

KNO<sub>3</sub> 对红发夫酵母生物合成虾青素的影响

华艳艳 孙玉梅 何连芳 陈芳良

(大连轻工业学院生物与食品工程学院,大连,116034)

**摘要** 比较了红发夫酵母(*Phaffia rhodozyma*)以KNO<sub>3</sub>、NaNO<sub>3</sub>、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>及蛋白胨为氮源的细胞生长及虾青素合成过程,重点研究了KNO<sub>3</sub>对红发夫酵母生物合成虾青素的影响。结果表明:低浓度KNO<sub>3</sub>(0.1~0.9 g/L)有利于细胞生长及虾青素合成,而高浓度KNO<sub>3</sub>(3.0~9.0 g/L)抑制细胞生长及虾青素合成。当培养基中含有0.3 g/L KNO<sub>3</sub>时,红发夫酵母的发酵过程不仅表现出细胞二次生长及虾青素二次合成现象,而且发酵周期较长,可获得较高的生物量和干细胞虾青素含量,分别为8.13 g/L和0.993 mg/g。

**关键词** 红发夫酵母, KNO<sub>3</sub>, 虾青素

红发夫酵母(*Phaffia rhodozyma*)属于担子菌纲(*basidiomycetous*)的红发夫酵母属(*Phaffia*)。因其能发酵多种糖合成具有极高经济价值的虾青素(3, 3'-二羟基-4, 4'-二酮基-β, β'-胡萝卜素)而极受关注<sup>[1,2]</sup>, 目前认为红发夫酵母是实现发酵法工业化生产虾青素最具潜力的菌种之一。

选用能促进产物合成且廉价易得的发酵原料是控制生产成本和提高产物产量的主要途径之一。(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>是红发夫酵母发酵制备虾青素的常用氮源<sup>[3]</sup>。Fang等<sup>[4]</sup>研究表明,酵母膏是突变株NCHU-FS301培养的最佳氮源。Fontana等<sup>[5]</sup>以红发夫酵母发酵制备虾青素,研究发现,蛋白胨是最佳单一氮源;分别以5.0 g/L酵母膏、牛肉膏、KNO<sub>3</sub>为氮源,可提高红发夫酵母中的类胡萝卜素含量。Parajo等<sup>[6]</sup>研究菌株NRRL Y-17268利用木糖合成虾青素,以3.0 g/L酵母膏和5.0 g/L蛋白胨为氮源时,加入0.2 g/L KNO<sub>3</sub>有利于提高所产类胡萝卜素中虾青素所占的比例。而朱明军等<sup>[7]</sup>发现,在较高浓度KNO<sub>3</sub>的培养基中,红发夫酵母的细胞产量及虾青素含量较低。但目前对KNO<sub>3</sub>为氮源的虾青素发酵过程及动力学尚无系统研究的报道。

文中采用红发夫酵母AS 2.1557发酵制备虾青素,比较了以KNO<sub>3</sub>、NaNO<sub>3</sub>、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>及蛋白胨为氮源的细胞生长和虾青素合成过程,探讨了KNO<sub>3</sub>对红发夫酵母生长及虾青素合成的影响,以期揭示KNO<sub>3</sub>影响红发夫酵母生长及虾青素合成的机理。

## 1 材料与方法

## 1.1 实验材料

## 1.1.1 菌种

红发夫酵母(*Phaffia rhodozyma*) AS 2.1557, 购自中国科学院微生物研究所。

## 1.1.2 培养基

(1)斜面培养基:葡萄糖10 g,麦芽汁(10°Bx)3 g,蛋白胨5 g,酵母膏3 g,琼脂20 g,自来水1 L, pH 6.0。

(2)种子培养基(YM培养基<sup>[8]</sup>):葡萄糖10 g,麦芽汁(10°Bx)3 g,蛋白胨5 g,酵母膏3 g,自来水1 L, pH 6.0。

(3)摇瓶发酵培养基<sup>[8]</sup>:葡萄糖20 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g, CaCl<sub>2</sub> 0.1 g, 酵母膏1 g, 自来水1 L, pH 6.0。

## 1.2 实验方法

## 1.2.1 培养方法

(1)菌种活化:取1环4℃保藏的斜面菌种,接种至新鲜YM斜面,于25℃恒温培养4 d。

(2)液体种子:将2环菌苔接种于装有25 mL种子培养基的250 mL三角瓶,于22℃、210 r/min振荡培养48 h。

(3)摇瓶发酵:将2 mL种子液接入装有23 mL发酵培养基的250 mL三角瓶,于22℃、210 r/min振荡培养,定期取样测定。

## 1.2.2 测定方法

(1)生物量测定:采用比浊法<sup>[9]</sup>。取1 mL发酵液,用纯净水稀释,并以除去菌体的发酵液作空白,测定500 nm波长下的吸光值。

第一作者:硕士研究生。

收稿日期:2004-09-14,改回日期:2005-03-15

(2) 虾青素提取及测定:二甲亚砜法<sup>[10]</sup>。取 2 mL 发酵液离心,收集菌体,洗涤 2 次,用 1 mL 二甲亚砜(55℃)破壁,加入 5 mL 丙酮提取,3 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,以二甲亚砜与丙酮混合液(体积比 1:5)为空白,测定上清液在 480 nm 波长下的吸光值。干细胞虾青素含量按如下公式计算:

$$\text{虾青素含量}(\text{mg/g}) = \frac{V_a \times A \times 10}{E \times G}$$

式中:  $V_a$  - 萃取液体积(mL);  $A$  - 480 nm 波长下的吸光值;  $E$  - 比消光系数,即  $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ ,为 2150;  $V_b$  - 发酵液取样体积(mL);  $G$  -  $V_b$  mL 发酵液中的细胞干重(g); 10 - 单位换算后的余数(mg/g)。

(3) 发酵液残糖测定:采用 3,5-二硝基水杨酸比色法<sup>[11]</sup>。

(4) 发酵液 pH 值测定:采用酸度计测定。

注:本实验中摇瓶发酵和分析测定均进行 3 次平行实验。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同氮源条件下的红发夫酵母生长及虾青素合成

分别以  $\text{KNO}_3$ 、 $\text{NaNO}_3$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  及蛋白胨为氮源,并使各培养基的含氮量相同,为 1.06 g/L。摇瓶培养红发夫酵母,定时取样测定,结果见图 1。

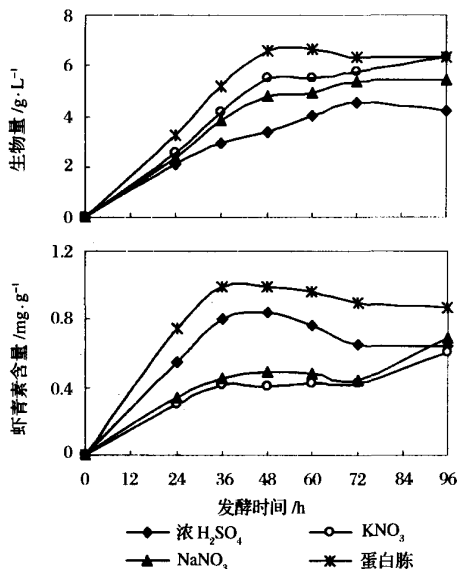


图 1 不同氮源对细胞生长及虾青素合成的影响

由图 1 可见,对细胞生长,在发酵 0~48 h 期间,不同氮源的细胞生长速度都较快,按蛋白胨、 $\text{KNO}_3$ 、

$\text{NaNO}_3$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的顺序递减,在发酵 48 h 时,蛋白胨为氮源的细胞产量已达最大;在发酵 48~72 h 期间,蛋白胨为氮源的细胞无明显生长,细胞量略有降低, $\text{KNO}_3$  和  $\text{NaNO}_3$  为氮源的细胞仍有生长,而  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  为氮源的细胞生长速度仍较快,在 72 h 达到了最大值;在发酵 72~96 h 期间,蛋白胨、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  和  $\text{NaNO}_3$  为氮源的细胞量基本不变,唯有  $\text{KNO}_3$  为氮源的细胞量略有增加,在发酵 96 h 时接近蛋白胨为氮源的细胞量。

对虾青素合成,在发酵 0~36 h 期间,不同氮源的细胞虾青素含量都迅速增加,以蛋白胨、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、硝酸盐的顺序递减。在发酵 36~72 h 期间,蛋白胨和  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  为氮源的细胞虾青素含量有所降低,后者降低较明显,随后 2 者的细胞虾青素含量基本不变。 $\text{KNO}_3$  和  $\text{NaNO}_3$  为氮源的细胞虾青素含量,在发酵 36~72 h 期间基本不变,在发酵 72~96 h 期间有增加趋势,到发酵 96 h 时,与  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  为氮源的细胞虾青素含量相当。

由此可见,在相同的氮素含量下,蛋白胨为氮源最有利于细胞生长和虾青素合成,其最高生物量和干细胞虾青素含量分别达到 6.65 g/L、0.994 mg/g。究其原因,可能是蛋白胨较其他 3 种无机氮源营养更全面,容易被红发夫酵母利用。以  $\text{KNO}_3$  和  $\text{NaNO}_3$  为氮源比以  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  为氮源更有利于细胞生长,而不及  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  为氮源的细胞虾青素含量高。另外, $\text{KNO}_3$  比  $\text{NaNO}_3$  更有利于细胞生长,但二者的虾青素发酵过程变化及生成量相近。

### 2.2 $\text{KNO}_3$ 浓度对红发夫酵母生长及虾青素合成的影响

在摇瓶发酵培养基中,分别以浓度为 0.1~9.0 g/L 的  $\text{KNO}_3$  为氮源,考察  $\text{KNO}_3$  浓度对红发夫酵母生长及虾青素合成的影响,发酵 72 h 的测定结果见图 2。

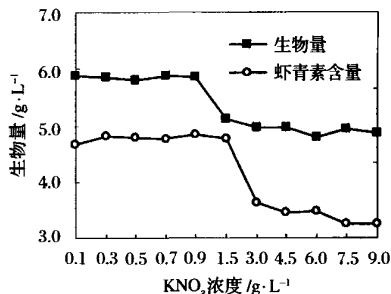


图 2  $\text{KNO}_3$  浓度对细胞生长及虾青素合成的影响

由图 2 可见,当培养基中  $\text{KNO}_3$  浓度在 0.1~0.9 g/L 时, $\text{KNO}_3$  浓度变化对细胞生长量及虾青素合成量影响较小,细胞产量及虾青素含量均较高;当  $\text{KNO}_3$  浓度高于 0.9 g/L 时,明显抑制细胞生长,而当  $\text{KNO}_3$  浓度高于 1.5 g/L 时,明显抑制虾青素合成;当培养基中  $\text{KNO}_3$  浓度在 3.0~9.0 g/L 时, $\text{KNO}_3$  浓度变化对细胞生长量及虾青素合成量的影响也较小,但细胞产量及虾青素含量均维持在较低水平。

由此可见,低浓度  $\text{KNO}_3$  对细胞生长及虾青素的合成有利,而高浓度  $\text{KNO}_3$  会对细胞生长及虾青素合成产生抑制作用。据文献报道,Cruz 等人<sup>[12]</sup>在研究红发夫酵母 *X. dendrorhous* ATCC 24228 以桉木水解物发酵生产虾青素时,培养基中加入较低浓度(0.1 g/L)  $\text{KNO}_3$  有利于虾青素合成。而朱明军等人<sup>[11]</sup>在研究以红发夫酵母合成虾青素时,采用了浓度较高的  $\text{KNO}_3$ (6.5 g/L),这可能就是其生物量及细胞虾青素含量较低的主要原因。

### 2.3 以 $\text{KNO}_3$ 为氮源时的发酵动态测定及机理分析

以含 7.0 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的摇瓶发酵为对照,跟踪测定以 0.3 g/L  $\text{KNO}_3$  为氮源的发酵过程中的生物量、细胞虾青素含量、发酵液残糖及 pH 值变化,结果如图 3 所示。

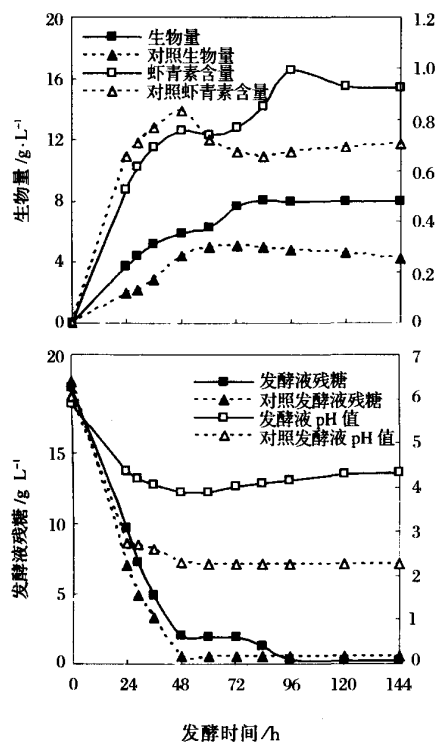


图 3 以 0.3 g/L  $\text{KNO}_3$  为氮源的发酵动态测定

从图 3 可见,在整个发酵过程中,低浓度  $\text{KNO}_3$  为氮源明显高于  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  为氮源的细胞量。在发酵 0~84 h 期间,红发夫酵母经历了 0~48 h 阶段的快速生长后,有一个短时的平衡阶段,随即在 60~84 h 期间又出现了一个快速生长阶段,生物量在发酵 84 h 达到最高值 8.13 g/L,随后基本趋于稳定。上述实验现象表明,在含 0.3 g/L  $\text{KNO}_3$  的培养基中,红发夫酵母的细胞生长存在二次生长。

采用低浓度的  $\text{KNO}_3$  为氮源,在发酵的前 60 h,红发夫酵母的虾青素合成与细胞生长同步,与粘红酵母 *Rhodotorula glutinis* 只有在细胞生长停止后才开始合成类胡萝卜素存在显著差别<sup>[13]</sup>。在发酵 60 h 后,细胞的虾青素合成滞后于细胞生长,表现为细胞达二次生长高峰后,细胞的虾青素合成量剧增,与非生长关联模式相似,与粘红酵母 *Rhodotorula glutinis* 在细胞生长停止后才开始合成类胡萝卜素存在相似性。以 0.3 g/L  $\text{KNO}_3$  为氮源,在发酵 0~48 h 期间,细胞虾青素含量低于对照组;在发酵 48 h 时,细胞虾青素含量达到较高值,在此后较长的一段时间内,细胞虾青素含量变化不大;在发酵 72~96 h 期间,菌体又开始以较快的速度合成虾青素,干细胞虾青素含量在发酵 96 h 时达到最大值 0.993 mg/g,随后略有下降。而对照组的细胞虾青素含量在发酵 48 h 时达到最高值后明显下降,在发酵 60 h 后细胞虾青素含量低于  $\text{KNO}_3$  为氮源发酵的细胞虾青素含量,且随发酵时间的延长,二者的细胞虾青素含量差别增大。由此可见,在含 0.3 g/L  $\text{KNO}_3$  的培养基中,红发夫酵母的虾青素合成存在二次合成,细胞最大量合成虾青素所需的时间较长。

从图 3 还可以看出,在整个发酵过程中,低浓度  $\text{KNO}_3$  为氮源与对照组的发酵液 pH 值和残糖变化差异较大,表现为前者的发酵液 pH 值降低幅度较小,在发酵约 60 h 开始缓慢回升,接近虾青素合成的最适 pH 4.5~5.0<sup>[14]</sup>,如此 pH 值变化对红发夫酵母的虾青素合成非常有利。而对照组的发酵液 pH 值在发酵 48 h 时降至最低,以后一直稳定在 pH 2.25 左右,远低于以低浓度  $\text{KNO}_3$  为氮源的同期发酵液 pH 值,这可能是导致  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  为氮源的发酵后期细胞虾青素含量不高的主要原因。

以低浓度  $\text{KNO}_3$  为氮源,红发夫酵母的发酵过程不仅表现出细胞二次生长及虾青素二次合成现象,而且发酵周期较长,这可能是由于  $\text{KNO}_3$  是一种高度氧化的无机氮源,细胞需将  $\text{NO}_3^-$  逐步还原成

$\text{NH}_4^+$  才能利用,使细胞对  $\text{KNO}_3$  的利用速度慢,综合表现为细胞生长和虾青素合成的速度受限,发酵周期较长。相比之下,以  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  为氮源发酵时,细胞可直接利用  $\text{NH}_4^+$ ,细胞生长和虾青素合成速度快,在较短的时间内,细胞生长量及虾青素合成量即可达到较高值;但生长平衡期后的细胞虾青素含量降低,这可能是以  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  为氮源进行发酵的化学环境,使原有细胞中已生成的虾青素转化成其他化合物,也使新生细胞的代谢不利于走向合成虾青素。

### 3 结 论

$\text{KNO}_3$  浓度对红发夫酵母的生长及虾青素合成有显著影响;低浓度  $\text{KNO}_3$  比高浓度  $\text{KNO}_3$  更有利于细胞生长和虾青素合成;与蛋白胨和  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  为氮源相比,以  $0.3 \text{ g/L}$   $\text{KNO}_3$  为氮源的发酵周期虽然较长,但细胞产量和虾青素含量很高,因而  $\text{KNO}_3$  更适于作为红发夫酵母生长及虾青素合成的氮源。

### 参 考 文 献

- Johnson E A. *Phaffia rhodozyma*: colorful odyssey [J]. Industry Microbiology, 2003, 6: 169~174
- Andrewes A G, Phaff H J, Starr M P. Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red-pigmented fermenting yeast [J]. Phytochemistry, 1976, 15: 1003~1007
- Yamane Y, Higashida K, Nakashimada Y, et al. Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* enhanced in fed-batch culture with glucose and ethanol feeding [J]. Biotechnology Letter, 1997, 19: 1109~1111
- Fang T J, Cheng Y S. Improvement of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through mutation and optimization of culture conditions [J]. Fermentation and Bioengineering, 1993, 75(6): 466~469
- Fontana J D, Guimaraes M F, Mertins N T, et al. Culture of the astaxanthin organic yeast *Phaffia rhodozyma* in low-cost media [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1996, 57/58: 413~422
- Parajo J C, Santos V, Vazquez M. Optimization of carotenoid production by *Phaffia rhodozyma* cells grown on xylose [J]. Process Biochemistry, 1998, 33(2): 181~187
- 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
- Yamane Y, Higashida K, Nakashimada Y et al. Influence of oxygen and glucose on primary metabolism and astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in batch and fed-batch cultures: kinetic and stoichiometric analysis [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63: 4471~4478
- Ramirez J, Gutierrez H, Gschaedler A. Optimization of astaxanthin production by *P. rhodozyma* through factorial design and response surface methodology [J]. Journal of Biotechnology, 2001, 88(3): 259~268
- Sedmak J J, Weerasinghe D K, Jolly S O. Extraction and quantitation of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* [J]. Biotechnology Techniques, 1990, 4(2): 107~112
- 北京大学生物系生化教研室编. 生物化学实验指导 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1984. 23~26
- Cruz J C, Parajo J C. Improved astaxanthin production by *X. dendrorhous* growing on enzymatic wood hydrolysates containing glucose and cellobiose [J]. Food Chemistry, 1998, 63 (4): 479~484
- Vechev A S, Kulilova A. Changes in polyene compounds at various stages of carotenoid development of *rhodotorula glutinis* [J]. Mikrobiologiya, 1968, 37: 558~560
- Johnson E A, Lewis M J. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma* [J]. Journal General Microbiology, 1979, 115: 173~183

## Effects of Potassium Nitrate on Biosynthesis of Astaxanthin by *Phaffia rhodozyma*

Hua Yanyan Sun Yumei He Lianfang Chen Fangliang

(College of Bio & Food Engineering, Dalian Institute of Light Industry, Dalian, 116034, China)

**ABSTRACT** Cell growth and astaxanthin synthesis of *Phaffia rhodozyma* with potassium nitrate, sodium nitrate, ammonium sulfate and peptone as nitrogen source, were studied. The results showed that the cell growth and astaxanthin synthesis of *Phaffia rhodozyma* were enhanced by low concentrations of potassium nitrate ( $0.1 \sim 0.9 \text{ g/L}$ ), but were inhibited by high concentrations of potassium nitrate ( $3.0 \sim 9.0 \text{ g/L}$ ). When the fermentation medium contained  $0.3 \text{ g/L}$  of potassium nitrate, cell re-growth and astaxanthin re-synthesis phenomena appeared during the fermentation process of *Phaffia rhodozyma*. The highest cellular dry weight and cellular astaxanthin content were  $8.13 \text{ g/L}$  and  $0.993 \text{ mg/g}$  respectively.

**Key words** *Phaffia rhodozyma*, potassium nitrate, astaxanthin