

一株海洋红法夫酵母 *Phaffia rhodozyma* RP-306 产虾青素的发酵条件优化

林嘉祺^{1,2}, 庄岩², 刘骁^{2,3}, 曾翰庭², 张玉苍¹, 产竹华², 曾润颖²

(1. 集美大学 海洋食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021; 2. 自然资源部第三海洋研究所 自然资源部海洋生物资源开发利用工程技术创新中心, 福建 厦门 361005; 3. 福州大学 先进制造学院, 福建 晋江 362200)

摘要: 为提高海洋红法夫酵母 *Phaffia rhodozyma* RP-306 的虾青素产量, 本研究利用单因素和响应面实验对其发酵条件进行了优化。首先用单因素实验确定了蔗糖、酵母粉、硫酸铵、pH、温度和装液量 6 个因素的初始值, 再利用 Plackett-Burman 实验筛选出了影响较大的 3 个因素: 蔗糖、pH、温度, 并采用最陡爬坡实验确定了因素的合理范围, 最后采用响应面法中的中心组合设计进行优化, 其优化发酵条件为: 蔗糖 29.93 g/L, 酵母粉 2.0 g/L, 硫酸铵 5.0 g/L, pH 5.27, 温度 19.9 °C。在此条件下虾青素产量从 13.46 mg/L 提高到 17.04 mg/L, 比优化前提高了 26.61%。以优化后发酵条件进行分批发酵, 虾青素产量达到 28.86 mg/L, 为进一步发酵放大研究奠定了良好基础。

关键词: 红法夫酵母; 虾青素; 发酵条件; 响应面优化

中图分类号: Q815 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2024)2-0069-10

DOI: 10.11759/hyxx20220726002

虾青素(Astaxanthin)是一种具有超强抗氧化性的类胡萝卜素^[1], 表现为具有自由基清除和增强细胞抗氧化性的能力^[2]。虾青素还有抗炎^[3]与抗癌^[4]、预防心血管疾病^[5]、增强免疫功能^[6]、肉类着色^[7]等功能, 在医药、水产养殖、化妆品、食品等行业得到广泛应用^[8]。

红法夫酵母(*Phaffia rhodozyma*)与雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)是虾青素主要的微生物来源^[9]。红法夫酵母中产十多种类胡萝卜素, 虾青素在这些类胡萝卜素中占比达 70%以上^[10]。相比于雨生红球藻, 红法夫酵母产虾青素有发酵周期短、无需日光照射、细胞壁容易破碎和易规模化培养等优点^[11]。目前提高红法夫酵母虾青素产量的研究主要集中于诱变选育高产菌株、优化发酵条件、基因工程改造等方面^[9]。

本研究以实验室前期通过诱变选育筛选出的红法夫酵母(*Phaffia rhodozyma* RP-306)作为研究对象, 进行发酵条件优化, 以期得到高产虾青素的发酵条件。首先通过单因素优化初步确定碳源、有机氮源的种类及添加量、无机氮源的种类及添加量、pH、温度和装液量, 其次通过 Plackett-Burman 实验设计与 Minitab17 软件分析显著性因素, 最后利用最陡爬

坡实验、响应面分析法获得提高虾青素产量的发酵条件。以优化后发酵条件对 *Phaffia rhodozyma* RP-306 进行分批发酵, 其虾青素产量达到了较高水平, 为进一步生产应用奠定了前提条件。

1 材料和方法

1.1 菌种与培养基

红法夫酵母(*Phaffia rhodozyma* RP-306)菌株由本实验室采用等离子体诱变选育获得(数据未列出); 出发菌株来源于福建漳江口红树林保护区(23°55'45"N, 117°27'33"E), 保藏于海洋微生物菌种保藏中心, 编号 2A00437。

种子培养基组成(YPD培养基): 酵母粉 10.0 g/L, 蛋白胨 20.0 g/L, 葡萄糖 20.0 g/L, 自然 pH, 添加

收稿日期: 2022-07-26; 修回日期: 2022-09-16

基金项目: 自然资源部资助项目(HX05-210101-21); 自然资源部新专项资助项目(HR02-200301-22)

[Foundation: Ministry of Natural Resources Funded Project, No. HX05-210101-21; Ministry of Natural Resources New Special Funded Project, No. HR02-200301-22]

作者简介: 林嘉祺(1998—), 男, 汉族, 福建三明人, 硕士研究生, 研究方向为微生物与发酵工程, E-mail: linkakie0305@163.com; 产竹华(1981—), 通信作者, 男, 汉族, 安徽怀宁人, 博士, 高级工程师, 研究方向为海洋微生物及酶的应用研究, E-mail: chan@tio.org.cn

20.0 g/L 琼脂即为固体培养基, 115 °C 灭菌 30 min 后备用。

发酵培养基组成: 蔗糖 30.0 g/L, 酵母粉 2.0 g/L, (NH₄)₂SO₄ 5.0 g/L, KH₂PO₄ 1.0 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.05 g/L, CaCl₂·2H₂O 0.01 g/L, 115 °C 灭菌 30 min 后备用。

1.2 培养方法

1.2.1 种子制备方法

取-80 °C 保存的菌种接种于固体平板培养基活化, 活化后接种于装液量 20.0 mL 的 100.0 mL 摇瓶中, 25 °C, 200 r/min 培养 24~36 h。

1.2.2 摇瓶发酵培养

按体积分数 8.0% 接种量接种于装液量 50.0 mL 的 250.0 mL 摇瓶中, 25 °C, 200 r/min 培养 72 h。

1.3 单因素实验

摇瓶发酵培养 *Phaffia rhodozyma* RP-306 菌株, 考察碳源种类、碳源添加量、氮源种类、有机氮源添加量、无机氮源添加量、pH、温度、装液量对其生物量和虾青素产量的影响。各组进行 3 次平行实验, 实验结果取平均值。

1.4 响应面实验设计

1.4.1 Plackett-Burman 实验

根据单因素实验结果, 选择蔗糖、酵母粉、硫酸铵、pH、温度和装液量 6 个因素, 采用六因素二水平的析因实验设计, 分析影响 *Phaffia rhodozyma* RP-306 虾青素产量的显著因素(表 1)。

表 1 Plackett-Burman 实验因素水平

Tab. 1 Factors and levels in the Plackett-Burman design

因素	单位	符号	水平	
			-1	+1
蔗糖	g/L	X ₁	25	35
酵母粉	g/L	X ₂	1.5	2.5
硫酸铵	g/L	X ₃	4	6
pH	—	X ₄	5	6
温度	°C	X ₅	18	22
装液量	mL	X ₆	30	50

1.4.2 最陡爬坡实验

根据 Plackett-Burman 实验结果, 采用最陡爬坡实验确定显著因素变化的取值范围在最优范围内, 最优组合在后续实验中继续寻找。

1.4.3 响应面实验

采用中心组合实验设计进行优化(表 2), 将优化所得数据与响应面进行拟合, 进行验证实验。

表 2 中心组合实验因素水平

Tab. 2 Factors and levels of central composite design

符号	因子	单位	水平				
			-1.68	-1	0	1	1.68
X ₁	蔗糖	g/L	26	28	31	34	36
X ₂	pH	—	5.0	5.2	5.4	5.6	5.8
X ₃	温度	°C	17.4	19	20	21	22.6

1.5 5.0 L 发酵罐培养

在 5.0 L 发酵罐中使用优化后发酵培养基培养, 装液量 3.0 L, 接种量 8.0%, 温度 20 °C, pH 5.3, 控制搅拌转速和通气量使得溶解氧保持在 30.0%~50.0%。

1.6 分析方法

1.6.1 细胞干重测定

取 50.0 mL 发酵液 8 000 r/min, 10 min 离心去除上清, 冷冻干燥 12 h, 烘箱烘干 15 min, 称量菌体质量。

1.6.2 虾青素提取

采用二甲基亚砜法^[12], 取 5.0 mL 发酵液, 8 000 r/min 离心 10 min 去除上清, 洗涤两次。加入二甲基亚砜(60 °C 预热)5.0 mL, 60 °C 水浴 30 min。加入 5.0 mL 丙酮振荡提取, 离心收集上层提取液。

1.6.3 虾青素浓度测定

采用紫外分光光度计检测^[13], 配制不同浓度梯度的虾青素标准品, 测定波长 474 nm 的吸光度, 绘制虾青素与吸光度的标准曲线, 根据标准曲线计算虾青素浓度。

2 结果与讨论

2.1 单因素优化菌株 *Phaffia rhodozymas* RP-306 摇瓶发酵

2.1.1 不同碳源种类的影响

在无碳源发酵培养基中, 分别添加 20.0 g/L 果糖、葡萄糖、乳糖、木糖、蔗糖、麦芽糖。发酵培养 *Phaffia rhodozyma* RP-306, 测定其虾青素浓度和细胞干重, 结果如图 1。

微生物能利用碳源为自身生长提供能量, 碳源也能转化为微生物自身细胞的组成成分, 还对微生物酶具有直接影响^[14]。图 1 可以看出, 果糖、葡萄糖、

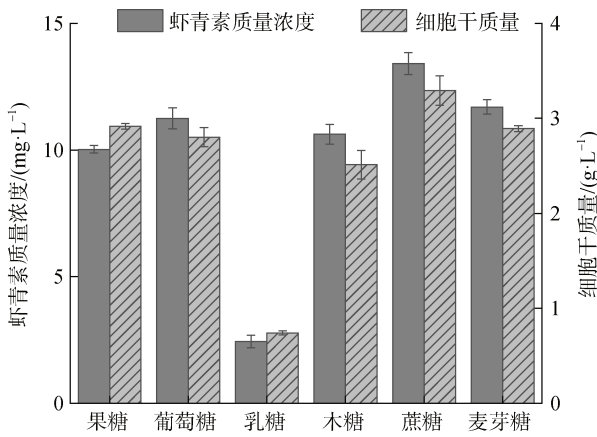


图 1 不同碳源对菌株生长及虾青素产量的影响

Fig. 1 Effect of different carbon sources on cell growth and yield of astaxanthin

木糖、蔗糖、麦芽糖为碳源时, 虾青素质量浓度和细胞干质量处于较高水平; 而乳糖作为碳源时, 虾青素质量浓度和细胞干质量则明显降低, 可能由于 *Phaffia rhodozyma* RP-306 中缺乏代谢乳糖的相关基因, 使得菌株对乳糖利用率降低, 从而抑制生长和代谢。蔗糖作为唯一碳源时, 其虾青素质量浓度最高, 达到 13.41 mg/L, 细胞干质量也最大, 达到 3.29 g/L。Vazquez 等^[15]研究中发现红法夫酵母菌株 ATCC 24203、ATCC 24261 在利用蔗糖的情况下拥有最大的细胞干质量; 张森^[16]在培养红法夫酵母 AS2.1557 使用蔗糖得到了最大虾青素产量。本实验与上述实验结果一致, 采用蔗糖得到了最大虾青素产量。

2.1.2 不同蔗糖浓度的影响

在无碳源发酵培养基中, 蔗糖作为单一碳源按照 20.0 g/L、25.0 g/L、30.0 g/L、35.0 g/L、40.0 g/L、45.0 g/L 分别加入。发酵培养 *Phaffia rhodozyma* RP-306, 测定其虾青素质量浓度和细胞干质量, 结果如图 2。

蔗糖 30.0 g/L 时, 总虾青素浓度达到最大值。此时虾青素质量浓度和细胞干质量分别为 13.92 mg/L 和 3.39 g/L。蔗糖在 30.0 g/L 以下时, 蔗糖添加量增加, 虾青素质量浓度和细胞干质量随之增加; 而当蔗糖添加量大于 30.0 g/L 时, 虾青素质量浓度和细胞干质量都开始下降。可能是高浓度蔗糖引起代谢通路的变化而不利于菌株生长^[17]。

2.1.3 不同氮源种类的影响

在无氮源发酵培养基中, 分别添加 5.0 g/L 氯化铵、硫酸铵、硝酸钾、酵母粉、蛋白胨、牛肉膏。发酵培养 *Phaffia rhodozyma* RP-306, 测定其虾青素浓度和细胞干质量, 结果如图 3。

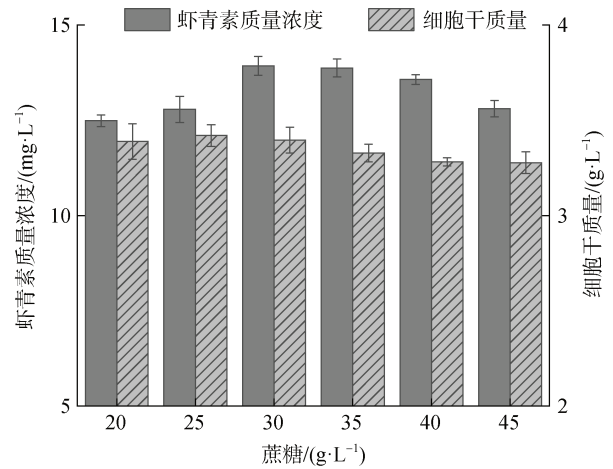


图 2 蔗糖浓度对菌株生长及虾青素产量的影响

Fig. 2 Effect of sucrose concentrations on cell growth and yield of astaxanthin

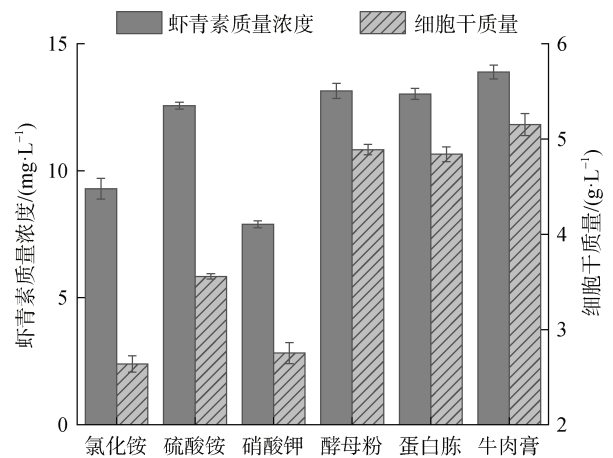


图 3 不同氮源对菌株生长及虾青素产量的影响

Fig. 3 Effect of different nitrogen sources on cell growth and astaxanthin yield

氮源主要用途是合成细胞内的含氮物质。无机氮源中硫酸铵效果最好, 虾青素质量浓度达到 12.55 mg/L, 细胞干质量达到 3.55 g/L; 有机氮源培养时虾青素质量浓度和细胞干质量均高于无机氮源, 其中酵母粉培养时虾青素产量达到 13.14 mg/L, 细胞干质量达到 4.88 g/L。有机氮源价格较为昂贵, 其中牛肉膏价格更是为酵母粉的 2~3 倍, 且其开封后易变质, 牛肉膏培养时虾青素质量浓度比酵母粉提高了 0.74 mg/L。无机氮源中硫酸铵价格低廉, 硫酸铵培养时虾青素质量浓度比酵母粉降低了 0.59 mg/L, 它可以作为氮源也能作为培养基的无机盐。综合考虑添加少量酵母粉作为生长因子, 而硫酸铵作为主要氮源。

2.1.4 不同无机氮源添加量的影响

硫酸铵作为单一氮源按照 3.0 g/L、4.0 g/L、5.0 g/L、

6.0 g/L、7.0 g/L 加入无氮源发酵培养基中。发酵培养 *Phaffia rhodozyma* RP-306, 测定其虾青素质量浓度和细胞干质量, 结果如图 4。

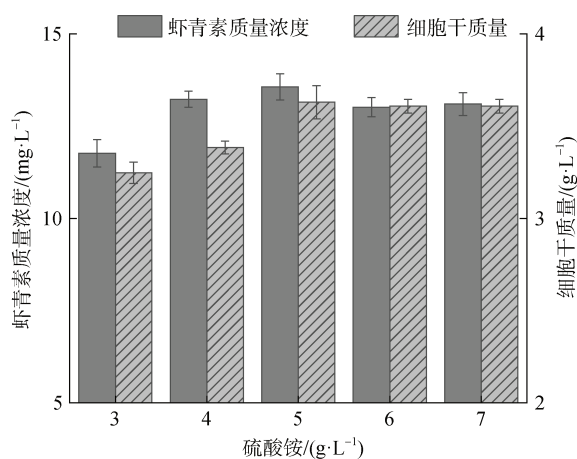


图 4 硫酸铵浓度对菌株生长及虾青素产量的影响
Fig. 4 Effect of (NH₄)₂SO₄ concentrations on cell growth and yield of astaxanthin

硫酸铵质量浓度 5.0 g/L 时, 虾青素质量浓度与细胞干质量达到最大值, 分别为 13.56 mg/L 和 3.63 g/L。当硫酸铵质量浓度超过 5.0 g/L, 虾青素质量浓度和细胞干质量开始下降。低浓度氮源可以增强柠檬酸裂解酶活性^[18], 也在一定程度上增加了虾青素合成限制因素乙酰辅酶 A 数量^[19], 促进虾青素积累。

2.1.5 不同有机氮源添加量的影响

酵母粉分别按照 0.5 g/L、1.0 g/L、1.5 g/L、2.0 g/L、2.5 g/L、3.0 g/L 加入含有 5.0 g/L 硫酸铵的无有机氮源发酵培养基中。发酵培养 *Phaffia rhodozyma* RP-306, 测定其虾青素质量浓度和细胞干质量, 结果如图 5。

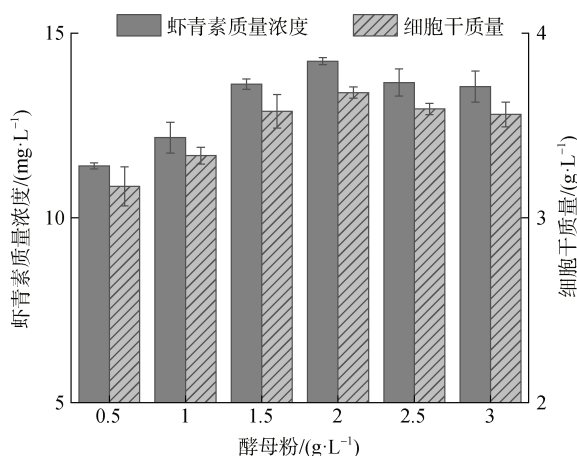


图 5 酵母粉质量浓度对菌株生长及虾青素产量的影响
Fig. 5 Effect of yeast extract powder concentrations on cell growth and astaxanthin yield

酵母粉浓度在 2.0 g/L 时, 虾青素质量浓度与细胞干质量达到最大值, 分别为 14.24 mg/L 和 3.67 g/L。酵母粉浓度继续升高, 虾青素质量浓度和细胞干质量开始下降。酵母粉和硫酸铵同时作为氮源, 使得氮源浓度过高, 菌株生长代谢物积累过多导致不利于生长。此时只需要低浓度的酵母粉充当生长因子。

2.1.6 不同温度的影响

基于上述优化配制发酵培养基, 调节温度 18 °C、20 °C、22 °C、24 °C、26 °C。发酵培养 *Phaffia rhodozyma* RP-306, 测定其虾青素浓度和细胞干质量, 结果如图 6。

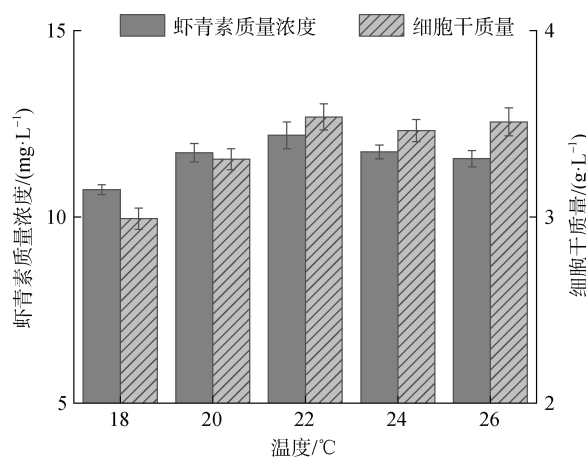


图 6 温度对菌株生长及虾青素产量的影响
Fig. 6 Effect of temperature on cell growth and yield of astaxanthin

温度为 22 °C 时, 虾青素质量浓度和细胞干质量达到最大值, 分别为 12.19 mg/L 和 3.53 g/L。温度通过影响酶活进一步影响细胞内代谢速率, 改变代谢物产量。Shi^[20]等人实验发现温度不同时色素合成途径中 *crtE*、*crtYB*、*crtI* 以及 *cHMG1* 基因表达量不同。温度较低时利于色素的合成, 温度高时利于菌体的生长。

2.1.7 不同 pH 的影响

基于上述优化配制发酵培养基, 将发酵培养基 pH 调节为 4、4.5、5、5.5、6 和 6.5。发酵培养 *Phaffia rhodozyma* RP-306, 测定其虾青素浓度和细胞干质量, 结果如图 7。

pH5.5 时虾青素浓度和细胞干质量达到最大值, 分别为 14.01 mg/L 和 3.38 g/L。细胞结构、代谢途径、代谢速率、细胞中酶的活性等因素都受 pH 的影响。合适的 pH 能够促进细胞生长, 提高目标产物产量。肖安风^[12]等人发现高 pH 利于菌体生长, 低 pH 利于虾青素积累。

2.1.8 不同装液量的影响

基于上述优化配制发酵培养基, 分别配制发酵培养基 20.0、30.0、40.0、50.0、60.0、70.0 mL 于

250.0 mL 摇瓶中。发酵培养 *Phaffia rhodozyma* RP-306, 测定其虾青素质量浓度和细胞干质量, 结果如图 8。

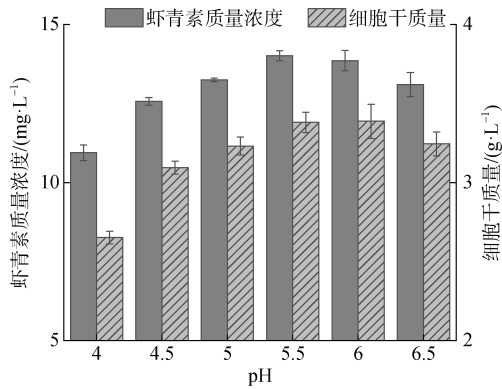


图 7 pH 值对菌株生长及虾青素产量的影响

Fig. 7 Effect of pH on cell growth and yield of astaxanthin

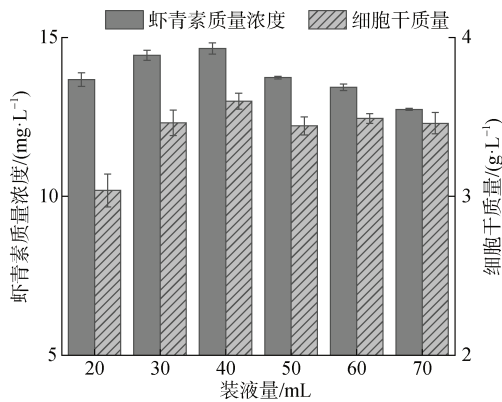


图 8 装液量对菌株生长及虾青素产量的影响

Fig. 8 Effect of liquid volume in the flask on cell growth and astaxanthin yield

装液量为 40.0 mL 时, 虾青素质量浓度和细胞干质量达到最大值, 分别为 14.65 mg/L 和 3.60 g/L。

红塔夫酵母的生长以及虾青素的合成都需要氧气的参与^[21]。在虾青素的生物合成中, 尤其在八氢番茄红素转化为 β -胡萝卜素进而生成虾青素的过程中, 存在多次脱氢、加氧反应^[22]。装液量对氧气的溶解有很大影响, 过多的装液量使得溶氧不足, 发酵液的流动性降低, 从而影响菌体生长与虾青素合成, 装液量太少影响产品的总体产量和收率。

2.2 Plackett-Burman 实验设计

根据单因素实验选择上述因素: 蔗糖(X_1)、硫酸铵(X_2)、酵母粉(X_3)、pH(X_4)、温度(X_5)、装液量(X_6)6 个因素作为考察对象, 采用实验次数 $N=12$ 的 Plackett-Burman 实验设计方案, 以虾青素浓度作为响应值, 结果如表 3。

利用 Minitab17 对表 3 中的实验结果进行分析, 可以发现各组间的差异显著($P<0.05$)。如表 4 所示, 在考察的 6 个因素中, 蔗糖(X_1)、pH(X_4)、温度(X_3)对实验结果影响显著, 蔗糖与 pH 值呈正效应, 温度与装液量呈负效应。酵母粉(X_2)、硫酸铵(X_3)、装液量(X_6)影响较小, 在后续实验中固定酵母粉 2.0 g/L, 硫酸铵 5.0 g/L, 装液量 40.0 mL 不变, 对蔗糖、pH、温度这 3 个因素进行进一步优化。

对虾青素(A)产量进行回归分析得到的多元一次回归方程为: $A=14.038+0.891X_1+0.083X_2-0.173X_3+0.605X_4-0.727X_5-0.033X_6$ 。该方程的方差分析结果 F 值为 6.29 >2 , 表明该模型在 $\alpha=0.05$ 水平显著, 同时该方程拟合度较好(相关系数 $R^2=88.30\%$)。

表 3 Plackett-Burman 实验设计与结果

Tab. 3 Design and results of the Plackett-Burman

实验号	水平						虾青素/(mg·L ⁻¹)
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	
1	1	-1	1	1	-1	1	16.60
2	-1	-1	1	1	1	-1	13.64
3	-1	1	1	1	-1	1	14.07
4	-1	1	-1	-1	-1	1	13.46
5	-1	1	1	-1	1	-1	12.43
6	1	1	1	-1	1	1	13.80
7	-1	-1	-1	-1	-1	-1	12.68
8	1	1	-1	1	1	-1	13.91
9	1	1	-1	1	-1	-1	17.05
10	1	-1	-1	-1	1	1	13.49
11	-1	-1	-1	1	1	1	12.60
12	1	-1	1	-1	-1	-1	14.73

注: 以上每组实验均进行 3 个重复

表 4 Plackett-Burman 实验中影响虾青素产量各因素的效应分析

Tab. 4 Effect analysis of various factors affecting astaxanthin yield in the Plackett-Burman experiment

因素	效应	标准误差	P 值
X_1	1.781	0.214	0.009
X_2	0.165	0.214	0.715
X_3	0.346	0.214	0.455
X_4	1.211	0.214	0.037
X_5	-1.453	0.214	0.019
X_6	-0.067	0.214	0.882

2.3 最陡爬坡实验

由以上分析结果,对蔗糖、pH、温度进行最陡爬坡实验,各因素变化的步长、方向以及实验结果如下(表 5)。

表 5 最陡爬坡实验设计及结果

Tab. 5 Design and results of the steepest climbing experiment

Step	蔗糖/(g·L ⁻¹)	pH	温度/°C	虾青素/(mg·L ⁻¹)
-2	22	4.8	23	13.38
-1	25	5.0	22	14.73
0	28	5.2	21	15.81
1	31	5.4	20	16.94
2	34	5.6	19	16.17
3	37	5.8	18	15.78
4	40	6.0	17	12.57

注:以上每组实验均进行 3 个重复

1 号实验组中虾青素产量达到最大值。将 1 号实验组的蔗糖、pH、温度用于以下响应面优化实验。

2.4 响应面分析的实验设计及结果

蔗糖、pH、温度是对虾青素产量影响显著的 3 个因素,最陡爬坡实验确定了接近最大响应值的蔗糖、pH 和温度取值,采用中心组合设计实验对这些因素进一步优化。

对表 6 的实验设计做回归分析得到回归方程为: $A=16.775-0.3987X_1-0.3324X_2-0.0757X_3-0.5064X_1^2-0.2466X_2^2-0.3049X_3^2-0.054X_1X_2+0.105X_1X_3-0.083X_2X_3$,其中, A 代表虾青素的浓度。回归方程的方差分析模型显著,拟合程度较高(相关系数 $R^2=89.88\%$),失拟不显著($P=0.440>0.05$)说明该方程为 *Phaffia rhodozyma* RP-306 发酵生产虾青素产量变化提供了一个合适的模型。

从图 9 可以直观的看出各个因子对响应的变化趋势,回归模型存在最大值。利用 Mintab17 软件的响应优化器对响应进行优化,得到预测的响应为 16.96 mg/L。

表 6 中心组合设计及实验结果

Tab. 6 Design and results of the central composite experiments

实验号	X_1	X_2	X_3	虾青素/(mg·L ⁻¹)
1	-1	-1	-1	16.79
2	-1	-1	1	16.47
3	-1	1	-1	16.22
4	-1	1	1	15.56
5	1	-1	-1	15.98
6	1	-1	-1	15.35
7	1	1	-1	14.93
8	1	1	1	14.70
9	-1.68	0	0	15.74
10	1.68	0	0	14.79
11	0	-1.68	0	16.34
12	0	1.68	0	15.66
13	0	0	-1.68	15.81
14	0	0	1.68	15.86
15	0	0	0	16.56
16	0	0	0	16.95
17	0	0	0	16.37
18	0	0	0	16.97
19	0	0	0	16.73
20	0	0	0	17.12

注:以上每组实验均进行 3 个重复

此时蔗糖为 29.93 g/L, pH 为 5.27, 温度为 19.9 °C。以上述条件做验证实验,实验三次得到平均虾青素产量为 17.04 mg/L,与理论预测值相差不大($P>0.05$),证实模型有效,虾青素产量比优化前提高了 26.61%。

2.5 5.0 L 发酵罐培养

摇瓶培养过程中 pH 值与溶解氧是无法控制的,然而 pH 值与溶解氧对红法夫酵母产虾青素尤为重要。摇瓶实验的培养环境往往与实际发酵罐的培养环境有所差别,发酵罐培养不可简单套用摇瓶实验的结果。为了进一步研究 *Phaffia rhodozyma* RP-306 生产虾青素的能力,使用 5.0 L 发酵罐进行分批发酵,培养时控制 pH5.5 与溶氧 30.0%~50.0%。

相比于摇瓶,使用 5.0 L 发酵罐培养红法夫酵母时,溶氧量充足, pH 能够保持,糖底物被彻底利用,虾青素产量进一步提高,达到 28.86 mg/L(图 10)。与表 7 中其他研究实验结果相比, *Phaffia rhodozyma* RP-306 在分批发酵时虾青素产量能够达到较高水平,具备了作为虾青素生产菌株的初步条件,本课题组拟进一步开发此菌株的补料生产工艺。

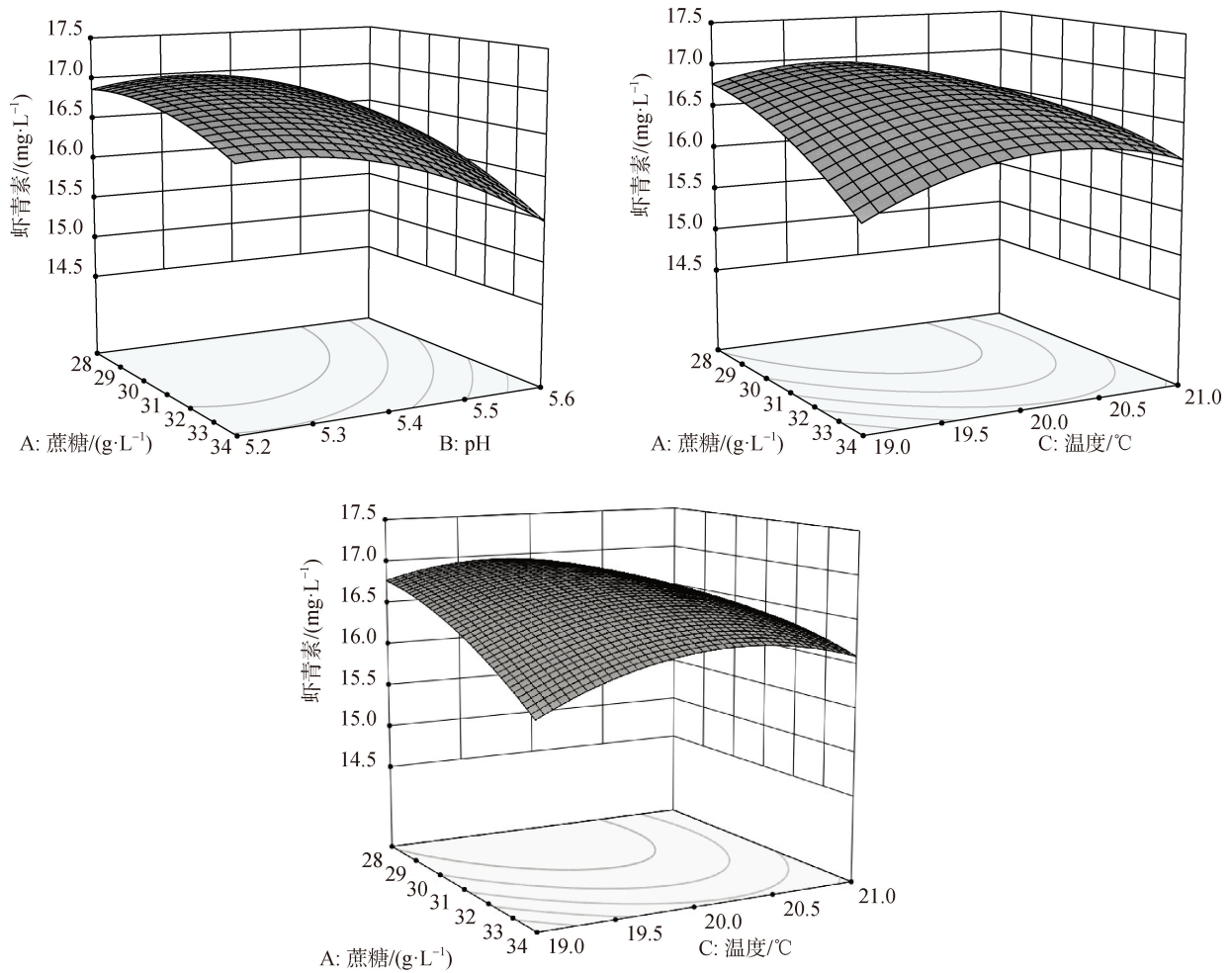


图 9 各因素交互作用对虾青素产量影响的响应面及等高线

Fig. 9 Response surface and contour lines of the interaction of various factors with the astaxanthin yield

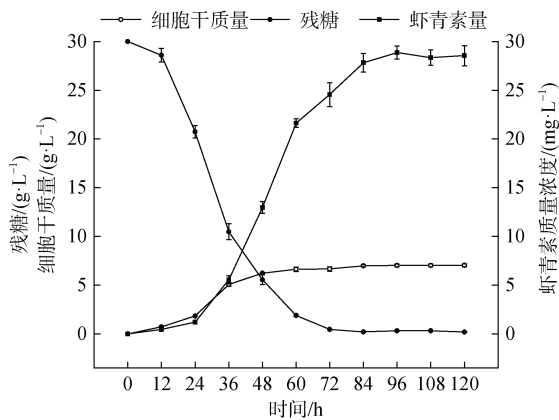


图 10 *Phaffia rhodozyma* RP-306 分批发酵产虾青素

Fig. 10 Astaxanthin yield in *Phaffia rhodozyma* RP-306 batch fermentation

3 结论

虾青素在多个领域具有广泛应用，市场上虾青素

主要是采用雨生红球藻生产的，关键原因是其来源的虾青素在食品目录。然而，雨生红球藻生产虾青素具有周期长(15~20 d 左右)、环境要求高、生产成本高等缺点，造成虾青素价格高、市场供应不足。红法夫酵母培养周期短，能利用多种营养物质，可在生物反应器中封闭高密度培养，其虾青素生产强度达到雨生红球藻的 4~6 倍，也是虾青素良好的生物来源。红法夫酵母菌体中含有多种蛋白质、维生素和矿物质等，破壁处理后无需萃取与提纯即可直接添加到动物饲料中，其虾青素主要以游离和未修饰的形式存在，易于吸收。虽然红法夫酵母来源的虾青素不在食品目录，但是多个研究报道表明，红法夫酵母虾青素具有活性高、安全性高、生产成本低等特点，目前已被允许在水产养殖上广泛使用。现今国内外正在推动红法夫酵母虾青素作为新食品原料的申报工作，未来其在食品、日化、饲料等行业具有良好的应用前景。

表 7 不同红法夫酵母菌株分批发酵产虾青素结果

Tab. 7 Astaxanthin yield by batch fermentation of different *Phaffia rhodozyma* strains

菌株	虾青素/(mg·L ⁻¹)	引用
<i>Phaffia rhodozyma</i> RP-306	28.86	本研究
<i>Phaffia rhodozyma</i> 7B12	7.71	[23]
<i>Phaffia rhodozyma</i> NRRLY-17268	10.40	[24]
<i>Phaffia rhodozyma</i> ZJUT46	32.48	[25]
<i>Phaffia rhodozyma</i> AS 2.1557	14.32	[26]
<i>Phaffia rhodozyma</i> MTCC 7536	8.60	[27]
<i>Phaffia rhodozyma</i> CSR19	25.30	[28]
<i>Phaffia rhodozyma</i> 5308	4.94	[29]

本研究对 *Phaffia rhodozyma* RP-306 的细胞生长及其虾青素产量进行发酵条件优化, 提高了虾青素产量。研究结果表明, 在虾青素生产过程中, 碳源浓度、pH 和温度是影响虾青素产量的主要因素。优化后发酵条件为: 蔗糖 29.93 g/L、酵母粉 2.0 g/L、硫酸铵 5.0 g/L、pH 5.27、温度 19.9 °C, 虾青素产量 17.04 mg/L, 相比优化前提高 26.61%。在 5.0 L 发酵罐中, 通过 pH 与溶解氧调控, 虾青素产量进一步提高, 达到 28.86 mg/L, 具备工业化生产菌株的发酵水平。此外, *Phaffia rhodozyma* RP-306 生产虾青素的最佳发酵温度为 19.9 °C, 该菌在生产过程中可减少温控能耗。研究结果显示, 单位体积发酵液中的虾青素产量已达到较高水平, 然而单位体积发酵液中红法夫酵母生物量仍处于较低水平。未来需要在单位质量菌体虾青素含量不降低的情况下, 继续优化策略提高菌株的生物量, 进一步提高虾青素的产量。尝试采用连续或补料发酵策略替代分批发酵, 提升空间、设备、能量的利用率; 结合高效真菌破壁系统提升虾青素的得率, 以推动红法夫酵母虾青素的规模化制备以及应用开发。

参考文献:

[1] SZTRETYYE M, DIENES B, GÖNCZI M, et al. Astaxanthin: a potential mitochondrial-targeted antioxidant treatment in diseases and with aging[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019(11): 3849692.

[2] DOSE J, MATSUGO S, YOKOKAWA H, et al. Free radical scavenging and cellular antioxidant properties of astaxanthin[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(1): 103-117.

[3] KOHANDEL Z, FARKHONDEH T, ASCHNER M, et al. Anti-inflammatory action of astaxanthin and its use in the treatment of various diseases[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2022, 145: 112179.

[4] FARAONE I, SINISGALLI C, OSTUNI A, et al. Astaxanthin anticancer effects are mediated through multiple molecular mechanisms: A systematic review[J]. *Pharmacological Research*, 2020, 155: 104689.

[5] FAKHRI S, ABBASZADEH F, DARGAHI L, et al. Astaxanthin: a mechanistic review on its biological activities and health benefits[J]. *Pharmacological Research*, 2018, 136: 1-20.

[6] FAKHRI S, NOURI Z, MORADI S Z, et al. Astaxanthin, COVID-19 and immune response: Focus on oxidative stress, apoptosis and autophagy[J]. *Phytotherapy Research*, 2020, 34(11): 2790-2792.

[7] LIM K C, YUSOFF F M, SHARIFF M, et al. Astaxanthin as feed supplement in aquatic animals[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2018, 10(3): 738-773.

[8] AMBATI R R, PHANG S M, RAVI S, et al. Astaxanthin: Sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications—A review[J]. *Marine Drugs*, 2014, 12(1): 128-152.

[9] ZHUANG Y, ZHU M J. Recent developments in astaxanthin production from *Phaffia rhodozyma* and its applications[M]//GOKARE A R, AMBATI R R. *Global perspectives on astaxanthin from industrial production to food, health, and pharmaceutical applications*. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2021: 225-251.

[10] OJIMA K, BREITENBACH J, VISSER H, et al. Cloning of the astaxanthin synthase gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) and its assignment as a β-carotene 3-hydroxylase/4-ketolase[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2006, 275(2): 148-158.

[11] XIAO A F, NI H, CAI H N, et al. An improved process for cell disruption and astaxanthin extraction from *Phaffia rhodozyma*[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 25(11): 2029-2034.

[12] 肖安风, 于广仁, 蔡慧农, 等. 法夫酵母发酵过程的 pH 值控制策略及对虾青素合成的影响[J]. *中国食品学报*, 2015, 15(1): 66-72.

XIAO Anfeng, YU Guangren, CAI Huinong, et al. pH

- control strategy and its effect on astaxanthin production in *Phaffia rhodozyma* fermentation[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2015, 15(1): 66-72.
- [13] 倪辉. 法夫酵母虾青素发酵条件的优化及提取与分析研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2005.
NI Hui. Optimization of *Phaffia rhodozyma* cultivation conditions, astaxanthin extraction and analysis[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2005.
- [14] 潘运国, 陈义伦, 张策, 等. 霉菌液态培养产酯化酶规律研究[J]. 酿酒科技, 2005(11): 35-37.
PAN Yunguo, CHEN Yilun, ZHANG Ce, et al. Study on the Production Rules of Esterified Enzyme by Mould Liquid Culture[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2005(11): 35-37.
- [15] VAZQUEZ M, SANTOS V, PARAJÓ J C. Effect of the carbon source on the carotenoid profiles of *Phaffia rhodozyma* strains[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 1997, 19(4): 263-268.
- [16] 张森. 红法夫酵母生产虾青素的研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2012.
ZHANG Sen. Fermentation production of astaxanthin by *Xanthophyllomyces dendrorhous*[D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2012.
- [17] HAGMAN A, SÄLL T, PIŠKUR J. Analysis of the yeast short-term Crabtree effect and its origin[J]. The FEBS Journal, 2014, 281(21): 4805-4814.
- [18] MIAO L, CHI S, TANG Y, et al. Astaxanthin biosynthesis is enhanced by high carotenogenic gene expression and decrease of fatty acids and ergosterol in a *Phaffia rhodozyma* mutant strain[J]. FEMS Yeast Research, 2011, 11(2): 192-201.
- [19] VUSTIN M M, BELYKH E N, KISHILOVA S A. Relationship between astaxanthin production and the intensity of anabolic processes in the yeast *Phaffia rhodozyma*[J]. Microbiology, 2004, 73(6): 643-649.
- [20] SHI F, ZHAN W, LI Y, et al. Temperature influences β -carotene production in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing carotenogenic genes from *Phaffia rhodozyma*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2014, 30(1): 125-133.
- [21] JOHNSON E A, LEWIS M J. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*[J]. Microbiology, 1979, 115(1): 173-183.
- [22] VERDOES J C, SANDMANN G, VISSER H, et al. Metabolic engineering of the carotenoid biosynthetic pathway in the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*)[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(7): 3728-3738.
- [23] NI H, CHEN Q H, RUAN H, et al. Studies on optimization of nitrogen sources for astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma*[J]. Journal of Zhejiang University Science B, 2007, 8(5): 365-370.
- [24] PARAJÓ J C, SANTOS V, VÁZQUEZ M. Production of carotenoids by *Phaffia rhodozyma* growing on media made from hemicellulosic hydrolysates of Eucalyptus globulus wood[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1998, 59(4): 501-506.
- [25] HU Z C, ZHENG Y G, WANG Z, et al. Production of astaxanthin by *Xanthophyllomyces dendrorhous* ZJUT46 with fed-batch fermentation in 2.0 m³ fermentor[J]. Food Technology and Biotechnology, 2007, 45(2): 209-212.
- [26] WANG W, YU L. Effects of oxygen supply on growth and carotenoids accumulation by *Xanthophyllomyces dendrorhous*[J]. Zeitschrift für Naturforschung C, 2009, 64(11/12): 853-858.
- [27] BATGHARE A H, SINGH N, MOHOLKAR V S. Investigations in ultrasound-induced enhancement of astaxanthin production by wild strain *Phaffia rhodozyma* MTCC 7536[J]. Bioresource Technology, 2018, 254: 166-173.
- [28] CHI S, HE Y, REN J, et al. Overexpression of a bifunctional enzyme, CrtS, enhances astaxanthin synthesis through two pathways in *Phaffia rhodozyma*[J]. Microbial Cell Factories, 2015, 14: 1-12.
- [29] TROPEA A, GERVASI T, MELITO M R, et al. Does the light influence astaxanthin production in *Xanthophyllomyces dendrorhous*[J]. Natural Product Research, 2013, 27(7): 648-654.

Optimization of fermentation conditions for astaxanthin production by marine *Phaffia rhodozyma* RP-306

LIN Jiaqi^{1, 2}, ZHUANG Yan², LIU Xiao^{2, 3}, ZENG Hanting², ZHANG Yucang¹,
CHAN Zhuhua², ZENG Runying²

(1. College of Ocean Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Marine Biological Resources Development and Utilization Engineering Technology Innovation Center, TIO, MNR, Xiamen 361005, China; 3. School of Advanced Manufacturing, Fuzhou University, Fuzhou 362200, China)

Received: Jul. 26, 2022

Key words: *Phaffia rhodozyma* RP-306; astaxanthin; fermentation conditions; response surface optimization

Abstract: To improve the yield of astaxanthin produced by *Phaffia rhodozyma* RP-306, fermentation conditions were optimized through single-factor and response surface methodology. Moreover, a single-factor experiment was designed for each factor during fermentation. First, initial values of six factors, including sucrose, yeast powder, ammonium sulfate, pH, temperature, and liquid volume, were determined by a single-factor experiment. Second, the Plackett–Burman design was employed to screen out influential factors, such as sucrose, pH, and temperature. The steepest climbing experiment was utilized to determine the reasonable range of the three factors. Finally, optimal fermentation conditions were obtained by central composite design in response surface methodology. The final results were as follows: sucrose 29.93 g/L, yeast powder 2.0 g/L, ammonium sulfate 5.0 g/L, pH 5.27, and temperature 19.9°C. Under these conditions, astaxanthin yield increased from 13.46 to 17.04 mg/L, which was 26.61% higher than that before optimization. Moreover, astaxanthin yield reached 28.86 mg/L via batch fermentation in a 5.0-L fermenter, which encouraged further fermentation scale-up research.

(本文编辑: 杨 悦)