

发酵前包被裂殖壶菌微胶囊工艺优化及其对裂殖壶菌生长和代谢特性的影响

李士鹏^{1,2}, 綦文涛², 彭文婷², 刘兴泉¹, 郭伟群^{1,2}

(1. 浙江农林大学 食品与健康学院, 杭州 311300; 2. 国家粮食和物资储备局科学研究院
粮食品质营养研究所, 北京 100037)

摘要:为了探究发酵前微胶囊化对裂殖壶菌生长代谢及二十二碳六烯酸(DHA)生产的影响,采用内源乳化凝胶法制备发酵前裂殖壶菌微胶囊,通过单因素实验和正交实验优化微胶囊制备工艺,并探究了裂殖壶菌在固化核心和液化核心两种微胶囊条件下的生长、代谢特性及耐热性。结果表明:裂殖壶菌微胶囊的最佳制备条件为海藻酸钠质量浓度12 g/L、Span 85添加量2 g/L、水油相体积比1:3、搅拌速度300 r/min,在此条件下微胶囊平均粒径为 $(420.49 \pm 23.12) \mu\text{m}$,最适粒径比例为55.74%,得率为73.10%。微胶囊环境下裂殖壶菌呈现聚团生长特征;与游离培养相比,微胶囊培养裂殖壶菌的葡萄糖消耗无显著变化,而pH变化和氮源消耗显著变慢;与游离培养相比,裂殖壶菌在液化核心微胶囊条件下生物量、油脂含量和DHA含量没有明显变化,而在固化核心微胶囊条件下均显著下降;微胶囊化提高了裂殖壶菌高温下的耐热性和胞内DHA保存率。综上,发酵前包被微胶囊有助于裂殖壶菌耐热性的提高,且液化核心微胶囊更有利于裂殖壶菌的生长、代谢。

关键词:乳化凝胶法;发酵前包被微胶囊;二十二碳六烯酸;裂殖壶菌;生长;代谢;耐热性

中图分类号:TS222+.2;TS201.3 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2025)05-0104-09

Optimization of the preparation process of *Schizochytrium* sp. microcapsules before fermentation and its effect on the growth and metabolic properties of *Schizochytrium* sp.

LI Shipeng^{1,2}, QI Wentao², PENG Wenting², LIU Xingquan¹, GUO Weiqun^{1,2}

(1. College of Food and Health, Zhejiang A & F University, Hangzhou 311300, China; 2. Institute of Food Quality and Nutrition, Academy of National Food and Strategic Reserves Administration, Beijing 100037, China)

Abstract: In order to investigate the effects of encapsulation before fermentation on the growth and metabolism of *Schizochytrium* sp. and the production of docosahexaenoic acid (DHA), the microcapsules of *Schizochytrium* sp. before fermentation were prepared by the endogenous emulsified gel method. The microcapsule preparation process was optimized by single factor experiment and orthogonal experiment, and the growth, metabolism properties and heat resistance of *Schizochytrium* sp. were investigated in the cured-core and liquefied-core microcapsule conditions. The results showed that the optimal conditions for the preparation of *Schizochytrium* sp. microcapsules were sodium alginate mass concentration 12 g/L, Span 85 dosage 2 g/L, aqueous phase to oil phase volume ratio 1:3, and stirring speed 300 r/min.

Under these conditions, the average particle size of the microcapsules was $(420.49 \pm 23.12) \mu\text{m}$, and

the ratio of the optimal particle size was 55.74%, with the yield of microcapsules of 73.10%. The microencapsulated *Schizochytrium* sp. showed agglomerative growth characteristics; glucose consumption of microencapsulated *Schizochytrium* sp. did not change significantly, while pH change

收稿日期:2024-02-23;修回日期:2025-01-16

基金项目:中央级公益性科研院所基本科研业务费专项课题(ZX2214)

作者简介:李士鹏(1999),男,硕士研究生,研究方向为食品营养与健康(E-mail)Li17615402640@163.com。

通信作者:郭伟群,副研究员,博士(E-mail)gwq@ags.ac.cn。

and nitrogen source consumption slowed down significantly compared with free culture. The biomass, lipid content and DHA content of *Schizochytrium* sp. did not change significantly in liquefied – core microcapsule conditions, while they all decreased significantly in cured – core microcapsule conditions compared with free culture. Microencapsulation improved *Schizochytrium* sp.'s heat resistance and intracellular DHA preservation rate at high temperature. In conclusion, encapsulation before fermentation contributes to the heat resistance of *Schizochytrium* sp., and liquefied – core microcapsules are more conducive to the growth and metabolism of *Schizochytrium* sp.

Key words: emulsified gel method; encapsulation before fermentation; docosahexaenoic acid; *Schizochytrium* sp.; growth; metabolism; heat resistance

二十二碳六烯酸(DHA)是 $n-3$ 家族多不饱和脂肪酸,在治疗心血管疾病、防治癌症、促进婴幼儿神经及智力发育等方面具有重要的作用^[1]。裂殖壶菌(*Schizochytrium* sp.)是破囊壶菌科的一种海洋微生物,富含油脂,其含油量最高可达到50%以上,且脂肪酸组成简单,其中DHA占总脂肪酸含量的35%以上^[2]。裂殖壶菌因发酵周期短、生长较快、DHA含量高而被认为是一种极具潜力的DHA工业发酵菌株^[3],其在2010年被原卫生部(现国家卫健委)正式批准可用于生产DHA藻油。但DHA容易受氧气、光照、高温等环境因素的影响而发生氧化、聚合等反应,失去原有的性质与功能,从而限制了裂殖壶菌工业化生产DHA的发展^[4-5]。此外,DHA作为裂殖壶菌胞内产物,需要经过菌体收集、干燥、破碎和离心等过程获取,这些过程涉及较高的温度,也会对DHA的稳定性产生影响^[6]。

微胶囊技术是一种利用天然或人工合成的高分子材料将活性物质或细胞等包埋起来,使其免受外部胁迫影响的技术^[7]。研究发现,微胶囊技术可以提高DHA的氧化稳定性,进而延长DHA的保质期^[8]。Song等^[9]发现,DHA微胶囊保存周期较未包埋DHA显著延长。然而,目前研究多采用发酵后收获菌体直接微胶囊化或裂解细胞提取DHA油脂后进而微胶囊化的方式,其环节多,DHA损失率大^[10-12]。发酵前包被技术是将较低密度的微生物细胞作为种子包埋在微胶囊中,再进行培养,使微生物在微胶囊中继续生长代谢,从而实现其囊内增殖和目标产物活性保护的目的^[13]。韦梦婷等^[14]对发酵前包被酵母微胶囊进行培养,发现与游离培养相比,发酵前包被培养活菌量提高了4.53倍。张琳等^[15]研究发现,与未包被的菌粉相比,发酵前包被布拉迪酵母菌和粪肠球菌微胶囊对储藏、高温、胃液和肠液等胁迫作用的抵抗力显著增强,且存活率显著提升。因此,发酵前微胶囊包被技术不仅对DHA的稳

定性具有积极作用,同时在提高菌体生物量方面具有一定潜力。然而,关于发酵前包被裂殖壶菌微胶囊的工艺及其对DHA的保护效果还未见报道。

发酵前微胶囊制备方法主要有挤压法^[16]、静电液滴法^[17]、乳化凝胶法^[18]等。研究表明,乳化凝胶法可以生产较小粒径的微胶囊,对生产设备要求低、操作简单、反应条件温和,适合大规模制备^[19]。乳化凝胶法又分为外源乳化凝胶法和内源乳化凝胶法,其中,内源乳化凝胶法克服了外源乳化凝胶法中CaCl₂溶液加入引起的微胶囊凝聚现象,可制备粒径更小、更均一的微胶囊^[20]。另外根据核心状态的不同,微胶囊可分为固化核心微胶囊和液化核心微胶囊,本文以海藻酸钠和壳聚糖为主要材料,采用内源乳化凝胶法制备发酵前裂殖壶菌微胶囊,通过单因素实验和正交实验优化微胶囊制备工艺,研究了裂殖壶菌在固化核心和液化核心两种类型微胶囊内部的生长和代谢特性,并探究DHA的活性稳定化效果,以为发酵前微胶囊包被技术在裂殖壶菌生产DHA中的应用提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

裂殖壶菌(*Schizochytrium* sp.) ATCC 20888,由中国农业大学提供;海藻酸钠、葡萄糖、次氯酸钠(有效氯含量5%)、亚硝基铁氰化钠,麦克林生化科技有限公司;3,5-二硝基水杨酸(DNS)、碳酸钙,索莱宝试剂公司;司盘85(Span 85)、液体石蜡、二水柠檬酸钠、盐酸、磷酸二氢钾、氯化钾、氯化钠、二水氯化钙、苯酚、冰醋酸,国药集团化学试剂有限公司;低聚壳聚糖,华迈科生物技术有限公司;酵母粉、蛋白胨、琼脂(生化试剂),正己烷、异辛烷(色谱纯),赛默飞世尔有限公司。除特别注明外,所有化学试剂均为分析纯。

1.1.2 培养基

种子培养基:30 g/L 葡萄糖,10 g/L 酵母粉,5 g/L 蛋白胨,20 g/L 海水晶,pH 为 6.5。

发酵培养基:100 g/L 葡萄糖,5 g/L 酵母粉,3.94 g/L 氯化钠,0.264 g/L 氯化钾,0.5 g/L 硫酸铵,1 g/L 磷酸二氢钾,1.43 g/L 硫酸镁,0.04 g/L 氯化钙,10 g/L 谷氨酸钠,pH 为 6.5。

1.1.3 仪器与设备

LRH-150 生化培养箱,上海一恒科学仪器有限公司;IS-RDD3 台式恒温振荡器,苏州捷美电子有限公司;MYP2011-250 电动搅拌器,上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司;CKX41 生物倒置显微镜、IX71 荧光倒置显微镜,日本 Olympus 公司;pH 计,德国赛多利斯科学仪器公司;Mastersizer 2000 激光粒度仪,英国马尔文仪器有限公司;7890 气相色谱仪,美国安捷伦科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌液培养

挑取固体斜面上较大的裂殖壶菌菌泥,接种于种子培养基,于 28℃、200 r/min 摇床培养 2 d。

1.2.2 裂殖壶菌微胶囊的制备及核心化处理

以质量比 3:1 称取海藻酸钠与碳酸钙,加入去离子水及 1.2.1 中裂殖壶菌菌液,分别配制不同质量浓度的海藻酸钠混合溶液作为水相(裂殖壶菌浓度 7.6×10^5 cfu/mL);将 Span 85 按一定添加量加入石蜡中作为油相;按一定体积比将水、油两相混合,在一定转速下搅拌 5 min,加入 200 μ L 冰醋酸酸解 8 min 后,加入生理盐水,分离并收集裂殖壶菌微胶囊。

取裂殖壶菌微胶囊,用生理盐水清洗 2~3 次,加入 10 倍体积 5 g 的壳聚糖溶液反应 15 min,静置分离,制得覆有壳聚糖膜的固化核心裂殖壶菌微胶囊(ACS)。取 ACS,用 0.2 g/100 mL 的海藻酸钠溶液中和微胶囊表面带有的正电荷,生理盐水清洗后加入 10 倍体积 pH 6.3 的柠檬酸钠溶液反应 5 min,静置分离,制得液化核心裂殖壶菌微胶囊(ACL)。

1.2.3 微胶囊平均粒径、形态、分离效率及得率的测定

采用激光粒度仪测定微胶囊的平均粒径和跨度(粒径分布);以纯水为分散剂,在泵速 2 000 r/min、遮光度 5%~30% 条件下,采用生物倒置显微镜观察微胶囊的球形度;测定 10 min 内微胶囊在去离子水中的沉降速度来表征其分离效率;将微胶囊置于已知质量滤纸上,60℃ 烘干至恒重,称其质量,以微胶囊质量与海藻酸钠和碳酸钙总质量的比值计算微胶囊得率。

1.2.4 微胶囊化裂殖壶菌的培养

以游离裂殖壶菌(FREE)为对照,调整初始活菌量一致,分别将 ACS 和 ACL 接入发酵培养基,于 28℃、200 r/min 摇床中培养 7 d。

1.2.5 微胶囊化裂殖壶菌的形态观察

采用荧光倒置显微镜观察游离及微胶囊化裂殖壶菌的微观形态。

1.2.6 微胶囊化裂殖壶菌生长和代谢特性的测定

生物量:用化学破囊液(0.2 mol/L NaHCO_3 和 0.06 mol/L 二水柠檬酸钠,pH 7.8)对微胶囊样品进行破碎得菌液^[21]。取 1 mL 菌液于已知质量的离心管,7 000 r/min 离心 5 min,去离子水清洗沉淀 2~3 次,离心后弃上清,真空冷冻干燥后称其质量,计算生物量。

葡萄糖消耗测定:通过 DNS 法测定裂殖壶菌微胶囊发酵上清液的葡萄糖质量浓度。以体积比 1:1 向质量浓度分别为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 g/L 的葡萄糖溶液加入 DNS 试剂,90℃ 温浴 5 min,冷却至室温,用紫外分光光度计在 540 nm 波长处测定吸光度并绘制标准曲线。取 1 mL 发酵液于离心管,7 000 r/min 离心 5 min,取上清液稀释后于 540 nm 处测定吸光度并代入标准曲线方程计算葡萄糖质量浓度。

氮源消耗测定:采用靛酚蓝-分光光度法测定裂殖壶菌微胶囊发酵上清液中的铵离子质量浓度。溶液 A 的配制:称取 1.00 g 苯酚溶解于 80 mL 纯水,加入 400 μ L 14.488 g/L 的亚硝基铁氰化钠溶液,定容至 100 mL,棕色瓶保存。溶液 B 的配制:称取 0.5 g NaOH、0.4 g 柠檬酸三钠和 700 μ L 次氯酸钠溶于 80 mL 纯水中,定容至 100 mL,棕色瓶保存。使用纯水将氨氮标准溶液稀释成质量浓度分别为 0、1、2、3、4、5 μ g/mL 的系列溶液,各取 10 μ L 分别加入 500 μ L 溶液 A 和溶液 B,充分混合,37℃ 显色 20 min,用紫外分光光度计在 640 nm 波长处测定吸光度,以氨氮标准溶液质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线。将 1 mL 发酵液在 8 000 r/min 下离心 5 min 后取上清液,稀释一定倍数后,于 640 nm 波长处测定吸光度,代入标准曲线方程计算铵离子质量浓度。

发酵液 pH 测定:取 3 mL 发酵液于离心管,采用 pH 计测定发酵液的 pH。

油脂含量测定:取 0.2 g 冻干 FREE 及微胶囊样品,加入 6 mL 6 mol/L 的 HCl 溶液,振荡混匀后,65℃ 超声水浴 1 h,冷却至室温,加入 4 mL 正己烷混匀,静置分层,转移上层溶液至已知质量的离心管中,氮吹后称其质量,计算发酵液中油脂含量。

DHA 含量测定:用气相色谱仪检测油脂的 DHA

含量。向收集了油脂的离心管中加入 4 mL 异辛烷,加入 200 μ L 2 mol/L 的氢氧化钾-甲醇溶液反应 10 min,加入 1 g 硫酸氢钠去除多余的氢氧化钾,取上清液进行气相色谱检测。气相色谱条件:VF-23ms 色谱柱(30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μ m);进样量 1 μ L;载气为 N₂;进样口温度 260 $^{\circ}$ C;检测器温度 260 $^{\circ}$ C;分流比 100:1;升温程序为初始温度 110 $^{\circ}$ C,保持 3 min,以 4 $^{\circ}$ C/min 升至 220 $^{\circ}$ C,保持 15 min。以 DHA 甲酯标准品的出峰时间进行定性,将样品 DHA 峰面积代入以 DHA 甲酯标准品绘制的标准曲线方程中进行定量,计算发酵液中 DHA 含量。

1.2.7 微胶囊化裂殖壶菌耐热性测定

参考 Zhang 等^[22]的方法,在 130 $^{\circ}$ C 和 150 $^{\circ}$ C 下分加热冻干 FREE 及微胶囊样品 5、10 min 和 15 min

后,测定其 DHA 含量,计算 DHA 保存率。

1.2.8 数据处理

采用 SPSS22 软件进行实验数据分析,所有数据均进行 3 次独立重复实验,结果以“平均值 $\pm$ 标准偏差”表示,采用方差分析进行多组均数间比较,采用 Duncan's test 法进行方差分析有统计学意义的事后两两比较;统计分析取双侧检验,显著性检验水平取 $\alpha=0.05$;用 Origin 2021 进行绘图。

2 结果与讨论

2.1 裂殖壶菌微胶囊制备工艺的单因素实验

2.1.1 搅拌速度的影响

在海藻酸钠质量浓度 15 g/L、水油相体积比 1:3、Span 85 添加量 2 g/L 的条件下,考察搅拌速度对微胶囊制备的影响,结果如表 1 所示。

表 1 搅拌速度对微胶囊制备的影响

Table 1 Effect of stirring speed on the preparation of microcapsules

搅拌速度/(r/min)	球形度	分离效率	平均粒径/ μ m	得率/%	跨度
200	++	++	914.96 $\pm$ 39.97 ^a	76.89 $\pm$ 8.76 ^a	1.48 $\pm$ 0.07 ^a
300	++	++	462.97 $\pm$ 18.48 ^b	68.10 $\pm$ 6.18 ^{ab}	1.55 $\pm$ 0.10 ^a
400	++	++	383.48 $\pm$ 29.41 ^c	56.52 $\pm$ 2.86 ^{bc}	1.47 $\pm$ 0.17 ^a
500	+	+	351.16 $\pm$ 30.24 ^c	49.89 $\pm$ 3.88 ^c	1.31 $\pm$ 0.10 ^a

注:++、+分别表示好、一般;同列不同字母表示具有显著差异($p<0.05$)。下同
Note:++ and + indicate good and fair, respectively. Different letters in the same column indicate significant differences ($p<0.05$). The same below

由表 1 可知,随着搅拌速度的增加,微胶囊的平均粒径显著减小,这可能是因为随着搅拌速度的增加,剪切力提高,有利于海藻酸钠溶液分散形成更小的液滴^[23]。研究发现,搅拌速度在 300 ~ 500 r/min 时均可形成粒径大小合适(300 ~ 600 μ m)的微胶囊^[24],结合表 1,300 r/min 条件下制得的微胶囊得率较高,且相对于 400 r/min 和 500 r/min 具有更小的剪切力,有利于降低对微生物的机械损伤,同时可以降低生产成本,因此选择 300 r/min 作为最佳搅

拌速度。

2.1.2 海藻酸钠质量浓度的影响

海藻酸根离子与钙离子结合形成海藻酸钙凝胶是微胶囊成型的关键,海藻酸根的质量浓度对微胶囊的粒径分布和形态影响巨大,也决定了微胶囊的凝胶强度和致密性^[25]。在搅拌速度 300 r/min、水油相体积比 1:3、Span 85 添加量 2 g/L 的条件下,考察海藻酸钠质量浓度对微胶囊制备的影响,结果如表 2 所示。

表 2 海藻酸钠质量浓度对微胶囊制备的影响

Table 2 Effect of sodium alginate mass concentration on the preparation of microcapsules

海藻酸钠质量浓度/(g/L)	球形度	分离效率	平均粒径/ μ m	得率/%	跨度
10	+	+	308.10 $\pm$ 8.73 ^c	67.63 $\pm$ 5.24 ^a	1.35 $\pm$ 0.28 ^b
15	++	++	388.58 $\pm$ 48.63 ^b	72.46 $\pm$ 13.30 ^a	1.54 $\pm$ 0.18 ^{ab}
20	++	++	409.24 $\pm$ 15.32 ^b	74.27 $\pm$ 11.75 ^a	1.62 $\pm$ 0.02 ^{ab}
25	++	++	704.60 $\pm$ 26.78 ^a	66.82 $\pm$ 5.03 ^a	1.81 $\pm$ 0.02 ^a

由表 2 可知,随着海藻酸钠质量浓度的增加,微胶囊平均粒径和跨度显著增大,高质量浓度的海藻酸钠具有更高的黏性,在剪切力相同情况下更难被打散成小液滴,导致形成粒径更大的微胶囊。海藻酸钠质量浓度为 10、15 g/L 和 20 g/L 下制备的微胶

囊平均粒径均在 300 ~ 600 μ m 的范围内,与 10 g/L 下制备的微胶囊相比,15、20 g/L 下制备的微胶囊具有更好的形态与分离效率,但 15 g/L 下制备的微胶囊具有更小的平均粒径且能节约成本,因此选择 15 g/L 作为最佳海藻酸钠质量浓度。

2.1.3 水油相体积比的影响

在搅拌速度 300 r/min、海藻酸钠质量浓度 15 g/L、Span 85 添加量 2 g/L 的条件下,考察水油相体

积比对微胶囊制备的影响,结果如表 3 所示。

表 3 水油相体积比对微胶囊制备的影响

Table 3 Effect of aqueous phase to oil phase volume ratio on the preparation of microcapsules					
水油相体积比	球形度	分离效率	平均粒径/ μm	得率/%	跨度
1:1	+	+	325.59 ± 14.16^c	49.71 ± 5.09^b	1.31 ± 0.06^c
1:3	++	++	481.57 ± 36.23^b	83.45 ± 1.82^a	1.78 ± 0.07^a
1:5	++	++	531.04 ± 8.25^{ab}	73.41 ± 12.57^{ab}	1.64 ± 0.05^{ab}
1:7	+	++	577.10 ± 31.45^a	75.33 ± 5.59^{ab}	1.58 ± 0.10^b

由表 3 可知,随着油相体积增大,微胶囊的平均粒径总体呈现显著增加的趋势,这可能是因为油相体积较小时,海藻酸钠混合溶液分散空间较小,容易受到机械桨的连续剪切作用,形成更小、更均一的乳滴,进而有利于小粒径微胶囊的生成。但随着油相体积增大,形成了较大的分散空间且有比较大的搅拌阻力,更有利于大液滴的形成,因此形成微胶囊粒径更大。水油相体积比为 1:1 及 1:3 时,制备的微胶囊平均粒径均在合适范围内,但水油相体积比 1:3

条件下微胶囊得率更高,球形度和分离效率更好,因此选择 1:3 为最佳水油相体积比。

2.1.4 Span 85 添加量的影响

Span 85 的添加可以降低反应体系中油-水界面张力,从而有利于提高稳定性^[26]。在搅拌速度 300 r/min、海藻酸钠质量浓度 15 g/L、水油相体积比 1:3 的条件下,考察 Span 85 添加量对微胶囊制备的影响,结果如表 4 所示。

表 4 Span 85 添加量对微胶囊制备的影响

Table 4 Effect of Span 85 dosage on the preparation of microcapsules					
Span 85 添加量/(g/L)	球形度	分离效率	平均粒径/ μm	得率/%	跨度
1	+	+	528.93 ± 19.66^a	74.53 ± 8.65^a	1.85 ± 0.07^a
3	++	++	385.87 ± 21.57^b	62.88 ± 7.23^{ab}	1.89 ± 0.03^a
5	++	+	329.62 ± 3.05^{bc}	48.75 ± 2.49^b	1.73 ± 0.04^{ab}
7	+	+	300.91 ± 26.17^c	56.43 ± 3.05^b	1.61 ± 0.10^b

由表 4 可知,随着 Span 85 添加量的增加,微胶囊的平均粒径、得率减小,且具有更小的跨度,这可能是因为油相液滴表面,乳化剂形成的空间位阻效应降低了油滴聚集速度,导致形成了更小的液滴,同时增加了乳液的稳定性,使乳滴大小接近,具备了更小的跨度^[27]。但过多的乳化剂会阻碍 H^+ 通过水油界面,从而影响海藻酸钠与碳酸钙反应,释放出的 Ca^{2+} 含量降低,与海藻酸钠结合形成凝胶受到影响,最终导致微胶囊得率降低。在 Span 85 添加量为 3 g/L 时,制备的微胶囊平均粒径在合适范围内,且具有良好的球形度与分离效率,因此选择 3 g/L 作为 Span 85 的最佳添加量。

2.2 裂殖壶菌微胶囊制备工艺的正交实验

在单因素实验的基础上,固定搅拌速度为 300 r/min,以海藻酸钠质量浓度(A)、Span 85 添加量(B)、水油相体积比(C)为考察因素,以微胶囊最适粒径(300~600 μm)在总粒径分布中所占比例为指标,设计 $\text{L}_9(3^4)$ 正交实验,正交实验因素水平见表 5,正交实验设计及结果见表 6,正交实验方差分析见表 7。

表 5 正交实验因素水平

Table 5 Orthogonal experiment factor levels			
水平	A 海藻酸钠 质量浓度/(g/L)	B Span 85 添加量/(g/L)	C 水油 相体积比
1	12	2	1:7
2	15	3	1:5
3	18	4	1:3

表 6 正交实验设计及结果

Table 6 Design and results of orthogonal experiment				
实验号	A	B	C	最适粒径比例/%
1	1	1	1	51.66
2	1	2	3	52.52
3	1	3	2	47.73
4	2	1	3	54.19
5	2	2	2	50.61
6	2	3	1	46.69
7	3	1	2	42.20
8	3	2	1	41.22
9	3	3	3	39.97
k_1	50.63	49.35	46.52	
k_2	50.50	48.12	46.85	
k_3	41.13	44.80	48.89	
R	9.50	4.55	2.37	

表 7 正交实验方差分析
Table 7 ANOVA for orthogonal experiment

因素	偏差平方和	自由度	方差	<i>F</i>	<i>p</i>
A	178.208	2	89.104	353.722	<0.01
B	33.344	2	16.672	66.184	<0.05
C	9.903	2	4.951	19.656	<0.05
误差	0.504	2	0.252		

由表 6 可知,对最适粒径比例影响最大的因素是海藻酸钠质量浓度,其次是 Span 85 添加量,水油相体积比的影响最小。最优因素水平组合为 A₁B₁C₃,即海藻酸钠质量浓度 12 g/L、Span 85 添加量 2 g/L、水油比相体积 1:3。由表 7 可知,各因素对最适粒径比例的影响大小顺序为海藻酸钠质量浓度(A) > Span 85 添加量(B) > 水油相体积比(C),

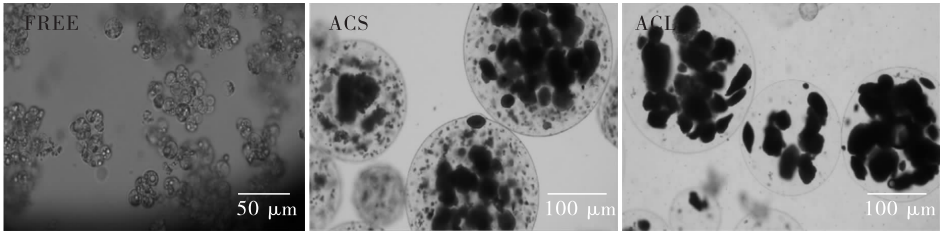


图 1 不同培养条件下的裂殖壶菌形态
Fig. 1 Morphology of *Schizochytrium* sp. under different culture conditions

由图 1 可知:游离培养的裂殖壶菌呈现松散分离的生长状态;ACS 呈现出更加紧密的聚团生长现象,菌团呈圆形,界限清晰可见;ACL 同样呈现出聚团状态,但由于 ACL 具有更大的内部空间,因此菌团形状不规则,且彼此间界面不明显,表明液化核心微胶囊更利于菌体生物量的提升。同时,聚团生长使得裂殖壶菌细胞局部密度变大,而单个细胞体积受到挤压变小,因此其生长和代谢过程将会受到影响。

2.3.2 微胶囊化裂殖壶菌生长代谢特征

对不同培养条件下(游离,微胶囊)裂殖壶菌的生长代谢指标进行测定,结果如图 2 所示。

葡萄糖是供给微生物生命活动所需的直接碳源,是其生长代谢的重要影响因素^[28]。由图 2a 可见,FREE、ACS 和 ACL 3 种裂殖壶菌葡萄糖消耗无明显差异,表明微胶囊环境无论是固态核心还是液态核心,对裂殖壶菌主要底物葡萄糖的消耗没有明显影响。氮源是微生物的主要营养物质,对微生物蛋白质、核酸等的合成具有重要作用^[29]。氮源的消耗反映了微生物的生长代谢状况。由图 2b 可见,培养初期,ACS 和 ACL 的氮源消耗明显低于游离培养,表明在微胶囊培养条件下延迟期较长,可能是裂殖壶菌在微胶囊制备过程中受到一定的物理损伤,

与极差分析结果一致。此外,3 个因素对最适粒径比例均有显著影响($p < 0.05$)。

在最佳制备条件下进行 3 次平行验证实验,得微胶囊平均粒径为 $(420.49 \pm 23.12) \mu\text{m}$,最适粒径比例为 55.74%,微胶囊得率为 73.10%。

2.3 微胶囊化裂殖壶菌生长和代谢特性

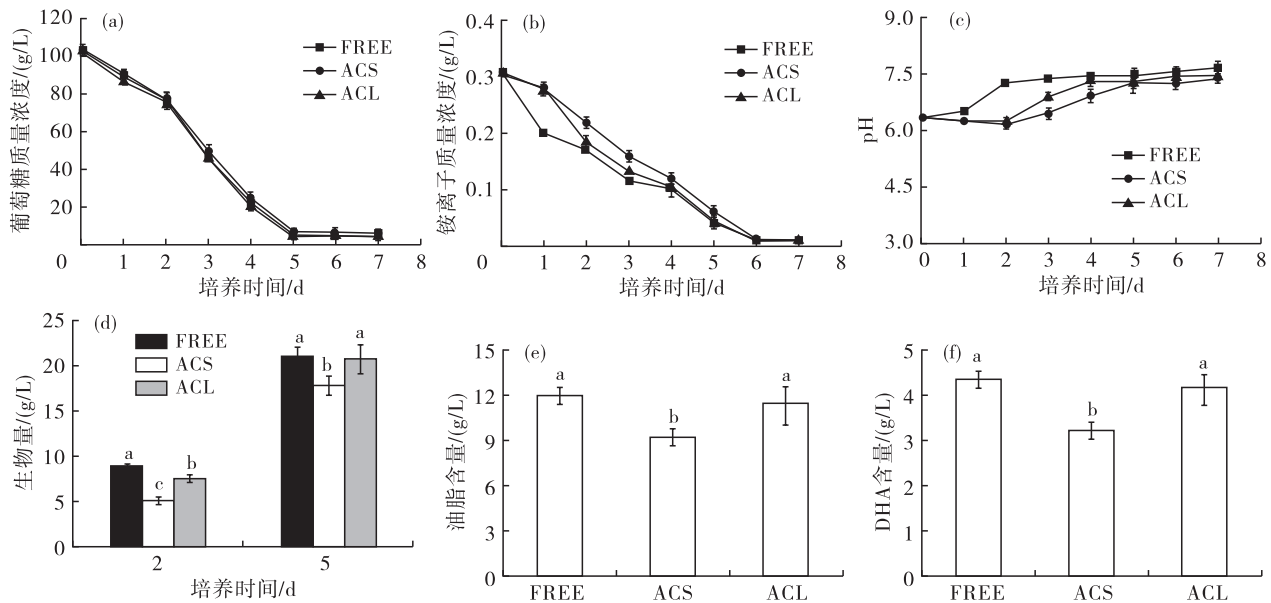
2.3.1 微胶囊化裂殖壶菌形态

微胶囊为包埋菌体提供了较为稳定的内部空间,避免了搅拌剪切力对微生物增殖活性的不利影响,但也限制了菌体的增殖空间,这些都会使微生物细胞增殖呈现出不同于游离培养条件下的形态特征。取最佳工艺下得到的裂殖壶菌微胶囊,经核心化处理后按 1.2.4 方法进行培养,并观察其形态,结果如图 1 所示。

且需要适应微胶囊新环境,从而导致生长延迟期变长。培养 2 d 后 ACL 的氮源消耗开始加速,与 FREE 的氮源消耗相差不大,而 ACS 的氮源消耗仍然较慢。pH 通过影响微生物原生质膜电荷及胞内各种酶的活性,从而影响代谢和产物合成,是代谢过程重要监测指标^[30]。发酵过程中,pH 会随着底物的消耗及代谢产物的排出而变化。由图 2c 可见,3 种培养条件下发酵液的 pH 均随着培养时间的延长总体升高,FREE 在培养 2 d 后趋于平稳,ACL 在培养 4 d 后趋于平稳并接近游离培养,这与 ACL 较长的生长延迟期有关。而与 FREE 和 ACL 相比,ACS 发酵液的 pH 增长缓慢,其 pH 始终低于 FREE 和 ACL 的。上述结果同时表明,由于 ACS 内部为固体的凝胶状态,微生物自由度和生长空间较小,而且相对液体状态,凝胶状态下物质传递,包括营养物质和代谢物质的传递均变慢,因此影响了裂殖壶菌的生长和代谢速度。DHA 是裂殖壶菌生产的重要目的产物,裂殖壶菌的生物量及 DHA 产量对裂殖壶菌的工业生产和实际应用具有重要指导意义。由图 2d、2e 和图 2f 可知,ACL 的生物量、DHA 含量及油脂含量与 FREE 无显著差异,而 ACS 的生物量、油脂含量、DHA 含量显著低于 FREE 和 ACL 的($p < 0.05$),这与上述裂殖壶菌底物消耗和 pH 变化趋势

一致。此外,裂殖壶菌积累脂质促使胞体膨大,挤压了 ACS 的固态环境,进一步限制了菌体的增长,从而导致脂滴的积累减少^[31]。由于液化核心条件下,

裂殖壶菌的生长代谢与游离条件更相似,因此液化核心更适合用于裂殖壶菌微胶囊产品的制备、培养和应用。



注:同一条件不同字母表示差异显著($p < 0.05$)。下同

Note: Different letters for the same condition indicate significant differences ($p < 0.05$). The same below

图2 不同培养条件下裂殖壶菌的生长及代谢变化

Fig. 2 Growth and metabolic changes of *Schizochytrium* sp. under different culture conditions

2.4 微胶囊化裂殖壶菌的耐热性

DHA 易受到高温破坏及空气氧化,有研究报道,微胶囊化可有效提高大鲵油中 DHA 的保存

率^[32]。温度对微胶囊化裂殖壶菌 DHA 保存率的影响如图 3 所示。

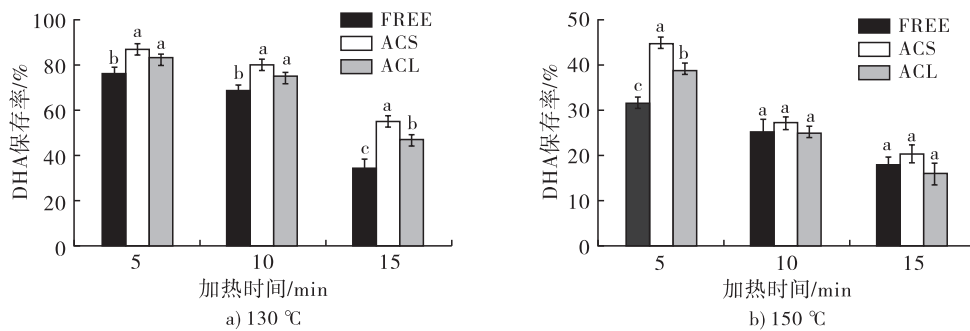


图3 温度对微胶囊裂殖壶菌 DHA 保存率的影响

Fig. 3 Effect of temperature on the preservation rate of DHA in microencapsulated *Schizochytrium* sp.

由图 3a 可知,在 130 °C 下,随着加热时间的延长,3 种裂殖壶菌的 DHA 保存率均出现降低趋势,相较于 FREE,ACS 和 ACL 的 DHA 保存率显著提高 ($p < 0.05$),且 ACS 的 DHA 保护作用随着加热时间的延长更加明显。由图 3b 可知,在 150 °C 下加热 5 min 时,ACS 和 ACL 的 DHA 保存率显著高于 FREE ($p < 0.05$),加热 10 min 和 15 min 时,3 种裂殖壶菌的 DHA 保存率无显著差异,但 ACS 的 DHA 保存率最高。这些结果表明,无论是固化核心还是液化核心,短时间的高温处理下,微胶囊环境都很好地保护

了裂殖壶菌胞内 DHA,但随着加热时间的延长或温度的升高,微胶囊的保护效果逐渐减少甚至丧失。

3 结论

本文通过单因素实验和正交实验优化了内源乳化凝胶法制备发酵前裂殖壶菌微胶囊的工艺条件,并探究了裂殖壶菌在固化核心和液化核心两种类型微胶囊条件下的生长和代谢特性以及耐热性。结果表明:微胶囊最佳制备工艺为海藻酸钠质量浓度 12 g/L、Span 85 添加量 2 g/L、水油相体积比 1:3、搅拌速度 300 r/min,在此条件下微胶囊平均粒径为 $(420.49 \pm$

23.12) μm ,最适粒径比例为 55.74%,微胶囊得率为 73.10%。微胶囊环境不影响裂殖壶菌培养过程中的葡萄糖消耗,而会导致 pH 变化和氮源消耗显著变慢;与游离培养相比,固化核心微胶囊显著降低了裂殖壶菌生物量、油脂含量和 DHA 含量,而液化核心微胶囊无显著影响,液化核心微胶囊更适合用于裂殖壶菌的包被、培养和应用。固化核心微胶囊和液化核心微胶囊均提高了裂殖壶菌的耐热性。

参考文献:

- [1] 任俊,吴赵梅,陈志炎.“葡萄糖充足-溶解氧浓度周期”组合控制策略强化 *Schizochytrium* sp. S31 生产二十二碳六烯酸[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(18): 101-106.
- [2] HONDA D, YOKOCHI T, NAKAHARA T, et al. *Schizochytrium limacinum* sp. nov., a new thraustochytrid from a mangrove area in the west Pacific Ocean[J]. Mycol Res, 1998, 102(4): 439-448.
- [3] ZHAO B, LI Y, LI C, et al. Enhancement of *Schizochytrium* DHA synthesis by plasma mutagenesis aided with malonic acid and zeocin screening[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2018, 102(5): 2351-2361.
- [4] 宿惊涛,于倩倩,魏志博,等. DHA 的微囊化制备、应用与吸收利用研究[J]. 中国食品添加剂, 2024, 35(1): 231-237.
- [5] 范学宁,成艳,赵国服,等. 氮、磷源浓度对裂殖壶菌生长及油脂积累的影响[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(24): 189-194.
- [6] 朱婧瑶,张红漫,胡耀池,等. 面向工业化的裂殖壶菌 DHA 油脂提取方法研究[J]. 食品科技, 2011, 36(9): 32-35, 40.
- [7] OZKAN G, FRANCO P, DE MARCO I, et al. A review of microencapsulation methods for food antioxidants: Principles, advantages, drawbacks and applications [J]. Food Chem, 2019, 272: 494-506.
- [8] 刘佳伟,王旭,曹雁平,等. DHA 稳态化技术研究进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(7): 273-277.
- [9] SONG P, LIANG J, DU J, et al. Optimization of the preparation process of algae oil microcapsules and analysis of influencing factors of its shelf life [J/OL]. Algal Res, 2023, 70: 102992[2024-02-23]. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.102992>.
- [10] 刘艺琳,陈弘培,龚世禹,等. 微藻油的提取与功能研究进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(5): 333-337, 342.
- [11] CAMPANATI C, ARANTZAMENDI L, ZORITA I, et al. Nutritional effect of substituting microalgal concentrates with microencapsulated diets in *Mytilus galloprovincialis* spat[J/OL]. Aquaculture, 2023, 576: 739879[2024-02-23]. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739879>.
- [12] 刘小亚,万仁口,范亚苇,等. EPA 藻油微胶囊工艺及其制备过程中脂肪酸组成的变化[J]. 中国食品学报, 2020, 20(3): 121-129.
- [13] 秦腾飞,负婷婷,王春玲,等. 发酵前包被布拉迪酵母生长代谢及其抗逆性机理[J]. 食品科学, 2017, 38(22): 137-142.
- [14] 韦梦婷,王英,刘文瑞,等. 微囊化酿酒酵母 FM-S-115 的高密度培养[J]. 食品工业科技, 2020, 41(15): 205-210, 224.
- [15] 张琳,负婷婷,蔡文涛,等. 乳化凝胶化法微囊化益生菌抗胁迫作用研究[J]. 动物营养学报, 2015, 27(11): 3636-3642.
- [16] 卢静,李玉红,王文翠,等. 基于挤压法的复方精油微胶囊干燥方法[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2018, 36(6): 38-44.
- [17] 葛得龙,张鸿飞,刘娇,等. 海藻酸钠/羧甲基微胶囊对副干酪乳杆菌生存率影响的研究[J]. 中国饲料, 2021(21): 53-59.
- [18] 李龙,李文凤,刘锁珠. 利用内源乳化凝胶法制备植物乳酸杆菌微胶囊及其体外效果评价[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2020(24): 134-136.
- [19] CAI S, ZHAO M, FANG Y, et al. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* CGMCC1.2686 via emulsification/internal gelation of alginate using Ca-EDTA and CaCO_3 as calcium sources[J]. Food Hydrocolloid, 2014, 39: 295-300.
- [20] 赵萌,蔡沙,屈方宁,等. 内源乳化法制备海藻酸盐微胶囊的研究进展[J]. 食品工业科技, 2013, 34(22): 392-396.
- [21] 薛伟明,于炜婷,刘袖洞,等. 载细胞海藻酸钠/壳聚糖微胶囊的化学破囊方法研究[J]. 高等学校化学学报, 2004, 25(7): 1342-1346.
- [22] ZHANG H, GONG T, LI J, et al. Study on the effect of spray drying process on the quality of microalgal biomass: A comprehensive biocomposition analysis of spray-dried *S. acuminatus* biomass [J]. BioEnergy Res, 2022, 15(1): 320-333.
- [23] SONG H, YU W, GAO M, et al. Microencapsulated probiotics using emulsification technique coupled with internal or external gelation process [J]. Carbohydr Polym, 2013, 96(1): 181-189.
- [24] QI W T, MA J, YU W T, et al. Behavior of microbial growth and metabolism in alginate-chitosan-alginate (ACA) microcapsules [J]. Enzyme Microb Technol, 2006, 38(5): 697-704.

- indigenous *Dunaliella isolates* with main focus on fatty acid composition towards potential biotechnological application [J/OL]. *Biotechnol Rep*, 2020, 26: e00479 [2024 - 03 - 28]. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00479>.
- [13] CHA T S, CHEN J W, GOH E G, et al. Differential regulation of fatty acid biosynthesis in two *Chlorella* species in response to nitrate treatments and the potential of binary blending microalgae oils for biodiesel application [J]. *Bioresour Technol*, 2011, 102 (22): 10633 - 10640.
- [14] RAMOS M J, FERNÁNDEZ C M, CASAS A, et al. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties [J]. *Bioresour Technol*, 2009, 100 (1): 261 - 268.
- [15] WU H, MIAO X. Biodiesel quality and biochemical changes of microalgae *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus* in response to nitrate levels [J]. *Bioresour Technol*, 2014, 170: 421 - 427.
- [16] ISHIKA T, BAHRI P A, LAIRD D W, et al. The effect of gradual increase in salinity on the biomass productivity and biochemical composition of several marine, halotolerant, and halophilic microalgae [J]. *J Appl Phycol*, 2018, 30(3): 1453 - 1464.
- [17] KHATOON H. Growth and carotenoid production of *Dunaliella salina* (dunal) teodoresco, 1905 cultured at different salinities [J/OL]. *Asian Fish Sci*, 2020, 33 (3): 001 [2024 - 03 - 28]. <https://doi.org/10.33997/j.afs.2020.33.3.001>.
- [18] TAKAGI M, KARSEN O, YOSHIDA T. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells [J]. *J Biosci Bioeng*, 2006, 101(3): 223 - 226.
- [19] WU M, ZHU R, LU J, et al. Effects of different abiotic stresses on carotenoid and fatty acid metabolism in the green microalga *Dunaliella salina* Y6 [J/OL]. *Ann Microbiol*, 2020, 70(1): 48 [2024 - 03 - 28]. <https://doi.org/10.1186/s13213-020-01588-3>.
- [20] KHATOON H, ABDU RAHMAN N, BANERJEE S, et al. Effects of different salinities and pH on the growth and proximate composition of *Nannochloropsis* sp. and *Tetraselmis* sp. isolated from South China Sea cultured under control and natural condition [J]. *Int Biodeterior Biodegrad*, 2014, 95: 11 - 18.
- [21] KNOTHE G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters [J]. *Fuel Process Technol*, 2005, 86(10): 1059 - 1070.
- [22] 陈艳凤, 曾建立, 杜泽学, 等. 生物柴油原料中不皂化物和脂肪酸分析 [J]. *中国油脂*, 2024, 49(4): 83 - 87.
-
- (上接第 111 页)
- [25] ZEEB B, SABERI A H, WEISS J, et al. Formation and characterization of filled hydrogel beads based on calcium alginate: Factors influencing nanoemulsion retention and release [J]. *Food Hydrocolloid*, 2015, 50: 27 - 36.
- [26] LIU Z, ZHAO M, SHEHZAD Q, et al. Whippable emulsions co - stabilized by protein particles and emulsifiers: The effect of emulsifier type [J/OL]. *Food Hydrocolloid*, 2023, 137: 108379 [2024 - 02 - 03]. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108379>.
- [27] MCCLEMENTS D J, BAI L, CHUNG C. Recent advances in the utilization of natural emulsifiers to form and stabilize emulsions [J]. *Annu Rev Food Sci Technol*, 2017, 8: 205 - 236.
- [28] 吴迪, 程艺超, 姜娇, 等. 酵母中葡萄糖阻遏作用机制研究进展 [J]. *微生物学报*, 2023, 63(9): 3409 - 3427.
- [29] 杨静, 齐男, 赵鑫, 等. 复合有机氮对产氢新菌 *C. guangxiense* 产氢的促进作用 [J]. *可再生能源*, 2019, 37(3): 317 - 321.
- [30] GUO J, MA Z, GAO J, et al. Recent advances of pH homeostasis mechanisms in *Corynebacterium glutamicum* [J/OL]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2019, 35(12): 192 [2024 - 02 - 23]. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2770-2>.
- [31] JU J H, KO D J, HEO S Y, et al. Regulation of lipid accumulation using nitrogen for microalgae lipid production in *Schizochytrium* sp. ABC101 [J]. *Renew Energ*, 2020, 153: 580 - 587.
- [32] 王寒, 罗庆华, 魏梦雅, 等. 大鲮油微胶囊的贮藏稳定性研究 [J]. *中国油脂*, 2018, 43(11): 24 - 27, 48.