

添加菌酶复合制剂发酵玉米秸秆的筛选试验

吴立坡^{1,2} 姜宁^{1,2} 张爱忠^{1,2*}

(1.黑龙江八一农垦大学动物科技学院,黑龙江省寒区饲料资源高效利用与营养调控重点实验室,大庆 163319;

2.畜禽养殖污染控制与资源化技术国家重点实验室,长沙 410125)

摘要: 本试验旨在探究菌酶复合制剂发酵玉米秸秆的最佳发酵条件及发酵效果。运用均匀设计试验,以中性洗涤纤维降解率、酸性洗涤纤维降解率为目的指标,对黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)接种量、纤维素酶和木聚糖酶添加量及发酵天数4个因素进行筛选,并对发酵效果进行评价和比较分析。结果表明:菌酶复合制剂发酵玉米秸秆的干物质、粗蛋白质含量显著高于未发酵秸秆($P<0.05$),酸性洗涤木质素、中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维含量显著低于未发酵秸秆($P<0.05$)。本研究所获得的最佳发酵条件为:纤维素酶添加量0.2 g/kg,木聚糖酶添加量0.1 g/kg,黄孢原毛平革菌接种量20%,发酵天数19 d;在此条件下,玉米秸秆的中性洗涤纤维降解率和酸性洗涤纤维降解率分别达到了23.47%和20.13%。

关键词: 玉米秸秆;黄孢原毛平革菌;纤维素酶;木聚糖酶;发酵条件

中图分类号:S816

文献标识码:A

文章编号:1006-267X(2020)07-3358-07

近年来,随着我国农业生产技术水平的不断提高,粮食产量逐年攀升,导致农作物秸秆的数量也在不断增加。有效利用农作物秸秆作为饲料资源不仅可缓解人畜争粮这一矛盾,还可以降低秸秆处理的成本并减少焚烧处理带来的环境污染。然而秸秆细胞壁结构复杂,难以被动物消化吸收,从而造成秸秆的堆积浪费。玉米秸秆由细胞壁中的木质素和半纤维素相互交联并将纤维素镶嵌于内,以牢固的醚键或酯键连接;同时,木质素又包围着纤维素形成一种外围基质,致使微生物和酶对半纤维素、纤维素的降解受到限制,而且动物体内又缺乏降解木质素的酶^[1],导致家畜对玉米秸秆的利用率较低。通过黄贮,既可降低秸秆的纤维组分含量,又可改善发酵品质,还有利于长期保存^[2]。冯冲凌^[3]在堆肥中接入黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*),其木质素降解率较对照组提高了10.9%;Zhi等^[4]通过试验对小麦

秸秆在30℃条件下固态发酵12 d,其木质素降解率达到 $(28.5\pm 1.3)\%$,使木质纤维素结构明显破坏;Chen等^[5]在玉米秸秆和低芥酸菜子残渣中接种黄孢原毛平革菌,结果表明,其纤维素和木质素含量分别降低了40.0%和64.3%。国内外有关秸秆黄贮的研究多集中在乳酸菌及产纤维素酶细菌等方面,如果不解决木质素的问题,其纤维素酶的降解作用也会受到影响。黄孢原毛平革菌是白腐真菌的一种,其分泌的锰过氧化物酶、漆酶、木质素过氧化物酶等胞外酶可有效降解秸秆中的木质素,使原本被木质素包裹的纤维素、半纤维素释放出来^[6]。而纤维素酶、木聚糖酶可直接或间接通过物理或化学的作用使秸秆整个纤维结构得到膨胀和破坏^[7]。因此,本研究拟使用菌酶复合制剂对玉米秸秆进行混合发酵,探讨其最佳发酵条件,以期为提高玉米秸秆的饲用价值提供理论依据。

收稿日期:2020-01-31

基金项目:国家重点研发计划项目(2018YFD0502100);黑龙江八一农垦大学平台支持计划(PTJH201903);黑龙江八一农垦大学研究生创新科研项目(YJSCX2019-Y20)

作者简介:吴立坡(1994—),男,河北石家庄人,硕士研究生,从事动物营养与饲料科学研究。E-mail: 321897719@qq.com

*通信作者:张爱忠,教授,博士生导师,E-mail: aizhzhang@sina.com

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌种和酶制剂

黄孢原毛平革菌 CICC 40299 购自中国工业微生物菌种保藏管理中心,活菌数为 1×10^8 CFU/mL;纤维素酶活性 $\geq 100\ 00$ U/g;木聚糖酶活性 $\geq 300\ 00$ U/g。

1.1.2 玉米秸秆

玉米秸秆购自大庆市周边农户,在自然风干后,用粉碎机切至 1~2 cm。

1.1.3 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养:马铃薯浸粉 3 g,葡萄糖 20 g,琼脂 14 g。黄孢原毛平革菌液体种子培养基:马铃薯提取液 1 L,葡萄糖 20 g,

KH_2PO_4 3 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g, 维生素 B_1 微量。121 °C 灭菌 15 min。

1.1.4 菌种培养

菌种活化:将黄孢原毛平革菌冻干菌粉接种到 PDA 培养基上,在 28 °C 条件下培养 5 d,并转接活化 2 次,放于 4 °C 保存备用。

液体菌种培养:将 PDA 培养基上的黄孢原毛平革菌接种到黄孢原毛平革菌液体种子培养基中,于 28 °C、150 r/min 条件下振荡培养 7 d。

1.2 试验方法

1.2.1 发酵条件的筛选

在固态发酵条件下,通过均匀设计^[8]对纤维素酶和木聚糖酶添加量、黄孢原毛平革菌接种量以及发酵天数进行筛选试验,水分含量调节至 60%~65%。均匀设计因素水平见表 1。

表 1 均匀设计因素水平
Table 1 Levels of uniform design factors

水平 Levels	因素 Factors			
	纤维素酶 Cellulase/(g/kg)	木聚糖酶 Xylanase/(g/kg)	黄孢原毛平革菌 <i>Phanerochaete chrysosporium</i> /%	发酵天数 Days of fermentation/d
1	0.2	0.1	10	5
2	0.4	0.2	15	10
3	0.6	0.3	20	15
4	0.8	0.4	25	20
5	1.0	0.5	30	30

1.2.2 发酵条件的验证

将切短至 1~2 cm 的玉米秸秆按均匀设计筛选的最佳发酵条件,添加菌酶复合制剂,并将水分含量调节至 60%~65%,装入 33 cm×40 cm 聚乙烯袋内,每袋 1 kg,用真空包装机(AT-620)抽真空并封口,室温下(25~32 °C)发酵 19 d。发酵验证试验设置 3 个重复,开封后用于样品测定。

1.3 指标测定

1.3.1 常规营养成分含量的测定

酸性洗涤木质素(ADL)、中性洗涤纤维(NDF)和酸性洗涤纤维(ADF)含量参考范氏洗涤纤维分析法^[9]测定。常规营养成分含量参照《饲料分析及饲料质量检测技术》^[10]测定。试验中中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维降解率按以下公式计算:

$$\text{中性洗涤纤维降解率}(\%) = 100 \times$$

$$[m_2 - (m_1 \times c_1)] / m;$$

$$\text{酸性洗涤纤维降解率}(\%) = 100 \times$$

$$[m_2 - (m_1 \times c_1)] / m。$$

式中: m_1 为空袋质量; m 为样品质量; m_2 为提取处理后样品残渣+滤袋质量; c_1 为空白袋子校正系数(烘干后质量/原来质量)。

1.3.2 发酵秸秆感官评定

开封后立即称取发酵秸秆样品 20 g,加入 180 mL 蒸馏水,用均质器拍打 90 s 使其充分混匀,再进行过滤,滤液用于测定饲料 pH 及有机酸。按青贮饲料质量评定标准进行感官评定,分别从气味、色泽、质地、含水率、pH 进行综合评定^[11]。100 分分配:pH 为 25 分,含水量为 20 分,色泽为 20 分,气味为 25 分,质地为 10 分。75~100 分为优等,51~76 分为良好,26~50 为一般,25 分及以下为劣质。

1.3.3 有机酸和氨态氮(NH₃-N)浓度的测定

有机酸浓度采用安捷伦 1200 型高效液相色谱仪测定;有机酸专用色谱柱 300 mm×7.8 mm,折光检测器,柱温为 55 ℃,压力为 32 bar,流速为 0.55 mL/min;流动相为 0.1% 硫酸水溶液。取经低速离心后的秸秆滤液 5 mL 加 25% 的偏磷酸 1 mL 混匀,取混合液体 1 mL 在 4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min,将上清液用 0.22 μm 水膜缓慢过滤后,即刻用注样器上机测定有机酸浓度,上样量为 5 μL,通过外标法计算。氨态氮浓度参照冯宗慈等^[12]的方法测定。

1.4 数据处理

试验数据使用 Excel 2016 软件整理,采用

DPS V7.05 软件的均匀设计模块对数据进行多元二次逐步回归分析。最佳发酵条件验证试验运用 SPSS 19.0 统计软件的独立样本 *t* 检验方法,试验数据用平均值±标准误表示。

2 结果与分析

2.1 回归方程的建立

中性洗涤纤维和酸性洗涤纤维降解情况见表 2。以纤维素酶(X_1)、木聚糖酶(X_2)、黄孢原毛平革菌(X_3)、发酵天数(X_4)作为自变量,以中性洗涤纤维降解率(Y_1)、酸性洗涤纤维降解率(Y_2)作为因变量,利用多元二次逐步回归建立回归方程。

表 2 中性洗涤纤维和酸性洗涤纤维降解情况

Table 2 Degradation of neutral detergent fiber and acid detergent fiber

组别 Groups	纤维素酶 Cellulase (X_1)	木聚糖酶 Xylanase (X_2)	黄孢原毛平革菌 <i>Phanerochaete</i> <i>chrysosporium</i> (X_3)	发酵天数 Days of fermentation (X_4)	中性洗涤 纤维降解率 NDF degradable rate (Y_1)	酸性洗涤 纤维降解率 ADF degradable rate (Y_2)
1	1(0.2)	2(0.2)	3(20)	4(20)	23.07	21.27
2	2(0.4)	4(0.4)	1(10)	3(15)	16.70	14.97
3	3(0.6)	1(0.1)	4(25)	2(10)	10.75	8.95
4	4(0.8)	3(0.3)	2(15)	1(5)	3.89	2.12
5	5(1.0)	5(0.5)	5(30)	5(30)	22.64	20.65

表中 Y_1 、 Y_2 为实测值。括号中数值为均匀设计因素水平。

The Y_1 and Y_2 in this table were measured values. Values in brackets were levels of uniform design factors.

中性洗涤纤维降解率的回归方程:

$$Y_1 = 7.2729 - 8.5804X_1 + 0.9266X_4 - 0.2567X_2X_3。$$

式中: Y_1 为中性洗涤纤维降解率(%); X_1 为纤维素酶添加量(g/kg); X_2 为木聚糖酶添加量(g/kg); X_3 为黄孢原毛平革菌接种量(%); X_4 为发酵天数(d)。

经优化后的发酵条件分别为 $X_1 = 0.20$ 、 $X_2 = 0.12$ 、 $X_3 = 20$ 、 $X_4 = 19.07$,在优化条件下预测中性洗涤纤维降解率为 22.59%。

酸性洗涤纤维降解率的回归方程:

$$Y_2 = 5.7763 - 8.9204X_1 + 0.9126X_4 - 0.2389X_2X_3。$$

式中: Y_2 为酸性洗涤纤维降解率(%); X_1 为纤维素酶添加量(g/kg); X_2 为木聚糖酶添加量(g/kg); X_3 为黄孢原毛平革菌接种量(%); X_4 为发酵天数(d)。

经优化后的发酵条件分别为 $X_1 = 0.20$ 、 $X_2 = 0.13$ 、 $X_3 = 20.01$ 、 $X_4 = 19.24$,在优化条件下预测酸

性洗涤纤维降解率为 20.80%。

由表 3 可知, $F_1, F_2 > F_4^2 = 6.94$ ($\alpha = 0.05$), $P < 0.05$,回归方程具有显著意义。理论最佳发酵条件为:纤维素酶添加量 0.2 g/kg,木聚糖酶添加量 0.1 g/kg,黄孢原毛平革菌接种量 20%,发酵天数 19 d。

2.2 最佳发酵条件验证

为了验证试验模型的准确性,在上述优化条件下进行发酵结果验证。并继续探究菌酶复合制剂发酵秸秆的发酵品质。采用上述最佳发酵条件,实际测得观测值如表 4 所示。菌酶复合制剂发酵秸秆的粗蛋白质、干物质含量分别较未发酵秸秆提高了 60.00% 和 3.75% ($P < 0.05$),酸性洗涤木质素含量较未发酵秸秆降低了 6.95% ($P < 0.05$);菌酶复合制剂发酵秸秆的中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维含量分别较未发酵秸秆降低了 23.47%、20.13% ($P < 0.05$),与预测值(22.59% 和

22.80%) 差距不大, 试验相对误差分别为 3.91%、 为以后大规模发酵提供理论依据。
3.22%, 相对误差较小, 可以较好地反映发酵效果,

表 3 回归方程的显著性检验

Table 3 Significance test of regression equation

项目 Items	中性洗涤纤维降解率 NDF degradable rate (Y_1)	酸性洗涤纤维降解率 ADF degradable rate (Y_2)
F 值 F-value	71 657	66 667
P 值 P-value	0.018	0.024
相关系数 Correlation coefficient	0.999 8	0.999 6
自由度 Degree of freedom	(3,1)	(3,1)

表 4 玉米秸秆发酵前后营养成分含量比较

Table 4 Comparison of nutrient component contents of corn straw before and after fermentation

项目 Items	未发酵秸秆 Unfermented straw	菌酶复合制剂发酵秸秆 Straw mixed fermentation with fungi and enzyme	%
粗蛋白质 CP	5.30±0.07 ^b	8.48±0.17 ^a	
干物质 DM	92.48±0.11 ^b	95.95±0.41 ^a	
酸性洗涤木质素 ADL	7.19±0.11 ^a	6.69±0.14 ^b	
中性洗涤纤维 NDF	67.44±0.58 ^a	51.61±0.45 ^b	
酸性洗涤纤维 ADF	39.79±0.27 ^a	31.77±0.37 ^b	

同行数据肩标不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)。下表同。

Values in the same row with different letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$). The same as below.

2.3 发酵品质的验证

由表 5 可知, 菌酶复合制剂发酵秸秆 pH 显著低于未发酵秸秆 ($P<0.05$), 表明添加菌酶制剂可

有效降低发酵物的 pH; 在色泽、气味、质地感官评价方面, 发酵秸秆品质明显优于未发酵秸秆, 接近优质发酵。

表 5 发酵玉米秸秆的感官评定

Table 5 Sensory evaluation of fermented corn straw

项目 Items	pH	含水量 Water content/%	色泽 Color	气味 Odor	质地 Texture	评定结果 Evaluation results
未发酵秸秆 Unfermented straw	5.51±0.07 ^a	62	黄褐色较深	略带酒酸味	质地较硬 松散不黏手	一般
菌酶复合发酵秸秆 Straw mixed fermentation with fungi and enzyme	4.13±0.04 ^b	64	淡黄色	酸香味, 舒适感	质地柔软松散	良好

2.4 有机酸和氨态氮含量

由表 6 可知, 菌酶复合制剂发酵秸秆, 乳酸含量显著高于未发酵秸秆 ($P<0.05$), 氨态氮含量显著低于未发酵秸秆 ($P<0.05$), 乙酸、丙酸含量差异不显著 ($P>0.05$), 丁酸未检出。

3 讨论

均匀设计法只考虑试验点在试验范围内均匀分布, 与正交试验相比, 可大大减少试验次数, 从而节约时间、节约资源, 适合用来优化工艺筛选条件。本试验采用均匀设计法对菌酶复合制剂的最

优发酵条件进行试验,通过逐步回归分析得到菌酶复合制剂的最佳组合,经验证试验得到的中性

洗涤纤维降解率、酸性洗涤纤维降解率与预测值相符。

表6 发酵玉米秸秆有机酸和氨态氮含量比较

Table 6 Comparison of organic acid and ammonia nitrogen contents in fermented corn stalk g/kg

项目 Items	未发酵秸秆 Unfermented straw	菌酶复合发酵秸秆 Straw mixed fermentation of fungi and enzyme
乳酸 LA	1.78±0.06 ^b	2.14±0.14 ^a
乙酸 AA	0.26±0.03	0.22±0.05
丙酸 PA	0.06±0.02	0.06±0.03
氨态氮 NH ₃ -N	3.67±0.12 ^a	2.99±0.12 ^b

发酵饲料成功的关键在于提供适宜的条件。为创造厌氧环境要把原料压实,而水分含量过低,不易压实,所以一般将发酵饲料适宜的水分含量调整为65%~70%^[13]。本试验通过黄孢原毛平革菌固体发酵所产生的3种酶系破坏木质素的复杂结构^[6],酸性洗涤木质素含量降低6.95%,可释放出纤维素和半纤维素,再利用酶制剂的高效性对纤维素和半纤维素进行降解,以期提高玉米秸秆的营养价值。发酵结束后玉米秸秆的感官评定和营养成分含量的变化表明,添加菌酶复合制剂可以显著提高发酵饲料的品质。与未发酵秸秆相比,发酵后秸秆均具有酸香味、松散不黏手且呈淡黄色。同时,粗蛋白质和干物质含量均有所提高,pH、中性洗涤纤维与酸性洗涤纤维含量降低。Song等^[14]通过纤维素酶-木聚糖酶共同处理使玉米秸秆转化率达到48.5%,并且证实了纤维素酶-木聚糖酶的协同作用高于单一酶处理。毛建红^[15]通过添加纤维素酶、果胶酶、布什乳酸杆菌发酵玉米秸秆后,中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维、纤维素、半纤维素含量显著降低,改善了秸秆营养品质。张仲卿等^[16]用拟康宁木霉和黄孢原毛平革菌混合发酵玉米秸秆,试验表明混合发酵均高于单一菌株发酵,其纤维素和木质素降解率分别达到36.80%和28.87%。本试验结果与上述相关研究结果一致。具有不同降解功能的微生物之间存在互生和共生的关系^[17],将其进行适当比例的组合可能会取得更好的应用效果。一般认为,pH在4.0以下为优质发酵饲料。薛艳林等^[18]在秸秆发酵中添加生物制剂可有效提高发酵饲料品质,迅速降低pH,抑制有害微生物的增殖,减少饲料营养物质的损失,使发酵饲料留存更多的营养物质。郭

萌萌^[19]通过添加乳酸菌、酵母菌、芽孢杆菌等复合菌发酵玉米秸秆,将发酵环境中pH降低至适宜的pH,从而控制有害菌的增长。在本研究中,添加黄孢原毛平革菌和纤维素酶后,pH迅速降低,且未出现增高现象,使得发酵品质得到明显改善。

本试验中,发酵秸秆乳酸含量显著高于未发酵秸秆,乳酸的产量与发酵饲料的品质有直接影响,乳酸的产生可有效抑制其他腐败菌的生长。菌酶复合制剂发酵秸秆较高的乳酸含量可能由于纤维素酶和黄孢原毛平革菌共同分解植物细胞壁,从而增加降解菌可利用的发酵底物,将碳水化合物进行生物降解,转化为有机酸。与未发酵秸秆相比,在整个发酵过程中菌酶复合制剂发酵秸秆的pH较低,这可能导致发酵秸秆氨态氮含量降低。本试验结果与在玉米秸秆青贮中添加乳酸菌及纤维素酶混合发酵改善青贮发酵品质的结果一致^[20-21]。

杨世帆等^[22]研究表明,乙酸含量产生与青贮品质呈负相关,对黄贮也是如此,乙酸会使发酵饲料产生酸味,降低适口性,并产生刺鼻的气味。丁酸是发酵中应尽量避免出现的有机酸,丁酸是源自含氮化合物的分解,使蛋白质分解,并降低其营养价值。本试验中,丙酸和乙酸含量与未发酵秸秆相比均无显著差异,发酵前后均未检测出丁酸,说明添加黄孢原毛平革菌和纤维素酶可提高玉米秸秆的发酵效果,且无有害酸产生。

贾晶霞等^[23]在研究玉米秸秆发酵过程中粗蛋白质含量呈上升趋势,这是因为微生物大量利用原料中的可溶性糖,而利用其蛋白质较少,从而使粗蛋白质相对含量升高。李川东等^[24]认为,在发酵过程中微生物的相互竞争死亡所产生出的菌体

蛋白,增加了蛋白质含量。岳丽等^[25]通过添加黑曲霉和产朊假丝酵母发酵甜高粱秸秆,将粗蛋白质含量提高至18.79%^[26]。混合发酵可产生酶系互补的作用,且对合成一系列酶过程具有一定的反馈调节作用,从而增加蛋白酶和纤维素酶的活性。本试验中,发酵秸秆的粗蛋白质含量显著高于对照组,可能是黄孢原毛平革菌通过对木质素结构的破坏释放出来的纤维素和半纤维被纤维素酶分解为单糖,促进菌丝的生长,增加菌体蛋白,从而提高了发酵秸秆中粗蛋白质的含量。玉米秸秆具有一定的营养价值,但木质素、纤维素含量过高,严重影响其利用价值^[27]。本研究中,发酵秸秆的酸性洗涤木质素、中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维含量显著低于未发酵秸秆,提高了秸秆的利用价值。在色泽、气味、质地感官评价方面,发酵秸秆品质明显优于未发酵秸秆,接近优质发酵。

4 结论

通过均匀设计筛选出最佳发酵条件为:纤维素酶添加量0.2 g/kg、木聚糖酶添加量0.1 g/kg、黄孢原毛平革菌接种量20%、发酵天数19 d,此条件下中性洗涤纤维降解率为23.47%,酸性洗涤纤维降解率为20.13%。在最佳发酵条件下,该菌酶复合制剂发酵玉米秸秆可显著提高秸秆的发酵品质和营养价值。

参考文献:

[1] 张克威,赵和平,薛艳林,等.乳酸菌和纤维素酶对玉米秸秆黄贮饲料品质的影响[J].畜牧与饲料科学,2017,38(4):20-24.

[2] 马广英,张文举,徐清华,等.秸秆黄贮优化方案及其对小麦、玉米、油菜秸秆处理的影响[J].中国草食动物科学,2014,34(2):24-27.

[3] 冯冲凌.黄孢原毛平革菌及其关键功能酶对木质纤维素降解转化特性的研究[D].博士学位论文.长沙:湖南大学,2011.

[4] ZHI Z L, WANG H. White-rot fungal pretreatment of wheat straw with *Phanerochaete chrysosporium* for biohydrogen production: simultaneous saccharification and fermentation[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2014, 37(7): 1447-1458.

[5] CHEN Y, WANG Y Y, XU Z, et al. Enhanced humification of maize straw and canola residue during composting by inoculating *Phanerochaete chrysosporium*

in the cooling period [J]. Bioresource Technology, 2019, 293: 122075.

[6] VA RSHNEY A K, MONAN M K, VIDYA RTHI A S, et al. Effect of nitrogen sources and C:N ratio on production of manganese peroxidase using *Phanerochaete chrysosporium* NCIM 1197 [J]. Journal of Pure and Applied Microbiology, 2014, 8(1): 481-487.

[7] 李红亚,李文,李术娜,等.解淀粉芽孢杆菌复合菌剂对玉米秸秆的降解作用及表征[J].草业学报,2017,26(6):153-167.

[8] 方开泰.均匀设计及其应用(IV) [J].数理统计与管理,1994(4):54-56.

[9] 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.

[10] 杨胜.饲料分析及饲料质量检测技术[M].北京:北京农业大学出版社,1993.

[11] 农业部畜牧兽医司.青贮饲料质量评定标准(试行) [J].中国饲料,1996(21):5-7.

[12] 冯宗慈,高民.通过比色测定瘤胃液氨氮含量方法的改进[J].畜牧与饲料科学,2010,31(6/7):37.

[13] CAO Y, TAKAHASHI T, HORIGUCHI K I, et al. Effect of adding lactic acid bacteria and molasses on fermentation quality and *in vitro* ruminal digestion of total mixed ration silage prepared with whole crop rice [J]. Grassland Science, 2010, 56(1): 19-25.

[14] SONG H T, GAO Y, YANG Y M, et al. Synergistic effect of cellulase and xylanase during hydrolysis of natural lignocellulosic substrates [J]. Bioresource Technology, 2016, 219: 710-715.

[15] 毛建红.酶-菌制剂发酵玉米秸秆对其瘤胃降解及微观结构的影响[D].硕士学位论文.阿拉尔:塔里木大学,2018.

[16] 张仲卿,张爱忠,姜宁.混合真菌发酵对玉米秸秆纤维素与木质素降解率的影响[J].动物营养学报,2019,31(3):1385-1395.

[17] GUTIERREZ-CORREA M, PORTAL L, MORENO P, et al. Mixed culture solid substrate fermentation of *Trichoderma reesei* with *Aspergillus niger* on sugar cane bagasse [J]. Bioresource Technology, 1999, 68(2): 173-178.

[18] 薛艳林,孙林,殷国梅,等.生物添加剂和填装密度对菊苣青贮饲料品质的影响[J].畜牧与饲料科学,2017,38(1):39-43.

[19] 郭萌萌.复合益生菌发酵全株玉米、玉米秸秆及豆粕

- 的效果研究[D].硕士学位论文.杨凌:西北农林科技大学,2019.
- [20] 李茂,字学娟,吕仁龙,等.添加乳酸菌和纤维素酶对王草青贮品质和瘤胃降解率的影响[J/OL].中国畜牧杂志,2020;1-9.[2020-02-06].<https://doi.org/10.19556/j.0258-7033.20190813-02>.
- [21] 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.
- [22] 杨世帆,田鑫森,张梦瑶,等.添加饲用复合菌剂黄贮玉米秸秆品质的综合评定[J].饲料研究,2019,42(5):82-86.
- [23] 贾晶霞,梁宝忠,王艳红,等.不同汽爆预处理对干玉米秸秆青贮效果的影响[J].农业工程学报,2013,29(20):192-198.
- [24] 李川东,李建农,沈益新.收获时间对饲用高粱和野生大豆单、混青贮品质的影响[J].中国草地学报,2008,30(5):75-79.
- [25] 岳丽,王卉,山其米克,等.复合菌种固态发酵法提高甜高粱秸秆饲料品质的研究[J].饲料工业,2019,40(5):34-39.
- [26] MARQUES N P, DE CASSIA PEREIRA J, GOMES E, et al. Cellulases and xylanases production by endophytic fungi by solid state fermentation using lignocellulosic substrates and enzymatic saccharification of pretreated sugarcane bagasse [J]. *Industrial Crops and Products*, 2018, 122: 66-75.
- [27] 张吉鹏,卢德勋.试述反刍动物日粮中的纤维问题[J].中国乳业,2003(7):21-24.

Screening Experiment of Fermented Corn Stalk with Fungi and Enzyme Mixed Preparation

WU Lipo^{1,2} JIANG Ning^{1,2} ZHANG Aizhong^{1,2*}

(1. Key Laboratory of High Efficiency Utilization and Nutrition Manipulation of Feed Resources in Cold Areas of Heilongjiang Province, College of Animal Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural Reclamation University, Daqing 163319, China; 2. National Engineering Laboratory for Pollution Control and Waste Utilization in Livestock and Poultry Production, Changsha 410125, China)

Abstract: The purpose of this experiment was to explore the optimum fermentation condition and effects of corn stalk fermented with fungi and enzyme mixed preparation. The degradable rate of neutral detergent fiber (NDF) and acid detergent fiber (ADF) were used as the evaluative indices in the uniform design, the fermentation days and the supplemented proportion of *Phanerochaete chrysosporium*, cellulase, xylanase were evaluated and screened. The results showed that the contents of dry matter, crude protein in fermented stalk were significantly higher than those in the unfermented stalk ($P < 0.05$) and the contents of acid detergent lignine, NDF and ADF in fermented stalk were significantly lower than those in unfermented stalk ($P < 0.05$). The optimum ferment condition: cellulase is 0.2 g/kg, xylanase is 0.1 g/kg, *Phanerochaete chrysosporium* is 20% and fermentation day is 19 days. The degradable rates of NDF and ADF are 23.47% and 20.13%, respectively. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2020, 32(7):3358-3364]

Key words: corn stalk; *Phanerochaete chrysosporium*; cellulase; xylanase; fermentation conditions