# 胡萝卜素产生菌粘红酵母 ZR-5 的培养优化条件研究

张博润　寇运同*　刘玉方
(中国科学院微生物研究所，北京　100080)

**摘要**　本文报道胡萝卜素产生菌粘红酵母(*Rhodotorula glutinis*) ZR-5 的培养优化条件。结果表明培养基组分、糖浓度、通气量、培养时间、培养基起始 pH 值等对该菌细胞生物量和胡萝卜素含量均有影响。在确定的优化条件下，细胞生物量为 27.7mg 干重/ml 培养基；胡萝卜素含量为 375μg/g 干重细胞。

**关键词**　粘红酵母，胡萝卜素，生物量，培养优化条件

胡萝卜素 (Carotene) 是一种桔红色的脂溶性物质，它存在于植物的花、果实及根部，在真菌和细菌中也存在胡萝卜素。胡萝卜素 (特别是 β-胡萝卜素)是人体内代谢过程中维生素 A 的前体，因此它在食品工业中应用甚广。此外，经近年来临床研究证明，β-胡萝卜素能在人体内遏制各种强力致癌的化学物质，从而可以阻止多种癌细胞的形成。由于胡萝卜素具有食品着色、增补营养及保健等功能，被广泛用作饮料、食品及饲料添加剂。

胡萝卜素的来源有三种途径：一是从天然果实或蔬菜中提取，但成本高、价格贵、工艺复杂、受季节限制及着色力差。二是化学合成，尽管成本低，但其合成的胡萝卜素含顺反两种构型；生物活性低，加之毒性问题越来越受到人们的关注，不少国家已先后制定了一系列限制使用化学合成食用色素的法规，如挪威已禁止使用化学合成食用色素。我国也已于 1991 年作出了化学合成食用色素的定点生产及婴儿代乳品不得使用化学合成色素的有关规定。三是生物合成，国外已有不少有关利用微生物发酵产生胡萝卜素的报道[1-5]。国内有关这方面的报道不多[6]。本文报道胡萝卜素产生菌粘红酵母 ZR-5 的培养优化条件研究结果。

## 1　材料和方法

### 1.1　实验菌株

经对收集到的 20 多株不同种的红酵母进行比较实验，选出生物量较高、胡萝卜素含量也高的粘红酵母 (*Rhodotorula glutinis*) ZR-5 作为实验菌株。

### 1.2　培养基(%)

麦芽汁培养基：10Be′ 麦芽汁，自然 pH。

YEPD 培养基：葡萄糖 4，蛋白胨 1，酵母粉 1，自然 pH。

YEPS 培养基：用蔗糖(食用白糖，下同)取代葡萄糖，其余同 YEPD。

YEPH 培养基：用水解糖 8 (含糖量 75%) 取代葡萄糖，其余同 YEPD。

CM　培养基：甘蔗糖蜜 10 (含糖量 48%)，$(NH_4)_2SO_4$ 0.5，$H_3PO_4$ 0.1，pH 6.0。

BM　培养基：甜菜糖蜜 10 (含糖量 46%)，其余同 CM。

以上培养基均用自来水配制，$0.8 \times 10^5$Pa 灭菌。

### 1.3　细胞培养

菌种在 YEPD 斜面上活化后，接一环到装有10ml YEPD 培养基的大试管中，28℃摇床培养 20h，以 5%接种量接入不同组分的培养基 (50ml/250ml 三角瓶)，28℃摇床培养 20h，再以 10%接种量接入相应组分的培养基，28℃摇床培养到适当时间。

### 1.4　细胞生物量测定

* 四川联合大学生物工程系代培硕士研究生
1994-08-28 收稿

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

5000r/min 离心 10min 收集菌体，用自来水洗两次，压榨后置 50℃左右烘干称重。

### 1.5 胡萝卜素的提取

按杨文等[6]报道的方法，稍作改进：1g 菌体加 5ml 3mol/L HCl，室温振荡浸泡 1h，在沸水中煮 4 min，迅速冷却，5000 r/min 离心 10min，水洗两次，1g 菌体加 3ml 丙酮，室温下振荡 30min 提取胡萝卜素，然后 5000r/min 离心 20min，得胡萝卜素浸提液，再用氯仿萃取，使之浓缩，真空干燥得胡萝卜素。

### 1.6 胡萝卜素含量测定

将胡萝卜素浸提液适当稀释，在 475nm 处测定吸光度，按下式[6]计算胡萝卜素含量。

$$\text{胡萝卜素含量}(\mu g/g\ \text{菌体}) = \frac{A\lambda max \times D \times V}{0.16 \times W}$$

（式中：$A\lambda max$ ═ 胡萝卜素最大吸收波长处的吸光度；V ═ 提取所用溶剂量 (ml)；D═测定试样的稀释倍数；W ═ 酵母菌体重量(g)；0.16═胡萝卜素的克分子消光系数。）

## 2 结果和讨论

### 2.1 培养基对细胞生物量和胡萝卜素的影响

**2.1.1** 不同培养基的影响：酵母菌通常在麦芽汁或 YEPD 培养基中生长良好，胡萝卜素的含量也较高，但这两种培养基成本较高。为了降低成本，有利于生产，我们首先选用了六种培养基进行比较。

表 1 不同培养基对细胞生物量及胡萝卜素含量的影响

| 项目 / 结果 / 培养基 | 生物量 (mg 干重细胞/ml 培养基) | 胡萝卜素含量 (μg/g 干重细胞) |
|---|---|---|
| 麦芽汁 | 28.2 | 319.20 |
| YEPD | 28.3 | 328.13 |
| YEPS | 28.0 | 328.13 |
| YEPH | 27.4 | 205.25 |
| CM | 21.3 | 218.75 |
| BM | 20.0 | 171.88 |

从表 1 中可以看出，六种培养基对细胞生物量和胡萝卜素含量均有不同影响，考虑成本和提取等因素，选用 YEPS 进行以下研究。

**2.1.2** 不同糖浓度的影响：取糖浓度为 2—12%的 YEPS 培养基培养收集菌体后，测定生物量和胡萝卜素含量，结果表明 6% 的糖浓度时，细胞生物量最高；当糖浓度为 4%时，胡萝卜素含量最高(图 1A)。

**2.1.3** 不同氮浓度对细胞生物量和胡萝卜素含量的影响：确定蔗糖浓度为 4%，用不同浓度的硫酸铵或尿素取代蛋白胨，试验结果如图 1B 所示，从图中可以看出加 0.4%的硫酸铵时细胞生物量最高，加 0.2%的硫酸铵时，胡萝卜素含量最高，添加尿素时也呈现类似现象。

**2.1.4** 玉米浆浓度对细胞生物量和胡萝卜素含量的影响：根据以上结果，确定蔗糖浓度为 4%、硫酸铵为 0.4%，再添加不同浓度的玉米浆进行试验，结果表明，添加 2%玉米浆为佳(图 1C)。

根据以上实验结果，综合成本、细胞生物量、胡萝卜素含量及有利于提取等因素考虑，确定采用蔗糖 4%，$(NH_4)_2SO_4$ 0.4%，玉米浆 2%的培养基继续进行以下的实验。

### 2.2 通气量的影响

根据我们以往的实验结果[7]，通气量对细胞生物量影响显著，但对细胞胡萝卜素含量的影响还不清楚。实验表明(图 1D) 通气量不仅对细胞生物量影响显著，对胡萝卜素含量影响也很大。

### 2.3 培养基起始 pH 的影响

酵母菌一般在中性偏酸条件下生长良好，但培养基的 pH 变化对细胞胡萝卜素含量有无明显影响，还未见详细报道。选用培养基起始 pH 在 4.0—7.0 时进行细胞培养。结果表明起始 pH 以 5.0—6.0 为宜，此时细胞生物量和胡萝卜素含量都高(图 1E)。

### 2.4 培养时间的影响

采用上述培养基，培养基起始 pH 6.0，装液量为 50ml/500ml 三角瓶，往复式摇床 (220 r/min)，28℃培养，每隔 24h 取样测定细胞生物量和胡萝卜素含量。结果表明 (图 1F) 当培养到 72h 时，细胞生物量达最高值；当培养到

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

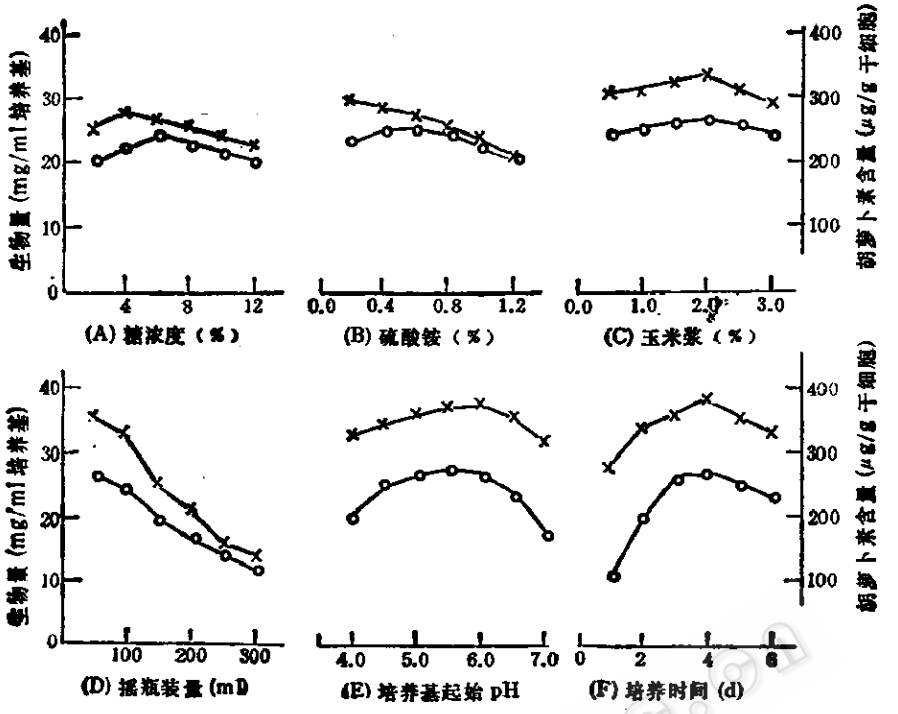


图 1　不同条件对粘红酵母 ZR-5 的生物量及胡萝卜素含量的影响
O－O生物量，×－×胡萝卜素

96h 时，胡萝卜素含量最高；如继续培养，细胞生物量和胡萝卜素含量均呈现降低趋势。

综上所述，初步确定了胡萝卜素产生菌粘红酵母 ZR-5 的摇瓶培养优化条件：培养基组分为蔗糖 4%，$(NH_4)_2SO_4$ 0.4%，玉米浆 2%，pH 6.0，摇瓶装量为 50 ml/500 ml 三角瓶，培养周期 4 d，在此条件下，细胞生物量达 27.7 mg 干重/ml 培养基，接近用麦芽汁、YEPD、YEPS 三种培养基作对照所获得的生物量；细胞胡萝卜素含量达 375 μg/g 干细胞，高于麦芽汁、YEPD、YEPS 培养的细胞的胡萝卜素含量。具有实际应用前景。

## 参 考 文 献

[1] Ciegler A. Adv Appl Microbiol, 1965,7:1—34.
[2] Liaaen-Jensen S, Andrewes A G. Annu Rev Microbiol, 1972, 26:225—248.
[3] Goliakov P N, Tikhonova T A. Mikol Fitopatol, 1975, 9:193—199.
[4] Perlman D.In:Primary products of metabolism. Economic Microbiology. Rose A H. (ed). London, New York: Academic Press. 1978, Vol. 2, 303—326.
[5] Schwarz Y, Margalith P. Appl Microbiol, 1965, 13:876—881.
[6] 杨文，刘炯，吴晨曦，等. 食品与发酵工业，1993，4：24—28.
[7] 张博润，黄英，田宇清，等. 微生物学通报，1994，4：21—24.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn