

玉米酒糟离心上清液发酵产单细胞蛋白的工艺优化

王继艳^{1*}, 刘 霄², 张 钧³, 宁艳春¹, 惠继星¹, 徐友海¹

(1. 中国石油吉林石化公司研究院, 吉林 吉林 132021; 2. 吉林燃料乙醇有限公司, 吉林 吉林 132021; 3. 中国石油吉林石化公司仓储中心, 吉林 吉林 132021)

摘要:利用中心组合响应面法优化了以玉米酒糟离心上清液为原料、产朊假丝酵母为菌种发酵生产单细胞蛋白的工艺。首先通过单因素优化法优化了培养条件, 采用 Plackett-Burman (PB) 设计试验筛选出影响发酵效果的显著性因素, 再通过响应面优化试验确定最优条件。试验结果表明, 采用廉价易得的碳氮源玉米糖化醪及尿素, 最优培养基组成为糖化醪体积分数为 17%, $\rho(\text{尿素}) = 0.8 \text{ g/L}$; 在最优条件下开展了 3.7 L 发酵罐流加发酵试验, 发酵液中粗蛋白干基质量分数达到 29.4%, 较发酵前提高 38.0%。

关键词:离心上清液; 产朊假丝酵母; 单细胞蛋白; 中心组合响应面优化法

中图分类号: TQ920.9

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2018)10-0148-06

DOI: 10.16606/j.cnki.issn.0253-4320.2018.10.033

Process optimization of single cell protein production through fermentation of upper serum of centrifugalized corn distiller's grains

WANG Ji-yan^{1*}, LIU Xiao², ZHANG Jun³, NING Yan-chun¹, HUI Ji-xing¹, XU You-hai¹

(1. Research Institute of PetroChina Jilin Petrochemical Company, Jilin 132021, China;

2. Jilin Fuel Alcohol Company Limited, Jilin 132021, China;

3. Storage Center, PetroChina Jilin Petrochemical Company, Jilin 132021, China)

Abstract: CCD-RSM (central composite design-response surface methodology) design is applied to optimize the production process for single cell protein by using upper serum of centrifugalized corn distiller's grains as raw material and *Candida utilis* as strain. Firstly, the cultural conditions are optimized by single factor optimization method. Secondly, the significant factors that affect fermentation effect are screened by Plackett-Burman design test. Finally, the optimal conditions are determined through CCD-RSM design test. The result suggests that the optimum culture matrix composes 17% volume fraction of saccharification liquor and $0.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ of urea when cheap and available saccharification liquor and urea are used as the source of carbon and nitrogen, respectively. Under the optimal conditions, fed-batch fermentation experiment is conducted in a 3.7 L fermenting tank. The result reveals that the mass fraction of crude protein in fermentation liquid reaches 29.4%, an increase of 38.0% comparing with that before fermentation.

Key words: upper serum of centrifugalized corn distiller's grains; *Candida utilis*; single cell protein; central composite design-response surface methodology

玉米酒糟是一种营养价值很高的蛋白质饲料^[1], 玉米酒糟离心上清液是酒糟经离心分离后得到的上清液, 酸度高、黏度大、组成成分复杂, 是一种高浓度有机废水^[2], 不含重金属元素和有毒物, 根据储存条件的不同易快速发生分解^[3], 若直接当作废弃物排放, 不仅造成资源的极大浪费, 也对环境产生污染^[4-5]。同时, 离心上清液中粗蛋白干基质量分数为 16%~20%, 远低于玉米酒糟饲料 DDGS (质量分数为 26%~28%), 若将其直接用于生产 DDGS, 必定降低 DDGS 的蛋白含量, 可通过发酵的方式提

高离心上清液中的蛋白含量, 进而提升 DDGS 的品质^[6]。因此, 离心上清液发酵生产高蛋白饲料对于玉米乙醇工业具有重要意义。

产朊假丝酵母具有较强的将无机氮转化为有机氮的能力, 并且在其发酵过程中会产生大量的生物活性物质^[7-8], 因此, 产朊假丝酵母广泛用于单细胞蛋白饲料行业, 具有广阔的应用前景^[9]。笔者以玉米酒精工业副产物—离心上清液为原料, 产朊假丝酵母为菌种发酵生产单细胞蛋白^[10-11], 采用 Plackett-Burman (PB) 设计试验筛选出影响发酵效

收稿日期: 2018-01-29; 修回日期: 2018-08-07

作者简介: 王继艳 (1988-), 女, 硕士, 工程师, 主要从事燃料乙醇领域研发工作, 通讯联系人, jh_wangiy@petrochina.com.cn。

果的显著性因素,再通过中心组合响应面法优化试验并确定最优条件^[12-16],以期为离心上清液生产单细胞蛋白提供试验依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

离心上清液、玉米糖化醪(葡萄糖质量浓度为215 g/L),吉林燃料乙醇有限公司生产;肮假丝酵母,中国工业微生物菌种保藏管理中心生产,保存条件为4℃;蛋白胨、酵母粉为生化试剂;葡萄糖、尿素、磷酸氢二铵均为分析纯;平面培养基:葡萄糖20 g/L、蛋白胨20 g/L、酵母粉10 g/L、琼脂20 g/L;种子培养基:葡萄糖20 g/L、蛋白胨20 g/L、酵母粉10 g/L。

1.2 仪器与设备

恒温恒湿培养箱:HWS-250型;超净工作台:SW-CJ-1FD型;离心机:Anke TGL-16G型;凯氏定氮仪:K12A型;高压灭菌锅:3870ELVC-D型;生物传感分析仪:SBA-40X型;3.7 L发酵罐:比欧3.7 L四联罐。

1.3 方 法

1.3.1 分析方法

(1)粗蛋白含量的测定。粗蛋白含量采用凯氏定氮法进行测定^[17]。

(2)真蛋白含量的测定。取30 mL发酵液,于10 000 r/min下离心5 min,离心所得菌体用蒸馏水洗涤3次后于65℃下烘干至恒重。烘干部分采用凯氏定氮法测定其蛋白含量。

(3)菌体浓度的测定。在单因素优化生产肮假丝酵母培养条件试验时,采用比浊法测定发酵液中的菌体浓度^[18]。

产单细胞蛋白的性能指标计算式为:

$$\text{容积生产率} = \text{菌体浓度} / \text{发酵时间} (\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}) \quad (1)$$

单位碳源菌体产出量计算式为:

$$\text{单位碳源菌体产出量} =$$

$$\text{菌体量} / \text{碳源消耗量} (\text{g 菌体} / \text{g 碳源}) \quad (2)$$

1.3.2 试验方法

(1)单因素优化培养条件。采用单因素试验的方法考察产肮假丝酵母在不同条件下的发酵效果,各因素的水平梯度设置分别为:发酵时间为15、24、33、38、45 h;发酵温度为26、28、30、32、34℃;培养基初始pH为3.5、4.5、5.5、6.5、7,接种量(体积分数)为2%、5%、10%、15%、20%;摇床转速为100、150、180、200、230 r/min^[19]。

(2)优化碳源与氮源质量比。在单因素优化得到的培养条件下,对培养基中的葡萄糖及蛋白胨质量比(1:1、3:1、5:1、8:1、9:1)进行优化。

(3)响应面法优化发酵工艺条件。在上述产肮假丝酵母培养条件及培养基碳源与氮源质量比优化的基础上,用糖化醪(葡萄糖质量浓度为230 g/L)提供碳源,采用响应面法并依据Plackett-Burman(PB)试验原理设计7因素2水平试验,显著性因素筛选试验因素水平如表1所示。

表1 显著性因素筛选试验设计

因素水平	+1	-1
固含量/%	5.5	11.0
糖化醪体积分数/%	10	30
ρ (葡萄糖)/(g·L ⁻¹)	20	60
ρ (磷酸氢二铵)/(g·L ⁻¹)	5	15
ρ (尿素)/(g·L ⁻¹)	2.5	7.5
pH	4	6.5
接种量/%	2	10
温度/℃	25	32

(上接第147页)

- [10] Zou G, Jing D, Zhong W, *et al.* A novel route for preparation of Mn-containing hollow framework TS-1, and its selective allylic oxidation of cyclohexene[J]. *Rsc Advances*, 2016, 6(5): 3729-3734.
- [11] Ji-Cheng Z, Xiang-Sheng W. Novel method for synthesis of titanium silicalite-1 (TS-1) [J]. *Chinese Journal of Chemistry*, 2000, 18(1): 42-48.
- [12] Bordiga S, Damin A, Berlier G, *et al.* The role of isolated sites in heterogeneous catalysis: Characterization and modeling[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2001, 2(5): 167-182.
- [13] Jorda E, Tuel A, Teissier R, *et al.* TiF₄: An original and very interesting precursor to the synthesis of titanium containing silicalite-1 [J]. *Zeolites*, 1997, 19(4): 238-245.
- [14] 李钢,王祥生,王丽琴,等.两种钛硅分子筛合成体系的比较

[J]. *石油学报(石油加工)*, 2003, 19(4): 76-81.

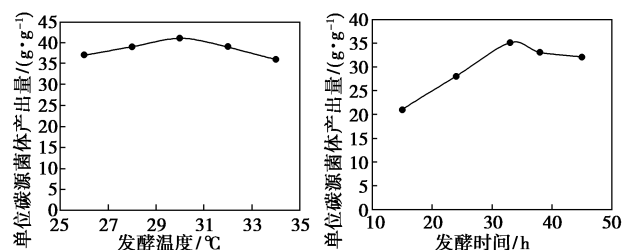
- [15] Ke X, Xu L, Zeng C, *et al.* Synthesis of mesoporous TS-1 by hydrothermal and steam-assisted dry gel conversion techniques with the aid of triethanolamine[J]. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2007, 106(1-3): 68-75.
- [16] Kerr G T. Chemistry of crystalline aluminosilicates. I. Factors affecting the formation of zeolite A [J]. *Journal Physical Chemistry*, 1966, 70: 1047-1050.
- [17] Hoebbel D, Garzó G, Engelhardt G, *et al.* Über die Silicatanionenkonstitution in tetraethylammoniumsilicaten und ihren wäßrigen Lösungen[J]. *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie*, 1980, 465(1): 15-33.
- [18] Feijen E J P, Martens J A, Jacobs P A. Zeolites and related microporous materials; State of the art [J]. *Studies in Surface Science and Catalysis*, 1994, 84: 3-21. ■

(4)3.7 L 发酵罐试验。利用 3.7 L 发酵罐,采用流加糖化醪清液的方式,在优化得到的最佳条件下开展产朊假丝酵母发酵产单细胞蛋白 3.7 L 发酵罐试验。

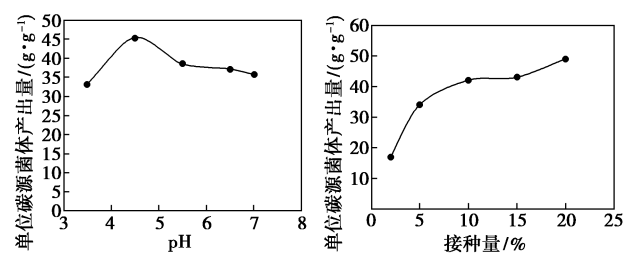
2 结果与分析

2.1 单因素培养条件的优化

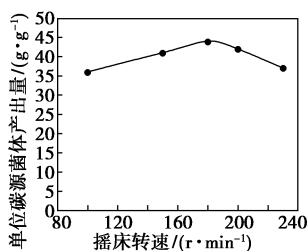
以单位碳源菌体产出量为评价指标,产朊假丝酵母在不同发酵时间、发酵温度、培养基中初始 pH、接种量、摇床转速条件下的发酵效果如图 1 所示。



(a) 发酵温度对发酵效果的影响 (b) 发酵时间对发酵效果的影响



(c) pH 对发酵效果的影响 (d) 接种量对发酵效果的影响



(e) 摇床转速对发酵效果的影响

图 1 单因素对产朊假丝酵母发酵效果的影响

图 1(a)中可以看出,当温度为 30℃时,单位碳源菌体产出量达到最大。因此,选择发酵温度为 30℃。从图 1(b)中可以看出,发酵至 33 h 左右葡萄糖消耗殆尽,到达发酵终点,由于营养的不足,生长环境逐渐恶劣,在这之后菌体浓度不再增加,故最佳发酵时间在 33 h 左右。由从图 1(c)中可以看出,在 pH 为 4.5 时的菌体浓度最高,因此,选择初始 pH 为 4.5。从图 1(d)中可以看出,当接种量大于 10% (体积分数) 时,增加速率放缓,同时较高的接种量会增加成本的投入;接种量过低,菌体生长缓

慢,发酵时间延长。综合考虑,接种量为 10% (体积分数) 时发酵效果最好。从图 1(e)中可以看出,摇床转速为 180 r/min 时,单位碳源菌体产出量最大,因此最佳转速为 180 r/min。

2.2 碳源与氮源质量比的优化

产朊假丝酵母在培养基中首先利用葡萄糖^[20],结合吉林燃料乙醇有限公司的生产装置,以糖化醪(葡萄糖质量浓度为 230 g/L)为碳源最为经济、合理,选择有机氮源蛋白胨为氮源^[21],产朊假丝酵母在不同碳源与氮源质量比培养基中的发酵性能如表 2 所示。

表 2 产朊假丝酵母在不同碳源与氮源质量比培养基中的发酵性能

编号	1	2	3	4	5
碳源与氮源质量比	1:1	3:1	5:1	8:1	9:1
菌体质量浓度/(g·L ⁻¹)	21.18	29.39	35.15	46.03	49.94
容积生产率/(g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	1.41	1.40	0.95	0.73	0.70
单位碳源菌体产出量/[g(菌体)·g(碳源) ⁻¹]	1.06	0.48	0.35	0.28	0.25

由表 2 可以看出,碳源与氮源质量比高的培养基中产朊假丝酵母的生长更旺盛,菌体质量浓度逐渐增加,但容积生产率及单位碳源菌体产出量却依次降低。这是由于高碳源与氮源质量比(葡萄糖质量浓度高)抑制酵母的生长或者酵母消耗的碳源没有完全用于菌体生长,而是代谢了其他副产物。因此,低的碳源与氮源质量比适于产朊假丝酵母菌体的积累,培养基中适宜的碳源与氮源质量比为 1:1。

2.3 响应面法优化发酵工艺条件

2.3.1 筛选显著性因素

在单因素试验基础上,利用 PB 设计筛选出显著性因素,以单位碳源菌体产出量为响应值,利用 Minitab15 软件完成分析因子设计。试验结果如表 3 所示,各因素的系数估计和效应评价如表 4 所示。

表 3 PB 试验设计结果

序号	1	2	3	4	5	6
单位碳源菌体产出量/(g·g ⁻¹)	0.51	0.78	0.25	0.28	0.90	0.37
序号	7	8	9	10	11	12
单位碳源菌体产出量/(g·g ⁻¹)	0.33	0.71	0.72	0.61	0.45	0.36

表 4 各因素的系数估计和效应评价

项目	系数标准误差	T 检验	P
常量	0.0275	19.03	0.000
糖化醪体积分数	0.0275	-6.61	0.003
磷酸氢二铵	0.0275	2.69	0.055
固含量	0.0275	-0.83	0.455
尿素	0.0275	0.60	0.582
pH	0.0275	0.47	0.664
接种量	0.0275	-0.28	0.792
温度	0.0275	0.17	0.871

由表 4 可以看出,在所考察的 7 个因素中,只有糖化醪体积分数的 P 值小于 0.05 (P 为 0.003),说明糖化醪体积分数是影响产朊假丝酵母发酵生产单细胞蛋白的显著性因素。此外,考虑到发酵过程不仅需要 C 源,还需要 N、P 等微量元素,因此,在糖化醪体积分数为显著性因素的条件下,还需进一步对磷酸氢二铵、尿素 2 种物质的浓度进行优化,以确定发酵培养基的最佳组成。

2.3.2 响应面优化发酵培养基组成

采用中心组合响应面法对发酵培养基的组成进行优化,首先确定糖化醪体积分数 ρ (磷酸氢二铵)及 ρ (尿素)的中心点及步长,进行最陡爬坡试验,以发酵前后真蛋白质量分数的增加率为指标,试验设计及结果如表 5 所示。

表 5 试验设计及结果

实验序号	1	2	3	4	5
三因素设计实际组合					
糖化醪体积分数/%	1	6	11	16	20
ρ (磷酸氢二铵)/(g·L ⁻¹)	0.00	0.80	1.50	2.00	2.50
ρ (尿素)/(g·L ⁻¹)	0.00	0.40	0.75	1.00	1.40
发酵前真蛋白干基质量分数/%	6.86	8.04	9.23	10.19	11.11
发酵后真蛋白干基质量分数/%	11.49	14.91	17.50	17.80	20.39
发酵前后真蛋白质量分数增加率/%	67.42	85.41	89.58	74.70	83.53

由表 5 可以看出,试验 3 发酵前后真蛋白质量分数增加率最大,以试验 3 的条件作为响应面因素水平的中心点,即糖化醪体积分数 11%、 ρ (磷酸氢二铵)=1.5 g/L、 ρ (尿素)=0.75 g/L,步长依次取 5%、0.50 g/L、0.40 g/L。

2.3.3 响应面模型可靠性分析

根据最陡爬坡试验确定的中心点及步长进行了 3 因素 [糖化醪体积分数 X_1 、 ρ (磷酸氢二铵) X_2 、

ρ (尿素) X_3] 5 水平 (-1.68、-1.0、1、1.68),以真蛋白质量分数增加率为响应值 (Y) 的中心组合响应面优化试验,回归模型系数的显著性检验及方差分析结果分别如表 6、表 7 所示。

表 6 回归模型系数的显著性检验

项目	系数	系数标准误差	T 值	P 值
常量	101.285	6.455	15.691	0.000
X_1	19.029	4.283	4.443	0.001
X_2	0.744	4.283	0.174	0.866
X_3	-3.809	4.283	-0.889	0.395
X_1^2	-15.154	4.169	-3.635	0.005
X_2^2	3.195	4.169	0.766	0.461
X_3^2	-3.884	4.169	-0.932	0.373
X_1X_2	1.571	5.596	0.281	0.785
X_1X_3	0.160	5.596	0.029	0.978
X_2X_3	0.525	5.596	0.094	0.927

表 7 回归模型的方差分析

项目	自由度	总离差平方和	相关系数	F 值	P 值
模型	9	8919.2	991.03	3.96	0.022
线性项	3	5151.1	1716.99	6.85	0.009
平方项	3	3746.1	1248.70	4.99	0.023
交互项	3	22.2	7.39	0.03	0.993
残差误差项	10	2504.8	250.48	—	—
失拟项	5	2482.8	496.56	112.78	0.000
纯误差项	5	22.0	4.40	—	—

由表 6 可以看出,3 个变量中只有 X_1 (糖化醪体积分数)的 P 值 < 0.05,表明其为影响发酵效果的显著性因素,与之前的 PB 设计结果相一致。经二次回归拟合得到的回归方程为: $Y = 101.28 + 19.03X_1 + 0.74X_2 - 3.81X_3 - 15.15X_{12} + 3.19X_{22} - 3.88X_{32} + 1.57X_1X_2 + 0.16X_1X_3 + 0.52X_2X_3$ 。

表 7 中模型的 P 值 < 0.05,说明该模型显著,可以用于试验结果的预测。利用回归方程得到的预测值与实际值的拟合情况如图 2 所示。由图 2 可以看

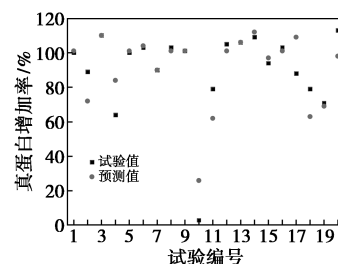


图 2 回归方程拟合值与实际值对比

出,只有个别条件下回归方程的预测值与实际值存在偏差,大部分条件拟合性较好,表明该回归方式选择合适。

2.3.4 二次交互项分析

利用 Statistic 6.0 软件对试验结果进行响应面分析,结果如图 3~图 5 所示。

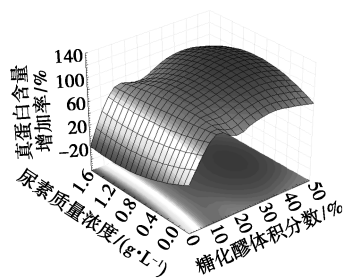


图 3 尿素质量浓度和糖化醪体积分数对真蛋白质量分数增加率的影响

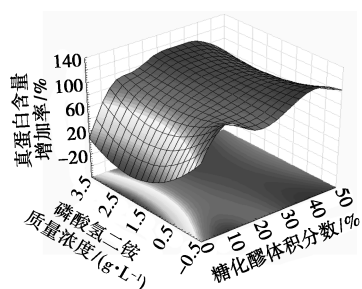


图 4 磷酸氢二铵质量浓度和糖化醪体积分数对真蛋白质量分数增加率的影响

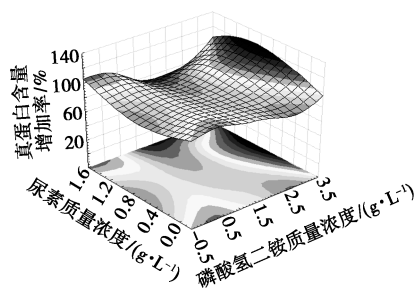


图 5 尿素质量浓度和磷酸氢二铵质量浓度对真蛋白质量分数增加率的影响

由图 3 可以看出,糖化醪体积分数与 ρ (尿素)的响应面图呈椭圆形,两者的交互作用较明显,由等高线确定糖化醪体积分数的最佳水平为 17%, ρ (尿素)的最佳水平为 0.8 g/L。由图 4、图 5 中可以看出,糖化醪体积分数和 ρ (磷酸氢二铵)以及 ρ (尿素)和 ρ (磷酸氢二铵)交互作用不明显,因此培养基中可不用加入磷酸氢二铵。

2.3.5 最优点验证及稳定试验

在上述中心组合响应面优化试验得到的最佳

糖化醪体积分数及 ρ (尿素)的基础上,在最优条件附近选择试验点开展验证试验,试验结果如表 8 所示。

表 8 试验条件及结果

编号	1	2	3	4	5	6
糖化醪体积分数/%	0	2	5	7	17	24
ρ (尿素)/(g·L ⁻¹)	0	0.2	0.3	0.5	0.8	1.2
发酵前真蛋白干基质量分数/%	7.61	7.92	8.10	8.35	8.67	9.01
发酵后真蛋白干基质量分数/%	9.97	11.83	13.36	14.16	15.52	16.11
发酵前后真蛋白质质量分数增加率/%	31.01	49.37	64.94	69.58	79.01	78.80

由表 8 可以看出,随着培养基中糖化醪体积分数及 ρ (尿素)的逐渐增加,发酵液中真蛋白质量分数逐渐增加。当糖化醪体积分数为 17%、尿素质量浓度为 0.8 g/L 时,发酵前后发酵液中真蛋白质量分数增加率达到最大,将培养基 35% 的无机氮转化为可消化氮,真蛋白质量分数增加率最大,若进一步降低糖的质量浓度,蛋白质量分数将达不到要求;表明在此条件下,营养物质的转化率最高,菌体增加量最大,发酵效果最好,与中心组合响应面优化结果一致。

在糖化醪体积分数为 17%、尿素质量浓度为 0.8 g/L 的条件下,进行了 3 批次的稳定试验,结果如表 9 所示。

表 9 试验结果

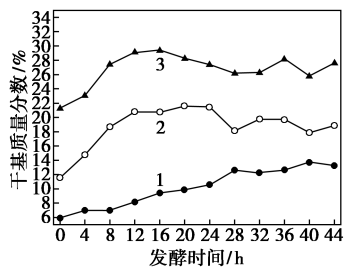
编号	1	2	3	平均值
发酵后粗蛋白干基质量分数/%	27.80	25.63	26.01	26.48
发酵前真蛋白干基质量分数/%	8.42	7.55	7.12	7.70
发酵后真蛋白干基质量分数/%	16.46	18.44	17.68	17.53
真蛋白质量分数增加率/%	95.53	144.09	148.52	129.38

由表 9 可以看出,由于分析误差导致稳定试验中蛋白质量分数较之前所测数据整体偏低,但均在误差范围之内。当糖化醪体积分数为 17%、尿素质量浓度为 0.8 g/L 时,发酵产物中平均粗蛋白干基质量分数为 26.48%,满足 DDGS 产品蛋白质质量分数的要求,平均真蛋白质量分数由离心上清液中的 7.70% 增加到 17.53%,效果显著。

2.4 3.7 L 发酵罐流加发酵试验

以离心上清液为原料、糖化醪上清液为碳源,开

展产朊假丝酵母流加发酵 3.7 L 规模试验, 试验条件为: 发酵液初糖质量浓度为 15 g/L、糖化醪离心清液体积分数为 7.0%、尿素质量浓度为 0.8 g/L、初始 pH 为 4.5、发酵温度为 30℃、初始 pH 为 4.5、接种体积分数为 10%、搅拌转速为 400 r/min, 试验结果如图 6 所示。



1—固含量;2—蛋白;3—粗蛋白

图 6 发酵液中各成分质量分数随发酵时间的变化情况

由图 6 可以看出, 在产朊假丝酵母流加发酵过程中, 发酵液中粗蛋白干基质量分数随着发酵时间的延长先升高后降低; 发酵液固含量随着发酵时间的延长而缓慢上升。发酵前离心上清液中粗蛋白干基质量分数为 21.3%, 真蛋白干基质量分数为 11.5%; 发酵 16 h, 消耗糖化醪 3 650 g, 发酵液中粗蛋白干基质量分数达到 29.4%, 真蛋白干基质量分数达到 20.7%, 发酵后粗蛋白质量分数较发酵前提高 38.0%, 真蛋白较发酵前提高 80%。

3 结论

通过开展产朊假丝酵母摇瓶培养优化试验, 对产朊假丝酵母的培养条件、种子培养基组成, 以及产朊假丝酵母发酵离心上清液的发酵工艺条件、发酵培养基组成进行了系统的优化, 得到产朊假丝酵母发酵工艺条件为: 发酵温度为 30℃, pH 为 4.5, 接种体积分数为 10%, 摇床转速为 180 r/min, 蛋白质量分数为 25.63% (干基质量分数), 较原料中粗蛋白质量分数提高 33.8%。

通过 PB 试验设计筛选出影响发酵效果的显著性因素, 进一步对产朊假丝酵母发酵培养基组成进行三因素五水平响应面优化试验, 最优组成为: 糖化醪体积分数为 17%, ρ (尿素) = 0.8 g/L。在小试最佳条件下, 完成了 3.7 L 发酵罐流加发酵试验, 发酵液中粗蛋白干基质量分数达到 29.4%, 较发酵前提高 38.0%。离心上清液经产朊假丝酵母发酵后蛋白质量分数升高, 提升了离心上清液的经济价值, 具有重要意义。

参考文献

- [1] 张光勤, 职承, 王玉琴, 等. 玉米酒精糟的高效利用[J]. 酿酒科技, 2013, 233(11): 95-97.
- [2] 周媛, 周子洋, 封莉, 等. 高浓度发酵废水生产单细胞蛋白的菌种筛选[J]. 环境工程学报, 2016, 10(11): 6037-6312.
- [3] 杨志强, 于涛, 张春泓, 等. 玉米酒精糟夜处理技术研究及展望[J]. 价值工程, 2010, 29(2): 112-113.
- [4] 张庆军, 李长明, 张昊, 等. 酒精糟液生产玉米干全酒精糟生产技术[J]. 现代食品, 2017, 13(19): 51-53.
- [5] 李臣支, 许旺发, 李永恒, 等. 玉米酒精糟液用于全淀粉发酵制备乙醇的研究[J]. 食品与生物, 2017, 10(227): 14-15.
- [6] 李兆春, 郑朔方, 侯文华, 等. 玉米酒精糟液生产高蛋白饲料的清洁生产工艺[J]. 工业用水与废水, 2005, 3(36): 27-29.
- [7] 齐宏亮, 崔卫东, 包慧芳, 等. 一株产朊假丝酵母 10 L 罐发酵工艺优化[J]. 新疆农业科学, 2015, 52(4): 718-723.
- [8] Roxana García, Yaima Izquierdo, Mauricio Ribas, et al. Effects of urea supplementation on candida utilis biomass production from distillery waste [J]. Waste and Biomass Valorization. Waste and Biomass Valorization, 2014, 5(1): 199-124.
- [9] Christoph Buerth, Denis Tielker, Joachim F Ernst, et al. Candida utilis and Cyberlindnera (Pichia) jadinii: Yeast relatives with expanding applications [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(16): 6981-6990.
- [10] 李加友, 蔡丽阳, 于建兴, 等. 饲用产朊假丝酵母的发酵培养条件研究[J]. 饲料工业, 2012, 33(6): 57-60.
- [11] 张倩倩, 管于平, 刁爱坡, 等. 产朊假丝酵母培养条件的优化研究[J]. 中国调味品, 2013, 38(5): 43-48.
- [12] 车颖洁, 郝林. 响应面法优化黄浆水发酵生产单细胞蛋白的工艺参数研究[J]. 中国酿造, 2016, 35(10): 91-94.
- [13] 吴明霞, 陈锡雄, 阮少江, 等. 响应面法优化啤酒糟培养基生产蛋白饲料的研究[J]. 大豆科学, 2012, 31(5): 842-845.
- [14] 梁静波, 杨伟, 宋震宇, 等. 响应面法优化固态发酵餐厨垃圾与醋糟生产蛋白饲料[J]. 中国酿造, 2014, 33(12): 98-101.
- [15] 钟厚, 庞会忠, 叶亚健, 等. 产朊假丝酵母 C-27 利用甜高粱秸秆汁产 SCP 的培养基优化[J]. 广东农业科学, 2011, 23: 94-99.
- [16] 张帆, 谢丽, 邹晓阳, 等. 响应面法优化制备高富硒产朊假丝酵母[J]. 农业资源与环境学报, 2014, 31(6): 575-582.
- [17] 罗小芬. 浅谈凯氏定氮法测定蛋白质准确度的操作技巧及关键点[J]. 现代食品, 2017, 19(28): 99-100.
- [18] 严益民. 比浊法在测定发酵液菌体浓度中的应用[J]. 抚顺石油学院学报, 2001, 21(1): 23-26.
- [19] 张倩倩, 管于平, 刁爱坡, 等. 产朊假丝酵母培养条件的优化研究[J]. 中国调味品, 2013, 38(5): 43-48.
- [20] 郭照宙, 许灵敏, 宋建楼, 等. 产朊假丝酵母功能的探究及应用[J]. 添加剂世界, 2016, 3: 33-39.
- [21] 何东东, 张坤生. 产朊假丝酵母生长条件的优化[J]. 食品科技, 2010, 35(2): 14-17. ■