将收获后的苜蓿运至定西市巨盆草牧业有限责任公司进行切碎、接种、打捆与包膜处理。

试验所用菌株包括:罗伊氏乳杆菌YM13(*L. reuteri* YM13)与罗伊氏乳杆菌A4-2(*L. reuteri* A4-2)。其中,*L. reuteri* YM13由兰州大学益生菌与生物饲料研究中心提供,该菌株生长与产酸能力较强,但几乎不产生阿魏酸酯酶,故在本研究中作为阳性对照。*L. reuteri* A4-2由甘肃普诺贝康生物科技有限责任公司提供,该菌分离自青藏高原垂穗

披碱草青贮饲料,具有阿魏酸酯酶活性,其NCBI GenBank登录号为OP038911。在试验开始前,参照Donaghy等人^[14]的方法,使用含阿魏酸乙酯的琼脂筛选平板,对*L. reuteri* A4-2产阿魏酸酯酶的能力进行了验证(见图1)。



图1 菌株*L. reuteri* YM13(左)和*L. reuteri* A4-2(右)产阿魏酸酯酶能力

Fig. 1 Results of ferulic acid esterase production by *L. reuteri* YM13 (left) and *L. reuteri* A4-2 (right)

注:阿魏酸酯酶测定平板显示*L. reuteri* A4-2牛津杯周围有明显的透明圈(每个牛津杯内含100 μ L菌悬液,菌株A4-2的活菌数为 1×10^8 CFU $\cdot$ mL⁻¹)

Note: ferulic acid esterase assay plate showing clear zone around oxford cup of *L. reuteri* A4-2 (including 100 μ L of bacteria suspension, the amount of strain A4-2 is 1×10^8 CFU $\cdot$ mL⁻¹)

1.2 试验设计

将所有饲草粉碎后,取不少于4份样品作为鲜样保存于-20℃下以备后续分析。本青贮试验共设3个处理组:(1)CON组(阴性对照组):喷洒等量无菌蒸馏水;(2)YM13组(阳性对照组):接种*L. reuteri* YM13;(3)A4-2组(试验组):接种*L. reuteri* A4-2。所有菌株的接种剂量均为 5×10^5 CFU $\cdot$ g⁻¹鲜草。每个处理组共准备直径60 cm,高60 cm的圆柱形青贮裹包30个,总重约2 t。青贮前*L. reuteri* YM13和*L. reuteri* A4-2均以冻干粉的形式溶解于蒸馏水中并均匀喷洒于苜蓿表面。蒸馏水的用量为5 L $\cdot$ t⁻¹青贮饲料。用专业的打包机进行打捆和包膜处理后的裹包随后被置于干燥阴凉的草棚中进行贮存。分别于青贮发酵的第20,40和60 d取样进行分析,每个处理随机选择6个裹包作为生物学重复。

1.3 发酵品质测定

取20 g样品与180 mL无菌蒸馏水混合,于组织匀浆机中高速匀浆30 s,所得匀浆液经四层医用纱布过滤。将滤液分成三份用于后续测定。滤液立即使用pH计测定pH。第一份滤液用7.14 mol $\cdot$ L⁻¹ H₂SO₄酸化至pH 2.0~3.0,经0.22 μ m滤膜过滤

后,采用高效液相色谱法测定乳酸和乙酸的含量^[15]。第二份滤液与250 g $\cdot$ L⁻¹的三氯乙酸溶液按4:1比例混合,于4℃静置过夜以沉淀真蛋白,随后在4℃,18 000 $\times$ g条件下离心15 min,取上清液采用苯酚-次氯酸钠比色法测定氨态氮(Ammonia nitrogen, NH₃-N)^[16],NH₃-N最终以g $\cdot$ kg⁻¹总氮(Total nitrogen, TN)表示。

1.4 化学成分测定

将青贮样品置于电热鼓风干燥箱中,在65℃下干燥48小时以测定干物质(Dry matter, DM)含量。随后使用粉碎机进行粉碎,并过1 mm筛。采用凯氏定氮法测定粗蛋白质(Crude protein, CP)含量。参照Van Soest等人^[17]的方法分析中性洗涤纤维(Neutral detergent fiber, NDF)和酸性洗涤纤维(Acid detergent fiber, ADF)含量,并用热稳定 α -淀粉酶去除淀粉的影响。WSC采用蒽酮-硫酸比色法测定^[18]。阿魏酸的提取和测定参照Li等人^[13]的方法进行。

1.5 抗氧化酶活性测定

取1.3中制备的第三份滤液,在4℃下以12 000 $\times$ g离心10 min,取上清液用于抗氧化酶活性测定。超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GPX)活性及总抗氧化能力(Total antioxidant capacity, T-AOC)均采用商品化试剂盒(南京建成生物工程研究所,中国)测定,并严格按照说明书进行操作。

1.6 体外消化率测定

1.6.1 供体动物饲养与管理 瘤胃液供体为5只体况健康、安装有永久性瘤胃瘘管的杜泊羊(18—24月龄)。试验羊自由采食,每日于07:30和17:30各饲喂一次,并自由饮水。基础日粮(以干物质计)由40%玉米青贮、20%苜蓿干草和40%精料补充料组成,其营养水平为:中性洗涤纤维46.7%,酸性洗涤纤维35.2%,粗蛋白16.7%,消化能12.6 MJ $\cdot$ kg⁻¹。晨饲前,采集足量的新鲜瘤胃液。

1.6.2 发酵底物制备 从每个青贮样品中准确称取3个平行子样品[(500 $\pm$ 5) mg],与约8 g玻璃珠一同装入经预处理的ANKOM F57纤维袋(孔隙度25 μ m,尺寸50 mm $\times$ 55 mm;ANKOM Technology

Corporation, Fairport, NY, USA), 并使用脉冲封口机(SF-400, Qingdao Ausense Packing Equipment Co., Ltd., Qingdao, China)热封袋口。纤维袋预处理方法为:丙酮预冲洗,风干后于105℃鼓风干燥箱中彻底烘干5 h。

1.6.3 体外培养与操作 人工瘤胃缓冲液参照Theodorou等人^[19]的方法配制并经39℃预热。试验当天晨饲前采集供体羊的瘤胃液,经4层纱布过滤后混匀,将其灌入含有CO₂的保温瓶中并在2 h内带回实验室。在每个培养罐中预先加入缓冲液,随后注入经过滤的混合瘤胃液,使瘤胃液与缓冲液的体积比为1:2,每个培养罐中瘤胃液-缓冲液混合体系总量约为510 mL。随后,每个培养罐放入10个封口的纤维袋,确保每个纤维袋对应约50 mL瘤胃液-缓冲液混合体系。从开始注入瘤胃液到密封培养罐的整个操作过程中,持续通入CO₂以维持严格的厌氧环境,随后立即盖上罐盖。将4个准备就绪的培养罐置于Daisy^{II}型培养箱中(ANKOM Technology Corporation, Fairport, NY, USA),在39℃条件下连续振荡培养48 h。

1.6.4 测定与计算 培养结束后,立即取出纤维袋,用冷蒸馏水反复冲洗直至冲洗液澄清。人工轻轻挤压去除多余水分后,将纤维袋置于65℃鼓风干燥箱中烘干48 h至恒重,冷却后精确称重。体外干物质消化率通过以下公式计算:

$$D = [(W_1 - W_2) / W_0] \times 100\%$$

其中, D 为体外干物质消化率(%), W_0 为培养前样品的重量(g); W_1 为培养前纤维袋与样品总重(g); W_2 为培养后纤维袋与残留物总重(g)。

1.7 数据处理

青贮前苜蓿的化学成分以平均值±标准差(SD)表示。青贮的发酵特性、阿魏酸含量、抗氧化酶活性、化学成分含量及消化率,根据3×3因子设计,采用SPSS 21.0(IBM Co., Armonk, NY, USA)软件的一般线性模型程序进行分析。统计模型如下:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + D_j + (T \times D)_{ij} + e_{ij}$$

其中, Y_{ij} 为因变量; μ 为观测到的平均值; T_i 为处理(Treatment)的影响; D_j 为青贮时间(Ensiling days)的影响; $(T \times D)_{ij}$ 为处理和青贮时间交互作用的影响; e_{ij} 为残差。若处理与时间的交互效应显著($P < 0.05$),则在各时间点内进一步使用Tukey多

重比较法检验同一时间点内各处理组间的差异,若交互效应不显著,则分析主效应。显著性水平设定为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 青贮前苜蓿的化学成分

青贮前紫花苜蓿的化学成分含量如表1所示。苜蓿经过晾晒后的DM含量为384 g·kg⁻¹鲜重(Fresh weight, FW)。CP含量为168 g·kg⁻¹ DM。NDF、ADF、半纤维素含量分别为618, 353, 266 g·kg⁻¹ DM。WSC和阿魏酸含量分别是81.7, 4.22 g·kg⁻¹ DM。

表1 青贮前苜蓿的化学成分

Table 1 Chemical composition of alfalfa before ensiling

项目 Item	Mean	±SD
干物质 DM/(g·kg ⁻¹ FW)	384.1	11.60
粗蛋白 CP/(g·kg ⁻¹ DM)	168.4	0.71
中性洗涤纤维 NDF/(g·kg ⁻¹ DM)	617.8	4.67
酸性洗涤纤维 ADF/(g·kg ⁻¹ DM)	353.2	11.53
半纤维素 Hemicellulose/(g·kg ⁻¹ DM)	266.5	8.27
可溶性碳水化合物 WSC/(g·kg ⁻¹ DM)	81.7	5.64
阿魏酸 Ferulic acid/(g·kg ⁻¹ DM)	4.2	0.03

2.2 不同处理组苜蓿裹包青贮饲料的发酵特性

不同处理组青贮饲料发酵特性的动态变化如图2所示。如图2(a), A4-2组的pH值最低,在青贮至40 d显著低于CON和YM13处理组($P < 0.05$), 60 d时显著低于CON组($P < 0.05$)。YM13组与CON组的pH值差异不显著。由图2(b)可知,乳酸含量在青贮20~40 d均迅速增加,并在中后期基本保持稳定。A4-2组青贮在20, 40和60 d时乳酸含量均显著高于CON组($P < 0.05$),并在60 d时显著高于YM13组($P < 0.05$),说明其发酵产酸能力较强,而YM13组的乳酸含量仅在青贮20 d时显著高于CON组($P < 0.05$)。乙酸含量亦随时间延长而升高,至60 d时A4-2组乙酸含量显著高于YM13组($P < 0.05$;图2c)。NH₃-N/TN在各处理组之间存在显著差异($P < 0.05$),并随青贮时间增加而上升(图2d)。A4-2与YM13处理组的NH₃-N/TN在40和60 d均显著低于CON组($P < 0.05$)。

2.3 不同处理组苜蓿青贮饲料中游离阿魏酸含量

不同处理组苜蓿青贮饲料的游离阿魏酸含量的动态变化如图3所示。总体上,青贮过程中游离阿魏酸含量呈先上升后下降的变化趋势,即在20~

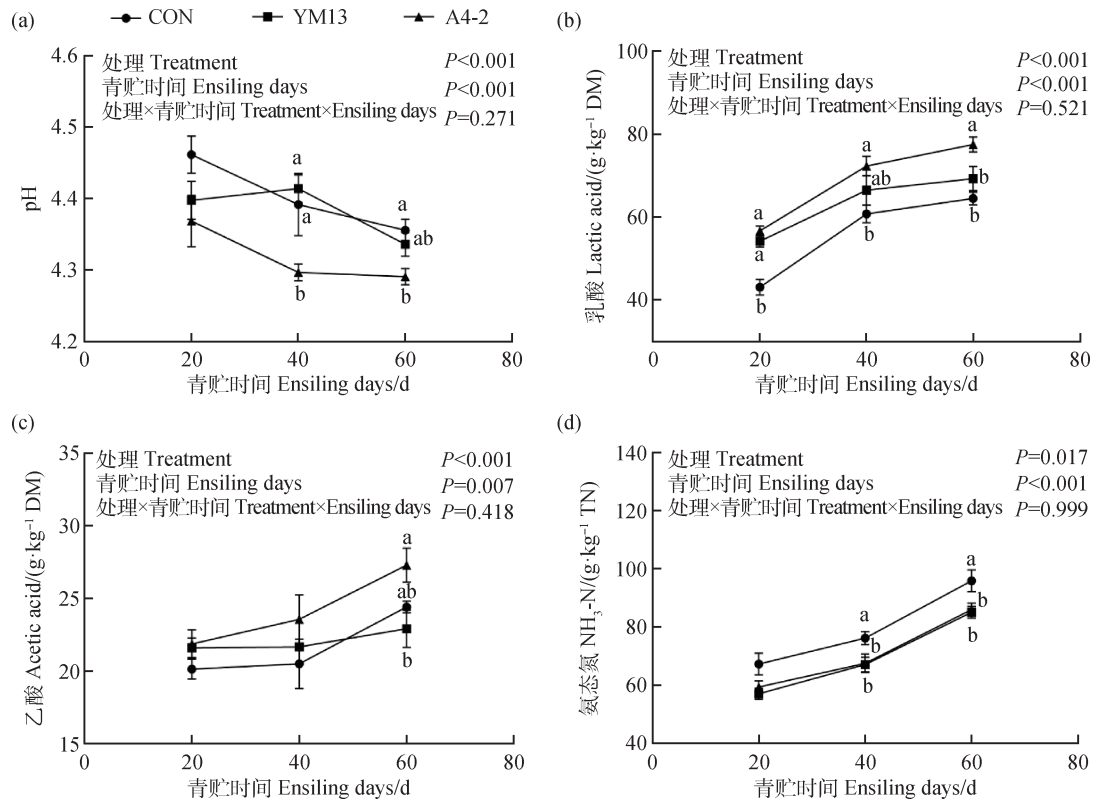


图2 不同处理组苜蓿青贮饲料的发酵特性

Fig. 2 Fermentation characteristics of alfalfa silage in different treatment groups

注: TN, 总氮。CON, 对照组(不添加乳酸菌处理组); YM13, 接种产阿魏酸酯酶罗伊氏乳杆菌 YM13 处理组; A4-2, 接种产阿魏酸酯酶罗伊氏乳杆菌 A4-2 处理组。不同小写字母代表同一时间内处理组之间差异显著。下同

Note: TN, Total Nitrogen. CON, Control (not inoculated with lactic acid bacteria); YM13, inoculated with non-feruloyl esterase-producing *Lactobacillus reuteri* YM13 treatment group; A4-2, inoculated with feruloyl esterase-producing *Lactobacillus reuteri* A4-2 treatment group. Different letters indicate significant differences among treatment groups at the same time point. The same as below

40 d 升高, 40~60 d 下降。A4-2 组的游离阿魏酸含量在第 20, 40 和 60 d 均显著高于 YM13 和 CON 组 ($P < 0.001$)。YM13 和 CON 处理组的游离阿魏酸含量差异不显著。

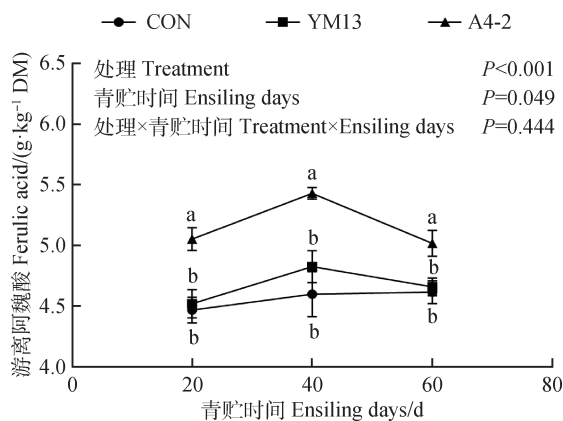


图3 不同处理组苜蓿青贮饲料中游离阿魏酸的含量

Fig. 3 Free ferulic acid content in alfalfa silage in different treatment groups

2.4 不同处理组苜蓿青贮饲料中抗氧化酶的活性

青贮过程中, 3 个处理组的 SOD, CAT, GPX 活性及 T-AOC 变化如图 4 所示。总体趋势表明, 接种 *L. reuteri* A4-2 能显著提高青贮饲料的抗氧化水平。A4-2 组的 SOD, CAT, GPX 活性及 T-AOC 总体水平均高于 YM13 和 CON 组, 且在多个青贮时间点差异显著 ($P < 0.05$)。如图 4(a) 所示, SOD 活性在青贮 20~40 d 呈下降趋势, 而在 40~60 d 阶段, A4-2 组出现明显回升, 其余两处理组则继续下降; 至 60 d 时, A4-2 组 SOD 活性显著高于 YM13 和 CON ($P < 0.05$)。CAT 活性在青贮 20~60 d 期间逐步下降, A4-2 组的 CAT 活性在 3 个时间点均显著高于 CON ($P < 0.05$), 在第 20 d 时显著高于 YM13 组 ($P < 0.05$; 图 4b)。GPX 活性在 20~40 d 期间变化不大, 而在 40~60 d 均出现上升趋势, 其中 A4-2 组的 GPX 活性在 40 和 60 d 时显著高于 YM13 与 CON 组 ($P < 0.05$; 图 4c)。如图 4(d), T-AOC 在青贮 20~60 d 呈缓慢下降趋势, 但 A4-2 组的 T-AOC 始终高于 YM13 和 CON 组 ($P < 0.05$)。

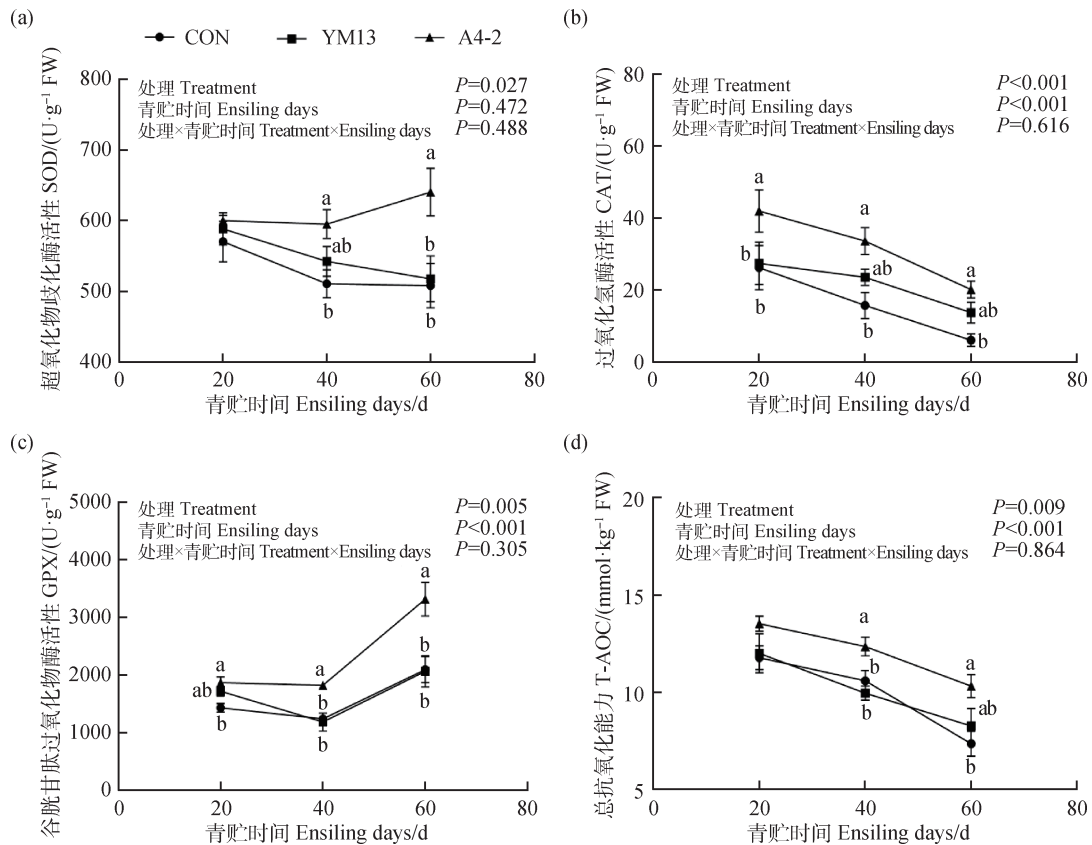


图4 不同处理组苜蓿青贮饲料中抗氧化酶的活性

Fig. 4 Antioxidant enzyme activity of alfalfa silage in different treatment groups

2.5 青贮饲料化学组成和体外消化率

如图5所示,青贮饲料的干物质含量受接种剂、青贮时间及其交互作用的影响,接种乳酸菌的青贮饲料的DM含量显著高于CON组($P<0.05$)。如图5(a),A4-2组的DM含量在青贮第20 d时显著高于YM13组($P<0.05$),40和60 d时差异不显著。NDF含量在20~60 d缓慢增加,但A4-2组的含量在3个时间点均最低(图5b)。A4-2组NDF含量在20 d显著低于CON组($P<0.05$)。ADF含量A4-2组最低,在第20,40 d时,A4-2组的ADF含量显著低于CON组($P<0.05$),60 d时显著低于YM13组($P<0.05$;图5c)。如图5(d)中的WSC含量,均为20~40 d下降,且YM13组下降幅度更大,然后40~60 d上升。在20 d时,A4-2显著高于CON组($P<0.05$),而在40,60 d时,A4-2显著高于YM13组($P<0.05$)。CP含量,三处理组间差异不显著(图5e)。对于体外干物质消化率(图5f),A4-2组在青贮20,40和60 d时均显著高于CON组($P<0.05$),40,60 d时显著高于YM13组($P<0.05$),而YM13与CON组差异则不显著。

3 讨论

3.1 *L. reuteri* A4-2对裹包苜蓿青贮发酵特性的影响

青贮饲料发酵品质的核心评价指标包括pH值、有机酸及 $\text{NH}_3\text{-N}$ ^[20]。优质青贮饲料的pH值一般低于4.2,而本研究中pH略高,主要由于紫花苜蓿蛋白质含量高、缓冲能力强的特性所致^[5]。在发酵过程中,乳酸与乙酸是维持发酵平衡、抑制有害微生物活动的关键有机酸。乳酸在发酵初期的快速积累能有效降低pH值,而乙酸则对提高青贮饲料的有氧稳定性至关重要,因其能显著抑制酵母菌和霉菌的繁殖^[21, 22]。此外,青贮初期植物蛋白酶会导致蛋白质降解为非蛋白氮(NPN),并在梭菌等微生物作用下进一步转化为 $\text{NH}_3\text{-N}$,从而降低饲料营养价值。值得注意的是,蛋白质降解程度与发酵体系的pH值水平密切相关,较低的pH环境可有效抑制紫花苜蓿青贮的蛋白降解^[23]。本研究结果显示,接种*L. reuteri* A4-2显著改善了苜蓿青贮的发酵品质。与YM13组及CON组相比,A4-2处理组的pH下降更快、乳酸含量更高、 $\text{NH}_3\text{-N}/\text{TN}$ 更低。这表明接种*L. reuteri* A4-2可能为青贮乳酸菌的厌氧发

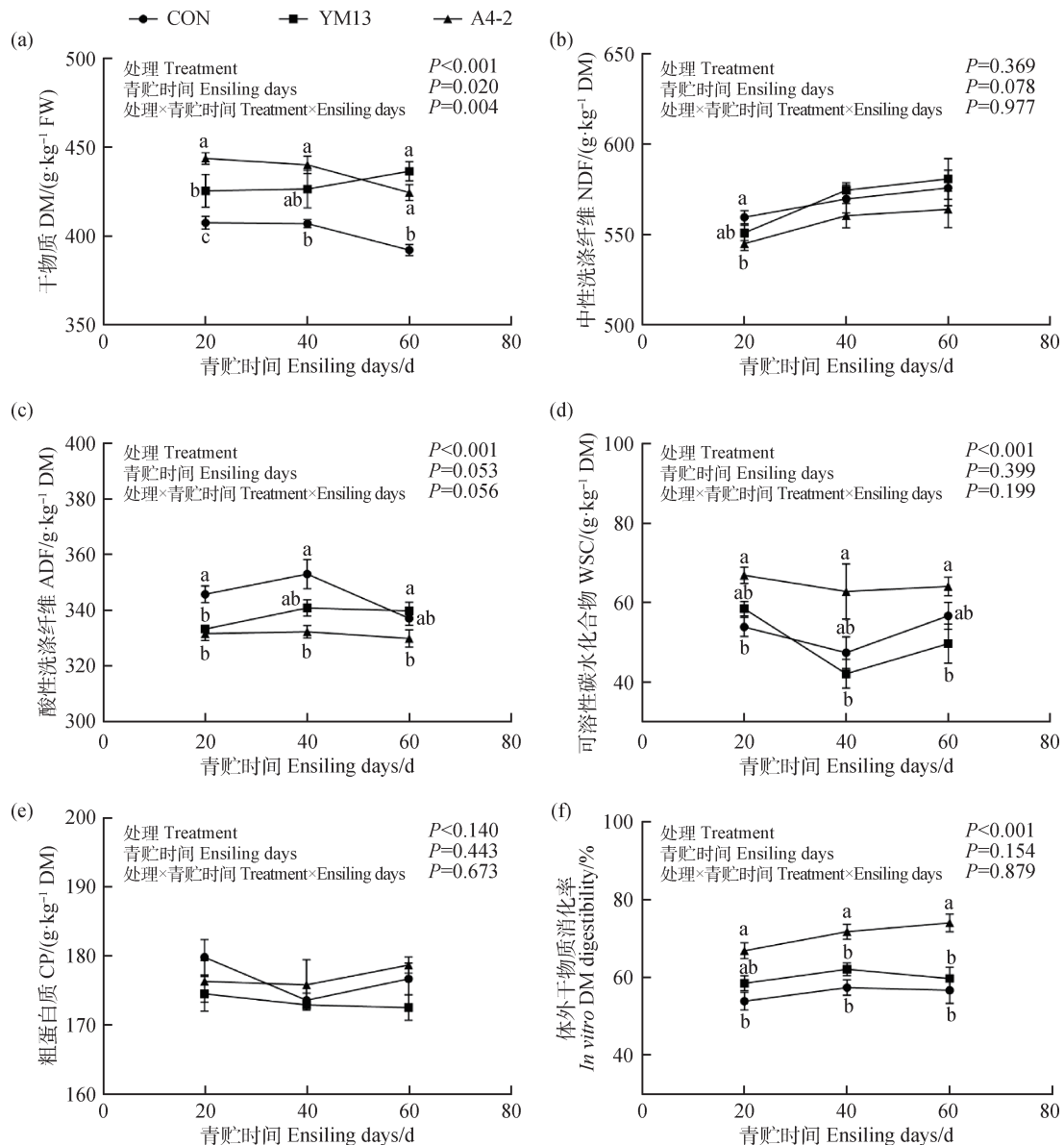


图 5 不同处理组苜蓿青贮饲料中化学成分含量及体外消化率

Fig. 5 Chemical composition and *in vitro* digestibility of alfalfa silage in different treatment groups

酵提供了更多的发酵底物,并且这一现象与其产生的阿魏酸酯酶有关。因为阿魏酸酯酶水解木质纤维素的阿魏酸酯键后,在微生物与酸性环境的作用下,A4-2处理组比CON和YM13组释放出更多的WSC供乳酸菌利用^[15]。这一猜想也可由图5(d) A4-2中较高浓度的WSC含量得到证实。此外,A4-2处理组在中后期乙酸含量显著高于其他处理组,进一步证实其在抑制有害微生物、提高青贮稳定性方面的积极作用,这与Li等人^[13]的研究结果一致。

3.2 *L. reuteri* A4-2对裹包苜蓿青贮游离阿魏酸含量的影响

游离阿魏酸的释放是产阿魏酸酯酶乳酸菌在

厌氧发酵过程中降解饲草木质纤维素的直接结果体现,也是提升青贮饲料抗氧化活性的关键^[11, 13, 15]。本研究中,接种产阿魏酸酯酶乳酸菌处理组的游离阿魏酸含量在整个青贮期均高于CON和YM13组,并在40 d达到峰值。这一结果验证了*L. reuteri* A4-2产生的阿魏酸酯酶能够有效水解苜蓿细胞壁中阿魏酸与木质素、半纤维素间的酯键,并释放游离态阿魏酸^[13]。相比之下,YM13组虽然在青贮的前期略有上升,但无显著升高,而CON组则始终维持较低水平,表明非产阿魏酸酯酶乳酸菌无法持续降解结合态阿魏酸。青贮后期游离阿魏酸含量出现下降趋势,一方面可能源于乳酸菌对其的代谢利用^[24],另一方面也可能源于pH的降低抑制了阿魏

酸酯酶的活性^[23]。这一发现与Li等人^[13]的研究结果基本一致。

3.3 *L. reuteri* A4-2对裹包苜蓿青贮抗氧化性能的影响

青贮饲料的抗氧化特性对反刍动物健康具有重要意义。在青贮过程中添加植物提取物、天然抗氧化剂或功能性菌株,可增强青贮饲料的抗氧化性能,除改善其营养品质和贮藏稳定性外,对动物健康甚至生产性能产生积极影响^[10, 25-26]。据报道,日粮中添加阿魏酸能很好地缓解羔羊在寒冷条件下的氧化应激^[27]。Li等人^[11]的研究也表明,饲喂接种产阿魏酸酯酶乳酸菌的苜蓿青贮,可提高泌乳奶山羊的血清抗氧化酶活性,如SOD,GPX,CAT以及T-AOC,同时提高机体免疫性能。本研究结果表明,A4-2组的SOD,CAT,GPX活性及T-AOC均显著高于CON和YM13处理组,表明接种*L. reuteri* A4-2能显著增强裹包苜蓿青贮的抗氧化性能。这一作用可能与其较CON和YM13处理组释放的更多游离阿魏酸有关。这可能主要归功于阿魏酸较强的自由基清除能力^[28]。在自由基清除过程中,SOD将超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)转化为过氧化氢(H_2O_2)和 O_2 ;CAT将 H_2O_2 分解为 H_2O 和 O_2 ;而GPX则利用还原型谷胱甘肽(GSH)将 H_2O_2 或脂质过氧化物还原为 H_2O 或醇^[29]。A4-2组SOD活性升高,可能与裹包青贮初期残留氧气促进了 $O_2^{\cdot-}$ 的生成,诱导了SOD的表达^[11, 13]有关。GPX活性的增强,则可能与阿魏酸协助维持GSH氧化还原循环,为GPX提供持续底物有关^[30]。尽管低pH环境会抑制CAT稳定性,但A4-2组始终维持最高CAT活性。青贮饲料T-AOC的显著提升,主要归因于A4-2处理所释放的游离阿魏酸和其对多种内源抗氧化酶系统的协同激活作用。综上,A4-2处理通过释放游离阿魏酸并协同激活内源酶系统,全面提升了青贮饲料的抗氧化能力。

3.4 *L. reuteri* A4-2对裹包苜蓿青贮营养成分的影响

青贮的最终价值体现在对动物的营养供给上^[5]。优良的青贮饲料可以较好地保存DM及CP含量。本研究中,YM13组和A4-2组的DM含量均高于CON组,表明接种罗伊氏乳杆菌有效抑制了发酵过程中的养分损失。A4-2组CP含量在40和

60 d时保存率较高,但不显著,这与先前Li等人^[11]的研究结果一致。在青贮饲料的纤维组分中,NDF和ADF含量是反映其纤维化水平的关键指标,并直接影响家畜的采食量与消化率^[31]。A4-2组NDF和ADF低于CON和YM13组,这可能是由阿魏酸酯酶对植物细胞壁的酶解作用造成的。吕家英等人^[32]研究发现,与不添加处理组相比,0.3%的阿魏酸酯酶无论单独使用或者与0.2%植物乳杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*)联合使用,均能显著降低杂交构树(*Broussonetia papyrifera*)的NDF和ADF含量。A4-2组的WSC含量显著高于CON和YM13组,可能是青贮饲料中的阿魏酸酯酶和有机酸对植物细胞壁的协同降解作用的结果,因为这进一步增加了酶或者微生物对结构多糖的可及性^[13];而YM13组在青贮中后期(40, 60 d)WSC含量较低,可能由于乳酸发酵过程中的消耗所致。

3.5 *L. reuteri* A4-2对裹包苜蓿青贮体外消化率的影响

干物质消化率反映饲料在瘤胃发酵体系中被微生物降解的程度,也是保证反刍动物饲料营养价值实现的前提^[33]。较高的干物质消化率通常意味着饲料中可发酵碳水化合物比例较高、细胞壁结构被有效破坏,从而促进瘤胃微生物对纤维组分的利用^[34]。本研究中,A4-2处理组的体外干物质消化率显著高于YM13组和CON组,这可能源于阿魏酸酯酶对植物细胞壁结构的有效解离。阿魏酸酯酶能够水解细胞壁中木质素与半纤维素间由阿魏酸介导形成的酯键,这些交联结构会增强细胞壁的稳定性和限制瘤胃微生物的附着与酶解过程,从而抑制纤维组分的降解与利用^[35]。因此,*L. reuteri* A4-2菌株所产的阿魏酸酯酶通过破坏此类交联,促进木质素-半纤维素复合体的解离,增加了瘤胃微生物或酶对纤维素与半纤维素的可及性,进而为瘤胃微生物提供了更丰富的可发酵底物。综上所述,*L. reuteri* A4-2产生的阿魏酸酯酶在青贮过程中通过改善细胞壁结构的可降解性,从机理上解释了A4-2组干物质消化率显著提高的结果,这与Li等人^[36]的结果也保持一致。

4 结论

本研究表明,用产阿魏酸酯酶的罗伊氏乳杆菌

接种苜蓿裹包青贮,可以通过降解木质纤维素的结构为青贮乳酸菌的发酵提供更多的发酵底物,进而改善青贮饲料的发酵特性,同时显著提高苜蓿青贮饲料的体外消化率。此外,青贮过程中释放的游离阿魏酸显著改善了苜蓿青贮的抗氧化性能。因此,*L. reuteri* A4-2作为一株功能性菌株,在提升裹包苜蓿青贮的抗氧化性能和消化率方面展现出更具竞争性的应用潜力。

参考文献

- [1] SORDILLO L M, AITKEN S L. Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2009, 128(1-3):104-109
- [2] CASTILLO C, PEREIRA V, ABUELO Á, et al. Effect of supplementation with antioxidants on the quality of bovine milk and meat production[J]. The Scientific World Journal, 2013, 2013:616098
- [3] ABUELO A, HERNÁNDEZ J, BENEDITO J L, et al. The importance of the oxidative status of dairy cattle in the periparturient period: revisiting antioxidant supplementation[J]. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 2015, 99(6):1003-1016
- [4] LOURENÇO S C, MOLDÃO-MARTINS M, ALVES V D. Antioxidants of natural plant origins: From sources to food industry applications[J]. Molecules, 2019, 24(22):4132
- [5] 王涛,李静,卢强,等. 蒲公英黄酮和枯草芽孢杆菌对燕麦青贮品质、抗氧化活性及微生物群落结构的影响[J]. 草业学报, 2025, 35(6):1-14
- WANG T, LI J, LU Q, et al. Effects of total flavonoids from *Taraxacum mongolicum* and *Bacillus subtilis* on fermentation quality, antioxidant activity, and aerobic stability of *Avena sativa* silage[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2025, 35(6):1-14
- [6] HUO W J, ZHANG Y J, ZHANG L Y, et al. Effect of lactobacilli inoculation on protein and carbohydrate fractions, ensiling characteristics and bacterial community of alfalfa silage[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13:1070175
- [7] HORVAT D, VILJEVAC VULETIĆ M, ANDRIĆ L, et al. Characterization of forage quality, phenolic profiles, and antioxidant activity in alfalfa (*Medicago sativa* L.) [J]. Plants, 2022, 11(20):2735
- [8] BHANDARI K B, RUSCH H L, HEUSCHELE D J. Alfalfa stem cell wall digestibility: Current knowledge and future research directions[J]. Agronomy, 2023, 13(12):2875
- [9] KIM D, LEE K D, CHOI K C. Role of LAB in silage fermentation: Effect on nutritional quality and organic acid production—An overview [J]. Aims Agriculture and Food, 2021, 6(1):216-234
- [10] ZHANG Y X, USMAN S, LI Q, et al. Effects of antioxidant-rich *Lactiplantibacillus plantarum* inoculated alfalfa silage on rumen fermentation, antioxidant and immunity status, and mammary gland gene expression in dairy goats[J]. Journal of Animal Science and Biotechnology, 2024, 15(1):9
- [11] LI F H, ZHANG B B, ZHANG Y X, et al. Probiotic effect of ferulic acid esterase-producing *Lactobacillus plantarum* inoculated alfalfa silage on digestion, antioxidant, and immunity status of lactating dairy goats[J]. Animal Nutrition, 2022, 11:38-47
- [12] KHARAZIAN Z A, JIA M Y, SU R N, et al. Fermentation quality, chemical composition, and antioxidant capacity of alfalfa and corn silages inoculated with exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria[J]. Animal Feed Science and Technology, 2025, 329:116490
- [13] LI F H, DING Z T, CHEN X Z, et al. The effects of *Lactobacillus plantarum* with feruloyl esterase-producing ability or high antioxidant activity on the fermentation, chemical composition, and antioxidant status of alfalfa silage[J]. Animal Feed Science and Technology, 2021, 273:114835
- [14] DONAGHY J, KELLY P F, MCKAY A M. Detection of ferulic acid esterase production by *Bacillus* spp. and *Lactobacilli* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1998, 50(2):257-260
- [15] LI F H, DING Z T, KE W C, et al. Ferulic acid esterase-producing lactic acid bacteria and cellulase pretreatments of corn stalk silage at two different temperatures: Ensiling characteristics, carbohydrates composition and enzymatic saccharification [J]. Bioresource Technology, 2019, 282:211-221
- [16] KE W C, DING W R, XU D M, et al. Effects of addition of malic or citric acids on fermentation quality and chemical characteristics of alfalfa silage[J]. Journal of Dairy Science, 2017, 100(11):8958-8966
- [17] 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
- [18] ARTHUR THOMAS T. An automated procedure for the determination of soluble carbohydrates in herbage[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1977, 28(7):639-642
- [19] THEODOROU M K, WILLIAMS B A, DHANOA M S, et al. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds [J]. Animal Feed Science and Technology, 1994, 48(3-4):185-197
- [20] 吴长荣,代胜,梁龙飞,等. 不同添加剂对构树青贮饲料发酵品质和蛋白质降解的影响[J]. 草业学报, 2021, 30(10):169-179
- WU C R, DAI S, LIANG L F, et al. Effects of different additives on fermentation quality and protein degradation of *Broussonetia papyrifera* silage[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2021, 30(10):169-179
- [21] DANNER H, HOLZER M, MAYRHUBER E, et al. Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(1):562-567
- [22] KUNG L, SHAVER R D, GRANT R J, et al. Silage review:

- Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages[J]. *Journal of Dairy Science*, 2018, 101(5): 4020-4033
- [23] DING Z T, XU D M, BAI J, et al. Characterization and identification of ferulic acid esterase-producing *Lactobacillus* species isolated from *Elymus nutans* silage and their application in ensiled alfalfa[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2019, 127(4):985-995
- [24] MATHEW S, ABRAHAM T E. Ferulic acid: An antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2004, 24(2-3):59-83
- [25] ZHANG X, ZHANG H X, WANG D C, et al. From waste to value: Multi-omics reveal pomegranate peel addition improves corn silage antioxidant activity and reduces methane and nitrogen losses[J]. *Bioresource Technology*, 2025, 429:132544
- [26] HUANG S, KE W C, LU Q, et al. Effects of total flavonoids from *Taraxacum mongolicum* Hand. -Mazz. on fermentation quality, antioxidant status and microbial community of *Caragana korshinskii* Kom. silage[J]. *Fermentation*, 2023, 9(11):949
- [27] WANG Y, WANG W, WANG R, et al. Dietary supplementation of ferulic acid improves performance and alleviates oxidative stress of lambs in a cold environment[J]. *Canadian Journal of Animal Science*, 2019, 99(4):705-712
- [28] KHAN K A, SALEEM M H, AFZAL S, et al. Ferulic acid: therapeutic potential due to its antioxidant properties, role in plant growth, and stress tolerance[J]. *Plant Growth Regulation*, 2024, 104(3):1329-1353
- [29] JOMOVA K, ALOMAR S Y, ALWASEL S H, et al. Several lines of antioxidant defense against oxidative stress: antioxidant enzymes, nanomaterials with multiple enzyme-mimicking activities, and low-molecular-weight antioxidants[J]. *Archives of Toxicology*, 2024, 98(5):1323-1367
- [30] ZHENG M L, LIU Y T, ZHANG G F, et al. The antioxidant properties, metabolism, application and mechanism of ferulic acid in medicine, food, cosmetics, livestock and poultry[J]. *Antioxidants*, 2024, 13(7):853
- [31] 陈桂武, 农智颜, 陈娜, 等. 不同比例假蒟对王草青贮发酵品质及体外发酵特性的影响[J]. *草地学报*, 2025, 33(5):1677-1685
- CHEN G W, NONG Z Y, CHEN N, et al. Effects of different proportions of *Piper sarmentosum* on the fermentation quality and in vitro fermentation characteristics of king grass silage[J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2025, 33(5):1677-1685
- [32] 吕家英, 王义翔, 侯国庆, 等. 阿魏酸酯酶与植物乳杆菌联合接种对杂交构树发酵品质的影响[J]. *饲料研究*, 2025, 48(5):121-125
- LÜ J Y, WANG Y X, HOU G Q, et al. Effect of co-inoculation of feruloyl esterase and *Lactiplantibacillus plantarum* on fermentation quality of hybrid *Broussonetia papyrifera* [J]. *Feed Research*, 2025, 48(5):121-125
- [33] 盛子阳, 王定发, 吕仁龙, 等. 假蒟提取物对海南黑山羊体外瘤胃发酵参数和干物质消化率的影响[J]. *中国畜牧杂志*, 2024, 60(5):233-238
- SHENG Z Y, WANG D F, LÜ R L, et al. Effects of *Piper sarmentosum* extract on in vitro ruminal fermentation parameters and dry matter digestibility in hainan black goats[J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2024, 60(5):233-238
- [34] 刘南冰, 王奕敏, 刁小高, 等. 没食子酸、葡萄籽原花青素对柱花草青贮发酵品质、营养成分和体外瘤胃发酵的影响[J]. *饲料工业*, 2025, 46(15):119-125
- LIU N B, WANG Y M, DIAO X G, et al. Effects of gallic acid and grape seed proanthocyanidins on fermentation quality, nutrient composition and in vitro ruminal fermentation of stylo silage[J]. *Feed Industry*, 2025, 46(15):119-125
- [35] YU P, MCKINNON J J, CHRISTENSEN D A. Improving the nutritional value of oat hulls for ruminant animals with pre-treatment of a multienzyme cocktail: In vitro studies[J]. *Journal of Animal Science*, 2005, 83(5):1133-1141
- [36] LI F H, USMAN S, HUANG W K, et al. Effects of inoculating feruloyl esterase-producing *Lactiplantibacillus plantarum* A1 on ensiling characteristics, in vitro ruminal fermentation and microbiota of alfalfa silage[J]. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2023, 14(1):43

(责任编辑 付 宸)