

红发夫酵母培养产虾青素的工艺研究

蔡焱湘 张梓龙 颜 静 戴 韬 唐建洲

长沙学院生物与环境工程学院 湖南 长沙 410022

【摘要】 虾青素具有多种生理活性，在医药、美容、饲料添加等方面均有广泛的应用，其抗氧化性在目前发现的天然抗氧化剂中是最强的。虾青素的前景市场广大，是目前研究的热点，然而，利用雨生红球藻提取虾青素的成本很高，红发夫酵母发酵生产虾青素的产量又很低。因此，本文先以发酵培养时间、接种量、豆粕发酵液和胡萝卜汁比例为单因子进行实验，最后正交实验以期获得一个最佳的提高红发夫酵母虾青素产量的发酵工艺。结果表明：实现最大的虾青素产量的单因子水平为：发酵培养102h、接种量10%、豆粕发酵液10%、胡萝卜汁8%。正交实验在发酵时间90h、接种量12%、豆粕发酵液8%、胡萝卜汁8%条件下收获最大的生物量和虾青素产量分别为9.4g/L、786.26 μg /mL。结论：最佳的提高虾青素产量的发酵工艺为发酵时间90h、接种量12%、豆粕发酵液比例8%、胡萝卜汁比例8%。

【关键词】 虾青素；红发夫酵母；发酵工艺

虾青素 (Astaxanthin) 属于类胡萝卜素的一种，是一种萜烯基团类不饱和化合物，含有多个共轭双键，在自然条件下虾青素由部分藻类、微生物和浮游生物产生。具有高效的抗氧化性，是维生素E的几百倍，能够增强机体免疫功能和巨噬细胞吞噬功能，并且能抑制肿瘤的产生。虾青素能有效防止脂类的紫外光氧化，从而保护眼睛和皮肤组织。其还具有消炎作用，能够提高动物繁殖能力和存活率。虾青素可以有效治疗脊髓损伤、Parkinson 综合征、Alzheimer 综合征等中枢神经系统疾病。

自然中的虾青素是部分藻类、细菌和浮游生物的次级代谢产物。利用虾青素的生物来源生产虾青素，一是利用藻类生产；二是利用酵母发酵生产，红发夫酵母发酵生产虾青素是目前研究的重点方向。发酵法生产的虾青素天然无污染，但成本较高、培养环境要求高和产量低。

目前市面上的虾青素大多数是由化学合成的，但人工合成的虾青素缺少生物活性，其只能在经济动物的饲料中添加，且动物吸收，转化的效率极低。药用的虾青素为雨生红球藻提取和红发夫酵母发酵生产，雨生红球藻时所有能合成虾青素的物种中虾青素含量最高的物种，但其培养周期长，虾青素存在于其厚壁孢子中，其破壁提取率低，成本高。虾青素虽然也能够通过红发夫酵母发酵生产，但酵母内虾青素的含量较低。目前国内外微生物发酵生产虾青素普遍采用的真菌。红发夫酵母可利用多种糖作为碳源发酵生产虾青素，细胞代谢快，可实现高密度培养；生产周期短，成本低，天然无污染；细胞壁容易破碎，生产的虾青素为有生物活性的反式结构。本文研究不同发酵原料和发酵条件对红发夫酵母发酵生产虾青素的影响，优化发酵工艺降低生产成本，为虾青素的生产提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 酵母菌株

红发夫酵母 *Phaffia rhodozyma*，长沙学院营养与调控重点实验室保存。

1.1.2 培养基及主要试剂

YPD 培养基 (美国)、虾青素标准品 (sigma 公司)、液相色谱流动相 (国产)

1.2 仪器设备

超净工作台 (SW-CK-2F)、生化培养箱 (微电脑控制 LRH-180)、AP-01P 真空泵、岛津高效液相色谱系统 (CBM-10A)、反相柱 (YWG C18)。

1.3 实验方法

1.3.1 菌种活化及种子扩大培养

红发夫酵母的活化与扩大培养：在超净工作台中，取一环菌种，划线接种于斜面试管培养基上，20℃恒温培养3-4天。：用接种环取一环已经活化的菌种接种于装有30 mL 种子培养基中，放入20℃摇床160 r/min 培养48小时后，以10%的接种量接入发酵培养基中，置于160 r/min，28℃摇床培养。

1.3.3 酵母生物量的测定

取10 mL 培养液，4000 r/min、4℃离心8 min，倒掉上清液，蒸馏水洗涤，重复两次后，将菌体移入预先干燥至恒质量为M的称量瓶中，置于电热恒温鼓风干燥箱中，105℃干燥至恒重（至少24h），称量称量瓶和菌体总质量M₀，生物量计算公式：

$$\text{生物量 } w(\text{g/L}) = \frac{1000 \times (M_0 - M)}{10}$$

1.3.4 虾青素提取、测定

1.3.4.1 虾青素的提取

采用酸热法破碎酵母细胞。取5 mL 发酵液培养液于离心管中，4000 r/min、4℃离心8 min，蒸馏水离心洗涤2次，倒去上清。加入3 mol/L的盐酸5 mL，混匀，沸水浴3 min，迅速冷却，蒸馏水洗涤次。离心去上清，加入5 mL 甲醇，暗处振荡提取30 min，离心，上清液即为虾青素提取液，冰箱避光冷藏保存。

1.3.4.2 虾青素的测定

高效液相色谱法测定虾青素含量。配置0.05、0.02、0.5、0.8、1.0 μg/mL的虾青素标准溶液。流动相的组

成为V 甲醇 :V 乙腈 = 9:1, 检测波长: 478 nm, 流速: 1.5 mL/min; 色谱柱: C18 柱 4.6 mm×150 mm。采用外标法计算提取液中虾青素含量。

1.3.5 单因子实验确定最佳发酵时间

设计发酵培养时间梯度: 6 h、18 h、30 h、42 h、54 h、78 h、90 h、102 h, 8个梯度, 每个梯度重复3次。种子液以10%的接种量接入发酵培养基, 置于160 r/min, 20℃的培养, 以酵母生物量和虾青素含量确定最佳的发酵时间。

1.3.6 单因子实验确定最佳接种量

设计发酵接种量梯度: 2%、5%、8%、10%、12%, 每个梯度重复3次, 发酵78h后测定酵母生物量和虾青素含量。

1.3.7 单因子实验确定最佳豆粕发酵液添加比例

设计豆粕发酵液添加体积比梯度: 2%、5%、8%、10%、12%、15%, 每个梯度重复3次, 发酵78h后测定酵母生物量和虾青素含量。

1.3.8 单因子实验确定最佳胡萝卜汁添加比例

设计胡萝卜汁添加体积比梯度: 2%、5%、8%、10%、12%、15% 每个梯度, 重复3次, 发酵78h后测定酵母生物量和虾青素含量。

1.3.9 正交实验确定最佳发酵工艺

以时间、接种量、豆粕和胡萝卜汁为因子, 设4因子3水平正交试验, 每组重复3次, 以酵母生物量和虾青素含量为衡量指标。进一步优化发酵工艺, 正交设计方案见表1。

表1 发酵条件正交实验方案

序号	培养时间 (h)	接种量	豆粕发酵液	胡萝卜汁
1	78	8%	8%	5%
2	78	10%	10%	8%
3	78	12%	12%	10%
4	90	8%	10%	10%
5	90	10%	12%	5%
6	90	12%	8%	8%
7	102	8%	12%	8%
8	102	10%	8%	10%
9	102	12%	10%	5%

2 结果与分析

2.1 不同发酵时间对红发夫酵母生长和虾青素积累的影响

由图1可知, 红发夫酵母在30h开始进入对数生长期, 酵母细胞生长迅速, 生物量不断增加。58h进入平衡期, 细胞缓慢生长, 生物量只有小幅度的变化, 在90h达到最大值4.69g/L, 酵母细胞内的虾青素开始积累, 在102h时, 虾青素含量达到328.09 μg/mL。

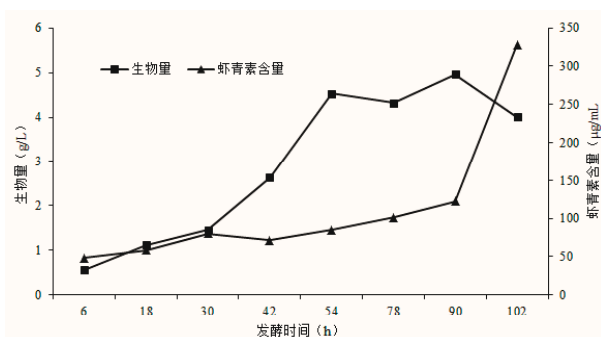


图1 不同发酵时间生物量和虾青素含量

2.2 不同接种量对红发夫酵母生长和虾青素积累的影响

由图2可知, 接种量从5%到10%, 红发夫酵母生物量逐渐增加达到最大值5.74 g/L, 虾青素含量也是缓慢增加, 达到499.2 μg/mL。接种量高于10%时, 养分消耗过大, 对于酵母细胞的持续增长和产物合成积累不利。

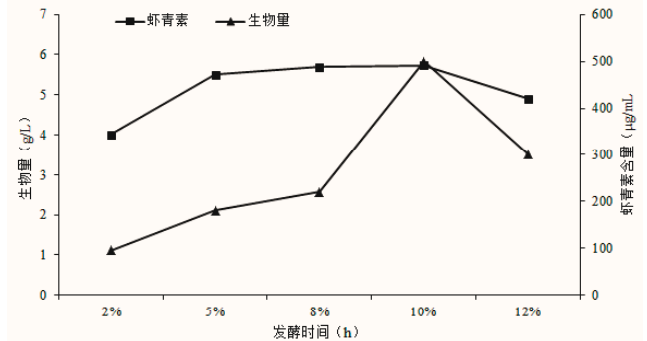


图2 不同接种量生物量虾青素含量

2.3 不同比例豆粕发酵液对红发夫酵母生长和虾青素积累的影响

酵母细胞的生物量随着豆粕发酵液添加比例的增加而增加, 在15%达到最大值13.9g/L(图3)。豆粕发酵液添加比例在2%至10%时, 虾青素含量随添加比例的增加而升高, 达519.4 μg/mL, 而添加比例在10%至15%时, 虾青素的含量却随添加比例的增加而下降。

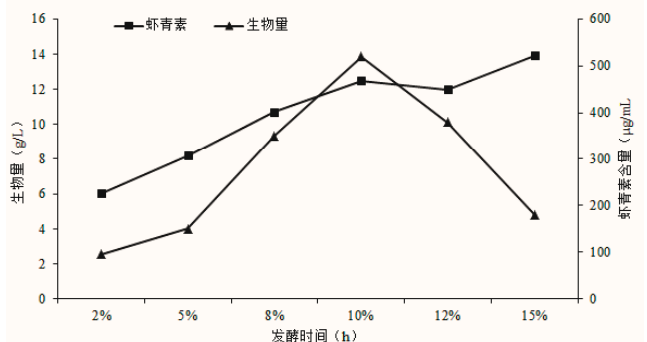


图3 不同豆粕发酵液比例生物量和虾青素含量

2.4 不同胡萝卜汁比例对红发夫酵母生长和虾青素积累的影响

由图4可知, 在2%至12%的胡萝卜汁添加比例时, 酵母生物量缓慢增加, 12%时达到最大9.1g/L; 虾青素含量随着添加比例的增大而增加, 8%时达到最大值605.4 μg/mL, 而后在8%至15%时, 发生大幅度的下降。

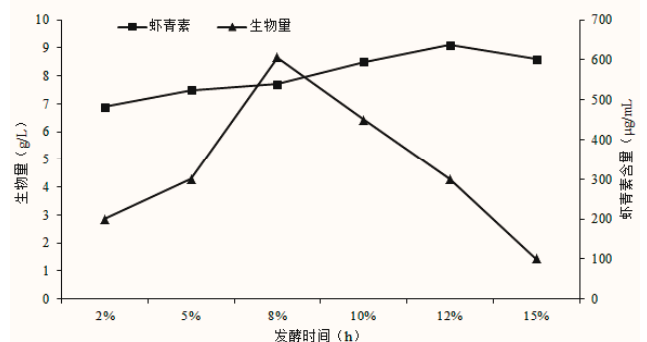


图4 不同胡萝卜汁比例生物量和虾青素含量

2.5 发酵条件正交实验结果

2.5.1 红发夫酵母生物量、虾青素含量结果分析

以发酵时间、接种量、豆粕发酵液、胡萝卜汁4个因子进行单因子实验确定3个水平进行正交一共是9组

搭配, 每组3次平行共27次实验的生物量测量结果见表2, 当发酵工艺为发酵时间90h、接种量12%、豆粕发酵液添加比例8%、胡萝卜汁添加比例8%时, 生物量最大, 达9.40 g/L, 虾青素含量最高, 达786.26 μg/mL

表2 正交实验生物量

组号	观测数	生物量		虾青素含量	
		总和 g/L	平均 g/L	总和 μg/mL	平均 μg/mL
1	3	25.1	8.37±0.06a	1556.45 1556.73	518.82±3.49c 518.91±0.50c
2	3	23.6	7.87±0.20c		
3	3	28.1	9.37±0.30a	1944.05	648.02±3.02b
4	3	27.9	9.30±0.07a	2354.64	784.88±51.55a
5	3	22.3	7.43±0.10c	1705.64	568.55±79.27c
6	3	28.2	9.40±0.07a	2358.78	786.26±2.49 a
7	3	25.5	8.50±0.12b	1778.59	592.86±32.94c
8	3	23.7	7.90±0.28c	1683.51	561.17±7.38c
9	3	26.5	8.83±0.09b	1512.91	504.30±0.94c

3 结束语

通过发酵时间和接种量单因子实验发现, 虾青素含量与酵母细胞生物量成正相关, 意味着确定合适的发酵条件以获得最大的生物量就能够收获更多的虾青素。但是, 通过豆粕发酵液和胡萝卜汁单因子实验却发现, 通过改变发酵原料以求提高虾青素含量, 超出一定的单因子原料浓度, 酵母细胞生物量却与虾青素含量成反比, 这个结果不能说明所有改变发酵原料以求获得更高虾青素产量的方法, 但至少存在因为所添加的发酵原料含有虾青素合成的前体物质如β-胡萝卜素而在低浓度提高酵母虾青素含量, 在高浓度抑制虾青素的合成; 或者是原料中含有诱导酵母细胞将能量流向细胞生长方向的物质如豆粕氨基酸, 从而减少合成虾青素方向的能量, 造成虾青素含量降低。

1、发酵培养90小时红发夫酵母生物量最大, 发酵培养102小时, 虾青素产量最大, 而接种量为10%, 虾青素含量及酵母的生物量均达到最大。添加豆粕发酵液进行发酵时, 15%的比例能收获最大生物量, 而虾青素产量最大的是10%的添加比例。在胡萝卜汁梯度中, 12%的比例生物量最大, 而8%的胡萝卜汁比例能收获最大的虾青素产量。

2、红发夫酵母生物量和虾青素含量是正相关的, 在其发酵工艺为发酵时间90h、接种量12%、豆粕发酵液添加比例8%、胡萝卜汁添加比例8%时, 红发夫酵母的生物量达到最大为9.40g/L, 虾青素产量达到最大为786.26 μg/mL。

3、综合分析得出最佳的提高虾青素产量的发酵工艺为: 发酵时间90h、接种量12%、豆粕发酵液添加比例8%、胡萝卜汁添加比例8%, 此条件下酵母细胞内的能量能够最大化流向合成虾青素, 在较低的发成本下获得最大的虾青素产量。

【参考文献】

- [1] 孙伟红. 不同来源虾青素的分离制备及其构效关系研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2015.
- [2] 吴丽君, 郭新明. 虾青素及运动对人体抗氧化能力、血乳酸、血尿酸代谢的影响[J]. 体育科学, 2017, 37(1): 62-67, 80.
- [3] SNODDERLY D M. Evidence for

protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins[J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 1995, 62(Suppl 1): 1448-1461.

[4] 黄文文, 洪碧红, 易瑞灶, 等. 虾青素生产方法及生物活性的研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2012, No.115(6): 214-218.

[5] 蔡俊, 游智能. 发酵法生产虾青素的研究进展[J]. 食品科学, 2015, 36;No.516(23): 380-388.

[6] 朱明军. 红发夫酵母 *Phaffia rhodozyma* 培养生产虾青素的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2001.

[7] 潘雪珊, 戴凌玫, 卢英华, 等. 溶氧及植物激素对红发夫酵母生长与虾青素合成的影响[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2017, 56;No.260(5): 679-685.

[8] 裘娟萍, 沈寅初. 红发夫酵母的生物学特性[J]. 工业微生物, 2001, 31(3):6-8.

[9] 杨文, 吉春明. 一种简单的胞壁破壁方法[J]. 微生物学通报, 1995, 22(1):58-59.

[10] 肖冬光, 李贤宇, 郝玥. 高效液相色谱法检测红发夫酵母胞内虾青素[J]. 天津科技大学学报, 2005, 20(1):9-12

* 课题来源: 大学生研究性学习和创新性实验计划项目

作者简介: 蔡焱湘(1998-), 男, 广东揭阳人, 生物工程专业

通讯作者: 唐建洲(1979-), 男, 湖南永州人, 生物化学专业, 副教授, 主要研究方向: 水生动物营养与水生生理生化。