DOI: 10. 11686/cyxb2025455
http://cyxb. magtech. com. cn
李情兵, 陈晓东, 柯文灿, 等. 有氧固态发酵工艺优化对柠条营养品质及体外消化特性的改善作用. 草业学报, 2026, 35(11): 88－105.
LI Qing-bing, CHEN Xiao-dong, KE Wen-can, *et al*. Optimization of an aerobic solid-state fermentation process for improving the nutritional quality and *in vitro* digestibility of *Caragana korshinskii*. Acta Prataculturae Sinica, 2026, 35(11): 88－105.

有氧固态发酵工艺优化对柠条营养品质及体外消化特性的改善作用

李情兵[1], 陈晓东[1], 柯文灿[2,3], 张桂杰[1*]
(1. 宁夏大学动物科技学院, 宁夏 银川 750021; 2. 宁夏大学林业与草业学院, 宁夏 银川 750021; 3. 内蒙古农牧业科学院, 内蒙古 呼和浩特 010000)

摘要: 旨在研究嗜热毁丝霉(Mt)与枯草芽孢杆菌(Bs)复合发酵对柠条营养品质、体外消化特性及瘤胃微生物群落结构的影响, 并优化其有氧固态发酵工艺。以初花期柠条为原料, 设置以下处理: 1)对照组(CK); 2)Mt与Bs复合菌组(Bs-Mt)。通过单因素试验结合Box-Behnken响应面法, 对温度、含水量、接种比、时间及接种量进行工艺优化, 在最优条件下发酵6 d后, 测定柠条木质纤维素降解率、营养成分、微观结构、体外瘤胃发酵参数及瘤胃微生物群落结构。结果表明: 1)最优发酵工艺参数为温度39. 6 ℃、含水量49. 93%、接种比(Mt∶Bs)1. 00∶1. 27、接种量20%, 此条件下木质纤维素降解率达15. 30%; 2)与CK组相比, Bs-Mt组中性洗涤纤维(NDF)、酸性洗涤纤维(ADF)与酸性洗涤木质素(ADL)含量显著降低($P<0.05$), 粗脂肪(EE)含量显著升高($P<0.05$), 扫描电镜显示发酵后柠条表面结构由致密变为疏松多孔; 3)Bs-Mt组显著提高了体外瘤胃发酵液中氨态氮(NH_3-N)、微生物蛋白(MCP)、总挥发性脂肪酸(TVFA)含量及体外干物质消化率(*IV*DMD)和体外中性洗涤纤维消化率(*IV*NDFD)($P<0.05$), 有机物消化率(OMD)与代谢能(ME)较CK组分别提升77. 3%与101. 4%($P<0.01$); 4)发酵后瘤胃微生物中纤维杆菌门相对丰度显著升高($P<0.05$), 属水平上月形单胞菌属与芽孢杆菌属显著富集($P<0.05$)。综上, 优化后的固态发酵工艺可有效破坏柠条纤维结构, 提升其营养品质与瘤胃发酵效率, 为柠条资源的高值化饲料开发提供理论依据。

关键词: 柠条; 固态发酵; 响应面优化; 木质纤维素降解; 体外瘤胃发酵

Optimization of an aerobic solid-state fermentation process for improving the nutritional quality and *in vitro* digestibility of *Caragana korshinskii*

LI Qing-bing[1], CHEN Xiao-dong[1], KE Wen-can[2,3], ZHANG Gui-jie[1*]
1. *College of Animal Science and Technology*, *Ningxia University*, *Yinchuan* 750021, *China*; 2. *College of Forestry and Grassland*, *Ningxia University*, *Yinchuan* 750021, *China*; 3. *Inner Mongolia Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences*, *Hohhot* 010000, *China*

Abstract: This experiment aimed to investigate the effects of co-fermentation with *Myceliophthora thermophila* (Mt) and *Bacillus subtilis* (Bs) on the nutritional quality, *in vitro* digestibility, and rumen microbial community structure of *Caragana korshinskii*, and to optimize its aerobic solid-state fermentation process. Fermentation experiments were conducted using *C. korshinskii* at the early flowering stage as the raw material, with two treatments: 1) Control (CK); 2) Co-fermentation with Mt and Bs (Bs-Mt). The fermentation process parameters,

收稿日期: 2025-11-10; 改回日期: 2025-12-12
基金项目: 国家自然科学基金区域创新发展联合基金(U24A20446), 宁夏回族自治区中央引导地方科技发展专项(2025FRF05008)和宁夏自然科学基金项目(2023AAC05018)资助。
作者简介: 李情兵(1999－), 男, 江西新余人, 在读硕士。E-mail: m18870900905@163. com
*通信作者 Corresponding author. E-mail: guijiezhang@nxu. edu. cn

including temperature, moisture content, inoculation ratio, time, and inoculation amount, were optimized through single-factor experiments combined with Box-Behnken response surface methodology. After 6 days of fermentation under the optimal conditions, the lignocellulose degradation rate, nutritional components, microstructure, *in vitro* rumen fermentation parameters, and rumen microbial community structure were determined. The results show that: 1) The optimal fermentation parameters were a temperature of 39.6 ℃, a moisture content of 49.93%, an inoculation ratio (Mt: Bs) of 1.00: 1.27, and an inoculation proportion of 20%. Under these conditions, the lignocellulose degradation rate reached 15.30%; 2) Compared with the CK, the Bs-Mt treatment resulted in significantly lower contents of neutral detergent fiber, acid detergent fiber, and acid detergent lignin, and a significantly higher content of ether extract in the fermented product ($P<0.05$). Scanning electron microscopy revealed that the surface structure of the fermented *C. korshinskii* had changed from compact to loose and porous; 3) Compared with the CK, the Bs-Mt treatment resulted in significantly increased production of ammonia nitrogen, microbial crude protein, and total volatile fatty acids, as well as higher *in vitro* dry matter digestibility and *in vitro* neutral detergent fiber digestibility of the *in vitro* rumen fermentation broth ($P<0.05$). The organic matter digestibility and metabolizable energy of the fermented product were 77.3% and 101.4% higher, respectively, in the Bs-Mt treatment than in the CK ($P<0.01$); 4) After fermentation in the Bs-Mt treatment, the relative abundance of the phylum Fibrobacterota in the rumen microbiota was significantly increased ($P<0.05$), and at the genus level, *Selenomonas* and *Bacillus* were significantly enriched ($P<0.05$). In conclusion, this optimized solid-state fermentation process with *M. thermophila* and *B. subtilis* can effectively disrupt the fiber structure of *C. korshinskii* and enhance its nutritional quality and rumen fermentation efficiency. These results provide a theoretical basis for the development of high-value feed from *C. korshinskii*.

Key words: *Caragana korshinskii*; solid-state fermentation; response surface optimization; lignocellulose degradation; *in vitro* rumen fermentation

柠条(*Caragana korshinskii*)是我国北方生态修复的重要灌木资源,其生长特性需要定期平茬复壮,因此会产生大量的灌木生物质资源[1-2]。柠条作为豆科植物具有丰富的营养价值,初花期粗蛋白含量(17.84%)显著高于成熟期(9.30%)[3],且富含类黄酮、多酚等生物活性化合物,是优质的非常规饲料开发对象[4]。然而,其细胞壁中木质素、纤维素与半纤维素形成的致密三维网络结构,导致反刍动物瘤胃微生物难以有效降解,干物质体外消化率较低,严重制约资源利用效率[5]。

传统的木质纤维素生物质(lignocellulosic biomass, LCB)预处理技术,主要依赖物理处理,如机械粉碎、微波处理、超声处理等,能耗较高且通常作为辅助手段,而化学处理具有高效的优势,但可能产生如糠醛、羟甲基糠醛、有机酸、酚类化合物等微生物抑制剂,且存在环境污染风险,进而影响生产效率[6]。微生物预处理则是通过微生物产生多种酶,直接或间接地降解LCB,其处理方式具有条件温和、能耗低且操作简便等优势[7]。微生物固态发酵技术是一种低成本且可持续获得LCB降解酶的方法[8]。嗜热毁丝霉(*Myceliophthora thermophile*, Mt)是一种嗜热丝状真菌,具有快速降解纤维素的能力,对人畜无毒害作用[9],其酶系种类和数量丰富,可作为食品和饲料添加剂单独使用,也可与其他酶结合使用,以改善饲料的营养特性[10-11]。枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*, Bs)具有分泌纤维素酶的能力,在LCB的生物降解工业应用广泛,且常用于食品加工、健康品与化妆品生产、畜牧饲料发酵以及生物燃料生产[12]。尽管两种微生物都具有单独降解LCB的能力,但微生物间协同降解具有酶系互补、环境适应性扩展和代谢协同作用[13]。

研究表明,微生物降解LCB过程中发酵参数会影响微生物的生长速度与产酶效率,进而影响其降解效率[14]。本研究以初花期柠条为对象,LCB降解率为评价指标,在传统发酵条件基础上,采用Box-Behnken响应面法,系统优化菌种比例[Mt:Bs=1.0:(0.5~1.5)]、发酵含水量(30%~70%)、时间(3~7 d)、接种量(8%~24%)及温度(28~44 ℃)等发酵工艺流程,明确最优柠条饲料固态发酵工艺。并利用瘤胃体外发酵技术,探究反刍动物对柠条

发酵饲料消化利用的情况，为柠条生物发酵饲料加工利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料与试验设计

试验用柠条来自宁夏回族自治区盐池县人工柠条林(37°42′ N，107°27′ E)，采于2024年5月初花期，在林间随机选取4个采样点，枝剪采集全株柠条，自然风干后进行揉丝粉碎至1～2 cm，室温密封保存备用。枯草芽孢杆菌(OR591285)为前期课题组自主筛选；嗜热毁丝霉(ATCC 42464)由中国农业科学院北京畜牧兽医研究所赠予。

试验采用完全随机区组设计：将Bs和Mt分别制备成1×10^7 cfu·g^{-1}的菌液备用，Bs和Mt混合添加组成Bs-Mt复合菌群，后续按不同试验要求添加到经过高压蒸汽灭菌的柠条原料中，以不添加处理作为对照组(CK)，处理组为添加Bs-Mt菌液。混合均匀后装入聚乙烯塑料袋(带通气盖)中，每袋100 g，每组3个重复。试验于2024年5月开始。试验地点为宁夏大学动物科技学院实验室。

1.2 单因素试验

试验以柠条LCB降解率为指标，研究接种比(Mt∶Bs为1∶0.5、1∶0.75、1∶1、1∶1.25、1∶1.5)、发酵含水量(30%、40%、50%、60%、70%)、发酵天数(3、4、5、6、7 d)、接种量(8%、12%、16%、20%、24%)和发酵温度(28、32、36、40、44 ℃)对柠条LCB降解率的影响。初始单因素试验1，参数设置为：发酵含水量60%、发酵天数6 d、接种量16%、发酵温度40 ℃，后续单因素试验按照上述单因素依次进行试验并测定柠条LCB的降解率，且后续单因素试验均在前一因素试验的较优结果上进行。每组单因素试验3个重复。

1.3 发酵条件响应曲面法优化

使用Design-Expert 8.0.6软件，以柠条LCB降解率为响应值，对发酵条件进行优化。

1.4 柠条木质纤维素降解率测定

将发酵后的柠条参照文献[15]进行LCB降解率测定。具体步骤如下：柠条经蒸馏水洗净、干燥后，利用万能粉碎机(红景天DE100，中国浙江)粉碎，过0.42 mm筛，用质量恒定为m_0的滤袋称取0.5 g柠条并密封，随后经中性洗涤剂(3% 十二烷基硫酸钠)煮沸处理，除去可溶性物质，置于105 ℃干燥1 h，之后在干燥器(JB-BLGZQ，中国江苏)中静置30 min后称量，质量记为m_1，再105 ℃干燥1 h，干燥冷却器中静置30 min后称量，质量记为m_2(m_1与m_2相差不高于0.02 g即为质量恒定)，恒定后的质量减滤袋的质量m_0，即为降解剩余物质量m_3。柠条中的木质纤维素含量$H_1=(0.5-m_3)/0.5\times100\%$；同上计算出发酵后柠条中的木质纤维素含量$H_2$。发酵柠条木质纤维素降解率$Y$计算公式为：

$$Y=(H_1-H_2)/H_1\times100\%$$

1.5 营养成分测定

按照《饲料中粗灰分的测定》[16]方法测定粗灰分(crude ash，Ash)含量；按照《饲料中粗蛋白的测定 凯氏定氮法》[17]方法测定粗蛋白质(crude protein，CP)含量；按照《饲料中粗脂肪的测定》[18]方法测定粗脂肪(ether extract，EE)含量；参照Van Soest等[19]的方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；按照《饲料中酸性洗涤木质素(ADL)的测定》[20]方法测定酸性洗涤木质素(acid detergent lignin，ADL)含量；蒽酮－浓硫酸法测定可溶性碳水化合物含量[21]。使用气相色谱仪(GC－2030，日本岛津)测定乳酸、乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、异丁酸、异戊酸和总挥发性脂肪酸含量[22]。氨态氮(NH_3-N)采用苯酚－次氯酸钠分光光度计比色法测定[23]。微生物蛋白浓度采用考马斯亮蓝法[24]测定。按照《饲料中淀粉总含量的测定 酶法》[25]方法测定淀粉(Starch)含量。

1.6 扫描电镜观察

在响应曲面法确定的最优条件下发酵柠条，通过场发射扫描电子显微镜[field emission scanning electron microscope，FESEM(SU5000，日本)]扫描观察降解前后柠条样品的表面形貌变化。

1.7　体外消化和产气

1.7.1　人工瘤胃液的制作　　选用18月龄滩羊作为瘤胃液供体，晨饲前经采集管获取新鲜瘤胃内容物。通过4层纱布加压过滤获得瘤胃液后，将其转移至预置39 ℃且持续通入CO_2的保温瓶，并立即置于恒温培养箱中维持厌氧条件。人工缓冲溶液的配置参照Menke等[26]的方法，其中包括（按顺序添加）520.2 mL蒸馏水，0.10 mL微量元素溶液A（$CaCl_2·2H_2O$ 13.2 g；$MnCl_2·4H_2O$ 10.0 g；$CoCl_2·6H_2O$ 1.0 g；$FeCl_3·6H_2O$ 8.0 g，并用蒸馏水配制为100 mL）；208.1 mL缓冲液B（NH_4HCO_3 4.0 g；$NaHCO_3$ 35.0 g，并用蒸馏水配制为1000 mL），208.1 mL常量元素溶液C（$Na_2HPO_4·12H_2O$ 9.45 g；KH_2PO_4 6.2 g；$MgSO_4·7H_2O$ 0.6 g，并用蒸馏水配制为1000 mL）和62.4 mL还原溶液D（1 mol·L^{-1} NaOH 4.0 mL；$Na_2S·9H_2O$ 625 mg加蒸馏水95 mL）。将人工缓冲液于39 ℃水浴预平衡，添加刃天青指示剂后持续通入CO_2脱氧（通气速率以培养液持续产生气泡为基准）。待溶液从蓝紫色渐变为无色时，按2∶1体积比与过滤瘤胃液混合。

1.7.2　体外消化试验　　采用ANKOM DAISY II体外培养系统测定柠条饲料消化率。称取0.50 g不同处理柠条封入滤袋，每个处理设3个生物学重复，并包含3个空白校正组。预热培养箱至39 ℃后，向各容器注入2 L人工瘤胃液，装入滤袋后充入CO_2 30 s形成气层密封。分别在24与48 h培养周期结束后取出滤袋，经蒸馏水冲洗至澄清，65 ℃烘干至恒重，计算体外干物质消化率（*in vitro* dry matter digestibility，*IV*DMD）。体外中性洗涤纤维消化率（*in vitro* neutral detergent fiber digestibility，*IV*NDFD）使用纤维自动分析仪（A2000i，美国纽约安科姆科技）测定。

$$IVNDFD(\%)=[(\text{样品初始NDF含量}-\text{发酵后样品残渣NDF含量})/\text{样品初始NDF含量}]\times 100$$

1.7.3　体外产气量试验　　采用ANKOM RFS产气测量系统进行体外发酵动态监测，具体操作流程如下：准确称取1.00 g样品置于250 mL专用发酵瓶，灌注125 mL人工瘤胃液后，启动气体置换程序（进气口通入CO_2≥15 s，同步开启放气阀维持模块压力归零）。完成厌氧环境构建后，立即转移至39 ℃恒温水浴摇床进行48 h连续培养。试验设计包含3个生物学重复及3个空白对照（校正基质背景产气），利用系统内置压力传感器每2 h自动采集产气数据，通过模块化压力－体积转换算法计算累计产气量。

1.7.4　瘤胃体外产气分析　　待产气发酵结束后，同时分析有机物消化率（organic matter digestibility，OMD）、代谢能（metabolizable energy，ME），产气参数模型采用DPS（data processing system）数据处理系统软件中一元非线性回归模型（Gompertz模型）计算。公式如下：

$$OMD=0.986\times GP+0.0606\times CP+11.03$$

$$ME=0.1639\times GP+0.0079\times CP+0.0239\times EE+0.04$$

$$X_2=C_1\times\exp[-C_2\times\exp(-C_3\times X_1)]$$

式中：GP为24 h的产气量（gas production，mL）；CP为粗蛋白质含量（%）；EE为粗脂肪含量（%）。X_2为产气量（mL）；C_1为理论最大产气量（mL）；C_2为产气速率（mL·h^{-1}）；C_3为产气延滞时间（h）；X_1为体外培养时间（h）。

乙丙比（乙酸/丙酸，acetate acid/propionate acid，A/P）是评估瘤胃发酵模式和生产意义的关键指标。计算公式如下：

$$\text{乙丙比}=\text{乙酸浓度}(\text{mmol}\cdot L^{-1})/\text{丙酸浓度}(\text{mmol}\cdot L^{-1})$$

1.8　微生物测序

将冻存于－80 ℃的发酵液样品送往上海美吉生物医药科技有限公司进行细菌测序。先对样品进行DNA提取，然后利用引物338F（5′-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3′）和806R（5′-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3′）对样品DNA进行PCR扩增。将PCR产物使用2%琼脂糖凝胶回收，利用DNA凝胶回收纯化试剂盒（PCR Clean-Up Kit，上海美吉逾华生物医药科技有限公司）进行回收产物纯化。利用Illumina Nextseq 2000平台进行测序（上海美吉生物医药科技有限公司）及16S IDNA序列测定。利用DADA 2软件对原始数据进行质量过滤、去噪、去重、拼接及去嵌合体。DADA 2降噪处理之后的序列通常被称为扩增子序列变体（amplicon sequence variants，ASVs）。基于Sliva 16S rRNA基因数据库（v 138），使用Qiime 2中的Naive bayes分类器对ASVs进行

物种分类学分析。

1.9 数据处理与统计

采用SPSS 27.0软件对单因素试验、瘤胃发酵参数和营养物质消化率等数据进行单因素方差分析，结果以平均值±标准差表示，$P<0.05$为差异显著。使用Wilcoxon秩和检验进行微生物Alpha多样性的组间差异分析；使用基于Bray-Curtis距离算法的主坐标分析(principal coordinate analysis, PCoA)检验样本间微生物群落结构的差异，并进行相似性检验(analysis of similarities, ANOSIM)。采用Wilxocon秩和检验分析微生物在门、属水平上的分类差异。$P<0.05$为组间差异显著。基于扩增子序列变异(ASV)表，使用R语言(VennDiagram包)绘制Venn图。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果分析

在本研究中，由图1A可知，接种比例对LCB的降解率具有显著影响，随着接种比例从1∶0.5上升至1∶1.25时，LCB降解率提高；但接种比例继续增加时，降解率反而下降，在Mt∶Bs=1∶1.25时，降解率达到最大值，为14.45%。由图1B可知，LCB降解率随着含水量的提高先升高后降低，在含水量为50%时达到最高，为13.19%。由图1C可知，LCB降解率随着发酵时间的延长而提高，在发酵第6天时降解率达到13.91%，第7天降解率达到14.10%。而在第6天后随着时间的增长降解率虽有提高但并不显著，考虑到成本问题，将最终发酵时间定为6 d进行后续试验。由图1D可知，LCB降解率在接种量为16%时为12.79%，在20%时达到最大(13.44%)，之后随着接种量的增加而降低。考虑到20%接种量时降解率已达到峰值，继续增加接种量可能导致营养竞争加剧或氧气供应不足，从而抑制降解率，因此将接种量固定为20%进行后续试验。由图1E可知LCB降解率在发酵温度为40 ℃时达到最大，为12.52%。

2.2 柠条木质纤维素降解率的响应面优化

2.2.1 试验结果与方差分析 根据上述单因素试验结果，确定柠条LCB降解最佳发酵时间为6 d，接种量为

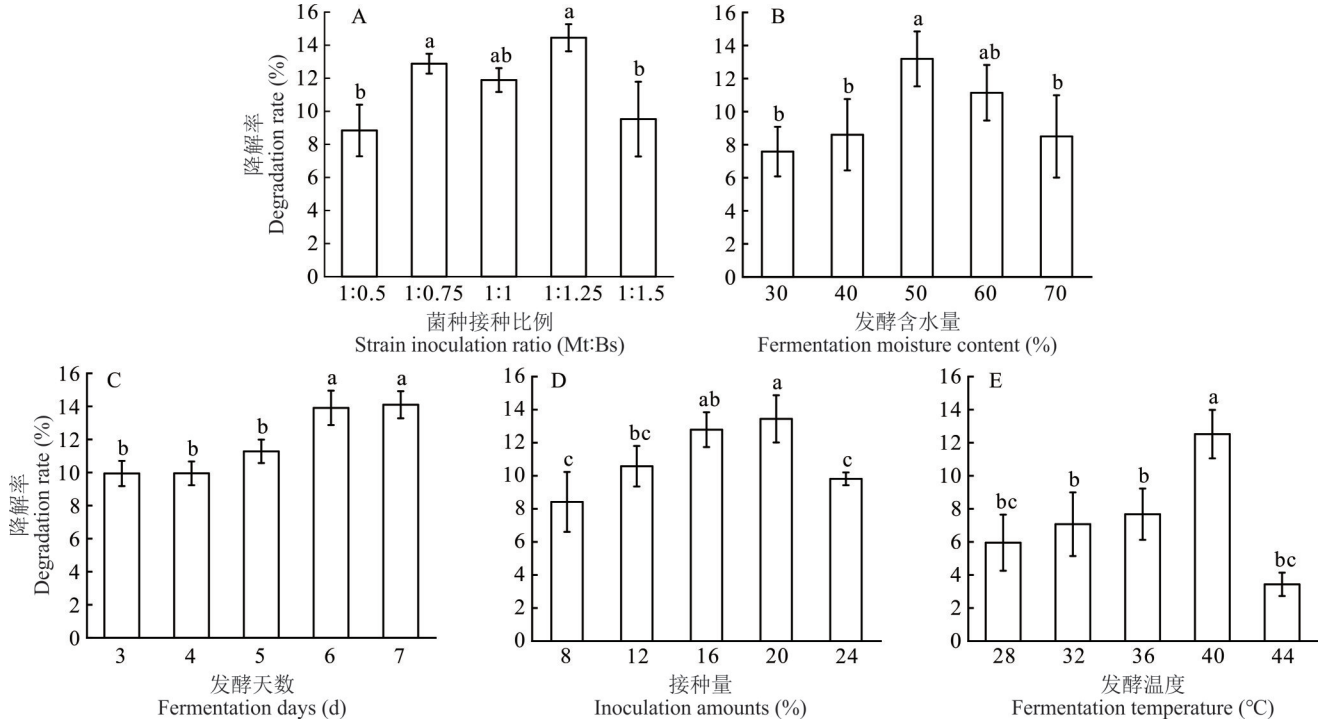

图1 不同因素对柠条木质纤维素降解率的影响

Fig. 1 Effect of different factors on the lignocellulose degradation rate of *C. korshinskii*

不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。Different lowercase letters indicated a significant difference ($P<0.05$).

20%。以LCB降解率为响应值，选择发酵温度（*A*）、含水量（*B*）、接种比（*C*）3个因素作为响应面优化的影响因素，使用Design-Expert 8.0.6软件设计3因素3水平试验，如表1所示。Box-Behnken设计及结果见表2。方差分析结果见表3。

利用Design-Expert 8.0.6软件对表2的试验结果进行二次多元拟合分析，可得到温度（*A*）、含水量

表1　响应面因素与编码

Table 1　Response surface factors and codes

编码值 Code	因素 Factor		
	温度 Temperature（℃，A）	含水量 Moisture content（%，B）	接种比 Inoculation ratio（Mt∶Bs，C）
−1	36	40	1∶1
0	40	50	1∶1.25
1	44	60	1∶1.5

表2　响应面试验设计与结果

Table 2　Response surface experimental design and results

试验序号 Test sequence number	温度 Temperature（℃，A）	含水量 Moisture content（%，B）	接种比 Inoculation ratio（Mt∶Bs，C）	木质纤维素降解率 Degradation rate of lignocellulosic biomass（%）	试验序号 Test sequence number	温度 Temperature（℃，A）	含水量 Moisture content（%，B）	接种比 Inoculation ratio（Mt∶Bs，C）	木质纤维素降解率 Degradation rate of lignocellulosic biomass（%）
1	40	50	1∶1.25	14.57	10	36	50	1∶1	7.56
2	36	40	1∶1.25	8.85	11	36	50	1∶1.5	9.91
3	40	60	1∶1.5	7.99	12	40	50	1∶1.25	13.95
4	36	60	1∶1.25	8.91	13	44	50	1∶1.5	6.97
5	40	50	1∶1.25	13.52	14	40	60	1∶1	8.73
6	44	40	1∶1.25	7.82	15	44	50	1∶1	7.82
7	44	60	1∶1.25	8.47	16	40	40	1∶1	7.17
8	40	50	1∶1.25	13.67	17	40	40	1∶1.5	9.86
9	40	50	1∶1.25	14.69					

表3　响应面试验结果的方差分析

Table 3　Analysis of variance of response surface experimental results

方差来源 Source of variance	平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	*F*值 *F*-value	*P*值 *P*-value	显著性 Significance
模型 Model	126.14	9	14.02	67.79	<0.0001	***
A	2.15	1	2.15	10.41	0.0145	*
B	0.02	1	0.02	0.10	0.7658	
C	1.49	1	1.49	7.21	0.0313	*
AB	0.09	1	0.09	0.43	0.5309	
AC	2.56	1	2.56	12.37	0.0098	**
BC	2.94	1	2.94	14.21	0.0070	**
A^2	37.15	1	37.15	179.67	<0.0001	***
B^2	28.43	1	28.43	137.51	<0.0001	***
C^2	39.08	1	39.08	189.01	<0.0001	***
残差 Residual error	1.45	7	0.21			
失拟项 Lack of fit	0.34	3	0.11	0.41	0.7574	
纯误差 Pure error	1.11	4	0.28			
校正总平方和 Corrected total sum of squares	127.59	16				
决定系数 Coefficient of determination（R^2）	0.9887					
调整决定系数 Adjusted *R*-squared（R^2_{Adj}）	0.9741					
变异系数 Coefficient of variation（CV，%）	4.53					

注：***表示差异极显著（$P<0.001$），**表示差异高度显著（$P<0.01$），*表示差异显著（$P<0.05$）。

Note：***，**，and * represent extremely significant（$P<0.001$），highly significant（$P<0.01$），and significant（$P<0.05$）differences，respectively.

(*B*)、接种比(*C*)与柠条LCB降解率(*Y*)的关系，试验的回归模型方程：$Y=14.08-0.52\times A+0.050\times B+0.43\times C+0.15\times A\times B-0.80\times A\times C-0.86\times B\times C-2.97\times A^2-2.60\times B^2-3.05\times C^2$。对试验所得的数据进行方差分析和显著性检验，结果如表3所示，此模型极显著($P<0.01$)，失拟项不显著($P>0.05$)，二次回归模型计算确定系数(R^2)为0.9887，调整后的确定系数(R^2_{Adj})为0.9741，接近R^2，表明模型拟合程度较好，可真实反映响应值与影响因素的变化情况[27]。因此上述3个因素对试验结果的干扰不明显，残差由随机误差引起，表示该回归模型与实测值能够较好地拟合，因此可用该模型对柠条LCB降解率进行分析和预测。

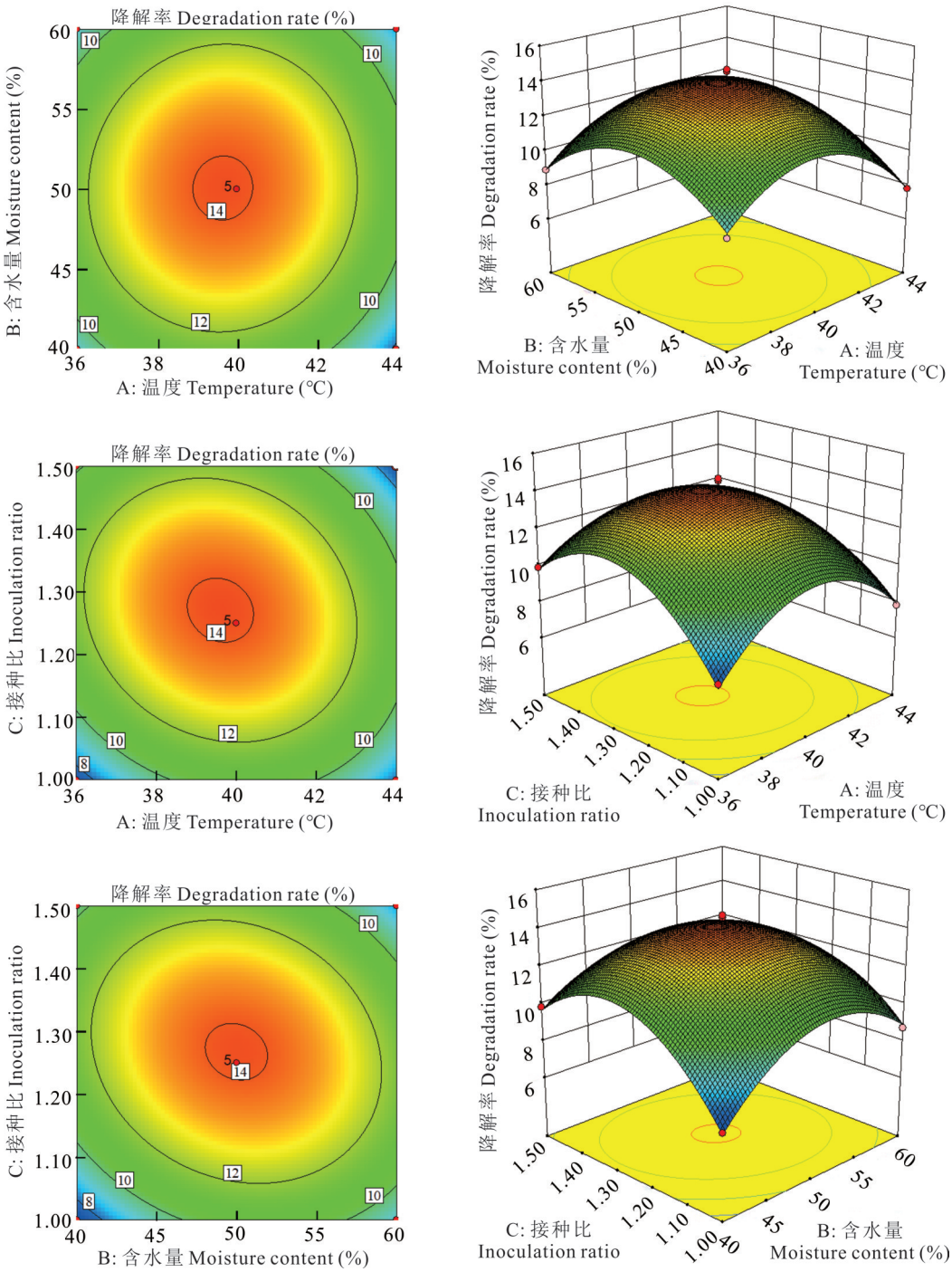

图2 温度、含水量、接种比对柠条木质纤维素降解率影响的响应曲面和等高线图

Fig. 2 Response surface and contour plots of *C. korshinskii* lignocellulosic biomass degradation rate as affected by temperature, moisture content, and inoculation ratio

2.2.2　各因素间的交互作用分析　　根据响应面试验结果的方差分析发现，一次项系数和二次项系数显著影响柠条的LCB降解率（$P<0.05$）。影响因素的强弱顺序分别是温度、接种比、含水量。为显示各因素之间的交互作用，做出各因素之间的响应面曲线图。如图2所示，各因素之间的交互作用对相应值的影响越强，对应响应面曲面越陡峭，反之则越平缓[28]。

2.2.3　最佳降解工艺的确定与验证　　运用Design-Expert 8.0.6软件，设置柠条LCB降解率同时达到极大值时，对回归方程模型求解得到柠条LCB降解的理论最优条件为：温度39.6 ℃、含水量49.93%，接种比Mt∶Bs=1∶1.27；在此条件下的柠条LCB降解率理论值为14.12%。在该条件下做重复试验得到降解率为15.30%，理论值与实际值相差不大，证明该模型可靠，可用于柠条LCB降解的分析与预测。

2.3　柠条降解前后扫描电镜观察结果

在本研究中，柠条降解前、后表面组织结构扫描电镜结果如图3A，B所示。由图3A可得，降解前柠条表面结构呈紧密、平整排列，图3B中降解后结构遭到破坏，裂解且多孔，说明固态发酵对柠条中的结构成分有降解作用。

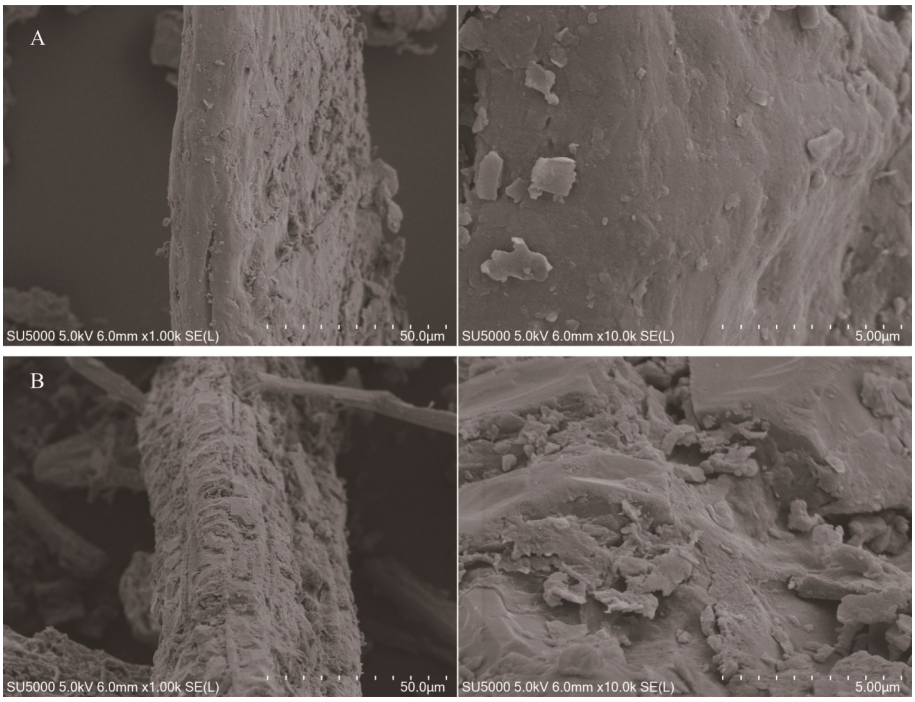

图3　降解前/后柠条的表面组织结构

Fig. 3　Surface tissue structure of *C. korshinskii* before/after degradation

A，B：降解前后的柠条表面组织结构 Surface tissue structure of *C. korshinskii* before/after degradation. ×1.00 k：放大倍数为1000倍 The magnification is 1000 times；×10.0 k：放大倍数为10000倍 The magnification is 10000 times.

2.4　柠条降解前后的营养成分变化

在本研究中，柠条经过微生物固态发酵后显著改变其常规营养组分（表4），其中淀粉、NDF、ADF、ADL含量显著降低（$P<0.05$），EE含量显著升高（$P<0.05$），而CP和可溶性碳水化合物（water soluble carbohydrates，WSC）同样具有增加趋势（$P=0.09$）。

2.5　最佳发酵工艺柠条对体外发酵特性的影响

如表5所示，在本研究中，与CK组相比，Bs-Mt组柠条在瘤胃发酵参数中的NH_3-N、微生物蛋白（microbial protein，MCP）、乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸和总挥发性脂肪酸含量显著提高（$P<0.05$）；*IV*DMD和

*IV*NDFD在发酵柠条组显著高于CK组($P<0.01$);CK与Bs-Mt组柠条在体外发酵参数中的pH值、戊酸含量与乙丙比无显著差异($P>0.05$)。CK与Bs-Mt组的柠条有机物消化率、代谢能和产气模型参数的变化如表6所示,发酵柠条的OMD、ME、C_1均显著高于柠条原样,C_2和C_3显著低于柠条原样。如图4所示,Bs-Mt组柠条产气量明显高于CK组,随着体外产气时间的延长,两组处理的累积产气量逐渐增加,CK组柠条在22 h达到最大产气量,Bs-Mt组柠条在46 h达到最大产气量。

表4 柠条降解前后的营养成分(干物质基础)

Table 4 Nutrient composition of *C. korshinskii* before and after degradation (dry matter basis, %)

项目 Item	CK	Bs-Mt	*P*值 *P*-value
粗灰分 Crude ash	3.91±0.09	3.97±0.15	0.60
粗脂肪 Ether extract (EE)	1.15±0.06	1.48±0.07	<0.05
粗蛋白 Crude protein (CP)	9.94±0.71	10.85±0.12	0.09
淀粉 Starch	1.10±0.06	0.62±0.10	<0.05
可溶性碳水化合物 Water soluble carbohydrates (WSC)	3.12±0.19	3.40±0.09	0.09
中性洗涤纤维 Neutral detergent fiber (NDF)	72.32±2.35	61.25±0.30	<0.01
酸性洗涤纤维 Acid detergent fiber (ADF)	57.08±2.96	50.60±1.66	<0.05
酸性洗涤木质素 Acid detergent lignin (ADL)	10.05±0.14	9.25±0.06	<0.01

表5 发酵柠条对体外瘤胃发酵参数及消化率的影响

Table 5 Effects of fermented *C. korshinskii* on *in vitro* ruminal fermentation parameters and digestibility rate

项目 Item	CK	Bs-Mt	*P*值 *P*-value
pH	6.83±0.04	6.85±0.02	0.21
氨态氮 Ammonia nitrogen (NH_3-N, mg·dL^{-1})	10.90±0.36	14.67±0.06	<0.01
微生物蛋白 Microbial protein (MCP, mg·mL^{-1})	5.82±0.42	9.64±1.67	<0.05
乙酸 Acetic acid (AA, mmol·L^{-1})	18.60±0.73	25.53±0.95	<0.01
丙酸 Propionic acid (PA, mmol·L^{-1})	6.18±0.22	8.40±0.14	<0.01
异丁酸 Isobutyric acid (IBA, mmol·L^{-1})	0.89±0.03	1.07±0.04	<0.05
丁酸 Butyric acid (BA, mmol·L^{-1})	2.94±0.14	5.17±0.12	<0.01
异戊酸 Isovaleric acid (IVA, mmol·L^{-1})	0.71±0.03	0.94±0.05	<0.05
戊酸 Valeric acid (VA, mmol·L^{-1})	0.94±0.05	0.87±0.02	0.62
总挥发性脂肪酸 Total volatile fatty acids (TVFA, mmol·L^{-1})	30.94±0.73	41.97±1.20	<0.01
乙丙比 Acetate acid/propionate acid (A/P)	3.13±0.14	3.04±0.06	0.12
体外干物质消化率 *In vitro* dry matter digestibility (*IV*DMD, %)	28.28±2.40	39.45±1.32	<0.01
体外中性洗涤纤维消化率 *In vitro* neutral detergent fiber digestibility (*IV*NDFD, %)	9.70±1.13	12.21±0.85	<0.01

表6 发酵柠条对有机物消化率、代谢能和产气模型参数的影响

Table 6 Effects of fermented *C. korshinskii* on the digestibility of organic matter, metabolic energy, and gas production model parameters

项目 Item	CK	Bs-Mt	*P*值 *P*-value
有机物消化率 Organic matter digestibility (OMD, %)	45.19±1.36	80.12±6.65	<0.01
代谢能 Metabolizable energy (ME, MJ·kg^{-1})	5.72±0.23	11.52±1.10	<0.01
理论最大产气量 Theoretical maximum gas production (C_1, mL·h^{-1})	32.73±1.47	71.72±6.35	<0.01
产气速率 Gas production rate (C_2, mL·h^{-1})	1.87±0.30	0.93±0.01	<0.01
产气延滞时间 Lag time of gas production (C_3, h)	0.29±0.02	0.14±0.01	<0.01

2.6　最佳发酵工艺柠条对瘤胃体外发酵菌群结构的影响

2.6.1　发酵柠条对瘤胃微生物 Alpha 多样性的影响　　如表 7 所示，两组的覆盖度均大于 99%，结果可以反映瘤胃体外发酵微生物群落的真实情况。Bs-Mt 与 CK 组的物种丰富度（Sobs 指数、Ace 指数、Chao 指数）均无显著差异（$P>0.05$）。群落多样性指数表现出显著变化，Bs-Mt 组的 Shannon 指数显著低于 CK 组（$P<0.01$），Simpson 指数则显著高于 CK 组（$P<0.05$）。

2.6.2　发酵柠条对瘤胃微生物 Beta 多样性的影响　　由图 5 可知，CK 和 Bs-Mt 组柠条总 ASVs 数目分别为 2653 和 2261 个，两组共有的 ASVs 数目为 528 个，分别占各组的 19.90% 和 23.35%。使用 PCoA 以表征瘤胃菌群群落的 β 多样性，基于加权和未加权 UniFrac 处理的主坐标分析（PCoA）结果如图 6 所示。ANOSIM 分析显示 Bs-Mt 与 CK 组发酵液菌群结构差异不显著（$P=0.098$），但两组组间差异大，且大于组内差异（$R=1$）。

2.6.3　物种组成分析　　由图 7 可知，Bs-Mt 对比 CK 组显著改变了体外瘤胃微生物的群落组成。在门水平上（图 7A，C），Bs-Mt 处理组中疣微菌门和弯曲杆菌门的相对丰度显著降低（$P<0.05$），而纤维杆菌门是一种重要的纤维降解菌门，在 Bs-Mt 组中的相对丰度显著升高。在属水平上（图 7B，D），CK 组显著富集了多种纤维降解菌，如理研菌科 RC9 肠道群、木聚糖杆菌属、克里斯滕森菌科 R-7 群以及瘤胃球菌属。而 Bs-Mt 组则显著富集了弯曲杆菌属、未分类 WCHB1-41 目、芽孢杆菌属、月形单胞菌属以及毛螺菌科 ND3007 群等。

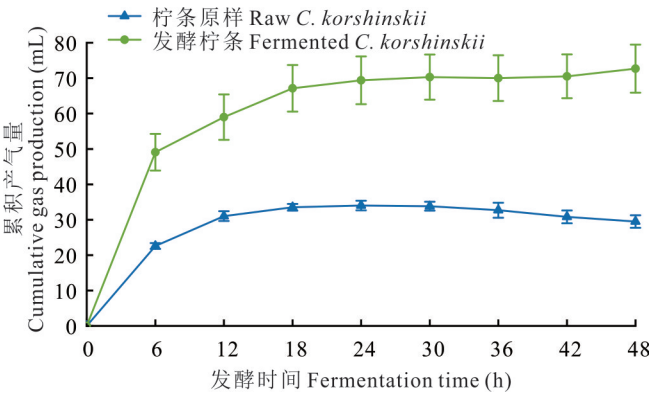

图 4　发酵柠条与柠条原样的体外产气规律

Fig. 4　Gas production kinetics of fermented versus raw *C. korshinskii in vitro* system

表 7　发酵柠条对瘤胃体外发酵菌群 Alpha 多样性的影响

Table 7　Effects of fermented *C. korshinskii* on the Alpha diversity of the rumen microbial community in *in vitro* fermentation

项目 Item	组别 Group		*P* 值 *P*-value
	CK	Bs-Mt	
覆盖度 Coverage	0.99±0.00	0.99±0.00	0.733
Sobs 指数 Sobs index	1157.67±69.33	1058.67±41.10	0.100
Ace 指数 Ace index	1167.20±76.25	1069.33±39.73	0.119
Chao 指数 Chao index	1160.63±71.29	1061.87±39.58	0.104
Shannon 指数 Shannon index	6.40±0.01	6.01±0.05	<0.010
Simpson 指数 Simpson index	0.003	0.007	<0.050

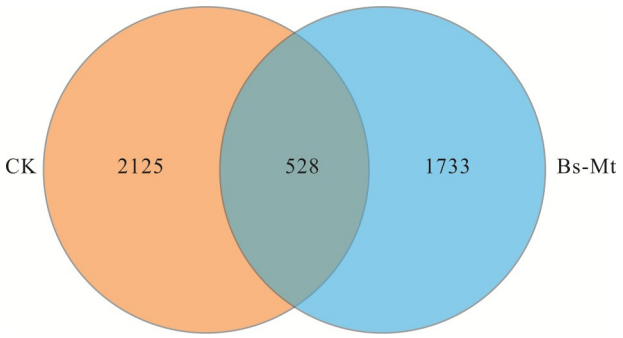

图 5　瘤胃微生物群中扩增子序列变异数量的 Venn 图

Fig. 5　Venn diagram showing the number of amplicon sequence variants (ASVs) in the rumen microbiota

3　讨论

3.1　不同单因素对固态发酵的影响

混合菌种固态发酵中，接种比例通过调控微生物互补酶系的分泌影响其协同效应[29]。邱炜玥等[30]利用葡萄糖发酵菌种 JH16031 和木糖发酵菌种 JH27071，当初始接种比为 1∶50 时，可有效缩短葡萄糖和木糖的总体发酵周期。朱龙博等[31]将产朊假丝酵母菌、酿酒酵母菌和植物乳杆菌菌种以 2∶1∶1 的比例应用于蒸汽爆破芦苇（*Phragmites australis*）秸秆发酵，其发酵产物的 CP 含量及纤维素与半纤维素降解率均显著高于其他试验组。本研究结果与前人研究结果一致，当 Mt 与 Bs 接种比例为 1∶1.25 时，对柠条 LCB 的降解率最高；而当比例增至 1∶1.5 时，降解率反而下降。这可能是由于较低的菌种比会限制微生物生长，导致生物量与酶

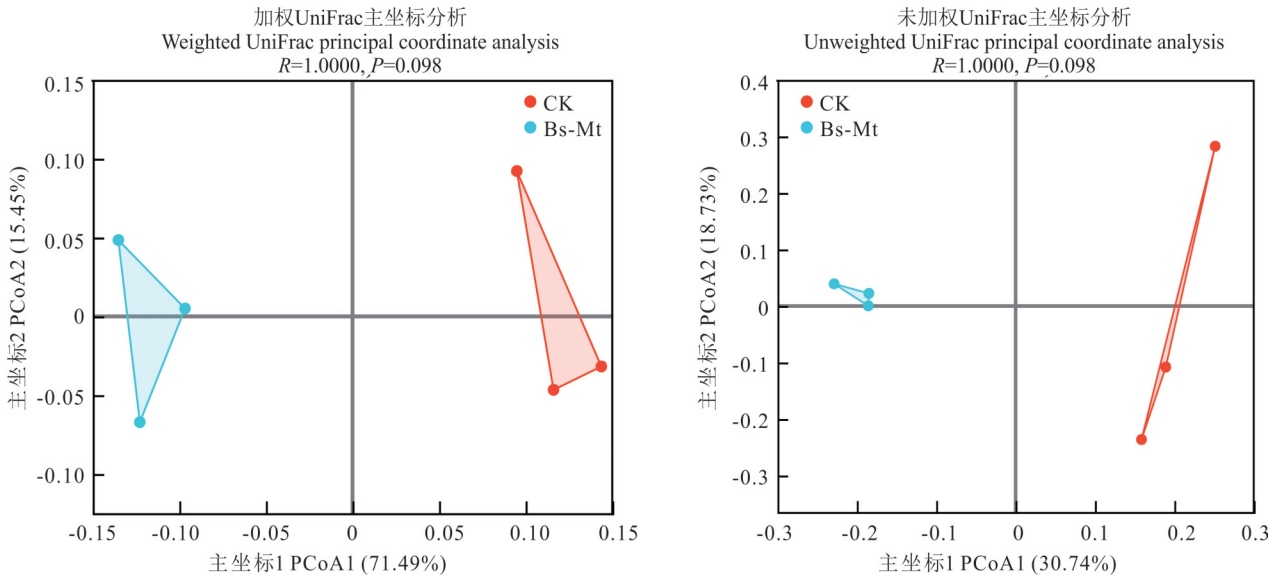

图6 发酵柠条瘤胃体外发酵菌群的主坐标分析

Fig. 6 Principal coordinate analysis (PCoA) of the rumen microbial community from the *in vitro* fermentation of fermented *C. korshinskii*

合成不足,提高菌种比例可促进微生物增殖与酶合成,但过高的比例则会因营养耗尽而抑制酶产量及代谢活性,导致微生物间的协同作用下降[32]。

水分是影响固态发酵的关键因素,对微生物生长、传热和底物水解至关重要,适宜的水分是孢子萌发、菌丝延伸及代谢活动正常进行的基础[33],但含水量过高会导致基质孔隙率降低,影响氧气扩散与微生物生长,从而抑制发酵效果[34]。Ding等[35]在混合菌种固态发酵茶(*Camellia sinensis*)渣时发现,当含水率为40%~55%,LCB降解率随含水率的增加而提高,并于55%时达到峰值,此后逐渐下降。杨阳[36]研究表明,棕榈(*Trachycarpus fortunei*)粕混菌固态发酵在含水量为50%时对LCB降解效果最好。本研究结果与前人研究结果相似,当含水量为50%时,柠条LCB降解率最高(13.19%),进一步验证了固态发酵中适宜含水量的范围。

发酵温度通过影响菌株活性和酶反应速率调控LCB降解过程。在本研究中,40 ℃条件下降解率最高(12.52%)。这可能是由于Mt的最适生长温度为40~45 ℃,且在40~50 ℃下具有较强的纤维素分解能力;Bs虽然生长温度适应性强(13~54 ℃),但其产酶能力在37 ℃左右最强[37-38],Yao等[39]在混合菌固态发酵研究中表明,最适温度是平衡混菌菌株活性的关键,本研究结论与其一致。

3.2 柠条木质纤维素降解工艺响应面优化的影响

响应面法(response surface methodology, RSM)是一种用于多变量建模和优化的数学统计技术,能够系统分析各因素及其交互作用对目标响应值的影响[40]。本研究基于单因素试验结果,选取接种比、含水量和发酵温度3个关键因素,采用Box-Behnken设计进行响应面优化,建立了柠条LCB降解率(Y)与各因素之间的二次回归模型。各因素对降解率的影响顺序为:温度>接种比>含水量,其中温度和接种比的线性效应及二次效应达到显著水平,表明二者对降解过程具有重要调控作用。交互项中AC(温度×接种比)和BC(含水量×接种比)具有显著性($P<0.01$),说明温度与接种比、含水量与接种比之间存在明显的协同或拮抗效应。在周静等[41]的研究中发现混菌发酵过程中,环境条件与微生物间的适配会影响菌株的代谢活性和酶系表达。因此,Mt与Bs在适当比例和适宜环境条件下可实现良好的代谢互补,充分发挥其纤维素酶和半纤维素酶的协同作用,对LCB起降解作用。

而通过模型优化得出最佳工艺参数为:温度39.6 ℃、含水量49.93%、接种比(Mt:Bs)1:1.27,此时理论降解率为14.12%,经过验证试验结果,实际降解率为15.30%,与预测值接近,误差在合理范围内,表明该模型具有良好的实用性和可靠性。

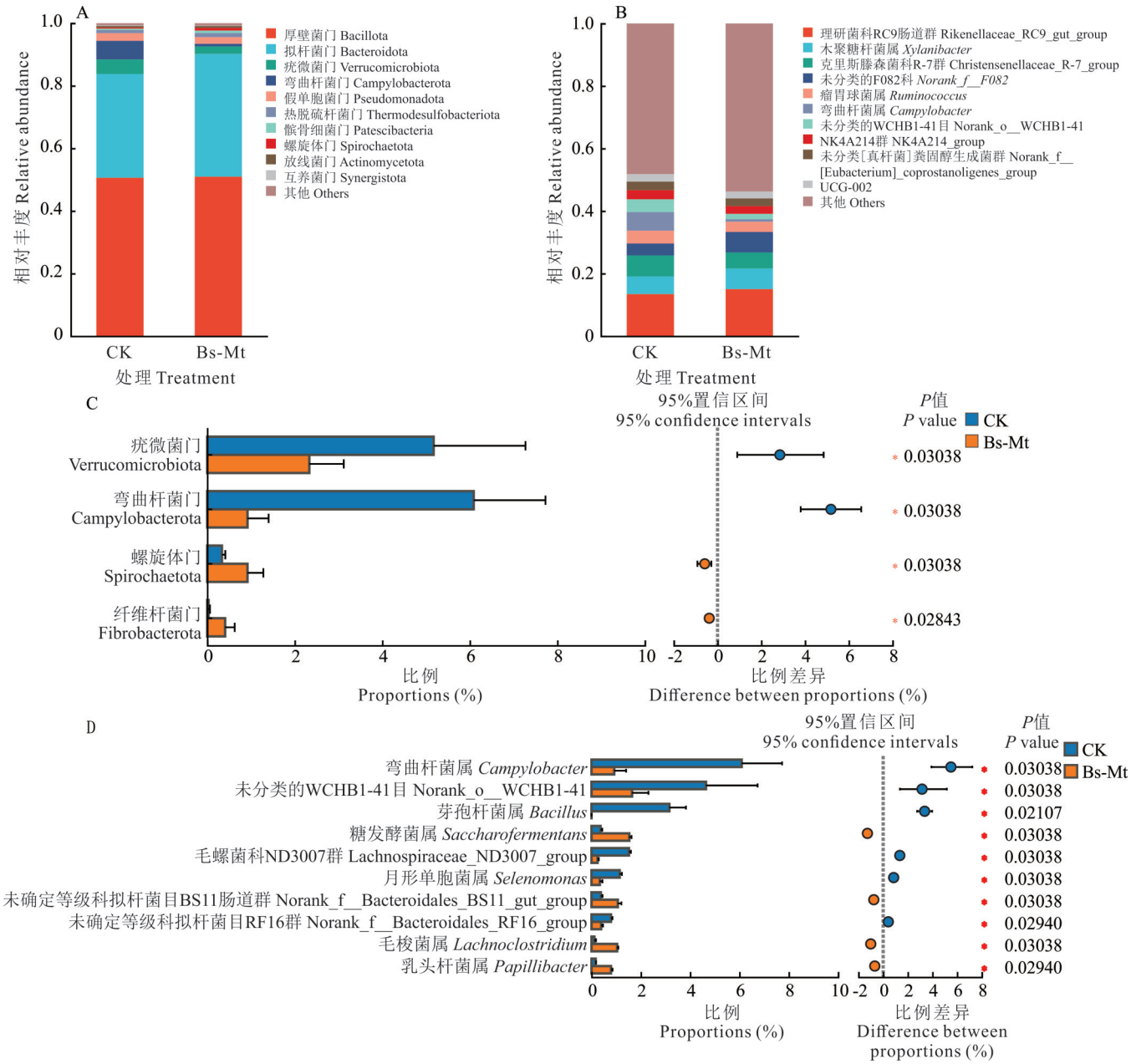

图 7　柠条原样与发酵柠条瘤胃体外发酵菌群在门和属水平上的组成

Fig. 7　Microbial community composition of raw and fermented *C. korshinskii* during *in vitro* rumen fermentation at the phylum and genus levels

A：门水平微生物组成 Microbial composition at phylum level；B：属水平微生物组成 Microbial composition at genus level；C：门水平微生物差异 Microbial difference at phylum level；D：属水平微生物差异 Microbial difference at genus level.

3.3　柠条固态发酵对结构降解和营养品质提升的影响

固态发酵对发酵底物的改良，主要是通过物理结构的破坏，驱动化学成分与营养功能的协同提升[42]。扫描电镜可以直观表征木质纤维素的微观结果变化，发酵后的柠条由表面致密变为疏松多孔，这表明木质素、纤维素和半纤维素相互交联形成的物理屏障被破坏[43]。在物理结构上的改变，表明混合菌群在发酵过程中分泌的纤维素酶、半纤维素酶和木质素酶等酶系协同作用，有效破坏了 LCB 的晶体结构和致密组织[44]。Bs 可分泌阿魏酸酯酶等 LCB 解聚酶，断裂木质素与半纤维素间的酯键，破坏细胞壁的致密结构，使纤维素酶和半纤维素酶能更有效地作用于纤维基质[45]。Mt 则能合成糖苷水解酶、多糖裂合酶、碳水化合物酯酶、辅助氧化还原酶和碳水化合物结合模块等一系列 LCB 降解核心酶[46]。发酵后柠条 NDF、ADF 和 ADL 含量显著降低，进一步证明 Bs-Mt 混菌对柠

条LCB可以有效降解。

利用微生物固态发酵技术改善饲料原料营养品质具有重要意义[47]。本研究中,柠条NDF和ADF含量显著降低,这两者是限制动物采食量和消化率的主要因素[48],其含量的下降直接提升了柠条的饲用价值。EE含量显著提升,CP和WSC呈上升趋势,这可能是因为微生物利用淀粉等易利用碳源及纤维降解产生的还原糖进行自身代谢,合成了菌体蛋白与脂肪,从而提高了CP与EE含量[49];而纤维结构的破坏则释放出被包裹的可溶性物质并生成寡糖,使WSC增加,进而改善发酵底物的能值[50]。该结果与朱龙博等[31]对芦苇秸秆的研究一致,其混菌发酵后CP显著提高、纤维组分显著下降;Xia等[51]在混菌固态发酵茶渣中也观察到CP和还原糖含量显著提高,纤维含量显著降低。综上,采用Bs-Mt组合进行固态发酵,可通过其酶系协同作用有效破坏柠条致密结构,降低纤维组分,并经由微生物生物转化提升柠条的整体饲用价值。

3.4 发酵柠条对体外瘤胃发酵特性的影响

瘤胃pH是反映瘤胃内环境稳定与微生物发酵效率的重要指标[52]。本试验中,Bs-Mt发酵柠条组与CK组瘤胃液pH无显著差异,且均维持在6.83至6.85,属于瘤胃pH正常范围,表明发酵柠条未破坏瘤胃内环境稳定。瘤胃NH_3-N浓度可以反映瘤胃中蛋白质的降解情况,其水平与CP的可消化性呈正相关关系[53]。Bs-Mt组NH_3-N浓度极显著高于CK组,这可能是由于固态发酵过程中微生物合成部分易于降解的真蛋白,另外柠条纤维结构的破坏增强了细胞壁中蛋白质的溶出程度与可及性,从而共同提高了NH_3-N水平[54]。MCP作为反刍动物优质蛋白质的重要来源,其含量的上升标志着饲料营养价值的改善。在本试验中Bs-Mt组MCP含量显著升高,可能与NH_3-N浓度升高为瘤胃微生物提供了更充足的氮源有关。

挥发性脂肪酸(volatile fatty acids, VFA)是碳水化合物经瘤胃微生物降解后的主要产物,是为反刍动物提供能量的主要物质,产量与组成是评估饲料能量价值的核心指标[55]。本试验中,发酵柠条显著提高了总VFA、乙酸、丙酸及丁酸组分的产量。总VFA的显著提升,表明发酵后柠条在瘤胃中可利用能值显著提高。在总VFA及各挥发性脂肪酸组分含量都显著提高时,乙酸与丙酸的比值(A/P)未发生显著变化,这表明,发酵柠条在提升能量总产值时,未改变瘤胃以乙酸型发酵为主导的基本发酵模式[56]。

纤维消化不足会限制反刍动物的采食量与生产性能,因此提高饲料干物质消化率至关重要,其中NDF消化率直接影响瘤胃纤维的水解速率、通过率及降解效率,与采食量密切相关[57]。在本试验中,Bs-Mt组柠条OMD、ME、*IV*DMD和*IV*NDFD均显著高于CK组,与扫描电镜观察到的纤维结构破坏及营养成分中纤维组分下降的结果一致。体外产气量可有效反映发酵底物的可消化性及其营养水平[58],其变化主要受瘤胃微生物活性及底物碳水化合物含量影响[59]。在本研究中,如图4所示,Bs-Mt组柠条总产气量显著高于CK组,CK组柠条在22 h达到最大产气量,Bs-Mt组柠条在46 h达到最大产气量,这与产气模型(表6)参数的结果一致,Bs-Mt组柠条的C_1显著提高,而C_2和C_3显著降低。这可能是由于固态发酵过程消耗了部分易降解组分,并破坏了纤维结构,使发酵主体由快速发酵的易降解成分转变为慢速发酵但总量更多的结构性碳水化合物,从而延缓产气高峰并提高总产气量。综上表明,柠条经固态发酵后具有更高的潜在瘤胃可发酵能量。

3.5 发酵柠条对瘤胃体外发酵菌群结构的影响

瘤胃微生物群落是一个复杂的生态系统,易受饲粮成分变化而变化,通过调整饲粮可有效改变瘤胃发酵模式[60]。本研究在门水平上发现,Bs-Mt组的纤维杆菌门(Fibrobacterota)相对丰度显著上升,而疣微菌门(Verrucomicrobiota)和弯曲杆菌门(Campylobacterota)的相对丰度显著下降。纤维杆菌门作为一类纤维降解菌,可分泌多种纤维素酶和半纤维素酶,在LCB降解中占据主导地位[61];其丰度的增加与前述*IV*NDFD升高的结果相一致,表明柠条经发酵处理,有助于促进纤维降解功能菌的增殖。疣微菌门主要参与复杂碳水化合物的分解,其丰度下降可能与柠条经过发酵后部分结构性组分被预先分解、底物可利用性发生变化有关[62-63]。

在属水平上,Bs-Mt组中月形单胞菌属(*Selenomonas*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*)的相对丰度显著富集。月形单胞菌属于乳酸利用菌,可将其转化为丙酸,有助于降低乳酸积累、提高总VFA与丙酸产量并降低乙丙比[64]。芽孢杆菌属(*Bacillus*)是一类益生菌,可分泌蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶及抗菌肽等多种活性物质[65]。Fuerniss等[66]的研

究发现，芽孢杆菌属可以有效改善牛盲肠微生物群落，提高能量吸收效率，减少甲烷产生。此外，Bs-Mt组中的理研菌科RC9肠道群、木聚糖杆菌属和瘤胃球菌属等部分传统纤维降解菌丰度下降，可能与发酵柠条纤维结构破坏、底物特性改变有关，促使瘤胃微生物群落由复杂纤维菌群向更适应易降解成分的菌群演替。

综上，发酵柠条可以通过优化底物特性，促使瘤胃微生物群落向更具降解效率的方向演替，但对真菌等真核微生物的动态具体影响机制仍需进一步研究。未来研究可采用ITS测序、宏基因组学或宏转录组学等技术以更全面地揭示包括真菌在内的整个瘤胃微生物群落对发酵底物的响应机制，更完整地解析混菌发酵饲料改善瘤胃功能的微生物生态学机制。

4　结论

本研究通过响应面法优化了Mt与Bs对柠条的有氧固态发酵工艺。结果表明，优化的混菌固态发酵工艺可以通过微生物的协同作用，有效破坏柠条LCB的致密结构，降低其纤维组分含量，并提高EE等营养成分。同时，发酵处理显著改善了柠条在瘤胃内的消化特性、VFA产量及氮代谢效率，并促进了以纤维杆菌门和月形单胞菌属等有益微生物菌群的富集。综上所述，本研究探究了一种柠条生物预处理技术，通过LCB结构降解及营养成分转化，有效地提升了柠条的饲用价值与瘤胃利用效率，为柠条资源的高值化饲料开发提供了工艺参考与理论依据。

参考文献 References：

[1] Bai B C, Qiu R, Sun L, *et al*. Effect isolated lactic acid bacteria inoculation on the quality, bacterial composition and metabolic characterization of *C. korshinskii* silage. Chemical and Biological Technologies in Agriculture, 2024, 11(1): 67.

[2] Huang F, Liu J, Wang B, *et al*. The impacts of shrub branch covering on soil respiration in a desert steppe of Ningxia. Acta Ecologica Sinica, 2025, 45(7): 3218－3228.
黄飞, 刘静, 王博, 等. 灌枝覆盖对宁夏荒漠草地土壤呼吸的影响. 生态学报, 2025, 45(7): 3218－3228.

[3] Li Z L, Ma F, Hu M M, *et al*. Study on the nutritional value of peashrub at different growth periods. China Feed, 2021(15): 121－123.
李占丽, 马飞, 胡美美, 等. 柠条不同生长时期营养价值的研究. 中国饲料, 2021(15): 121－123.

[4] Yang F Y, Wu M X, Wang X K. Research progress in woody forage. Feed Industry, 2025, 46(6): 1－7.
杨富裕, 吴铭鑫, 王学凯. 木本饲料研究进展. 饲料工业, 2025, 46(6): 1－7.

[5] Shi J H. Construction of complex fermentation flora and its effect on lignocellulose degradation of *Caragana*. Yinchuan: Ningxia University, 2024.
史金红. 复合发酵菌群对柠条青贮饲料品质及木质纤维素降解的影响. 银川: 宁夏大学, 2024.

[6] Wu Z Y, Peng K, Zhang Y, *et al*. Lignocellulose dissociation with biological pretreatment towards the biochemical platform: A review. Materials Today Bio, 2022, 16: 100445.

[7] Wu Q, Zhang Y X, Zhao L, *et al*. Strategies for efficient degradation of lignocellulose from straw: Synergistic effects of acid-base pretreatment and functional microbial agents in composting. Chemical Engineering Journal, 2025, 508: 161048.

[8] Casciatori F P, Mafra N S C, Rodrigues N A, *et al*. Flow configuration and packing density of sugarcane bagasse and wheat bran affecting enzymes production by solid-state fermentation. BioEnergy Research, 2024, 17(1): 187－197.

[9] Beijing Kelimeishi Biotechnology Co., Ltd. A novel *Myceliophthora thermophila* strain and its application: China, CN102352320A. 2012-02-15.
北京可力美施生物科技有限公司. 一种嗜热毁丝霉新菌株及其应用: 中国, CN102352320A. 2012-02-15.

[10] Liu Q, Li J G, Zhang C Y, *et al*. Research progress of genome editing technologies for industrial filamentous fungi. Synthetic Biology Journal, 2021, 2(2): 256－273.
刘倩, 李金根, 张晨阳, 等. 工业丝状真菌基因组编辑技术研究进展. 合成生物学, 2021, 2(2): 256－273.

[11] Dahiya S, Kumar A, Singh B. Enhanced endoxylanase production by *Myceliophthora thermophila* using rice straw and its synergism with phytase in improving nutrition. Process Biochemistry, 2020, 94: 235－242.

[12] Liu G W, Gong H X, Tang H R, *et al*. Enhanced lignocellulose degradation in *Bacillus subtilis* RLI2019 through CRISPR/Cas9－mediated chromosomal integration of ternary cellulase genes. International Journal of Biological Macromolecules, 2025,

306(Pt 3): 141727.

[13] Wang S C, Long H C, Hu X R, *et al*. The co-inoculation of *Trichoderma viridis* and *Bacillus subtilis* improved the aerobic composting efficiency and degradation of lignocellulose. Bioresource Technology, 2024, 394: 130285.

[14] Chen Y L. Study on the factors and mechanism affecting the stability of structure and function of lignocellulosic degradation complex strains. Yichang: China Three Gorges University, 2022.
陈永伦. 影响木质纤维素降解复合菌系结构和功能稳定性的因素及机理研究. 宜昌: 三峡大学, 2022.

[15] Liu X F, Hou Y, Ma J Q, *et al*. Efficient degradation and optimization of fermentation conditions of actinomycetes from corn cob. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2020, 51(11): 329-337.
刘晓飞, 侯艳, 马京求, 等. 降解玉米芯木质纤维素放线菌的筛选与发酵条件优化. 农业机械学报, 2020, 51(11): 329-337.

[16] State Administration for Market Regulation, Standardization Administration of the People's Republic of China. Animal feeding stuffs-Determination of crude ash: GB/T 6438-2007. Beijing: Standards Press of China, 2007.
国家市场监督管理总局, 中国国家标准化管理委员会. 饲料中粗灰分的测定: GB/T 6438-2007. 北京: 中国标准出版社, 2007.

[17] State Administration for Market Regulation, Standardization Administration of the People's Republic of China. Determination of crude protein in feeds-Kjeldahl method: GB/T 6432-2018. Beijing: Standards Press of China, 2018.
国家市场监督管理总局, 中国国家标准化管理委员会. 饲料中粗蛋白的测定 凯氏定氮法: GB/T 6432-2018. 北京: 中国标准出版社, 2018.

[18] State Administration for Market Regulation, Standardization Administration of the People's Republic of China. Determination of crude fat in feeds: GB/T 6433-2006. Beijing: Standards Press of China, 2006.
国家市场监督管理总局, 中国国家标准化管理委员会. 饲料中粗脂肪的测定: GB/T 6433-2006. 北京: 中国标准出版社, 2006.

[19] 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.

[20] State Administration for Market Regulation, Standardization Administration of the People's Republic of China. Determination of acid detergent lignin in feedstuffs: GB/T 20805-2006. Beijing: Standards Press of China, 2006.
国家市场监督管理总局, 中国国家标准化管理委员会. 饲料中酸性洗涤木质素(ADL)的测定: GB/T 20805-2006. 北京: 中国标准出版社, 2006.

[21] 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.

[22] Liu R F, Wang Y W. Optimization of conditions for determination of organic acids in corn silage by HPLC. Feed Research, 2023, 46(2): 113-116.
刘瑞芳, 王艺伟. 优化高效液相色谱测定玉米青贮饲料中有机酸条件的研究. 饲料研究, 2023, 46(2): 113-116.

[23] Feng Z C, Gao M. Improvement of method for determining ammonia nitrogen concentration in rumen fluid by colorimetry. Animal Husbandry and Feed Science, 2010, 31(Z1): 37.
冯宗慈, 高民. 通过比色测定瘤胃液氨氮含量方法的改进. 畜牧与饲料科学, 2010, 31(Z1): 37.

[24] Makkar H P, Sharma O P, Dawra R K, *et al*. Simple determination of microbial protein in rumen liquor. Journal of Dairy Science, 1982, 65(11): 2170-2173.

[25] National Feed Industry Standardization Technical Committee (SAC/TC 76). Determination of total starch content in feed Enzymatic method: GB/T 42491-2023. Beijing: Standards Press of China, 2023.
全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76). 饲料中淀粉总含量的测定 酶法: GB/T 42491-2023. 北京: 中国标准出版社, 2023.

[26] Menke K H, Raab L, Salewski A, *et al*. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. The Journal of Agricultural Science, 1979, 93(1): 217-222.

[27] Sundarraj A A, Thottiam V R, Sriramulu G. Optimized extraction and characterization of pectin from jackfruit (*Artocarpus integer*) wastes using response surface methodology. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 106: 698-703.

[28] Zhou Y C, Wei X B, Li Z Z, *et al*. Optimization of new ultrasound-assisted extraction process for mulberry leaf protein and investigation of its antioxidant activity. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2025, 37(4): 2716-2727.

周一晨，卫旭彪，李震震，等．桑叶蛋白超声辅助提取新工艺优化及其抗氧化活性研究．动物营养学报，2025，37(4)：2716－2727.

[29] Huang Q Y，Yan H B，Liu Y H，*et al*. Effects of microalgae-bacteria inoculation ratio on biogas slurry treatment and microorganism interactions in the symbiosis system. Journal of Cleaner Production，2022，362：132271.

[30] Qiu W Y，Li M，Chen S Y，*et al*. Constructing *Escherichia coli* synthetic microbial communities for simultaneously utilizing mixed sugars to product L-lactic acid. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology，2024，24(7)：208－218.
邱炜玥，李敏，陈思宇，等．构建大肠杆菌合成生物群落利用混合糖同步发酵生产L-乳酸．中国食品学报，2024，24(7)：208－218.

[31] Zhu L B，Han Q N，Shen N N，*et al*. Study on degradation of cellulose from steam-blasted reed straw by solid-state fermentation with mixed bacteria. Feed Research，2024，47(23)：134－139.
朱龙博，韩倩男，申娜娜，等．混菌固态发酵降解蒸汽爆破芦苇秸秆纤维素的研究．饲料研究，2024，47(23)：134－139.

[32] Kashyap P，Sabu A，Pandey A，*et al*. Extra-cellular L-glutaminase production by *Zygosaccharomyces rouxii* under solid-state fermentation. Process Biochemistry，2002，38(3)：307－312.

[33] Jin G，Zhu Y，Rinzema A，*et al*. Water dynamics during solid-state fermentation by *Aspergillus oryzae* YH6. Bioresource Technology，2019，277：68－76.

[34] Jiao Y H，Gao T Y，Gong J G，*et al*. Study on optimization of solid-state fermentation with mixed bacteria to improve nutritional value of seabuckthorn fruit residue. Feed Research，2024，47(24)：75－79.
焦奕豪，高腾雨，龚建刚，等．混菌固态发酵对改善沙棘果渣营养价值工艺优化的研究．饲料研究，2024，47(24)：75－79.

[35] Ding X Q，Yao L，Hou Y，*et al*. Optimization of culture conditions during the solid-state fermentation of tea residue using mixed strains. Waste and Biomass Valorization，2020，11(12)：6667－6675.

[36] Yang Y. Research on fermentation of mixed probiotics to improve feed quality of palm meal. Huai'an：Huaiyin Institute of Technology，2023.
杨阳．混菌发酵改善棕榈粕品质的研究．淮安：淮阴工学院，2023.

[37] Zhao J. Optimization of cellulose production conditions and transcriptome analysis of *Myceliophthora thermophlia*. Xinyang：Xinyang Normal University，2023.
赵佳．嗜热毁丝霉产纤维素酶条件优化及转录组分析．信阳：信阳师范学院，2023.

[38] Gauvry E，Mathot A，Couvert O，*et al*. Effects of temperature，pH and water activity on the growth and the sporulation abilities of *Bacillus subtilis* BSB1. International Journal of Food Microbiology，2021，337：108915.

[39] Yao K Y，Zhang T Z，Wang H F，*et al*. Upgrading of by-product from beverage industry through solid-state fermentation with *Candida utilis* and *Bacillus subtilis*. Letters in Applied Microbiology，2018，67(6)：557－563.

[40] Han Q N，Li N，Zheng Z，*et al*. Screen and process optimization of compound enzymes for fiber component degradation of steam explosion bamboo powder. Chinese Journal of Animal Nutrition，2025，37(7)：4863－4875.
韩倩男，李宁，郑梓，等．蒸汽爆破竹粉纤维组分降解复合酶筛选及工艺优化．动物营养学报，2025，37(7)：4863－4875.

[41] Zhou J，Huang W M，Qin L J，*et al*. Construction of mixed fermentation system of four PGPR strains and evaluation of its promoting effect. Biotechnology Bulletin，2021，37(4)：116－126.
周静，黄文茂，秦利军，等．四株PGPR菌株混菌发酵体系的构建及促生效应评价．生物技术通报，2021，37(4)：116－126.

[42] Islam S，Miah M A S，Islam M F，*et al*. Exploring the effects of spontaneous and solid-state fermentation on the physicochemical，functional and structural properties of whole wheat flour (*Triticum aestivum* L.). Innovative Food Science & Emerging Technologies，2024，97：103798.

[43] Wang J W，Zhang W Q，Liu Y X. Thermochemical treatment of lignocellulosic biomass *Ceratophyllum demersum* at temperatures below 100 ℃ to prepare the carbon adsorbent. ACS Sustainable Chemistry & Engineering，2025，13(14)：5394－5402.

[44] Chen J M，Cai Y F，Wang Z，*et al*. Construction of a synthetic microbial community based on multiomics linkage technology and analysis of the mechanism of lignocellulose degradation. Bioresource Technology，2023，389：129799.

[45] Lara E C，Basso F C，de Assis F B，*et al*. Changes in the nutritive value and aerobic stability of corn silages inoculated with *Bacillus subtilis* alone or combined with *Lactobacillus plantarum*. Animal Production Science，2016，56(11)：1867－1874.

[46] Zou J H. Enzymatic mechanism of cellulose degradation by *Myceliophthora thermophile*. Beijing：Chinese Academy of Agricultural Sciences，2023.

邹佳欢. 嗜热毁丝霉高效降解纤维素的酶学机制研究. 北京：中国农业科学院，2023.

[47] Wang S M, Wang Z, Wang N, *et al*. Efficient conversion of corn straw to feed protein through solid-state fermentation using a thermophilic microbial consortium. Waste Management, 2025, 194: 298－308.

[48] Cheng Z Z, Aibibula·Yimamu, Li F M, *et al*. Evaluation of feeding effect of pepper straw and its silage with different treatments on lambs. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2024, 36(1): 387－396.
程志泽，艾比布拉·伊马木，李凤鸣，等. 辣椒秸秆及其不同处理的青贮对羔羊饲喂效果评价. 动物营养学报，2024，36(1)：387－396.

[49] Chen J M, Cai Y F, Wang Z, *et al*. Solid-state fermentation of corn straw using synthetic microbiome to produce fermented feed: the feed quality and conversion mechanism. Science of the Total Environment, 2024, 920: 171034.

[50] Huang W Q, Hu X, Zeng J R, *et al*. Changing the nutrient composition and enhancing the hydrolytic enzyme activity of citrus pulp residue by cofermentation with *Candida utilis* and *Bacillus subtilis*. Process Biochemistry, 2021, 107: 83－90.

[51] Xia T, Nie Y, Chen Y, *et al*. Structural and physicochemical properties and changes *in vitro* digestion and fermentation of soluble dietary fiber from tea residues modified by fermentation. Food Chemistry, 2025, 473: 142926.

[52] Zhuang Q Y, Zhao L W, Luo C L, *et al*. Effects of yeast culture on *in vitro* rumen methane emission, fermentation parameters and microbiota of dairy cows. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2025, 37(2): 1059－1070.
庄巧越，赵丽伟，雒诚龙，等. 酵母培养物对奶牛体外瘤胃甲烷排放、发酵参数及微生物区系的影响. 动物营养学报，2025，37(2)：1059－1070.

[53] Niu D Z, Zuo S S, Jiang D, *et al*. Treatment using white rot fungi changed the chemical composition of wheat straw and enhanced digestion by rumen microbiota *in vitro*. Animal Feed Science and Technology, 2018, 237: 46－54.

[54] Zheng M H, Zuo S S, Niu D G, *et al*. Effect of four species of white rot fungi on the chemical composition and *in vitro* rumen degradability of naked oat straw. Waste and Biomass Valorization, 2021, 12(1): 435－443.

[55] Qu J J, Pu X X, Huo J B, *et al*. Effects of steam explosion and steam explosion＋fermentation on nutritional components, *in vitro* rumen fermentation characteristics and methane production of bagasse. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2024, 36(6): 4003－4013.
曲佳静，普宣宣，霍家斌，等. 蒸汽爆破和蒸汽爆破＋发酵处理对甘蔗渣营养成分、体外瘤胃发酵特征和甲烷产量的影响. 动物营养学报，2024，36(6)：4003－4013.

[56] He Y, Wang H B, Yu Z T, *et al*. Effects of the gender differences in cattle rumen fermentation on anaerobic fermentation of wheat straw. Journal of Cleaner Production, 2018, 205: 845－853.

[57] Lorenzana-Moreno A V, Leal L H, Corona L, *et al*. Production of 17 strains of edible mushroom grown on corn stover and its effect on the chemical composition and ruminal *in vitro* digestibility of the residual substrate. PLoS One, 2023, 18(5): e286514.

[58] Esen S. Optimizing ruminant nutrition: insights from a comprehensive analysis of silage composition and *in vitro* gas production dynamics using nonlinear models. BioSystems, 2023, 234: 105062.

[59] Zhang M M, Liang G G, Zhang X L, *et al*. The gas production, ruminal fermentation parameters, and microbiota in response to *Clostridium butyricum* supplementation on *in vitro* varying with media pH levels. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 960623.

[60] Su H P, Shen N, Ding C G, *et al*. Effects of selenium nanoparticles on growth performance, serum indexes, rumen fermentation parameters and microflora structure of Shaanbei white cashmere goats. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2025, 37(9): 6072－6083.
苏红萍，沈娜，丁常根，等. 纳米硒对陕北白绒山羊生长性能、血清指标、瘤胃发酵参数和菌群结构的影响. 动物营养学报，2025，37(9)：6072－6083.

[61] Ransom-Jones E, Jones D L, McCarthy A J, *et al*. The fibrobacteres: an important phylum of cellulose-degrading bacteria. Microbial Ecology, 2012, 63(2): 267－281.

[62] Yang G Y, Zhu Y N, Xie X J, *et al*. Advances in termite-symbiotic microbe system in degradation of lignocelluloses. Acta Microbiologica Sinica, 2020, 60(12): 2621－2634.
羊桂英，朱娅宁，谢晓俊，等. 白蚁－共生微生物系统降解木质纤维素研究进展. 微生物学报，2020，60(12)：2621－2634.

[63] Zhang K M, Li C Y, Liu Y W, *et al*. The association between vegetable and red meat consumption and gut microbiota in subjects with high risk of colorectal cancer. Acta Nutrimenta Sinica, 2023, 45(4): 371－377.
张克明，李春燕，刘奕玮，等. 结直肠癌高危人群蔬菜和红肉摄入频率与肠道菌群关系的研究. 营养学报，2023，45(4)：371－377.

[64] Mao S Y, Long L M, Zhu W Y. Effect of *Selenomonas ruminantium* alone, or in combination with yeast cultures, on *in vitro* rumen bacterial fermentation. Acta Prataculturae Sinica, 2010, 19(4): 176－186.
毛胜勇, 龙黎明, 朱伟云. 体外研究反刍兽新月形单胞菌及与酵母联用对瘤胃微生物发酵的影响. 草业学报, 2010, 19(4): 176－186.

[65] Wang S S, Zhang Z Q, Lyu Q X, *et al*. Research advances in the application of *Bacillus* probiotics in rabbit production. Chinese Journal of Rabbit Farming, 2025, 44(1): 30－34.
王帅帅, 张自强, 吕琼霞, 等. 芽孢杆菌属益生菌在家兔生产中的应用研究进展. 中国养兔杂志, 2025, 44(1): 30－34.

[66] Fuerniss L K, Kreikemeier K K, Reed L D, *et al*. Cecal microbiota of feedlot cattle fed a four-species *Bacillus* supplement. Journal of Animal Science, 2022, 100(10): skac258.