

利用农业废弃物碳源的红法夫酵母生产虾青素研究进展

周桂雄,王 闻,谭雪松,庄新姝,袁振宏*,亓 伟,余 强,王 琼,苗长林,王 瑶

(中国科学院广州能源研究所,中国科学院可再生能源重点实验室,广州 510640)

摘要: 利用红法夫酵母产虾青素工艺具有绿色、安全、低成本等优点,但培养红法夫酵母的培养基(尤其是碳源)成本是制约该工艺实现大规模生产的主要因素之一。传统的利用纯糖如葡萄糖、蔗糖、木糖等作为红法夫酵母生产虾青素的碳源,效果虽好,但因其价格较高,仅适用于实验室研究和小型发酵生产,不适用于大规模工业化生产。如何寻找来源广、价廉且发酵效果好的碳源,降低虾青素的生产成本是发展虾青素产业亟待解决的课题。利用廉价且来源广泛的原料如水果类原料、糖质原料、甘油及废弃木质纤维素类原料等作为碳源能有效降低成本。但这些原料都存在一些问题,比如水果类原料存在季节性及地域性限制,糖蜜类原料供应稳定性方面存在问题,甘油类原料杂质多且存在食品安全隐患,木质纤维素类原料来源广泛、价格低廉,不存在占用耕地等问题,是最有希望用于规模化低成本发酵生产虾青素的原料,但其利用存在一些技术瓶颈。该文介绍了目前利用红法夫酵母生产虾青素的基本情况,并系统地对外国内外不同碳源条件下利用红法夫酵母生产虾青素的研究状况进行了综述、比较及分析。最后,对利用红法夫酵母生产虾青素在碳源方面的未来发展趋势及重点研究方向进行了展望。

关键词: 碳源;微生物;废弃物;红法夫酵母;虾青素;木质纤维素

doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2016.15.043

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2016)-15-0308-07

周桂雄,王 闻,谭雪松,庄新姝,袁振宏,亓 伟,余 强,王 琼,苗长林,王 瑶. 利用农业废弃物碳源的红法夫酵母生产虾青素研究进展[J]. 农业工程学报, 2016, 32(15): 308-314. doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2016.15.043
<http://www.tcsae.org>

Zhou Guixiong, Wang Wen, Tan Xuesong, Zhuang Xinshu, Yuan Zhenhong, Qi Wei, Yu Qiang, Wang Qiong, Miao Changlin, Wang Yao. Review on astaxanthin production from agricultural wastes by *Phaffia rhodozyma*[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2016, 32(15): 308-314. (in Chinese with English abstract)
doi:10.11975/j.issn.1002-6819.2016.15.043 <http://www.tcsae.org>

0 引言

虾青素(astaxanthin),化学名称3,3'-二羟基-4,4'-二酮- β,β -胡萝卜素,是一种含有2个酮基和2个羟基的酮式类胡萝卜素,具有强抗氧化、抗肿瘤、抗光敏等多种生物学活性并能消除机体自由基,能一定程度提高机体免疫能力,因此被广泛应用于养殖业、食品、保健品和医药等工业^[1]。据统计,虾青素在全球的类胡萝卜素市场中占据第二位,预计2015年年产值将达到2.5亿美元^[2],随着人们生活品质的提高及对健康的日益关注,虾青素市场将更加广阔。

目前虾青素的制备方法主要有3种,即化学合成法、甲壳动物废物提取法及微生物合成法。其中化学合成法由于成本高,工艺复杂,且合成的虾青素大多数为顺式结构,人体很难吸收且存在安全隐患,根据美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)规定,仅反式结

构的虾青素可用于水产养殖的添加剂,因此化学合成法的发展前景受到一定限制^[3]。利用甲壳动物废物提取虾青素主要存在的问题是含量很低,一般质量分数仅为80~153 $\mu\text{g/g}$,并且这些甲壳中灰分、几丁质的含量较高,极大地限制了虾青素的提取和利用^[4]。而微生物合成法相对于前2种方法,因为具有环境友好、生产周期短、生产的虾青素更加安全等优点,被认为是最适合的生产天然虾青素的方法,具有广阔的应用前景。

能够被用来生产虾青素的微生物种类很多,其中酵母菌中的红法夫酵母因为具有生长周期短、易实现高密度培养、体内虾青素积累迅速、含量高、易提取等优点而被人们所关注。Andrews于1976年最早在红法夫酵母中发现虾青素,此后关于利用红法夫酵母生产虾青素的报道大量出现^[5]。根据报道,红法夫酵母生长温度范围为4~27 $^{\circ}\text{C}$,属于兼性嗜冷的低温型微生物,最适生长pH值为6.0左右,色素形成的最适pH值为5.0左右,在合适的条件下,红法夫酵母体内能积累大量的类胡萝卜素,其中45%~90%是虾青素^[6]。虽然目前关于利用红法夫酵母生产虾青素的研究报道很多,从酵母菌培养到虾青素提取等各个环节都取得了不错的研究成果,但实际上利用红法夫酵母生产虾青素并未能进行大规模推广应用,其中一个很重要的原因便是红法夫酵母的发酵成本偏高,这极大地制约了它的工业化推广应用,因此目前许多研究都集中在如何降低其发酵成本上。红法夫酵母的发酵成本在很

收稿日期:2016-01-22 修订日期:2016-04-07

基金项目:国家自然科学基金国际交流合作重点项目(51561145015);广东省自然科学基金重点项目(2015A030311022);广东省科技计划项目(2014A010106023)

作者简介:周桂雄,男,湖南株洲人,博士后,主要从事生物质生化转化研究。广州 中国科学院广州能源研究所,510640。

Email: guixiongzhou@163.com

*通信作者:袁振宏,男,研究员,博士生导师,主要从事生物质高品位能源化利用及发展战略方面的研究。广州 中国科学院广州能源研究所,510640。Email: yuanzh@ms.giec.ac.cn

大程度上取决于培养基,尤其是碳源,因此寻找廉价高效的培养基原料是实现大规模利用红法夫酵母生产虾青素的关键。目前关于这方面的研究报道比较多,被发现可以用作红法夫酵母生长的碳源除了葡萄糖、木糖、蔗糖、果糖、阿拉伯糖、蔗糖等纯糖物质外,还有一些来源广泛而价格低廉的原料比如糖蜜、果汁、植物提取物、甘油、木质纤维素原料等也能被用作红法夫酵母生长的碳源。为此本文系统地国内外不同碳源条件下利用红法夫酵母生产虾青素的研究状况进行了综述、比较及分析,并对利用红法夫酵母生产虾青素在碳源方面的未来发展趋势及重点研究方向进行了展望。

1 纯糖碳源发酵生产虾青素

1.1 不同纯糖物质作为碳源时的比较

红法夫酵母的发酵主要采用两类培养基,一类是合成或半合成培养基,一类是天然培养基。合成或半合成培养基使用的碳源主要有葡萄糖、木糖、阿拉伯糖等单糖或者蔗糖和麦芽糖等二糖以及它们的混合糖。Palágyi等^[7]研究了99种不同的化合物作为红法夫酵母生产虾青素的碳源,发现能被所有红法夫酵母菌株利用的碳源主要有葡萄糖、木糖、果糖、阿拉伯糖、甘露糖、麦芽糖、蔗糖、纤维二糖等,而有的化合物却只能被部分特殊的红法夫酵母利用。这些纯糖作为红法夫酵母生产虾青素的碳源时,消耗速度相差很大并且产生的效果也不一样,有的纯糖适合酵母细胞生长,但不适合细胞体内积累虾青素,而有的纯糖则恰好相反。Park等^[8]研究比较了葡萄糖、果糖及蔗糖作为碳源时,红法夫酵母生长及产虾青素的情况,发现红法夫酵母利用蔗糖产虾青素的效果最好,葡萄糖次之,而果糖效果则最差。其中蔗糖的消耗速度是葡萄糖的1.3倍,而葡萄糖的利用速度又是果糖的2.9倍,且利用蔗糖所得的红法夫酵母的生物量远多于葡萄糖和果糖,Meyer^[9]和国内的余龙江等^[10]也得到了类似的研究结论,经过研究均发现红法夫酵母对蔗糖与葡萄糖的利用速率要快于果糖的利用速率。此外,梁成等^[11]研究发现,虽然果糖作碳源时,红法夫酵母的细胞生物量远低于蔗糖和葡萄糖,但细胞体内的虾青素含量却明显比蔗糖和葡萄糖作碳源的时候高。Persike等^[12]则对蔗糖、纤维二糖、葡萄糖及果糖作为碳源时,红法夫酵母的生长及产虾青素情况进行了比较,发现当纤维二糖作为碳源时,红法夫酵母的生长速率及虾青素生成速率均要好于其他3种糖。Johnson等^[13]也在比较不同纯糖作为红法夫酵母生产虾青素的碳源时得到了同样的结论,发现纤维二糖作为碳源时,红法夫酵母产虾青素的能力要强于其他纯糖类物质如蔗糖、葡萄糖等。因此,从现有的文献报道来看,不同的酵母对各类纯糖的利用有很大差异,但总的来说,红法夫酵母对纯糖物质的利用效果一般是纤维二糖>蔗糖>葡萄糖>果糖>木糖。

1.2 木糖作为红法夫酵母生产虾青素的碳源

木糖作为一种常见的五碳糖,能从木质纤维素等廉价原料中水解大量获得,并且木糖的利用一直以来就是木质纤维素原料能否被高效利用的关键,因此也常被一些研究者用作红法夫酵母生长的碳源。根据文献报道,

大多数的红法夫酵母能够在木糖培养基中生长良好且产生虾青素,但不同的红法夫酵母菌株对木糖的利用相差很大。如Montanti等^[14]将木糖和葡萄糖、阿拉伯糖的进行比较,发现在一定生长时间内,每克消耗的木糖所产生的虾青素要高于葡萄糖,但木糖消耗速度却远低于葡萄糖。Vázquez等^[15]比较了木糖和葡萄糖、蔗糖作为红法夫酵母*P. rhodozyma* ATCC 24228生长碳源时的情况,发现木糖作为碳源时红法夫酵母产生的总类胡萝卜素(主要为虾青素)甚至比葡萄糖和蔗糖的都高,国内的朱明军等^[16]研究比较了木糖与其他纯糖物质作为红法夫酵母生产虾青素的碳源时,也得到了类似的结论。总的来说,利用木糖作为红法夫酵母的碳源生产虾青素时,虽然其消耗速度要比其他常用的纯糖物质如葡萄糖、阿拉伯糖、蔗糖等缓慢,但木糖更有利于虾青素在酵母细胞体内的积累。利用木糖作为红法夫酵母的碳源生产虾青素时,还受到其他因素如氮源、光照的影响。如Parajó等^[17]利用木糖作红法夫酵母生长的碳源来生产虾青素,研究发现不同的氮源对虾青素酵母体内的积累影响非常大,当利用硝酸钾作氮源时,虾青素的产率最高,原因可能是当木糖作碳源时,钾离子能促进红法夫酵母细胞体内虾青素的生成。Stachowiak^[18]则研究了光照条件对红法夫酵母利用木糖产虾青素的影响,红法夫酵母利用木糖作碳源时的生长及产虾青素的情况,发现一定条件的光照能够促进红法夫酵母生长并提高虾青素的产率。此外,Parajó等^[19]在研究时还发现,利用木糖作为红法夫酵母生产虾青素的碳源时,同时还会有大量的木糖被转化成木糖醇,因此,以后的研究或者实际生产中以木糖为碳源时,可以将木糖醇与虾青素进行联产。

1.3 混合糖作为碳源时相互之间的影响

由于利用单独纯糖的成本都很高,实际生产过程中使用的原料很多情况下都是多种糖混合在一起的,因此,一些学者也研究了将不同纯糖混合在一起作为红法夫酵母生产虾青素的碳源时的情况。由于来源及成本的原因,目前研究最多的主要是葡萄糖、木糖、阿拉伯糖这3种纯糖的混合影响。如Nghiem等^[20]先将这3种糖分别两两混合作为红法夫酵母产虾青素的碳源,发现葡萄糖和木糖混合时,木糖一般都是在葡萄糖快耗尽才开始被利用,并且利用效率非常低,在168 h后仍只消耗了34%,并且反过来,木糖的存在会影响葡萄糖的消耗,直到168 h,葡萄糖仍有残留。而当葡萄糖与阿拉伯糖混合时,阿拉伯糖也是在葡萄糖快耗尽时才开始被利用,但阿拉伯糖对葡萄糖消耗几乎没有影响,葡萄糖在72 h时被完全耗尽。当这3种糖同时混合在一起时,葡萄糖利用受到影响,168 h后仍有残留,而木糖、阿拉伯糖则受影响更大,两者都有大量残余。Montanti等^[14]同样发现多种糖混合在一起时会互相影响,将葡萄糖、木糖及阿拉伯糖按一定比例混合在一起作为红法夫酵母的碳源,结果发现消耗最迅速的是葡萄糖,而木糖则能在葡萄糖消耗完前开始被利用,而阿拉伯糖利用却有被抑制的现象,自始至终都只有少量被消耗。

1.4 促进剂对红法夫酵母利用纯糖产虾青素的影响

据报道,在培养基中添加虾青素合成的前体物质和某些化学物质,能够促进红法夫酵母体内虾青素的合

成。在红法夫酵母利用纯糖产虾青素时,由于培养基成分单一,添加一些促进剂能够提高红法夫酵母产虾青素的产率。目前报道过的促进剂主要包括3类,即红法夫酵母合成虾青素的前体物质、强氧化剂、及氧载体。红法夫酵母合成虾青素的前体物质如番茄红素、甲羟戊酸、乙酸、柠檬酸、乳酸等^[13,21-26],这类物质作为红法夫酵母细胞体内合成虾青素代谢途径中的前体物质,增加这类物质的浓度能够促进代谢过程向下一步反应进行,从目前报道过的文献来看,效果最好的是乳酸,虾青素的产率最高能提高46.2%。强氧化剂包括亚硒酸钠、氯酸钠和二氧化钛等,由于虾青素具有强抗氧化性,因此强的氧化剂能够诱导虾青素的表达,目前报道过效果最佳的强氧化剂是氯酸钠,虾青素的产率最高能提高30.6%^[27]。氧载体如正十二烷、正十六烷等,能够提高红法夫酵母细胞体内的氧浓度,从而诱导虾青素的合成,目前报道过效果最佳的氧载体是正十六烷,虾青素的产率最高能提高35.9%^[28]。从目前报道过的文献来看,促进剂对红法夫酵母合成虾青素的影响研究仍在摸索阶段,对具体的机制方面研究比较少,其次目前研究的都是单一的促进剂对红法夫酵母合成虾青素的影响,由于各促进剂对虾青素合成的影响途径不一样,因此,多种促进剂混合使用效果可能会更

好,这2个方面可能会很好的研究前景。

总的来说,纯糖物质作碳源适合红法夫酵母生产虾青素,效果也较好,但因其价格较高,仅适用于实验室研究和小型发酵生产,不适于大规模工业化生产。

2 廉价原料作为碳源生产虾青素

廉价培养基一般以工业、农业或者林业生产的废弃物或者含糖量较高的果蔬原料为主,目前用来生产虾青素的廉价原料主要包括果汁原料或者植物提取物、糖蜜、纤维素原料、制备生物柴油时的副产物甘油等。这类原料量大而价廉,可能是降低红法夫酵母生产虾青素成本的有效途径。

2.1 木质纤维素原料

木质纤维素原料来源广泛,主要包括一些农业或者林业废弃物,如秸秆、木屑、玉米纤维等。目前木质纤维素原料一个热门的应用领域便是制备燃料乙醇,但利用木质纤维素制备燃料乙醇一个主要的障碍便是木糖的利用,而红法夫酵母则是可以高效率地利用木糖,因此木质纤维素原料是生产虾青素的一类非常有潜力的原料。目前有很多关于利用木质纤维素作为红法夫酵母生产虾青素的报道,如表1所示。

表1 利用木质纤维素原料生产虾青素研究情况

Table 1 Research situation of astaxanthin production from lignocellulosic feedstocks

原料 Feedstocks	处理方法 Processing methods	菌种 Strains	细胞生物量 Biomass/(g·L ⁻¹)	虾青素产量 Astaxanthin yields/(mg·L ⁻¹)	参考文献 References
甘蔗渣	氨水浸泡后加纤维素酶和木聚糖酶酶解	Phaffiarhodozyma JTM185	7.16	2.56	[14]
大麦秸秆	氨水浸泡后加纤维素酶和木聚糖酶酶解	Phaffiarhodozyma JTM185	12.78	2.99	[14]
玉米纤维	稀酸水解后加纤维素酶和纤维二糖酶酶解	Phaffiarhodozyma ATCC 74219	-	18.2	[20]
桉木木屑	稀酸水解	Phaffiarhodozyma NRRLY-17269	10.3	7.19	[29]
桉木	NaOH浸泡预处理后分别采用两种酶解方法:1)单独纤维素酶;2)纤维素酶和β-葡萄糖苷酶	Phaffiarhodozyma ATCC 24228	(1):10 (2):8	(1):1.6 (2):1.4	[30]
海岸松木屑	稀硫酸预处理后,固体部分加入纤维素酶和纤维二糖酶酶解	Phaffiarhodozyma ATCC 24228	10	2.14	[31]
泥炭	稀酸水解	Phaffiarhodozyma ATCC 24202	4.6	7.2	[32]
大麦秸秆	氨水浸泡后加木聚糖酶	Phaffiarhodozyma ATCC 74219	-	23.6	[33]

2.1.1 原料、预处理方法及酶解方法的影响

利用木质纤维素原料作为红法夫酵母的碳源,都需要先将木质纤维素原料进行预处理及水解成还原糖。利用木质纤维素作为红法夫酵母产虾青素的碳源,首先与木质纤维素原料的种类有关,不同的原料种类,经过预处理及酶解得到的虾青素产量相差很大,如Montanti等^[14]利用相同的方法(氨水浸泡)对甘蔗渣和大麦秸秆进行预处理,然后用纤维素酶和木聚糖酶水解,最终2种水解液的虾青素产量相差非常大,原因是不同原料得到的水解液中还原糖种类及浓度相差很大。其次,当木质纤维素原料作碳源时,最终虾青素产量还与原料的预处理及酶解方法有关,如Vázquez等^[29]和Cruz等^[30]均采用桉木作原料,但前者采用10%的NaOH浸泡预处理的方法,后者则采用稀酸预处理方法,然后利用得到的水解液作碳源产虾青素,发现利用稀酸预处理得到的水解液远比NaOH浸泡预处理得到的水解液虾青素产量高。最后,利用木质纤维素原料作碳源还与酶解方法有关,如Cruz等^[30]在木

质纤维素原料预处理完后采用2种不同的方法进行酶解,一种加纤维素酶和β-葡萄糖苷酶,另一种则只加纤维素酶,这样第1种情况得到的水解液主要为葡萄糖,第2种则含有葡萄糖和纤维二糖,这2种水解液分别作为红法夫酵母产虾青素的碳源,结果发现,这2种水解液得到的红法夫酵母的生物量大致相近,但只利用纤维素酶解得到的水解液中的虾青素产量却远大同时加入纤维素酶和β-葡萄糖苷酶酶解得到的水解液,这说明纤维二糖比葡萄糖更有利于红法夫酵母在体内积累虾青素。

2.1.2 水解液中抑制剂的影响

木质纤维素的预处理方法有很多种,但从效率及成本方面考虑,目前主要的预处理方法为碱法、酸法、蒸汽爆破法、高温液态水法等。这些预处理方法能高效地破坏木质纤维素结构,但缺陷也非常明显,就是在预处理过程中会产生大量的抑制剂如糠醛、5-羟甲基糠醛等,这些抑制剂对红法夫酵母产虾青素影响比较大。如Martin等^[31]研究了利用不同温度条件下稀酸水解泥炭得到的水

解液作为红法夫酵母作为碳源生产虾青素,结果发现温度越低得到的水解液的虾青素产率最高,其中一个最重要的原因就是低温硫酸水解产生的发酵抑制剂相对少一些。Parajó等^[32]和Vázquez等^[29]均利用稀酸预处理木质纤维素原料,然后利用相同糖浓度的合成培养基作对照,发现稀酸预处理过程中产生的水解液中抑制剂对红法夫酵母产虾青素影响非常明显。目前抑制剂对红法夫酵母产虾青素的影响研究比较少,并且抑制机制还不清楚,因此,研究抑制剂对红法夫酵母的抑制机理将极具研究潜力。

2.1.3 虾青素与其他产品联产工艺

利用木质纤维素原料作为红法夫酵母生产虾青素的碳源,大部分情况是虾青素作为单一产品,即木质纤维素经过预处理水解后得到的所有糖都用来生产虾青素,但有时虾青素也会与别的产品如乙醇、木糖醇等联产,即木质纤维素经过预处理水解后得到的糖同时用来生产虾青素和其他产品,这样做的好处就是能够充分利用木质纤维素水解液中的木糖。Nghiem等^[20,33]分别研究了利用玉米纤维及大麦秸秆联产虾青素和乙醇,利用不同的预处理及酶解工艺,虾青素及乙醇产率均取得了不错的结果。Horiuchi等^[34]利用玉米芯的稀酸水解液联产木糖醇、乙醇及虾青素,分别用木兰假丝酵母将水解液中的部分木糖转化成木糖醇,利用酿酒酵母将水解液中的部分葡萄糖转化成乙醇,而剩下的一些木糖及葡萄糖则用来作为红法夫酵母生产虾青素的碳源,也取得了不错的效果。由于红法夫酵母很难完全利用木质纤维素水解液中的还原糖,因此采用与其他产品进行联产的工艺,有利于充分利用水解液中的还原糖,提高原料利用率。

总的来说,木质纤维素类原料来源更广泛、价格低廉,不存在占用耕地等问题,是最有希望用于规模化低成本发酵生产虾青素的原料,但其利用存在一些技术瓶颈:一是原料需要复杂的预处理;二是酸水解产生的微生物抑制物需增加脱毒流程,生产效率会下降;三是采用酶解的纤维素酶价格仍偏高,降解效率也不高,即纤维原料糖平台构建方面成本居高不下,导致虾青素生产成本较高。

2.2 果汁原料或者植物提取物

果汁原料相对比较廉价,并且果汁成分营养丰富,不需要添加额外的生长因子,适合微生物生长,因此也有报道利用果汁原料作为红法夫酵母的生长原料来生产虾青素。目前研究比较多的水果汁或者植物提取物主要是丝兰枣汁、菠萝汁、甘蔗汁、葡萄汁、椰乳等^[35-42],这些果汁或者植物提取物作红法夫酵母生产虾青素的碳源时,虾青素产率比含有相同还原糖浓度的合成培养基作碳源时的高很多,原因便是这类碳源除了含有还原糖外还含有大量的其他营养物质及适合红法夫酵母的生长因子。这些原料中目前研究最多的是丝兰枣汁,这种果汁作红法夫酵母生产虾青素的碳源时,虾青素最高产率是含有相同还原糖浓度的合成培养基作碳源时的3.5倍^[36]。而效果最好的果汁类原料则是椰乳,椰乳作为红法夫酵母生产虾青素的碳源时,最高虾青素产率能达到11.47 mg/L^[42]。虽然水果类原料来源丰富、预处理简单、适合微生物生长,是虾青素生产中研究较广泛使用的原料,但其季节波动

性和地域局限性较大,大规模推广有难度。

2.3 糖蜜

糖蜜是制糖工业的副产品,化学组成因制糖原料、加工条件的不同而略有差异。糖蜜中含有大量蔗糖等可发酵性糖,是非常好的发酵原料,现已用于酒精、氨基酸和有机酸等产品的发酵生产上,因而也被用作红法夫酵母的碳源来生产虾青素。比如Haard等^[43]利用糖蜜(蔗糖49.8%,葡萄糖4.4%,果糖4.6%)作为红法夫酵母的碳源生产虾青素,结果在稀释度为10%的糖蜜培养基中取得最佳的虾青素产率,达到1 182 μg/g(虾青素/总糖),而用作对照的模拟糖蜜(即根据糖蜜中还原糖比例配置)的虾青素产率为875 μg/g(虾青素/总糖),原因可能是糖蜜中含有促进虾青素表达的因子。国内的朱明军^[17]通过比较不同碳源对红法夫酵母生产虾青素的影响,也发现糖蜜对红法夫酵母的生长最为有利,要明显高于蔗糖和葡萄糖。此外,An等^[44]利用甜菜糖蜜(主要成分为蔗糖、葡萄糖和果糖)作为红法夫酵母的碳源生产虾青素,在添加尿素作为氮源条件下,虾青素产率最高为2.4 mg/g(虾青素/总糖)。糖蜜类原料含糖量高、供应量较大,是优良的碳源,但将其用于虾青素生产可能存在与其他行业(如燃料酒精)争夺原料的问题,原料供应的稳定性值得研究。

2.4 甘油

甘油作为生物柴油生产时的一种副产物,价格低廉且极易获得,因此以甘油作为红法夫酵母生产虾青素的碳源,能够有效降低生产成本。Kusdiyantini等^[45]研究了以纯甘油作为红法夫酵母生产虾青素的碳源时pH值及甘油初始浓度对虾青素产量的影响,结果表明当pH值为6.0,初始甘油质量浓度为37.8 g/L,红法夫酵母生长良好且虾青素达到最大产率,为0.97 mg/g(虾青素/甘油)。Silva等^[46]同样对纯甘油作为红法夫酵母生产虾青素的碳源进行了研究,发现当培养基中甘油质量浓度为40 g/L时,温度25℃时,经过168 h的发酵,虾青素的产量达到最大值为1.7 mg/L。可见,甘油是一种非常适合作红法夫酵母生产虾青素的碳源,红法夫酵母利用甘油作碳源不仅生长良好且虾青素在酵母体内的积累也很好,但甘油原料面临的一个问题是纯度高的甘油很难获得,生物柴油生产过程中的粗甘油杂质(比如甲醇)较多,这对微生物的生长及虾青素的积累会有很大影响,并且可能会涉及到食品安全的问题。

3 结论与展望

利用红法夫酵母生产虾青素,培养基原料(尤其碳源)成本偏高是制约该材料规模化应用的主要问题之一。如何寻找来源广、价廉且发酵效果好的碳源,降低虾青素的生产成本是发展虾青素产业亟待解决的课题。葡萄糖、阿拉伯糖、果糖、木糖等合成或半合成培养基所用碳源适合红法夫酵母生产虾青素,效果也较好,但因其价格较高,仅适用于实验室研究和小型发酵生产,不适于大规模工业化生产。一些廉价且来源广泛的原料是规模化生产虾青素的良好碳源。这些天然原料包括水果类原料、糖质原料、甘油和废弃纤维素类原料等,但这些原料都存在一些问题,比如水果类原料存在季节性地域性

限制,糖蜜类原料供应稳定性方面存在问题,甘油类原料杂质多且存在食品安全隐患,木质纤维素类原料来源广泛、价格低廉,不存在占用耕地等问题,是最有希望用于规模化低成本发酵生产虾青素的原料,但其利用存在一些技术瓶颈。

基于这些碳源所存在的问题,未来在红法夫酵母产虾青素碳源方面的研究主要将在以下几个方面:1)更多廉价原料的开发:由于目前已研究的廉价原料都存在不同的缺陷,因此寻找新的来源广泛且价格低廉的原料将是今后的一个重要研究方向。2)由于来源广泛及价格低廉,木质纤维素原料将是红法夫酵母生产虾青素最具潜力的廉价原料,针对木质纤维素原料作碳源时存在的技术瓶颈,今后这方面的研究内容将主要为低成本低污染木质纤维素原料预处理的工艺选择及优化、水解液中抑制剂对红法夫酵母的抑制机理研究及虾青素与其他产品联产工艺的研究等。3)果汁、植物提取物及糖蜜类原料主要的制约因素是原料的供应稳定性,因此,扩大原料来源途径及原料的低成本储存将是今后的研究方向。4)甘油能够通过生产生物柴油大量获得并且价格低廉,针对粗甘油中的杂质如甲醇对红法夫酵母产虾青素的影响,今后研究的重点方向将是粗甘油中的甲醇低成本去除技术或者生物柴油生产过程中的低甲醇甚至无甲醇工艺。

[参 考 文 献]

- [1] 刘子贻,沈奇桂. 虾青素的生物活性及开发应用前景[J]. 中国海洋药物, 1997, 63(3): 46 - 49.
- [2] Schmidt I, Schewe H, Gassel S, et al. Biotechnological production of astaxanthin with *Phaffia rhodozyma*/*Xanthophyllomyces dendrorhous*[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2011, 89(3): 555 - 571.
- [3] Misawa N. Pathway engineering of plants toward astaxanthin production[J]. Plant Tissue Culture Letters, 2009, 26(1): 93 - 99.
- [4] 翟兴文,蒋敏霞. 虾青素的生物开发和应用[J]. 广东饲料, 2002, 11(5): 38 - 39.
- [5] Andrewes A G, Phaff H J, Starr M P, et al. Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red-pigmented fermenting yeast[J]. Phytochemistry, 1976, 15(6): 1003 - 1007.
- [6] Calo P, González T. The yeast *Phaffia rhodozyma* as an industrial source of astaxanthin[J]. Microbiologia, 1995, 11(3): 386 - 388.
- [7] Palágyi Z, Ferenczy L, Vágvölgyi C. Carbon-source assimilation pattern of the astaxanthin-producing yeast *Phaffia rhodozyma*[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2001, 17(1): 95 - 97.
- [8] Park K M, Min S H. Production of carotenoids by β -ionone-resistant mutant of *Xanthophyllomyces dendrorhous* using various carbon sources[J]. Biotechnology & Bioprocess Engineering, 2008, 13(2): 197 - 203.
- [9] Meyer P S, Preez J D. Effect of culture conditions on astaxanthin production by a mutant of *Phaffia rhodozyma* in batch and chemostat culture[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 1994, 40(6): 780 - 785.
- [10] 何璞,余龙江,周蓬蓬,等. 响应面法对红法夫酵母合成虾青素主要影响因素的优化[J]. 工业微生物, 2007, 37(1): 63 - 66.
He Pu, Yu Jianglong, Zhou Pengpeng, et al. Optimization of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* using response surface methodology[J]. Industrial Microbiology, 2007, 37(1): 63 - 66. (in Chinese with English abstract)
- [11] 梁成,黄彦君,吴海珍,等. 红发夫酵母两步碳源流加培养[J]. 食品与发酵工业, 2002, 28(2): 7 - 10.
Liang Cheng, Huang Yanjun, Wu Haizheng, et al. Two-step addition of carbon source for the culture of *Phaffia rhodozyma*[J]. Food and Fermentation Industries, 2002, 28(2): 7 - 10. (in Chinese with English abstract)
- [12] Persike D S, Bonfim T B, Santos M R, et al. Invertase and urease activities in the carotenogenic yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (formerly *Phaffia rhodozyma*) [J]. Bioresource Technology, 2002, 82(1): 79 - 85.
- [13] Johnson E A, Lewis M J. Astaxanthin formation by the yeast *phaffiarhodozyma*[J]. Journal of General Microbiology, 1979, 115(1): 173-183.
- [14] Montanti J, Nghiem N P, Johnston D B. Production of astaxanthin from cellulosic biomass sugars by mutants of the yeast *Phaffia rhodozyma*[J]. Applied Biochemistry & Biotechnology, 2011, 164(5): 655 - 665.
- [15] Vázquez M, Santos V, Parajó J C. Effect of the carbon source on the carotenoid profiles of *Phaffia rhodozyma* strains[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 1997, 19(4): 263 - 268.
- [16] 朱明军,浦跃武,吴海珍,等. 不同碳源及其浓度对红发夫酵母培养的影响[J]. 华南理工大学学报:自然科学版, 2002, 30(4): 77 - 80.
Zhu Mingjun, Pu Yewu, Wu Haizhen, et al. Effects of carbon sources and concentration on the culture of *Phaffia rhodozyma*[J]. Journal of South China University of Technology, 2002, 30(4): 77 - 80. (in Chinese with English abstract)
- [17] Parajó J C, Santos V, Vázquez M. Optimization of carotenoid production by *Phaffiarhodozyma* cells grown on xylose[J]. Process Biochemistry, 1998, 33(2): 181 - 187.
- [18] Stachowiak B. Astaxanthin synthesis by *Xanthophyllomyces dendrorhous* DSM 5626 and its mutants on carrot extract medium under different illumination intensity[J]. Applied Biochemistry & Microbiology, 2014, 13(3): 279 - 288.
- [19] Parajo J C, Santos V, Vazquez M. Co-production of carotenoids and xylitol by *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) [J]. Biotechnology Letters, 1997, 19(2): 139 - 142.
- [20] Nghiem N P, Montanti J, Johnston D. Production of astaxanthin from corn fiber as a value-added co-product of fuel ethanol fermentation[J]. Applied Biochemistry & Biotechnology, 2009, 154(1/2/3): 48 - 58.
- [21] Calo P, Miguel T D, Velázquez J B, et al. Mevalonic acid increases trans-astaxanthin and carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*[J]. Biotechnology Letters, 1995, 17(6): 575 - 578.
- [22] Meyer P S, Preez J D. Effect of acetic acid on astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma*[J]. Biotechnology Letters, 1994, 16(1): 101 - 104.

- 1993, 15(9): 919 – 924.
- [23] Flores-Cotera L B, Martín R, Sánchez S. Citrate, a possible precursor of astaxanthin in *Phaffiarhodomyces*: influence of varying levels of ammonium, phosphate and citrate in a chemically defined medium[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 55(3): 341 – 347.
- [24] 林舒乐,倪辉,肖安风,等. 乳酸钠对法夫酵母产虾青素的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2010, 36(8): 106 – 111.
Lin Shule, Ni Hui, Xiao Anfeng, et al. Effect of sodium lactate on production of astaxanthin of *Phaffia rhodozyma* [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2010, 36(8): 106 – 111. (in Chinese with English abstract)
- [25] Gu W L, An G H, Johnson E A. Ethanol increases carotenoid production in *Phaffia rhodozyma* [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 1997, 19(2): 114 – 117.
- [26] Yamane Y, Nakashimada Y T, Nishio N, et al. Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* enhanced in fed-batch culture with glucose and ethanol feeding[J]. *Biotechnology Letters*, 1997, 19(11): 1109 – 1111.
- [27] 田小群,朱明军,梁世中. 几种化学激活剂刺激虾青素合成的机理研究[J]. *氨基酸和生物资源*, 2003, 25(2): 27 – 30.
Tian Xiaoqun, Zhu Mingjun, Liang Shizhong. Research on mechanism of promotion of astaxanthin synthesis by chemical activators[J]. *Amino Acids and Biotic Resources*, 2003, 25(2): 27 – 30. (in Chinese with English abstract)
- [28] 王小连,魏维,李秋爽,徐威. 氧载体正十六烷对红法夫酵母发酵产虾青素的影响[J]. *沈阳药科大学学报*, 2011(1): 73 – 77.
Wang Xiaolian, Wei Wei, Li Qiushuang, et al. Influences of n-hexadecane on producing astaxanthin by *Xanthophyllomyces dendrorhous* fermentation method[J]. *Journal of Shenyang Pharmaceutical University*, 2011(1): 73 – 77. (in Chinese with English abstract)
- [29] Vázquez M, Santos V, Parajó J C. Fed-batch cultures of *phaffia rhodozyma* in xylose-containing media made from wood hydrolysates[J]. *Food Biotechnology*, 1998, 12(1/2): 43 – 55.
- [30] Cruz M, Parajo J C. Improved astaxanthin production by *Xanthophyllomyces dendrorhous* growing on enzymatic wood hydrolysates containing glucose and cellobiose[J]. *Food Chemistry*, 1998, 63(4): 479 – 484.
- [31] Martin A M, Acheampong E, Patel T R. Production of astaxanthin by *Phaffia rhodozyma* using peat hydrolysates as substrate[J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 1993, 58(3): 223 – 230.
- [32] Parajó J C, Santos V, Vázquez M, et al. Production of carotenoids by *Xanthophyllomyces dendrorhous* growing on enzymatic hydrolysates of prehydrolysed wood[J]. *Food Chemistry*, 1997, 60(3): 347 – 355.
- [33] Nghiem N P, Kim T H, Chang G Y, et al. Enzymatic fractionation of SAA-pretreated barley straw for production of fuel ethanol and astaxanthin as a value-added co-product[J]. *Applied Biochemistry & Biotechnology*, 2013, 171(2): 341 – 351.
- [34] Horiuchi J I, Tada K, Kanno T. Biorefinery for bioethanol, lactic acid, xylitol and astaxanthin production from corn cobs [J]. *Journal of Biotechnology*, 2010, 150(6): 171 – 171.
- [35] Ramírez J, Obledo N, Arellano M, et al. Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in a fedbatch culture using a low cost medium feeding[J]. *e-Gnosis*, 2006, 5(4): 1 – 9.
- [36] Ramírez J, Nuñez M L, Valdivia R. Increased astaxanthin production by a *Phaffia rhodozyma* mutant grown on date juice from *Yucca fillifera*[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2000, 24(3): 187 – 190.
- [37] Luna-Flores C H, Ramírez-Cordova J J, Pelayo-Ortiz C, et al. Batch and fed-batch modeling of carotenoids production by *Xanthophyllomyces dendrorhous* using *Yucca fillifera* date juice as substrate[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2010, 53(1): 131 – 136.
- [38] Jirasripongpun K, Pewlong W, Kitraksa P, et al. Carotenoid production by *Xanthophyllomyces dendrorhous*: use of pineapple juice as a production medium[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2008, 47(2): 112 – 116.
- [39] Florêncio J A, CR Soccol C R, Furlanetto L F, et al. A factorial approach for a sugarcane juice-based low cost culture medium: increasing the astaxanthin production by the red yeast *Phaffia rhodozym*[J]. *Bioprocess Engineering*, 1998, 19(3): 161 – 164.
- [40] Fontana J D, Guimarães M F, Martins N T, et al. Culture of the astaxanthinogenic yeast *Phaffia rhodozyma* in low-cost media[J]. *Applied Biochemistry & Biotechnology*, 1996, 57/58(1): 413 – 422.
- [41] Meyer P S, Preez J D. Astaxanthin production by a *Phaffia rhodozyma* mutant on grape juice[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 1994, 10(2): 178 – 183.
- [42] Domínguez-Bocanegra A R, Torres-Muñoz J A. Astaxanthin hyperproduction by *Phaffia rhodozyma* (now *Xanthophyllomyces dendrorhous*) with raw coconut milk as sole source of energy[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2004, 66(3): 249 – 252.
- [43] Haard N F. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma* on molasses[J]. *Biotechnology Letters*, 1988, 10(9): 609 – 614.
- [44] An G H, Jang B G, Cho M H. Cultivation of the carotenoid-hyperproducing mutant 2A2N of the red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) with molasses[J]. *Journal of Bioscience & Bioengineering*, 2001, 92(2): 121 – 125.
- [45] Kusdiyantini E, Gaudin P, Goma G. Growth kinetics and astaxanthin production of *Phaffia rhodozyma* on glycerol as a carbon source during batch fermentation[J]. *Biotechnology Letters*, 1998, 20(10): 929 – 934.
- [46] Silva C M, Borba T M, Burkert C V, et al. Carotenoid production by *Phaffia rhodozyma* using raw glycerol as an additional carbon source[J]. *International Journal of Food Engineering*, 2012, 8(4): 186 – 191.

Review on astaxanthin production from agricultural wastes by *Phaffia rhodozyma*

Zhou Guixiong, Wang Wen, Tan Xuesong, Zhuang Xinshu, Yuan Zhenhong*, Qi Wei, Yu Qiang, Wang Qiong, Miao Changlin, Wang Yao

(Key Laboratory of Renewable Energy, Guangzhou Institute of Energy Conversion, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* is environmentally friendly, safe, and cost effect, but the cost of the medium for culture of *Phaffia rhodozyma* especially carbon sources is one of the major factors that constrain this process from achieving massive production. Using cheap and widely sourced raw materials such as saccharides, low-value starch, glycerol, and waste lignocellulose carbon sources can effectively reduce the cost. In this paper, we summarized the current use of *Phaffia rhodozyma* to produce astaxanthin, and systematically reviewed, compared, and analyzed domestic and foreign studies on astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* using different carbon sources. Conventional use of pure sugar such as glucose, sucrose and xylose as a carbon source for astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* has good effects, but is applicable only in laboratory studies and in small-scale fermentation due to its high costs. Fruit, when used as a carbon source for astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma*, has wide resources and is easy to pretreat, suitable for microbial growth and widely used for astaxanthin production. However, due to the seasonal fluctuations and geographical limitations on fruit, it is difficult to promote the use of fruit as a carbon source for astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* on a large scale. Molasses, which has a high sugar content and is subject to a wide supply, is a good carbon source. However, using it for astaxanthin production may result in competing resource with other industries (such as fuel alcohol). Therefore, the stability of its supply cannot be ensured. When glycerin is used as a carbon source for astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma*, not only can *Phaffia rhodozyma* grow well, but astaxanthin also accumulates steadily in the body of *Phaffia rhodozyma*. However, it is difficult to obtain high-purity glycerin. Crude glycerol generated during biodiesel production contains a lot of impurities (such as methanol), which can significantly affect microbial growth and astaxanthin accumulation, and may also have food safety issues. Lignocellulose has a variety of sources, which primarily include some agricultural or forest waste such as straw, wood chips, and corn fiber. Currently, a popular application of lignocellulose is the preparation of fuel ethanol, but the utilization of xylose poses a major obstacle to the preparation of fuel ethanol using lignocellulose. *Phaffia rhodozyma* can make efficient utilization of xylose. Therefore, lignocellulose is a very promising raw material that can be used for large-scale and low-cost fermentative astaxanthin production. However, its utilization suffers from the following technological bottlenecks: complicated pre-treatment; the inhibitory substances to microbial growth produced from acid hydrolysis need to be detoxified, which can result in a decrease in astaxanthin production efficiency; and, the high cost and inefficiency of cellulase used for hydrolyzing lignocellulose, which makes it costly to prepare reduced sugars using lignocellulose and produce astaxanthin. Based on these, future studies on the carbon sources for astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* should focus on the development of more cheap carbon sources or the comprehensive utilization of multiple carbon sources, while aiming to overcome technological bottlenecks that restrict the use of lignocellulose as a carbon source. Finally, the future trends in and key research directions for the carbon sources used for astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* were envisaged.

Keywords: carbon; microorganism; wastes; *Phaffia rhodozyma*; astaxanthin; lignocelluloses