

[文章编号] 1007-7405(2017)04-0020-08

# 乙醇补料对法夫酵母发酵产虾青素的促进效果

付爽<sup>1</sup>, 沈宁燕<sup>1</sup>, 倪辉<sup>1,2,3,4</sup>, 李利君<sup>1,2,3,4</sup>, 杨秋明<sup>1,2,3,4</sup>, 肖安风<sup>1,2,3,4</sup>

(1. 集美大学食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021; 2. 福建省食品微生物与酶工程重点实验室, 福建 厦门 361021; 3. 福建省海洋功能食品工程技术研究中心, 福建 厦门 361021; 4. 厦门市海洋功能食品重点实验室, 福建 厦门 361021)

[摘要] 将法夫酵母(*Phaffia rhodozyma*) JMU-MVP14菌株在7 L发酵罐中进行培养, 考察在不同葡萄糖质量浓度条件下, 补加乙醇对法夫酵母 JMU-MVP14菌株的生长和虾青素合成的影响。结果表明: 低糖质量浓度下(20 g/L), 恒定乙醇浓度发酵明显提高虾青素产量和细胞产率, 与分批发酵相比, 虾青素产量和细胞产率分别提高了27%和40%, 分别达到102.8 mg/L和5.9 mg/g; 中糖质量浓度下(30 g/L), 恒定乙醇浓度发酵, 得到较高的虾青素产量为118.4 mg/L, 与分批发酵相比提高了34%; 高糖质量浓度下(60 g/L), 发酵得到较高虾青素产量为280.6 mg/L, 是低糖质量浓度培养下虾青素产量的3.5倍, 恒定乙醇发酵与分批发酵相比, 生物量和虾青素产量均有显著降低。

[关键词] 法夫酵母; 虾青素; 乙醇; 补料

[中图分类号] TQ 920.6

## Promotion Effect of Ethanol on Astaxanthin Synthesis During Fed-batch by *Phaffia rhodozyma*

FU Shuang<sup>1</sup>, SHEN Ningyan<sup>1</sup>, NI Hui<sup>1,2,3,4</sup>, LI Lijun<sup>1,2,3,4</sup>, YANG Qiuming<sup>1,2,3,4</sup>, XIAO Anfeng<sup>1,2,3,4</sup>

(1. College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering of Fujian Province, Xiamen 361021, China;

3. Fujian Provincial Engineering Technology Research Center of Marine Functional Food, Xiamen 361021, China;

4. Xiamen Key Laboratory of Marine Functional Food, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** *Phaffia rhodozyma* strain JMU-MVP14 was cultured in 7 L fermentor to investigate the effect of ethanol supplementation on cell growth and astaxanthin synthesis under different concentrations of glucose. The results showed that astaxanthin content and cell yield reached 102.8 mg/L and 5.9 mg/g at low concentration of glucose (20 g/L) under the condition of constant ethanol concentration. Compared with batch fermentation, astaxanthin content and cell yield were significantly increased by 27% and 40%, respectively. Under the condition of 30 g/L glucose at constant ethanol concentration, the content of astaxanthin was 118.4 mg/L, which was 34% higher than that of batch fermentation. At high glucose concentration (60 g/L), the yield of astaxanthin was 280.6 mg/L, which was 3.5 times of the yield of astaxanthin at low sugar concentration (20 g/L). The biomass and the yield of astaxanthin were significantly decreased by constant ethanol-fed fermentation compared with batch fermentation.

[收稿日期] 2017-02-25

[修回日期] 2017-04-18

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31501448); 福建省教育厅项目(JA15266)

[作者简介] 付爽(1993—), 女, 硕士生, 从事食品生物技术研究。通信作者: 肖安风(1973—), 男, 教授, 博士, 从事食品生物技术研究, E-mail: xxaaffeng@jmu.edu.cn。

http://xuebaobangong.jmu.edu.cn/zkb

**Keywords:** *Phaffia rhodozyma*; astaxanthin; ethanol; fed-batch

## 0 引言

虾青素 (astaxanthin) 是一种存在于生物体的脂溶性酮式类胡萝卜素,具有很强的抗氧化性、抗肿瘤和增强免疫力等生物学功能,广泛应用于食品、饲料、化妆品和医药等领域<sup>[1]</sup>。

法夫酵母 (*Phaffia rhodozyma*) 是一种可生产天然虾青素的微生物资源<sup>[2]</sup>。由于法夫酵母能够在多种碳氮源条件下快速生长,是一种极具产业化前景的天然虾青素资源,因此引起了人们的广泛关注<sup>[3]</sup>。为了提高法夫酵母虾青素产量,人们探究了多种罐上补料工艺来提高法夫酵母发酵产虾青素的水平。Fuente 等<sup>[4]</sup>在 10 L 发酵罐中进行法夫酵母的分批补料培养并进行白光的照射,其胞内虾青素质量含量达到 4.7 mg/g。梁新乐等<sup>[5]</sup>发现,分批发酵方式对菌体的生长和虾青素的积累都不如分批补料发酵方式,采用指数补料流加,对菌体的生长和虾青素的积累有利,生物量最大为 32.6 g/L,虾青素质量含量可达 14.5 mg/L。因此,合理的补料可以为菌体提供最适的环境,提高细胞调控水平和目标产物的合成能力<sup>[6]</sup>。Gu 等<sup>[7]</sup>研究表明,乙醇可以促进法夫酵母发酵产虾青素的细胞产率。孙玉梅等<sup>[8]</sup>在利用豆腐黄浆水发酵红法夫酵母合成虾青素的过程中,添加 6 g/L 乙醇能明显促进虾青素的积累。朱明军等<sup>[9]</sup>研究发现,在虾青素生长的不同阶段添加乙醇,可以增加虾青素产量,最佳添加质量浓度为 3 g/L。

可见,在法夫酵母发酵过程中,乙醇可以促进酵母细胞内虾青素的积累。本实验室在摇瓶培养过程中,考察了不同培养条件对法夫酵母细胞生长及其产虾青素的影响,发现在摇瓶培养基中添加乙醇可以促进虾青素的合成<sup>[10]</sup>。由于搅拌和供氧方式的差异,在摇瓶中培养法夫酵母,其细胞生长和虾青素合成与实际的发酵生产有很大差异。因此,本试验在 7 L 发酵罐中培养法夫酵母 JMU - MVP14 菌株,考察在不同糖质量浓度培养条件下,添加乙醇对法夫酵母 JMU - MVP14 菌株产虾青素的影响,建立有效提高法夫酵母虾青素产量的罐上乙醇补料策略,以提高法夫酵母发酵产虾青素的能力。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

法夫酵母 (*P. rhodozyma*) JMU - MVP14 菌株:由法夫酵母 JMU - VDL668 菌株经甲基磺酸乙酯诱变,用质量分数 0.5% 的双氧水结合紫外线照射产生自由基淘汰低产菌株选育得到,本实验室保存<sup>[11]</sup>。

### 1.2 培养基

斜面菌种培养基与种子制备培养基<sup>[11]</sup>: 4°Bx 麦汁培养基, pH = 6.0。

无碳源培养基 (g/L):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5,  $\text{CaCl}_2$  0.2,  $\text{MgSO}_4$  0.5, 酵母膏 3, pH = 6.0。

7 L 罐发酵培养基 (g/L): 在无碳源培养基中添加葡萄糖,配制成发酵培养基。

### 1.3 培养方法

#### 1.3.1 摇瓶种子的制备

1) 菌种的活化 取 -70 °C 甘油管保存的菌种,在装有 4°Bx 麦汁培养基的斜面上划线,置于 22 °C 的恒温培养箱中培养 5 d。

2) 发酵种子的制备 挑取斜面上的单菌落,接入 250 mL 的摇瓶中,培养 2~3 d 后为 1 代种子。转接 1 代种子到新配制的种子培养基中,得到 2 代种子,用于发酵试验。

#### 1.3.2 7 L 发酵罐试验

分批发酵:以 5% 的接种量将摇瓶种子接入装液量为 5 L 的 7 L 发酵罐培养基中,发酵过程中利用质量分数 8% 的氨水控制 pH 值为 5.0,发酵温度 21 °C,通气量 3 L/min,调节搅拌转速控制溶氧值为 30%~40%。

乙醇补料发酵: 接种前添加 2 g/L 的乙醇至 7 L 发酵罐培养基中, 接种后用乙醇传感器每 4 h 测定乙醇含量的变化, 并补加乙醇至 2 g/L, 其余培养条件同分批发酵。

## 1.4 分析方法

### 1.4.1 生物量的测定

取 5 mL 发酵液于离心管中, 3500 r/min 离心 5 min, 并用蒸馏水洗涤菌体 2 次, 于 105 °C 烘干至恒重<sup>[12]</sup>。

### 1.4.2 虾青素含量的测定

二甲基亚砷法破壁<sup>[13-14]</sup>: 取 5 mL 发酵液离心 2 次后得到菌体。将菌体在 55 °C 下预热 5 min 后, 加入 2 mL 已预热至 75 °C 的二甲基亚砷, 充分振荡后加入 5 mL 乙醇提取色素, 经离心后得到色素提取液, 用乙醇定容至 10 mL。

紫外分光光度计检测<sup>[15]</sup>: 配制不同浓度梯度的虾青素标准品, 在波长 474 nm 下检测, 绘制出虾青素标准曲线。在相同条件下, 测定发酵样品, 根据标准曲线求得样品中的虾青素含量。

### 1.4.3 发酵液残糖的测定

3, 5-二硝基水杨酸 (3, 5-dinitrosalicylic acid, DNS) 法<sup>[16]</sup>: 1 mL 的发酵上清液稀释至适宜浓度, 加入 0.6 mL 的 DNS, 沸水浴 10 min 后立即冷却, 用蒸馏水定容至 5 mL, 使用紫外分光光度计在波长 520 nm 下测定。

### 1.4.4 发酵液乙醇浓度的测定

配制 2 g/L 的乙醇标准溶液, 稀释不同浓度分装于相同规格的 50 mL 离心管中, 每管装 5 mL, 用于测定乙醇标准曲线。在 22 °C 下, 乙醇传感器提前预热 30 min 至读数为 0, 将传感器感应端置于离心管中距样品液面 0.5 cm 处, 用秒表计时 50 s 后读数。取出感应端置于空气中, 待读数为 0 后测定下一个样品。

### 1.4.5 二次参数的计算

1) 虾青素细胞产率 (mg/g) = 虾青素质量浓度 (mg/L) / 生物量质量浓度 (g/L), 以每克干细胞中含有虾青素的质量 (mg) 为单位。

2) 细胞得率 (g/g) = 生物量质量浓度 (g/L) / 消耗的糖质量浓度 (g/L), 以消耗每克糖产生的干细胞质量 (g) 为单位。

3) 虾青素得率 (mg/g) = 虾青素质量浓度 (mg/L) / 消耗的糖质量浓度 (g/L), 以消耗每克糖产生的虾青素质量 (mg) 为单位。

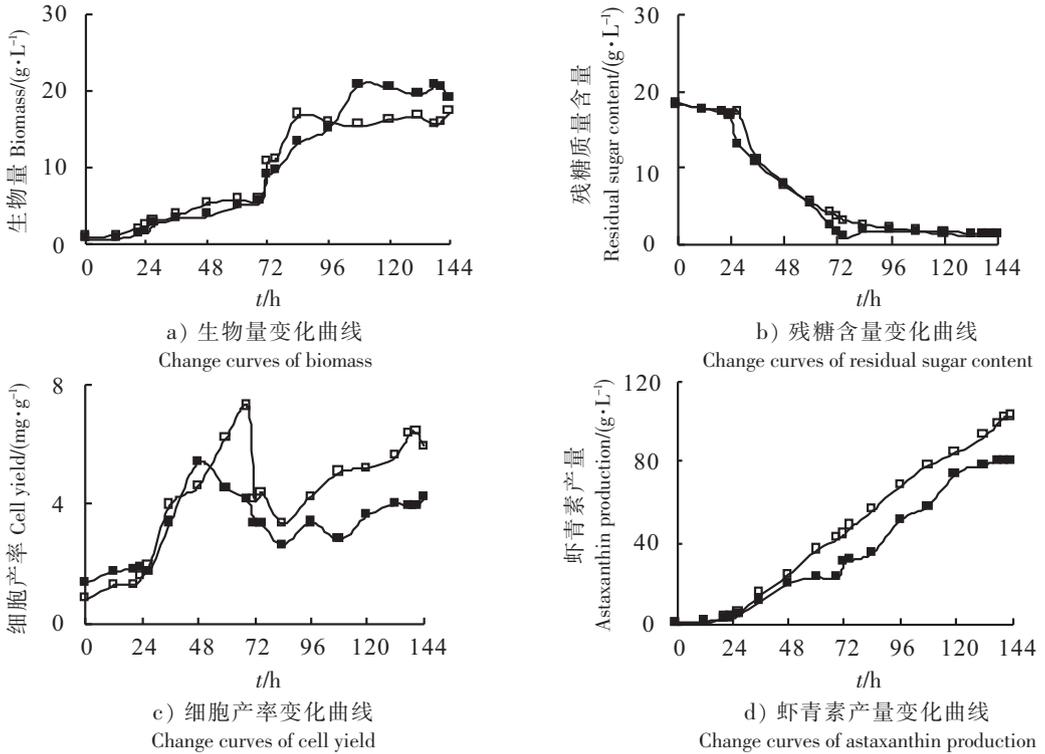
## 2 结果与讨论

### 2.1 低糖质量浓度培养基对发酵的影响

在无碳源 7 L 发酵罐培养基中, 添加 20 g/L 葡萄糖, 配制成发酵培养基。以乙醇作为补料液进行补料发酵, 每 12 h 取样检测生物量、虾青素产量及残糖含量, 并计算虾青素细胞产率, 取样分析, 试验结果如图 1 所示。

观察不添加乙醇的分批发酵状况, 发酵 24 h 前生物量增长缓慢, 处于延滞期, 随着对葡萄糖的利用, 24 h 后法夫酵母进入了对数生长期 (图 1a), 至 108 h 生长趋于稳定, 生物量达到了最大值 20.8 g/L。此时, 发酵液中的葡萄糖基本被消耗殆尽, 然而虾青素含量呈现持续增长的趋势, 最终在 144 h 达到最大值 80.6 mg/L。由图 1b 可知, 发酵至 84 h 后, 培养基中的葡萄糖基本被利用完。因此, 在低糖质量浓度下发酵, 法夫酵母会处于碳源缺乏的状态, 而发酵过程补加乙醇促进了虾青素的合成, 虾青素细胞产率也有明显增加 (图 1c), 与分批发酵相比提高了 40%, 达到 5.9 mg/L。与对照试验相比, 乙醇补料发酵下发酵, 其生物量略有下降, 葡萄糖消耗曲线基本一致, 但虾青素产量有明显的增加 (图 1d)。

由表1可知, 至发酵终点, 虾青素产量达到 102.8 mg/L, 与分批发酵相比提高了 27%。Yamane 等<sup>[17]</sup>研究发现, 在法夫酵母发酵过程中添加乙醇对法夫酵母产虾青素有一定的促进作用。虾青素得率明显增加, 说明乙醇的添加促进了单位细胞内虾青素的产量。Gu 等<sup>[7]</sup>研究表明, 乙醇可促进法夫酵母代谢过程中的乙醇脱氢酶和羟甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶 (HMG - CoA 还原酶) 的活性, HMG - CoA 还原酶的活性提高后, 将合成更多的甲羟戊酸进入虾青素合成途径, 从而促进胞内虾青素的积累。



说明 Notes: -□- 分批发酵 Batch fermentation; -■- 乙醇补料发酵 Batch fermentation with ethanol addition

图1 低糖质量浓度罐上乙醇补料对法夫酵母 JMU-MVP14 发酵的影响

Fig.1 The time-course of microbial growth and astaxanthin production ethanol fed-batch at 20 g/L initial glucose concentration by *P. rhodozyma* JMU-MVP14

表1 低糖时(20 g/L)乙醇补料对法夫酵母 JMU - MVP14 产虾青素的影响

Tab.1 The effect of fed-batch on astaxanthin production at 20 g/L initial glucose concentration by *P. rhodozyma* JMU - MVP14

发酵方式 Fermentation method	残糖质量含量 Residual sugar content /(g · L <sup>-1</sup> )	生物量 Biomass /(g · L <sup>-1</sup> )	细胞得率 Cell yield /(g · g <sup>-1</sup> )	虾青素产量 Astaxanthin production /(mg · L <sup>-1</sup> )	虾青素细胞产率 Astaxanthin cell yield /(mg · g <sup>-1</sup> )	虾青素得率 Astaxanthin yield /(mg · g <sup>-1</sup> )
分批发酵 Batch fermentation	1.24	19.17	1.01	80.63	4.21	4.33
乙醇补料发酵 Ethanol fed-batch fermentation	1.16	17.33	0.89	102.78	5.93	5.55

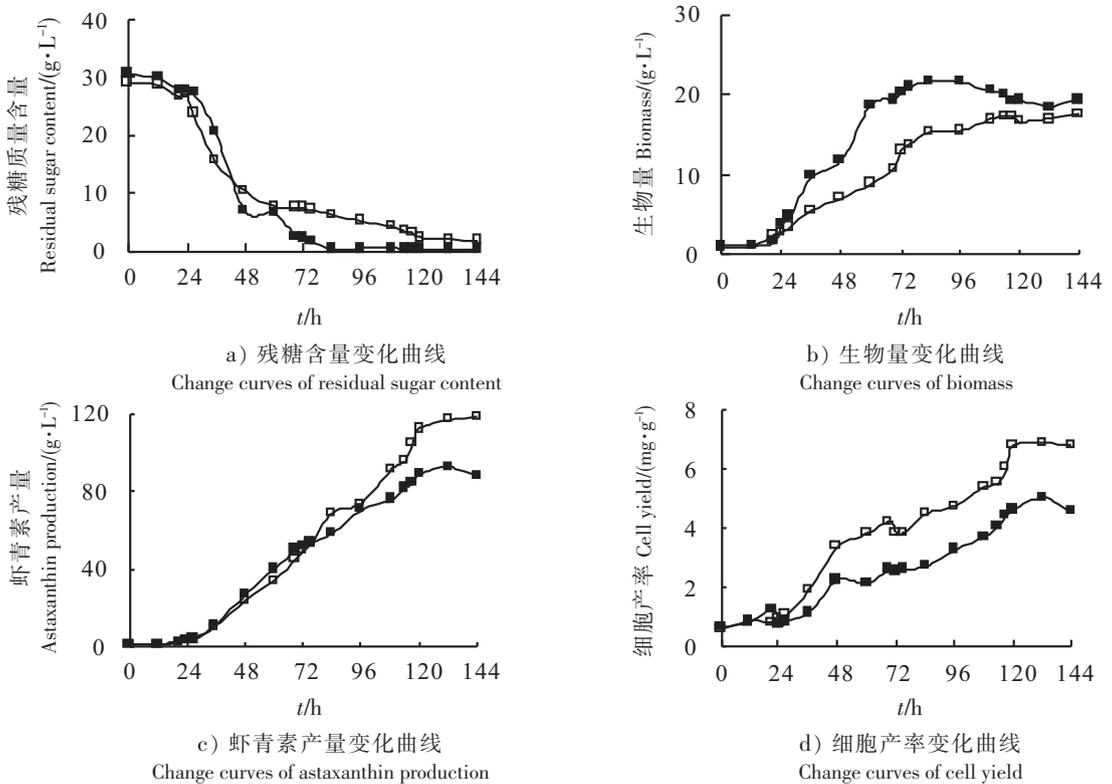
### 2.2 中糖质量浓度培养基对发酵的影响

碳源是培养基的主要成分之一，是细胞各种代谢产物的主要元素，同时又是异养微生物生长的能量来源，高 C/N 比有利于法夫酵母细胞内虾青素的积累<sup>[18]</sup>。在低糖质量浓度下乙醇补料发酵提高了虾青素产量，因此进一步提高葡萄糖质量浓度至 30 g/L，配制成中糖质量浓度的发酵培养基，将乙醇作为补料液进行发酵。每 12 h 取样分析生物量、虾青素产量及残糖含量的变化，并计算虾青素细胞产率，试验结果如图 2 所示。

由图 2 可知，未添加乙醇的分批发酵在发酵 24 h 前，法夫酵母的生长处于延滞期，发酵至 84 h 生物量达到最大值 21.7 g/L，此时葡萄糖基本被消耗完，发酵过程中虾青素产量与细胞产率均呈上升趋势。

随着细胞的生长，葡萄糖被消耗完后乙醇作为小分子碳源被利用 (图 2a)。在发酵过程中补加乙醇明显抑制了法夫酵母菌体的生长 (图 2b)，却促进了虾青素的合成 (图 2c)，发酵至 144 h 虾青素产量为 118.4 mg/L，比对照组提高了 34%。Yamane 等<sup>[19]</sup>研究发现，高 C/N 比有利于法夫酵母细胞内虾青素的积累。在此条件下，虾青素细胞产率与对照组相比提高了 48%，达到 6.8 mg/g (图 2d)。

比较图 1 及图 2，当培养基中葡萄糖质量浓度由 20 g/L 提升至 30 g/L 时，法夫酵母 JMU - MVP14 发酵产虾青素的过程中生物量和虾青素产量均有提高。相比之下，30 g/L 的葡萄糖培养条件下补加乙醇，可以达到更高的虾青素产量，这说明较高葡萄糖质量浓度对法夫酵母虾青素产量更为有利。



说明 Notes: -□- 分批发酵 Batch fermentation; -■- 乙醇补料发酵 Batch fermentation with ethanol addition

图 2 中糖质量浓度罐上乙醇补料对法夫酵母 JMU-MVP14 发酵的影响

Fig.2 The time-course of microbial growth and astaxanthin production ethanol fed-batch at 30 g/L initial glucose concentration by *P. rhodozyma* JMU-MVP14

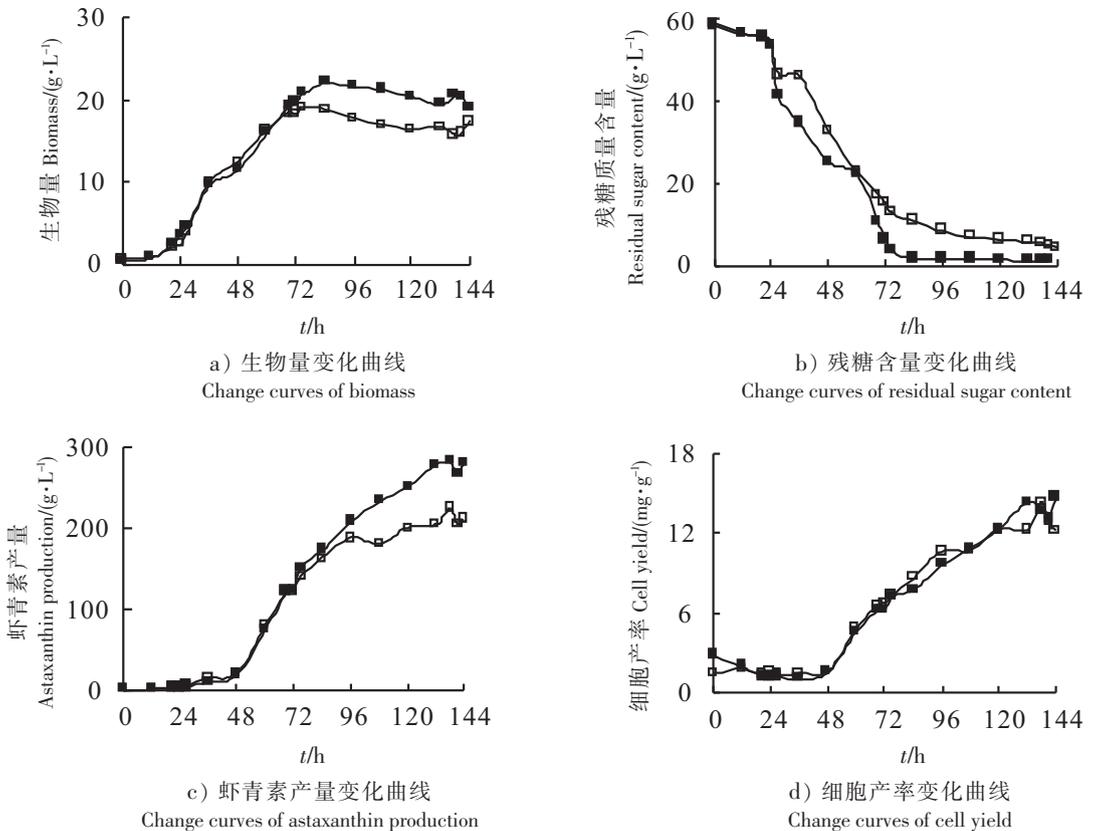
### 2.3 高糖质量浓度培养基对发酵的影响

曹樱等<sup>[20]</sup>研究表明，高质量浓度葡萄糖对法夫酵母 JMU - MVP14 菌株的虾青素合成有促进作用。本实验室前期的实验结果也表明，培养基中葡萄糖的质量浓度较高时，有利于法夫酵母 JMU - MVP14 菌株发酵生产虾青素。因此本试验在无碳源 7 L 发酵罐培养基中，添加 60 g/L 葡萄糖，配制

成高糖质量浓度的发酵培养基。以乙醇作为补料液进行补料发酵, 每 12 h 取样, 检测生物量、虾青素产量及残糖含量, 并计算虾青素细胞产率, 结果如图 3 所示。

法夫酵母在高糖质量浓度下发酵, 前 12 h 为生长的延滞期, 生物量、残糖、虾青素产量变化不明显。与前期的生物量变化曲线相比, 培养基中葡萄糖质量浓度为 60 g/L 时, 法夫酵母生长更快, 并缩短了生长的延滞期, 提前进入对数期 (图 3a)。

从残糖变化曲线 (图 3b) 可知, 随着菌体的增长, 发酵液中的葡萄糖不断被利用, 不添加乙醇的对照组发酵至 84 h 后葡萄糖基本被利用完, 而补加乙醇的试验组并未消耗完葡萄糖, 发酵至末期残糖为 4.7 g/L。推测可能在高糖质量浓度下, 即使溶氧供应充足, 法夫酵母的生长也会受到抑制, 会出现克雷布特里效应 (Crabtree effect)<sup>[21]</sup>, 减弱其对葡萄糖的利用率, 同时酵母细胞还会产生乙醇等代谢副产物抑制细胞生长。高糖质量浓度下补加乙醇发酵, 法夫酵母 JMU - MVP14 菌株生长后期的生物量和虾青素产量均有显著降低 (图 3a、图 3c)。从细胞产率的曲线 (图 3d) 可知, 采用两种工艺发酵法夫酵母 JMU - MVP14 的细胞产率变化趋势一致, 这说明在高糖质量浓度下补加乙醇发酵, 对法夫酵母细胞产虾青素没有促进作用。高糖质量浓度下分批发酵比补料乙醇发酵虾青素产量提高 33%, 说明高糖质量浓度培养基对法夫酵母 JMU - MVP14 菌株产虾青素有促进作用。



说明 Notes: □ - 分批发酵 Batch fermentation; ■ - 乙醇补料发酵 Batch fermentation with ethanol addition

图 3 高糖质量浓度罐上乙醇补料对法夫酵母 JMU-MVP14 发酵的影响

Fig.3 The time-course of microbial growth and astaxanthin production ethanol fed-batch at 60 g/L initial glucose concentration by *P. rhodozyma* JMU-MVP14

## 2.4 不同葡萄糖质量浓度下补加乙醇对法夫酵母细胞生长及虾青素合成的影响比较

3 种葡萄糖质量浓度培养下, 乙醇的补加对法夫酵母 JMU - MVP14 菌株细胞生长及虾青素合成的影响结果如表 2 所示。从表 2 中可以看出, 培养基中 20 ~ 60 g/L 葡萄糖质量浓度对法夫酵母 JMU - MVP14 细胞的生长没有显著影响。60 g/L 的葡萄糖质量浓度提高了法夫酵母 JMU - MVP14 发酵产虾

青素的能力, 虾青素产量为 280.6 mg/L, 是低糖质量浓度 (20 g/L) 培养下虾青素产量的 3.5 倍, 表明高糖质量浓度培养更有利于法夫酵母细胞内虾青素的积累。

乙醇补料发酵法夫酵母明显抑制了菌株的生长。随着葡萄糖质量浓度的增加, 虾青素产量与虾青素细胞产率均增大, 但是细胞得率下降。20 ~ 30 g/L 葡萄糖质量浓度下添加乙醇对法夫酵母虾青素的合成有促进作用, 发酵过程中虾青素含量和虾青素细胞产率均呈上升趋势。20 g/L 葡萄糖质量浓度条件下乙醇补料发酵, 虾青素得率增加, 而中糖质量浓度和高糖质量浓度条件下虾青素得率下降, 说明在低葡萄糖质量浓度条件下, 添加乙醇促进内源性碳源转化为虾青素。

与同在 60 g/L 葡萄糖质量浓度培养下的分批发酵相比, 乙醇的补加降低了法夫酵母 JMU - MVP14 菌株生长后期的生物量和虾青素产量。而从细胞产率的曲线可知, 采用两种发酵工艺发酵法夫酵母 JMU - MVP14 的细胞产率变化趋势一致。虽然总的虾青素产量下降了, 但单位细胞内虾青素的含量并未改变。说明高糖质量浓度培养时, 乙醇减弱了虾青素的产量, 主要是由于抑制了菌体生长, 并未导致细胞内虾青素含量的降低。

表 2 不同糖质量浓度培养时乙醇补料对法夫酵母 JMU - MVP14 产虾青素的影响  
Tab.2 The effect of different fed-batch on astaxanthin production at different initial glucose concentration by *P. rhodozyma* JMU - MVP14

葡萄糖质量浓度 Glucose concentration $/(g \cdot L^{-1})$	发酵方式 Fermentation method	残糖质量含量 Residual sugar content $/(g \cdot L^{-1})$	生物量 Biomass $/(g \cdot L^{-1})$	细胞得率 Cell yield $/(g \cdot g^{-1})$	虾青素产量 Astaxanthin production $/(mg \cdot L^{-1})$	虾青素细胞产率 Astaxanthin cell yield $/(mg \cdot g^{-1})$	虾青素得率 Astaxanthin yield $/(mg \cdot g^{-1})$
20	分批发酵 Batch fermentation	1.24	19.17	1.01	80.63	4.21	4.33
	乙醇补料发酵 Ethanol fed-batch fermentation	1.16	17.33	0.89	102.78	5.93	5.55
30	分批发酵 Batch fermentation	0.17	19.41	0.60	88.36	4.55	2.87
	乙醇补料发酵 Ethanol fed-batch fermentation	1.70	17.43	0.60	118.42	6.79	4.31
60	分批发酵 Batch fermentation	1.24	19.17	0.32	280.56	14.64	4.83
	乙醇补料发酵 Ethanol fed-batch fermentation	4.64	17.33	0.31	210.32	12.13	3.88

### 3 结论

在 7 L 发酵罐上, 研究不同初始糖质量浓度条件下, 补加乙醇对法夫酵母 JMU - MVP14 菌株菌体生长和虾青素合成的影响。在 20, 30 g/L 的初始葡萄糖质量浓度下培养法夫酵母, 采用恒定乙醇浓度发酵有利于细胞内虾青素的积累, 并提高虾青素产量和细胞产率, 试验结果表明: 在 20 g/L 的初始葡萄糖质量浓度下补加乙醇, 虾青素产量可达 102.8 mg/L, 细胞产率达到 5.9 mg/g; 在 30 g/L 葡萄糖质量浓度下, 采用恒定乙醇浓度发酵, 虾青素产量为 118.4 mg/L, 比对照组提高了 34%; 在 60 g/L 的高葡萄糖质量浓度下培养法夫酵母, 虾青素产量达到最高, 为 280.6 mg/L, 而补加乙醇抑制了法夫酵母菌株生长后期的生物量和虾青素产量。

## [ 参 考 文 献 ]

- [1] SCHMIDT I, SCHEWE H, GASSEL S, et al. Biotechnological production of astaxanthin with *Phaffia rhodozyma*/*Xanthophyllomyces dendrorhous* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 89(3): 555-571. DOI:10.1007/s00253-010-2976-6.
- [2] 蒋兴龙, 洪清林, 蔡慧农, 等. 补料工艺对两株法夫酵母菌株产虾青素的影响 [J]. 微生物学通报, 2013, 40(11): 1996-2004.
- [3] 倪辉, 杨远帆. 法夫酵母转化类胡萝卜素生产虾青素的初步研究 [J]. 泉州师范学院学报, 2006, 24(2): 89-93.
- [4] JUAN LUIS D L F, RODRÍGUEZ-SÁIZ M, SCHLEISSNER C, et al. High-titer production of astaxanthin by the semi-industrial fermentation of *Xanthophyllomyces dendrorhous* [J]. Journal of Biotechnology, 2010, 148(2/3): 144. DOI:10.1016/j.jbiotec.2010.05.004.
- [5] 梁新乐, 岑沛霖, 张虹, 等. 法夫酵母高密度培养及虾青素的高产研究 [J]. 菌物学报, 2001, 28(4): 508-514.
- [6] 储炬, 李友荣. 现代工业发酵调控学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2002.
- [7] 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. DOI:10.1038/sj.jim.2900425.
- [8] 孙玉梅, 崔迎进, 曹芳, 等. 豆腐黄浆水中补加乙醇和葡萄糖发酵虾青素的研究 [J]. 中国酿造, 2007(1): 24-27.
- [9] ZHU M J. Increased production of astaxanthin of *Phaffia rhodozyma* with addition of ethanol [J]. Journal of South China University of Technology, 2001, 29(10): 61-64.
- [10] 肖安风, 洪清林, 蔡慧农, 等. 细胞生长、葡萄糖代谢及副产物重新利用对法夫酵母虾青素合成的影响分析 [J]. 高校化学工程学报, 2014, 28(2): 290-297.
- [11] 倪辉, 洪清林, 肖安风, 等. 一株法夫酵母虾青素高产菌株的生产性能 [J]. 生物工程学报, 2011, 27(7): 1065-1075.
- [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.
- [13] 肖冬光, 李贤宇, 郝玥. 高效液相色谱法检测红发夫酵母胞内虾青素 [J]. 天津科技大学学报, 2005, 20(1): 9-12.
- [14] JOHNSON E A, LEWIS M J. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma* [J]. Journal of General Microbiology, 1979, 115(1): 173-183.
- [15] 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.
- [16] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术 [M]. 2版. 北京: 高等教育出版社, 1997: 1-3.
- [17] 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 Letters, 1997, 19(11): 1109-1111. DOI:10.1023/A:1018492611011.
- [18] CHÁVEZ-CABRERA C, FLORES-BUSTAMANTE Z R, MARSCH R, et al. ATP-citrate lyase activity and carotenoid production in batch cultures of *Phaffia rhodozyma* under nitrogen-limited and nonlimited conditions [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 85(6): 1953-1960. DOI:10.1007/s00253-009-2271-6.
- [19] 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 & Environmental Microbiology, 1997, 63(11): 4471-4478.
- [20] 曹樱, 洪清林, 蔡慧农, 等. 4株法夫酵母产虾青素菌株的发酵性能比较 [J]. 中国食品学报, 2013, 13(4): 65-73.
- [21] REYNDERS M B, RAWLINGS D E, HARRISON S T L. Demonstration of the Crabtree effect in *Phaffia rhodozyma* during continuous and fed-batch cultivation [J]. Biotechnology Letters, 1997, 19(6): 549-552. DOI: 10.1023/A:1018341421122.

(责任编辑 马建华 英文审校 刘静雯)