海洋红酵母产虾青素培养基优化的初步研究

杨秋明[1,2], 蔡慧农[1*], 宋思扬[2], 苏文金[1]

(1. 集美大学 生物工程学院,福建 厦门 361021;2. 厦门大学 生命科学学院,福建 厦门 361001)

摘 要 为了提高海洋红酵母发酵虾青素的产量水平,对海洋红酵母的培养基成分进行了初步研究。试验结果表明,海洋红酵母能利用葡萄糖、淀粉水解糖、糖蜜等多种碳源,用淀粉水解糖为碳源培养海洋红酵母所获得的虾青素体积产率最大;用牛肉膏为氮源有利于提高海洋红酵母的生物量,以 $(NH_4)_2SO_4$、NH_4Cl 和蛋白胨为氮源有利于提高海洋红酵母的虾青素体积产率,用 KNO_3、草酸铵、蛋白胨、尿素有利于提高海洋红酵母的虾青素细胞产率;在海洋红酵母的培养基中添加 Mn^{2+}、Cd^{2+}、Zn^{2+}、Fe^{2+} 能增加生物量,添加 Zn^{2+}、Fe^{3+}、Mn^{2+} 能增加海洋红酵母的虾青素体积产率,添加 Fe^{3+} 能提高海洋红酵母的虾青素细胞产率。

关键词 海洋红酵母;虾青素;发酵;培养基

中图分类号 Q939.99 **文献标识码** B **文章编号** 1005 - 7021(2007)01 - 0072 - 04

Medium Optimization of Astaxanthin by Oceanic Red Yeast

YANG Qiu-ming[1,2], CAI Hui-nong[1], SONG Si-yang[2], Su Wen-jin[1]

(1. *Sch. of Bio-Engin. Jimei Univ. Xiamen* 361021; 2. *Coll. of Life Sci. Xiamen Univ. Xiamen* 361001)

Abstract In order to improve the production level of astaxanthin by oceanic red yeast (ORY), the ingredients of medium for it were studied. The results of experiment showed that ORY could utilize many kinds of carbon sources such as glucose, starch hydrolyzed sugar (SHS), and molasses etc. However, volume productivity of astaxanthin was the biggest among these sugars when using SHS. Using beef extract as nitrogen source is helpful to enhance biomass of ORY, while $(NH_4)_2SO_4$, NH_4Cl and peptone were conducive to improve the ORY volume productivity of astaxanthin. In addition, KNO_3, ammonium oxalate, peptone, and urea were conducive to improve the cellular productivity of astaxanthin. Adding Mn^{2+}, Cd^{2+}, Zn^{2+}, and Fe^{2+} to the ORY medium, could increase the biomass. Adding Zn^{2+}, Fe^{2+}, and Mn^{2+} could increase the ORY volume productivity of astaxanthin. And adding Fe^{2+} could increase the ORY cellular productivity of the astaxanthin.

Keywords oceanic red yeast (ORY); astaxanthin; fermentation; media

虾青素(astaxanthin,3,3′-二羟基-β,β′-胡萝卜素-4,4′-二酮)是自然界广泛存在的类胡萝卜素[1],近年来,虾青素的许多生物学功能[2~5]引起了人们的广泛兴趣,天然虾青素的生产越来越受到人们的重视。集美大学"虾青素发酵技术"课题小组经过长期的研究积累,从集美海滩上筛选获得了 1 株能产生虾青素的海洋红酵母,为了提高该菌发酵虾青素的产量水平并考察其应用前景,有必要研究优化该菌产虾青素的培养基。用单因素试验研究了碳、氮源、碳源浓度、碳氮比及金属离子对海洋红酵母产虾青素的影响,为利用海洋红酵母生产虾青素提供了试验参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 海洋红酵母 Jmu0305,本实验分离

收稿日期:2006 - 09 - 11

作者简介:杨秋明 男,实验师。主要从事微生物发酵方面的科研工作。

项目来源:福建省重点科技项目(2006H0033);厦门市科技项目(B04066)

* 通讯作者

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

并保存。

1.1.2　培养基　①斜面培养基(质量分数,%):麦汁浓度 5,NaCl 浓度 5,pH 6.0,琼脂 2;②种子培养基(g/L):葡萄糖 10,麦汁 3,蛋白胨 5,酵母膏 3,NaCl 5,pH 6.0;③发酵基础培养基(g/L):葡萄糖 20,$(NH_4)_2SO_4$ 5,KH_2PO_4 1,$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5,$CaCl_2 \cdot H_2O$ 0.1,酵母膏 2,NaCl 5,pH 6.0。

1.1.3　试剂与药品　虾青素标准样品购自 Sigma 试剂公司;葡萄糖、KH_2PO_4、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$、KNO_3、尿素、KH_2PO_4、$CaCl_2 \cdot H_2O$、NaCl、$(NH_4)_2SO_4$、NH_4Cl、草酸铵等培养基成分均为分析纯;酵母膏、蛋白胨、牛肉膏、糖蜜等均购自上海生化试剂有限公司;无水 $MgSO_4$、3,5 二硝基水杨酸、二甲亚砜、丙酮等虾青素提取试剂为分析纯;甲醇、乙腈、四氢呋喃等液相分析用试剂为色谱纯。

1.1.4　试验仪器　FA1004 型电子天平(上海精科天平)、HWY-111 恒温培养摇床(上海智城分析仪器制造有限公司、真空冷冻干燥机(美国 Svant 公司产品)、立式圆形蒸汽压力灭菌器(武汉市黄陂医疗华工设备厂)、LXJ-IIB 低速大容量多管离心机(上海安亭科学仪器总厂)、TG-16G 高速离心机(上海安亭科学仪器厂)、101-3B 型电热鼓风干热箱(上海市实验仪器总厂)、CARY50 型可见-紫外分光光度计(美国瓦里安有限公司)、1525 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司)。

1.2　方法

1.2.1　种子培养方法　接一环新活化的斜面种子于装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中,22 ℃、180 r/min 培养 72 h,取此培养液 5 mL(按接种量 10%)接于装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中 22 ℃、180 r/min 再次培养 72 h 备用。

1.2.2　摇瓶培养方法　接种量 10%,培养温度 22 ℃,摇床转速 180 r/min,培养 72～96 h。

1.2.3　菌体的获取　离心法收集菌体:离心转速 3 000 r/min,离心时间为 5 min,用蒸馏水洗涤 3 次。

1.2.4　生物量的测定　发酵液在 3 000 r/min 的条件下离心 5 min,弃上清后将得到的菌体用无菌水洗涤 3 次,最后将菌体冷冻干燥后烘干至恒重。

1.2.5　残糖的测定　3,5-二硝基水杨酸比色法[10]。

1.2.6　类胡萝卜素的提取　二甲亚砜法[11]。

1.2.7　虾青素测定　高效液相色谱法:使用 Waters 公司 1525 型高效液相色谱仪,Waters 公司 Novapak C_{18} 反相色谱柱(3.9 mm ×150 mm,4 μ)进行色素的分离与定性分析;通过 Waters 公司 2487 型紫外检测器检测,用 Breeze 色谱分析软件分析,外标法定量虾青素。

2　结　果

2.1　碳源对海洋红酵母发酵的影响

选用发酵工业中几种常用的碳源,以相同的含碳量(以 2%的葡萄糖计)代替基础培养基中的葡萄糖配制培养基培养海洋红酵母,实验结果如图 1 所示。用淀粉水解糖、葡萄糖及糖蜜为碳源培养海洋红酵母所获得的生物量、虾青素体积产率及虾青素细胞产率之间的差别不大,且明显高于用淀粉和麦芽糖为碳源时的对应值。考虑到实验过程中糖测定的方便性,本试验采用葡萄糖为碳源进一步试验。

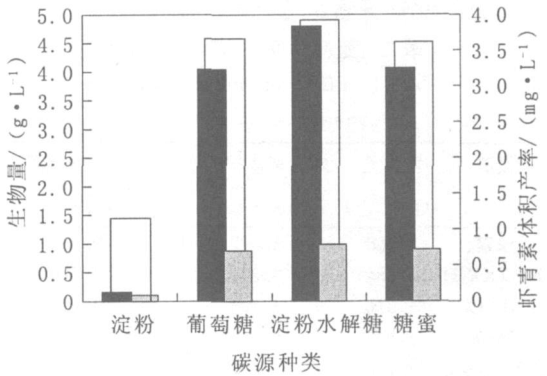

图 1　碳源种类对海洋红酵母产虾青素影响

Fig.1　Effects of carbon sources on astaxathin production by oceanic red yeast

2.2　碳源浓度对海洋红酵母发酵的影响

以葡萄糖为碳源,控制培养基起始碳源浓度分别为 20、40、60、80、100、120 g/L,培养海洋红酵母,96 h 后取样测定各参数,实验结果如表 1 所示。当碳源浓度为 80 g/L 时,生物量达到最大值,当碳源小于 80 g/L 时,生物量随碳源浓度增

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

大而增大,当碳源浓度大于 80 g/L 时,残糖浓度随碳源浓度升高而增大,表明培养液中的碳源浓度已过量。当碳源浓度为 60 g/L 时,虾青素的体积产率达到最大值,当碳源浓度小于 60 g/L 时,虾青素体积产率随碳源浓度增大而增大,当碳源浓度大于 60 g/L 时,虾青素体积产率随碳源浓度升高而减少。当碳源浓度低于 60 g/L 时,细胞得率、虾青素细胞产率及虾青素得率基本稳定,但当碳源浓度高于 60 g/L 时,细胞得率、虾青素细胞产率及虾青素得率随着碳源浓度的上升而下降。

表 1 碳源浓度对海洋红酵母生长及产虾青素的影响

Table 1 Effects of carbon source concentration on culturing oceanic red yeast

葡萄糖浓度 / (g·L^{-1})	残糖 / (g·L^{-1})	生物量 / (g·L^{-1})	虾青素体积产率 / (mg·L^{-1})	虾青素细胞产率 / (mg·g^{-1})	细胞得率 / (g·g^{-1})	虾青素得率 / (mg·g^{-1})
20	0.45	4.53f	3.853	0.85a	0.45a	0.39a
40	0.39	13.56e	11.78d	0.87a	0.45a	0.39a
60	0.12	22.12c	20.84a	0.89a	0.44a	0.42a
80	0.08	26.01a	19.86b	0.76b	0.37b	0.28b
100	0.11	24.51b	19.21b	0.78b	0.27c	0.21c
120	0.15	19.23d	14.33c	0.75b	0.17d	0.13d

注:表中不同字母表示用 Duncan 氏新复极差分析所获 5 %显著水平的不同数值,下表同

2.3 氮源对海洋红酵母发酵的影响

用不同的氮源代替摇瓶基础培养基中的 $(NH_4)_2SO_4$ 和酵母膏,并控制各培养基的氮源浓度与 5 % $(NH_4)_2SO_4$ 相当,接种海洋红酵母,试验结果如表 2 所示。用牛肉膏为氮源培养海洋红酵母所获得的生物量最大,用 $(NH_4)_2SO_4$、$(NH_4)_2Cl$ 和蛋白胨等为氮源所获的虾青素体积产率最大,用 KNO_3、草酸铵、蛋白胨、尿素等为氮源所获得的虾青素细胞产率最大。

表 2 氮源对海洋红酵母的影响

Table 2 Effects of nitrogen sources on culturing oceanic red yeast

氮源	生物量 / (g·L^{-1})	虾青素体积产率 / (mg·L^{-1})	虾青素细胞产率 / (mg·L^{-1})
尿素	3.56d	3.01b	0.85a
CH_3COONH_4	1.88g	1.33e	0.71b
NH_4Cl	4.81b	3.59a	0.75b
KNO_3	3.06f	2.64cd	0.86a
$(NH_4)_2SO_4$	4.79b	3.44a	0.72b
草酸铵	3.23e	2.82c	0.87a
蛋白胨	4c	3.54a	0.89a
牛肉膏	5.44a	2.39d	0.44c
酵母膏	3.36e	2.16d	0.64d

2.4 碳氮比对海洋红酵母产虾青素的影响

以葡萄糖为碳源,$(NH_4)_2SO_4$ 为氮源,控制起始碳源浓度为 20 g/L,设置不同的碳氮比培养海洋红酵母,试验结果如表 3 所示。当碳氮比为 16 时,生物量和虾青素体积产率都最大,当碳氮比小于 16 时,随着碳氮比的增大,海洋红酵母的生物量、虾青素体积产率和虾青素的细胞产率都不断增大,当碳氮比大于 16 时,海洋红酵母的生物量和虾青素体积产率随碳氮比增大而逐渐降低,而虾青素的细胞产率保持稳定。

表 3 碳氮比对海洋红酵母培养的影响

Table 3 Effects of ratio of carbon source concentration to nitrogen source concentrations on culturing oceanic red yeast

碳氮比	生物量 / (g·L^{-1})	虾青素体积产率 / (mg·L^{-1})	虾青素细胞产率 / (mg·g^{-1})
31	4.29d	3.09d	0.72a
26	4.83c	3.51c	0.73a
21	5.27b	3.91b	0.74a
16	6.26a	4.53a	0.72a
11	6.37a	3.95b	0.62b
6	5.41b	3.45c	0.64b
1	4.49d	1.63e	0.36c

2.5 金属离子对海洋红酵母产虾青素的影响

表 4 不同金属离子对海洋红酵母培养的影响

Table 4 Influence of some metal ion on cultivation of oceanic red yeast

金属离子	生物量 / (g·L^{-1})	虾青素体积产率 / (mg·L^{-1})	虾青素细胞产率 / (mg·g^{-1})
Cd^{2+}	4.52c	3.38d	0.75b
Fe^{2+}	4.58c	3.54c	0.77b
空白	4.35d	3.58c	0.82b
Cu^{2+}	4.42cd	3.63c	0.82b
Mn^{2+}	5.88b	3.96b	0.67c
Fe^{3+}	4.35d	4.10ab	0.94a
Zn^{2+}	6.38a	4.18a	0.66c

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

在海洋红酵母培养基中分别添加 1 μmol/L 的 Cu^{2+}、Mn^{2+}、Cd^{2+}、Zn^{2+}、Fe^{2+}、Fe^{3+},以 10 % 的接种量接种培养 72 h,试验结果如表 4 所示。在培养液中添加 1 μmol/L 的 Zn^{2+},细胞干重和虾青素体积产率都最大,其值分别达到了 6.38 g/L 和 4.18 mg/L;在培养液中添加 1 μmol/L 的 Fe^{3+} 时,虾青素细胞产率含量达到最大值(0.94 mg/g)。该结果与前人以法夫酵母所进行的试验有较大的区别,其原因有待进一步研究[12]。

3　讨　论

以上试验结果说明,碳源种类、浓度,氮源种类和金属离子等培养基成分以及碳氮比对培养海洋红酵母生产虾青素具有重要的影响。这些试验结果为进一步优化培养基及利用营养成分调节海洋红酵母的代谢,促进虾青素发酵产量的提高提供了第一手研究资料。

碳源试验结果表明,海洋红酵母能利用葡萄糖、淀粉水解糖、糖蜜等多种碳源,虽然用淀粉水解糖为碳源培养海洋红酵母所获得的虾青素体积产率最大,但从工业发酵的成本及原料的稳定性考虑,糖蜜可能也是培养海洋红酵母的适宜碳源。

由表 1 可知,当碳源浓度超过 60 g/L 时,虾青素细胞产率、细胞得率和虾青素得率等发酵参数都随着碳浓度的增高而降低,但当碳源浓度低于 60 g/L 时,这些发酵参数随着碳源浓度的增加而增加。分析其原因主要有 2 个方面,第一,高浓度的碳源会造成溶氧值下降;第二,海洋红酵母可能和其他红酵母一样存在严重的 crabtree 现象[13],即使在溶氧充足的条件下,高浓度的碳源也会导致乙醇、乙酸等副产物的产生,从而导致生物量及虾青素合成下降。这个结果说明,在工业培养海洋红酵母时,应该控制较低的碳源浓度。

氮源试验结果表明不同氮源对海洋红酵母的生物量及虾青素合成会产生较明显的影响。用牛肉膏为氮源有利于提高海洋红酵母的生物量;以 $(NH_4)_2SO_4$、$(NH_4)_2Cl$ 和蛋白胨为氮源有利于提高海洋红酵母的虾青素体积产率;用 KNO_3、草酸铵、蛋白胨、尿素有利于提高海洋红酵母的虾青素细胞产率。

表 3 所示的试验结果表明,碳氮比对海洋红酵母的培养也具有很大的影响,当碳氮比为 16 时,生物量、虾青素体积产率和虾青素细胞产率都最大,因此,在培养海洋红酵母生产虾青素时应控制碳氮比在此附近。

由表 4 可知,在海洋红酵母的培养基中添加 Mn^{2+}、Cd^{2+}、Zn^{2+}、Fe^{2+} 能增加生物量,添加 Zn^{2+}、Fe^{3+}、Mn^{2+} 能增加海洋红酵母的虾青素体积产率,添加 Fe^{3+} 能提高海洋红酵母的虾青素细胞产率。

参考文献:

[1] 王业勤,李勤生. 天然类胡萝卜素—研究进展,生产,应用[M]. 北京:中国医药科技出版社,1997.

[2] Kurashige, M. Inhibition of oxidative injury of biological membranes by astaxanthin [J]. Physiol. Chem. Phys. Med. NMR, 1990, 22:27-38.

[3] Martin Guerin, Mark E. Huntley and Miguel Olaizola. *Haematococcus* astaxanthin: application for human health and nutrition [J]. TRENDS in Biotechnology, 2003, 21(5): 210-216.

[4] Shimidzu, N. Carotenoids as singlets oxygen quenchers in marine organisms[J]. Fish. Sci. 1996, 62:134-137.

[5] Palagyi Z., Ferenczy L. and Vagvlogyi C.. Carbon source assimilation pattern of the astaxanthin-producing yeast Phaffia rhodozyma[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2001, 17:95-97.

[6] Stepnowski P., Olafsson G., Helgason H. *et al*. Recovery of astaxnthin from seafood wastewater utilizing fish scales waste[J]. Chemosphere, 2004, 54:413-417.

[7] Johnson E. A. Phaffia rhodozyma: colorful odyssey[J]. Int Microbiol, 2003, 6:169-174.

[8] Visser H., Albert J.J. Van O., *et al*. Metobolic engineering of the astaxanthin-biosynthetic pathway of Xanthophyllomyces dendrorhous [J]. FEMS Yeast research, 2003, (4): 221-231.

[9] 张龙翔. 生化实验方法和技术[M]. 北京:北京高等教育出版社,1998.

[10] Sedmak J. J, Weerasinghe D. K., Jolly S. O. Extraction and quantitation of astaxanthin from Phaffia rhodozyma[J]. Biotechnol Tech., 1990, 4:107-112.

[11] Flores-Cotera L. B. and Sanchez S. Copper but not iron limitation increases astaxanthin production by Phaffia rhodozyma in a chemically defined medium [J]. Biotechnology Letters., 2001(23): 793-797.

[12] Reynders M. B., Rawlings D. E. and Harrison S. T. L. Demonstration of the Crabtree effect in Phaffia rhodozyma during continuois and fed-batch cultivation[J]. Biotechnology Letters, 1997, 19(6): 549-552.

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net