

青贮饲料蛋白质降解研究进展

唐国建¹,王江丽¹,梅雪晴¹,许留兴²,武丹^{2*}

(1.六盘水师范学院 生物科学与技术学院,贵州 六盘水 553004;

2.昭通学院 农学与生物技术学院,云南 昭通 657000)

摘要:青贮饲料在改善动物采食量和增加畜产品供应方面发挥着重要作用,但受青贮工艺、牧草营养和环境的影响,牧草在青贮过程中发生蛋白质降解尤为常见。基于近年来国内外有关田间管理措施(如施氮量、混播方式和生育期等)影响青贮饲料蛋白质降解的研究现状,从青贮饲料中氨基酸酶活性和非蛋白质氮产生变化两方面探讨了青贮饲料蛋白质降解的变化机理,并对青贮饲料蛋白质降解的未来研究方向进行了初步展望:未来应深入探讨田间管理措施对青贮饲料蛋白质降解的影响机制,并以青贮饲料发酵过程中代谢的中间产物(小分子)构建预测模型,利用测序技术解析青贮饲料中微生物的动态变化,并通过定量蛋白质组学手段对牧草青贮过程中微生物的蛋白质表达进行精准鉴定和定量,从而为主导蛋白质降解的关键功能性微生物菌株的筛选及深入解析蛋白质的变化提供参考。

关键词:青贮饲料;蛋白质降解;氨基酸酶;非蛋白氮

中图分类号:S816.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1671-055X(2026)01-0039-15

随着工业化与全球化的不断加深,2015年全球粮食产量比1960年增加了2倍,但仍有许多国家高蛋白质食物(如牛羊肉、奶制品)供应紧缺,饥饿与营养不良问题持续存在^[1]。

收稿日期:2025-05-24

基金项目:云南省基础研究计划青年项目“氨基酸酶对牧草青贮过程中蛋白降解的作用机理研究”(202301AU070035);六盘水师范学院大学生创新创业训练计划项目“不同比例方竹笋壳与皇竹草混合青贮对其发酵品质和微生物群落的影响”(S2024109771623);六盘水师范学院大学生创新创业训练计划项目“刺梨渣青贮用乳酸菌分离筛选及其功能特性研究”(S2024109771627)。

作者简介:唐国建,男,云南文山人,农学博士,副教授,主要从事牧草加工与利用研究;王江丽,女,贵州遵义人,主要从事牧草加工与利用研究;梅雪晴,女,贵州遵义人,主要从事牧草加工与利用研究;许留兴,男,贵州盘县人,农学博士,副教授,主要从事牧草栽培与青贮研究;武丹,女,贵州毕节人,主要从事牧草加工与利用研究。

***通信作者:**武丹

在国内,随着人均肉类消费量的增加,居民对草饲型畜产品的选择优于粮食型产品^[2]。一些东亚国家(包括中国和日本)发展畜牧业主要依赖进口优质饲料,但优质饲料价格容易受到政治、经济和气候等因素的影响,导致其价格不稳定^[3]。基于这些挑战,稳定而优质的动物饲料供应对于畜牧业的快速健康发展至关重要^[4],但受季节影响,大多数地区在早春、晚秋和冬季几乎不能放牧,而畜牧业的发展严重依赖玉米籽粒和作物秸秆。此外,近年来玉米价格持续走高,且玉米秸秆营养价值低^[5],限制了养殖户生产规模的扩大和经济收益的提高。因此,如何增加畜产品的供应成为众多国家所面临的问题。

青贮饲料具有成本低、营养保存好、调节饲草季节性供应不均衡等优点,是畜牧业中重要的粗饲料来源,其品质与营养价值直接关系到畜牧业的生产效益和可持续性。然而,青贮过程中蛋白质的降解问题一直是制约青贮饲料品质提升的关键因素之一。常用作调制青贮饲料的牧草有紫花苜蓿、象草、黑麦草、燕麦和青贮玉米等。随着畜牧业规模化、集约化的快速发展,小麦、大麦、小黑麦和燕麦等谷类作物也被做成青贮饲料供动物饲用^[6-9],并成为部分国家或地区冬季重要的粗饲料来源。然而,无论是以意大利黑麦草和紫花苜蓿为代表的传统牧草,还是以玉米、小麦、大麦和燕麦为代表的谷物类饲料,在青贮发酵过程中都出现了不同程度的蛋白质降解。通常情况下,优良青贮饲料的调制受到诸多因素的影响,青贮过程中蛋白质降解也由诸多因素调控,如原材料特性、青贮条件和添加剂使用等。此外,一些田间管理技术也对青贮饲料中氨态氮($\text{NH}_3\text{-N}$)含量的增加产生了极为显著的影响,如收获时间^[10]、施氮量^[11]和肥料类型^[12]等,但这些因素对青贮饲料蛋白质降解的影响容易被忽略。由于青贮材料的营养、化学添加剂和微生物制剂等因素对青贮饲料蛋白质降解的影响较大,相关研究信息较充实。因此,本研究并未阐述这些方面的信息,而是就国内外影响青贮饲料蛋白质降解的背景和容易忽略的内容进行综合分析,旨在为生产优质的青贮饲料提供理论依据和技术支持。

1 田间管理影响青贮饲料蛋白质降解

田间管理措施,如施氮量、混播和刈割时期对牧草的产量与营养价值具有重要影响。同样,田间管理措施对青贮饲料蛋白质降解也具有非常重要的影响。如增加施氮量虽然可以提高牧草蛋白质含量,但也可能增加青贮过程中蛋白质的降解率,因为高氮条件下微生物活性增强,促进了蛋白质的分解。混播通过调整牧草种类,可以影响青贮饲料的发酵特性和微生物群落结构,进而影响蛋白质降解速度和程度,有利于保持青贮饲料中蛋白质的完整性和可利用性。而刈割时期的选择则直接影响到青贮原料的成熟度,进而影响青贮过程中蛋白质的保护机制和降解模式。因此,合理的田间管理措施不仅能够优化牧草的产量和营养价值,还能有效控制青贮饲料蛋白质的降解,为畜牧业提供更加稳定和高效的饲料资源。

1.1 施氮量

氮肥是影响作物产量和质量最重要的营养元素。然而,土壤中的氮非常有限,农业生产者通常需要投入额外的氮来满足生产需要。研究发现,随着施氮量从 100 kg /hm²增加到 300 kg /hm²,甜高粱青贮饲料的乳酸菌数量、硝酸盐和亚硝酸盐含量都趋于增加^[13]。Li 等^[11]研究发现,随着施氮量从 0 kg /hm²增加到 225 kg /hm²,青贮饲料中的 HN₃-N 和 NO₃-N 含量都趋于增加。这说明随着施氮量的增加,青贮饲料蛋白质降解的风险也随之增加^[11,14]。此外,牧草氨基酸含量也与施氮量密切相关^[15]。在青贮饲料中,以酪氨酸、组氨酸和色氨酸为主的氨基酸经脱羧反应生成酪胺、组胺和色胺等生物胺^[16],这些生物胺的积累不仅影响青贮饲料的营养价值,还可能对动物的健康产生不良影响。高浓度的生物胺,如酪胺、组胺和色胺等,可能导致动物采食后出现中毒症状,如消化不良、过敏反应甚至神经系统损伤。因此,在追求高产量的同时,农业生产者还需密切关注青贮饲料中生物胺的含量,以确保饲料的安全性。合理的氮肥管理策略是降低青贮饲料蛋白质降解风险和生物胺积累风险的关键。通过优化施氮量和施肥时间,可以有效调控青贮饲料的发酵过程,减少有害物质的生成。例如,采用分次施肥或缓释氮肥技术,可以使氮肥的释放与作物的需求更加匹配,减少氮素的浪费和环境污染。此外,选择适宜的青贮原料和添加剂也是改善青贮饲料品质的重要途径。不同牧草品种对氮肥的响应存在差异,选择氮素利用效率高、抗蛋白质降解能力强的牧草品种,可以从源头上降低蛋白质降解的风险。同时,添加乳酸菌制剂、酶制剂等生物添加剂,可以优化青贮饲料的发酵环境,抑制有害微生物的生长,进一步减少生物胺等有害物质的产生。

在以往的氮肥投入与青贮研究中,研究人员常将缓冲能与蛋白质降解相联系,而忽略了氮肥投入对牧草表面微生物区域的影响。Dong 等^[17]通过亚细胞定位分析发现,在组织结构破损条件下,牧草在整个青贮过程中的蛋白质降解主要取决于亚细胞所在的位置,其中呈下降趋势的蛋白质主要分布在叶绿体基质或线粒体内部,而高浓度的氮肥投入增加了植物硝酸根离子的积累^[18],这进一步诱导了根系中 *OsNPF7.2* 基因的表达,进而导致了亚细胞的位置发生改变^[19],同时也反映了氮素投入对基因的影响及在牧草青贮中氮降解的关键基因表达。然而,尚未见到有关铵态氮肥、硝态氮肥、硝铵态氮肥等对青贮饲料蛋白质降解研究的报道。

1.2 混播

不同牧草种类及其混播方式对青贮饲料的品质具有显著的影响。苜蓿与鸭茅、高羊茅和红豆草混播时,牧草青贮饲料的 NH₃-N 含量显著高于单播处理,乳酸含量显著低于单播处理^[14]。在相同田间管理条件下,相比单播小麦,豆科牧草与小麦混播对青贮饲料的非蛋白氮含量并无影响^[20]。随着甜高粱比例的增加,苜蓿和甜高粱混合青贮饲料的非蛋白氮含量趋于增加,说明甜高粱比例较高的混合青贮饲料中蛋白质降解更加严重^[21]。导致

上述结果的原因是一些牧草的缓冲能较高,不利于青贮饲料pH的快速下降,进而导致植物蛋白酶活性下降缓慢而积累了更多的非蛋白氮。

此外,混播牧草之间的相互作用也可能对青贮饲料的蛋白质降解产生影响。例如,豆科牧草如苜蓿与非豆科牧草如鸭茅、高羊茅等混播时,豆科牧草中的蛋白质和氨基酸可能为非豆科牧草提供了氮源,促进了非豆科牧草的生长,但同时也可能增加了整个青贮体系中蛋白酶的活性,从而加速了蛋白质的降解。同时,牧草混播还可能影响青贮饲料的发酵过程。不同牧草种类的微生物群落结构存在差异,混播可能导致微生物之间的竞争或协同作用,进而影响乳酸等有机酸的生成和pH的下降速度。pH的快速下降对于抑制植物蛋白酶活性至关重要,因此,混播可能通过影响发酵过程而间接影响蛋白质降解。值得注意的是,虽然混播牧草青贮饲料的 $\text{NH}_3\text{-N}$ 含量和非蛋白氮含量较高,但这并不意味着其营养价值较低。在实际应用中,可以通过调整混播比例、优化田间管理措施以及添加适宜的添加剂等方式,平衡青贮饲料的蛋白质降解和营养价值。如适当减少易降解蛋白质含量较高的牧草比例,增加富含纤维素和半纤维素的牧草比例,可以减缓蛋白质降解速度,提高青贮饲料的可消化性和能量价值。

1.3 生育期

牧草的生育期通过营养成分的变化来影响牧草的青贮发酵品质。随着生长时间的延长,意大利黑麦草逐渐衰老,青贮饲料中的 $\text{NH}_3\text{-N}$ 含量逐渐升高,且这一变化规律不受青贮时间的影响^[22],可能是由于在这个过程中植物细胞结构的破坏和蛋白酶活性的增强,使原本存储在细胞内的蛋白质会逐渐分解为氨基酸,进而部分转化为 $\text{NH}_3\text{-N}$ 。然而,并非所有牧草都遵循这一规律,如柠条青贮饲料的 $\text{NH}_3\text{-N}$ 含量会随着成熟度的增加而降低^[23]。这可能与柠条特有的生理机制有关,在柠条成熟过程中,可能通过调节氮素的吸收、转运和再利用等过程来减少 $\text{NH}_3\text{-N}$ 的积累。饲用豌豆的情况又有所不同,随着成熟度的增加,饲用豌豆青贮饲料中的非蛋白氮和游离氨基酸含量都呈现出降低的趋势。这种降低并不受凋萎处理和乳酸菌添加剂的影响^[24]。这表明饲用豌豆在成熟过程中可能发生了特定的生理变化,导致蛋白质的降解和转化受到抑制。但也有研究发现,苜蓿随着成熟度的增加,青贮饲料中的氨基肽酶活性、可溶性蛋白质和非可溶性蛋白质含量没有显著变化^[25]。这可能与苜蓿具有较强的抗蛋白质降解能力有关,也可能与其内部特定的代谢调控机制有关。

2 蛋白质降解变化机理

在青贮饲料加工调制这一复杂而精细的过程中,牧草原料中所蕴含的真蛋白质经历了一系列的生物化学变化,这些变化主要由植物蛋白酶与微生物蛋白酶协同作用所驱动。具体而言,牧草中的真蛋白质在这两种酶的双重作用下,被逐步拆解为肽氮、游离氨基酸态氮及 $\text{NH}_3\text{-N}$ 等形式的非蛋白氮。这一系列生化反应的总和,被学术界定义为青贮饲料中的蛋

白质降解现象。青贮饲料中的蛋白质降解并非一蹴而就,而是循序渐进地分为两个阶段,如图1所示。

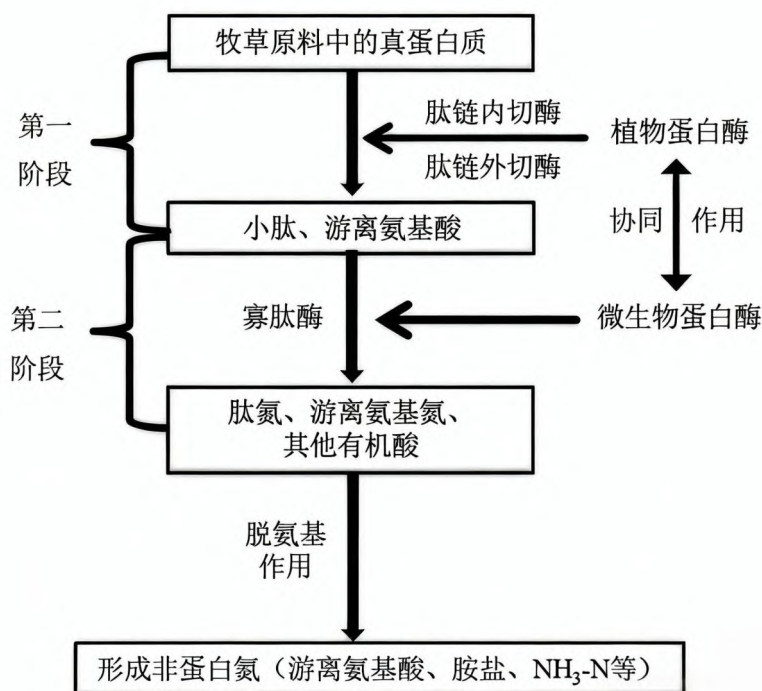


图1 青贮饲料蛋白质降解流程

从图1可见,在第一个阶段中,植物自身的蛋白酶将原本结构复杂的蛋白质切割成小肽和游离氨基酸,为后续反应奠定了基础;在第二个阶段中,青贮体系中微生物蛋白酶进一步将这些游离氨基酸分解为氨和其他有机酸——这一过程深刻体现了微生物在青贮饲料发酵中的核心作用^[22, 25]。值得注意的是,在青贮过程中,植物蛋白酶与微生物蛋白酶并不是孤立存在的,而是相互协同、共同作用于青贮饲料中的蛋白质。植物蛋白酶的水解作用为微生物提供了易于利用的底物,促进了微生物的生长和繁殖;而微生物的代谢活动又进一步促进了植物蛋白酶的释放,并增强了它的活性。这种协同作用加速了蛋白质的降解过程,降低了青贮饲料的营养价值。因此,这一系列看似自然的生化过程,实则对青贮饲料的品质构成了严峻挑战:不仅导致了牧草中真蛋白质的严重损失,还可能触发一系列不良的发酵连锁反应,这些反应直接或间接地降低了青贮饲料的适口性和动物的消化利用率,进而影响到畜牧业的生产效率和经济效益。

然而,蛋白酶的活性并非一成不变,而是受到多重环境因素的精密调控。其中,青贮环境的pH值及其下降速度扮演着至关重要的角色^[26],直接影响了蛋白酶的工作效率和稳定性。此外,牧草的种类、干物质含量^[27]及温度^[28]等因素同样对蛋白酶活性产生了显著影响。在植物蛋白酶层面,肽链内切酶和肽链外切酶作为其主要的表现形式,共同作用于蛋

白质降解的第一阶段,如同精准的“剪刀”,将蛋白质切割成更小的片段。进入蛋白质降解的第二阶段,微生物成为主角。通过脱氨基作用,将氨基酸转化为 $\text{NH}_3\text{-N}$,这一过程与产蛋白酶微生物的活跃程度紧密相关。在这一阶段中,氨基肽酶作为一种关键的寡肽酶,其作用不容忽视——能够从肽链的氨基末端逐一水解出氨基酸,直至生成二肽,这一过程既体现了氨基肽酶作为酶类的催化活性,也揭示了其在细胞表面作为受体参与物质转运的潜在功能。尽管羧基肽酶和酸性蛋白酶在蛋白质降解过程中的作用已受到广泛关注,但氨基肽酶的活性以及非蛋白氮的产生却往往被学术界所忽视。因此,本文重点阐述了青贮饲料中的氨基肽酶活性和非蛋白氮含量的变化机理。

2.1 氨基肽酶

氨基肽酶是一类能够水解蛋白质或多肽N端氨基酸残基的酶,广泛存在于植物、动物及微生物中。在青贮饲料中,氨基肽酶参与蛋白质的降解过程,通过逐步切除多肽链末端的氨基酸,促进蛋白质向小分子肽和氨基酸的转化。这一过程不仅影响饲料的营养价值,还直接关系到动物对饲料的消化吸收效率。因此,氨基肽酶在青贮饲料蛋白质降解过程中扮演着至关重要的角色,其活性变化直接影响着蛋白质的降解程度和速率。

2.1.1 氨基肽酶的类型

根据催化机制的具体作用方式以及对不同类型酶的敏感性差异,氨基肽酶这一大类酶又可分为金属酶、半胱氨酸酶和丝氨酸肽酶。这些分类显示了其在活性中心所含金属离子(如锌或钴)或是特定氨基酸残基(如半胱氨酸或丝氨酸)作为催化基团的不同^[29]。金属酶通常依赖金属离子来协调底物的结合和催化反应的进行,而半胱氨酸酶和丝氨酸肽酶则分别利用半胱氨酸或丝氨酸残基上的硫醇基或羟基作为亲核试剂,参与肽键的水解过程。氨基肽酶通过水解蛋白质或多肽链的N端氨基酸残基,释放出游离的氨基酸产物,这些氨基酸产物在微生物生态系统中扮演着至关重要的角色,经常作为微生物获取能量的重要来源。特别是在青贮环境中,一个富含植物材料且氧气受限的发酵过程中,微生物群落会分泌特定的氨基肽酶来降解复杂蛋白质,以满足其生长和代谢的需要。在此过程中, NH_3 是蛋白质降解的一个最终常见产物,不仅能够为微生物提供氮源,还可能影响青贮饲料的品质和安全。

值得注意的是,当环境中氮含量充足时,某些氨基肽酶的活性会受到调节,表现为增强或抑制,这反应了生物体在应对不同氨基酸供应情况时采取的精细调控策略。如亮氨酸氨基肽酶和甘氨酸氨基肽酶等,尽管都以特定氨基酸作为底物,但在不同条件下表现出不同的活性模式,这可能与各自在氨基酸代谢网络中的特定角色有关^[29]。这种现象也解释了为什么在一些研究中观察到粗蛋白质含量与氨基肽酶活性之间存在正相关关系,即在蛋白质含量高的物料中,氨基肽酶的活性也相应较高,以更有效地处理这些丰富的蛋白质资源。

Guo等^[30]在研究紫花苜蓿青贮中发现,丝氨酸肽酶和金属肽酶在将多肽分解为游离

氨基酸方面发挥了主要作用,这一过程对于提高青贮饲料的营养价值至关重要,因为游离氨基酸更容易被动物体吸收利用。相比之下,天冬氨酸胺酶和半胱氨酸胺酶则更倾向于将较大的蛋白质分子初步降解为较小的寡肽片段。这些发现不仅深化了对氨基胺酶在青贮过程中作用机制的理解,也强调了不同酶类在促进蛋白质降解路径上的互补性。在黑麦草青贮中,金属胺酶和半胱氨酸胺酶同样被证实为主要参与蛋白质降解的酶类,但在不同牧草种类中的活性存在显著差异^[31]。如紫花苜蓿中金属胺酶的活性相对较低,这可能与植物本身的生化组成及微生物群落结构有关^[30]。这些差异提示氨基胺酶的活性及其作用模式可能受到多种因素的影响,包括植物种类、青贮条件以及微生物群落结构等。尽管已有一些研究揭示了氨基胺酶在某些青贮饲料中的作用,但这一领域的研究仍然相对薄弱,特别是在其他重要青贮原料(如饲料桑、玉米、小麦等)中的应用效果及机制方面,仍有大量未知等待探索。

2.1.2 氨基胺酶活性变化机理

以往的研究广泛认为氨基胺酶在牧草蛋白质降解过程中扮演着至关重要的角色,作为主要的水解酶之一,其对蛋白质分解和后续的营养物质释放具有决定性的影响^[32]。氨基胺酶通过水解蛋白质或多肽链的N端,释放出单个氨基酸残基,这些残基在后续的化学反应中进一步转化为 $\text{NH}_3\text{-N}$,为 $\text{NH}_3\text{-N}$ 的形成提供了直接的物质基础^[33]。值得注意的是,氨基胺酶的活动与青贮饲料中非蛋白氮、 $\text{NH}_3\text{-N}$ 、游离氨基酸态氮以及肽氮的含量密切相关。具体来说,约57%的非蛋白氮、30%的 $\text{NH}_3\text{-N}$ 、21%的游离氨基酸态氮和75%的肽氮的生成与氨基胺酶的催化作用直接相关^[34],这凸显了氨基胺酶在调控青贮饲料氮素转化和营养价值方面的重要性。

Tao等^[21]的研究进一步揭示了氨基胺酶活性变化的机制,指出其变化主要是由发酵时间延长引起的pH值变化所驱动。在青贮初期,当pH值维持在6.6~7.1中性至微碱性范围内时,氨基胺酶的活性较高,能够有效促进蛋白质的降解。然而,随着发酵过程的深入,pH值逐渐下降,氨基胺酶的活性也随之降低^[35]。当pH值降至4.5时,氨基胺酶几乎完全失活,表明其在青贮过程中的活跃期可能仅限于发酵初期的前5~7 d,且其活性降低的时间早于羧基胺酶和酸性蛋白酶^[36]。然而,在特定的牧草种类如红三叶中情况可能有所不同。研究发现,在青贮前3 d,向红三叶中添加植物乳杆菌与蔗糖并未对氨基胺酶的活性产生抑制作用^[34]。这可能是由于植物乳杆菌自身也能分泌氨基胺酶,从而在一定程度上抵消了pH下降对酶活性的抑制作用。此外,pH的快速下降主要抑制了由植物自身主导的氨基胺酶活性,而由微生物分泌的氨基胺酶活性可能并不受pH值变化的显著影响。除了pH值外,温度也是影响氨基胺酶活性的重要因素之一。随着温度的升高,氨基胺酶的活性也相应增强。例如,当温度升高至40℃时,氨基胺酶的活性显著提升^[35]。这提示在青贮饲料的储存和管理过程中,温度控制对保持氨基胺酶活性及其促进蛋白质降解的功能至关重要。

在谷类作物如大麦中,同样存在大量的氨基肽酶。这些酶不仅在大麦叶片^[37]中被发现,也在大麦种子^[38]中广泛存在。然而,尽管谷类作物中含有丰富的氨基肽酶,但关于这些酶对全株谷类青贮饲料发酵品质影响的研究相对缺乏。这反映了当前氨基肽酶研究领域的局限性,尤其是在不同植物种类和青贮条件下酶活性的差异及其对饲料品质影响的深入理解方面。此外,在牧草加工过程中,机械损伤的程度也会影响氨基肽酶的提取和活性。当机械损伤较小时,细胞壁保持相对完整,从而限制了细胞内容物的溢出和释放^[39]。这意味着部分氨基肽酶可能因被束缚在细胞内而无法充分发挥其催化作用,导致对未提取的氨基肽酶在青贮过程中对蛋白质降解的实际贡献知之甚少。

2.1.3 微生物对氨基肽酶的影响

曲霉属、链霉菌属、假单胞菌属、乳杆菌属和芽孢杆菌属等微生物,是牧草表面及青贮饲料生态系统中极为常见的微生物^[40]。这些微生物在青贮过程中不仅参与发酵,还通过代谢活动产生多种酶类,其中就包括氨基肽酶。氨基肽酶作为一种重要的水解酶,能够催化蛋白质或多肽链N端的氨基酸残基水解,从而释放出游离氨基酸,这些氨基酸进一步参与青贮饲料的氮素转化和营养价值的提升。在青贮过程中,脱氨基作用是影响饲料品质的关键因素之一。研究表明,产丁酸、乙酸和乳酸的细菌在这一过程中发挥着主导作用^[41]。这些细菌通过特定的代谢途径,将蛋白质降解产生的游离氨基酸进一步转化为 NH_3 和其他挥发性脂肪酸,从而影响青贮饲料的pH值、营养价值以及适口性。李(Li)等^[42]的研究通过代谢组学技术,进一步揭示了 NH_3 相关基因的携带者与产生者的身份。 NH_3 的产生主要与肠杆菌科成员相关,而非梭菌属。此外,一些肠球菌和乳杆菌也具有产生氨和生物胺的能力^[43]。这些微生物通过脱氨酶和脱羧酶的催化作用,将可利用的游离氨基酸转化为 NH_3 和生物胺,如尸胺、酪胺和腐胺等。尸胺由赖氨酸通过赖氨酸脱羧酶产生,酪胺由酪氨酸通过酪氨酸脱羧酶产生,而腐胺则可以通过组氨酸脱羧酶或鸟氨酸脱羧酶以及胍丁胺等途径生成。 NH_3 的产生是氮代谢的终产物之一^[44-45]。值得注意的是,一些特定的肠杆菌,如肠杆菌属、克雷伯杆菌属和埃希氏杆菌属等,也具有较强的产氨能力^[42]。这些微生物在青贮饲料中的存在和活动,对饲料的氮素转化和品质有着重要影响。在青贮初期,氨基肽酶一直处于活跃状态,参与蛋白质的降解和游离氨基酸的释放。随着氧气的耗尽,青贮饲料进入厌氧发酵阶段,微生物群落结构会发生显著变化。当青贮饲料开封后重新接触氧气时,微生物群落会再次发生极大变化,这些变化可能包括新微生物的入侵、原有微生物的活性变化以及酶类产生的差异等。然而,关于这些微生物在重新接触氧气后代谢产生氨基肽酶的机制,目前仍知之甚少。

2.1.4 其他

Dong等^[46]研究发现,不同蛋白质降解的速率有明显差异,25种蛋白质降解的速度较快,被认为是植物中存在的最丰富的核酮糖二磷酸羧基酶的大链。由于大部分蛋白质被定位于叶绿体基质或线粒体内部,在生产或加工过程中,牧草的细胞膜受到损害或增厚,

对蛋白质的保护作用也会发生变化,某些牧草蛋白质降解增加的原因之一就是细胞膜变薄或受到破坏,进而导致水解酶活性(尤其是氨基肽酶活性)的增强。值得注意的是,类囊体膜中的蛋白质保存较好的原因,是其中很多蛋白质的位置与多酚氧化酶在植物细胞中的位置完全一致^[47]。多酚氧化酶介导的蛋白质-苯醌化学过程中,多酚氧化酶参与了蛋白质复合体,其中糖-二磷酸缩醛酶和甘油醛-3-磷酸脱氢酶活性也增强^[46]。因此,富含多酚氧化酶的红三叶在切割时溢出大量多酚氧化酶,导致内源性苯酚被氧化为苯二酚。苯二酚具有高度活性,能与巯基、酰胺和咪唑基等基团形成共价键^[48],进而抑制了青贮饲料中复杂蛋白质的降解。值得注意的是,核苷酸在青贮中代谢速度可能与能量代谢趋势不一致,进而导致氨基肽酶活性受到影响。其原因是核苷酸既可作为生产DNA的底物,同时也是细胞活动过程的能源,这一过程对非蛋白氮构成的信息几乎没有体现。

2.2 非蛋白氮的产生

2.2.1 乳酸菌代谢产生了部分非蛋白氮

尽管牧草表面附着众多乳酸菌,如肠球菌属、明串珠菌属和魏斯氏菌属^[49],但数量少于 10^5 cfu/g 鲜物质^[50],远远达不到调制优质青贮饲料的要求。因此,为避免更多非蛋白氮的产生,添加乳酸菌制剂是一种有效举措。但最近的研究发现,乳酸菌主导产生了70%的 $\text{NH}_3\text{-N}$ 、79%的游离氨基酸态氮和25%的肽氮^[51]。此外,氨基酸是乳酸菌重要的营养源之一,而且不同乳酸菌对不同氨基酸的降解具有差异,如副干酪乳杆菌能降解脯氨酸^[52],丝氨酸易被植物乳杆菌降解^[53]。Fijatkowska等^[41]在青贮中检测到较高的尸胺和腐胺含量,这可能是乳酸菌代谢利用了一些氨基酸并使其发生脱氨基的结果。遗憾的是,这些研究并未对其他微生物的代谢产物提供信息。因此,无法解释功能细菌的蛋白质翻译及相应的代谢产物合成途径。此外,针对青贮饲料中其他功能细菌的蛋白质翻译及相应的代谢产物合成途径的解析也尚未有相关报道。

2.2.2 其他微生物对非蛋白氮的影响

在青贮饲料中,游离氨基酸脱氨基和脱羧基形成的胺及生物胺主要由细菌酶活性引起,由植物主导的蛋白酶在其中的作用较小。在众多微生物中,梭菌属是青贮饲料中 NH_3 和生物胺的主要生产者^[42]。同时,作为青贮饲料中的主要微生物之一,埃希氏杆菌属和克雷白杆菌属也被认为具备代谢产生 NH_3 和生物胺的能力^[43]。因为这些微生物通过脱氨和脱羧作用(不同的代谢途径),将游离氨基酸转化为 NH_3 和生物胺^[44]。因此,游离氨基酸肽氮和 $\text{NH}_3\text{-N}$ 存在相关性。枯草芽孢杆菌的添加抑制了全株玉米青贮饲料非蛋白氮的产生,但解淀粉芽孢杆菌增加了青贮饲料的非蛋白氮含量^[40],说明不同特性的芽孢杆菌对非蛋白氮的产生或抑制差异较大。

青贮过程中的微生物种类繁多,受限于这些微生物的种类及功能,与之对应的酶将对最终产物的贡献程度有所差异。如作为非蛋白氮的重要组成部分之一,肽氮含量通常高于游离氨基酸和 $\text{NH}_3\text{-N}$ 含量,但在青贮过程中也可能出现某些微生物为自身繁殖而利用

了过多的肽氮导致其含量降低的现象。尽管Li等^[42]通过宏基因组学揭示了部分产NH₃的功能细菌,但并不能完全解释蛋白质翻译过程,因为低丰度的基因对部分非蛋白氮的合成途径及代谢途径也可能发挥关键性作用。

2.3 其他微生物与蛋白质降解的关系

微生物与蛋白质降解密切相关。假单胞菌属常出现在新鲜牧草和青贮饲料中^[53], Ogunade等^[54]首次揭示了其与氨含量、pH、酵母菌和霉菌数量等呈负相关。肠杆菌属在饲料作物中较常见^[53],因其与乳酸菌竞争利用可溶性碳水化合物导致蛋白质发生降解而不受欢迎^[55],但也是主导蛋白质降解的关键微生物之一。李旭娇^[34]通过对苜蓿进行青贮后发现肠杆菌属的丰富度与羧基肽酶的活性呈正相关。但随着乳酸含量的增加,青贮饲料的pH降至4.0时,大肠杆菌能被有效清除^[54],而一些乳酸菌代谢产物也被检测出产生生物胺^[56]。众所周知,羧基肽酶最适宜的pH为5.4,当pH下降速度较慢时不利于抑制羧基肽酶的活性^[35],这些复杂的原因及过程有必要追溯到牧草表面的微生物群落结构。尽管罗伊氏乳杆菌与肠膜明串珠菌的添加能降低甜高粱青贮饲料中的硝酸盐含量,但NH₃-N含量趋于增加^[13]。

3 展望

施氮量、混播方式和生育期等田间管理措施在青贮饲料蛋白质降解过程中扮演着至关重要的角色,这些管理措施不仅直接影响牧草的生长和发育,还通过调控植物体内的生理生化过程,间接影响青贮饲料中蛋白质的降解程度和速率。因此,深入探究不同牧草品种对这些田间管理措施的响应机制,对于优化青贮饲料的生产和提高其营养价值具有重要意义。未来研究应聚焦以下几个方面。

首先,通过精准施肥技术,根据牧草的生长需求和土壤养分状况,科学合理地确定施氮量和施肥时机,以提高青贮饲料原料的蛋白质含量和品质。同时,结合不同牧草品种的生长特性和营养需求,优化混播方式,实现牧草之间的优势互补,进一步提高青贮饲料的整体营养价值。

其次,需要关注牧草的生育期,选择适宜的收获时机,以确保青贮饲料中蛋白质的含量和品质达到最佳状态。在优化田间管理措施的基础上,还应注重青贮饲料调制技术的改进和创新。通过调整青贮过程中的温度、湿度和压实程度等参数,可以有效改善青贮饲料的发酵环境,从而减缓蛋白质的降解速率,提高青贮饲料的营养价值。同时,利用乳酸菌等微生物的演替规律,揭示田间管理、植物生理、微生物活动和青贮饲料蛋白质降解之间的相互作用关系,有助于制定更加科学合理的田间管理措施和青贮饲料调制方案。

最后,为了更深入地理解青贮饲料中微生物的动态变化和蛋白质降解机制,未来还可以结合测序技术和定量蛋白质组学等高通量技术手段,通过构建基于代谢中间产物的预

测模型,实现对青贮饲料发酵过程中微生物活动的实时监测和预测。同时,利用测序技术解析青贮饲料中微生物的群落结构和动态变化,结合定量蛋白质组学对微生物蛋白质表达的精准鉴定和定量分析,可以进一步揭示关键功能微生物菌株在青贮饲料蛋白质降解过程中的作用机制。这些设想不仅有助于筛选和优化产生非蛋白氮的关键功能微生物菌株,还为青贮饲料的生产和品质提升提供了新的思路和方法。

总之,通过深入探究不同田间管理措施对青贮饲料蛋白质降解的影响机制,结合精准施肥技术、优化混播方式和收获时机等措施,以及改进和创新青贮饲料调制技术,可以有效提高青贮饲料的蛋白质含量和营养价值。同时,利用高通量技术手段揭示微生物的动态变化和蛋白质降解机制,为青贮饲料的生产和品质提升提供了更为科学、精准和可持续的解决方案,必将有助于促进牧草在生产和青贮中的可持续发展潜力,为畜牧业的发展作出更大的贡献。

4 参考文献

- [1] Beddington J-R, Crute I R, Godfray H J. Food security: the challenge of feeding 9 billion people[J]. *Science*, 2010, 327(5967):812-818.
- [2] Lin Huilong, Xiong Xiaoyu, Liu yifan, et al. The Substitution effect of grass-fed livestock products on grain-fed livestock products from the perspective of supply-side reform in china[J]. *The Rangeland Journal*, 2021(43):377-387.
- [3] Food and Agriculture Organization. Optimization of feed efficiency in ruminant production systems[M]. In *Proceedings of the FAO Symposium, Bangkok, Thailand, 2012*: 1-5.
- [4] Makkar H P. Animal nutrition in a 360-degree view and a framework for future r&d work: towards sustainable livestock production[J]. *Animal Production Science*, 2016, 56(1): 1561-1568.
- [5] Gado H M, Elghandour M Y, Cipriano M, et al. Rumen degradation and nutritive utilization of wheat straw, corn stalks and sugarcane bagasse ensiled with multienzymes[J]. *Journal of Applied Animal Research*, 2017, 45(1): 485-489.
- [6] West M H, Mullenix M K, Rabinowitz A N, et al. 20 Forage production and nutritive quality of dual-purpose wheat managed under three different grazing frequencies in the southeastern united states[J]. *Journal of Animal Science*, 2022, 100(1): 17-18.
- [7] Gómezmiranda A, Lópezgonzález F, Vieyraalberto R, et al. grazed barley for dairy cows in small-scale systems in the highlands of mexico[J]. *Italian Journal of Animal Science*, 2022, 21(1): 178-187.
- [8] Yang Chungcheng, Chen Yahnsir, Chen Jianxiong. The Impact of the covid-19 pandemic on food consumption behavior: based on the perspective of accounting data of chinese food enterprises and economic theory[J]. *Nutrients*, 2022, 14(6): 1-16.
- [9] Yin Xuejing, Zhao Jie, Wang Siran, et al. Separating the chemical and microbial factors of oat harvested at two growth stages to determine the main factor on silage fermentation[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2022, 132(6): 4266-4276.

- [10] Xie Zhengsheng, Zhang Tian, Chen Xiaoyang, et al. Effects of maturity stages on the nutritive composition and silage quality of whole crop wheat[J]. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2012, 25(10):1374-1379.
- [11] Li Chun, Xu Zhengchun, Dong Zhen, et al. Effects of nitrogen application rate on the yields, nutritive value and silage fermentation quality of whole-crop wheat [J]. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2016, 29(8): 1129-1134.
- [12] Xu Li, Xu Zhengchun, Chen Ming, et al. Effects of seeding rate, fertilizing time and fertilizer type on yield, nutritive value and silage quality of whole-crop wheat[J]. *Tropical Grasslands-Forrajes Tropicales*, 2021, 9(2): 225-234.
- [13] 刘家杏. 甜高粱中硝酸盐与亚硝酸盐含量及降低技术研究[D]. 广州:华南农业大学, 2018:1-57.
- [14] Bijeli Z, Tomi Z, Mandi V, et al. The effect of sward structure and n fertilization on the grassgume silage quality[J]. *Tarim Bilimleri Dergisi*, 2016, 22(1):62-68.
- [15] 刘小飞, 孟可爱, 李科云. 氮肥对桂牧一号杂交象草叶绿素、含氮物含量和转氨酶活性的影响[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2013, 41(12):43-48.
- [16] Anderl J N, Zahller J, Roe F, et al. Role of nutrient limitation and stationary-phase existence in klebsiella pneumoniae biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin [j]. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2003, 47(4): 1251-1256.
- [17] Dong Miaoyin, Li Qiaoqiao, Xu Fuqiang, et al. Effects of microbial inoculants on the fermentation characteristics and microbial communities of sweet sorghum bagasse silage [J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 1-9.
- [18] 张小贝, 朱国鹏, 陈艳丽, 等. 追施氮肥水平对菜用甘薯产量、品质及硝酸盐积累的影响[J]. *热带作物学报*, 2018, 39(1): 1-5.
- [19] 胡锐. 硝酸根转运体 OsNPF7. 2 在水稻生长发育中的功能研究[D]. 北京:中国科学院大学, 2016:1-78.
- [20] Xu Liuxing, Hu Yaqin, Li Xinqin, et al. Effects of wheat-legume cultures on the fermentation quality and protein degradation of silage[J]. *Grassland Science*, 2022, 68(1):13-22.
- [21] Tao Ya, Sun Qizhong, Li Feng, et al. Comparative analysis of ensiling characteristics and protein degradation of alfalfa silage prepared with corn or sweet sorghum in semiarid region of inner mongolia [J]. *Animal Science Journal*, 2020, 91(1): e13321.
- [22] Johan D B, Elien D, Eva W, et al. The effect of a mixture of lactobacillus strains on silage quality and nutritive value of grass harvested at four growth stages and ensiled for two periods[J]. *Agricultural and Food Science*, 2013, 22(1): 115-126.
- [23] Ke Wencan, Wang Yan, Rinne M, et al. Effects of lactic acid bacteria and molasses on the fermentation quality, in vitro dry matter digestibility, and microbial community of korshinsk peashrub (caragana korshinskii kom.) silages harvested at two growth stages[J]. *Grass & Forage Science*, 2024, 79(1): 1-13.
- [24] Cavallarin L, Antoniazzi S, Tabacco E, et al. Effect of the stage of growth, wilting and inoculation in field pea (pisum sativum l.) silagesii. nitrogen fractions and amino acid compositions of herbage and silage[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2006, 86(9):1383-1390.

- [25] Sikora M C, Hatfield R D, Kalscheur K F. Fermentation and chemical composition of high-moisture lucerne leaf and stem silages harvested at different stages of development using a leaf stripper[J]. *Grass and Forage Science*, 2019, 74(2): 254–263.
- [26] Li Xujiao, Tian Jipeng, Zhang Qing, et al. Effects of mixing red clover with alfalfa at different ratios on dynamics of proteolysis and protease activities during ensiling[J]. *Journal of Dairy Science*, 2018, 101(1): 8954–8964.
- [27] Windle M C, Walker N, Kung Jr L. Effects of an exogenous protease on the fermentation and nutritive value of corn silage harvested at different dry matter contents and ensiled for various lengths of time[J]. *Journal of Dairy Science*, 2014, 97(5): 3053–3060.
- [28] Bedrosian M C, Kung Jr L. The effect of various doses of an exogenous acid protease on the fermentation and nutritive value of corn silage[J]. *Journal of Dairy Science*, 2019, 102(12): 10925–10933.
- [29] Chen Hao, Li Dejun, Zhao Jie, et al. Effects of nitrogen addition on activities of soil nitrogen acquisition enzymes: a meta-analysis[J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2018, 252(1): 126–131.
- [30] Tao Li, Chen Wei, Zhang Yan, et al. Contribution of endopeptidases to the formation of nonprotein nitrogen during ensiling of alfalfa[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2011, 168(1–2): 42–50.
- [31] Nsereko V L, Rooke J A. Effects of peptidase inhibitors and other additives on fermentation and nitrogen distribution in perennial ryegrass silage[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1999, 79(5): 679–686.
- [32] Mclersie B D, Buchanan S J. Changes in the levels of proteolytic enzymes in ensiled alfalfa forage[J]. *Canadian Journal of Plant Science*, 1982, 62(1): 111–116.
- [33] Guo Xusheng, Zhou Hong, Yu Zi, et al. Changes in the distribution of nitrogen and plant enzymatic activity during ensilage of lucerne treated with different additives[J]. *Grass and Forage Science*, 2007, 62(1): 35–43.
- [34] 李旭娇. 紫花苜蓿青贮饲料蛋白质降解机制与调控研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2018: 1–154.
- [35] Mckersie B D. Proteinases and peptidase of alfalfa herbage[J]. *Canadian Journal of Plant Science*, 1981, 61(1): 53–59.
- [36] 代艳. 不同添加剂对紫花苜蓿青贮过程中蛋白质降解特性的影响[D]. 长春: 吉林农业大学, 2008: 1–44.
- [37] Desimone M, Krüger M, Wessel T, et al. Purification and characterization of an aminopeptidase from the chloroplast stroma of barley leaves by chromatographic and electrophoretic methods[J]. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 2000, 737(1–2): 285–293.
- [38] Oszywa B, Pawelczak M, Kafarski P. The influence of α -aminophosphonic acids on the activity of aminopeptidase from barley seeds—an approach to determine the enzyme specificity[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2015, 37(3): 1–6.
- [39] Boudon A, Acosta A, Delagarde R, et al. Release of cell contents and comminution of particles of perennial ryegrass herbage during ingestion by dairy cows fed indoors or grazing[J]. *Grass and Forage Science*, 2006, 61(3): 205–217.
- [40] Bai Jie, Ding Zitong, Ke Wencan, et al. Different lactic acid bacteria and their combinations regulated the fermentation process of ensiled alfalfa: ensiling characteristics, dynamics of bacterial community and their functional shifts[J]. *Microbial Biotechnology*, 2021, 14(3): 1171–1182.

- [41] Fijalkowska M, Lipinski K, Pysera B, et al. The effect of ensiling in round bales on the content of nitrogen fractions in lucerne and red clover protein[J]. *Journal of Elementology*, 2015, 20(2):285–291.
- [42] Li Rongrong, Zheng Mingli, Zheng Menghu, et al. Metagenomic analysis reveals the linkages between bacteria and the functional enzymes responsible for potential ammonia and biogenic amine production in alfalfa silage[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2021, 132(4):2594–2604.
- [43] Oladosu Y, Rafii M Y, Abdullah N, et al. Fermentation quality and additives: a case of rice straw silage[J]. *BioMed Research International*, 2016:1–14.
- [44] Hu Min, Dong Jun, Tan Guiliang, et al. Metagenomic insights into the bacteria responsible for producing biogenic amines in sufu[J]. *Food Microbiology*, 2021, 98(2):1–8.
- [45] Huang Xiao, Yang Xinmei, Zhu Jia, et al. Microbial interspecific interaction and nitrogen metabolism pathway for the treatment of municipal wastewater by iron carbon based constructed wetland[J]. *Biore-source Technology*, 2020, 315(8):123814.
- [46] Dong Zhihao, Li Junfeng, Chen Lei, et al. Using proteomics to decipher the effect of tissue damage on the fate of red clover proteins during ensiling[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2019, 257(1):114271.
- [47] Mayer A M. Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? a review[J]. *Phytochemistry*, 2006, 67(21):2318–2331.
- [48] Brudzynski K, Maldonado A L. Polyphenol–protein complexes and their consequences for the redox activity, structure and function of honey: a current view and new hypothesis—a review[J]. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 2015, 65(2):71–80.
- [49] Yu A O, Leveau J J, Marco M L. Abundance, diversity and plant–specific adaptations of plant–associated lactic acid bacteria[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2020, 12(1):16–29.
- [50] 陶莲. 青贮过程中蛋白酶对紫花苜蓿蛋白质降解的作用机理[D]. 北京: 中国农业大学, 2012:1–145.
- [51] Winters A L, Cockburn J E, Dhanoa M S, et al. Effects of lactic acid bacteria in inoculants on changes in amino acid composition during ensilage of sterile and non–sterile ryegrass[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, 89(1):442–451.
- [52] Ohshima M, McDonald P. A review of the changes in nitrogenous compounds of herbage during ensilage[J]. *Journal of the Science of Food & Agriculture*, 1978, 29(6):497–505.
- [53] Sun Ruru, Yuan Xianjun, Li Junfeng, et al. contributions of epiphytic microbiota on the fermentation characteristics and microbial composition of ensiled six whole crop corn varieties[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2021, 131(1):1683–1694.
- [54] Ogunade I M, Jiang Y, Kim D H, et al. Fate of *Escherichia coli* O157: H7 and bacterial diversity in corn silage contaminated with the pathogen and treated with chemical or microbial additives[J]. *Journal of Dairy Science*, 2017, 100(3):1780–1794.
- [55] Ávila C S, Carvalho B F. Silage Fermentation—updates focusing on the performance of micro–organisms[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2020, 128(4):966–984.
- [56] 刘畅, 张灼阳, 郭晓奎. 产生物胺乳酸菌的筛查与检测[J]. *中国微生物学杂志*, 2009, 21(5):427–429.

Progress of Protein Degradation in Silage

Tang Guojian¹, Wang Jiangli¹, Mei Xueqing¹, Xu Liuxing², Wu Dan^{2*}

(1.School of Biological Sciences and Technology, Liupanshui Normal University, Liupanshui 553004, China;

2.School of Agriculture and Life Sciences, Zhaotong University, Zhaotong 657000, China)

Abstract: Silage plays an important role in improving animal intake and increasing livestock products supply, but protein degradation during ensiling is particularly common due to the influence of ensiling techniques, forage nutritional quality, and environmental factors. In this paper, the research progresses of the effects of field management measures (such as nitrogen application, mixed sowing methods, and growth stage) on silage protein degradation in recent years are summarized; the mechanisms underlying changes in protein degradation are discussed from two aspects: the activity of aminopeptidases and the production of non-protein nitrogen in silage; future research directions for silage protein degradation are primarily prospected. In the future, it is essential to further explore the mechanisms by which field management practices influence protein degradation in silage. Additionally, predictive models should be developed based on intermediate metabolites (small molecules) produced during silage fermentation. Sequencing technologies should be employed to analyze the dynamic changes in microbial communities within silage, while quantitative proteomics should be utilized to accurately identify and quantify microbial protein expression during the ensiling process of forage. This will provide a foundation for screening key functional microbial strains that dominate protein degradation and for a thorough understanding of protein changes.

Keywords: Silage; Protein degradation; Aminopeptidase; Non-protein nitrogen

[责任编辑:张俊英 江 伟]