

# 一株法夫酵母虾青素高产菌株的生产性能

倪辉<sup>1,2,3</sup>, 洪清林<sup>1</sup>, 肖安风<sup>1,2</sup>, 李利君<sup>1</sup>, 蔡慧农<sup>1,2,3</sup>, 苏文金<sup>1,2,3</sup>

1 集美大学生物工程学院, 厦门 361021

2 福建省高校食品微生物与酶工程技术研究中心, 厦门 361021

3 厦门市食品与生物工程技术研究中心, 厦门 361021

**摘要:** 为了评价虾青素高产菌株-法夫酵母 JMU-MVP14 的生产性能及建立虾青素高产发酵技术, 通过测定糖、生物量、虾青素产量、总类胡萝卜素产量等发酵参数, 用摇瓶试验对比了法夫酵母 JMU-MVP14 和出发菌株的差异, 用 7 L 罐试验对比了 pH 值调控方式及补料培养基成分对发酵的影响, 用 1 m<sup>3</sup> 罐试验评估了法夫酵母 JMU-MVP14 高密度发酵虾青素的产量水平。摇瓶发酵结果表明, 法夫酵母 JMU-MVP14 虾青素及总类胡萝卜素的细胞产率分别达到 6.01 mg/g 及 10.38 mg/g; 7 L 罐分批发酵试验结果表明, 自动流加调控 pH 值比间歇调控 pH 更有利于该法夫酵母的生长及虾青素合成; 法夫酵母 JMU-MVP14 的  $\mu_{\max}$  和  $K_s$  分别为 0.20 h<sup>-1</sup> 及 21.73 g/L, 其虾青素合成的模型为部分生长关联型。7 L 罐补料分批发酵试验表明, 在发酵过程中只补充糖液而不补充酵母膏及玉米浆有利于高密度、高产发酵虾青素; 7 L 罐补料分批发酵的生物量、虾青素和总类胡萝卜素的体积产率、虾青素和总类胡萝卜素的细胞产率分别达到了 32.81 g/L、155.99 mg/L、399.99 mg/L、4.94 mg/g、12.19 mg/g。1 m<sup>3</sup> 罐中试补料分批发酵的生物量、虾青素和总类胡萝卜素的体积产率、虾青素和总类胡萝卜素的细胞产率分别达到 85.11 g/L、279.96 mg/L、618.01 mg/L、3.29 mg/g 和 7.26 mg/g; 法夫酵母 JMU-MVP14 细胞中的蛋白质、总糖、脂肪含量分别为 21.54%、41.34% 和 34.31%。该菌株具有很强的虾青素生产能力及良好的综合利用价值, 能大幅度提高虾青素的发酵生产水平。

**关键词:** 法夫酵母, 虾青素, 高产菌株, 动力学, 补料分批发酵

## Characterization and evaluation of an astaxanthin over-producing *Phaffia rhodozyma*

Hui Ni<sup>1,2,3</sup>, Qinglin Hong<sup>1</sup>, Anfeng Xiao<sup>1,2</sup>, Lijun Li<sup>1</sup>, Huinong Cai<sup>1,2,3</sup>, and Wenjin Su<sup>1,2,3</sup>

1 College of Bioengineering, Jimei University, Xiamen 361021, China

2 Research Center of Food Microbiology and Enzyme Engineering Technology of Fujian Province, Xiamen 361021, China

3 Research Center of Food Biotechnology of Xiamen City, Xiamen 361021, China

**Received:** October 25, 2010; **Accepted:** January 5, 2011

**Supported by:** National Nature Science Foundation of China (No. 20702019), Fujian Provincial Key Technique Foundation (No. 2010N5009), Fund for Innovative Research Team of Jimei University (No. 2010A006).

**Corresponding author:** Huinong Cai. Tel: +86-592-6181764; Fax: +86-592-6180470; E-mail: chn@jmu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 20702019), 福建省产学研重大专项项目 (No. 2010N5009), 集美大学科研创新团队基金 (No. 2010A006) 资助。

**Abstract:** We evaluated an astaxanthin overproducing *Phaffia rhodozyma* JMU-MVP14, and developed astaxanthin high-yielding fermentation process. We analyzed several fermentation parameters, i.e., biomass, astaxanthin and total carotenoids content to compare the characteristics of *P. rhodozyma* JMU-MVP14 and the original strain through flask fermentation experiments. We conducted batch and fed-batch fermentation experiments in 7 L fermentor to investigate the effects of pH controlling models and feeding medium compositions on the production of astaxanthin. We further evaluated the capability and practical value of *P. rhodozyma* JMU-MVP14 by fed-batch cultivation in the 1 m<sup>3</sup> fermentor. Flask fermentation experiments revealed that *P. rhodozyma* JMU-MVP14 produced high yield of astaxanthin and carotenoids with specific productivity of astaxanthin and specific productivity of total carotenoids of 6.01 mg/g and 10.38 mg/g. Results of batch culture experiments in the 7 L fermentor showed that controlling the pH by ammonia auto-feeding was better than discontinuously adjusting pH value at 6.0 with regard to the high productivities of biomasses and astaxanthin. This *P. rhodozyma* strain synthesized astaxanthin partially linked to the growth with the  $K_s$  and  $\mu_{max}$  of 0.20 h<sup>-1</sup> and 21.73 g/L, respectively. Results of batch-fed fermentations in 7 L fermentor indicated that the complex feeding medium consisted of 50% glucose, 0.5% yeast extract and 0.3% corn steep syrup had lower astaxanthin productivity than the simple feeding medium containing only 50% glucose, which produced biomass, volumetric productivity of astaxanthin, volumetric productivity of total carotenoids, specific productivity of astaxanthin and total carotenoids at 32.81 g/L, 155.99 mg/L, 4.94 mg/g, 399.99 mg/L and 12.19 mg/g, respectively. As fed-batch cultured in 1 m<sup>3</sup> fermentor, *P. rhodozyma* JMU-MVP14 yielded 85.11 g/L of biomass, 279.96 mg/L of volumetric productivity of astaxanthin, 618.01 mg/L of volumetric productivity of total carotenoids, 3.29 mg/g of specific productivity of astaxanthin and 7.26 mg/g of specific productivity of total carotenoids. Additionally, *P. rhodozyma* JMU-MVP14 cell contained 21.54% of protein, 41.34% of carbohydrate and 34.31% of lipid. These comprehensive results suggest that *P. rhodozyma* JMU-MVP14 has great practical prosperity related to its strong ability to produce astaxanthin and good value byproducts.

**Keywords:** *Phaffia rhodozyma*, astaxanthin, over-producing strain, kinetic models, batch-fed fermentation

虾青素 (Astaxanthin) 是一种含氧类胡萝卜素, 具有超强的抗氧化活性, 同时还具有抑制肿瘤发生、增强免疫、抗炎症、机体着色等多种生物学功能, 在功能性食品、饲料、化妆品、医药等方面有着广泛的应用<sup>[1-3]</sup>。

利用法夫酵母 *Phaffia rhodozyma* 发酵生产虾青素具有发酵条件容易满足、发酵培养基简单、易实现工厂化生产、不受气候条件影响等优点, 是最具产业化前景的天然虾青素生产方法<sup>[5-6]</sup>。上世纪 80 年代以后, 人们从虾青素的合成机理<sup>[7]</sup>、优良菌株选育<sup>[8-10]</sup>、发酵工艺条件优化<sup>[11-16]</sup>、提取工艺优化<sup>[17-18]</sup>、廉价培养基的选择<sup>[19-20]</sup>及虾青素合成酶基因的克隆与表达<sup>[21]</sup>等多方面对法夫酵母发酵虾青素进行了全面研究, 虽然已经基本阐明了法夫酵母的生物学特性、虾青素的合成代谢机理、发酵培养基的基本成分和发酵条件, 但到目前为止, 所报道的法夫酵母的虾青素细胞产率最高为 3~3.5 mg/g<sup>[9-10,22]</sup>, 虾青素发酵产量最高为 60 mg/L<sup>[22]</sup>, 虾青素的发酵

水平一直停滞不前, 虾青素的产业化发酵一直没有成功, 很多科研单位及企业都放弃了对虾青素发酵生产技术继续进行研究, 近年来相关研究陷入了低谷。

虽然目前很容易购买到先进的发酵设备及建立工业发酵技术, 但没有选育获得符合产业化生产要求的高产菌株制约了虾青素发酵技术的产业化应用。因此, 选育优良的生产菌种是提高虾青素发酵水平、推动虾青素发酵产业化的最根本途径。本实验室在前期研究基础上<sup>[14,22]</sup>, 选育得到了一株高产虾青素的法夫酵母 (*Phaffia rhodozyma* JMU-MVP14), 其虾青素细胞产率可达到 5 mg/mL 以上, 从出发菌株 (*Phaffia rhodozyma* JMU-668) 所能达到的生物量 (60 g/L) 来看, 对该菌株进行高密度发酵, 其虾青素产量应该能达到 300 mg/L 以上。按目前虾青素的市场价值 (\$2 000/kg) 估算, 如果虾青素的发酵产量能达到 200 mg/L, 则其生产成本和产品价值相当, 如果发酵产量高于 250 mg/L, 则具有产业化发酵价值; 以此为根据, 该菌株应该是一株具有产业

化前景的高产菌株。因此, 进一步评估该菌株的生产性能, 明确该菌株是否具有产业化价值对于虾青素的发酵生产具有重要的意义。

前期试验表明, *Phaffia rhodozyma* JMU-MVP14 的生长及产虾青素的条件与其他法夫酵母菌株相似, 但发酵 pH 值的调控方式及补料液成分对虾青素的合成却具有较大的影响。针对这些情况, 本文在对发酵 pH 值的调控方式及补料液成分进行比较研究的基础上, 侧重于考察该菌株高密度发酵虾青素的生产性能, 为后续研究及产业化应用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 试验菌株

法夫酵母出发菌株 (*Phaffia rhodozyma* JMU-668): 由法夫酵母 Pst-1 菌株 (德国柏林工业大学 stahl 教授赠送) 经紫外诱变, 用薄层色谱法筛选得到, 其特点是虾青素占总类胡萝卜素的 95% 以上。

法夫酵母虾青素高产菌株 (*Phaffia rhodozyma* JMU-MVP14): 由出发菌株经甲基磺酸乙酯诱变, 用 0.5% 的双氧水结合紫外照射产生自由基淘汰低产菌株选育得到, 本实验室保存。

#### 1.1.2 培养基

斜面培养基与种子培养基: 4° Bx 麦汁培养基, pH 6.0; 制备斜面培养基时添加 1.5% 的琼脂。

摇瓶发酵培养基: 葡萄糖 20 g/L, 硫酸铵 5 g/L, 磷酸二氢钾 2 g/L, 硫酸镁 0.5 g/L, 氯化钙 0.2 g/L, 酵母膏 3 g/L, pH 6.0。

分批发酵培养基: 葡萄糖 30 g/L, 硫酸铵 5 g/L, 磷酸二氢钾 2 g/L, 硫酸镁 0.5 g/L, 氯化钙 0.2 g/L, 酵母膏 2 g/L, pH 6.0。

补料分批发酵培养基: 葡萄糖 30 g/L, 硫酸铵 5 g/L, 磷酸二氢钾 3 g/L, 硫酸镁 3 g/L, 酵母膏 15 g/L, pH 6.0。

#### 1.1.3 试剂及药品

虾青素标准样品购自 Sigma 试剂公司; 葡萄糖 (分析纯)、磷酸二氢钾 (分析纯)、氯化钙 (分析纯)、硫酸氨 (分析纯)、无水硫酸镁 (分析纯)、3,5-二硝基水杨酸 (分析纯)、氢氧化钠 (分析纯)、亚硫酸钠 (分析纯)、无水乙醇 (分析纯)、二甲亚砜 (化学纯)、酵母膏等都为上海国药集团有限公司产品。

#### 1.1.4 主要仪器

FA2004 型电子天平 (上海精密科学仪器有限公司), LXJ-IIB 型低速大容量多管离心机 (上海安亭分析仪器厂), ZHWY-2102 型双层全温度恒温摇床 (上海智城分析仪器制造有限公司), SP-DJ 系列垂直净化工作台 (上海浦东伟普净化设备厂), 101-3B 型电热鼓风干燥箱 (上海市实验仪器总厂), UV-2600A 型紫外可见分光光度计 (尤尼柯 (上海) 仪器有限公司), NBS Bioflo-110 7 L 发酵罐 (New Brunswick Scientific Company), GUJT100L-1000L 型中试型发酵罐 (镇江东方生物工程设备技术有限责任公司), Waters 1525 型液相色谱仪 (Waters Corporation, Milford, MA, USA)。

## 1.2 方法

#### 1.2.1 摇瓶种子的制备

将斜面活化的菌种接种于装有 30 mL 种子培养基的 250 mL 摇瓶中, 于 22 °C、190 r/min 培养 96 h 得到 1 代摇瓶种子。取 1 mL 1 代摇瓶种子转接到新鲜的种子培养基中, 在相同的条件下培养 48 h 得到摇瓶种子。

#### 1.2.2 摇瓶发酵试验

将 1 mL 摇瓶种子接入装有 30 mL 摇瓶培养基的 250 mL 摇瓶中, 在 22 °C、190 r/min 的条件下培养 120 h 后测定发酵液中的生物量、总类胡萝卜素及虾青素。

#### 1.2.3 7 L 罐分批发酵试验

以 5% 的接种量将摇瓶种子接种至装有 5 L 发酵培养基的 7 L 发酵罐中, 控制发酵温度 22 °C, 发酵 pH 6.0, 通气量为 3 L/min, 通过调节搅拌转速将溶

氧控制在 30%~50%之间进行发酵, 转速下限为 200 r/min, 上限为 800 r/min, 定时取样分析, 对比以下两种 pH 调控方式对发酵的影响。

1) 自动流加控制 pH 值: 整个发酵过程中通过用 10% 氨水自动流加调控 pH 值。

2) 手动间歇调整 pH 值: 发酵初始时 pH 随发酵时间的延长而下降, 发酵至 60 h, pH 降低至 2.5, 打开碱泵补氨水使 pH 值升高至 6.14 后关闭碱泵, 发酵至 72 h, pH 降低至 3.77, 补氨水使 pH 值升高至 5.98 后关闭碱泵后继续发酵直至 108 h。

#### 1.2.4 7 L 罐补料分批发酵试验

整个发酵过程中溶氧控制在 30%~50%之间, 每隔 12 h 取样测定发酵液中的糖度, 当糖度低于 1% 时进行补料使发酵液的葡萄糖浓度达到 4%, 控制发酵过程中糖浓度为 1%~4%, 通过检测样品的生物量、虾青素及总类胡萝卜素含量, 对比两种补料液对补料分批发酵虾青素的影响。补料液 1 为 50% 的葡萄糖; 补料液 2 为 50% 的葡萄糖、0.5% 的酵母膏及 0.3% 的玉米浆。

#### 1.2.5 1 m<sup>3</sup> 罐发酵试验

以 2% 的接种量将摇瓶种子接种至装有 75 L 发酵培养基的 100 L 种子罐中, 在温度 22 °C、pH 6.0、

溶氧 30%~50% 的条件下培养 72 h, 转接入装有 750 L 发酵培养基的 1 m<sup>3</sup> 发酵罐中进行发酵。发酵过程中控制发酵温度 22 °C, 利用 10% 氨水自动流加控制 pH 为 6.0, 调节搅拌转速和通气量控制溶氧值在 30%~50% 之间, 每隔 12 h 取样测定发酵液中的糖浓度, 当初糖耗完后, 流加 60% 的葡萄糖液维持发酵液糖浓度不大于 1 g/L。

#### 1.3 检测方法

用干重法测定生物量<sup>[22]</sup>, 液相色谱法测定虾青素含量<sup>[22]</sup>, 紫外分光光度法测定总类胡萝卜素<sup>[22]</sup>, 3,5-二硝基水杨酸法测定还原糖<sup>[23]</sup>; 总蛋白、总脂肪、总糖及灰分测定采用 AOAC 推荐的方法<sup>[24]</sup>。

#### 1.4 相关参数及其缩写

相关参数的计算公式及其缩写见表 1。

#### 1.5 发酵动力学的计算

用 Monod 模型描述发酵生长动力学, 用 Luedeking-Piret 模型描述产物生成动力学。

#### 1.6 数据处理与分析

摇瓶试验为 5 次平行试验的平均值, 用 DPS 软件进行显著性分析; 罐上发酵为 3 次平行测定的平均值, 一次参数用 Excel 软件计算标准差, 并在作图时添加误差线, 二次参数用平均值表示。

表 1 发酵参数的计算及公式

Table 1 Fermentation parameters and their calculations

Parameter	Symbol	Detective or calculative method	Unit
Biomass	X	Dry weight	g/L
Volumetric productivity	P	Detected by HPLC or photometric method	mg/L
Residual sugar	S	Detected by DNS method	g/L
Specific productivity	$Y_{p/x}$	$P/X$	mg/g
Growth speed	$r_x$	$\frac{X_2 - X_1}{(t_2 - t_1)}$	g/(L·h)
Syntheses speed	$r_p$	$\frac{P_2 - P_1}{(t_2 - t_1)}$	mg/(L·h)
Specific growth rate	$\mu$	$\frac{X_2 - X_1}{(t_2 - t_1)X}$	$h^{-1}$
Specific synthesis rate	$q_p$	$\frac{P_2 - P_1}{(t_2 - t_1)X}$	mg/(g·h)
Monod constant	K <sub>s</sub>	Modulated by monod equation	g/L

## 2 结果与分析

### 2.1 摇瓶培养

如表 2 所示, 高产菌株 (*P. rhodozyma* JMU-MVP14) 的生物量显著低于出发菌株 (*P. rhodozyma* JMU-668), 而总类胡萝卜素的体积产率、虾青素

体积产率、总类胡萝卜素细胞产率、虾青素细胞产率分别是 28.45 mg/L、16.53 mg/L、10.38 mg/L 及 6.01 mg/g, 都显著高于出发菌株。

### 2.2 7 L 罐分批发酵

如图 1 所示, 用自动流加的方式控制发酵液的 pH, 法夫酵母 JMU-MVP14 的糖消耗、生物量、对

表 2 高产菌株与出发菌株摇瓶发酵试验结果

Table 2 Comparison of astaxanthin high producing strain and original strain by flask experiments

Strain No.	Biomass (g/L)	Volumetric productivity of total carotenoids (mg/L)	Volumetric productivity of astaxanthin (mg/L)	Specific productivity of total carotenoids (mg/g)	Specific productivity of astaxanthin (mg/g)
<i>P. rhodozyma</i> JMU-MVP14	2.75±0.13 <sup>b</sup>	28.45±0.58 <sup>a</sup>	16.53±0.25 <sup>a</sup>	10.38±0.29 <sup>a</sup>	6.01±0.19 <sup>a</sup>
<i>P. rhodozyma</i> JMU-668	4.15±0.13 <sup>a</sup>	2.92±0.04 <sup>b</sup>	2.42±0.04 <sup>b</sup>	0.70±0.02 <sup>b</sup>	0.59±0.02 <sup>b</sup>

The numbers marked by different superscript letter in the same column were significant different at the significant level of 5%, i.e., the value marked with "a" in superscript was significant more than the counterpart followed by "b" in superscript.

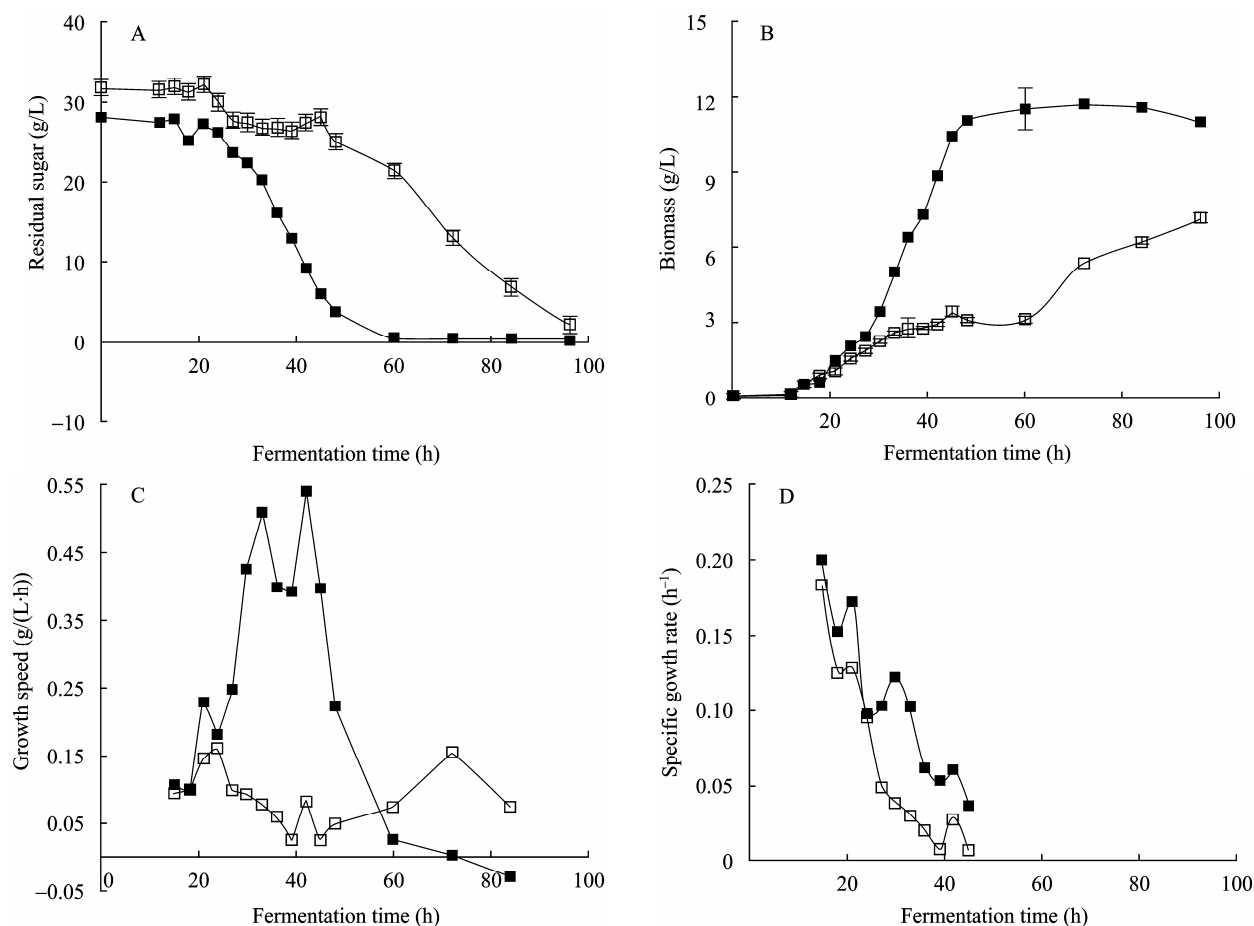


图 1 两种 pH 值控制方式对法夫酵母 JMU-MVP14 生长及糖消耗的影响

Fig. 1 Effects of the pH value controlling style on the growth and sugar utilization of *P. rhodozyma* JMU-MVP14. (A) Comparison of the sugar utilization. (B) Comparison of the biomass. (C) Comparison of the growth speed. (D) Comparison of the specific growth rate. The fermented sample by auto-controlling pH value at 6.0 (■). The fermented sample by discontinuously adjusting pH value at 6.0 (□).

数生长期的生长速率、生长比速率等都大于手动间歇调节 pH 的发酵模式。由图 2 可知,用自动流加的方式控制发酵液的 pH, 表征法夫酵母 JMU-MVP14 虾青素合成的主要参数, 即虾青素的体积产率、细胞产率、合成速率、合成比速率等都大于手动间歇调节 pH 的发酵模式。对自动流加控制 pH 值的发酵结果进行动力学分析, 其生长及产物合成动力学如图 3 所示,  $\mu_{\max}$  和  $K_s$  分别为  $0.20 \text{ h}^{-1}$  及  $21.73 \text{ g/L}$  (图 3A); 产物合成的模型可表示为  $q_p=0.74\mu+0.15$  (图 3B), 说明该法夫酵母合成虾青素的模型为部分生长

关联型, 即部分虾青素是在生长时合成的, 而更多的虾青素是在细胞生长后合成的。

### 2.3 7 L 罐补料分批发酵

如图 4 所示, 在发酵过程中补充酵母膏及玉米浆不但不能提高生物量, 相反其生物量还低于只补充葡萄糖时的情况。如图 5 所示, 在发酵过程中只补充葡萄糖液, 总类胡萝卜素的体积产率、总类胡萝卜素的细胞产率、虾青素的体积产率、虾青素的细胞产率都大于同时补充葡萄糖和有机氮源时的对应值。这说明法夫酵母 JMU-MVP14 对氮源及生

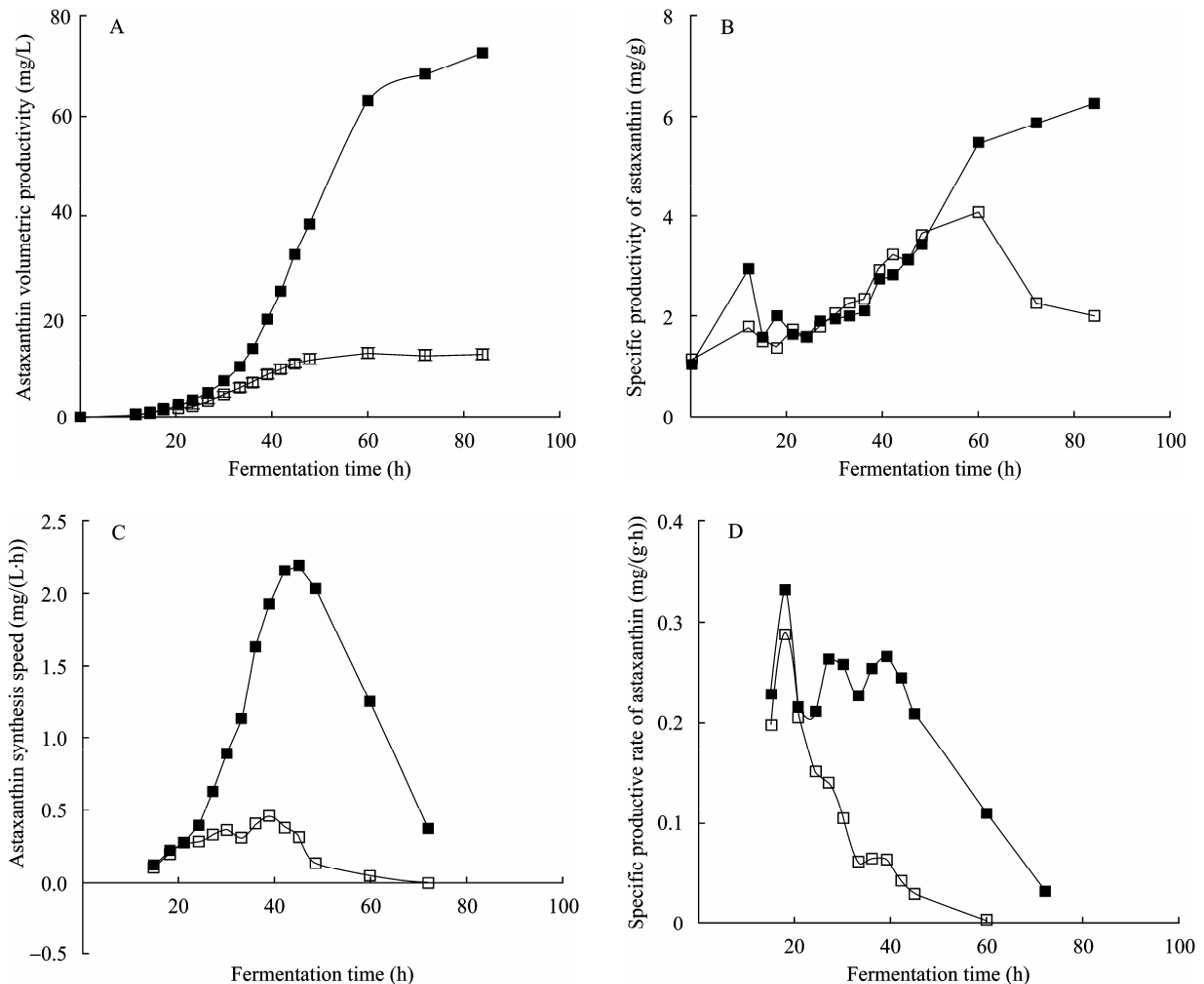


图 2 两种 pH 值控制方式对法夫酵母 JMU-MVP14 虾青素合成的影响

Fig. 2 Effects of the pH value controlling style on the astaxanthin syntheses of *P. rhodomya* JMU-MVP14. (A) The volumetric productivity of astaxanthin. (B) The specific productivity of astaxanthin. (C) The synthesis speed of astaxanthin. (D) The specific productive rate of astaxanthin. The fermented samples by auto-controlling pH value at 6.0 (■); the fermented samples by discontinuously adjusting pH value at 6.0 (□).

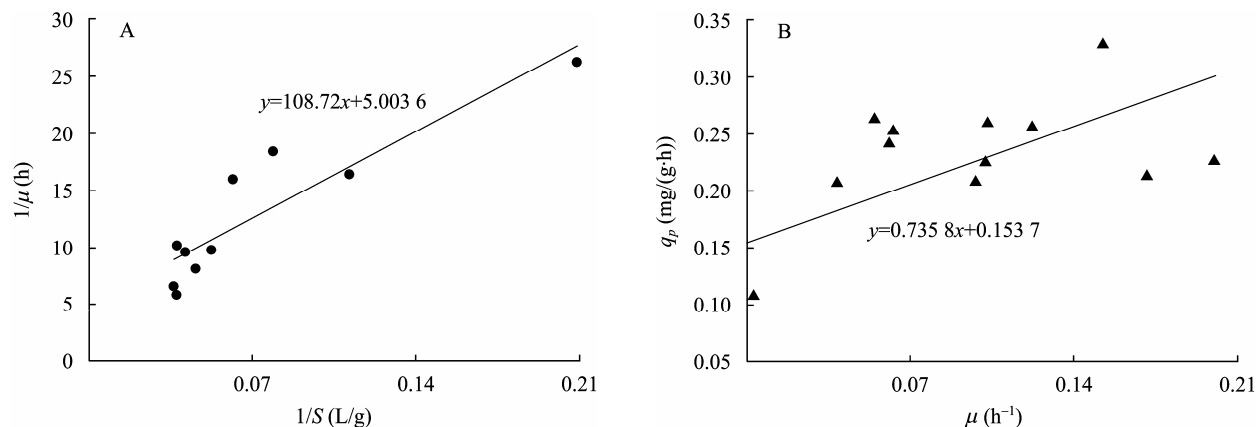


图3 法夫酵母 JMU-MVP14 生长及产物合成动力学分析

Fig. 3 Kinetic analysis of the growth and astaxanthin production of *P. rhodomya* JMU-MVP14. (A) The kinetic model of growth. (B) The kinetic model of astaxanthin synthesis.

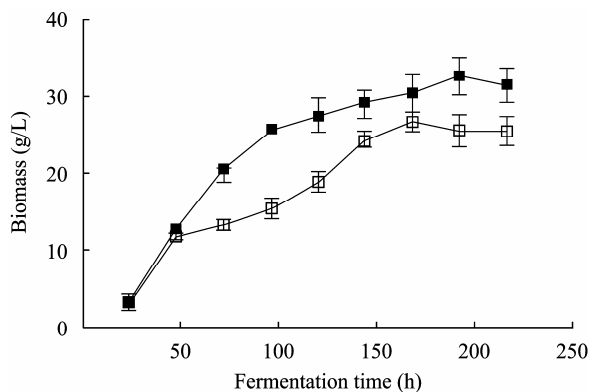


图4 补料培养基对法夫酵母 JMU-MVP14 生长的影响

Fig. 4 Effects of the feeding medium on the growth of *P. rhodomya* JMU-MVP14. The feeding medium containing glucose only (■). The feeding medium containing glucose as well as yeast extract and corn syrup 6.0 (□).

长因子的要求不高, 增加酵母膏及玉米浆的含量并不能提高虾青素的产量, 相反会降低虾青素的产量。在 7 L 罐中进行补料分批发酵, 最大生物量、虾青素体积产率、虾青素细胞产率、总类胡萝卜素体积产率、总类胡萝卜素细胞产率分别达到了 32.81 g/L、155.99 mg/L、4.94 mg/g、399.99 mg/L、12.19 mg/g (图 4~5)。

#### 2.4 1 m<sup>3</sup> 罐分批补料分批发酵

如图 6 所示, 在 1 m<sup>3</sup> 罐中补料分批发酵虾青素, 当初糖耗完后, 葡萄糖浓度一直都维持在相对比较

低的水平; 生物量在发酵前期快速增加, 至发酵后期增加速度变慢; 总类胡萝卜素在整个发酵过程中都快速增加; 虾青素在发酵前期快速增加, 后期增加速度变慢, 虾青素占总色素的百分比一直维持在 47% 左右 (数据未列出); 至发酵终点时, 生物量为 85.11 g/L、虾青素体积产率、总类胡萝卜素体积产率都达到最大, 分别为 279.96 mg/L 及 618.01 mg/L; 此时, 虾青素和总类胡萝卜素的细胞产率分别为 3.29 mg/g 和 7.26 mg/g, 菌体中蛋白质含量为 21.54%, 总糖为 41.34%, 脂肪为 34.31%, 灰分为 1.58% (图 7)。

### 3 讨论

选育优良菌株及提高虾青素的发酵产量是虾青素发酵生产研究的主要课题, 法夫酵母 JMU-MVP14 菌株的虾青素含量远高于目前所报道最好的虾青素生产菌株<sup>[9-10,22,25]</sup>; 其总类胡萝卜素含量接近了 An 等根据荧光量及法夫酵母体积预测的类胡萝卜素含量的极限值 (15 mg/g)<sup>[26]</sup>。该法夫酵母的  $\mu_{max}$  与相关研究结果相近<sup>[27-29]</sup>,  $K_s$  与 Meyer 等的研究结果相近<sup>[25]</sup>, 但高于 Reynders 及本实验室的前期研究结果<sup>[22,29]</sup>。 $\mu_{max}$  及  $K_s$  表明法夫酵母 JMU-MVP14 在高糖浓度下可以快速生长, 明显区别于其他法夫

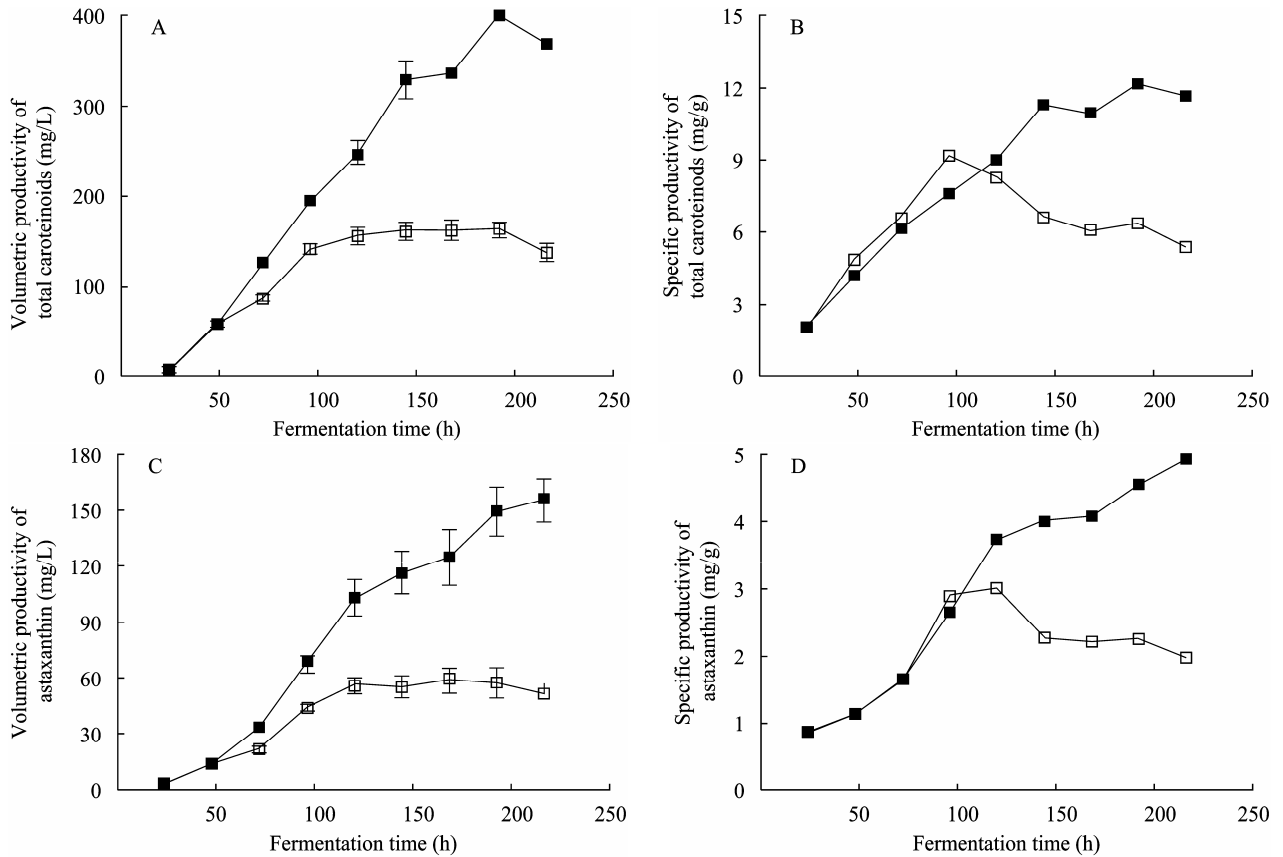


图5 补料培养基对补料分批发酵过程中总类胡萝卜素及虾青素的影响

Fig. 5 Effect of the feed medium on the production of total carotenoids and astaxanthin by batch-fed culture. (A) The volumetric productivity of total carotenoids. (B) The specific productivity of total carotenoids. (C) The volumetric productivity of astaxanthin. (D) The specific productivity of astaxanthin. The feeding medium containing glucose only (■); The feeding medium containing glucose as well as yeast extract and corn syrup 6.0 (□).

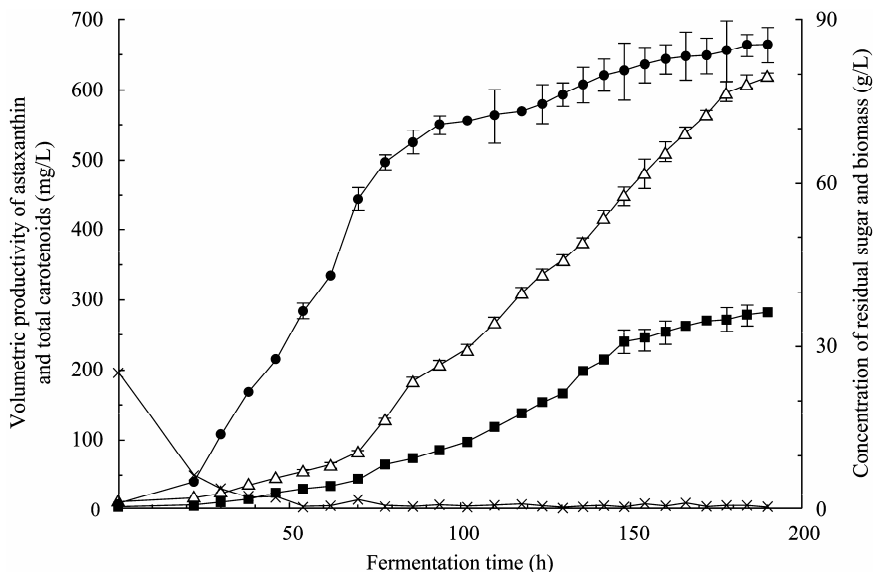


图6 1 m<sup>3</sup> 罐补料分批培养法夫酵母 JMU-MVP14 的结果

Fig. 6 Results of the batch-fed cultivation of *P. rhodomyza* JMU-MVP14 in 1 m<sup>3</sup> fermentor. Volumetric productivity of astaxanthin (■). Volumetric productivity of total carotenoids (△). Biomass (●). Residual sugar (×).



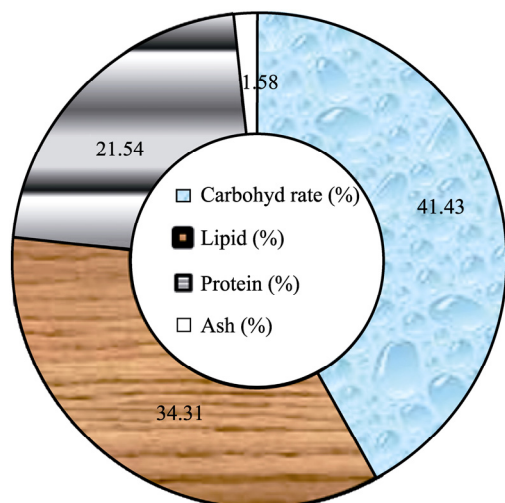


图 7 法夫酵母 JMU-MVP14 菌体的主要成分  
Fig. 7 Main composition of *P. rhodozyma* JMU-MVP14.

酵母菌株所显示的 Crabtree 效应<sup>[29]</sup>。法夫酵母 JMU-MVP14 合成虾青素的模型为部分生长关联型 (图 3B), 与其他报道的虾青素合成模型相似<sup>[30]</sup>, 但其虾青素合成的两个参数 0.74 (表示每生长 1 g 菌体就合成 0.74 mg 虾青素) 及 0.15 (表示每 g 菌体每小时合成 0.15 mg 的虾青素) 都远大于其他报道的菌株<sup>[22,30]</sup>。

虾青素是胞内脂溶性产物, 受细胞容积及脂肪含量的限制及影响, 每个法夫酵母细胞只能合成极有限的虾青素, 虾青素的产量是其细胞产率与法夫酵母生物量的乘积, 要实现虾青素的高产发酵, 不仅要有高产菌株, 还要求建立高密度培养技术, 在保持虾青素细胞产率较高的前提下, 尽可能提高其生物量。前期研究表明, 当培养基中葡萄糖的浓度超过 40 g/L 时, 法夫酵母 JMU-MVP14 菌株的生长速度及细胞得率系数就会显著降低, 因此, 用含有高浓度葡萄糖的培养基进行分批发酵不能获得虾青素的高产, 而采用补料分批发酵的模式, 用葡萄糖浓度较低的初始培养基培养法夫酵母, 当初糖消耗以后, 补充一定浓度的葡萄糖, 控制发酵液中葡萄糖的浓度不超过 40 g/L, 当该部分葡萄糖消耗以后, 继续补充葡萄糖, 如此不断循环, 随着葡萄糖

不断补充到发酵液中, 生物量及虾青素产量将按一定的比例不断增加, 用这种模式进行发酵, 最终可获得很高的生物量及虾青素产量。根据补料分批发酵的理论及前期研究基础, 从以下 3 个方面开展研究: 1) 确定发酵过程中 pH 值的控制模式; 2) 确定补料分批发酵过程中的补料培养基成分; 3) 用 1 m<sup>3</sup> 罐中试测定法夫酵母 JMU-MVP14 及其补料分批发酵虾青素的生产性能, 建立了法夫酵母 JMU-MVP14 菌株罐上高产发酵虾青素的工艺。结果表明采用氨水自动流加的方式调控 pH 值, 用葡萄糖浆为补料培养基相对间歇手动调控 pH 及用葡萄糖、酵母膏、玉米浆组成的补料培养基更有利于虾青素的合成。与摇瓶及 7 L 罐分批发酵相比, 在 7 L 罐及 1 m<sup>3</sup> 罐中进行补料分批发酵, 由于发酵结束时总耗糖量大量增加, 法夫酵母 JMU-MVP14 的生物量大幅度提高, 生物量的提高导致了虾青素的产量 (体积产率) 大幅度提高, 如, 摇瓶发酵、7 L 罐分批发酵、7 L 罐补料分批发酵及 1 m<sup>3</sup> 罐补料分批发酵的生物量分别是 2.75、11.20、32.80、85.11 g/L, 与生物量相对应的虾青素含量分别为 28.45、72.47、155.99、279.96 mg/L。

发酵中试是建立产业化发酵工艺的必要环节, 在 1 m<sup>3</sup> 发酵罐中进行的发酵试验所达到的产量水平具有重要的产业化发酵参考价值。本研究中, 1 m<sup>3</sup> 罐的虾青素产量及生物量都高于 7 L 罐中补料分批发酵的相应值, 说明在小罐中建立的虾青素补料分批发酵工艺容易在中试型发酵罐中得到实现, 只要保持相同的搅拌流型, 采用氨水自动流加控制 pH, 溶氧与转速相偶联控制在 30%~50%, 就可实现在中试罐中高产发酵虾青素。1 m<sup>3</sup> 罐及 7 L 罐中虾青素细胞产率分别为 4.94 mg/g 及 3.29 mg/g, 说明 1 m<sup>3</sup> 罐的虾青素产量比 7 L 罐更高的原因并不是虾青素细胞产率提高引起的, 而是由于生物量的提高所造成的。现代发酵理论表明, 中试型发酵罐与 5 L 或 7 L 罐相比, 其传质条件的改善往往会引起生物量及目标产物浓度的增高, 这是引起 1 m<sup>3</sup> 罐中法夫

酵母 JMU-MVP14 生物量比 7 L 罐大幅度提高的原因, 根据这个规律, 预计在生产型的发酵罐中进行产业化发酵, 该法夫酵母的生物量及虾青素产量还将进一步提高。

本研究结果说明, 用法夫酵母 JMU-MVP14 进行补料分批发酵, 可以实现虾青素高产发酵, 其产量水平达到了产业化发酵生产的要求; 同时, 法夫酵母 JMU-MVP14 菌株还含有大量的其他类胡萝卜素, 其发酵产量可达 300 mg/L 以上, 可通过进一步研究, 将其转化为虾青素或开发其利用价值; 此外, 该法夫酵母还含有丰富的蛋白质、糖类及脂肪, 可从提取虾青素后的菌体中回收这些成分并加以利用; 因此该菌株具有良好的产业化应用前景。

## REFERENCES

- [1] Johnson EA, An GH. Astaxanthin from microbial sources. *Crit Rev Biotechnol*, 1991, 11(4): 297-326.
- [2] Miki W. Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure Appl Chem*, 1991, 63(1):141-146.
- [3] Bjerkgeng B, Peisker M, von Schwartzberg M, et al. Digestibility and muscle retention of astaxanthin in Atlantic salmon, *salmo salar*, fed diets with the red yeast *Phaffia rhodozyma* in comparison with synthetic formulated astaxanthin. *Aquaculture*, 2007, 269(1/4): 476-489.
- [4] Santocono M, Zurria M, Berrettini M, et al. Lutein, zeaxanthin and astaxanthin protect against DNA damage in SK-N-SH human neuroblastoma cells induced by reactive nitrogen species. *J Photochem Photobiol B*, 2007, 88(1): 1-10.
- [5] Andrewes AG, Phaff HJ, Starr MP. Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red-pigmented fermenting yeast. *Phytochemistry*, 1976, 15(6): 1003-1007.
- [6] Johnson EA. *Phaffia rhodozyma*: colorful odyssey. *Int Microbiol*, 2003, 6(3): 169-174.
- [7] Cannizzaro C, Christensen B, Nielsen J, et al. Metabolic network analysis on *Phaffia rhodozyma* yeast using <sup>13</sup>C-labeled glucose and gas chromatography-mass spectrometry. *Metab Eng*, 2004, 6(4): 340-351.
- [8] Chumpolkulwong N, Kakizono T, Nagai S, et al. Increased astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* mutants isolated as resistant to diphenylamine. *J Ferment Bioeng*, 1997, 83(5): 429-434.
- [9] An GH, Jang BG, Cho MH. Cultivation of the carotenoid-hyperproducing mutant 2A2N of the red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) with molasses. *J Biosci Bioeng*, 2001, 92(2): 121-125.
- [10] Sun N, Lee S, Song KB. Characterization of a carotenoid-hyperproducing yeast mutant isolated by low-dose gamma irradiation. *Int J Food Microbiol*, 2004, 94(3): 263-267.
- [11] Johnson EA, Lewis MJ. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. *J Gen Microbiol*, 1979, 115(1): 173-183.
- [12] Liu YS, Wu JY, Ho KP. Characterization of oxygen transfer conditions and their effects on *Phaffia rhodozyma* growth and carotenoid production in shake-flask cultures. *Biochem Eng J*, 2006, 27(3): 331-335.
- [13] Hu ZC, Zheng YG, Wang Z, et al. pH control strategy in astaxanthin fermentation bioprocess by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Enzyme Microb Technol*, 2006, 39(4): 586-590.
- [14] Ni H, Chen QH, Ruan H, et al. Studies on optimization of nitrogen sources for astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma*. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2007, 8(5): 365-370.
- [15] Wang WJ, Yu LJ, Zhou PP. Effects of different fungal elicitors on growth, total carotenoids and astaxanthin formation by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Bioresour Technol*, 2006, 97(1): 26-31.
- [16] Flores-Cotera LB, Martín R, Sánchez S. Citrate, a possible precursor of astaxanthin in *Phaffia rhodozyma*: influence of varying levels of ammonium, phosphate and citrate in a chemically defined medium. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 55(3): 341-347.
- [17] Ni H, Chen QH, He GQ, et al. Optimization of acidic extraction of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2008, 9(1): 51-59.
- [18] Xiao AF, Ni H, Cai HN, et al. An improved process for cell disruption and astaxanthin extraction from *Phaffia rhodozyma*. *World J Microbiol Biotechnol*, 2009, 25(11): 2029-2034.
- [19] Ni H, Xiao AF, Li LJ, et al. Studies on cultivation of *Phaffia rhodozyma* for producing astaxanthin with starch syrup as carbon source. *J Chin Ins Food Sci Technol*, 2009, 9(1): 29-34.

- 倪辉, 肖安风, 李利君, 等. 利用淀粉糖作碳源培养法夫酵母生产虾青素的研究. 中国食品学报, 2009, 9(1): 29-34.
- [20] Luna-Flores CH, Ramírez-Cordova JJ, Pelayo-Ortiz C, et al. Batch and fed-batch modeling of carotenoids production by *Xanthophyllomyces dendrorhous* using *Yucca fillifera* date juice as substrate. *Biochem Eng J*, 2010, 53(1): 131-136.
- [21] Álvarez V, Rodríguez-Sáiz M, de la Fuente JL, et al. The *crtS* gene of *Xanthophyllomyces dendrorhous* encodes a novel cytochrome-P450 hydroxylase involved in the conversion of  $\beta$ -carotene into astaxanthin and other xanthophylls. *Fungal Genet Biol*, 2006, 43(4): 261-272.
- [22] Ni H. Optimization of *Phaffia rhodozyma* cultivation condition, astaxanthin extraction and analysis [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2005.  
倪辉. 法夫酵母虾青素发酵条件的优化及提取与分析研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2005.
- [23] Zhang LX, Zhang TF, Li LY. *Biochemistry Experiment Method and Technology*. 2nd ed. Beijing: Higher Education Press, 1997.  
张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术. 2 版. 北京: 高等教育出版社, 1997.
- [24] AOAC. Horwitz W, ed. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 15th ed. Washington D.C.: American Public Health Association, 1990.
- [25] Meyer PS, Preez JC, Kilian SG. Selection and evaluation of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma*. *World J Microbiol Biotechnol*, 1993, 9(5): 514-520.
- [26] An GH, Suh OS, Kwon HC, et al. Quantification of carotenoids in cells of *Phaffia rhodozyma* by autofluorescence. *Biotechnol Lett*, 2000, 22(12): 1031-1034.
- [27] Vázquez M, Martín AM. Mathematical model for *Phaffia rhodozyma* growth using peat hydrolysates as substrate. *J Sci Food Agric*, 1998, 76(4): 481-487.
- [28] Kusdiyantini E, Gaudin P, Goma G, et al. Growth kinetics and astaxanthin production of *Phaffia rhodozyma* on glycerol as a carbon source during batch fermentation. *Biotechnol Lett*, 1998, 20(10): 929-934.
- [29] Reynders MB. Studies of growth, modelling and pigment production by the yeast *Phaffia rhodozyma* [D]. Rondebosch: University of Cape Town, 1995.
- [30] Liang XL. Biosynthesis of astaxanthin by the yeast *Phaffia rhodozyma*[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2001.  
梁新乐. 法夫酵母生物合成虾青素的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2001.