

## 研究报告



## 角蛋白酶水解豆粕的微生物多样性分析

于海涛 周智旋 陆文清\*

中国农业大学农业部饲料工业中心 北京 100193

**摘要:**【背景】酶解饲料底物在酶解至干燥过程中微生物的变化影响着酶解饲料的营养成分以及风味的改变,从而影响动物对其进行采食、消化和吸收,最终影响动物肠道健康。【目的】探究两种酶解物料(纯豆粕和豆粕麦麸混合物)在酶解至干燥过程中的微生物多样性变化。【方法】实验室条件下,采用平板计数法测定物料总细菌数、总霉菌和酵母菌数变化。中试条件下,采用 16S rRNA 基因和 ITS rDNA 的高通量测序,检测物料中细菌和真菌多样性随酶解时间(0–36 h)的变化。【结果】酶解前后的平板计数结果显示,加入角蛋白酶处理 24 h 后,两种物料中的细菌数量相对于原料提升了 1 000–10 000 倍。而经过风干过后,细菌和真菌的数量较风干前下降 90%–99%。通过 MiSeq 平台的 16S rRNA 基因和 ITS rDNA 测序结果表明,两种酶解豆粕均具有相似的  $\alpha$  多样性指标,微生物丰富度水平相近。然而,16S rRNA 基因测定的  $\beta$  多样性结果显示, *Fructobacillus* 属和魏斯属(*Weissell*) 在 36 h 的酶解进程中成为优势菌属;纯豆粕酶解物中的 *Fructobacillus* 属在数量上更占优势,豆粕麦麸混合酶解物中则魏斯属更具数量上的优势。ITS rDNA 测定的  $\beta$  多样性结果显示,纯豆粕酶解物中曲霉属(*Aspergillus*)一直占据着数量上的绝对优势,而豆粕麦麸混合酶解物中链格孢属(*Alternaria*)、赤霉属(*Gibberella*)和曲霉属(*Aspergillus*)则在前 18 h 相对含量较高,但随着时间的延长相对数量减少;毕赤酵母属(*Pichia*)和酵母属(*Remersonia*)逐渐占据数量上的优势。【结论】小麦麸作为酶解豆粕辅料能够改变酶解豆粕中的微生物多样性,并使其中的微生物生长更偏向于魏斯属细菌和酵母类真菌。

关键词: 豆粕, 小麦麸, 酶解, 多样性, 细菌

## Microbial diversity of soybean meal hydrolysate treated by keratinase

YU Hai-Tao ZHOU Zhi-Xuan LU Wen-Qing\*

Ministry of Animal and Feed Industry Center, China Agricultural University, Beijing 100193, China

**Abstract:** [Background] The nutritional value and flavor of feed ingredient was improved after fermentation and keratinase hydrolysis because microbiota compositions in the enzymolytic feed can be altered. In addition, enzymolytic soybean meal has significant improvements in growth performance and intestinal health. [Objective] Therefore, in this study, enzymolytic soybean meal (ESBM) was produced by fermentation and keratinase hydrolysis. The aim of this study was to explore the effect of two kinds of

Foundation item: National Key Research and Development Program of China (2016YFD0501308)

\*Corresponding author: E-mail: luwq196825@126.com

Received: 05-04-2018; Accepted: 20-08-2018; Published online: 09-11-2018

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFD0501308)

\*通信作者: E-mail: luwq196825@126.com

收稿日期: 2018-04-05; 接受日期: 2018-08-20; 网络首发日期: 2018-11-09

ESBM (keratinase hydrolyzed soybean meal (KHS) and keratinase hydrolyzed SBM with 30% inclusion of wheat bran (KHS-WB) on the microbiota diversity in the process of hydrolysis to drying. **[Methods]** First of all, the numbers of total bacteria, total mildew and yeast were measured by plate counting in laboratory. Additionally, Illumina MiSeq sequencing of 16S rRNA gene and ITS rDNA were employed to test the bacterial and fungal diversity dynamics of hydrolysis samples (0–36 h) in the pilot experiment. **[Results]** The plate counting result showed that the numbers of bacteria of two kinds of ESBM were 1 000–10 000 times higher than that of raw materials after treated with keratinase for 24 h. However, after drying, the counts of bacteria and fungi of ESBM were significantly decreased by 90%–99% than that of before drying. Moreover, the Illumina MiSeq sequencing results of 16S rRNA gene and ITS rDNA indicated that two kinds of ESBM had a similar alpha diversity index and microflora richness level. Additionally, the beta diversity of 16S rRNA sequencing result showed that *Fructobacillus* in KHS and *Weissella* in KHS-WB kept sustainable growth, occupied the privilege and became dominant bacterial genus (36 h), respectively. The results of ITS rDNA sequencing demonstrated that *Aspergillus* occupied the privilege in all genus of KHS while the diversity of dominant fungi was more abundant of KHS-WB in the process of hydrolysis. **[Conclusion]** Wheat bran as ESBM substrate can influence the microbiota diversity of ESBM, as well as the *Weissella* and yeast fungi will be the diversity of dominant microbes in the ESBM.

**Keywords:** Soybean meal, Wheat bran, Enzymolysis, Diversity, Bacteria

豆粕是目前应用最广泛的植物蛋白饲料原料, 具有粗蛋白质含量高、氨基酸组成平衡的特点, 能够满足动物体的蛋白质需要<sup>[1]</sup>。目前, 许多研究已经将应用蛋白酶作为降解大豆蛋白的重要手段<sup>[2]</sup>。Panda 等<sup>[3]</sup>研究表明, 蛋白酶对大豆蛋白的体外降解并不总是降低其生物学致敏性。大豆蛋白的降解具有蛋白酶特异性, 不同的蛋白酶会作用于不同的大豆蛋白亚基或结构, 并最终反映到对动物的致敏性差异上, 从而影响着动物对营养物质的消化吸收、肠道微生物以及免疫功能<sup>[4-6]</sup>。

角蛋白酶由于能降解角蛋白和高角蛋白含量的生物质(如动物毛发)而得名。Williams 等<sup>[7]</sup>分离得到了一株能够降解羽毛的细菌——地衣芽孢杆菌 PWD-1 (*Bacillus licheniformis* PWD-1)。此后, 产自地衣芽孢杆菌 PWD-1 的角蛋白酶被发现能够促进肉仔鸡生长<sup>[8]</sup>。Wang 等<sup>[2]</sup>研究表明, 在日粮中添加 500 g/t 角蛋白酶能够促进动物生长和营养吸收, 但是其机制尚未明确。作为农作物加工副产品和饲料原料, 因为经过了破碎和高温(物理方法)导致自然状态下植物组织的降解, 从而更容易被微生物定殖。酶解作为一种能够破坏植物的手段, 同样可能会导致物料结构被降解从而容易滋生有害菌。在以

往关于酶解豆粕的研究或应用中, 往往忽视了其中微生物的影响作用, 马慧慧<sup>[9]</sup>探究了产毒素的菌株在不同饲料原料上产生黄曲霉毒素 B1 的速度和位点, 结果发现, 经过破碎和高温灭菌后的大豆和小麦要比未经过处理的籽实更容易滋生黄曲霉, 大豆和小麦相较于豆粕和小麦麸也更容易产生黄曲霉毒素 B1, 造成该差异的根本原因是物料中营养物质的分布, 豆粕和小麦麸相较于大豆和小麦籽实分别损失了很大一部分脂质和碳水化合物, 而经过破碎和高温处理后的物料结构受到破坏, 霉菌更容易利用颗粒内部的营养物质。因此, 可以推测豆粕经过角蛋白酶处理后, 大分子的蛋白被降解为多肽或氨基酸, 更易于被微生物利用。在酶解饲料的实际中试生产过程中, 发酵底物原料也未经过任何处理, 因此酶解过程的微生物防控十分重要, 以避免酶解豆粕的安全隐患。

目前, 酶解豆粕主要应用在幼龄动物和水产饲料领域。陈乃松等<sup>[10]</sup>用多种大豆制品替代欧洲鳗饲料中的鱼粉作为蛋白源, 当大豆蛋白混合物在日粮中的比例 $\leq 30\%$ 时, 欧洲鳗的各项生长性能指标均未与替代鱼粉前产生显著性差异。王之盛等<sup>[11]</sup>通过体外酶解去除豆粕中的抗原蛋白, 提高了断奶仔猪的

饲料利用率。近年来, 酶解豆粕在生产过程中还可能联合菌种发酵。魏金涛等<sup>[12]</sup>利用木瓜蛋白酶和酵母菌在 40 °C 条件下制取豆粕的液态酶解发酵物, 饲喂生长育肥猪可以提高生产性能, 降低粪中氮、磷、铜和锌的排放量。杨雪海等<sup>[13]</sup>研究豆粕液态酶解物对育雏期固始鸡生产性能、血清生化指标以及均匀度的影响, 结果表明, 豆粕液态酶解发酵物组的平均日增重显著高于无抗生素组, 而与含抗生素基础日粮组无显著性差异, 各组间均匀度也无显著性差异。

酶解过程中微生物的多样性和差异性一直在发生变化, 通过高通量测序可以监测变化概况。Illumina 公司开发的 MiSeq 测序平台有效地解决了通量低、操作复杂等问题, 目前已广泛应用于微生物群落多样性研究<sup>[14-16]</sup>。但是, 高通量测序作为基因水平的检测往往忽视了微生物个体的实际特性和环境因素, 单靠此技术并不能够说明实际问题。因此, 本研究根据实验室已探索出的酶解参数(主要是料水比、角蛋白酶添加量和麦麸添加), 扩大规模进行更贴近实际生产的酶解试验, 并于实验室条件下, 采用平板计数法测定物料总细菌数、总霉菌和酵母菌数变化; 然后于中试条件下, 通过 16S rRNA 基因和 ITS rDNA 高通量测序, 检测物料中细菌和真菌多样性随酶解时间(0-36 h)的变化情况, 从而深化小麦麸在酶解豆粕加工上的应用价值, 为酶解豆粕在养殖生产中的应用提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

耐高温角蛋白酶赛和素<sup>®</sup>DP100 (CIBENZA<sup>®</sup> DP100), 诺伟司(Novus)国际贸易(上海)有限公司; 去皮大豆粕(中国饲料号 5-10-0103, 去皮, 浸提或预压浸提 NY/T 1 级), 中粮佳悦(天津)有限公司; 小麦麸, 益海嘉里(北京)粮油食品工业有限公司; 培养基, 北京奥博星生物技术有限责任公司。电热鼓风干燥箱, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; 振动流化床干燥机, 常州市永乾机械设备有限公司

司; 温度自动记录仪, Apresys 公司; pH 仪, Hanna 公司。测序和基础分析工作由北京奥维森基因科技有限公司协助完成。

### 1.2 实验室酶解豆粕的制备

在进行正式的中试生产前, 按照本实验室特定的工艺参数制备酶解豆粕, 并用于平板计数。每个呼吸袋中装入 200 g 底物(豆粕、小麦麸或豆粕麦麸混合物), 再向其中加入 1.20 g 角蛋白酶, 混合均匀。之后, 加入 160 mL 蒸馏水, 再次搅拌均匀后, 将湿豆粕压实, 呼吸袋开口处用封口机封闭, 之后放入恒温电热培养箱中进行 25 °C 酶解反应 24 h。酶解反应结束后, 将物料置于恒温鼓风干燥箱, 以 65 °C 恒温干燥 12 h, 物料层厚度不超过 3 cm。在酶解前、酶解 24 h 以及干燥后取样, 分别选取具有代表性的 3 个样品进行总菌数的测定。

### 1.3 酶解豆粕的中试生产

中试试验于北京市平谷区的实验基地进行, 整体环境适宜制备酶解豆粕。首先备好 340 kg 豆粕、60 kg 小麦麸、320 L 清水和 2.4 kg 角蛋白酶, 按照表 1 进行试验。其中, 制备角蛋白酶酶解豆粕-纯豆粕型(Keratinase hydrolyzed SBM, KHS)需要 200 kg 豆粕、160 L 自来水和 1.2 kg 角蛋白酶; 制备角蛋白酶酶解豆粕-豆粕麦麸混合型(Keratinase hydrolyzed SBM-WB, KHS-WB)需要 140 kg 豆粕、60 kg 小麦麸、160 L 自来水和 1.2 kg 角蛋白酶。物料混匀后平均分装于塑料桶中, 压实后加盖密封。酶解过程中实时监控室内环境温度和湿度、物料中心温度和物料 pH 的变化。其中, 温度和湿度采用温/湿度自动记录仪进行记录, 每 15 min 记录一次温度(°C)和湿度(% RH), 单点连续记录 96 h; 物料中心温度为两种酶解豆粕各选取其中的一桶物料进行定点定时观测, 每 20 min 记录一次温度; 物料 pH 采用工业级的便携式 pH 计和探头对每桶物料 pH 进行不定时观测。

物料在容器中酶解结束后, 需要进行两阶段的干燥操作: 振动流化床干燥和自然晾晒。振动流化床干燥阶段是利用自然风, 通过传送带和

表 1 酶解豆粕的原料及加工参数

Table 1 The contents of ingredients and process parameters for soybean meal enzymatically

项目 Items	试验内容 Contents	
原料 Ingredients (%)	纯豆粕型 KHS	豆粕麦麸混合型 KHS-WB
豆粕 Soybean meal (%)	50.0	35.0
小麦麸 Wheat bran (%)	—	15.0
自来水 Tape water (%)	40.0	40.0
角蛋白酶 Keratinase (%)	0.3	0.3
酶解参数 Parameters of enzymolysis		
实际温度 Observed temperature	室内温/湿度和酶解物料中心(深度 25 cm)温度 Indoor temperature/humidity and enzymolysis material center (depth 25 cm) temperature	
pH	10–15 cm 深处, 物料原位 pH 测量 10 to 15 cm depth, material <i>in situ</i> pH measurement	
时间 Time	36 h <sup>a</sup>	
干燥参数 Parameters for drying		
干燥方法 Drying method	阶段干燥: 振动流化床干燥和自然晾晒 Stage drying: fluidized bed drying and air drying	
时间 Time	36 h <sup>b</sup>	
水分 Moisture	包括干燥前、流化床干燥后和晾晒后的物料水分 Including moisture prior to drying, moisture of fermented substrate after fluidized bed drying and after air drying	

注: <sup>a</sup>: 根据酶解环境的温度情况做适当调整; <sup>b</sup>: 该时间包括流化床干燥耗时 6 h、首日日照 6 h、首次回潮 12 h 和次日日照 12 h; —: 未添加。

Note: <sup>a</sup>: Making appropriate adjustments according to the temperature of the enzymolysis environment; <sup>b</sup>: This time includes fluidized bed drying time of 6 h, first day sunshine 6 h, first reversion 12 h and next day sunshine 12 h; —: No addition.

长锥体旋风分离器将湿物料充分打散均匀, 进而将物料初步干燥。总耗时约 6 h, 平均每种物料需要完整地通过传送带 2–3 次, 每种物料首次通过约耗时 1.0–1.5 h, 后续通过总耗时约 1 h。经过初步干燥后, 物料水分含量可以从 50% 下降至 30% 左右。经过至少 2 d 的晾晒, 物料进一步干燥, 成品含水量小于 10%。

## 1.4 酶解豆粕的微生物组成分析

### 1.4.1 实验室条件下酶解豆粕样品采集及微生物测定

实验室条件下, 分别测定原料、酶解物料和干燥物料的细菌、酵母菌和霉菌数量。样品采用 0.85% (质量体积比) 生理盐水进行重悬和稀释, 同时测定样品的干物质含量。取样、称样和检测等实验操作均在超净工作间内进行。涂布 3 种样品的菌悬液于营养琼脂培养基(Nutrient agar, NA), 37 °C 培养

24 h 后对所有可见菌落进行计数, 测定总细菌数; 涂布 3 种样品的菌悬液于高盐察氏琼脂培养基(Salt Czapek Dox agar, SCDA), 25 °C 培养 3 d 后开始计数所有霉菌/酵母菌特征菌落, 连续计数 7 d 并对观测的菌落形态进行鉴别和判断。

### 1.4.2 中试试验的酶解豆粕样品采集及微生物测定

中试条件下, 对两种物料进行高通量测序, 分析酶解过程中不同物料组分下细菌和真菌多样性的变化和差异。在 36 h 内共选取 5 个时间点进行采样, 分别是 0、9、18、27 和 36 h。样本采用 MiSeq 平台进行 16S rRNA 基因和 ITS rDNA 测序。

### 1.4.3 酶解豆粕中细菌的 DNA 提取与文库测序

两种不同底物的酶解豆粕细菌总 DNA 提取按照 QIAamp DNA Mini Kit 进行。以提取的细菌总 DNA 为模板, 采用通用引物 515F (5'-GTGCCAGC

MGCCGCGGTAA-3')和 806R (5'-GGACTACHVGG GTWTCTAAT-3')对 16S rDNA 的 V3-V4 区进行扩增。PCR 体系(50  $\mu$ L): 上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 2  $\mu$ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 4  $\mu$ L, 10 $\times$ Pyrobest buffer 5  $\mu$ L, Pyrobest DNA 聚合酶(2 U/ $\mu$ L) 0.3  $\mu$ L, 超纯水溶解的 DNA 36.7  $\mu$ L。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 5 min; 95  $^{\circ}$ C 30 s, 56  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 40 s, 共 25 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min; 4  $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物纯化后回收, 采用 NEB NEXT<sup>®</sup> Ultra<sup>™</sup> DNA Library Prep Kit for Illumina 进行文库的构建, 使用 MiSeq PE300 上机测序。

#### 1.4.4 测序结果分析

测序平台得到的原始数据经过数据拆分、PE Reads 拼接、Tag 过滤和去嵌合体序列得到有效 Tag。采用 Uparse 软件将样本有效 Tag 聚类成不同的操作分类单元(Operational taxonomic unit, OTU), 并进行物种注释和样品复杂程度分析。

#### 1.5 数据处理

采用 SPSS 软件及 Metastats 方法对各个处理进行数据统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 平板计数法测定酶解过程中微生物数量的变化

原料和角蛋白酶的总菌计数结果见表 2。结果表明, 豆粕中的细菌数量为小麦麸的 7.4 倍, 而酵母菌或霉菌数量不及小麦麸的 1/10; 角蛋白酶中残留有大量的细菌, 数量为 9.71 LogCFU/g, 同时这类细菌还耐受一定程度的高盐, 可以在高盐察氏琼脂上生长, 数量为 5.37 LogCFU/g。

表 2 原料的总菌计数(LogCFU/g, 干物质基础, n=3)  
Table 2 Total germs counting for ingredients (LogCFU/g, DM basis, n=3)

原料 Ingredients	营养琼脂 NA	高盐察氏琼脂 SCDA
豆粕 Soybean meal	5.07	3.09
小麦麸 Wheat bran	4.20	4.20
角蛋白酶 Keratinase	9.71	5.37

对酶解物料干燥前和干燥后的总菌计数结果见表 3。结果表明, 豆粕酶解 24 h 后, 总细菌数上升至 9.11 LogCFU/g, 总酵母菌或霉菌数上升至 6.66 LogCFU/g; 小麦麸的总细菌数则上升至 8.05 LogCFU/g, 总酵母菌或霉菌数上升至 4.97 LogCFU/g; 豆粕小麦麸混合物的上升区间位于豆粕和小麦麸之间。65  $^{\circ}$ C 干燥 12 h 后, 豆粕和豆粕小麦麸混合物中的细菌数损失约 80%和 95%, 酵母菌/霉菌数则均损失了 99%以上; 而小麦麸中细菌数损失不及 1%, 酵母菌/霉菌数损失幅度为 66%。

### 2.2 酶解过程中环境参数的监控

酶解过程中物料温度和 pH 变化见图 1。酶解过程中环境温度的变化范围在 20-27  $^{\circ}$ C, 并且随着室外温度的变化而日夜波动, 但是室内环境温度和湿度的变化都满足酶解豆粕的酶解条件, 并不对酶解过程造成影响。酶解物料温度和 pH 变化结果显示, 酶解物料中心的温度则由最初的 21  $^{\circ}$ C 缓慢上升并达到各自的稳定期和温度极值。纯豆粕酶解物(KHS)在 90 h 时达到 28.5  $^{\circ}$ C 左右的温度极值, 而豆粕小麦麸混合酶解物(KHS-WB)在 72 h 时达到 30  $^{\circ}$ C 左右的温度极值。试验中选取的酶解终点在

表 3 酶解物料干燥前和干燥后的总菌计数(LogCFU/g, 干物质基础, n=3)

Table 3 Total germs counting for enzymatic hydrolyzed substrates before and after drying (LogCFU/g, DM basis, n=3)

干燥 Drying	培养基 Mediums	豆粕 Soybean meal	小麦麸 Wheat bran	豆粕和小麦麸(7:3) SBM and WB (7:3)
干燥前 Before drying	营养琼脂 NA	9.11	8.05	8.98
	高盐察氏琼脂 SCDA	6.66	4.97	6.05
干燥后 After drying	营养琼脂 NA	8.52	8.04	7.81
	高盐察氏琼脂 SCDA	3.58	4.49	4.72

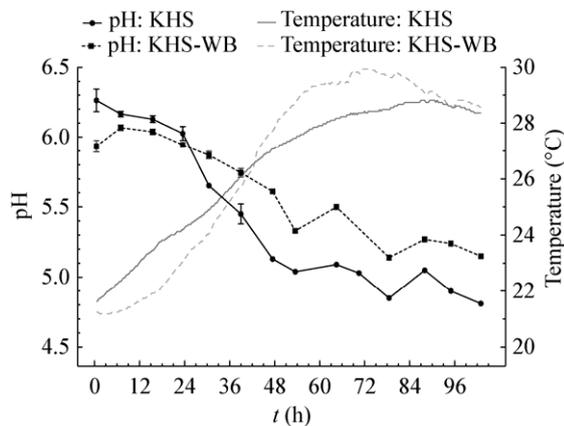


图1 酶解豆粕温度和pH的变化

Figure 1 The dynamics of pH and temperature in different enzymatic hydrolyzed soybean meal

注：酶解豆粕温度变化曲线数据采集于温度自动记录仪，pH变化曲线数据采集于便携式pH仪。黑线为pH曲线，灰线为温度曲线，实线为纯豆粕型(KHS)，虚线为豆粕麦麸混合型(KHS-WB)。温度每20 min自动记录一次，pH为间隔9 h人工测量，测量重复数均为3。

Note: The data of the temperature change curve of the soybean meal were collected by temperature automatic recorder, and the data of the pH change curve were collected in the portable pH meter. The black line is the pH curve, the gray line is the temperature curve, the solid line is the pure soybean meal type (KHS), the dashed line is the soybean meal wheat bran mixed type (KHS-WB). The temperature is recorded automatically once every 20 min, and pH is interval 9 h manual measurement. The study was measured repeatedly 3 times.

40 h左右，此时二者均处在温度的快速上升期，温度均为26°C左右。两种物料的pH由最初的5.9–6.5到40 h时下降至5.4 (KHS)和5.7 (KHS-WB)。

### 2.3 酶解豆粕含水量的变化

酶解豆粕含水量的变化见表4。中试选用的豆粕和小麦麸原料含水量均为10.8%，如果按料水比5:4 (质量比)添加实验用水，理论的物料初始

含水量为50.4%。随着酶解的进行，由于酶解物料中的微生物活动，物料含水量会略微上升。并且，需要将酶解后的物料运回实验室后进行水分测定，这期间水分还会略微上升(使用工业用水分测定仪进行物料原位测量可以消除此部分误差)。由表4可知，两种酶解豆粕在酶解之后都有不同程度的水分提升，经过初步干燥后，水分能减少约40%；而经过自然晾晒后，水分含量会下降至10%以下。

### 2.4 中试试验酶解过程中微生物多样性分析

#### 2.4.1 酶解过程中细菌和真菌测序质量评价、OTU及 $\alpha$ 和 $\beta$ 多样性指标分析

$\alpha$ 多样性指标表示的是样品中微生物的绝对丰度，而 $\beta$ 多样性则表示的是样品之间微生物相对丰度的动态性与差异性。

酶解过程中细菌和真菌的多样性变化通过Illumina MiSeq进行测序分析。表5和表6分别展示了两种酶解豆粕在酶解过程中细菌和真菌的 $\alpha$ 多样性指标。

经过数据的拆分、拼接、过滤和去嵌合体等一系列处理后，发现纯酶解豆粕的细菌多样性随着酶解时间延长呈现出先增加再减少的趋势。在第18 h原始序列达到高值，分析出有效序列共91 284条，有效性达到99.14%。不同时间点的最低有效序列超过47 770条，有效性为99.10%。酶解豆粕麦麸混合物的细菌多样性在0–27 h随着酶解时间的延长呈现出增加的趋势，于第36 h开始细菌多样性降低。在第27 h分析出有效序列98 005条，有效性达到了99.3%。以97%相似度为聚类阈值，在第18 h，两种酶解豆粕样本细菌的OTU分别为

表4 干燥过程中酶解豆粕含水量的变化(%，干物质基础，n=6)

Table 4 The changes of moisture of enzymatic hydrolyzed soybean meal in drying process (%，DM basis，n=6)

项目 Items	酶解 36 h Enzymolysis of 36 h	初步干燥，次数 Initial drying, times		自然晾晒 Natural drying
		1	2	
		纯豆粕型 KHS	53.9	
豆粕麦麸混合型 KHS-WB	51.7	36.3	31.8	5.2

表 5 样本中观测到的细菌 16S rRNA 基因的 Illumina MiSeq 测序结果和  $\alpha$  多样性指标

Table 5 Observed 16S rRNA gene Illumina MiSeq sequencing of bacteria results and alpha diversity indices in samples

样本编号 Sample ID	原始序列 Raw tags	有效序列 Effective tags	核酸数 Nucleotides	Q20 (%)	Q30 (%)	GC (%)	有效性 Effective (%)	OTU (97%)	Chao1 index	Shannon index
A0	63 459	58 817	24 635 856	98.75	94.73	54.73	98.83	72	106.25	1.78
A9	54 400	47 770	20 649 985	98.78	94.85	50.41	99.10	56	96.00	2.17
A18	113 846	91 284	39 494 471	98.78	94.94	49.31	99.14	72	91.20	1.55
A27	106 461	83 977	36 357 613	98.67	94.54	49.53	99.07	64	46.75	1.42
A36	104 798	86 188	37 274 929	98.84	95.19	49.57	99.18	59	64.00	1.44
B0	29 560	28 424	11 909 592	98.90	95.15	55.07	97.82	95	153.13	2.15
B9	39 356	36 475	15 802 015	98.73	94.68	53.70	98.12	84	107.25	2.34
B18	45 937	43 452	18 761 852	98.84	95.14	49.51	99.33	53	66.00	0.94
B27	98 005	84 413	36 463 117	98.86	95.23	49.74	99.30	68	72.30	1.46
B36	97 745	84 593	36 498 412	98.84	95.12	48.96	99.42	62	54.20	1.28

注: 样品来源于中试生产. 样品编号由酶解豆粕的类型(纯豆粕型为 A, 豆粕麦麸混合型为 B)与采集的时间点(0、9、18、27 和 36 h)组成. 有效序列将在 Qiime 平台和 Uclust 平台进行聚类分析, Q20 表示 99%精确度, Q30 表示 99.9%精确度. 表格数据为基于 97%相似度下的  $\alpha$  多样性指标, 包括操作分类单元数(Operational taxonomic unit, OTU)、Chao1 指数和香农指数(Shannon).

Note: Samples were collected in pilot production. Sample ID was made of the type of keratinase hydrolyzed SBM (A meant KHS and B meant KHS-WB) and time point of the enzymolysis (0, 9, 18, 27 and 36 h). Effective tags were used for cluster analysis in Qiime and Uclust. Different levels of effective tags were explained by Q20 as 99% accuracy and Q30 as 99.9% accuracy. Alpha diversity indices contained operational taxonomic unit (OTU), Chao1 and Shannon and based on 97% similarity.

表 6 样本中观测到的真菌 ITS rDNA Illumina MiSeq 测序结果和  $\alpha$  多样性指标

Table 6 Observed ITS rDNA Illumina MiSeq sequencing results of fungi and alpha diversity indices in samples

样品编号 Sample ID	原始序列 Raw tags	有效序列 Effective tags	核酸数 Nucleotides	Q20 (%)	Q30 (%)	GC (%)	有效性 Effective (%)	OTU (97%)	Chao1 index	Shannon index
A0	12 998 986	38 923	9 958 030	99.89	99.59	49.80	96.09	527	550.23	5.18
A9	22 712 858	67 428	17 129 452	99.89	99.60	49.15	95.82	723	659.21	5.70
A18	18 112 073	54 915	13 771 739	99.90	99.61	48.73	96.11	693	639.21	5.69
A27	17 902 878	53 516	13 602 478	99.88	99.56	48.81	95.73	658	654.01	5.80
A36	31 610 117	93 719	24 205 473	99.86	99.52	49.66	96.03	768	680.46	5.70
B0	18 461 534	57 154	14 334 742	99.90	99.62	48.05	96.62	676	736.84	5.24
B9	22 564 766	69 763	17 533 408	99.88	99.57	48.80	96.71	701	687.69	5.74
B18	27 387 388	84 827	20 933 330	99.88	99.55	48.58	96.91	772	656.27	5.74
B27	6 527 787	19 258	4 516 747	99.84	99.42	46.16	96.56	422	565.57	5.32
B36	11 180 645	32 843	8 510 912	99.86	99.50	50.51	96.55	498	628.93	5.22

注: 样品来源于中试生产. 样品编号由酶解豆粕的类型(纯豆粕型为 A, 豆粕麦麸混合型为 B)与采集的时间点(0、9、18、27 和 36 h)组成. 有效序列将在 Qiime 平台和 Uclust 平台进行聚类分析, Q20 表示 99%精确度, Q30 表示 99.9%精确度. 表格数据为基于 97%相似度下的  $\alpha$  多样性指标, 包括操作分类单元数(Operational taxonomic unit, OTU)、Chao1 指数和香农指数(Shannon).

Note: Samples were collected in pilot production. Sample ID was made of the type of keratinase hydrolyzed SBM (A meant KHS and B meant KHS-WB) and time point of the enzymolysis (0, 9, 18, 27 and 36 h). Effective tags were used for cluster analysis in Qiime and Uclust. Different levels of effective tags were explained by Q20 as 99% accuracy and Q30 as 99.9% accuracy. Alpha diversity indices contained operational taxonomic unit (OTU), Chao1 and Shannon and based on 97% similarity.

72 和 53。在第 27 h, 两种酶解豆粕样本的 OTU 分别为 64 和 68, 酶解豆粕麦麸混合物的 OTU 数大于纯酶解豆粕的 OTU 数。在 97%相似度水平下, 纯酶解豆粕的细菌 Chao1 和 Shannon 指数在第 0 h 和第 9 h 最大分别为 106.25 和 96.00 以及 1.78 和 2.17,

酶解豆粕麦麸混合物的细菌 Chao1 和 Shannon 指数在第 0 h 和第 9 h 最大分别为 153.13 和 107.25 以及 2.15 和 2.34, 均优于纯酶解豆粕(表 5)。

经过数据的拆分、拼接、过滤和去嵌合体等一系列处理后, 发现纯酶解豆粕在酶解的第 36 h 原始

序列达到高峰值,分析出有效序列共 93 719 条,其中有效率为 96.03%。随之在 97% 聚类阈值和相似度水平,OTU、Chao1 和 Shannon 值分别为 768、680.46 和 5.70。酶解豆粕麦麸混合物于酶解第 18 h 原始序列达到高峰值,分析出有效序列 84 827 条,有效性达到了 96.91%,其在 97% 聚类阈值和相似度水平,OTU、Chao1 和 Shannon 值分别为 772、656.27 和 5.74。酶解豆粕麦麸混合物的真菌多样性在 OTU、Chao1 和 Shannon 等指标上和纯酶解豆粕接近(表 6)。

#### 2.4.2 酶解过程中细菌和真菌差异性分析

图 2 和图 3 则为  $\beta$  多样性的结果。细菌 16S rRNA 基因多样性结果显示:纯豆粕型酶解豆粕中

的细菌主要为 *Fructobacillus* 菌、魏斯菌(*Weissella*)、葡萄球菌(*Staphylococcus*)、芽孢杆菌(*Bacillus*)和乳球菌(*Lactococcus*)。酶解的最初芽孢杆菌为主要优势菌,占 25.11% 的相对丰度。由于未被降解的植物基因组的存在,造成细菌的相对丰度值整体偏低。在 0–9 h 期间,葡萄球菌的相对丰度急剧上升至 36.56%,而在 18 h 之后又急剧下降至 4.81%。与此同时,*Fructobacillus* 菌保持着持续稳健的增长趋势,并且在 36 h 时达到了 66.05% 的相对丰度。魏斯菌也在 36 h 时达到了 24.77% 的相对丰度;除了肠杆菌目(*Enterobacteriaceae*)的存在以外,豆粕麦麸混合型酶解豆粕中主要的细菌类别与纯豆粕

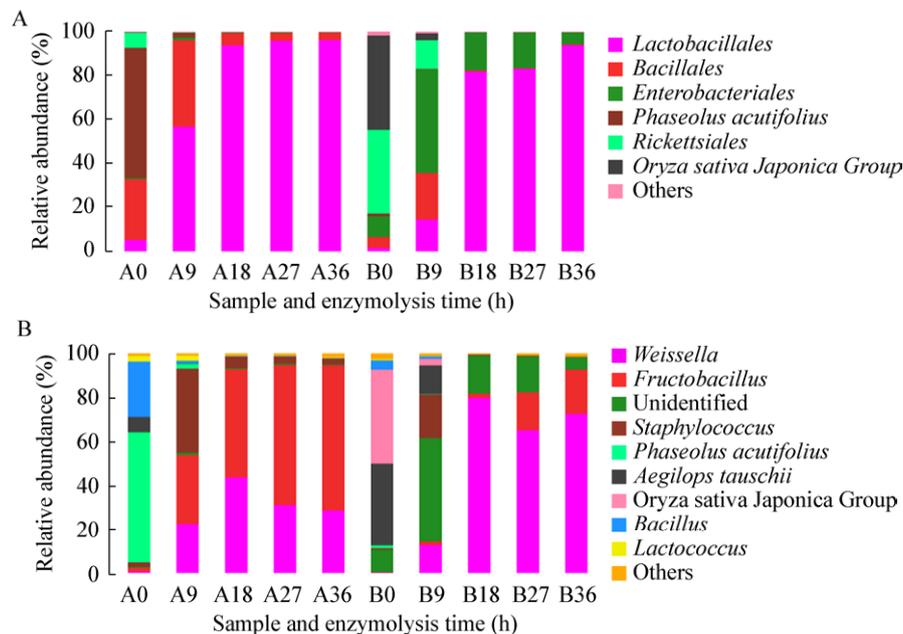


图 2 酶解豆粕中细菌在目(A)和属(B)分类水平下相对丰度的动态性

**Figure 2** Dynamics of relative abundances of the major bacterial orders (A) and genera (B) in enzymatic hydrolyzed SBM

注:相对丰度(Relative abundance)表示为占总的有效细菌序列的百分比。随着酶解进行,乳杆菌目(*Lactobacillales*)取代纯豆粕型酶解豆粕(A0–A36)中的芽孢杆菌目(*Bacillales*)和豆粕麦麸混合型酶解豆粕(B0–B36)中的肠杆菌目(*Enterobacteriales*)成为了优势菌。而乳杆菌目中的 *Fructobacillus* 属和魏斯属(*Weissella*)在两种酶解豆粕中的分布不一样。纯豆粕型酶解豆粕中 *Fructobacillus* 属和魏斯属均为优势菌,但 *Fructobacillus* 属优势明显;而豆粕麦麸混合型酶解豆粕中魏斯属占据着优势,直至第 18 h 以后 *Fructobacillus* 属的丰度才逐渐上升。此外,图中 Other 表示的是在所有的 10 个样本中相对丰度均小于 1% 的其他菌。所有数据来自于 Illumina MiSeq 测序结果,检测的保守序列区域为 16S rRNA 基因上 V3–V4 区。

Note: The relative abundance meant the percentage of total effective bacterial sequences. With the enzymatic hydrolysis processed, *Lactobacillales* became the dominant order and replaced the dominant role of *Bacillales* in KHS and *Enterobacteriales* in KHS-WB. *Fructobacillus* and *Weissella* were rich in KHS (A9–A36) while only *Weissella* had absolute predominance in KHS-WB (B18–B36). Besides, the abundances of other orders and genera inhabited < 1% in all samples. All values were obtained by Illumina MiSeq sequencing targeting the V3–V4 regions of 16S rRNA genes.

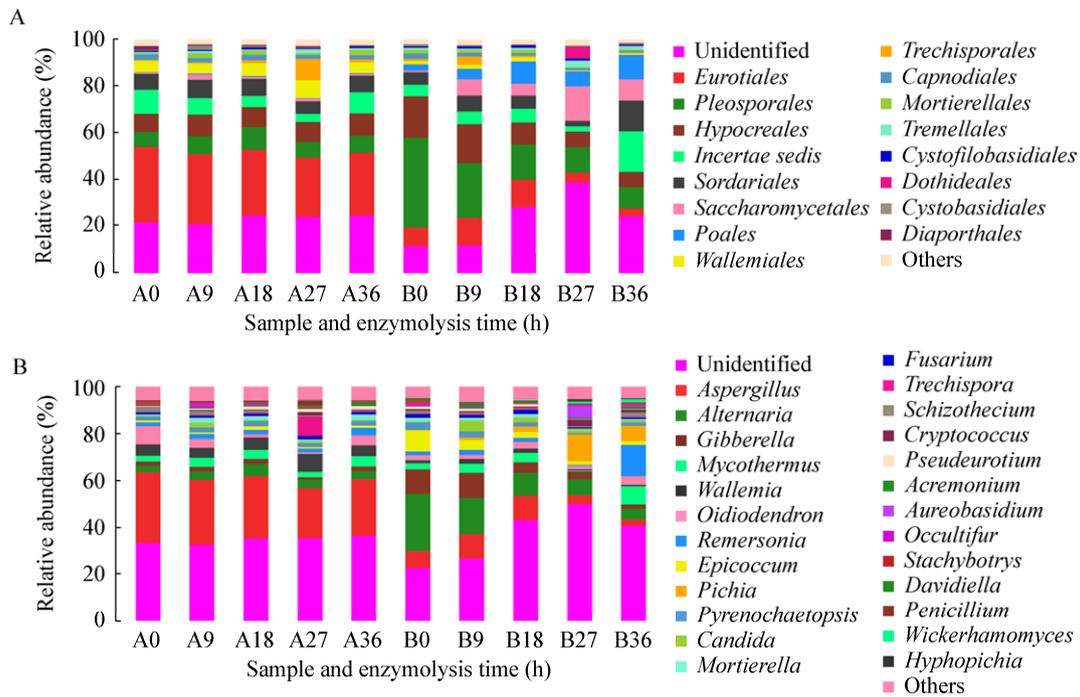


图3 酶解豆粕中真菌在目(A)和属(B)分类水平下相对丰度的动态性

Figure 3 Dynamics of relative abundances of the major fungal orders (A) and genera (B) in enzymatic hydrolyzed SBM

注: 散囊菌目(*Eurotiales*)一直为纯豆粕型酶解豆粕的优势菌。格孢菌目(*Pleosporales*)为豆粕麦麸混合型酶解豆粕前 18 h 的优势菌, 其相对丰度随着时间而减少, 酵母菌目(*Saccharomycetales*)则在 18 h 后逐渐成为优势菌。在属的水平上看, 纯豆粕型酶解豆粕中的曲霉属(*Aspergillus*)一直占据着数量上的绝对优势。豆粕麦麸混合型酶解豆粕中链格孢菌(*Alternaria*)、赤霉菌(*Gibberella*)和曲霉属(*Aspergillus*)则在前 18 h 相对含量较高, 随着酶解进行其相对丰度在减少。同时, 毕赤酵母(*Pichia*)和 *Remersonia* 酵母将逐渐占据数量上的优势。图中 Other 表示的是在所有样本中相对丰度均小于 1% 的其他菌; Unidentified 表示的是未能准确识别和归类的序列丰度。所有数据来自于 Illumina MiSeq 测序结果, 检测的保守序列区域为内转录间隔区基因(Internal transcribed spacer-1, ITS-1)。

Note: The KHS mainly riched in *Eurotiales* always. *Pleosporales* was the dominant order in KHS-WB at the first of 18 h while its relative abundance decreased with the time gone by. *Saccharomycetales* dominated gradually in KHS-WB after 18 h. In genus view, *Aspergillus* was dominant in KHS always. In KHS-WB, *Alternaria*, *Gibberella* and *Aspergillus* was dominant in first 18 h and their relative abundances decreased on the process. At the same time, *Pichia* and *Remersonia* dominated gradually. The relative abundances of other orders and genera inhabited < 1% in all samples. There were unidentified tags representing the relative abundances identified and classified uncertainly. All values were obtained by Illumina MiSeq sequencing targeting the internal transcribed spacer-1 (ITS-1) genes.

型相似。另外, 两种酶解豆粕在 *Fructobacillus* 菌和魏斯菌的比例上存在差异。酶解 36 h 时, 豆粕麦麸混合型酶解豆粕中 *Fructobacillus* 菌占 20.05% 的相对丰度, 而魏斯菌则占有 71.44% 的相对丰度。

真菌 ITS rDNA 多样性结果显示: 纯豆粕型酶解豆粕中的真菌主要以散囊菌目(*Eurotiales*)为主, 而其中又以曲霉属(*Aspergillus*)居多。根据测序结果, 在种水平下一共有 3 个 OTU 被识别为曲霉属。其中 *Aspergillus cibarius* 菌占有 2 个 OTU 并且为主

要占比, 而黄曲霉菌(*Aspergillus flavus*)占有 1 个 OTU。随着酶解的进行, *Aspergillus cibarius* 的相对丰度在 0–36 h 由 27.95% 降至 22.34%, 但仍占据着分布优势, 而黄曲霉菌的相对丰度在 36 h 内由 0.11% 略微提升至 0.58%。此外, *Wallemia*、树粉孢菌(*Oidiodendron*)和链格孢菌(*Alternaria*)的占比也在稳步增大, 最终分别占有 3%–4% 的相对丰度。对于豆粕麦麸混合型酶解豆粕而言, 在 36 h 时各优势菌相对丰度占比由大到小依次为: 银耳纲(*Tremellomycetes*) 16.30%、

*Remersonia* 属 13.18%、毕赤酵母属(*Pichia*) 6.49%，这些优势菌在最初物料中的相对丰度均小于 3%。与此同时，附球菌属(*Epicoccum*)、赤霉属(*Gibberella*) 和丛赤壳科(*Nectriaceae*) 在酶解过程中的相对丰度持续降低。与纯豆粕型酶解豆粕不同的是，链格孢菌在最初的豆粕麦麸混合物中占有 24.27% 的丰度，而在酶解 36 h 后仅占有 4.61%，与此类似的还有树粉孢菌和 *Schizothecium* 的生长趋势在两种酶解豆粕中是相反的。

### 3 讨论

#### 3.1 酶解过程中微生物数量的变化(平板计数法)

从检测结果上看，所使用的豆粕和小麦麸携带有较多的微生物。因此，在酶解豆粕中加入小麦麸作为辅料，除了考虑其工艺上的优势以外，还需要确定其安全性；另外，在角蛋白酶的检测中发现了大量细菌，根据培养基上细菌形态和显微镜镜检推断，可能是在生产过程中随角蛋白酶一同干燥出来的工业用地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)，这类工业用菌菌落较小，可耐受一定程度的高温，但却不易生长繁殖，易退化。因此，在酶解豆粕加工过程中，地衣芽孢杆菌一直存在，但并未成长为优势菌，这也从侧面说明酶解后细菌和真菌的生长可以认为是饲料原料中原驻菌群的生长，角蛋白酶对豆粕中抗原蛋白的降解作用并不依赖角蛋白酶自身所携带的菌体本身。

#### 3.2 酶解过程中环境参数的监控

外源角蛋白酶为酶解过程中的主效应，而在保证酶解顺利进行的同时，还需要稳定酶解豆粕的性质，包括酶解豆粕的营养成分变化和微生物组成变化。但是，营养成分和微生物的检测都是滞后且静态地对酶解产品进行分析，并不能代表实际的生产结果。因此，环境因子在中试过程中的重要性就体现在能够以最简易和直观的指标预判中试产品的可能性。温度的重要性主要有两点：角蛋白酶适宜酶解温度的控制和微生物生长的体现。本试验所用角蛋白酶最适反应温度为 50 °C，环境温度过低时，

完全发挥酶解作用所需的时间相应延长。因此，中试生产中因为环境和物料温度过低，酶解时间需要相应地延长；另外，酶解过程中伴随着原驻菌群的生长繁殖，温度和水分含量也会随之提升。温度上升期中段时对应的温度，即是该温度下对应优势菌种的适宜温度，温度继续上升至平台期时优势菌群也将再发生更迭。本试验选取 36 h 为酶解终点，该时刻均为两种酶解物料的温度上升期中段，并且二者物料温度相近，此时不仅二者菌群稳定，而且由温度造成的酶活差异也得以消除。

本试验采用的角蛋白酶最适反应 pH 为 8.0，而中试生产用水 pH 为 7.0–8.0，加水后物料起始 pH 为 6.0–6.5。本实验室研究结果表明，pH 为 6.0–8.0 时，角蛋白酶对豆粕抗原蛋白的降解效率几乎是一致的(结果未公布)。因此，本试验中 pH 的重要性主要体现在微生物组分和代谢产物的预测上。相较于纯豆粕而言，豆粕麦麸混合物在酶解过程中 pH 下降得更加缓慢，在 36 h 时，二者 pH 相差 0.3–0.5；随后的跟踪观察发现，纯豆粕酶解物 pH 能够下降并稳定至 5.0 以下，而豆粕麦麸混合物的 pH 依旧稳定在 5.0 以上。这说明二者的微生物菌群在产酸性能上存在着明显区别，因此可能会影响仔猪的饲养效果，具体的营养物质差异和养殖效果还需要后续试验证实。

#### 3.3 酶解豆粕含水量的变化

水分控制对生产酶解豆粕的重要性主要体现在两点：(1) 饲料酶制剂发挥作用需要以水为介质，在水环境中与底物发生酶促反应；(2) 水是影响生产成本的重要关键，水的流动方式是酶解豆粕生产工艺的重要问题。酶解豆粕需要将基质的水分含量提升以满足反应需要，但是酶解过后豆粕水分过高将不利于后续的储存和加工，应根据实际情况考虑选用合适的干燥方式。

从饲料原料的角度上看，9.0% 和 5.2% 的含水量足够进行粉碎制粒。然而从大豆深加工产品上看，据中华人民共和国国家标准 GB/T 22492-2008 要求，

以大豆粕或大豆蛋白为原料用酶解或微生物发酵生产的大豆肽的水分含量在 7.0% 以下。由此可见, 高水分不仅影响纯豆粕型酶解豆粕的干燥速度, 还影响其干燥成品的干物质含量。

### 3.4 酶解豆粕的微生物组成(高通量测序)

葡萄球菌和肠杆菌通常都被视为潜在的致病细菌。在本研究中, 酶解时间设置为 36 h 而不是 12 h 或更短的时间, 有效地防止了葡萄球菌和肠杆菌因得不到有效抑制而大量残留于酶解豆粕中。

*Fructobacillus* 菌是一类嗜好果糖的乳酸菌, 通常栖息于果糖含量丰富的环境中, 比如植物的花、果实和发酵蔬果等<sup>[17]</sup>。魏斯菌常见于发酵食品、植物和土壤中, 在青贮饲料制作初期起着重要作用。其中融合魏斯菌存在致病性的危险, 发酵葡萄糖产气并对万古霉素具有天然的耐药性<sup>[18-19]</sup>。在本研究中, 豆粕及酶解豆粕中都含有 *Fructobacillus* 和魏斯菌。与其他常见乳酸菌不同的是, *Fructobacillus* 和魏斯菌适宜的生长温度为 25–30 °C 而非 37 °C。酵母可以跟魏斯菌或 *Fructobacillus* 菌起到一定的协同作用, 进一步降解物料中的不良寡糖。在固态发酵中, 温度分布不均匀和难以控制限制了许多微生物在实际生产中的应用<sup>[17]</sup>。我们推测, *Fructobacillus* 和魏斯菌能够在酶解豆粕中生长的重要原因是角蛋白酶将豆粕中大分子蛋白降解为小分子的多肽和氨基酸, 同时温度、湿度和物料 pH 适宜其生长。*Fructobacillus* 和魏斯菌分别作为纯豆粕型和豆粕麦麸混合型酶解豆粕的优势菌, 造成这个区别的原因在于麦麸的添加与否, 麦麸的加入改变了物料的营养成分, 因而使其更偏向于魏斯菌的生长。此外, 关于 *Fructobacillus* 的功能和应用也需要进行后续的研究。

在真菌多样性的研究中, 纯豆粕型和豆粕麦麸混合型酶解豆粕存在 2 个主要的不同点。一方面是优势菌的多样性, 在纯豆粕型中只有曲霉菌占据着绝对的优势, 而在豆粕麦麸混合型中存在多种优势菌并存的情况; 另一方面的不同点在于曲霉菌在两

种物料中的生长趋势, 麦麸对豆粕中曲霉菌的生长是有抑制作用的, 豆粕麦麸混合型中最后占据优势的菌种多为酵母菌。本研究中提到的两类曲霉菌中 *Aspergillus cibarius* 常见于发酵大豆中<sup>[20]</sup>, 而黄曲霉菌则是潜在的可产霉菌毒素的菌种, 对人和动物的健康有着严重威胁<sup>[21]</sup>。因此, 酶解过程中任何曲霉菌的生长都是值得注意的, 需要明确其是否有害于人和动物的健康。

## 4 结论

小麦麸作为酶解豆粕辅料能够改变酶解豆粕中的微生物多样性, 并使其中的微生物生长更偏向于魏斯属细菌和酵母类真菌。

## REFERENCES

- [1] Stein HH, Lagos LV, Casas GA. Nutritional value of feed ingredients of plant origin fed to pigs[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2016, 218: 33-69
- [2] Wang D, Piao XS, Zeng ZK, et al. Effects of keratinase on performance, nutrient utilization, intestinal morphology, intestinal ecology and inflammatory response of weaned piglets fed diets with different levels of crude protein[J]. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2011, 24(12): 1718-1728
- [3] Panda R, Tetteh AO, Pramod SN, et al. Enzymatic hydrolysis does not reduce the biological reactivity of soybean proteins for all allergic subjects[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(43): 9629-9639
- [4] Wang Y, Liu XT, Wang HL, et al. Optimization of processing conditions for solid-state fermented soybean meal and its effects on growth performance and nutrient digestibility of weanling pigs[J]. *Livestock Science*, 2014, 170: 91-99
- [5] Lu WQ, Zhou ZX, Yu HT, et al. Method for eliminating beta-conglycinin in fermented soybean meal: CN, CN201610890870.X[P]. 2016-10-12 (in Chinese)  
陆文清, 周智旋, 于海涛, 等. 一种消除发酵豆粕中  $\beta$ -伴大豆球蛋白的方法: 中国, CN201610890870.X[P]. 2016-10-12
- [6] Yu HT. Study on solid-state fermented soybean meal combined with wheat bran and its application on growing pigs[D]. Beijing: Master's Thesis of China Agricultural University, 2016 (in Chinese)  
于海涛. 豆粕麦麸混合固态发酵及其仔猪养殖中的应用研究[D]. 北京: 中国农业大学硕士学位论文, 2016
- [7] Williams CM, Richter CS, Mackenzie JM, et al. Isolation, identification, and characterization of a feather-degrading bacterium[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, 56(6): 1509-1515
- [8] Odetallah NH, Wang JJ, Garlich JD, et al. Keratinase in starter diets improves growth of broiler chicks[J]. *Poultry Science*, 2003, 82(4): 664-670

- [9] Ma HH. The study on difference and mechanism of different feedstuff on aflatoxin B<sub>1</sub> production by *Aspergillus parasiticus*[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2015 (in Chinese)  
马慧慧. 寄生曲霉菌在不同饲料原料中产生黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的差异性及其机制研究[D]. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2015
- [10] Chen NS, Ai QH, Wang DZ. Studies on soybean protein as a substitute for fish meal in formulated diets for *Anguilla anguilla*[J]. Journal of Fisheries of China, 1998, 22(3): 283-287 (in Chinese)  
陈乃松, 艾庆辉, 王道尊. 欧洲鳗配合饲料中大豆蛋白替代鱼粉的研究[J]. 水产学报, 1998, 22(3): 283-287
- [11] Wang ZS, Kuang YG, Liu HF, et al. The effects of the compound-enzyme degraded antigen-protein feed on piglet growth performance[J]. Journal of Sichuan Agricultural University, 2003, 21(4): 338-342 (in Chinese)  
王之盛, 况应谷, 刘惠芳, 等. 酶解去除抗原蛋白饲料对仔猪生产性能的影响[J]. 四川农业大学学报, 2003, 21(4): 338-342
- [12] Wei JT, Li SZ, Yang XH, et al. Effect of liquid enzymolysis and fermented soybean meal on growth performance and partial nutriment in feces excreta of growing pigs[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2012, 32(3): 478-482 (in Chinese)  
魏金涛, 李绍章, 杨雪海, 等. 液态酶解发酵豆粕对生长育肥猪生产性能及部分营养物质粪排泄量的影响[J]. 中国兽医学报, 2012, 32(3): 478-482
- [13] Yang XH, Zhao N, Wei JT, et al. Effects of the liquid enzymolysis and fermented soybean meal on growth performance and physiological-biochemical parameters of Gushi broiler[J]. China Feed, 2015(20): 22-24 (in Chinese)  
杨雪海, 赵娜, 魏金涛, 等. 豆粕液态酶解发酵物对育雏期固始鸡生长性能及血清生化指标的影响[J]. 中国饲料, 2015(20): 22-24
- [14] Degnan PH, Ochman H. Illumina-based analysis of microbial community diversity[J]. The ISME Journal, 2012, 6(1): 183-194
- [15] Polka J, Rebecchi A, Pisacane V, et al. Bacterial diversity in typical Italian salami at different ripening stages as revealed by high-throughput sequencing of 16S rRNA amplicons[J]. Food Microbiology, 2015, 46: 342-356
- [16] Wang WQ, Zhao SG, Ma LQ, et al. The research progress and application of resequencing based on animal genomics[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2016, 47(10): 1947-1953 (in Chinese)  
汪文强, 赵生国, 马利青, 等. 动物基因组学重测序的应用研究进展[J]. 畜牧兽医学报, 2016, 47(10): 1947-1953
- [17] Endo A, Tanaka N, Oikawa Y, et al. Fructophilic characteristics of *Fructobacillus* spp. may be due to the absence of an alcohol/acetaldehyde dehydrogenase gene (*adhE*)[J]. Current Microbiology, 2014, 68(4): 531-535
- [18] Li ZH, Duan XB. New progress in the classification and identification of bacteria of the genus Weiss[J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2006, 27(8): 721-723 (in Chinese)  
李中华, 段雄波. 魏斯菌属细菌的分类与鉴定新进展[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(8): 721-723
- [19] Formenti LR, Nørregaard A, Bolic A, et al. Challenges in industrial fermentation technology research[J]. Biotechnology Journal, 2014, 9(6): 727-738
- [20] Hong SB, Lee M, Kim DH, et al. *Aspergillus cibarius* sp. nov., from traditional meju in Korea[J]. Journal of Microbiology, 2012, 50(4): 712-714
- [21] Ellis WO, Smith JP, Simpson BK, et al. Aflatoxins in food: occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1991, 30(4): 403-439