

红发夫酵母(*phaffia rhodozyma*) 生产虾青素进展

王菊芳 梁世中

(华南理工大学食品与生物工程学院, 广州 510640)

摘要 本文综述了利用红发夫酵母(*phaffia rhodozyma*) 培养生产虾青素的研究进展

关键词 红发夫酵母培养 虾青素

虾青素(Astaxanthin), 即 3, 3'-二羟基-4, 4'-二酮基- β , β' 胡萝卜素, 在动物体内, 尤其是水生动物如虾、蟹及动物的羽毛中广泛存在。虾青素虽是一种类胡萝卜素, 但其某些生物学作用远比其它类胡萝卜素强。虾青素为脂溶性, 具有艳丽的红色和强的抗氧化性能。虾青素应用十分广泛, 在食品上, 不仅可以着色还可以有效地起到保鲜、防止变色、变味、变质的作用^[1]。含虾青素的红色油剂既可用于蔬菜、海带和水果的腌渍, 用于饮料、面条、调料的着色也有专利报道。虾青素的抗光敏作用较 β -胡萝卜素更强, 国外有含虾青素的化妆品专利, 制药及食品工业利用虾青素的抗氧化作用、抗炎症作用及免疫促进作用来作为药物预防氧化性组织损伤和配制保健食品^[2]。同时由于虾青素有艳丽红色, 并可与肌动蛋白非特异结合, 将其加入水产饲料中, 可以改善养殖鱼类的皮肤和肌肉色泽, 增加鱼类的抗病能力^[3,4], 家禽食用虾青素积累在蛋黄中, 不仅使蛋更具营养, 而且可提高着色效果^[5]。

虾青素是 β -胡萝卜素合成的终止点, 由 β -胡萝卜素转变为虾青素需加上两个酮基和羟基, 因此合成比较困难。相应的市场上虾青素的价格比 β -胡萝卜素要高出许多。1992年人工合成的虾青素和 β -胡萝卜素市场价格每公斤分别为2500和600美元^[5]。有鉴于此, 虾青素的生产近年来都是供不应求。随着天然食品的兴起, 目前, 许多企业纷纷把投资从合成 β -胡萝卜素转向利用红发夫酵母生产虾青素^[6]。

红发夫酵母属于担子菌纲的红发夫酵母属。最早由Phaff等人在美国和日本采集, 后经Miller鉴定并命名为新属红发夫酵母属种, 1976年Andrews等发现它能产生虾青素^[7]。目前, 国外主要利用红发夫酵母为菌种生产虾青素, 国外学者对红发夫酵母培养生产虾青素的研究主要集中在高产菌种选育、廉价培养基的利用、如何提高虾青素产量和降低

成本等方面。本文拟将这些方面的进展作一综述。

1 虾青素高产菌种选育

在菌种选育方面, An等^[8]以红发夫酵母为出发菌株, 经抗霉素A诱变, 得到了ant^r1, 再经亚硝基胍诱变出ant^r1-4。此二诱变株在适宜条件下培养, 虾青素产量分别为800~900 μ g/g和900~1300 μ g/g, 比母株的虾青素产量300~450 μ g/g高出了许多, 这表现通过诱变育种方法, 可以达到提高虾青素产量的目的。Calo等^[9]用benomyl和EMS诱变红发夫酵母, 获得的突变株虾青素最高产量为1.5mg/g干细胞, 他们还分析测定了红发夫酵母的二十九个突变株的虾青素和类胡萝卜素的含量, 发现浅色突变株的 β -胡萝卜素含量高于野生株, 而深色突变株虾青素含量却显著增加(232%)。Lewis等^[10]根据 β -紫罗酮抑制红发夫酵母株虾青素合成的原理, 以NTG突变株67-210为出发株, 在添加有 β -紫罗酮的培养基中培养, 筛选出仍能产生红色色素虾青素的菌株NTG-37。John等^[11]以NRRL Y-17269为出发菌株, 经特殊诱变方法诱变得到的JB2株, 是报道过的突变株中虾青素产量最高的菌株, 其虾青素的产量可达2180 μ g/g。

2 廉价培养基的利用

一些研究集中在生产虾青素的原料, 包括粗原料及三废的利用上。Okabue等^[12]使用廉价的苜蓿液培养红发夫酵母, 有效地增加了细胞的繁殖量, 但不利于虾青素的产生。Ginka等^[13]报道了*Rhodotorula glutinis*株与*Lactobacillus helveticus* 22P株在乳清超滤液中共培养, 在通风量0.5vvm、搅拌速率为220rpm的条件下, 在15L发酵罐中培养6天, 类胡萝卜素总量达到268 μ g/g, 而虾青素等色素作为细胞生长的平行产物, 在细胞生长稳定期的前期达到最大产量。Parajo等^[14]报道了红发夫

酵母在纤维素的酶水解物上生长的情况,比生长速率为 0.07h^{-1} ,细胞产量达 0.47g/g 糖,虾青素含量达 $720\sim 1080\mu\text{g/g}$,显示了纤维素酶水解产物用来培养红发夫酵母生产虾青素的潜力。Pajaro 等^[15]也曾试用处理过的桉木水解液来培养红发夫酵母 NRRL Y-17268,摇瓶培养细胞浓度达到 10.5g/L ,虾青素产量为 4.6mg/L ,采用分批发酵罐培养方式,细胞浓度为 23.2g/L ,虾青素产量为 10.4mg/L 。Fontana 等^[16]使用简化的含廉价营养源的培养基如过滤的甘蔗汁、尿素和磷酸钠等培养红发夫酵母,虾青素产量得到提高(大于 5g/L)。John 等^[11]则研究了突变株 JB2 在以谷物为原料的燃料乙醇蒸馏物上生长情况,JB2 菌株和其亲本菌株虾青素最终产量分别为 $1.33\sim 1.75\text{mg/g}$ 干菌体和 $0.34\sim 0.42\text{mg/g}$ 干菌体;在蒸馏物或酵母麦芽汁培养基上生长时,虾青素产量相似;5L 发酵罐试验效果更为理想,虾青素产量达到了 $1.84\sim 2.18\text{mg/g}$ 干菌体,这表明 JB2 菌株适合于利用廉价稀蒸馏物来生产虾青素。

3 提高虾青素产量

要提高红酵母培养生产虾青素的产量,培养基组成、pH、底物浓度、溶氧、添加剂、培养方式等培养条件相当关键。Johnson 等人^[17]研究红发夫酵母生产虾青素的最佳条件发现,纤维二糖为虾青素积累的最佳碳源,酵母膏浓度从 0.1 增加到 10mg/ml 时,虾青素的产量从 $156\mu\text{g/g}$ 增加到 $524\mu\text{g/g}$ 干重,pH 5.0 最适合生长和积累虾青素,在 6% 葡萄糖的培养基中,生物量、胞内虾青素含量及虾青素产量分别为 16g/L 、 0.3mg/g 及 5mg/L 。Haard 等人^[18]采用糖蜜代替葡萄糖为碳源,获得的虾青素产量为 15mg/L 。Yamane 等^[19]研究了氧和葡萄糖对 *Phaffia rhodozyma* 酵母初级代谢和虾青素合成的影响。在限氧或高葡萄糖浓度的条件下,虾青素的产生速率显著下降,而在有氧条件下时,虾青素的产量随供氧的增加而增加;高的初始 C/N 比有利于虾青素产量的提高,但高糖抑制酵母的生长。他们还通过计算分析,得出了虾青素产量的提高可通过降低厌氧代谢所需的 NADPH 的量来实现,提出依靠使用高的 C/N 比来提高虾青素产量。在此基础上研究了两步分批流加法,即先通过低的 C/N 比来强化细胞的生长,后通过流加高 C/N 比的基质来强化虾青素的合成,最终培养液中虾青素产量达到了 16mg/L 。

Fang 等^[20]研究 NCHU-FS501 菌株时,发现温度和 pH 对虾青素的产率影响显著,当葡萄糖浓度为 1% 时,虾青素的产量为 $6.72\mu\text{g/ml}$,提高葡萄糖的浓度到 3.5% ,此时虾青素的含量可达 $16.33\mu\text{g/ml}$,当葡萄糖浓度大于或等于 4.5% 时,抑制虾青素的合成。蛋白胨(总氮为 15.8%)是虾青素生产的最佳氮源。

光照和抗生素显著影响红发夫酵母的生长及虾青素的合成。琼脂平板上的红发夫酵母在强光下,生长受到抑制,而且虾青素合成下降;在液体培养基中,野生红发夫酵母种 UCD-FST-67-385 的生长受抗生素抑制,但这种抑制在光作用下可减轻^[21]。

培养基中添加虾青素合成前体及刺激剂也能显著增加虾青素的产量。Calo 等^[22]培养野生型红发夫酵母时,在培养基中添加 0.1% 甲瓦龙酸,可促进虾青素产量平均提高 300% 以上。Johnson 等人^[17]在培养液中加入含有虾青素合成前体物质番茄红素的番茄汁,使虾青素的含量提高到 $814\mu\text{g/g}$ 。Meyer 等人^[5]以乙酸作为滴定剂增加红发夫酵母的生物量,细胞中虾青素含量达到 $1430\mu\text{g/g}$ 干细胞。

另外,不同的培养方式也会影响虾青素的产量。Vazquez 等^[23]采用 2L 容积、 1L 装液量的机械搅拌发酵罐培养红酵母,在温度为 22°C 、通气速率为 3.0vvm 、搅拌速率 400rpm 条件下,以脱色的木材水解液和 0.2g/L 的硝酸钾及 3g/L 的蛋白胨为基质,分别进行连续流加分批培养和多步流加分批培养,结果表明连续流加分批培养时菌体的产率和体积得率明显低于分批培养,而虾青素含量却高于多步分批培养(高 89%)。

4 问题与展望

虽然利用红发夫酵母生产虾青素获得了一系列的可喜进展,但与其它成熟的发酵产品来比,利用红发夫酵母生产虾青素仍是产量低,发酵成本高,因而大规模商业化生产并不普遍。当前除了继续在高产菌株筛选、优化培养条件、降低发酵成本、提高产量等方面深入研究外,还有必要运用基因工程技术,将合成虾青素的关键酶基因多拷贝转入红发夫酵母中,并能有效地进行代谢调控,实现虾青素的高效表达,克服传统技术难以解决的问题,满足迅速发展的市场对虾青素及其制品的巨大需求。

参考文献

[1] 刘子贻等:中国海洋药物,(3):46-49,1997.

- [2] 张素琴等: 食品与发酵工业, 14(5): 1– 5, 1989.
- [3] Lee S H et al: J. Agri. and Food Chem. , 38(8): 1630– 1634, 1990.
- [4] Toshiki N et al: J. Agri. and Food Chem. , 43(6): 1570– 1573, 1995.
- [5] 戴亦军等: 生物技术, 6(3): 41– 44, 1996.
- [6] Nelies H J et al: Journal of Applied Bacteriology, 70: 181– 191, 1991.
- [7] Andrews A G et al. Phytochemistry, 15: 1003– 1007, 1976.
- [8] An G H et al: Applied and Environmental Microbiology, 55(1): 116– 124, 1989.
- [9] Calo et al: J. Agri. And Food Chem. , 43(5): 1396– 1399, 1995.
- [10] Lewis M J et al: Applied and Environmental Microbiology, 56(9): 2944– 2955, 1990.
- [11] John A B et al: Biotechnology Letters, 19(2): 109– 112, 1997.
- [12] Okagbue R N et al: Applied Microbiology and Biotechnology, 20: 33– 39, 1984.
- [13] Ginka F et al: Biotechnology and Bioengineering, 44(8): 888– 894, 1994.
- [14] Parajo J C et al: Food Chemistry, 60(3): 347– 355, 1997.
- [15] Parajo J C et al: Biotechnology and Bioengineering, 59(4): 501– 509, 1998.
- [16] Fontana J D et al: Appl. Biochem. Biotechnol. , spring, 57– 58: 413– 422, 1996.
- [17] Johnson E A et al: J. of General Microbiology, 115: 173– 183, 1979.
- [18] Haard N F et al: Biotechnology Letters, 10: 609– 614, 1988.
- [19] Yamane Y I et al: Applied and Environmental Microbiology, 63(11): 4471– 4478, 1997.
- [20] Fang T J et al: J. of Industrial Microbiology, 16(1): 175– 181, 1996.
- [21] An G H et al: Antonie. Van. Leeuwenhoek, May, 57(4): 191– 203, 1990.
- [22] Calo P et al: Biotechnology Letters, 17(6): 575– 578, 1995.
- [23] Vazquez M et al: Food Biotechnology, 12(1– 2): 43– 55, 1998.

Advancement of Astaxanthin Production by *Phaffia rhodozyma* Culture

Wang Jufang Liang Shizhong

(College of Food and Bioengineering, South China University of Technology, guangzhou 510640)

Abstract This paper reviewed the advancement of astaxanthin production by *phaffia rhodozyma* culture.

Key words *Phaffia rhodozyma* culture Astaxanthin

《遗传》杂志

《遗传》杂志(刊号 ISSN 0253-9772, CN11-1912/ R) 为中国科学院遗传研究所和中国遗传学会共同主办的科技期刊(双月刊), 全国自然科学核心期刊。主要报道人类与医学遗传、动植物遗传与育种及分子与微生物遗传等领域的最新成果与进展。主要栏目有: 研究报告、技术与方法、争鸣与讨论、遗传学教学、综述与专论、重点实验室介绍、品种介绍、成果交流、会议信息、图书信息、图书信息等。读者对象为基础医学、生物制药、农林牧渔、细胞学、生物化学、生物技术等专业的科研、教学、开发、管理人员, 大专院校生物系师生与中学生物教师等。欢迎供稿, 欢迎订阅, 欢迎刊登广告。

2001 年起,《遗传》改为大 16 开本, 80 页, 每期定价 10. 00 元, 全年 60. 0 元。国内外公开发行, 国内邮发代号: 2– 810, 国外发行代号: BM62。《遗传》编辑部地址:

北京市安定门外大屯路 917 大楼, 邮政编码: 100101, 电话/ 传真: (010) 64889348, 手机: (0) 13601221912, 联系人: 李绍武, 主编: 朱立煌。