

红发夫酵母两步碳源流加培养*

梁 成 黄彦君 吴海珍 梁世中

(华南理工大学食品与生物工程学院, 广州, 510640)

摘 要 红发夫酵母是虾青素生产中最具潜力的生物来源。研究中应用 *Phaffia rhodozyma* As 2.1557 菌种, 通过实验和分析方法确定碳源的两步流加培养方式, 即第 1 步用蔗糖和甘油的混合物, 第 2 步则流加蔗糖和乙醇的混合物。培养结果良好。

关键词 红发夫酵母, 虾青素, 两步流加法

随着水产养殖业的发展, 虾青素的需求量越来越大, 其主要生物来源是甲壳类动物的提取液、血球藻和红发夫酵母(*Phaffia rhodozyma*)。其中红发夫酵母具有生长速度快、发酵周期短, 能在发酵罐中实现高密度培养, 以及色素提取后菌体单细胞蛋白可作为饵料、饲料添加剂等优点而成为目前研究的重点。但是野生型红发夫酵母虾青素含量还不够高, 只有 200~300 $\mu\text{g/g}$ 干细胞, 与工业生产还有一定的距离^[1]。虾青素产业化的关键在于筛选出高虾青素产量的菌株和价格低廉的培养基, 使酵母生物量和虾青素产量都得到较大的提高。本实验研究确定具体的碳源流加方式。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌 种

红发夫酵母(*Phaffia rhodozyma* As2.1557)购自中科院微生物研究所, 华南理工大学生化工程研究室选育保藏。

1.1.2 培养基

(1) YM 培养基(g/L): 葡萄糖 10, 酵母膏 3, 蛋白胨 5, 麦芽汁 3, pH 值 5.0。

(2) 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, pH 值 5.0。

(3) 液态种子培养基(g/L): YM 培养基。

(4) 发酵培养基(g/L): 酵母膏 0.1, KH_2PO_4 0.5, NaH_2PO_4 0.5, CaCl_2 0.1, MgSO_4 0.14, 蔗糖 16.42, 尿素 2.27, 甘油 0.929, pH 5.0。

所有培养基均在 121℃ 下灭菌 20 min。

1.2 实验方法

1.2.1 培养方法

斜面菌种: 菌株接入斜面培养基上, 20℃ 培养 48 h, 4℃ 保藏。

摇瓶种子: 将 1 环菌苔接种于装有 30 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶, 于 20℃、160 r/min 培养 48 h。

摇瓶发酵: 将摇瓶种子以 10% 的接种量接入装有 50 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中, 20℃、160 r/min 培养。

1.2.2 测定方法

(1) 生物量的测定

红发夫酵母生物量采用干重法测定。取 10 mL 酵母培养液, 2 500 r/min 离心 5 min, 水洗 2 遍, 将菌体转移至预先衡重的称量瓶, 在 105℃ 干燥至恒重, 称重 $W(\text{g})$, 并由此计算细胞浓度(g/L) = 1000 $W/10$ 。

(2) 虾青素含量的测定

细胞培养 96 h, 清洗离心, 然后进行细胞破碎, 并用丙酮溶液提取, 通过以下公式计

第一作者: 硕士研究生。

* 广东省自然科学基金资助项目(No. 990671)

收稿时间: 2001-05-11, 改回时间: 2001-09-24

算^[3]:

虾青素含量($\mu\text{g/g}$ 干细胞)

$$= A_{474} \times D \times V / (0.16 \times W)$$

式中: A_{474} 为提取液在474 nm处的吸光度; D 为测定试样的稀释倍数; V 为丙酮体积(mL); W 为用于提取的红酵母细胞干重(g)。0.16为虾青素的消光系数。

1.2.3 实验方案的设计

使用混合碳源,一方面促进细胞生物量的增加,另一方面促进虾青素的积累。筛选碳源后,通过组合分析确定合适的混合碳源两步流加方式。

2 结果与讨论

2.1 碳源的影响

依照碳源摩尔量相等的原则,分别选取(g/L):葡萄糖20、木糖18.18、棉子糖20、果糖18.18、D-甘露糖18.18、蔗糖17.27、乙醇14.68、甘油18.59、醋酸钠24.84、麦芽糖18.18和可溶性淀粉18.18作为单一碳源。实验结果如图1所示。

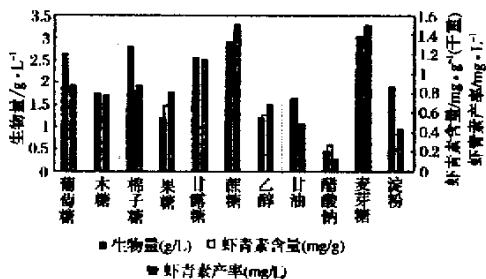


图1 不同碳源的筛选

从图1看到,麦芽糖、蔗糖为最佳的碳源,其次为甘露糖、葡萄糖和棉子糖。在这几种碳源中,甘露糖和麦芽糖的价格较高。综合考虑,选择葡萄糖和蔗糖较好。

值得一提的是,果糖和乙醇作为碳源,细胞生物量(DBW)虽不高,仅为1.2 g/L,但其虾青素含量分别为677.08和572.92 $\mu\text{g/g}$ (干重),明显高于其他碳源。这对如何提高细胞虾青素含量提供了一个有益的启示:我

们可以先后使用2种混合碳源,一种促进生物量的提高,另一种则促进虾青素的积累。

2.2 碳源组合的优化与析因设计

2.2.1 碳源组合的优化

在2.1节实验中初步选定几种碳源即葡萄糖、木糖、蔗糖、麦芽糖、乙醇和甘油,进行混合碳源的实验。为了判断哪种碳源对细胞的生物量和虾青素的影响较大,先将乙醇和甘油与其他4种碳源混合配对,筛选出较优的组合,然后进行析因设计,确定组合里2种碳源的添加比例。

各组碳源如下(单位: g/L):

- A. 葡萄糖17+乙醇2.2; B. 蔗糖14.68+乙醇2.2;
C. 麦芽糖15.45+乙醇2.2; D. 葡萄糖17+甘油2.79;
E. 蔗糖14.68+甘油2.79; F. 麦芽糖15.453+甘油2.7;
G. 蔗糖17.27。

具体的测定结果如图2所示。

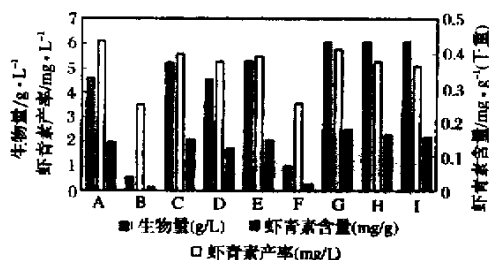


图2 混合碳源对红发夫酵母生长和虾青素积累的影响

从图2看出,蔗糖分别与乙醇和甘油的组合,酵母细胞的生物量和虾青素含量是最高的,因此在下面的实验中将对蔗糖+甘油和蔗糖+乙醇这2个组合进行析因分析,确定其最佳的比例组合。

2.2.2 析因设计

取乙醇的添加范围是5%~15%,甘油5%~15%,蔗糖的范围是85%~95%。碳源组别为:

- A. 95%蔗糖; C. 15%乙醇; E. 15%甘油;
B. 85%蔗糖; D. 5%乙醇; F. 5%甘油。

通过析因设计,在实验的基础上确定蔗糖、乙醇和甘油的添加范围^[5]。

(1) 乙醇对红发夫酵母生物量的影响

以乙醇和蔗糖作为混合碳源,调配蔗糖含量为 95% 和 85%,乙醇含量为 15% 和 5%,测定细胞浓度。实验结果如表 1 所示。

表 1 蔗糖和乙醇添加范围的 2^2 析因设计表

试验 单元	处理组合结果 细胞浓度(干重 $\text{Y}_{\text{g} \cdot \text{L}^{-1}}$)	重 复		
		I	II	总计
Y I	BD 蔗糖(低),乙醇(低)	4.74	4.56	9.3
Y II	AD 蔗糖(高),乙醇(低)	5.54	5.4	11.04
Y III	BC 蔗糖(低),乙醇(高)	4.86	4.88	9.74
Y IV	AC 蔗糖(高),乙醇(高)	5.46	5.28	10.74

由表 1 可知,5%~15% 的体积分数范围内,乙醇对红发夫酵母细胞生长没有显著影响。

(2) 甘油对红发夫酵母生物量的影响

以蔗糖和甘油作为混合碳源,蔗糖浓度为 95% 和 85%,甘油为 15% 和 5%,测定细胞的浓度。实验结果如表 2 所示。

表 2 蔗糖和甘油添加范围的 2^2 析因设计表

试验 单元	处理组合结果 细胞浓度(干重 $\text{Y}_{\text{g} \cdot \text{L}^{-1}}$)	重 复		
		I	II	总计
Y I	蔗糖(低),甘油(高)	5.36	5.14	9.3
Y II	蔗糖(高),甘油(低)	5.74	5.42	11.16
Y III	蔗糖(低),甘油(低)	5.36	5.14	10.50
Y IV	蔗糖(高),甘油(高)	5.62	5.84	11.46

由表 2 可知,5%~15% 的浓度范围内,甘油对红发夫酵母的细胞生长没有显著影响。

(3) 乙醇对红发夫酵母的虾青素积累的影响

以蔗糖和乙醇为混合碳源,蔗糖质量分别为 95% 和 85%,乙醇体积分数为 15% 和 5%,测定细胞的虾青素含量。实验结果如表 3 所示。

表 3 蔗糖和乙醇添加范围的 2^2 析因设计表

试验 单元	处理组合结果 虾青素含量 $/\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (干重)	重 复		
		I	II	总计
Y I	BD 蔗糖(低),乙醇(低)	349.42	327.58	677
Y II	AD 蔗糖(高),乙醇(低)	320.4	330.45	650.85
Y III	BC 蔗糖(低),乙醇(高)	290.64	263.83	554.47
Y IV	AC 蔗糖(高),乙醇(高)	343.41	352.75	696.16

由表 3 可知蔗糖和乙醇的混合碳源配对,乙醇对红发夫酵母的类胡萝卜素积累有显著影响。

(4) 甘油对红发夫酵母的虾青素积累的影响

以蔗糖和甘油作为混合碳源,蔗糖质量分数为 95% 和 85%,甘油为 15% 和 5%,测定虾青素含量。实验结果如表 4 所示。

表 4 蔗糖和甘油添加范围的 2^2 析因设计表

试验 单元	处理组合结果 虾青素含量 $/\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (干重)	重 复		
		I	II	总计
Y I	BE 蔗糖(低),甘油(高)	292.9	291.03	583.93
Y II	AF 蔗糖(高),甘油(低)	350.61	337.87	688.48
Y III	BF 蔗糖(低),甘油(低)	336.99	329.52	666.51
Y IV	AE 蔗糖(高),甘油(高)	329.24	309.16	638.4

由表 4 可知,5%~15% 的质量分数范围内,甘油对红发夫酵母的类胡萝卜素含量没有显著影响。

3 结论与展望

通过上述实验,得知乙醇和蔗糖为混合碳源时,乙醇浓度提高有利于虾青素积累。当乙醇的添加浓度超过细胞的承受范围时,细胞停止生长。所以在用乙醇和蔗糖作为混合碳源的时候,必须控制乙醇的添加浓度。

甘油和蔗糖作为混合碳源时,甘油对红发夫酵母的细胞生长并没有显著影响。但添加少量的甘油比不添加甘油以及添加乙醇更能促进细胞生长。甘油的添加比例可控制在 5% 左右。

实验确定了在生物反应器培养红发夫酵母的两步碳源流加方案。第 1 步选择蔗糖和甘油作为混合碳源,甘油的比例为 5% 左右;当红发夫酵母进入生长的稳定期后,虾青素开始大量积累,此时选择蔗糖和乙醇混合物作为流加碳源,乙醇占总碳源的 5% 左右。

参 考 文 献

- 1 Johnson E A, An Gil-Hwan. Critical Reviews in Biotechnology, 1991 4 297~326

- 2 陈思耘, 萧熙佩. 酵母生物化学. 济南: 山东科学技术出版社, 1990. 1
- 3 Yamane Y, Higashida K et al. Biotechnology Letters, 1997, 19(11): 109~111
- 4 Gu W L, An G H, Johnson E A. Journal of Industrial Microbiology, 1997, 19(2), 114~117
- 5 宋 清, 张得聪. 实验设计与数据评价. 广州: 华南理工大学出版社, 1996. 73~76

Two-step Addition of Carbon Source for the Culture of *Phaffia rhodozyma*

Liang Cheng Huang Yanjun Wu Haizheng Liang Shizhong

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

ABSTRACT *Phaffia rhodozyma* is the most potential biological source of astaxanthin. By experiment and datamining, two-step addition of substrate was set up, the medium used initial contained sugar and glycerol and the fed-batch medium was the mixture of sugar and alcohol.

Key words *Phaffia rhodozyma*, astaxanthin, two-step addition method

安琪公司“年产 15 000t 高活性干酵母生产线”建成投产

湖北安琪酵母股份有限公司“年产 15 000t 高活性干酵母生产线”项目经过 15 个月的艰辛努力, 已建成投产并一次运行成功。该项目是国家技术改造项目, 是安琪上市募集资金投向的最大项目, 项目总投资 18 128 万元, 其中固定资产投资 16 182 万元。

该项目于 2000 年 8 月破土动工, 2001 年 12 月正式投料并连续生产。初步统计项目累计完成固定资产投资 16 200 万元, 完成计划投资的 100.1%。

该生产线汇集了当今世界上最先进的酵母生产工艺技术、酵母生产装备与控制技术, 能实现提高质量、降低消耗和规模经济的目标, 是目前世界上最先进的, 规模最大的单条高活性干酵母生产线之一。

项目建成投产后正常年份新增销售收入 38 710 万元, 利润 9 876 万元, 投资利润率 43.57%。

安琪公司科技攻关项目动态

湖北安琪酵母股份有限公司承担的“高糖高活性干酵母菌种选育及产品开发”项目于 2001 年 12 月 26 日通过湖北省科技厅的专家鉴定。专家对项目的完成给予了高度的评价, 一致认为, 安琪耐高糖面包酵母菌种性能优良, 达到了国际同类产品的水平, 具有自主知识产权, 并且形成了国内独创的全套高糖高活性干酵母生产工艺。

另据报道, 国家“十五”科技攻关项目近日揭晓, 湖北安琪酵母股份有限公司和湖北大学合作的“魔芋甘露寡糖产品的研制”项目正式被国家科技部认定为国家“十五”攻关发酵工程项目。这是该公司在完成国家“九五”攻关项目后的又一个国家级项目。

2000 年世界 10 大啤酒公司排名

2000 年世界 10 大顶尖啤酒公司的排名顺序如下:

Anheuser-Busch, 产量: 1 580 万 t, 全球市场份额: 12.0%; Interbrew, 产量: 971 万 t, 全球市场份额: 7.4%; Heineken, 产量: 720 万 t, 全球市场份额: 5.5%; Amber, 产量: 560 万 t, 全球市场份额: 4.3%; SAB, 产量: 530 万 t, 全球市场份额: 4.0%; Miller, 产量: 530 万 t, 全球市场份额: 4.0%; Carlsberg, 产量: 440 万 t, 全球市场份额: 3.4%; Scottish & N, 产量: 360 万 t, 全球市场份额: 2.7%; Asahi, 产量: 350 万 t, 全球市场份额: 2.7%; Kirin, 产量: 320 万 t, 全球市场份额: 2.4%。