



破囊壶菌利用工农业废弃物生产脂肪酸的研究进展

宁耀东^{1,2} 王秋珍³ 何艺科^{1,2} 肖国华⁴ 汪光义^{*1,2}

1 天津大学环境科学与工程学院 天津 300072

2 天津大学海洋生态环境研究中心 天津 300072

3 河北农业大学海洋学院 河北 秦皇岛 066000

4 河北省海洋生物资源与环境重点实验室 河北 秦皇岛 066200

摘要: 破囊壶菌因具有高产脂肪酸的特性而受到广泛关注, 然而传统的培养方式需要的原料成本很高, 很大程度上阻碍了破囊壶菌的工业化进程, 因此, 寻找可被破囊壶菌高效利用、来源广泛并且廉价易得的生产原料成为该领域的研究重点。本文以破囊壶菌及其生产脂肪酸为切入点, 综述了近年来破囊壶菌利用工农业废弃物生产脂肪酸的研究现状, 总结并提出了其发展前景, 以期对今后的研究有所启发。

关键词: 破囊壶菌, 工农业废弃物, 脂肪酸

Progress in fatty acids production by thraustochytrids using industrial and agricultural wastes

NING Yao-Dong^{1,2} WANG Qiu-Zhen³ HE Yi-Ke^{1,2} XIAO Guo-Hua⁴
WANG Guang-Yi^{*1,2}

1 School of Environmental Science and Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China

2 Center for Marine Environmental Ecology, Tianjin University, Tianjin 300072, China

3 Ocean College, Hebei Agricultural University, Qinhuangdao, Hebei 066000, China

4 Hebei Key Laboratory for Marine Biological Resources and Environment, Qinhuangdao, Hebei 066200, China

Abstract: Thraustochytrids produce fatty acids in high yields. However, the high cost of raw materials required by the traditional culture method has largely hindered the industrialization of thraustochytrids. Searching for cheap raw materials with high utility and easy availability has thus become a major research concern. In this paper, thraustochytrids and their potential in producing fatty acids are reviewed, with a focus on the utilization of industrial and agricultural wastes as nutritional sources in the production of fatty acids by thraustochytrids. We expect this review to provide information for future research.

Keywords: Thraustochytrids, Industrial and agricultural wastes, Fatty acids

Foundation items: Open Fund of Laboratory for Marine Biology and Biotechnology; Think Tank United Foundation of Qingdao Marine Engineering and Technology (201707071001); Open Fund of Hebei Key Laboratory for Marine Biological Resources and Environment (HBSHZ2018K004)

*Corresponding author: E-mail: gywang@tju.edu.cn

Received: 03-06-2019; **Accepted:** 22-07-2019; **Published online:** 26-08-2019

基金项目: 海洋生物学与生物技术功能实验室开放基金; 青岛海洋工程与技术智库联合基金(201707071001); 河北省海洋生物资源与环境重点实验室开放基金(HBSHZ2018K004)

*通信作者: E-mail: gywang@tju.edu.cn

收稿日期: 2019-06-03; **接受日期:** 2019-07-22; **网络首发日期:** 2019-08-26

破囊壶菌是一类海洋异养原生生物^[1-3], 其细胞内积累的大量脂肪酸, 尤其是多不饱和脂肪酸, 如 DHA (docosahexaenoic acid)、EPA (eicosapentaenoic acid)等^[4-5], 对人体健康具有至关重要的作用^[6-7], 因而近年来受到广泛关注。此外, 破囊壶菌中的饱和脂肪酸如棕榈酸(C16:0)、十八烷酸等, 可以作为制备生物柴油的原料^[8-11]。破囊壶菌作为异养微生物, 其生长需要消耗各种营养源, 包括碳源、氮源、微量元素等。其中, 碳源和氮源是影响破囊壶菌生长和脂肪酸合成的两种至关重要的原料^[12-13]。然而在工业化的过程中, 用于破囊壶菌发酵的原料成本过高, 提取工艺复杂, 而多不饱和脂肪酸等高附加值产物的产值又不足以弥补投入, 严重制约了破囊壶菌的工业化进程^[14-15], 所以寻求廉价的原料来源已经成为目前亟需解决的问题。

所谓工农业废弃物是指工农业生产过程中产生的廉价副产品或废弃物, 这些工农业废料不仅数量庞大, 而且大部分被直接排放到环境中, 造成环境污染。近年来的研究发现, 某些农业废料如秸秆、果皮、残渣等含有的大量纤维素、木质素等多糖, 在经过处理之后能够转化为可被微生物利用的小分子单糖, 从而作为微生物发酵的替代碳源^[16-17]。工农业废料可以作为破囊壶菌发酵生产脂肪酸的优质原料。Nguyen 等^[17]利用甘蔗渣水解液中的葡萄糖、木糖等培养破囊壶菌, 其 DHA 的产量达到 1.29 g/L。某些工业废料中含有大量的有机氮成分, 可以作为破囊壶菌发酵的替代氮源^[18-20]。Xu 等^[18]利用废丙氨酸母液培养破囊壶菌, 其 DHA 的产量达到 2 g/L。因此, 工农业废料的合理利用不仅可以减轻环境污染, 而且可以缓解当前严峻的资源短缺问题。

本文首先介绍了破囊壶菌及其代谢产物, 主要是二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)及饱和脂肪酸的相关信息, 总结了近年来利用破囊壶菌生产脂肪酸的研究现状, 综述了近年来破囊壶菌利用工农业废弃物生产脂肪酸的应用研究,

分析了不同发酵底物对破囊壶菌产脂肪酸的影响, 并由此总结出一些共性, 以期对今后的研究有所启发和帮助, 不断推动该领域的研究。

1 破囊壶菌及其生产脂肪酸的研究现状

破囊壶菌最早发现于 1936 年, 现被归类为管毛生物界(Stramenopila)不等毛门(*Heterokonta*)网粘菌纲(*Labyrinthulomycetes*)破囊壶菌目(*Thraustochytriales*)破囊壶菌科(*Thraustochytriaceae*)^[1,3,21]。研究发现破囊壶菌细胞具有外质网结构, 线粒体内含有管状嵴, 并且细胞壁含有硫化多糖非纤维成分^[2,21]。破囊壶菌以孢子的形式繁殖, 成熟营养体可以直接通过向心分裂的方式产生孢子, 成为一个游动孢子囊; 也可先经过变形阶段, 再向心分裂产生孢子^[2]。破囊壶菌广泛分布于海洋和河口环境中, 能够通过产生多种胞外酶如脂肪酶、蛋白酶和纤维素酶等, 降解动物有机碎屑或者腐烂植物的有机质等难降解有机物, 是生物地球化学循环的重要参与者; 同时, 破囊壶菌还可以产生较多种类的碳氢化合物(多糖、脂肪酸、萜类、类胡萝卜素类), 是很多高等生物的营养来源, 在海洋生态系统食物链传递中发挥重要作用, 具有独特的地位^[2]。

破囊壶菌细胞内油脂含量高, 有的菌株脂肪酸比重甚至占到细胞干重的 60%以上^[2], 可以替代传统的脂肪酸来源, 因而近年来受到广泛关注。破囊壶菌的饱和脂肪酸主要是棕榈酸(C16:0)、十八烷酸等, 其中棕榈酸在总脂肪酸中的含量可以达到 50%以上, 具有工业化生产生物柴油的潜力^[8,22], 并且利用破囊壶菌的脂肪酸制备的生物柴油表现出良好的燃烧性能, 不会对环境造成污染^[23-24]。破囊壶菌中的多不饱和脂肪酸, 主要包括二十二碳六烯酸(DHA)、二十二碳五烯酸(docosapentaenoic acid, DPA)及二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)等, 是重要的营养添加剂^[25], 在食品、医药等行业都有广泛的应用^[26]。

此外,破囊壶菌还可以合成类胡萝卜素^[27-28]、角鲨烯^[29]、多种胞外酶^[23,30]和胞外多糖^[2]等高附加值代谢产物,具备广阔的开发应用前景。

DHA 即二十二碳六烯酸,是一种重要的多不饱和脂肪酸,有“脑黄金”之称,是 Ω -3 家族中重要的脂质,对人类神经和认知功能具有重要影响^[27,31]。由于 DHA 可以促进婴儿大脑的生长和功能发育,因此婴儿需要富含 DHA 的饮食配方^[32-33]。此外,摄入足够的 DHA 对非传染性疾病,如心血管疾病和癌症等都具有预防作用^[6]。传统 DHA 的主要来源是深海鱼油^[34],然而由于过度捕捞等因素,目前鱼油的来源正在减少,而且海洋污染导致鱼油的质量也在下降。因此,人们开始寻找 DHA 的可替代和可持续来源。饱和脂肪酸是生物柴油的重要来源^[22,24],生物柴油燃烧后对环境污染小,且安全性比化石燃料高,同时以微生物产油为原料的生物柴油来源更广泛^[8]。近年来,人们发现破囊壶菌中饱和脂肪酸和 DHA 的比重可分别占到总脂肪酸含量的 30%以上。Marchan 等^[7]对分离自澳大利亚的破囊壶菌提取多不饱和脂肪酸后,对剩余脂肪酸制备生物柴油的潜力进行了研究,结果表明这些剩余脂肪酸制备的生物柴油符合欧洲(EN 14214)和美国(ASTM D6751)生物柴油标准,说明这些菌株同时具有工业化生产 DHA 和生物柴油的潜力。Wang 等^[8]发现在生产饱和脂肪酸的最优条件下,两株破囊壶菌 *Schizochytrium* sp. PKU#Mn4 和 *Thraustochytriidae* sp. PKU#Mn16 的多不饱和脂肪酸可以占到总脂肪酸的 50%左右,进一步表明两株菌同时具有生产 DHA 和生物柴油的潜力。以上研究增强了人们对于工业化生产 DHA 废油的回收再利用意识,并且进一步提高了破囊壶菌的经济价值。

目前已知的破囊壶菌大体上可以分为 8 个属,各个属合成脂肪酸的产量和种类具有差异^[2]。其中, *Schizochytrium* 和 *Aurantiochytrium* 两个属的破囊壶菌细胞内脂肪酸的比重较高(>60%)^[35],具有

工业化生产脂肪酸的潜力,并且主要的脂肪酸成分是 DHA 和 C16:0,极具工业化应用潜力。Chen 等^[36]使用优化后的培养基发酵 *Schizochytrium* sp. S056 时,其饱和脂肪酸的最大产量达到 26 g/L, DHA 的产量达到 8.59 g/L; Lee Chang 等^[24]在分批补料的培养模式下发酵 *Aurantiochytrium* sp. TC20,其生物量达到 71 g/L,饱和脂肪酸产量达到 20 g/L; Yin 等^[16]利用廉价的碳源甘蔗糖蜜和氮源废藻渣将 *Schizochytrium* sp. HX-308 的生物量提高到 25 g/L,总脂肪酸的含量达到 5 g/L,具备了工业化生产的条件。然而,由于目前适用于工业化生产 DHA 和生物柴油的破囊壶菌菌株并不多,并且不同菌株的脂肪酸组成差异较大,因此筛选高产脂肪酸的破囊壶菌新菌株对于该类微生物的工业化应用具有重要意义。

2 破囊壶菌利用工农业废弃物的研究

葡萄糖和甘油是破囊壶菌最常用的碳源,酵母提取物(yeast extract, YE)、蛋白胨(peptone, Pep)和玉米浆是其最常用的氮源^[8,12,35]。然而,葡萄糖作为破囊壶菌生产脂肪酸的优良碳源,价格大约是 500 美金/t,有机氮源如酵母提取物,价格至少是葡萄糖的 5 倍,仅利用葡萄糖作为碳源的成本就占去了油脂生产总成本的 60%^[37]。因此在较长的一段时间内,由于原料成本过高,而不饱和脂肪酸如 DHA、EPA 等高附加值产物产量又较低,使得产值不足以弥补投入,进而严重制约了破囊壶菌的工业化进程^[14],所以寻求廉价的碳氮源成为了近几年的研究热点。近几年的研究发现,一些工农业废弃物含有丰富的碳、氮以及磷等营养物质^[38](表 1、2),而且微生物对其利用并不需要非常复杂的前处理过程^[37]。此外,在以这些废弃物作为底物的条件下,破囊壶菌的生物量和脂肪酸产量甚至高于其在传统的葡萄糖-酵母膏培养基下的产量,从而极大地节约了生产成本。因此,工农业废弃物可以作为破囊壶菌生产脂肪酸的极具潜力的营养源。

表 1 文献报道的破囊壶菌利用农业废弃物生产脂肪酸的研究

Table 1 Studies on the production of fatty acids from agricultural wastes by thraustochytrids reported in literature

菌株 Strains	碳源种类 Carbon source	氮源种类 Nitrogen source	生物量 Biomass (g/L)	总脂肪酸 Total FAs (g/L)	DHA (g/L)	参考文献 References
<i>Schizochytrium</i> sp. HX-308	甘蔗糖蜜 Cane molasses	藻渣 Algae-residue	25.54	5.21	2.080	[16]
<i>Schizochytrium</i> sp. BCRC33482	甘蔗渣 Sugarcane bagasse	蛋白胨+酵母提取物 Pep+YE	10.45	4.72	1.290	[17]
<i>Thraustochytrium</i> sp. CR01	玉米糖浆(7.5%) Corn syrup (7.5%)	蛋白胨+酵母提取物 Pep+YE	10.00	5.70	0.270	[13]
	糖蜜(3%) Molasses (3%)	蛋白胨+酵母提取物 Pep+YE	12.00	6.48	0.480	
	液体食糖(7.5%) Liquid sugar (7.5%)	蛋白胨+酵母提取物 Pep+YE	12.00	3.00	0.050	
	菊芋 Jerusalem artichoke	酵母提取物 YE	32.71	19.72	9.240	[39]
	面包屑(0.5%) Bread crumbs (0.5%)	蛋白胨+酵母提取物 Pep+YE	2.53	0.26	—	[40]
<i>Aurantiochytrium</i> sp. YLH70	面包屑(1%) Bread crumbs (1%)	蛋白胨+酵母提取物 Pep+YE	4.76	0.39	—	
	空棕榈果壳 Empty palm fruit bunches	酵母提取物 YE	34.40	12.50	5.400	[41]
	甜高粱秸秆汁(50%) Sweet sorghum juice (50%)	蛋白胨+酵母提取物 Pep+YE	9.38	6.86	2.350	[42]
<i>Schizochytrium limacinum</i> SR21	甜高粱秸秆汁(25%) Sweet sorghum juice (25%)	蛋白胨+酵母提取物 Pep+YE	8.97	4.95	1.750	
	甜高粱秸秆汁(25%) Sweet sorghum juice (25%)	蛋白胨+酵母提取物 Pep+YE				
<i>Schizochytrium mangrovei</i> SK-02	椰子汁(33%)+葡萄糖 Coconut water (33%)+glucose	酵母提取物 YE	28.60	14.12	5.500	[43]
	豆渣 Okara	豆渣 Okara	7.68	—	0.072	[44]

注: —: 未见报道.

Note: -: No reference.

2.1 糖类作为碳源的利用

糖类是促进破囊壶菌生长的重要碳源, 并且糖的种类和浓度对破囊壶菌的生长及代谢具有重要影响^[13,16,35]。糖类分为单糖、二糖及多糖等, 其中葡萄糖、果糖、半乳糖等属于单糖, 蔗糖、乳糖、麦芽糖则是典型的二糖, 多糖主要包括纤维素、木质素类物质以及淀粉等大分子化合物^[8]。破囊壶菌对单糖的利用效果最好, 尤其是葡萄糖^[16,42]。然而蔗糖、多糖等较大分子的糖由于无法透过破囊壶菌的细胞膜, 导致破囊壶菌无法直接利用这些大分子糖类; 而且蔗糖还会影响细胞正常的渗透压, 对细胞生长具有一定的抑制作用, 所以二糖及多糖类物质不适宜直接作为破囊

壶菌发酵的碳源^[16-17,43]。虽然破囊壶菌可以分泌一系列的胞外酶, 如纤维素酶、淀粉酶等^[23,30,48], 从而将纤维素、淀粉等多糖类物质分解为小分子化合物后再被自身利用, 然而胞外酶活性普遍不高的缺点限制了破囊壶菌对多糖类物质的直接利用。

2.1.1 单糖及二糖作为碳源的利用

葡萄糖和果糖等单糖是破囊壶菌的优良碳源^[8,12,17,35], 因此在寻找其替代碳源时, 物质中含有或者可以水解产生葡萄糖、果糖等单糖类是非常必要的。Uba 等^[13]研究了几种葡萄糖替代品(液体食糖、糖蜜、玉米糖浆)对破囊壶菌 *Thraustochytrium* sp. CR01 的生长和脂肪酸产量的影响, 结果表明这 3 种糖对破囊壶菌的生物量均没

表 2 文献报道的破囊壶菌利用工业废弃物生产脂肪酸的研究

Table 2 Studies on the production of fatty acids from industrial wastes by thraustochytrids reported in literature

菌株 Strains	碳源种类 Carbon source	氮源种类 Nitrogen source	生物量 Biomass (g/L)	总脂肪酸 Total FAs (g/L)	DHA (g/L)	参考文献 References
<i>Thraustochytridae</i> <i>kinney</i> VAL-B1	葡萄糖 Glucose	酵母提取物+谷氨酸钠+猪屠宰场废水 YE+MSG+piggery slaughterhouse wastewater	3.39	—	—	[45]
<i>Schizochytrium</i> sp. B4D1	葡萄糖 Glucose	丙氨酸母液+酵母提取物 Alanine mother liquor+YE	10.80	—	2.00	[18]
<i>Aurantiochytrium</i> sp. SD116	葡萄糖 Glucose	蛋白胨+酵母提取物+发酵废水 Pep+YE+fermentation wastewater	25.00	9.25	5.00	[19]
<i>Thraustochytrium</i> <i>kinney</i> VAL-B1	羽扇豆残渣 Lupine residue	酵母提取物+谷氨酸钠 YE+MSG	7.22	—	1.50	[20]
	发酵酒 Fermented wine	酵母提取物+谷氨酸钠 YE+MSG	2.72	—	0.36	
	甘油残渣 Residual glycerol	酵母提取物+谷氨酸钠 YE+MSG	6.54	—	2.29	
<i>Thraustochytrium</i> sp. S-3	废植物油+葡萄糖 Spent plant oil+glucose	酵母提取物+谷氨酸钠 YE+MSG	7.80	0.72	0.26	[12]
<i>Aurantiochytrium</i> sp. KRS101	甘油 Glycerol	废酵母 Spent yeast	31.80	12.11	4.14	[37]
<i>Schizochytrium</i> <i>limacinum</i> SR21	粗甘油+玉米渣 Crude glycerol+corn steep solid	蛋白胨+酵母提取物 Pep+YE	11.78	6.99	1.74	[46]
<i>Schizochytrium</i> <i>limacinum</i> SR21	葡萄糖 Glucose	海水养殖废水+酵母提取物 Marine aquaculture wastewater+YE	58.00	37.00	12.70	[47]

注: —: 未见报道。

Note: —: No reference.

有显著影响, 最大生物量均在 10 g/L 左右。Liang 等^[42]利用不同浓度的甜高粱秸秆汁作为底物发酵培养 *S. limacinum* SR21, 结果发现在 50% 甜高粱秸秆汁中, *S. limacinum* SR21 的生物量(9.4 g/L)与纯葡萄糖条件下的生物量(10.9 g/L)相差不大, 但总油脂和 DHA 的含量均增加了 15% 左右。Unagul 等^[43]利用破囊壶菌 *S. mangrovei* Sk-02 在添加了 33% 椰子汁的培养基中发酵生产 DHA 的研究表明, 添加了椰子汁与未添加椰子汁的初始葡萄糖培养基相比, *S. mangrovei* Sk-02 的生物量(28 g/L)和 DHA 产量(6 g/L)均提高了 50% 左右; 并且在不同种类的氮源条件下, 其生物量和 DHA 产量都提高了 2-3 倍。蔗糖虽然无法被破囊壶菌直接高效利用, 但是经过预处理后其利用效率明显提高。Yin 等^[16]直接使用甘蔗糖蜜培养破囊壶菌 *Schizochytrium* sp. HX-308 时发现, 甘蔗糖蜜中的某些细胞毒性物质对破囊壶菌的生长产生抑制作

用, 但甘蔗糖蜜经过酸解处理之后便可以破囊壶菌高效利用。这是由于蔗糖经酸解后产生的大量葡萄糖和果糖可以被破囊壶菌直接利用, 并且其中的细胞毒性物质被去除, 因此对蔗糖进行预处理是非常有必要的。由此可见破囊壶菌对糖种类具有选择性, 并且糖的种类也可以影响破囊壶菌的脂肪酸组成。

2.1.2 多糖类水解物作为碳源的利用

破囊壶菌利用多糖类农业废弃物生产高附加值代谢产物是近年来的研究热点。经过各种物理、化学或生物学方法的预处理, 纤维素类、淀粉等废弃物产生的大量小子单糖, 如葡萄糖、果糖、木糖、鼠李糖等^[17]可以作为破囊壶菌生产多不饱和脂肪酸的发酵底物, 从而将廉价、易得并且来源广泛的农业废弃物转化成具有较高经济价值的物质, 不仅可以降低生产成本, 并且有利于保护环境。Nguyen 等^[17]将甘蔗渣水解后产生的葡萄

糖和木糖用于 *Schizochytrium* sp. BCRC33482 的培养, 结果表明在甘蔗渣水解液培养条件下破囊壶菌的生物量(10.45 g/L)、油脂产量(4.72 g/L)以及多不饱和脂肪酸和 DHA (1.29 g/L)的含量, 均比在同浓度葡萄糖培养条件下(分别为 4、2 和 0.18 g/L)高, 由此可见甘蔗渣的水解产物可以为破囊壶菌发酵提供优良碳源。然而这些水解液成分往往比较复杂, 其中不仅包括能够促进破囊壶菌生长的糖类, 而且含有对其生长具有抑制性作用的物质。Yu 等^[39]将菊芋进行酸解, 并使用水解产生的果糖等替代葡萄糖培养破囊壶菌 *Aurantiochytrium* sp. YLH70, 结果发现在此条件下破囊壶菌的生物量、总油脂及 DHA 的产量都比在葡萄糖培养条件下高 10%左右, 而且 DHA 的相对含量达到 50%左右。Hong 等^[41]以空棕榈果串水解液作为破囊壶菌 *Aurantiochytrium* sp. KRS101 发酵底物的研究表明, 破囊壶菌能够产生较多的 DHA (5.4 g/L), 而且发酵前不需要对水解液进行脱毒处理。因此, 采取适当的预处理方法, 寻找能够被破囊壶菌高效利用的农业废弃物种类, 以及筛选具有优良特性的高耐受性破囊壶菌株, 对于破囊壶菌生产脂肪酸的工业化应用至关重要, 并且仍需要大量的研究和探索。

另外, 也有一些研究报道过利用破囊壶菌发酵固体多糖类底物的方法。Thyagarajan 等^[40]利用面包屑作为替代碳源培养 *Thraustochytrium* sp. AH-2 的研究表明, 无论是动态培养还是静态培养, 破囊壶菌生物量与总油脂含量均处于较低水平。相比于液体发酵底物, 在固体培养环境下破囊壶菌的生长受到某种程度的限制, 对固体发酵底物的利用效率较低。此外, 固体发酵底物会与菌体混合, 不利于后期破囊壶菌菌体的收集以及油脂的提取, 因此固体多糖类并不适合作为破囊壶菌大规模发酵的底物。

2.2 粗甘油作为碳源的利用

甘油也是破囊壶菌的优良碳源之一。粗甘油是生物柴油生产过程中的副产物^[49-50], 每生产

1 L 的生物柴油就会产生 80 g 的粗甘油^[28,51], 其产量正急剧上升。粗甘油的价格非常低, 大约是 0.022 美元/kg^[37], 几乎成了工业垃圾, 若不及时处理, 有可能会成为一种新污染源^[51], 因此开发粗甘油的新用途变得尤为关键^[50]。由于在制备生物柴油的过程中使用了催化剂, 导致粗甘油具有高盐度的特点^[28,49]。Lee Chang 等^[49]曾分析过粗甘油的成分, 包括 38.2% (质量体积比)的水、61.8% (质量体积比)的干物质、0.17% (质量体积比)的蛋白质、0.08% (质量体积比)的粗脂肪, 还有钙(0.01%, 质量体积比)、磷(0.1%, 质量体积比)、硫(1.4%, 质量体积比)、钠(1.4%, 质量体积比)等元素, 以及氯化物、氢氧化物等化合物和低浓度的甲醇, 真实的甘油比重只占粗甘油的 41% (质量体积比)。粗甘油具有高含盐量和丰富的元素组成等特点, 可以满足海洋微生物生长和发育的需求^[28], 因此也为粗甘油的合理利用开辟了一个新方向。

近年来, 科学家们将粗甘油的利用与破囊壶菌的发酵培养结合起来, 对粗甘油的应用潜力进行了探索。Chen 等^[36]对比葡萄糖与粗甘油用于发酵培养裂殖壶菌 *Schizochytrium* sp. S056 的研究发现, 粗甘油条件下的 DHA 产量要比葡萄糖条件下高 50%, 转录组分析表明, 当以粗甘油为发酵底物时, 糖酵解和与代谢相关的支链氨基酸(缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸)基因表达显著上调, 导致乙酰辅酶 A 的总体含量增加, 而乙酰辅酶 A 作为脂肪酸合成的前体物质可以促进脂肪酸的合成。此外, 参与糖异生、戊糖磷酸和柠檬酸循环通路的基因表达显著下调, 导致更多的乙酰辅酶 A 参与形成脂肪酸, 过量的乙酰辅酶 A 必然导致 DHA 等脂肪酸产量的上升。然而, 吴论文等^[51]在控制温度、溶氧及培养基其他成分相同的条件下培养裂殖壶菌, 发现随着粗甘油浓度的增加, 菌体油脂含量和脂肪酸组成没有显著的变化, 但菌体的生物量、油脂得率系数、生物量生产率和油脂生产率逐渐下降, 表明过高浓度的粗甘油对菌体的

生长具有抑制作用。Ethier 等^[46]利用粗甘油来培养破囊壶菌 *S. limacinum* SR21, 结果发现甘油浓度和稀释率影响菌体的生长和 DHA 的产量。因此选择适宜的甘油浓度是培养破囊壶菌生产脂肪酸过程中比较重要和关键的环节。另外, 在一些研究中也发现粗甘油中的杂质成分会抑制破囊壶菌的生长。Pyle 等^[50]探究了粗甘油中的杂质对破囊壶菌生物量和 DHA 产量的影响, 发现所有的粗甘油中都包含甲醇、肥皂及不同的元素(钙、磷、钾、硅、钠、锌)等, 其中甲醇和肥皂不利于 DHA 的合成; 同时提出了一些解决方案, 对于甲醇可以使用高温蒸发的方法去除, 对于肥皂可以使用 pH 调节沉淀的方法去除。Lee Chang 等^[49]利用粗甘油培养 8 个不同属的破囊壶菌菌株, 结果同样表明粗甘油中的杂质对破囊壶菌的生长具有抑制作用。因此粗甘油中杂质的去除是破囊壶菌高效利用粗甘油的重要前提。

除了以糖类和甘油用作替代碳源外, 盛哲良等^[12]也尝试以混合葵花籽油和橄榄油高温烹煮后的废弃油为研究对象, 比较了添加未烹煮前的植物油与烹煮后的废弃油对破囊壶菌 *Thraustochytrium* sp. S-3 的生长和脂肪酸组成的影响, 结果表明添加植物油和废弃油均能够明显促进破囊壶菌的生长, 生物量最高达到 8.8 g/L; 添加废弃植物油后, 破囊壶菌合成 DHA 等多不饱和脂肪酸的能力明显提升, 并且破囊壶菌的脂肪酸组成与植物油本身的脂肪酸组成之间呈明显的正相关, 比如加入植物油后破囊壶菌中增加的十八碳脂肪酸是植物油本身的主要脂肪酸, 但 DHA、EPA 等不饱和脂肪酸的相对含量有所下降, 这同样跟植物油的脂肪酸组成类似。因此, 通过改变底物中脂肪酸的组成, 可以利用破囊壶菌定向合成富含特定种类脂肪酸的油脂产物。因此, 寻找高含油量的廉价碳源替代物也是破囊壶菌发酵方面可以突破的一个方向。

2.3 可替代氮源的利用

关于可替代氮源的研究比较少, 然而为数不

多的研究表明, 破囊壶菌可以利用多种废弃物作为替代氮源。Yin 等^[16]证明了以海藻渣替代酵母提取物用于破囊壶菌 *Schizochytrium* sp. HX-308 发酵生产 DHA 的可行性。以海藻渣作为氮源, 在 50 L 发酵体系中 *Schizochytrium* sp. HX-308 的 DHA 产量达到 18.58 g/L; 同时使用海藻渣能够促进破囊壶菌对葡萄糖的利用, 并且与使用酵母提取物及谷氨酸钠作为氮源具有同样的效果^[16]。Ryu 等^[37]利用啤酒工业生产之后的废酵母液作为底物用于培养破囊壶菌 *Aurantiochytrium* sp. KRS101, 结果表明废酵母液有利于 DHA 的合成, DHA 含量可以占到总脂肪酸的 38.2%, 并且在逐步培养模式下其生物量可以达到 31.8 g/L。Xu 等^[18]将丙氨酸母液(丙氨酸生产中的工业废料)作为氮源用于培养 *Schizochytrium* sp. B4D1 时发现, 在稀释 100 倍的浓度下其最高生物量达到 12.5 g/L, 在稀释 150 倍的浓度下可以获得最高的 DHA 产量(2 g/L)。Fan 等^[44]研究了破囊壶菌利用豆渣合成 DHA 和 EPA 的能力, 结果表明破囊壶菌能够利用豆渣, 但 DHA 产量非常低(0.072 g/L)。由此进一步证明, 固体发酵底物不适合作为破囊壶菌大规模培养的发醇底物。

2.4 工业废料作为微量元素的应用

工业废料指的是在工业生产过程中所产生的一些废水和废液, 这些废水和废液中常含有工业生产的一些原材料、中间产物、副产品以及对环境有害的物质。化学性工业废水中含有大量的无机物、放射性物质以及重金属等^[38]; 生物性工业废水中会含有对人体有害的病原菌, 这些病原菌具有繁殖和扩散的能力, 对水体的污染非常严重。在海洋中, 破囊壶菌是以分解者的角色大量存在^[4], 他们具有广泛利用有机碳氮化合物作为营养物质的能力; 同时作为海洋微生物群的组成部分, 他们也有降解和利用碳氢化合物的能力^[3,52]。另外, 它们还被证明可以通过产生一系列胞外酶积极参与高难降解有机物的分解、清除和矿化^[21], 同时各种金属离子和微量元素也对破囊壶菌的生长具有促进作用^[12,53-55]。因此, 开发利用破囊壶菌的

降解功能不仅能够减轻工业垃圾对环境的不利影响,而且破囊壶菌还可以利用工业废料中的营养物质,降低其工业化生产脂肪酸的成本。

近年来有不少学者开始探究破囊壶菌利用工业废料的能力。Hipp 等^[45]利用破囊壶菌 *T. kinney* VAL-B1 的降解功能来处理屠宰行业产生的工业废水,结果显示废水中的大部分油脂和磷可以被分解掉,50%–60%的 COD、氮和铁元素也可以被利用掉,但工业废水的使用并不会明显提高破囊壶菌的生长和油脂积累。Song 等^[19]将破囊壶菌发酵过程中产生的废水多次循环用于破囊壶菌 *Aurantiochytrium* sp. SD116 的再培养,结果发现废水的使用能够影响该菌的生长,而对其脂肪酸组成影响不大。Jung 等^[47]利用海水养殖废水培养破囊壶菌 *S. limacinum* SR21,发现养殖废水的利用对破囊壶菌的生长影响不大,因此破囊壶菌可以用于工业废水的处理。其次,破囊壶菌可以分解利用固体废料。Silva 等^[20]研究了3种工农业废料(羽扇豆残渣、发酵酒、甘油残渣)对破囊壶菌 *T. kinney* VAL-B1 产脂肪酸能力的影响,发现使用甘油残渣获得的 DHA 产量最高(2.53 g/L),使用羽扇豆残渣获得的生物量最高(7.22 g/L)。虽然在对工业废料进行减毒处理之后,破囊壶菌可以利用其中的有机物、微量元素等营养物质合成脂肪酸,从而减轻工业废料对环境的危害。然而由于工业废料的成分复杂,并且具有一定的毒性,破囊壶菌的生长会受到不同程度的抑制。因此,开发工业废料的前处理技术以使其被破囊壶菌更加高效地利用也是一个值得探索的方向。

3 结论与展望

本文通过对破囊壶菌利用工农业废弃物生产脂肪酸的综述,大致总结了破囊壶菌的主要廉价原料,包括糖类碳源、粗甘油、高含氮废弃物及工业废水废液等。首先,富含糖类和粗甘油的工农业废弃物可以直接或者间接为破囊壶菌提供优良的碳源,是目前研究最多的可替代原料。

其次,工农业废弃物中的高含氮有机物通常具有高毒性,并且不容易被除去,所以目前对于破囊壶菌可替代氮源的研究并不深入。此外,破囊壶菌可以有效利用工农业废水中的无机盐和微量元素,并且多次循环使用的废水不会明显影响破囊壶菌的脂肪酸产量。

综上所述,很多工农业废弃物可以作为破囊壶菌发酵生产脂肪酸的优质原料,由此不仅可以极大地降低破囊壶菌工业化的成本,而且有利于节约资源和保护环境。然而,破囊壶菌对工农业废弃物利用效率普遍不高的问题始终是限制其应用的关键,这就要求我们不断探索新的废弃物预处理技术,以及寻找新的可被破囊壶菌高效利用的廉价原料来源。

REFERENCES

- [1] Liu Y, Singh P, Liang YM, et al. Abundance and molecular diversity of thraustochytrids in coastal waters of southern China[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2017, 93(6): fix070
- [2] Fossier Marchan L, Lee Chang KJ, Nichols PD, et al. Taxonomy, ecology and biotechnological applications of thraustochytrids: a review[J]. *Biotechnology Advances*, 2018, 36(1): 26-46
- [3] Singh P, Liu Y, Li LS, et al. Ecological dynamics and biotechnological implications of thraustochytrids from marine habitats[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(13): 5789-5805
- [4] Jaritkhuan S, Suanjit S. Species diversity and polyunsaturated fatty acid content of thraustochytrids from fallen mangrove leaves in Chon Buri province, Thailand[J]. *Agriculture and Natural Resources*, 2018, 52(1): 24-32
- [5] Kabilan C, Roy RK, Chadha A. Docosahexaenoic acid production by a novel high yielding strain of *Thraustochytrium* sp. of Indian origin: isolation and bioprocess optimization studies[J]. *Algal Research*, 2018, 32: 93-100
- [6] Wang XL, Wang H, Pierre JF, et al. Marine microalgae bioengineered *Schizochytrium* sp. meal hydrolysates inhibits acute inflammation[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 9848
- [7] Marchan LF, Lee Chang KJ, Nichols PD, et al. Screening of new British thraustochytrids isolates for docosahexaenoic acid (DHA) production[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2017, 29(6): 2831-2843
- [8] Wang QZ, Sen B, Liu XH, et al. Enhanced saturated fatty acids accumulation in cultures of newly-isolated strains of *Schizochytrium* sp. and *Thraustochytriidae* sp. for large-scale biodiesel production[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 631-632: 994-1004

- [9] Lee Chang KJ, Rye L, Dunstan GA, et al. Life cycle assessment: heterotrophic cultivation of thraustochytrids for biodiesel production[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2015, 27(2): 639-647
- [10] Chen W, Ma L, Zhou PP, et al. A novel feedstock for biodiesel production: the application of palmitic acid from *Schizochytrium*[J]. *Energy*, 2015, 86: 128-138
- [11] Lee Chang KJ, Dunstan GA, Abell G CJ, et al. Biodiscovery of new Australian thraustochytrids for production of biodiesel and long-chain omega-3 oils[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93(5): 2215-2231
- [12] Sheng ZL, Zhu S, Xu JL, et al. Effect of waste plant oil on the production of PUFA by *Thraustochytrium*[J]. *Journal of Ningbo University (Natural Science & Engineering Edition)*, 2017, 30(2): 6-10 (in Chinese)
盛哲良, 朱鹭, 徐继林, 等. 废弃植物油对破囊壶菌生产多不饱和脂肪酸的影响[J]. *宁波大学学报: 理工版*, 2017, 30(2): 6-10
- [13] Uba MO, Duabe KCP, Biene MACM, et al. Growth and fatty acid profile of *Thraustochytrium* sp. CR01 using different sugar substitutes[J]. *Philippine Journal of Science*, 2016, 145(4): 365-371
- [14] Chauton MS, Reitan KI, Norsker NH, et al. A techno-economic analysis of industrial production of marine microalgae as a source of EPA and DHA-rich raw material for aquafeed: research challenges and possibilities[J]. *Aquaculture*, 2015, 436: 95-103
- [15] Ludevese-Pascual G, Peña MD, Tornalejo J. Biomass production, proximate composition and fatty acid profile of the local marine thraustochytrid isolate, *Schizochytrium* sp. LEY7 using low-cost substrates at optimum culture conditions[J]. *Aquaculture Research*, 2016, 47(1): 318-328
- [16] Yin FW, Zhu SY, Guo DS, et al. Development of a strategy for the production of docosahexaenoic acid by *Schizochytrium* sp. from cane molasses and algae-residue[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 271: 118-124
- [17] Nguyen HC, Su CH, Yu YK, et al. Sugarcane bagasse as a novel carbon source for heterotrophic cultivation of oleaginous microalga *Schizochytrium* sp.[J]. *Industrial Crops and Products*, 2018, 121: 99-105
- [18] Xu J, Zhu YJ, Li HC, et al. Alanine mother liquor as a nitrogen source for docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp. B4D1[J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2018, 35: 10-17
- [19] Song XJ, Ma ZX, Tan YZ, et al. Wastewater recycling technology for fermentation in polyunsaturated fatty acid production[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 235: 79-86
- [20] Silva D, Villarroel MP, Roa AL, et al. Use of waste from agroindustrial sources as substrate for polyunsaturated fatty acids production by *Thraustochytrium kinney* VAL-B1[J]. *International Journal of Engineering Research in Africa*, 2017, 33: 50-55
- [21] Liu Y, Singh P, Sun Y, et al. Culturable diversity and biochemical features of thraustochytrids from coastal waters of Southern China[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(7): 3241-3255
- [22] Sitepu IR, Garay LA, Sestric R, et al. Oleaginous yeasts for biodiesel: current and future trends in biology and production[J]. *Biotechnology Advances*, 2014, 32(7): 1336-1360.
- [23] Gupta A, Singh D, Byreddy AR, et al. Exploring omega-3 fatty acids, enzymes and biodiesel producing thraustochytrids from Australian and Indian marine biodiversity[J]. *Biotechnology Journal*, 2016, 11(3): 345-355
- [24] Lee Chang KJ, Dumsday G, Nichols PD, et al. High cell density cultivation of a novel *Aurantiochytrium* sp. strain TC 20 in a fed-batch system using glycerol to produce feedstock for biodiesel and omega-3 oils[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(15): 6907-6918
- [25] Béligon V, Christophe G, Fontanille P, et al. Microbial lipids as potential source to food supplements[J]. *Current Opinion in Food Science*, 2016, 7: 35-42
- [26] Mavrommatis A, Chronopoulou EG, Sotirakoglou K, et al. The impact of the dietary supplementation level with *Schizochytrium* sp. on the oxidative capacity of both goats' organism and milk[J]. *Livestock Science*, 2018, 218: 37-43
- [27] Sahin D, Altindag UH, Tas E. Enhancement of docosahexaenoic acid (DHA) and beta-carotene production in *Schizochytrium* sp. using symbiotic relationship with *Rhodotorula glutinis*[J]. *Process Biochemistry*, 2018, 75: 10-15
- [28] Bindea M, Rusu B, Rusu A, et al. Valorification of crude glycerol for pure fractions of docosahexaenoic acid and β -carotene production by using *Schizochytrium limacinum* and *Blakeslea trispora*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17(1): 97
- [29] Hoang LAT, Nguyen HC, Le TT, et al. Different fermentation strategies by *Schizochytrium mangrovei* strain pq6 to produce feedstock for exploitation of squalene and omega-3 fatty acids[J]. *Journal of Phycology*, 2018, 54(4): 550-556
- [30] Byreddy AR. Thraustochytrids as an alternative source of omega-3 fatty acids, carotenoids and enzymes[J]. *Lipid Technology*, 2016, 28(3/4): 68-70
- [31] Samuelsen TA, Oterhals Å, Kousoulaki K. High lipid microalgae (*Schizochytrium* sp.) inclusion as a sustainable source of n-3 long-chain PUFA in fish feed — effects on the extrusion process and physical pellet quality[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2018, 236: 14-28
- [32] Ramos-Vega A, Rosales-Mendoza S, Bañuelos-Hernández B, et al. Prospects on the use of *Schizochytrium* sp. to develop oral vaccines[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2506
- [33] Wang H, Zhang HJ, Wang XC, et al. Dietary choline and phospholipid supplementation enhanced docosahexaenoic acid enrichment in egg yolk of laying hens fed a 2% *Schizochytrium* powder-added diet[J]. *Poultry Science*, 2017, 96(8): 2786-2794
- [34] Lopes PA, Bandarra NM, Martins SV, et al. Markers of

- neuroprotection of combined EPA and DHA provided by fish oil are higher than those of EPA (*Nannochloropsis*) and DHA (*Schizochytrium*) from microalgae oils in Wistar rats[J]. *Nutrition & Metabolism*, 2017, 14(1): 62
- [35] Zhang AQ, Xie YX, He YD, et al. Bio-based squalene production by *Aurantiochytrium* sp. through optimization of culture conditions, and elucidation of the putative biosynthetic pathway genes[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 287: 121415
- [36] Chen W, Zhou PP, Zhang M, et al. Transcriptome analysis reveals that up-regulation of the fatty acid synthase gene promotes the accumulation of docosahexaenoic acid in *Schizochytrium* sp. S056 when glycerol is used[J]. *Algal Research*, 2016, 15: 83-92
- [37] Ryu BG, Kim K, Kim J, et al. Use of organic waste from the brewery industry for high-density cultivation of the docosahexaenoic acid-rich microalga, *Aurantiochytrium* sp. KRS101[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 129(2): 351-359
- [38] Leong HY, Su CA, Lee BS, et al. Development of *Aurantiochytrium limacinum* SR21 cultivation using salt-rich waste feedstock for docosahexaenoic acid production and application of natural colourant in food product[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 271: 30-36
- [39] Yu XJ, Liu JH, Sun J, et al. Docosahexaenoic acid production from the acidic hydrolysate of Jerusalem artichoke by an efficient sugar-utilizing *Aurantiochytrium* sp. YLH70[J]. *Industrial Crops and Products*, 2016, 83: 372-378
- [40] Thyagarajan T, Puri M, Vongsvivut J, et al. Evaluation of bread crumbs as a potential carbon source for the growth of thraustochytrid species for oil and omega-3 production[J]. *Nutrients*, 2014, 6(5): 2104-2114
- [41] Hong WK, Yu AN, Heo SY, et al. Production of lipids containing high levels of docosahexaenoic acid from empty palm fruit bunches by *Aurantiochytrium* sp. KRS101[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2013, 36(7): 959-963
- [42] Liang YN, Sarkany N, Cui Y, et al. Use of sweet sorghum juice for lipid production by *Schizochytrium limacinum* SR21[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(10): 3623-3627
- [43] Unagul P, Assantachai C, Phadungruengluij S, et al. Coconut water as a medium additive for the production of docosahexaenoic acid (C22:6 n3) by *Schizochytrium mangrovei* Sk-02[J]. *Bioresource Technology*, 2007, 98(2): 281-287
- [44] Fan KW, Chen F, Jones EBG, et al. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids production by and okara-utilizing potential of thraustochytrids[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2001, 27(4): 199-202
- [45] Hipp MPV, Rodríguez DS. Bioremediation of piggery slaughterhouse wastewater using the marine protist, *Thraustochytrium kinney* VAL-B1[J]. *Journal of Advanced Research*, 2018, 12: 21-26
- [46] Ethier S, Woisard K, Vaughan D, et al. Continuous culture of the microalgae *Schizochytrium limacinum* on biodiesel-derived crude glycerol for producing docosahexaenoic acid[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(1): 88-93
- [47] Jung IS, Lovitt RW. Integrated production of long chain polyunsaturated fatty acids (PUFA)-rich *Schizochytrium* biomass using a nutrient supplemented marine aquaculture wastewater[J]. *Aquacultural Engineering*, 2010, 43(2): 51-61
- [48] Taoka Y, Nagano N, Okita Y, et al. Extracellular enzymes produced by marine eukaryotes, thraustochytrids[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2009, 73(1): 180-182
- [49] Lee Chang KJ, Paul H, Nichols PD, et al. Australian thraustochytrids: potential production of dietary long-chain omega-3 oils using crude glycerol[J]. *Journal of Functional Foods*, 2015, 19: 810-820
- [50] Pyle DJ, Garcia RA, Wen ZY. Producing docosahexaenoic acid (DHA)-rich algae from biodiesel-derived crude glycerol: effects of impurities on DHA production and algal biomass composition[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(11): 3933-3939
- [51] Wu LW, Yang MH, Yao Y, et al. Effect of concentration of crude glycerol as biodiesel byproduct on the growth and lipid accumulation of *Schizochytrium* sp. WZU 6961[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2015, 41(5): 30-34 (in Chinese)
吴论文, 杨美慧, 姚瑶, 等. 生物柴油副产品粗甘油浓度对裂殖壶菌生长与积累油脂的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2015, 41(5): 30-34
- [52] Raikar MT, Raghukumar S, Vani V, et al. Thraustochytrid protists degrade hydrocarbons[J]. *Indian Journal of Marine Sciences*, 2001, 30: 139-145
- [53] Wang K, Sun T, Cui JY, et al. Screening of chemical modulators for lipid accumulation in *Schizochytrium* sp. S31[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 260: 124-129
- [54] Tani N, Yoneda K, Suzuki I. The effect of thiamine on the growth and fatty acid content of *Aurantiochytrium* sp.[J]. *Algal Research*, 2018, 36: 57-66
- [55] Sun XM, Ren LJ, Ji XJ, et al. Enhancing biomass and lipid accumulation in the microalgae *Schizochytrium* sp. by addition of fulvic acid and EDTA[J]. *AMB Express*, 2018, 8(1): 150