

胡萝卜素产生菌红酵母 R-93 培养基营养条件研究*

陈碧娥^① 张佳峰^②

(^① 华侨大学化工与生化工程系, ^② 华侨大学计算机科学系, 泉州 362011)

摘要 采用均匀设计的方法, 优化胡萝卜素产生菌红酵母 R-93 发酵培养基的营养条件. 经回归分析和发酵试验得出最佳培养基配方(%): 蔗糖为 1.0; 蛋白胨为 1.25; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为 1.0; KH_2PO_4 为 0.28; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 为 0.025. 在此条件下, 发酵指数可达到 $0.262 \text{ g(干菌体)} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$.

关键词 红酵母, 培养基, 均匀设计

分类号 TQ 924

胡萝卜素具有鲜艳的色泽, 是一种天然的色素. β -胡萝卜素是维生素 A 的前体, 经近年来临床研究证明它在人体内能遏制各种强力致癌的化学物质. 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. 胡萝卜素虽然广泛存在于植物、藻类和真菌中, 但动物和人体内却不能合成胡萝卜素, 必须从外界输入. 从天然果蔬及藻类提取胡萝卜素存在着成本高、工艺复杂等问题, 而且其生产受自然条件限制. 化学合成的胡萝卜素尽管成本低, 但生物活性低, 加之毒性问题, 不少国家已限制使用. 微生物合成胡萝卜素的研究已日益受到人们的重视^[1~3]. 以红酵母为菌种, 通过细胞培养提取胡萝卜素, 首先必须取得高生物量. 本文报道 R-93 培养基营养条件优化的结果.

1 材料与方法

1.1 主要原材料

(1) 菌种为红酵母 R-93(*Rhodotorato glutinis* 93), 中国科学院微生物研究所提供. (2) 葡萄糖, 蔗糖, 蛋白胨, 酵母膏(均为市售).

1.2 培养条件

(1) 斜面培养基为麦芽汁培养基. (2) 发酵培养基配方: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 为 0.025%, 蔗糖、蛋白胨、酵母膏、硫酸铵、磷酸二氢钾等根据试验方案按比例加入, pH 为 6. (3) 培养方法为 500 mL 三角瓶装 100 mL 培养液, 旋转式摇床, 转速 $210 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$; 在 28°C 恒温下, 振荡培养到适当时间.

1.3 测定方法

(1) 发酵液中还原糖的测定: DNS 法. (2) 生物量的测定: (a) 细胞干重法; (b) 菌体浓度

* 本文 1997-01-25 收到

OD 值法.

1.4 均匀设计

本实验采用均匀设计的方法^[4,5]来优化培养基的营养条件. 以单位时间的生物量 $[g(\text{干菌体}) \cdot (L \cdot h)^{-1}]$ 即发酵指数作为衡量标准, 用多元二次多项式逐步回归的方法. 根据实验数据和预定数学模型, 运用数理统计的方法进行参数估计, 建立回归方程, 并推断其可信性. 由回归方程可对发酵指数进行预测.

2 结果与讨论

2.1 均匀设计方案

考察发酵培养基的 5 种主要组分, 即蔗糖、酵母膏、蛋白胨、 $(NH_4)_2SO_4$ 和 KH_2PO_4 对发酵指数的影响. 每种组分均取 11 个水平. 因此, 选用 5 因素 11 水平的均匀设计表 $U_{11}(11^5)$. 根据 $U_{11}(11^5)$ 的使用表, 选用 1, 2, 3, 5, 7 列, 得到 5 个因素的水平表如表 1 所示. 表 2 为均匀设计试验方案.

表 1 培养基配比试验因数及水平表

因数培养基	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
X_1 蔗糖	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5
X_2 酵母膏	0.1	0.3	0.5	0.7	0.9	1.1	1.3	1.5	1.7	1.9	2.1
X_3 蛋白胨	0.0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4	1.6	1.8	2.0
X_4 $(NH_4)_2SO_4$	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0	1.1
X_5 KH_2PO_4	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0	1.1

表 2 均匀设计试验方案

试验号	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	试验号	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5
1	1.5	0.3	0.4	0.5	0.7	7	4.5	0.5	1.8	0.2	0.5
2	2.0	0.7	1.0	1.0	0.3	8	5.0	0.9	0.2	0.7	0.1
3	2.5	1.1	1.6	0.4	1.0	9	5.5	1.3	0.8	0.1	0.8
4	3.0	1.5	0	0.9	0.6	10	6.0	1.7	1.4	0.6	0.4
5	3.5	1.9	0.6	0.3	0.2	11	6.5	2.1	2.0	1.1	1.1
6	4.0	0.1	1.2	0.8	0.9						

2.2 摇瓶发酵试验的结果

发酵终点用残糖及菌体浓度 OD 值这两个测定结果来控制, 即当残糖小于 0.1 % 或者 OD 值增加不明显时, 就停止发酵.

从表 3 可以看出, 随着糖浓度的增加, 生物量也增加. 但到一定程度, 由于糖抑制菌体的生长, 降低了糖的利用率, 延长了发酵时间, 因此, 发酵指数反而降低.

表 3 中 a 为糖利用率, b 为单位体积的生物量, e 为发酵指数, pH 为终点值.

2.3 发酵培养基的优化

采用逐步回归法并用微机处理上述数据, 约定的回归系数显著性检验临界值(FIS)为 1.00, 结果见表 4.

根据表 4 中各变量影响显著性检验值 F , 可排出影响的顺序为: $X_3 > X_5^2 > X_4^2 > X_5^2 > X_1 > X_5$. 影响因素的强弱为: X_3 (蛋白胨) $> X_4$ (硫酸铵) $> X_5$ (KH_2PO_4) $> X_1$ (蔗糖). 得到的回归

方程为

$$y = 8.5 \times 10^{-3}X_1 + 1.9 \times 10^{-1}X_3 - 3.2 \times 10^{-2}X_5 - 4.5 \times 10^{-3}X_1^2 - 7.6 \times 10^{-2}X_3^2 + 5.0 \times 10^{-2}X_4^2 + 5.8 \times 10^{-2}X_5^2 + 9.8 \times 10^{-2}.$$

回归方程的显著性检验统计量 $F=148.078$, 结果是影响显著.

表 3 主要实验结果汇总

实验号	t/h	pH	a/(%)	b/g(干菌体)·L ⁻¹	e/g(干菌体)·(L·h) ⁻¹
1	52	2.5	74.2	9.68	0.186
2	52	2.8	80.9	13.40	0.258
3	77	6.5	77.5	17.80	0.231
4	92	2.7	81.8	11.43	0.124
5	69	2.5	77.8	11.37	0.165
6	92	2.7	82.7	21.60	0.236
7	120	2.5	78.7	17.48	0.146
8	142	2.1	64.6	11.90	0.084
9	144	2.5	74.1	17.80	0.124
10	165	3.0	85.1	19.75	0.120
11	192	6.8	69.4	15.80	0.082

表 4 多元二次多项式逐步回归结果

变量	回归系数	显著性检验 F 值	标准回归系数
a	0.097 700 3		
X ₁	8.547 751E-03	1.493 045	0.231 881
X ₃	0.129 550 4	313.810	2.089 381
X ₅	-0.032 315 12	1.476 303	-0.175 522 8
X ₁ ²	-4.463 741E-03	26.146 72	-0.983 376
X ₃ ²	-0.076 448	190.218 3	-1.722 577
X ₄ ²	4.978 102E-02	57.533 1	0.279 606 7
X ₅ ²	5.813 726E-02	6.864 498	0.388 627 6

回归方程的复相关系数 $R=0.998\ 556$, 剩余标准差 $S=5.995\ 526 \times 10^{-3}$, 可见回归方程是有代表性的.

根据二次函数求极值原理, 可算出 X_1, X_3, X_5 的最大值, 即 $X_{1\max}=0.95, X_{3\max}=1.25, X_{5\max}=0.28$. X_4 仅有平方项且为正值, 取 1.0. 预测 $Y_{\max}=0.266$.

2.4 培养基营养条件的确定

经回归分析, 发酵培养基的组分删去了酵母膏, 糖的浓度明显降低, 其它 3 种组分在试验水平范围内, 据此安排了 3 个发酵试验, 结果见表 5.

表 5 优化试验

编号	蔗糖/(%)	蛋白胨/(%)	(NH ₄) ₂ SO ₄ /(%)	KH ₂ PO ₄ /(%)	MgSO ₄ ·7H ₂ O/(%)	a/(%)	e/g(干菌体)·(L·n) ⁻¹
1	1.0	1.25	1.0	0.28	0.025	97	0.258
2	1.0	1.25	0.5	0.28	0.025	98	0.262
3	1.5	1.25	1.0	0.28	0.025	95	0.243

由表 5 的实验结果与表 4 相比较,可以看出优化后的糖利用率大大提高,发酵指数与回归方程的预测值相近.最后选定第 2 组为最佳培养基配方(%),即蔗糖为 1.0,蛋白胨为 1.25, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为 0.5, KH_2PO_4 为 0.28, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 为 0.025.

3 结 论

本研究采用均匀设计的方法,由回归分析及实际试验得出培养红酵母的最佳培养基配方.在该配方的营养条件下,大大提高红酵母对糖的利用率,能在单位时间内获得最大生物量.该培养基为低糖发酵培养基,可作为初始培养条件的优化.进行大规模生产时,为提高糖的浓度,可采用流加法进行高密度发酵.研究结果同时表明,均匀设计是优化培养基营养条件的有效方法.

参 考 文 献

- 1 Alew-Cieger. Beta-carotene production in 20-liter fermentors. *Biotechnology and Bioengineering*, 1963, (5):109~121
- 2 Matelli H L. Production of beta-carotene by a *Rhodotorula* strain grown on sugar cane juice. *Biotechnology Letters*, 1990, (12):207~208
- 3 Frngova G. Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in whey ultrafiltrate-lactose assimilation by yeast in mixed culture with *Lactobacillus helveticus*, for carotenoid production. *Biotechnology and Bioengineering*, 1994, 44(8):888~894
- 4 方开泰. 均匀设计. *应用数学学报*, 1980, 3(4):363~372
- 5 白新桂. 数据分析与试验优化设计. 北京:清华大学出版社, 1986. 1~10

A Study on the Optimized Culture Medium for the Carotin

Producer *Rhodotorula Glutinis* R-93

Chen Bie^① Zhang Jiafeng^②

(^① Dept. of Chem. & Biochem. Eng., Huaqiao Univ.,

^② Dept. of Comput. Sci., Huaqiao Univ., 362011, Quanzhou)

Abstract The nutritional condition of culture medium for *Rhodotorula glutinis* R-93 as carotin producer can be optimized by adopting the method of even design. The optimum prescription of culture medium for this carotin producer is obtained by regression analysis and fermentation test as follows: 1.0 % sucrose, 1.25 % peptone, 1.0 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.28 % KH_2PO_4 , 0.025 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Under such condition, a fermentation index of 0.262 g dried cells per liter per hour can be attained.

Keywords *Rhodotorula*, culture medium, even design