

高温湿热酸法破壁提取法夫酵母胞内虾青素

卢宝驹^{1,2}, 肖安风^{1,2}, 李利君^{1,2}, 倪辉^{1,2}, 蔡慧农^{1,2}, 苏文金^{1,2}

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: 法夫酵母是一种能积累虾青素的红酵母, 对其进行破壁是当前虾青素工业化提取生产的瓶颈工艺。研究在高温湿热条件下, 低浓度盐酸对法夫酵母破壁而提取其胞内虾青素的工艺。探讨了不同破壁温度、盐酸浓度、液料比与破壁处理时间等因素对法夫酵母破壁后虾青素及类胡萝卜素提取率的影响, 确定了高温湿热酸法破壁提取虾青素的最佳条件为: 饱和蒸汽压力 0.1 MPa (121°C), 盐酸浓度 0.5 mol/L, 液料比 (V/W) 30 mL/g, 破壁时间 2 min。在最佳条件下进行中试放大实验, 可得到虾青素与类胡萝卜素的提取率分别为: (84.8 ± 3.2)%, (93.3 ± 2)%。经优化后的新破壁工艺安全高效, 不会有毒性残留, 具有良好的工业应用前景。

关键词: 法夫酵母, 细胞破壁, 虾青素提取, 高温湿热, 盐酸

Technological Process of Cell Disruption for Extracting Astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* by Acid Method under Autoclave Conditions

Baoju Lu^{1,2}, Anfeng Xiao^{1,2}, Lijun Li^{1,2}, Hui Ni^{1,2}, Huinong Cai^{1,2}, and Wenjin Su^{1,2}

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

2 The Research Center of Food Biotechnology, Xiamen 361021, China

Abstract: *Phaffia rhodozyma* is one of the organisms for production of astaxanthin, and the key process for extracting intracellular astaxanthin is cell disruption. In this work, cell disruption for extracting astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* was studied with autoclave method at low acid concentration. The optimum disrupting conditions were: autoclave pressure 0.1 MPa, 121°C; hydrochloric acid concentration 0.5 mol/L; liquid to material ratio (V/W) 30 mL/g dry cell weight and disruption time 2 min. Under the optimum conditions, medium scale experiment showed that astaxanthin and total carotenoids recovery from *Phaffia rhodozyma* were (84.8 ± 3.2)% and (93.3 ± 2)%, respectively. This new method can lead to no poisonous residues and get high extraction yield, which have good prospects to be put into industrial production

Keywords: *Phaffia rhodozyma*, cell disruption, astaxanthin extraction, autoclave, hydrochloric acid

虾青素(3, 3'-二羟基-4, 4'-二酮基-β, β'-胡萝卜素)是水产动物类胡萝卜素的主要组成部分。许多研

究表明虾青素的抗氧化能力是其它类胡萝卜素的 10 倍, 是维生素 E 的 300~500 倍^[1-3]。虾青素以其显著

Received: October 23, 2007; Accepted: January 17, 2008

Supported by: the National Natural Science Foundation of China (No. 20702019), the Science and Technology Foundation of Fujian Province, China (No. 2006H0033) and the Innofund for Talented Youth of Fujian Province (No. 2005Z035).

Corresponding author: Wenjin Su. Tel: +86-592-6183832; E-mail: wjsu@jmu.edu.cn.

国家自然科学基金(No. 20702019), 福建省科技计划重点项目(No. 2006H0033)资助和福建省青年科技人才创新项目 (No.2005Z035) 资助。

的抗氧化活性广泛应用于水产饲料、化学试剂、制药与保健品工业等行业^[4-6]。化学合成的虾青素于上世纪 80 年代被美国 FDA 批准用于水产饲料添加剂, 市场价已高达 2500~3000 美元/kg, 但是化学合成虾青素多种异构体的存在形式不利于动物的消化吸收和体内沉积, 此外, 人们对化学合成虾青素食用安全性的疑虑一直未消除, 对它的使用也仅限于饲料添加剂行业^[7,8]。相对于化学合成虾青素, 天然虾青素都为反式异构体, 其生理活性高且安全性好^[9]。近年, 随着天然虾青素在人类保健与医疗方面作用的发现, 它作为潜在的药用及保健食品资源越来越受到人们重视。

法夫酵母(*Phaffia rhodozyma*)是一类能积累大量虾青素的红酵母, 同其它天然虾青素来源比较, 它具有生长快、培养周期短、虾青素含量高(占类胡萝卜素含量的 70%~95%)及能利用多种碳、氮源等特点, 是一种极具有产业化应用前景的天然虾青素原料^[10]。虾青素作为法夫酵母的胞内色素, 其浓度达不到正常使用要求, 进行提取是对法夫酵母虾青素开发利用的必要途径。法夫酵母细胞壁由葡聚糖、甘露聚糖、糖蛋白等成分组成, 不仅结构致密, 而且异常坚硬, 这非常不利于胞内虾青素的开发利用^[10-12]。许多处理方法如碱法^[13]、酸法^[14,15]、自溶法^[11]、酶法^[12]、二甲亚砜法^[16]等已用来对法夫酵母破壁, 但是这些破壁方法都存在不同程度的缺点而不能用于工业化的提取生产虾青素。因此, 对酵母进行破壁处理是当前工业化提取生产法夫酵母虾青素的瓶颈工艺。

研究表明, 高温湿热条件(121°C, 0.1 MPa)对雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)进行破壁, 能够有效地提取胞内虾青素^[17]。本研究在前期研究基础上, 将高温湿热条件与酸法结合, 进行法夫酵母的细胞破壁研究, 优化其工艺条件, 以期达到缩短破壁时间、降低酸浓度与提高虾青素提取率的目的, 得到适合工业化生产需要的高效安全的法夫酵母细胞破壁工艺。

1 材料与方法

1.1 试验菌种与培养基

法夫酵母 *Pas-1*, 由柏林工业大学食品科学系馈赠, 本实验室保存。

斜面培养基(W/W): 麦芽汁 5%, NaCl 5%, 琼脂 2%, pH 6.0^[17]。

种子培养基: 葡萄糖 10 g/L, 麦汁 3 g/L, 蛋白胨 5 g/L, 酵母膏 3 g/L, NaCl 5 g/L, pH 6.0^[16]。

发酵基础培养基: 葡萄糖 20 g/L, (NH₄)₂SO₄ 5 g/L, KH₂PO₄ 1 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L, CaCl₂·H₂O 0.1 g/L, 酵母膏 1 g/L, NaCl 5 g/L, pH 6.0^[17]。

1.2 实验方法

1.2.1 发酵及菌体获取

法夫酵母 *Pas-1* 菌株通过斜面活化、一代摇瓶及二代摇瓶培养菌种后, 接种于 5 L 发酵罐发酵 72 h (22°C, pH 6.0, 通气量 0.5~1.2 m³/(m³·min)), 发酵液离心(5000 r/min, 5 min)后收集菌体备用。取适量法夫酵母菌体在 55°C 条件下烘干至恒重, 测菌体干重作为破壁料液加入的量化指标。

1.2.2 法夫酵母高温湿热酸法破壁方法

高温湿热酸法破壁装置(10 L, 自行设计)示意图如图 1。取湿菌体按一定的液料比加入不同浓度盐酸后放入耐压、耐酸、空气密封性好的高压装置内; 首先用真空泵从抽真空阀门抽出装置中空气使其处于负压状态, 然后将高温锅炉中的饱和蒸汽从装置中蒸汽入口充入, 使压力升高到所需压力, 并在此压力下保持一段时间; 迅速从排气阀门立即排除饱

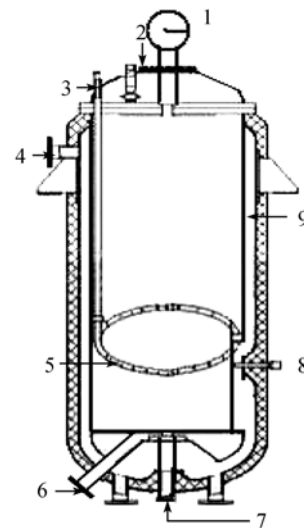


图 1 高温湿热酸法破壁装置示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the pressurization apparatus for disrupting the cell wall of *Phaffia rhodozyma*

1: pressure gauge; 2: vacuum-pumping valve; 3: steam-exhausting valve; 4: condensed water outlet; 5: fixing frame; 6: saturated steam inlet; 7: material outlet; 8: condensed water inlet; 9: condensed water interlayer

和蒸汽, 并从破壁装置夹套进出口通入循环冷凝水快速降温, 然后从料液排泄口排除已破壁菌体作为分析用。

1.3 检测分析方法

1.3.1 虾青素含量及总类胡萝卜素含量的分析

虾青素含量测定采用高效液相色谱法, 使用 Waters 公司 1525 型高效液相色谱仪及 Novapac 18 反相色谱柱(3.9×150 mm, 4 μ m)进行色素分离与定性分析, 使用 Waters 公司 2487 型紫外检测器检测及 Breeze 色谱分析软件外标法进行定量分析。流动相为: A 液, 甲醇: 四氢呋喃: 乙腈(V/V)= 53:36:11, B 液为水。梯度洗脱条件为: 0~40 min, A 液比例为 65%~100%; 40~45 min, A 液比例为 100%~65%; 45~48 min, 保持 A 液比例为 65%; 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 35°C。虾青素标样(Sigma 公司)及法夫酵母提取液中总类胡萝卜素的色谱图如图 2 中(a)和(b)

所示。

总类胡萝卜素含量使用 Varian 公司 Cary 50 型紫外分光光度计于 474 nm 下测定^[5]。

1.3.2 法夫酵母胞内虾青素提取

TA(总虾青素)与 TC(总类胡萝卜素)的提取及测定: 采用二甲亚砜法破壁^[14], 取酵母湿菌体加入已预热至 70°C 二甲亚砜(20 mL/g 干菌体)于 55°C 破壁 5 min, 迅速冷却, 加入乙醇(50 mL/g 干菌体)振荡浸提 5 min, 取上清液用于高效液相色谱与紫外分光光度法分析; 如提取不完全, 在加入乙醇浸提直至菌体无色。

FEA(高温湿热酸法破壁后可直接提取的虾青素)与 FEC(高温湿热酸法破壁后可直接提取的类胡萝卜素)的提取与测定: 将破壁方法改为高温湿热酸法破壁, 破壁后的细胞悬浮液离心洗涤, 加入乙醇提取, 测定方法同总虾青素与总类胡萝卜素。

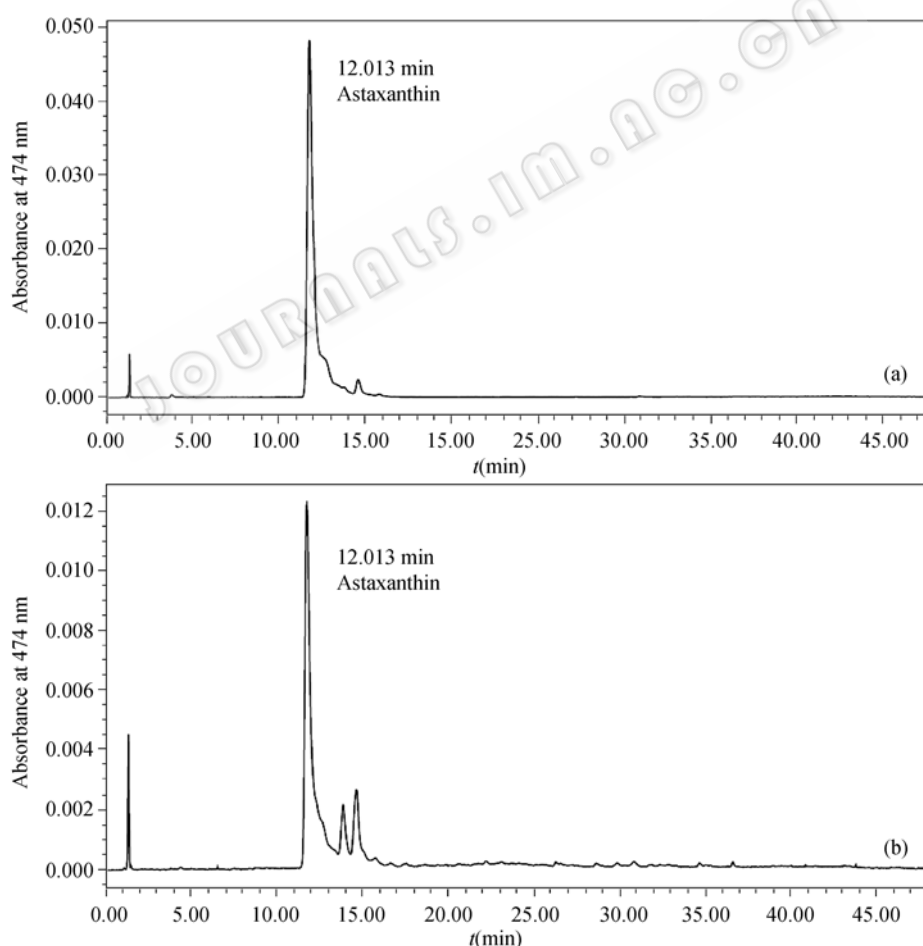


图 2 虾青素标准品(a)与法夫酵母总类胡萝卜素(b)的高效液相色谱图

Fig. 2 HPLC spectra of standard astaxanthin(a) and total carotenoids from *Phaffia rhodozyma*(b)

虾青素提取率计算公式:

$$\text{提取率}(\%) = [\text{FEA}(\mu\text{g/g 干菌体}) / \text{TA}(\mu\text{g/g 干菌体})] \times 100^{[1]}$$

类胡萝卜素提取率计算公式:

$$\text{提取率}(\%) = [\text{FEC}(\mu\text{g/g 干菌体}) / \text{TC}(\mu\text{g/g 干菌体})] \times 100$$

1.3.3 扫描电子显微镜分析

法夫酵母样品经过磷酸盐缓冲液清洗后, 用 2.5%戊二醛预固定 2 h, 再用 1%的锇酸溶液固定 1 h, 再用磷酸盐缓冲液清洗. 经梯度乙醇(50%~100%)脱水后以乙酸异戊酯取代, 上述样本用 CO₂ 临界点干燥仪干燥, 真空涂膜仪内喷金, 然后用加速电压为 1~20 kV 的 XL30 ESEM-TMP 环境扫描电镜(Philips FEI, 荷兰)观察分析。

2 结果

2.1 不同高温湿热酸法破壁条件对虾青素提取率的影响

2.1.1 饱和蒸汽压力对虾青素提取率的影响

分别加入 0.3、0.5、0.7 mol/L 盐酸于液料比 30 mL/g 干菌体的法夫酵母菌悬液中, 然后装入破壁装置, 分别通入 0.05、0.1、0.15、0.2、0.25 MPa 的饱和蒸汽(对应温度分别为:112、121、128、134、140℃)保压处理 2 min, 测虾青素和类胡萝卜素的提取率, 结果如表 1 所示。考虑到饱和蒸汽压力与酸浓度之

间有交互作用, 对不同压力下各浓度酸处理后的虾青素提取率平均值在 $P < 0.05$ 水平上进行方差分析, 结果显示当破壁压力为 0.1 MPa(121℃)时提取率差异显著, 同时, 对总胡萝卜素提取率平均值进行方差分析发现在 $P < 0.05$ 水平上差异不显著。当破壁压力小于 0.1 MPa 时, 法夫酵母细胞壁破坏不严重, 虾青素及其它类胡萝卜素提取率均不高。破壁压力为 0.1~0.25 MPa 时, 低浓度盐酸可对法夫酵母有效破壁。在饱和蒸汽压力为 0.1 MPa 时, 获得虾青素与总类胡萝卜素的提取率达到最大值分别为: $86.7\% \pm 2.5\%$, $95\% \pm 1.8\%$ 。偏高的饱和蒸汽压力(0.15~0.25 MPa)与温度(128~140℃)会造成虾青素氧化破坏, 同时也会对胞内其它类胡萝卜素造成降解。同时, 对不同盐酸浓度下各压力条件处理后的虾青素与总类胡萝卜素提取率的平均值在 $P < 0.05$ 的水平上进行方差分析, 差异并不显著。综合考虑, 选择 0.1 MPa 作为饱和蒸汽破壁压力。

2.1.2 盐酸作用浓度的确定

为确定破壁所用盐酸的最低浓度及最高浓度, 分别加入 0.1、0.3、0.5、0.7、0.9 mol/L 的盐酸于 30 mL/g 的液料比的法夫酵母菌悬液中, 在 0.1 Mpa (121℃)的饱和蒸汽中保压 2 min 后测虾青素和类胡萝卜素的提取率, 实验结果如图 3 所示。当盐酸浓度为 0.3~0.7 mol/L 时, 虾青素与类胡萝卜素的提取率达到最大值分别为: $(88.4 \pm 4.1)\%$ 、 $(94.8 \pm 2.8)\%$ 。

表 1 不同饱和蒸汽压力对虾青素提取率与类胡萝卜素提取率影响(平均数±标准偏差, $n=4$)

Table 1 Effects of the pressure of saturated steam on *Phaffia rhodozyma* cell disruption for the extractability of astaxanthin and carotenoids (mean ± S.D., $n=4$)

Pressure(MPa)		Hydrochloric acid concentration(mol/L)			Mean (%)*
		0.3	0.5	0.7	
Astaxanthin extractability(%)	0.05	51.6 ±2.5	53.3±2.1	80.2 ±1.7	61.7 ^b
	0.1	78.6±3.1	86.6±2.4	83.5±2.8	82.9 ^a
	0.15	84.2±3.2	79.3±3.5	72.5±2.5	78.7 ^b
	0.2	80.5±2.8	52.4±2.8	48.3±3.2	60.4 ^b
	0.25	72.9±3	38.4±2.5	39.1±2.6	50.1 ^c
	Mean(%) **	73.6 ^a	64.7 ^a	62 ^a	
Carotenoids extractability(%)	0.05	54.8±2.9	60.5±2.2	89.7±3.1	68.3 ^a
	0.1	84.8±3.2	95.3±2.6	92.8±2.5	91 ^a
	0.15	93.6±3.8	94±2.1	88.6±2.8	92 ^a
	0.2	88.3±3.5	86.2±2.8	70.7±2.6	81.7 ^a
	0.25	85.1±2.8	83±1.6	52.2±1.4	73.4 ^a
	Mean(%) **	83.8 ^a	81.3 ^a	78.8 ^a	

* Different superscripts; a,b,c: within a row indicate significant($P < 0.05$) different among the means of extraction under the same saturated steam

** The superscript; a: within a line indicate significant($P < 0.05$) different among the means of extraction under the same concentration of hydrochloric acid

当盐酸浓度低于 0.3 mol/L 时, 获得的提取率不高, 破壁不完全。当破壁酸液浓度高于 0.7 mol/L 时, 偏高的酸浓度会加速虾青素的氧化破坏及其它类胡萝卜素的降解。从经济高效的角度考虑, 破壁酸液浓度应控制在 0.3~0.7 mol/L 为宜。本次实验选择获得提取率最高的 0.5 mol/L 酸液浓度作为破壁酸液浓度以优化其它工艺参数。

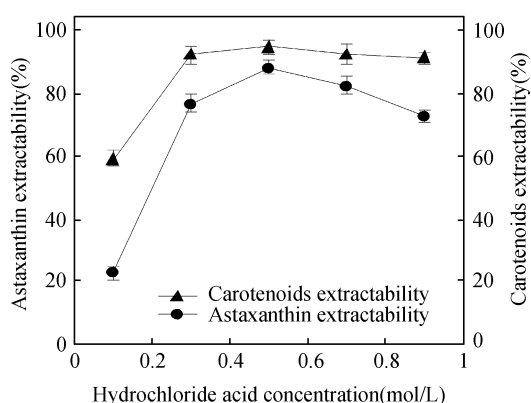


图3 盐酸浓度对法夫酵母高温湿热酸法破壁的影响
Fig. 3 Effects of hydrochloride acid concentration on cell disruption of *Phaffia rhodozyma*

2.1.3 液料比对虾青素提取率影响

在其它条件相同的情况下, 采用不同的液料比 (V/W) 进行实验, 即 0.5 mol/L 盐酸体积 (V/mL): 酵母菌体干重 (W/g) 分别为 10:1、20:1、30:1、40:1、50:1、60:1 于 0.1 MPa (121°C) 的饱和蒸汽中保压作用 2 min 后测虾青素和类胡萝卜素的提取率, 结果如图 4 所示。当液料比为 30:1~50:1 时, 破壁后虾青素和类胡萝卜素的提取率相对较高, 再增加液料比会有

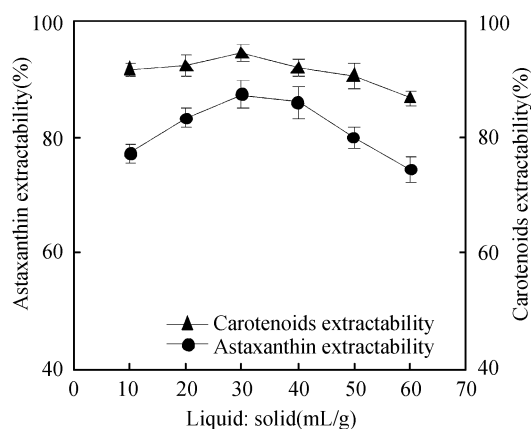


图4 液料比对法夫酵母高温湿热酸法破壁的影响
Fig. 4 Effects of liquid to material ratio on cell disruption of *Phaffia rhodozyma* by hydrochloric acid

所降低, 但影响相对较小。因此, 高温湿热酸法破壁工艺控制液料比在 30 mL/g 比较合适。

2.1.4 破壁时间对虾青素提取率的影响

高温高压条件下, 酸作用于酵母细胞壁时间的长短是影响破壁效果的重要因素。因此为获得短时高效的破壁效果, 我们对高温高压作用时间进行了优化。在其它条件相同的情况下, 装入液料比 30 mL/g 干重的菌悬液 (含 0.5 mol/L 盐酸) 于破壁装置中, 分别在 0.1 MPa (121°C) 的饱和蒸汽中保压作用 1、2、5、10 min 后测虾青素和类胡萝卜素的提取率。如图 5 所示, 在 0.1 MPa 的饱和蒸汽条件下, 保压作用 1~5 min 时, 虾青素与类胡萝卜素的提取率分别达到最大, 最大值分别为: (87.8 ± 3.2)%、(95.6 ± 3.7)%。而保压时间超过 5 min 后, 虾青素与类胡萝卜素的提取率均下降。高温长时作用于已破壁的法夫酵母菌体也会造成虾青素的极大降解, 当保压作用时间增到 10 min 时, 虾青素和类胡萝卜素破壁后的提取率已分别降至 (66.3 ± 1.8)%、(87.6 ± 2.8)%。同样对作用于法夫酵母不同时间后的虾青素提取率在 $P < 0.05$ 水平上进行方差分析, 结果显示保压作用时间为 2 min 的提取率差异显著。为获得短时高效的破壁工艺, 高温饱和蒸汽保压作用时间应控制在 2 min 为宜。

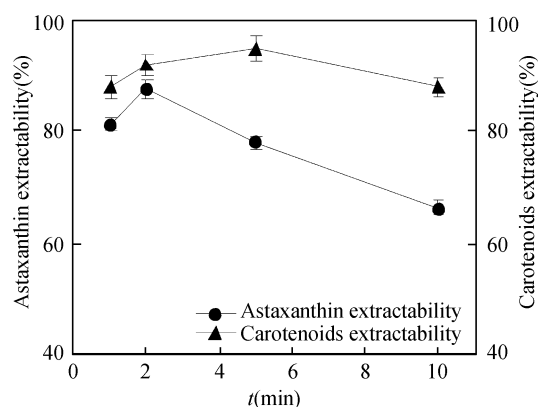


图5 破壁时间对法夫酵母高温湿热酸法破壁的影响
Fig. 5 Effects of disrupting time on cell disruption of *Phaffia rhodozyma*

综合上述实验结果, 确定法夫酵母高温湿热酸法破壁提取虾青素的最佳工艺条件为: 饱和蒸汽压力为 0.1 MPa (121°C), 盐酸浓度 0.5 mol/L, 破壁液料比 30 mL/g (V/W), 破壁时间 2 min。

2.2 扫描电子显微镜分析

取经高温湿热酸法最佳破壁工艺处理与其他破

壁工艺处理后的法夫酵母菌体用扫描电子显微镜比较观察酵母细胞结构变化。如图 6a 所示, 在破壁处理前法夫酵母细胞形状较规则且完整, 细胞呈椭圆形, 细胞直径为 $5\ \mu\text{m}$ 左右, 有的细胞还处于芽殖状态。经过高温湿热酸法处理后的法夫酵母菌体细胞破坏非常严重, 细胞呈蜂窝状排列, 各种细胞器较为混乱(图 6b), 并且, 该方法处理后非常有利于用有机溶剂对其胞内虾青素进行浸提。类似常温酸法^[15]与碱法^[13]处理本次实验所用法夫酵母菌体(图 6c, d), 只能对部分法夫酵母菌体细胞壁进行破坏, 而且破坏并不完全, 同时, 用有机溶剂也不能对菌体胞内虾青素进行有效浸提。与常温酸法和碱法相比较, 法夫酵母细胞在高温酸性条件下短时作用后, 所有菌体的细胞壁可更为有效地被破坏。

2.3 中试试验

以优化的破壁工艺条件, 在原来规模上放大 300~500 倍进行中试实验(表 2)。为考察工艺的稳定性, 实验做 5 个平行。称取 300 g (干重 81 g) 和 500 g (干重 135 g) 法夫酵母菌体分别加入 0.5 mol/L 盐酸至 2.5 L 和 4 L 于破壁装置中, 0.1 MPa (121°C) 的饱和蒸汽中保压作用 2 min 后测虾青素与总类胡萝卜素提取率。结果如表 2 所示, 300 g 菌体在 2.5 L 的酸液中经破壁处理后的虾青素与类胡萝卜素的提取率分别为 $(85.1\pm4.6)\%$ 、 $(94.5\pm3.2)\%$, 500 g 菌体处理后的提取率分别为 $(84.8\pm3.2)\%$ 、 $(93.3\pm2)\%$ 。经放大规模处理后, 虾青素和类胡萝卜素的提取率同样可以达到较高的水平, 而且相对标准偏差(R.S.D.)均小于 5%, 说明本工艺重复性强并可以适合较大规模进行, 对工业化提取生产虾青素具有很好的应用价值。

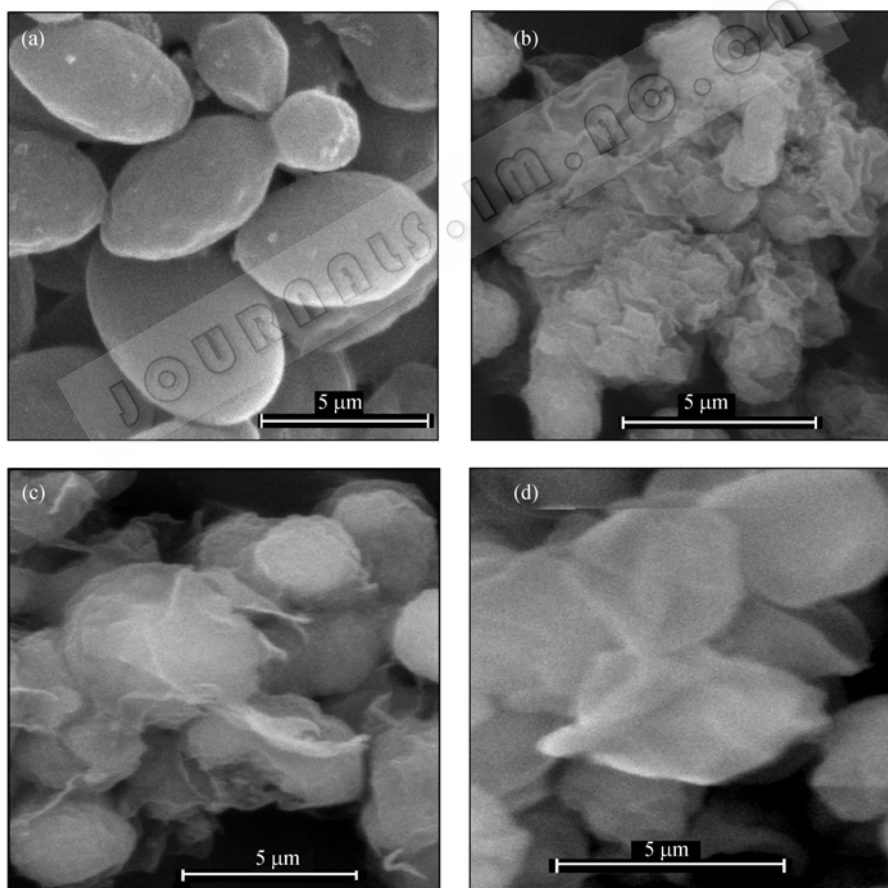


图 6 法夫酵母扫描电子显微镜图片($\times 10\ 000$)

Fig. 6 Scanning electron micrographs of *Phaffia rhodozyma* cells($\times 10\ 000$) before disrupting(intact)(a), treatment by acid method under autoclave conditions(b), treatment by acid method(c), treatment by base method(d)

表 2 法夫酵母细胞高温湿热酸法破壁中试实验结果

Table 2 The results of extracting astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* by acid method under autoclave conditions in medium scale

Sample No.		1	2	3	4	5	Mean \pm SD	R.S.D. (%)
300 g (2.5 L)	Astaxanthin extractability (%)	86.5	84.4	83.5	89.7	81.5	85.1 \pm 2.8	3.3
	Carotenoids extractability (%)	95.8	93.2	95.6	96.8	91.3	94.5 \pm 2	2.1
500 g (4 L)	Astaxanthin extractability (%)	82.6	88.5	79.6	85.5	87.7	84.8 \pm 3.2	3.9
	Carotenoids extractability (%)	94.4	95.5	90.3	91.6	94.8	93.3 \pm 2	2.2

3 讨论

许多不同的方法已被用来对法夫酵母细胞破壁处理提取虾青素,但多数方法的工业化应用前景并不理想,其主要原因有以下几点:(1)法夫酵母具有致密的细胞壁结构,有效破壁需要比较剧烈的条件;(2)虾青素分子结构不稳定,容易被氧化或降解;(3)虾青素作为饲料、食品或药品应用时,产品不得有残留毒性成分,产品安全性要求高。杨文等^[15]以 3 mol/L 盐酸加入到法夫酵母中沸水热处理 3 min 获得良好的破壁效果,但浓酸易对虾青素造成破坏而且后续工艺中不易去除,从经济方面考虑并不适用,类似的常温酸法处理本次实验用酵母破壁效果如图 6c 所示。陈晓明等^[13]用碱法对法夫酵母破壁获得了 70%~80% 的虾青素提取率,在碱性条件下,虾青素极易脱氢氧化形成虾红素,并且工艺条件不好控制,用类似碱法条件处理本次实验用法夫酵母效果如图 6d 所示,破壁效果并不是很好。Okagbue 等^[11]比较了不同的自溶条件对法夫酵母细胞破壁提取效果,酵母菌体在 pH 7.2 蒸馏水中,于 37°C 条件下保温作用 26 h,虾青素提取率为 78%,长时间保温作用使虾青素的降解严重。Okagbue 等^[12]还尝试将枯草芽孢杆菌(*Bacillus circulans*)与法夫酵母混合培养,利用枯草芽孢杆菌分泌的细胞壁溶解酶酶解酵母细胞壁,但发酵过程中法夫酵母虾青素的产率不高而且条件要求苛刻。利用二甲亚砜等有机溶剂进行破壁,提取效果虽然非常好,但是所用溶剂毒性较大,产品安全难以得到保障^[16]。

在本研究中,我们设计了一种高温耐酸装置,用低剂量酸结合高温湿热条件短时作用于酵母菌体。本实验所用的法夫酵母菌体胞内虾青素与总类胡萝卜素含量分别为:(918.1 \pm 2.8) μ g/g, (1118.2 \pm

3.3) μ g/g,在最优工艺条件下,中试实验的虾青提取率为(84.8 \pm 3.2)%,总类胡萝卜素的提取率为(93.3 \pm 2)%,并且工艺稳定性良好。Mendens-Pinto 等发现^[17],在隔绝氧气的条件下,高温湿热环境对雨生红球藻处理 30 min 可对细胞壁的某些成分的有效破坏,获得了较高的提取率。Storebakken 等也发现用 102~137°C 的循环饱和蒸汽作用于含有 45%~95% 破壁率的法夫酵母饲料 15~30 min,对胞内虾青素的稳定性影响不大^[19]。然而,前期研究发现(数据未发表),用类似的高温湿热方法处理法夫酵母并不能提取出虾青素,其原因可能是酵母细胞壁成分与藻类细胞不同。本实验改进了原有的法夫酵母破壁方法,所用的高温湿热条件辅以低剂量的盐酸能使细胞壁及细胞膜成分变性并对其进行有效降解(图 6b),同时,破壁装置中高温饱和蒸汽对氧气的去除以及短作用时间降低了不良环境下虾青素及其它类胡萝卜素的降解,故取得了良好的破壁提取效果。

在高温湿热酸法破壁工艺中,饱和蒸汽压力与盐酸浓度是影响虾青素及类胡萝卜素提取率的重要因素。高温饱和蒸汽的作用条件在大多数工厂都能满足,工厂可以根据实际需要设计不同规模的破壁设备。破壁所用的盐酸同其他有机酸相比不仅价格低廉、使用量少而且水洗容易除去,降低了经济成本,避免了环境污染。另外,在破壁过程中使用无毒副作用的乙醇为提取溶剂,可提取出卫生安全的天然虾青素满足食品及医药的应用需求,工业化应用前景良好。

REFERENCES

- [1] Miki W. Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure and Applied Chemistry*, 1991, **63**(1):

- 141–146.
- [2] Schroeder WA, Johnson EA. Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1995, **270**: 18374–18379.
- [3] Naguib YM. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, **48**(4): 1150–1154.
- [4] Ramírez J, Gutierrez H, Gschaedler A. Optimization of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through factorial design and response surface methodology. *Journal of Biotechnology*, 2001, **88**(3): 259–268.
- [5] Johnson EA, An GH. Astaxanthin from microbial sources. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1991, **11**(4): 297–326.
- [6] Jyonouchi H, Sun S, Iijima K, *et al.* Antitumor activity of astaxanthin and its model of action. *Nutrition and Cancer*, 2000, **36**(1): 59–65.
- [7] Dominguez-Bocanegra AR, Ponce-Noyola T, Torres-Munoz JA. Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* and *Haematococcus pluvialis*: a comparative study. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, **75**(4): 783–791.
- [8] Osterlie M, Bjerkeng B, Liaaen-Jensen S. Accumulation of astaxanthin all-*E*, 9*Z* and 13*Z* geometrical isomers and 3 and 3'*RS* optical isomers in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is Selective. *The Journal of Nutrition*, 1999, **129**: 391–398.
- [9] Bernhard, K. Synthetic astaxanthin. The route of a carotenoid from research to commercialization. *Carotenoids: Chemistry and Biology*, Krinsky NI *et al.* (editors), Plenum Press, New York, 1989, 337–364.
- [10] Johnson EA, Lewis MJ. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Journal of General Microbiology*, 1979, **115**: 173–184.
- [11] Okagbue RN, Lewis MJ. Autolysis of the red yeast *Phaffia rhodozyma*: a potential tool to facilitate extraction of astaxanthin. *Biotechnology Letters*, 1984, **6**: 247–250.
- [12] Okagbue RN, Lewis MJ. Mixed culture of *Bacillus circulans* WL-12 and *Phaffia rhodozyma* on different carbon sources: Yeast-wall lytic enzyme production and extractability of astaxanthin. *Biotechnology Letters*, 1983, **5**: 731–736.
- [13] Cheng XM, Xu XM, Jin ZY. Alkali breaking the cell wall of *Phaffia rhodozyma*. *Journal of Huaiyin Institute of Technology*, 2000, **9**(4): 104–105.
陈晓明, 徐学明, 金征宇. 法夫酵母的碱法破壁. 淮阴工学院学报, 2000, **9**(4): 104–105.
- [14] Ni H, He GQ, Wu GB, *et al.* Effects of disrupting conditions on extracting astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* by acid method. *Transactions of the CSAE*, 2005, **21**(3): 175–180.
倪辉, 何国庆, 吴光斌, 等. 酸法破壁条件对法夫酵母虾青素提取效果的影响. 农业工程学报, 2005, **21**(3): 175–180.
- [15] Yang W, Ji CM. A simple method for disrupting the cell wall. *Microbiology*, 1995, **22**(1): 58–59.
杨文, 吉春明. 一种简单的胞壁破碎方法. 微生物学通报, 1995, **22**(1): 58–59.
- [16] Ni H, He GQ, Wu GB, *et al.* Optimization of condition for extracting astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. *Transactions of the CSAE*, 2004, **20**(2): 204–208.
倪辉, 何国庆, 吴光斌, 等. 法夫酵母虾青素提取工艺的优化研究. 农业工程学报, 2004, **20**(2): 204–208.
- [17] Mendes-Pinto MM, Raposo MF, Bowen J, *et al.* Evaluation of different cell disruption processes on encysted cells of *Haematococcus pluvialis*: effects on astaxanthin recovery and implications for bio-availability. *Journal of Applied Phycology*, 2001, **13**: 19–24.
- [18] Meyer PS, Dupreez JC, Vandyk MS. The effect of monoterpenes on astaxanthin production by a mutant of *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnology Letters*, 1994, **16**(2): 125–128.
- [19] Størebakken T, Sørensen M, Bjerkeng B, *et al.* Stability of astaxanthin from red yeast, *Xanthophyllomyces dendrorhous*, during feed processing: effects of enzymatic cell wall disruption and extrusion temperature. *Aquaculture*, 2004, **231**: 489–500.