



张志平,段乃心,魏湘楠,等. 基于光胁迫粘红酵母合成高值化类胡萝卜素发酵条件优化[J]. 轻工学报, 2022,37(4):10-17.  
ZHANG Z P, DUAN N X, WEI X N, et al. Optimization of fermentation conditions for high value carotenoid synthesis by *Rhodotorula glutinis* under light stress[J]. Journal of Light Industry, 2022,37(4):10-17.  
DOI:10.12187/2022.04.002

# 基于光胁迫粘红酵母合成高值化类胡萝卜素发酵条件优化

张志平<sup>1,2</sup>, 段乃心<sup>1</sup>, 魏湘楠<sup>1</sup>, 段晨阳<sup>1</sup>, 宋丽丽<sup>1,2</sup>, 魏涛<sup>1,2</sup>

1. 郑州轻工业大学 食品与生物工程学院, 河南 郑州 450001;
2. 食品生产与安全河南省协同创新中心, 河南 郑州 450001

**摘要:**以模拟日光照射为非生物环境胁迫条件,通过单因素试验和正交试验对粘红酵母(*Rhodotorula glutinis*)合成类胡萝卜素的发酵条件进行优化,研究光胁迫对粘红酵母生长和类胡萝卜素合成的影响。结果表明:光照强度为5000 Lux时,可显著提高粘红酵母生物量和类胡萝卜素产量;碳源对类胡萝卜素的合成影响最大,以甘油和葡萄糖最佳;最佳发酵条件为甘油质量浓度20 g/L、酵母粉质量浓度3.5 g/L、初始pH值5.0、培养温度25℃;5 L发酵罐培养144 h,生物量和类胡萝卜素产量分别达14.2 g/L和17.3 mg/L,比优化前分别提高了24.5%和21.0%;光胁迫在提高类胡萝卜素产量的同时,可有效提高高值化类胡萝卜素(红酵母红素和圆酵母素)在类胡萝卜素中的占比。

**关键词:**光胁迫;粘红酵母;类胡萝卜素;发酵条件;高值化

**中图分类号:**TS202.3 **文献标识码:**A **文章编号:**2096-1553(2022)04-0010-08

## 0 引言

类胡萝卜素是一类橙黄色、橙红色或红色的多烯类化合物,其特有的抗氧化性可有效保护细胞中各种生物大分子不受自由基损伤,具有维持细胞正常生命代谢、防止机体衰老、提高机体免疫力等作用<sup>[1]</sup>,被广泛应用于食品着色、营养添加、动物饲料等行业。目前,市场上80%~90%的类胡萝卜素通过传统化学合成法制备,但该方法由于自身的毒性问题使制备的类胡萝卜素在食品领域的应用受到严重限制<sup>[2]</sup>。天然色素主要来源于植物和微生物,其中,植物源色素主要采用植物原料直接提取法制备,

但植物较长的生长周期使其在大规模应用中受到限制<sup>[3]</sup>;相较于植物源色素,微生物源色素主要采用发酵合成法制备,具有工艺绿色、稳定、发酵原料易得、发酵周期不受季节变化影响等优势。因此,采用发酵合成法制备微生物源类胡萝卜素的安全性显著优于化学合成法和植物原料直接提取法<sup>[4]</sup>。受生产成本限制,天然类胡萝卜素产量仅占市场总量的10%<sup>[5]</sup>,而采用微生物发酵技术低成本、高效率生产类胡萝卜素是解决“合成色素好看不健康,天然色素健康不易得”这一行业性难题的有效途径之一。

粘红酵母(*Rhodotorula glutinis*)为生产类胡萝卜素的主要菌种之一,其生物安全性使生产的类胡

收稿日期:2022-02-21

基金项目:河南省科技攻关项目(212102310077,222102320331);中原科技创新领军人才项目(224200510017)

作者简介:张志平(1981—),男,河南省安阳市人,郑州轻工业大学讲师,博士,主要研究方向为生物质资源化利用。E-mail: zzp@zzuli.edu.cn

通信作者:魏涛(1980—),男,河南省焦作市人,郑州轻工业大学教授,博士,主要研究方向为生物催化与转化。E-mail: weit8008@zzuli.edu.cn

胡萝卜素可用作天然食品着色剂和水产养殖饲料添加剂<sup>[4-5]</sup>。影响粘红酵母生长和类胡萝卜素合成的外部培养因素包括温度、pH 值、通气量等<sup>[4-6]</sup>,营养因素包括碳源、氮源、无机盐等<sup>[7-8]</sup>。已有文献<sup>[9-10]</sup>报道,以葡萄糖为碳源时,非生物可控光胁迫因子能显著提高菌体生长率和类胡萝卜素产量,主要原因是光胁迫可显著上调类胡萝卜素生物合成途径的相关基因表达,而类胡萝卜素的过度积累是细胞抵抗辐射引起活性氧(ROS)损伤的重要保护机制,表明粘红酵母具有抗氧化应激相关生理代谢能力<sup>[10]</sup>。粘红酵母的碳源来源广,有机废水中的挥发性有机酸、生物柴油副产物粗甘油、啤酒厂废水中的麦芽糖等均可作为粘红酵母发酵用碳源,但光胁迫对粘红酵母生物转化上述廉价碳源的影响效果尚缺少系统性评价。

基于此,为降低微生物类胡萝卜素发酵原料成本,有效提高粘红酵母类胡萝卜素合成速率和产量,本文拟设置非生物可控光胁迫条件,考查粘红酵母生长和类胡萝卜素合成的最佳碳源、氮源、初始 pH 值和培养温度,并进一步采用正交试验优化粘红酵母合成类胡萝卜素的发酵条件,以期资源化利用可再生有机废弃物生产微生物高值化类胡萝卜素提供技术支持和参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌种

粘红酵母,购于中国食品工业发酵研究所,经郑州轻工业大学实验室诱变筛选后,于 4 ℃ 条件下保存于 YPD 固体培养基中。

### 1.2 主要试剂

葡萄糖、牛肉膏、乙酸钠、甘油、蔗糖、NaOH、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{NaNO}_2$ , 北京博奥星生物科技有限责任公司产;酵母粉,英国 Oxoid 公司产;无水乙醇,津东天正精细化学品试剂厂产。以上化学试剂均为分析纯。

### 1.3 主要仪器与设备

Agilent 1260 型高效液相色谱仪,配有 Zorbax EclipsePlus C18 柱(150 mm×4.6 mm×5 μm),安捷伦科技(中国)有限公司产;5 L 发酵罐,德国赛多利斯公司产;XRP-3000 型数字式照度计,美国 Spectronics

公司产;SW-CJ-2FD 型超净工作台,苏州净化设备有限公司产;LIDA PHS-3C 型 pH 计,上海理达仪器厂产;THZ-100 型恒温振荡摇床,上海一恒科学仪器有限公司产;LX-C50 型立式自动灭菌锅,合肥华泰医疗设备有限公司产;ME204E 型电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司产;HH-S4 水浴锅,上海爱朗仪器有限公司产;T700 型紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司产;T5LED 型灯管,南京亚丹照明科技有限公司产;TDZ5-WS 型台式低速离心机,上海卢湘仪离心机仪器有限公司产。

### 1.4 培养基与培养条件

基础培养基:葡萄糖 40 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  7 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2 g,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  2 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.5 g, 酵母粉 1.5 g, 调 pH 值至 5.5, 加水定容至 1000 mL, 于 116 ℃ 灭菌 25 min。常规摇瓶培养温度为 30 ℃, 转速为 220 r/min。250 mL 摇瓶装液量为 100 mL, 接种量为 10%。

5 L 发酵罐培养:以正交试验确定的最佳发酵条件配制培养基,设置最佳培养参数条件进行 5 L 发酵罐培养,装液量为 4 L,接种量为 10%,通气量为 4 L/min,搅拌桨转速为 300 r/min,外置 5000 Lux 的 LED 光源。

### 1.5 实验方法

**1.5.1 光胁迫对粘红酵母生长和类胡萝卜素合成的影响** 菌种活化后,重新按接种量 10% 转接于基础培养基摇瓶中。为尝试开发利用日光照射培养粘红酵母的工艺,采用模拟日光的强度(5000 Lux)作为光胁迫条件,设置暗培养为对照组,于 30 ℃、220 r/min 摇床振荡培养,比较光胁迫对粘红酵母生长和类胡萝卜素合成的影响。

**1.5.2 单因素试验设计** 1) 最佳碳源的确定:分别选择葡萄糖、乙酸钠、甘油和蔗糖为基础培养基的唯一碳源,初始质量浓度均为 20 g/L,于 30 ℃、220 r/min 摇床振荡培养,比较不同碳源对粘红酵母生长和类胡萝卜素合成的影响。

2) 最佳氮源的确定:分别选择 3 种无机氮源( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{NaNO}_3$  和  $\text{NaNO}_2$ ) 和 3 种有机氮源(酵母粉、牛肉膏和蛋白胨)代替基础培养基中的  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  和酵母粉,初始质量浓度均为 3.5 g/L,

于 30 ℃、220 r/min 摇床振荡培养,比较不同氮源对粘红酵母生长和类胡萝卜素合成的影响。

3)最佳初始 pH 值的确定:分别将基础培养基的初始 pH 值调为 4.0、5.0、6.0,于 30 ℃、220 r/min 摇床振荡培养,比较不同初始 pH 值对粘红酵母生长和类胡萝卜素合成的影响。

4)最佳培养温度的确定:分别于 25 ℃、30 ℃ 和 37 ℃ 条件下采用基础培养基培养粘红酵母,比较不同温度对粘红酵母生长和类胡萝卜素合成的影响。

**1.5.3 正交试验设计** 在单因素试验的基础上,以类胡萝卜素产量为指标,设置光照强度为 5000 Lux,选取碳源(20 g/L, A)、氮源(3.5 g/L, B)、初始 pH 值(C)、培养温度(D)为主要影响因素,设计  $L_9(3^4)$  正交试验,其因素与水平见表 1。

表 1  $L_9(3^4)$  正交试验因素与水平

Table 1  $L_9(3^4)$  orthogonal test factors and levels

水平	因素			
	A	B	C	D/℃
1	葡萄糖	酵母粉	5.0	25
2	甘油	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5.5	28
3	乙酸钠	牛肉膏	6.0	30

**1.5.4 生物量测定** 取 1 mL 发酵液于 1.5 mL 离心管中,于 5000 r/min 转速下离心 5 min,弃上清液,用质量分数为 0.9% 的 NaCl 溶液悬浮菌体,重复离心 1 次。用去离子水稀释菌悬液 100 倍,采用紫外可见分光光度计测定 600 nm 处吸光度,按式①( $R^2=0.998$ )计算发酵液生物量:

$$W = 100 \times (0.8899 \times A_{600} - 0.04205) \quad \text{①}$$

式中,  $W$  为生物量/(g·L<sup>-1</sup>);100 为稀释倍数; $A_{600}$  为样品在 600 nm 处吸光度。

**1.5.5 类胡萝卜素测定** 1)类胡萝卜素含量和产量测定。参考朱丽花等<sup>[1]</sup>的方法,略作调整。取 2 mL 发酵液,以 5000 r/min 转速离心 5 min,收集菌体,并用蒸馏水悬浮菌体再离心,加入 6 mL HCl 溶液(3 mol/L)振荡悬浮菌体,沸水浴静置 5 min 后迅速冷却,以 5000 r/min 转速离心 15 min,弃上清液,加入 6 mL 石油醚与丙酮的等体积混合溶液,振荡提取类胡萝卜素,离心后适当稀释,即得类胡萝卜素提取液。测定其 475 nm 处吸光度,按式②和③分别计算类胡萝卜素含量/( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )和产量/( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ):

$$\text{类胡萝卜素含量} = A_{475} \times D \times V / (0.16 \times W) \quad \text{②}$$

$$\text{类胡萝卜素产量} = \text{类胡萝卜素含量} \times W \quad \text{③}$$

式中, $A_{475}$  为样品在 475 nm 处吸光度; $V$  为消耗有机溶剂的总体积/mL; $D$  为测量吸光度时的溶液稀释倍数;0.16 为类胡萝卜素消光系数。

2)类胡萝卜素种类测定。采用反向高效液相色谱法测定类胡萝卜素种类,具体方法为:用 1 mL 医用注射器吸取类胡萝卜素提取液 1 mL,有机相滤膜(0.22  $\mu\text{m}$ )过滤后,将滤液置于 2 mL 上样瓶中,于 4 ℃ 冰箱保存待测。测定条件如下:分析柱为 Zorbax EclipsePlus C18 柱(150 mm×4.6 mm×5  $\mu\text{m}$ ),流动相为体积分数为 95% 的甲醇溶液,流速为 1 mL/min,柱温为 45 ℃,检测波长为 450 nm,依据每种类胡萝卜素标准品的出峰时间和保留峰面积分别进行定性和定量分析。

## 1.6 数据处理

每个样品的测定指标至少平行测定 3 次,采用正交设计助手 II v3.1 软件作极差和方差分析,利用 Origin9.0 作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 光胁迫对粘红酵母生长和类胡萝卜素合成的影响分析

光胁迫作为一种刺激因子,可影响含色素类菌株产生细胞生理代谢应激反应,进而影响细胞生长和产物合成<sup>[10]</sup>。光胁迫对粘红酵母生长速率、生物量和类胡萝卜素产量的影响如图 1 所示。由图 1 可以看出,当以葡萄糖(20 g/L)为碳源时,光胁迫可提高粘红酵母生长速率、生物量和类胡萝卜素产量。光照组和对照组的最大生物量分别为 11.4 g/L(144 h)和 9.4 g/L(168 h),光照组的最大生物量比对照组提高了 21.3%,且培养时间缩短了 24 h,表明光胁迫可提高粘红酵母生长速率和总生物量。这可能是因为光照可显著上调细胞内糖酵解途径(EMP 途径)和三羧酸(TCA)循环的相关基因表达,而 TCA 循环的激活可促进氨基酸合成和细胞的快速生长<sup>[11]</sup>。从类胡萝卜素含量和产量变化趋势可以看出,光照组和对照组的最大类胡萝卜素含量均出现在菌体对数生长期;而两者的最大类胡萝卜

素产量均出现在对数生长末期,分别为 14.3 mg/L (96 h) 和 9.9 mg/L (120 h),光照组的类胡萝卜素产量比对照组提高了 44.4%。在培养基营养比例适当时,光刺激可激活细胞产生对辐射损伤 ROS 的保护机制。一方面,合成多碳长链多烯类化合物类胡萝卜素的相关生物合成途径基因上调,如用于合成类萜、类固醇等生物分子合成前体的甲羟戊酸 (MVA) 途径的相关基因上调,特别是将焦磷酸 (GGPP) 转化为类胡萝卜素的反应为产色素酵母类所独有<sup>[12]</sup>;另一方面,磷酸戊糖途径 (PPP)、苹果酸脱氢酶 (ME)、异柠檬酸脱氢酶 (IDH) 等相关基因上调使细胞合成大量的还原型辅酶 II (NADPH),为类胡萝卜素的生物合成提供了还原力<sup>[10]</sup>。物质和能量代谢促使粘红酵母通过非酶(类胡萝卜素、谷胱甘肽和类黄酮)系统抵抗氧化应激。当细胞培养至对数生长后期,由于培养基中碳源与氮源比例失调,细胞代谢流会优先用于细胞生长,因而造成类胡萝卜素含量下降;由于培养体系生物量的持续增加,类胡萝卜素产量在细胞对数生长中后期也随之提高。

## 2.2 单因素试验结果分析

### 2.2.1 光胁迫下碳源对粘红酵母生长和类胡萝卜素合成的影响分析

基于适当强度光照可显著促进粘红酵母生长和产物合成,后续发酵工艺体系的优化过程需要给予模拟日光照射。已有文献<sup>[13-15]</sup>报

道,粘红酵母可利用葡萄糖、乙酸钠、甘油和麦芽糖作为碳源进行生长,除葡萄糖为广谱性碳源之外,其他 3 种碳源均可从废弃生物质原料中获得。其中,乙酸钠一般为工业有机废水酸化后形成,甘油为食品加工或生物柴油催化过程形成的副产物,麦芽糖则主要来源于啤酒厂废水。

外置 5000 Lux 光胁迫条件下,不同碳源对粘红酵母生物量和类胡萝卜素产量的影响如图 2 所示。由图 2a) 可以看出,葡萄糖组、甘油组和乙酸钠组的最大生物量分别为 11.5 g/L、9.3 g/L 和 5.6 g/L,麦芽糖组的生物量几乎没有变化,表明光胁迫条件下,粘红酵母能以葡萄糖、甘油和乙酸钠作为唯一碳源,而不能以麦芽糖作为唯一碳源。这可能是因为甘油和乙酸钠可通过简单扩散的方式进入细胞而被代谢为具有和其他糖类相同生产力的底物<sup>[7]</sup>,麦芽糖的利用则需要通过水解措施或使用具有降解该糖的菌株来实现<sup>[15]</sup>。由图 2b) 可以看出,粘红酵母能够利用的这 3 种碳源均可有效合成类胡萝卜素,且葡萄糖组、甘油组和乙酸钠组对应的最大类胡萝卜素产量分别为 14.2 mg/L (96 h)、8.7 mg/L (120 h) 和 9.3 mg/L (216 h),乙酸钠组中的类胡萝卜素产量在发酵后期 (168 h) 超过了甘油组,这表明后续利用上述 3 种碳源合成类胡萝卜素时需要考虑发酵周期。

### 2.2.2 光胁迫下氮源对粘红酵母生长和类胡萝卜素合成的影响分析

为了更全面地考查粘红酵母对

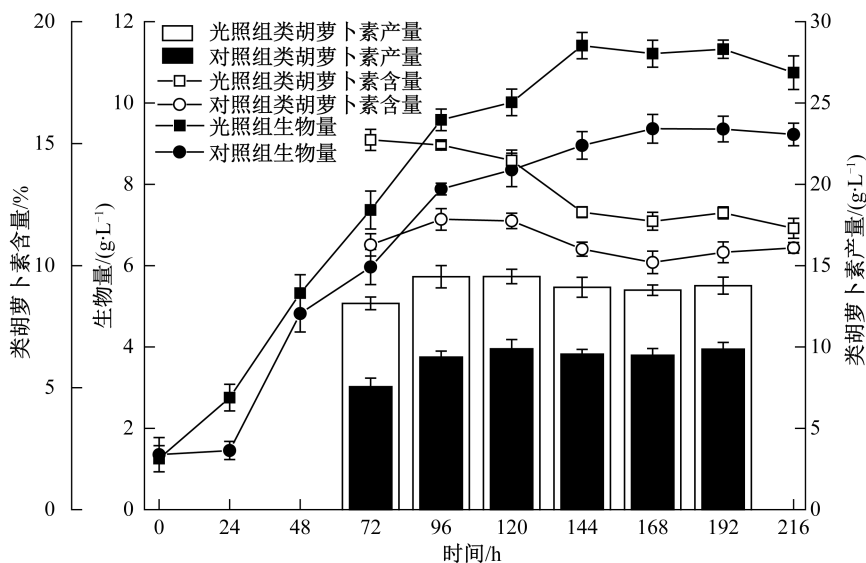


图 1 光胁迫对粘红酵母生长速率、生物量和类胡萝卜素产量的影响

Fig. 1 Effects of light stress on growth rate, biomass and carotenoid yields of *R. glutinis*

无机氮源和有机氮源的利用情况,选择酵母粉、牛肉膏和蛋白胨作为有机氮源,铵根盐、硝酸根盐和亚硝酸根盐作为无机氮源,初始质量浓度均为 3.5 g/L,培养至 192 h。不同氮源对粘红酵母生物量和类胡萝卜素产量的影响如图 3 所示。由图 3 可以看出,有机氮源由于营养成分复杂,除能给微生物提供氮

源(有机大分子蛋白质、小分子多肽和游离单体氨基酸)之外,还可以提供生长因子、维生素、微量元素等物质,因此,其培养组的生物量和类胡萝卜素产量均较高,表明该菌具有资源化利用含蛋白氨基酸类有机废水的潜力;无机氮源也能被粘红酵母利用,但该菌对铵根盐的利用情况明显优于硝酸根盐和亚硝酸根盐。考虑到无机氮源和有机氮源相结合具有协同增效的效果,因此选用  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、酵母粉和牛肉膏作为后续发酵用复配氮源。

**2.2.3 光胁迫下初始 pH 值对粘红酵母生长和类胡萝卜素合成的影响分析** 粘红酵母在 pH 值为 4.0~7.0 的条件下均可以生长,然而培养基初始 pH 值的不同会影响菌体对基质的利用速度,进而影响菌体的生长和产物的合成速率<sup>[16]</sup>。不同初始 pH 值对粘红酵母生物量和类胡萝卜素产量的影响如图 4 所示。由图 4a)可以看出,虽然初始培养基 pH 值不同,但整个培养体系的 pH 值均随发酵时间的延长而降低。这可能是因为,一方面随着菌体进入对数生长期,发酵体系溶氧下降,酵母进行无氧呼吸产酸,致使整个培养体系的 pH 值下降<sup>[17]</sup>;另一方面,当培养基碳源与氮源比例失调且有机氮源被细胞利用后,也会造成培养体系的 pH 值下降<sup>[18]</sup>。选取生物量均达到最大值时的培养时间(168 h)取样测定各培养组参数,结果如图 4b)所示。由图 4b)可知,当初始 pH 值为 6.0 时,可获得最大生物量(12.4 g/L);当初始 pH 值为 5.0 时,可获得最大类胡萝卜素产量(14.5 mg/L)。综上所述,选择初始 pH 值为 5.0~6.0 进行下一步试验。

**2.2.4 光胁迫下培养温度对粘红酵母生长和类胡萝卜素合成的影响分析** 温度是直接影响微生物生长速率的重要物理因素之一,其主要通过影响酶的表达和活性进而影响类胡萝卜素的合成<sup>[19]</sup>。不同培养温度对粘红酵母生物量和类胡萝卜素产量的影响如图 5 所示。由图 5 可以看出,在 37 °C 条件下,粘红酵母几乎停止生长;在 25 °C 和 30 °C 条件下,粘红酵母的生长情况及类胡萝卜素产量均表现良好,其中 25 °C 为最佳培养温度,在该培养温度下的最大生物量为 12.4 g/L(192 h),最大类胡萝卜素产量为 15.33 mg/L(120 h),表明后续工艺优化可选择的培

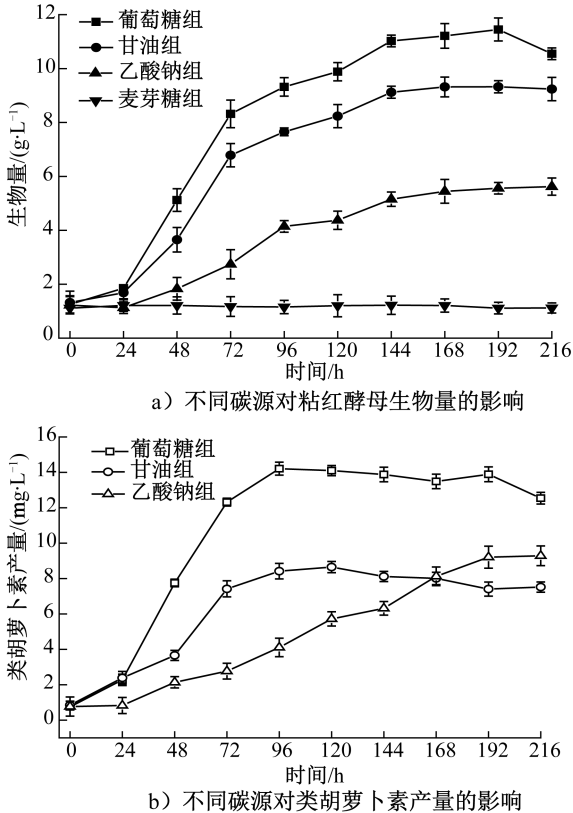


图 2 不同碳源对粘红酵母生物量和类胡萝卜素产量的影响

Fig. 2 Effects of different carbon sources on biomass and carotenoid yields of *R. glutinis*

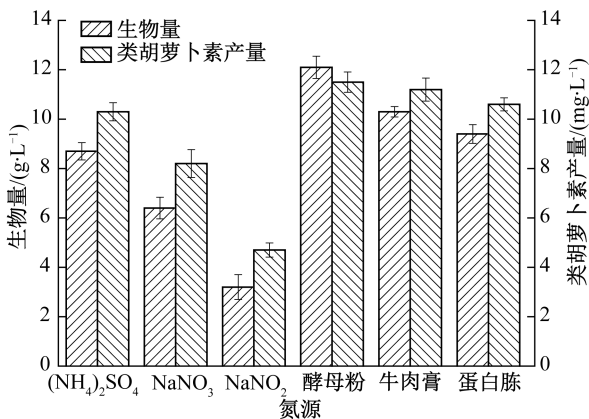


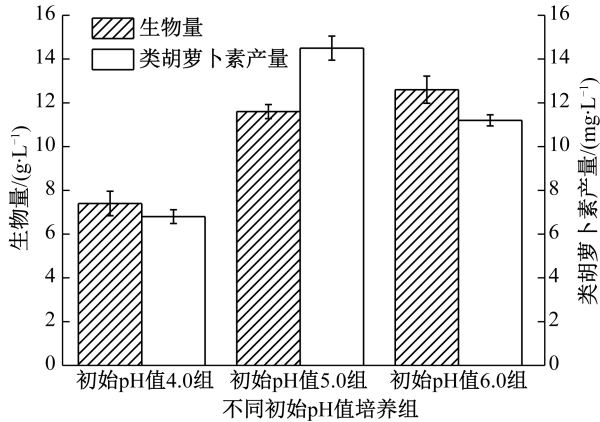
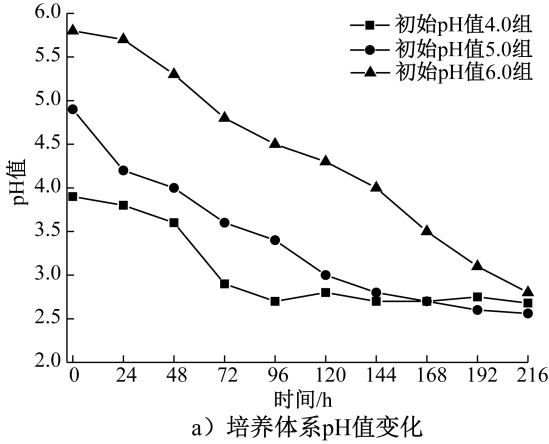
图 3 不同氮源对粘红酵母生物量和类胡萝卜素产量的影响

Fig. 3 Effects of different nitrogen sources on biomass and carotenoid yields of *R. glutinis*

养温度为 25~30 ℃。

### 2.3 正交试验结果分析

粘红酵母发酵条件正交试验结果见表 2。由表



b) 发酵 168 h 时的粘红酵母生物量和类胡萝卜素产量

图 4 不同初始 pH 值对培养体系 pH 值、粘红酵母生物量和类胡萝卜素产量的影响

Fig. 4 Effects of different initial pH values on pH value of culture system, biomass and carotenoid yields of *R. glutinis*

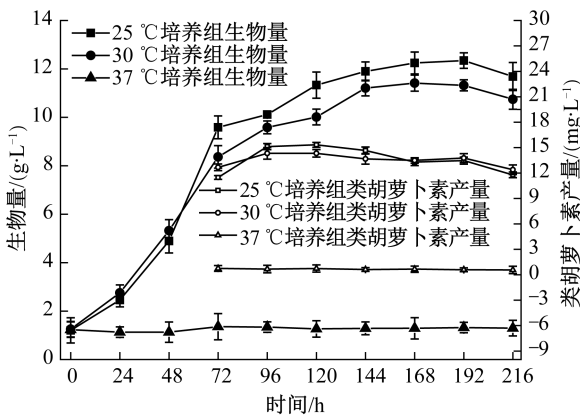


图 5 不同培养温度对粘红酵母生物量和类胡萝卜素产量的影响

Fig. 5 Effects of different culture temperature on biomass and carotenoid yields of *R. glutinis*

2 可知,以类胡萝卜素产量为指标,各因素的主次关系为碳源(A)>初始 pH 值(C)>氮源(B)>培养温度(D)。因此,光胁迫条件下,碳源种类的选择为影响类胡萝卜素产量的主要因素,以甘油为最佳,其次为葡萄糖,表明粘红酵母可高效利用生物柴油主要副产物甘油合成类胡萝卜素。根据极差分析结果,确定粘红酵母的最佳发酵条件为:20 g/L 的甘油为碳源,3.5 g/L 的酵母粉为氮源,初始 pH 值为 5.0,培养温度为 25 ℃,其他无机盐和微量元素与基础培养基一致。经 5 L 发酵罐培养后,获得的最大生物量和类胡萝卜素产量分别为 14.2 g/L 和 17.3 mg/L,与优化前(11.4 g/L 和 14.3 mg/L)相比,生物量和类胡萝卜素产量分别提高了 24.5% 和 21.0%。

### 2.4 光胁迫下粘红酵母合成类胡萝卜素种类和含量分析

光胁迫下粘红酵母合成类胡萝卜素种类及含量见表 3。由表 3 可知,光照组和对照组均可合成 3 种类胡萝卜素,分别为  $\beta$ -类胡萝卜素、红酵母红素和圆酵母素。光胁迫除影响类胡萝卜素产量外,还将红酵母红素和圆酵母素在类胡萝卜素中的占比由 21.7% 提高到 40.6%。这可能是因为红酵母红素和

表 2 粘红酵母发酵条件正交试验结果

Table 2 Results of orthogonal test on fermentation conditions of *R. glutinis*

试验号	A	B	C	D	类胡萝卜素产量/(mg·L <sup>-1</sup> )
1	1	1	1	1	14.8
2	1	2	2	2	12.1
3	1	3	3	3	9.7
4	2	1	1	2	17.3
5	2	2	2	3	17.8
6	2	3	3	1	14.1
7	3	1	1	3	8.7
8	3	2	2	1	6.3
9	3	3	3	2	5.3
K <sub>1</sub>	36.6	40.8	47.1	35.2	
K <sub>2</sub>	49.2	36.2	36.2	34.7	
K <sub>3</sub>	20.3	29.1	29.1	29.1	
k <sub>1</sub>	12.2	13.6	15.7	11.7	
k <sub>2</sub>	16.4	12.1	12.1	11.6	
k <sub>3</sub>	6.8	9.7	9.7	9.7	
R	9.6	3.9	6.0	2.0	
主次因素	A>C>B>D				
最优组合	A <sub>2</sub> B <sub>1</sub> C <sub>1</sub> D <sub>1</sub>				

圆酵母素是粘红酵母抵抗逆境的主要途径,粘红酵母通过选择性调控某些关键基因的表达,改变具有抗逆效果的色素合成途径,赋予细胞应激反应的能力,以响应环境的光胁迫<sup>[20]</sup>。相较于 $\beta$ -类胡萝卜素,红酵母红素和圆酵母素具有更高的市场价值,即光胁迫可有效提升粘红酵母合成类胡萝卜素的产品价值。

表3 光胁迫下粘红酵母合成类胡萝卜素种类及含量

Table 3 Carotenoid species and content by *R. glutinis* under light stress mg/L

种类	光照组含量	对照组含量
$\beta$ -类胡萝卜素	10.4	11.2
红酵母红素	4.9	2.3
圆酵母素	2.2	0.8

### 3 结论

本文设置了模拟日光照射(5000 Lux)的光胁迫条件,优化了粘红酵母合成类胡萝卜素的发酵条件,得到最佳发酵条件为甘油质量浓度20 g/L、酵母粉质量浓度3.5 g/L、初始pH值5.0、培养温度25℃,其他无机盐和微量元素与基础培养基一致,在此条件下,经5 L发酵罐培养结束后,粘红酵母生物量和类胡萝卜素产量比对照组分别提高了24.5%和21.0%。光胁迫条件下,高附加值类胡萝卜素(红酵母红素和圆酵母素)占比由对照组的21.7%提高到40.6%。后续研究可选取廉价、易得的工农业有机废弃物作为发酵原料,开发基于日光周期控制的工艺手段,在有效降低微生物类胡萝卜素发酵成本的基础上,提高类胡萝卜素的产品价值和市场竞争力。

#### 参考文献:

[1] 朱丽花,马延琴,纪彦宇,等.产类胡萝卜素酵母菌的筛选及色素稳定性分析[J].中国酿造,2021,40(9):139-144.

[2] DA COSTA CARDOSO L A, YURIFEIOSAKANNO K, KARP S G. Microbial production of carotenoids: A review[J]. African Journal of Biotechnology, 2017, 16(4): 139-146.

[3] 于雪,张威,吴玉洁,等.微生物产色素机制及

其生物活性[J].微生物学报,2022,62(4):1231-1246.

[4] MARTÍNEZ-CÁMARA S, IBAÑEZ A, RUBIO S, et al. Main carotenoids produced by microorganisms[J]. Encyclopedia, 2021, 1(4): 1223-1245.

[5] HERNÁNDEZ-ALMANZA A, MONTANEZ J C, AGUILAR-GDNZALEZ M A, et al. *Rhodotorula glutinis* as source of pigments and metabolites for food industry[J]. Food Bioscience, 2014, 5: 64-72.

[6] MOLINO A, MEHARIYA S, KARATZA D, et al. Bench-scale cultivation of microalgae *Scenedesmus almeriensis* for CO<sub>2</sub> capture and lutein production[J]. Energies, 2019, 12(14): 2806.

[7] SAINI R K, KEUM Y S. Microbial platforms to produce commercially vital carotenoids at industrial scale: An updated review of critical issues[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2019, 46(5): 657-674.

[8] CHEN W C, HSU Y C, CHANG J S, et al. Enhancing production of lutein by a mixotrophic cultivation system using microalga *Scenedesmus obliquus* CWL-1[J]. Bioresource Technology, 2019, 291: 121891.

[9] ZHANG Z P, ZHANG X, TAN T W. Lipid and carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* under irradiation/high-temperature and dark/low-temperature cultivation[J]. Bioresource Technology, 2014, 157: 149-153.

[10] GONG G P, LIU L, ZHANG X, et al. Multi-omics metabolism analysis on irradiation-induced oxidative stress to *Rhodotorula glutinis* [J]. Apply Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(1): 361-374.

[11] LIU Z Y, YU W L, NOMURA C, et al. Increased flux through the TCA cycle enhances bacitracin production by *Bacillus licheniformis* DW2 [J]. Apply Microbiology Biotechnology, 2018, 102(16): 6935-6948.

- [12] LEHMANN M, VAMVAKA E, TORRADO A, et al. Introduction of the carotenoid biosynthesis  $\alpha$ -branch into *Synechocystis* sp. PCC 6803 for lutein production [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 6(12):699424.
- [13] GONG G P, ZHANG X, TAN T W. Simultaneously enhanced intracellular lipogenesis and  $\beta$ -carotene biosynthesis of *Rhodotorula glutinis* by light exposure with sodium acetate as the substrate [J]. *Bioresource Technology*, 2020, 295(C):122274.
- [14] ZHANG L H, SONG Y L, WANG Q, et al. Culturing *Rhodotorula glutinis* in fermentation-friendly deep eutectic solvent extraction liquor of lignin for producing microbial lipid [J]. *Bioresource Technology*, 2021, 337:125475.
- [15] MAZA D D, SCVIÑARTA S C, GUILLAMÓN J M, et al. Growth and lipid production of *Rhodotorula glutinis* R4, in comparison to other oleaginous yeasts [J]. *Journal of Biotechnology*, 2020, 310:21–32.
- [16] MUSSAGY C U, GUIMARAES A A C, ROCHA L V F, et al. Improvement of carotenoids production from *Rhodotorula glutinis* CCT-2186 [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2021, 165:107827.
- [17] 刘方舟,任洪艳,陈红芬,等.不同碳源对普通小球藻和粘红酵母共培养产油脂的影响[J]. *基因组学与应用微生物学*, 2020, 39(8):3612–3619.
- [18] ZHANG Z P, JI H R, GONG G P, et al. Synergistic effects of oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* and microalga *Chlorella vulgaris* for enhancement of biomass and lipid yields [J]. *Bioresource Technology*, 2014, 164:93–99.
- [19] CHEN J H, CHEN C Y, HASUNUMA T, et al. Enhancing lutein production with mixotrophic cultivation of *Chlorella sorokiniana* MB-1-M12 using different bioprocess operation strategies [J]. *Bioresource Technology*, 2019, 278:17–25.
- [20] GONG G P, LIU L, ZHANG X, et al. Comparative evaluation of different carbon sources supply on simultaneous production of lipid and carotene of *Rhodotorula glutinis* with irradiation and the assessment of key gene transcription [J]. *Bioresource Technology*, 2019, 288:121559.

## Optimization of fermentation conditions for high value carotenoid synthesis by *Rhodotorula glutinis* under light stress

ZHANG Zhiping<sup>1,2</sup>, DUAN Naixin<sup>1</sup>, WEI Xiangnan<sup>1</sup>, DUAN Chenyang<sup>1</sup>, SONG Lili<sup>1,2</sup>, WEI Tao<sup>1,2</sup>

1. College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;

2. He'nan Collaborative Innovation Centre of Food Production and Safety, Zhengzhou 450001, China

**Abstract:** Taking simulated sunlight as abiotic environmental stress condition, the fermentation conditions of carotenoid synthesis by *Rhodotorula glutinis* were optimized by single factor test and orthogonal test. The effects of high stress on growth of *Rhodotorula glutinis* and carotenoid synthesis were studied. The results showed that the light intensity of 5000 Lux could significantly increase the biomass and carotenoid yield. The type of carbon sources had the greatest effect on carotenoid biosynthesis. Glycerol and glucose could be better used to synthesize carotenoids. The optimal fermentation conditions were glycerol concentration of 20 g/L, yeast powder addition of 3.5 g/L, the initial pH value 5.0 and temperature of 25 °C. After cultured in 5 L fermentor for 144 h, the biomass and carotenoid yield reached 14.2 g/L and 17.3 mg/L, respectively, which were 24.5% and 21.0% higher than those before optimization; Light stress could not only increase the yield of carotenoids, but also effectively increase the proportion of high value-added carotenoids (torularhodin and torulene) in the product.

**Key words:** light stress; *Rhodotorula glutinis*; carotenoid; fermentation conditions; high value

(责任编辑:杨晓娟)