

微生物发酵生产虾青素*

郑裕国 沈寅初

(浙江工业大学生物工程研究所, 杭州 310014)

摘要 对微生物发酵法生产虾青素的微生物菌种、生物合成代谢途径、发酵工艺条件优化和提取分离检测方法等方面的研究现状进行了综述,并展望了微生物发酵法生产虾青素的前景。

关键词 虾青素 红发夫酵母 发酵

虾青素(Astaxanthin, 3,3'-二羟基- β , β -胡萝卜素-4,4'-二酮),属于酮式类胡萝卜素。生理研究表明,虾青素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,调节降低这些由于光化学引起的伤害,对紫外线引起的皮肤癌有很好的治疗效果。虾青素的抗氧化功能高于角黄素(Carothaxanthin)、 β -胡萝卜素(β -Carotene)、玉米黄素(Zeaxanthin)等其它类胡萝卜素,能抑制生物膜被氧化,显著促进淋巴结抗体的产生。

虾青素广泛存在于生物界中,特别是水生甲壳类动物如虾、蟹等。因此,虾青素可以从食品加工的废弃物中提取分离得到。但由于微生物发酵法生产虾青素具有生长速度快、生产周期短的特点,易于工业化生产,已成为虾青素生产的主要方法。目前,微生物发酵法生产虾青素的主要微生物是红发夫酵母(*Phaffia rhodozyma*)。该酵母是Phaff等人于70年代所发现,后经鉴定并命名为新属范菲亚属。1976年Andrews等人^[1]发现它能够生产虾青素,1980年Johnson^[2]把发酵培养菌体用于鲑鳟鱼和鲟鱼饲料中,获得了良好的效果。鲑鳟鱼和鲟鱼食用了红发夫酵母(*Phaffia rhodozyma*)的发酵培养菌体后,鱼皮和肌肉中由于积累了虾青素而呈红色,增加了鲑鳟鱼和鲟鱼的食用美感。也增加了食用功效,在市场上大受欢迎。在欧美等国,虾青素的年销售额已达十几亿美元。同时,虾青素可开发成医药品、化妆品、食品添加剂等,具有抗癌变、抗衰老和增强免疫等功能,有着重要的经济价值。

1 虾青素产生菌和虾青素的生物合成途径

能够产生虾青素的微生物菌株并不多。目前,国内外主要利用红发夫酵母(*Phaffia rhodozyma*)生产虾青素。Yanane等^[3]指出,红发夫酵母(*Phaffia rhodozyma*)被普遍使用的主要原因是由于其所产生的类胡萝卜素物质中虾青素是主要的一种成份以及生产过程较易控制。一些文献也已报道其他一些微生物菌株。但有些菌生长较慢且虾青素含量低,无工业应用前景。在一些文献中提到的菌株尽管能产生较高的虾青素含量,如深红酵母(*Phodotordal rubra*)、粘红酵母(*Rhodotrodula glutinis*)等^[4],但没有见到详细的研究报告。

Girard等^[5]总结了Andrews^[1]、Ceigler^[6]、An^[7]等人的研究工作,指出红发夫酵母(*Phaffia rhodozyma*)合成虾青素的代谢途径。异戊烯焦磷酸(Isopentenyl diphosphate)首先合成为牛儿焦磷酸(Gevanylgernyl diphosphate),牛儿焦磷酸再转化成八氢番茄红素(phytoene),然后八氢番茄红素脱氢形成番茄红素(Lycopene),番茄红素环化形成 β -胡萝卜素(β -carotene)(见图1)。 β -胡萝卜素可以先在C-3,3'位羟基化形成中间产物 β -隐黄质(β -Cryptoxanthin)和玉米黄素(Zeaxanthin),再在C-4位氧化形成中间产物3-二羟基-2-酮- β -胡萝卜素(Adonixanthin),进一步氧化Adonixanthin最后形成虾青素(见图2)。 β -胡萝卜素也可以先在C-4,4'氧化形成中间产物海胆酮(Echinone)和鸡油菌黄质(Carothaxanthin),再在C-3位羟基化形成中间产物4-二酮-3-羟基- β -胡萝卜素(Adonimbuin),进一步将Adonimbuin在C-3'位羟基化形成虾青素(见图3)^[8]。Girard^[5]等对红发夫酵母(*Phaffia rhodozyma*)进行诱变处理,发现了从无色到红色的诱变突变菌

* 国家十五科技攻关重点项目(2001BA708B05-03),浙江省重大攻关项目(011103399)

株。分析突变菌株的虾青素合成中间产物,可以发现,番茄红素环化形成 β -胡萝卜素这一步骤不会受到诱变处理的影响,但诱变处理能影响到其他的步骤,即诱变处理主要影响 β -胡萝卜素合成之前的步骤。虾青素有三种不同的旋光异构体,见图4。红发夫酵母(*Phaffia rhodozyma*)合成的虾青素为3R,3'R异构体(3S,3'S异构体的对称体),而人工化学合成的虾青素为3S,3'S异构体、3R,3'R异构体和3R,3'S异构体^[8]。由此可见,生物合成的虾青素要优于化学合成的虾青素。

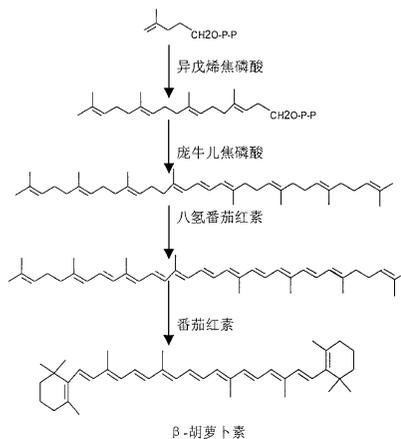


图1 虾青素前体 β -胡萝卜素的合成

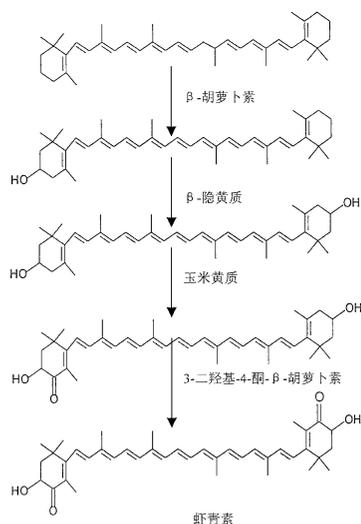


图2 虾青素合成途径之一

2 培养条件对胞内虾青素积累的影响

微生物细胞内虾青素的生物合成基本上由它们的遗传特性所控制,通过诱变育种技术,改变微生物的遗传特征,得到高产虾青素的微生物菌株。但是,微生物胞内虾青素的积累也受各种环境因子的影

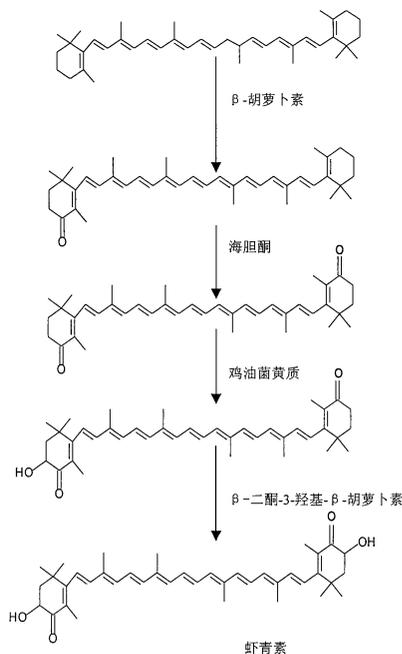


图3 虾青素合成途径之二

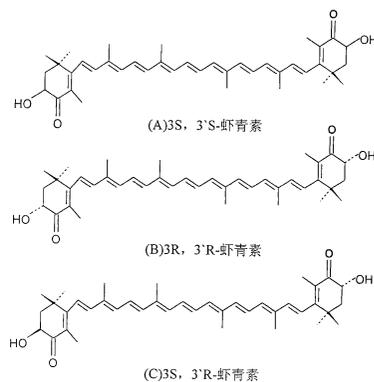


图4 三种虾青素旋光异构体

响,会随发酵培养基的改变而改变,还受诸如温度、pH和溶氧等因素的影响。Johnson^[7]首先考察了红发夫酵母(*Phaffia rhodozyma*)的发酵工艺条件,发现虾青素积累的最佳碳源为纤维二糖,葡萄糖和蔗糖都会加快菌体的生长速度,但当菌体生长速率较高时,胞内虾青素含量将会下降;发酵过程中的溶解氧浓度对菌体合成虾青素的影响较大,当溶氧值低于30mmol/L $h O_2$ 时,菌体主要积累 β -胡萝卜素和单烯酮类,虾青素生物合成途径受到抑制。在6%浓度的葡萄糖含量条件下,生物量、胞内虾青素的含量以及虾青素的产量分别为16mg/ml, 300 μ g/g和5 μ g/ml。Meyer等^[9]用红发夫酵母(*Phaffia rhodozyma*)诱变株,进行不同碳源、氮源的研究,发现采用甘露糖醇和琥珀酸作碳源时,与其他碳源相比可以有效地增强胞内虾青素的合成,缬氨酸作为唯一氮源时,也

可以有效地增加胞内虾青素的积累。但是,酵母的比生长速率较低,菌体得率也较低。在整个发酵过程中,酵母的生长最适 pH 在 4.5~5.5 之间,而虾青素合成的 pH 值则在 3.0 以上。Kusdiyantini 等^[10]发现用甘油作为碳源,酵母膏和蛋白胨作为有机氮源的情况下,红发夫酵母的最大比生长速率可达到 0.24h^{-1} 左右,胞内虾青素占总色素量约为 78%。最大的虾青素产量为 $37.7\mu\text{g/ml}$,胞内虾青素含量为 $1800\mu\text{g/g}$ 干菌体。但是用甘油作为唯一碳源时,其发酵周期要达到 168h。Parajo 等^[11]利用半纤维素的水解液作为红发夫酵母 (*Phaffia rhodozyma*) 生产虾青素的碳源,在较佳的氮源情况下,虾青素产量可达到 $4.6\mu\text{g/ml}$,胞内虾青素可达 $439.0\mu\text{g/g}$ 干菌体。在工业生产中,必须考虑生产的成本,实现这一目标的措施之一,是利用一些廉价的工业副产物。为此,Haard^[12]利用了糖蜜作为碳源,Fontana 等^[13]和 Hayman 等人^[14]则利用了甘蔗汁和米厂湿粉碎的副产品。Haard 采用 10% 的糖蜜替代葡萄糖作为碳源获得的结果是:胞内虾青素含量为 $1100\mu\text{g/g}$ 干菌体,虾青素产量为 $15\mu\text{g/ml}$ 。但是,当糖蜜作为培养基的碳源时,由于糖蜜中主要成份为蔗糖,蔗糖为红发夫酵母利用时,分解的葡萄糖和果糖将会阻抑蔗糖的利用,结果降低了蔗糖利用速率,许多学者都指出了这一点,并考察了蔗糖的利用与单糖传递的关系。几乎在所有的研究中都指出,由于红发夫酵母形成虾青素的生物合成途径属于生长偶联型,因此,低氧和高糖都要影响虾青素的产量。

从虾青素合成途径中可以看到,合成虾青素的前体物质有很多种,如 β -胡萝卜素、番茄红素等。Johnson 等人在培养液中加入番茄汁,因为番茄汁中含有虾青素合成的前体物质番茄红素,结果使得胞内虾青素的含量提高到 $814\mu\text{g/g}$ 干菌体^[7]。类胡萝卜素合成的起点物质是甲羟戊酸(MVA),Calo 等人在培养基中加入 0.1% 甲羟戊酸,胞内虾青素和总色素增加了 4 倍。Meyer 等人^[15]在培养液中加入单萜烯类物质来考察对发酵的影响。Lewis 和 Okagbue 等^[16]则分别报告了 β -紫罗酮(β -ionone)和皂苷(Saponin)对红发夫酵母 (*Phaffia rhodozyma*) 的虾青素合成有抑制作用。Meyer 等^[16]以醋酸作为滴定剂调节 pH 值,当培养液中醋酸的浓度达到 2g/L 时,细胞生长完全被抑制,在适当的醋酸浓度下,虾青素含量最大可增加到 $1430\mu\text{g/g}$ 干菌体。

笔者研究了用玉米水解液、大米水解液、薯干粉水解液、糖蜜等作为红发夫酵母碳源研究了发酵的

工艺条件,将迅速利用碳源和缓慢利用碳源相复合控制酵母的比生长速率,并通过加入前体物质、控制发酵温度等手段有效地提高胞内虾青素含量,并使发酵液中的生物量提高到 $40\text{--}50\text{g}$ 干重/L 以上。

3 虾青素的提取以及分析检测

虾青素在细胞内合成,是细胞内物质。为了促进虾青素的释放,Okagbue 和 Lewis 采用蒸馏水或柠檬酸自溶法^[17]。An 等人^[7]和 Haard 等^[12]先用机械破碎的方法破坏红发夫酵母 (*Phaffia rhodozyma*) 的细胞结构,然后用有机溶剂提取。Okagbue 等人^[17,18]在发酵结束后先热处理,灭活酵母,调整 pH 后加入芽孢杆菌 (*Bacillus circulans*),芽孢杆菌分泌胞外酶溶解酵母壁,使虾青素释放。比较各种提取方法,较为理想且能实现产业化的是有机溶剂萃取的方法。在这种固-液萃取过程,包括了溶剂渗透、色素溶解、溶度扩散等一系列步骤。有机溶剂的选择对于提取虾青素是非常重要的。虾青素不溶于水,在极性弱的有机溶剂中溶解度较大,如在氯仿中的溶解度为 10g/L ;在极性强的有机溶剂中溶解较小,如丙酮中虾青素的溶解度为 0.2g/L ,二甲亚砜中为 0.5g/L 。据文献报道,应用较多的有机溶剂为甲醇、乙酸、二甲亚砜、丙酮、石油醚等^[9,19,20]。由于虾青素对光、热、氧都比较敏感,易分解、破坏,因此在提取过程中,应尽量避免由这些因素而导致的分解和破坏,在提取过程应及时加入一些保护物质,尽量避免其他杂质与虾青素一起被提取出来,可以减少以后净化、分离工序的繁杂程度,尽管红发夫酵母中的其他色素对人体或动物没有危害作用。

虾青素目前最常用的分离、提取和分析的方法是高效液相色谱方法,可以用 C18 反向色谱柱或硅胶正向色谱柱进行。Sedmark 等^[20]提出了用二甲亚砜破壁,有机溶剂溶解,然后用正向硅胶柱高效液相色谱法测定的方法。该方法被较多文献所引用,并作了一些改进。Meyer 等^[9]提出了用反相 C18 柱分离提纯在 480nm 检测的方法。在发酵过程的控制上,用分光光度计测定细胞内的总色素含量是一种比较简便易用的方法^[7]。

笔者用有机溶剂萃取法提取虾青素,得到了一条较易产业化的提取分离工艺路线,探索了虾青素保护、提纯的方法和工艺条件,得到了虾青素结晶品。开发了化学检测法和高效液相色谱法测定胞内虾青素含量的分析方法。

4 微生物发酵法生产虾青素的展望

虾青素具有抗氧化、抗癌变、增强免疫等功能,可用作抗癌变预防治疗剂、抗衰老剂、饲料添加剂、食品和化妆品的着色剂,是一种具有很大发展前途的生物工程产品。随着医药保健工业、食品工业、水产养殖业等迅速发展,对虾青素的需求必将越来越大。但目前国内虾青素的研究开发刚刚起步,还没有生产虾青素的工厂企业,市场尚无产品供应,而国外仅欧美每年的需求额就达到十几亿美元。加紧研究与开发微生物各虾青素产品具有非常广阔的前景。利用遗传改良的方法提高红发夫酵母(*Phaffia rhodozyma*)胞内虾青素的含量,得到稳定高产菌株,改进发酵工艺提高虾青素的产量,用先进的生物分离技术获得虾青素产品,是将微生物法生产虾青素推向产业化必须要做的工作。

参考文献

- [1] Andrews, A. G.; Phaff, H. J. and Starr, M. P. *Phytochemistry*, 1976, 15: 1003-1007.
- [2] Johnson, E. A.; Villa, T. and Lewis, M. *Aquaculture*, 1980, 20: 123-134.
- [3] Yanane, Y. I.; Higashida, K.; Nakashimada, Y.; *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, 63(11): 4471-4428.
- [4] 施安辉, 萧海杰. *生物工程进展*, 1999, 19(1): 29-31.
- [5] Girard, P.; Falcomier, B.; Bricout, J. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*

- nol.*, 1994, 41: 183-191.
- [6] Ceigler, A. *Adv. Appl. Microbiol.*, 1965, 7:1-34.
- [7] An, G. H.; Schuman, D. B. and Johnson, E. A. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1989, 55: 116-124.
- [8] 陈峰, 姜悦. *海藻生物技术*, 北京: 中国轻工业出版社, 1999, 186-207.
- [9] Meyer, P. S.; Du Preez, and Killian, S. G. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 1993, 9: 514-520.
- [10] Kusdiyantini, E.; Gaudin, P.; Goma, G. and Blanc, P. J. *Bio-technol. Lett.*, 1998, 20(10): 929-934.
- [11] Parajo, J. C.; Santos, V.; Vazquez, M. *Biotechnol. Bioeng.*, 1998, 59(4):501-506.
- [12] Haard, N. F. *Biotechnol. Lett.*, 1988, 10:609-614.
- [13] Fontana, J. D.; Guimaraes, M. F.; Martins, N. T.; *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 57/58: 413-422.
- [14] Hayman, G. T.; Mammarelli, B. M. and Leathers, T. D. *J. Ind. Microbiol.*, 1995, 14: 389-395.
- [15] Okagbue, R. N. and Lewis, M. J. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 20: 278-280.
- [16] Meyer, P. S. and Du Preez, J. C. *Biotechnol. Lett.*, 1993, 15(9): 919-924.
- [17] Okagbue, R. N. and Lewis, M. J. *Biotechnol. Lett.*, 1983, 5: 731-736.
- [18] Okagbue, R. N. and Lewis, M. J. *J. Appl. Bacteriol.*, 1985, 59: 243-245.
- [19] Sedmark, J. J.; Weerasinghe, D. K. and Jolly, S. O. *Biotechnol. Tech.*, 1990, 4(2):107-112.
- [20] Calo, P.; Velazquez, J. B.; Sieiro, C.; *J. Agric. Food Chem.*, 1995, 43: 1396-1399.

Production of Astaxanthin from Fermentation by Microorganisms

Zheng Yur guo Shen Yir chu

(Institute of Bioengineering, Zhejiang University of Technology Hangzhou 310014)

Abstract The researches about production of astaxanthin from fermentation by microorganisms were reviewed, including producing strains, biosynthesizing pathway, operating conditions of fermentation, methods of extraction and analysis, and so on. The prospects about researches were presented.

Key words Astaxanthin, *Phaffia rhodozyma*, Fermentation