

文章编号 :1009 - 038X(2002)01 - 0005 - 05

法夫酵母产虾青素的补料发酵

徐学明, 金征宇, 刘当慧

(江南大学 食品学院 江苏 无锡 214036)

摘 要 :以法夫酵母(*Phaffia rhodozyma*) WSS-FF6 为产生菌进行产虾青素的补料发酵,在通气量为 250 L/h, pH = 6.0 ± 0.5 的条件下,先流加高糖浓度的培养基,后添加 0.1% 乙醇,进行分批补料发酵,经 130 h 发酵后,生物量与类胡萝卜素产量分别为 27.4 mg/mL、26.12 $\mu\text{g/mL}$,生长得率、产物得率及酵母色素质量分数分别为 0.46、0.44 和 0.95。

关键词 :虾青素;补料发酵;法夫酵母

中图分类号:TQ 920.6

文献标识码:A

Fed-Batch Culture of Astaxanthin Producing Strain *Phaffia rhodozyma*

XU Xue-ming, JIN Zheng-yu, LIU Dang-hui

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract : Fed-batch culture of *Phaffia rhodozyma* for producing Astaxanthin was studied. It was observed that fed-batch cultivation could increase the productivities of biomass and total carotenoids. Adding some ethanol was also useful to the accumulation of pigment during fed-batch fermentation. Based on these results, a two-stage fed-batch culture was performed, in which biomass was enhanced by adding high concentration of glucose in the first stage and carotenoid/astaxanthin production was increased by 0.1% ethanol in the second stage when aeration rate was 250 mL/h, and pH was monitored at 6.0 ± 0.5 . Under these conditions, the biomass and total pigment reached 27.4 mg/mL and 26.12 $\mu\text{g/mL}$, respectively, after the culture was carried out for 130 h culture. The yield coefficient of growth, product and the content of pigment in yeast were 0.46, 0.44, and 0.95, respectively.

Key words : astaxanthin; fed-batch culture; *Phaffia rhodozyma*

法夫酵母(*Phaffia rhodozyma*)被认为是最有可能实现工业化发酵法生产虾青素的优良菌种,法夫酵母产虾青素的研究近年来已得到国内外研究者的重视。法夫酵母在发酵过程中呈现克雷布特里效应(CRABTREE EFFECT)^[1,2],因此,对法夫酵母而言,采用简单的分批发酵,其单位发酵液的生物量

及色素量较低,基质生长得率系数和产物得率系数也很难提高。

作者以实验室筛选获得的诱变株 WSS-FF6 为出发菌^[3],研究其补料分批发酵工艺,期望能提高发酵效率,以对工业化生产起一定的指导作用。

收稿日期 2001 - 10 - 30; 修订日期 2001 - 11 - 29。

基金项目 国家教育部骨干青年教师基金资助(教技司(2000)65号)。

作者简介 徐学明(1968 -)男,江苏苏州人,工学博士,副教授。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

2 L 容积台式发酵罐 瑞士 INFER 制造.

1.2 菌种

法夫酵母菌 WSS-FF6^[3] ,作者所在实验室保藏.

1.3 培养基

1.3.1 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.

1.3.2 种子培养基 葡萄糖 10 g/L ,麦芽汁 3 g/L , 蛋白胨 5 g/L 酵母膏 3 g/L pH 6.0.

1.3.3 摇瓶培养基 葡萄糖 20 g/L (NH₄)₂SO₄ 5 g/L , KH₂PO₄ 1 g/L , MgSO₄ · 7H₂O 0. 5 g/L , CaCl₂ · 2H₂O 0.1 g/L 酵母膏 1 g/L pH 6.0.

1.3.4 流加培养基 由上述摇瓶培养基各组分质量浓度扩大 7.5 倍.

1.4 培养方法

1.4.1 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 容积三角烧瓶中 ,22 ℃ , 220 r/min ,培养 48 h ,以此发酵液 2 mL(按接种量 10%)接于 23 mL 摇瓶培养基的 250 mL 容积三角烧瓶中 22 ℃ 220 r/min 培养 48 h.

1.4.2 摇瓶培养方法 接种量 10% ,250 mL 容积三角瓶装液 25 mL 22 ℃ 220 r/min 培养 72 h.

1.4.3 发酵罐培养方法 接种量 10% ,装液量为

1.2 L 20 ~ 22℃ .

1.5 测定方法

1.5.1 生物量测定 干重法 将培养液离心后 ,用蒸馏水洗一次 ,再离心 ,105 ℃ 烘箱内烘干至恒重.

1.5.2 总类胡萝卜素测定 二甲基亚砜(DMSO) 法^[4] .2 mL 发酵液用 1 mL DMSO 破壁 ,加 5 mL 丙酮直接萃取 ,以 V(丙酮): V(DMSO)= 5:1 为空白 ,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 ;

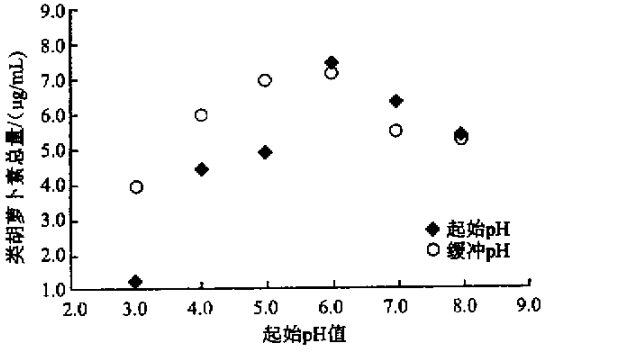
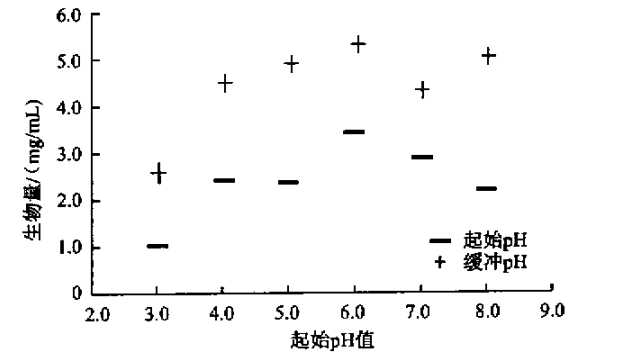
V_f—取样发酵液体积(mL).

1.5.3 发酵液残糖量的测定 3 ,5-二硝基水杨酸比色法^[5].

2 结果与讨论

2.1 控制 pH 值对发酵的影响

环境 pH 值影响细胞膜所带的电荷及培养基中营养物质的离子化作用程度 ,从而影响微生物的生长与生产 .发酵罐培养不同于摇瓶培养 ,它更能有效地控制发酵过程的 pH 值 ,使酵母生长于最适的 pH 值环境之中 .图 1 是用 0.2 mol/L 磷酸二氢钠和 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲体系^[5]将摇瓶培养基的 pH 值分别调至 3 4 5 6 7 8 的培养结果 .



注 起始 pH 值对发酵影响的数据来自文献 [2] .经 72 h 摇瓶发酵后 ,不同起始 pH 值发酵液的 pH 值差别不大 ,均在 2.5 ~ 2.6 之间.

图 1 pH 值对发酵的影响

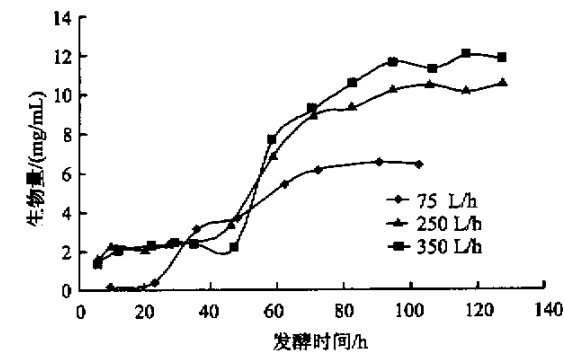
Fig.1 Effect of pH on fermentation

结合非缓冲体系起始 pH 值对发酵的影响^[2] , 可以看出 ,发酵过程中保持相对稳定的 pH 值有利于生物量及色素量的提高 ,其中对提高生物量效果更明显 .在最适 pH 值 6 处 “ 缓冲 pH 值体系 ” 比 “ 起始 pH 值体系 ” 的生物量提高近一倍 ,而色素量差别不大 .pH 值对法夫酵母生物量的这种影响同 HO 等

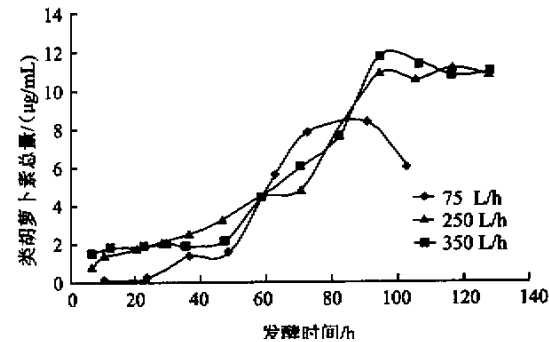
(1999) 的研究报道一致^[6] .

2.2 通气量对发酵的影响

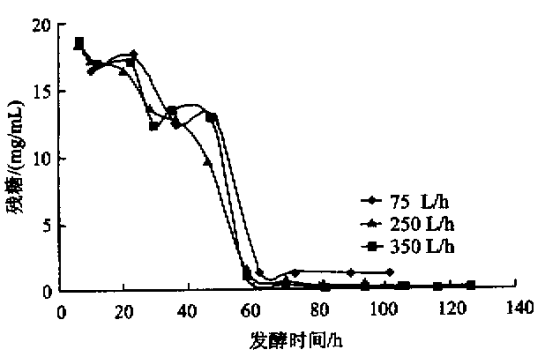
以摇瓶培养基为基础培养基进行通气量的发酵试验 ,其不同通气量下的发酵进程曲线见图 2 ,由图 2 所得通气量对发酵的影响结果见表 1 .



a. 不同通气量发酵对生物量的影响



b. 不同通气量发酵对类胡萝卜素产量的影响



c. 不同通气量发酵对糖利用的影响

图 2 不同通气量的发酵进程曲线

Fig.2 Profiles of effect of aeration rate on growth of and astaxanthin by *Phaffia rhodozyma*

表 1 不同通气量对发酵的影响

Tab.1 Effect of aeration rate on fermentation

发酵指标	通气量/(L/h)		
	75	250	350
发酵时间/h	90	94	94
生物量/(mg/mL)	6.58	10.23	11.72
色素量/(μg/mL)	8.27	10.78	11.66
$\Delta X/\Delta S$	0.33	0.51	0.59
$\Delta P/\Delta S$	0.41	0.54	0.58
$\Delta P/\Delta X$ 方数据	1.26	1.05	1.00

从进程曲线可以看出,3种通气量下酵母的发酵情况基本相似,但在75 L/h的通气量下,酵母进入对数生长期的时间较早,在发酵至90 h后,酵母色素量开始下降,这可能同酵母自溶有关^[7]。比较表1涉及各参数的数据不难看出,采用大于等于250 L/h的通气量效果较好。

2.3 起始葡萄糖质量浓度对发酵的影响

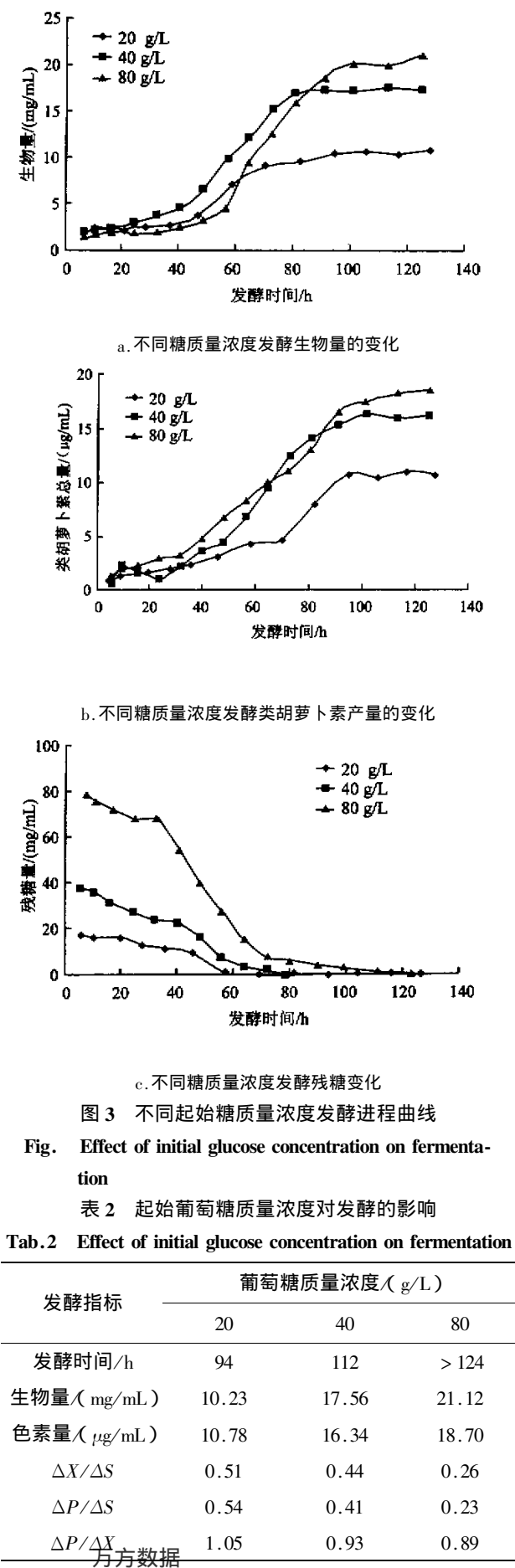
YAMANE等(1997)对法夫酵母ATCC24202的研究表明,在溶氧浓度较高的条件下发酵($DO=5.0\text{ mg/L}$),可以抑制克雷布特里效应的作用,使酵母在10~120 g/L起始葡萄糖质量浓度的不同培养基中培养均不产生乙醇、甘油、醋酸盐、丙酮酸盐等代谢副产物,但酵母最大比生长速率随起始糖质量浓度的增加而降低,并发现不同糖质量浓度培养基之间存在着这样一种关系,即低质量浓度糖的培养基有利于酵母的生长,而高质量浓度糖培养基则对提高色素产量有利。由此,作者结合培养基中氮的变化采用先低糖(即低的碳氮比,2.8 mol葡萄糖/1 mol硫酸铵)后高糖(11.2 mol葡萄糖/1 mol硫酸铵)的两步分批补料发酵,获得了较好的结果^[1]。作者在250 L/h的通气量下进行了不同起始葡萄糖质量浓度的发酵试验,其进程曲线见图3,由图3所得不同起始糖质量浓度对发酵的影响见表2。

进程曲线表明,在通气量250 L/h的条件下,不同起始糖质量浓度的发酵状态相似,但发酵时间随糖质量浓度提高而延长,这一点同YAMANE等(1997)的实验结果一致^[1]。

分析表2的生长得率及产物得率可以看出,两者的变化趋势一致,均随起始糖质量浓度的增大而降低,即采用低质量浓度糖发酵对提高生物量及色素量均有利,这同上述YAMANE阐述的结论不同。结合文献[2]的实验结果不难发现,摇瓶培养由于很难控制通气量,其基质生长得率与产物得率比相同糖质量浓度的发酵罐培养要低2~3倍,由此反映出氧气对法夫酵母发酵的重要性。但比较两者类胡萝卜素的质量分数(单位细胞色素量) $\Delta P/\Delta X$ 发现,相同糖质量浓度下摇瓶的单位细胞色素量比发酵罐的要高1倍左右,这种结果不仅进一步证明了乙醇对色素累积的促进作用,同时也验证了YAMANE等就高溶氧条件下,法夫酵母在一定糖质量浓度范围内发酵不产生乙醇的结论。

2.4 乙醇质量浓度对发酵的影响

以乙醇作为唯一碳源对法夫酵母生长具有较强的抑制作用,但培养基中添加适量的乙醇可以提高乙醇脱氢酶及虾青素合成途径中甲羟戊二酸单



酰辅酶 A 还原酶的活性,因此对提高单位细胞的色素量有益^[8],这一点文献[2]中的实验结果亦已证实.利用乙醇的这种作用,YAMANE 等(1997)^[9]在细胞生长的稳定期添加 0.3% 的乙醇,Cu 等(1997)^[10]在延迟期后期或对数生长期添加 0.2% 的乙醇,均使色素产量提高了近 1 倍左右.为了考察乙醇对 WSS-FF6 菌株的作用,以摇瓶培养基为基础,以不同质量浓度的乙醇取代培养基中全部葡萄糖或在原培养基中加入不同含量的乙醇进行摇瓶发酵,其实验结果见表 3.可见单纯以乙醇作碳源时,乙醇质量浓度 ≤ 10 g/L 时,乙醇只起一般碳源作用,对虾青素的累积不起促进作用.而在葡萄糖存在的前提下,额外添加 1.0 g/L 乙醇,对 WSS-FF6 酵母生长的抑制作用已消除,类胡萝卜素质量分数是不加乙醇时的 1.1 倍.

表 3 乙醇质量浓度在摇瓶培养中对 WSS-FF6 发酵的影响

Tab.3 Effect of ethanol concentration on growth of and astaxanthin production by WSS-FF6 in shake flask culture

碳源质量 浓度/(g/L)		生物量/ (mg/mL)	类胡萝卜素 总量/ (μg/mL)	类胡萝卜素 质量分数/ (μg/g)
乙醇	葡萄糖			
1.0	0	0.31±0.07	0.35±0.17	1 129
3.0	0	0.48±0.06	0.54±0.30	1 115
5.0	0	0.72±0.28	0.78±0.31	1 083
10.0	0	0.79±0.30	0.98±0.21	1 240
15.0	0	1.05±0.10	2.42±0.13	2 304
1.0	20	2.97±0.12	6.35±0.18	2 139
3.0	20	2.43±0.01	3.24±0.15	1 331
5.0	20	2.51±0.41	2.45±0.04	976
10.0	20	2.50±0.42	1.63±0.16	652
0	20	3.16±0.20	6.26±0.20	1 981

2.5 两步分批补料发酵

鉴于以上实验结果,以 20 g/L 葡萄糖的摇瓶培养基为起始培养基,在 pH 6±0.5(2 mol/L NaOH 滴加控制),通气量 250 g/L 的条件下,进行只加流加培养基的一步补料发酵及再加 0.1 g/dL 质量浓度乙醇的两步分批补料发酵试验.第一次补料开始于发酵液中残糖量小于 5.0 g/L^[11],第二次加乙醇在发酵液残糖量低于 2.0 g/L 时.结果见图 4.在发酵至 120 h 时,不加乙醇的生物量及类胡萝卜素总量分别为 28.48 mg/mL、21.34 μg/mL,加入乙醇后分别为 28.3 mg/mL、25.5 μg/mL,加入乙醇后类胡萝卜素总量提高至未加时的 1.2 倍,类胡萝卜素质量分数由

未加前的 750 $\mu\text{g/g}$ 上升至 900 $\mu\text{g/g}$,也是 1.2 倍 ,由此可以看出 ,添加乙醇对 WSS-FF6 的色素累积有一定作用 ,但提高幅度比国外报道的要小 .试验总共补加流加培养基 510 mL ,折合分批发酵相当于起始葡萄糖质量浓度为 59 g/L ,根据两次补料

发酵 130 h 时的生物量及类胡萝卜素总量 ,可以算出酵母生长得率 $\Delta X/\Delta S$ 、产物得率 $\Delta P/\Delta S$ 及类胡萝卜素质量分数 $\Delta P/\Delta X$,分别为 0.46、0.44 和 0.95 ,其效率同分批发酵起始糖质量浓度为 40 g/L 时相同(表 2) ,说明采用流加方式提高了发酵效率 .

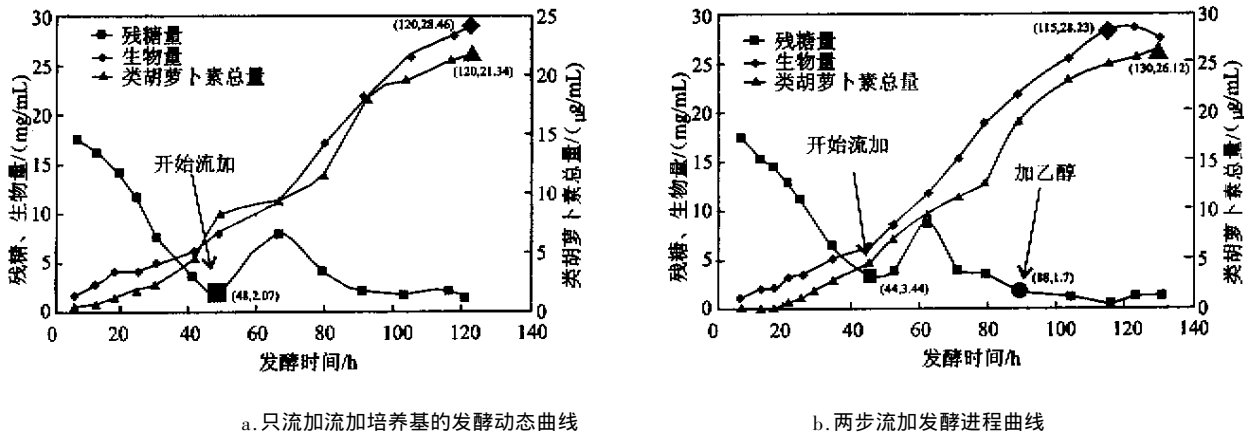


图 4 不同流加方法对发酵的影响

3 结 论

分批流加可以提高 WSS-FF6 菌株的生长得率

及产物得率 ,流加过程中添加适量乙醇对累积色素具有一定的促进作用 .

参考文献 :

[1] YAMANE Y , HIGASHIDA K , NAKASHIMADA Y , *et al.* . Influence of oxygen and glucose on primary metabolism and astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in batch and fed-batch cultures : kinetic and stoichiometric analysis[J] . **Applied and Envir Microbiology** , 1997 , 63 (1) : 4471 - 4478 .

[2] 徐学明 , 金征宇 , 刘当慧 , 等 . 法夫酵母产虾青素的摇瓶工艺 [J] . 无锡轻工大学学报 , 2000 , 19 (3) : 230 - 235 .

[3] 徐学明 , 金征宇 , 吕玉华 . 虾青素高产突变株的选育 [J] . 食品与发酵工业 , 2000 , 26 (5) : 22 - 27 .

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

[5] 诸葛健 , 王正祥 . 工业微生物实验技术手册 [M] . 北京 : 中国轻工业出版社 , 1994 .

[6] HO K P , TAM C Y , ZHOU B . Growth and carotenoid production of *Phaffia rhodozyma* in fed-batch cultures with different feeding method[J] . **Biotechnol Letters** , 1999 , 21 : 175 - 178 .

[7] MEYER P S , Du PREEZ J C . Effect of culture conditions on astaxanthin production by a mutant of *Phaffia rhodozyma* in batch and chemostat culture[J] . **Appl Microbiol Biotechnol** , 1994 , 40 : 780 - 785 .

[8] AN G H , SCHUMAN D B , JOHNSON E A . Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin conten[J] . **Appl Environ Microbiol** , 1989 , 55 : 116 - 124 .

[9] YAMANE Y , HIGASHIDA K , NAKASHIMADA Y , *et al.* . Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* enhanced in fed-batch culture with glucose and ethanol feeding[J] . **Biotechnol Letters** , 1997 , 19 (11) : 1109 - 1111 .

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

(责任编辑 : 秦和平)