

DOI: 10.11686/cyxb2018339

<http://cyxb.magtech.com.cn>

王成, 王益, 周玮, 等. 植物乳杆菌和含水量对辣木叶青贮品质和单宁含量的影响. 草业学报, 2019, 28(6): 109—118.

Wang C, Wang Y, Zhou W, *et al.* Effects of *Lactobacillus plantarum* (LP) and moisture on feed quality and tannin content of *Moringa oleifera* leaf silage. Acta Prataculturae Sinica, 2019, 28(6): 109—118.

# 植物乳杆菌和含水量对辣木叶青贮 品质和单宁含量的影响

王成<sup>1</sup>, 王益<sup>2</sup>, 周玮<sup>2</sup>, 骈瑞琪<sup>2</sup>, 张庆<sup>2\*</sup>, 陈晓阳<sup>2\*</sup>

(1. 华南农业大学动物科学学院, 广东 广州 510642; 2. 华南农业大学林学与风景园林学院, 广东 广东 广东饲料工程技术研究中心, 广东省森林植物种质创新与利用重点实验室, 广东 广州 510642)

**摘要:** 试验旨在探讨含水量和添加植物乳杆菌对辣木叶青贮品质、单宁含量的影响。采用双因素(水分×植物乳杆菌)完全随机设计, 含水量分别为 60%、70% 和 75%, 植物乳杆菌设置添加组( $1 \times 10^6$  cfu · g<sup>-1</sup> 鲜样)和对照组。分别于青贮的 60 和 120 d, 开袋取样测定发酵品质、蛋白组分和单宁含量。辣木叶干物质中粗蛋白(CP)含量为 16.72%, 可溶性碳水化合物(WSC)含量为 10.72%。含水量对辣木叶青贮品质有显著影响, 70% 含水量组与 60% 含水量组相比, 氨态氮(NH<sub>3</sub>-N)、氨基酸类游离氮(FAA)、乙酸(AA)、丙酸(PA)和乳酸(LP)含量均显著降低( $P < 0.05$ ); 在 70% 含水量条件下, 添加植物乳杆菌, 有机酸(LA、AA、PA)含量显著升高( $P < 0.05$ ), 乳酸菌(LAB)和酵母菌(Yeast)数目显著降低( $P < 0.05$ ); 发酵 60 d 时, 在 60% 和 75% 含水量条件下, 添加植物乳杆菌, pH 值显著降低( $P < 0.05$ ); 所有处理的大肠杆菌数量均小于  $2.0 \log \text{cfu} \cdot \text{g}^{-1} \text{FM}$ 。不同含水量和植物乳杆菌对辣木叶青贮后单宁含量均有降低作用, 但无显著差异( $P > 0.05$ )。辣木叶蛋白丰富, 易于调制青贮饲料, 70% 含水量和添加植物乳杆菌对辣木叶青贮品质有明显的改善作用, 对降解单宁含量并未产生显著影响。

**关键词:** 辣木叶青贮; 含水量; 乳酸菌; 单宁

## Effects of *Lactobacillus plantarum* (LP) and moisture on feed quality and tannin content of *Moringa oleifera* leaf silage

WANG Cheng<sup>1</sup>, WANG Yi<sup>2</sup>, ZHOU Wei<sup>2</sup>, PIAN Rui-qi<sup>2</sup>, ZHANG Qing<sup>2\*</sup>, CHEN Xiao-yang<sup>2\*</sup>

1. College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University, Guangdong Research Center of Woody Forage Engineering Technology Guangzhou, Guangdong Key Laboratory for Innovation Development and Utilization of Forest Plant Germplasm, Guangzhou 510642, China

**Abstract:** This study aimed to investigate the effect of moisture and *Lactobacillus plantarum* (LP) on the quality and tannin content of *Moringa oleifera* leaf silage. The design was a completely randomized, two-factor (60%, 70%, or 75% moisture × +/− LP,  $1 \times 10^6$  cfu · g<sup>-1</sup> fresh matter. After 60 and 120 days ensiling, samples were collected to determine fermentation quality, protein composition and tannin content. The *M. oleifera* leaves at ensiling had a crude protein (CP) content of 16.72% of dry matter (DM), and water soluble carbohydrate (WSC) content of 10.72% DM. The moisture content had a significant effect on the quality of *M.*

收稿日期: 2018-05-22; 改回日期: 2018-07-05

基金项目: 国家自然科学基金(31702177), 广州市科技计划项目(201707010462)和广东省农业标准化研究项目(辣木叶青贮技术的研究)资助。

作者简介: 王成(1994-), 男, 安徽芜湖人, 在读硕士。E-mail: 2556567744@qq.com

\* 通信作者 Corresponding author. E-mail: zqing1988@126.com, xychen@scau.edu.cn

*oleifera* leaf silage. Compared with the 60% water group, the content of ammoniacal nitrogen ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ) and free amino acid (FAA) in the 70% water content group was significantly decreased ( $P<0.05$ ), and the contents of lactic acid (LA), acetic acid (AA) and propionic acid (PA) were significantly increased ( $P<0.05$ ). At 70% water content, adding *L. plantarum* resulted in significantly increased ( $P<0.05$ ) the content of organic acids (LA, AA, PA), while the numbers of lactic acid bacteria and yeasts were significantly decreased ( $P<0.05$ ). After 60 d at 75% moisture content, the addition of *L. plantarum* had reduced the pH value significantly ( $P<0.05$ ), and all treated coliform counts were less than  $2.0 \log \text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$  fresh matter. None of the various combinations of LP and moisture treatment produced any statistically significant change to the tannin content of *M. oleifera* leaf silage ( $P>0.05$ ). The protein content of *M. oleifera* leaves is high, and they are easy to ensile. The 70% water content and the addition of LP obviously improve the quality of *M. oleifera* leaf silage, but do not have any significant effect on degradation of the tannin content.

**Key words:** *Moringa oleifera* leaves silage; moisture; lactic acid bacteria; tannin

目前,我国传统蛋白质饲料资源严重短缺且价格昂贵,蛋白饲料主要依赖于进口,这已成为制约畜牧业发展的主要因素。因此,寻求价廉、高产和高效的新型蛋白饲料,以期完全或部分替代传统蛋白饲料成为动物营养学研究的热点。辣木(*Moringa oleifera*)是一种起源于印度北部的热带、亚热带植物,已在我国广东、广西、海南、四川和云南等地大规模种植。其特点是年产量高,鲜重年产量约  $126 \text{ t} \cdot \text{hm}^{-2}$ <sup>[1]</sup>,干物质年产量  $10.4 \sim 20.7 \text{ t} \cdot \text{hm}^{-2}$ <sup>[2]</sup>;蛋白含量高且纤维含量低,Teixeira 等<sup>[3]</sup>研究显示辣木叶粉中含有 28.7%的粗蛋白、7.1%的脂肪、44.4%碳水化合物以及各类维生素和矿物元素,符合优质蛋白质饲料的基础,可以开发成为一种新型的植物性蛋白质饲料<sup>[4]</sup>。近年来,多项研究发现,可以将辣木叶作为蛋白来源和饲料组分应用到动物生产中,主要在山羊<sup>[5-7]</sup>、绵羊<sup>[8]</sup>以及其他反刍动物<sup>[9-10]</sup>中,有着积极的效果。但报道使用的多为辣木叶粉,青贮使用较少,辣木叶粉需要经过晾干粉碎处理,成本提高,且南方雨水较多,辣木叶粉容易受潮发霉,增加了处理难度。而青贮调制不受天气影响,成本低廉,青贮过程还可以降低原料的抗营养因子<sup>[11]</sup>,有利于辣木叶的长期保存。乳酸菌作为一种发酵促进剂,能够促进青贮初期尽快进入乳酸发酵阶段,促进单糖物质转化为乳酸,使 pH 迅速降低,同时抑制蛋白质的水解作用,降低氨态氮( $\text{NH}_3\text{-N}$ ),乙酸(AA)和丁酸(BA)浓度,减少酵母菌和霉菌的滋生<sup>[12]</sup>。除添加剂外,青贮原料本身的含水量和青贮时间也是影响青贮品质的重要因素,含水量太高,青贮过程中会产生大量渗出液,易引起梭菌发酵;含水量太低,不利于压实,引起好氧霉变,使营养物质大量损失<sup>[13-14]</sup>。

含水量和添加乳酸菌对于常规牧草青贮品质的影响报道较多,而辣木作为木本植物,通过青贮技术应用于饲料生产的研究鲜有报道。本试验在不同含水量的青贮辣木中添加乳酸菌,在发酵 60 和 120 d 测定辣木的青贮品质和单宁含量,研究乳酸菌添加剂和含水量对辣木叶青贮品质的影响,以期对辣木叶的青贮调制提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验所用的辣木品种为 PKM-1,于云南辣木种子资源库采种,2016 年 8 月种植于华南农业大学稻香园试验田,2017 年 7 月采叶,然后进行不晾晒(含水量约为 75%)和晾晒 3 h(含水量约为 70%),晾晒 12 h(含水量约为 60%)处理。试验所用的乳酸菌(lactic acid bacteria, LAB)为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*, LP),由中国农业大学青贮实验室研发。

### 1.2 试验设计

本实验采用双因素完全随机设计,因素一为添加乳酸菌,添加量为  $1 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$  鲜样(fresh matter, FM),将不添加作为对照(CK)组;因素二为含水量,分 3 个水平,75%(DM<sub>1</sub>)、70%(DM<sub>2</sub>)和 60%(DM<sub>3</sub>)。采集新鲜辣木原料,用铡刀切成 3~4 cm 的小段后,分别晾晒 0、3 和 12 h 后,将植物乳杆菌添加剂喷洒于不同含水量原料上,对照组喷洒等量的蒸馏水,混合均匀后装到聚乙烯塑料袋(20 cm×30 cm)中,每袋 180 g 左右,真空封口机除

去空气并密封保存。一共 6 个组,每组 6 个重复,共 36 袋。分别在青贮的 60 和 120 d 后开袋,对其化学成分、发酵品质进行测定分析。

### 1.3 试验指标测定

#### 1.3.1 营养指标 粗蛋白质(CP)测定:凯氏定氮法<sup>[15]</sup>。

非蛋白氮(non-protein nitrogen, NPN)测定:三氯乙酸溶液混合发酵后的辣木叶干粉,无损的取定量滤纸过滤后的沉淀,烘干后用凯氏定氮法测定含氮量即非蛋白氮<sup>[16]</sup>,真蛋白(true protein, TP),  $TP = CP - NPN$ ,通过凯氏定氮仪分别测定粗蛋白质(CP)和非蛋白氮(NPN)。

氨态氮( $NH_3-N$ )测定:苯酚一次氯酸钠比色法<sup>[17]</sup>。

游离氨基酸氮(FAA)测定:茚三酮—硫酸肼比色法<sup>[18]</sup>。

酸性洗涤纤维(ADF)和中性洗涤纤维(NDF)测定:范氏纤维测定法<sup>[19]</sup>。

#### 1.3.2 发酵品质和微生物数量 pH 值测定:开袋后,取代表性青贮样品 20 g,加入 180 mL 蒸馏水,混合均匀,经家用榨汁机榨汁 1 min,依次用 4 层纱布和中速定性滤纸过滤,得到浸提液,采用 pH 计(PHS-3C,上海雷磁)测量 pH 值<sup>[20]</sup>。

有机酸的测定:浸提液经 0.22  $\mu m$  孔径的滤膜过滤得到滤液,采用岛津 GC-14 型高效液相色谱仪(色谱柱:Shodex Rspak KC-811 s-DVB gel column,日本;检测器:SPD-M10AVP)测定乳酸(lactic acid, LA)、乙酸(acetic acid, AA)、丙酸(propionic acid, PA)含量,流动相为 3 mmol  $\cdot L^{-1}$  高氯酸,流速 1 mL  $\cdot min^{-1}$ ;柱温为 50  $^{\circ}C$ ;检测波长为 210 nm,进样量为 5  $\mu L$ <sup>[21]</sup>。

干物质和可溶性碳水化合物测定方法:干物质(将青贮辣木叶混合均匀后,称重取样放在 65 $^{\circ}C$  恒温烘箱中,烘至绝干,计算烘干前后的重量比值,即为干物质);可溶性碳水化合物(蒽酮比色法测定。制作葡萄糖标准曲线,将样品煮沸 10 min,冷却过滤定容,经吸取摇匀后加入蒽酮,在 620 nm 波长下比色测定吸光度来测得)。

乳酸菌、酵母菌和大肠杆菌数量测定:取代表性样品 20 g,加入 180 mL 灭菌的生理盐水,均匀混合后逐级稀释。微生物数量测定采用平板计数法,乳酸菌、大肠杆菌、酵母菌分别采用 MRS 琼脂培养基[蛋白胨 10.0 g;牛肉浸粉 5.0 g;酵母提取物 4.0 g;葡萄糖 20.0 g;吐温-80, 1.0 mL;磷酸氢二钾 2.0 g;乙酸钠 5.0 g;柠檬酸三铵 2.0 g;七水合硫酸镁 0.2 g;四水合硫酸锰 0.05 g;琼脂 15.0 g;最终 pH 值(6.2 $\pm$ 0.2)]、结晶紫中性红胆盐琼脂[VRBA, 蛋白胨 7.0 g;酵母提取物 3.0 g;乳糖 10.0 g;氯化钠 5.0 g;胆汁盐 3 号 1.5 g;中性红 0.03 g;结晶紫 0.002 g;琼脂 15.0 g;最终 pH 值(7.4 $\pm$ 0.2)]、孟加拉红培养基(虎红琼脂)(蛋白胨 5.0 g;葡萄糖 10.0 g;磷酸氢二钾 1.0 g;七水合硫酸镁 0.5 g;琼脂 15.0 g;孟加拉玫瑰红 0.033 g;氯霉素 0.1 g)进行培养计数,乳酸菌用厌氧培养箱,酵母菌和大肠杆菌用生化培养箱,30  $^{\circ}C$  培养 24 h 后计数<sup>[22]</sup>。

#### 1.3.3 单宁含量测定 水解单宁:用 70% 丙酮,超声波处理,离心并收集上清液,用没食子酸(广州添资生物科技有限公司,广州)为标准品绘制标准曲线,采用 Folin-Ciocalteu 试剂比色法测定总酚和简单酚含量,总酚减去简单酚即为水解单宁含量;缩合单宁:20 mg 样品加 10 mL 丙酮—丁醇—氯化氢试剂,70 $^{\circ}C$ 水浴 2.5 h,冷却后 8000 r $\cdot min^{-1}$ 离心 5 min,554 nm 测 OD 值,以原花青素(广州添资生物科技有限公司,广州)为标准品制作标准曲线,计算缩合单宁含量<sup>[23]</sup>。

### 1.4 数据统计

采用 SPSS 18.0 进行双因素方差分析(Two-way ANOVA),两个因素交互显著时用 Duncan 氏对各组进行多重比较, $P < 0.05$  为差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 辣木原料的特性

辣木叶原料 CP 含量为 16.72%, WSC 含量较高为 10.72%, NDF 和 ADF 分别为 31.24% 和 24.23%, 水解单宁和缩合单宁分别是 1.86% 和 1.48%, 原料中微生物含量丰富,乳酸菌和大肠杆菌数量分别是 4.63 和 4.81 log cfu  $\cdot g^{-1}$  FM(表 1)。

2.2 辣木叶青贮 60 d 指标测定

2.2.1 植物乳杆菌和含水量对 60 d 青贮辣木叶青贮品质的影响

由表 2 可知,辣木叶青贮发酵 60 d, 75%和 60%水分组添加 LP 后,pH 值显著下降( $P<0.05$ ),70%水分组添加 LP 后 pH 值显著上升( $P<0.05$ ),70%和 60%水分组添加 LP 后 AA 和 PA 含量显著升高( $P<0.05$ ),70%水分组添加 LP 后的 LA 含量显著升高( $P<0.05$ );大肠杆菌的数量小于  $2.0 \log \text{cfu} \cdot \text{g}^{-1} \text{FM}$ 。方差分析结果表明,水分对于各个指标(ADF、NDF 含量和大肠杆菌数量除外)均有极显著的影响( $P<0.01$ ),添加 LP 对 pH 值,AA,PA 含量和乳酸菌数量有极显著的影响( $P<0.01$ ),对 LA 含量有显著的影响( $P<0.05$ ),二者的交互作用对 pH 值、乳酸菌数目,LA 和 PA 含量有极显著的影响( $P<0.01$ )。

表 1 辣木叶原料的特性

Table 1 The characteristics of <i>M. oleifera</i> leaves material	
项目 Items	含量 Content
干物质 Dry matter (%)	24.89
粗蛋白 Crud protein (CP, %DM)	16.72
可溶性碳水化合物 Water soluble carbohydrate (WSC, %DM)	10.72
中性洗涤纤维 Neutral detergent fiber (NDF, %DM)	31.24
酸性洗涤纤维 Acid detergent fiber (ADF, %DM)	21.23
水解单宁 Hydrolysable tannin (HT, %DM)	1.86
缩合单宁 Condensed tannin (CT, %DM)	1.48
乳酸菌 Lactic acid bacteria (LAB, log cfu · g <sup>-1</sup> FM)	4.63
酵母菌 Yeasts (log cfu · g <sup>-1</sup> FM)	2.30
大肠杆菌 Coliform bacteria (log cfu · g <sup>-1</sup> FM)	4.81

表 2 植物乳杆菌和含水量对 60 d 辣木叶青贮品质的影响

Table 2 Effect of moisture and LP treatment on character of silage *M. oleifera* leaves in 60 d

项目 Items	处理 Treatments	水分 Moisture			SEM	差异性显著 Significance		
		DM <sub>1</sub>	DM <sub>2</sub>	DM <sub>3</sub>		M	T	M×T
干物质 Dry matter (%)	CK	23.60C	29.70B	39.80A	1.85	* *	NS	NS
	LP	24.70B	26.70B	40.70A				
pH	CK	3.82a	3.82b	3.83a	0.02	* *	* *	* *
	LP	3.69bC	3.93aA	3.76bB				
乳酸菌 Lactic acid bacteria (log cfu · g <sup>-1</sup> FM)	CK	5.03B	6.82aA	5.14bB	0.29	* *	* *	* *
	LP	4.92B	<2.00bC	5.30aA				
酵母菌 Yeasts (log cfu · g <sup>-1</sup> FM)	CK	4.80B	5.24A	4.46B	0.19	* *	NS	NS
	LP	4.89A	3.15B	3.70B				
大肠杆菌 Coliform (log cfu · g <sup>-1</sup> FM)	CK	<2.00	<2.00	<2.00	0.00	NS	NS	NS
	LP	<2.00	<2.00	<2.00				
乳酸 Lactic acid (LA, %DM)	CK	1.25A	0.78bB	1.17A	0.51	* *	*	* *
	LP	1.36A	1.05aAB	0.98BC				
乙酸 Acetic acid (AA, %DM)	CK	0.013aB	0.004bC	0.045bA	0.08	* *	* *	NS
	LP	0.009bC	0.092aA	0.072aB				
丙酸 Propionicacid (PA, %DM)	CK	0.90bB	0.27bB	3.27bA	0.51	* *	* *	* *
	LP	2.87aB	5.27aA	5.72aA				
中性洗涤纤维 Neutral detergent fiber (NDF, %DM)	CK	30.30	28.90	29.50	0.41	NS	NS	NS
	LP	31.20	29.90	30.20				
酸性洗涤纤维 Acid detergent fiber (ADF, %DM)	CK	20.90	19.10	21.50	0.39	NS	NS	NS
	LP	22.40	22.00	21.90				

注: 同列不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ ); 同行不同大写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。CK 为对照组, LP 为添加植物乳杆菌组; DM<sub>1</sub>、DM<sub>2</sub>、DM<sub>3</sub> 分别表示含水量 75%、70%、60%; SEM, 平均标准误; \* \* 表示 0.01 水平差异显著, \* 表示 0.05 水平差异显著, NS 表示差异不显著; M 表示水分, T 表示处理, M×T 表示水分和处理的交互作用。下同。

Note: a—b means significant difference in the same column ( $P<0.05$ ); A—C means significant difference in the same raw ( $P<0.05$ ). CK is the control group, LP is the addition of *Lactobacillus plantarum*; DM<sub>1</sub>, DM<sub>2</sub> and DM<sub>3</sub> are the moisture content of 75%, 70%, 60%; SEM, standard error of means; \* \* significant at  $P<0.01$ , \* significant at  $P<0.05$ , NS no significant; M, moisture; T, treatment; M×T, interaction between moisture and treatment. The same below.

**2.2.2 植物乳杆菌和含水量对 60 d 青贮辣木叶单宁含量的影响** 由表 3 可知,辣木叶青贮发酵 60 d 后,添加 LP 和 3 个含水量处理对单宁酸含量均无显著影响。

**2.2.3 植物乳杆菌和含水量对 60 d 青贮辣木叶营养价值的影响** 由表 4 可知,辣木叶青贮发酵 60 d 后,60%含水量组相比于 75%和 70%水分组,TP 含量显著降低( $P<0.05$ ),FAA 和  $\text{NH}_3\text{-N}$  含量显著升高( $P<0.05$ );添加 LP 和 3 个水分处理对 CP 含量无显著影响。70%水分组添 LP 后,TP 含量显著降低( $P<0.05$ ),NPN 含量显著增加( $P<0.05$ )。方差分析结果表明,含水量对于 NPN、TP、FAA、 $\text{NH}_3\text{-N}$  的含量有极显著的影响( $P<0.01$ ),对 CP 含量有显著影响( $P<0.05$ );添加 LP 对 NPN 和  $\text{NH}_3\text{-N}$  的含量有极显著的影响( $P<0.01$ ),对 TP 含量有显著影响( $P<0.05$ );水分和植物乳杆菌的交互作用对 NPN 有显著影响( $P<0.05$ )。

表 3 植物乳杆菌和含水量对 60 d 青贮辣木叶单宁含量的影响

Table 3 Effect of moisture and LP treatment on the Tannin contents of silage *M. oleifera* leaves in 60 d (% DM)

项目 Items	处理 Treatments	水分 Moisture			SEM	差异性显著 Significance		
		DM <sub>1</sub>	DM <sub>2</sub>	DM <sub>3</sub>		M	T	M×T
总酚 Total phenols	CK	2.36	2.40	2.90	0.11	NS	NS	NS
	LP	2.46	3.01	2.30				
简单酚 Simple phenols	CK	0.73	0.76	0.86	0.03	NS	NS	NS
	LP	0.75	0.87	0.82				
水解单宁 Hydrolysable tannin (HT)	CK	1.63	1.64	2.04	0.09	NS	NS	NS
	LP	1.71	2.14	1.45				
缩合单宁 Condensed tannin (CT)	CK	1.09	1.13	1.34	0.03	NS	NS	NS
	LP	1.20	1.24	1.26				

表 4 植物乳杆菌和含水量对 60 d 青贮辣木叶营养价值的影响

Table 4 Effect of moisture and LP treatment on nutrition value of silage *M. oleifera* leaves in 60 d (% DM)

项目 Items	处理 Treatments	水分 Moisture			SEM	差异性显著 Significance		
		DM <sub>1</sub>	DM <sub>2</sub>	DM <sub>3</sub>		M	T	M×T
真蛋白质 Crud protein (CP)	CK	17.38	17.98	17.69	0.15	*	NS	NS
	LP	17.76	18.53	18.53				
真蛋白质 Total protein (TP)	CK	7.56B	9.50aA	6.10bC	0.29	* *	*	NS
	LP	6.84A	7.23bA	7.23aA				
非蛋白氮 Non-protein nitrogen (NPN)	CK	9.82bB	8.48bC	11.59A	0.28	* *	* *	*
	LP	10.91aA	11.30aA	11.30A				
氨基酸类游离氮 Free amino acid (FAA)	CK	0.48B	0.47B	0.76A	0.07	* *	NS	NS
	LP	0.74B	1.17A	1.04A				
氨态氮 Ammonia nitrogen ( $\text{NH}_3\text{-N}$ )	CK	0.017bB	0.012bB	0.058bA	0.01	* *	* *	NS
	LP	0.041aC	0.135aA	0.112aB				

2.3 辣木叶青贮 120 d 指标测定

**2.3.1 植物乳杆菌和含水量对 120 d 青贮辣木叶青贮品质的影响** 由表 5 可知,60%含水量组相比于 75%和 70%水分组,LAB 数目显著降低( $P<0.05$ ),AA、PA、NDF 和 ADF 含量显著升高;各个水分组添加 LP 后 pH 值和酵母菌数目均降低但并不显著,75%和 70%含水量组添加 LP 后 LAB 数目显著降低( $P<0.05$ ),70%含水量添加 LP 后 LA 含量显著升高( $P<0.05$ )并且各个水分组的 AA 和 PA 含量均有显著升高( $P<0.05$ );在 75%和 70%含水量下添加 LP 后 NDF 和 ADF 含量显著升高( $P<0.05$ )。方差分析结果表明,水分对 LAB 数目,PA、NDF 和 ADF 含量有着极显著的影响( $P<0.01$ ),对 LA 和 AA 含量有显著影响( $P<0.05$ );添加 LP 对 pH 值以



及 AA 和 PA 含量有极显著影响( $P<0.01$ ),对 LAB 数量,LA、NDF 和 ADF 含量有显著影响( $P<0.05$ ),二者的交互作用对 pH 值有极显著影响( $P<0.01$ )。

**2.3.2 植物乳杆菌和含水量对 120 d 青贮辣木叶单宁含量的影响** 由表 6 中方差分析结果表明,水分以及二因素的交互作用对水解单宁含量有极显著影响( $P<0.01$ )。

表 5 植物乳杆菌和含水量对 120 d 青贮辣木叶青贮品质的影响

Table 5 Effect of moisture and LP treatment on character of silage *M. oleifera* leaves in 120 d

项目 Items	处理 Treatments	水分 Moisture			SEM	差异性显著 Significance		
		DM <sub>1</sub>	DM <sub>2</sub>	DM <sub>3</sub>		M	T	M×T
干物质 Dry matter (%)	CK	23.70C	36.30A	31.40B	1.54	*	NS	NS
	LP	23.40B	33.30A	36.50A				
pH	CK	3.99	4.08	4.05	0.03	**	**	**
	LP	3.86	4.06	3.91				
乳酸菌 Lactic acid bacteria (LAB, log cfu·g <sup>-1</sup> FM)	CK	6.50aA	6.55aA	5.97bB	0.18	**	*	NS
	LP	5.23bA	5.21bA	4.53aB				
酵母菌 Yeasts (log cfu·g <sup>-1</sup> FM)	CK	4.41	3.87	4.21a	0.11	NS	NS	NS
	LP	4.11	3.96	3.40b				
大肠杆菌 Coliform (log cfu·g <sup>-1</sup> FM)	CK	<2.00	<2.00	<2.00	0.00	NS	NS	NS
	LP	<2.00	<2.00	<2.00				
乳酸 Lactic acid (LA,%DM)	CK	0.62	0.69b	0.72	0.69	*	*	NS
	LP	0.78B	1.08aA	0.94B				
乙酸 Acetic acid (AA,%DM)	CK	—	0.013bB	0.045bA	0.10	*	**	NS
	LP	0.012B	0.109aA	0.082aA				
丙酸 Propionicacid (PA,%DM)	CK	0.55bB	0.67bB	2.44bA	0.54	**	**	NS
	LP	2.68aB	2.68aB	6.59aA				
中性洗涤纤维 Neutral detergent fiber (NDF,%DM)	CK	26.78bB	28.09bB	30.45A	0.35	**	*	NS
	LP	30.61a	30.44a	30.59				
酸性洗涤纤维 Acid detergent fiber (ADF,%DM)	CK	16.34bB	17.19bB	22.66A	0.51	**	*	NS
	LP	22.24a	21.22a	22.37				

注:“—”表示未检测出乙酸(AA)含量。  
Note:“—”means not detected acetic acid (AA) content.

表 6 植物乳杆菌和含水量对 120 d 青贮辣木叶单宁含量的影响

Table 6 Effect of moisture and LP treatment on the Tannin contents of silage *M. oleifera* leaves in 120 d (% DM)

项目 Items	处理 Treatments	水分 Moisture			SEM	差异性显著 Significance		
		DM <sub>1</sub>	DM <sub>2</sub>	DM <sub>3</sub>		M	T	M×T
总酚 Total phenols	CK	1.13	2.41	2.88	0.17	NS	NS	NS
	LP	2.27	2.58	3.03				
简单酚 Simple phenols	CK	0.63	0.75	0.88	0.04	NS	NS	NS
	LP	0.68	0.96	1.00				
水解单宁 Hydrolysable tannin (HT)	CK	0.64B	1.66A	2.01A	0.12	**	NS	**
	LP	1.59B	2.16A	1.78B				
缩合单宁 Condensed tannin (CT)	CK	1.38	1.49	1.28	0.03	NS	NS	NS
	LP	1.31	1.34	1.24				

**2.3.3 植物乳杆菌和不同含水量对 120 d 青贮辣木叶营养价值的影响** 由表 7 可知,60%含水量组相比于 70%含水量组,TP 含量显著降低( $P<0.05$ ),FAA 和  $\text{NH}_3\text{-N}$  含量显著升高( $P<0.05$ );70%含水量组添加 LP 后,TP 含量有显著降低( $P<0.05$ ),NPN 含量显著升高( $P<0.05$ );75%和 70%含水量组添加 LP 后, $\text{NH}_3\text{-N}$  和 FAA 含量显著升高( $P<0.05$ )。方差分析结果表明,水分对各个指标(CP 除外)均有极显著影响( $P<0.01$ );植物乳杆菌对 NPN 和 TP 含量有极显著影响( $P<0.01$ ),对  $\text{NH}_3\text{-N}$  和 FAA 含量有显著影响( $P<0.05$ );二者的交互作用对 TP 含量有极显著影响( $P<0.01$ ),对 NPN 含量有显著影响( $P<0.05$ )。

表 7 植物乳杆菌和不同含水量对 120 d 青贮辣木叶营养价值的影响  
Table 7 Effect of moisture and LP treatment on nutrition value of silage *M. oleifera* leaves in 120 d (% DM)

项目 Items	处理 Treatments	水分 Moisture			SEM	差异性显著 Significance		
		DM <sub>1</sub>	DM <sub>2</sub>	DM <sub>3</sub>		M	T	M×T
真蛋白质 Crud protein (CP)	CK	19.12	19.15	18.92	0.21	NS	NS	NS
	LP	17.74	19.05	18.76				
真蛋白质 Total protein (TP)	CK	7.56B	13.34aA	6.95bB	0.32	* *	* *	* *
	LP	7.29A	6.58bB	7.22aA				
非蛋白氮 Non-protein nitrogen (NPN)	CK	11.38aA	8.81bB	11.97A	0.33	* *	* *	*
	LP	10.45bC	12.47aA	11.54B				
氨基酸类游离氮 Free amino acid (FAA)	CK	0.56bB	0.45bB	0.81A	0.06	* *	*	NS
	LP	0.68aB	1.13aA	1.03A				
氨态氮 Ammonia nitrogen ( $\text{NH}_3\text{-N}$ )	CK	0.022bB	0.025bB	0.057bA	0.01	* *	*	NS
	LP	0.041aC	0.135aA	0.112aB				

3 讨论

3.1 辣木叶作为青贮原料的特点

本试验中使用的辣木叶原料 CP 为 16.72%,低于刘昌芬等<sup>[24]</sup>报道的 27.5%,这可能是不同的地理位置、品种、收获时间导致辣木叶营养物质含量不同。辣木叶原料 NDF 和 ADF 分别为 31.24%和 21.23%,均低于热带木本饲用灌木的平均含量<sup>[25]</sup>(NDF:38.83%;ADF:33.67%);WSC 为 10.72%,张庆<sup>[26]</sup>报道,WSC 是能否成功制作优质青贮饲料的关键,青贮原料中 WSC 一般需达到 6%~7%以上,青贮饲料才能良好保存。本试验中,辣木叶原料 WSC 为 10.72%,这可能是辣木叶易于调制青贮饲料的原因。

3.2 含水量对青贮品质的影响

青贮原料的含水量是影响饲料营养品质和青贮发酵品质的重要条件之一。本试验中,辣木叶青贮发酵 60 和 120 d 时,与 75%和 60%含水量组相比,70%含水量组的 NPN 含量显著降低,TP 含量显著升高;与 60%含水量组相比,70%含水量组的 FAA 和  $\text{NH}_3\text{-N}$  含量显著升高。可见辣木叶青贮过程中,大量的蛋白质降解成非蛋白氮。青贮饲料中蛋白质的变化,除了与梭菌等有害菌的活动有关外,最主要的是植物中所含的蛋白质水解酶的作用<sup>[27]</sup>,并且蛋白酶的活性受到 pH 的影响。在适宜含水量条件下青贮时,干物质和可溶性碳水化合物含量较高,能够增加发酵底物,快速降低 pH 得到较高的 LA 含量<sup>[28]</sup>,而原料含水量过高导致腐败菌的滋生,同时产生的渗液会使饲草养分流失较多<sup>[29]</sup>,含水量过低又会使介质中水的活性降低,自身的产酸菌处于生理干旱状态,酸度积累受到抑制,影响青贮的效果。因此 NPN 含量的降低,原因可能是酸性环境对蛋白酶活性的抑制作用以及适宜含水量减少腐败菌的滋生。发酵 60 d 时,70%含水量组相比于 60%含水量组,LAB 和 Yeasts 的数目显著升高,大肠杆菌数目小于 2.0 log cfu · g<sup>-1</sup> FM,而 LP,AA 和 PA 含量均显著降低,说明 70%含水量组有利于乳酸菌等微生物的繁殖,这与张德玉等<sup>[30]</sup>研究结果一致。含水量低的青贮辣木叶的 NDF 和 ADF 含量整体高于含水量高的青贮,这可能是各水分组间青贮原料干物质含量差异引起的。发酵 60 和 120 d 时,70%含水量组相比于

60%含水量组,  $\text{NH}_3\text{-N}$  和 FAA 含量显著降低, 同时  $\text{NH}_3\text{-N}/\text{TN}$ (总氮) 小于 10%, 说明 70%水分条件下辣木叶青贮发酵中蛋白质分解程度低, 符合优质饲料标准<sup>[22]</sup>。

### 3.3 添加植物乳杆菌对青贮品质的影响

在青贮过程中的乳酸菌数量需要达到  $1 \times 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$  才可以使 pH 迅速降低, 抑制有害微生物的生长, 减少青贮饲料营养物质的消耗、分解和流失, 同时减少胺等有毒物质的产生, 保证青贮料的质量<sup>[32-33]</sup>。本试验中, 添加植物乳杆菌后, 在辣木叶青贮发酵的 60 和 120 d 时, 与 CK 组相比, 70%含水量组 TP 含量显著降低,  $\text{NH}_3\text{-N}$  和 FAA 显著升高。添加 LP 后, 辣木叶青贮品质虽有改善, 但效果不太明显, 这可能是添加的乳酸菌与辣木叶原料中的乳酸菌产生了拮抗作用, 这也导致了 LP 处理后 70%含水量组中乳酸菌数量相比于 CK 组显著降低, Wohlt<sup>[33]</sup>也发现了类似的现象。另一方面, 辣木叶中含有丰富的酚类化合物, 具有抗菌活性<sup>[34-35]</sup>, 这也可能是导致添加乳酸菌对辣木叶青贮发酵品质改善效果不够显著的原因。与 CK 组相比, 70%含水量组的有机酸(LA、AA 和 PA)含量显著升高, 原因可能是添加植物乳杆菌, 使得 PH 迅速降低, 抑制其他微生物的生长, 有利于乳酸等有机酸的积累, 这与玉柱等<sup>[36]</sup>, 田瑞霞等<sup>[37]</sup>的研究结果一致。

### 3.4 添加植物乳杆菌和含水量对单宁含量的影响

单宁是植物性饲料原料中一种重要的抗营养因子, 主要表现在减少动物采食量, 降低营养物质的生物利用率及产生毒害作用<sup>[38-39]</sup>。同时, 单宁对动物的生长具有多种生理活性, 如止血、抑制微生物、抗过敏、抗突变、抗衰老等作用<sup>[40]</sup>。根据化学结构的不同, 单宁通常分为水解单宁(鞣酸酯类多酚)和缩合单宁(聚黄烷醇类多酚或原花色素)<sup>[41-42]</sup>。本试验发现, 辣木叶直接青贮 60 和 120 d 后对单宁含量有一定的降低作用, 这可能是因为青贮饲料中丰富的微生物产生了单宁酶<sup>[43]</sup>, 单宁酶的活性受 pH 影响很大, 刘如石等<sup>[43]</sup>和郭鲁宏等<sup>[19]</sup>研究发现, 单宁酶活性的最适 pH 为 6.0~6.5。因此, 可能是青贮过程的酸性内环境影响了单宁酶的活性, 导致单宁降解变化不显著。

## 4 结论

辣木叶饲用价值较高且易于调制青贮饲料。青贮时适宜含水量和添加植物乳杆菌均可提高辣木叶发酵品质, 研究发现以 70%含水量为最佳, 显著降低氨态氮( $\text{NH}_3\text{-N}$ )和氨基酸类游离氮(FAA)含量, 显著增加真蛋白质(TP)和乳酸菌(LAB)含量; 添加植物乳杆菌后, 可以显著增加有机酸(LA、AA 和 PA)的含量。研究还发现添加植物乳杆菌(LP)和调整不同含水量可以降低青贮辣木叶单宁含量, 但影响不显著。

## 参考文献 References:

- [1] Xu M, Zhao S J, Song H, *et al.* Research progress of *Moringa oleifera*. Food Science, 2016, 37(23): 291-301.  
许敏, 赵三军, 宋晖, 等. 辣木的研究进展. 食品科学, 2016, 37(23): 291-301.
- [2] Liu Z J, Sun J H, Liu Z H, *et al.* The application value and development prospect of characteristic plant *Moringa oleifera*. Chinese Journal of Tropical Crops, 2014, 35(9): 1871-1878.  
刘子记, 孙继华, 刘昭华, 等. 特色植物辣木的应用价值及发展前景分析. 热带作物学报, 2014, 35(9): 1871-1878.
- [3] Teixeira E M, Carvalho M R, Neves V A, *et al.* Chemical characteristics and fractionation of proteins from *Moringa oleifera* leaves. Food Chemistry, 2014, 147(4): 51-54.
- [4] Wu D, Cai Z H, Wei Y X, *et al.* The research progress of *Moringa oleifera* as a new plant protein feed. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2013, 25(3): 503-511.  
吴颀, 蔡志华, 魏焯昕, 等. 辣木作为新型植物性蛋白质饲料的研究进展. 动物营养学报, 2013, 25(3): 503-511.
- [5] Asaolu V, Binuomote R, Akinlade J, *et al.* Intake and growth performance of west african dwarf goats fed *Moringa oleifera*, *gliricidia sepium* and *leucaena leucocephala* dried leaves as supplements to cassava peels. Journal of Biology Agriculture & Healthcare, 2012, 2(9): 45-53.
- [6] Babeker E A, Bdalbagi Y M A. Effect of feeding different levels of *Moringa oleifera* leaves on performance, haematological, biochemical and some physiological parameters of Sudan Nubian goats. Online Journal of Animal & Feed Research, 2015, 5(2): 50-61.
- [7] Sultana N, Alimon A R, Huque K S, *et al.* The feeding value of *Moringa* (*Moringa oleifera*) foliage as replacement to conventional concentrate diet in Bengal goats. Advances in Animal & Veterinary Sciences, 2015, 3(3): 164-173.



- [8] Adegun M, Aye P. Evaluation of *Moringa oleifera*, *Gliricidia sepium* and *Leucaena leucocephala*-based multnutrient blocks as feed supplements for sheep in South Western Nigeria. *Agriculture & Biology Journal of North America*, 2011, 2(11): 1395—1401.
- [9] Mendieta-Araica B, Spöndly R, Reyes-Sánchez N, *et al.* *Moringa (Moringa oleifera)* leaf meal as a source of protein in locally produced concentrates for dairy cows fed low protein diets in tropical areas. *Livestock Science*, 2011, 137(1/3): 10—17.
- [10] Sarwatt S V, MilangHa M S, Lekule F P, *et al.* *Moringa oleifera* and cottonseed cake as supplements for smallholder dairy cows fed Napier grass. *Livestock Research for Rural Development*, 2004, 16(6): 13—20.
- [11] Zhang J G, Feng F, Zhuang Q, *et al.* Silage treatment of degradation of mimosin and tannin in *Leucaena*//Procedural Symposium of Youth Working Committee of China Grass Society (Volume One). Shanghai: 2010.  
张建国, 冯帆, 庄骐, 等. 青贮处理降解银合欢中含羞草素和单宁的研究//中国草学会青年工作委员会学术研讨会论文集(上册). 上海: 2010.
- [12] Zhong S, Zhang X N, Yang Y G, *et al.* Effects of lactic acid bacteria and cellulase on the quality of alfalfa silage with different water contents. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2017, 29(5): 1821—1830.  
钟书, 张晓娜, 杨云贵, 等. 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.
- [13] Wan L Q, Li X L, Zhang X P, *et al.* Effects of concentration of water and additive components on silage effect in alfalfa. *Acta Prataculturae Sinica*, 2007, 16(2): 40—45.  
万里强, 李向林, 张新平, 等. 苜蓿含水量与添加剂组分浓度对青贮效果的影响研究. *草业学报*, 2007, 16(2): 40—45.
- [14] Wang P, Bai C S, Liu L, *et al.* Effects of mixed lactic acid bacteria preparations on fermentation quality of phragmites australis under low temperature conditions. *Acta Agrestia Sinica*, 2011, 19(1): 127—131.  
王鹏, 白春生, 刘林, 等. 低温条件下混合乳酸菌制剂对芦苇发酵品质的影响. *草地学报*, 2011, 19(1): 127—131.
- [15] Zhang L Y. Feed analysis and quality detection technology. Third edition. Beijing: China Agricultural University Press, 2007: 49—75.  
张丽英. 饲料分析及质量检测技术(第 3 版). 北京: 中国农业大学出版社, 2007: 49—75.
- [16] Licitra G, Hernandez T M, Soest P J V. Standardization of procedures for nitrogen fraction on ruminant feeds. *Animal Feed Science & Technology*, 1996, 57(4): 347—358.
- [17] Bolsen K K, Lin C, Brent B E, *et al.* Effect of silage additives on the microbial succession and fermentation process of alfalfa and corn silage. *Journal of Dairy Science*, 1992, 75(11): 3066—3083.
- [18] Cui X. Effects of adding formic acid and mixed silage on the fermentation characteristics and nutritional quality of alfalfa. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2015.  
崔鑫. 添加甲酸及混合青贮对紫花苜蓿发酵特性和营养品质的影响. 南京: 南京农业大学, 2015.
- [19] Guo L H, Yang S K. Study on preparation of gallic acid from immobilized aspergillus niger tanase. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2000, 16(5): 614—617.  
郭鲁宏, 杨顺楷. 利用固定化黑曲霉单宁酶制备没食子酸的研究. *生物工程学报*, 2000, 16(5): 614—617.
- [20] Shu S M, Yang C H, Tang Z S, *et al.* Effect of adding green juice fermented broth on the quality of hemorrhoids silage with different water content. *Grass Feeding Livestock*, 2011, (4): 41—43.  
舒思敏, 杨春华, 唐智松, 等. 添加绿汁发酵液对不同含水量扁穗牛鞭草青贮料品质的影响. *草食家畜*, 2011, (4): 41—43.
- [21] Xu Q F, Yu Z, Han J G, *et al.* Determination of organic acids in alfalfa silage by high performance liquid chromatography. *Grassland and Turf*, 2007, (2): 63—65.  
许庆方, 玉柱, 韩建国, 等. 高效液相色谱法测定紫花苜蓿青贮中的有机酸. *草原与草坪*, 2007, (2): 63—65.
- [22] Zhang Q, Wang X G, Yu Z. Effects of lactobacillus additives and water content on silage of alfalfa. *Chinese Cows*, 2015, (18): 37—40.  
张庆, 王显国, 玉柱. 乳酸菌添加剂和含水量对紫花苜蓿青贮的影响. *中国奶牛*, 2015, (18): 37—40.
- [23] Makkar H P S, Becker K. Vanillin-HCl method for condensed tannins: Effect of organic solvents used for extraction of tannins. *Journal of Chemical Ecology*, 1993, 19(4): 613—621.
- [24] Liu C F, Li G H. The nutritional value of *Moringa*. *Tropical Agricultural Science and Technology*, 2004, 27(1): 4—8.  
刘昌芬, 李国华. 辣木的营养价值. *热带农业科技*, 2004, 27(1): 4—8.
- [25] Li M, Zi X J, Zhou H L, *et al.* Evaluation of forage value of sometropical shrubs in hainan province. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2012, (1): 85—94.  
李茂, 字学娟, 周汉林, 等. 海南省部分热带灌木饲用价值评定. *动物营养学报*, 2012, (1): 85—94.
- [26] Zhang Q. Screening and action mechanism of lactic acid bacteria for forage silage. Beijing: China Agricultural University,

- 2016.
- 张庆. 饲草青贮用乳酸菌的筛选及作用机理. 北京: 中国农业大学, 2016.
- [27] Rooke J A, Armstrong D G. The importance of the form of nitrogen on microbial protein synthesis in the rumen of cattle receiving grass silage and continuous intrarumen infusions of sucrose. *British Journal of Nutrition*, 1989, 61(1): 113—121.
- [28] Zhang X G, Han W X. Alfalfa semi-dry silage technology. *Animals Breeding and Feed*, 2010, (8): 78—80.
- 张学功, 韩文祥. 紫花苜蓿半干青贮技术. *养殖与饲料*, 2010, (8): 78—80.
- [29] Wan L Q, Li X L, He F. Effect of lactic acid bacteria and cellulase on quality of alfalfa silage. *Pratacultural Science*, 2011, 28(7): 1379—1383.
- 万里强, 李向林, 何峰. 添加乳酸菌和纤维素酶对苜蓿青贮品质的影响. *草业科学*, 2011, 28(7): 1379—1383.
- [30] Zhang D Y, Li Z Q, Liu C L. Research progress on the factors affecting silage quality. *Journal of Domestic Animal Ecology*, 2007, 28(1): 109—112.
- 张德玉, 李忠秋, 刘春龙. 影响青贮饲料品质因素的研究进展. *家畜生态学报*, 2007, 28(1): 109—112.
- [31] Liu T, Wang T F, Luo K, *et al.* Advances in research on alfalfa silage additives. *Feed Research*, 2016, (19): 12—14.
- 刘婷, 王腾飞, 罗宽, 等. 苜蓿青贮添加剂研究进展. *饲料研究*, 2016, (19): 12—14.
- [32] Li G Y, Chen J H, Zhang L J. Application of additives in alfalfa silage. *Feed Research*, 2014, (7): 14—16.
- 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.
- [33] Wohlt J E. Use of a Silage inoculant to improve feeding stability and intake of a corn silage-grain diet1. *Journal of Dairy Science*, 1989, 72(2): 545—551.
- [34] Guillén-Román C J, Guevara-González R G, Rocha-Guzmán N E, *et al.* Effect of nitrogen privation on the phenolics contents, antioxidant and antibacterial activities in *Moringa oleifera* leaves. *Industrial Crops & Products*, 2018, 114: 45—51.
- [35] Ratshilivha N, Awouafack M D, Toit E S D, *et al.* The variation in antimicrobial and antioxidant activities of acetone leaf extracts of *Moringa oleifera*, (Moringaceae) trees enables the selection of trees with additional uses. *South African Journal of Botany*, 2014, 92(1): 59—64.
- [36] Yu Z, Bai C S, Sun Q Z, *et al.* Effects of different additives on the quality of fructus lyciimillet. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2008, 10(4): 76—81.
- 玉柱, 白春生, 孙启忠, 等. 不同添加剂对五芒雀麦青贮品质的影响. *中国农业科技导报*, 2008, 10(4): 76—81.
- [37] Tian R X, An Y, Wang G W, *et al.* The changes of pH value and nutrient substances in the process of alfalfa silage. *Acta Prataculturæ Sinica*, 2005, 14(3): 82—86.
- 田瑞霞, 安渊, 王光文, 等. 紫花苜蓿青贮过程中 pH 值和营养物质变化规律. *草业学报*, 2005, 14(3): 82—86.
- [38] Hathway D E. CHAPTER 5—The condensed tannins. *Wood Extractives & Their Significance to the Pulp & Paper Industries*, 1962, 20(6): 191—228.
- [39] Huo Z H, Fang R J. Mechanism of anti-nutritional action of tannin on ruminants and its elimination measures. *Chinese Feed*, 2007, 20: 20—23.
- 霍振华, 方热军. 单宁对反刍动物的抗营养作用机理及其消除措施. *中国饲料*, 2007, 20: 20—23.
- [40] Shi B, Di Y. Plant polyphenols. Beijing: Science Press, 2000.
- 石碧, 狄莹. 植物多酚. 北京: 科学出版社, 2000.
- [41] Sun D W. Plant tannin chemistry. Beijing: China Forestry Publishing House, 1992.
- 孙达旺. 植物单宁化学. 北京: 中国林业出版社, 1992.
- [42] Jana A, Halder S K, Banerjee A, *et al.* Biosynthesis, structural architecture and biotechnological potential of bacterial tannase; a molecular advancement. *Bioresource Technology*, 2014, 157: 327—340.
- [43] Liu R S, Xie D P, Wang G S, *et al.* Study on the immobilization and properties of tannins. *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences)*, 2000, 26(5): 386—388.
- 刘如石, 谢达平, 王革生, 等. 单宁酶的固定化及其性质的研究. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2000, 26(5): 386—388.