

# 黏红酵母离子注入诱变及其发酵产生 $\beta$ -胡萝卜素条件的研究

王岁楼<sup>1,3</sup>, 吴晓宗<sup>2</sup>, 陈德经<sup>3</sup>, 邓百万<sup>3</sup>

(1.中国药科大学食品科学与安全系, 江苏 南京 210009; 2.郑州轻工业学院食品与生物工程系, 河南 郑州 450002;  
3.陕西省资源生物重点实验室, 陕西 汉中 723001)

**摘 要:** 利用低能 $N^+$ 注入黏红酵母高压突变株G-39, 经筛选获得高产 $\beta$ -胡萝卜素的离子诱变株GL-5, 其 $\beta$ -胡萝卜素产量由出发菌株的9.64mg/L提高到17.36mg/L, 增加了80.08%。通过均匀设计试验法, 初步确定了诱变株GL-5的 $\beta$ -胡萝卜素发酵最适条件(葡萄糖40g/L、蛋白胨30g/L、酵母膏10g/L、番茄汁3ml/L、核黄素0.5mg/L、初始pH6.0、摇瓶装量50ml/250ml、接种量50ml/L), 使其 $\beta$ -胡萝卜素产量进一步由17.36mg/L提高到34.21mg/L, 比对照增加了98.09%。这表明, 离子诱变株GL-5是一株优良的高产 $\beta$ -胡萝卜素突变株, 离子注入对该菌种具有良好的诱变效果。

**关键词:** 黏红酵母; 离子注入; 诱变;  $\beta$ -胡萝卜素

## Mutation Effect of Ion Implantation on *Rhodotorula glutinis* and Its Fermentation Conditions for $\beta$ -Carotene Production

WANG Sui-lou<sup>1,3</sup>, WU Xiao-zong<sup>2</sup>, CHEN De-jing<sup>3</sup>, DENG Bai-wan<sup>3</sup>

(1.Department of Food Science and Safety, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;  
2. Department of Food Science and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450002, China;  
3. Shaanxi Key Laboratory for Resource Biotechnology, Hanzhong 723001, China)

**Abstract:** A new mutant strain GL-5 was obtained from the high-pressure mutant strain G-39 of *Rhodotorula glutinis* by  $N^+$  ion implantation. Its  $\beta$ -carotene yield is up to 17.36mg/L, higher 80.08% than that of the initial strain G-39. Its optimum medium (glucose 40 g/L, peptone 30 g/L, yeast extract 10 g/L, tomato extract 3 ml/L, riboflavin 0.5 ml/L, inoculation amount 50 ml/L, culture broth quantity 50 ml in 250-ml shake flask and initial pH 6.0) for producing  $\beta$ -carotene was obtained by uniform design experiment. Under the above culture conditions, the yield of  $\beta$ -carotene produced by the mutant strain GL-5 reaches 34.21 mg/L, higher 98.09% than the control. This study suggested that the mutant strain GL-5 is an excellent strain for producing  $\beta$ -carotene and has bright application prospect in biochemical engineering.

**Key words:** *Rhodotorula glutinis*; ion implantation; mutation;  $\beta$ -carotene

中图分类号: TQ920.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)05-0135-06

$\beta$ -胡萝卜素的功能及应用十分广泛, 具有诱人的市场前景;  $\beta$ -胡萝卜素的生产方法有化学合成法、植物提取法和微生物发酵法等<sup>[1]</sup>。发达国家以化学合成法为主, 技术复杂但产品售价远不如天然品的高, 因而近年来已转向对天然制品的开发。从植物中提取天然 $\beta$ -胡萝卜素, 受原料含量、气候、产地和运输等条件限制, 难以大量生产。美国、澳大利亚和以色列等国家

利用高盐、少雨的近海培养盐藻提取天然 $\beta$ -胡萝卜素, 也受地域和技术限制, 不符合我国国情。前苏联和东欧国家, 利用三孢布拉霉(*Blakeslea trispora*)的两性菌株发酵生产天然 $\beta$ -胡萝卜素, 产率较高, 已达工业化水平, 但技术工艺复杂、发酵周期长, 均已停产。利用红酵母发酵生产 $\beta$ -胡萝卜素具有营养要求简单、发酵周期短等优势, 是一项很有发展前景的生物化工技

收稿日期: 2008-03-13

基金项目: 中国药科大学基金项目(211082); 河南省自然科学基金项目(2006550002);

陕西省资源生物重点实验室访问学者专项计划项目(05j06)

作者简介: 王岁楼(1961-), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: cpuwsl@126.com

术,但其不足之处就是目前所报道的菌株产量都不高<sup>[2-3]</sup>。

超高压处理是一种快速发展的食品与生物工程高新技术<sup>[4-5]</sup>。笔者曾对漆酶产生菌灵芝的高压诱变效应作了初步的实验研究,获得了一些产量大幅度提高的高压突变株<sup>[6]</sup>。近来,又利用超高压处理技术提高黏红酵母生物合成 $\beta$ -胡萝卜素的产量<sup>[7-8]</sup>,其 $\beta$ -胡萝卜素产量由最初的6.03mg/L提高了59.87%,达9.64mg/L,在经初步的培养条件优化后,其 $\beta$ -胡萝卜素产量可进一步提高到13.43mg/L,但此生产水平距工业化仍有差距。

离子注入是近年来兴起的一种材料表面处理技术,这一高技术已被成功地应用于农作物育种方面,近年来在生物化工菌种改良方面也初显成效,如一些单位已通过离子束改良获得了糖化酶、利福霉素、麦角甾醇等的高产菌株<sup>[9-14]</sup>。据认为,离子注入引发的突变可在低剂量注入,细胞损伤较轻的情况下发生,因而可获得较高的突变率和较宽的突变谱,为筛选有利突变型提供了较为广阔的空间。本实验采用10keV能量的 $N^+$ 束,对高产 $\beta$ -胡萝卜素黏红酵母超高压突变株G-39进行离子注入技术进行研究,以期大幅度提高其生物合成 $\beta$ -胡萝卜素的产量。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

#### 1.1.1 菌种

实验用黏红酵母突变株G-39是一株高产 $\beta$ -胡萝卜素的超高压诱变株,为本实验室保藏菌种。

#### 1.1.2 材料与试剂

番茄汁(食用级)为实验室自制;可溶性淀粉和花生油(均为食用级)购自超市;VB<sub>2</sub>、VB<sub>1</sub>、VC(均为药用级)购自药店。

葡萄糖、蛋白胨、酵母膏及琼脂粉(均为生化试剂)北京双旋微生物培养基制品厂;3,5-二硝基水杨酸(化学纯)潮州市菱湖振兴助剂厂;二甲基亚砷、氟化铵、醋酸铵、L-亮氨酸、L-缬氨酸(均为分析纯)及植酸(食品级)郑州东风化学试剂公司。

#### 1.1.3 仪器与设备

Titan离子注入装置 河南省离子束生物工程重点实验室;HYG-III型回转式恒温调速摇瓶柜 上海欣蕊自动化设备有限公司;LRH-150S型恒温恒湿培养箱 广东省医疗器械厂;LD5-10型大容量离心沉淀机 北京医用离心机厂;756MC型紫外-可见分光光度计 上海精密科学仪器有限公司。

### 1.2 培养基与培养方法

#### 1.2.1 培养基

斜面活化培养基:含葡萄糖2%、蛋白胨2%、酵

母膏1%、琼脂2%,pH值自然。

液体种子培养基:含葡萄糖4%、蛋白胨1%、酵母膏1%,pH值自然。每支试管分装5ml。

摇瓶发酵培养基:含葡萄糖4%、蛋白胨2%、酵母膏1%,pH6.0。250ml三角瓶分装50ml。

无碳基础培养基:含 $(NH_4)_2SO_4$  0.5%、 $K_2HPO_4$  0.05%、 $MgSO_4$  0.05%、酵母粉0.2%。

无氮基础培养基:含葡萄糖2%、 $K_2HPO_4$  0.05%、 $MgSO_4$  0.05%、酵母粉0.2%。

以上培养基均在0.1MPa下湿热灭菌30min。

#### 1.2.2 培养方法

诱变筛选培养方法:将保藏的斜面菌种移接到斜面活化培养基上,在28℃培养48h,接两环于种子培养基中,在28℃振荡(150r/min)培养12h,然后按10%接种量即每支试管种子(5ml)接入摇瓶发酵培养基1瓶,在28℃下振荡(150r/min)培养约72h。

发酵培养基优化培养方法:菌种在斜面活化后,接入装有100ml/500ml的三角瓶中,置于150r/min恒温摇床28℃振荡培养1d。取摇瓶培养1d后的新鲜红酵母培养液,以5%接种量加入有50ml培养基的250ml三角瓶中,同时加入添加剂,在28℃振荡培养(150r/min)72h后进行测定。各实验组和对照组均设置3个重复,测定结果取平均值。

#### 1.3 离子注入方法

把待处理的菌株细胞均匀涂布在平板培养皿上,用无菌空气风干制成菌膜,采用能量10keV、脉冲剂量 $1 \times 10^{14} N^+/cm^2$ 的 $N^+$ 束注入,每次连续注入5s,间隔50~90s,总剂量为0(对照)~ $7 \times 10^{14} N^+/cm^2$ ,注入靶室的真空度为 $10^{-3} Pa$ 。测定各剂量处理后酵母菌的存活率/致死率,绘制成存活率/致死率-剂量曲线。

#### 1.4 突变株的筛选方法

将经过离子注入处理后生长良好的平板单个菌落,分别移接到斜面,28℃培养48h,挑一环接入种子培养管中,在摇床上培养12h后,按10%接种量接到摇瓶发酵培养基中,于28℃摇床(150r/min)培养72h,取发酵液离心,收集菌体、破壁、提取并测定 $\beta$ -胡萝卜素含量,据此筛选出产量较高的菌株,连续传3代发酵以选出产量高且稳定性好的菌株。

#### 1.5 最佳发酵生理学条件测试方法

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<sup>[15-16]</sup>,对影响红酵母生长及胡萝卜素合成的各种营养与环境条件进行系统测试。

#### 1.6 分析测定方法

##### 1.6.1 细胞生物量、 $\beta$ -胡萝卜素含量的测定<sup>[8,17]</sup>:

将发酵液转入离心杯中,以3000r/min离心10min,

弃去上清液,沉淀水洗后再次离心,所得酵母泥于55℃烘干称重即为生物量。

准确称取0.1g干菌体,加4ml盐酸(3mol/L),室温下振荡浸泡1h,在沸水浴中煮4min,迅速冷却,3000r/min离心15min,弃上清液,沉淀用蒸馏水洗涤两次(每次洗涤后都要3000r/min离心5min)后加4ml丙酮,室温下振荡30min以浸提胡萝卜素,然后再于3000r/min离心20min,得上清液即为胡萝卜素提取液。将提取液适当稀释后,用756MC分光光度计在 $\beta$ -胡萝卜素特征吸收波长475nm处测定吸光度,按下式计算 $\beta$ -胡萝卜素含量:

$$\beta\text{-胡萝卜素含量}(\mu\text{g/g 菌体}) = \frac{A_{\lambda_{\max}}DV}{0.16W}$$

式中: $A_{\lambda_{\max}}$ 为 $\beta$ -胡萝卜素最大吸收波长处的吸光度; $V$ 为提取所用溶剂量(ml); $D$ 为测定试样的稀释倍数; $W$ 为酵母菌体量(g);0.16为 $\beta$ -胡萝卜素的摩尔消光系数。

### 1.6.2 还原糖的测定

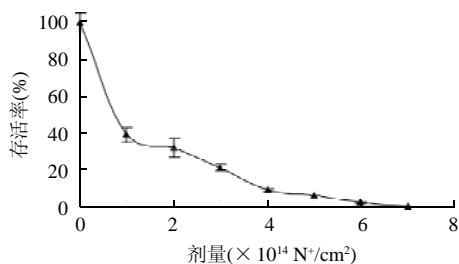
还原糖采用3,5-二硝基水杨酸比色法(DNS法)测定,具体方法见参考文献[18]。

## 2 结果与分析

### 2.1 高压突变株G-39的离子注入诱变

#### 2.1.1 存活率曲线

将对照平板和各剂量注入处理后的平板,在相同条件下培养后进行菌落计数,结果发现各菌体存活率与注入离子剂量有关,随着 $N^+$ 注入剂量的增大,菌株存活率降低。由图1可见,当注入剂量超过 $7 \times 10^{14} N^+/cm^2$ 时,存活率降为零。



图中数据为3个重复的平均值。图2~3同。

图1 G-39菌株离子注入后存活曲线

Fig.1 Change of survival rate of strain G-39 implanted with  $N^+$  ion with dose

#### 2.1.2 诱变效应统计

从表1(与对照菌株相比产率变化在10%以内的菌株视为未发生突变)可知,注入剂量为 $1.0 \times 10^{14} \sim 3.0 \times 10^{14} N^+/cm^2$ 时,菌种G-39有较高的存活率、突变率及正

诱变率,剂量 $1 \times 10^{14} N^+/cm^2$ 时最高。

表1  $N^+$ 注入红酵母G-39的诱变效应

Table 1 Mutation effects of  $N^+$  implantation on original strain G-39

注入剂量( $\times 10^{14} N^+/cm^2$ )	存活率(%)	突变率(%)	正变率(%)
0	100	0	0
1.0	39	81	32
2.0	32	76	20
3.0	21	68	16
4.0	9	40	10
5.0	6	20	3.5
6.0	2	12	0
7.0	0	0	0

#### 2.1.3 高产突变株的筛选

采用 $1 \times 10^{14} N^+/cm^2$ 的注入剂量对G-39菌株进行离子注入诱变处理,并对分离到的50多个突变株进行发酵实验,最终筛选到3株 $\beta$ -胡萝卜素产量有较大提高的突变株GL-5、GL-26、GL-33,结果见表2。可以看出,高压诱变株G-39的离子注入诱变效果较好, $\beta$ -胡萝卜素产量最高可对照提高80.08%。

表2 离子注入诱变筛选结果

Table 2  $\beta$ -carotene yields produced by original strain G-39 and its mutant strains

菌种	$\beta$ -胡萝卜素产量(mg/L)	提高率(%)
G-39(对照)	$9.64 \pm 0.12$	0
GL-5	$17.36 \pm 0.26$	80.08
GL-26	$15.73 \pm 0.23$	63.17
GL-33	$15.91 \pm 0.24$	65.04

#### 2.1.4 突变株GL-5的遗传稳定性

对 $\beta$ -胡萝卜素产量最高的突变株GL-5进行复筛及多次传代培养,并测定其第5、10代的 $\beta$ -胡萝卜素发酵结果,结果见表3。可以看出,该高产菌株的遗传性能较为稳定。

表3 突变株GL-5的遗传稳定性实验

Table 3 Genetic stability of mutant strain GL-5

代数	0	5	10
$\beta$ -胡萝卜素产量(mg/L)	$17.36 \pm 0.26$	$17.41 \pm 0.26$	$17.32 \pm 0.25$

#### 2.1.5 $N^+$ 注入对生物量和 $\beta$ -胡萝卜素含量的影响

从表4可知, $N^+$ 注入对高压突变株G-39的生物量和 $\beta$ -胡萝卜素含量均有较大的提高作用,对菌体生物量的提高更为明显。该结果与笔者曾经从野生型菌株直接进行离子诱变的结果正好相反,可能是本次离子注入实验的出发菌株G-39已经是超高压诱变株的原因,具体原因有待研究。

表 4 N<sup>+</sup>注入对红酵母 G-39 生物量及  $\beta$ -胡萝卜素含量的影响  
Table 4 Effects of N<sup>+</sup> implantation on biomass and  $\beta$ -carotene yield of original strain G-39

菌种	生物量 (g/L)	$\beta$ -胡萝卜素含量 ( $\mu$ g/g 菌体)	$\beta$ -胡萝卜素产量 (g/L)
G-39(对照)	17.51 $\pm$ 0.26	550.86 $\pm$ 7.16	9.64 $\pm$ 0.11
GL-5	26.97 $\pm$ 0.40	643.72 $\pm$ 8.36	17.36 $\pm$ 0.20
提高率(%)	54.03	16.86	80.08

### 2.1.6 突变株 GL-5 的发酵特性

从图 2 可以看出, 高产诱变株 GL-5 与出发菌株 G-39 的  $\beta$ -胡萝卜素发酵过程特性无差异, 两菌株的糖消耗与产色素速度均保持平衡, 只是突变菌 GL-5 的耗糖速度稍慢, 但产物形成更迅速并且产物期延长, 说明诱变菌株 GL-5 具有更强的  $\beta$ -胡萝卜素合成能力。

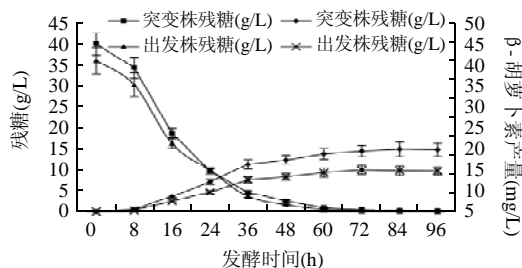


图 2 出发菌株 G-39 和突变株 GL-5 的  $\beta$ -胡萝卜素发酵过程曲线  
Fig.2 Course curves of  $\beta$ -carotene fermentation production by original strain G-39 and mutant strain GL-5

## 2.2 突变株 GL-5 的发酵条件研究

### 2.2.1 碳源和氮源的选择

表 5 碳源对生物量和  $\beta$ -胡萝卜素合成的影响

Table 5 Effects of various carbon sources on  $\beta$ -carotene yield and biomass of mutant strain GL-5

碳源(40g/L)	葡萄糖	麦芽糖	蔗糖	可溶性淀粉
生物量(g/L)	26.81 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup>	23.24 $\pm$ 0.30 <sup>b</sup>	27.62 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>	4.89 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>
$\beta$ -胡萝卜素含量 ( $\mu$ g/g 菌体)	630.13 $\pm$ 7.56 <sup>a</sup>	615.58 $\pm$ 7.38 <sup>b</sup>	621.29 $\pm$ 8.07 <sup>b</sup>	297.41 $\pm$ 3.87 <sup>c</sup>
$\beta$ -胡萝卜素产量 (mg/L)	16.89 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	14.31 $\pm$ 0.21 <sup>b</sup>	17.16 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	1.45 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>

注: 发酵时间为 72h; 同行右上角字母不同表示数据有显著性差异 ( $p < 0.05$ )。

从表 5 可知, 除淀粉不能利用外, 常见碳源葡萄糖、麦芽糖和蔗糖均是 GL-5 菌株生长及  $\beta$ -胡萝卜素合成的良好碳源, 但考虑到生产成本和原料来源(大量生产中葡萄糖可用淀粉水解糖代替), 选葡萄糖作为最佳碳源。

表 6 氮源对生物量和  $\beta$ -胡萝卜素合成的影响

Table 6 Effects of various nitrogen sources on  $\beta$ -carotene yield and biomass of mutant strain GL-5

氮源(10g/L)	蛋白胨	酵母膏	蛋白胨+酵母膏(1:1)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> +酵母膏(1:1)
生物量(g/L)	22.54 $\pm$ 0.29 <sup>b</sup>	14.58 $\pm$ 0.20 <sup>d</sup>	26.51 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>	18.56 $\pm$ 0.26 <sup>c</sup>
$\beta$ -胡萝卜素含量 ( $\mu$ g/g 菌体)	621.67 $\pm$ 7.46 <sup>a</sup>	437.32 $\pm$ 5.24 <sup>c</sup>	631.75 $\pm$ 7.58 <sup>a</sup>	589.13 $\pm$ 7.05 <sup>b</sup>
$\beta$ -胡萝卜素产量 (mg/L)	14.01 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>	6.38 $\pm$ 0.07 <sup>d</sup>	16.75 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	10.93 $\pm$ 0.12 <sup>c</sup>

注: 发酵时间为 72h; 同行右上角字母不同表示数据有显著性差异( $p < 0.01$ )。

从表 6 可知, 4 种氮源中, 以蛋白胨和酵母膏效果最好, 故选其作为最佳氮源。

### 2.2.2 发酵促进剂的筛选

根据  $\beta$ -胡萝卜素的生物合成途径, 结合有关资料及前期的预实验结果<sup>[18-19]</sup>, 选择 VC、植酸、二甲基亚砷、蕃茄汁、花生油、VB<sub>2</sub>、VB<sub>1</sub>、氟化铵、醋酸铵、L-亮氨酸和 L-缬氨酸等 11 种添加物进行不同浓度的实验。实验结果(数据从略)表明, 除 VC、植酸和二甲基亚砷外, 适量添加蕃茄汁、花生油、VB<sub>2</sub>、VB<sub>1</sub>、氟化铵、醋酸铵、L-亮氨酸和 L-缬氨酸, 均可提高红酵母  $\beta$ -胡萝卜素发酵的产率, 其中蕃茄汁和 VB<sub>2</sub> 作用最明显, 在所试浓度范围内最高可分别比对照组提高  $\beta$ -胡萝卜素产率 55.23% 和 51.02%。因此, 根据其效果、来源、成本和发酵配方从简的原则, 本实验选择效果最明显的蕃茄汁和核黄素作为发酵助剂。

### 2.2.3 最佳发酵生理学条件测试

影响红酵母  $\beta$ -胡萝卜素发酵的因素很多, 除碳源、氮源外, 还有发酵助剂(蕃茄汁、核黄素等)及通气量(培养基装量)等环境条件。为了以较少的实验量得到较佳的发酵生理学条件, 采用正交设计更简洁的均匀设计试验法<sup>[15]</sup>, 各因素及水平的选取见表 7, 试验结果(数据均为 3 次实验平均值)与分析见表 8(本实验采用 8 因素 3 水平的试验设计, 所使用的均匀设计表由笔者根据 10 因素 11 水平的均匀设计表 U<sub>11</sub>(11<sup>10</sup>)经演化得到)。

表 7 均匀设计试验各因素及水平

Table 7 Factors and levels of uniform design test for  $\beta$ -carotene fermentation production conditions

因素	水平		
	1	2	3
A 葡萄糖(g/L)	20	30	40
B 蛋白胨(g/L)	10	20	30
C 酵母膏(g/L)	5	10	15
D 蕃茄汁(ml/L)	1	2	3
E 核黄素(mg/L)	0.5	0.6	0.7
F 初始 pH 值	5.5	6.0	6.5
G 培养基装量(ml/250ml)	50	60	70
H 接种量(ml/L)	50	60	70

从表 8 可知, 各因素对红酵母生物量、菌体  $\beta$ -胡萝卜素含量和发酵产量的影响不尽一致。其中对生物量影响最大的是核黄素添加量、初始糖浓度、接种量和通风量(摇瓶装量)等, 对色素含量影响最大的是通风量、酵母膏浓度、初始 pH 值和接种量等, 对发酵产率影响最大的是酵母膏浓度、通风量、核黄素和番茄汁添加量等。另外, 发现  $\beta$ -胡萝卜素产率最高的因素组合(A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>2</sub>D<sub>3</sub>E<sub>1</sub>F<sub>2</sub>G<sub>1</sub>H<sub>1</sub>)与生物量最高的因素组合

表 8 均匀设计试验方案及结果分析  
Table 8 Results and analysis of uniform design test for  $\beta$ -carotene fermentation production conditions

试验号	因素								生物量 (g/L)	β-胡萝卜素含量 (μg/g 菌体)	β-胡萝卜素产量 (mg/L)	
	A	B	C	D	E	F	G	H				
1	1	1	1	2	2	2	3	1	26.8	698.7	18.7	
2	1	2	2	3	2	1	1	3	31.2	664.6	20.7	
3	1	2	3	1	2	3	2	3	24.6	627.5	15.4	
4	2	3	1	2	3	1	2	3	29.3	608.1	17.8	
5	2	3	2	3	1	3	1	2	38.4	687.9	26.4	
6	2	1	3	1	3	1	3	2	35.2	656.2	15.9	
7	3	1	3	2	1	3	2	2	32.9	589.4	19.4	
8	3	2	1	3	3	2	1	1	36.5	618.6	22.6	
9	3	3	2	1	1	2	3	1	34.3	694.6	23.8	
生物量	I /3	27.5	31.6	30.9	31.4	35.2	31.9	35.4	32.5	U=32.1	649.5	20.1
	II /3	34.3	30.8	34.6	29.7	27.5	32.5	28.9	35.5			
	III /3	34.6	34.0	30.9	35.4	33.7	32.0	32.1	28.4			
	R	7.1	3.2	3.7	5.7	7.7	0.6	6.5	7.1	A <sub>3</sub> B <sub>3</sub> C <sub>2</sub> D <sub>3</sub> E <sub>1</sub> F <sub>2</sub> G <sub>1</sub> H <sub>2</sub> R <sub>E</sub> > R <sub>A</sub> =R <sub>H</sub> > R <sub>G</sub> > R <sub>D</sub> > R <sub>C</sub> > R <sub>B</sub> > R <sub>F</sub>		
β-胡萝卜素含量	I /3	663.6	648.1	641.8	659.4	657.3	643.0	657.0	670.6			
	II /3	650.7	636.9	682.4	632.1	663.6	670.6	608.3	644.5			
	III /3	634.2	663.5	624.4	657.0	627.6	634.9	683.2	633.4	A <sub>1</sub> B <sub>3</sub> C <sub>2</sub> D <sub>1</sub> E <sub>2</sub> F <sub>2</sub> G <sub>3</sub> H <sub>1</sub> R <sub>G</sub> > R <sub>C</sub> > R <sub>H</sub> > R <sub>E</sub> > R <sub>F</sub> > R <sub>A</sub> > R <sub>D</sub> > R <sub>B</sub>		
	R	29.4	26.6	58.0	27.3	36.0	35.7	74.9	37.2			
β-胡萝卜素产量	I /3	18.3	18.0	19.7	18.4	23.2	18.1	23.2	21.7			
	II /3	20.0	19.6	23.6	18.6	18.3	21.7	17.5	20.6			
	III /3	21.9	22.7	16.9	23.2	18.8	20.4	19.5	18.0	A <sub>3</sub> B <sub>3</sub> C <sub>2</sub> D <sub>3</sub> E <sub>1</sub> F <sub>2</sub> G <sub>1</sub> H <sub>1</sub> R <sub>C</sub> > R <sub>G</sub> > R <sub>E</sub> > R <sub>D</sub> > R <sub>B</sub> > R <sub>H</sub> > R <sub>A</sub> =R <sub>F</sub>		
	R	3.6	4.7	6.7	4.8	4.9	3.6	5.7	3.7			

( $A_3 B_3 C_1 D_1 E_1 F_2 G_1 H_1$ )基本相同,即葡萄糖 40g/L、蛋白胨 30g/L、酵母膏 10g/L、番茄汁 3ml/L、核黄素 0.5mg/L、初始 pH 值 6.0、摇瓶装量 50ml/250ml、接种量 50ml/L。由此可知,从工艺学角度来看,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  $\beta$ -胡萝卜素含量更有效的措施,而大幅度提高菌体  $\beta$ -胡萝卜素含量也许只有通过定向育种的生物学途径才能有所突破。

但产率最高的因素组合不在均匀设计试验 9 次试验中,其是否为最优条件还需要验证。从表 9 可知,在此最优条件下 3 次实验的平均生物量、 $\beta$ -胡萝卜素含量和产率分别可达 39.80g/L、859.49 $\mu\text{g/g}$  菌体和 34.21mg/L,比对照组的 26.83g/L、643.71 $\mu\text{g/g}$  菌体和 17.27mg/L 分别提高了 48.34%、32.59% 和 98.09%。

表 9 最优条件组合时的摇瓶发酵结果  
Table 9 Results of validation experiments on optimized conditions

实验号	生物量 (g/L)	提高率 (%)	$\beta$ -胡萝卜素含量 ( $\mu\text{g/g}$ 菌体)	提高率 (%)	$\beta$ -胡萝卜素产量 (mg/L)	提高率 (%)
1	38.78	44.54	860.82	33.73	33.38	93.28
2	41.12	53.26	854.38	32.73	35.13	103.41
3	39.51	47.26	863.26	34.11	34.11	97.51
平均	39.80	48.34	859.49	32.59	34.21	98.09
对照	26.83	0	643.71	0	17.27	0

2.2.4 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优化到的摇瓶培养条件在 5L 发酵罐上进行发酵<sup>[20]</sup>,并定时取样分析测定,结果见图 3。

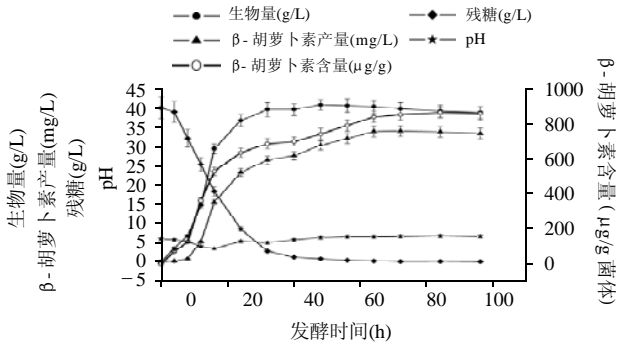


图 3  $\beta$ -胡萝卜素发酵过程曲线  
Fig.3 Course curves of  $\beta$ -carotene fermentation production by mutant strain GL-5 under optimized conditions

由图 3 可见,随着发酵的进行,细胞生物量、 $\beta$ -胡萝卜素含量和产量均呈增加趋势,但依次在 48、84 和 72h 时达到最高值,同时酵母对糖的利用经 48h 基本结束。用肉眼观察,发酵液在 24h 前呈浅黄色,24h 后逐步转红,且越来越红。这说明  $\beta$ -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时形成,但大量形成于生长期结束及营养耗完之后。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,选定 72h 为最佳发酵时间。

### 3 讨论

以黏红酵母超高压突变株 G-39 为材料, 注入 10keV 的低能  $N^+$  束进行诱变处理, 经筛选获得高产  $\beta$ -胡萝卜素的离子突变株 GL-5, 其  $\beta$ -胡萝卜素产率由出发菌株 G-39 的 9.64mg/L 提高到 17.36mg/L, 增加了 80.08%, 并且传代性能稳定。这表明, 低能  $N^+$  注入可以使产生  $\beta$ -胡萝卜素的黏红酵母 G-39 发生可遗传的变异, 对该菌株具有良好的诱变效果。据报道, 离子注入诱变时经常发现存活曲线呈“马鞍型”, 即先降低再升高再降低的趋势, 但本实验中菌株存活曲线却并未呈现“马鞍型”, 可能与菌种等因素有关。因此, 离子注入生物体后, 质、能、电的联合作用对生物体的作用内容非常丰富和复杂<sup>[21-25]</sup>, 其诱变机理有待继续从理论和实验上进行深入探讨。

突变株 GL-5 经初步的培养条件优化后,  $\beta$ -胡萝卜素产量可进一步提高到 34.21mg/L, 比出发菌株株 G-39 产量提高了 2.55 倍。这说明突变株 GL-5 是一株优良的高产  $\beta$ -胡萝卜素诱变株, 离子注入技术是改进生物化工菌种的有效手段。如能进行多因素多次复合诱变, 其  $\beta$ -胡萝卜素生物合成能力可能会有更大的突破。实验中发现, 高压突变株比野生型黏红酵母对低能  $N^+$  注入更加敏感, 因而诱变幅度更大。这启示采用多种诱变源轮回处理可能会有更好的诱变效果。

添加蕃茄汁能够明显提高红酵母  $\beta$ -胡萝卜素发酵产率的原因, 是蕃茄汁中含有  $\beta$ -胡萝卜素合成的前体物质——八氢蕃茄红素和四氢蕃茄红素。VB<sub>2</sub> 对  $\beta$ -胡萝卜素产率有影响, 其机理也是由于它参与或影响红酵母  $\beta$ -胡萝卜素生物合成途径。

### 参考文献:

- [1] 王岁楼. 食品生物技术[M]. 北京: 中国海洋出版社, 1998.
- [2] BHOSALE P B. Studies on yeast *Rhodotorula*, its carotenoids and their applications[D]. University of Pune, 2001.
- [3] BHOSALE P B, GADRE R V. Production of  $\beta$ -carotene by a mutant of *Rhodotorula glutinis*[J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 55: 423-427.
- [4] BARTLETT D H. Pressure effects on *in vivo* microbial processes[J]. Biochemicalet Biophysical Acta, 2002, 1995: 367-381.
- [5] 王岁楼, 吴晓宗, 郝莉花. 超高压在工业微生物诱变育种中的应用初探[J]. 中国生物工程杂志, 2005, 25(6): 7-9.
- [6] 王岁楼, 吴晓宗, 段旭昌. 超高压对漆酶产生菌的诱变效应研究[J]. 工业微生物, 2006, 36(2): 31-35.
- [7] 王岁楼, 韩北忠, 孙君社. 利用高静水压技术提高黏红酵母生物合成  $\beta$ -胡萝卜素的产量[J]. 现代化工, 2007, 27(5): 38-41.
- [8] WANG S L, SUN J S, HAN B Z, et al. Optimization of  $\beta$ -carotene production by *Rhodotorula glutinis* using high hydrostatic pressure and response surface methodology[J]. Journal of Food Science, 2007, 72 (8): 325-329.
- [9] FENG H Y, YU Z L, CHU P K. Ion implantation of organisms[J]. Materials Science and Engineering R, 2006, 54: 49-120.
- [10] 宋道军, 余汛, 姚建明. 低能离子束对微生物细胞的刻蚀与损伤研究[J]. 生物化学与生物物理学报, 1998, 30(6): 570-574.
- [11] 于洋, 姚建铭, 虞龙, 等.  $N^+$  离子注入选育色素产生菌 *Monascus* 的研究[J]. 中国科学院研究生院学报, 2002, 19(4): 443-446.
- [12] 蒋海波, 王纪, 姚建铭. 离子注入麦角甾醇酵母选育研究[J]. 工业微生物, 2000, 30(2): 1-3.
- [13] 陈祖华, 叶晴, 尹光琳.  $N^+$  离子注入热带假丝酵母对长链二元酸产量的影响[J]. 微生物学通报, 2000, 27(3): 174-177.
- [14] 许安, 姚建铭, 余增亮. 离子注入改良 VC 二步发酵混合菌研究[J]. 工业微生物, 1998, 28(4): 21-24.
- [15] 林维宣. 试验设计方法[M]. 大连: 大连海事大学出版社, 1995: 335-336.
- [16] 王岁楼, 熊卫东. 生化工程[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002.
- [17] 王岁楼, 张鑫. 红酵母类胡萝卜素提取方法研究[J]. 食品与机械, 2000 (6): 30-31.
- [18] 钱铭镛. 发酵工程最优化控制[M]. 南京: 江苏科技出版社, 1998: 306-307.
- [19] 王岁楼, 张鑫. 红酵母 RY-98 类胡萝卜素发酵助剂的研究[J]. 生物技术, 2001, 11(1): 33-35.
- [20] 戚以政, 汪叔雄. 生化反应动力学与反应器[M]. 北京: 化学工业出版社, 1999.
- [21] XIANG D, LI J, YAO J M, et al. The breeding of *Streptomyces spectabilis* 1043 by ion beam implantation[J]. Acta Laser Biology Sinica, 2002, 11 (4): 276-279.
- [22] YU L, XU A, WANG J, et al. The application of low energy ion implantation in breeding of high yield VC strains[J]. Acta Laser Biology Sinica, 1999, 8(3): 217-220.
- [23] SHAO C L, XU A, YU Z L. Charge exchange effect of ion implantation to biomolecules[J]. High Technology Letters, 1997, 20(2): 70-73.
- [24] DENG J G. ESR study on ion beam irradiated DNA and its bases[J]. Nuc Tec, 1992, 15(10): 600-605.
- [25] SONG D J, YAO J M, SHAO C L. A possible mechanism of dose related survival of microorganism implanted by  $N^+$  ions[J]. High Technology Letters, 1999, 22(3): 129-132.