

文章编号 : 1009 - 038X(2000) 03 - 0230 - 06

法夫酵母产虾青素的摇瓶工艺*

徐学明¹, 金征宇¹, 刘当慧¹, 陈晓明²

(1. 无锡轻工大学食品学院, 江苏无锡 214036; 2. 江苏淮阴工业专科学校, 江苏淮阴 223001)

摘 要 :以法夫酵母(*Phaffia rhodozyma*) WSS-FF6 为产生菌进行摇瓶条件下的类胡萝卜素(主要为虾青素) 发酵条件研究. 正交试验表明 : 葡萄糖质量分数对酵母产色素影响较大, 在起始 pH 值为 6, 培养温度 22 ℃, 葡萄糖 3.0%、尿素 0.1%、磷酸二氢钾 0.6%、玉米浆 0.6% 的培养基下经过 72 h、220 r/min 摇瓶发酵, 其生物量为 6.58 mg/mL, 类胡萝卜素产量为 14.92 μg/mL, 其中虾青素占 78%.

关键词 : 虾青素 ; 摇瓶发酵 ; 法夫酵母

中图分类号 : TQ920.6 **文献标识码 :** A

Astaxanthin Production by *Phaffia rhodozyma* in Shake Flask Culture

XU Xue-ming¹, JIN Zheng-yu¹, LIU Dang-hui¹, CHEN Xiao-ming²

(1. School of Food Science & Technology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036; 2. Huaiying Industry Training School, Huaiying 223001)

Abstract : Shake flask culture conditions of carotenoids and /or astaxanthin production were studied with a mutant WSS-FF6 of *Phaffia rhodozyma*. It was found that the concentration of glucose was a major factor to produce carotenoids by orthogonal experiment. When the mutant grew under the culture medium (initial pH=6.0) of 3.0% glucose, 0.1% urea, 0.6% KH₂PO₄, and 0.6% corn steep liquor, the concentration of biomass and total carotenoids could reach 6.58 mg/mL and 14.92 μg/mL, 78 percentage of which was astaxanthin after three day's flask culture in 22 ℃ and 220 r/min.

Key words : Astaxanthin ; shake flask culture ; *Phaffia rhodozyma*

虾青素, 3, 3'-二羟基-4, 4'-二酮基-β, β'-胡萝卜素, 是一种非维生素 A 源的类胡萝卜素^[1]. 它不仅具有很强的抗氧化性^[2]、抗肿瘤及增强免疫的生理功能^[3, 4], 而且拥有艳丽的粉红色及很强的色素沉积能力^[5, 6], 在食品、医药、化妆品及饲料等工业中具有很大的应用前景.

法夫酵母(*Phaffia rhodozyma*) 是 20 世纪 70

年代发现的一种新酵母属, 至今为止此属只有一种^[7]. 由于在法夫酵母所产的十几种类胡萝卜素中, 虾青素是野生株中最大的组份, 占总类胡萝卜素的 40~95%^[8], 因此它被认为是最有可能实现工业化发酵法生产是青素的优良菌种^[9]. 近年来国外已进行广泛研究, 而国内尚未见报道.

作者以实验室筛选获得的诱变株为出发菌, 对

* 收稿日期 : 1999-08-25, 修订日期 : 2000-03-05.

作者简介 : 徐学明 (1968 年 11 月生) 男, 江苏吴县人, 粮油与植物蛋白工程博士研究生

其类胡萝卜素及虾青素摇瓶发酵条件进行了研究.

1 材料与方法

1.1 菌种

法夫酵母菌 WSS-FF6(本实验室保藏号), 是野生株 OW1 经 4 次不同浓度的亚硝基胍连续诱变获得的突变株 , 保存于 4 ℃、2% 琼脂的 YM 培养基.

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基(YM培养基 ,g/L) 葡萄糖 10 , 麦芽汁 3 , 蛋白胨 5 酵母膏 3 琼脂 20 ; pH 6.0

1.2.2 种子培养基(g/L) 葡萄糖 10 , 麦芽汁 3 , 蛋白胨 5 酵母膏 3 ; pH 6.0

1.2.3 摇瓶培养基(g/L) 葡萄糖 20 (NH₄)₂SO₄ 5 , KH₂PO₄ 1 , MgSO₄ · 7H₂O 0. 5 , CaCl₂ · 2H₂O 0. 1 酵母膏 1 ; pH 6. 0

1.3 培养方法

1.3.1 种子培养方法 接一环斜面种子于装有 25 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中 , 22 ℃、240 r/min 培养 48 h , 以此发酵液 2 mL(按接种量 10%) 接于装有 23 mL 摇瓶培养基的 250 mL 三角烧瓶中 , 22 ℃、220 r/min 培养 48 h

1.3.2 摇瓶培养方法 接种量 10% , 250 mL 三角瓶装液 25 mL 22 ℃ 220 r/min 培养 72 h

1.4 测定方法

1.4.1 总类胡萝卜素测定 二甲亚砜法^[10] 2 mL 发酵液用 1 mL 二甲亚砜破壁 , 加 5 mL 丙酮直接萃取 . 测定 λ_{max} = 480 nm 时的吸光度 .

细胞总类胡萝卜素质量浓度(μg/mL) = (A × V_a) / (E × V_f)

式中 : A—吸光度 ;

V_a—萃取液体积 , mL ;

E—消光系数 , 为 0. 16 ;

V_f—取样发酵液体积 , mL

实验进行两次平行测定 .

1.4.2 虾青素含量测定 液相色谱法 , 以标样为基准(标样由 ROCHE 公司提供) , 计算峰面积 , 色谱条件 ZOBAX C18 色谱柱 , 流动相 V_{乙腈} : V_{甲醇} : V_水 = 70 : 25 : 5 , 进样量 5 μL , 流速 1 mL/min , λ = 480 nm .

1.4.3 生物量测定 干重法 , 105 ℃ 烘至恒重 , 实验进行两次平行测定 .

1.4.4 发酵液残糖量测定 3 , 5-二硝基水杨酸比色法^[11] . 万方数据

2 结果与讨论

2.1 种龄的确定

为了减少成分相差较大的培养基在转接后对酵母生长的影响 , 缩短延迟期 , 以 10% 接种量将种子培养基培养 2 d 的酵母接入摇瓶培养基 , 培养 3 d . 其生物量与发酵时间的关系见图 1 . 取对数生长后期的酵母为出发种子 , 即种龄 48 h 较适宜 .

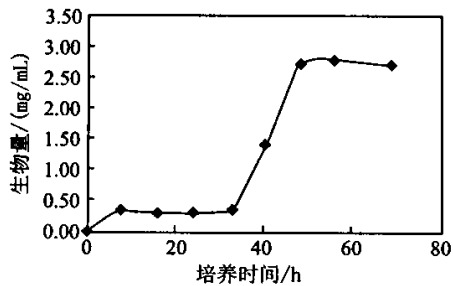


图 1 不同培养时间对生物量的影响

Fig. 1 Effect of culture time on yeast growth

2.2 接种量的确定

分别将种子以 3%、5%、8%、10%、12% 接入摇瓶培养基进行摇瓶培养 , 由图 2 可见 , 随接种量的增大 , 其生物量及类胡萝卜素总量均呈上升趋势 , 当接种量大于 10% 时 , 两者增加不再明显 , 因此接种量在 10% ~ 12% 为好 .

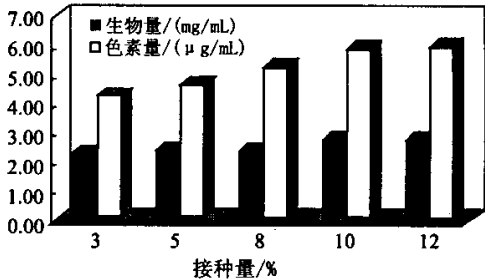


图 2 不同接种量对发酵的影响

Fig. 2 Effect of inoculating amount on fermentation

2.3 碳源的选择

选用几种常用的碳源 , 以相同碳含量为基准取代摇瓶培养基中的葡萄糖 , 结果见表 1 . 可见 , 蔗糖、

表 1 不同碳源对发酵的影响

Tab. 1 Effect of carbon source on fermentation

碳源	生物量/ (mg/mL)	类胡萝卜素 质量浓度/ (μg/mL)	类胡萝卜素 质量分数/ (μg/g)
乙醇	1. 05 ± 0. 10	2. 42 ± 0. 13	2305
蔗糖	3. 20 ± 0. 08	6. 06 ± 0. 30	1894
葡萄糖	3. 16 ± 0. 20	6. 26 ± 0. 20	1981
果糖	3. 12 ± 0. 23	6. 14 ± 0. 23	1968
麦芽糖	3. 10 ± 0. 06	3. 49 ± 0. 52	1127

葡萄糖、果糖是合成类胡萝卜素的^[12]有效碳源,但单位细胞的色素产量又以乙醇最高,这种作用可能是一定浓度的乙醇提高了法夫酵母合成虾青素过程中乙醇脱氢酶及甲羟戊二酸单酰辅酶 A 还原酶的活性所致^[12]。作者选用葡萄糖作碳源。

2.4 葡萄糖质量浓度对发酵的影响

以摇瓶发酵培养基为基础,改变葡萄糖的质量

浓度进行摇瓶发酵,结果见表 2。

由表 2 看出,随糖质量浓度的增加,色素及生物量均呈一定的上升趋势,但糖的利用率随质量浓度增加而降低。从残糖来看,当糖质量浓度大于 20 g/L 时,在发酵的时间内,糖未完全被用完,说明高质量浓度糖延长了发酵时间。因此,发酵糖质量浓度应不高于 20 g/L。

表 2 不同葡萄糖质量浓度对发酵的影响

Tab.2 Effect of glucose concentration on fermentation

葡萄糖质量浓度/ (g/L)	生物量 ΔX/ (mg/mL)	类胡萝卜素总量 ΔP/ (mg/mL)	残糖质量浓度/ (mg/mL)	消耗糖 ΔS/ (mg/mL)	ΔX/ΔS	ΔP/ΔS
20	2.94±0.17	6.01±0.19	0.34±0.47	19.64	0.15	0.31
40	2.95±0.18	5.41±0.15	15.38±0.21	24.62	0.12	0.22
60	2.96±0.03	5.82±0.06	28.63±0.38	31.37	0.09	0.19
80	3.07±0.01	6.19±0.27	41.40±0.42	38.60	0.08	0.16

2.5 氮源的选择

选用常见的无机氮源,等摩尔氮的取代发酵培养基中的硫酸铵进行发酵培养。由表 3 可见,尿素对提高单位发酵液的类胡萝卜素量及生物量效果最好。

表 3 氮源对发酵的影响

Tab.3 Effect of nitrogen source on fermentation

氮源	生物量/ (mg/mL)	类胡萝卜素 质量浓度/ (μg/mL)	类胡萝卜素 质量分数/ (μg/mg)
硫酸铵	2.39±0.04	4.84±0.13	2023
尿 素	4.62±0.14	8.75±0.24	1894
氯化铵	2.02±0.08	4.78±0.16	2366

2.6 尿素质量分数对发酵的影响

以摇瓶发酵培养基为基础,用尿素替代硫酸铵做不同尿素质量分数的发酵试验。图 3 表明,提高尿素浓度对酵母生长及色素产量均有抑制作用。在本实验中,尿素质量分数为 0.1% 时,类胡萝卜素产量及生物量最高。

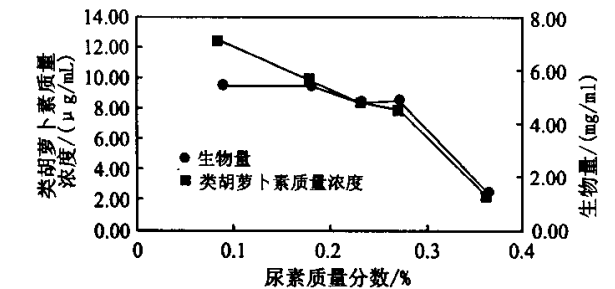


图 3 尿素质量分数对发酵的影响

Fig.3 Effect of urea concentration on fermentation
万方数据

2.7 初始 pH 值对发酵的影响

不同的起始 pH 值将直接影响法夫酵母的生长及类胡萝卜素的产量。图 4 表明,起始 pH 值对发酵影响很大,且色素与生物量随 pH 值的变化趋势一致。培养基初始 pH 值为 6 左右对法夫酵母生长及色素生产较有利。

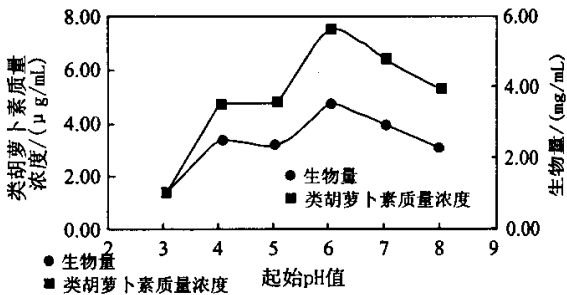


图 4 培养基初始 pH 值对发酵的影响

Fig.4 Effect of initial pH on fermentation

2.8 装液量对发酵的影响

法夫酵母为好氧微生物,可用摇瓶装液量来调节通气量研究,对其发酵的影响,结果见图 5。当 250 mL 三角瓶装液量超过 40 mL 时,类胡萝卜素产量显著降低,因此装液量以 25 mL 为宜。

2.9 磷酸二氢钾质量分数对发酵的影响

磷是核酸与磷酸脂的成分,钾既是许多酶的激活剂,又对原生质的胶态与细胞质膜的透性起调节作用。再者,磷酸盐对培养基 pH 值的变化起缓冲作用,因此通常培养基中适宜的磷酸二氢钾对酵母发酵有较大的影响。表 4 表明,不同质量分数磷酸二氢钾对生物量的影响不大,但就类胡萝卜素产量而言,过低或过高的磷酸二氢钾质量分数对类胡萝卜

素生产不利 培养基中以 0.6% 较好.

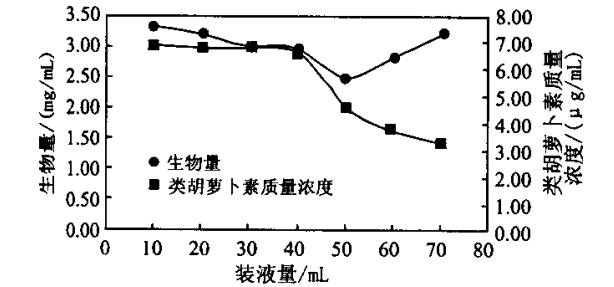


图 5 不同装液量对发酵的影响

Fig.5 Effect of liquid volume in flask on fermentation
表 4 磷酸二氢钾质量分数对发酵的影响
Tab.4 Effect of KH_2PO_4 concentration on fermentation

$\text{KH}_2\text{PO}_4/\%$	生物量/ (mg/mL)	类胡萝卜总量/ ($\mu\text{g/mL}$)
0.05	3.26 ± 0.44	5.00 ± 0.44
0.10	2.99 ± 0.21	6.10 ± 0.27
0.20	3.42 ± 0.14	6.21 ± 0.34
0.40	3.45 ± 0.45	6.00 ± 0.18
0.60	3.69 ± 0.10	7.08 ± 0.33
0.80	4.12 ± 0.37	6.63 ± 0.14
1.00	3.63 ± 0.18	6.45 ± 0.05

2.10 玉米浆质量分数对发酵的影响

玉米浆富含多种维生素、微量元素及氨基酸. 以不同浓度玉米浆替代培养基中酵母膏进行发酵试验 其对法夫酵母的影响见图 6.

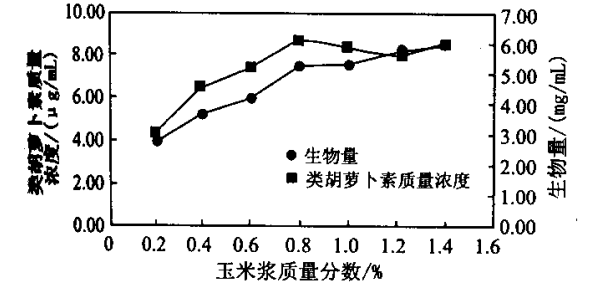


图 6 玉米浆质量分数对发酵的影响

Fig.6 Effect of corn steep liquor on fermentation
玉米浆对法夫酵母的生长及类胡萝卜素生产效果较好. 同发酵培养基的培养结果相比, 培养基中应用 0.6%~1.2% 的玉米浆能显著提高生物量

及类胡萝卜素产量.

2.11 温度对发酵的影响

法夫酵母发酵的温度较低, Johnson 等^[13]对野生株 UCD67—210 的研究表明, 其最高生长温度为 27.5℃, 但此时生物量及色素量均很低. 作者进行的温度试验见图 7. WSS—FF6 在 24℃ 时就不能生长, 但在 16~22℃ 的范围内对生长及色素产量影响不大, 这一点同 Johnson 的结果相同.

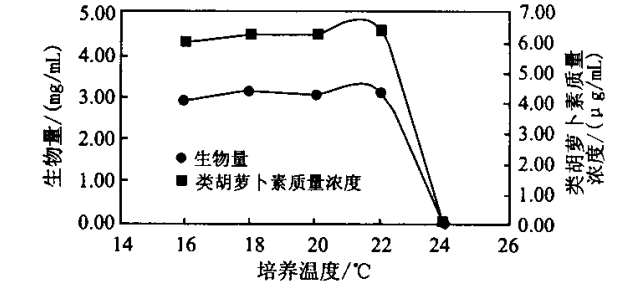


图 7 温度对发酵的影响

Fig.7 Effect of temperature on fermentation

2.12 正交试验

结合上述单因素试验, 以类胡萝卜素总量及生物量为指标, 以发酵培养基为基础培养基, 其中酵母膏用玉米浆取代, 选取初始 pH、葡萄糖、尿素、磷酸二氢钾及玉米浆为考察因素, 以 $L_{16}(4^5)$ 正交表作正交试验, 其因素水平表及正交试验结果分别见表 5、表 6.

表 7 极差分析表明, 各因素的主次关系为: 以类胡萝卜素为指标, $B > C > A > D > E$; 以生物量为指标, $B > A > C > E > D$. 表 8 方差分析表明, 就类胡萝卜素产量而言, 葡萄糖质量分数对产量影响显著 (f 检验, $\alpha = 0.05$), 对生物量, 葡萄糖质量分数是极显著的影响因子 (f 检验, $\alpha = 0.01$), pH 值是显著影响因子 (f 检验, $\alpha = 0.05$). 结合极差与方差分析, 以类胡萝卜素总量为主要指标, 其最佳工艺条件为 $A_2B_2C_2D_2E_1$, 即起始 pH 值为 6, 葡萄糖 3.0%, 尿素 0.1%, 磷酸二氢钾 0.6%, 玉米浆 0.6%, 以此条件进行发酵培养, 结果为类胡萝卜素总量为 14.92 $\mu\text{g/mL}$, 生物量为 6.58 mg/mL . 分别是优化前 YM 培养基发酵的 1.96 及 1.78 倍. 此时虾青素的含量为 78%.

表 5 正交试验 $L_{16}(4^5)$ 因素水平安排表

Tab.5 Concentrations of variables assigned to the different levels of orthogonal experiment					
水平	A 起始 pH 值	B 葡萄糖/%	C 尿素/%	D 磷酸二氢钾/%	E 玉米浆/%
1	5.0	2.0	0.05	0.40	0.60
2	6.0	3.0	0.10	0.60	0.80
3	7.0	4.0	0.15	0.80	1.00
4	8.0	5.0	0.20	1.00	1.20

表 6 正交试验结果
Tab.6 Results of orthogonal experiment

实验号	A	B	C	D	E	类胡萝卜素质量浓度/($\mu\text{g/mL}$)	生物量/(mg/mL)
1	1	1	1	1	1	9.28 ± 0.15	6.22 ± 0.23
2	1	2	2	2	2	12.23 ± 0.80	8.90 ± 0.28
3	1	3	3	3	3	9.27 ± 0.35	8.26 ± 0.00
4	1	4	4	4	4	8.47 ± 0.18	10.04 ± 0.48
5	2	1	2	4	3	8.39 ± 0.07	6.58 ± 0.14
6	2	2	1	3	4	11.98 ± 0.30	9.67 ± 0.07
7	2	3	4	2	1	11.32 ± 0.84	9.40 ± 0.08
8	2	4	3	1	2	8.30 ± 0.36	10.28 ± 0.14
9	3	1	3	2	4	7.66 ± 0.20	5.47 ± 0.44
10	3	2	4	1	3	9.80 ± 0.04	6.82 ± 1.22
11	3	3	1	4	2	11.63 ± 1.11	8.18 ± 0.71
12	3	4	1	4	2	10.33 ± 0.42	9.56 ± 0.17
13	4	1	4	3	2	3.23 ± 0.08	3.24 ± 0.17
14	4	2	3	4	1	9.00 ± 0.51	6.94 ± 0.31
15	4	3	4	1	4	11.25 ± 0.66	9.59 ± 0.21
16	4	4	1	2	3	9.73 ± 0.85	8.22 ± 0.99

表 7 正交试验极差分析表
Tab.7 Analysis of orthogonal experiment results

	A	B	C	D	E	
以类胡萝卜素总量为指标						
K_1	39.23	28.55	42.61	38.62	39.92	$\sum x_i = 151.82$
K_2	39.98	43.00	42.20	40.93	35.37	$\sum x_i^2 = 1512.71$
K_3	39.41	43.46	34.22	34.80	37.18	
K_4	33.21	36.82	32.80	37.48	39.35	
$\sum k_i^2$	5792.71	5907.72	5842.45	5781.83	5775.42	
Q	7.60	36.35	20.03	4.87	3.27	
k_1	9.81	7.14	10.65	9.65	9.98	
k_2	9.99	10.75	10.55	10.23	8.84	
k_3	9.85	10.86	8.56	8.70	9.30	
k_4	8.30	9.21	8.20	9.37	9.84	
R	1.69	3.73	2.45	1.53	1.14	
以生物量为指标						
K_1	33.42	21.51	32.29	32.91	32.12	$\sum x_i = 127.37$
K_2	35.93	32.33	34.63	31.99	30.60	$\sum x_i^2 = 1070.61$
K_3	30.03	35.43	30.95	30.73	29.88	
K_4	27.99	38.10	29.50	31.74	34.77	
$\sum k_i^2$	4092.82	4214.45	4069.69	4057.86	4069.47	
Q	9.34	39.75	3.56	0.60	3.50	
k_1	8.36	5.38	8.07	8.23	8.03	
k_2	8.98	8.08	8.66	8.00	7.65	
k_3	7.51	8.86	7.74	7.68	7.47	
k_4	7.00	9.53	7.38	7.94	8.69	
R	1.99	3.48	0.70	0.31	0.38	

表 8 正交试验方差分析表
Tab.8 Analysis of standard deviation

方差来源	平方和	自由度	方差	F	显著性	方差来源	平方和	自由度	方差	F	显著性
以类胡萝卜素总量为指标						以生物量为指标					
A	7.60	3	2.53	2.32		A	9.34	3	3.11	15.55	*
B	36.35	3	12.12	11.12	*	B	39.75	3	13.25	66.25	* *
C	20.03	3	6.68	6.13		C	3.56	3	1.19	5.95	
D	4.87	3	1.62	1.49		D	0.68	3	0.20		
E	3.27	3	1.09		E	3.50	3	1.17	5.85		

注：1)误差自由度为零，将平均平方和最小的项改为误差项；2) $F_{0.05}(3,3)=9.28$ ， $F_{0.01}(3,3)=29.46$ 。

3 结 语

由于虾青素是法夫酵母所产色素的主要成分，国外对虾青素的研究通常都以测定虾青素最大吸光度处的类胡萝卜素总量作指标，这不仅因为其值能体现虾青素含量的高低，而且简化了测定方法，

降低了检测成本。
研究表明，法夫酵母生长同色素形成呈一定的正相关，即酵母生长的同时色素也在不断地生成。这种相关性同一般的产色素酵母如 *Sporobolomyces roseus*^[14]及 *Rhodotorula glutinis*^[15]不同，它们的色素均是在酵母生长停止后才开始形成的。

参考文献

[1] WATARU M. Biological functions and activities of animal carotenoid[J]. *Pure Appl Chem*, 1991, 63(1):141~146

[2] LEE Sh, MIN D B. Effects quenching mechanisms and kinetics of carotenoids in chlorohyll-sensitised photo-oxidation of soybean oil[J]. *J Agric Food Chem*, 1990, 38(8):1630~1633

[3] TANAKA T, MORISHITA Y, SUZUI M, et al. Chemoprevention of mouse urinary bladder carcinogenesis by the naturally occurring carotenoid ataxanthir[J]. *Carcinogenesis*, 1994, 15(1):15~17

[4] TANAKA T, MAKITA H, OHNISISHI H, et al. Chemoprevention of rat oral carcinogenesis by naturally occurring xanthophylls, astaxanthin and canthaxanthin[J]. *Cancer Res*, 1995, 55(18):4059~4062

[5] JOHNSON E A, VILLA T G, LEWIS M J. *Phaffia rhodozyma* as an astaxanthin source in salmonid diets[J]. *Aquaculture*, 1980, 20:123~127

[6] JOHNSON E A, LEWIS M J, GRAU C R. Pigmentation of egg yolks with astaxanthin from the yeast *Phaffia rhodozyma*[J]. *Poult Sci*, 1980, 59:1777~1779

[7] MILLER M W. The yeast a Taxonomic study[M]. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B V, 1984.

[8] ANDREWS H G, STARR M P. (3R, 3r')-Astaxanthin from the yeast *Phaffia rhodozyma*[J]. *Phytochemistry*, 1976, 15:1009~1011

[9] NELLS N J. Microbial sources of carotenoid pigments used in foods and feed[J]. *J Appl Bacteriology*, 1991, 70:181~191

[10] JAMES S J, DEEPTHI K. Extraction and Quantitation astaxanthin from *Phaffia thodozyma*[J]. *Biotechnology Technoque*, 1990, 4(2):107~112

[11] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术[M]. 北京: 人民教育出版社, 1981.

[12] GU W L, AN G H, JOHNSON E A. Ethanol increases carotenoid productioj in *Phaffia rhodozyma*[J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 1997, 19(2):114~117

[13] JOHNSON E A, MICHAEL J L. Astaxanthis formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*[J]. *J General Microbiology*, 1979, 115:173~183

[14] BOBKOVA T S, Carotenoid pigments of mycobacteria and yeast[J]. *Mikrobiologiya* (English translation), 1965, 34:229~233

[15] VECHER A S, KULIKOVA A. Changes in polyene compounds at various stages of carotenoid development of *Rhodotorula gracili*[J]. *Mikrobiologiya* (English translation), 1968, 37:558~560

(责任编辑 朱 明)