

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2024.80177

# 啤酒废酵母水解液养殖裂壶藻生产 DHA 藻油

杨庆懿<sup>1</sup> 唐裕芳<sup>2</sup> 李 涛<sup>1</sup> 刘 磊<sup>2</sup> 周大科<sup>3</sup>

(1. 湖南省产商品质量检验研究院食品安全监测与预警湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410007;

2. 湘潭大学化工学院, 湖南 湘潭 411105; 3. 湖南珠江啤酒有限公司, 湖南 湘潭 411228)

**摘要:** [目的] 探索啤酒废酵母水解液养殖裂壶藻生产 DHA 藻油的可行性。[方法] 以还原糖质量浓度和总氮质量浓度为响应值优化超声辅助复合酶法破壁水解废啤酒酵母, 并利用水解液培养裂壶藻生产 DHA 藻油。[结果] 在超声功率 400 W, 温度 60 °C, pH 5.0, 木瓜蛋白酶添加量 0.5 g,  $m_{\beta\text{-葡聚糖酶}}:m_{\text{木瓜蛋白酶}}=4:5$ , 超声 40 min, 所得水解液中还原糖和总氮质量浓度达到最大, 分别为 20.40, 6.72 g/L。水解液体积分数 75%, 裂壶藻接种体积分数 14%, 培养 3 d, 裂壶藻的生物量、油脂产量以及 DHA 质量分数和产量达到最大, 分别为 17.14 g/L, 2.88 g/L, 3.13%, 0.55 g/L, 均较传统发酵培养养殖裂壶藻的生物量 (10.29 g/L)、油脂产量 (1.84 g/L) 以及 DHA 质量分数 (2.76%) 和产量 (0.29 g/L) 高, 所得藻油的致病菌和重金属指标均低于食品安全国家标准的最低限量。[结论] 利用超声辅助复合酶法所得废啤酒酵母水解液养殖裂壶藻生产 DHA 是可行的, 可以实现食品生产废弃物处理和微藻化工产品生产的有机统一。

**关键词:** 废啤酒酵母; 水解液; 裂壶藻; DHA

## Production of DHA algal oil from *Schizochytrium* sp. fed with waste beer yeast hydrolysate

YANG Qingyi<sup>1</sup> TANG Yufang<sup>2</sup> LI Tao<sup>1</sup> LIU Lei<sup>2</sup> ZHOU Dake<sup>3</sup>

(1. Hunan Provincial Key Laboratory of Food Safety Monitoring and Early Warning of Hunan Institute of Commodity Quality Inspection, Changsha, Hunan 410007, China; 2. College of Chemical Engineering of Xiangtan University, Xiangtan, Hunan 411105, China; 3. Hunan Zhujiang Beer Co., Ltd., Xiangtan, Hunan 411228, China)

**Abstract:** [Objective] To explore the feasibility of cultivating *Schizochytrium* sp. using waste beer yeast hydrolysate to produce DHA algal oil. [Methods] Ultrasound-assisted composite enzyme method was selected to break the cell wall and hydrolyze waste beer yeast, optimizing the process based on reducing sugar and total nitrogen concentrations as response variables. The hydrolysate was then used to cultivate *Schizochytrium* sp. to produce DHA algal oil. [Results] Under the conditions of ultrasonic power at 400 W, temperature at 60 °C, pH 5.0, papain at 0.5 g,  $\beta$ -glucanase:papain ratio of 4:5, and hydrolysis time of 40 min, the hydrolysate achieved maximum concentrations of reducing sugar and total nitrogen, which were 20.40 g/L and 6.72 g/L, respectively. When the hydrolysate volume fraction was 75% and the inoculum volume fraction of *Schizochytrium* sp. was 14%, after 3 days of cultivation, the biomass, oil yield, DHA content, and DHA yield reached their maximum values of 17.14 g/L, 2.88 g/L, 3.13%, and 0.55 g/L, respectively, which were higher than those obtained from traditional fermentation cultures (biomass 10.29 g/L, oil yield 1.84 g/L, DHA content 2.76%, DHA yield 0.29 g/L). The pathogenic bacteria and heavy metal levels in the algal oil were below the minimum limits specified in national food safety standard. [Conclusion] Using waste beer yeast hydrolysate obtained through ultrasound-assisted composite enzyme hydrolysis to cultivate *Schizochytrium* sp. for DHA production is feasible. This method achieves an organic integration of food production waste treatment and microalgae-based chemical product production.

**Keywords:** waste beer yeast; hydrolysate; *Schizochytrium* sp.; DHA

基金项目: 湖南省自然科学基金面上项目 (编号: 2024JJ7545, 2022JJ90027, 2021JJ30660)

通信作者: 唐裕芳 (1970—), 女, 湘潭大学教授, 博士生导师, 博士。E-mail: tyfchky@126.com

收稿日期: 2024-02-28 改回日期: 2025-01-20

二十二碳六烯酸(DHA)具有预防心血管疾病、抗炎和抗癌、促进视觉和神经系统组织的正常发育等重要生理功能<sup>[1]</sup>。DHA的传统来源主要是深海鱼油,但对海洋资源的过度开发以及环境污染等问题使得鱼油品质和产量均无法满足需求。裂壶藻等海洋微藻中DHA含量较高,被认为是商业生产DHA的合适替代品。但由于养殖裂壶藻生产DHA的成本较高,其中,所需用水和营养物就占总成本的80%,使得裂壶藻生产DHA受到一定程度限制。目前,增加裂壶藻生物量和DHA含量以及降低养殖裂壶藻的营养费用是降低裂壶藻生产DHA成本的两大类策略。其中利用裂壶藻同化有机废弃物或废液中含碳和含氮化合物积累代谢产物,降低养殖裂壶藻营养费用是降低DHA生产成本的常用策略。Kujawska等<sup>[2]</sup>利用废甘油作为碳源,通过分批补料培养裂壶藻,生物量达到 $(103.44 \pm 1.50) \text{ g/dm}^3$ , DHA质量浓度达到 $(21.98 \pm 0.36) \text{ g/dm}^3$ 。Wang等<sup>[3]</sup>将调节pH后的豆腐黄浆水用作裂壶藻的发酵培养基,裂壶藻的生物量和DHA产率分别达到1.89 g/L和0.24 g/(L·d)。上述研究表明,有机废弃物或废水经过简单处理后可用作裂壶藻发酵生产DHA的营养基质以降低裂壶藻生产DHA的成本。

中国每年约有50万t啤酒废酵母形成,其中约2/3被用于饲料<sup>[4]</sup>,其余部分用于提取细胞中生物活性物质或直接丢弃。废啤酒酵母细胞中含有丰富的含碳和含氮化合物以及矿质元素<sup>[4]</sup>,但这些物质存在于细胞内,有的营养物是以有机大分子形式存在的,不能被微生物吸收。因此,废啤酒酵母必须经过破壁或酶解处理以释放营养物。细胞破壁方法可分为物理法、化学法和酶法<sup>[5]</sup>。其中物理方法虽破壁效果较好,也不造成二次污染,但此方法不能将大分子有机化合物水解成微生物可吸收利用的分子物质。化学法虽破壁效果好,但可能会损坏营养物质并产生二次污染<sup>[6]</sup>或化学残留。酶法虽能将大分子有机物酶解成小分子<sup>[7]</sup>,但不能使细胞最大程度破壁<sup>[8]</sup>。而物理法与酶法联合使用可以有效破碎细胞,同时将大分子物质水解成小分子物质<sup>[9]</sup>。相比高压均质、高压脉冲、蒸汽爆破、热解液化等物理方法,超声破壁法不需要特殊的设备;相比珠磨法,超声破壁法破壁效果较好<sup>[10]</sup>。有报道证实,超声波辅助酶法破壁时能加速酶的反应<sup>[11]</sup>和超声波辅助 $\beta$ -葡聚糖酶促进产朊假丝酵母破壁水解<sup>[12]</sup>。说明超声波辅助 $\beta$ -葡聚糖酶促进细胞破壁是可行的。木瓜蛋白酶可催化蛋白质大分子物质水解成可被生物利用的含氮小分子。目前,采用超声辅助复合酶法(木瓜蛋白酶+ $\beta$ -葡聚糖酶)促进啤酒酵母细胞破壁提升水解液中还原糖和总氮含量鲜见

报道。研究拟采用超声辅助复合酶法破壁水解废啤酒酵母,通过单因素试验优化废啤酒酵母水解液养殖裂壶藻生产DHA的工艺条件,并评价所得裂壶藻藻油的安全性,以期为废啤酒酵母的高值化利用和DHA生产提供新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

废啤酒酵母:湖南珠江啤酒有限公司;

木瓜蛋白酶:酶活350万U/g,南宁庞博生物工程有限公司;

$\beta$ -葡聚糖酶:酶活3万U/g,隆科特酶制剂有限公司;

裂壶藻(*Schizochytrium* sp. ATCC20888);实验室冷藏,于 $-80^\circ\text{C}$ 保存于50%甘油溶液。

### 1.2 试验方法

1.2.1 破壁水解方法筛选 发酵罐中放出的废啤酒酵母细胞和啤酒废液的混合物经离心得到酵母泥和上清液,然后在500 mL的烧杯中加入20 g离心所得酵母泥和200 mL离心所得上清液,以还原糖和总氮质量浓度为指标,采用超声、木瓜蛋白酶、 $\beta$ -葡聚糖酶、超声辅助木瓜蛋白酶、超声辅助 $\beta$ -葡聚糖酶、木瓜蛋白酶+ $\beta$ -葡聚糖酶以及超声辅助木瓜蛋白酶+ $\beta$ -葡聚糖酶7种方法破壁水解废啤酒酵母。其中,超声功率500 W、水解温度 $50^\circ\text{C}$ 、pH 6.0、木瓜蛋白酶添加量0.5 g、 $m_{\beta\text{-葡聚糖酶}}:m_{\text{木瓜蛋白酶}}=1:1$ ,水解60 min。以不采用这7种方法处理为未处理组。

1.2.2 超声辅助木瓜蛋白酶+ $\beta$ -葡聚糖酶复合酶法破壁水解废啤酒酵母条件优化

(1) 超声功率优化:固定温度 $50^\circ\text{C}$ 、pH 6.0、木瓜蛋白酶添加量0.5 g、 $m_{\beta\text{-葡聚糖酶}}:m_{\text{木瓜蛋白酶}}=1:1$ ,分别在超声功率100,200,300,400,500,600,700 W条件下水解60 min,确定最佳超声功率。

(2) 温度优化:固定pH 6.0、木瓜蛋白酶添加量0.5 g、 $m_{\beta\text{-葡聚糖酶}}:m_{\text{木瓜蛋白酶}}=1:1$ 及优化的超声功率,分别在30,40,50,60,70 $^\circ\text{C}$ 水解60 min,确定最佳温度。

(3) pH优化:固定木瓜蛋白酶添加量0.5 g、 $m_{\beta\text{-葡聚糖酶}}:m_{\text{木瓜蛋白酶}}=1:1$ 及优化的超声功率和温度,分别在pH值4.0,5.0,6.0,7.0,8.0条件下水解60 min,确定最佳pH。

(4) 酶比优化:固定木瓜蛋白酶添加量0.5 g及优化的超声功率、温度、pH值,分别在 $m_{\beta\text{-葡聚糖酶}}:m_{\text{木瓜蛋白酶}}$ 为1:5,2:5,3:5,4:5,1:1条件下水解60 min,确定最佳酶比。

(5) 时间优化:固定木瓜蛋白酶添加量0.5 g及优化的超声功率、温度、pH值、酶比,分别水解20,30,40,50,60 min,确定最佳水解时间。

水解反应完成后于沸水浴中灭酶10 min,然后冷却

至室温,8 000 r/min 离心 10 min,取上清液备用。

### 1.2.3 废啤酒酵母水解液养殖裂壶藻生产DHA

(1) 裂壶藻种子培养基和发酵培养基成分及裂壶藻活化:参照文献[13],接种用裂壶藻悬液菌数为  $1 \times 10^5$  CFU/mL,以裂壶藻的传统发酵培养基为对照。

(2) 水解液体积分数:废啤酒酵母水解液稀释成不同体积分数(25%,50%,75%,100%),裂壶藻种子液按体积分数 10% 分别接种到不同体积分数的水解液中,以传统发酵培养基为对照组,培养 3 d,确定水解液的最适稀释浓度。

(3) 接种量:分别以体积分数 2%,6%,10%,14%,18% 接种裂壶藻种子液于最适稀释浓度水解液中,培养 3 d,确定裂壶藻产 DHA 的最佳接种比例。

(4) 培养时间:按照 1.2.3(3) 确定的接种比例接种裂壶藻到 1.2.3(2) 确定浓度的水解液中,分别培养 1,2,3,4,5,6 d,确定裂壶藻中 DHA 含量及产量最高的培养时间。

### 1.2.4 还原糖和总氮测定

(1) 还原糖质量浓度:采用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法<sup>[14]</sup>。

(2) 总氮质量浓度:采用过硫酸钾氧化分光光度法,按 HJ 636—2012 执行。

1.2.5 生物量测定 取发酵液置于已称重的离心管中,8 000 r/min 离心 10 min,弃去上清。藻泥经蒸馏水冲洗 3 次真空冷冻干燥至恒重(约 48 h)。根据式(1)计算裂壶藻生物量。

$$c = \frac{m}{V} \times 1000, \quad (1)$$

式中

$c$ ——生物量,g/L;

$m$ ——干燥裂壶藻质量,g;

$V$ ——发酵液体积,mL。

1.2.6 总脂和DHA含量测定 参照文献[15]。

1.2.7 DHA藻油安全性检测 DHA藻油中相关安全指标委托湘潭市市场管理监督局检测。各指标检测按照DHA藻油行业标准(LS/T 3243—2015)执行。

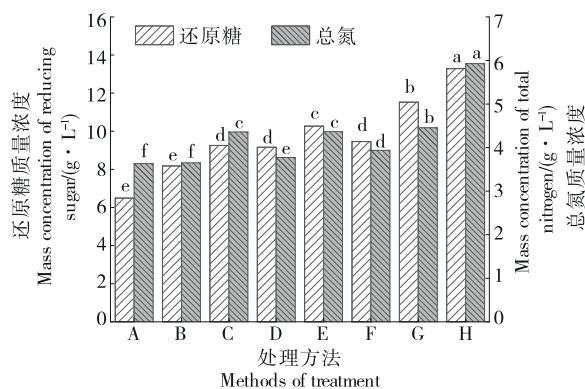
1.2.8 数据分析 所有试验重复3次,结果以平均值±标准偏差来表示,数据使用IBM SPSS 27进行统计分析和显著性评价,绘图采用Origin 2018软件。

## 2 结果与讨论

### 2.1 筛选破壁水解废啤酒酵母的方法

由图1可知,未经处理的废液中还原糖与总氮质量浓度分别为6.49,3.63 g/L。废液中的酵母细胞通过超声破碎处理,还原糖质量浓度增加到8.18 g/L,较未处理组提

高了26.04%,可能是超声处理使部分酵母细胞壁破裂<sup>[9]</sup>,细胞中的可溶性物质流出所致,总氮质量浓度未显著增加。加入木瓜蛋白酶或 $\beta$ -葡聚糖酶后,还原糖质量浓度达到9.25或9.16 g/L,总氮质量浓度分别达到4.36或3.77 g/L,较未处理组,还原糖质量浓度分别提高了42.52%或41.14%,总氮质量浓度分别提高了20.09%或3.86%。当超声辅助木瓜蛋白酶处理时,还原糖与总氮质量浓度分别为10.27,4.37 g/L,还原糖质量浓度较单独超声处理和单独木瓜蛋白酶处理分别提高了25.56%,11.02%,总氮质量浓度较超声处理提高了19.45%,而较木瓜蛋白酶处理无显著提高。超声辅助 $\beta$ -葡聚糖酶处理时,还原糖与总氮质量浓度分别为9.46,3.77 g/L,较单独超声处理分别提高了15.65%,7.95%,较单独 $\beta$ -葡聚糖酶处理分别提高了3.28%,4.51%。当超声辅助木瓜蛋白酶+ $\beta$ -葡聚糖酶复合酶处理时,水解液中的还原糖与总氮质量浓度均达到最高,分别为12.99,5.85 g/L,较未处理组分别提高了100.00%,61.16%。这些结果表明,单独依靠酶或超声无法充分使水解液中还原糖和总氮质量浓度达到更大。超声辅助酶解可以有效地将酵母细胞破碎并将大分子物质水解,同时超声波可以加强酶与底物分子的混合效果,增加酶与底物相互作用的机会<sup>[16-17]</sup>。而超声辅助复合酶法则进一步提高水解液中还原糖和总氮质量浓度。因此,选择超声辅助木瓜蛋白酶+ $\beta$ -葡聚糖酶复合酶法破壁水解废啤酒酵母。



A. 未处理 B. 超声法 C. 木瓜蛋白酶 D.  $\beta$ -葡聚糖酶 E. 超声辅助木瓜蛋白酶 F. 超声辅助 $\beta$ -葡聚糖酶 G. 木瓜蛋白酶和 $\beta$ -葡聚糖酶 H. 超声辅助木瓜蛋白酶+ $\beta$ -葡聚糖酶 同一指标小写字母不同表示不同水解方法之间差异显著( $P < 0.05$ )

图1 不同处理方法所得啤酒废酵母破壁水解液中的还原糖与总氮质量浓度

Figure 1 Mass concentrations of reducing sugar and total nitrogen in waste yeast hydrolysate treated by different methods

## 2.2 超声辅助木瓜蛋白酶+ $\beta$ -葡聚糖酶复合酶法破壁水解废啤酒酵母工艺优化

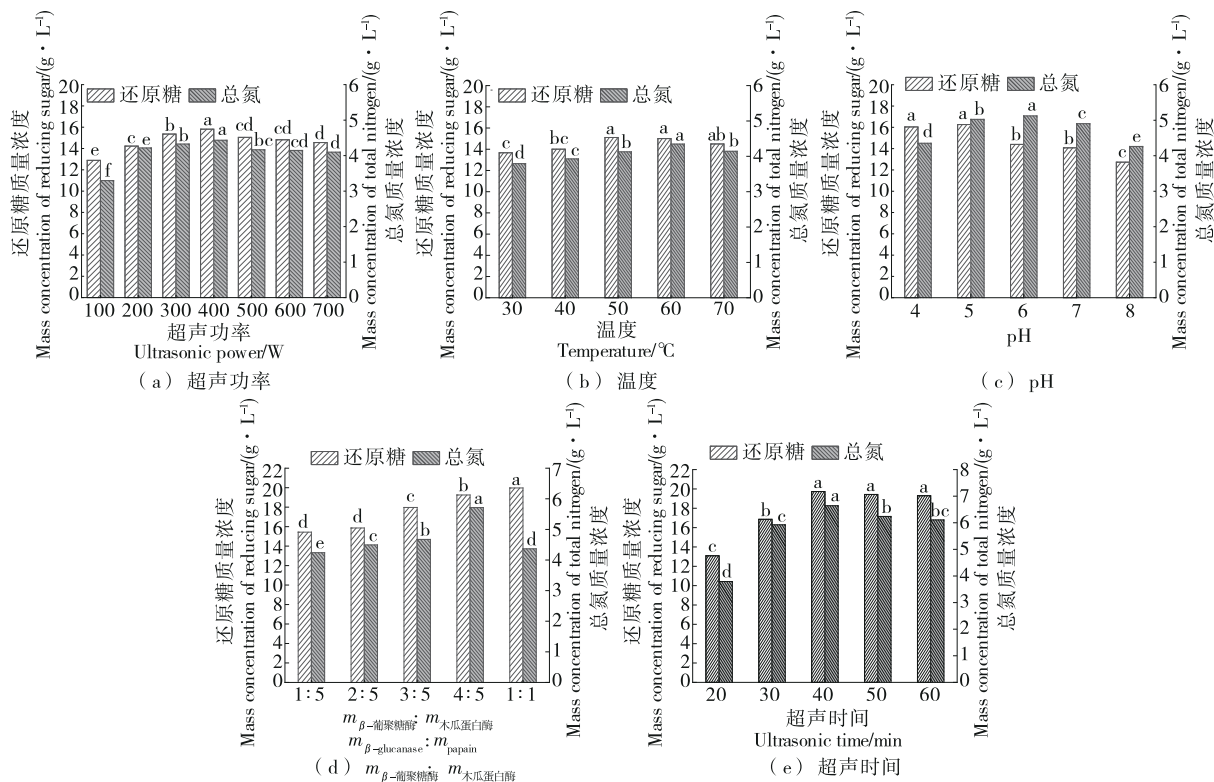
**2.2.1 超声功率** 由图 2(a)可以看出,随着超声功率的增加,还原糖与总氮质量浓度先增加后下降。当超声功率为 400 W 时,还原糖与总氮质量浓度均达到最大,分别为 15.9, 4.48 g/L。这是因为超声功率增加,作用在单位体积酵母细胞上的超声能增加<sup>[18]</sup>。另外,超声空化作用能起到一定的均质作用<sup>[19]</sup>,增加了细胞间的碰撞以及底物与酶的接触,从而提高了酶促反应的效率<sup>[20]</sup>。超声功率超过 400 W,还原糖与总氮质量浓度呈下降趋势,这可能是因为过高的超声功率会破坏酶的活性中心,从而导致其水解效率降低<sup>[21]</sup>。综合能耗考虑,超声功率选择 400 W。

**2.2.2 水解温度** 由图 2(b)可以看出,随着温度升高,还原糖与总氮质量浓度呈先上升后下降的趋势。这是由于木瓜蛋白酶与 $\beta$ -葡聚糖酶有其发挥最大活性的适宜温度范围。当温度为 60℃时,水解液中还原糖与总氮质量浓度分别为 15.45, 4.42 g/L,虽说还原糖比 50℃时的(15.71 g/L)低,但差异不显著。当温度超过 60℃,还原糖

与总氮质量浓度下降,可能是酶活性下降所致<sup>[22]</sup>。同时,温度升高可能会导致超声空化效应减弱<sup>[23]</sup>。因此,选择在 60℃下破壁水解啤酒废酵母。

**2.2.3 pH** 由图 2(c)可以看出,当 pH 从 4.0 上升到 5.0 时,水解液中还原糖质量浓度达最高,为 17.05 g/L,当 pH 继续上升到 6.0 时,水解液中还原糖质量浓度(14.39 g/L)显著下降,总氮质量浓度升高至 5.05 g/L。这可能是因为随着 pH 升高,酶羧基、氨基的解离效率提高,从而促进酶的活性和酶促反应速度<sup>[23]</sup>。而当 pH 继续提高,酶分子活性部位上有关基团的离解程度受到抑制,使底物不能与酶结合,或者结合后不能生成产物<sup>[23]</sup>,从而影响酶的活性,使水解反应效率下降。由于 pH 5.0 升至 6.0,还原糖质量浓度显著降低,总氮质量浓度增加幅度较小。因此,选择水解 pH 为 5.0。

**2.2.4 酶比例** 根据预试验确定木瓜蛋白酶的最适添加量为 0.5 g,然后固定木瓜蛋白酶的添加量,改变 $\beta$ -葡聚糖酶与木瓜蛋白酶比例( $m_{\beta\text{-葡聚糖酶}}:m_{\text{木瓜蛋白酶}}$ )。由图 2(d)可以看出,随着 $m_{\beta\text{-葡聚糖酶}}:m_{\text{木瓜蛋白酶}}$ 增加,还原糖质量浓度增加,总氮质量浓度先增加后下降。当 $m_{\beta\text{-葡聚糖酶}}:m_{\text{木瓜蛋白酶}}$ 增



同一指标小写字母不同表示不同处理之间差异显著( $P < 0.05$ )

图2 超声辅助复合酶对废啤酒酵母水解液中还原糖与总氮质量浓度的影响

Figure 2 Effect of ultrasound-assisted composite enzyme method on mass concentration of reducing sugar and total nitrogen in waste beer yeast hydrolysate

加到4:5时总氮质量浓度为5.71 g/L,当 $m_{\beta\text{-葡聚糖酶}}:m_{\text{木瓜蛋白酶}}$ 增加到1:1时,还原糖质量浓度达最大,为19.97 g/L,相比 $m_{\beta\text{-葡聚糖酶}}:m_{\text{木瓜蛋白酶}}=4:5$ 时增加了3.74%,但总氮质量浓度下降了30.96%。因此,选择 $m_{\beta\text{-葡聚糖酶}}:m_{\text{木瓜蛋白酶}}=4:5$ 。

**2.2.5 水解时间** 由图2(e)可以看出,随着水解时间增加,还原糖与总氮质量浓度呈先增加后略微下降。当水解时间增加到40 min时,还原糖与总氮质量浓度均达到最大,分别为20.40,6.72 g/L。这是因为随着水解时间增加到40 min时,超声波使细胞壁通透性增加,同时,酶与底物反应达到平衡<sup>[24]</sup>,但当水解时间继续延长,超声波的热效应和水解液的pH变化破坏了酶活性,从而影响水解反应效率<sup>[18]</sup>。因此,破壁水解时间选择40 min。

### 2.3 水解液养殖裂壶藻生产含DHA藻油

**2.3.1 水解液稀释体积分数确定** 由图3(a)可以看出,当水解液体积分数为75%时,裂壶藻的生物量达到最高,

为12.29 g/L,相比传统培养基的提高了16.16%。当水解液体积分数增加到100%时,裂壶藻生物量急剧下降。这可能是由于水解液中含有的碳源、氮源和无机盐等,可以作为裂壶藻生长的营养物质促进裂壶藻细胞的分裂、细胞内物质转运代谢等<sup>[25]</sup>,但当水解液体积分数增大,某些不利于裂壶藻生长的物质的浓度也增大而抑制裂壶藻的生长。裂壶藻中油脂质量分数随着水解液体积分数增加而增加,当水解液体积分数为100%时,裂壶藻中油脂质量分数最高,达到18.20%,但裂壶藻生物量低至2.5 g/L致使油脂的产量低至0.46 g/L。水解液体积分数为75%时裂壶藻油脂产量达最高,为2.08 g/L,比传统培养基的提高了13.04%。由图3(b)可知,当水解液体积分数为75%时,DHA质量分数和产量最高,分别为3.33%和0.41 g/L,分别比传统培养基的提高了20.65%和41.38%。因此,采用体积分数75%的水解液养殖裂壶藻。

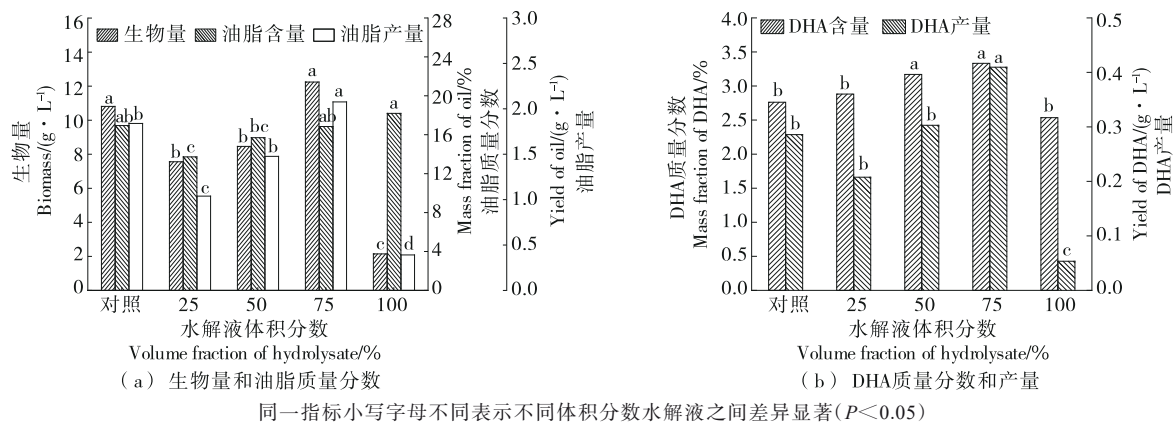


图3 水解液体积分数对裂壶藻生物量和油脂质量分数及DHA质量分数和产量的影响

Figure 3 Effects of volume fraction of hydrolysate on biomass, mass fraction of oil, and mass fraction of DHA, yield in *Schizochytrium sp.*

**2.3.2 接种量确定** 由图4可知,接种量会影响裂壶藻的生长及细胞内油脂和DHA含量。当接种体积分数为14%时,裂壶藻的生物量为17.16 g/L,油脂质量分数及产量分别为16.35%和2.78 g/L,DHA质量分数及产量分别为3.03%和0.53 g/L,均达到最大值。因此,选择接种体积分数为14%。

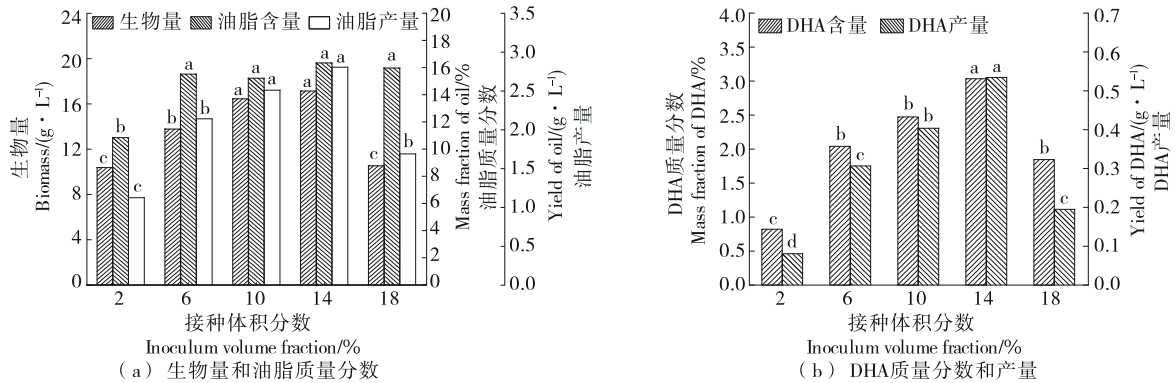
**2.3.3 培养时间确定** 由图5可以看出,培养3 d时裂壶藻生物量、油脂含量及产量分别为17.14 g/L,16.78%,2.88 g/L,DHA含量及产量分别为3.13%,0.55 g/L,均达到最大值。因此,培养时间选择3 d为宜。

### 2.4 DHA藻油安全性分析

由表1可以看出,啤酒废酵母水解液养殖裂壶藻生产DHA藻油的各项安全指标均低于LS/T 3243—2015《DHA藻油》中的最低限量,符合DHA藻油行业标准和食品安

全国家标准要求。说明啤酒废酵母水解液养殖裂壶藻生产的DHA藻油有应用于食品、医药行业的潜力。

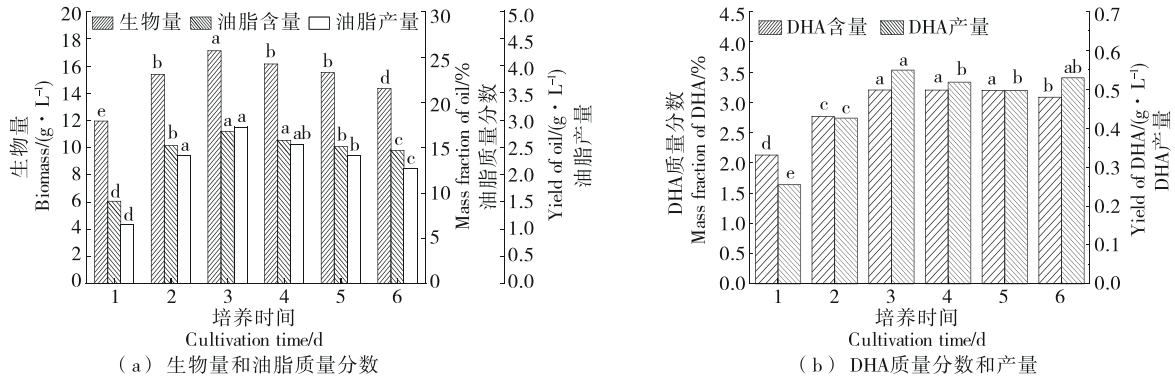
啤酒发酵废酵母在超声功率400 W,温度60 °C,pH 5.0,木瓜蛋白酶添加量0.5 g, $m_{\beta\text{-葡聚糖酶}}:m_{\text{木瓜蛋白酶}}=4:5$ 的条件下,超声40 min所得水解液稀释体积分数到75%,裂壶藻接种体积分数14%,培养到第3天,所得裂壶藻的生物量为17.14 g/L,油脂的质量分数及产量分别为16.78%,2.88 g/L,DHA的质量分数及产量分别为3.13%,0.55 g/L,均高于传统培养基培养的。结果表明,啤酒废酵母破壁水解后所得水解液具有裂壶藻生长和DHA积累的营养物质,可以用于养殖裂壶藻生产油脂和DHA藻油。另外,啤酒废酵母细胞破壁水解后,胞内的酚类等抗氧化物质释放出来进入水解液中,抑制DHA氧化降解,促进DHA的生物积累从而使裂壶藻中DHA质量分数增



同一指标小写字母不同表示不同接种比例之间差异显著( $P<0.05$ )

图4 不同接种量时裂壶藻生物量、油脂质量分数和DHA质量分数及产量

Figure 4 Biomass, mass fraction of oil, mass fraction of DHA, and yield at different inoculation amounts of *Schizochytrium* sp.



同一指标小写字母不同表示不同培养之间差异显著( $P<0.05$ )

图5 培养时间对裂壶藻生物量、油脂质量分数和DHA质量分数及产量的影响

Figure 5 Effect of culture time on biomass, mass fraction of oil, mass fraction of DHA, and yield in *Schizochytrium* sp.

表1 啤酒废酵母水解液养殖裂壶藻生产DHA藻油安全性评价

Table 1 Evaluation on the safety of DHA algal oil from *Schizochytrium* sp. with waste beer yeast hydrolysate

| 指标        | 单位    | LS/T 3243—2015 | 含量        | 指标                  | 单位      | LS/T 3243—2015 | 含量        |
|-----------|-------|----------------|-----------|---------------------|---------|----------------|-----------|
| 不皂化物      | %     | ≤4.0           | 0.92±0.05 | 过氧化值                | mmol/kg | ≤7.5           | 1.02±0.12 |
| 水分        | %     | ≤0.1           | 0.02±0.01 | 反式脂肪酸               | %       | ≤1.0           | 0.02±0.03 |
| 不溶性杂质     | %     | ≤0.2           | 0.45±0.07 | 黄曲霉毒素B <sub>1</sub> | μg/kg   | ≤5.0           | 0.78±0.04 |
| 溶剂残留      | mg/kg | ≤1.0           | 0.13±0.08 | 总砷(以As计)            | mg/kg   | ≤0.1           | 未检出       |
| 酸价(以KOH计) | mg/g  | ≤3.0           | 0.12±0.05 | 铅(Pb)               | mg/kg   | ≤0.1           | 未检出       |

加。超声辅助复合酶法水解啤酒废酵母时,超声和复合酶协同使啤酒废酵母破壁,同时, $\beta$ -葡聚糖酶和木瓜蛋白酶催化碳水化合物和蛋白质水解,增大水解液中还原糖和总氮质量分数,提供裂壶藻生长和代谢物积累所需碳源和氮源。水解液原液可能并不适合微藻生长<sup>[26]</sup>,如图3所示,当水解液体积分数增大到100%(原液),某些不利于裂壶藻生长的物质的浓度也增大从而抑制裂壶藻的生长,导致裂壶藻生物量下降而使藻油和DHA产量下降,

所以废啤酒酵母水解液需要稀释到一定浓度才适合裂壶藻生长。另外,接种量会影响微藻生物量积累,太高或太低都可能使微藻生物量降低<sup>[26]</sup>。如图4所示,接种体积分数小于或超过14%均会使水解液养殖裂壶藻的生物量降低,这可能是因为大接种量带进种子培养基中的代谢废物和有毒物质<sup>[27]</sup>不利于裂壶藻生长,小接种量致使裂壶藻接种后适应期延长而影响生物量的积累。裂壶藻养殖时间超过3 d后生物量下降[图5(a)],可能是在裂殖

壶菌培养体系的稳定期和衰亡期,细胞自溶、蛋白质和碳水化合物降解。所以用啤酒废酵母水解液养殖裂壶藻生产含DHA藻油时应优化养殖条件,尽可能提高裂壶藻生物量而使DHA质量分数和DHA藻油产量提高。

### 3 结论

研究通过超声辅助复合酶法破壁水解废啤酒酵母,然后利用废啤酒酵母水解液养殖裂壶藻生产含DHA藻油。在超声功率400 W,超声温度60℃,pH 5.0,木瓜蛋白酶添加量0.5 g,  $m_{\beta\text{-葡聚糖酶}}:m_{\text{木瓜蛋白酶}}=4:5$ ,超声时间40 min的条件下,所得水解液中还原糖和总氮质量浓度达到最高,分别为20.40, 6.72 g/L。水解液体积分数75%,裂壶藻接种体积分数14%,培养3 d,裂壶藻藻油产量、DHA质量分数及产量最高,分别为2.88 g/L, 3.13%, 0.55 g/L,均高于传统培养基养殖的。综上,啤酒废酵母水解液可以替代传统培养基养殖裂壶藻生产含DHA藻油,降低DHA藻油生产成本,具有一定的经济潜力。后续可以考虑通过补料培养模式进一步提高裂壶藻生物量及藻油产量,通过分析裂壶藻胞内抗氧化体系(抗氧化酶:超氧化物歧化酶和过氧化氢酶等;抗氧化物质:谷胱甘肽和类胡萝卜素等)以及油脂和DHA合成关键酶(苹果酸酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、脂肪酸合酶和聚酮合酶等)的变化,解析废啤酒酵母水解液促进油脂和DHA积累的机制。

### 参考文献

- [1] GUO D S, JI X J, REN L J, et al. Development of a multi-stage continuous fermentation strategy for docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp. [J]. *Bioresource Technology*, 2018, 269: 32-39.
- [2] KUJAWSKA N, TALBIERZ S, DĘBOWSKI M, et al. Cultivation method effect on *Schizochytrium* sp. biomass growth and docosahexaenoic acid (DHA) production with the use of waste glycerol as a source of organic carbon[J]. *Energies*, 2021, 14(10): 2 952.
- [3] 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]. *Science of the Total Environment*, 2020, 710: 136448.
- [4] ESTÉVEZ A, PADRELL L, IÑARRA B, et al. Brewery by-products (yeast and spent grain) as protein sources in gilthead seabream (*Sparus aurata*) feeds[J]. *Aquaculture*, 2021, 543: 736921.
- [5] 董爱华. 啤酒废酵母水解物的生产工艺优化及其在仔猪生产中的应用[D]. 广州: 华南理工大学, 2019: 1-6.
- [6] LIN D H, LOPEZ-SANCHEZ P, LI R, et al. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* CGMCC 3917 using only waste beer yeast as nutrient source[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 151: 113-119.
- [7] 黄海. 啤酒废酵母多糖及谷胱甘肽提取工艺的研究[D]. 兰州: 兰州理工大学, 2018: 9-20.
- [8] HUANG H. Study on the extraction process of polysaccharides and glutathione from waste beer yeast[D]. Lanzhou: Lanzhou University of Technology, 2018: 9-20.
- [9] THANH H V, PHI N T L, KHOI N T, et al. Green extraction and biological activity of phenolic extracts from cashew nut testa using a combination of enzyme and ultrasound-assisted treatments[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2023, 103(11): 5 626-5 633.
- [10] ZHANG C, LI J J, CHEN L, et al. Effects of alkali, enzymes, and ultrasound on monosodium glutamate byproduct for a sustainable production of *Bacillus subtilis*[J]. *Food Chemistry*, 2021, 360: 129967.
- [11] 张莉弘, 吴琼. 几种废啤酒酵母细胞破壁方法的比较[J]. 长春大学学报, 2014, 24(4): 464-467.
- [12] ZHANG L H, WU Q. comparison of a few kinds of cell-wall breaking methods for waste beer yeast[J]. *Journal of Changchun University*, 2014, 24(4): 464-467.
- [13] SZABO O E, CSISZAR E. Some factors affecting efficiency of the ultrasound-aided enzymatic hydrolysis of cotton cellulose[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 156: 357-363.
- [14] YUAN H J, HE Y, ZHANG H, et al. Ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis of yeast  $\beta$ -glucan catalyzed by  $\beta$ -glucanase: chemical and microstructural analysis[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2022, 86: 106012.
- [15] 唐裕芳, 刘磊, 杨雨欣, 等. 胺酯和2,4-二氯苯氧乙酸协同诱导裂壶菌积累DHA[J]. 化工进展, 2023, 42(11): 5 900-5 907.
- [16] TANG Y F, LIU L, YANG Y X, et al. Synergy inducing effect of diethyl aminoethyl hexanoate and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on DHA accumulation in *Schizochytrium* sp. [J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2023, 42(11): 5 900-5 907.
- [17] 周志豪, 李芸芸, 王唯, 等. 酱油渣水解液养殖小球藻积累蛋白可行性研究[J]. 湘潭大学学报(自然科学版), 2023, 45(1): 115-126.
- [18] ZHOU Z H, LI Y Y, WANG W, et al. Feasibility of cultivation of *Chlorella protothecoides* in soy sauce residue hydrolysate and protein accumulation[J]. *Journal of Xiangtan University (Natural Science Edition)*, 2023, 45(1): 115-126.
- [19] 张剑, 杨雨欣, 唐裕芳, 等. 六种植物生长调节剂促进裂壶藻

- 油脂和 DHA 积累的研究[J]. 湘潭大学学报(自然科学版), 2022, 44(4): 81-89.
- ZHANG J, YANG Y X, TANG Y F, et al. Investigation of six plant growth regulators promoting lipid and DHA accumulation in *Schizochytrium*[J]. Journal of Xiangtan University (Natural Science Edition), 2022, 44(4): 81-89.
- [16] CAO Z H, GUO Y, LIU Z H, et al. Ultrasonic enzyme-assisted extraction of comfrey (*Symphytum officinale* L.) polysaccharides and their digestion and fermentation behaviors in vitro[J]. Process Biochemistry, 2022, 112: 98-111.
- [17] YUN C, WANG S F, GAO Y, et al. Optimization of ultrasound-assisted enzymatic pretreatment for enhanced extraction of baicalein and wogonin from *Scutellaria baicalensis* roots[J]. Journal of Chromatography B, 2022, 1188: 123077.
- [18] LADOLE M R, NAIR R R, BHUTADA Y D, et al. Synergistic effect of ultrasonication and co-immobilized enzymes on tomato peels for lycopene extraction[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2018, 48: 453-462.
- [19] YUAN H J, HE Y, ZHANG H, et al. Ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis of yeast  $\beta$ -glucan catalyzed by  $\beta$ -glucanase: chemical and microstructural analysis[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2022, 86: 106012.
- [20] QU Y B X, YANG Z G, LI H P, et al. Ultrasound-assisted enzymatic extraction method for multi-element analysis of rice [J]. Food Analytical Methods, 2020, 13(8): 1 549-1 555.
- [21] 罗轩. 蜂花粉多肽的超声辅助酶解制备及其过程原位实时监测技术研究[D]. 苏州: 江苏大学, 2022: 32-46.
- LUO X. Ultrasound-assisted enzymatic preparation of bee pollen peptides and in-situ real-time monitoring of the process [D]. Suzhou: Jiangsu University, 2022: 32-46.
- [22] 徐康, 王远兴. 半固态酶解法制备豆粕肽工艺的优化[J]. 中国食品学报, 2023, 23(7): 278-288.
- XU K, WANG X Y. Optimization of preparation of soybean meal peptides by semi-solid enzymatic hydrolysis[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2023, 23(7): 278-288.
- [23] 陈灼娟, 柯秀贤, 黄霄. 姬松茸抗氧化酶解液的制备[J]. 食品与机械, 2023, 39(3): 183-187, 232.
- CHEN Z J, KE X X, HUANG X. Preparation of antioxidant hydrolysate of *Agaricus blazei* Murill[J]. Food & Machinery, 2023, 39(3): 183-187, 232.
- [24] HOAI T V, CAO P N, LE THAO M P, et al. Ultrasound-assisted enzymatic extraction of adenosine from vietnamese cordyceps militaris and bioactivity analysis of the extract[J]. Journal of Chemistry, 2020, 2 020: 1487654.
- [25] BAO Z D, ZHU Y M, ZHANG K, et al. High-value utilization of the waste hydrolysate of *Dioscorea zingiberensis* for docosaheaxaenoic acid production in *Schizochytrium* sp. [J]. Bioresource Technology, 2021, 336: 125305.
- [26] BAI Y N, LI Y Q, TANG Y F, et al. *Rhizopus oryzae* fermentation wastewater nutrient removal coupling protein fodder production by employing *Chlorella pyrenoidosa*[J]. Bioresource Technology, 2022, 362: 127858.
- [27] 秦宇, 欧莹, 王尤婧, 等. 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[J]. 中国油脂, 2023, 48(3): 116-122.
- QIN Y, OU Y, WANG Y J, et al. Optimization of fermentation process of culturing *Schizochytrium* to produce DHA using distiller's grains treatment liquid as nitrogen source[J]. China Oils and Fats, 2023, 48(3): 116-122.