DOI:10.11686/cyxb2025498 http://cyxb.magtech.com.cn
崔可儿, 王艳艳, 周天宇, 等. 甜叶菊渣替代王草及添加糖蜜对发酵全混合日粮的影响研究. 草业学报, 2026, 35(12): 113－123.
CUI Ke-er, WANG Yan-yan, ZHOU Tian-yu, *et al*. An evaluation of the impact on dairy cow fermented total mixed ration nutritional value of substitution of king grass with stevia residue and molasses addition. Acta Prataculturae Sinica, 2026, 35(12): 113－123.

甜叶菊渣替代王草及添加糖蜜对发酵全混合日粮的影响研究

崔可儿[1],王艳艳[1],周天宇[1],李国栋[2],张建国[1],田静[1*]
(1. 华南农业大学南方草业中心,广东 广州 510642;2. 华微(广州)农业生物科技有限公司,广东 广州 510700)

摘要:本研究基于高产奶牛的营养需求明确不同比例甜叶菊渣替代王草并添加糖蜜对发酵全混合日粮(FTMR)特性的影响。以甜叶菊渣和王草为原料,将甜叶菊渣分别按鲜物质0、25%以及50%的比例替代王草制作全混合日粮(TMR),设无添加糖蜜为对照(CK)以及添加2%糖蜜(TM),青贮60 d,测定发酵品质、有氧稳定性、细菌多样性和抗氧化能力。结果表明,未添加糖蜜的处理中,甜叶菊渣替代50%王草显著增加其FTMR的乙酸含量[9.75至12.85 g·kg^{-1}干物质(DM)],显著降低其氨态氮(NH_3-N)含量[24.24至22.23 g·kg^{-1}总氮(TN)];添加糖蜜显著($P<0.05$)提高了替代50%时FTMR的乳酸(49.13至52.95 g·kg^{-1} DM)和乙酸含量(12.85至16.81 g·kg^{-1} DM);甜叶菊渣替代王草显著提高了FTMR的有氧稳定性,替代比例为50%时,有氧稳定性最好(>6 d);替代比例的提高显著降低了FTMR有氧暴露期间的干物质损失率,无添加糖蜜FTMR的干物质损失率由6.78%下降为2.04%,添加糖蜜的干物质损失率由4.94%下降为2.23%。甜叶菊渣替代王草的FTMR优势细菌属由寡食杆菌属变为慢乳杆菌属。此外,随甜叶菊渣替代比例增加,FTMR的自由基清除能力也显著提高。综上,以50%甜叶菊渣替代王草并添加2%糖蜜的处理组合,可使FTMR获得最优的发酵品质和有氧稳定性,为高产奶牛FTMR的原料优化提供了理论依据与实践参考。

关键词:王草;甜叶菊渣;发酵全混合日粮;发酵品质;有氧稳定性

An evaluation of the impact on dairy cow fermented total mixed ration nutritional value of substitution of king grass with stevia residue and molasses addition

CUI Ke-er[1], WANG Yan-yan[1], ZHOU Tian-yu[1], LI Guo-dong[2], ZHANG Jian-guo[1], TIAN Jing[1*]
1. *South Pratacultural Research Center, South China Agricultural University, Guangzhou* 510642, *China*; 2. *Huawei (Guangzhou) Agricultural Biotechnology Co., Ltd, Guangzhou* 510700, *China*

Abstract: This study investigated the effects on the characteristics of fermented total mixed ration (FTMR) of replacing king grass (*Pennisetum purpureum* × *Pennisetum americanum* cv. 'Reyan No. 4') as a ration component with different proportions of stevia (*Stevia rebaudiana*) residue and supplementing molasses, for meeting nutritional requirements of high-yielding dairy cows. A series of total mixed rations (TMR) was prepared by replacing king grass with stevia residue at 0, 25%, and 50% on a fresh matter basis, either with no molasses addition (CK) or 2% molasses addition (TM). After 60 days of ensiling, the fermentation quality, aerobic stability, bacterial diversity, and antioxidant capacity were evaluated. It was found that in the treatments without molasses addition, at a stevia

收稿日期:2025-12-09;改回日期:2026-03-02
基金项目:国家自然科学青年基金(32401484)和国家重点研发计划(2022YFE0111000-2)资助。
作者简介:崔可儿(2000－),女,甘肃景泰人,在读博士。E-mail: 2622330529@qq.com
*通信作者 Corresponding author. E-mail: tianjing@scau.edu.cn

substitution ratio of 50%, the acetic acid content of FTMR was significantly increased from 9.75 to 12.85 g·kg^{-1} dry matter (DM), compared the corresponding treatments with molasses added, and the ammonia nitrogen content was significantly decreased from 24.24 to 22.23 g·kg^{-1} total nitrogen (TN). Adding molasses significantly ($P<0.05$) increased the lactic acid content from 49.13 to 52.95 g·kg^{-1} DM and the acetic acid content from 12.85 to 16.81 g·kg^{-1} DM in FTMR at this same stevia 50% substitution ratio. The substitution of king grass with stevia residue significantly improved the aerobic stability of FTMR. The best aerobic stability was achieved (>6 days) at the stevia substitution ratio of 50%. Increased substitution ratio significantly reduced the dry matter loss rate of FTMR during aerobic exposure. For FTMR without molasses addition, the dry matter loss rate decreased from 6.78% to 2.04%, and for FTMR with molasses addition, it decreased from 4.94% to 2.23% across the range of substitution ratios tested. In FTMR where king grass was substituted with stevia residue, the dominant bacterial genus shifted from *Paucibacter* to *Lentilactobacillus*. Additionally, as the substitution ratio of stevia residue increased, the free radical scavenging ability of FTMR also significantly improved. In conclusion, the treatment combination of replacing king grass with 50% stevia residue and adding 2% molasses achieved the best fermentation quality and aerobic stability of FTMR in these tests, providing scientific data and practical recommendation for the optimization of raw materials when preparing FTMR for high-yielding dairy cows.

Key words: king grass; stevia residue; fermented total mixed ration; fermentation quality; aerobic stability

甜叶菊(*Stevia rebaudiana*)是菊科甜叶菊属的多年生灌木,其叶片可提取甜菊糖苷,我国已成为全球最大的甜叶菊种植国和甜菊糖苷生产国[1],但甜叶菊提取甜菊糖苷后产生的大量甜叶菊渣,在实际生产中仅少量用作肥料[2],其余大部分采取燃烧、填埋等方式处理,不仅浪费资源,还会造成环境污染。甜叶菊含有抗氧化、抗炎、抗菌、降血糖等生物活性物质[3]以及较高含量的粗蛋白、氨基酸、多酚和萜类等,能改善青贮饲料的口感和营养价值,因此甜叶菊渣是一种极具利用价值的中药材加工废弃物。但甜叶菊渣中的可溶性糖含量可能不足以供给乳酸菌代谢生长,导致发酵品质降低[4]。热研4号王草(*Pennisetum purpureum*×*Pennisetum americanum* cv. 'Reyan No. 4')是我国主要热带牧草品种之一,在我国南方地区,夏秋季节高温多雨,虽然生长迅速[5],但高温高湿的环境不利于其调制干草,而将其通过青贮贮藏,对家畜全年饲料供应具有重要意义[6]。糖蜜能为乳酸菌(lactic acid bacteria,LAB)提供发酵底物,促进乳酸快速生成,迅速降低pH值,有效抑制其他有害微生物的活性,使青贮饲料能长期保存[7]。

全混合日粮(total mixed ration,TMR)是将精饲料、粗饲料、矿物质、维生素等混合而成的日粮[8],其营养物质比例均衡,能满足动物生长需求[9],与传统饲喂模式相比,TMR饲喂模式不仅能降低能耗成本,还能提高动物干物质采食率[10]。但TMR易发生好氧变质,牲畜采食易生病,造成经济损失[11]。发酵全混合日粮(fermented total mixed ration,FTMR)是指将配制好的TMR密封发酵,不仅能长期保存营养,还能提高饲料利用率[12]。由于FTMR厌氧发酵的复杂条件,其微生物组成高度多样化,在有氧稳定性方面起着关键作用[13]。本研究通过探究添加糖蜜对不同比例甜叶菊渣与王草混合FTMR的发酵品质、有氧稳定性、微生物多样性以及抗氧化能力等的影响,为甜叶菊渣的有效利用提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 青贮原料

热研4号王草收获于华南农业大学校内实验基地;甜叶菊渣来自桂林莱茵生物科技股份有限公司;豆(*Glycine max*)粕、麦(*Triticum aestivum*)麸、玉米(*Zea mays*)粉、干豆腐渣、糖蜜等均购于市场。

1.2 试验设计

TMR配方成分为紫花苜蓿(*Medicago sativa*)10%、麦麸5%、豆粕16.5%、干豆腐渣6%、玉米粉21%、维矿添加剂0.5%、盐1%;在TMR中将甜叶菊渣以鲜物质基础的0、25%和50%共3个比例替代王草,并设无添加糖蜜为对照组(CK),添加2%糖蜜为添加糖蜜组(TM),共6个处理,含水量统一调节为50%,每个处理3个重复。

将调制好的样品混匀后分装至约 30 cm×20 cm 的聚乙烯青贮袋中，每袋约 400 g，用真空封口机（青叶 P290，东莞市益健包装机械有限公司）抽真空后于暗处青贮 60 d。

1.3　分析方法

1.3.1　化学特性　取样品 20 g，放入聚乙烯封口袋中，加入 80 mL 蒸馏水，放置 4 ℃冰箱浸泡 18 h 后过滤，滤液用于测定 pH 和缓冲能。pH 使用 pH 计（雷磁 PHS-3E，上海仪电科学仪器股份有限公司）测定，缓冲能用盐酸－氢氧化钠滴定法测定[14]；称取约 100 g 样品于 70 ℃恒温烘箱烘干至恒重后测定样品干物质（dry matter，DM）含量[15]，烘干样品粉碎过 1 mm 筛用于测定化学成分。采用凯氏定氮法测定粗蛋白（crude protein，CP）含量，采用灼烧法[16]测定粗灰分（crude ash，Ash）含量，采用蒽酮－硫酸法[17]测定水溶性碳水化合物（water soluble carbohydrates，WSC）含量，采用滤袋分析法测定中性洗涤纤维（neutral detergent fiber，NDF）和酸性洗涤纤维（acid detergent fiber，ADF）含量[18]。

1.3.2　微生物数量及群落组成测定　无菌条件下取样品 10 g，加入 90 mL 无菌水采用稀释平板涂布法[19]测定微生物。乳酸菌、好氧细菌、酵母和霉菌数量分别采用 MRS（Deman，Rogosa and Sharpe agar）琼脂培养基（蛋白胨 10 g，牛肉膏 3 g，氯化钠 5 g，琼脂 17 g，蒸馏水 1000 mL，pH 7.2）（广东环凯微生物有限公司）、营养琼脂培养基（蛋白胨 10 g，牛肉浸粉 3 g，氯化钠 5 g，琼脂 15 g，蒸馏水 1000 mL，pH 7.3）（广东环凯微生物有限公司）和孟加拉红（虎红）培养基（蛋白胨 5 g，葡萄糖 10 g，磷酸二氢钾 1.0 g，硫酸镁 0.5 g，琼脂 15 g，孟加拉红 0.03 g，氯霉素 0.1 g，蒸馏水 1000 mL，pH 7.2）（广东环凯微生物有限公司）培养。乳酸菌在厌氧条件下 37 ℃培养 2 d，好氧细菌、酵母菌和霉菌在有氧条件下 30 ℃培养 2～3 d。

无菌环境下称取样品添加至 20 倍体积灭菌的磷酸盐缓冲液（pH 7.4）中进行细菌 DNA 的提取，再通过聚合酶链反应（PCR）扩增细菌 16S 核糖体 RNA 基因的 V3～V4 区域，反应程序为：95 ℃预变性 2 min；然后进行 25 个循环的 95 ℃变性 30 s、55 ℃退火 30 s、72 ℃延伸 30 s；最后 72 ℃终延伸 5 min。所用引物为 338F（ACTCCTACGGGAGGCAGCAG）和 806R（GGACTACHVGGGTWTCTAAT）。最后将 PCR 产物在 Illumina MiSeq 平台上测序，使用 Trimmomatic v 0.33 软件，对测序得到的原始测序序列（raw reads）进行过滤；用 Cutadapt 1.9.1 软件进行引物序列的识别与去除，得到不包含引物序列的高质量读段（reads），再拼接序列即优质有效序列（clean reads），使用 UCHIME v 4.2 软件，鉴定并去除嵌合体序列，得到最终有效数据，选取相对丰度高于 0.1% 的细菌类群进行门、属、种水平分析。

1.3.3　发酵品质和有氧稳定性　FTMR 开袋后混合均匀取样。测定 pH，另取 10 mL 滤液，用苯酚－次氯酸钠比色法[20]测定氨态氮（NH_3-N）含量；再取 2 mL 滤液在 12000 r·min^{-1}的低温离心机中离心 3 min，用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤，用岛津 LC-20AT 型高效液相色谱仪（日本）分析有机酸含量，色谱条件：色谱柱为 PSpak KC-811，检测器为 SPD-20A，流动相为 0.1 mmol·L^{-1}的磷酸溶液，流速为 1 mL·min^{-1}，柱温 40 ℃，检测波长 210 nm。取样后剩余的 FTMR 样品不封口放置在青贮袋中，用干净的湿纱布覆盖袋口防止水分蒸发，于不同天数（d）测定 pH、好氧细菌、酵母菌和霉菌数量。

1.3.4　自由基清除能力及总黄酮含量　称取 1.3.1 中干粉 0.2 g 于 15 mL 离心管中，加入 10 mL 甲醇，置于摇床（ZQZY-78A，上海知楚仪器有限公司）200 r·min^{-1}振荡 24 h，6000 r·min^{-1}离心 3 min 后提取上清液 7 mL 左右，放置在 4 ℃冰箱冷藏待测。称取 1 g 托洛克斯（trolox）溶于 1 L 甲醇中，配 1 g·L^{-1}的 trolox 溶液待用。

参考 Xie 等[21]的方法测定自由基 1，1-二苯基-2-三硝基苯肼（1，1-diphenyl-2-picrylhydrazy，DPPH）清除能力。清除活性表示为托洛克斯当量（trolox equivalent，TE）。参考 Abdennacer 等[22]的方法测定自由基 2，2′-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸[2，2′-azinobis-（3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate），ABTS]清除能力和铁还原抗氧化能力（ferric ion reducing antioxidant power，FRAP）。ABTS 清除活性及 FRAP 还原力均表示为 TE。采用氯化铝比色法[23]测定总黄酮（total flavonoids，TF）含量，表示为芦丁当量（rutin equivalent，RE）。

1.4　数据处理

采用 Excel 2019 和 SPSS 21 软件对青贮前原材料的化学特性和微生物数量进行方差分析，青贮后发酵品质、抗氧化能力和有氧稳定性用双因素方差分析和 Duncan 法进行多重比较，$P<0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 青贮前材料特性

2.1.1 原材料营养及活性成分 甜叶菊渣和王草的干物质含量分别为37.22%和18.02%，粗蛋白含量分别约16%DM和5%DM，NDF含量分别为66%DM和75%DM，ADF含量分别为49.50%DM和49.35%DM；甜叶菊渣的WSC含量较低，仅为1.36%DM，而王草较高，为7.42%DM；甜叶菊渣的粗灰分含量为6.99%DM，王草的粗灰分含量为10.32%DM；甜叶菊渣与王草的pH差异较小，分别为5.86和5.84；王草的缓冲能为302.81 mEq·kg^{-1} DM，是甜叶菊渣的4倍；而甜叶菊渣的TF、DPPH、ABTS以及FRAP均高于王草(表1)。

2.1.2 TMR的营养成分及微生物组成 甜叶菊渣替代王草对TMR的粗灰分、ADF、WSC含量均无显著($P>0.05$)影响，替代25%对TMR的DM、CP和NDF含量无显著影响；pH随甜叶菊渣替代比例增加由6.03显著降低至5.83($P<0.05$)；当甜叶菊渣替代比例提高至50%时，缓冲能由292.53 mEq·kg^{-1}DM显著降低至243.98 mEq·kg^{-1}DM($P<0.05$)。随甜叶菊渣替代比例上升，TMR的乳酸菌数量显著上升($P<0.05$)，好氧细菌数量在替代比例为50%时显著最高($P<0.05$)；酵母菌数量无显著差异($P>0.05$，表2)。

表1 甜叶菊渣和王草的营养及活性成分

Table 1 Nutritional and active components of stevia residue and king grass

项目 Item	甜叶菊渣 Stevia residue	王草 King grass
干物质 Dry matter (%FM)	37.22±0.30	18.02±0.51
粗蛋白 Crude protein (%DM)	16.30±0.40	5.41±0.57
粗灰分 Crude ash (%DM)	6.99±1.09	10.32±0.32
pH	5.86±0.04	5.84±0.05
缓冲能 BC (mEq·kg^{-1} DM)	73.13±11.79	302.81±25.52
中性洗涤纤维 NDF (%DM)	66.08±3.02	75.03±0.85
酸性洗涤纤维 ADF (%DM)	49.50±1.34	49.35±1.54
水溶性碳水化合物 WSC (%DM)	1.36±0.01	7.42±0.02
总黄酮 TF (mg RE·g^{-1}DM)	10.41±0.85	8.64±0.60
DPPH (mg TE·g^{-1}DM)	2.59±0.05	1.74±0.06
ABTS (mg TE·g^{-1}DM)	7.24±0.22	3.62±0.38
FRAP (mg TE·g^{-1}DM)	3.00±0.31	1.88±0.17

BC：Buffering capacity；NDF：Neutral detergent fiber；ADF：Acid detergent fiber；WSC：Water-soluble carbohydrate；TF：Total flavonoid；DPPH：自由基DPPH清除活性 Free radical DPPH scavenging activity；ABTS：自由基ABTS清除活性 Radical ABTS scavenging activity；FRAP：铁还原抗氧化能力 Ferric-reducing antioxidant power；FM：鲜物质 Fresh matter；DM：干物质 Dry matter. RE：芦丁当量 Rutin equivalent；TE：托洛克斯当量 Trolox equivalent；下同 The same below.

表2 甜叶菊渣替代王草全混合日粮的营养成分和微生物组成

Table 2 Nutritional composition and microbial counts of total mixed ration formulated with stevia residue in place of king grass

项目 Item	替代比例 Replacement ratio			标准误 SEM	显著性 Significance
	0	25%	50%		
干物质 Dry matter (%FM)	45.32b	48.52ab	52.97a	1.30	*
粗蛋白 Crude protein (%DM)	18.77b	20.11ab	21.35a	0.42	**
粗灰分 Crude ash (%DM)	7.22a	6.98a	6.83a	0.09	NS
pH	6.03a	5.92b	5.83c	0.03	**
缓冲能 BC (mEq·kg^{-1} DM)	292.53a	277.60a	243.98b	7.54	**
中性洗涤纤维 NDF (%DM)	37.93b	39.72ab	41.17a	0.56	*
酸性洗涤纤维 ADF (%DM)	21.59a	22.71a	25.29a	0.79	NS
水溶性碳水化合物 WSC (%DM)	10.29a	9.39a	10.78a	0.85	NS
乳酸菌 LAB (lg cfu·g^{-1} FM)	5.64c	6.01b	6.75a	0.16	**
好氧细菌 AB (lg cfu·g^{-1} FM)	6.75b	6.87b	7.55a	0.13	**
酵母菌 Yeast (lg cfu·g^{-1} FM)	4.28a	4.49a	4.46a	0.06	NS
霉菌 Mold (lg cfu·g^{-1} FM)	3.00b	3.46a	3.10b	0.08	*

SEM：Standard error of the mean；LAB：Lactic acid bacteria；AB：Aerobic bacteria；cfu：菌落形成单位 Colony-forming unit；同行不同小写字母表示差异显著($P<0.05$) Different lowercase letters within the same row indicate significant differences ($P<0.05$)；*：$P<0.05$；**：$P<0.01$；NS：无显著差异 No significant difference；下同 The same below.

2.2　FTMR的发酵品质

所有FTMR的pH均低于4.2;对照中当甜叶菊渣替代比例为0和25%时,FTMR的乳酸含量显著高于替代比例为50%的处理,添加糖蜜的乳酸含量随甜叶菊渣替代比例增加无显著差异;当甜叶菊渣替代比例相同时,添加糖蜜显著($P<0.05$)增加了乙酸含量;随甜叶菊渣替代比例增加,所有处理乙酸含量显著增加($P<0.05$),添加糖蜜的NH_3-N含量显著降低。其中,当甜叶菊渣替代比例为50%时,CK和添加糖蜜的乙酸含量最高,分别为12.85和16.81 g·kg^{-1}DM,所有处理均未检测到丙酸和丁酸。各FTMR的好氧细菌数量无显著差异($P>0.05$),为4.0 lg cfu·g^{-1}FM左右;除纯王草的两个处理外,其他处理酵母菌和霉菌数均小于2.0 lg cfu·g^{-1}FM(表3)。相比于全王草,当甜叶菊渣替代比例为25%与50%时,FTMR有氧暴露期的干物质损失率有所下降(图1)。

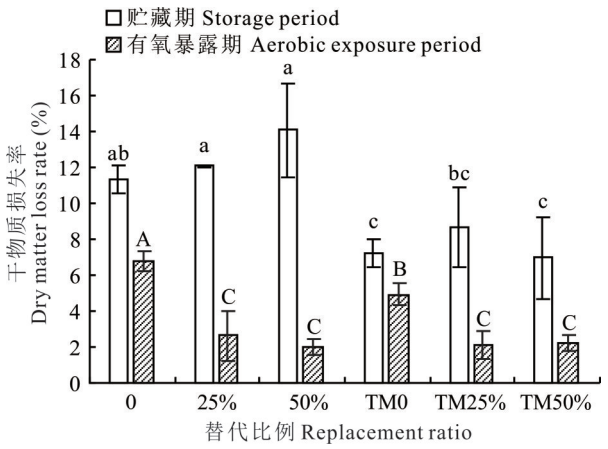

图1　甜叶菊渣替代王草发酵全混合日粮的干物质损失率

Fig. 1　The dry matter loss rate of fermented total mixed ration formulated with stevia residue in place of king grass

TM: 添加2%糖蜜 Addition of 2% molasses; 不同小写字母表示贮藏期所有处理间差异显著($P<0.05$) Different lowercase letters indicate significant differences among different additives and replacement ratios during storage period ($P<0.05$); 不同大写字母表示有氧暴露期所有处理间差异显著($P<0.05$) Different uppercase letters indicate significant differences among different additives and replacement ratios during aerobic exposure period ($P<0.05$); 下同 The same below.

2.3　有氧暴露期间FTMR的有氧稳定性

甜叶菊渣替代比例为0时,对照和添加糖蜜的FTMR的pH在有氧暴露第3天显著上升(图2);好氧细菌和酵母菌数量也均在有氧暴露3 d后显著上升(表4)。当甜叶菊渣替代比例增加至25%和50%时,对照和添加糖蜜的pH均在有氧暴露第9天显著上升($P<0.05$,图2);对照的好氧细菌和酵母菌数量在有氧暴露第6天显著上升($P<0.05$,表4)。

2.4　FTMR的微生物多样性

甜叶菊渣替代王草影响了FTMR的细菌多样性。在门水平上,TMR的主要优势菌为变形菌门

表3　不同比例甜叶菊渣替代王草发酵全混合日粮的发酵品质

Table 3　Fermentation quality of fermented total mixed ration formulated with stevia residue in place of king grass

添加剂 Additive	替代比例 R	pH	有机酸 Organic acid (g·kg^{-1} DM)				NH_3-N (g·kg^{-1} TN)	微生物 Microorganism (lg cfu·g^{-1} FM)		
			乳酸 LA	乙酸 AA	丙酸 PA	丁酸 BA		好氧细菌 AB	酵母菌 Yeast	霉菌 Mold
CK	0	4.15±0.02a	54.59±2.76a	9.75±0.59c	ND	ND	24.24±0.59ab	4.20±0.04a	2.28±0.49b	<2.00
	25%	4.11±0.01ab	54.10±1.31a	12.52±0.13b	ND	ND	21.30±0.14d	4.13±0.17a	<2.00	<2.00
	50%	4.10±0.06ab	49.13±0.32b	12.85±1.79b	ND	ND	22.23±1.43cd	4.14±0.14a	<2.00	<2.00
TM	0	4.14±0.03ab	51.05±1.39ab	13.79±1.10b	ND	ND	25.19±0.80a	4.25±0.14a	3.06±0.12a	<2.00
	25%	4.08±0.01b	52.12±3.18ab	16.28±0.68a	ND	ND	24.16±1.12ab	3.99±0.19a	<2.00	<2.00
	50%	4.13±0.03ab	52.95±1.80ab	16.81±1.48a	ND	ND	23.15±0.73b	4.22±0.10a	<2.00	<2.00
显著性 Significance	A	NS	NS	**	NS	NS	**	NS	*	NS
	R	*	NS	**	NS	NS	**	NS	**	NS
	I	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS	**	NS

LA: Lactic acid; AA: Acetic acid; PA: Propionic acid; BA: Butyric acid; NH_3-N: 氨态氮 Ammoniacal nitrogen; TN: 总氮 Total nitrogen; CK: 对照 Control; TM: 添加2%糖蜜 Addition of 2% molasses; A: 添加剂 Additive; R: 替代比例 Replacement ratio; I: 互作 Interaction; 同列不同小写字母表示不同处理间差异显著($P<0.05$) Different lowercase letters within the same column indicate significant differences among different additives and replacement ratios ($P<0.05$); ND: 未检测到 Non-detectable; 下同 The same below.

(Proteobacteria),相对丰度为72%～81%,其次是厚壁菌门(Firmicutes)(除甜叶菊渣替代比例为0);发酵后,替代比例为0时的主要优势菌仍是变形菌门,相对丰度均为81%,其他处理的主要优势菌为厚壁菌门,相对丰度均大于40%,其次为变形菌门(图3a)。属水平上,发酵前各TMR的优势菌为寡食杆菌属(*Paucibacter*),相对丰度为30%～54%,其次是不动杆菌属(*Acinetobacter*),相对丰度为10%～27%;发酵后的优势菌为中慢生根瘤菌属(*Mesorhizobium*);其他处理的优势菌属为慢乳杆菌属(*Lentilactobacillus*),相对丰度为24%～53%(图3b)。种水平上,各TMR的优势菌为*Cenchrus americanus*,相对丰度为30%～54%,其次为鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*);发酵后,替代比例为0时优势菌种为中慢生根瘤菌(*Mesorhizobium* sp. *HRTP027*),相对丰度为36%左右;其他处理的优势菌种为芫菁缓乳杆菌(*Lentilactobacillus rapi*)(图3c)。

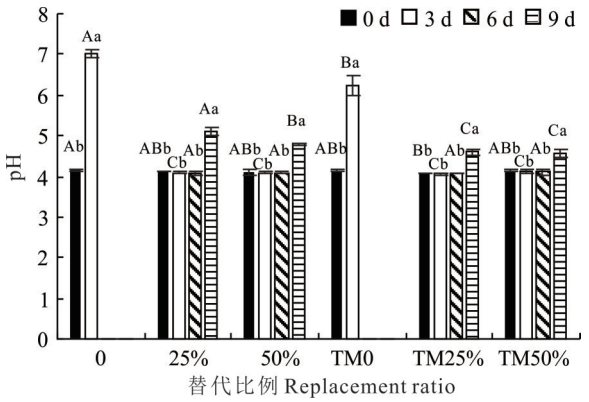

图2 甜叶菊渣替代王草的发酵全混合日粮有氧暴露期间的pH变化

Fig. 2 The pH changes of fermented total mixed ration formulated with stevia residue in place of king grass

不同大写字母表示同一有氧暴露天数不同替代比例间的差异显著($P<0.05$) Different uppercase letters indicate significant differences in different substitution ratios on the same aerobic exposure day ($P<0.05$);不同小写字母表示同一替代比例不同有氧暴露天数间差异显著($P<0.05$) Different lowercase letters indicate significant differences in different aerobic exposure days at the same substitution ratio ($P<0.05$);0、TM0在6和9 d未取样 Samples were not collected for 0 and TM0 at 6 and 9 d.

表4 甜叶菊渣替代王草的发酵全混合日粮有氧暴露期间的微生物数量

Table 4 Microbial counts of fermented total mixed ration formulated with stevia residue in place of king grass during aerobic exposure (lg cfu·g^{-1}FM)

项目 Item	添加剂 A	替代比例 R	有氧暴露天数 Duration of aerobic exposure				显著性 Significance						
			0 d	3 d	6 d	9 d	A	R	D	A×R	A×D	R×D	I
好氧细菌 AB	CK	0	4.20±0.04aB	8.85±0.07aA	—	—	**	**	**	**	**	**	**
		25%	4.13±0.17aB	4.13±0.12cB	5.02±0.24aA	—							
		50%	4.14±0.14aB	4.26±0.11cB	4.80±0.13aA	—							
	TM	0	4.25±0.14aB	8.29±0.12bA	—	—							
		25%	3.99±0.19aB	4.21±0.08cB	4.17±0.16bB	6.98±1.22aA							
		50%	4.22±0.10aB	4.29±0.07cB	4.39±0.17bB	6.93±1.02aA							
酵母菌 Yeast	CK	0	2.28±0.49bB	8.69±0.13aA	—	—	NS	*	**	NS	**	**	**
		25%	ND	1.70±1.57bB	6.64±0.07aA	—							
		50%	ND	1.53±1.46bB	6.51±0.06aA	—							
	TM	0	3.06±0.12aB	7.94±0.09aA	—	—							
		25%	ND	2.29±0.55bB	2.84±0.26bB	4.92±1.60aA							
		50%	ND	1.74±1.54bBC	2.84±0.18bAB	4.44±2.15aA							

同列不同小写字母表示同一有氧暴露时间微生物数量间差异显著($P<0.05$) Different lowercase letters in the same column indicate significant differences in microbial counts at the same aerobic exposure time ($P<0.05$);同行不同大写字母表示不同有氧暴露时间微生物数量间差异显著($P<0.05$) Different uppercase letters in the same row indicate significant differences in microbial counts at different aerobic exposure times ($P<0.05$);—:数量大于10^9 cfu·g^{-1}FM The quantity is greater than 10^9 cfu·g^{-1}FM;ND:霉菌均未检测到 No molds were detected;D:有氧暴露天数 Days of aerobic exposure;A×R:添加剂和替代比例的交互作用 Interaction between the additive and the replacement ratio;A×D:添加剂和有氧暴露天数的交互作用 Interaction between the additive and the days of aerobic exposure;R×D:替代比例和有氧暴露天数的交互作用 Interaction between the replacement ratio and the days of aerobic exposure;下同 The same below.

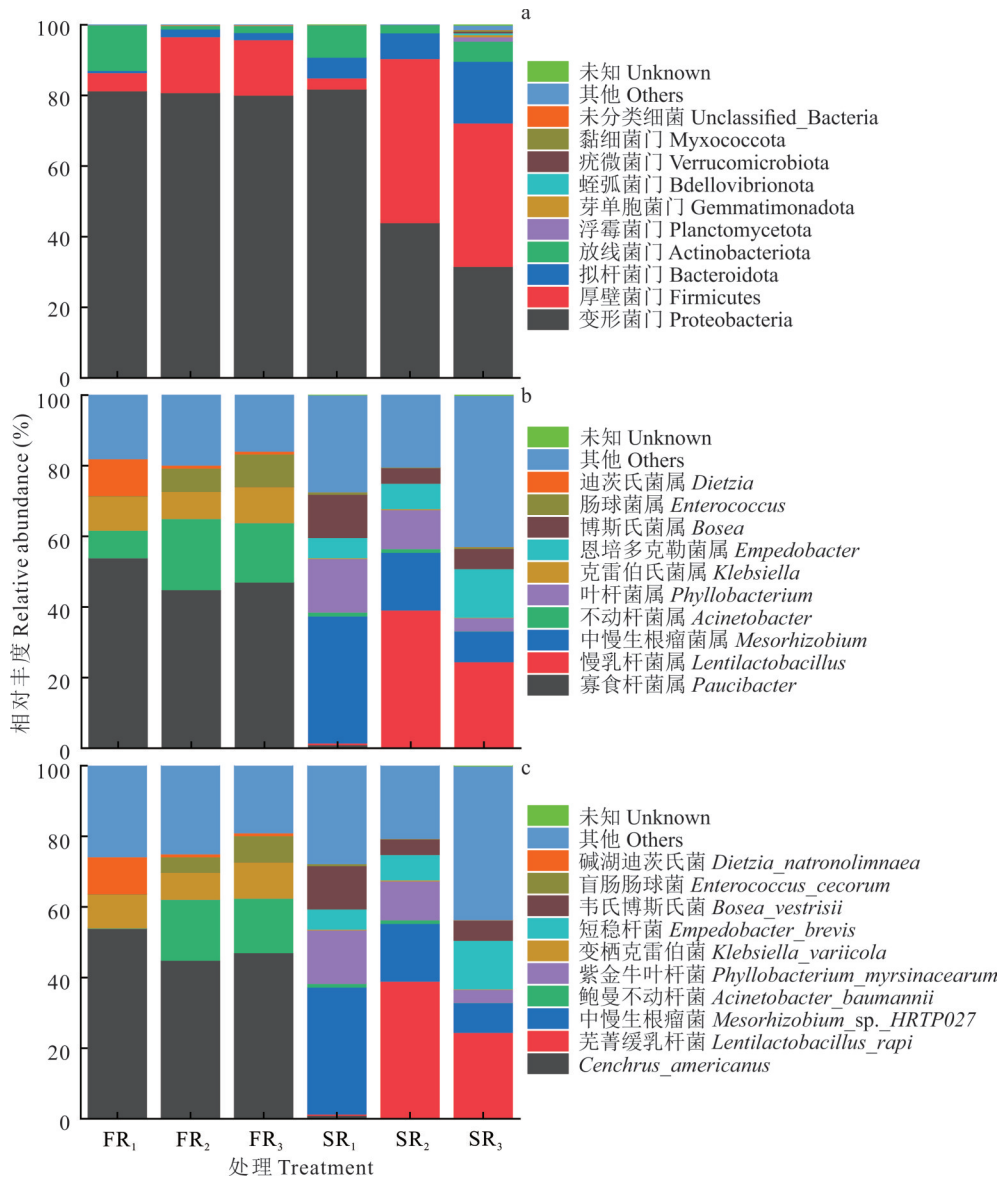

图 3　甜叶菊渣替代王草的发酵全混合日粮在门(a)、属(b)和种(c)水平的细菌多样性

Fig. 3　Bacterial diversity of the fermented total mixed ration with stevia residue replacing king grass at the phylum (a), genus (b) and species (c) levels

F：全混合日粮 Total mixed ration；S：发酵全混合日粮 Fermented total mixed ration；R_1、R_2、R_3：甜叶菊渣替代王草比例 0、25%、50% The ratios of stevia residue replacing king grass at 0, 25%, and 50% respectively.

2.5　FTMR 的抗氧化性

以甜叶菊渣替代王草均提高了各 FTMR 的 DPPH、ABTS 自由基清除能力和 FRAP 铁还原抗氧化能力。当甜叶菊渣替代比例为 25% 时，对照和添加糖蜜的 DPPH 达到最高，分别为 2.37 和 2.66 mg TE·g^{-1} DM，添加糖蜜的总黄酮含量最高，为 12.97 mg RE·g^{-1}DM。当甜叶菊渣替代比例为 50% 时，添加糖蜜的 ABTS 自由基清除能力以及 FRAP 铁还原抗氧化能力达到最高，分别为 4.48 mg TE·g^{-1} DM 和 2.86 mg TE·g^{-1} DM(表 5)。

3　讨论

3.1　FTMR 的发酵品质与有氧稳定性

本研究中所有 FTMR 的 pH 均低于 4.2，且有酸香味，表明发酵良好，符合优质青贮饲料的标准[24]。随甜叶菊渣替代比例增加，FTMR 的乙酸含量显著增加，可能是由于甜叶菊渣的 WSC 含量较低，仅 0.3%DM，乳酸菌可利

表5 甜叶菊渣替代王草的发酵全混合日粮自由基清除能力和总黄酮含量

Table 5 Free radical scavenging capacity and total flavonoid content of fermented total mixed ration formulated with stevia residue in place of king grass

添加剂 Additive	替代比例 Replacement ratio	自由基清除能力 Free radical scavenging capacity (mg TE·g^{-1}DM)			总黄酮 TF (mg RE·g^{-1}DM)
		DPPH	ABTS	FRAP	
F	0	1.34±0.10d	2.98±0.12e	1.24±0.07e	6.02±0.21c
	25%	1.54±0.04d	3.50±0.15d	1.50±0.05de	6.40±0.68c
	50%	1.85±0.15c	3.78±0.54bcd	1.56±0.20d	7.12±0.53c
CK	0	2.25±0.20b	3.32±0.18e	2.36±0.34c	12.55±0.43ab
	25%	2.37±0.06ab	4.21±0.15ab	2.76±0.04ab	11.51±1.11ab
	50%	2.24±0.03b	4.13±0.05abc	2.33±0.11c	10.30±0.44b
TM	0	2.33±0.14b	3.68±0.12cd	2.42±0.03cd	11.92±0.15ab
	25%	2.66±0.34a	4.44±0.33a	2.52±0.07bc	12.97±3.22a
	50%	2.54±0.24ab	4.48±0.43a	2.86±0.25a	12.08±0.84ab
显著性 Significance	A	**	**	**	**
	R	*	**	**	NS
	I	NS	NS	*	NS

用的发酵底物减少;甜叶菊渣占比相同时,添加糖蜜的FTMR乙酸含量显著高于对照,可能由于异型发酵乳酸菌成为主要菌群或产乙酸菌等微生物占据优势,同型乳酸发酵逐渐转变为异型乳酸发酵[25],且甜叶菊渣中结构性碳水化合物(如木质素、纤维素)比例较高,可能限制了乳酸菌对发酵底物的利用[26],其缓慢降解也可能促进了乙酸生成[27],这些均导致后期乙酸含量增加,同时有研究表明,在热带牧草青贮中,发酵产物往往是乙酸而非乳酸[28]。NH_3-N含量随甜叶菊渣占比上升而降低,可能是由于甜叶菊渣中次生代谢物(如多酚类物质)对蛋白分解酶的抑制作用减少了蛋白质的降解[29],以及甜菊糖苷的抑菌性抑制了蛋白质分解菌如芽孢杆菌等的增殖[30]。

干物质损失率直接反映了青贮工艺的优劣及饲料营养价值的保留程度。青贮期所有处理组的干物质损失率均高于有氧暴露期,可能是由于在青贮前期,乳酸菌大量繁殖,原料的WSC逐渐损失,导致干物质损失率增加[31]。而随甜叶菊渣替代比例上升,FTMR有氧暴露后的干物质损失率显著下降,可能是因为甜叶菊渣结构性碳水化合物含量较高[26],较难被发酵微生物分解,且甜叶菊渣占比上升导致可发酵底物减少、微生物代谢强度降低,干物质气态损失减少。相较之下,王草中WSC含量更高,被微生物快速利用,因此易产生CO_2、CH_4等气体导致干物质损失。且添加糖蜜后随甜叶菊渣替代比例增加,乙酸含量显著增加,而乙酸在青贮有氧暴露阶段能够起到抗真菌的作用,能够有效避免有氧变质,减少营养损失,降低青贮饲料的干物质损失率[32]。

本研究中,甜叶菊渣的替代显著提升了FTMR的有氧稳定性,当替代比例为25%和50%时,有氧稳定性最优(>3 d),添加糖蜜后表现更好(>6 d),这可能与甜叶菊渣中天然抗菌成分和糖蜜协同调控的代谢产物共同作用有关;也可能与同型发酵转变为异型发酵后异型乳酸菌代谢,生成更高浓度的乙酸及1,2-丙二醇等有关[30]。此外,甜叶菊渣中木质纤维素的物理屏障作用可能限制了氧气渗透,抑制了需氧微生物的增殖[4]。

3.2 FTMR的微生物群落

本研究中,在门水平上,TMR的变形菌门相对丰度较高,主要优势菌属为变形菌门的寡食杆菌属(*Paucibacter*)。发酵后,纯王草处理FTMR的主要优势菌仍为变形菌门,优势菌属为中慢生根瘤菌属(*Mesorhizobium*),其通常具有固氮功能,在青贮系统中的优势地位可能源于初始原料中残留的氧气或未被完全消耗的糖分,为其提供了代谢优势。相比之下,混合甜叶菊渣的FTMR厚壁菌门相对丰度上升,成为主要菌群,优势菌属为慢乳杆菌属(*Lentilactobacillus*)。这可能与甜叶菊渣对WSC的高效利用以及结构性碳水化合物(如纤维素、半纤维素)和次生代谢物(如多酚类物质)的选择性调控作用相关,也可能与其对纤维底物的适应性及多

酚的耐受性有关[33]，同时在青贮过程中的低pH和厌氧条件有利于厚壁菌门的生长[34]，并且甜叶菊渣中的抗菌物质[35]抑制了竞争性菌群（如变形菌门中的部分革兰氏阴性菌）或通过提供缓释碳源（如纤维降解产物），间接促进了厚壁菌门的增殖[4]。优势菌属慢乳杆菌属（*Lentilactobacillus*）为同型乳酸发酵菌，能高效利用WSC生成乳酸，快速降低pH，从而抑制腐败微生物的生长，并且寡食杆菌属（*Paucibacter*）对酸性环境的耐受性低而慢乳杆菌属（*Lentilactobacillus*）的耐受性较高，巩固了其在发酵后期的优势地位[33]。且甜叶菊渣的纤维组分延缓了底物发酵速率，减少了初始氧气的残留，创造了更严格的厌氧环境，此外，多酚类物质抑制竞争性菌群，间接增强了乳酸菌的生态位优势[36]。

3.3　FTMR的自由基清除能力与总黄酮含量

本研究中，甜叶菊渣的替代显著提升了FTMR的自由基清除能力和FRAP铁还原抗氧化能力，甜叶菊渣替代王草后，FTMR抗氧化能力有所改善，可能是因为甜叶菊渣中含较多的天然多酚类化合物（如绿原酸、咖啡酸等），可通过提供氢原子或电子直接清除自由基，阻断氧化链式反应，从而显著增强体系的抗氧化活性[29]。发酵过程中，甜叶菊渣的细胞壁结构可能因酸性环境或微生物酶的作用部分降解，细胞内的抗氧化物质流出，增强了清除自由基的能力[37]。总黄酮含量随甜叶菊渣替代比例增加无显著变化，可能是青贮过程中，乳酸菌等通过代谢途径对黄酮类物质进行生物转化，导致总黄酮含量未随原料比例升高而增加；同时，部分黄酮可能被酵母菌等兼性厌氧微生物作为碳源利用，进一步降低了其净积累量[38]。

4　结论

综上，甜叶菊渣替代王草显著增加了FTMR的乙酸含量，显著降低了NH_3-N含量；甜叶菊渣替代王草的FTMR优势细菌属由寡食杆菌属（*Paucibacter*）变为慢乳杆菌属（*Lentilactobacillus*）。甜叶菊渣替代王草提升了FTMR的自由基清除能力。当替代比例为50%且添加2%糖蜜时，FTMR的发酵品质、有氧稳定性（>6 d）和自由基清除能力最优。

参考文献 References：

[1] Lemus-Mondaca R, Vega-Gálvez A, Zura-Bravo L, *et al*. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. Food Chemistry, 2012, 132(3): 1121－1132.

[2] Ding H R, Hong L Z, Zhao B Q, *et al*. The main uses and the problems of *Stevia* in current production. Sugar Crops of China, 2016, 38(6): 77－78.
丁海荣, 洪立洲, 赵宝泉, 等. 甜叶菊主要用途及当前生产中存在的问题. 中国糖料, 2016, 38(6): 77－78.

[3] Molina-Calle M, Priego-Capote F, Luque D C M. Characterization of *Stevia* leaves by LC-QTOF MS/MS analysis of polar and non-polar extracts. Food Chemistry, 2017, 219: 329－338.

[4] Wu L J, Ou X, Cao X H, *et al*. The effect of the mixing ratio of mulberry and sweet leaf chrysanthemum residue on the quality and microbial diversity of silage feed. Chinese Journal of Animal Science, 2024, 60(12): 276－281.
吴丽娟, 欧翔, 操贤洪, 等. 饲料桑与甜叶菊渣混合比例对青贮饲料品质及微生物多样性的影响. 中国畜牧杂志, 2024, 60(12): 276－281.

[5] Long S H, Li X F, Pan J X, *et al*. Study on silage quality and microbial community diversity of 'Reyan No. 4' king grass harvested at different growth days. Acta Agrestia Sinica, 2022, 30(7): 1900－1908.
龙仕和, 李雪枫, 潘俊歆, 等. 不同生长天数'热研4号'王草青贮品质和微生物群落多样性研究. 草地学报, 2022, 30(7): 1900－1908.

[6] Li M, Zi X J, Bai C J, *et al*. Effect of different temperatures on fermentation quality of king grass silage. China Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2014, 41(10): 91－94.
李茂, 字学娟, 白昌军, 等. 不同贮藏温度对王草青贮发酵品质的影响. 中国畜牧兽医, 2014, 41(10): 91－94.

[7] Jiang F G, Cheng H J, Wei C, *et al*. Effects of addition amount of molasses on the fermentation quality and microbial diversity of hybrid *Broussonetia papyrifera* L. Vent silage. Biotechnology Bulletin, 2021, 37(9): 68－76.
姜富贵, 成海建, 魏晨, 等. 糖蜜添加量对杂交构树青贮发酵品质和微生物多样性的影响. 生物技术通报, 2021, 37(9):

68－76.

[8] Li X B, Cheng Y Z, Yang F F, *et al*. Improving total mixed ration silage: effects of lactic acid bacteria inoculants and antimicrobial additives on fermentation quality and aerobic stability. Agronomy, 2024, 14(8): 1602.

[9] Li Y M, Duan X H, Zhang W H, *et al*. Research progress of TMR for beef cattle. China Feed, 2024(14): 5－9.
李艳梅, 段新慧, 张旺宏, 等. 肉牛全混合日粮(TMR)应用的研究进展. 中国饲料, 2024(14): 5－9.

[10] Wang S R, Ding C L, Tian J P, *et al*. Effects of biological and antifungal additives on ensiling characteristics, *in vitro* digestibility, gas production, and aerobic stability of fermented total mixed ration including wet brewers' grains. Acta Prataculturae Sinica, 2025, 34(6): 213－226.
王思然, 丁成龙, 田吉鹏, 等. 乳酸菌和抗真菌添加剂对湿啤酒糟全混合日粮青贮发酵品质、体外消化率及有氧稳定性的影响. 草业学报, 2025, 34(6): 213－226.

[11] Ji H Q, Meng L N, Yu M, *et al*. Effect of TMR particles on growth performance, digestion and metabolism, and serum indicators of Liaoning cashmere goats. Feed Research, 2025, 48(18): 19－23.
冀红芹, 孟令楠, 于明, 等. TMR颗粒对辽宁绒山羊生长性能、消化代谢和血清指标的影响. 饲料研究, 2025, 48(18): 19－23.

[12] Wang L, Jin S, Wang P, *et al*. Fermented total mixed ration enhances nutrient digestibility and modulates the milk components and fecal microbial community in lactating holstein dairy cows. Frontiers in Veterinary Science, 2024, 11: 1408348.

[13] Yang X L, Wang Z L, Yu Z, *et al*. Effect of various roughage compositions on the fermentation quality of total mixed ration (TMR). Pratacultural Science, 2010, 27(2): 139－143.
杨晓亮, 王宗礼, 玉柱, 等. 不同的粗饲料搭配对TMR饲料发酵品质的影响. 草业科学, 2010, 27(2): 139－143.

[14] Playne M J, Mcdonald P. The buffering constituents of herbage and of silage. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1966, 17(6): 264－265.

[15] Zhang L Y. Feed analysis and feed quality detection technology. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2003: 46－75.
张丽英. 饲料分析及饲料质量检测技术. 北京: 中国农业科技出版社, 2003: 46－75.

[16] Han Y S. Food chemistry experiment guide. Beijing: Beijing Agricultural University Press, 1996: 19－22.
韩雅珊. 食品化学实验指导. 北京: 北京农业大学出版社, 1996: 19－22.

[17] Murphy R P. A method for the extraction of plant samples and the determination of total soluble carbohydrates. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1958, 9(11): 714－717.

[18] 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. Journal of Dairy Science, 1991, 74(10): 3583－3597.

[19] Huang X L. Microbiological test guidance. Beijing: Higher Education Press, 2000.
黄秀梨. 微生物学试验指导. 北京: 高等教育出版社, 2000.

[20] Broderick G A, Kang J H. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and *in vitro* media. Journal of Dairy Science, 1980, 63(1): 64－75.

[21] Xie J H, Shen M Y, Xie M Y, *et al*. Ultrasonic-assisted extraction, antimicrobial and antioxidant activities of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja polysaccharides. Carbohydrate Polymers, 2012, 89(1): 177－184.

[22] Abdennacer B, Karim M, Yassine M, *et al*. Determination of phytochemicals and antioxidant activity of methanol extracts obtained from the fruit and leaves of Tunisian *Lycium intricatum* Boiss. Food Chemistry, 2015, 174: 577－584.

[23] Singh R S G, Negi P S, Radha C. Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activities of free and bound phenolic extracts of *Moringa oleifera* seed flour. Journal of Functional Foods, 2013, 5(4): 1883－1891.

[24] Wang J. Study on the mixed silage of rice straw or corn stover and agricultural by-products. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2017.
王坚. 水稻、玉米秸秆与农副产品混合青贮研究. 南京: 南京农业大学, 2017.

[25] Mcdonald P, Henderson A R, Heron S J E. The biochemistry of silage. Marlow, Bucks, UK: Chalcombe Publications, 1991.

[26] Kondo M, Naoki N, Kazumi K, *et al*. Enhanced lactic acid fermentation of silage by the addition of green tea waste. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2004, 84(7): 728－734.

[27] Teng D M, Hao M J. Effects of herbage silage on fermentation quality. China Feed, 2020(22): 122－125.
滕道明, 郝明静. 不同牧草青贮对发酵品质的影响. 中国饲料, 2020(22): 122－125.

[28] Zhang G N, Fang X P, Feng G Z, *et al*. Silage fermentation, bacterial community, and aerobic stability of total mixed ration

containing wet corn gluten feed and corn stover prepared with different additives. Animals, 2020, 10(10): 1775.

[29] Myint K Z, Zhou Z, Shi Q, *et al*. *Stevia* polyphenols, their antimicrobial and anti-inflammatory properties, and inhibitory effect on digestive enzymes. Molecules, 2023, 28(22): 7572.

[30] Nishino N, Hattori H, Wada H, *et al*. Biogenic amine production in grass, maize and total mixed ration silages inoculated with *Lactobacillus casei* or *Lactobacillus buchneri*. Journal of Applied Microbiology, 2007, 103(2): 325－332.

[31] Xiao S H, Yuan X J, Dong Z H, *et al*. Effects of inoculant and molasses additives on fermentation quality of mixed silages of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb) and common vetch (*Vicia sativa* L). Journal of Nanjing Agricultural University, 2016, 39(6): 1017－1022.
肖慎华, 原现军, 董志浩, 等. 添加乳酸菌制剂和糖蜜对箭筈豌豆和苇状羊茅混合青贮发酵品质的影响. 南京农业大学学报, 2016, 39(6): 1017－1022.

[32] Borreani G, Piano S, Tabacco E. Aerobic stability of maize silage stored under plastic films with different oxygen permeability. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2014, 94(13): 2684－2690.

[33] Pang H L, Qin G Y, Tan Z F, *et al*. Natural populations of lactic acid bacteria associated with silage fermentation as determined by phenotype, 16S ribosomal RNA and *recA* gene analysis. Systematic and Applied Microbiology, 2011, 34(3): 235－241.

[34] Zhang L, Zhou X K, Gu Q C, *et al*. Analysis of the correlation between bacteria and fungi in sugarcane tops silage prior to and after aerobic exposure. Bioresource Technology, 2019, 291: 121835.

[35] Guo X, Chen D D, Huang P S, *et al*. Effects of tannin-tolerant lactic acid bacteria in combination with tannic acid on the fermentation quality, protease activity and bacterial community of stylo silage. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2025, 105(4): 2540－2551.

[36] Li J Z, Li G M, Zhang H S, *et al*. The fermentation quality, antioxidant activity, and bacterial community of mulberry leaf silage with *Pediococcus*, *Bacillus*, and wheat bran. Fermentation-Basel, 2024, 10(4): 214.

[37] He L W, Lv H J, Chen N, *et al*. Improving fermentation, protein preservation and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaves silage with gallic acid and tannin acid. Bioresource Technology, 2020, 297: 122390.

[38] Iqbal S, Younas U, Sirajuddin, *et al*. Proximate composition and antioxidant potential of leaves from three varieties of mulberry (*Morus* sp.): A comparative study. International Journal of Molecular Sciences, 2012, 13(6): 6651－6664.