

红酵母 COS-5产胡萝卜素条件的研究

刘月英 潘丽娉 何国荣 李仁忠

(厦大学生物学系 厦门 361005)

摘要 研究碳源、氮源和添加剂对红酵母(*Rhodotorula* sp.) COS-5产胡萝卜素的影响,并通过正交试验优化其产胡萝卜素的培养基组成。结果表明,COS-5产胡萝卜素的适宜培养基:蔗糖 50g、蛋白胨 5g、酵母膏 5g、桔子皮 15g、盐酸硫胺素 0.002g,定容 1L, pH6.0。250mL三角瓶装培养基 30mL。在上述条件下 28℃振荡培养 96h,细胞生物量为 27.5mg 干重 / mL 发酵液,胡萝卜素含量达 492.7 μ g / g 干重细胞。COS-5 胡萝卜素在 474.4nm、338.6nm 和 310.2nm 处有吸收峰,色素的主要成份为 β -胡萝卜素。

关键词 红酵母,胡萝卜素,正交试验

分类号 Q936, **文献识别码** A, **文章编号** 0253-2654 (1999)-03-0194-198

1998-06-11收稿,98-09-15修回

STUDIES ON CONDITIONS OF CAROTENE PRODUCTION BY *RHODOTORULA* SP. COS-5

Liu Yueying Pan Liping He Guorong Li Renzhong

(Department of Biology, Xiamen University, Fujian Xiamen, 361005)

Abstract Effect of carbon source, nitrogen source and additives on carotene production of strain *Rhodotorula* sp. COS-5 were investigated. The compositions of medium were optimized with orthogonal test. The results showed that the optimal medium was as follows (g/L): sucrose 50, peptone 5, yeast extract 5, orange skin 15, thiamine 0.002, initial pH6.0. The optimal medium volume in 250 mL flask was 30 mL. 27.5 mg dry cell / mL medium and 492.7 μg carotene / g dry cell were produced by strain COS-5 with above-mentioned conditions after growing at 28 $^{\circ}\text{C}$ for 96h. Carotene produced by strain COS-5 has absorption peaks at 474.4 nm, 338.6 nm and 310.2 nm. The major component of pigment of COS-5 is β -carotene.

Key words *Rhodotorula*, Carotene, Orthogonal test

胡萝卜素以其营养、药用和保健的作用及纯天然的色泽,已被广泛用作饮料、食品、化妆品和饲料添加剂。目前国内外用微生物生产胡萝卜素的研究主要集中在丝状真菌和红酵母^[1-3]。为了开发利用胡萝卜素,从椰子油污染的土壤分离筛选获得一株产胡萝卜素的红酵母 COS-5。利用红酵母产胡萝卜素,虽然总色素量及 β -胡萝卜素的含量都比三孢布拉霉菌低得多,但它具有成本较低、便于工业化生产、菌体可综合利用等优点。因此,研究红酵母生产胡萝卜素具有应用价值和开发前景,本文报道红酵母 COS-5 产胡萝卜素条件的优化结果。

1 材料与方 法

1.1 培养基与培养条件

1.1.1 斜面培养:培养基为饴糖 50g,酵母膏 5g,琼脂 18, g 定容 1L, 自然 pH。28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24h。

1.1.2 液体种子培养:培养基为蔗糖 40g,蛋白胨 10g,酵母膏 10g,定容 1L,自然 pH。250mL 三角瓶装培养基 30mL, 28 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 20h,

1.1.3 摇瓶发酵:基础培养基为蔗糖 40g,蛋白胨 10g,酵母膏 10g,定容 1L, pH6.0。250mL 三

角瓶装培养基 50mL, 接液体种子 5%, 28 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 96h。

1.2 测定方法

1.2.1 胡萝卜素的抽提:按张博润等^[1]报道的方法稍加修改。取发酵液 2.0mL 离心 (3500r / min, 10min) 得菌体, 加入 3mol / L HCl 3mL 于室温振荡浸泡 1h, 沸水浴加热 4min, 迅速冷却, 3500r / min 离心 10min 弃上清液。沉淀用蒸馏水洗涤后加入 3mL 丙酮, 室温振荡 30min, 离心得上清液为胡萝卜素提取液。

1.2.2 胡萝卜素的定量测定:按张博润等^[1]报道的方法测定, 计算公式稍作改变, 即式中 W 为提取所用的发酵液体积, 胡萝卜素含量以 μg / mL 发酵液表示。

1.2.3 胡萝卜素的光谱分析:用 UV-2100 紫外可见分光光度计在 200~600nm 波长扫描。

1.2.4 细胞生物量:以菌体干重计。

1.2.5 残糖的测定:用苯酚硫酸法^[6]。

2 结果与讨论

2.1 COS-5产胡萝卜素条件的优化

2.1.1 碳源的影响:据报道添加植物油有利于胡萝卜素的产生^[2-3]。用 40g / L 葡萄糖、40g / L 蔗糖和 30g / L 蔗糖 + 10g / L 花生油作碳源以

及用 30g / L 蔗糖 + 10g / L 花生油作碳源并添加 1g / L 吐温 80 的基础培养基试验, 结果胡萝卜素的产量分别为 5.74、5.51、5.05 和 4.86 $\mu\text{g} / \text{mL}$, 即以 30g / L 蔗糖 + 10g / L 花生油作碳源, 不管是否添加吐温 80 胡萝卜素产量均较低。用蔗糖作碳源的产量虽比用葡萄糖的低些, 但蔗糖来源丰富, 价格较低, 因此进一步试验选用蔗糖作碳源。

2.1.2 氮源的影响: 用 40g / L 蔗糖为碳源, 以 10g / L 酵母膏 + 10g / L 蛋白胨、10g / L 酵母膏、50g / L 玉米浆、10g / L 蛋白胨、10g / L 酵母膏 + 5g / L 硫酸铵和 10g / L 酵母膏 + 5g / L 尿素作氮源, 胡萝卜素的产量分别为 5.67、4.69、4.41、3.66、2.44 和 2.10 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 。结果表明: 用 10g / L 酵母膏和 10g / L 蛋白胨混合作氮源, 胡萝卜素的产量最高; 以 10g / L 酵母膏加 5g / L 硫酸铵或 5g / L 尿素作氮源, 胡萝卜素的产量都比仅以 10g / L 酵母膏为氮源的低得多, COS-5 的这一特性与粘红酵母 ZR-5 不同^[1], 后者添加硫酸铵或尿素有利于胡萝卜素的合成。说明不同种或不同菌株的酵母产胡萝卜素的特性不同。

2.1.3 添加剂的影响: 据报道^[2]硫酸素、紫罗酮可分别提高耻垢分枝杆菌和三孢布拉霉的胡萝卜素产量, 八氢蕃茄红素和四氢蕃茄红素是胡萝卜素及 β -胡萝卜素合成的前体。为此, 在发酵基础培养基中添加盐酸硫酸素 1mg/L、盐酸硫酸素 1mg/L + 桔子皮汁 20mg/L/L (以代替紫罗酮)、桔子皮汁 20mL/L、桔子皮 10g/L、蕃茄汁 20mL/L、维生素 C 1mg/L 或 4mg/L 进行试验。结果表明, 所试的几种物质除维生素 C 的作用不明显外, 其它的均有促进作用, 其中以添加盐酸硫酸素 + 桔子皮汁或添加桔子皮的效果最佳, 它们的胡萝卜素产量分别比对照 (无添加剂) 的 (5.66 $\mu\text{g} / \text{mL}$) 提高 34.8% 和 32.9%。

2.1.4 蔗糖、酵母膏、蛋白胨、桔子皮和盐酸硫酸素含量的影响: 为了进一步优化培养基的组成, 采用 $L_9(3^4)$ 表对培养基组份进行正交试验, 通过方差分析找出主要影响因素^[7]。结果表明, 所做的 9 个实验中, 第 7 号实验的胡萝卜素产

表1 培养基正交试验结果分析

试验	因素 ^a (g/L)			胡萝卜素产量($\mu\text{g}/\text{mL}$)			
	C	N	O	B ₁	T ₁	T ₂	T ₁ +T ₂
1	20	5+5	0	0.001	4.76	4.48	9.24
2	20	10+10	7.5	0.002	4.54	4.23	8.77
3	20	15+15	15	0.003	4.91	5.34	10.25
4	35	5+5	7.5	0.003	5.94	5.96	11.92
5	35	10+10	15	0.001	5.45	6.25	11.70
6	35	15+15	0	0.002	4.05	4.09	8.14
7	50	5+5	15	0.002	8.41	8.86	17.27
8	50	10+10	0	0.003	5.31	4.92	10.25
9	50	15+15	7.5	0.001	5.31	5.50	10.81
K ₁	28.26	38.43	27.63	31.75			
K ₂	31.76	30.72	31.50	34.18			
K ₃	38.33	29.20	39.22	32.42			
k ₁	4.71	6.41	4.61	5.29			
k ₂	5.29	5.12	5.25	5.70			
k ₃	6.39	4.87	6.45	5.40			
极差r	1.68	1.54	1.93	0.41			

^aC: 蔗糖, N: 蛋白胨+酵母膏, O: 桔子皮, B₁: 盐酸硫酸素

表2 培养基正交试验的方差分析

变异来源	自由度	平方和	方差	F	F _{0.05}	F _{0.01}
区组	1	0.05	0.05	0.63	4.46	8.65
蔗糖	2	8.71	4.36	54.50	4.46	8.65
N ^a	2	8.16	4.08	51.00	4.46	8.65
桔子皮	2	11.61	5.81	72.63	4.46	8.65
B ₁ ^b	2	0.53	0.27	3.38	4.46	8.65
误差	8	0.64	0.08			
总计	17	29.70				

^aN: 蛋白胨+酵母膏, ^bB₁: 盐酸硫酸素

量极显著高于其它 8 个实验的产量, 第 7 号实验的培养基组成恰是正交试验结果所得到的最优组合, 即蔗糖 50g, 酵母膏 5g, 蛋白胨 5g, 桔子皮 15g, 盐酸硫酸素 0.002g, 定容 1L, (表 1)。培养基中碳源(蔗糖)、氮源(酵母膏 + 蛋白胨)和桔子皮的含量对菌株 COS 5 产胡萝卜素的影响极其显著, 而盐酸硫酸素含量的影响较小(表 2)。

2.1.5 通气量的影响: 用 250mL 三角瓶分别装上上述优化组合的培养基 30、50、75 和 100mL,

28℃振荡培养96h,胡萝卜素产量分别为13.55、9.36、4.73和3.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 发酵液。说明通气量对COS-5产胡萝卜素影响很大,COS-5的这一特性与粘红酵母ZR-5相似^[1]。

2.1.6 发酵过程:用上述优化组合的培养基进行胡萝卜素发酵,定时取样测定胡萝卜素产量、生物量和残糖。(图1)表明,在24h内,生物量迅速增加(20.5mg/mL),48h达26.0mg/mL,48h后变化很小,84h达最高(29.5mg/mL);随着生物量的增加,蔗糖迅速被消耗,发酵至48h,蔗糖由起始浓度50g/L降至6.9g/L,72h时降至3.7g/L;胡萝卜素产量在24h后迅速增加,96h时达最高(13.55 $\mu\text{g}/\text{mL}$),之后可能由于菌体自溶和胡萝卜素氧化,胡萝卜素产量略有下降。这些结果表明,COS-5生长主要在24h之前,而胡萝卜素合成在24h之后,胡萝卜素是胞内色素,菌体量的多少直接影响胡萝卜素的产量,因此控制合适的发酵条件,以获得最大生物量,是提高胡萝卜素产量的保证。

2.2 COS-5胡萝卜素的吸收光谱

酵母COS-5胡萝卜素丙酮抽提液与 β -胡萝卜素标准品(Sigma公司)丙酮液,用UV-2100型紫外-可见分光光度计在200~600nm波长下作扫描图谱,结果如图2所示。 β -胡萝卜素标准品在452.8nm、329.2nm和306.6nm处有吸收峰,COS-5胡萝卜素在474.4nm、338.6nm和310.2nm处有吸收峰;从扫描图形看,COS-5胡萝卜素的主要成分为 β -胡萝卜素;COS-5的色素吸收峰与红酵母PYC₁₂的色素吸收峰有些不同^[4],这可能与菌株不同,以

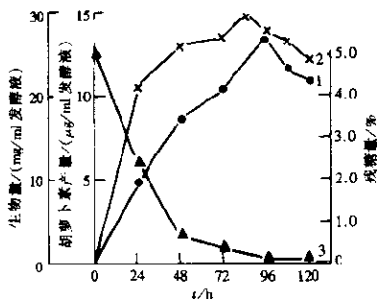


图1 发酵过程

1 胡萝卜素产量, 2 生物量, 3 残糖量

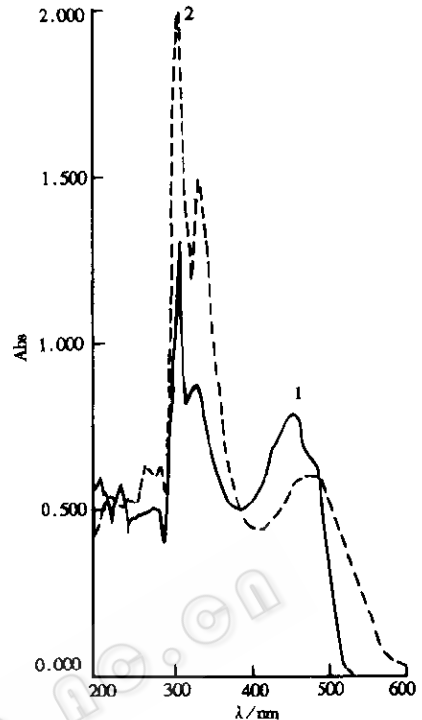


图2 光吸收扫描图形

1 β -胡萝卜素标准品, 2 COS-5胡萝卜素

及培养条件、色素的提取和分析测定条件不同有关。

2.3 小结

红酵母COS-5产胡萝卜素的条件经优化,其培养基为蔗糖50g、蛋白胨5g、酵母膏5g、桔子皮15g、盐酸硫胺素0.002g,定容1L,pH6.0。250mL三角瓶装培养基30mL;培养时间96h。在上述条件下,其胡萝卜素的产量可达13.55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 发酵液(4个重复试验的平均值),比用发酵基础培养基的产量5.51 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 提高了近2.5倍;菌体的胡萝卜素含量为492.7 $\mu\text{g}/\text{g}$ 干重细胞,比粘红酵母ZR-5高^[1]。从光吸收扫描图谱分析表明,COS-5胡萝卜素的主要成分为 β -胡萝卜素。该菌株具有较高的应用价值和开发前景。

参考文献

- [1] 张博润,寇运同,刘玉方. 微生物学通报,1995,22(4): 212~214.
- [2] B.阿特金森, F. 马维图纳著,何忠效等译. 生化工程与生物技术手册上册. 北京: 科学出版社,1992,310~320.

- [3] 张建法, 黄为一, 吴江等. 微生物学通报, 1996, 23(1): 12~14, 55.
- [4] 徐海, 钱卫, 高东等. 工业微生物, 1997, 27(3): 24~26, 31.
- [5] 任双喜, 尹光琳. 微生物学通报, 1998, 25(1): 20~23.
- [6] 微生物研究法讨论会编. 微生物学实验法. 北京: 科学出版社, 1983, 200.
- [7] 朱燕宝. 应用概率统计方法. 西安: 西北工业大学出版社, 1986, 114~150.