

重组 *Microdochium nivale* 还原糖氧化酶用于制备乳糖酸方法的研究

顾利敏^{1,2}, 周星^{1,2}, 金征宇^{*1,2}, 徐学明^{1,2}, 周家慧^{1,2}

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: *Microdochium nivale* (*M. nivale*) 还原糖氧化酶可以催化乳糖转化为乳糖酸, 作者采用实验室保存的重组 *M. nivale* 还原糖氧化酶基因工程菌 X33-pPICZαA-MnCO, 通过诱导在毕赤酵母中表达并制备了重组 *M. nivale* 还原糖氧化酶, 通过单因素和正交实验考查了乳糖浓度, 重组 *M. nivale* 还原糖氧化酶用量, 反应温度, 反应时间对乳糖酸转化率的影响。结果表明: 重组 *M. nivale* 还原糖氧化酶催化乳糖制备乳糖酸的最适转化条件为: 乳糖浓度 5 mmol/L, 酶的添加量为 1.5 U/ml, 反应温度为 55 ℃, 反应时间为 48 h, 最终反应乳糖酸的转化率接近 100%。

关键词: 乳糖酸; 乳糖; 重组 *Microdochium nivale* 还原糖氧化酶; 转化率

中图分类号: TS 236.9 文献标志码: A 文章编号: 1673-1689(2017)07-0720-06

Utilization of Recombinant Carbohydrate Oxidase from *Microdochium nivale* for Lactobionic Acid Production

GU Limin^{1,2}, ZHOU Xing^{1,2}, JIN Zhengyu^{*1,2}, XU Xueming^{1,2}, ZHOU Jiahui^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The carbohydrate oxidase from *Microdochium nivale* (MnCO) can catalyze the oxidation of lactose to produce lactobionic acid. In this study, we used the recombinant MnCO which expressed in *Pichia pastoris* from the genetically engineered bacteria X33-pPICZαA-MnCO stored in our lab. The production of lactobionic acid was optimized by single factor experiment and orthogonal test. The optimal fermentation conditions for the production of lactobionic acid were as follows: the concentration of lactose solution of 5 mmol/L, the amount of enzyme of 1.5 U/ml, the reaction temperature of 55 ℃, the reaction time of 48 h, the conversion rate of lactose to lactobionic acid could reach to 100%.

Keywords: lactobionic acid, lactose, recombinant MnCO, conversion rate

收稿日期: 2015-06-23

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK20130140); 江苏省科技支撑计划项目(BE2013311)。

* 通信作者: 金征宇(1960—), 男, 江苏扬州人, 教授, 博士研究生导师, 主要从事碳水化合物化研究。E-mail: zjin@jiangnan.edu.cn

引用本文: 顾利敏, 周星, 金征宇, 等. 重组 *Microdochium nivale* 还原糖氧化酶用于制备乳糖酸方法的研究 [J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(07): 720-725.

乳糖酸(Lactobionic acid, LA)是一种新型多羟基有机酸^[1],是集修护、抗衰老、保湿、抗氧化、促进机体更新^[2]等多种功效于一身的最先进的果酸。在食品中乳糖酸可以做为食品添加剂,并且能够与矿物质盐形成复合物,促进肠道中益生菌的生长以及对矿物质的吸收^[3]。在酸奶的制作过程中,乳糖酸的存在能够改善酸奶凝乳的持水力、调和酸味、促进风味形成。在肉制品中添加一定量的乳糖酸,可以减少肉制品在冷冻后产生的水分损失^[3]。乳糖酸在医学中是器官移植前保护性缓冲液的重要组成部分^[5-6],可螯合 Fe^{3+} ,降低由于离子催化产生的氢氧自由基对组织的损伤,增加了器官的保存性^[7]。在美容行业中,由于乳糖酸有极强的吸水性,并且能够促进上皮形成,加速伤口愈合,有修护肌肤的功效,因此乳糖酸可用于防止皮肤干燥以及肌肤修护^[8]。

目前制备乳糖酸的方法有生物制备法^[9]、化学氧化法^[10]、电化学法和催化氧化法等多种方法,但是这些方法存在着副产物多,产物的分离纯化比较复杂以及化学污染等问题。生物酶法常以高效、绿色著称,目前酶法制备乳糖酸所使用的酶包括乳糖脱氢酶,葡萄糖果糖氧化酶和还原糖氧化酶,但是乳糖脱氢酶是一种膜蛋白,分离纯化过程复杂,且酶极易失活。葡萄糖果糖氧化酶可将乳糖和果糖转化为山梨醇和乳糖酸,但是山梨醇和乳糖酸混在一起使得乳糖酸的分离纯化极为复杂。Elizabeth J 团队在 *Microdochium nivale* (*M. nivale*) 中发现一种还原糖氧化酶^[11],该酶可以将末端带有还原性糖残基的单糖和低聚糖氧化成相应的酸,没有其他副产物产生,具有更加有效催化乳糖氧化形成乳糖酸的潜力^[12-13]。作者采用实验室保存的在 C-末端加入组氨酸标签的重组 *M. nivale* 还原糖氧化酶基因工程菌,通过诱导在毕赤酵母中表达制备了重组 *M. nivale* 还原糖氧化酶,并研究了其作用于乳糖的最适温度和 pH 及优化了制备乳糖酸的反应条件。

1 材料与方法

1.1 实验材料

菌种毕赤酵母 X33-pPICZ α A-MnCO:作者所在实验室保存;过氧化氢试剂盒、蛋白 Marker:生工生物技术(上海)有限公司产品;乳糖、乳糖酸标品:Sigma 公司产品;酵母粉、胰蛋白胨:英国 Oxoid 公司产品;其它分析纯试剂均购于国药集团化学试剂

有限公司;YPD、BMGY 种子培养基、BMMY 诱导培养基:按 Invitrogen 公司毕赤酵母操作表达手册配制。

1.2 实验仪器

高速冷冻离心机 (BIOFUGE PRIMOR):美国 Thermo Scientific 有限公司产品;低速台式大容量离心机 (RJTDL-50A):无锡瑞江分析仪器有限公司产品;双光束紫外可见分光光度计 (TU-1900):北京普析通用仪器有限责任公司产品;高效液相色谱仪 (LC-20AT230V)、示差折光检测器 (RID-10A)、AKTA purifier 900 蛋白纯化系统:岛津公司产品;NH₂P-50 色谱柱:美国 Thermo 公司产品;Ni-NTA 亲和层析柱:GE Healthcare life sciences 公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 重组毕赤酵母 pPICZ α A-MnCO 的诱导表达 将保存的菌种 X33-pPICZ α A-MnCO 接种到 YPD 中,30 ℃,220 r/min 培养至 $A_{600\text{nm}}$ 为 2~3,按照体积分数 3%的接种量接种到 BMGY 中,30 ℃,220 r/min 培养至 $A_{600\text{nm}}$ 为 4~5,用无菌管离心收集菌体,菌体用 BMMY 悬浮,加入到含有 BMMY 的锥形摇瓶中,28 ℃,220 r/min 每隔 12 h 添加甲醇至终体积分数 0.5%,诱导表达 72 h,离心收集上清液。将上清液放入 pH 6.0 的 20 mmol/L 的 PBS 中透析 48 h,去除培养基中的大分子得到粗酶液。

1.3.2 重组 *M. nivale* 还原糖氧化酶的分离纯化 重组 *M. nivale* 还原糖氧化酶在 C-末端加入组氨酸标签,镍柱中镍离子与组氨酸产生配位相互作用,选用镍柱亲和层析对其进行纯化。具体步骤为:用过膜(0.22 μm)并脱气后的超纯水冲洗 AKTA 蛋白纯化系统,基线平稳后换淋洗液(50 mmol/L, pH 7.0 的 Tris-HCl, 200 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑)平衡 Ni-NTA 柱,流量为 1 mL/min,平衡完毕后将粗酶液通过 0.22 μm 的膜后进样,进样量为 1 mL。待杂蛋白去除后换洗脱液(50 mmol/L, pH 7.0 的 Tris-HCl, 200 mmol/L NaCl, 500 mmol/L 咪唑)洗脱目标蛋白,收集洗脱液^[14],将洗脱下来含 *M. nivale* 还原糖氧化酶的组分用 20 mmol/L 的 PBS (pH 6.0)透析脱盐。采用 SDS-PAGE 对重组 *M. nivale* 还原糖氧化酶进行鉴定。

1.3.3 *M. nivale* 还原糖氧化酶理化性质分析

1)SDS-PAGE 电泳 浓缩胶质量浓度选为 5 g/dL,分离胶质量浓度选为 12 g/dL,纯化酶液与 5 $\times$ 样品缓冲液混合,沸水浴 5 min,将 10 μL 处理好的样

品加入到凝胶孔中,调节电压保持 100 V。电泳结束,取出凝胶染色,选用质量分数为 0.1%考马斯亮蓝 R-250 染色 5 min 后,换成考马斯亮蓝脱色液,震荡脱色^[15]。

2) 重组 *M. nivale* 还原糖氧化酶酶活的测定 取 200 μL 的乳糖(0.1 mol/L)保温 10 min,加入 20 μL 的酶液,在一定温度下避光反应 20 min,采用过氧化氢试剂盒测定过氧化氢浓度。

酶活定义:在 pH 6.0,50 $^{\circ}\text{C}$ 下 1 min 内催化乳糖反应产生 1 $\mu\text{mol/L}$ 的过氧化氢所需的酶量为 1 U。

3) 蛋白质浓度的测定 标准品选用牛血清蛋白,采用 Bradford 法^[16]对蛋白质浓度进行测定。

1.3.4 乳糖酸含量的测定 用高效液相色谱法对乳糖酸的含量进行定量测定,采用示差检测器检测,色谱柱为 $\text{NH}_2\text{P}-50$ 。流动相为乙腈和 40 mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4-20$ mmol/L 柠檬酸缓冲液,在 pH 5.0 的条件下,以 0.8 mL/min 的流量在 40 $^{\circ}\text{C}$ 下泵入^[17]。

1.3.5 重组 *M. nivale* 还原糖氧化酶作用于乳糖的最适温度和最适 pH 在 30~80 $^{\circ}\text{C}$ 范围内,以 5 $^{\circ}\text{C}$ 为温度间隔,测定重组 *M. nivale* 还原糖氧化酶作用于乳糖的最适温度,测定的酶活最大值为 100%,各温度条件下的酶活为相对酶活。

以不同 pH 的缓冲溶液为底物溶液,将 pH 分成 3 段(3~6、6~8、8~9),依次选用 20 mmol/L 的柠檬酸/柠檬酸钠、磷酸氢二钠/磷酸二氢钠、氨酸/氢氧化钠缓冲液,在相同温度下测定重组 *M. nivale* 还原糖氧化酶作用于乳糖的活性,测定的酶活最大值为 100%,各 pH 条件下的酶活为相对酶活。

1.3.6 单因素试验设计

1) 乳糖浓度对乳糖酸转化率的影响 分别以 1,5,10,25 mmol/L 的乳糖为底物,每 100 mL 的反应液中添加 3.0 U/mL 的过氧化氢酶,通气量为 0.6 L/min,每隔 12 h 加入 1.5 U/mL 的重组 *M. nivale* 还原糖氧化酶,通过加入 0.1 mol/L 的 Na_2CO_3 溶液调节反应液的 pH 在 5~6,55 $^{\circ}\text{C}$ 反应 48 h 后对乳糖酸的转化率进行分析。

2) 加酶量对乳糖酸转化率的影响 以 5 mmol/L 的乳糖为底物,每 100 mL 的反应液中添加 3.0 U/mL 的过氧化氢酶,通气量为 0.6 L/min,每隔 12 h 分别加入 0.5,1.0,1.5,2.0 U/mL 的重组 *M. nivale* 还原糖氧化酶,通过加入 0.1 mol/L 的 Na_2CO_3 溶液调节反应液的 pH 在 5~6,55 $^{\circ}\text{C}$ 反应 48 h 后对乳糖

酸的转化率进行分析。

3) 反应温度对乳糖酸转化率的影响 以 5 mmol/L 的乳糖为底物,每 100 mL 的反应液中添加 3 U/mL 的过氧化氢酶,通气量为 0.6 L/min,每隔 12 h 加入 1.5 U/mL 的重组 *M. nivale* 还原糖氧化酶,通过加入 0.1 mol/L 的 Na_2CO_3 溶液调节反应液的 pH 在 5~6,分别在 40,45,50,55,60 $^{\circ}\text{C}$ 反应 48 h 后对乳糖酸的转化率进行分析。

4) 反应时间对乳糖酸转化率的影响 以 5 mmol/L 的乳糖为底物,每 100 mL 的反应液中添加 3.0 U/mL 的过氧化氢酶,通气量为 0.6 L/min,每隔 12 h 加入 1.5 U/mL 的重组 *M. nivale* 还原糖氧化酶在 55 $^{\circ}\text{C}$ 下反应,通过加入 0.1 mol/L 的 Na_2CO_3 溶液调节反应液的 pH 在 5~6,分别在反应 12,24,36,48,60 h 后取样,对乳糖酸的转化率进行分析。

1.3.7 正交试验 在单因素实验的基础上,采用 $L_9(3^4)$ 正交表对乳糖浓度、加酶量、反应温度、反应时间进行优化,以乳糖酸转化率为评定指标,试验因素水平见表 1。

表 1 正交试验因素与水平设计表

Table 1 Design table of factor and level in orthogonal test

水平	因素			
	乳糖浓度 A/ (mmol/L)	加酶量 B/ (U/mL)	反应时间 C/ h	反应温度 D/ $^{\circ}\text{C}$
1	1	0.5	36	50
2	5	1	48	55
3	10	1.5	60	60

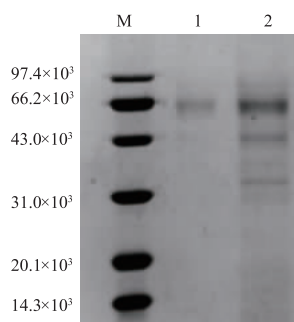
2 结果与讨论

2.1 重组 *M. nivale* 还原糖氧化酶的 SDS-PAGE 分析

以甲醇诱导表达的重组毕赤酵母 X33/pPICZ α A-MnCO₂ 诱导表达 72 h,离心取上清,透析得到粗酶液,粗酶液经 Ni-NTA 纯化后得到重组 *M. nivale* 还原糖氧化酶,由图 1 可以看出粗酶液在 60 KDa 出有明显条带,经 Ni-NTA 纯化后得到纯度大于 95%的重组 *M. nivale* 还原糖氧化酶。

2.2 重组 *M. nivale* 还原糖氧化酶的酶活和蛋白质质量分数

经实验测定重组 *M. nivale* 还原糖氧化酶活力为 500.435 U/mL,蛋白质质量分数为 0.501 mg/mL。



M: 蛋白 Marker; 1: 纯化酶; 2: 粗酶液

图 1 重组 *M. nivale* 还原糖氧化酶 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the recombinant MnCO

2.3 重组 *M. nivale* 还原糖氧化酶作用于乳糖的最适温度和最适 pH

按照 2.3.2 中的方法测定重组 *M. nivale* 还原糖氧化酶作用于乳糖的最适温度和最适 pH。图 2 显示, 该酶作用于乳糖的最适温度为 55 °C, 最适 pH 为 6.0, 且 pH 值在 4.0~6.0 时, 酶活大于 85%, 该特性有助于重组 *M. nivale* 还原糖氧化酶催化乳糖氧化转化为乳糖酸。

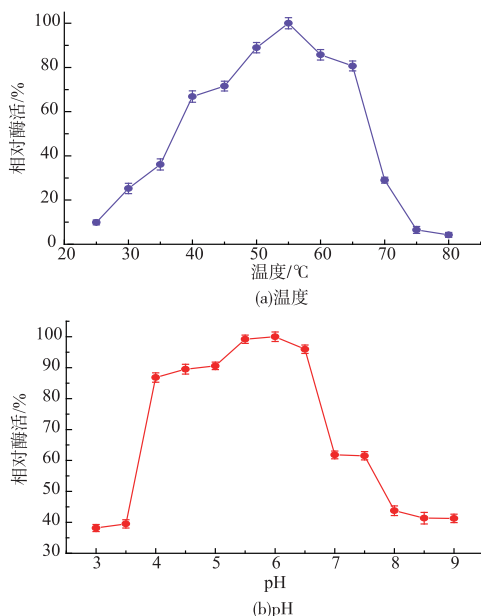


图 2 重组 *M. nivale* 还原糖氧化酶作用于乳糖的最适温度与 pH

Fig. 2 Optimal reaction pH of the recombinant MnCO on lactose

2.4 单因素试验

2.4.1 乳糖浓度对乳糖酸转化率的影响 由图 3 可以看出, 乳糖浓度为 10 mmol/L 和 25 mmol/L 时, 转化率均低于 60%。当乳糖浓度为 1 mmol/L 和 5

mmol/L 时, 转化率接近 100%, 造成这一现象的原因可能为: 随着乳糖浓度的增大。乳糖与酶分子之间无法充分相互接触, 从而使得乳糖酸的转化率降低。

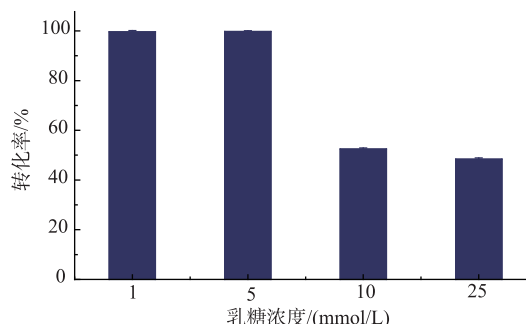


图 3 乳糖浓度对乳糖酸转化率的影响

Fig. 3 Effect of concentration of lactose on the LA conversion rate

2.4.2 加酶量对乳糖酸转化率的影响 由图 4 可以看出加酶量为 0.5 U/mL 时, 乳糖的转化率大于 90%, 提高加酶量至 1.0 U/mL 时乳糖的转化率接近 100%。造成这一现象的原因可能为: 酶的浓度较低时, 酶分子不能够完全与乳糖相互接触, 从而使得乳糖酸的转化率较低, 增加酶浓度之后, 酶分子与乳糖完全接触, 能够完全催化乳糖转化为乳糖酸。

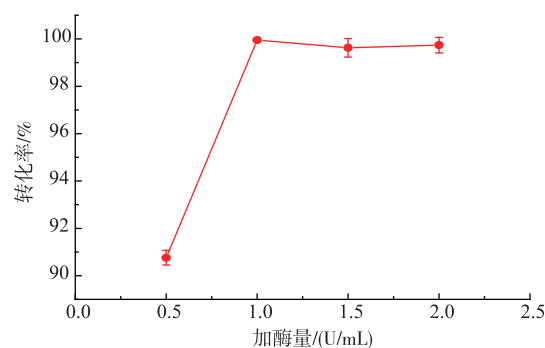


图 4 加酶量对乳糖酸转化率的影响

Fig. 4 Effect of the amount of MnCO on the LA conversion rate

2.4.3 温度对乳糖酸转化率的影响 由图 5 可以看出在 40 °C 到 55 °C, 随着温度的上升乳糖的转化率也呈现上升趋势, 在 55 °C 时达到最高, 接近 100%, 当反应温度为 60 °C 时乳糖的转化率下降, 出现这种现象的原因可能是当温度较低时, 重组 *M. nivale* 还原糖氧化酶的活性中心没有完全打开, 当

温度升高后,活性中心完全打开,能够完全氧化乳糖成乳糖酸,当反应温度高于重组 *M. nivale* 还原糖氧化酶用于乳糖的最适温度后,部分酶分子在反应过程中已经失去活性,使得乳糖酸的转化率降低^[18]。

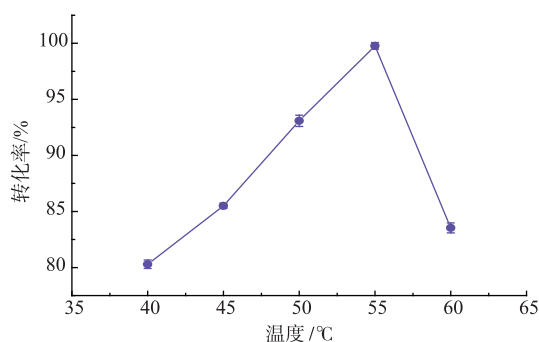


图 5 温度对乳糖酸转化率的影响

Fig. 5 Effect of temperature on the LA conversion rate

2.4.4 反应时间对乳糖酸转化率的影响 由图 6 可以看出,在 12~48 h 内随着反应时间的延长,乳糖酸的转化率逐渐上升,在反应至 36 h 乳糖酸的转化率达到 96%,在反应 48 h 后达到最高,为 99.98%,接近 100%。

2.5 正交试验结果

通过正交试验可知,影响乳糖酸转化率的因素大小依次为 A(乳糖浓度) > B(反应时间) > D(反应温度) > C(加酶量),最佳工艺为 $A_2B_2C_2D_2$,即乳糖浓

度为 5 mmol/L,反应时间为 48 h,反应温度为 55 °C,加酶量为 1.5 U/mL。按照此方案进行验证试验,乳糖酸的转化率为 99.98%。

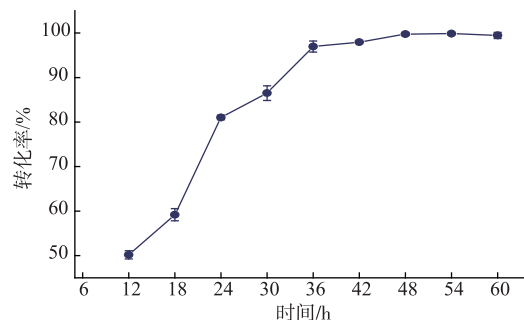


图 6 时间对乳糖酸转化率的影响

Fig. 6 Effect of time on the LA conversion rate

3 结 语

通过研究重组 *M. nivale* 还原糖氧化酶作用于乳糖的最适温度和最适 pH 及重组 *M. nivale* 还原糖氧化酶用于乳糖制备乳糖酸的条件,测定重组 *M. nivale* 还原糖氧化酶活力为 500.435 U/mL,蛋白质质量浓度为 0.501 mg/mL,其作用于乳糖的最适温度为 55 °C,最适 pH 为 6.0,当乳糖浓度为 5 mmol/L,在 55 °C 下加入 1.5 U/mL 的重组 *M. nivale* 还原糖氧化酶反应 48 h 后可将乳糖转化为乳糖酸,转化率接近 100%。

参考文献:

- [1] AHMAD S K, BRINCH D S, FRIIS E P, et al. Toxicological studies on lactose oxidase from *Microdochium nivale* expressed in *Fusarium venenatum*[J]. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 2004, 39(3): 256-270.
- [2] TASIC K M, SAVIC S, LUKIC M, et al. Lactobionic acid in a natural alkylpolyglucoside-based vehicle: assessing safety and efficacy aspects in comparison to glycolic acid[J]. **Journal of cosmetic dermatology**, 2010, 9(1): 3-10.
- [3] TOSHIKAKI S, SHUICHI Y, TOMOKO K, et al. Bifidus factors containing lactobionic acid[J]. **Japanese Patent**, 1995, 7277990.
- [4] VERSTREPEN K J, VAN Laere S D M, VANDERHAEGEN B M P, et al. Expression levels of the yeast alcohol acetyltransferase genes ATF1, Lg-ATF1, and ATF2 control the formation of a broad range of volatile esters [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2003, 69(9): 5228-5237.
- [5] LUDWIG R, OZGA M, et al. Continuous enzymatic regeneration of electron acceptors used by flavoenzymes: cellobiose dehydrogenase-catalyzed production of lactobionic acid as an example [J]. **Biocatalysis and Biotransformation**, 2004, 22(2): 97-104.
- [6] HUA L, NORDKVIST M, NIELSEN P M, et al. Scale-up of enzymatic production of lactobionic acid using the rotary jet head system[J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 2007, 97(4): 842-849.
- [7] ISAACSON Y, SALEM O, SHEPHERD R E, et al. Lactobionic acid as an iron chelator: a rationale for its effectiveness as an organ preservative[J]. **Life Sciences**, 1989, 45(24): 2373-2380.

- [8] BERARDESCA E,DISTANTE F,VIGNOLI G P,et al. Alpha hydroxyacids modulate stratum corneum barrier function[J]. **British Journal of Dermatology**, 1997, 137(6):934-938.
- [9] GREEN J W. The halogen oxidation of simple carbohydrates.Advanced in Carbohydrat Chemistry [M]. New York:AcadPress, 1948.
- [10] NORDKVIST M,NIELSEN P M,VILLADSEN J. Oxidation of lactose to lactobionic acid by a *Microdochium nivale* carbohydrate oxidase:Kinetics and operational stability[J]. **Biotechnology and bioengineering**, 2007, 97(4):694-707.
- [11] XU F,GOLIGHTLY E J,FUGLSANG C C,et al. A novel carbohydrate:acceptor oxidoreductase from *Microdochium nivale*[J]. **European Journal of Biochemistry**, 2001, 268(4):1136-1142.
- [12] JANSSEN F W,RUELIUS H W. Carbohydrate oxidase,a novel enzyme from polyporus obtusus:II. Specificity and characterization of reaction products[J]. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)–Enzymology**, 1968, 167(3):501-510.
- [13] RUELIUS H W,KERWIN R M,JANSSEN F W. Carbohydrate oxidase,a novel enzyme from polyporus obtusus:I. Isolation and purification[J]. **Biochimicaet Biophysica Acta (BBA)–Enzymology**, 1968, 167(3):493-500.
- [14] 许燕. 4- α -糖基转移酶作用于脱支淀粉制备大环糊精的研究[D]. 无锡:江南大学, 2014.
- [15] 汪家政,范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京:科学出版社, 2000:42-46.
- [16] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. **Analytical Biochemistry**, 1976, 72(1):248-254.
- [17] ZHENG Yan,KUANG Lixue,LI Chao,et al. Optimization of fermentation conditions for lactobionic acid production by burkholderia cepacia[J]. **Food Science**, 2012, 33(11):181-184.(in Chinese)
- [18] 谢渊. 脂肪酶活性中心区域进化提高酶动力学稳定性和催化活性[D]. 长春:吉林大学, 2014.

会 议 消 息

会议名称(中文):2017 中国生物材料大会

所属学科:生物技术与生物工程,生物及医药化工,纺织材料与纺织技术,材料科学基础学科

开始日期:2017-10-27

结束日期:2017-10-29

所在城市:江西省 南昌市

主办单位:中国生物材料学会、中国生物医学工程学会生物材料分会、华东交通大学

会议主席:王迎军 万 明

联系人:敖海勇 15797863906

联系电话:0791-87046893

E-MAIL:aohyong@126.com

会议网站:<http://clxy.ecjtu.edu.cn/meeting2017/Action/TouristMain>

会议背景介绍:由中国生物材料学会(CSBM)、中国生物医学工程学会生物材料分会(CSBME-BMB)和华东交通大学共同主办的“2017 中国生物材料大会”将于 2017 年 10 月 27-29 日在“英雄城”南昌举行。“2017 中国生物材料大会”以“生物医用材料创新研发与产业化”为主题,邀请学养深厚的专家学者就生物材料科学与产业的研究热点、发展前沿在南昌论道。大会将由 6 个大会报告、24 个专题报告会(专题分会场近百个)、4 个专题研讨会及论坛和墙报等组成。