

# 法夫酵母产虾青素的反复分批及反复分批补料发酵

肖安风<sup>1,2</sup>, 倪辉<sup>1,2</sup>, 李利君<sup>1,2</sup>, 蔡慧农<sup>1,2</sup>

1 集美大学生物工程学院, 厦门 361021

2 厦门市食品生物工程技术研究中心, 厦门 361021

**摘要:** 以生物量和虾青素产量为指标, 考察法夫酵母多批次半连续培养产虾青素的稳定性。实验结果显示, 在摇瓶上分别以 4 d 和 5 d 为周期反复分批培养法夫酵母, 虾青素产量呈现先增加再下降的趋势, 但第 2 代至第 7 代虾青素产量仍高于第 1 代, 并且 4 d 为周期的虾青素平均产量略高于 5 d 的。在 5 L 罐法夫酵母进行反复分批补料发酵中, 不管是补加 30% 的葡萄糖还是补加 30% 的淀粉水解糖, 第 2 个批次发酵的生物量和虾青素产量均达到第 1 个批次的水平, 表明菌种稳定性较好。

**关键词:** 虾青素, 法夫酵母, 反复分批发酵, 反复分批补料发酵, 稳定性

## Repeated batch and fed-batch process for astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma*

Anfeng Xiao<sup>1,2</sup>, Hui Ni<sup>1,2</sup>, Lijun Li<sup>1,2</sup>, and Huinong Cai<sup>1,2</sup>

1 College of Bioengineering, Jimei University, Xiamen 361021, China

2 Research Center of Food Biotechnology, Xiamen 361021, China

**Abstract:** A comparative study of batch and repeated batch process was carried out for astaxanthin fermentation of *Phaffia rhodozyma* to develop a more economical method for astaxanthin industrial production. In shaking flask fermentation, the change of biomass and astaxanthin production was studied to compare the five-day cycle with four-day cycle of repeated batch culture of *P. rhodozyma*. Astaxanthin production increased at first and then decreased subsequently in seven cycles, yet the yield of astaxanthin in the next six cycles remains higher than that of the first cycle. Comparing the average production of astaxanthin in the seven cycles, four-day cycle performed even better than five-day cycle. Subsequently, a repeated fed-batch process was used in a 5-L bioreactor. The experimental data showed that biomass and astaxanthin production of the second batch could reach the level of the first batch, no matter that the carbon source was glucose or hydrolysis sugar of starch. This result showed that this strain had good stability, and thus repeated batch and fed-batch process could be applied in astaxanthin fermentation for economical purpose.

**Received:** August 18, 2010; **Accepted:** November 16, 2010

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 20702019), Fujian Provincial Key Technique Foundation (No. 2010N5009), Innofund for Talented Youth of Fujian Province (No. 2007F3072), Jimei University Middle-aged and Young Creative Team Special Fund (No. 2010A006).

**Corresponding author:** Huinong Cai. Tel: +86-592-6183832; Fax: +86-592-6180470; E-mail: huinongcai@163.com

国家自然科学基金 (No. 20702019), 福建省产学研重大专项 (No. 2010N5009), 福建省青年人才创新项目 (No. 2007F3072), 集美大学中青年创新团队专项基金 (No. 2010A006) 资助。

**Keywords:** astaxanthin, *Phaffia rhodozyma*, repeated batch, repeated fed-batch, stability

虾青素是一种非维生素 A 原的类胡萝卜素, 具有抗氧化、抗肿瘤、抗衰老、提高免疫力等多种生物学功能, 在饲料、食品、医药、化妆品等行业中具有广泛的需求, 其市场非常广阔<sup>[1]</sup>。

作为虾青素的生产菌, 法夫酵母 *Phaffia rhodozyma* 相比雨生红球藻 *Haematococcus pluvialis* 具有许多优势: 可利用多种糖进行快速异养代谢、培养时间短、菌体可综合利用、发酵过程易于产业化等<sup>[2-3]</sup>。因此, 人们以法夫酵母为研究对象, 对菌种选育、发酵技术等方面进行了深入、系统的研究, 并获得了一定的成果。如 Sun 等<sup>[4]</sup>采用  $\gamma$  射线诱变法夫酵母, Lewis 等<sup>[5]</sup>采用 NTG 诱变和紫罗兰酮筛选突变株, 法夫酵母的类胡萝卜素含量均有显著提高, Chun 等<sup>[6]</sup>利用诱变得到的营养缺陷型菌株作为亲本进行原生质体融合, 得到类胡萝卜素含量提高近 4 倍的高产菌株。对于法夫酵母发酵, 培养基组成及发酵条件是关键因素, 培养温度、pH 和溶氧条件<sup>[7]</sup>、C/N 比<sup>[8]</sup>、碳源组成<sup>[9]</sup>、氮源组成<sup>[10]</sup>等均对法夫酵母发酵虾青素的产量或生产成本有影响: Ramirez 等<sup>[11]</sup>采用最陡爬坡法和响应面分析, 优化 pH、温度、接种量、碳源浓度和氮源浓度 5 个因素, 虾青素的最高产量可达 8.1 mg/L, 较优化前提高了 92%; 为了降低发酵成本, Haard<sup>[12]</sup>采用廉价的糖蜜作为发酵底物, 虾青素的产量比用葡萄糖为底物提高 3 倍。采用添加前体或促进剂的方式, 也可以提高虾青素的产量: Calo 等<sup>[13]</sup>在培养基中添加 1 g/L 的甲羟戊酸, 结果虾青素和总类胡萝卜素产量提高了 300% 以上; Flores-Cotera 等<sup>[14]</sup>发现在培养基中添加柠檬酸可以显著提高虾青素的产量和含量。

在微生物培养过程中, 采用反复分批发酵工艺, 由于只需 1 次菌种活化及种子培养, 就可以进行多个批次的发酵, 大大缩短了发酵时间, 可以有效地提高生产率, 因此, 这种工艺在许多工业发酵过程中都得到了应用<sup>[15-17]</sup>。目前, 人们对法夫酵母产虾青素的发酵工艺已经做了很多有效的工作, 并开发

出了适合产业化生产的发酵工艺。不过, 由于前期的菌种活化、种子扩大培养需要较长的时间, 无形中使发酵周期加长, 生产效率也因之下降。本实验分别在摇瓶和 5 L 罐上, 对比研究分批发酵和反复分批发酵两种工艺培养法夫酵母虾青素的差异, 考察反复分批发酵工艺应用到法夫酵母虾青素生产的可行性, 以期实现提高生产效率, 开发出一种经济、实用的虾青素发酵工艺。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种及培养基

法夫酵母 Pst-1 菌株, 由柏林工业大学食品科学系 Ulf Stahl 教授馈赠, 本实验室保存。

斜面菌种培养基<sup>[18]</sup>: 葡萄糖 10 g/L, 细菌蛋白胨 3 g/L, 麦汁 3 g/L, 酵母膏 3 g/L, 琼脂 20 g/L。

种子培养基<sup>[19]</sup>: 葡萄糖 20 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.1 g/L, 酵母膏 3 g/L, pH 6.0。

发酵基础培养基<sup>[19]</sup>: 葡萄糖 35 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.1 g/L, 酵母膏 3 g/L, pH 6.0。

补料培养基: 30% 的葡萄糖或淀粉水解糖液。

### 1.2 种子扩大培养及发酵

#### 1.2.1 菌种制备

将斜面活化的菌种接种至装有含 30 mL 发酵基础培养基的 250 mL 摇瓶中, 22 °C、180 r/min 摇瓶培养 4 d, 取 1 mL 一代种子接种于装液量 30 mL 的 250 mL 摇瓶中, 22 °C、180 r/min 摇瓶培养 2 d<sup>[20]</sup>。

#### 1.2.2 摇瓶反复分批发酵

将二级种子液以适当的接种量 (10%) 接入装有含 30 mL 发酵基础培养基的 250 mL 摇瓶中, 22 °C、180 r/min 摇床培养一段时间后, 以摇瓶发酵液作为种子, 按 10% 的接种量接入另一装有含 30 mL 发酵基础培养基的 250 mL 摇瓶中进行培养, 如此反复进行发酵。

### 1.2.3 5 L 罐反复分批补料发酵

将培养好的摇瓶种子接入装 4 L 发酵基础培养基的发酵罐 (美国 NBS 公司, BioFlo 110 型) 内, 22 °C、pH 4.0、溶氧 40% 下进行发酵。在发酵过程中, 每隔 4 小时用 3,5-二硝基水杨酸法 (DNS 法) 检测发酵液中还原糖浓度, 通过调节补料培养基补加速率, 控制糖浓度在 15~25 g/L 左右。每隔 8 小时取样检测生物量, 当生物量在 24 h 内不再增加时, 此时生物量已达到峰值, 放罐, 留部分发酵液, 按 10% 接种量 (约 400 mL) 接入新鲜 4 L 的培养基, 反复进行发酵。

## 1.3 分析方法

### 1.3.1 发酵液糖浓度测定

采用 DNS 法<sup>[21]</sup>: 取发酵液 3 500 r/min 离心 5 min, 将上清稀释一定倍数后取 1 mL, 与 3 mL DNS 试剂混合, 沸水浴反应 15 min, 冷却后蒸馏水定容至 25 mL, 在 520 nm 处测吸光度。由标准曲线计算即可得到发酵液的糖浓度。

### 1.3.2 生物量测定

取 5 mL 菌液 3 500 r/min 离心 5 min 后去上清, 蒸馏水洗涤菌体, 离心去上清, 105 °C 下烘至恒重。

### 1.3.3 虾青素的提取及测定

取 1 mL 发酵液样品 3 500 r/min 离心 5 min, 去上清, 用蒸馏水洗涤沉淀, 菌体加入 2 mL 预热至 75 °C 的 DMSO, 立即剧烈振荡, 50 °C 破壁 5 min, 再加入 5 mL 的无水乙醇, 振荡摇匀, 3 500 r/min 离心 5 min, 将上清用无水乙醇定容至 10 mL, 用紫外分光光度计在 474 nm 下测定吸光值<sup>[22]</sup>。

### 1.3.4 二次参数计算

根据得到的生物量浓度、虾青素浓度及发酵液的糖浓度, 计算虾青素单产、细胞得率和虾青素得率, 计算公式如下:

虾青素单产=虾青素浓度/生物量浓度 (mg 虾青素/g 干细胞);

细胞得率=生物量浓度/消耗的糖浓度 (g 干细胞/g 糖);

虾青素得率=虾青素浓度/消耗的糖浓度 (mg 虾青素/g 糖)。

## 2 结果与分析

### 2.1 摇瓶反复分批发酵实验结果

本菌种在摇瓶培养的第 4 天进入稳定期, 此时发酵液中的生物量和虾青素浓度接近或达到最大值, 此后 2 d 内生物量和虾青素含量基本不变, 因此, 在摇瓶上, 选择 4 d 和 5 d 周期进行反复分批发酵, 分别在每个周期结束时取样检测生物量、虾青素浓度和糖浓度, 并计算每个周期的虾青素单产、细胞得率和虾青素得率。

图 1 是以 4 d 和 5 d 为周期的反复分批发酵, 其传代次数和法夫酵母生物量及虾青素产量变化的关系图。以 4 d 为周期进行反复分批发酵, 前 3 个批次的生物量比较接近, 在 4 g/L 左右, 4~7 代生物量有所增加, 在 6 g/L 的范围; 而以 5 d 为周期进行反复分批发酵, 前 4 个批次呈现增加的趋势, 第 4~7 个批次, 生物量也基本稳定在 6 g/L 左右。从虾青素产量变化来看, 4 d 为周期反复分批发酵的虾青素产量, 在第 2 个批次达到最高值 3.59 mg/L, 从第 2 个批次开始呈递减的趋势, 至第 7 批次降至 1.99 mg/L, 与第 1 个批次 1.95 mg/L 基本相等; 5 d 为周期发酵的虾青素产量, 前 2 个批次虾青素含量约为 2 mg/L, 第 3 批次略有下降, 为 1.77 mg/L, 第 4 批次增至 3.17 mg/L, 然后呈递减趋势, 至第 7 代减至 2.13 mg/L。

从单产来看, 4 d 为 1 周期的虾青素单产, 其数值先呈增加趋势, 第 2 和第 3 批次分别达到 0.96 mg 虾青素/g 干细胞和 0.90 mg 虾青素/g 干细胞, 随后单产开始递减, 其中第 4、第 5 批次单产略高于第 1 批次, 而第 6、第 7 批次略低于第 1 批次; 5 d 为一周期的单产最大在第 1 批次, 虾青素单产达到 1.25 mg 虾青素/g 干细胞, 第 2~6 批次稳定在 0.5 mg 虾青素/g 干细胞左右。比较可知, 5 d 为周期的单产总体上高于 4 d 周期的单产。

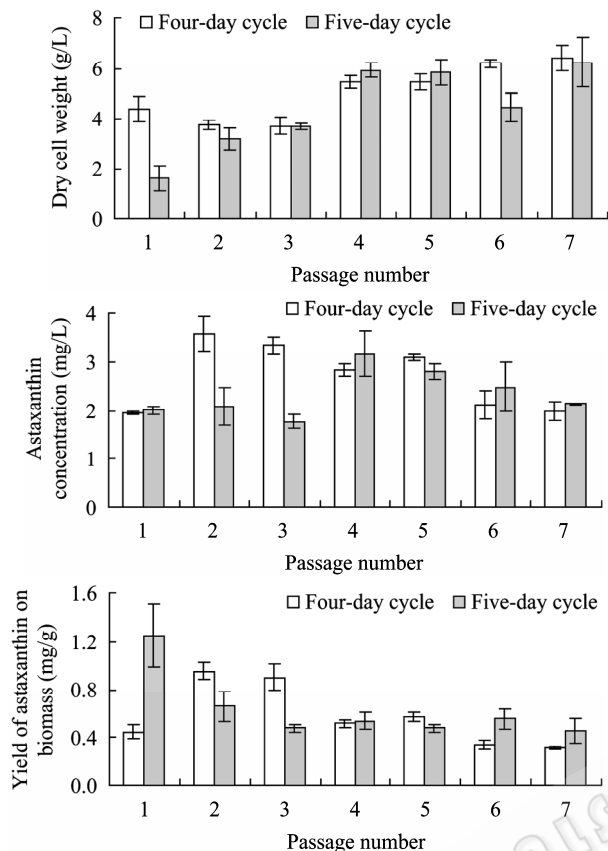


图1 不同周期摇瓶反复分批发酵试验结果  
Fig. 1 Change of cell growth and astaxanthin formation in repeated batch culture of *P. rhodozyma* in shaking flask fermentation.

比较两种周期反复分批发酵的虾青素平均产量, 以4 d为周期进行反复分批发酵, 虾青素平均产量为2.70 mg/L, 5 d周期的虾青素平均产量为2.35 mg/L, 前者略高于后者, 此外, 4 d周期所需发酵时间更短, 因此, 在摇瓶上进行4 d周期的反复分批发酵, 要优于5 d周期的反复分批发酵。

由此可见, 在一定批次内进行摇瓶反复分批发酵, 对法夫酵母细胞的生长和虾青素生产有利。这说明本菌株生产虾青素的性能比较稳定, 不会出现因传代次数多而导致菌株退化、产物产量下降的情况。

## 2.2 罐上反复分批补料发酵实验结果

### 2.2.1 补葡萄糖对法夫酵母产虾青素的影响

在5 L罐中, 以葡萄糖作为碳源, 进行两个批次的反复分批补料发酵, 取样检测发酵过程生物量、虾青素浓度和葡萄糖浓度, 根据生物量、虾青素浓

度和葡萄糖消耗量变化, 进行单产、细胞得率和虾青素得率的计算, 所得结果如图2所示。

从图2可以得出, 在反复分批补料过程中, 两个批次的生物量变化曲线基本一致, 在发酵过程呈现快速增长的趋势, 在批次发酵的后期, 生物量均达到最大值, 分别为47.0 g/L (第1批次) 和49.5 g/L (第2批次)。在每个批次发酵的前26 h, 葡萄糖消耗量近似为0, 随着发酵时间的进行, 每个批次的葡萄糖消耗量均不断增加, 但第2个批次的糖耗要稍少于第1个批次的糖耗。每个批次虾青素浓度随时间呈递增的现象, 第1个批次虾青素浓度最大值为18.96 mg/L, 而第2个批次虾青素浓度最大值为23.14 mg/L, 在获得相等的生物量的情况下, 第2个批次发酵所获得的虾青素要高于第1个批次。

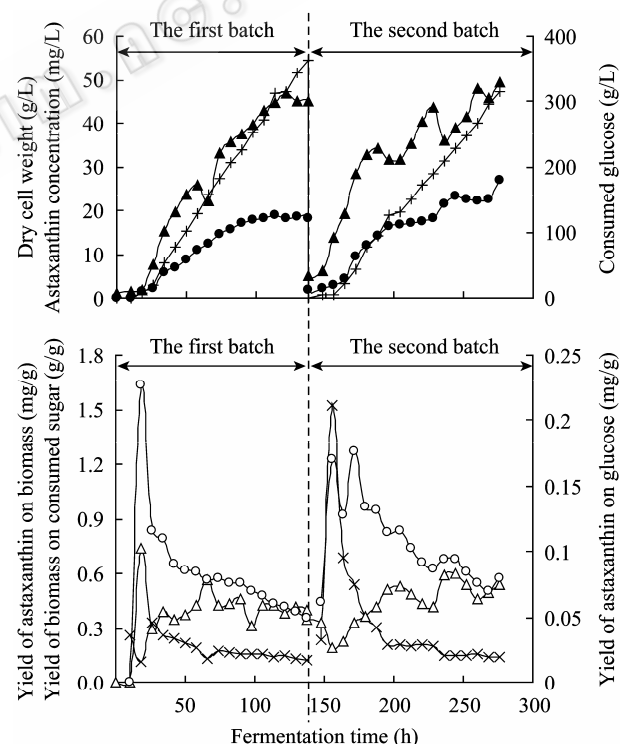


图2 以葡萄糖作为碳源进行罐上反复分批补料发酵试验结果

Fig. 2 Profiles of cell growth, astaxanthin formation and quadratic parameters in repeated fed-batch with 30% glucose in 5-l bioreactor. ▲: dry cell weight; ●: astaxanthin concentration; +: consumed glucose; Δ: yield of astaxanthin on biomass; ○: yield of astaxanthin on consumed glucose; ×: yield of biomass on consumed glucose.

对二次参数的变化情况进行分析,可以看出,第1批次虾青素单产在18 h时为0.74 mg 虾青素/g 干细胞,随后稳定0.3~0.60 mg 虾青素/g 干细胞之间,第2个批次虾青素单产没有出现突然增大的情况,前50 h逐渐增大,最后稳定在0.4~0.6 mg 虾青素/g 干细胞之间,第2批次发酵中后期虾青素单产要略高于第1批次。

两个批次细胞得率变化有所不同,第1个批次细胞得率变化比较稳定,前期在0.25 g 干细胞/g 糖左右变化,然后细胞得率呈缓慢下降趋势,最终降至0.12 g 干细胞/g 糖。第2个批次细胞得率由0.23 g 干细胞/g 糖突然升至最大值1.52 g 干细胞/g 糖,然后在40 h内迅速降至0.21 g 干细胞/g 糖,后期细胞得率下降缓慢,最终为0.14 g 干细胞/g 糖。

比较两个批次的虾青素得率变化,虾青素得率前期均迅速增加,达到最大值,然后出现连续下降。虽然第1个批次虾青素得率最大值(0.23 mg 虾青素/g 糖)大于第2个批次(0.18 mg 虾青素/g 糖),但第1个批次虾青素得率下降速率比第2个批次快,因此在发酵中后期,第2个批次的虾青素得率明显高于第1个批次。

对图2的发酵参数变化进行总体分析,可以发现,两个批次的生物量、虾青素含量、虾青素单产、细胞得率、虾青素得率均有类似的变化趋势,而且第2个批次所获得的生物量和虾青素并未降低,这说明以葡萄糖作为碳源,进行法夫酵母产虾青素的反复分批补料发酵是可行的。

### 2.2.2 补水解糖对法夫酵母产虾青素的影响

由于法夫酵母发酵过程需要消耗大量的葡萄糖,为了降低成本,可以用主要成分为葡萄糖的淀粉水解糖代替葡萄糖进行发酵。在本试验中,用淀粉水解糖代替葡萄糖作为碳源,在5 L 罐中进行反复分批补料发酵,取样检测生物量、虾青素浓度和残糖,并计算二次参数变化,结果如图3所示。

从图3可以得出,以淀粉水解糖作为碳源进行反复分批补料发酵,两个批次的生物量变化曲线基

本一致,在发酵过程呈现快速增长的趋势,在批次发酵的后期,生物量均达到最大值,分别为27.2 g/L (第1批次)和29.5 g/L (第2批次)。随着发酵的进行,不断消耗淀粉水解糖,其中第2个批次达到较大生物量所需要的水解糖量略少于第1个批次。第1个批次虾青素浓度呈现持续增长的情况,甚至在发酵后期,生物量不再增加时,虾青素浓度还有较大增长,最终达到17.34 mg/L;第2个批次虾青素浓度变化与细胞生长呈正相关的关系,当细胞生长停滞时,虾青素浓度稳定在13 mg/L的范围,后期细胞出现衰亡,虾青素浓度也下降。可以发现,第2个批次虾青素含量的增长速率明显高于第1个批次,除去最终阶段的两个点,虾青素含量第2个批次高于第1个批次。

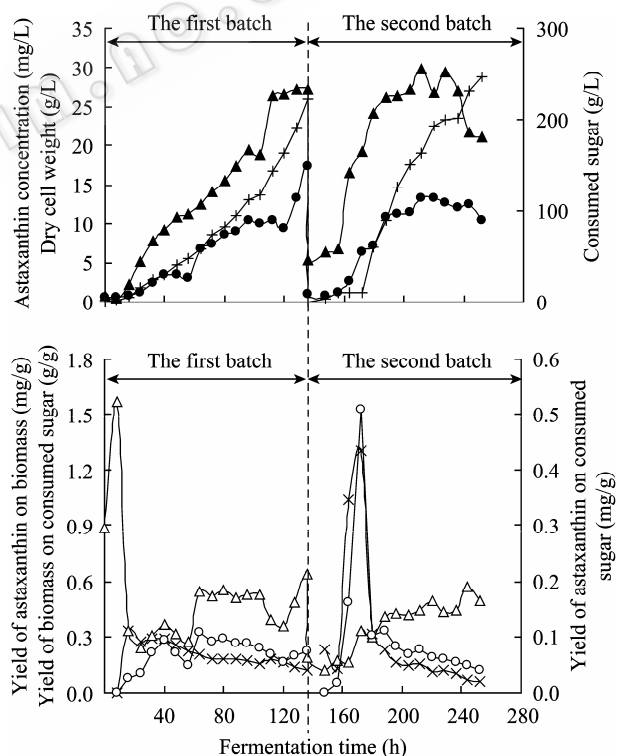


图3 以淀粉水解糖作为碳源进行罐上反复分批补料发酵试验结果

Fig. 3 Profiles of cell growth, astaxanthin formation and quadratic parameters in repeated fed-batch with 30% hydrolysis sugar of starch in 5-l bioreactor. ▲: dry cell weight; ●: astaxanthin concentration; +: consumed sugar; Δ: yield of astaxanthin on biomass; ○: yield of astaxanthin on consumed sugar; ×: yield of biomass on consumed sugar.

对二次参数的变化情况进行分析, 第 1 批次在 8 h 时为 1.57 mg 虾青素/g 干细胞, 随后降至 0.3 mg 虾青素/g 干细胞左右 (16~56 h), 64 h 后稳定在 0.6 mg 虾青素/g 干细胞之间, 第 2 批次自 136 h 开始, 虾青素单产没有出现突然增大的情况, 而是出现逐步上升的趋势, 至 244 h 达到最大值 0.57 mg 虾青素/g 干细胞。比较两个批次的虾青素单产, 在发酵中后期两个批次差别不大。

两个批次细胞得率变化均出现先增加再下降的情况, 其中第 1 个批次细胞得率变化比较稳定, 细胞得率在 16 h 达到最大值 0.33 g 干细胞/g 糖, 然后呈缓慢下降趋势, 最终降至 0.12 g 干细胞/g 糖。从 136 h 至 172 h, 第 2 个批次的细胞得率出现一较快增长, 172 h 达到最大值 1.30 g 干细胞/g 糖, 然后缓慢下降, 发酵结束时降至 0.06 g 干细胞/g 糖。

第 1 个批次虾青素得率变化出现先上升再下降的趋势, 整个变化过程比较平稳, 64 h 时达到最大值 0.11 mg 虾青素/g 糖。第 2 个批次, 虾青素得率先快速增加, 至 172 h 达到 0.51 mg 虾青素/g 糖, 然后迅速降至 0.1 mg 虾青素/g 糖左右, 至发酵结束时虾青素得率最低, 为 0.04 mg 虾青素/g 糖。

对图 3 的发酵参数变化进行总体分析, 第 1 和第 2 个批次的生物量、虾青素含量、虾青素单产、细胞得率、虾青素得率变化趋势基本一致。相对于第 1 个批次, 第 2 个批次所获得的生物量和虾青素并未降低, 说明以淀粉水解糖作为碳源, 进行连续两个批次的法夫酵母产虾青素的反复分批补料发酵, 不会出现因菌种退化而导致产量下降的情况。

### 3 讨论

工业发酵过程广泛采用分批和分批补料发酵工艺, 但是, 每个发酵批次均要花费相当长的时间制备种子, 同时每次均要对所涉及到的发酵设备进行灭菌, 过程繁琐且费时<sup>[23]</sup>。采用反复分批发酵工艺, 只需要进行一次菌种活化及种子培养, 就可以进行多个批次的发酵, 因而大大地缩短了发酵时间, 可

以有效地提高生产率, 在工业发酵过程中有很好的应用前景。

一般来说, 处于对数生长期的微生物活力最高, 此时最适宜作为种子接入进行发酵, 因此, 当部分发酵液取出作为种子接入发酵罐后, 原来的发酵罐会继续补料发酵一段时间, 至生物量或产量达到最大后放罐, 这样, 实现多批次的反复分批补料发酵就需要两个以上的发酵罐<sup>[16,24]</sup>。在本实验中, 选取进入稳定期的酵母进行接种, 此时的生物量和虾青素产量已达到最大值, 因此在每个批次发酵结束后, 直接放罐, 只留下部分发酵液作为下一个批次的种子在罐中, 因此只需要 1 个发酵罐 (或摇瓶) 就可以实现连续多个批次的反复分批发酵, 而每个批次是一个完整的分批发酵流程。这种发酵方式节省了发酵设备, 在工业发酵过程具有实际的应用价值。

反复分批发酵过程中会出现批次产量下降的情况<sup>[25-26]</sup>, 其主要原因是菌种退化。在本实验中, 与分批发酵 (第 1 个批次) 的结果相比, 生物量和虾青素产量并未出现下降, 这说明菌种稳定性较好。反复分批发酵过程中出现产量下降的另一个可能原因是发酵液中乙醇、乙酸或其他代谢副产物的积累, 导致细胞生长和产物合成受到抑制<sup>[27]</sup>。但在本实验的摇瓶反复分批发酵过程中, 反而出现后 6 个批次的虾青素产量普遍高于第 1 个批次的情况。比较摇瓶培养和 5 L 罐的发酵条件, 可知摇瓶培养容易出现氧供应不足的情况, 因而发酵过程中会产生较多的乙醇、乙酸等醇解产物。文献报道, 在法夫酵母发酵过程中添加乙醇、乳酸、柠檬酸、乙酸等糖代谢产物, 对法夫酵母产虾青素有一定的促进作用<sup>[8,14,21]</sup>。因此, 在摇瓶培养中, 部分葡萄糖代谢生产乙醇、乙酸等副产物, 当葡萄糖消耗完后, 法夫酵母重新利用这些糖代谢产物, 使虾青素的合成受到促进, 虾青素的产量提高。而在 5 L 罐发酵中, 溶氧一直维持在 40% 左右, 较少产生乙醇、乙酸等糖代谢副产物, 而且发酵过程通过补料控制糖浓度在 15~25 g/L 左右, 糖代谢副产物的利用受到抑制,

因此,第2个批次的虾青素产量并未有明显的提高。

## 4 结论

法夫酵母生产虾青素摇瓶反复分批发酵与5 L罐反复分批补料发酵的研究结果表明:摇瓶发酵,4 d周期虾青素产量和5 d周期的变化趋势相似,4 d周期的虾青素产量略高于5 d的。以葡萄糖为碳源的5 L罐发酵,相对第1批次,第2批次的生物量和虾青素变化趋势类似,最高生物量和虾青素产量略有增加。以淀粉水解糖作为碳源的5 L罐发酵,以淀粉水解糖作为碳源,第1和第2批次的生物量、虾青素含量、虾青素单产、细胞得率、虾青素得率变化趋势相似,菌种没有退化。

## REFERENCES

- [1] Johnson EA, An GH. Astaxanthin from microbial sources. *Crit Rev Biotechnol*, 1991, 11(4): 297-326.
- [2] Xu XM, Jin ZY, Liu DH. Fed-batch culture of astaxanthin producing strain *Phaffia rhodozyma*. *J Food Sci Biotechnol*, 2002, 21(1): 5-9.  
徐学明, 金征宇, 刘当慧. 法夫酵母产虾青素的补料发酵. *食品与生物技术学报*, 2002, 21(1): 5-9.
- [3] Hu ZC, Zheng YG, Wang Z, et al. Effect of sugar-feeding strategies on astaxanthin production by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *World J Microbiol Biotechnol*, 2005, 21(5): 771-775.
- [4] Sun N, Lee S, Song KB. Characterization of a carotenoid-hyperproducing yeast mutant isolated by low-dose gamma irradiation. *Int J Food Microbiol*, 2004, 94(3): 263-267.
- [5] Lewis MJ, Ragot N, Berlant MC, et al. Selection of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma* with  $\beta$ -ionone. *Appl Environ Microbiol*, 1990, 56(9): 2944-2945.
- [6] Chun SB, Chin JE, Bai S, et al. Strain improvement of *Phaffia rhodozyma* by protoplast fusion. *FEMS Microbiol Lett*, 1992, 93(3): 221-226.
- [7] Johnson EA, Lewis MJ. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. *J Gen Microbiol*, 1979, 115(1): 173-183.
- [8] Yamane Y, Higashida K, Nakashimada Y, et al. Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* enhanced in fed-batch culture with glucose and ethanol feeding. *Biotechnol Lett*, 1997, 19(11): 1109-1111.
- [9] Cruz JM, Parajo JC. Improved astaxanthin production by *Xanthophyllomyces dendrorhous* growing on enzymatic wood hydrolysates containing glucose and cellobiose. *Food Chem*, 1998, 63(4): 479-484.
- [10] Fang TJ, Cheng YS. Improvement of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through mutation and optimization of culture conditions. *J Ferment Bioeng*, 1993, 75(6): 466-469.
- [11] Ramírez J, Gutierrez H, Gschaediger A. Optimization of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through factorial design and response surface methodology. *J Biotechnol*, 2001, 88(3): 259-268.
- [12] Haard NF. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma* on malasses. *Biotechnol Lett*, 1998, 10(9): 609-614.
- [13] Calo P, Miguel T, Welázquez JB, et al. Mevalonic acid increases trans-astaxanthin and carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnol Lett*, 1995, 17(6): 575-578.
- [14] Flores-Cotera LB, Martín R, Sánchez S. Citrate, a possible precursor of astaxanthin in *Phaffia rhodozyma*: influence of varying levels of ammonium, phosphate and citrate in a chemically defined medium. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 55(3): 341-347.
- [15] Wan HM, Chen CC, Giridhar R, et al. Repeated-batch production of kojic acid in a cell-retention fermenter using *Aspergillus oryzae* M3B9. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2005, 32(6): 227-233.
- [16] Ito T, Sota H, Honda H, et al. Efficient acetic acid production by repeated fed-batch fermentation using two fermentors. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1991, 36(3): 295-299.
- [17] Xue XD, Li W, Li ZM, et al. Enhanced 1, 3-propanediol production by supply of organic acids and repeated fed-batch culture. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2010, 37(7): 681-687.
- [18] Ni H, Chen QH, He GQ, et al. Optimization of acidic extraction of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2008, 9(1): 51-59.
- [19] Ni H, Xiao AF, Li LJ, et al. Studies on cultivation of *Phaffia rhodozyma* for producing astaxanthin with starch

- syrup as carbon source. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2009, 9(1): 29–34.
- 倪辉, 肖安风, 李利君, 等. 利用淀粉糖作碳源培养法夫酵母生产虾青素的研究. *中国食品学报*, 2009, 9(1): 29–34.
- [20] Xu XM, Jin ZY, Liu DH, et al. Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in shake flask culture. *J Wuxi Uni Light Ind*, 2000, 19(3): 230–231.
- 徐学明, 金征宇, 刘当慧, 等. 法夫酵母产虾青素的摇瓶工艺. *无锡轻工业大学学报*, 2000, 19(3): 230–231.
- [21] Xiao AF, Ni H, Li LJ, et al. Comparative study on effects of various carbohydrate metabolic products on astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma*. *Food Sci*, 2009, 30(19): 268–272.
- 肖安风, 倪辉, 李利君, 等. 几种糖代谢产物对法夫酵母产虾青素影响的对比研究. *食品科学*, 2009, 30(19): 268–272.
- [22] Ni H. Optimization of *Phaffia rhodozyma* cultivation conditions, astaxanthin extraction and analysis [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2005.
- 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.
- [23] Ohya T, Ohyama M, Kobayashi K. Optimization of human serum albumin production in methylotrophic yeast *Pichia pastoris* by repeated fed-batch fermentation. *Biotechnol Bioengineering*, 2005, 90(7): 886–887.
- [24] Bauer R, Katsikis N, Varga S, et al. Study of the inhibitory effect of the product dihydroxyacetone on *Gluconobacter oxydans* in a semi-continuous two-stage repeated-fed-batch process. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2005, 28(1): 37–43.
- [25] Lim HK, Choi SJ, Kim KY, et al. Dissolved-oxygen-stat controlling two variables for methanol induction of rGuamerin in *Pichia pastoris* and its application to repeated fed-batch. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, 62(4): 342–348.
- [26] Mussatto SI, Rodrigues LR, Teixeira JA.  $\beta$ -Fructofuranosidase production by repeated batch fermentation with immobilized *Aspergillus japonicus*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2009, 36(7): 923–928.
- [27] Liu YQ, Liu DH. Kinetic study on glycerol production by repeated batch fermentation using free *Candida krusei*. *Process Biochem*, 2004, 39(11): 1507–1510.