

郑州轻工业大学

大学生实践创新项目申报书

项目名称	微生物饲料添加剂的绿色制备及研发
项目负责人	魏湘楠
项目组成员	方雯雯、卢珍喜、许博利、康珂
指导教师	张志平
所在学院	食品与生物工程学院
填报日期	2023 年 11 月 20 日

一、项目基本情况

项目名称		微生物饲料添加剂的绿色制备及研发						
项目来源		☐ 学生自选课题 ☒ 导师科研项目 ☐ 与专业实践相关 ☐ 与课程设计相关 ☒ 与竞赛相关，如果是，请填写竞赛名称：全国大学生生命科学竞赛						
负责人	姓名	学号		所在院系		专业		手机
	魏湘楠	542103010422		食品与生物工程学院		食品科学与工程		132■■■■7357
参与 组 员	方雯雯	542103020104		食品与生物工程学院		生物工程		176■■■■2826
	卢珍喜	542103020114		食品与生物工程学院		生物工程		188■■■■1706
	许博利	542203020224		食品与生物工程学院		生物工程		159■■■■9347
	康珂	542103020110		食品与生物工程学院		生物工程		176■■■■9382
指 导 教 师	姓名 1	张志平		所在院系 1		食品与生物工程学院		
	联系电话			手机	182■■■■3020		E-mail	zzp@zzuli.edu.cn
	职务/职称	生物工程系副主任/副教授				主要研究方向		废弃物资源化利用
	姓名 2			所在院系 2				
	联系电话			手机			E-mail	
	职务/职称					主要研究方向		

二、项目申请理由

项目背景和意义	(选题的来源, 国内外同类研究工作的现状、方法、难点等, 前期准备工作)
	1.1 项目的研究目的及背景 1.1.1 饲料行业及饲料添加剂的发展趋势 河南是我国重要的农业大省, 同时也是重要的饲料业经济大省。长期以来, 河南省依托种植业的发展, 形成了比较完善的饲料工业体系, 并在全省各地都有较为知名的领头饲料企业。改革开放以来, 河南饲料业始终保持着持续、健康、快速的发展, 有力推动当地和全国养殖业的发展。但是随着中国经济发展出现新态势、信息技术推动了经济产业的转型升级, 工业生产结构调整、农业供给侧结构改革为河南饲料业经济带来了诸多挑战, 也带来更加广阔的发展空间。如何积极应对新经济形态的挑战, 提高企业竞争力和经济效益, 成为摆在众多河南饲料企业面前的难题。 习近平总书记在党的十九大报告中明确提出“绿水青山就是金山银山”的理念, 强调在经济发展过程中要加大对自然生态系统的保护力度。因此, 建设生态文明就被提升到推动中华民族永久发展的千年大计层面上, 各个省市地区都在本地经济发展中强调要做到节约资源和保护环境并行。为契合绿色发展的经济战略, 国家加强了对饲料和饲料添加剂的相关管理, 并出台了一系列法律法规和政策加紧饲料行业的管理。据农业农村部第 194 号公告, 自 2020 年 7 月 1 日起, 饲料生产企业停止生产含有促生长类药物饲料添加剂(中药类除外)的商品饲料。上述政策及发展趋势要求我们必须坚持绿色发展理念, 在重视饲料业经济效益的同时也要注意饲料业带来的食品安全、环境保护、病害防控等问题, 在省内坚持推进绿色生产模式, 推广和应用高吸收、低排放、高回收、低消耗的生产标准。因此, 积极开发生物饲料添加剂, 降低原料成本, 增加饲料中营养物质, 减少药物残留, 推动农牧业的健康发展, 逐渐成为提高饲料技术含量的发展方向之一。
	1.1.2 淀粉废水资源化转化开发饲料添加剂 基于我省农业大省的地位, 淀粉年产量也位居全国前列, 此生产过程中产生大量淀粉废水。淀粉废水是以玉米、马铃薯、小麦、大米等农产品为原料生产淀粉或淀粉深加工产品(淀粉糖、葡萄糖、淀粉衍生物等)产生的废水, 一般都属于高浓度有机废水, 是造成环境污染的主要污染源之一。据测算, 每加工生产 1 吨精淀粉需耗水 60 吨, 其废水的 pH 值为 4.3-7.7, COD 值通常在 10000mg/L 左右, 主要污染物有悬

浮物 (SS)、化学需氧量 (COD)、氨氮 (NH₃-N)、总氮 (TN) 和总磷 (TP)，可细化为蛋白质、糖、纤维素、木质素等有机物及 N、K、P、Ca 等矿物质。原国家环保部发布的淀粉废水治理工程技术规范 (HJ2043-2014)，以我国现行的污染物排放标准和污染控制技术为基础，规定了以玉米、小麦和薯类等为原料生产淀粉及后续产物的生产废水治理工程设计、施工、验收和运行维护等技术要求。然而，按现行 COD 直接排放 100mg/L 或间接排放 300mg/L 的标准，许多企业根本无法达到。目前，淀粉废水治理总体上采用“预处理+厌氧生物处理+好氧生物处理+深度处理”的污染治理工艺，如通过厌氧-好氧处理或活性污泥处理，将有机质转化为 CO₂ 和水。上述传统处理工艺对于污水处理虽然有效，但一方面废水处理成本较高，许多中小型企业无法承担；另一方面从资源的有效利用上分析，是不经济的，毕竟宝贵的有机质转化为温室气体 CO₂。

如何采用生物炼制技术低成本、高效率、规模化生产生物基化学品，是解决淀粉废水资源化利用的有效途径之一。部分产油微生物可利用碳源种类较多，能够有效转化某些淀粉废水中的 COD 合成油脂或其它天然产品。粘红酵母 (*Rhodotorula glutinis*) 和小球藻 (*Chlorella vulgaris*) 作为两种营养类型不同微生物，均可利用该类废水中的 COD 合成油脂和色素。微生物油脂因其在脂肪酸组成上同植物油脂相似，富含饱和和低度不饱和的长链脂肪酸，且生产上具有独特的优势，如生长周期短、不受季节气候限制、易于实现大规模生产等，更适合规模化推广，有望开发成为高营养价值的饲料添加剂。并且某些产油微生物碳源利用广谱，而工农业有机废水含有大量还原性糖，排放量大，且分布集中，能够被微生物利用产油的同时实现废水资源化利用。微生物合成的类胡萝卜素是天然色素，可以通过各种微生物合成，包括细菌，酵母，丝状真菌和微藻。类胡萝卜素是一类异戊二烯类色素，在动物和人体中具有增强免疫反应、转化为维生素 A 和清除氧自由基的作用。目前市场上 80%-90% 的类胡萝卜素是通过化学合成法生产的，然而由于化学合成类胡萝卜素所带来的健康问题，人们开始对天然产生的类胡萝卜素的需求正在增加。预计类胡萝卜素的市场在 2021 年将达到 22 亿美元左右，年增长率为 2.3%。然而天然生产的类胡萝卜素仅占总市场的 10%，由于生产成本低，如何实现利用微生物大规模生产的同时提高产量和降低成本已成为研究热点。然而，由于废水组分较复杂，COD 浓度较高，直接培养单一产油微生物较困难，往往需要对废水进行预处理或适当稀释，且培养过程中需要适当补充碳源，限制了规模化培养产油微生物生产油脂的推广。近年来，利用不同菌株混合培养相关

研究有望突破纯菌培养的不足之处，逐渐成为了一个新的研究热点。

1.1.3 *R. glutinis* 和 *C. vulgaris* 混合体系的构建

R. glutinis 作为一种高产油脂的酵母菌株不仅可以利用淀粉废水中 COD 合成油脂，且该酵母自身还可以合成色素，其中 β -胡萝卜素为主要成分。光照条件下，可以刺激此类产色素微生物做出应激反应，影响其生长、油脂和色素含量。*R. glutinis* 主要进行好氧生长时，生长速率较快，能够利用一些廉价底物获得较高的生物量，生长过程中需要消耗大量的 O_2 ，排放出 CO_2 ；如果氧气供给不足，酵母会产生 $0.042M \sim 0.130M$ 的可溶性 CO_2 ，势必会进行无氧呼吸，产生大量的挥发性小分子有机酸，浪费营养物质。一般来说，酵母生长的最佳 pH 值为 6.0 左右，小分子有机酸的产生使 pH 值能快速下降至 4.0 左右，从而进一步抑制酵母的生长，且有文献报道，由于小分子有机酸较无机酸具有更好的细胞膜通透性，更容易进入胞内，进而改变胞内 pH 环境，影响菌体代谢生长。

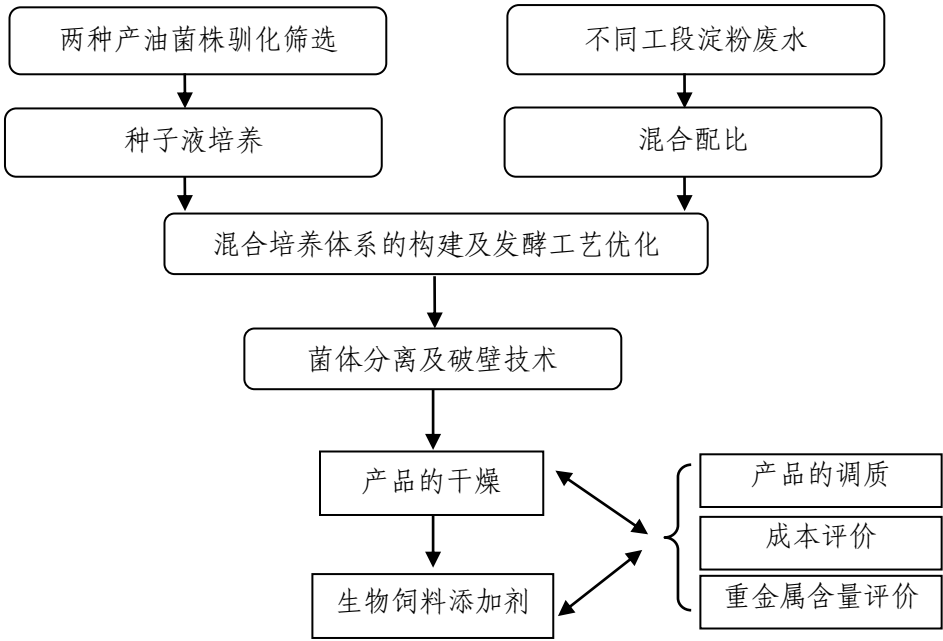
另外，能利用 CO_2 合成油脂的产油微藻的相关研究越来越受到国际研究者的重视。有些微藻不仅能够进行光合自养生长，而且可以利用有机碳源进行异养生长或兼养（自养和异养同时进行），在兼养条件下能够获得最大的生物量和油脂产量。*C. vulgaris* 作为一类高产油脂藻种，能够利用废水中高浓度 N、P 和其它离子，在光照的条件下进行自养生长，同时放出 O_2 。当培养体系中溶氧含量达到 20%以上时，藻类的自养代谢受到限制；当环境中溶氧下降到 1~3%时，光合作用加强。另外，*C. vulgaris* 在利用 CO_2 进行光合自养时， CO_2 首先溶解于水溶液中，生成 HCO_3^- ，当被小球藻利用时， HCO_3^- 又分解成 CO_2 和 OH^- ，使溶液 pH 值升高，而小球藻一般的最佳生长 pH 值范围为 6.5-7.0 之间，最佳油脂合成 pH 值在 7.0-8.5 之间。所以，当小球藻培养一段时间后，pH 会自动升高而抑制生长。

综上所述，传统淀粉废水处理技术不利于有效资源化利用废水 COD，迫切需要开发环境友好、产品附加值高、经济效益好的废弃物资源化转化技术。微生物油脂因其在脂肪酸组成上同植物油脂相似，富含饱和或低度不饱和的长链脂肪酸，且生产上具有独特的优势，如生长周期短、不受季节气候限制、易于实现规模化生产等优势，可作为饲料行业添加剂。另外，*R. glutinis* 和 *C. vulgaris* 均含有丰富的天然色素，该类色素具有食品着色和营养增补剂的双重效果，因而被广泛用于医药、食品、饮料、化妆品及饲料添加剂等领域，在国内外食品工业中一直处于供不应求的状态。为降低微生物饲料添加剂的生产成本，利用酵母和藻类在生理代谢上的协同共生机制开发混

	合培养工艺，有利于降低生产成本，实现工业有机废水的资源化利用。因此，开发 <i>R. glutinis</i> 与 <i>C. vulgaris</i> 序列混合培养资源化利用淀粉废水工艺，生产具有特定营养价值和保健作用的生物饲料添加剂，具有重要的社会和环境意义。 1.2 本项目的研究意义 本项目主要围绕“替抗”类动物饲料添加剂的开发展开研究。近年来，随着我国畜牧业的迅速发展，年饲料消耗总量越来越大，饲料业在推动整个畜牧业发展的同时也引发了环境污染、食品安全等问题出现。抗生素作为饲料添加剂在饲料业中的大规模应用在促进动物生长、预防畜禽疾病、提高饲料效益等方面发挥着重要作用，同时，其在环境、食用安全等方面带来的负面效应也引起了人们的极大关注。基于以上问题，我国农业农村部在 2019 年 7 月 0 日发布了第 94 号公告，要求在 2020 年 7 月 1 日起，饲料中禁用其他促生长类药物饲料添加剂（除中草药）。 面对饲料业如此巨大的市场需求，传统药物添加剂显然已经无法满足，为解决以上问题，我们提出了一种基于菌藻共培养资源化利用淀粉废水的方法，旨在开发一种绿色、低成本、新型可再生微生物饲料添加剂，同时实现淀粉废水的资源化利用，保护环境，促进饲料业的可持续发展。该项目的意义在于，一方面对淀粉废水进行了资源化利用处理，具有重要的环境和经济效益；另一方面，通过开发制造新型饲料添加剂，可以减少养殖业中抗生素的使用、提高动物的健康水平和生产效率，同时也可以降低养殖成本，促进畜牧业的健康和可持续发展。
项目申请理由	（项目团队成员具备的知识基础、能力素养、兴趣特长和已参加的科研等条件） 本项目的团队成员主要是我校食品科学与工程、生物工程及生物技术相关专业的高年级本科生，具有一定的专业理论和实验操作能力，大部分同学参加过全国大学生生命科学竞赛或互联网+等学科竞赛，且获得较好的实验操作锻炼竞赛成绩。其中项目负责人魏湘楠从大一开始进入指导教师科研团队，截至目前，以项目负责人的身份参加全国大学生生命科学竞赛一项，参与发表核心论文两篇，具有较强的团队组织能力和实验操作、分析能力；团队成员方雯雯参与由本项目指导教师负责指导的河南省大学生互联网+项目一项，获校级二等奖，参赛过程表现出良好的材料撰写、组织分工及成果展示等能力。 综上，项目团队成员专业及主要核心成员具有完成本项目所具有的发酵工艺控制、目标产品提取、主要营养成分分析等专业理论知识和实验操作训练，保证了本项目的顺利进行。

三、项目研究内容

项目研究的主要内容及目标	(主要研究内容，重点和难点，研究思路和方法等) 1. 本项目的研究内容 本项目针对目前淀粉废水利用效率低、处理成本高、对环境污染较大等现状，同时解决饲料行业高质量发展的瓶颈问题,形成以序列菌藻混合培养体系利用淀粉废水联产微生物油脂和色素的稳定控制工艺,开发以资源化利用淀粉废水为核心的生物饲料添加剂的技术体系。其实施方案主要内容包括：稳定、高效、低成本的序列菌藻混合培养体系构建；混合培养微生物的高效、低成本破壁技术及绿色饲料添加剂的制备工艺；产品调质及评价。基于上述研究内容，开发一条混菌培养资源化利用淀粉废水生产生物饲料添加剂的技术体系。 2. 本项目的研究重点和难点 本项目的重点和难点是混合培养体系中存在着复杂、精妙的微生物协同代谢相互作用与影响，构建稳定、可控的产油酵母和小球藻序列混合培养体系为本项目的重点和难点，确定出稳定培养体系的关键控制因素后，可提高菌藻混合工艺处理废水的能力，有效提高产物产量，从而更好的为建立规模化采用混合培养模式处理含 N、P 工、农业有机废水生产生物饲料添加剂提供工艺技术指导。 3. 研究思路和方法 具体研究思路和方法如下： （1）实验菌株 粘红酵母和小球藻为实验室以淀粉废水为培养基长期驯化筛选获得，分别于 4℃条件下保存于 YPD 固体培养基和 BG11 固体培养基。 （2）粘红酵母与小球藻序列混合稳定培养体系的构建 设置两组实验：以淀粉废水适当添加废糖蜜作为培养基，先培养一种微生物至稳定初期，然后接种另外一种处于对数生长期的种子液。之后，培养顺序互换，通过考察两种稳定期微生物在混合培养后的生长情况，选择、构建最优序列混合培养协同转化淀粉废水联产油脂/色素的培养模式。 （3）混和微生物的高效低成本破壁技术及绿色饲料添加剂的制备 针对产油微生物油脂提取工艺中细胞破壁成本高的问题,开发高效低成本的破壁技术，快速释放油脂，低成本、快速的油水分离技术，研究不同提取工艺（如酸
--------------	---

	热法、酶法和连续逆流提取法等）的优缺点及适应范围，确定最优菌体分离、破壁工艺。 （4）根据国家有关生物饲料添加剂的执行标准，对产品进行蛋白质、不饱和脂肪酸和类胡萝卜素等有益成分进行分析评价，完成产品的调质，同时，考察重金属离子等含量是否达标。  <pre> graph TD A[两种产油菌株驯化筛选] --> B[种子液培养] C[不同工段淀粉废水] --> D[混合配比] B --> E[混合培养体系的构建及发酵工艺优化] D --> E E --> F[菌体分离及破壁技术] F --> G[产品的干燥] G --> H[生物饲料添加剂] G --> I[产品的调质] G --> J[成本评价] G --> K[重金属含量评价] </pre> 图 1 本项目技术路线
项目创新点	本项目的创新点有以下两点： （1）发酵原料创新：采用淀粉生产过程中废水（玉米浸泡工段的玉米浸泡废水、淀粉生产工段的麸质水和糖化工段的葡萄糖废母液）合理配比用于混菌发酵的工艺开发，为目前我国生物饲料添加剂的生产提供了解决方案，拓展了生物饲料添加剂的原料来源，有利于实现饲料行业的绿色发展理念。 （2）微生物培养工艺创新：混合培养体系中存在着复杂、精妙的微生物协同代谢互动与影响，构建稳定、可控的产类胡萝卜素酵母和小球藻序列混合培养体系为本项目的另一创新点。确定出稳定培养体系的关键控制因素后，可提高菌藻混合工艺处理废水的能力，有效提高产物产量。

四、项目进度安排

项目 进 度 安 排	(查阅资料、自主设计项目研究方案、实验研究、数据统计、处理与分析、研制开发、中期检查、填写结题表、撰写研究论文和总结报告、参加结题答辩和成果推广等)
	2024.01—2021.03 前期准备工作, 菌种活化剂种子培养, 分析检测手段建立
	2024.04—2021.07 混菌发酵资源化转化淀粉废水相关工艺研究及放大
	2024.08—2024.09 绿色、高效菌体分离、干燥、破壁等产品形成工艺的建立
	2024.09—2024.12 产品品质分析及调质; 总结实验数据, 撰写相关文章及专利; 进行技术推广及转化。

五、项目实施条件

项目 实 施 的 条 件 和 资 源	(依托的科研或教学实验基地, 实验仪器设备的配置, 图书资料, 实验或实践场地等项目实施的条件)
	郑州轻工业大学食品与生物工程学院始建于 1980 年河南省首个“食品工程”专业, 现有食品科学与工程一级学科博士学位授权点、以及食品科学与工程、轻工技术与工程、烟草科学与工程、生物化工、生物与医药五个硕士学位授权点; 食品科学与工程学科为河南省优势特色学科(群)和河南省特色骨干学科(群), 第九批河南省重点学科, 全国第五轮学科评估结果为 B⁻; 轻工技术与工程学科为河南省第九批重点学科, 博士点建设重点立项建设学科; 以食品科学与工程学科为主要支撑的农业科学学科跻身 ESI 前 1%。现有省特聘教授 2 人、省讲座教授 2 人、省学术技术带头人 2 人、省杰出人才、省杰出青年、省教学名师、省优秀教师等 20 余人。学院建有省部级教研平台 9 个、创新战略联盟产学研平台 6 个; 近五年, 承担各类科研项目 280 余项, 其中“十三五”国家重点研发计划、国家自然科学基金等国家级项目 56 项, 省部级重大科技专项等 100 余项, 到账科研经费 1.3 亿元; 获国家技术发明二等奖 1 项, 省部级科技奖励 16 项, 科技成果转化实现经济效益数亿元; 发表学术论文 600 余篇, SCI 和 EI 收录 200 余篇。 本项目主要依托食品与生物工程学院郑州市代谢工程和系统生物学重点实验室, 具体实验室为食工楼 410 和 411, 同时借助生物发酵中试实验室、发酵产品分离纯化实验室等, 可保证本项目的小试、中试放大及产品分离纯化等实验条件。

六、项目预期效果及成果形式

项目预期成果及其形式	(学术论文、竞赛获奖、专利申请、开发软件、研制产品、项目鉴定, 推广应用等) (1) 预计主要技术、经济指标 ①构建一条绿色、稳定、可控、低运行成本的微生物类胡萝卜素中试生产技术路线; ②吨淀粉废水生产的微生物类胡萝卜素不低于 150g, 废水 COD 利用率 90%以上。 (2) 可获得的知识产权和人才培养 ①申请国家发明专利 1-2 件; ②发表论文 1-2 篇以上, 其中 SCI 论文 1 篇以上; ③指导、培养本科生 4-5 名参与项目研究。
结合专业学习的计划	(是否有进一步深造的想法如何通过参与项目研究加强专业学习, 培养自身的实践能力、科研能力。) 本项目的目标是基于已构建的菌藻共生协同代谢培养技术, 通过混合发酵动力学模型及实际发酵经验指导工艺不断优化得到菌藻共生培养体系, 设计淀粉废水原料预处理技术处理淀粉废水, 得到原料制造绿色、无污染、安全高效的新型饲料添加剂。同时, 该项目将以淀粉废水作为培养基主要原料, 实现淀粉有机废水资源的最大化利用, 为养殖业的可持续发展提供支持。 通过有效参与本项目的实施最终能力愿景如下: 在完成本项目计划的研究任务之外, 能够强化我们的专业理论理解能力和实际操作动手能力, 同时通过对数据分析整理及参与相关答辩活动, 使我们能够有效表达我们的研究成果, 提升了我们的项目组织和交流能力。因此, 本项目的完成, 不仅可以锻炼我们的科研实践能力, 同时还能显著提高项目参与人员的分析和解决问题的能力、表达能力及社交能力, 相信上述能力会使我们终身受益, 在为我们本科学学校添加浓重一笔的基础上, 激发我们对研究生科研生活的向往和追求。非常感谢学校给了我们这次锻炼自己的机会。

七、项目经费预算

项目经费使用计划	（包括大概支出科目（含配套经费）、金额、计算根据及理由，如果别的经费支持请说明） 本项目已有河南省科技攻关项目经费支持，可满足对本项目的支持。考虑到训练本科生的工作及耗材消耗量大的现实，学校可适当给予一定的材料费。		
	支出科目	金额（元）	计算根据及理由
	材料费	2000	支付训练本科生科研过程中用到的各种原材料、实验耗材和辅助材料等费用

八、指导老师意见

指导教师意见及指导计划	（指导教师指导项目实施的机会和安排，并从项目学科性、前沿性、可行性、研究性、可操作性和成效性加以评价） 本项目为指导教师的科研项目，且有一定前期研究基础，项目研究内容和方法科学可行，能够关注国家大政方针，注重国家需求，满足人民生活对美好生活向往的追求。指导教师所在实验室条件满足本项目的实施，过程指导中除了指导教师外，还有博士研究生和硕士研究生的参与，上述条件都能项目的有效实施、及时分析和最终产出。
	指导教师签字： 年 月 日

九、审查意见

学院意见	教学院长签字： 年 月 日 (学院盖章)
答辩专家组意见	答辩专家组签字： 年 月 日
工程训练中心意见	负责人签字： 年 月 日 (盖章)