发夫酵母工业化生产虾青素的培养基研究

汪洪涛[1]，徐学明[2]，金征宇[2]
（1. 江苏经贸职业技术学院食品系，江苏南京 210007）（2. 江南大学食品学院，江苏无锡 214036）

摘要：为进一步降低培养基成本，促进工业化生产，在前期优化的培养基基础上，本研究尝试直接以价廉易得的玉米粉、玉米淀粉、马铃薯淀粉水解液代替葡萄糖作碳源，进行摇瓶发酵实验和 10 L 罐分批发酵实验，探讨了发夫酵母产虾青素工业化培养基的制备。研究发现玉米淀粉水解液可代替葡萄糖作碳源进行工业化生产，并确定了淀粉双酶水解的最佳工艺条件为淀粉糊浓度为 30%、液化酶添加量为 25 U/g 淀粉、糖化酶添加量为 200 U/g 淀粉、糖化时间为 4 h。这样可大大降低培养基成本。

关键词：发夫酵母；虾青素；工业化培养基

文章篇号：1673-9078(2012)8-1021-1024

Industrialized Culture Medium of *Phaffia rhodozyma* for Astaxanthin Production

WANG Hong-tao[1], XU Xue-ming[2], JIN Zheng-yu[2]
(1.Food Department, Jiangsu Vocational College of Economy and Trade, Nanjing 210007, China)
(2.School of Food Science andTechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: In order to further reduce the cost of medium and promote industrialized production,industrialized culture medium of *Phaffia rhodozyma* for astaxanthin synthesis was studied on the base of pre-optimized culture medium，using cheaper corn flour，corn starch and tomato starch hydrolyzate instead of glucose as carbon source. Shake flask culture and 10 liter fermentor culture were used with the mutant 269 of *Phaffia rhodozyma*. Results showed that corn starch hydrolyzate could instead glucose as carbon source in the industrialized production of astaxanthin. The optimal hydrolyzed conditions of com starch were as follows: the concentration of corn starch paste 30%, the concentration of α-amylase 25 U/g starch, the concentration of saccharifying enzyme 200 U/g starch and the saccharifying time 4 hours , under which the cost of culture media could be decrease significantly.

Key words: *Phaffia rhodozyma*; astaxanthin; industrialized culture medium

虾青素（astaxanthin）即 3,3’-二羟基-4,4’-二酮基-β,β’-胡萝卜素，又称虾黄质、虾黄素、龙虾壳色素，分子式为 $C_{40}H_{52}O_4$，是一种非维生素 A 源类胡萝卜素。它不仅具有特殊的着色功能，使鱼类的肉质、虾壳和家禽的表皮及卵黄着色，使其色泽鲜艳[1]，而且还具有高度淬灭单原子氧和清除自由基的作用；抗氧化作用，其抗脂肪氧化的能力比 β-胡萝卜素高 10 倍，比维生素 E 高 100 倍，可有效的防止组织、细胞、和 DNA 被氧化损伤[2]；增强免疫功能[3]；抗癌作用；保护心血管健康等生理功能[4]。虾青素作为功能性色素在医药、食品、饲料及化妆品等工业中具有广阔的应用前景。

高产虾青素发夫酵母菌株的选育对于生产成本控制是很重要的；同时选用最有效、价廉易得的培养基是降低发酵成本的一个重要手段。在前期优化的培养基中，碳源（葡萄糖）是其主要成分，要降低发酵成本，必须用其它物质代替葡萄糖作碳源进行工业化生产。如以桉树木水解液[5]作为碳源已有报道。淀粉是农产品的加工产物，来源广泛，价格低廉；玉米浆是淀粉加工的副产物。本文是在以前优化培养基的基础上，研究直接以来源广泛的马铃薯淀粉和玉米淀粉作为原料，用酶进行水解后直接作为碳源，用玉米浆代替酵母膏来培养发夫酵母合成虾青素，并确定一个最佳水解工艺条件，以期望降低发酵成本，从而为天然虾青素的工业化生产提供一定的指导作用。

收稿日期：2012-05-09

作者简介：汪洪涛（1973-），男，硕士，讲师，研究方向为食品营养与生物技术

1 材料与方法

1.1 菌种

江南大学食品学院实验室保藏的发夫酵母(*Phaffia rhodozyma*)269，其虾青素含量占类胡萝卜素总量的 78%

1.2 培养基

斜面培养基（g/L）：葡萄糖 10，酵母膏 3，蛋白胨 5，麦芽汁（10 °Bx）3，琼脂 20。

种子培养基（g/L）：葡萄糖 10，酵母膏 3，蛋白胨 5，麦芽汁（10 °Bx）3。

发酵培养基（g/L）：淀粉水解液，硫酸铵 5，磷酸二氢钾 2，玉米浆 2，硫酸镁 0.5，氯化钙 0.1，pH 6.0。

1.3 主要试剂及仪器

玉米粉(市购)，玉米淀粉、马铃薯淀粉(无锡山北淀粉厂)，耐高温 α-淀粉酶、液体糖化酶、玉米浆（无锡杰能科生物工程有限公司），3,5-二硝基水杨酸、葡萄糖、磷酸二氢钾、丙酮、二甲基亚砜（分析纯、中国医药集团上海化学试剂公司），超净工作台（上海浦东跃进欣欣科学仪器厂），HYG-2 迴转恒温摇瓶柜（上海新星自动控制设备成套厂），80-2 型离心机（上海手术器材厂），723 分光光度计（上海分析仪器总厂），NC101-2A 电热鼓风干燥箱（南京长江电器仪器），pHS-25C 数字式 pH 计（上海理達仪器厂）。

1.4 试验方法

1.4.1 种子培养方法

从斜面上挑一环菌体于 25 mL 种子培养基/250 mL 摇瓶中，22 ℃，220 r/min 下旋转振荡培养 48 h。

1.4.2 发酵培养

将培养 48 h 的种子培养液按 10%（*V*/*V*）的接种量接种到发酵培养基中（25 mL 培养基/250 mL 摇瓶），22 ℃，220 r/min 下旋转振荡培养 72 h。

1.4.3 双酶法水解淀粉的工艺流程

分别称取适量的马铃薯淀粉和玉米淀粉，将其调成糊后，先添加适量的耐高温 α-淀粉酶，在 95 ℃左右，pH 6.0 下液化 2 h 后，升温灭酶。然后将温度降到 55~60 ℃，pH 4.5 下添加液体糖化酶保温糖化，彻底水解过滤后测滤液的还原糖含量[6]。

1.4.4 菌体生物量的测定

取 10 mL 发酵液于 4000 r/min 下离心 7 min 后，再用蒸馏水洗涤离心三次，于 105 ℃下烘干至恒重，称重，单位 mg/mL。

1.4.5 类胡萝卜素总量的分析

二甲亚砜（DMSO）法[7]：取 2 mL 发酵液，离心后用去离子水洗涤离心三次，加 2 mL 55 ℃的 DMSO 破壁，最后用 5 mL 丙酮提取，在 480 nm 下测其 OD 值，同时用 2 mL DMSO 和 5 mL 丙酮混匀调零。计算公式如下：

类胡萝卜素总量(μg/gCDW)=(A×Va)/(E×G)

或类胡萝卜素总量(μg/mL)=(A×Va)/(E×Vb)

其中 A：吸光度；Va：提取液的体积；E：消光系数（0.16）；G：Vb mL 发酵液的细胞干重（CDW），g。

1.4.6 虾青素含量的测定

HPLC 法[7]。

1.4.7 发酵液残糖的测定

用 3,5-二硝基水杨酸比色法（DNS 法）[8]。

2 结果与讨论

2.1 以玉米粉水解液作碳源对发夫酵母发酵的影响

发夫酵母能在多种碳源上生长，且虾青素浓度变化很大，主要与碳源、营养物的种类和浓度及菌株有关。本次试验在本实验室优化培养基的基础上，尝试直接以玉米粉水解液代替葡萄糖，并添加不同量的玉米浆于 22 ℃，220 r/min 下进行摇瓶发酵 72 h。结果见表 1。

表 1 以玉米粉水解液作碳源对发夫酵母发酵的影响

Table 1 The effect of corn flour hydrolyzate as carbon source on the fermentation of *Phaffia rhodozyma*

玉米浆的含量/%	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
类胡萝卜素总量/(μg/mL)	11.99	14.7	14.15	14.07	14.37	13.54
生物量/(mg/mL)	11.36	9.44	9.58	9.8	9.44	9.92
发酵残糖/(mg/mL)	0.3	0.59	0.43	0.5	0.597	0.64

注：由于 269 菌株所产虾青素含量占类胡萝卜素总量的 78%，故在分析时均以类胡萝卜素总量计。

由表 1 可知，当用玉米粉水解液作碳源时，通过添加不同量的玉米浆，测得类胡萝卜素最大含量为 14.7 μg/mL，而在相同的条件下用葡萄糖作碳源，测得类胡萝卜素最大含量为 16.8 μg/mL，且直接用玉米粉水解，葡萄糖得率很低，故直接以玉米粉水解液作碳源，效果不是很好。

2.2 不同淀粉水解液作碳源对发夫酵母发酵的影响

为了在一定的条件下具有可比性，培养基的其它成分不变，分别用价廉易得的马铃薯淀粉水解液和玉米淀粉水解液代替葡萄糖作碳源，其还原糖含量均为 3%，并以葡萄糖作对照进行发酵试验，结果如表 2。

表 2 不同淀粉水解液作碳源对发夫酵母发酵的影响

Table 2 The effect of different starch hydrolyzate as carbon source on the fermentation of *Phaffia rhodozyma*

碳源	葡萄糖	马铃薯淀粉水解液	玉米淀粉水解液
生物量/(mg/mL)	12.3	12.28	12.5
类胡萝卜素总量/(μg/mL)	15	14.61	14.83
发酵残糖/(mg/mL)	0.51	0.75	0.78

由表 2 可知，用玉米淀粉水解液和马铃薯淀粉水解液作碳源所得结果与葡萄糖作碳原相比，相差不大。因淀粉水解液的主要成份为葡萄糖，另外还有少许二糖和极限糊精。在另外添加适量其它营养物质后，可

被 269 菌株利用生产虾青素。因玉米淀粉较马铃薯淀粉来源广，价格低，且水解后葡萄糖得率比马铃薯淀粉高。故实际生产中可以用玉米淀粉水解液代替葡萄糖进行工业化生产。

2.3 玉米淀粉最佳双酶水解工艺条件的研究

从上面的研究结果得知可以用玉米淀粉水解液代替葡萄糖作碳源，但在工业化生产中，为了降低发酵成本，应对双酶法水解工艺进行研究，以确定一个最佳水解工艺条件。

2.3.1 淀粉液化工艺条件的研究

液化型淀粉酶（俗称 α-淀粉酶）能将淀粉分子链的 α-1,4-糖苷键任意切断成长短不一的短链糊精以及少量的麦芽糖和葡萄糖，而使淀粉对碘呈蓝紫色的特异反应逐渐消失，糊精分子小到一定程度时，遇碘不再变色，称为“消色点”作为液化反应的终点，记录反应时间。在淀粉的液化反应中，淀粉乳浓度和液化酶的添加量是影响液化效果的两个重要因素。液化反应的因素与水平安排见表 3，液化温度取 95 ℃，pH 值 6.0。试验结果见表 4、表 5。

表 3 正交试验因素水平表

Table 3 Orthogonal experiment level

水平	因素	
	A (淀粉浓度/%)	B [液化酶添加量/(U/g 淀粉)]
1	20	5
2	30	15
3	40	25

表 4 正交试验结果

Table 4 The result of the orthogonal experiment

试验号	因素		液化时间/min
	A	B	
1	1	1	89
2	1	2	55
3	1	3	34
4	2	1	155
5	2	2	85
6	2	3	50
7	3	1	190
8	3	2	120
9	3	3	79
K_1	178	434	$\sum x_i$=857
K_2	290	260	$\sum x_i^2$=102593
K_3	389	163	
$\sum K_i^2$	267105	282525	
Q	7429.6	12569.6	
R	211	271	

表 5 正交试验方差分析结果

Table 5 The variance analysis result of the orthogonal experiment

项目	平方和	自由度	平均平方和	F	显著性
A	7429.6	2	3714.8	15.03	*
B	12569.6	2	6284.8	25.43	**
误差	988.4	4	247.1		
总和	20987.6	8			

注：$F_{0.10(2,4)}$=4.32，$F_{0.05(2,4)}$=6.94，$F_{0.01(2,4)}$=18.00。

由表 5 可知，液化酶添加量对淀粉液化反应影响特别显著，液化反应随着液化酶添加量的增加而加快；淀粉乳浓度对液化反应影响显著，淀粉乳浓度越低，液化反应越快。但低浓度的淀粉乳会降低设备的效率。在成本允许的前提下，应加大液化酶用量和用低浓度的淀粉乳来进行液化反应，可以节约反应时间，提高效率。本文选取的液化优化条件为：淀粉乳浓度 30%，液化酶添加量为 25 U/g 淀粉。

2.3.2 淀粉糖化工艺的研究

在液化工序中，淀粉经 α-淀粉酶水解成糊精和低聚糖范围较小分子产物，糖化是利用葡萄糖淀粉酶进一步将这些产物水解成葡萄糖。淀粉乳的浓度、糖化酶添加量、糖化时间是糖化反应研究的三个重要因素。在液化优化条件确定的情况下，淀粉乳的浓度就确定了。所以在糖化反应阶段只考虑糖化酶添加量、糖化时间对反应的影响。试验中糖化酶取三个水平：100 U/g 淀粉、200 U/g 淀粉、300 U/g 淀粉，糖化温度为 60 ℃，pH 值取 4.5，不定时取样测定还原糖含量，结果见表 6。

表 6 糖化酶用量和糖化时间与 DE 值的关系

Table 6 The relation of glucoamylase dosage, saccharification time and DE value

加酶量/	糖化时间/h							
(U/g 淀粉)	0	1	2	3	4	5	6	7
100	36.1	67.4	81.7	85.6	86.4	88.5	90.9	92
200	36.1	80.5	88.2	94.6	96.2	96.5	97.1	97.4
300	36.1	84.3	88.8	96.1	96.7	97.1	97.9	97.5

加酶量/	糖化时间/h							
(U/g 淀粉)	8	9	10	11	12	24	26	28
100	93.7	94.6	95.3	95.8	95.7	98	98.5	98.7
200	97.8	97.2	97.1	97.9	97.8	98.6	97.9	97.6
300	97.5	97.6	96.9	97.9	98	97.5	97.5	97.4

由表 6 可知，当加入糖化酶后，淀粉糖液的葡萄糖值迅速增加，经过一段时间后，糖液的葡萄糖值趋于稳定。糖化酶添加量 200 U/g 淀粉与 300 U/g 淀粉的糖化效果差异很小，但比添加量为 100 U/g 淀粉酶的糖化时间明显短。从缩短时间，提高生产效率的角度出

发，选取糖化酶添加量为200 U/g 淀粉。在此添加量下，前 4 h 糖化反应的 DE 值增加较快，已达 96.2%，但 4 h 后 DE 值增加缓慢，且随着糖化时间的逐渐延长，部分糖会发生复合反应。故在实际生产过程中，只要糖化 4 小时即可，这样可以大大的提高生产效率。

2.4 10 L 发酵罐分批发酵验证试验

根据上述最佳工艺条件并以葡萄糖作碳源进行对照，培养基其它成分不变，在 22 ℃，搅拌转速为 300 r/min，通气量为 6 L/min 的条件下进行 10 L 罐分批发酵试验(装液量为 6 L)，结果见图 1~4。

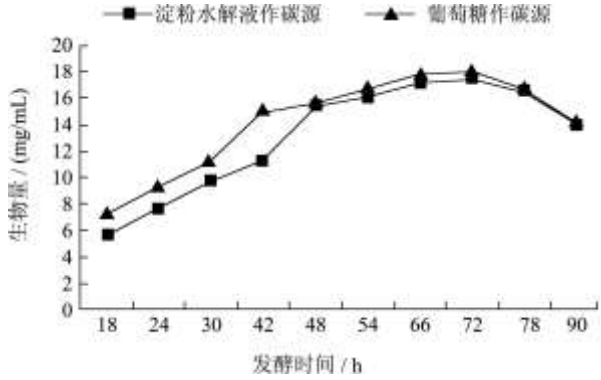


图 1 不同碳源对发夫酵母生物量的影响

Fig.1 The effect of carbon sources on *Phaffia rhodozyma* biomass

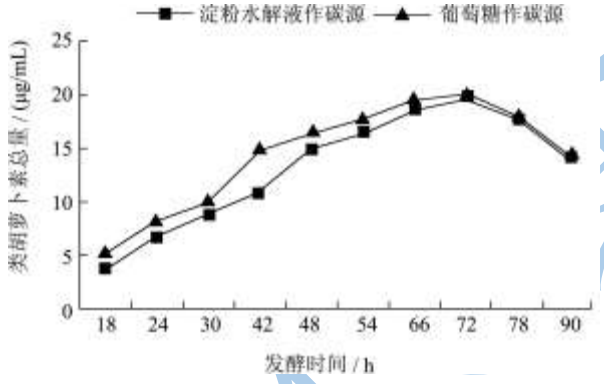


图 2 不同碳源对发夫酵母类胡萝卜素总量的影响

Fig.2 The effects of different carbon sources on *Phaffia rhodozyma* total carotenoid

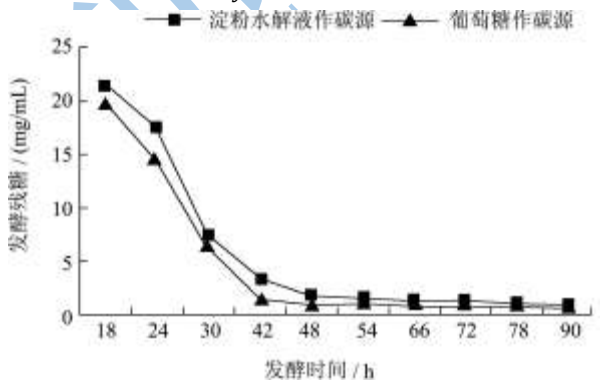


图 3 不同碳源对发夫酵母发酵残糖的影响

Fig.3 The effect of different carbon sources on *Phaffia rhodozyma* fermentation residual sugar

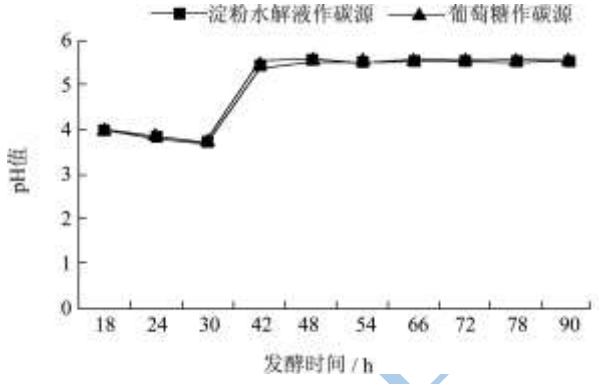


图 4 不同碳源对发夫酵母发酵液 pH 的影响

Fig.4 The effect of different carbon sources on *Phaffia rhodozyma* fermentation pH

由图 1~4 可知，虽然以玉米淀粉水解液作碳源时，在开始 42 h 内类胡萝卜素总量和生物量比以葡萄糖作碳源时上升得较慢，但两者均在 72 h 内类胡萝卜素总量和生物量达到最大值，且数值相差较小。另外对发酵残糖和 pH 的影响几乎一致，故进一步证明了在工业化生产中可以用玉米淀粉水解液代替葡萄糖作碳源。

3 结论

3.1 通过对以玉米粉、马铃薯淀粉和玉米淀粉水解液为底物进行法夫酵母 269 菌株生长与虾青素合成的研究，得出在工业化生产中玉米淀粉水解液最适合代替葡萄糖作为碳源，被发夫酵母利用进行虾青素的生物合成，这样可以大大的降低发酵成本。

3.2 通过对双酶法水解工艺条件的研究，得出工业化生产中双酶法水解玉米淀粉的最佳工艺条件为：淀粉乳浓度 30%，液化酶添加量为 25 U/g 淀粉；糖化酶添加量为 200 U/g 淀粉，糖化时间为 4 h，这样可大大提高设备的利用效率。

参考文献

[1] Meyers S P. Developments in world aquaculture feed formulations and role of carotenoids [J]. Pure & Appl. Chem., 1994,66: 1069-1076

[2] Cross, et al. Oxygen radicals and human disease [J]. Ann. Intern. Med., 1987, 107: 526-545

[3] Chew B P, Park J S, et al. A comparison of the anticancer activities of dietary β-carotene, canthaxanthin and astaxanthin in mice in vivo [J]. Anticancer Res. 1999, 19: 1849-1853

[4] Tanaka T, et al. Chemoprevention of rat oral carcinogenesis by naturally occurring xanthophylls: astaxanthin and canthaxanthin [J]. Cancer Res., 1995, 55: 4059-4064

[5] J M Cruz. Improved astaxanthin production by Phaffia Rhodozyma growing on enzymatic wood hydrolysates

containing glucose and cellobiose [J]. Food Chemistry , 1998, 63: 479-484

[6] 王燕主编.食品检验技术（理化部分）[M].中国轻工业出版社,2008

[7] Sedmak J. Extraction and quantitation of astaxanthin from Phaffia rhodozyma [J]. Biotechnology Techniques, 1990, 4(2): 107-112

[8] 张龙翔,张庭芳,李令媛.生化试验方法和技术[M].人民教育出版社,1983

现代食品科技