

余 泉, 谢晓航, 叶 萌, 等. 秸秆饲料化全细胞纤维素酶的构建及应用[J]. 农业资源与环境学报, 2019, 36(5): 687-693.

YU Xiao, XIE Xiao-hang, YE Meng, et al. Generation and application of whole-cell cellulase for straw feed[J]. *Journal of Agricultural Resources and Environment*, 2019, 36(5): 687-693.

秸秆饲料化全细胞纤维素酶的构建及应用

余 泉¹, 谢晓航¹, 叶 萌¹, 李华南², 刘晓鹏³, 宋慧婷^{1*}

(1. 湖北大学资源环境学院, 武汉 430062; 2. 湖北大学生命科学学院, 武汉 430062; 3. 湖北民族学院生物资源保护与利用湖北省重点实验室, 湖北 恩施 445000)

摘 要:为提升秸秆饲料的品质,通过构建全细胞酿酒酵母纤维素酶,探究全细胞纤维素酶用于秸秆饲料化的应用前景。通过与其他青贮菌剂对比用于秸秆饲料化发酵,比较分析全细胞酿酒酵母纤维素酶在秸秆饲料化中的应用效果。试验发酵条件设置为:发酵温度 28 ℃,发酵时间 14 d,真空厌氧发酵。结果表明:与乳酸菌发酵相比,纤维素酶与乳酸菌混合发酵的玉米秸秆铵态氮/总氮比没有明显上升($P>0.05$),因此不会造成饲料中的蛋白过量分解;纤维素含量显著下降($P<0.01$),相比未发酵秸秆下降 15.03 个百分点,比乳酸菌发酵效果提高一倍以上,与商用青贮剂发酵效果相当;半纤维素含量相比未发酵秸秆下降 2.70 个百分点。研究表明酿酒酵母全细胞纤维素酶与乳酸菌混合处理秸秆,可提高纤维素酶酶解效率,有效减低秸秆中纤维素、半纤维素含量,酶解产物可加速乳酸菌发酵进程,全细胞酶可增加秸秆单细胞蛋白含量,实现玉米秸秆发酵效果、营养价值和利用效率的同步提升。

关键词:秸秆饲料;全细胞纤维素酶;发酵;乳酸菌

中图分类号:X71

文献标志码:A

文章编号:2095-6819(2019)05-0687-07

doi: 10.13254/j.jare.2018.0263

Generation and application of whole-cell cellulase for straw feed

YU Xiao¹, XIE Xiao-hang¹, YE Meng¹, LI Hua-nan², LIU Xiao-peng³, SONG Hui-ting^{1*}

(1. School of Resources and Environmental Science, Hubei University, Wuhan 430062, China; 2. College of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, China; 3. Hubei Key Laboratory of Biological Resources Protection and Utilization, Hubei University for Nationalities, Enshi 445000, China)

Abstract: In order to improve the quality of straw feed, we explored the prospect of application of whole-cell *Saccharomyces cerevisiae* cellulase for straw feed. The effects of whole-cell *S. cerevisiae* cellulase used in straw fermentation were compared to those of other silage microbial agents. The fermentation conditions were as follows: fermentation temperature, 28 ℃; fermentation time, 14 days; and fermentation state, vacuum and anaerobic. The results showed that compared to lactic acid bacteria fermentation, the ammonium nitrogen/total nitrogen ratio did not increase significantly ($P>0.05$) and thus did not cause excessive protein decomposition in the feed. The cellulose content decreased significantly from 43.44% (blank control) to 28.41% ($P<0.01$), which was more than double the fermentation effect of lactic acid bacteria and equivalent to commercial silage. The hemicellulose content decreased from 22.20% (blank control) to 19.50%. This study showed that the combination of whole-cell cellulase and lactic acid bacteria in *S. cerevisiae* could improve the enzymatic hydrolysis efficiency of cellulase and effectively reduce the cellulose and hemicellulose content in straw. The enzymatic hydrolysis product can accelerate fermentation by lactic acid bacteria, and the whole-cell enzyme can increase the single-cell protein content of straw, realize the fermentation potential of corn straw, and simultaneously improve nutritional value and utilization efficiency.

Keywords: straw feed; whole-cell cellulase; fermentation; lactic acid bacteria

收稿日期:2018-10-02 录用日期:2018-11-03

作者简介:余 泉(1993—),男,湖北大冶人,硕士研究生,从事秸秆资源化利用研究。E-mail: ArthurYuX@outlook.com

*通信作者:宋慧婷 E-mail: htsong@hubu.edu.cn

基金项目:湖北省自然科学基金项目(2018CFA019);湖北省技术创新专项(2019ABA117, 2018ABA098, 2017ABA139);武汉市应用基础研究项目(2019020701011496, 2017020201010229)

Project supported: The Natural Science Foundation of Hubei Province, China (2018CFA019); Special Fund for Technological Innovation of Hubei Province (2019ABA117, 2018ABA098, 2017ABA139); Applied Basic Research Project of Wuhan, China (2019020701011496, 2017020201010229)

我国秸秆资源丰富,据估计我国每年产生3.27亿t玉米秸秆^[1-2]。大部分玉米秸秆最后都自然腐解或直接焚烧,不但会破坏土壤表层有机质,还会引起空气污染,对人类健康造成危害^[3]。玉米秸秆富含有机质,蛋白质与脂肪也占有一定比例,基本组织构成以纤维素、半纤维素及木质素为主^[4],在饲料、肥料、燃料、食用菌原料、加工原料等方面具有很高的开发利用价值^[5]。

秸秆饲料化是解决目前畜禽养殖业饲料原料短缺的有效途径,生物处理具有能耗低、污染小、易于操作等优点,可依靠微生物和酶制剂进行生物降解及生物转化^[6],如利用乳酸菌发酵,其发酵液可以改善秸秆饲料风味和营养价值^[7]。秸秆发酵时接种乳酸菌可以迅速增加农作物表面的乳酸菌数目,使乳酸发酵占主导地位,从而降低pH值,抑制有害微生物的活动,保存和提高饲料营养价值^[8]。然而由于玉米秸秆的细胞壁成分含量较高,营养价值不能显著提高,限制了乳酸菌的饲用范围。

纤维素酶作为水解纤维素的“工具”,用途广泛,主要应用于制备生物能源,汤斌等^[9]、李旭东等^[10]研究纤维素酶在稀酸作用下对秸秆产燃料乙醇的预处理效果,分别发现以质量分数0.8%或4%的稀硫酸处理可获得最佳效果。除了制备生物能源之外,纤维素酶还可以制备成饲料添加剂、织物洗涤剂、造纸工业等有关的酶制剂等投入工业生产^[11]。纤维素酶在饲料添加剂方面的研究主要是通过向秸秆中添加具有分解纤维素能力的酶制剂,在密封发酵的过程中,使秸秆中的部分纤维素降解为可溶性糖。万里强等^[12]研究表明,青贮苜蓿中加入纤维素酶能发酵纤维素分解产生戊糖、乳酸和少量乙酸,而无二氧化碳生成,有利于抑制腐败菌生长,提高饲料的贮藏期。尽管在青贮饲料中添加纤维素酶有很多优点,但目前该研究领域仍有许多问题制约其发展:如生产成本较高,青贮饲料中添加纤维素酶稳定性不高等^[13]。

酿酒酵母广泛应用于食品、酿造及生物能源生产等领域,良好的细胞活性有利于增加生物量的积累,促进细胞循环使用,提高发酵效率^[14]。目前,酿酒酵母用于发酵研究多集中在产乙醇领域,将酿酒酵母用于玉米秸秆青贮发酵的研究较为少见。玉米秸秆中接种酿酒酵母可以缓解或解除游离SO对菌群的抑制作用,使乳酸菌在青贮过程中迅速增殖形成优势菌群,促进乳酸的形成和积累,使原料的pH值迅速降低^[15]。

确保青贮成功的关键因素是保持乳酸菌持续累积乳酸并维持较低pH值^[16],而秸秆中可溶性碳水化合物较少,直接青贮较难^[17]。需要使用能够分解纤维素的酶制剂提供可溶性碳水化合物,才能维持乳酸菌发酵^[18],但纤维素酶会因酶解产物产生反馈抑制作用,酶解效率不高^[19]。本研究以构建表达纤维素酶的酿酒酵母为基础,希望通过乳酸菌与全细胞纤维素酶制剂间协同发酵,降解部分纤维素为乳酸菌提供发酵底物,加速乳酸菌发酵进程,提高玉米秸秆发酵效果^[20],并同时解除纤维素酶的反馈抑制作用^[21]。使用全细胞酿酒酵母纤维素酶在发酵的玉米秸秆中自行繁殖,既可促进乳酸菌发酵,又可不受添加量较小的限制,降低纤维素酶成本。且酿酒酵母能提供大量丰富单细胞蛋白,可提高玉米秸秆饲用品质。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 原料

回收的玉米秸秆剪短至2~4 cm,在55℃烘箱中烘至恒重,于干燥阴凉处保存备用。玉米秸秆原料成分如表1所示。

表1 玉米秸秆原料成分及含量
Table 1 Composition of corn stalk raw materials

成分 Composition	含量 Content/%
干物质	93.12
粗蛋白	10.74
纤维素	43.44
半纤维素	22.20

1.1.2 菌株和质粒

大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α -Gold 用于质粒构建,菌种实验所用单一菌种为木聚糖酶与纤维素酶共生型酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)pHBM368-PGK-CBH,由湖北大学工业生物技术湖北省重点实验室保藏的原始载体pHBM368-PGK经重组构建而成。实验所用复合乳酸菌发酵剂(购自北京川秀科技有限公司),商用青贮菌剂、秸秆发酵剂购自农富康生物科技有限公司。

1.1.3 培养基

筛选重组菌培养基为LA固体培养基:1%蛋白胨,0.5%酵母抽提物,1%氯化钠,1.5%琼脂粉,37℃用于重组菌培养。添加100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的氨苄青霉素。

活化酿酒酵母培养基为液体 YPD 培养基:蛋白胨 2 g,酵母抽提物 1 g,葡萄糖 2 g,蒸馏水 100 mL。

活化乳酸菌制剂培养基为液体 LB 培养基:蛋白胨 1 g,酵母抽提物 0.5 g,氯化钠 1 g,蒸馏水 100 mL。

活化商用青贮菌剂培养基为蔗糖培养基:蔗糖 10 g,蒸馏水 150 mL。

LB 培养基及蔗糖培养基用高压灭菌锅在 121 ℃ 灭菌 30 min,YPD 培养基用高压灭菌锅 108 ℃ 灭菌 20 min,接种前均置于无菌操作台紫外灭菌 30 min。

1.2 试验方案

1.2.1 纤维素酶表达载体 pHBM-368-PGK-CBH 构建

根据 CBH2 基因序列设计一对引物 *Cbh2f* (5' AATTACGTATTTGCTTTGATTGTTTTTGC3', 下划线为 *SnaB* I 酶切位点)和 *Cbh2r* (5' TAACCTGAG-GCTAATAAGTGCTATCAATCG 3', 下划线为 *Eco81* I 酶切位点),以 pPIC9K-CBH2 为模板,PCR 扩增得到目的基因 CBH2 (表 2)。将原始质粒 368-PGK 用 *SnaB* I 和 *Eco81* I 两个限制性内切酶进行酶切,暴露出载体上两端黏性末端。将 PCR 扩增得到的 CBH2 同样用 *SnaB* I 和 *Eco81* I 酶切后回收。

将酶切处理回收后的 CBH2 和载体 pHBM368-PGK 片段混合,通过 T4 DNA 连接酶在 16 ℃ 反应过夜。连接产物以 *E.coli* DH5 α -Gold 感受态为宿主进行常规转化,涂布在含有氨苄青霉素的 LB 固体培养基中,37 ℃ 过夜培养,挑取重组子单菌落 (图 1)。

1.2.2 秸秆饲料化应用效果评价

为研究乳酸菌与全细胞纤维素酶制剂混合使用是否与其单独使用发酵效果有所差异,应用效果实验设置为 5 个发酵组合,分别是:A 组 (乳酸菌制剂发酵)、B 组 (全细胞酿酒酵母纤维素酶发酵)、C 组 (乳酸菌制剂与全细胞酿酒酵母纤维素酶混合发酵)、D 组

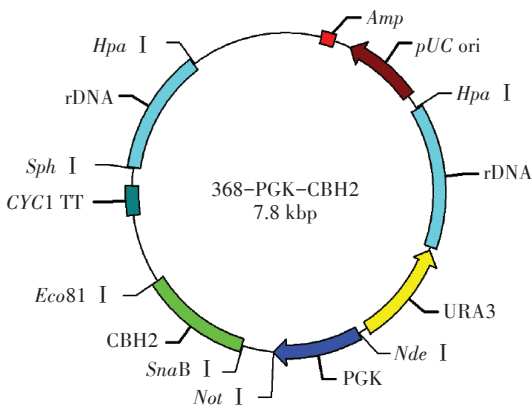


图 1 纤维素酶表达载体 pHBM-368-PGK-CBH 示意图
Figure 1 Cellulase expression vector pHBM-368-PGK-CBH

(商用青贮剂发酵)、E 组 (自然发酵),另用相同来源而未发酵的秸秆设置为 F 组 (对照),每个组各设置 3 个平行样品,实验组添加玉米秸秆原料均为 50 g,添加发酵添加剂液体均为 100 mL (生物量通过 OD₆₀₀ 标定)。但乳酸菌制剂活化使用的 LB 培养基相关培养原料 (主要成分为 1% 蛋白胨、0.5% 酵母抽提物和 1% 葡萄糖) 中氮源含量只有全细胞纤维素酶制剂活化使用的 YPD 培养基 (主要成分为 2% 蛋白胨、1% 酵母抽提物和 2% 葡萄糖) 的一半,为确保各实验组额外氮源添加量的一致,使用 LB 培养基活化的乳酸菌制剂取 100 mL,而使用 YPD 培养基的全细胞纤维素酶制剂取 50 mL,以此推算混合发酵组取 25 mL 全细胞纤维素酶制剂与 50 mL 乳酸菌制剂混合,商用青贮剂按使用方法需 50 mL,各实验组都稀释至 100 mL 使用。处理体系见表 3。将烘干后的玉米秸秆倒入 1000 mL 容量烧杯中,将菌液与水按表 1 中的量混合后倒入喷壶中,均匀喷洒在秸秆上,并不断搅拌,直至喷洒完毕后静置 15 min 使秸秆充分吸收菌液,将处理好的样品倒入真空包装袋中,使用真空封口机封口后于 28 ℃ 恒温培养箱中恒温发酵 14 d。

1.3 测定项目及方法

感官评价:分别从气味、色泽、质地、形态四个指标以效果最差为 1 分、效果最好为 5 分,分四个维度进

表 2 CBH2 引物设计
Table 2 CBH2 primer design

引物 Primer	序列 Sequence
<i>Cbh2f</i>	5' AATTACGTATTTGCTTTGATTGTTTTTGC 3'
<i>Cbh2r</i>	5' TAACCTGAGGCTAATAAGTGCTATCAATCG 3'

表 3 玉米秸秆发酵处理体系
Table 3 Corn stalk fermentation treatment

项目 Items	A 组 Group A	B 组 Group B	C 组 Group C	D 组 Group D	E 组 Group E
发酵菌剂	乳酸菌制剂	全细胞酿酒酵母纤维素酶	乳酸菌+全细胞酿酒酵母纤维素酶	商用青贮剂	未添加
玉米秸秆添加量/g	50	50	50	50	50
菌液添加量/mL	100	50	50+25	50	0
无菌水添加量/mL	0	50	25	50	100

行综合评价,发酵玉米感官评价标准见表4。

总氮(TN)含量:经硫酸消化法得到液体成分,采用碱性过硫酸钾氧化紫外分光光度法测定^[22]。

铵态氮(NH₄⁺-N)含量:经硫酸消化法得到液体成分,采用苯酚-次氯酸钠比色法测定^[23]。

纤维素含量:通过美国国家可再生能源实验室(NREL)方法^[24]水解得到液体成分,采用蒽酮硫酸比色法测定^[25]。

半纤维素含量:经硝酸钙预处理后,采用2 mol·L⁻¹盐酸水解法得到液体成分,调节pH值后采用DNS法测定^[26]。

采用SAS软件对数据进行差异性分析(LSD法,α=0.05)

2 结果与讨论

2.1 全细胞酿酒酵母纤维素酶构建及功能分析

挑取重组子单菌落,酶切鉴定后测序验证。将测序正确的pHBM368-PGK-CBH2质粒经Hpa I酶切线性化,用电转化法将线性DNA转化到酿酒酵母中,涂布于营养缺陷型SC平板上,从营养缺陷型的SC平板上挑取单菌落至YPD平板,28℃培养促使其生长。挑取重组酵母的单菌落,转接至含有1%羧甲基纤维素(CMC)的YPD平板,加入刚果红染色液,观察菌落周围出现水解圈,见图2,表明纤维素酶成功在营养缺陷型酿酒酵母中分泌表达,对照菌株则没有水解圈。

筛选出的菌落经过扩大培养后即为全细胞酿

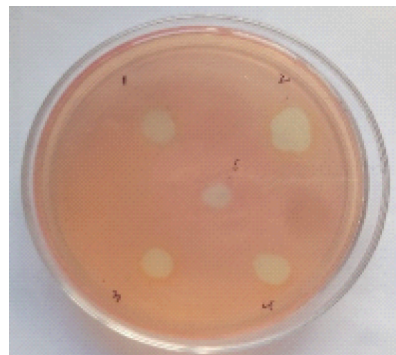
酒酵母纤维素酶,扩大培养后用于后续的玉米秸秆发酵。

2.2 发酵感官评价

发酵玉米秸秆的感官评价是进行饲料化应用中的基础评价指标,通过评价发现,乳酸菌发酵与全细胞纤维素酶混合发酵的玉米秸秆在气味和形态上均有较大改善,相比而言酸香味适中且有淡淡酒香,形态上糜烂程度减轻,结块现象减少,综合评价结果见表5,混合发酵的玉米秸秆总体上优于其他处理组合。

2.3 不同发酵添加剂对粗蛋白含量的影响

粗蛋白含量是评价饲料营养价值的重要指标,结果见图3,各发酵处理对玉米秸秆粗蛋白含量无显著



四周4个菌株为表达纤维素酶的酿酒酵母,中间为野生型对照菌株
The four strains around the glass culture dish are the cellulase-expressing *Saccharomyces cerevisiae*, and the middle is the wild-type.

图2 全细胞纤维素酶的功能验证

Figure 2 Functional verification of whole-cell cellulase

表4 发酵玉米秸秆感官评价标准

Table 4 Fermented corn stalk sensory evaluation standard

评价指标 Evaluation index	1.0分	2.0分	3.0分	4.0分	5.0分
气味	腐败臭味	酸败味	酸味	酸香味	甘酸香味
色泽	其他颜色	褐色	黄褐色	黄色	亮黄色
质地	结块	黏性结块	略带黏性	松散	松散柔软
形态	茎叶严重腐烂	茎叶腐烂	茎叶轻微腐烂	茎叶结构破坏	茎叶保存良好

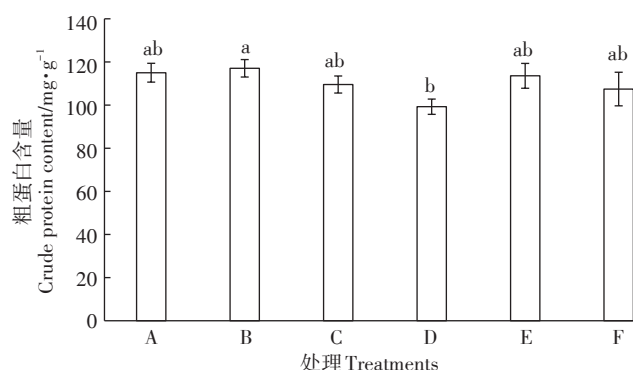
表5 发酵玉米秸秆感官评价

Table 5 Fermented corn stalk sensory evaluation results

实验组 Treatments	气味 Flavor	色泽 Color	质地 Texture	形态 Form	平均得分 Average score	饲料感官等级 Feed sensory level
A	3.0	3.0	3.0	3.0	3.00	中等
B	3.0	3.0	4.0	3.0	3.25	良好
C	4.0	3.0	4.0	5.0	4.00	优质
D	4.0	3.0	4.0	4.0	3.75	良好
E	2.0	2.0	4.0	1.0	2.25	差

注:A.乳酸菌制剂发酵;B.全细胞纤维素酶发酵;C.乳酸菌制剂与全细胞纤维素酶混合发酵;D.商用青贮剂发酵;E.自然发酵

Note: A. Fermentation of lactic acid bacteria preparation; B. Whole-cell cellulase fermentation; C. Mixed fermentation of lactic acid bacteria preparation and whole-cell cellulase; D. Commercial silage fermentation; E. Natural fermentation



A: 乳酸菌制剂发酵; B: 全细胞纤维素酶发酵; C: 乳酸菌制剂与全细胞纤维素酶混合发酵; D: 商用青贮剂发酵; E: 自然发酵; F: 未发酵秸秆。

不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。下同

A: Fermentation of lactic acid bacteria preparation; B: Whole-cell cellulase fermentation; C: Mixed fermentation of lactic acid bacteria preparation and whole-cell cellulase; D: Commercial silage fermentation; E: Natural fermentation; F: Unfermented straw. Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$). The same below

图3 玉米秸秆粗蛋白含量

Figure 3 Crude protein content in corn stalk

影响 ($P > 0.05$), 乳酸菌发酵、全细胞纤维素酶发酵及混合发酵样品中粗蛋白含量分别达到 115.01 、 117.06 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 109.53 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。商用青贮剂发酵粗蛋白含量为 99.26 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 明显低于全细胞纤维素酶发酵组, 可能是由于商用青贮剂中含有导致氮源损失的微生物类群。

2.4 不同发酵添加剂对 NH_4^+-N 含量的影响

NH_4^+-N 含量是衡量秸秆发酵效果的重要指标, 是由腐败菌分解饲料中的蛋白生成, NH_4^+-N 含量越高, 发酵饲料的营养价值和品质就越低, 因此 NH_4^+-N 含量可以反映不同发酵添加剂对玉米秸秆饲料化处理的效果。乳酸菌发酵、全细胞纤维素酶发酵、混合发

酵、商用青贮剂发酵均对玉米秸秆 NH_4^+-N 含量有显著影响, 见图 4, 乳酸菌发酵、全细胞纤维素酶发酵、混合发酵引起 NH_4^+-N 含量显著上升 ($P < 0.01$), 商用青贮剂发酵引起 NH_4^+-N 含量显著下降 ($P < 0.01$)。采用乳酸菌与全细胞纤维素酶制剂混合发酵的玉米秸秆 NH_4^+-N 含量为 3.651 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 且其铵态氮与总氮比例 ($\text{NH}_4^+-\text{N}/\text{TN}$) 值为 0.21 , 与乳酸菌单独发酵、全细胞纤维素酶单独发酵 $\text{NH}_4^+-\text{N}/\text{TN}$ 值相差不大, 说明乳酸菌与全细胞纤维素酶制剂混合发酵不会引起 $\text{NH}_4^+-\text{N}/\text{TN}$ 值的大幅上升, 即二者用于混合发酵时不会造成饲料中的蛋白过量分解。但与商用青贮剂相比, 其 $\text{NH}_4^+-\text{N}/\text{TN}$ 值仍属较高范畴, 在后续研究中应关注如何降低发酵过程中蛋白质的损失。

2.5 不同发酵添加剂对纤维素比例的影响

非瘤胃动物无法直接消化利用纤维素, 纤维素是玉米秸秆用作饲料时的一个重要评价指标。由图 5 可知, 乳酸菌单独发酵和全细胞纤维素酶单独发酵均对纤维素比例有影响 ($P < 0.05$), 混合发酵和商用青贮剂发酵引起纤维素比例显著下降 ($P < 0.01$)。对比 A、B、C 三组样品的纤维素比例, 乳酸菌与全细胞纤维素酶制剂混合发酵的玉米秸秆纤维素比例最低, 为 28.41% , 相比未发酵玉米秸秆降低 15.03 个百分点, 与商业青贮剂发酵效果相当, 其纤维素含量比全细胞纤维素酶制剂单独发酵和乳酸菌单独发酵明显降低 ($P < 0.05$)。由于在酶解过程中, 产生的纤维二糖和葡萄糖对整个反应具有抑制作用, 使得纤维素酶酶解效率不高, 当酶解产生的纤维二糖和葡萄糖被乳酸菌、酵母菌利用时, 可以解除纤维二糖及葡萄糖对纤维素酶的反馈抑制作用, 因此混合发酵情况下可提高纤维素酶的酶解效果。

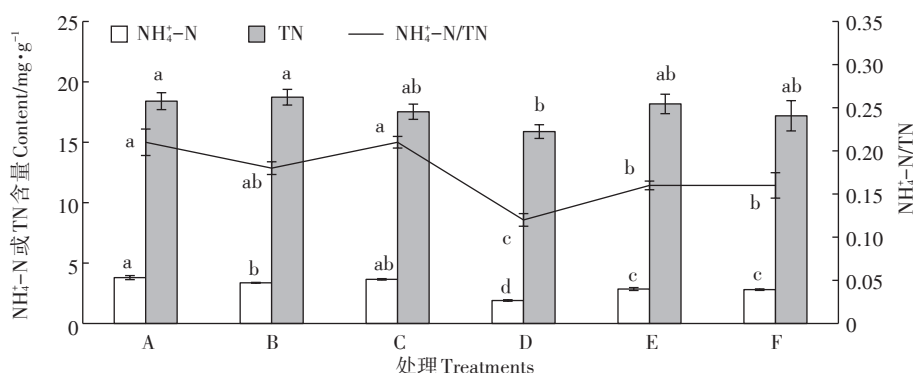


图4 玉米秸秆铵态氮(NH_4^+-N)、总氮(TN)含量及铵态氮与总氮比例($\text{NH}_4^+-\text{N}/\text{TN}$)

Figure 4 Ammonium nitrogen(NH_4^+-N) and total nitrogen(TN) content of corn stalk and ratio of ammonium nitrogen to total nitrogen($\text{NH}_4^+-\text{N}/\text{TN}$)

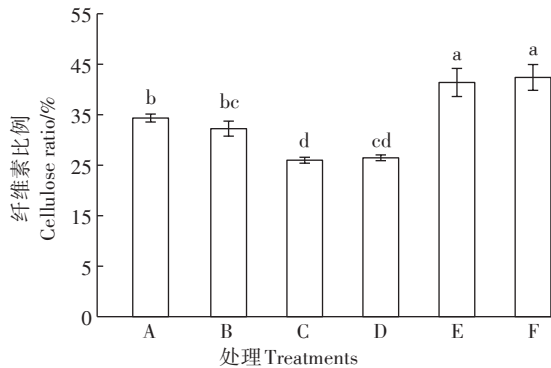


图5 玉米秸秆纤维素比例

Figure 5 Corn stalk cellulose ratio

2.6 不同发酵添加剂对半纤维素比例的影响

半纤维素与纤维素合称膳食纤维,且在膳食纤维中占50%以上,饲料中充足的膳食纤维可以提供饱腹感,但其消化率低,不能被非瘤胃动物充分消化吸收。由图6可知,乳酸菌单独、全细胞纤维素酶单独发酵、自然发酵对玉米秸秆半纤维素比例无显著影响($P>0.05$)。比较A、B、C组可发现:乳酸菌发酵玉米秸秆和全细胞纤维素酶制剂发酵的玉米秸秆半纤维素含量与空白样品无显著差异,说明乳酸菌用于秸秆发酵时不能很好地降解半纤维素,乳酸菌与全细胞纤维素酶制剂混合发酵的玉米秸秆半纤维素比例最低,为19.50%,相比未发酵玉米秸秆下降2.70个百分点,说明乳酸菌与全细胞纤维素酶制剂混合发酵可以提高发酵玉米秸秆的半纤维素降解效果。

3 结论

(1)乳酸菌剂和全细胞酿酒酵母纤维素酶混合处理秸秆可有效提高秸秆饲料中纤维素、半纤维素降解效率,提高秸秆饲料利用效率。

(2)乳酸菌剂和全细胞酿酒酵母纤维素酶混合处

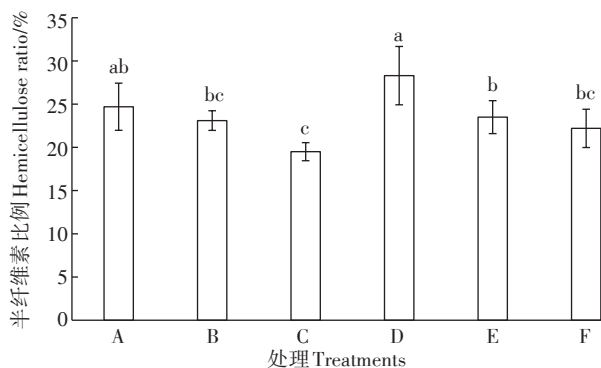


图6 玉米秸秆半纤维素比例

Figure 6 Corn stalk hemicellulose ratio

理秸秆可有效提高秸秆饲料中单细胞蛋白含量,提升秸秆饲料品质。

(3)全细胞酿酒酵母纤维素酶在秸秆饲料青贮中具有很好的应用前景。

参考文献:

- [1] 孟尧,魏志谋,郑明霞,等.瘤胃液用于玉米秸秆产酸的影响因素[J].环境工程学报,2017,11(1):497-502.
MENG Yao, WEI Zhi-mou, ZHENG Ming-xia, et al. Influencing factor of VFA production with corn straw inoculated with rumen fluid[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2017, 11(1):497-502.
- [2] 吴文韬,鞠美庭,刘金鹏,等.一株纤维素降解菌的分离、鉴定及对玉米秸秆的降解特性[J].微生物学通报,2013,40(4):712-719.
WU Wen-tao, JU Mei-ting, LIU Jin-peng, et al. Isolation, identification and corn stalk degradation characteristics of cellulose-degrading bacterial strain NH11[J]. *Microbiology*, 2013, 40(4):712-719.
- [3] 曹国良,张小曳,龚山陵,等.中国区域主要颗粒物及污染气体的排放源清单[J].科学通报,2011,56(3):261-268.
CAO Guo-liang, ZHANG Xiao-ye, GONG Shan-ling, et al. Emission inventories of primary particles and pollutant gases for China[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2011, 56(3):261-268.
- [4] 吴鸿欣,曹洪国,韩增德,等.中国玉米秸秆综合利用技术介绍与探讨[J].农业工程,2011,1(3):9-12.
WU Hong-xin, CAO Hong-guo, HAN Zeng-de, et al. Introduction and discussion of cornstalk utilization technology in China[J]. *Agriculture Engineering*, 2011, 1(3):9-12.
- [5] 左旭,王红彦,王亚静,等.中国玉米秸秆资源量估算及其自然适宜性评价[J].中国农业资源与区划,2015,36(6):5-10.
ZUO Xu, WANG Hong-yan, WANG Ya-jing, et al. Estimation and suitability evaluation of corn straw resources in China[J]. *China Journal of Agricultural Resources and Regional Planning*, 2015, 36(6):5-10.
- [6] 张立霞,屠焰,李艳玲,等.不同微生物菌株及其组合处理对玉米秸秆瘤胃降解率的影响[J].动物营养学报,2014,26(8):2433-2444.
ZHANG Li-xia, TU Yan, LI Yan-ling, et al. Effects of different microbes and their combinations on rumen degradation rate of corn stalk[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2014, 26(8):2433-2444.
- [7] 刘晶晶,宋成洁,刘晋欢,等.乳酸菌复合系SFC-2发酵液对秸秆饲料的抑菌作用[J].中国农业大学学报,2015,20(4):134-140.
LIU Jing-jing, SONG Cheng-jie, LIU Jin-huan, et al. Antibacterial activity of lactic acid bacteria community SFC-2 on straw feed[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2015, 20(4):134-140.
- [8] 美合热阿依·木台力甫,乌斯满·依米提.乳酸菌与纤维素分解菌混合菌剂对玉米青贮饲料发酵品质的影响[J].饲料工业,2016,37(23):51-54.
MihRayi Mutailip, Usman Imiti. Effects of mixed additive of lactobacillus and cellulose decomposition bacteria on the quality of corn stover silage[J]. *Feed Industry*, 2016, 37(23):51-54.
- [9] 汤斌,陈中碧,张庆庆,等.玉米秸秆发酵燃料乙醇预处理条件的优化[J].食品与发酵工业,2008,34(6):65-67.

- TANG Bin, CHEN Zhong-bi, ZHANG Qing-qing, et al. Optimization of pretreatment condition for corn stover fermentation fuel ethanol[J]. *Food and Fermentation Industry*, 2008, 34(6):65-67.
- [10] 李旭东, 王 霞. 玉米秸秆预处理研究[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(4):111-114.
- LI Xu-dong, WANG Xia. Study on pretreatment of corn straw[J]. *Food and Fermentation Industry*, 2008, 34(4):111-114.
- [11] 赵 燕, 陈庚华, 周 卫, 等. 纤维素酶及其基因研究进展[J]. 生物技术通报, 2013, 1(2):35-40.
- ZHAO Yan, CHEN Geng-hua, ZHOU Wei, et al. Progress of cellulase and cellulase gene research[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2013, 1(2):35-40.
- [12] 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[J]. 草业科学, 2011, 28(7):1379-1383.
- WAN Li-qiang, LI Xiang-lin, HE Feng. The effects of adding lactic acid bacteria and cellulase on alfalfa silage quality[J]. *Pratacultural Science*, 2011, 28(7):1379-1383.
- [13] 赵 珊, 刘 杰, 余 容, 等. 纤维素酶在畜牧业中的应用及研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2014(1):30-33.
- ZHAO Shan, LIU Jie, SHE Rong, et al. Application and research progress of cellulase in animal husbandry[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2014(1):30-33.
- [14] 赵心清, 张明明, 徐桂红, 等. 酿酒酵母乙酸耐性分子机制的功能基因组进展[J]. 生物工程学报, 2014, 30(3):368-380.
- ZHAO Xin-qing, ZHANG Ming-ming, XU Gui-hong, et al. Advances in functional genomics studies underlying acetic acid tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2014, 30(3):368-380.
- [15] 王 楠, 许 丽, 李红宇, 等. 不同水平酿酒酵母处理玉米浆对玉米秸秆发酵品质的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2015, 51(17):44-48.
- WANG Nan, XU Li, LI Hong-yu, et al. Influences of addition level of corn steep liquor treated with *Saccharomyces cerevisiae* on the fermentation quality of corn stover silage[J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2015, 51(17):44-48.
- [16] Xu Z, Zhang S, Zhang R, et al. The changes of dominant lactic acid bacteria and their metabolites during corn stover ensiling[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2018, 125(3):675-685.
- [17] 张 庆, 张万军, 田吉鹏, 等. 乳酸菌青贮技术研究进展[J]. 草业科学, 2014, 31(2):328-333.
- ZHANG Qing, ZHANG Wan-jun, TIAN Ji-peng, et al. Advances in lactic acid bacteria silage technology research[J]. *Pratacultural Science*, 2014, 31(2):328-333.
- [18] Dinic B, Djordjevic N, Radovic J, et al. Trends in legumes ensilaging[J]. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 2011, 27(4):1551-1561.
- [19] 王大宝, 赵东旭. 纤维素酶解研究进展[C]. 北京:第六届国际生物能源研讨会. 2012.
- WANG Da-bao, ZHAO Dong-xu. Progress in cellulose enzymatic research[C]. Beijing: The 6th World Bioenergy Symposium, 2012.
- [20] 左飒飒, 牛东泽, 郑明利, 等. 微生物接种剂及延迟密封对玉米秸秆青贮品质和有氧稳定性的影响[J]. 饲料工业, 2016(15):35-39.
- ZUO Sa-sa, NIU Dong-ze, ZHENG Ming-li, et al. Effect of bio-additives and delay seal on the fermentation quality of corn stover silage[J]. *Feed Industry*, 2016(15):35-39.
- [21] 沈雪亮, 夏黎明. 共固定化细胞协同糖化发酵纤维素原料产乳酸[J]. 化工学报, 2008, 59(1):167-172.
- SHEN Xue-liang, XIA Li-ming. Synergetic saccharification and lactic acid fermentation by coimmobilized cells using cellulosic materials[J]. *CIESC Journal*, 2008, 59(1):167-172.
- [22] 郝冬亮. 碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法测定总氮的影响因素[J]. 中国给水排水, 2014, 30(12):148-150.
- HAO Dong-liang. Influence factors of alkaline potassium persulfate digestion UV spectrophotometry for determination of total nitrogen[J]. *Chinese Water and Wastewater*, 2014, 30(12):148-150.
- [23] 屯妮萨·麦提赛伊迪, 阿里娅古丽·依布热依木, 阿依沙依拉, 等. 碱性次氯酸钠-苯酚分光光度法测定甲醇处理的瘤胃液中氨态氮浓度[J]. 新疆农业科学, 2012, 49(3):565-570.
- Tunisai Matisaidi, Ariaguli Ibrahim, Aisha, et al. Determination of ammonia-nitrogen in ruminal fluid treated with methanol by alkaline hypochlorite-phenol spectrophotometry[J]. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2012, 49(3):565-570.
- [24] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, et al. NREL laboratory analytical procedure: Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass[R]. NREL, 2012.
- [25] 张文博, 贺建龙, 蒋 浩, 等. 木质纤维物质中纤维素和半纤维素含量的测定[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(5):281-284.
- ZHANG Wen-bo, HE Jian-long, JIANG Hao, et al. Determination of cellulose and hemicellulose contents in lignocellulosic materials[J]. *Ji-angsu Agricultural Science*, 2017, 45(5):281-284.
- [26] 王金主, 王元秀, 李 峰, 等. 玉米秸秆中纤维素、半纤维素和木质素的测定[J]. 山东食品发酵, 2010(3):44-47.
- WANG Jin-zhu, WANG Yuan-xiu, LI Feng, et al. Determination of cellulose, hemicellulose and lignin in corn stalk[J]. *Shandong Food Ferment*, 2010(3):44-47.