

产虾青素海洋酵母菌 YS-185 的鉴定及发酵条件优化

何 磊^{1,2} 刘均忠¹ 秦胜利³ 于佳民⁴ 孙 谥^{1*}

(¹农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(²上海海洋大学食品学院, 201306)

(³青岛科技大学化工学院, 266071)

(⁴大连海洋大学食品学院, 116023)

摘 要 以 26S rDNA 法将实验室保藏的 1 株产虾青素的海洋酵母菌 YS-185 鉴定为粘红酵母。以海洋酵母菌 YS-185 为试验菌株, 运用摇瓶发酵优化的方式, 探索培养基组分和发酵工艺条件对该菌发酵的影响。实验结果表明, 该菌生长最适培养基组分为葡萄糖 8 g/L、蛋白胨 8 g/L, 最适生长起始 pH 值为 5.5、转速 220 r/min、接种量 8%、温度 20℃; 虾青素合成的最佳培养基组分葡萄糖 8 g/L、蛋白胨 8 g/L, 最佳虾青素合成条件: pH 5.5, 转速 220 r/min, 接种量 8%, 培养温度 25℃。发酵优化后的虾青素产量 2.670 μg/ml, 较优化前的 1.572 μg/ml 提高了 69.8%。温度对酵母菌的生长和虾青素的合成都有显著影响。海洋酵母菌 YS-185 优化后的发酵条件有规模化生产虾青素的应用潜力。

关键词 26S rDNA 虾青素含量 发酵优化 正交实验

中图分类号 Q939; TQ920.6 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2011)04-0093-09

Identification of an astaxanthin-producing marine yeast strain YS-185 and optimization of its fermentation conditions

HE Lei^{1,2} LIU Jun-zhong¹ QIN Sheng-li³ YU Jia-ming⁴ SUN Mi^{1*}

(¹ Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(² College of Food Science & Technology, Shanghai Ocean University, 201306)

(³ College of Chemical Engineering, Qingdao University of Science & Technology, 266071)

(⁴ Food Engineering College, Dalian Ocean University, 116023)

ABSTRACT A yeast strain YS-185 isolated from the ocean can produce astaxanthin. 26S rDNA sequence analysis showed that the strain belongs to *Rhodotorula glutinis*. The effects of culture medium components and fermentation conditions on the marine yeast growth and pigment yield were investigated in shake flasks. The results showed that the optimum culture medium for the bacteria growth consisted of glucose (8g/L), peptone (8g/L), and the optimum fermentation conditions were initial pH 5.5, shaking speed 200r/min, inoculum level 8% (v/v),

山东省 2008 年科学技术发展计划(2008GG10005017)资助

* 通讯作者。E-mail: sunmi@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2010-12-13; 接受日期: 2011-02-22

作者简介: 何 磊(1984-), 男, 硕士研究生, 主要从事海洋产物资源与酶工程研究。E-mail: hlei85@126.com, Tel: (0532)85833961

and temperature 20°C. The optimum culture medium for astaxanthin production consisted of glucose (8g/L), peptone (8g/L), and the optimum fermentation conditions were initial pH 5.5, shaking speed 220 r/min, inoculum level 8%(v/v) and temperature 25°C. We found that temperature had significant influence on the bacteria growth and the astaxanthin production based on the data analysis of the orthogonal experiments. An overall 69.7% increase of astaxanthin yield (2.670 μ g/ml) was obtained compared with that of the original conditions (1.572 μ g/ml). Marine yeast YS-185 had the potential to produce astaxanthin at a large scale.

KEY WORDS 26S rDNA Content of astaxanthin Fermentation optimization
Orthogonal experiment

虾青素(Astaxanthin)化学名称为 3,3-二羟基- β , β -胡萝卜素-4,4-二酮,分子式为 C₄₀H₅₂O₄(宋光泉等 2007),是一种非维生素 A 源类胡萝卜素,在体内不转变为维生素 A,发挥多重生理功效,如抗肿瘤活性(Miki 1991;Jyonouchi *et al.* 1995)。虾青素清除自由基能力比 β -胡萝卜素高 10 倍,比维生素 E 高 100 倍(Miki *et al.* 1998),因此在食品、医药及饲料添加剂等行业广泛应用(祝美云等 2006)。

虾青素的合成有两种途径:一是化学方法合成,化学合成虾青素比较困难,合成成本偏高,产品价格昂贵,技术为少数跨国公司掌握(梁春梅 2007)。二是生物合成,成本低且速度快、量大。国内外已有不少有关利用发夫酵母和雨生红球藻等微生物产虾青素的报道(许陪雅等 2001;陈晓飞等 2007)。本研究用正交实验对产虾青素的海洋酵母菌 YS-185 发酵条件进行了优化。

1 材料与方法

1.1 菌株

产虾青素的海洋酵母菌 YS-185 由中国水产科学研究院黄海水产研究所产物资源与酶工程室保藏。

1.2 培养基

斜面培养基(g/L):葡萄糖 15,麦芽汁 3,蛋白胨 5,酵母膏 3,琼脂 20;

种子培养基(g/L):葡萄糖 15,麦芽汁 5,蛋白胨 5,酵母膏 3;

发酵培养基(g/L):葡萄糖 20,酵母粉 3,蛋白胨 5,K₂HPO₄ 1,MgSO₄0.5,CaCl₂ 0.1。

1.3 主要仪器

Alliance 2690-PAD 2996 高效液相色谱系统(美国 Waters)、旋转蒸发器 RE-52C(郑州亚荣)、高速冷冻离心机 20PR-52D(日本日立)、超声波细胞粉碎机(宁波新芝)、Biometra PCR 仪(德国 Biometra)。

1.4 菌落和菌体形态观察

观察菌落在 YPD 平板(1% 酵母膏,2% 蛋白胨,2% 葡萄糖,2% 琼脂)上的形态;观察发酵液中菌体大小、生长和繁殖状况。

1.5 菌的分子遗传鉴定(张晓娟等 2008;Lu *et al.* 2004;Xue *et al.* 2008;Wang *et al.* 2008)

DNA 的提取采用改进的 CTAB 法(王玮等 2005):2 ml 离心管收集菌体,灭菌双蒸水洗涤,加入 5 μ l β -巯基乙醇混匀后静置 15 min,加入 100 μ l 30 mg/ml 的蜗牛酶充分混匀,37°C 水浴 1h,加入提取缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl,pH 8;50 mmol/L EDTA,pH 8;1.4 mol/L NaCl;2% CTAB) 500 μ l,充分混匀,65°C 水浴 20 min,加入 650 μ l 氯仿-异戊醇(24:1),室温 12 000 r/min,离心 10 min,收集上清液。

26S rDNA 扩增引物 NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') 和 NL4 (5'-GCTCCGT-GTTTCAAG-3') 购自上海生工生物工程技术有限公司。PCR 扩增 26S rDNA D2 区基因片段, 扩增产物送上海桑尼生物科技有限公司检测。根据同源性序列对待测酵母进行分类。

1.6 生物量的测定

将发酵液离心(10 000 r/min, 10 min), 弃上清液, 用蒸馏水稀释 20 倍, 测定波长为 600 nm。用蒸馏水作参比, 测定其吸光度(李国保等 2008)。

1.7 发酵条件的优化

初始发酵条件: 葡萄糖 20 g/L、蛋白胨 5 g/L、酵母粉 3 g/L、 K_2HPO_4 1 g/L、 $MgSO_4$ 0.5 g/L、 $CaCl_2$ 0.1 g/L、起始 pH=5、温度 25℃、转速 200r/min、接种量 5%。在这些单因素实验基础上进行正交实验优化发酵。

1.8 虾青素提取和测定方法

检测方法参照陈小飞等(2007)的 HPLC 的方法, 稍作修改。5 ml 发酵液离心后加入石油醚和丙酮混合物(每克菌粉加入 40 ml 1:1 混合液), 置于液氮预处理 5 min, 室温超声破壁 30 min, 离心(10 000 r/min, 15 min)取上清液, 加入适量丙酮萃取至菌体呈白色, 离心取上清液并混合样品液。将样品液放入分液漏斗中, 加入适量的蒸馏水和甲醇震荡, 静置分层, 仅保留上层的色素层。色素层液在旋转蒸发仪中 40℃ 蒸馏得色素固体, 甲醇溶解备用。

色素鉴定和含量测定在高效液相色谱仪上进行, 以标准虾青素溶液作对照并作浓度-峰曲线。HPLC 色谱条件: Symmetry C18 柱(5 μ m, 2.1 mm \times 150 mm); 进样量 10 μ l, 流动相为: 甲醇: 乙腈: 四氢呋喃 = 80: 5: 15, 流速为 0.5 ml/min; 检测波长 478 nm。

2 结果与分析

2.1 菌落形态

菌落表面光滑不透明、湿润、黏稠、易被挑起; 颜色为橘红色(图 1)。此菌具有卵圆形、长形和矩形等各种形态。菌体长一般为 5~6 μ m, 宽度范围为 3~4 μ m, 进行无性繁殖的裂殖(图 2)。



图 1 平板上的菌落形态

Fig. 1 Morphology of colony on the plate

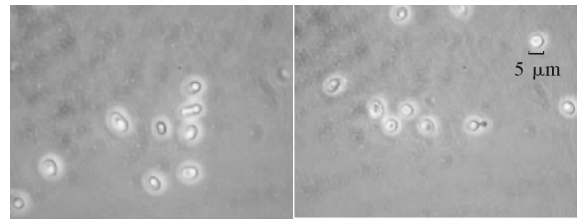


图 2 发酵液中的菌体形态

Fig. 2 Morphology of mycelial in fermentation

2.2 分子鉴定

26S rDNA 5' 末端有一个长约 600 bp 的 D1/D2 序列, 根据 Petercon 对核苷酸序列可变区 D2 的多态性分析, 发现这一区域在同种间的核苷酸的差异小于 1%, 而不同的菌株差异通常远远大于这个数, 可以根据同源性序列来对待测酵母进行分类(赵丽丽等 2008)。

对海洋酵母 YS-185 的基因组 DNA 进行 26S rDNA 序列 PCR 扩增, 并将序列在 GenBank 上登录号为 HQ397723。此序列通过 BLAST 在 GenBank 核酸序列数据库中进行同源序列搜索。结果表明, 与 4 株粘红酵母 26S rDNA 序列(GenBank 数据库登录号 EU285499.1、EU285542.1、EU285541.1、EU285532.1) 相似性

≥99%，结合菌落特性与分子生物学鉴定结果，作者筛选到的酵母菌株初步鉴定为粘红酵母 *Rhodotorula glutinis* (Fres.) Harrison。

2.3 碳源的选择

选择几种常用碳源，以相同糖含量 20 g/L 取代培养基中的葡萄糖，结果见图 3。

由图 3 可以看出，这 4 种碳源都是合成虾青素的有效碳源，但是以葡萄糖为碳源时生物量和虾青素的合成量最高，故选择葡萄糖作为培养基中的碳源。

2.4 不同葡萄糖质量浓度对发酵培养的影响

以摇瓶发酵培养基为基础，改变葡萄糖的质量浓度进行摇瓶发酵实验，结果如图 4-1、图 4-2。

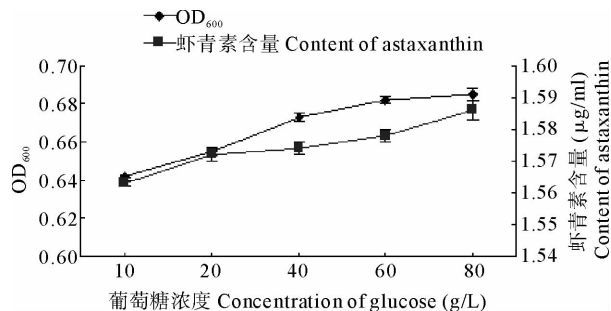


图 4-1 不同葡萄糖浓度对发酵的影响

Fig. 4-1 Effect of different concentration of glucose on the fermentation

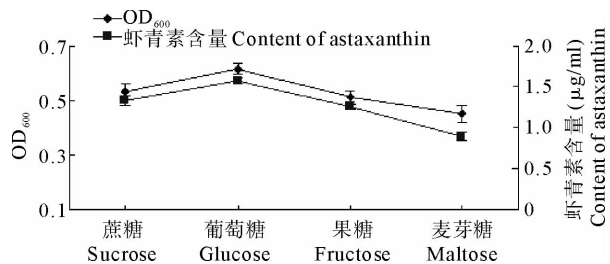


图 3 碳源不同对发酵培养的影响

Fig. 3 Effect of different carbon source on the fermentation

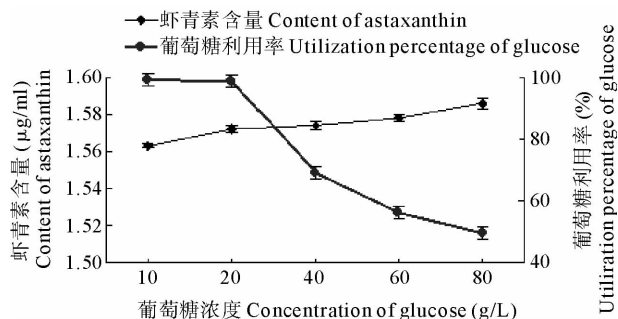


图 4-2 葡萄糖的利用率

Fig. 4-2 The utilization percentage of glucose

由图 4-1 可看出，随着葡萄糖质量浓度的增加，酵母菌的生物量和虾青素含量呈上升趋势，当葡萄糖浓度为 80 g/L 时，生物量和虾青素的产量都达到了最高值。同时由图 4-2 也可看出，葡萄糖的利用率随质量浓度增加而降低。综合考虑葡萄糖利用率，选择发酵培养基的葡萄糖质量浓度 10 g/L。

2.5 氮源的选择

图 5 中 4 种氮源浓度均为 5 g/L。如图 5 所示，以蛋白胨为氮源时生物量和虾青素产量最高，将其作为发酵培养基的氮源。

2.6 不同蛋白胨质量浓度对发酵培养的影响

以摇瓶培养基为基础，以蛋白胨为氮源，分别设置 3、5、8、10、15 g/L 的质量浓度。

从图 6 看出，当浓度达到 8 g/L 时，生物量和虾青素产量都达到了最高值，当质量浓度超过 10 g/L 时，海洋酵母菌虾青素产量有下降趋势，因此选取 8 g/L 蛋白胨作为培养基的氮源。

2.7 初始 pH 值对发酵培养的影响

选择不同的 pH 为初始的培养条件。结果如图 7 所示，初始 pH=5 时，生物量最高；初始 pH=6 时，虾青素的合成量最高。

2.8 不同转速对发酵培养的影响

由图 8 可见随着转数的提高，生物量和虾青素的合成量都呈上升趋势，当摇床转数超过 200 r/min 时，生

物量和虾青素的合成量上升趋于平稳。因此选取 200 r/min 转速为摇瓶发酵培养的条件。

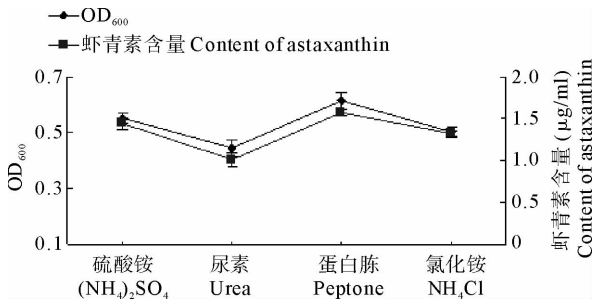


图 5 不同氮源对发酵的影响

Fig. 5 Effect of different nitrogen source on the fermentation

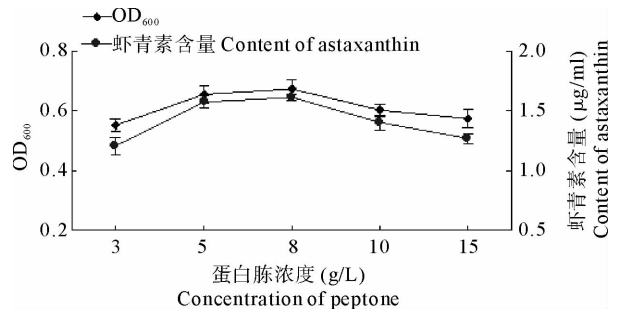


图 6 不同蛋白胨质量浓度对发酵培养的影响

Fig. 6 Effect of different peptone concentration on the fermentation

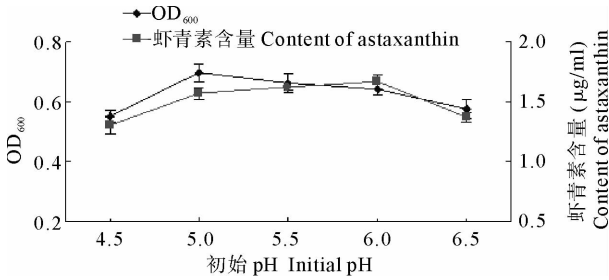


图 7 起始 pH 值对发酵培养的影响

Fig. 7 Effect of initial pH on the fermentation

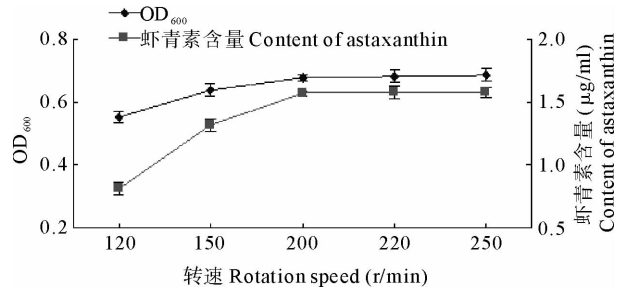


图 8 不同摇床转速对发酵培养的影响

Fig. 8 Effect of different rotation speed on the fermentation

2.9 接种量条件的优化

由图 9 可见,随着接种量的增加,生物量和虾青素产量呈上升趋势。在接种量为 8% 时,生物量和虾青素的合成量最高,因此接种量在 8% 为好。

2.10 温度对发酵培养的影响

如图 10 所示,海洋酵母菌 YS-185 在温度为 20℃ 时生物量达到最大值;25℃ 时虾青素的合成量达到最大值。

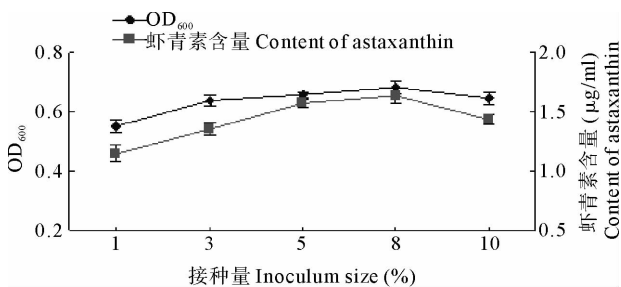


图 9 接种量对发酵的影响

Fig. 9 Effect of inoculum level on the fermentation

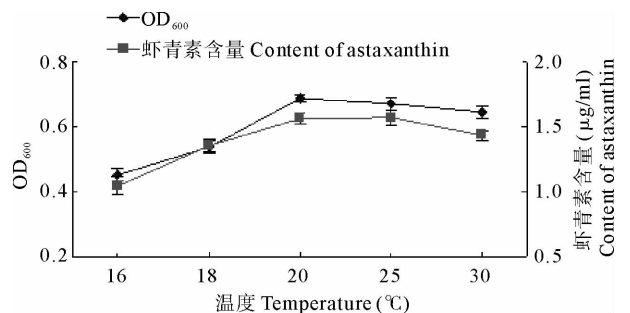


图 10 温度对发酵培养的影响

Fig. 10 Effect of temperature on the fermentation

2.11 正交实验

综合上述,单因素试验以生物量和虾青素产量为指标。选取葡萄糖浓度、蛋白胨浓度、培养摇床转速、接种量、初始 pH 值、温度为考察因素,以 $L_{25}(6^5)$ 正交表作试验,其因素水平及正交试验结果分别见表 1、表 2 和表 5。

表 1 正交试验 $L_{25}(6^5)$ 因素水平安排表

Table 1 The schedule on level of factor of orthogonal experiment for $L_{25}(6^5)$

水平 Level	A	B	C	D	E	F
	起始 pH Initial pH	葡萄糖浓度(g/L) Glucose concentration	蛋白胨浓度(g/L) Peptone concentration	转速(r/min) Rotation speed	接种量(%) Inoculum level	温度(℃) Temperature
1	4.5	8	3.0	180	3	16
2	5.0	10	5.0	200	5	18
3	5.5	20	8.0	220	8	20
4	6.0	30	10.0	250	10	25
5	6.5	40	12.0	260	12	30

表 2 正交试验 $L_{25}(6^5)$ 结果(OD_{600})

Table 2 The results of orthogonal experiment for $L_{25}(6^5)(OD_{600})$

实验号 Experimental group	A	B	C	D	E	F	合成量 Amount
	起始 pH Initial pH	葡萄糖浓度(g/L) Glucose concentration	蛋白胨浓度(g/L) Peptone concentration	转速(r/min) Rotation speed	接种量(%) Inoculum level	温度(℃) Temperature	
1	1	1	1	1	1	1	0.553±0.031
2	1	2	2	2	2	2	0.560±0.019
3	1	3	3	3	3	3	0.672±0.026
4	1	4	4	4	4	4	0.527±0.015
5	1	5	5	5	5	5	0.515±0.014
6	2	1	2	3	4	5	0.653±0.017
7	2	2	3	4	5	1	0.619±0.026
8	2	3	4	5	1	2	0.461±0.034
9	2	4	5	1	2	3	0.453±0.028
10	2	5	1	2	3	4	0.681±0.024
11	3	1	3	5	2	4	0.650±0.023
12	3	2	4	1	3	5	0.589±0.031
13	3	3	5	2	4	1	0.461±0.018
14	3	4	1	3	5	2	0.551±0.037
15	3	5	2	4	1	3	0.617±0.012
16	4	1	4	2	5	3	0.587±0.021
17	4	2	5	3	1	4	0.573±0.036
18	4	3	1	4	2	5	0.567±0.032
19	4	4	2	5	3	1	0.547±0.027
20	4	5	3	1	4	3	0.519±0.031
21	5	1	5	4	3	2	0.512±0.016
22	5	2	1	5	4	2	0.550±0.019
23	5	3	2	1	5	4	0.581±0.023
24	5	4	3	2	1	5	0.579±0.032
25	5	5	4	3	2	1	0.551±0.029

极差分析表明,以生物量为指标,各因素的主次关系为:F>C>D>B>E>A(表 3),即温度对虾青素的含量的影响最大,蛋白胨其次。方差分析以生物量为指标,温度对酵母菌的生长影响显著(表 4)。6 种影响因素的优势组合为 A₃B₁C₃D₃E₃F₃,最适生长培养基组分为葡萄糖 8g/L,蛋白胨 8g/L,最适生长初始 pH 为 5.5,转速 220r/min,接种量 8%,温度为 20℃。

表 3 正交试验极差分析(OD₆₀₀)

Table 3 Range analysis of orthogonal test(OD₆₀₀)

项目 Item	A	B	C	D	E	F
	起始 pH	葡萄糖浓度(g/L)	蛋白胨浓度(g/L)	转速(r/min)	接种量(%)	温度(℃)
	Initial pH	Glucose concentration	Peptone concentration	Rotation speed	Inoculum level	Temperature
合成量 Amount	0.565	0.591	0.580	0.539	0.557	0.546
	0.573	0.578	0.592	0.574	0.556	0.417
	0.574	0.548	0.608	0.600	0.600	0.680
	0.559	0.531	0.543	0.568	0.542	0.602
	0.565	0.577	0.503	0.545	0.571	0.581
R	0.019	0.060	0.105	0.061	0.058	0.263

表 4 正交方差分析(OD₆₀₀)

Table 4 Fvariance analysis of orthogonal test(OD₆₀₀)

因素 Factor	偏差平方和 Sum of square of deviations	自由度 Degree of Freedom	F 比 F-ratio	F 临界值 F critical value	显著性 Significant
A	0.001	4	0.023	2.780	不显著 Not significant
B	0.012	4	0.281	2.780	不显著 Not significant
C	0.036	4	0.844	2.780	不显著 Not significant
D	0.012	4	0.281	2.780	不显著 Not significant
E	0.010	4	0.234	2.780	不显著 Not significant
F	0.185	4	4.336	2.780	显著 Significant
误差 Error	0.26	24			

表 5 正交试验 L₂₅(6⁵)结果(虾青素)

Table 5 The results of orthogonal experiment for L₂₅(6⁵)(Astaxanthin as an index)

实验号 Experimental group	A	B	C	D	E	F	虾青素含量 (μg/ml)
	起始 pH	葡萄糖浓度(g/L)	蛋白胨浓度(g/L)	转速(r/min)	接种量(%)	温度(℃)	Content of astaxanthin
	Initial pH	Glucose concentration	Peptone concentration	Rotation speed	Inoculum size	Temperature	
1	1	1	1	1	1	1	2.013±0.024
2	1	2	2	2	2	2	2.050±0.052
3	1	3	3	3	3	3	2.648±0.014
4	1	4	4	4	4	4	1.946±0.064
5	1	5	5	5	5	5	1.882±0.036
6	2	1	2	3	4	5	2.590±0.014
7	2	2	3	4	5	1	2.460±0.012
8	2	3	4	5	1	2	1.810±0.023
9	2	4	5	1	2	3	1.770±0.032

续表 5

实验号 Experimental group	A	B	C	D	E	F	虾青素含量 ($\mu\text{g/ml}$) Content of astaxanthin
	起始 pH Initial pH	葡萄糖浓度(g/L) Glucose concentration	蛋白胨浓度(g/L) Peptone concentration	转速(r/min) Rotation speed	接种量(%) Inoculum size	温度($^{\circ}\text{C}$) Temperature	
10	2	5	1	2	3	4	2.700 \pm 0.032
11	3	1	3	5	2	4	2.510 \pm 0.052
12	3	2	4	1	3	5	2.288 \pm 0.060
13	3	3	5	2	4	1	1.840 \pm 0.086
14	3	4	1	3	5	2	2.000 \pm 0.056
15	3	5	2	4	1	3	2.430 \pm 0.038
16	4	1	4	2	5	3	2.146 \pm 0.050
17	4	2	5	3	1	4	2.126 \pm 0.030
18	4	3	1	4	2	5	1.973 \pm 0.047
19	4	4	2	5	3	1	1.846 \pm 0.043
20	4	5	3	1	4	3	1.763 \pm 0.045
21	5	1	5	4	3	2	2.001 \pm 0.030
22	5	2	1	5	4	3	1.992 \pm 0.021
23	5	3	2	1	5	4	2.134 \pm 0.012
24	5	4	3	2	1	5	2.110 \pm 0.020
25	5	5	4	3	2	1	1.935 \pm 0.014

极差分析表明,以虾青素为指标各因素的主次关系为:F>E>C>B>D>A(表6),即温度对虾青素的含量的影响最大,接种量其次。方差分析以虾青素产量为指标,温度对虾青素产量影响显著(表7)。6种影响因素的优势组合为 $A_3B_1C_3D_3E_3F_4$ 。最佳虾青素合成培养基组成:葡萄糖 8g/L、蛋白胨 8g/L,最佳虾青素合成条件:pH 值为 5.5,转速 220r/min,接种量 8%,培养温度 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

3 摇瓶发酵

实验室摇瓶发酵优化实验确定海洋酵母菌 YS-185 摇瓶优化虾青素合成培养基组成:葡萄糖 8 g/L、蛋白胨 8 g/L,最佳虾青素合成条件:pH 5.5,转速 220 r/min,接种量 8%,培养温度 25 $^{\circ}\text{C}$ 。为了验证其可行性,摇瓶实验重复 3 次。结果表明,虾青素的产量为 2.701、2.689、2.620 $\mu\text{g/ml}$,平均值为 2.670 $\mu\text{g/ml}$,相比未优化时的产量 1.572 $\mu\text{g/ml}$ 提高了 69.8%。

表 6 正交试验极差分析(虾青素为指标)

Table 6 Range analysis of orthogonal test(Astaxanthin as an index)

项目 Item	A	B	C	D	E	F
	起始 pH Initial pH	葡萄糖浓度(g/L) Glucose concentration	蛋白胨浓度(g/L) Peptone concentration	转速(r/min) Rotation speed	接种量(%) Inoculum level	温度($^{\circ}\text{C}$) Temperature
虾青素指标 Index of astaxanthin	2.108	2.255	2.128	2.014	2.101	2.020
	2.171	2.184	2.213	2.172	2.049	1.575
	2.219	2.084	2.320	2.262	2.298	2.286
	1.991	1.935	2.027	2.164	2.049	2.571
	2.034	2.165	1.925	2.011	2.126	2.170
R	0.280	0.320	0.395	0.251	0.249	0.996

表7 正交方差分析(虾青素为指标)

Table 7 Fvariance analysis of orthogonal test(Astaxanthin as an index)

因素 Factor	偏差平方和 Sum of square of deviations	自由度 Degree of Freedom	F比 F-ratio	F临界值 F critical value	显著性 Significance
A	0.283	4	0.403	2.780	不显著 Not significant
B	0.298	4	0.424	2.780	不显著 Not significant
C	0.478	4	0.680	2.780	不显著 Not significant
D	0.239	4	0.340	2.780	不显著 Not significant
E	0.211	4	0.300	2.780	不显著 Not significant
F	2.706	4	3.852	2.780	显著 Significant
误差 Error	4.21	24			

4 讨论

随着大部分酵母菌的 26S rDNA 序列都已经公布在 GenBank 等核酸序列数据库,鉴定 1 株酵母菌种只需 7 d 左右,因此,26S rDNA 序列在分析酵母菌的分类中有着明显的简便性(赵丽丽等 2008)。

通过单因素及正交试验优化了粘红酵母的发酵条件,提高了其虾青素的产量,对于工业化生产具有相当大的意义。建立了粘红酵母菌产虾青素的优化发酵条件为菌最适生长培养基组分为葡萄糖 8 g/L、蛋白胨 8 g/L,最佳虾青素合成条件:pH 为 5.5,转速 220 r/min,接种量为 8%,培养温度 20℃;虾青素合成的最佳培养基组分葡萄糖 8 g/L、蛋白胨 8 g/L,最佳虾青素合成条件:pH 5.5,转速 220 r/min,接种量 8%,培养温度 25℃。温度对生物量和虾青素的合成影响都显著,可能是温度诱导了调控酵母菌内部生长和产虾青素的相关调控基因,通过控制某些关键酶的合成来调控酵母菌的生长和虾青素的合成。因此,在日常的发酵生产中应重点控制温度参数。优化后虾青素的含量相比未优化提高了 69.8%。但发酵的实验仍有很多没有考虑的因素,例如复合碳氮源、金属离子、光照、苯酚等因素(Kim *et al.* 2004),这些因素也有可能是影响虾青素的相关因素。

参 考 文 献

- 王 玮,于志晟,文湘华. 2005. 白腐真菌总 DNA 提取方法研究. 见:第八次全国微生物学术研讨会论文集,129~133
- 宋光泉,闫 杰,王荣辉,施 进. 2007. 天然虾青素的提取纯化及其应用. 广东化工, 34(11):63~66
- 李国保,孙 溢,张 琇. 2008. 产虾青素海洋酵母菌 YS-185 原生质体制备与紫外诱变. 海洋水产研究,29(1):86~91
- 李金霞,刘光全,程 池. 2007. 酿酒酵母 26S rDNAD1/D2 区域序列分析及其系统发育研究. 酿酒,34(1):37~39
- 陈晓飞,严小军. 2007. 红球藻虾青素含量测定方法的探讨. 宁波大学学报, 20(4):441
- 张晓娟,王 柱,周光燕,宋 萍. 2008. 西南菌种站 20 株酵母菌种基于 26S rDNA D1//D2 区序列分析研究. 四川食品与发酵,44(3):1~4
- 赵丽丽,陈存社,郭风莲. 2008. 26S rDNA 序列分析法鉴定酵母菌. 中国酿造, 15:49~51
- 祝美云,王艳萍,曹发昊,王成章. 2006. 虾青素的生物功效及其应用. 安徽农业科学,24(34):6 517~6 518
- 梁春梅. 2007. 虾青素的生物学功能及其在水产饲料中的应用. 广东饲料,16(5):34~35
- 许陪雅,郑裕国,沈寅初. 2001. 分光光度法测定红发夫酵母中虾青素的含量. 浙江工业大学学报,29(2): 120~123
- Kim, B. K., Park, P. U., Chae, H. J., and Kim, E. Y. 2004. Effect of phenol on β -Carotene content in total carotnoids production in cultivation of *Rhodotorula glutinis*. Korean J. Chem. Eng. 21(3):689~692
- Jyonouchi, H., Sun, S., Tomita, Y., and Gross, M. D. 1995. Astaxanthin, a carotenoid without vitamin A activity, augments antibody responses in cultures including T-helper cell clones and suboptimal doses of antigen. J. Nutr. 125(10):2 483~2 492
- Lu, H. Z., Jia, J. H., and Wang, Q. M. 2004. *Candida asparagi* sp. nov., *Candida Diospyri* sp. nov. and *Candida qinlingensi* sp. nov., novel anamorphic, ascomycetous yeast species. International Journal of Systematic and Evoloutinary Microbiology, 54:1 409~1 414
- Miki, W. 1991. Biological functions and activities of animal carotenoids. Pure& Appl. Chem. 63(1):141~146
- Miki, W., and Hosoda, K. 1998. Astaxanthin-containing drink. Patent No 10155459. Japan
- Wang, S. A., Jia, J. H., and Bai, F. Y. 2008. *Metschnikowia sinensis* sp. nov., *Metschnikowia zizyphicola* sp. nov. and *Metschnikowia shanxiensis* sp. nov., novel yeast species from plants. Antonie van Leeuwenhoek, 94:257~265
- Xue, M. L., Zhang, L. Q., Wang, Q. M. *et al.* 2006. *Metschnikowia sinensis* sp. nov., *Metschnikowia zizyphicola* sp. nov. and *Metschnikowia shanxiensis* sp. nov., novel yeast species from jujube fruit. International Journal of Systematic and evolutionary Microbiology, 56:2 245~2 250