

京内资准1620-L0034



内部资料

# 发酵工业

FERMENTATION INDUSTRY

6

2020

生物发酵产业权威资料 / 行业信息传播平台

总第335期



# 2030全球食品与饮料趋势

# CONTENTS

2020 6  
总第 335 期

## 行业聚焦 INDUSTRYFOCUS

- 04 2030 全球食品与饮料趋势
- 06 2020 年中国快消品 10 大趋势!

## 研究开发 RESEARCH&DEVELOPMENT

- 09 在毕赤酵母中高分泌表达的甲基对硫磷水解酶基因突  
变体的构建

# 目录 | CONTENTS

- 16 解淀粉芽孢杆菌 11568 产柚苷酶发酵条件的优化
- 26 发酵豆腐废水的抑菌效果研究
- 34 微生物制剂对围产期牦牛瘤胃微生物及发酵功能的影响

## 数据 DATA

- 39 2020 年 1-4 月有关产品进出口情况

## 通知公告 NOTICE&ANNOUNCEMENT

- 42 中国生物发酵产业协会关于组织申报第二批中国轻工工业工程技术研究中心认定工作的通知
- 50 关于征集氨基酸及相关产业 2020-2021 年度国家标准、行业标准及团体标准制修订建议的通知
- 51 中国生物发酵产业协会入会申请书



编印单位：中国生物发酵产业协会  
网 址：[www.cbfi.org.cn](http://www.cbfi.org.cn)

主 编：石维忱

编 委（按姓氏笔画排名）：

于昌德 于培星 牛继星  
王兆光 王 勇 王星云  
王新建 王德辉 王 晋  
田玉兰 白 钢 冯志合  
卢 涛 朱新建 刘宗利  
刘顺启 江保安 李学纯  
李世勇 李建军 陈 刚  
陈尧乐 陈桂贞 陈德水  
宗伟刚 俞学锋 贺俊士  
夏令和 袁建国 寇光智  
谢海华 程少博 詹志春

编 辑：关 丹

法律顾问：赵一方

编辑出版：《发酵工业》编辑部

电 话：010-68396573

电子邮箱：[gd1104@163.com](mailto:gd1104@163.com)

地 址：北京市西城区阜外大街  
乙22号502室

邮政编码：100833

设计印制：北京科信印刷有限公司

## 2030 全球食品与饮料趋势

近日，英敏特发布了预计将在未来 10 年内影响全球食品和饮料行业的趋势。英敏特表示，企业在社会责任、个性化饮食和农业方面的新举措，将在未来 10 年内改变食品和饮料行业。



消费者对地球健康予以的重视度与自身健康不相上下，预计将进一步提高植物在饮食中的地位。此外，由于消费者预期寿命变长，许多人将想要了解自己的饮食如何为长期认知健康带来益处。

而品牌运用科技开发新产品、减少生产时间、取信于人。同时，将出现如非洲和印度等地的新种植区域以及农业创新（如漂浮农业），应对全球食物危机。

### 融入变革

“未来十年，消费者将渴望领导力，希望环境问题、道德商业行为、公共卫生和其他重要领域呈现显而易见的变化。消费者将答谢那些采取行动、改善重大社会问题的品牌。未来 10 年，那些推动新的‘清醒’消费时代的企业将成为赢家。明日‘有意识/清醒消费’的消费者将寻找



环保的包装和产品，同时也在寻求提高饮食可持续性的指导。”

## 智能饮食

报告指出，世界人口的增长加剧消耗了地球的资源，消费者将会考虑我们的饮食对环境的影响。



再加上消费者能够通过个人健康测试工具深入了解自身生物知识，将使他们能够个性化自己的饮食和健康方案。“这些工具的分析结果将告诉消费者，他们需要采取哪些步骤来解决自身健康的各个方面，包括大脑和情绪健康。因此，为了在未来十年取得成功，品牌将需要提供更多个性化的产品，开发智能家庭解决方案，并帮助消费者解决情绪和大脑健康问题。”

## 高科技盛宴

英敏特预测，食品、技术和软件将结合智能厨房设备，提供定制食谱和购物清单，而3D打印机可以制作个性化的食品。雀巢、博世和一些软件公司已经申请了3D营养专利。



消费者还需要更多创新的解决方案来推荐他们喜欢的口味、特定的营养或功能成分，帮助他们实时应对（如通过可穿戴技术）。例如，微软已经为提供营养反馈的眼镜授予了专利。

此外，科学将与食物供应链交织，提升产量、对抗气候变化。宣传实验室培育食品的可持续、健康和成本效益，对于向消费者宣传与天然食品相同的替代品至关重要。然而，在讲述这些现代新方案时，食品和饮料行业将不得不提升自然和人类扮演的角色。

在未来，科学家将和农民一样发挥不可或缺的作用，信息的透明度对于培养信任至关重要。颂扬（无论是在实验室还是田野中种植的）食物背后的人们仍将是建立消费者信任的经典方式。

值得注意的是，英敏特表示，据世界肥胖联合会预测，到2030年，全球将有2.5亿儿童肥胖，高于2019年的1.5亿。英敏特的报告指出，像甜菊糖这样的植物性零卡路里甜味剂已经被认为是一种解决方案，但它的味道用途有限。

此外，英敏特提到，到2030年，消费者将寻求更容易回收、再填充、再利用，甚至消费包装的创新。而那些关心地球健康的人可能会减少肉类和奶制品的消费，并在可能的情况下选择道德和环境标准较高的产品。

# 2020 年中国快消品 10 大趋势!

近日，“前瞻 2020 第 20 届中国（上海）快消品高层年会”同期发布了《2020 中国快消品产业年度报告》，报告揭示 2020 年中国快消品将呈现 10 大趋势。

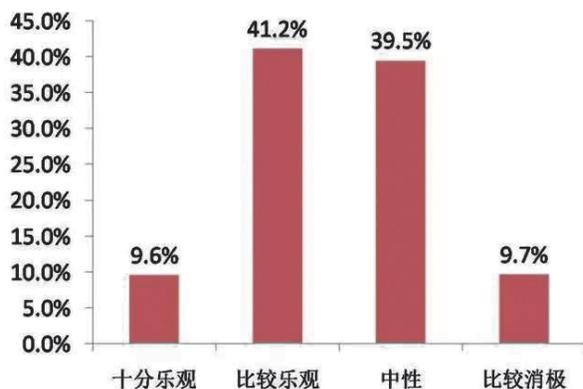
《2020 中国快消品产业年度报告》显示，在近 200 个品类的榜单中，快消品行业作为开放和竞争程度最高的国民经济行业，民营金品在其中发挥着重要的作用，在品类冠军中，民营金品占据 50.8%，外资金品占据 39.3%，国有金品则占据 9.9%。

2019 年快消品年度资本大事显示，零售、饮品和乳业等行业是 2019 年快消品并购的热门行业。

## — 01 — 增长谨慎乐观

### 2020 行业预期

2020 年中国经济的内外部不确定因素加大，在本次《快消品百位高管年度访谈》中，39.5% 的高管对于 2020 年持中性谨慎预期，41.2% 的

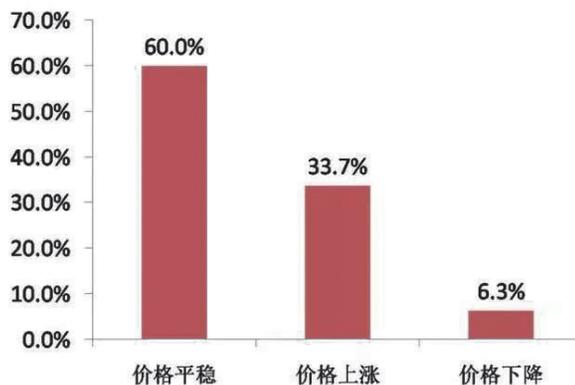


高管对 2020 年所属行业预期持比较乐观态度。

## — 02 — 价格趋于稳定

### 2020 价格预期

2019 年由于猪瘟病毒的持续扩散和中美贸易



摩擦使得消费品价格上升明显，60% 的高管表示 2020 年价格将保持平稳。

## — 03 — 新品主攻健康、时尚和高端

随着中国居民的生活水平和消费能力的日益提高，健康、时尚、高端的快消品成为新品的主流趋势。



## — 04 — 进口快消品的商机

2020 年又将迎来第三届进口博览会，这将进一步推动进口快消品的热销。据统计，进口快消品近年来的增速是普通快消品增速的一倍。



## — 05 — 借势奥运会、冬奥会玩转体育营销

2020 年将是“体育大年”，可口可乐、宝洁

和阿里巴巴等已经成为 2020 年东京奥运会的全球顶级合作伙伴，会通过系列的整合营销提升自身的品牌。而 2022 年的冬奥会在北京举行，青岛啤酒已正式成为赞助商。借助冬奥会的明星效应，蒙牛与 16 岁的年轻滑雪世界冠军谷爱凌正式签约，宣布其成为代言人。金龙鱼品牌成为 2020 东京奥运会、2022 北京冬奥会、2024 巴黎奥运会连续三届奥运会中国体育代表团官方粮油产品赞助商；而光明优倍牵手中国女排、伽蓝集团旗下的自然堂则赞助世界冠军队伍—中国跳水队。



## — 06 — 回归初心做好产品和品牌

在本次《快消品百位高管年度访谈》中，众多高管面对 2020 年复杂严峻的内外部形势，纷纷表示要回归快消品人的初心，就是做好产品和品牌！



## — 07 — 加码线上注重线上与线下相融合

线上渠道已成为驱动快消品增长的重要推动

力，在这次受访的年度访谈中，很多高管表示2020年要把渠道重点放在线上，但是一些品牌更注重线上和线下的融合，到店和到家的结合。



## — 08 — “银发消费”蕴藏无限潜力

2020年，我国的老年消费市场规模将达到3.79万亿；近3年老年适用的商品数量以年均39%的增速增长，“银发消费”蕴藏很大潜力，东锦食品集团、光明乳业、金佰利等企业均纷纷推出适老消费的专属产品。



## — 09 — 中低线城市成为增长引擎

2010年至2018年，三四线城市中，年可支配收入达到14万至30万元人民币的家庭年复合增长率达到38%，高于一二线城市的23%，这些较富裕家庭占到三四线城市人口的34%以上；



而电商平台的崛起更推动了中低线城市富裕年轻人增加消费支出，小镇青年则成为重要的带动者，《快消品百位高管年度访谈》中很多品牌表示2020年把更多的产品向中低线城市拓展。

## — 10 — 数智化和精细化提升价值

在新的消费时代下，快消品企业将通过融合数智技术用最低的成本、最高的效率满足消费者的需求。

阿里巴巴集团近日正式发布了阿里巴巴商业操作系统，通过品牌、商品、销售、营销、渠道管理、服务、资金、物流供应链、制造、组织和IT系统等11个要素的数字化、智能化，来激发商业增长的新动能；而联合利华则利用阿里巴巴数智化平台，成功推出多款新品；而罗森便利2020年的重点工作则体现在产品精致化、管理精细化、营销精准化。



## 在毕赤酵母中高分泌表达的甲基对硫磷水解酶基因突变体的构建

◎王璋 李光雷 龚小晓

北京森根比亚生物工程技术有限公司, 北京, 100012

**【摘要】**通过采用 DNA shuffling 技术对甲基对硫磷水解酶基因 (Methyl organophosphorus hydrolase, MPH) DNA, 用 DNA 酶 I 进行随机切割, 获得较小的 DNA 片段混合物, 并以此进行体外改造, 获得了突变基因以及改组文库和改组子序列信息, 为下一步筛选预期突变体提供了原材料和技术基础。该技术克服了模板来源、丰度、消化、改组等多个技术上的难点, 通过反复试验和改进体系, 不仅在高度同源的基因之间实现了体外改组, 在中度同源的序列片段之间也完成了改组实验, 并且取得了多个成功引入突变的改组子。因此, 这一技术和项目圆满的完成了预期的项目目标, 并为下一步大规模筛选奠定了必备的基础, 同时为新功效的生化洗消用酶研发和拓展提供了有效的技术储备。

**【关键词】**甲基对硫磷水解酶基因, DNA shuffling 技术, 基因突变体, 构建



## 1 研究背景

随着人类对生活要求的提高和工业生产的日益发展，许多人工合成且难以被天然微生物迅速降解的化合物进入自然界中。其中，在国内外大量生产并大面积用做杀虫剂的有机磷农药可以破坏乙酰胆碱酯酶的活性，从而引发一系列神经中毒症状，甚至死亡。因此，随着人们生活质量的提高和环保意识的加强，有机磷农药对于环境的污染和生态平衡的破坏越来越受到人们的关注，如何有效的去除有机磷农药残留、降低其毒性成为世界各国研究人员普遍关注并努力攻克的热点问题。

有机磷降解酶 (Organophosphorus hydrolase, EC3.1.8.1)，它是一种可以水解磷酸酯键的酶，一方面，它可以断裂有机磷农药的磷酸酯键使其脱毒；另一方面，由于不同种类有机磷农药的区别大都是取代基不同，所以一种有机磷降解酶往往可水解多种有机磷农药。其中，甲基对硫磷水解酶 (Methyl parathion hydrolase, MPH)，它的最适底物是甲基对硫磷，酶分子结构解析和进化树分析结果表明它属于  $\beta$  内酰胺酶家族 (PFAM accession no. PF00753)。

甲基对硫磷水解酶大都是在中国发现和分离得到的，测定了水解活性和酶学性质的只有 4 个，其中来源于 *Pseudomonas* sp. WBC-3、*Plesiomonas* sp. M6 和 *Ochrobactrum* sp. M231 的甲基对硫磷水解酶 (MPH) 氨基酸序列相似性很高，约为 98%，它们在酶学性质上表现出的共同特点是催化甲基对硫磷的效率高，碱性条件利于催化，热稳定性较差。只有从 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* 分离出的 OPHC2 具有较好的热稳定性，但是与上述几个 MPH 的氨基酸序列最高相似性仅有 58.5%，催化甲基对硫磷的能力也相对较差。综合分析上述研究结果发现甲基对硫磷水解酶 MPH 具有优良的水解能

力和催化活性。

于是，研究人员对于 MPH 的异源表达进行了多方面的探索，Yang 等通过构建蛋白质二硫键异构酶 DsbA 与 MPH 在大肠杆菌中实现共表达，提高分泌蛋白的可溶性，使 MPH 酶活有了显著地提升。林恒等在 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 中实现了 MPH 重组诱导表达后，采用乳糖为诱导剂，对生产 MPH 发酵条件进行优化，利用 7 L 自控发酵罐进行发酵，经 12 h 培养，得到菌体干重达到 12.65 g (DCW) /L，MPH 表达量为 14.56%，酶活 18.69 U/mL。Yang 等利用双精氨酸运输机制 (Tat 途径) 提高 MPH 的分泌，将大肠杆菌的三甲胺氧化还原酶 (TorA) 双精氨酸信号肽与 MPH 在枯草芽孢杆菌中共表达，结果 MPH 的分泌量为 6.1 mg/L。然而，这些对 MPH 的表达水平还不足以满足工业化生产的需求。

针对酶蛋白表达水平优化方面，研究者应用蛋白质工程等相关技术进行了多种设计方案的探索和研究。常用的策略主要包括理性设计策略，定向进化策略。所谓定向进化技术就是在实验室中人为创造特殊的进化条件，模拟自然界进化机制 (如突变、重组) 使基因发生大量突变，然后定向选择出所需性质的蛋白质的一项技术。这种技术的应用不仅可以在短时间内完成了自然界几百年才能完成的事情，而且还不需要了解蛋白质的空间结构和功能，适合一切蛋白质的改造，大大拓宽了蛋白质工程学的研究和应用范围，特别是能够解决合理设计所不能解决的问题，为酶的结构与功能研究开辟了崭新的途径，并且正在工业、农业和医药等领域逐渐显示其生命力。现在普遍为大家使用的定向进化技术为：易错 PCR (error-prone PCR)，DNA 改组 (DNA shuffling)，寡核苷酸突变 (oligonucleotide-directed mutagenesis)，增加平截杂合酶制造法 (incremental

truncation for the creation of hybridenzymes, ITCHY), 交错延伸 (stagger extension process, StEP) 和随机引物体外重组法 (RPR), 其中前三种是最为广泛应用。

近年来本实验室一直致力于有机磷降解酶方面的研究工作, 从农药污染的土壤中分离得到一些高效降解有机磷农药的细菌, 并且分离得到两个编码甲基对硫磷水解酶的基因: 来源于假产碱假单胞菌 (*Pseudomonas pseudoalcaligenes*) 的 OPHC2 (GenBank 登录号: Accession No.CAE53631) 和来源于苍白杆菌 (*Ochrobactrum* sp.) 的 MPH-Och (GenBank 登录号: Accession No. ACC63894)。其中 MPH-Och 与已报道的来源于 *Pseudomonas* sp.WBC-3 的 MPH 相似性很高, 达到 98.2%, 酶学性质也基本相同。比较 MPH-Och 与 OPHC2 发现, 这两个酶蛋白氨基酸序列相似性为 58.1%。

在之前的研究中我们应用毕赤酵母表达系统实现了 OPHC2 的高效表达, 3L 发酵罐可 OPHC2 的分泌表达量达到 5.5g/L, MPH-Och 在常温下对甲基对硫磷的催化效率明显优于 OPHC2, 它的比活性是 4.3 U/mg, 约是 OPHC2 的 3 倍, 但是, 该基因在毕赤酵母系统中只表达在细胞内, 不能有效地分泌, 对后续的蛋白质分离纯化造成了极大的困难以及成本提升。因此, 本研究应用 DNA shuffling 技术, 对甲基对硫磷水解酶 OPHC2 和 MPH 进行突变重排, 获得在毕赤酵母系统中分泌改良的突变酶, 为该类酶的产业化应用奠定基础。

DNA shuffling 技术介绍: (称 DNA 改组技术, DNA 体外随机拼接或称为有性 PCR), 1994 年由 Stemmer 等首次提出, 该法是对一组基因群体 (进化上相关的 DNA 序列或曾筛选出的性能改进序列) 进行重组创造新基因的方法。因为该法在 DNA 片段组装过程中也可能引入点突变, 所以它对从单一

序列指导进化蛋白质也是有效的。这种方法产生的多样性文库, 可以有效积累有益突变, 排除有害突变和中性突变, 同时也可实现目的蛋白多种特性的共进化。正是由于该技术包括了 DNA 重新组装的过程, 使它与以往的诱变技术有了很大不同。

此法的一般过程为: 将单基因或一组不同来源的基因 DNA 或一组来自同一基因的具有不同突变部位的突变体 DNA, 用 DNA 酶 I 进行随机切割, 获得较小的 DNA 片段混合体。以此混合体在不加引物的情况下直接进行 PCR, DNA 酶 I 切割的 DNA 片段通过相互间的同源性进行随机互补并以此为引物, 经 PCR 扩增, 获得 DNA 分子的复制, 由此获得大量 DNA 不同区域间的随机重新组合的新 DNA 突变体; 完成这一 PCR 随机扩增后, 再加入特定引物进行最后的 PCR 扩增, 便可获得全长基因的 PCR 产物。将 PCR 产物在一定寄主细胞中表达并筛选出希望获得的突变体, 如此进行多次循环, 直到筛选出理想突变体。

## 2 实验材料

### 2.1 菌株及质粒

质粒 pET30a (+) -*ophc2*, pET30a (+) -*mph*、菌株 *E.coli* BL21、*E.coli* Top10 和菌株 *Pichia pastors* GS115 由实验室保存, 质粒 pPIC9 购自 Invitrogen 公司, 载体 pGM-T 购自天根生化科技 (北京) 有限公司。

#### 2.1.2 试剂

质粒提取、胶回收试剂盒购自 Axygen 公司, Taq polymerase 购自天根生化科技 (北京) 有限公司, T4-连接酶、限制性内切酶购自 NEB 公司, 重组酶、Fast Pfu 购自全式金生物技术有限公司, 蛋白胨 (Tryptone) 和酵母提取物 (Yeast extract) 购自

英国 Oxford 公司, YNB 购自北京经科宏达生物技术有限公司, 其他化学试剂均为国产分析纯。

### 2.1.3 试验仪器

恒温摇床(太仓市科技器材厂)、PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)、恒温箱(天津市泰斯特仪器有限公司)、凝胶成像分析系统(上海培清科技有限公司)、连接仪(卡尤迪生物科技有限公司)、恒温金属浴(金银杏生物技术有限公司)、漩涡振荡器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司)、真空冷冻干燥器(德国 Christ 公司)、高压蒸汽灭菌锅(日本 SANYO 公司)、台式高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司)、立式高速冷冻离心机(美国 Sigma 公司)、电热恒温水浴锅(上海一恒仪器有限公司)、电击转化仪(美国 Bio-Rad 公司)、酶标仪(芬兰 Thermo 公司)、蛋白质电泳仪(北京六一仪器厂)、莱驰 MM400 研磨仪(德国 Retsch 公司)。

## 2.2 DNA Shuffling 获得突变基因

以实验室保存的质粒 pET30a (+) -*ophc2* 质粒为模板, 以为 *ophc2*-up-BamHI (ggatccGCCGCA CCGGCACAACAGAAG) 和 *ophc2*-down-XhoI (ctcgagTCAGC GGTCGCTACGGATCGG) 引物扩增获得全长的 *ophc2* 基因; 同时, 以 pET30a (+) -*mph* 质粒为模板, *mph*-up-BamHI (ggatccGCT GCTCCACAAGTTAGAACTTC) 和 *mph*-down-XhoI (ctcgagTTACTTTGGGTTAACGACGG) 为引物, 扩增获得全长的 *mph* 基因。

扩增产物经回收试剂盒回收, 最终回收产物的浓度应达到 30ng/μl。回收的产物用 Dnase I 进行酶切消化, 50 μl 体系: 2 U/mL DNaseI; 约 800ng 回收 DNA (*ophc2* 和 *mph* 各 400ng); 25 °C 酶切 30min, 75 °C 处理 10min 灭活 Dnase I。酶切后的

50-100bp 的小片段 DNA 以低熔点胶法进行回收。回收片段进行无引物 PCR, 50μl PCR 反应体系如下:

项目	添加量
消化双链 <i>mph</i>	5 μL
消化双链 <i>ophc2</i>	5 μL
5× fastpfu buffer	10 μL
dNTPs (2.5mM)	4μL
Fast pfu	1.5μL
dd H <sub>2</sub> O	24.5μL
总体积	50 μL

PCR 程序: 94 °C 5min; 94 °C 30sec; 45 °C 30sec; 72 °C 1.5min; 45 个循环 72 °C 10min。以无引物 PCR 产物为模板, 加入引物 (*ophc2*-up-SnaBI GACC TACGTAGCCGCACCGGCACAACAGAAG 和 *mph*-down-NotI ATAAGAATGCGGCCGCTTACTTTGGG TTAACGA CGG, ) 进行有引物 PCR。

程序如下: 94 °C 5min, 1 个循环, 94 °C 30Sec 50 °C 30sec 72 °C 1min, 30 个循环, 72 °C 10min。将 900bp 左右的 PCR 产物以回收试剂盒回收。

## 2.3 构建大肠杆菌突变体库

将回收的 PCR 产物和 pPIC9 载体分别进行 *SnaBI/NotI* 双酶切, 回收酶切后的片段, 加入 T4 连接酶进行连接, 连接体系如下: 突变基因 6 μL, pPIC9 2 μL, 10×T<sub>4</sub> DNA Ligase Buffer 1 μL, T<sub>4</sub> DNA Ligase 1 μL, 16 °C 连接过夜。连接产物热击转化入大肠杆菌克隆菌株 Top10。转化后平板中长出的单克隆菌株经 37 °C、200 rpm 震荡培养 10-12h, 转化所得菌株经过质粒提取, 酶切鉴定, 确定菌株的阳性率为 62.5%。

## 2.4 酵母突变体库的建立

提取大肠突变体库的混合质粒, 保证质粒的量达到 5-10 μg。利用 Bgl II, 37 °C 酶切 5 h 后将质粒 DNA 线性化, 取 8 μg 线性化后的 DNA 与 100

$\mu\text{L}$  酵母 GS115 感受态细胞混匀，转入预冷的 0.2 cm 电击杯（BioRad）底部，电击仪设置：电压 2.5 kV，电容 25  $\mu\text{F}$ ，电阻 400  $\Omega$ ，电击结束后，立即在电击杯中加入 1 mL 4 $^{\circ}\text{C}$  预冷的 1 mol/L 山梨醇，混合均匀后，取 200  $\mu\text{L}$  涂布 MD 平板，吹干后，倒置在 30 $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中，培养 2-3 天可得到约 500 个转化子。

## 2.5 甲基对硫磷降解酶活性测定筛选有益突变酶

转化子初步筛选：

(1) 挑取 MD 平板上长出的菌落，按编号依次挑到新的 MD 板上；

(2) 按 MD 平板上对应的编号依次挑到 48 孔深孔培养板中（每孔中含 500  $\mu\text{L}$  BMGY），3 层纱布（长超出 5 孔宽超出 1 孔）封口，盖上盖子，用皮筋捆紧，28 $^{\circ}\text{C}$ ，200 rpm 摇床震荡培养 48 h；

(3) 取出纱布，盖上盖子，用封口膜封住。将深孔培养板 4000 rpm 离心 10 min，弃上清，再加入 400  $\mu\text{L}$  BMMY 诱导培养基，更换新纱布，28 $^{\circ}\text{C}$ ，200 rpm 摇床震荡培养 48 h；

(4) 000 rpm 离心 10 min，将上清转移至 96 孔培养板中，进行有机磷农药降解酶活性分析，从中筛选出具有酶活性的阳性重组子。

甲基对硫磷水解酶活性测定方法：取 100  $\mu\text{L}$  酶液加入含有 5  $\mu\text{L}$  10 mg/mL 甲基对硫磷和 900  $\mu\text{L}$  50 mmol/L Tris-Cl (pH8.0) 缓冲液的体系中，37 $^{\circ}\text{C}$  保温 10 min，加入 1 mL 10% 三氯乙酸终止反应，再加入 1 mL 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液显色，410 nm 测定光吸收值，计算水解产物对硝基酚的含量和酶的活性。

一个酶活性单位 (U) 定义为：在 37 $^{\circ}\text{C}$ ，每分钟释放出 1  $\mu\text{mol}$  对硝基酚所需的酶量。

## 2.6 突变酶的序列测定及分析

采用热碱法破碎 7 号毕赤酵母重组菌株，即挑取毕赤酵母菌落于试管中，微波炉加热 10 min，加入 NaOH 溶液 40  $\mu\text{L}$ ，于热水中煮沸 10 min 后，取 12000 rpm/min 离心后的上清作为 PCR 模板，用通用引物 5' AOX 和 3' AOX 进行 PCR。

PCR 程序为：94 $^{\circ}\text{C}$  5 min；94 $^{\circ}\text{C}$  40 s；55 $^{\circ}\text{C}$  40 s；72 $^{\circ}\text{C}$  30 s；29 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$  10 min。

## 3 实验结果

### 3.1 产生甲基对硫磷降解酶有益突变菌株筛选

通过筛选 500 个转化子，从中获得 30 个酶活性较好的阳性转化子进入复筛。

挑取初筛中 30 株酶活性较高的毕赤酵母菌株在摇瓶水平上进行跟踪诱导表达，同时接种野生型 MPH 酵母表达菌株为对照。

首先，在 45 mL BMGY 中培养 48 h，然后，5000 rpm 离心 5 min，弃去上清，置换成 15 mL BMMY 诱导培养基，从诱导后第 24 h 开始取样，每隔 24 h 取样一次，并补加甲醇至终浓度为 0.5%。每次取出 1 mL 的样品，1, 2000 rpm 离心 5 min，上清吸出备用，菌体用 0.9% (m/v) 的生理盐水清洗两次，然后用与吸出时相同体积的 Tris-HCl (50 mmol/L，pH 8.0) 缓冲液重悬。分别测定培养上清中的甲基对硫磷水解酶活性与菌体细胞中的甲基对硫磷水解酶活性。

通过比较发现，7 号突变酶在酵母中表达时其分泌到上清液中的酶活性与在细胞内酶活性比值与 MPH 相比显著提高（图 1），并且随着诱导时间的增加逐渐增加，当发酵到 96 h 的时候，7 号的胞外活性与胞内活性的比值可以到达 2.89。同时，我们

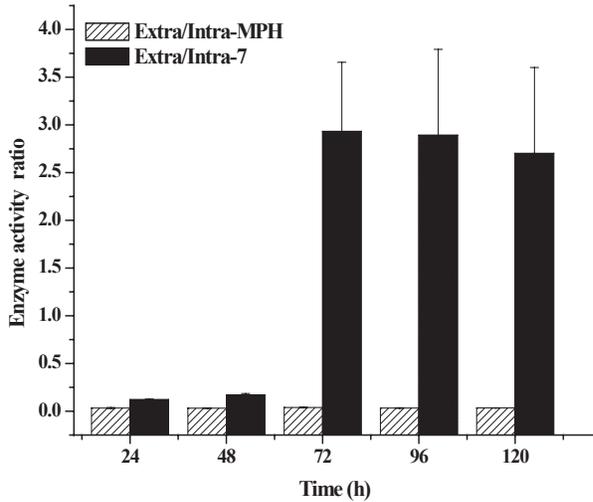


图1 毕赤酵母重组菌株摇瓶诱导培养胞外与胞内酶活比值图

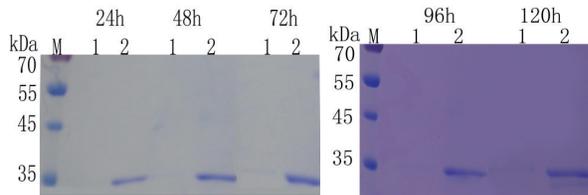


图2 毕赤酵母重组菌株摇瓶诱导培养上清 SDS-PAGE 电泳

M: 蛋白质分子量标准, 1: 野生型 MPH 培养上清, 2: 突变体 7 号培养上清

对培养上清样品进行 SDS-PAGE 电泳分析 (图 2)。发现 7 号菌株有明显的目的条带, 这些结果均说明突变酶与野生型 MPH 相比在酵母上清液中分泌能力显著增加。

### 3.2 突变酶基因碱基序列分析

PCR 产物在作物遗传育种国家重点实验室进行测序, 测序结果分析, 7 号突变体基因的 5' 端含 *ophc2* 基因 5' 端的 207 个核苷酸, 此后为 *mph* 的核酸序列, 即 7 号突变酶的 N 端含 OPHC2 N 端的 69 个氨基酸。7 号突变体基因的核苷酸序列如 SEQ

ID NO.1 所示, 其氨基酸序列如 SEQ ID NO.2 所示。

SEQ ID NO.1:

```

gccgcaccggcacaacagaagaccagggtaccgggctactacc
gtatggcactcgggtgacttcgaagtcaccgctctgtatgacggctacgtc
gacctgctgccagcctgctcaagggcatcgtatgacaaggacctgcaa
tcgctgctggctcgcattctgtggcgtcggagaaaggcgtgcagactg
cggtaacgcctacctggtcaaacactggtccaagtgttttggcagaca
ctggtgctgccggtttgttcggaccaacctgggtgactgctccaact
tgaaggccgctggttaccaccagagcaagttgacgagatttacatcact
cacatgcatcctgaccacgttgagggtttgatggttggtgagcaattggct
ttcccaaacgctgctgtagagctgacaaaaggaggccgatttctggct
ttctcaaacactggacaaggctcctgacgattctaaagtttctcaag
gggtccatggcttcccttaaccatacgttaaggccgtaagtcaagcct
ttctcgggtaaacactgactggttctctgtattaaagctttggcctcccag
gacacaccgctggtcacactacctggttgaatctcaaggctcaaaag
cttgcttgggtgactgatcttggctgctgcttcaattcagcatcc
atccgttactagccaattggactctgactccaagctgctgccgtgagag
aaagaaagcttctgctgatccgctaaggagggttaccttatcgtgctg
cccactgtccttcccaggatttggtcacatcagagctgaaggaaggat
accgttctgctgtaactactcctgctgtaacccaagtaa
    
```

SEQ ID NO.2:

```

Aapaqqktqvpgyymaldfvtyldgyvdlpasllkgid
dkdlqslarmfvasekgvqtavnaylvntgsklvldtgaaglfptl
grlaanlkaagyqpeqvdeiyithmhpdhvgglmvgeqlafpnavv
radqkeadfwlsqtnldkappdskgffkgamaslnpyvkagkfkpfs
gntdlvpgikalashgtaghttyvvesqgqklallgdliilvaavqfdd
psvtsqlsdsksaaverkkafadaakggyliaaahlsfpgighiraeg
kgyrfvpyvnyvvnpk
    
```

### 【参考文献】

[1] Ng, T.K., et al., Altering the substrate specificity of methyl parathion hydrolase with directed evolution. Arch Biochem Biophys, 2015. 573: p. 59-68.

- [2] Wang, J.-F., et al., The Degradation Effects of a PseudomonasHydrolase OPHC2 to Organophosphorus Insecticides. Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements, 2008. 183(2-3): p. 804-810.
- [3] Wymore, T., et al., Hydrolysis of DFP and the Nerve Agent (S)-Sarin by DFPase Proceeds along Two Different Reaction Pathways: Implications for Engineering Bioscavengers. The Journal of Physical Chemistry B, 2014. 118(17): p. 4479-4489.
- [4] Wu, N., Isolation, purification and properties characterization of a new organphosphorus hydrolase OPHC2. Chinese Science Bulletin, 2004. 49(3): p. 268.
- [5] Wu, N., Cloning and expression of ophc2, a new organphosphorus hydrolase gene. Chinese Science Bulletin, 2004. 49(12): p. 1245.
- [6] Su, Y., et al., Improving the thermostability of a methyl parathion hydrolase by adding the ionic bond on protein surface. Appl Biochem Biotechnol, 2011. 165(3-4): p. 989-97.
- [7] Satvik Iyengar, A.R., et al., Improving storage stability of recombinant organophosphorus hydrolase. Protein Expr Purif, 2015. 111: p. 28-35.
- [8] C. STEVEN McDANIEL, LINDA L. HARPER, and J.R. WILD\*, Cloning and Sequencing of a Plasmid-Borne Gene (opd) Encoding a Phosphotriesterase. Journal of bacteriology 1988. 170(5): p. 2306-2311.
- [9] Koudelakova, T., et al., Engineering enzyme stability and resistance to an organic cosolvent by modification of residues in the access tunnel. Angew Chem Int Ed Engl, 2013. 52(7): p. 1959-63.
- [10] Hawwa, R., et al., Structure-Based and Random Mutagenesis Approaches Increase the Organophosphate-Degrading Activity of a Phosphotriesterase Homologue from Deinococcus radiodurans. Journal of Molecular Biology, 2009. 393(1): p. 36-57.

## 解淀粉芽孢杆菌 11568 产柚苷酶发酵条件的优化

◎ 郦金龙<sup>1,2</sup> 朱运平<sup>1,3\*</sup> 滕超<sup>1,3</sup> 李秀婷<sup>1,2</sup>

1. 北京食品营养与人类健康高精尖创新中心 北京工商大学 北京 100048; 2. 北京市食品添加剂工程技术研究中心 北京 100048; 3. 北京市食品风味化学重点实验室 北京 100048

**【摘要】**本研究利用前期筛选获得的一株解淀粉芽孢杆菌 11568 进行液体发酵产柚苷酶,并考察不同碳源、氮源、pH 值、培养温度、摇瓶转速、金属离子种类与浓度等对该菌株产柚苷酶能力的影响。通过单因素考察、响应面分析可知,解淀粉芽孢杆菌 11568 液体发酵产柚苷酶的最优培养基成分为(g/L): 麦芽糖 15.1, 胰蛋白胨 10,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  20, NaCl 10, 酵母提取物 5; 最优发酵条件为: 培养温度 40.9 °C, 摇床转速 180 r/min, pH 7.5, 发酵时间 48 h。在最优条件下,柚苷酶活力达到 201.12 U/mL,是优化前的 2.4 倍。

**【关键词】**解淀粉芽孢杆菌; 柚苷酶; 液体发酵; 发酵条件; 优化

柚苷酶(Naringinase)是一种由 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶( $\alpha$ -L-rhamnosidase, EC 3.2.1.40)与 $\beta$ -D-葡萄糖苷酶( $\beta$ -D-glucosidase, EC3.2.1.21)组成的糖苷水解复合酶系,具有 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶和 $\beta$ -D-葡萄糖苷酶两种酶的活性<sup>[1-2]</sup>,能将柚皮苷(Naringin)水解为柚皮素(Naringenin),在蜜柚脱苦,改善酒的风味和香味,抗菌,抗炎,制备普鲁宁等方面具有广泛的应用前景<sup>[3-11]</sup>。柚苷酶最早于1938年由Hall<sup>[12]</sup>从芹菜籽中分离得到,其后Thomas<sup>[13]</sup>从微生物的粗提物中获得柚苷酶样液,通过酒精沉淀法,从粗提物中获得了较为纯化的酶,它的最适pH值为5~6,60°C处理4h后,活性仅丧失16%。1960年酶活为100U/mL的柚苷酶被研制出,并获得美国专利<sup>[14]</sup>。

柚苷酶的来源广泛,植物、动物和微生物均有之,例如真菌和细菌中的一些微生物都可以产生柚苷酶,而且在产生柚苷酶时一般需要有诱导物的存在,常见的诱导物有柚皮苷、鼠李糖等。目前研究主要集中在真菌产柚苷酶,包括青霉属<sup>[15-17]</sup>和曲霉属<sup>[18-22]</sup>。由于黑曲霉是酶工业中常用的菌株,安全系数较高,培养技术也比较成熟,因此黑曲霉是目前研究柚苷酶应用最广泛的菌株,早在1955年就有了利用黑曲霉发酵生产柚苷酶的报道。例如汪钊等<sup>[23]</sup>运用豆饼为主要原料,采用固态发酵黑曲霉变异菌株ZG86生产柚苷酶获得成功;胡奎等<sup>[24]</sup>在堆积过腐坏柑桔的土壤中分离到了多株产柚苷酶菌株,并初步鉴定为黑曲霉;赖崇德等<sup>[25]</sup>以橘皮粉为唯一的碳和氮源,通过富集培养的方式从腐烂的橘皮上筛选出一株高产柚苷酶生产菌株A166,该菌株进行摇瓶发酵测定酶活力达到955.6U/mL,并初步判定该菌株为黑曲霉。

迄今为止,细菌来源的柚苷酶报道较少,有研究指出细菌来源的柚苷酶比真菌来源的应用范围要广<sup>[26]</sup>,已经引起人们对细菌产柚苷酶研究的重视。发酵生产柚苷酶的主要方式是液体发酵<sup>[27-28]</sup>。这是一项相对成熟的技术,可以精确地控制通气量、pH值、温度等参数,方便地进行条件优化。本研究以一株前期研究筛选到的解淀粉芽孢杆菌11568为研究对象,采用单因素试验以及响应面优化法对主要因素进行交互作用的分析,旨在明确不同培养基及发酵因素对产酶活力的影响,找出淀粉芽孢杆菌11568产柚苷酶的最佳产酶条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

试验菌株：解淀粉芽孢杆菌 11568；其它试剂（如麦芽糖、磷酸氢二铵等）均为分析纯。

DYY-10C 电泳仪，北京六一仪器厂；SE600 垂直电泳槽，美国 GE 公司；VS-1300L-U 超净工作台，苏净安泰空气技术有限公司；1-14 高速离心机，美国 Sigma 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 菌种培养

以 LB 培养基为初始培养基，接种量为 0.02（体积分数），在 35℃、180r/min 的初始培养条件下摇瓶发酵 4d。

#### 1.2.2 酶活测定

发酵液离心后，留菌体，用 0.2 mol/L、pH 5.5 的醋酸缓冲液洗涤菌体 2 次，弃去洗涤液后准确加入 15mL 0.2mol/L、pH 5.5 的醋酸缓冲液，在冰浴的条件下，以 25W，2.0s/2.0s 的条件超声破碎 10 min，之后在 4℃ 条件下以 10000 r/min 的转速离心 10min，离心后上清液即为试验所需的胞内柚苷酶粗酶液。

柚苷酶粗酶液用 pH 5.5 醋酸缓冲液稀释，于试管中加入 1g/L 柚皮苷标准液 2mL，0.2mol/L pH5.5 醋酸缓冲液 1.9mL，40℃ 恒温水浴锅中预热 5min，再取 0.1mL 已稀释的发酵液，40℃ 恒温反应 30min。取 0.1mL 酶解液加入 90% 一缩二乙二醇 5mL，1mol/L NaOH 溶液 0.5mL，蒸馏水 0.4mL，并取 0.1mL 蒸馏水作为空白对照。40℃ 恒温水浴 15min，在 420nm 波长处测吸光度。以在 40℃、pH5.5 条件下，每分钟水解 1 μg 柚皮苷所需的酶量为 1 个酶活力单位（U）。

#### 1.2.3 单因素法优化产酶条件

##### 1.2.3.1 碳源对菌株产酶的影响

按照 1.2.1 节所述菌种的培养方法，选择葡萄糖、乳糖、麦芽糖、蔗糖、柚皮苷、桔皮粉、可溶性淀粉、鼠李糖共 8 种不同碳源，初始添加量为 1.0%（质量分数，下同），研究不同碳源种类对解淀粉芽孢杆菌 11568 产胞内柚苷酶的影响。之后选择最利于菌株产酶的碳源，改变碳源的添加量，研究碳源添加量对解淀粉芽孢杆菌 11568 产胞内柚苷酶的影响。碳源添加量分别选择 0.5%，0.75%，1%，1.25%，1.5%，1.75%，2%，2.25%，2.5%。

##### 1.2.3.2 氮源对菌株产酶的影响

在确定最佳碳源及浓度基础上，以 2.0% 的添加量添加大豆蛋白胨、牛肉蛋白胨、过硫酸铵、磷酸氢二铵、酪蛋白胨、硝酸钾、尿素、硝酸钠、硫酸铵、亚硝酸钠共 10 种不同氮源。在 35℃、180 r/min 下发酵 4d，取样备用。研究氮源种类对解淀粉芽孢杆菌 11568 产胞内柚苷酶的影响。确定最佳氮源后，改变氮源的添加量，研究菌株产柚苷酶的最适氮源添加量。氮源添加量依次为：0.5%，0.75%，1%，1.25%，1.5%，1.75%，2%，2.25%，2.5%。

##### 1.2.3.3 pH 值对菌株产酶的影响

确定碳源和氮源种类及添加量后，用 1 mol/L 的 HCl 或 NaOH 溶液调节培养基初始 pH 值分别为 4.5，5.0，5.5，6.0，6.5，7.0，7.5，8.0，测定不同 pH 值下菌株产柚苷酶活力，研究最适宜菌株 11568 产柚苷酶的 pH 环境。

##### 1.2.3.4 培养温度对菌株产酶的影响

在 20，25，30，35，40，45，50℃ 条件下分别进行摇瓶发酵，180 r/min 转速下发酵 4 d，取样备用。测定菌株 11568 在不同培养温度下产柚苷酶活力，探讨菌株 11568 的最适产酶温度。

##### 1.2.3.5 不同转速对菌株产酶的影响

确定碳源、氮源、pH 值、温度参数后，分别

设置 120, 150, 180, 210, 240 r/min 等 5 个不同的转速, 使菌株 11568 在不同转速条件下进行培养, 液体发酵 4d 后测定菌株 11568 在不同转速下柚苷酶活力, 考察摇床转速对菌株产酶活力的影响。

#### 1.2.3.6 培养时间对菌株产酶的影响

优化上述因素后, 在最优的培养基组成及适宜的培养条件下分别培养 12, 24, 36, 48, 60, 72 h, 考察培养时间对菌株产酶活力的影响, 绘制菌株 11568 的产酶曲线。

#### 1.2.3.7 金属离子对菌株产酶的影响

在培养基中分别添加浓度为 10 mmol/L 的  $Fe^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Na^{+}$ 、 $Mg^{2+}$  共 5 种不同的金属离子, 以未添加金属离子的酶液作空白对照, 考察金属离子对菌株产酶的影响。

#### 1.2.4 响应面试验

响应面试验 (Response surface methodology, RSM) 是一种运用数学和统计学的方法研究不同因素在不同水平对于某一响应值的影响以及各因素之间相互作用的方法。本研究选取麦芽糖添加量、培养温度、初始 pH 值这 3 个因素, 采用响应面法中的 Box-Behnken design (BBD) 法研究解淀粉芽孢杆菌产胞内柚苷酶的最优发酵条件。参考单因素试验的结果, 确定 3 个因素的范围, 运用 Design Expert 8.0 软件设计 3 因素 3 水平共 17 组实验组, 对试验结果进行回归分析以及最优发酵条件的预测。因素水平表如表 1 所示。

表 1 Box-Behnken 试验设计的因素水平表

因素	水平		
	-1	0	1
A (麦芽糖添加量 /%)	1.25	1.5	1.75
B (培养温度 /°C)	35	40	45
C (初始 pH)	7.0	7.5	8.0

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验结果

#### 2.1.1 碳源种类及添加量对菌株产酶的影响

碳源在菌株生产柚苷酶的过程中影响很大, 既是微生物生长过程中不可缺少的营养基础, 又为其提供维持生命活动所需的能源, 同时还能作为微生物产生柚苷酶的诱导底物。本研究选取的 8 种不同的碳源对菌株 11568 产柚苷酶的影响如图 1 所示。

由图 1 可知, 以柚皮苷为碳源时, 最有利于产酶, 柚苷酶活力最高, 达 138U/mL, 说明柚苷酶在有诱导物如柚皮苷的存在下更有利于产酶, 这与文献<sup>[29]</sup>报道的相一致。相较于柚皮苷, 麦芽糖为次优碳源。桔皮粉作为碳源对菌株 11568 产柚苷酶的促进作用不明显, 与未添加任何碳源的空白酶液相比, 酶活基本无变化。同时结果也显示, 以可溶性淀粉、鼠李糖、葡萄糖为碳源时菌株 11568 所产柚苷酶活力低于空白组, 其中柚皮苷的水解产物鼠李糖对柚苷酶的形成抑制作用最为强烈。考虑到柚皮苷价格较昂贵, 本研究选取麦芽糖为菌株 11568 产胞内柚苷酶的最适碳源。

图 2 显示了以麦芽糖为碳源时, 不同麦芽糖含量对于菌株 11568 产胞内柚苷酶能力的影响。结果表明, 菌株在低含量麦芽糖下产酶活力很弱, 柚

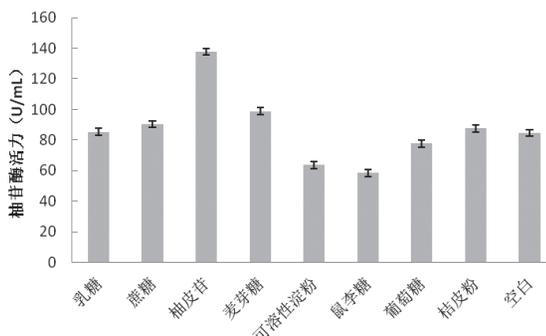


图 1 碳源对菌株 11568 产柚苷酶的影响

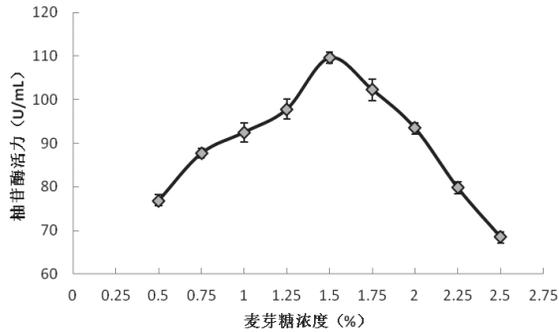


图2 麦芽糖添加量对菌株 11568 产柚苷酶的影响

苷酶活力随着麦芽糖含量的增加呈先增后降趋势。即发酵初期随着麦芽糖含量逐渐增加，菌株产酶活力呈上升趋势，当麦芽糖含量达到 1.5% 时，菌株 11568 的产酶活力最高，达到 109.6 U/mL；当麦芽糖含量继续增加，产酶活力与麦芽糖浓度呈负相关；当麦芽糖含量达到 2.5% 时，柚苷酶活力下降至 68.5 U/mL。该结果表明过高含量的麦芽糖会抑制菌株的产酶活性。其原因可能是，麦芽糖含量过高，菌体生长速度过快，使发酵液 pH 值大幅降低，而在强酸环境下柚苷酶的分泌受到抑制。由此选择 1.5% 的麦芽糖添加量为适宜的初始碳源添加量。

### 2.1.2 氮源种类及添加量对菌株产酶的影响

柚苷酶的合成受酶诱导物及蛋白质前体物质的调控，其中酶诱导物多为可利用的碳源，而蛋白质的前体主要来源于氮源，由此氮源的种类和添加量也是影响酶的合成及分泌的关键因素之一。微生物对不同的氮源利用能力不一样，不同种类的氮源对促进微生物生长和产酶都有着不同的作用，发酵过程中应对氮源的种类和添加量进行严格控制，防止不适当的氮源及添加量对菌体生长和酶的产生造成不利的影响。氮源分为无机氮源和有机氮源，一般来说，有机氮源更有利于微生物产酶。图 3 显示了不同种类的氮源对菌株 11568 合成柚苷酶的影响。

由图 3 可知，相比于无机氮源，有机氮源更有

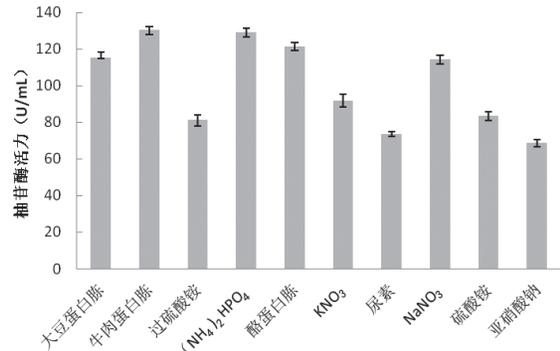


图3 氮源对菌株 11568 产柚苷酶的影响

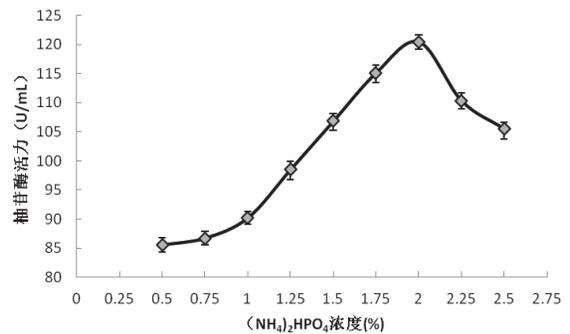


图4 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 添加量对菌株 11568 产柚苷酶的影响

利于菌株 11568 产柚苷酶，其中以牛肉蛋白胨为氮源时柚苷酶活力最高，而 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 促进产酶的效果与牛肉蛋白胨相当，出于经济方面的考虑，选择 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 为氮源进行下一步研究。

图 4 显示了不同的 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 添加量对菌株 11568 产柚苷酶的影响。分析可知，氮源添加量在适宜的范围内促进微生物产酶，超出这一范围，过高或者过低的氮源添加量均不利于酶的获得。具体而言，2% 为最适宜的 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 添加量，此时菌株产柚苷酶活力最高，达到 120.5 U/mL。

### 2.1.3 培养基初始 pH 值对菌株产酶的影响

培养基的初始 pH 值对菌体生长、酶的组成和分泌都有较大的影响。pH 值能够通过改变细胞膜的渗透性和影响细胞膜上电荷的状况影响菌株对营

营养成分的吸收以及其他物质的运输，从而对菌株的生长状态及产酶造成影响。pH 值还能影响细胞中各种酶的活性，强酸或强碱环境均都会影响酶的构象，甚至使酶变性而失活。不同菌株都有其最适 pH 值范围，本研究从酸性到碱性范围共选取 9 种不同的 pH 值，考察 pH 值在菌株产酶过程中的作用，结果如图 5 所示。

从图 5 可以看到，pH 值过高或者过低都不利于菌株产酶。当 pH 值较低时，随着 pH 值的增加，菌株 11568 产酶活力也随之增加；当 pH 值为 7.5 时，菌株产酶活力最高，为 135.8 U/mL；pH 值在 7.0~8.0 时酶活相对稳定，变化不明显；当 pH 值超过 8.0 后，酶活力随 pH 值增加呈现下降趋势。由此菌株 11568 产柚苷酶的最适宜 pH 值为 7.5 左右。李志坚等<sup>[30]</sup>研究发现，黑曲霉 C15 在发酵培养基起始 pH 值为 5.0 时，柚苷酶活力最高，pH 值偏高或偏低都不利于菌体产酶。吴升山等<sup>[20]</sup>初步优化黑曲霉 DB056 产柚苷酶的发酵条件，发现当培养基初始 pH 值为 8.0 时，黑曲霉 DB056 培养液中柚苷酶和  $\alpha$ -鼠李糖苷酶活力均达到最高。而 Bram 等<sup>[31]</sup>发现 pH 值在 4.5~7.5 范围内对黑曲霉产酶影响不明显，当 pH 值低于 4 时柚苷酶活力会明显降低。由此可见，不同微生物即使发酵产生相同的酶类，其对发酵液 pH 值的要求也不尽相同。这也正是考察不同 pH 值对不同微生物产

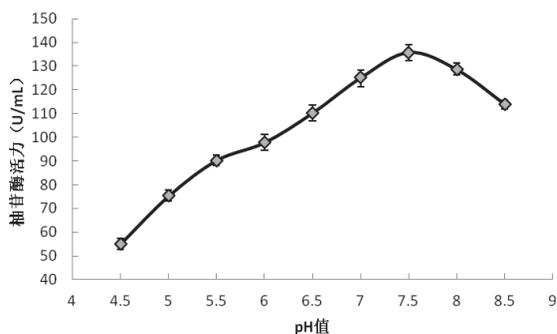


图 5 培养基初始 pH 值对菌株 11568 产柚苷酶的影响

酶能力影响的最主要原因之一。

#### 2.1.4 培养温度对菌株产酶的影响

不同微生物适宜的温度环境一般不同，菌体在最适温度条件下能够快速生长，生长代谢速率加快，生产周期缩短，同时目标产物积累增多，而温度过高容易使酶失活，主要表现为菌体易衰老，产酶量下降。本研究选取 7 个不同试验温度，分别为 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 °C，得到菌株 11568 的产酶活性如图 6 所示。

由图 6 可知，当培养温度较低的时候，菌株产酶活力也较低，这是因为温度过低时，细胞代谢缓慢，菌体生长滞后，菌体总量较低，直接影响发酵产物柚苷酶的产量。随着温度的升高，菌株产酶活力逐渐增大，在温度范围 30~40 °C 时，随着温度的升高，产酶活性上升迅速。当培养温度为 40 °C 时，菌株产酶活力达到最高，为 148.5 U/mL。当培养温度继续升高，菌株产酶活力逐步降低。由此适合菌株 11568 产柚苷酶的最佳培养温度为 40 °C，温度偏高或偏低都不利于产酶。

#### 2.1.5 摇床转速对菌株产酶的影响

菌体生长需要氧气，在发酵的过程中溶氧速率应大于菌体的耗氧速率，在此条件下菌体才能正常生长，合成酶蛋白，否则菌体会生长缓慢影响产酶，由此可知转速是影响产酶活力的一个重要因素。提

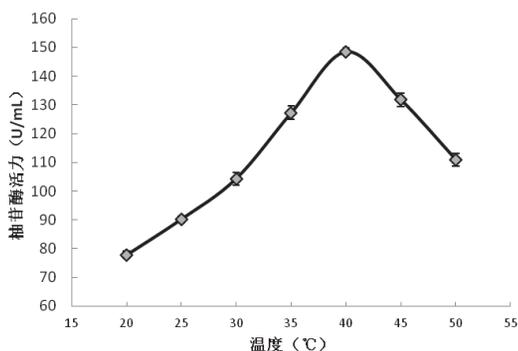


图 6 培养温度对菌株 11568 产柚苷酶的影响

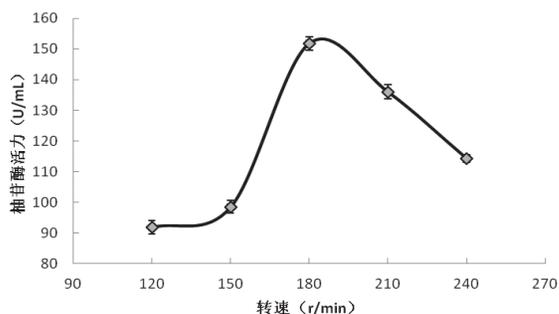


图7 转速对菌株 11568 产柚苷酶的影响

高搅拌转速，能够加速氧溶解，改善通气，减少菌丝抱团现象的发生，有利于菌株对营养物质的吸收以及酶的分泌；而转速过快，会对菌体造成伤害，影响酶的生产。本研究考察不同摇瓶转速对产柚苷酶的影响，结果如图 7 所示。

由图 7 可知，当转速控制在 180 r/min 时，菌株产柚苷酶活力最高。转速过慢时，振荡程度小，微生物不能得到足够的氧气，可能会引起部分菌株进行无氧呼吸，从而降低柚苷酶的产量；而转速过快虽然一定程度上有利于微生物的生长，但是一方面会增加能源的消耗，另一方面菌体受到的剪切力作用过大也会使菌体生长受到影响，从而导致产酶活力下降。

#### 2.1.6 培养时间对菌株产酶的影响

菌株生长初期，菌体数量较少，此时的酶活力处于较低水平，随着菌体的生长，产酶活力迅速增加。其后随着培养时间继续延长，营养物质不断减少，有害的代谢产物不断增加，产酶活力出现下降。本研究共观察菌株 11568 生长 4d 内的酶活变化，每 12 h 监测 1 次，得到菌株 11568 的产酶曲线如图 8 所示。

由图 8 可知，培养时间少于 36h 时，酶活力随时间延长逐步升高，36 ~ 48 h 范围时，柚苷酶活力迅速上升，到 48h 时菌株 11568 产柚苷酶活力最高，达到 163.2 U/mL。随着培养时间继续延长，酶

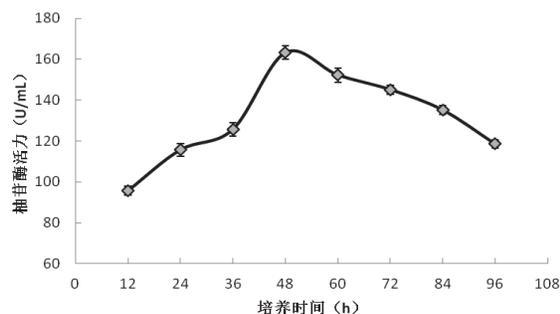


图8 菌株 11568 产柚苷酶的产酶曲线

活力不升反降，可能的原因是培养基中营养物质不断减少，菌体不断产生有害的代谢产物，不适宜菌体生长，导致产酶活力出现下降。由此，选择 48 h 为适宜的培养时间。目前研究最多的黑曲霉一般要培养 4 ~ 5 d，才能达到最高的产酶活力，采用 11568 来发酵生产柚苷酶，可较大幅度缩短发酵时间，节约发酵成本。

#### 2.1.7 金属离子对菌株产酶的影响

很多金属离子都能与酶活性中心结合影响其结构，从而对酶活性造成影响。有的金属离子能促进酶活力，称为激活剂，而抑制剂就是与酶结合后降低酶活力的金属离子。本研究在发酵培养基中添加 5 种不同的金属离子，探讨金属离子对菌株 11568 产柚苷酶的影响，结果如图 9 所示。

由图 9 可知，当添加量为 10 mmol/L 时， $Mg^{2+}$ 、

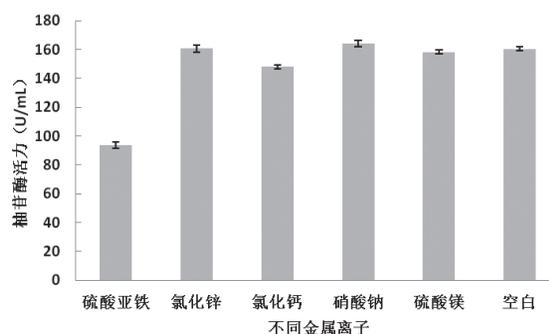


图9 金属离子对菌株 11568 产柚苷酶的影响

Zn<sup>2+</sup>、Na<sup>+</sup>对柚苷酶促进效果不明显,酶活力略有提升,Fe<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>抑制柚苷酶活力,尤其是Fe<sup>2+</sup>,浓度为10 mmol/L时,酶活力仅有93.5 U/mL,是未添加金属离子酶活力的58.4%,具有明显的抑制作用。

## 2.2 响应面试验

按照试验设计的因素水平表对解淀粉芽孢杆菌11568产胞内柚苷酶的最优发酵条件进行预测,结果如表2所示。

表2 解淀粉芽孢杆菌11568产胞内柚苷酶的BBD试验设计和结果

标准顺序	试验顺序	A	B	C	酶活力 / U · mL <sup>-1</sup>
9	1	1.50	35	7	168.1
6	2	1.75	40	7	178.7
14	3	1.50	40	7.5	197.5
17	4	1.50	40	7.5	197.4
15	5	1.50	40	7.5	198.7
1	6	1.25	35	7.5	165.3
4	7	1.75	45	7.5	169.1
7	8	1.25	40	8	177.5
16	9	1.50	40	7.5	196.8
12	10	1.50	45	8	188.6
2	11	1.75	35	7.5	167.9
3	12	1.25	45	7.5	167.0
13	13	1.50	40	7.5	196.2
10	14	1.50	45	7	187.2
8	15	1.75	40	8	176.4
5	16	1.25	40	7	175.6
11	17	1.50	35	8	167.4

表3 回归方程的变量分析表

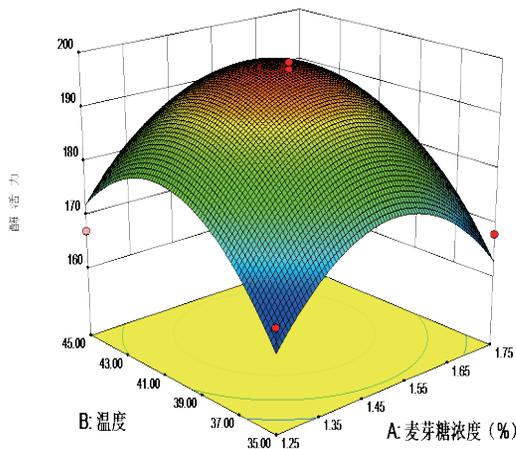
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob>F	
Model	2426.79	9	269.64	10.52	0.0026	significant
A	5.61	1	5.61	0.22	0.6540	
B	233.28	1	233.28	9.10	0.0195	
C	0.011	1	0.011	4.390E-004	0.9839	
AB	0.063	1	0.063	2.439E-0030.17	0.9620	
AC	4.41	1	4.41		0.6907	
BC	1.10	1	1.10		0.8416	
A2	996.62	1	996.62		38.89	0.0004
B2	898.75	1	898.75	35.07	0.0006	
C2	100.48	1	100.48	3.92	0.0882	
Residual	179.38	7	25.63			
Lack of Fit	175.91	3	58.64	67.63	0.0007	significant
Pure Error	3.47	4	0.87			
Cor Total	2606.17	16				

运用 Design-Expert.8.05b 软件对响应面试验结果进行分析, 得到回归方程的变量分析表 3。

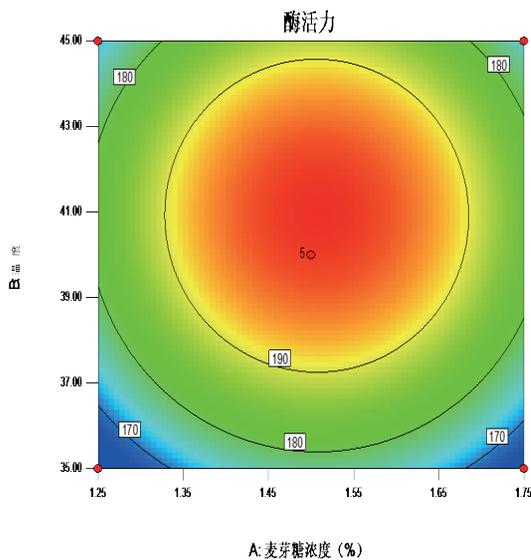
对响应面试验的响应值进行回归拟合后得到的回归方程如下:  $Y=197.32+0.84A+5.40B+0.038C-0.12AB-1.05AC+0.52BC-15.38A^2-14.61B^2-4.89C^2$

其中 Y= 响应值, 即本研究中的柚苷酶酶活力。

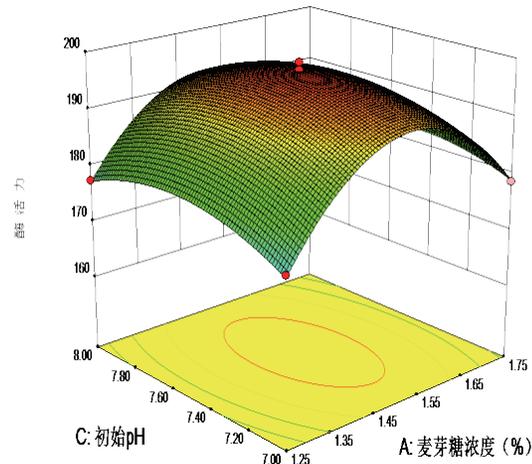
由表 4 可知, 模型 P 值 =0.0026<0.05, 说明响应值与自变量间具有良好的线性关系, 模型可信度高。试验中所选 3 个因素间的交互作用如图 9 所示。



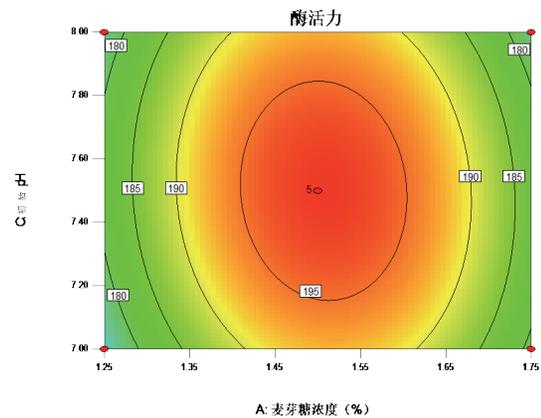
(a) 麦芽糖添加量与温度相互作用的响应面图



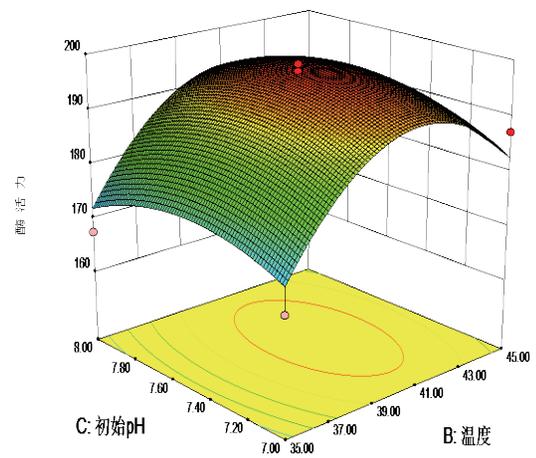
(b) 麦芽糖添加量与温度相互作用的等高线图



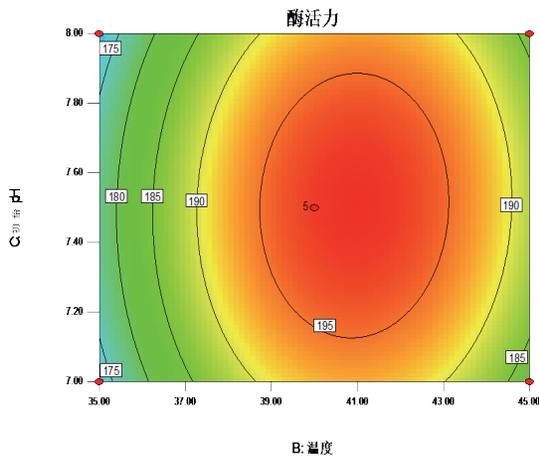
(c) 麦芽糖添加量与初始 pH 值相互作用的响应面图



(d) 麦芽糖添加量与初始 pH 值相互作用的等高线图



(e) 温度与初始 pH 值相互作用的响应面图



(f) 温度与初始 pH 值相互作用的等高线图  
图 10 因素间交互作用的响应面图和等高线

从上述回归模型中求得最优工艺条件为麦芽糖添加量 1.51%，培养温度 40.9 °C，初始 pH7.5，此时解淀粉芽孢杆菌 11568 液体发酵产胞内柚苷酶酶活力为 197.83 U/mL。根据最优工艺条件设计验证试验，结果表明，在最优条件下，柚苷酶酶活力能达到  $(201.12 \pm 1.73)$  U/mL。经单因素试验和响应面法优化产酶条件后，菌株 11568 产柚苷酶水平明显提高，优化后的产酶水平是未优化前的 2.4 倍，在国内外柚苷酶相关研究中处于较高的产酶水平。

### 3 结论

本研究对解淀粉芽孢杆菌 11568 液体发酵产胞内柚苷酶过程中的培养基成分及培养条件等多个因素进行了优化。结果表明，在单因素试验的基础上结合响应面分析，得出解淀粉芽孢杆菌 11568 液体发酵产胞内柚苷酶的最优培养、发酵条件为：麦芽糖 15.1 g，胰蛋白胨 10 g， $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  20 g，NaCl 10 g，酵母提取物 5 g；培养温度 40.9 °C，摇床转速 180 r/min，pH 7.5，发酵时间 48 h。在最优的条件下，柚苷酶活力达到 201.12 U/mL，是未优

化前的 2.4 倍，在国内外柚苷酶相关研究中处于较高的产酶水平。

#### 【参考文献】

- [1] Soria F, Ellenrieder G, Grasselli M, et al. Fractionation of the naringinase complex from *Aspergillus terreus* by dye affinity chromatography [J]. *Biotechnol Lett*, 2004, 26(16): 1265–1268.
- [2] 雷生姣, 潘思轶. 柚(皮)苷酶的研究进展[J]. *食品科学*, 2009(19): 314–318.
- [3] 张林河, 方柏山. 微生物来源柚苷酶的研究进展及应用[J]. *化工进展*, 2013(05): 1108–1115.
- [4] 黄高凌, 倪辉, 胡阳, 等. 柚皮苷酶对瑯溪蜜柚果汁脱苦效果工艺优化[J]. *食品科学*, 2010, 31(8): 70–73.
- [5] Lei S, Xu Y, Fan G, et al. Immobilization of naringinase on mesoporous molecular sieve MCM-41 and its application to debittering of white grapefruit[J]. *Applied Surface Science*, 2011, 257(9): 4096–4099.
- [6] 肖仔君, 文淑仪, 唐辉, 等. 响应面优化柚皮苷酶对长坝柚汁的脱苦工艺[J]. *食品研究与开发*, 2014, 35(22): 5–9.
- [7] Michlmayr H, Brandes W, Eder R, et al. Characterization of two distinct glycosyl hydrolase family 78  $\alpha$ -L-rhamnosidases from *Pediococcus acidilactici*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(18): 6524–6530.
- [8] Koseki T, Mese Y, Nishibori N, et al. Characterization of an  $\alpha$ -L-rhamnosidase from *Aspergillus kawachii* and its gene[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 80(6): 1007–1013.
- [9] Cardona ST, Mueller CL, Valvano MA. Identification of essential operons with a rhamnose-inducible

- promoter in *Burkholderia cenocepacia*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(4): 2547–2555.
- [10] 苏玲, 刘启德. 柚皮苷生物活性和药代动力学研究新进展[J]. *中国医药技术经济与管理*, 2008, 2(10): 74–80.
- [11] 覃青云, 卢凯玲, 许静, 等. 柚皮苷在口腔护理用品中的应用研究[J]. *牙膏工业*, 2009, 19(2):25–29.
- [12] Hall DH. A new enzyme of the glycosidase type [J]. *Nature*, 1938, 142(1):150.
- [13] Thomas DW, Smythe CV, Labbee MD. Enzymatic hydrolysis of naringin, the bitter principle of grapefruita[J]. *Journal of Food Science*, 1958, 23(6): 591–598.
- [14] Puri M, Banerjee UC. Production, purification, and characterization of the debittering enzyme naringinase[J]. *Biotechnology Advances*, 2000, 18(3): 207–217.
- [15] 黎继烈, 崔培梧 李忠海. 柚苷酶产生菌 *Penicillium* sp.1523 分批发酵动力学研究[J]. *中国食品学报*, 2012, 12(1): 32–37.
- [16] 崔培梧, 黎继烈, 文蓉, 等. 紫外线诱变青霉 P-M1 选育柚苷酶高产菌株研究[J]. *北方园艺*, 2009, ?(2): 42–44.
- [17] 黎继烈, 崔培梧, 鲁耀邦, 等. *Penicillium* sp.1523 产柚苷酶摇瓶发酵培养基优化[J]. *食品科学*, 2011, 32(9): 151–155.
- [18] 王迪, 倪辉, 李利君, 等. 一株棘孢曲霉的鉴定及其柚苷酶合成规律[J]. *微生物学报*, 2013, 53(7): 691–701.
- [19] 卢云真, 倪辉, 蔡慧农, 等. 黑曲霉 DB056 分泌的柚苷酶分离纯化及酶学性质研究[J]. *中国食品学报*, 2010, 10(3):69–75.
- [20] 吴升山, 倪辉, 肖安风, 等. 黑曲霉 DB056 产柚苷酶发酵条件初步优化[J]. *微生物学通报*, 2010, 37(9): 1305–1311.
- [21] 张怡, 曾红亮, 姚辉, 等. 柚苷酶产生菌的分离筛选及鉴定[J]. *中国食品学报*, 2012, 12(2): 196–201.
- [22] 陈红, 倪辉, 李利君, 等. 棘孢曲霉固态发酵柚皮产柚苷酶及其在柑橘果汁脱苦中的应用[J]. *菌物学报*, 2013, 32(6): 1034–1045.
- [23] 汪钊, 毛富根. 柚苷酶产生菌的选育及发酵条件研究[J]. *微生物学通报*, 1995, 22(1):18–22.
- [24] 胡奎, 李帮秀, 吴珍龄. 柚苷酶生产菌的选育[J]. *西南农业大学学报*, 2003, 25(2): 141–143.
- [25] 赖崇德, 蔡华静, 夏海林, 等. 一株产柚苷酶菌株黑曲霉的分离及菌种鉴定的初步研究[J]. *江西农业大学学报*, 2005, 27(5): 759–763.
- [26] Puri M. Updates on Naringinase: Structural and biotechnological aspects [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93(1): 49–60.
- [27] 张卫华, 汪超, 罗军杰, 等. 响应面法优化醋酸菌在梨渣中的发酵条件研究[J]. *北京工商大学学报(自然科学版)*, 2012, 30(1): 36–40.
- [28] 占纪勋, 刘廷志, 王德培, 等. 黑曲霉 S13 液体发酵产木聚糖酶的研究[J]. *北京工商大学学报(自然科学版)*, 2002, 20(4): 14–17.
- [29] 陈玲, 涂国全. 透明圈法筛选柚苷酶高产菌株[J]. *江西科学*, 2007, 25(1): 27–29.
- [30] 李志坚, 谭兴和, 李高阳. *Aspergillus niger* C15 产柚苷酶发酵条件的优化研究[J]. *食品工业科技*, 2012(22): 229–233.
- [31] Puri M, Banerjee A, Banerjee CU. Optimization of process parameters for the production of naringinase by *Aspergillus niger* MTCC 1344 [J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40(1): 195–201.

## 发酵豆腐废水的抑菌效果研究

◎石丽华<sup>1</sup> 冯潇<sup>1</sup> 沈宇标<sup>2</sup> 方诗瑶<sup>1</sup> 胥媛媛<sup>1</sup> 包璇<sup>1</sup> 闫雪<sup>1</sup> 纪伟<sup>2</sup> 朱炫<sup>1, 2\*</sup>

1. 浙江工商大学食品与生物工程学院, 食品安全重点实验室, 杭州 310036;

2. 浙江清华长三角研究院, 浙江嘉兴 314000

**【摘要】** 选取豆腐废水作为发酵底物, 添加 10% 葡萄糖作为外加糖源, 并利用微生物发酵工艺, 开展基于发酵豆腐废水抑菌效果的研究及其在豆腐和冷鲜肉保鲜过程中的应用。本文选取谢氏丙酸菌、费氏丙酸杆菌和罗伊氏乳杆菌作为实验菌株, 通过发酵豆腐废水得到发酵产物, 并研究发酵产物上层清液对大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 和枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 三种指示菌的抑制作用。结果表明, 三种实验菌株发酵产物上层清液对于大肠埃希氏菌的抑菌能力: 罗伊氏乳杆菌 > 谢氏丙酸菌 > 费氏丙酸杆菌; 对于金黄色葡萄球菌的抑菌能力: 罗伊氏乳杆菌 > 费氏丙酸杆菌 > 谢氏丙酸菌; 对于枯草芽孢杆菌的抑菌能力: 罗伊氏乳杆菌 > 谢氏丙酸菌 > 费氏丙酸杆菌。豆腐和冷鲜肉的保鲜实验结果表明, 选取罗伊氏乳杆菌发酵豆腐废水上层清液作为抑菌物质喷洒至豆腐和冷鲜肉表面后, 可将豆腐和冷鲜肉的保质期分别延长 1-2 d 和 2 d 以上, 且几乎不影响其本身的理化性质与感官风味。

**【关键词】** 豆腐废水; 生物抑菌剂; 保鲜应用; 环保

### 前言

豆制品是我国城乡人民重要的蛋白质食品之一, 除豆乳、豆粉等少数现代大豆制品外, 我国的豆制品主要是传统豆制品, 如豆腐、腐乳、豆豉、腐竹等。我国的豆腐产量大, 每天均有大量豆腐废水排出, 每生产 1 t 豆腐, 会产生至少 10 t 的废水, 而废水的 COD 值极高, 超过 2000 mg/L, 若直接排放,

对环境污染极大。豆制品加工根据机械化程度不同, 废水排放量一般为 30-50 m<sup>3</sup>/t 大豆, 一家加工能力为 65 t/d 的豆制品加工厂, 其废水产生量大约为 2000 m<sup>3</sup>/d, 加工废水主要来源于生产过程中黄豆清洗浸泡产生的泡豆水以及磨浆产生的豆腐黄水。

大豆含蛋白质 40% 左右, 脂肪 20% 左右。大豆含有较为丰富的水溶性蛋白质, 主要是球蛋白 (94%) 和白蛋白 (6%) 两部分。同时含有人体必

需的营养成分如胡萝卜素, 维生素 B 族, 烟酸以及丰富的钙、磷等<sup>[1]</sup>。豆腐黄水是豆腐制造过程中产生的工业废水, 含有低聚糖、蛋白质、大豆异黄酮等多种营养物质, 其中还原糖 1.2-1.3 g/L, 总糖 5.2-8.0 g/L, 总氮 0.7-0.8 g/L, 还有单糖、寡聚糖、钾、磷、钙、铁、有机酸、水溶性蛋白、氨基酸、脂类等营养成分, 直接排放不仅严重污染环境, 而且还造成资源的极大浪费<sup>[2]</sup>。

通常情况下, 豆制品企业生产过程中产生的豆腐黄水经过简单处理后会直接排放到下水管道中, 对水环境污染影响较大。目前仍缺乏成熟的、可商业化推广的处理技术, 豆腐黄水的处理一直是豆制品生产企业所面临的一大难题。

据文献报道, 豆腐黄水的 COD 值高达 23000 mg/L, 可通过膜分离的方法进行处理<sup>[3]</sup>, 但工序相对繁琐, 成本较高。利用微生物发酵可有效处理酿造业的废渣废水, 降低整体的 COD 与 BOD<sup>[4]</sup>。生物发酵处理豆腐黄水的方法一般可分为厌氧法、好氧法和厌氧-好氧处理法。厌氧法处理豆腐黄水, 可采用厌氧硫化床工艺处理豆腐黄水, 一般采用厌氧折流板反应器处理豆腐黄水, 亦可采用多极厌氧生物滤池处理豆腐黄水 (COD<sub>Cr</sub> 去除率可由 78%-80% 提高到 90% 以上); 好氧法处理豆腐黄水, 一般采用 AB 活性污泥法处理豆腐黄水 (COD<sub>Cr</sub> 出水总去除率可达到 97%, 其中 A 段去除率为 89%, B 段去除率为 83%); 厌氧-好氧处理法能发挥出厌氧微生物承担高浓度、高负荷与回收有效能源的优势, 同时又能利用好氧微生物生产速度快, 处理水质好的特点。但将豆腐黄水作为发酵底物, 利用微生物发酵豆腐黄水产生抑菌物质用于延长豆腐和冷鲜肉在实际保藏过程中的保质期却为国内首创。

豆腐作为一款老少皆宜的大众喜爱食品, 其蛋

白质含量高, 营养成分丰富, 但新鲜的豆腐不易保存, 即使在低温冰箱储存, 也最多只有 1-2 d 保质期, 且豆腐表层易滋生细菌<sup>[5]</sup>。常用的豆腐保鲜方法是将豆腐放在盐水中煮开, 放凉后连水一起放入保鲜盒中再放入冰箱, 可存放约一星期不变质, 但该方法只适合少量豆腐保鲜, 不适合大型豆腐生产企业进行推广。

冷鲜肉因其汁液流失少、柔软有弹性、滋味鲜美、营养价值高等优点, 近年来深受消费者喜爱。但冷鲜肉在销售过程中一般放置在 0-4 °C 的冷柜中, 其温度只能使微生物的生长繁殖和酶的活性在一定程度上受到抑制, 货架期仅为 2-3 d, 冷鲜肉的卫生质量和安全性问题仍然存在。目前, 冷鲜肉主要的保鲜技术有: 防腐剂保鲜、超高压加工、辐射保鲜、真空包装保鲜、冷藏保鲜等<sup>[6]</sup>。先进的冷鲜肉保鲜包装技术主要有真空收缩包装、热成型包装、真空贴体包装、气调保鲜包装, 这些方法虽然保鲜效果较好, 但成本相对较高。

随着环保概念的深入人心, 绿色防腐的方法越来越得到研究者的关注。利用丙酸菌和罗伊氏乳杆菌发酵液作为新型抑菌物质用于各类食品防腐保鲜也已越来越成为研究者关注的重点<sup>[7]</sup>。本文以豆腐黄水为发酵底物, 通过微生物发酵的方式得到抑菌物质, 能有效延长豆腐和冷鲜肉在保藏过程中的保质期, 且成本低, 不仅可以解决豆腐黄水资源化利用的问题, 同时很好地实现了环境与经济的双赢, 微生物与环境的共生。

## 1 实验材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 菌种

本次实验所用菌种详见表 1。

表 1 菌种

中文名称	英文名称
谢氏丙酸菌	Propionibacterium shermanii, PS
费氏丙酸杆菌	Propionibacterium freudenreichii, PF
罗伊氏乳杆菌	Lactobacillus reuteri, LR
大肠埃希氏菌	Escherichia coli
金黄色葡萄球菌	Staphylococcus aureus
枯草芽孢杆菌	Bacillus subtilis

以上菌种来源于浙江工商大学浙江省食品安全重点实验室。

### 1.1.2 培养基

LB 固体培养基, LB 液体培养基, 平板计数琼脂 (PCA) 培养基, MRS 培养基均购于北京陆桥技术股份有限公司; 实验所用豆腐及豆腐黄水均购于嘉兴市家家乐食品有限责任公司。

### 1.1.3 设备

本次实验所有仪器设备详见表 2。

表 2 主要设备

名称型号	制造商
二级生物柜	上海博迅实业有限公司医疗设备厂
蛋白纯化仪	AKTA Purifier 100, GE, Sweden
凝胶成像仪	Bio-Rad
pH 酸度计 PB-10	Startorius
台式高速冷冻离心机	Thermo Fisher Scientific
电泳槽 Mini Proteom <sup>®</sup>	Bio-Rad, MSA
电泳电源 PowerpacBasic <sup>™</sup>	Bio-Rad, MSA
数显恒温水浴锅 HH-6	上海森信实验仪器有限公司
超纯水仪 Milli-Q <sup>®</sup> Biocel <sup>™</sup>	Millipore, MSA
生化培养箱 SPX-150B-Z 型	上海博迅实业有限公司医疗设备厂
分光光度计 pHamaSpec MV-1700	SHIMADZ M, Japan
台式冷冻恒温振荡器 SKY-2008	上海苏坤实业有限公司
手提式压力蒸汽灭菌器 YXQ.SG41	上海华微医用核子仪器有限公司

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 豆腐黄水发酵实验

取豆腐黄水 600 mL, 分别盛放于 3 个 300 mL 锥形瓶中, 每瓶 200 mL, 扎口, 高温蒸汽灭菌锅

121 °C 条件下灭菌 15 min, 自然冷却至 35 °C 左右后, 将浓度为 10<sup>6</sup> CFU/mL 的 PS、PF、LR 三种发酵菌分别接入。PS、PF 发酵菌在 30 °C 恒温培养箱中培养, LR 发酵菌在 37 °C 恒温培养箱中培养 72 h, 每隔 24 h 测一次 pH 与 OD 值。同时用移液枪吸取 1 mL 发酵菌液, 低温高速离心机 8000 r/min 离心 5 min 后, 取上层清液用于后期抑菌实验。

### 1.2.2 豆腐黄水发酵对比实验

相比于“1.2.1 豆腐黄水发酵实验”, 在接种发酵菌的同时, PS、PF 所在豆腐黄水发酵瓶中添加 10% 的葡萄糖, LR 所在豆腐黄水发酵瓶中添加比例为 1:3 的葡萄糖: 甘油<sup>[8-12]</sup>, 其余操作均同“1.2.1 豆腐黄水发酵实验”。

### 1.2.3 抑菌实验

配置 3 个 500 mL 的 LB 半固体培养基并灭菌, 分为 A、B、C 三组。自然冷却至 35 °C 后 A 组培养基中接入 2% 的 10<sup>6</sup> CFU/mL 大肠埃希氏菌菌液, B 组培养基中接入 2% 的 10<sup>6</sup> CFU/mL 金黄色葡萄球菌, C 组培养基中接入 2% 的 10<sup>6</sup> CFU/mL 枯草芽孢杆菌。随后倒平板, 每组培养基倒 9 个平皿, 每个平皿中装大约 20 mL 培养基, 待培养基凝固后用打孔器在每个培养基上平板上各打 3 个孔, 放入 4 °C 冰箱中冷藏 30 min 后取出。

向其中一个孔中加入 200 μL 豆腐黄水发酵实验 (表 3 中简称发酵组) 某一发酵菌种发酵上层清液, 另一个孔中加入 200 μL 豆腐黄水发酵对比实验 (表 3 中简称对比组) 相同菌种发酵上层清液, 最后一个孔中加入 200 μL 无菌水, 作为对照, 平行 3 次实验。然后放入 4 °C 冰箱中冷藏 3 h, 作饥饿处理, 随后取出后放入 37 °C 恒温培养箱中培养 72 h, 每隔 24 h 测量抑菌圈大小, 并记录数据。详见表 3。

### 1.2.4 发酵产物抑菌机制研究

取波长 600 nm 下 OD 值为 0.5 的大肠杆菌作

表 3 抑菌实验分组

组别	指示菌	孔 1	孔 2	孔 3
A	大肠埃希氏菌	发酵组 PF 上层清液	发对比组 PF 上层清液	无菌水
		发酵组 PS 上层清液	发对比组 PS 上层清液	无菌水
		发酵组 LR 上层清液	发对比组 LR 上层清液	无菌水
B	金黄色葡萄球菌	发酵组 PF 上层清液	发对比组 PF 上层清液	无菌水
		发酵组 PS 上层清液	发对比组 PS 上层清液	无菌水
		发酵组 LR 上层清液	发对比组 LR 上层清液	无菌水
C	枯草芽孢杆菌	发酵组 PF 上层清液	发对比组 PF 上层清液	无菌水
		发酵组 PS 上层清液	发对比组 PS 上层清液	无菌水
		发酵组 LR 上层清液	发对比组 LR 上层清液	无菌水

为指示菌菌悬液，在转速为 6000 r/min 下离心 5 min，用缓冲液洗涤菌体后，在菌体中加入缓冲液，加入 0.1 μmol/L 的荧光探针 disC<sub>2</sub>(5)，静置 5 min，随后加入 LR 发酵上层清液，在激发波长为 650 nm，发射波长为 670 nm 的条件下进行荧光检测，同时，以乳酸链球菌素 (Nisin)<sup>[13,14]</sup> 为对照组。

### 1.2.5 在食品保鲜中的应用

#### 1.2.5.1 发酵上层清液在豆腐保鲜中的应用

取新鲜的豆腐，将其切成 5 cm\*5 cm\*5 cm 大小若干块，将豆腐黄水发酵对比实验中罗伊氏乳杆菌发酵上层清液按照 1: 1000 的比例喷洒在豆腐块表面，并设置空白对照组，置于常温下 72 h，每隔 24 h 利用平板计数法<sup>[15]</sup> 测定豆腐表面菌落总数，同时进行感官评定，评定项目见表 4:

表 4 感官评定项目

评定标准	评定结果
形状是否完整	
色泽是否光滑	
是否散发异味	
表面是否粘稠	
弹性是否良好	

#### 1.2.5.2 发酵上层清液在冷鲜肉保鲜中的应用

选取 5 cm\*5 cm\*5 cm 大小的冷鲜肉为培养基<sup>[16]</sup>，将豆腐黄水发酵对比实验中罗伊氏乳杆菌发酵上层清液按照 0.1% 的比例喷洒在冷鲜肉表面，并设置

空白对照组，置于常温下 72 h，每隔 24 h 利用平板计数法测定冷鲜肉表面菌落总数。

## 2 结果与分析

### 2.1 豆腐黄水发酵实验及对比实验结果

PS、PF、LR 三种发酵菌在豆腐黄水发酵实验及对比实验中，通过连续发酵 72 h，每间隔 24 h 测量发酵液的 pH 及 OD 值（代表菌液浓度），具体变化见下图:

由图 1 可得，针对 PS、PF、LR 三种发酵菌，其三个对比组的 pH 下降速率普遍比实验组更快，且第 3 天发酵液达到的 pH 更低，其中 PF 对比组

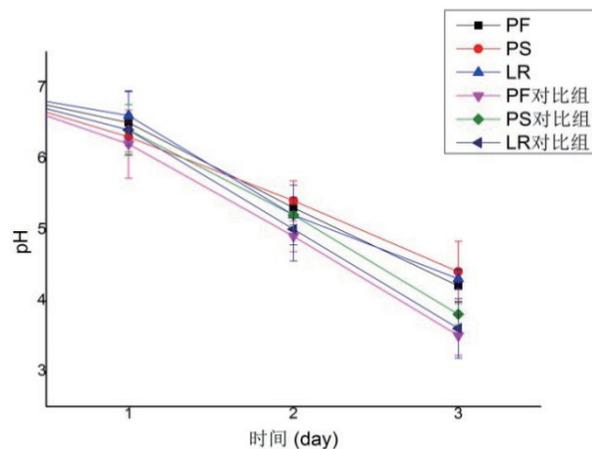


图 1 豆腐黄水发酵实验及对比实验 pH 变化

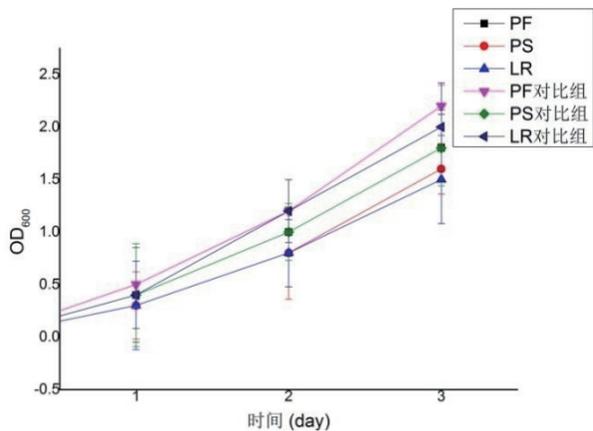


图2 豆腐黄水发酵实验及对比实验 OD 值变化

发酵液的 pH 最低，达到了将近 3.5；由图 2 可得，三个对比组的 OD 值上升速率比实验组更快，且第 3 天发酵液达到的 OD 值更高，其中 PF 对照组发酵液的 OD 值最高，达到了近 2.2。

结合图 1、图 2，对照组比实验组的实验条件更有利于发酵菌的生长发育，即在普通豆腐黄水中添加 10% 葡萄糖后可有效促进三种发酵菌的生长。

## 2.2 抑菌实验结果

比较图 3 中各组抑菌圈直径大小可得，对比组与发酵组对大肠埃希氏菌生长均有抑制作用；对于同一个发酵菌株，其对比组抑菌效果明显优于发酵组；且对于大肠埃希氏菌的抑菌能力 LR > PS > =PF，对比组 LR 上层清液对大肠埃希氏菌生长抑制作用最强。

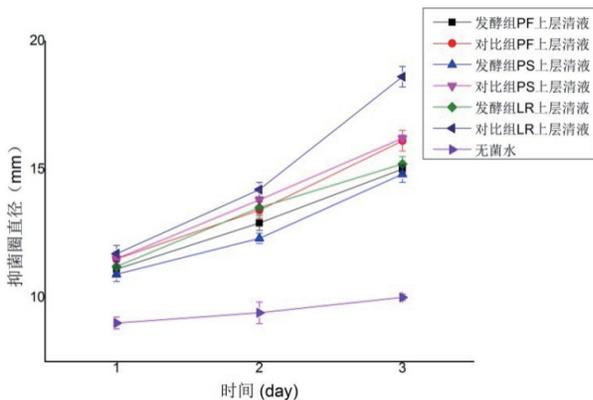


图3 大肠埃希氏菌抑菌结果

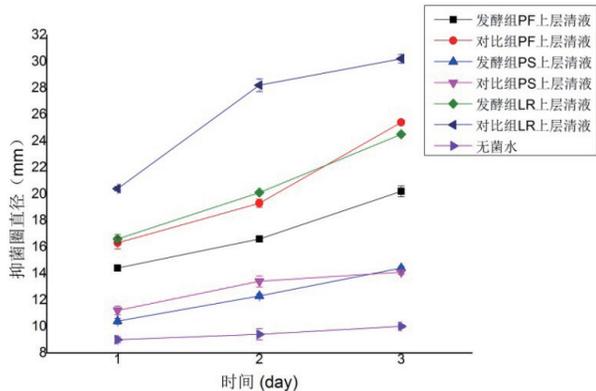


图4 金黄色葡萄球菌抑菌结果

组；且对于金黄色葡萄球菌的抑菌能力 LR > PS > =PF，对比组 LR 上层清液对金黄色葡萄球菌生长抑制作用最强。

比较图 4 中各组抑菌圈直径大小可得，对比组与发酵组对金黄色葡萄球菌生长均有抑制作用；对于同一个发酵菌株，其对比组抑菌效果明显优于发酵组；且对于金黄色葡萄球菌的抑菌能力 LR > PS > PF，对比组 LR 上层清液对金黄色葡萄球菌生长抑制作用最强。

比较图 5 中各组抑菌圈直径大小可得，对比组与发酵组对枯草芽孢杆菌生长均有抑制作用；对于同一个发酵菌株，其对比组抑菌效果明显优于发酵组；且对于枯草芽孢杆菌的抑菌能力 LR > PS > =PF，对比组 LR 上层清液对枯草芽孢杆菌生长抑制作用最强。

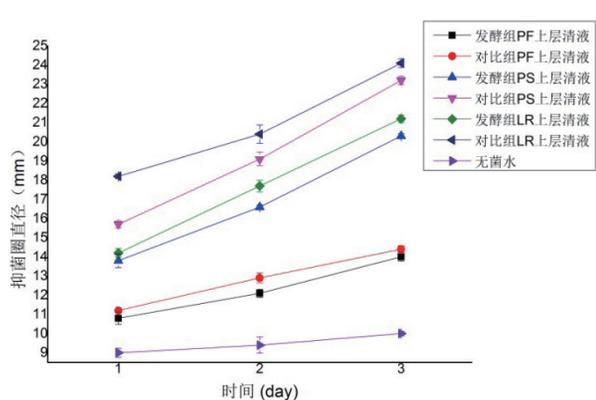


图5 枯草芽孢杆菌抑菌结果

PF, 对比组 LR 上层清液对枯草芽孢杆菌生长抑制作用最强。

综合图 3,4,5 的抑菌结果, 对比组 LR 上层清液对于大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌生长的抑制作用最强, 故在下一步食品保鲜实验中采用对比组 LR 上层清液进行应用研究。

### 2.3 抑菌机理研究结果

比较图 6 中数据, 随着荧光对探针标定的指示菌内容物的响应, 响应曲线不断上升, 在 0.5 min 左右, 因 Nisin 作用于指示菌细胞表面, 导致指示菌内容物泄漏, 故荧光响应强度不断减弱, 到 6 min 左右达到最低值, 此为 Nisin 通过作用指示菌细胞表面使其破裂从而达到抑菌效果的整个表现过程。

比较图 7 中数据, 随着荧光对探针标定的指示菌内容物的响应, 响应曲线不断上升, 在 4.5 min 左右达到稳定的峰值, 随着 LR 发酵上层清液与指

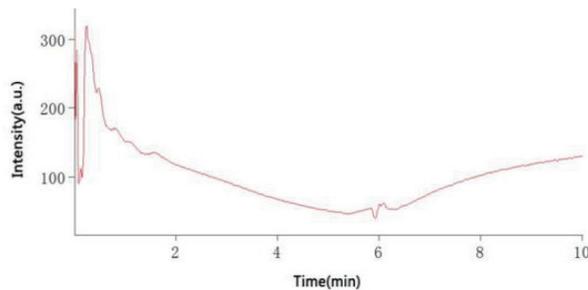


图 6 Nisin 泄漏实验结果

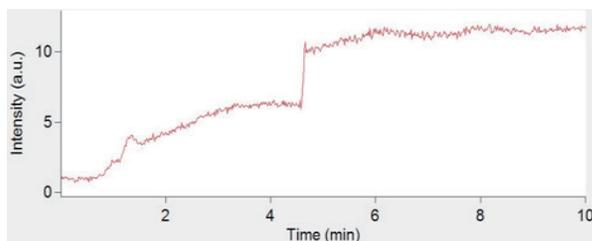


图 7 LR 发酵上层清液泄漏实验结果

示菌内容物的作用, 荧光响应值突然增强, 并在 1-2 min 中内达到另一个稳定的峰值, 可以确定 LR 发酵上层清液对指示菌的抑制作用并非与 Nisin 般作用于指示菌细胞表面使其内容物泄漏, 具体抑菌机理有待进一步研究。

## 2.4 食品保鲜应用结果

### 2.4.1 在豆腐保鲜中的应用结果

比较图 8 中的数据, 以菌落总数 ( $\lg(\text{cfu/g})=7$ ) 为指标限, 常温下空白对照组在 2 d (48 h) 内便可达到, 而喷洒了罗伊氏乳杆菌 (LR) 发酵上层清液的实验组则需要 3 d 左右的时间, 即常温下可将豆腐的保质期延长 1-2 d。

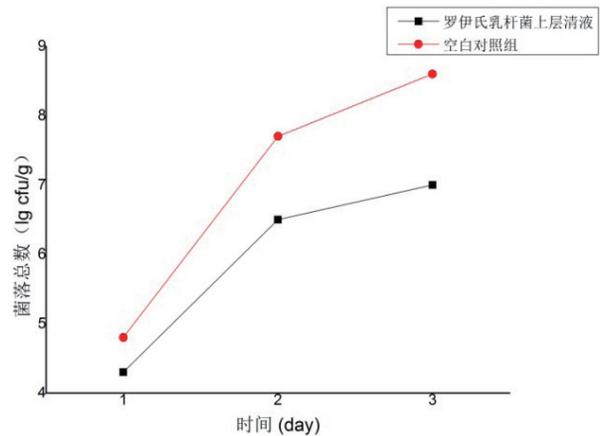


图 8 豆腐保鲜实验结果

表 5 感官评价表

评定标准	第一天		第二天		第三天	
	实验组	空白组	实验组	空白组	实验组	空白组
形状是否完整	是	是	是	否	是	否
色泽是否光滑	是	是	是	否	否	否
是否散发异味	否	否	否	否	是	是
表面是否粘稠	否	否	否	是	是	是
弹性是否良好	是	是	是	是	是	否

对比表 5 中的感官评定结果，从第二天开始，空白对照组便开始出现形状不完整、色泽不光滑、表面粘稠等问题，到了第三天豆腐基本已经腐坏；而喷洒了 LR 发酵上层清液的实验组到了第三条才开始出现色泽变化、散发异味等问题，但豆腐整体形状和弹性仍较为良好。故从感官的角度分析，通过喷洒 LR 发酵上层清液，可将豆腐的保质期延长 1-2 d。

#### 2.4.2 在冷鲜肉保鲜中的应用结果

比较图 9 中的数据，以菌落总数 ( $\lg(\text{cfu/g})=7$ ) 为指标限，常温下空白对照组在 2 d (48 h) 内便可达到，而喷洒了罗伊氏乳杆菌 (LR) 发酵上层清液的实验组在第 3 天菌落总数 ( $\lg(\text{cfu/g})=5$ )，仍低于指标限。故可初步得出结论，通过喷洒 LR 发酵上层清液，可将冷鲜肉的保质期延长 2 d 以上。

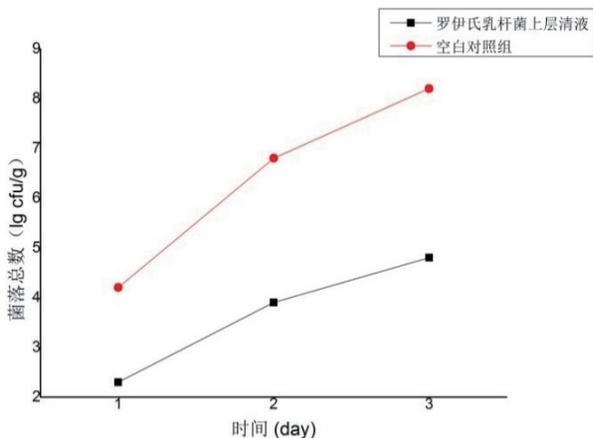


图 9 冷鲜肉保鲜实验结果

## 3 结论

以豆腐黄水为发酵底物，选取谢氏丙酸菌、费氏丙酸菌和罗伊氏乳杆菌，通过微生物发酵的方式得到发酵产物上层清液，抑菌实验证明，谢氏丙酸

菌、丙酸菌发酵液和罗伊氏乳杆菌发酵上层清液对大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌三种指示菌具有良好的抑菌效果。

对于大肠埃希氏菌的抑菌能力：罗伊氏乳杆菌 > 谢氏丙酸菌 > 费氏丙酸杆菌；对于金黄色葡萄球菌的抑菌能力：罗伊氏乳杆菌 > 费氏丙酸杆菌 > 谢氏丙酸菌；对于枯草芽孢杆菌的抑菌能力：罗伊氏乳杆菌 > 谢氏丙酸菌 > 费氏丙酸杆菌。故选取罗伊氏乳杆菌发酵上层清液作为抑菌物质开展在豆腐和冷鲜肉保鲜过程中的应用研究。

保鲜实验表明，选取罗伊氏乳杆菌发酵上层清液作为抑菌物质喷洒至豆腐和冷鲜肉表面后，可将豆腐的保质期延长 1-2 d，将冷鲜肉的保质期延长 2 d 以上，且几乎不影响其本身的理化性质与感官风味。

上述结果表面，基于发酵豆腐黄水所示的抑菌技术不仅绿色、高效，并且其对食品本身和周围环境污染小，能有效替代化学防腐剂在食品防腐行业的作用。但该发酵产物抑菌机理仍不明晰，下一步我们将从酶或者基因等的角度进行进一步的研究与解释；同时，我们将对发酵产物进行纯化，探究其作用于各类有害细菌的最少添加量等问题。

#### 【参考文献】

- [1] 陈学珍, 杨建宇, 李欣等, 大豆营养与人体健康 [J]. 农业新技术, 2004(4):5-7.
- [2] 杜欣, 发酵黄浆水的抗氧化和抑菌活性研究 [D]. 华南理工大学, 2014.
- [3] 王华国, 彭小文, 杨艳等, 豆腐废水清洁生产的工艺研究 [J]. 武汉生物工程学院学报, 2009(4):268-270.
- [4] 肖永澜, 利用微生物处理酿造业的废渣废水 [J]. 中国酿造, 1986, 5(2):3-7+12.
- [5] 张桂, 李杏巧, 郭占京等, 豆腐保鲜技术的研究 [J].

- 中国果菜, 2004(5):35-35.
- [6] 王永红, 张淑蓉, 冷鲜肉的保鲜技术研究进展 [J]. 粮油食品科技, 2012, 20(1):48-51.
- [7] 梁慧珍, 赵树欣, 杨志岩等, 固定化丙酸菌发酵生产丙酸 -- 黄水应用新途径 [J]. 酿酒科技, 2005(2):75-78.
- [8] Montiel R, Martíncabrejas I, Langa S, et al. Antimicrobial activity of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* on *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon.[J]. Food Microbiology, 2014, 44(4):1.
- [9] Yu Y, Zhu X, Shen Y, et al. Enhancing the vitamin B12 production and growth of *Propionibacterium freudenreichii*, in tofu wastewater via a light-induced vitamin B12 riboswitch[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(24):10481-10488.
- [10] 陈国, 王珍珠, 陈宏文等, 甘油添加策略对罗伊氏乳杆菌代谢特性的影响 [J]. 高校化学工程学报, 2012, 26(3):460-464.
- [11] Talarico T L, Casas I A, Chung T C, et al. Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1988, 32(12): 1854-1858.
- [12] Doleyres Y, Beck P, Vollenweider S, et al. Production of 3-hydroxypropionaldehyde using a two-step process with *Lactobacillus reuteri* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 68(4):467-474.
- [13] 徐炳政, 王颖, 梁小月等, 乳酸菌细菌素应用研究进展 [J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2015(1):60-63.
- [14] 章检明, 任璐雅, 易华西等, 乳酸菌细菌素的高效表达方法研究 [J]. 中国酿造, 2014, 33(7):29-33.
- [15] 王晓英, 余东敏, 刘秀梅, 涂布平板计数法与 MPN 法定量检测禽肉和蛋中沙门菌的比较 [J]. 中国食品卫生杂志, 2005, 17(2):106-108.
- [16] 李巍, Nisin 对冷鲜肉保质期的影响 [J]. 安徽农业科学, 2012(5):2866-2867.

# 微生态制剂对围产期牦牛瘤胃微生物及发酵功能的影响

◎金红岩 杨晶晶 李鼎 封家旺 顾庆云

生物饲料工程研究中心

**【摘要】** 试验旨在研究微生态制剂对围产期牦牛血液生化、瘤胃微生物区系和瘤胃发酵功能的影响。将 20 头牦牛，按照年龄、体重、胎次及生理状态相近的配对原则，分为对照组和处理组（微生态制剂），饲喂期 42d，在不同日龄收集血清和瘤胃液。结果表明，与对照组相比，微生态制剂可以降低血液中  $\beta$ -羟丁酸（BHBA）浓度和瘤胃液中乳酸浓度，增加瘤胃液中丙酸浓度；显著增加瘤胃液中反刍月形单胞菌和栖瘤胃普雷沃氏菌数量，降低黄色瘤胃球菌数量。研究表明，微生态制剂通过影响围产期牦牛瘤胃微生物，可以改善牦牛瘤胃发酵功能和产后代谢紊乱。

瘤胃是一个复杂的生态系统，反刍动物采食的营养物质通过发酵过程被消化，发酵过程由各种微生物如细菌、原生动物和真菌执行。为了提高反刍动物生产效率，微生态制剂等饲料添加剂常用来改善反刍动物的发酵功能。此外，微生态制剂作为饲料添加剂在动物饲喂中主要作用是改善动物生产性能，并在单胃动物和水生动物中取得了良好的效果。微生态制剂可调节瘤胃微生态环境，促进幼龄反刍动物瘤胃功能的完善，提高瘤胃 pH 值和挥发性脂肪酸浓度，但在反刍动物中研究相对较少，特别是牦牛。因此，本试验通过在日粮中添加微生态制剂，研究微生态制剂对围产期牦牛血清生化、瘤胃发酵功能、瘤胃微生物区系的影响，为微生态制剂在牦牛生产中的应用提供参考依据。

## 1 材料与方

### 1.1 试验材料

微生态制剂由本实验室前期制备，制备方法为

真空干燥法，主要成分为酿酒酵母、产朊假丝酵母、伯顿毕赤酵母、反刍月形单胞菌和埃氏巨型球菌，含活菌总数大于  $2 \times 10^9$  CFU/g。

### 1.2 试验动物及日粮

在拉萨市林周县选择体重、体况相似、健康、处于妊娠中期的牦牛 20 头，按照年龄、体重、胎次及生理状态相近的配对原则将其分为对照组与复合微生态制剂饲喂组（以下简称饲喂组），每组 10 头，基础口粮相同，对照组不饲喂，饲喂组牦牛每头每天饲喂 5g 复合微生态制剂，饲喂期 42d。微生态制剂饲喂方式为精饲料中混合饲喂。试验日粮包括精料和粗料，单头饲喂，每日 2 次，自由饮水。精料成分根据 NRC（2000）肉牛营养需要和中国肉牛饲养标准（2013）设计，补充精料组成及营养水平见表 1。

表1 补充精料组成及营养水平

原料组成	含量 /%	营养水平	
玉米	60.0	干物质 /%	88.12
豆粕	19.0	粗蛋白质 /%	15.34
棉粕	8.2	粗纤维 /%	5.20
麦麸	8.0	钙 /%	0.73
预混料	4.8	磷 /%	0.59
合计	100.0	综合净能 / (MJ/kg)	42.00

注：预混料购自美德宝生物技术开发有限公司。

### 1.3 瘤胃液和血液的采集与处理

围产期牦牛分别在分娩 -21、-14、-7、1、7、14 和 21d, 于晨饲后 4 和 8h 从牛瘤胃腹囊下部抽取瘤胃液, 每次采集约 50mL, 将所采集的瘤胃液混合。采集的瘤胃液用四层纱布过滤, 取 30mL 滤液于液氮中冻存, 用于检测细菌数量及种类。剩余的滤液经 3500r/min 离心 10min, 取上清液于 -20℃ 冻存, 用于检测 pH 值、氨态氮、乙酸、丙酸、丁酸、乳酸。从牦牛静脉采集 5mL 血液于肝素钠管中, 3500r/min 离心 5min, 取血清, 放置于 -80℃ 冻存, 用于检测各种生化指标。

### 1.4 血清生化指标的测定

测定的血清生化指标包括: 血清总蛋白 (TP)、白蛋白 (ALB)、葡萄糖 (GLU)、碱性磷酸酶 (ALP)、尿素氮 (BUN)、甘油三脂 (TG)、总胆固醇 (CHO)、尿素氮 (BUN)、肌酐酸 (CRE)、谷草转氨酶和谷丙转氨酶采用全自动生化分析仪 (日立 7170s 全自动生化分析仪) 进行测定。球蛋白 (GLO) 测定采用试剂盒 (南京建成生物有限公司) 利用免疫比浊法进行测定,  $\beta$ -羟丁酸测定采用试剂盒 (南京建成生物有限公司) 利用免疫比浊法进行测定。

### 1.5 瘤胃液指标的测定

瘤胃液 pH 值采用 pH 计测定, 瘤胃液中氨态氮采用比色法测定, 乙酸、丙酸、丁酸、乳酸根据标准法使用 water-baseline 810 液相色谱仪进行测定。

### 1.6 瘤胃微生物水平的测定

细菌总 DNA 的提取采用天根生化科技 (北京) 有限公司细菌 DNA 提取试剂盒, 操作方法按照说明书进行, 采用 NanoDrop one (Thermo Fisher Scientific) 测定 DNA 浓度。以细菌总 DNA 为模板, 采用荧

光定量 PCR 检测瘤胃乳酸杆菌、牛链球菌、反刍月形单胞菌、埃氏巨型球菌、产琥珀酸丝状杆菌、白色瘤胃球菌、黄色瘤胃球菌、嗜淀粉瘤胃细菌、溶纤维丁酸弧菌、布氏普雷沃氏菌、普雷沃氏短杆菌、栖瘤胃普雷沃氏菌、厌氧弧杆菌的水平。引物序列参考 NCBI 中各菌种序列设计, 引物序列如表 2 所示, 细菌数量的相对表达水平以真细菌校正后进行分析, 分析方法参考 Berglund 等的方法。

表2 引物序列

名称	上下游	序列	长度
乳酸杆菌	上游	GTTGACTCGGTGGCGGCTT	100
	下游	GGAGCGCTGTGACATCAGCCG	
牛链球菌	上游	AAGGCTGAACTCAAAG	247
	下游	GTGCCAACTCAATGATGGCACT	
反刍月形单胞菌	上游	CAATAAGCAITTCAGCCTGG	138
	下游	TTCACTCAATGTCAAGCCCTGG	
埃氏巨型球菌	上游	ACGGGTGAGTAACGGTAAGCAACCT	527
	下游	GCCCGCACTTTTAAGACCGACTTAC	
产琥珀酸丝状杆菌	上游	GGCCGGATTGAATGACCTTGAGA	204
	下游	TCCGCTGCGCCCTGAACCTATC	
白色瘤胃球菌	上游	GTTTTAGGATGTGTAACCTGTGCTT	270
	下游	CCTAATATCTACGCAATTCACCGC	
黄色瘤胃球菌	上游	GATGCCGCTGGGGAAGAAG	132
	下游	CATTCACCGCTACACCAAGAA	
嗜淀粉瘤胃细菌	上游	TGA CCG CCT GGG GAG TAC GG	237
	下游	TTG CGC TCG TTG GGG GAC TT	
溶纤维丁酸弧菌	上游	TAACATGAGAGTTGATCCTGGCTC	136
	下游	CGTTACTCACCCGTCCGC	
布氏普雷沃氏菌	上游	GAAAGCAGCTCGTGTATGTG	145
	下游	GAATTGGGAAGCGAAGCGGT	
普雷沃氏短杆菌	上游	GATTAGATACCCCTGGTAGTCC	268
	下游	CATGGAGGACCTTCACAA	
栖瘤胃普雷沃氏菌	上游	GAAAGTCGGATTAATGCTCTATGTTG	74
	下游	CATCCTATAGCGGTAACCTTGG	
厌氧弧杆菌	上游	TTGGACTGAGACACGG	237
	下游	CAACGCTGCCACCTA	

## 1.7 数据统计与分析

数据采用 EXCEL 2016 初步统计后, 使用 SPSS 19.0 进行显著性检测分析, 结果以“平均值 ± 标准误”表示, P<0.05 表示差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 微生态制剂对牦牛血液生化指标的影响 (见表 3~ 表 5)

由表 3 可知, 在围产期不同时间, 总蛋白和球蛋白水平在产后显著增加 (P<0.05), 但是微生态制剂饲喂没有影响, 两者无交互作用。在对照组和微生态制剂组中, 与围产期 -21d 相比, 不同时间点白蛋白、碱性磷酸酶、尿素氮、肌酐酸、谷草转氨酶、谷丙转氨酶浓度差异不显著 (P>0.05)。

由表 4、表 5 可知，对照组和微生态制剂组血清中葡萄糖在围产前期增加，产后下降至正常水平，甘油三酯浓度在围产期下降，胆固醇浓度则先下降后增加至正常水平。然而在微生态组中  $\beta$ -羟丁酸浓度则下降，且差异显著 ( $P=0.039$ )。

## 2.2 微生态制剂对瘤胃发酵功能的影响 (见表 6、表 7)

由表 6、表 7 可知，对照组和微生态制剂组 pH

值和氨态氮水平均无显著差异 ( $P>0.05$ )；对照组和微生态制剂组乙酸水平均无显著差异 ( $P>0.05$ )，但微生态制剂可增加产后乙酸浓度 ( $P=0.083$ )；围产期内丙酸浓度无显著差异，但微生态制剂可以显著增加产后丙酸的浓度 ( $P=0.034$ )；围产期内丁酸浓度无显著变化，同时微生态制剂对丁酸浓度也无影响；在产后，瘤胃内乳酸浓度在对照组和微生态制剂组显著增加 ( $P=0.013$ ,  $P=0.048$ )，与对照组相比，微生态制剂降低瘤胃液中乳酸浓度 (50%)。

表3 微生态制剂对围产期不同时间点血清生化指标的影响

项目	-21 d		1 d		21 d		SEM	P 值		
	对照组	微生态制剂组	对照组	微生态制剂组	对照组	微生态制剂组		时间	处理	时间 × 处理
总蛋白/(g/L)	69.32 <sup>a</sup>	64.25 <sup>a</sup>	65.78 <sup>a</sup>	67.32 <sup>a</sup>	73.10 <sup>b</sup>	71.69 <sup>b</sup>	3.61	0.032	0.618	0.351
白蛋白/(g/L)	33.62	31.69	33.67	34.78	32.79	32.17	1.92	0.695	0.492	0.893
球蛋白/(g/L)	35.64 <sup>a</sup>	34.32 <sup>a</sup>	32.49 <sup>a</sup>	33.69 <sup>a</sup>	39.57 <sup>b</sup>	38.19 <sup>b</sup>	3.67	0.049	0.267	0.492
碱性磷酸酶/(U/L)	130.65	125.69	136.78	137.64	131.15	132.33	31.56	0.587	0.324	0.872
尿素氮/(mmol/L)	5.62	5.26	5.36	5.16	5.78	5.87	0.29	0.268	0.298	0.697
肌酐/(mmol/L)	99.64	92.34	102.18	99.37	86.72	103.78	14.39	0.247	0.659	0.893
谷草转氨酶/(U/L)	68.47	63.78	69.18	69.17	68.90	65.92	6.38	0.683	0.593	0.961
谷丙转氨酶/(U/L)	41.67	40.69	45.56	43.97	42.19	46.17	5.26	0.493	0.634	0.816

注：同行数据肩标字母相同或无字母表示差异不显著 ( $P>0.05$ )，字母不同表示差异显著 ( $P<0.05$ )；下表同。

表4 对照组围产期牦牛不同时间点血清代谢产物测定

项目								/(mmol/L)	
	-21 d	-14 d	-7 d	1 d	7 d	14 d	21 d	SEM	P 值
葡萄糖	4.26 <sup>a</sup>	4.37 <sup>a</sup>	4.16 <sup>a</sup>	5.27 <sup>b</sup>	4.59 <sup>ab</sup>	4.62 <sup>ab</sup>	4.49 <sup>ab</sup>	0.53	0.048
甘油三酯	0.42 <sup>b</sup>	0.43 <sup>b</sup>	0.41 <sup>b</sup>	0.30 <sup>a</sup>	0.28 <sup>a</sup>	0.27 <sup>a</sup>	0.27 <sup>a</sup>	0.09	0.013
总胆固醇	2.56 <sup>b</sup>	2.39 <sup>ab</sup>	2.19 <sup>a</sup>	2.04 <sup>a</sup>	2.07 <sup>a</sup>	2.49 <sup>b</sup>	2.68 <sup>b</sup>	0.43	0.021
$\beta$ -羟丁酸	0.53	0.49	0.51	0.56	0.52	0.49	0.50	0.05	0.851

表5 微生态制剂组围产期牦牛不同时间点血清代谢产物测定

项目								/(mmol/L)	
	-21 d	-14 d	-7 d	1 d	7 d	14 d	21 d	SEM	P 值
葡萄糖	4.31 <sup>a</sup>	4.36 <sup>a</sup>	4.40 <sup>a</sup>	5.19 <sup>b</sup>	4.71 <sup>a</sup>	4.51 <sup>a</sup>	4.50 <sup>a</sup>	0.57	0.043
甘油三酯	0.45 <sup>b</sup>	0.46 <sup>b</sup>	0.43 <sup>b</sup>	0.35 <sup>a</sup>	0.31 <sup>a</sup>	0.30 <sup>a</sup>	0.29 <sup>a</sup>	0.13	0.029
总胆固醇	2.67 <sup>b</sup>	2.49 <sup>ab</sup>	2.28 <sup>a</sup>	2.29 <sup>a</sup>	2.31 <sup>a</sup>	2.56 <sup>ab</sup>	2.79 <sup>b</sup>	0.57	0.035
$\beta$ -羟丁酸	0.54 <sup>b</sup>	0.47 <sup>b</sup>	0.43 <sup>ab</sup>	0.42 <sup>a</sup>	0.43 <sup>ab</sup>	0.41 <sup>a</sup>	0.40 <sup>a</sup>	0.06	0.039

表6 对照组围产期牦牛不同时间点瘤胃液指标测定

项目									
	-21 d	-14 d	-7 d	1 d	7 d	14 d	21 d	SEM	P 值
pH 值	6.94	6.95	6.98	6.96	7.00	6.98	6.97	0.15	0.689
氨态氮/(mg/L)	114.60	113.60	116.90	111.70	114.80	113.70	112.70	0.26	0.178
乙酸/(mmol/L)	46.45	46.29	44.21	43.69	46.97	49.67	50.18	3.64	0.173
丙酸/(mmol/L)	12.39	12.37	11.89	11.90	12.93	13.29	13.69	1.87	0.364
丁酸/(mmol/L)	4.89	5.29	4.69	5.19	5.46	5.58	5.47	1.18	0.674
乳酸/(mmol/L)	1.69 <sup>a</sup>	1.52 <sup>a</sup>	1.72 <sup>a</sup>	2.98 <sup>b</sup>	4.95 <sup>c</sup>	5.49 <sup>c</sup>	5.32 <sup>c</sup>	0.34	0.013

表7 微生态制剂组围产期奶牛不同时间点瘤胃液指标测定

项目	-21 d	-14 d	-7 d	1 d	7 d	14 d	21 d	SEM	P 值
pH 值	6.93	6.94	6.98	7.00	6.96	6.99	6.97	0.11	0.498
氨态氮/(mg/L)	113.70	112.90	116.80	112.80	114.70	113.90	115.80	0.24	0.295
乙酸/(mmol/L)	46.36	45.69	44.18	46.78	49.29	51.49	53.72	3.97	0.083
丙酸/(mmol/L)	12.19 <sup>a</sup>	12.65 <sup>a</sup>	13.29 <sup>ab</sup>	14.28 <sup>b</sup>	15.79 <sup>bc</sup>	16.47 <sup>bc</sup>	17.29 <sup>b</sup>	1.39	0.034
丁酸/(mmol/L)	4.73	4.96	5.17	4.93	5.39	5.47	5.69	1.39	0.362
乳酸/(mmol/L)	1.60 <sup>a</sup>	1.72 <sup>a</sup>	1.66 <sup>a</sup>	2.42 <sup>b</sup>	2.67 <sup>b</sup>	2.57 <sup>b</sup>	2.50 <sup>b</sup>	0.28	0.048

表8 瘤胃液中微生物的相对数量(倍数)

项目	-21 d		1 d		21 d		SEM	P 值		
	对照组	微生态制剂组	对照组	微生态制剂组	对照组	微生态制剂组		时间	处理	时间 × 处理
乳酸杆菌	-1.36	-1.21	2.96	-1.36	1.36	-1.26	0.61	0.364	0.063	0.351
牛链球菌	5.16	5.24	6.17	5.96	2.83	3.46	1.92	0.587	0.267	0.872
反刍月形单胞菌	-3.69	-4.09	-4.19	-2.01	-2.48	2.19	1.67	0.247	0.024	0.492
埃氏巨型球菌	1.39	1.49	0.17	0.63	1.59	1.63	1.69	0.683	0.324	0.893
产琥珀酸丝状杆菌	1.36	1.26	3.79	4.09	1.34	3.73	1.16	0.061	0.247	0.593
白色瘤胃球菌	1.39	1.07	-2.13	1.24	1.19	3.51	1.19	0.317	0.498	0.683
黄色瘤胃球菌	2.19	1.98	2.36	0.56	2.44	-1.48	1.23	0.586	0.028	0.493
嗜淀粉瘤胃菌	-4.29	-3.93	2.19	0.19	-0.76	2.18	1.32	0.040	0.173	0.103
溶纤维丁酸弧菌	2.19	2.36	4.18	2.96	0.79	2.47	1.14	0.031	0.493	0.634
布氏普雷沃氏菌	0.69	0.79	-1.62	-1.36	-0.87	-1.27	1.24	0.498	0.816	0.931
普雷沃氏短杆菌	-1.96	-1.73	0.51	0.29	1.79	-0.83	1.03	0.674	0.494	0.823
栖瘤胃普雷沃氏菌	-2.67	-2.16	1.75	-0.19	-1.29	0.93	0.79	0.032	0.364	0.216
厌氧弧杆菌	-3.19	-2.93	1.71	1.29	1.69	1.97	1.31	0.046	0.676	0.873

### 2.3 微生态制剂对瘤胃微生物的影响 (见表8)

由表8可知, 对照组中, 乳酸杆菌数量在产后1d最高, 随后下降, 但差异不显著( $P>0.05$ ), 微生态制剂组没有变化。对照组中, 韦荣球菌科的反刍月形单胞菌和埃氏巨型球菌数量没有显著变化, 但微生态制剂组的反刍月形单胞菌显著增加( $P<0.05$ )。纤维杆菌门中, 琥珀酸丝状杆菌的数量在对照组在产后1d最高, 随后下降, 但差异不显著, 微生态制剂组中则在产后保持相同水平。瘤胃球菌科中, 对照组白色瘤胃球菌数量呈先下降后增加, 而微生态制剂组则在围产期内保持增加但差异不显著; 对照组黄色瘤胃球菌数量无显著变化, 微生态制剂组显著下降。围产期内对照组和微生态制剂组的嗜淀粉瘤胃菌数量显著增加, 但微生态制剂没有影响。对照组的溶纤维丁酸弧菌数量呈先增加后下降, 而在微生态制剂组则无变化。普雷沃氏

菌科中, 布氏普雷沃氏菌数量在对照组和微生态制剂组均下降, 但差异不显著; 普雷沃氏短杆菌数量在对照组中增加, 但微生态制剂组呈先增加后下降。栖瘤胃普雷沃氏菌数量在对照组呈先增加后下降, 而微生态制剂组则显著增加。厌氧弧杆菌数量在对照组和微生态制剂组显著增加, 但两组间差异不显著。

## 3 讨论

血液中GLU浓度是动物机体能量代谢水平的重要体现, 而GLU来源主要包括挥发性脂肪酸为前体物的合成和瘤胃内淀粉的分解吸收, 在围产期前后GLU水平的变化体现了动物对GLU合成与利用能力的变化, 本研究中微生态制剂对GLU浓度没有影响, 与Hassan等的结果不相同, 但与Norton的研究结果类似, 可能由于添加剂与物种之间的差异。TP包括GLO和ALB, 在围产期内呈现规律性变化,

表明在产后由于泌乳的蛋白需要，体内蛋白合成代谢受到影响，而微生物制剂对围产期牦牛的蛋白代谢无影响，这与杨朋飞的结果不同，但与 Stella 等的研究结论一致。在泌乳过程中由乳腺合成乳脂肪是前体物之一是  $\beta$ -羟丁酸，而高浓度的  $\beta$ -羟丁酸会抑制乳腺细胞中脂肪的合成。本试验中，微生物制剂显著降低产后血液中  $\beta$ -羟丁酸的浓度，表明可能对糖脂代谢有一定的影响。而在围产期内 TG 和 TC 的水平同样呈规律性的变化，但微生物制剂并无显著影响，表明微生物制剂可能通过糖异生途径影响脂肪代谢过程。微生物制剂对血液中肌酐酸、谷草转氨酶、谷丙转氨酶浓度无显著影响，表明饲喂微生物制剂对围产期牦牛机体健康未产生不良影响。

瘤胃内环境发酵机能是反映牛消化代谢状况的重要指标，由于在围产期内饲料组分的变化，瘤胃内微生物种类和数量产生快速变化，同时在产后为了维持乳液的分泌，牛体内能量动员易引起围产期代谢紊乱。发酵产生的挥发性脂肪酸吸收后通过糖异生或直接氧化供能方式参与动物机体的供能，丙酸则是主要的生糖前质。瘤胃液中 pH 值会影响瘤胃内微生物菌群组成，保持稳定的瘤胃液 pH 值对瘤胃发酵功能至关重要，而 pH 值主要受饲料结构引起的发酵模式的影响。本研究中，围产期内 pH 值、氨态氮、乙酸、丙酸、丁酸水平没有变化，但乳酸水平显著增加，这与奶牛中的变化相同。微生物制剂饲喂增加瘤胃液中乙酸和丙酸的水平，并降低乳酸水平，对 pH 值、氨态氮和丁酸浓度无影响，结果与酮病奶牛和亚急性、急性瘤胃酸中毒的奶牛添加微生物制剂结果相同。泌乳奶牛饲喂酿酒酵母也可以增加瘤胃液中丁酸的浓度。瘤胃液中乳酸浓度过高是由于相应产乳酸产生菌过量增殖产生的，而过多乳酸会引起瘤胃酸中毒导致机体代谢紊乱。围产期内牦牛瘤胃液中乳酸水平增加，微生物制剂可

以显著减少乳酸水平并增加乙酸和丙酸的水平，说明微生物制剂可能通过增加乳酸的利用，增加丙酸等生糖前体的供给，改善围产期的代谢紊乱。

瘤胃发酵产物的质量和数量取决于瘤胃微生物的种类和活性，瘤胃微生物生态系统非常多样化。反刍月形单胞菌和埃氏巨型球菌是瘤胃中主要的丙酸生成菌，也是发酵乳酸生成挥发性脂肪的优势菌，其中反刍月形单胞菌占瘤胃总细菌数量的 51%。本研究中，微生物制剂可以显著增加反刍月形单胞菌数量，但对埃氏巨型球菌数量没有影响。Nisbet 等研究表明，日粮中添加啤酒酵母可以增加瘤胃中反刍月形单胞菌数量，进而增加瘤胃中挥发性脂肪酸的浓度，尤其是丙酸的浓度。瘤胃中 70% 的乳酸是由埃氏巨型球菌发酵分解，并以丙酸为最终产物。产后奶牛灌服埃氏巨型球菌可以改变发酵方式，显著增加瘤胃中挥发性脂肪酸的浓度，尤其是丙酸的浓度，改善机体的代谢。但本研究中，微生物制剂对围产期瘤胃中埃氏巨型球菌没有影响。在体外试验中，白色瘤胃球菌生长过程中会分泌出一些抑制因子，对黄色瘤胃球菌的增殖起到排斥作用，但当环境内反刍月形单胞菌占优势时，黄色瘤胃球菌即会表现出更明显的生长优势。而本研究中黄色瘤胃球菌水平降低，可能是白色瘤胃球菌和反刍月形单胞菌共同作用的结果。栖瘤胃普雷沃氏菌是瘤胃中的优势菌群，它在瘤胃中是数量最多的蛋白质降解菌，表明微生物制剂可能对瘤胃内蛋白质的消化代谢产生影响。

## 4 结论

围产期牦牛饲喂微生物制剂可以降低血液中  $\beta$ -羟丁酸浓度；降低瘤胃液中乳酸浓度，增加丙酸浓度；显著增加反刍月形单胞菌种栖瘤胃普雷沃氏菌数量，降低黄色瘤胃球菌数量。

## 2020年1-4月有关产品进出口情况

### 一. 进口

单位：千克，美元

序号	品名	4月份		1-4月份	
		数量	金额	数量	金额
1	玉米,种用除外	886,972,138	190,267,594	2,137,624,434	456,239,484
2	小麦淀粉	57,800	37,140	904,825	416,766
3	玉米淀粉	293,697	335,474	1,658,749	1,556,158
4	马铃薯淀粉	2,085,900	1,801,330	10,317,534	9,345,092
5	木薯淀粉	334,142,355	134,180,401	969,682,659	397,496,542
6	未列名淀粉	2,273,699	1,172,692	5,678,687	3,080,242
7	菊粉	273,440	672,426	1,187,649	2,826,440
8	粗甘油;甘油水及甘油碱液	105,327,981	22,074,729	397,156,149	85,092,763
9	砂糖	31,270,612	13,147,011	99,807,958	41,203,105
10	绵白糖	20,445	9,251	555,445	209,322
11	无水乳糖,重量计干燥状态的乳糖含量≥99%	5,601,610	4,967,947	22,995,143	20,811,921
12	其他乳糖及乳糖浆	1,277,477	2,301,196	5,786,415	9,343,265
13	槭糖及槭糖浆	15,982	107,270	46,443	366,025
14	葡萄糖及葡萄糖浆,果糖<20%	374,881	459,802	882,827	1,526,283
15	葡萄糖及糖浆,20%≤果糖<50%,转化糖除外	20,050	34,513	129,216	143,891
16	化学纯果糖	20,185	31,675	822,596	818,609
17	果糖及果糖浆,果糖>50%,转化糖除外	326,447	643,050	1,304,164	2,086,715
18	其他固体糖及未加香料或着色剂的糖浆	126,053,570	47,779,286	294,824,358	113,202,552
19	活性酵母	81,351	1,117,691	345,044	3,231,251
20	非活性酵母;已死的其他单细胞微生物	52,707	670,119	268,284	2,753,665
21	发酵粉	9,625	33,996	21,788	137,366
22	味精	31,855	131,015	377,749	1,442,113
23	未列名二元醇	17,296,211	24,304,104	73,325,767	98,678,486
24	季戊四醇	226,002	333,762	1,051,137	1,675,206
25	甘露糖醇	37,532	305,007	114,535	857,071
26	山梨醇	179,192	233,944	712,692	1,197,023
27	丙三醇(甘油)	49,183,724	22,790,890	139,674,931	66,101,230
28	木糖醇	6,553	69,627	7,104	75,710
29	其他多元醇	54,559	199,639	789,231	1,141,184
30	肌醇	4,798	153,067	12,560	367,006
31	草酸	7,545	82,918	31,311	343,042
32	其他无环多元羧酸及其酸酐等及其衍生物	269,776	1,824,324	1,252,863	7,272,157
33	乳酸及其盐和酯	861,948	1,773,591	5,199,520	8,647,996
34	酒石酸	60,296	333,876	82,237	450,520
35	酒石酸盐及酒石酸酯	157	19,406	34,505	300,908
36	柠檬酸	418,437	952,545	667,014	1,847,280
37	柠檬酸盐及柠檬酸酯	153,238	918,772	367,916	2,411,232

(续上表)

序号	品名	4 月份		1-4 月份	
		数量	金额	数量	金额
38	葡糖酸及其盐和酯	37,428	140,835	160,302	628,138
39	赖氨酸	32	2,169	24,905	312,956
40	赖氨酸酯及盐	70,165	162,704	270,297	643,422
41	谷氨酸	2,134	30,094	4,559	63,100
42	谷氨酸钠	10,107	64,690	30,223	143,451
43	其他谷氨酸盐	257	1,949	1,358	95,153
44	未列名氨基酸	677,160	5,763,387	3,004,469	24,384,285
45	其他氨基酸酯及盐	280,897	924,363	919,037	3,607,505
46	糠醇及四氢糠醇	863	5,183	118,518	252,895
47	未混合的维生素 C 及其衍生物	6,740	518,958	41,811	1,936,587
48	未混合的维生素 E 及其衍生物	221,748	3,888,146	1,812,059	21,895,511
49	木糖	3,000	10,535	3,000	10,535
50	其他化学纯糖, 但蔗糖 / 乳糖 / 麦芽糖 / 葡萄糖及果糖除外; 糖醚 / 糖缩醛 / 糖酯及其盐	297,692	986,841	1,764,016	4,158,565
51	糊精及其他改性淀粉	41,791,357	38,611,403	131,940,006	128,549,506
52	以淀粉 / 糊精或其他改性淀粉为基本成分的胶	12,843	29,445	23,307	55,864
53	粗制凝乳酶及其浓缩物	4,155	83,600	18,382	323,191
54	碱性蛋白酶	134,137	969,488	610,062	3,727,975
55	碱性脂肪酶	173	51,182	318	81,422
56	未列名的酶; 未列名的酶制品	825,586	19,915,208	3,370,521	70,693,036
57	编号 2905.4400 以外的山梨醇	1,908	10,845	6,535	33,686

## 二. 出口

单位: 千克, 美元

序号	品名	4 月份		1-4 月份	
		数量	金额	数量	金额
1	玉米, 种用除外	384,200	29,015	1,929,970	523,686
2	小麦淀粉	387,423	194,377	110,742,515	36,450,490
3	玉米淀粉	87,126,899	28,830,668	220,631,992	73,049,344
4	马铃薯淀粉	88,148	106,634	373,729	378,381
5	木薯淀粉	45,414	43,004	3,473,953	3,288,239
6	未列名淀粉	3,469,098	3,571,104	8,875,052	8,807,966
7	菊粉	66,820	234,665	371,195	1,569,675
8	粗甘油; 甘油水及甘油碱液			0	0
9	砂糖	4,518,323	2,010,783	24,518,848	10,485,290
10	绵白糖			545,100	212,110
11	无水乳糖, 重量计干燥状态的乳糖含量 $\geq 99\%$	1,500	9,000	1,600	10,150
12	其他乳糖及乳糖浆	9,050	32,008	63,860	188,812
13	械糖及械糖浆	0	28	0	28
14	葡萄糖及葡萄糖浆, 果糖 $< 20\%$	83,246,974	35,518,010	314,912,031	136,374,577
15	葡萄糖及糖浆, $20\% \leq$ 果糖 $< 50\%$ , 转化糖除外	93,763	85,023	2,051,821	989,889

(续上表)

序号	品名	4 月份		1-4 月份	
		数量	金额	数量	金额
16	化学纯果糖	145,800	214,098	936,000	987,717
17	果糖及果糖浆,果糖>50%,转化糖除外	16,788,198	6,231,153	79,799,216	28,621,849
18	其他固体糖及未加香料或着色剂的糖浆	50,516,679	33,071,195	188,096,679	121,280,249
19	活性酵母	11,465,600	24,539,862	38,784,535	82,152,973
20	非活性酵母;已死的其他单细胞微生物	3,599,047	8,087,657	9,767,309	22,226,025
21	发酵粉	1,603,631	1,830,303	3,763,438	4,801,622
22	味精	1,569,039	1,604,273	6,924,944	6,956,424
23	未列名二元醇	4,109,281	8,403,123	20,594,951	39,419,180
24	季戊四醇	2,874,708	4,505,719	16,365,300	26,128,855
25	甘露糖醇	1,065,080	2,500,307	3,602,275	8,476,188
26	山梨醇	8,521,241	6,115,252	37,729,168	27,637,645
27	丙三醇(甘油)	602,009	562,356	1,557,893	1,559,195
28	木糖醇	3,955,932	13,219,957	15,648,148	53,306,519
29	其他多元醇	4,500,810	9,983,041	14,049,560	31,570,429
30	肌醇	955,443	3,405,521	2,555,497	8,647,817
31	草酸	7,756,686	4,439,446	36,502,849	20,279,961
32	其他无环多元羧酸及其酸酐等及其衍生物	8,022,250	25,562,025	31,670,051	97,331,768
33	乳酸及其盐和酯	4,721,059	6,261,836	16,208,056	22,170,000
34	酒石酸	5,288,655	11,100,302	16,613,724	35,208,704
35	酒石酸盐及酒石酸酯	271,059	1,098,356	694,304	3,098,483
36	柠檬酸	99,901,047	61,271,303	384,400,888	226,521,168
37	柠檬酸盐及柠檬酸酯	21,264,931	16,294,669	83,228,564	62,755,722
38	葡糖酸及其盐和酯	13,597,846	9,704,159	76,112,628	46,333,895
39	赖氨酸	12,040	143,275	51,155	575,813
40	赖氨酸酯及盐	82,795,805	75,248,830	282,308,261	244,000,032
41	谷氨酸	9,033,448	9,026,602	29,066,419	28,964,163
42	谷氨酸钠	59,373,215	52,569,327	252,198,317	227,964,579
43	其他谷氨酸盐	51,505	347,836	90,438	467,691
44	未列名氨基酸	21,276,994	67,443,909	79,215,614	245,071,353
45	其他氨基酸酯及盐	13,557,137	32,002,967	47,179,438	103,127,299
46	糠醇及四氢糠醇	5,051,177	6,732,623	22,244,657	31,778,246
47	未混合的维生素 C 及其衍生物	20,106,684	71,656,788	69,769,630	217,656,932
48	未混合的维生素 E 及其衍生物	8,899,736	72,647,508	28,154,611	204,585,000
49	木糖	1,979,501	4,709,694	6,744,180	15,976,977
50	其他化学纯糖,但蔗糖/乳糖/麦芽糖/葡萄糖及果糖除外;糖醚/糖缩醛/糖酯及其盐	3,387,599	11,852,753	14,138,461	43,809,625
51	糊精及其他改性淀粉	8,581,050	7,772,507	29,429,729	27,344,071
52	以淀粉/糊精或其他改性淀粉为基本成分的胶	595,484	508,547	2,118,404	1,580,790
53	粗制凝乳酶及其浓缩物	16,170	42,732	34,592	106,352
54	碱性蛋白酶	36,648	392,702	231,364	2,487,492
55	碱性脂肪酶	2,375	55,000	40,931	339,850
56	未列名的酶;未列名的酶制品	6,976,036	33,116,231	28,786,203	127,172,456
57	编号 2905.4400 以外的山梨醇	7,724,920	3,653,103	34,681,212	16,097,396

(以上表格内容未经许可不得转载)

## 中国生物发酵产业协会关于组织申报 第二批中国轻工业工程技术研究中心认定工作的通知

中生发协 [2020] 36 号

### 各相关单位：

根据《关于开展第二批中国轻工业工程技术研究中心认定的通知》（中轻联综合 [2020] 138 号）文件的要求，协会组织会员单位申报中国轻工业工程技术研究中心，现转发通知如附件。请各申报单位按照申报书填写说明的具体要求，组织填写申报书和报送相关申报材料。

请申请单位认真填写《中国轻工业工程技术研究中心申请书》（详见附件 2），并附相关证明材料，经负责人签字盖章。申请材料一式 4 份，同时报送电子版（光盘），应根据申报书填写说明的要求按顺序排列，且与书面版本一致。

请各申报单位于 2020 年 7 月 30 日前，将申报材料的书面版和电子版统一报送至中国生物发酵产业协会，按照择优的原则推荐。对于此前已经被认定为国家或行业企业技术中心、工程技术研究中心、重点实验室、专项技术中心等的依托单位，协会将优先推荐。

联系人：莫小曼

联系电话：010-68396571

E-mail: mxm@cfia.org.cn

联系地址：北京西城区阜成门外大街乙 22 号 502 室

邮政编码：100833

附件：关于开展第二批中国轻工业工程技术研究中心认定工作的通知（中轻联综合 [2020] 138 号）

- 1、中国轻工业工程技术研究中心认定及管理办法（暂行）
- 2、中国轻工业工程技术研究中心申请书

中国生物发酵产业协会  
2020 年 6 月 2 日

附件 1

## 中国轻工业工程技术研究中心认定及管理办法 (暂行)

### 第一章 总则

第一条为了规范和加强中国轻工业工程技术研究中心(以下简称“工程中心”)的认定与运行管理,充分发挥其在工程化研究开发,科技成果转化方面的作用,特制定本管理办法。

第二条认定中国轻工业工程技术研究中心,旨在落实新发展理念,建立健全以企业为主体、市场为导向、产学研相结合的技术创新体系,为推进供给侧结构性改革和行业高质量发展提供技术支撑。

第三条工程中心主要依托轻工行业内创新型企业、高新技术企业等综合实力和创新能力较强的科技型企业建设,要求具有较完备的工程技术综合配套试验条件,能够提供多种综合性服务,同时具有自我良性循环发展机制的科技开发实体。

#### 第四条工程中心的主要任务

(一)根据我国轻工相关行业的发展现状,开展重大共性与关键技术的工程化研发,为产业化提供成熟、配套的技术、标准、工艺、装备和新产品,提升行业、领域的技术创新能力。

(二)综合运用国内外创新资源,开展多层次、多形式、多领域的技术交流与合作。注重产学研相结合,与高校和科研机构建立长期、稳定的合作关系,提高承接重大科技项目的能力。

(三)培养、聚集相关专业的高层次的工程技术人才和管理人才,为本行业、企业提供工程技术人才培养。

(四)开展多种形式的国际、国内科技合作与交流,开展相关的标准制定工作和行业信息服务,促进行业、领域的技术发展。

### 第二章 管理机构及其职责

第五条中国轻工业联合会是工程中心的归口管理部门,主要职责是:

(一)制定和颁布实施工程中心管理办法,及其相关规章制度与实施细则,指导工程中心的建设与运行。

(二)批准工程中心的建立、调整和撤销,组织工程中心的评估和检查,指导协调工程中心之间的协同合作。

第六条依托单位作为工程中心的建设与运行管理的具体负责单位,主要职责是:

(一)优先支持工程中心的发展建设,协调解决组建及运行期间存在的相关问题,并提供必要的人、财、物等保障条件。

(二)聘任工程中心主任和技术委员会主任。

(三)对工程中心进行年度考核,并将考核报告上报中国轻工业联合会,协助中国轻工业联合会做好评估等工作。

### 第三章 申报与条件

第七条凡符合组建工程中心的总体规划和布局原则,拟申报承担组建任务的单位,应具备以下基本条件:

(一)依托单位须在中华人民共和国境内注册、具有独立法人资格,其中企业应在国内建有生产、科研基地。

(二)工程中心名称、研发方向、研发内容合理,依托单位在本行业领域内的技术水平处于领先地位,拥有较好的工程技术研究、设计基础和丰富的成果转化背景及经验。

(三)具有学术水平高、工程化实践经验丰富的工程技术带头人;拥有一定数量和较高水平的工程技术研究和工程设计人员,其中专职研发人员不少于 20 人,拥有硕士学位或中级职称以上人员不低于 30%;有能够承担工程试验任务的熟练技术工人。

(四)具备工程技术试验条件和基础设施,有必要的检测、分析、测试手段和工艺设备,且设备原值应当不低于 300 万元。

(五)拥有较强的科研资产和经济实力,有筹措资金的能力和信誉。

第八条具备基本条件并符合认定通知要求的工程中心,其依托单位为中国轻工业联合会会员单位的直接申报,其它单位需经有关国家级轻工行业协会及省、自治区、直辖市、计划单列市轻工行业组织审核推荐至中国轻工业联合会。

第九条行业优势企业、科研院所、高等学校、社会投资机构可联合申请工程中心,联合组建的工程中心须附有联合组建协议书。

### 第四章 认定与授牌

第十条工程中心依照“自愿申请,择优认定”的原则进行认定。

第十一条中国轻工业联合会组织专家对依托单位提交的《中国轻工业联合会工程技术研究中心申请书》进行评审。根据专家组评审意见，确定工程中心认定建议名单，按程序予以公示。

第十二条对公示中无异议或异议不成立的工程中心，经会长办公会审定，正式认定为工程技术研究中心，并颁发证牌。工程技术研究中心统一命名为“中国轻工业 XXXX 工程技术研究中心（依托单位）”，英文名称为“Engineering Technology Research Center of XXXX（依托单位的英文名称），China National Light Industry Council”。其中，XXXX 为工程中心研究方向。

### 第五章运行与管理

第十三条工程中心在国家产业政策和技术政策的指导下，实行开放、流动的运行机制，主要面向相关行业、企业承接工程化研究开发任务。

第十四条工程中心实行主任负责制，负责中心的全面工作，并设立一名专职副主任，负责中心的日常管理工作，工程中心主任实行聘任制。

第十五条工程中心应成立专家技术委员会，负责制定有关发展方向、规划计划，审议有关工程技术研究开发年度工作计划，评价工程设计试验方案，提供技术经济咨询及市场信息等。

第十六条工程中心应建立健全各项内部管理制度和运行机制，依托单位聘任的工程中心主任和专家技术委员会主任需报送中国轻工业联合会备案，中国轻工业联合会定期组织召开工程中心工作交流会。

第十七条工程中心应加强知识产权的保护，对工程中心完成的专著、论文、软件等研究成果均应署工程中心名称，专利申请、成果转让、申报奖励按有关规定办理。

第十八条工程中心建设采取多元化的投入机制，经费来源主要依靠依托单位，工程中心应多渠道筹措研究与管理经费。工程中心的日常费用由中心、依托单位自筹，鼓励吸引社会力量投资工程中心建设。

### 第六章考核与评估

第十九条依托单位应对工程中心进行年度考核，考核情况应于下一年度 3 月 31 日前报中国轻工业联合会备案。

第二十条中国轻工业联合会对工程中心每三年进行一次定期评估，主要对工程中心前三年的整体运行状况进行综合评价，指标包括研究水平与贡献、队伍建设与人才培养、开放交流与运行管理等。

第二十一条工程中心应于三年评估当年 3 月 1 日前将评估材料报中国轻工业联合会。中国轻工业联合会组织专家对上报的评估材料及相关情况进行核查，形成评估意见。

第二十二条有以下情况之一的视为评估不合格：

- （一）评估专家组认定评估材料不合格。
- （二）无特殊原因，逾期一年不上报年度考核材料。
- （三）无特殊原因，逾期一个月不上报三年定期评估材料。
- （四）上报材料内容严重不实或者数据存在虚假。
- （五）有重大违规、违法行为。

第二十三条中国轻工业联合会根据三年评估意见，结合考核情况，确定工程中心评估结果并向社会公布；评估不合格的工程中心撤销其资格。

### 第七章附则

第二十四条本办法自颁布之日起实施。

第二十五条本办法由中国轻工业联合会负责解释。

附件 2

## 中国轻工业工程技术研究中心 申请书

工程中心名称： \_\_\_\_\_

申请单位： \_\_\_\_\_ (公章)

推荐单位： \_\_\_\_\_ (公章)

中国轻工业联合会

二〇二 年 月 日

工程中心基本信息表

工程中心名称				专业领域	
申请单位名称（联合申报要写所有单位）				牵头单位类别	企业 高校 院所
负责人		手机		电话	
联系人		手机		电话	
电子邮件				传真	
通信地址				邮编	
主要研究领域					
基础设施情况	中心面积		M <sup>2</sup>	主要实验检测仪器	台（套）
人员情况	人员总数（人）	高级职称（人）	中级职称（人）	院士（人）	长江学者、国家杰出青年科学基金资助的人才、“千人计划”人才（人）
					省部级学术带头人（人）
	2019 年		2018 年	2017 年	总计
牵头申请单位主营业收入额（万元）					
科研经费额（万元）					

发明专利授权 (项)				
实用新型授权 (项)				
获国家科学技术奖 (项)				
获省部级奖 (项)				
获行业奖 (项)				
科技论文 (篇)				
其中 SCI 论文 (篇)				
其中 EI 论文 (篇)				
举办学术会议 (次)				
新增国家科研课题 (项)				
新增地方科研课题 (项)				
新增自立科研课题 (项)				

注：专利、奖励、学术会议、科研课题需与申请成立的行业工程中心相关。

## 申请书提纲

### 一、组建工程中心的背景和意义

本技术领域的确切含义；重要性（中心所在行业对国民经济和社会发展的作用；中心所处技术领域在行业发展中的地位和作用等）；必要性（组建中心的需求和意义进行分析）；预期经济效益和对行业进步的带动作用

### 二、国内外最新技术进展、发展趋势、研究开发及产业化现状（重点是工程中心主要研究领域）

技术发展趋势；国外情况；国内情况及与国外差距；相关知识产权情况；市场需求及效益分析

### 三、工程中心研发方向及实施方案（重点是拟开展的相关工作）

### 四、现有研究基础和条件

工程技术人才队伍（包括中心带头人情况）；工程技术试验条件、基础设施和设备；研究开发活动状况及效益；科研成果、专利发明及获奖；与其它企业、科研院所、大专院校合作情况；国家、省市、部门的具体支持方式和外部环境状况；已组建的同类国家级、省部级工程中心运行情况。

### 五、预期建设目标、投资规模、组建经费预算及投资来源

## 六、依托单位意见

单位（印章）：

负责人（签字）：

年 月 日

## 七、推荐单位意见

单位（印章）：

负责人（签字）：

年 月 日

**附表 1：工程中心人员名单**

序号	姓名	性别	出生年月	技术职称	文化程度	工作单位	工程中心 职务
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							

**附表 2：工程中心现有设备明细表（出厂价格超过 5 万元的列入）**

序号	设备名称	产地	规格、型号	出厂时间	出厂价格	生产厂商
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						

**其他附件：**

- 1、各申请单位营业执照或事业单位法人证书复印件
- 2、长江学者、获得国家杰出青年科学基金资助的人才、入选“千人计划”人才需提供证明文件
- 3、场地确认文件（需确定本次申请工程中心的面积和分布情况）
- 4、前一年科研投入确认文件
- 5、近三年科技立项、科技论文、专利、科技成果、科技奖励、组织学术交流、设备共享、成果转让、引进人才、参与或主持制定国家和行业标准、培养和提供行业人才证明文件。（以上材料需与本次申请工程中心相关）
- 6、相关规划制度文件，需有依托单位公章
- 7、与其他单位的合作证明材料及联合申报协议
- 8、申报材料真实性承诺声明

## 关于征集氨基酸及相关产业 2020-2021 年度 国家标准、行业标准及团体标准制修订建议的通知

### 各氨基酸生产企业及相关单位：

我国氨基酸行业标准的缺失严重制约了行业的发展，为此，“中国生物发酵产业标准化技术委员会氨基酸分会”（简称“氨基酸分会”）于2017年6月正式成立，旨在弥补我国氨基酸产业在政策及标准等方面的不足，为企业的发展保驾护航。“氨基酸分会”成立至今，先后组织氨基酸行业相关企业开展了《取水定额 第9部分 味精制造》、《取水定额 第xx部分 赖氨酸盐制造》等国家标准，《三支链氨基酸》、《L-谷氨酰胺》等行业标准，《绿色设计产品评价技术规范 氨基酸》、《氨基酸行业绿色工厂评价要求》、《食品加工用氨基酸》、《食用氨基酸制品》、《氨基酸饮料》、《液体味精（液体谷氨酸钠）》等团体标准的制修订工作。其中，《食品加工用氨基酸》团体标准荣获工信部“2019年团体标准应用示范项目”荣誉。

根据氨基酸产业发展需要，现针对氨基酸及相关产业征集2020-2021年度国家标准、行业标准及团体标准制修订建议，具体要求如下：

### 一、申报范围

围绕氨基酸及相关产业的发展需求、未来发展方向等开展申报工作：

- 1、国家标准：氨基酸产业基础、通用、管理、方法等。
- 2、行业标准：氨基酸产品及方法等。
- 3、团体标准：（1）已有国家标准、行业标准，但需要更加规范并与国际接轨的产品及相关标准；（2）没有国家标准、行业标准，但行业亟需的产品及相关标准；（3）定制专用标准。

### 二、申报时间

根据标准申报情况，与联系人具体协商。

### 三、联系方式

联系人：关丹

电话：010-68396573

邮箱：gd1104@163.com

附件：1、国家标准立项建议申报材料；2、食品安全国家标准立项建议书；3、行业标准立项建议申报材料；4、团体标准立项建议申报材料。（附件详见 [www.cfia.org.cn](http://www.cfia.org.cn)）

中国生物发酵产业协会氨基酸分会

2020年2月13日

## 中国生物发酵产业协会入会申请书

为促进我国生物发酵产业的发展，我单位自愿申请加入中国生物发酵产业协会。承认协会章程和遵守有关规定，履行会员义务，执行理事会的决议。愿意在协会中为推动我国生物发酵行业的振兴和发展做出贡献。

申请单位 \_\_\_\_\_ (公章)

单位法人代表：(签章)

年 月 日

协会意见：

年 月 日

# 30 周年庆

中国生物发酵产业协会



## 2020 第八届上海国际 生物发酵产品与技术装备展览会

2020.8.26-28 || 上海新国际博览中心

新产品

新工艺

新技术

新装备

生物技术 融合·助力 发酵产业

40000  
平方米

800+  
展商

26  
场行业论坛  
及活动



扫描二维码加关注了解更多

021-57617459

E-mail: bioexpo@163.com

诚邀：生物工程、细胞工程、基因工程、微生物、食品、食品添加剂、酒、饮料、乳制品、动植物提取物、医药、生物饲料、生物肥料、生物农药、高校与科研机构等行业人士参观、参会