

# CHU-R 菌株产虾青素的发酵工艺研究

谭颖嫦<sup>1</sup>, 廖美德<sup>2</sup>, 秦鹏<sup>1</sup>, 夏枫耿<sup>1</sup>

(1. 广州市微生物研究所, 广东广州 510663) (2. 华南农业大学资源环境学院, 广东广州 510642)

**摘要:** 本文通过对获得的虾青素产生菌 CHU-R 进行最佳培养基、培养温度、接种量、初始 pH 等发酵工艺参数的优化研究, 得到 CHU-R 菌产虾青素的最佳培养基为: 6%蔗糖、1%糖蜜、0.5%硫酸铵、0.3% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.05% KI、0.05% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 50 L 罐最适发酵工艺条件为: 温度 28 °C, 通风量 1:0.1~0.15 (V/V/min), 初始转速 120 r/min、罐压 0.05~0.08 MPa、装液量 30 L、初始 pH 6.8~7.0、接种量 6%, 发酵过程维持溶氧量在 40~60%之间。由此得到的虾青素含量近达 23 mg/g 干菌体重。

**关键词:** CHU-R; 虾青素; 发酵; 乳杆菌

文章编号: 1673-9078(2012)3-289-291

## Fermentation of CHU-R for Astaxanthin Production

TAN Ying-chang<sup>1</sup>, LIAO Mei-de<sup>2</sup>, QIN Peng<sup>1</sup>, XIA Feng-geng<sup>1</sup>

(1. Guangzhou Microbiology Institute, Guangzhou 510663, China)

(2. College of Natural Resource and Environment, South China Agriculture University, Guangzhou 610642, China)

**Abstract:** The fermentation process parameters of CHU-R, such as medium, incubation temperature, inoculation, etc. were discussed in this paper. It was found that the best medium formulas was: 6% sucrose, 1% molasses, 0.5% ammonium sulfate, 0.3% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05% KI, and 0.05% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O. The optimum fermentation conditions in 50 L fermenter were: temperature 28 °C, ventilation 0.1~0.15 (V/V/min), the initial speed of 120rpm, tank pressure 0.05~0.08 MPa, liquid volume 30 L, the initial pH 6.8~7.0 and inoculum size 6%, the fermentation process to maintain dissolved oxygen at 40~60%. The results showed that the CHU-R yield pigment nearly reached 23 mg/g of its dry weight fermented in 50 L fermenter.

**Key words:** CHU-R; astaxanthin; fermentation; lactobacillus

虾青素 (astaxanthin) 是一种萜烯类化合物, 全称为 3,3'-二羟基-4,4'-二酮基- $\beta,\beta$ -胡萝卜素, 属于酮类胡萝卜素。它具有很强的抗氧化功能, 能清除体内由紫外线照射产生的自由基, 调节降低这些由光化学引起的伤害, 对紫外线引起的皮肤癌有很好的治疗效果<sup>[1]</sup>, 是目前唯一能在生物体内能通过血脑屏障清除脑部自由基的抗氧化剂<sup>[2]</sup>。此外, 新近研究表明, 虾青素还具有抑制氯化汞<sup>[3]</sup>、环磷酰胺等毒物引起的细胞毒性<sup>[4]</sup>, 在降低心血管患者的氧化应激和感染<sup>[5]</sup>方面具有良好的功效。雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*) 和红发夫酵母 (*Phaffia rhodozyma*) 是目前普遍用来生产商业生物源虾青素的主要生物, 其中雨生红球藻产量可达 20 mg/g 干重, 但培养时间长达 3 周, 培养过程中需强光照和高于 30 °C 温度条件才能大量积累虾青素<sup>[6]</sup>; 红发夫酵母易于大规模培养, 培养周期 96 h, 但虾青素产量只有 1.2~2.0 mg/g 干重, 且积

收稿日期: 2011-12-22

基金项目: 广州市科技支撑项目 (2010Z1-E361)

作者简介: 谭颖嫦 (1979-), 女, 工程师, 从事食品、生物发酵、分离纯化等研究

累虾青素培养时需要 20 °C 左右的低温<sup>[7-9]</sup>, 这些都在一定程度上制约了其生产和应用。CHU-R 菌株是本课题组自行分离获得的一虾青素产生菌, 经 16 SrRNA 序列分析结果表明, 该菌株为乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 细菌。本研究欲通过对该菌株的培养基和培养温度、接种量、初始 pH 等发酵工艺条件进行优化研究, 以确定 50 L 罐的发酵培养条件, 为大规模生产虾青素奠定基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

##### 1.1.1 菌种

CHU-R, 由本课题组自行分离获得。

##### 1.1.2 培养基

基础培养基: 碳源 2%, 氮源 1%, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.3%, KI 0.05%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%; 碳源: 葡萄糖、蔗糖、低聚果糖、糖蜜; 氮源: 大豆蛋白胨、酵母粉、牛肉膏、硫酸铵。

##### 1.1.3 主要仪器与设备

培养箱、三角瓶、高压灭菌锅、分光光度计、天

平、pH计、离心机、恒温摇床等

### 1.2 试验方法

从斜面挑一环于液体培养基活化后，转接发酵培养基于适当温度、转速下培养，测定 OD<sub>600</sub>、虾青素含量，每个试验做三个平行。

### 1.3 虾青素含量的测定方法

将培养液 4000 r/min 离心 15 min，去上清液，菌体用无菌水重复洗 2~3 次，洗去菌体中残留的培养基；然后加入 95%酒精搅匀、离心，去上清液，重复脱水 1 次；待酒精挥发完全后，加入相当于沉淀 5 倍体积的二甲基亚砜，搅拌均匀后于 65 °C 水浴 60 min，再加入 5 mL 丙酮，摇匀提取 3 min，离心，取上清液，以丙酮为对照，在波长 480 nm 下测定 OD 值，代入标准曲线得虾青素含量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 最佳培养基的确定

#### 2.1.1 最佳碳源的确定

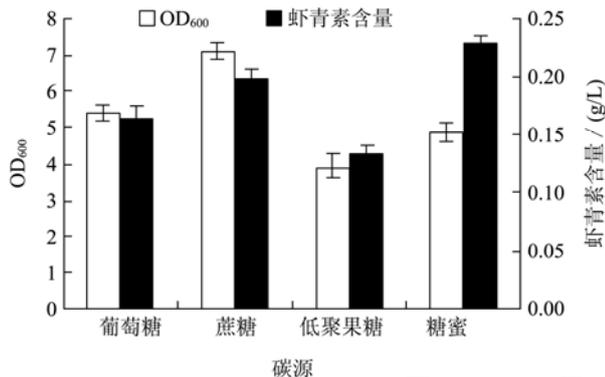


图1 不同碳源培养结果

Fig.1 Effect of carbon sources on astaxanthin production

以大豆蛋白胨为固定氮源，分别以葡萄糖、蔗糖、低聚果糖、糖蜜为碳源作摇瓶培养，测定 OD<sub>600</sub> 和虾青素含量，结果见图 1。从图 1 可以看出，以蔗糖为碳源的发酵液 OD<sub>600</sub> 最高，说明以蔗糖为碳源菌体均生长得比较好；而对于虾青素含量来说，则糖蜜的比较高。综合考虑菌体生长和虾青素产量的需要，选取蔗糖和糖蜜做混合碳源。

#### 2.1.2 最佳氮源的确定

以蔗糖为固定碳源，分别以大豆蛋白胨、酵母粉、牛肉膏、硫酸铵为氮源作摇瓶培养，测定 OD<sub>600</sub> 和虾青素含量，结果见图 2。从图 2 可以看出，四组试验的 OD<sub>600</sub> 相差不大，说明这四种氮源对菌体的生长影响不大。以硫酸铵为氮源的发酵液虾青素含量明显高于其他三组，故选取硫酸铵为氮源。

#### 2.1.3 最佳碳、氮源配比的确定

以蔗糖、糖蜜、硫酸铵为因素，设计三因素三水

平 L<sub>9</sub>(3<sup>3</sup>) 正交试验，以确定最佳碳、氮源配比。

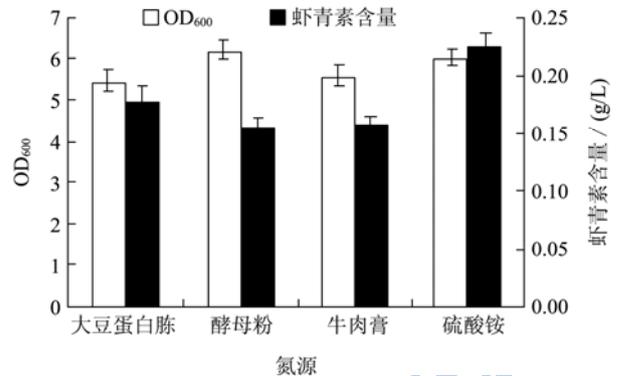


图2 不同氮源培养结果

Fig.2 Effect of nitrogen sources on astaxanthin production

表1 因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平	因素		
	A 蔗糖/%	B 糖蜜/%	C 硫酸铵/%
1	2	0.5	0.5
2	4	1.0	1.0
3	6	1.5	1.5

表2 正交试验及结果

Table 2 Results of the orthogonal test

试验号	A	B	C	虾青素含量/(g/L)
1	1	1	1	0.274
2	1	2	2	0.282
3	1	3	3	0.245
4	2	1	2	0.334
5	2	2	3	0.302
6	2	3	1	0.319
7	3	1	3	0.405
8	3	2	1	0.464
9	3	3	2	0.388
K <sub>1</sub>	0.801	1.013	1.057	
K <sub>2</sub>	0.955	1.048	1.004	
K <sub>3</sub>	1.257	0.952	0.952	
R	0.456	0.096	0.105	

由极差分析可知，R<sub>A</sub>>R<sub>C</sub>>R<sub>B</sub>，即蔗糖对虾青素产量的影响最显著，硫酸铵次之，糖蜜影响最小。从表 2 可以看出，最佳组合是 A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>1</sub>，即最佳碳、氮源配比为：6%蔗糖+1%糖蜜+0.5%硫酸铵。

### 2.2 最适培养温度的确定

把摇瓶分别置于 25 °C、28 °C、30 °C、35 °C 下培养，发现在 25 °C 和 28 °C 下菌体生长和产虾青素的能力都较好，30 °C 次之，35 °C 最差，说明低温有利于该菌体的生长和虾青素的合成。鉴于 25 °C 和 28 °C 下培养的结果相差不大，考虑到能源节约问题，选取

28 °C为发酵培养温度。具体结果见图3。

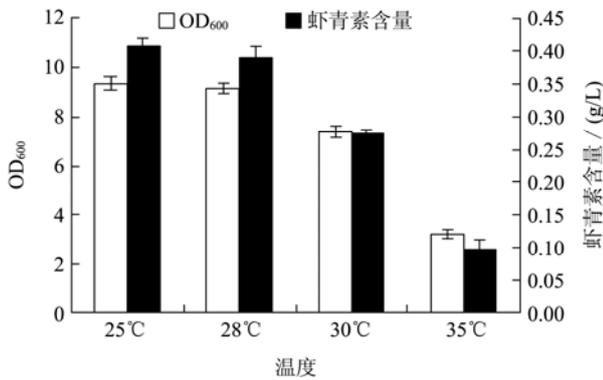


图3 不同温度培养结果

Fig.3 Effect of fermentation temperature on astaxanthin production

2.3 最适接种量的确定

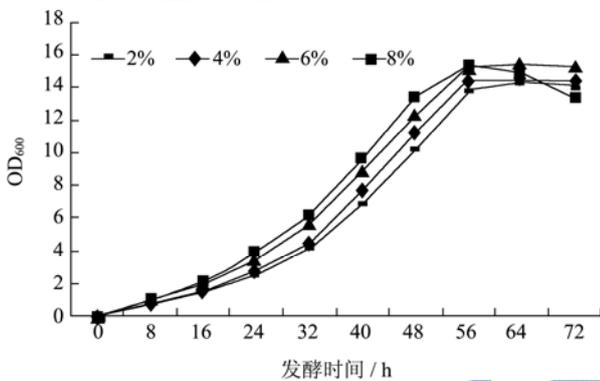


图4 不同接种量培养结果

Fig.4 Effect of inocula size on astaxanthin production

分别以 2%、4%、6%、8%的接种量接种，测定 OD<sub>600</sub>，结果见图4。从图4结果可见，接种量越高，菌体生长越快；但当增大到 8%的时候，菌体的衰退也较快，产虾青素的能力必定也随之下降，故选取 6%的接种量。另外，从图中曲线还可以看出，菌体的发酵周期约为 54~56 h。

2.4 最适初始 pH 值的确定

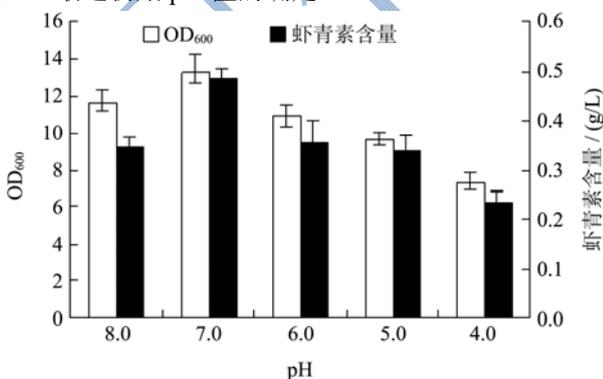


图5 不同初始 pH 培养结果

Fig.5 Effect of initial pH on astaxanthin production

调节培养基初始 pH 值至 8.0、7.0、6.0、5.0、4.0 进行试验。结果显示，初始 pH 为 7.0 时，OD<sub>600</sub> 和虾

青素含量都比较高，pH 8.0、6.0、5.0、4.0 的效果都不是太好，故选取 7.0 为菌体培养的初始 pH。

2.5 最适转速的确定

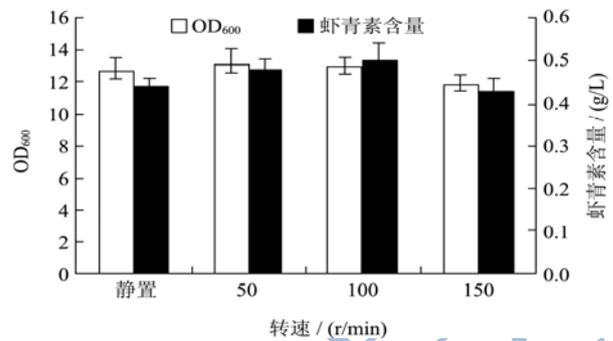


图6 不同培养条件培养结果

Fig.6 Effect of different culture conditions on astaxanthin production

在 500 mL 三角瓶中装入 200 mL 培养基，分别于 50 r/min、100 r/min、150 r/min 和静置条件下进行培养，发现在 50 r/min 和 100 r/min 条件下，OD<sub>600</sub> 和虾青素含量均较高，说明少量的空气有利于该菌体的生长和虾青素的合成，故在发酵罐培养时应适当通入空气和调节转速，以满足菌体需要。

2.6 50 L 罐扩大试验

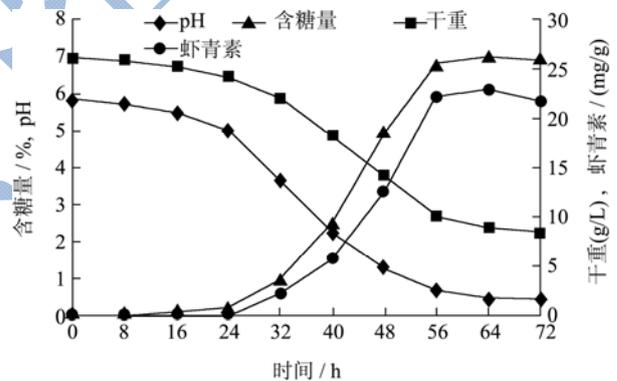


图7 50 L 罐发酵培养结果

Fig.7 Result of fermentation in 50 L fermenter

根据以上试验结果，对培养条件进行适当扩大和转换，进行 50 L 罐发酵扩大培养。通过多罐次试验，确定 50 L 罐的发酵条件为：温度 28 °C，通风量 1:0.1~0.15 (V/V/min)，初始转速 120 rpm，罐压 0.05~0.08 MPa，装液量 30 L，初始 pH 6.8~7.0，接种量 6%，发酵过程维持溶氧量在 40~60%之间。由此得到的菌体干重达 26 g/L，虾青素含量近达 23 mg/g。从图7还可以看出，菌体在前 24 h 生长缓慢，24~56 h 进入对数生长期，菌体快速增长，同时虾青素也集中在这个时期积累，色素的积累与菌株的生长曲线基本相近，呈偶联关系。56~64 h 生长趋缓，64 h 后开始自溶，因此，考虑在 56~64 h 之间放罐。

3 结论

3.1 通过一系列的培养基、培养条件优化试验,确定 CHU-R 菌株产虾青素的最佳培养基配方为: 6%蔗糖, 1%糖蜜, 0.5%硫酸铵, 0.3%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.05% KI, 0.05%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。通过多罐次试验, 确定 50 L 罐发酵条件为: 温度 28 °C, 通风量 1:0.1~0.15(V/V/min), 初始转速 120 r/min, 罐压 0.05~0.08 MPa, 装液量 30 L, 初始 pH6.8~7.0, 接种量 6%, 发酵过程维持溶氧量在 40~60%之间。由此得到的菌体干重达 26 g/L, 虾青素含量近达 23 mg/g。

3.2 本研究得到的虾青素产量与雨生红球藻的虾青素产量相当, 但培养时间大大缩短, 仅需 56~64 h, 且培养温度只需 28 °C, 可降低能耗, 适合大规模生产, 故具有较大的研究开发意义。

#### 参考文献

- [1] 王业勤,李勤生.天然类胡萝卜素[M].北京:中国医药科技出版社,1997
- [2] 汪洪涛,徐学明,金征宇.虾青素的生物来源及其生理功用[J].食品科技,2003,2:72-75
- [3] P R Augusti, G M M Conterato, et al. Effect of astaxanthin on kidney function impairment oxidative stress induced by mercuric chloride in rats [J]. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46: 212-219
- [4] 刘安军,马天娇,陈影,等.虾青素对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用[J].现代食品科技,2010,26(11):1197-1199
- [5] Fredric J Pashkow, MD David G Watumull, et al. Astaxanthin: A Novel Potential Treatment for Oxidative Stress and Inflammation in Cardiovascular Disease [J]. The American Journal of Cardiology, 2008, 101(10): S58-S68
- [6] 沈建新,韦金河.用雨生红球藻生产生产虾青素的研究进展及其产业化现状[J].江苏农业科学,2007,3:197-199
- [7] 鲁明波,朱疑,周蓬蓬,等.两阶段法培养红发夫酵母生产虾青素[J].食品与发酵工业,2007,8:65-67
- [8] 朱晓立,裘晖,邓毛程,等.红发夫酵母生产虾青素的培养基优化[J].食品与发酵工业,2008,2:61-64
- [9] 蔡颖,邢向英,董庆霖.氮和磷对红发夫酵母突变株 sp12 生长和虾青素合成的影响[J].安徽农业科学,2009,9:3980-3982