

氮源对红发夫酵母生产虾青素的影响

朱晓立, 朱明军, 吴振强, 梁世中

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要:研究了不同氮源对红发夫酵母生长及虾青素积累的影响。结果表明,在所研究的有机氮源中,玉米浆是最好的单一氮源,虾青素产量达到 5255 $\mu\text{g/L}$ 。以酵母粉、蛋白胨为单一氮源时,虾青素产量分别是 3287、3087 $\mu\text{g/L}$,远远低于玉米浆;而无机氮源最佳为柠檬酸三铵,虾青素产量 5737 $\mu\text{g/L}$ 。当采用玉米浆和柠檬酸三铵作为混合氮源(2:5)时,虾青素产量达到 7746 $\mu\text{g/L}$ 。

关键词:氮源,红发夫酵母,虾青素

Abstract:Effect of nitrogen sources on the growth of *phaffia rhodozyma* and the accumulation of astaxanthin are investigated. Among nitrogen sources investigated, corn steep liquor is the best organic nitrogen source and astaxanthin production reaches 5255 $\mu\text{g/L}$. Astaxanthin yield was 3287 $\mu\text{g/L}$ and 3087 $\mu\text{g/L}$ respectively when yeast extract and peptone had been used as single nitrogen source, which are far lower than when corn steep liquor was used. $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{H}_5\text{O}_7$ is the best inorganic nitrogen source and astaxanthin yield reached 5737 $\mu\text{g/L}$. Astaxanthin production could reach 7746 $\mu\text{g/L}$ when corn steep liquor and $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{H}_5\text{O}_7$ had been used as compound nitrogen sources(2:5).

Key words:nitrogen sources; *phaffia rhodozyma*; astaxanthin

中图分类号: TS201.3 文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2005)09-0073-04

虾青素(Astaxanthin),即 3,3'-二羟基-4,4'-二酮基- β,β' -胡萝卜素,呈鲜红色,具有极强的抗氧化、抗癌变、增强免疫作用的功能。它也是一种理想的着色剂,含虾青素的饲料能使鲑鱼、鳟鱼的皮肤、肌肉象野生鱼一样呈鲜艳的红色,可增加鱼的抗病能力,提高鱼的繁殖能力。由于动物本身体内并不能合成虾青素,因而虾青素目前具有广阔的市场前景。红发夫酵母最先由 Phaff 及其合作者在高纬度地区落叶木的渗出粘液中发现,属于杂担孢子菌(*Heterobasidiomycetous*)。该菌具有有氧呼吸和发酵两种代谢方式,有细胞壁,是目前常用于生产虾青素

的真菌^[1]。本文研究了不同氮源对红发夫酵母生长及虾青素积累的影响。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

菌种 *phaffia rhodozyma* BCY3, 华南理工大学生化工程研究室选育保藏;YM 培养基(g/L) 葡萄糖 10,酵母膏 3,蛋白胨 5,麦芽汁 3,pH5.0;斜面培养基(g/L) 葡萄糖 10,酵母膏 3,蛋白胨 5,麦芽汁 3,琼脂 20,pH5.0;液体种子培养基 YM 培养基;无氮基础培养基(g/L) 葡萄糖 20, K_2HPO_4 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5,酵母膏 01,pH5.0。

1.2 实验方法

1.2.1 培养方法

1.2.1.1 斜面菌种的保藏 菌株接入斜面培养基上,20 $^\circ\text{C}$ 培养 48h,4 $^\circ\text{C}$ 保藏。

1.2.1.2 摇瓶种子培养 将一环菌苔接种于装 30mL 种子培养基的 250mL 三角瓶中,20 $^\circ\text{C}$ 、160r/min 培养 48h。

1.2.1.3 摇瓶发酵培养 将摇瓶种子以 10%的接种量接入装有 30mL 发酵培养基的 250mL 三角瓶中,20 $^\circ\text{C}$ 、160r/min 培养。

1.2.2 测定方法

1.2.2.1 细胞干重的测定 取 10mL 培养液,离心洗涤 2 次,105 $^\circ\text{C}$ 烘至恒重。

1.2.2.2 虾青素的提取^[2] 取 5mL 培养液,离心洗涤 2 次,加 3mL 3mol/LHCl,沸水浴 3min,迅速冷却,离心洗涤 2 次,添加 5mL 甲醇振荡提取 1min,离心取上清液。如果提取不完全,再加甲醇提取,直至菌体无色。提取液置冰箱冷藏至测定。

1.2.2.3 虾青素测定^[3] 采用 HPLC 法测定,流动相:甲醇:乙腈=9:1,流动相流速 1.0mL/min,柱温 30 $^\circ\text{C}$,以 Sigma 公司的虾青素(Astaxanthin)作为标样。

2 结果与讨论

2.1 不同氮源对红发夫酵母生长及虾青素合成的影响

收稿日期: 2005-01-20

作者简介: 朱晓立(1980-),男,硕士研究生。

基金项目: 广东省科技攻关项目(2002C1040101);广州市科技计划项目(2003Z2-E0131)。

有机氮源采用玉米浆、酵母粉、脲、硫脲、蛋白胨;无机氮源主要是铵盐,采用碳酸铵、磷酸三铵、酒石酸铵、柠檬酸三铵、硫酸铵、草酸铵、硝酸铵、乙酸铵、硫酸亚铁铵。氮源浓度均采用 6.5g/L^[4],研究单一有机氮源和无机氮源对红发夫酵母的生长及虾青素合成的影响。

2.1.1 有机氮源对红发夫酵母生长及虾青素合成的影响 将有机氮源玉米浆、酵母粉、脲、硫脲、蛋白胨添加到无氮培养基中,测定其 72h 的细胞干重、虾青素含量及产量。有机氮源对红发夫酵母生长及虾青素合成的影响如图 1 所示。

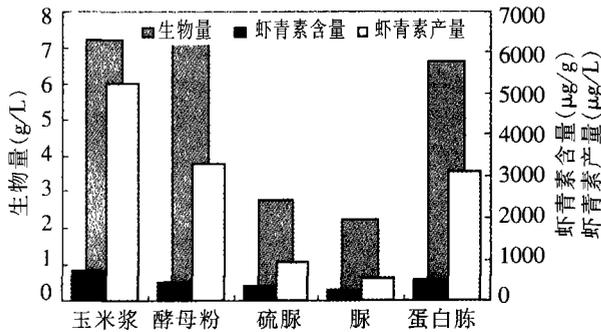


图 1 有机氮源对红发夫酵母生长及虾青素积累的影响

由图 1 可以看出,玉米浆、酵母粉、蛋白胨有利于细胞的生长,细胞干重分别为 7.23、7.2、6.6g/L;硫脲和脲不利于细胞的生长,细胞干重仅为 2.75 和 2.26g/L。玉米浆、酵母粉、蛋白胨也有利于虾青素的积累,特别是玉米浆,虾青素的含量为 727μg/g,产量为 5255μg/L,远远高于其他四种有机氮源,而且玉米浆来源广泛,比较廉价。因此,从工业利用的角度来看,玉米浆可以考虑作为红发夫酵母培养生产虾青素的氮源。

2.1.2 无机氮源对红发夫酵母生长及虾青素合成的影响 将无机氮源碳酸铵、磷酸三铵、酒石酸铵、柠檬酸三铵、硫酸铵、草酸铵、硝酸铵、乙酸铵、硫酸亚铁铵添加到无氮培养基中,测定其 72h 的细胞干重、虾青素含量及产量。无机氮源对红发夫酵母生长及

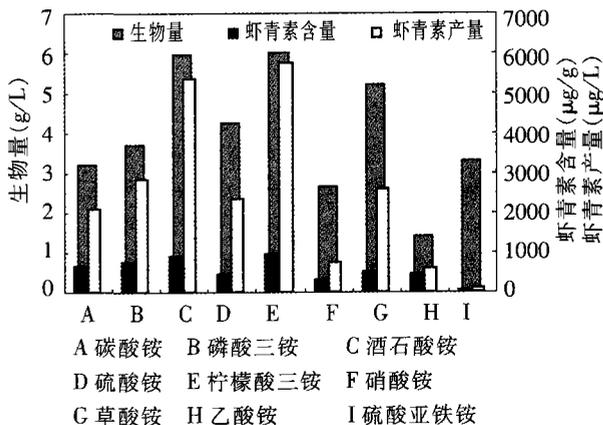


图 2 无机氮源对红发夫酵母生长及虾青素积累的影响

虾青素合成的影响如图 2 所示。

由图 2 可知,不同的无机氮源对细胞生长及虾青素合成的影响差异很大,酒石酸铵、柠檬酸三铵、草酸铵有利于细胞的生长,细胞干重分别为 5.93、6.02、5.80g/L;磷酸三铵、酒石酸铵、柠檬酸三铵也有利于虾青素的积累,虾青素的含量分别为 771、899、953μg/g;酒石酸铵、柠檬酸三铵不仅有利于细胞的生长,而且有利于虾青素的积累,虾青素的产量分别为 5734、5737μg/L;其次为磷酸三铵,虾青素产量为 2867μg/L。而其它无机氮源虾青素产量较低,特别是硫酸亚铁铵,虽然其细胞干重为 3.32g/L,但虾青素含量极低,不利于红发夫酵母合成虾青素。

2.2 利用有利氮源时生物量和虾青素积累的变化曲线

由图 1 和图 2 对比可知,理想的有机氮源为玉米浆,无机氮源为酒石酸铵、柠檬酸三铵、磷酸铵。将酒石酸铵、柠檬酸三铵、磷酸铵、玉米浆添加到无氮培养基中,定时测定生物量和虾青素含量。

2.2.1 有利氮源对红发夫酵母生长的影响 这些有利氮源对红发夫酵母生长的影响如图 3 所示。

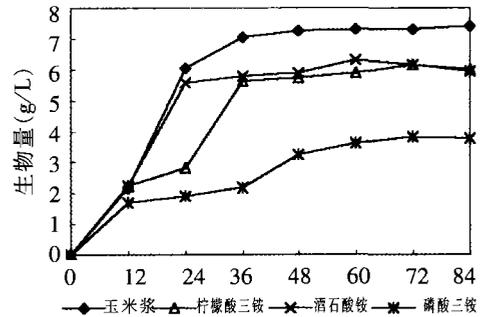


图 3 有利氮源对红发夫酵母生长的影响

各氮源的生长较快的时段不同,玉米浆为 0~36h,酒石酸铵 0~24h,柠檬酸三铵为 24~36h,磷酸三铵为 36~48h。大约在 48h 之后,生物量不再增加,趋于稳定。可见,有机氮源玉米浆较其它三种氮源更有利于菌体的生长,其次为酒石酸铵、柠檬酸三铵、磷酸三铵。

2.2.2 有利氮源对虾青素含量和产量的影响 有利

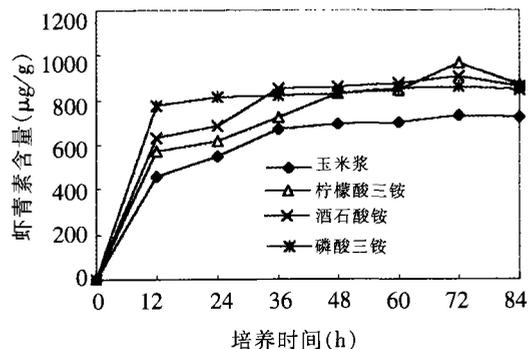


图 4 氮源对红发夫酵母虾青素含量的影响

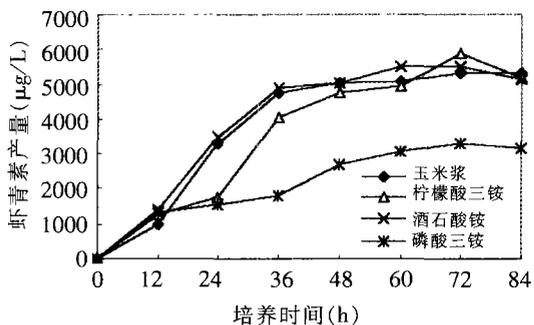


图5 氮源对红发夫酵母虾青素产量的影响

氮源对虾青素含量和产量的影响如图4、图5所示。

从图4,图5可知,玉米浆虽然不利于虾青素的积累,72h 虾青素含量最高仅为 726μg/g,但是它有利于红酵母的生长,使得虾青素产量最高为 5323μg/L;磷酸三铵有利于虾青素的积累,虾青素含量最高为 858μg/g,但不利于红酵母的生长,使得虾青素产量仅为 3279μg/L;柠檬酸三铵、酒石酸铵有利于虾青素的积累,虾青素含量分别为 962、900μg/g,虾青素产量分别为 5888、5510μg/L。由于柠檬酸三铵、酒石酸铵成本相对较高,所以可以考虑玉米浆与它们作为混合氮源,降低成本,发挥各自的优势。

2.2.3 有利氮源对培养基 pH 的影响 有利氮源对培养基 pH 的影响如图6所示。

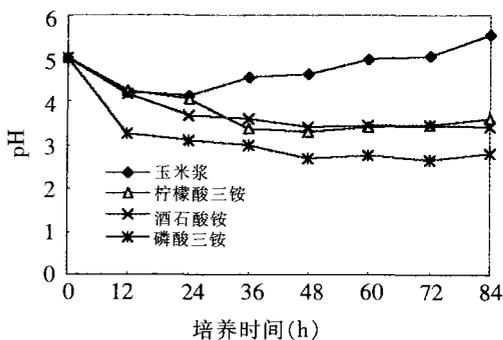


图6 红发夫酵母生长过程中 pH 的变化曲线

从图6可知,加入磷酸三铵的培养基 pH,随培养时间下降明显。24hpH 下降至 3.09,此后降至 3 以

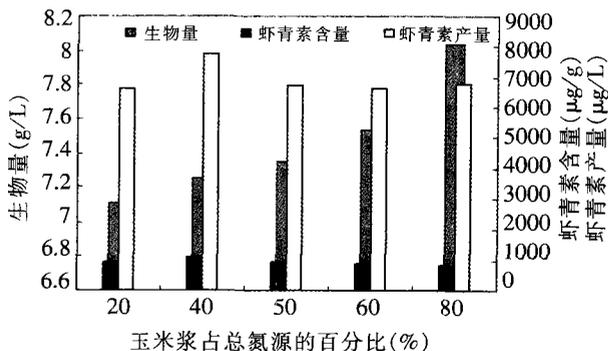


图7 玉米浆和柠檬酸三铵混合对红发夫酵母生长及虾青素积累的影响

下,此 pH 不利于红发夫酵母的生长,使得最终虾青素的产量相对较低。

加入酒石酸铵和柠檬酸三铵的培养基 pH 变化范围分别为 3.41~4.16、3.28~4.25,对虾青素积累的影响,有可能是它们提供了虾青素合成途径中的有用物质。加入玉米浆的培养基 pH 变化范围为 4.2~5.56,有利于红发夫酵母的生长和虾青素的积累。

玉米浆和硫酸铵混合实验结果如图8所示。

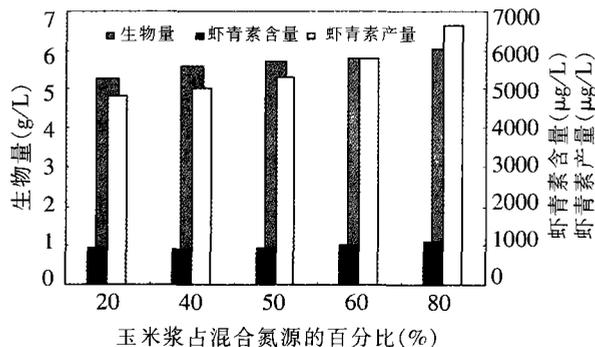


图8 玉米浆和硫酸铵混合对红发夫酵母生长及虾青素积累的影响

从图8可知,随着玉米浆所占总氮源百分比的增加,红酵母的生物量、虾青素的含量和产量逐渐增加,当玉米浆占总氮源的80%时达到最高,分别为 6.04g/L、1101μg/g、6644μg/L。硫酸铵对红酵母的生物量、虾青素的含量和产量影响不明显。

酵母粉与柠檬酸三铵混合实验结果如图9所示。

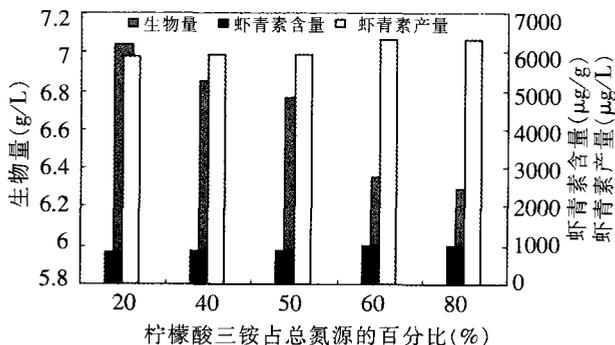


图9 酵母粉和柠檬酸三铵混合对红发夫酵母生长及虾青素积累的影响

从图9可知,酵母粉对红酵母的生长影响很大,随着其比例的下降,生物量下降明显,当酵母粉占总氮源百分比为80%和20%时,生物量分别为 7.04、6.29 g/L。而柠檬酸三铵对虾青素的积累有利,随着其含量的增加,虾青素的含量与产量也随之增加,当占总氮源80%时,虾青素含量与产量分别为 1004μg/g、6313μg/L。

3 结论

实验结果表明,不同氮源对于红发夫酵母的生长及虾青素产量有显著影响。 (下转第77页)

泡持值,同时做空白实验。

2.3 PGA 添加量对纯生啤酒泡沫稳定性的影响

见表 1。从表 1 可以看出,空白酒样的泡持值为 294s; 当试样用量为 30mg/L 时,啤酒的泡持值为 367s; 当试样用量为 35mg/L 时,啤酒的泡持值为 402s; 当用量超过 35mg/L 时,啤酒的泡持值反而呈下降趋势。

表 1 PGA 添加量对纯生啤酒泡沫稳定性的影响

PGA 溶液用量(mg/L)	0	20	25	30	35	40	45
泡持值(s)	294	304	318	367	402	400	398

2.4 PGA 添加量对货架期内纯生啤酒泡沫稳定性的影响

见表 2。由表 2 可见,在纯生啤酒中添加微量的 PGA 可明显地提高纯生啤酒的泡沫稳定性,有效地延缓货架期内成品啤酒泡沫稳定性的衰减。

表 2 PGA 添加量对货架期内纯生啤酒泡沫稳定性的影响

PGA 用量 (mg/L)	货架期间泡持值(s)						
	1d	2d	7d	14d	21d	30d	60d
0	294	290	275	204	175	185	180
20	304	316	308	306	301	298	290
25	318	328	324	320	318	310	302
30	367	372	370	365	354	347	348
35	402	408	400	400	392	392	390
40	400	396	395	390	391	387	385
45	398	396	380	367	354	348	351

2.5 PGA 对纯生啤酒理化指标的影响

见表 3。通过分析可知,添加微量的 PGA 对清酒的理化指标没有影响。

2.6 PGA 对纯生啤酒口味的影响

对添加 PGA 所滤出的清酒及成品酒与空白样作对照品评,两者口味一致,未发现异味。

3 结论

(上接第 75 页) 玉米浆和柠檬酸三铵是比较好的单一氮源,虾青素产量分别达到 5255、5737 $\mu\text{g/L}$ 。玉米浆很容易被微生物利用,因为它含有丰富的氨基酸(丙氨酸、赖氨酸、谷氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸等)、还原糖、磷、微量元素和生长素^[5]。柠檬酸三铵被菌体利用后,培养液中就留下酸性物质柠檬酸,引起 pH 的变化。柠檬酸可能与金属离子作用起到了调解 pH 的作用,而且柠檬酸也是三羧酸循环的中间物质,对整个发酵体系中的虾青素合成途径有积极作用。玉米浆和柠檬酸三铵的混合氮源对红发夫酵母积累虾青素效果更佳,当玉米浆在混合氮源中占 40%时,虾青素含量和产量最高,分别为 1068 $\mu\text{g/g}$ 、7746 $\mu\text{g/L}$,两者存在正的正交互作用。

表 3 PGA 对清酒理化指标的影响

项目	加 PGA 所滤的清酒	未加 PGA 所滤的清酒
色度(EBC)	6.0	6.0
酒精度, m/m(%)	3.21	3.20
双乙酰(mg/L)	0.05	0.06
pH	4.4	4.5
浊度(EBC)	0.31	0.33
CO ₂ , m/m(%)	0.61	0.60
总酸(mL/100mL)	1.82	1.82
苦味值(Bu)	13.6	13.9

3.1 在纯生啤酒中添加适量的 PGA,既可提高纯生啤酒的泡沫稳定性,又可延缓货架期内纯生啤酒泡沫稳定性的衰减。

3.2 啤酒的泡沫稳定性随 PGA 添加量的增加而增强。当 PGA 的添加量达到 35mg/L 时,可使纯生啤酒的泡沫稳定性明显提高; 当 PGA 的添加量超过 35mg/L 时,其作用效果趋于稳定,甚至出现下降趋势。

3.3 由于 PGA 的耐热性较差,其水溶液在 60℃以下稳定,因而 PGA 特别适用于纯生啤酒的泡沫稳定剂。

3.4 PGA 的使用对纯生啤酒的其他感官指标及生物稳定性均不会产生不良的影响。即使通过温瓶处理,PGA 也不会影响纯生啤酒的风味及胶体稳定性。

3.5 PGA 在酸性溶液中特别稳定,因此在配制 PGA 溶液时,应先将水的 pH 调整到 6.0 以下,最终溶液的 pH 不得超过 5.0。

参考文献:

[1] 天津轻工业学院食品工业教学研究室.食品添加剂[M].北京:中国轻工业出版社,1985,7:263.
 [2] 张立群,等.藻酸丙二醇酯应用研究[J].酿酒,2002(4):41-42.
 [3] Jackson G,Roberts R T,Wainwright T. Mechanism of beer foam stabilization by propylene glycol alginate[J]. J Inst Brew, 1980,86:34~37.

参考文献:

[1] 吴江,刘子怡.法夫红酵母高产虾青素菌株的研究概况[J].生物技术通报,1999,15(4):23~26.
 [2] 杨文,吉春明.一种简单的胞壁破碎方法[J].微生物学通报,1995,22(1):58~59.
 [3] Meyer P S,Du Preez J C. Effect of acetic acid on astaxanthin production by Phaffia rhodozyma[J].Biotechnology letters,1993,15(9):919~924
 [4] 朱明军,梁世中,吴海珍.不同氮源对红发夫酵母培养的影响[J].郑州工程学院学报,2001,22(2):59~61.
 [5] 俞俊堂,唐孝宣,邬行彦,等.生物工艺学[M].北京:化学工业出版社,2003.102~103.