

文章编号 :1009 - 038X(2001)03 - 0252 - 05

高产类胡萝卜素红酵母的筛选及其发酵条件

王岁楼 , 张 鑫 , 卫 军 , 张鸿辉 , 李洪坤 , 梁婵娟
(郑州轻工业学院食品与生物工程系 , 河南郑州 450002)

摘 要 :通过对数株红酵母培养后发酵液中菌体生物量及类胡萝卜素含量的测定比较 ,从中选出了 1 株产类胡萝卜素能力较强的红酵母 RY-98 ,研究了该菌株产类胡萝卜素的最适碳源和氮源 ,并对其主要营养与环境条件进行了选择及优化 ,获得了最佳发酵条件 :葡萄糖 40 g/L、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 g/L、酵母膏 3 g/L、蕃茄汁 2 ml/L、花生油 0.5 ml/L、接种量 30 ml/L、初始 pH 6.0、250 mL 三角瓶中培养基装量为 40 mL。在此初步优化的培养条件下 ,红酵母 RY-98 经 72 h 摇瓶发酵 ,其生物量、类胡萝卜素含量和产量分别可达 26.8 g/L、386.9 $\mu\text{g/g}$ 和 10.4 mg/L ,依次比初筛中提高了 34.7%、15.6% 和 55.2%。

关键词 :类胡萝卜素 ;红酵母 ;发酵

中图分类号 :Q562

文献标识码 :A

Screening of *Rhodotorula* Producing Carotenoids and Its Fermentation Conditions

WANG Sui-lou , ZHANG Xin , WEI Jun , ZHANG Hong-hui ,
LI Hong-kun , LIANG Chan-juan

(Food & Biotechnology Department , Zhengzhou Institute of Light Industry , Zhengzhou 450002)

Abstract The *Rhodotorula* strain RY-98 with high carotenoids yield of 6.7 mg/L was obtained from 12 strains of yeasts by common screening test. The varied physiological conditions for carotenoids fermentation were studied by uniform design test method. The cell biomass , carotenoids content and yield from strain RY-98 could respectively reach 26.8 g/L , 386.9 $\mu\text{g/g}$ and 10.4 mg/L under selected optimum conditions. The optimum fermentation conditions for carotenoids production were as follows , glucose 40 g/L ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 g/L , yeast extract 3 g/L , tomato juice 2 mL/L , peanut oil 0.5 mL/L , medium 40 mL (in 250 mL flask) , initial pH 6.0 , inoculum size 30 mL/L and culture time 72 h (at 28 $^\circ\text{C}$, 150 r/min).

Key words : carotenoids ; *Rhodotorula* ; fermentation

类胡萝卜素(Carotenoids)是一类具有预防血管硬化、抑制肿瘤发生、增加宿主免疫力、抗氧化能力和抑制自由基产生等功能的物质 ,主要包括 β -胡

萝卜素、虾青素、叶黄素和蕃茄红素等。从植物和盐藻中提取天然类胡萝卜素受地域条件、原料来源、提取率等限制 ,生产成本较高。利用微生物技术生

收稿日期 2000 - 11 - 08 ,修订日期 2001 - 03 - 05。

基金项目 :河南省杰出青年科学基金项目(80121)及河南省自然科学基金项目(994012500)资助课题。

作者简介 :王岁楼(1961 -) ,男 ,陕西宝鸡人 ,工学硕士 ,副教授。

产天然类胡萝卜素的主要菌种为三孢布拉霉(*Blakeslea trispora*)和红酵母(*Rhodotorula*),前者已处于产业化开发研究阶段,后者尚处于实验室小试研究阶段.一般认为,采用红酵母生产类胡萝卜素,虽然其色素生产水平目前较三孢布拉霉低许多,但红酵母营养要求简单、培养周期短、菌体可综合利用、发酵过程易于产业化,具有很高的应用价值和开发前景^[1].但目前国内对红酵母类胡萝卜素的研究主要集中在色素的提取及鉴定等方面,对菌种筛选、育种及其类胡萝卜素形成的生理学条件等则缺少深入研究.作者报道了对红酵母类胡萝卜素高产菌株 RY-98 的筛选及其发酵生理学条件的研究结果.

1 材料与方法

1.1 菌种

红酵母菌株 作者所在实验室收集、分纯和保存.

1.2 菌种筛选培养基

斜面活化培养基 :3° Be 麦芽汁固体培养基 ;液体种子培养基 :葡萄糖 2% ,蛋白胨 1% ,酵母膏 1% ,自然 pH 值 ;液体发酵培养基 :葡萄糖 4% ,蛋白胨 1% ,酵母膏 1% ,调 pH 6.0.

1.3 培养和筛选方法

将各待试菌株从保存斜面移接到斜面活化培养基上,28℃培养 48 h 之后,挑 2 环接入装有 30 mL 液体种子培养基的 250 mL 三角瓶中,28℃振荡培养 24 h,然后按 5% 的接种量接入装有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中,于 28℃振荡(150 r/min)培养 72 h.发酵结束后经离心收集菌体并测定生物量和类胡萝卜素含量,根据单位体积发酵液的类胡萝卜素产量确定高产菌株.

1.4 最佳生理条件测试方法

先按单因素试验法选择适宜的碳、氮源,然后按均匀设计试验方法^[2],对影响红酵母生长及类胡萝卜素合成的各种营养与环境条件进行系统测试.

1.5 细胞生物量测定

将发酵液转入离心杯中,以 3 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,沉淀水洗后再次离心,所得酵母泥于 55℃烘干称重.

1.6 类胡萝卜素的抽提与测定

按文献[3]所述方法进行,结合具体情况略有改动.干菌体经盐酸—热处理法破壁后,以丙酮抽提类胡萝卜素.粗提液用 721 型分光光度计在 475

nm 处测定吸光度,计算出类胡萝卜素含量.

1.7 残糖和 pH 测定

残糖用斐林氏法测定,pH 用笔式酸度计测定.

2 结果与讨论

2.1 菌种筛选及结果

按材料和方法中所述,对待筛选的 12 株红酵母进行发酵培养并分别测定生物量和类胡萝卜素含量及产量,其结果列于表 1.从此表可知,除 RY-2、RY-4、SY-1 和 SY-3 4 株酵母在所试条件下类胡萝卜素产量较低外,其它酵母产类胡萝卜素能力均较强.其中,RY-98 菌株不仅生物量高,而且类胡萝卜素含量也高,故单位体积发酵液产量提高.因此,筛选结果把 RY-98 视为类胡萝卜素高产菌株.

表 1 菌种筛选试验结果

Tab.1 The screening results of strains producing carotenoids

菌种	生物量/ (g/L)	类胡萝卜素质 量分数/(μg/g)	类胡萝卜素质 量浓度/(mg/L)
RY-1	18.8	255.8	4.8
RY-2	8.4	169.6	1.4
RY-3	18.6	286.9	5.3
RY-4	11.4	207.2	2.4
RY-98	19.9	334.8	6.7
RY-981	18.5	324.7	6.0
RY-982	16.2	315.7	5.1
RY-99	14.8	368.6	5.5
RY-991	16.6	359.2	6.0
SY-1	10.6	224.6	2.4
SY-2	23.6	246.8	5.8
SY-3	8.8	320.3	2.8

另外,从育种角度讲,把生物量较高而类胡萝卜素含量较低的菌株 SY-2 与类胡萝卜素含量较高而生物量较低的菌株 RY-99,通过原生质体融合技术或基因工程技术,构建菌体生长快且类胡萝卜素含量高的新菌株,将是今后努力的一个方向.

2.2 碳源和氮源的选择

从表 2 可知,除淀粉不能利用外,常见碳源如葡萄糖、麦芽糖和蔗糖均是红酵母 RY-98 生长及类胡萝卜素合成的良好碳源,但考虑到生产成本和原料来源(大生产中葡萄糖可用淀粉水解液代替),选葡萄糖作为最佳碳源.在所试 4 种氮源中,蛋白胨和酵母膏效果最好((NH₄)₂SO₄ 和酵母膏次之,但后者成本较低,故选(NH₄)₂SO₄ 和酵母膏作为最佳氮源.

表 2 不同碳、氮源对生物量和类胡萝卜素合成的影响
Tab. 2 The effects of carbon and nitrogen sources on the carotenoids fermentation

碳源	生物量/ (g/L)	色素质量浓度/ (mg/L)	氮源	生物量/ (g/L)	色素质量浓度/ (mg/L)
葡萄糖	21.3	7.1	蛋白胨	20.6	6.1
麦芽糖	18.9	6.2	(NH ₄) ₂ SO ₄	11.8	3.2
蔗糖	23.2	7.4	蛋白胨 + 酵母膏	22.4	7.3
可溶性淀粉	3.6	0.46	(NH ₄) ₂ SO ₄ + 酵母膏	19.6	6.8

2.3 最佳发酵生理学条件试验

影响红酵母类胡萝卜素发酵的因素很多^[4,5],除碳源、氮源外,还有发酵助剂(蕃茄汁、花生油等)及通气量(培养基装量)等环境条件.为了以较少的试验量得到较佳的发酵生理学条件,采用比正交设计更简洁的均匀设计试验法^[2],各因素及水平的选取见表 3,试验结果与分析见表 4.本实验为 8 因素 3 水平,所使用的均匀设计表是作者根据 10 因素 11 水平的均匀设计表 $U_{11}(11^{10})$ 演化而来.

由表 4 可知,各因素对红酵母生物量、类胡萝卜素含量和产量的影响不尽一致,但不难发现,单

位体积发酵液产类胡萝卜素的最优条件组合(参见图 1)正好与均匀设计试验中第 5 号试验的条件组合相同,可见在该条件下生物量、类胡萝卜素含量和产量的平均值分别可达 26.8 g/L、386.9 μg/g 和 10.4 mg/L,依次比初筛中提高 34.7%、15.6% 和 55.2%.由此可知,设法提高红酵母生物量(如通过高密度培养技术等),是比提高菌体类胡萝卜素含量更有效的措施,后者也许只有通过定向育种的生物学途径才能有所突破.

表 3 均匀设计试验各因素及水平
Tab.3 The factors and levels of uniform design test

因 素	水 平		
	1	2	3
酵母膏质量浓度 $A/(g/L)$	2	3	4
接种量体积分数 $B/(mL/L)$	10	20	30
蕃茄汁体积分数 $C/(mL/L)$	1	2	3
培养基装量体积分数 $D/(mL/L)$	240	200	160
花生油体积分数 $E/(mL/L)$	0.5	1.0	1.5
pH 值 F	5.0	5.5	6.0
葡萄糖质量浓度 $G/(g/L)$	40	30	20
(NH ₄) ₂ SO ₄ 质量浓度 $H/(g/L)$	5	10	15

表 4 均匀设计试验方案及结果分析
Tab.4 The results of uniform design test

试验号	试验条件								生物量/	质量分数/	质量浓度/
	A	B	C	D	E	F	G	H	(g/L)	(μg/g)	(mg/L)
1	1	1	1	2	2	2	3	1	18.6	397.8	7.4
2	1	2	2	3	2	1	1	3	21.2	363.5	7.7
3	1	2	3	1	2	3	2	3	14.7	326.4	4.8
4	2	3	1	2	3	1	2	3	18.2	299.1	5.4
5	2	3	2	3	1	3	1	2	26.8	386.9	10.4
6	2	1	3	1	3	1	3	2	24.2	352.6	8.5
7	3	1	3	2	1	3	2	2	22.7	289.9	6.6
8	3	2	1	3	3	2	1	1	25.6	316.8	8.1
I /3	18.2	21.8	20.8	20.8	24.3	21.2	24.5	22.5	$\overline{\mu} = 21.7$	347.7	7.6
II /3	23.1	20.5	23.8	19.8	18.2	22.5	18.5	24.6			
III /3	23.9	22.8	20.5	24.5	22.7	21.4	22.1	18.0			
R	5.7	2.3	3.3	4.7	6.1	1.3	6.0	6.6	$A_3B_3C_2D_3E_1F_2G_1H_2$ $R_H > R_E > R_G > R_A > R_D > R_C > R_B > R_F$		
I /3	362.4	246.8	337.9	358.5	357.7	338.4	355.7	370.3			
II /3	346.2	335.6	382.3	328.9	362.6	370.3	305.1	343.1			
III /3	334.4	360.8	323.0	355.7	322.8	334.4	382.3	329.7			
R	28.0	25.2	59.3	29.6	39.8	35.9	77.2	40.6	$A_1B_3C_2D_1E_2F_2G_3H_1$ $R_G > R_C > R_H > R_E > R_F > R_D > R_A > R_B$		
I /3	6.6	7.5	7.0	7.5	8.8	7.2	8.7	8.3			
II /3	8.1	6.9	9.1	6.5	6.6	8.3	5.6	8.5			
III /3	8.0	8.4	6.6	8.7	7.3	9.7	8.4	6.0			
R	1.5	1.5	2.5	2.2	2.2	2.5	3.1	2.5	$A_2B_3C_2D_3E_2F_3G_1H_1$ $R_G > R_C = R_F = R_H > R_D > R_E > R_A = R_B$		

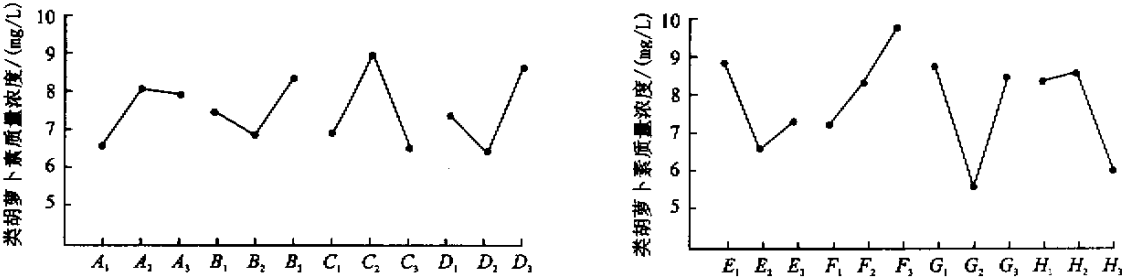


图 1 各因素对类胡萝卜素产量的影响趋势

Fig.1 The effects of different factors on carotenoids fermentation

2.4 光照对类胡萝卜素形成的影响

为考察光照对红酵母生长及类胡萝卜素合成的影响,采用 2 种光照条件不同的摇床进行培养.结果表明,光照能显著促进类胡萝卜素的形成,这可能是由于光照促进了类胡萝卜素前体物质及双键的形成而引起的.同时,光照对生物量也有一定的影响,但并不显著.与色素形成所需条件相比,细胞生长所需条件要宽松些^[4],所以在采用红酵母进

行类胡萝卜素发酵时应优先满足产物形成的条件,大生产时可考虑使用玻璃钢罐.

2.5 发酵过程动态分析

为揭示发酵全过程中各个因素之间的动态变化规律和相互关系及选择最佳发酵周期,按前面均匀设计试验中所选定的各项条件,一次配料接种进行摇瓶发酵,定时随机重复取样进行分析测定,结果见图 2 所示.

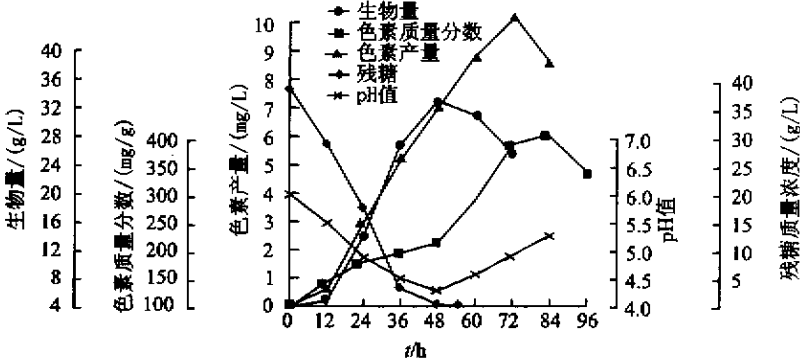


图 2 发酵过程动态曲线

Fig.2 The analysis of fermentation course

由图 2 可见,随着发酵的进行,细胞生物量、类胡萝卜素质量分数和产量均呈均增加趋势,但依次在 48 h、84 h 和 72 h 时达到最高值,同时酵母对糖的利用经 48 h 基本结束.如用肉眼观察,发酵液在 24 h 前呈浅黄色,24 h 后逐渐转红,且越来越红.这说明,类胡萝卜素是红酵母的次级代谢产物,对数生长后期和稳定期开始形成,但大量形成于生长期结束和营养耗完时.发酵液 pH 值呈先下降后回升的趋势,可能是由菌体生长、自溶作用及产物氧化等所引起的.综合考虑各项指标,作者选定 72 h 为最佳发酵周期,过长或过短对产量和产物提取均不利.

2.6 类胡萝卜素的定性测定

将红酵母 RY-98 菌体细胞经酸热法破壁并经丙酮浸提所得的粗提液与 β -胡萝卜素标准品的丙酮浸提液,分别用紫外可见分光光度计在 200 ~ 600

nm 波长下扫描,发现其最大的 2 个吸收峰波长前者为 475 nm 和 370 nm,后者为 460 nm 和 345 nm,可见该红酵母所产类胡萝卜素是以 β -胡萝卜素为主要成份.

3 结 论

1) 通过测定菌株生物量和类胡萝卜素含量,从数株红酵母中筛选出了一株产类胡萝卜素能力较强的菌株 RY-98,其类胡萝卜素产量为 6.7 mg/L.

2) 通过对主要营养与环境条件的选择及优化,特别是采用均匀设计试验法,初步确定了该菌株类胡萝卜素发酵的最佳生理条件,使其类胡萝卜素产量可提高到 10.4 mg/L,比初筛中产量增加了 55.2%.

3) 通过观测发酵过程生理现象的变化,认为该

菌株所产类胡萝卜素是菌体的次生代谢产物 ,并选定其最佳发酵周期为 72 h.

参考文献：

[1]王岁楼.利用红酵母发酵生产 β -胡萝卜素的研究进展 [J].微生物学杂志 ,2000 ,20(2) :41 ~ 43.
[2]木维宣主编.试验设计方法 [M].大连 :大连海事大学出版社 ,1995.
[3]杨 文.一种简单的胞壁破碎方法 [J].微生物学通报 ,1995 ,22(1) :58 ~ 59.
[4]杨 文.影响红酵母产胡萝卜素的因素 [J].食品工业科技 ,1997 (5) :14 ~ 15.
[5]王岁楼.红酵母类胡萝卜素发酵研究 [J].郑州轻工业学院学报 ,2000 ,15(2) :3 ~ 7.

(责任编辑 朱 明)

(上接第 251 页)

[5]JUN-ichi Koizumi ,MINORU Takeda ,RYUICHIRO Kurane ,*et al.* Synergetic flocculation of the bioflocculant FIX extracellularly produced by *Nocardia amara*[J]. **J Gen Appl Microbiol** ,1991 ,37 :447 ~ 454.
[6]吕向红.微生物絮凝剂 [J].化工环保 ,1995 ,15(4) :211 ~ 218.
[7]HIROAKI Takagi ,KIYOSHI Kadowaki. Flocculant Production by *Paecilomyces* sp. Taxonomic Studies and Culture Conditions for Production[J]. **Agric Biol Chem** ,1985 ,49(11) :3151 ~ 3157.
[8]陈宗淇 ,戴闽光.胶体化学 [M].北京 :高等教育出版社 ,1984.
[9]LEVY N ,VAR-OR Y ,MAGDASSI S. Flocculation of Bentonite Particles by a Cyanobacterial Bioflocculan[J]. **Colloids and Surfaces** ,1990 ,48 :337 ~ 349.
[10]JIN S ,GI S ,SANG O L ,*et al.* Bioflocculant Produced by *Aspergillus* sp. JS-4[J]. **Biosci Biotech Biochem** ,1996 ,60(2) :325 ~ 327.

(责任编辑 朱 明)