

利用酒糟处理液作为氮源培养裂殖壶菌 生产 DHA 的发酵工艺优化

秦宇, 欧莹, 王尤婧, 张玲, 冯守帅, 杨海麟

(江南大学生物工程学院, 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏无锡 214122)

摘要:为降低发酵培养裂殖壶菌生产 DHA 的成本, 以酱香型白酒酒糟为实验材料, 将其简单预处理后作为裂殖壶菌发酵培养基氮源, 首先分析了酒糟处理液与胰蛋白胨的游离氨基酸组成与含量, 然后以生物量、油脂产量和 DHA 产量为指标, 对酒糟处理液、胰蛋白胨、酵母提取物和牛肉膏作为氮源培养裂殖壶菌生产 DHA 进行了比较, 优化了酒糟处理液作为氮源时的发酵工艺条件, 并对发酵废液进行三次循环利用。结果表明: 酒糟处理液可以作为满足裂殖壶菌生长的氮源; 与酵母提取物、牛肉膏相比, 酒糟处理液作为氮源有明显优势; 利用酒糟处理液作为氮源的最佳发酵工艺条件为酒糟(含水量约 10%)与水质量比 1:9、酒糟处理液添加量 70% (与基础发酵培养基中水的置换比例)、初始 pH 7.0、培养时间 108 h, 在此条件下裂殖壶菌生物量、油脂产量和 DHA 产量分别达到 22.14、8.88 g/L 和 2.84 g/L; 最佳条件下三次循环添加 15.0% (与基础发酵培养基中水的置换比例) 发酵废液于酒糟处理液培养基中, 裂殖壶菌 DHA 产量分别为 4.27、3.70 g/L 和 2.75 g/L。综上, 利用酒糟处理液培养裂殖壶菌生产 DHA 是酒糟资源化利用的新方法。

关键词:酒糟处理液; 裂殖壶菌; DHA; 发酵废液

中图分类号: TQ920.6; TQ921 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2023)03-0116-07

Optimization of fermentation process of culturing *Schizochytrium* to produce DHA using distiller's grains treatment liquid as nitrogen source

QIN Yu, OU Ying, WANG Youjing, ZHANG Ling,
FENG Shoushuai, YANG Hailin

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, School of Biotechnology,
Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

Abstract: In order to reduce the cost of producing DHA by fermentation culture of *Schizochytrium*, the sauce-flavor distiller's grains were used as the experimental material, and it was simply pretreated as the nitrogen source of the fermentation culture medium of *Schizochytrium*. Firstly, the free amino acid composition and content of distiller's grains treatment liquid and tryptone were analyzed. Then, the biomass, oil yield and DHA yield were used as indicators, the production of DHA by *Schizochytrium* using distiller's grains treatment liquid, tryptone, yeast extract and beef extract as nitrogen sources was compared, and the fermentation conditions were optimized when distiller's grains treatment liquid was used as nitrogen source. The fermentation wastewater was recycled for three times. The results showed that the distiller's grains treatment liquid could be used as a nitrogen source for the growth of *Schizochytrium*.

Compared with yeast extract and beef extract, distiller's grains treatment liquid had obvious advantages as nitrogen source. The optimal fermentation conditions for using distiller's grains treatment liquid as nitrogen source were obtained as follows: mass ratio of distiller's grains (about 10% of water content) to water 1:9, dosage of distiller's

收稿日期: 2021-01-10; 修回日期: 2022-10-29

作者简介: 秦宇(1996), 女, 硕士研究生, 研究方向为细胞培养与代谢工程(E-mail) 1249958452@qq.com。

通信作者: 杨海麟, 教授(E-mail) 19891996@sina.com。

grains treatment liquid 70% (replacement ratio of water in the basic fermentation culture medium), initial pH 7.0, and incubation time 108 h. Under these conditions, the biomass, oil yield, and DHA yield of *Schizochytrium* reached 22.14, 8.88 g/L, and 2.84 g/L, respectively. After three cycles of adding 15.0% (replacement ratio of water in the basic fermentation culture medium) of fermentation wastewater into the distiller's grains treatment liquid culture medium, the DHA yield of *Schizochytrium* was 4.27, 3.70, 2.75 g/L respectively. In summary, it is a new method of resource utilization of distiller's grains to cultivate *Schizochytrium* to produce DHA by distiller's grains treatment liquid.

Key words: distiller's grains treatment liquid; *Schizochytrium*; DHA; fermentation wastewater

二十二碳六烯酸(DHA)是一种人体不可或缺的多不饱和脂肪酸,具有促进神经系统发育、保护心血管健康、抗癌、抗炎等功效^[1]。传统的DHA由鱼类资源加工制取,但随着近年来鱼类资源过度捕捞、海洋环境污染严重等问题的出现,鱼油的可持续性和安全性引发了人们的担忧^[2-3]。海洋微藻是新兴的DHA来源,与鱼油相比,藻油具有无鱼腥味、品质稳定、无污染、易提取纯化等优点。

裂殖壶菌可通过异氧培养模式将有机物有效转化为高附加值脂肪酸^[4],被认为是一种非常有前途的商业DHA生产替代品,但高昂的生产成本限制了其广泛应用。因此,有必要探索低成本的DHA生产策略。目前寻找廉价碳源的研究较多^[5-6],与碳源相比,氮源占产油微生物大部分发酵生产成本,因此寻找低成本氮源物质以降低裂殖壶菌发酵生产DHA藻油的成本至关重要,但目前对低价氮源的研究较少。Ryu等^[7]在啤酒工业废酵母培养基条件下培养 *Aurantiocytrium* sp. KRS101,生物量可达31.80 g/L, DHA含量可达38.2%。Wang等^[8]利用豆腐乳清废液培养 *Schizochytrium* sp. S31,通过调节pH,生物量和DHA产率分别达到1.89 g/(L·d)和0.24 g/(L·d)。上述研究表明,一些低成本生物物质在微生物发酵产油中有良好的应用前景。

我国是白酒酿造大国,每年白酒鲜酒糟的产量高达2400多万t,干酒糟产量约800万t^[9]。酒糟是一种廉价而优质的植物蛋白质原料,但目前其主要用途为饲用或直接废弃。酒糟含水量高,堆放时会有大量高浓度高酸度污染物渗出,对环境造成严重污染^[10-11]。目前,利用酒糟培养裂殖壶菌的相关报道较少。本研究基于酒糟中丰富的氨基酸组成,对酒糟进行预处理,以酒糟处理液为氮源培养裂殖壶菌发酵生产富含DHA的藻油,并将酒糟处理液与传统培养基中氮源胰蛋白胨、酵母提取物、牛肉膏进行对比,同时对发酵废液进行循环利用,以期降低DHA工业化生产成本提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

裂殖壶菌菌株(*Schizochytrium* sp. S31),菌种编号ATCC20888, -80℃保存于ATCC By + 790培养基中,购于美国模式培养物集存库(American type culture collection, ATCC)。

活化培养基:ATCC By + 790 固体培养基。种子培养基:葡萄糖30 g/L、胰蛋白胨10 g/L、酵母提取物5 g/L、海水晶15 g/L、V_{B1} 0.05 g/L、V_{B6} 0.05 g/L、V_{B12} 0.0005 g/L, 115℃灭菌20 min。基础发酵培养基:葡萄糖70 g/L、L-谷氨酸钠一水合物20 g/L、磷酸二氢钾2.5 g/L、硫酸镁7.2 g/L、硫酸钠12.8 g/L、氯化钙0.4 g/L、海水晶17.5 g/L、V_{B1} 0.1 g/L、V_{B6} 0.1 g/L、V_{B12} 0.001 g/L、生物素0.006 g/L, 115℃灭菌20 min。

酒糟,贵州安酒酱香型白酒酒糟;37种脂肪酸甲酯混合标准品, Nu - Chek Prep 公司;DHA及C19:0标准品,上海安谱实验科技股份有限公司;DNS试剂,上海源叶生物科技有限公司;正己烷、甲醇为色谱纯,其余试剂为分析纯,上海国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 仪器与设备

3K-15台式高速冷冻离心机,德国Sigma公司;UV-5200紫外可见分光光度计,上海元析仪器有限公司;Shimadzu GC-2010气相色谱仪,日本岛津公司;Agilent 1100游离氨基酸分析专用高效液相色谱仪,美国安捷伦公司;Scientz-10ND真空冷冻干燥机,宁波新芝冻干设备有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种的扩大培养与发酵

将保藏于-80℃的菌种转接于活化培养基上,于28℃条件下培养3 d,接种环刮取1环,接入装有50 mL种子培养基的250 mL三角瓶中,以28℃、200 r/min摇床培养48 h,按1:10转接3代,作为种

子液。以 10% 的接种量将种子液接种于装有 100 mL 发酵培养基的 500 mL 锥形瓶中,于 28 ℃、200 r/min 的恒温摇床上培养。

1.2.2 酒糟处理液的制备

将酒糟晾晒 2 d 至含水量约为 10% 后,按酒糟与水质量比 1:9 加水将酒糟浸泡 4 h,每隔 1 h 搅拌 1 次,得到酒糟溶液。将酒糟溶液加热煮沸 2 min,用 0.074 mm(200 目)孔径筛滤去残渣后用离心机以 5 000 r/min 离心 3 min,取上清液并用快速滤纸过滤得到酒糟处理液。

1.2.3 游离氨基酸组成与含量测定

用质量浓度 10 g/100 mL 三氯乙酸(TCA)溶液将发酵液等体积稀释,双层滤纸过滤,以 15 000 r/min 离心 30 min,将上清液用 0.22 μm 水膜过滤后用游离氨基酸分析专用高效液相色谱仪测定游离氨基酸组成与含量。

1.2.4 葡萄糖含量测定

参考文献[12]测定葡萄糖含量。

1.2.5 生物量测定

取 30 mL 发酵液于离心管中,以 8 000 r/min 离心 15 min,沉淀用双蒸水洗涤离心 2 次,置于 -20 ℃ 冰箱冷冻 24 h 后,用真空冷冻干燥机干燥,称质量,计算生物量(以每升发酵液中干菌体的质量表示)。

1.2.6 油脂提取

采用酸热破壁与正己烷提取法提取油脂,参照文献[13]改进。具体步骤:精确称取 0.8 g 冷冻干燥后的菌体于 50 mL 离心管中,加入 8 mL 浓盐酸和 4 mL 去离子水,75 ℃ 水浴 1 h 左右,间隔 20 min 振荡 1 次。冷却后加 3.2 mL 无水乙醇与 8 mL 正己烷,充分摇匀,以 3 000 r/min 离心 2 min,收集上层正己烷层,重复 3 次,合并正己烷层,于 65 ℃ 真空水浴旋转蒸发脱除正己烷,得到油脂。以每升发酵液中油脂的质量计算油脂产量。

1.2.7 脂肪酸组成及含量测定

参考文献[14]进行脂肪酸甲酯化。采用气相色谱法测定脂肪酸组成。

气相色谱条件:Innowas capillary column 气相色谱柱(30 m × 0.32 mm × 0.25 μm);氢离子火焰检测器,检测器温度 250 ℃;进样口温度 250 ℃,进样量 1 μL,不分流进样;载气为 N₂;柱升温程序为起始温度 130 ℃ 维持 2 min,以 10 ℃/min 的速度升温至 180 ℃,再以 4 ℃/min 的速度升温至 240 ℃,维持 8 min。

采用与 37 种脂肪酸甲酯混合标准品保留时间对比进行脂肪酸定性;通过各脂肪酸与添加的内标 C19:0 进行出峰面积比对进行脂肪酸定量。以每升

发酵液中 DHA 的质量计算 DHA 产量。

1.2.8 数据分析

所有实验均重复 3 次,用标准差检测实验数据的稳定性。利用 Origin 软件作图。利用 SPSS 软件进行单因素方差分析(ANOVA)。

2 结果与分析

2.1 酒糟处理液与胰蛋白胨中游离氨基酸组成与含量

有研究表明,利用胰蛋白胨和酵母提取物等商品化氮源培养裂殖壶菌时,菌体生物量在胰蛋白胨培养基中达到峰值^[15],说明胰蛋白胨是较适于裂殖壶菌生长的氮源。白酒酒糟蛋白质含量高,粗纤维含量较少,而且还含有多种维生素和微量元素等有益成分^[9,16]。为检验酒糟处理液作为裂殖壶菌发酵培养基氮源的适用性,将酒糟处理液与胰蛋白胨的游离氨基酸组成与含量进行比较,结果如表 1 所示。

表 1 胰蛋白胨与酒糟处理液游离氨基酸组成与含量

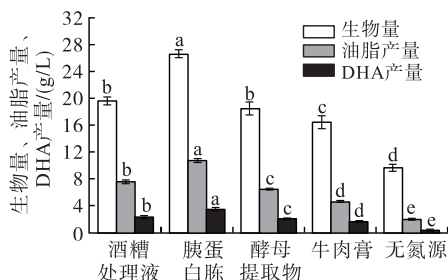
氨基酸	胰蛋白胨	酒糟处理液
天冬氨酸	0.156 5	0.247 2
谷氨酸	0.141 6	0.244 4
丝氨酸	0.027 1	0.028 0
组氨酸	0.033 8	0.035 0
甘氨酸	0.080 7	0.170 8
苏氨酸	0.034 3	0.225 5
精氨酸	0.300 8	0.112 6
丙氨酸	0.092 2	0.131 9
酪氨酸	0.049 1	0.099 5
半胱氨酸	0.039 3	0.049 0
缬氨酸	0.059 5	0.150 3
甲硫氨酸	0.029 6	0.030 9
色氨酸	0.047 7	0.042 2
苯丙氨酸	0.127 0	0.076 1
异亮氨酸	0.082 2	0.087 3
亮氨酸	0.150 5	0.129 1
赖氨酸	0.094 2	0.060 5
脯氨酸	0.278 4	0.058 0
总量	1.824 5	1.978 3

从表 1 可以看出,酒糟与水按质量比 1:9 混合后经预处理得到的酒糟处理液游离氨基酸总量为 1.978 3 g/L,相比于胰蛋白胨的游离氨基酸总量提高 8.43%。研究表明,培养基中甲硫氨酸、丙氨酸、谷氨酸、赖氨酸、脯氨酸对细胞生长和 DHA 积累有积极作用,而甘氨酸、精氨酸和苏氨酸对细胞生长和 DHA 积累有负面影响^[17]。酒糟处理液中甲硫氨酸、丙氨酸、谷氨酸等含量均高于胰蛋白胨,可作为

满足裂殖壶菌生长所需的氮源。

2.2 酒糟处理液替代传统氮源培养裂殖壶菌产 DHA 比较

胰蛋白胨和酵母提取物等商品化培养基氮源中含有许多适于微生物生长代谢的生长因子,所以常被用于裂殖壶菌的培养^[18]。本文以无氮源条件为对照,分别在基础发酵培养基中添加酒糟处理液、胰蛋白胨、酵母提取物、牛肉膏作为不同氮源,在初始 pH 均为 7.0 条件下培养裂殖壶菌 108 h,考察氮源种类对裂殖壶菌生物量、油脂产量和 DHA 产量的影响,结果如图 1 所示。其中:以酒糟处理液培养时,酒糟与水质量比为 1:9、酒糟处理液添加量为 60% (与基础发酵培养基中水的置换比例);根据文献^[19]和本实验室前期研究,确定胰蛋白胨、酵母提取物和牛肉膏在培养基中的质量浓度为 5.6 g/L。



注:不同字母表示组间差异显著($p < 0.05$)

图 1 不同氮源条件下裂殖壶菌生物量、油脂产量及 DHA 产量

从图 1 可以看出,以酒糟处理液为氮源培养裂殖壶菌,生物量为 19.58 g/L,与酵母提取物、牛肉膏和无氮源条件下的生物量相比分别提高 6.24%、19.24% 和 102.06%,其油脂产量和 DHA 产量显著高于酵母提取物、牛肉膏、无氮源条件下的($p < 0.05$)。因此,与酵母提取物、牛肉膏相比,酒糟处理液作为裂殖壶菌培养基氮源有明显优势,但与胰蛋白胨为氮源相比,其生物量、油脂产量和 DHA 产量偏低,需进一步优化酒糟处理液为氮源条件下的发酵工艺。

2.3 酒糟处理液为氮源培养裂殖壶菌产 DHA 的发酵工艺优化

2.3.1 酒糟与水质量比

在酒糟与水质量比分别为 1:3、1:6、1:9 和 1:12,酒糟处理液添加量 60%,初始 pH 6.5,培养时间 108 h 条件下培养裂殖壶菌,考察酒糟与水质量比对裂殖壶菌生物量、油脂产量及 DHA 产量的影响,结果如图 2 所示。

从图 2 可以看出:酒糟与水质量比为 1:3 时,生物量、油脂产量和 DHA 产量仅分别为 8.53、2.11

g/L 和 0.53 g/L;酒糟与水质量比为 1:9 时,生物量最大,为 19.42 g/L,油脂产量最大,为 7.62 g/L,此时 DHA 产量也最高,分别是酒糟与水质量比为 1:3、1:6、1:12 时的 4.80、1.60 倍和 1.14 倍。上述结果表明,培养基中的碳氮比对裂殖壶菌的油脂合成和 DHA 的积累影响较大,氮源浓度过高会抑制微生物的生长,这与 Jiang 等^[20]研究结果一致。

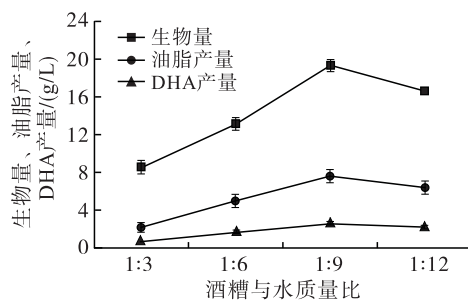


图 2 酒糟与水质量比对裂殖壶菌生物量、油脂产量及 DHA 产量的影响

2.3.2 酒糟处理液添加量

在酒糟与水质量比 1:9,初始 pH 6.5,培养时间 108 h,酒糟处理液添加量分别为 0、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100% 条件下培养裂殖壶菌,考察酒糟处理液添加量对裂殖壶菌生物量、油脂产量及 DHA 产量的影响,结果如图 3 所示。

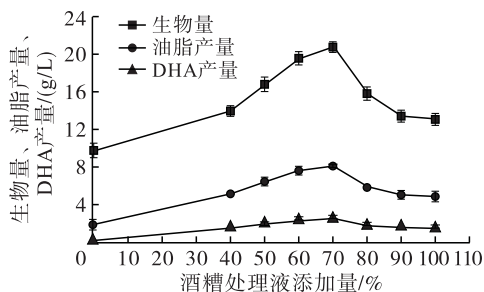


图 3 酒糟处理液添加量对裂殖壶菌生物量、油脂产量及 DHA 产量的影响

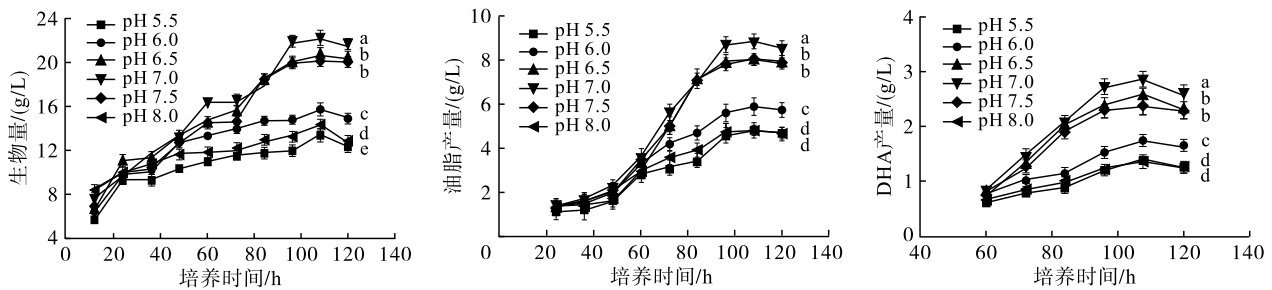
从图 3 可以看出,当酒糟处理液添加量从 40% 上升至 70% 时,生物量和油脂产量迅速提高,表明提高氮源浓度使微生物的营养变得均衡,最适碳氮比为裂殖壶菌菌株生长繁殖和油脂积累提供了有利条件。当酒糟处理液添加量为 70% 时,生物量为 20.67 g/L,油脂产量为 8.07 g/L,DHA 产量为 2.56 g/L,但当酒糟处理液添加量大于 70% 时,生物量、油脂产量和 DHA 产量同步下降,说明氮源虽是菌体生长的必要条件,但其过量会抑制菌体生长和油脂积累。

2.3.3 初始 pH 和培养时间

发酵液初始 pH 会直接影响微生物的生长和油脂积累^[21]。酒糟处理液的 pH 约为 4.7,不利于藻类生长,因此对培养基初始 pH 进行优化。在酒糟

与水质量比 1:9,酒糟处理液添加量 70%,初始 pH 分别为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 条件下培养裂殖

壶菌,考察初始 pH 和培养时间对裂殖壶菌生物量、油脂产量及 DHA 产量的影响,结果如图 4 所示。



注:不同字母表示培养时间 108 h 下组间差异显著($p < 0.05$)

图 4 初始 pH 和培养时间对裂殖壶菌生物量、油脂产量及 DHA 产量的影响

从图 4 可以看出,在不同初始 pH 条件下裂殖壶菌细胞生长良好,没有明显的滞后期,说明酒糟处理液是一种很有前景的可维持细胞可持续生长的基础培养基氮源,培养 108 h 时生物量、油脂产量及 DHA 产量均达到最大值。当初始 pH 在 6.5~7.5 时,生物量较高,油脂产量和 DHA 产量也较大。在发酵培养基初始 pH 为 6.5、7.0 和 7.5,培养 108 h 时,裂殖壶菌生物量分别为 20.67、22.14 g/L 和 20.18 g/L,油脂产量分别为 8.07、8.88 g/L 和 8.02 g/L, DHA 产量分别为 2.56、2.84 g/L 和 2.35 g/L。因此,当酒糟处理液发酵培养基初始 pH 为 7.0 时,更有利于裂殖壶菌菌株的生长及油脂的合成。

综上所述,以酒糟处理液为氮源培养裂殖壶菌的最佳条件为酒糟与水质量比 1:9、酒糟处理液添加量 70%、培养基初始 pH 7.0、培养时间 108 h,此时生物量、油脂产量和 DHA 产量分别为 22.14、8.88 g/L 和 2.84 g/L,油脂中 DHA 含量为 32.08%,与 2.2 中以胰蛋白胨为氮源所得油脂的 DHA 含量(33.18%)相比没有显著性差异。

2.4 发酵废液循环利用

2.4.1 发酵废液分析

在最佳条件下完成第一次发酵后,将以酒糟处理液为氮源的裂殖壶菌发酵液以 8 000 r/min 离心 15 min,所得上清液即为发酵废液,对发酵废液进行分析,结果如表 2 所示。

表 2 发酵废液 pH 和成分

项目	指标
pH	6.2 ± 0.5
葡萄糖含量/(g/L)	10.2 ± 0.9
游离氨基酸总量/(g/L)	7.4 ± 0.9

从表 2 可以看出,发酵废液中含有未利用的葡萄糖和游离氨基酸,添加适量发酵废液于第二次发酵培养基中可为菌体生长提供更多能量,为发酵废

液循环利用的可行性提供理论依据。

2.4.2 发酵废液添加量优化

为进一步降低生产成本,将以酒糟处理液为氮源的裂殖壶菌发酵废液按适当比例添加到酒糟处理液发酵培养基中,在最佳发酵条件下探究发酵废液添加量(6.0%、10.5%、15.0%、19.5%、24.0%)(与基础发酵培养基中水的置换比例)对裂殖壶菌生物量、油脂产量及 DHA 产量的影响,结果如图 5 所示。

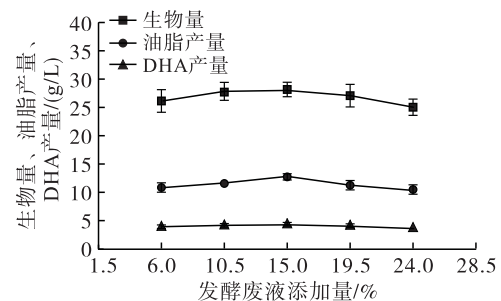


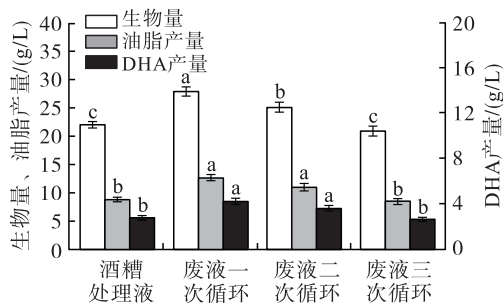
图 5 发酵废液添加量对裂殖壶菌生物量、油脂产量及 DHA 产量的影响

从图 5 可以看出,裂殖壶菌生物量随发酵废液添加量的增多呈先上升后下降趋势,在发酵废液添加量为 15.0% 时,裂殖壶菌生物量达到最高,为 27.97 g/L,此时油脂产量为 12.75 g/L, DHA 产量为 4.27 g/L。这可能是因为发酵结束后离心得到的废液中含有一些细胞生长和代谢所必需的矿物元素^[22],同时发酵废液中的盐使培养基渗透压增加,而适度升高渗透压有利于裂殖壶菌的生长^[23],但发酵废液添加量过多,发酵过程中释放的抑制细胞生长的一些化合物浓度增加^[24],从而抑制了裂殖壶菌的生长。因此,在酒糟处理液发酵培养基中发酵废液最佳添加量为 15.0%。

2.4.3 发酵废液循环利用

在最佳发酵条件下,将酒糟处理液与发酵废液

三次循环培养条件下裂殖壶菌的生长及产油情况进行对比,结果如图6所示。



注:不同字母表示组间差异显著($p < 0.05$)

图6 发酵废液循环利用对裂殖壶菌生物量、油脂产量及DHA产量的影响

从图6可以看出:在发酵废液添加量为15.0%时,一次循环利用时裂殖壶菌生物量、油脂产量、DHA产量分别为27.97、12.75 g/L和4.27 g/L,与酒糟处理液培养基相比分别提高26.33%、43.58%和50.35%;二次循环利用时裂殖壶菌生物量、油脂产量、DHA产量分别为25.15、11.05 g/L和3.70 g/L,与酒糟处理液培养基相比显著提高;三次循环利用时裂殖壶菌生物量、油脂产量、DHA产量分别为20.92、8.61 g/L和2.75 g/L,低于酒糟处理液培养基的,但无显著性差异。在发酵废液一次和二次循环利用时,废液中的生长因子可促进裂殖壶菌的生长,三次循环利用时发酵过程中产生的一些化合物积累可能会抑制菌体的生长和油脂积累。实验结果验证了发酵废液循环利用的可行性,进一步降低生产成本的同时提高了生产效率。

3 结论

本研究以酒糟处理液为氮源发酵培养裂殖壶菌,利用单因素实验进行工艺参数优化,确定最优发酵工艺条件为酒糟与水质比1:9、酒糟处理液添加量70%、初始pH 7.0、培养时间108 h,在此条件下生物量可达22.14 g/L,油脂产量为8.88 g/L,DHA产量为2.84 g/L,证实了酒糟处理液作为培养基氮源培养裂殖壶菌的可行性。在酒糟处理液培养基中添加15.0%发酵废液进行三次循环培养,所得生物量分别为27.97、25.15 g/L和20.92 g/L,油脂产量分别为12.75、11.05 g/L和8.61 g/L,DHA产量分别为4.27、3.70 g/L和2.75 g/L。与未添加发酵废液相比,一次循环和二次循环生物量、油脂产量及DHA产量均显著提升,三次循环条件下生物量、油脂产量及DHA产量均无显著差异。该方法在降低生产成本的同时降低了废液处理成本,可减少环境污染,实现了酒糟和发酵废液资源的高值化利用。

参考文献:

- [1] ZHANG M, CHEN C Y, YOU C H, et al. Effects of different dietary ratios of docosahexaenoic to eicosapentaenoic acid (DHA/EPA) on the growth, non-specific immune indices, tissue fatty acid compositions and expression of genes related to LC-PUFA biosynthesis in juvenile golden pompano *Trachinotus ovatus* [J]. *Aquaculture*, 2019, 505: 488-495.
- [2] SUN X M, REN L J, JI X J, et al. Adaptive evolution of *Schizochytrium* sp. by continuous high oxygen stimulations to enhance docosahexaenoic acid synthesis [J]. *Bioresour Technol*, 2016, 211: 374-381.
- [3] GUO D S, JI X J, REN L J, et al. Development of a real-time bioprocess monitoring method for docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp. [J]. *Bioresour Technol*, 2016, 216: 422-427.
- [4] 刘兆欣,汪波,刘志翔,等.用脱脂蚕蛹水解物作氮源培养裂殖壶菌生产DHA的发酵工艺及动力学研究[J].*蚕业科学*, 2018, 44: 128-136.
- [5] NGUYEN H C, SU C H, YU Y K, et al. Sugarcane bagasse as a novel carbon source for heterotrophic cultivation of oleaginous microalga *Schizochytrium* sp. [J]. *Ind Crop Prod*, 2018, 121: 99-105.
- [6] YIN F W, ZHU S Y, GUO D S, et al. Development of a strategy for the production of docosahexaenoic acid by *Schizochytrium* sp. from cane molasses and algae-residue [J]. *Bioresour Technol*, 2019, 271: 118-124.
- [7] RYU B G, KIM K, KIM J M, et al. Use of organic waste from the brewery industry for high-density cultivation of the docosahexaenoic acid-rich microalga, *Aurantiochytrium* sp. KRS101 [J]. *Bioresour Technol*, 2013, 129: 351-359.
- [8] WANG S K, WANG X, TIAN Y T, et al. Nutrient recovery from tofu whey wastewater for the economical production of docosahexaenoic acid by *Schizochytrium* sp. S31 [J/OL]. *Sci Total Environ*, 2020, 710: 136448 [2022-01-10]. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136448>.
- [9] 刘志云,钟晓霞,姚焰础,等.白酒糟生物饲料及其在猪生产上的应用现状[J].*动物营养学报*, 2020, 32: 15-20.
- [10] AO T J, LI R L, CHEN Y C, et al. Anaerobic thermophilic digestion of Maotai-flavored distilled grains: process performance and microbial community dynamics [J]. *Energ Fuel*, 2019, 33(9): 8804-8811.
- [11] 杨新,杨双全,陈莉,等.以酒糟为基质的高温型生物有机肥复合发酵菌剂的制备[J].*食品与发酵工业*, 2019, 45: 242-249.
- [12] 王申强.裂殖壶菌产DHA的发酵工艺研究及高产菌

- 株选育[D]. 江苏 无锡:江南大学,2013.
- [13] 赵犇. 提高 *Schizochytrium* DHA 产量的诱变筛选方法研究及高产机理解析[D]. 江苏 无锡:江南大学,2018.
- [14] 袁军, 赵犇, 孙梦玉, 等. 常压室温等离子体(ARTP)诱变快速选育高产 DHA 的裂殖壶菌突变株[J]. 生物技术通报, 2015(10): 199 – 204.
- [15] ZHU L Y, ZHANG X C, REN X Y, et al. Effects of culture conditions on growth and docosahexaenoic acid production from *Schizochytrium limacinum* [J]. J Ocean Univ China, 2008, 7(1): 83 – 88.
- [16] 宋立立, 刘苗. 混合菌发酵生产蛋白饲料的研究进展[J]. 中国饲料, 2020(11): 15 – 19.
- [17] SONG X J, ZANG X N, ZHANG X C. Production of high docosahexaenoic acid by *Schizochytrium* sp. using low – cost raw materials from food industry [J]. J Oleo Sci, 2015, 64(2): 197 – 204.
- [18] XU J, ZHU Y J, LI H C, et al. Alanine mother liquor as a nitrogen source for docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp. B4D1 [J]. Electron J Biotechnol, 2018, 35: 10 – 17.
- [19] 赵犇, 王武, 李昌灵, 等. EMS – ARTP 复合诱变选育高产 DHA 裂殖壶菌[J]. 食品与机械, 2018, 34(2): 19 – 24.
- [20] JIANG X, ZHANG J, ZHAO J, et al. Regulation of lipid accumulation in *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 in response to different nitrogen sources [J/OL]. Eur J Lipid Sci Technol, 2017, 119(10): 201700025 [2022 – 01 – 10]. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201700025>.
- [21] BELIGON V, POUGHON L, CHRISTOPHE G, et al. Improvement and modeling of culture parameters to enhance biomass and lipid production by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* grown on acetate [J]. Bioresour Technol, 2015, 192: 582 – 591.
- [22] YIN F W, GUO D S, REN L J, et al. Development of a method for the valorization of fermentation wastewater and algal – residue extract in docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp. [J]. Bioresour Technol, 2018, 266: 482 – 487.
- [23] HU X C, REN L J, CHEN S L, et al. The roles of different salts and a novel osmotic pressure control strategy for improvement of DHA production by *Schizochytrium* sp. [J]. Bioproc Biosyst Eng, 2015, 38(11): 2129 – 2136.
- [24] MAZZOLENI S, LANDI C, CARTENI F, et al. A novel process – based model of microbial growth: self – inhibition in *Saccharomyces cerevisiae* aerobic fed – batch cultures [J/OL]. Microb Cell Fact, 2015, 14: 109 [2021 – 01 – 10]. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0295-4>.
-
- (上接第 94 页)
- [14] TAVERNIER I, NORTON I T, RIMAUX T, et al. Effect of high cooling and shear rate on the microstructural development of hybrid systems containing diacylglycerols and triacylglycerols of palm origin [J]. J Food Eng, 2019, 246(4): 141 – 152.
- [15] WEI F, MIAO J, TAN H, et al. Oleogel – structured emulsion for enhanced oxidative stability of perilla oil: influence of crystal morphology and cooling temperature [J/OL]. LWT – Food Sci Technol, 2021, 139(3): 110560 [2021 – 12 – 14]. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110560>.
- [16] FLOTTER E, WETTLAUFER T, CONTY V, et al. Oleogels: their applicability and methods of characterization [J/OL]. Molecules, 2021, 26(6): 1673 [2021 – 12 – 14]. <https://doi.org/10.3390/molecules26061673>.
- [17] YANG D X, CHEN X W, YANG X Q. Phytosterol – based oleogels self – assembled with monoglyceride for controlled volatile release [J]. J Sci Food Agric, 2018, 98(2): 582 – 589.
- [18] SINGH A, AUZANNEAU F I, ROGERS M A. Advances in edible oleogel technologies; a decade in review [J]. Food Res Int, 2017, 97(7): 307 – 317.
- [19] KAMALI E, SAHARI M A, BARZEGAR M, et al. Novel oleogel formulation based on amaranth oil: physicochemical characterization [J]. Food Sci Nutr, 2019, 7(6): 1986 – 1996.
- [20] CHOPIN – DOROTEO M, MORALES – RUEDA J A, DIBILDOX – ALVARADO E, et al. The effect of shearing in the thermo – mechanical properties of candelilla wax and candelilla wax – tripalmitin organogels [J]. Food Biophys, 2011, 6(3): 359 – 376.
- [21] 刘宏, 刘慧敏, 冯国霞, 等. 植物甾醇 + γ – 谷维素型凝胶油的制备及其影响因素的研究 [J]. 中国油脂, 2015, 40(6): 66 – 71.
- [22] 韩立娟. 超分子油脂凝胶微观结构衍变与宏观性能变化的关系研究[D]. 广州:华南理工大学, 2014.
- [23] TAVERMIER I, DOAN C D, VAN DE WALLE D, et al. Sequential crystallization of high and low melting waxes to improve oil structuring in wax – based oleogels [J]. RSC Adv, 2017, 7(20): 12113 – 12125.