

红法夫酵母产特种胡萝卜素酮的研究

王 武 方光瑾 唐 蕾 汤 坚

(无锡轻工业学院, 无锡 214036)

M. Lewis

(美国加利福尼亚大学 Davis 分校)

摘 要 红法夫酵母 (*Phaffia rhodozyma*) 可产 3-羟-3', 4'-二脱氢- β , ϕ -胡萝卜素-4-酮 (HDCO), 经多次诱变和 HDCO 生成条件研究, HDCO 产率由原来的 30 μ g/g (细胞干重) 提高至 510 μ g/g (细胞干重), HDCO 占 *P. rhodozyma* 所产总类胡萝卜素含量由 8% 提高到 45%。还对促进和抑制 HDCO 生成因子及可能的机理进行初步探讨。酵母产 HDCO 的研究在国内外尚属首次报道。

关键词 红法夫酵母, 3-羟-3', 4'-二脱氢- β , ϕ -胡萝卜素-4-酮, 类胡萝卜素, 二苯胺

类胡萝卜素因其特殊的结构, 是一类天然色素, 又具有屏蔽紫外线, 消除氧自由基和抗衰老、防癌等积极的保健作用。已知某些动植物和微生物体内可产生胡萝卜素和类胡萝卜素, 近年来较多的开发研究工作是围绕植物和藻类的 β -胡萝卜素而进行的。

红法夫酵母是七十年代才发现的一种新的酵母属, 至今为止, 此属只有一个种^[1]。它的有关特点是胞内可产生十几种类胡萝卜素, 野生株中最大的组份是虾黄质^[2]。国外某些学者曾以红法夫酵母作为鲑鱼等鱼类的饲料添加剂, 以增强鱼类色素^[3]。据说美国食品与药物管理局 (FDA) 已批准该酵母作为饲料。目前为止, 国外学者主要研究红法夫酵母的虾黄质。

笔者不久前发现, 当红法夫酵母所产的十几种类胡萝卜素组份得以良好分离时, 可提取出一种玫瑰红色的小组份, 即 3-羟-3', 4'-二脱氢- β , 4-胡萝卜素-4-酮, 简称 HDCO。在可见光谱内最大吸收峰为 492nm, 及亚主吸收峰为 522nm, 这种化合物可望研制成高级天然色素, 应用于化妆品和食品工业中。

1 材料与方 法

1.1 菌种

红法夫酵母 (*P. rhodozyma*) UCD67-210 来自美国加利福尼亚大学 Davis 分校^[4]。

1.2 培养基

培养基组成为 (%): 葡萄糖 2, 酵母膏 0.3, 硫酸铵 0.5, 氯化钙 0.1, 硫酸镁 0.025, 磷酸二氢钾 0.3, pH6.0—6.5

1.3 总类胡萝卜素提取与测定

本研究得到国家自然科学基金资助。

本文于 1993 年 2 月 25 日收到。

收集细胞, 洗涤, 50℃干燥, 加石英砂研磨细胞, 以丙酮萃取总类胡萝卜素, 细胞破碎物再经研磨, 提取至无色为止。萃取液合并过滤去除固形物, 减压浓缩至干。类胡萝卜素含量测定按下法进行: 取一定浓度的丙酮萃取液于 480nm 处测吸光度, 消光系数为 0.16。

细胞类胡萝卜素含量 ($\mu\text{g/g dry cell} = \frac{A \times V_a}{E \times \text{g/dry cell}}$, 每毫升发酵液产类胡萝卜素 ($\mu\text{g/ml} = \frac{A \times V_a}{E \times V_f}$)

式中 A ——吸光度读数; V_a ——萃取液 ml 数; E ——消光系数, 为 0.16; dry cell——细胞干重, 以克为单位; V_f ——取样酵母发酵液 (ml)

1.4 类胡萝卜素组分分离

所提取的类胡萝卜素经浓缩后, 点样于 0.25mm 硅胶 G 薄板上, 以石油醚: 丙酮 = 8:2 为展开剂, 展开 2 小时左右, 使各组份分离。

1.5 HDCO 的测定

从薄板上刮下 HDCO 谱带, 以丙酮萃取出 HDCO, 再刮下其余谱带, 另以等量丙酮萃取之。分别于 480nm 处测吸光度, 并按下式计算:

$$\text{HDCO } (\mu\text{g/g dry cells}) = \text{类胡萝卜素总量 } (\mu\text{g/g dry cells}) \times \frac{A_h \times V_h}{A_h \times V_h + A_r \times V_r}$$

式中 A_h ——HDCO 吸光读数; V_h ——HDCO 丙酮萃取液 ml 数; A_r ——其他类胡萝卜素吸光读数; V_r ——其他类胡萝卜素丙酮萃取液 ml。

HDCO 的定性测定, 采用岛津 UV-240 在 350nm—700nm 范围内自动扫描, 测其谱形及最大吸收峰。

2 结果与讨论

2.1 HDCO 高产变异株的诱变选育

野生株 UCD67-210 胞内所产的类胡萝卜素总量接近 $400\mu\text{g/g dry cells}$, 其中 HDCO 含量仅为 $30\mu\text{g/g dry cells}$ 利用紫外光和亚硝基胍 (NTG) 等诱变因子对红法夫酵母细胞进行诱变, 发现紫外光诱变带来较多的负突变株, 而无正突变株。NTG 诱变则导致若干正突变株的出现, 其中总类胡萝卜素含量提高, 同时提高突变株的 HDCO 含量是筛选目标。红法夫酵母诱变谱系与结果见表 1。

表 1 红法夫酵母诱变谱系与结果

Table 1 *P. rhodozyma* cells mutagenesis result

<i>P. rhodozyma</i> strains	Total carotenoids ($\mu\text{g/g dry cells}$)	HDCO ($\mu\text{g/g dry cells}$)	HDCO in carotenoids (%)
UCD 67-210	400	30	7.5
↓			
N361	600	125	25
↓			
ND131	710	315	45

突变株 ND131 细胞所产生的各种类胡萝卜素中虾黄质的含量比已下降到 30% 左右, 而 HDCO 的含量比为 45%, 成为各种类胡萝卜素中的最大组份。

2.2 有利于 HDCO 产生的某些因素

2.2.1 温度影响: 一般的酵母可于 25—30℃ 之间生长良好, 而红法夫酵母细胞于 28℃ 下培养则完全停止生长。培养温度对细胞生长与 HDCO 生成的影响见图 1。从

图 1 中可以看出培养温度为 18—22℃ 之间, 是红法夫酵母细胞生长, 总类胡萝卜素及 HDCO 合成的最适温度范围, 有趣的是, 温度下降至 14℃ 时, 对细胞生长与产类胡萝卜素水平仍无多大影响。这是 *P. rhodozyma* 的一种独特的性状。

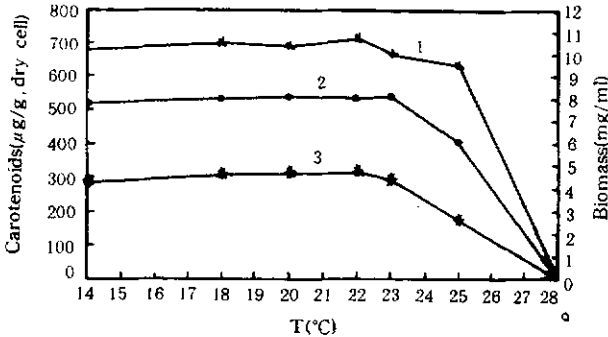


图 1 温度对 HDCO 产生及菌体生长的影响

Fig. 1 HDCO production and biomass fermentation effected by different temperature

1. Carotenoids, 2. Biomass, 3. HDCO

这种效应是谷氨酸和天冬氨酸的氨基还是碳链主体所起的作用, 以 α -酮戊二酸和苹果酸取代上述两种氨基酸, 发现它们与谷氨酸、天冬氨酸的效应相似。根据植物类胡萝卜素生物合成途径^[5], 生物合成由乙酰辅酶 A 经多步转化, 合成为 C_{10} 的八氢番茄红素, 形成了类胡萝卜素基本骨架。上述的结果提示了红法夫酵母的类胡萝卜素生物合成基本途径与植物的相似, 是从三羧酸循环开始的, 因而三羧酸循环的底物及其衍生的氨基酸的增加带来了胡萝卜素途径末端产物生成量的提高。HDCO 含量比提高的原因尚待进一步研究。

表 2 某些氨基酸和有机酸对红法夫酵母类胡萝卜素生成的影响

Table 2 Effects of amino acids and organic acids on *P. rhodozyma* carotenoids productions

Added substances	Carotenoids (µg/g dry cells)	HDCO in carotenoids (%)
Control	387	10.7
Glutamate	467	16.4
Aspartate	438	15.0
Lysine	373	—
Leucine	370	—
Methionine	slight	—
Cysteine	0	—
Ammonium α -keto-glutarate	532	19.4
Ammonium Malate	435	13.7

2.2.2 三羧酸循环的某些底物的促进作用: 在试用各种培养氮源的过程中, 我们发现谷氨酸对促进红法夫酵母的总类胡萝卜素和 HDCO 生成量具有明显作用, 以原始菌株 UCD67-210 为培养对象, 谷氨酸的添加使类胡萝卜素生成量提高 20% 左右, 使 HDCO 的含量比提高 50% 左右。(见表 2)。添加赖氨酸、亮氨酸对类胡萝卜素生成量无明显影响, 而蛋氨酸、半胱氨酸的添加造成细胞生长不良。仅天冬氨酸具有类似于谷氨酸的作用。为了解这

2.2.3 培养条件优化: 通过对各种促进红法夫酵母产生 HDCO 的理化因子的研究, 并经正交试验, 设定更佳培养条件后, 类胡萝卜素含量又提高了, 见表 3。为工业化开发 HDCO 提供了基础。

2.3 类胡萝卜素生物合成抑制因子的研究

已有报道发现 β -紫罗酮可抑制红法夫酵母类胡萝卜素的合成, 我们发现当在培养基中添加 10^{-4} mol/L 二苯胺时, 红法夫酵母细胞生成量无影响, 而其类胡萝卜素合成则完全受抑。当培养基中存在二苯胺时, 再添加 0.5% 的纯净植物油可回复类胡萝卜素合成 (表 4), 添加 0.2% 吐温的目的是使植物油和培养基形成乳化体。从

表 4 中可看出, 仅添加植物油和吐温对类胡萝卜素生成并无促进作用, 而当二苯胺存在时, 却能起解抑作用。

表 3 类胡萝卜素生成量优化结果
Table 3 Improvements of carotenoids productions

Strains	Mean of improvement	Carotenoids ($\mu\text{g/g}$ dry cells)	HDCO ($\mu\text{g/g}$ dry cells)	HDCO in carotenoids (%)
UCD 67-210		400	30	7.5
↓	NTG treatment			
N 361		600	125	21
↓	NTG treatment			
ND 131		710	315	45
↓	Optimization			
ND 131		950	430	45.3
↓	Optimization			
ND 131		1125	510	45.3

表 4 二苯胺和植物油对红法夫酵母 UCD 67-210 产类胡萝卜素的影响
Table 4 Effects of diphenylamide and soy oil on carotenoids productions by *P. rhodozyma* UCD 67-210

Carotenoids ($\mu\text{g/g}$ dry cells)	Additives	UCD 67-210		
		Control	Soy oil (in 0.5%) + Tween 80 (in 0.2%)	Tween 80 (in 0.2%)
Diphenylamide				
	10 $\mu\text{mol/L}$	0	378	Slight
	0	357	348	355

通过透射电镜观察上述培养物中的细胞, 发现正常情况下, 细胞中存在大量脂肪滴 (图版 I-A)。当培养基中存在二苯胺时, 相当一部分细胞中脂肪滴很少 (且细胞形状偏长) (图版 I-B), 这说明二苯胺在某种程度抑制胞内脂肪的合成。当二苯胺和植物油皆存在时, 细胞又普遍出现胞内脂肪滴 (图版 I-C)。这些现象也许可以理解为类胡萝卜素是脂溶性分子, 胞内脂肪滴是类胡萝卜素的贮存库, 事实上许多产类胡萝卜素的微生物都同时产大量的胞内脂肪, 如 *Phycomyces*、*Blakeslea*^[6] 等。二苯胺抑制了胞内脂肪的合成, 有可能造成胞内生成的类胡萝卜素无法被携离合成场所, 致使出现终产物对途径的抑制。当某些添加物可促进脂肪滴合成时, 胞内产生的类胡萝卜素溶入脂肪滴, 而造成途径受抑的解脱, 从而使类胡萝卜素合成回复到原有水平。

参 考 文 献

- [1] Miller M W *et al.* The Yeast, a Taxonomic Study, Elsevier Science Publishers B V Amsterdam, 1984, 890—892.
- [2] Andrewes, A G *et al.* Phytochemistry, 1976, 15: 1003—1007.
- [3] Heard N F *et al.* Proc 1st Intern Conf Food of Sci & Tech, Wuxi, China, 1991, 348—360.
- [4] Johnson E A *et al.* J Gen Microb, 1979, 115: 173—183.
- [5] 阿特金森等著, 何忠效等译, 生化工程与生物技术手册, 北京: 科学出版社, 1992, p. 312.
- [6] Desai H G *et al.* Current sci, 1975, 44: 619—620.

Production of Carotene-4-one by *Phaffia rhodozyma*

Wang Wu Fang Guangjin Tang Lei Tang Jian

(Wuzi Institute of Light Industry, Wuzi 214036)

M. Lewis

(University of California, Davis 95616, USA)

Abstract *Phaffia rhodozyma* produces 3-hydroxy-3', 4'-didehydrogen- β , ϕ -carotene-4-one (HDCO). After mutagenesis treatment and further studies on HDCO accumulation, the yield of HDCO per gram of dry cells increased from 30 μ g to 510 μ g, the proportion of HDCO in total carotenoids increased from 7% to 45%. The stimulation and inhibition factors on carotenoids synthesis were also studied. This is the first report on HDCO production by *P. rhodozyma*.

Key words *Phaffia rhodozyma*, 3-hydroxy-3', 4'-didehydrogen- β , ϕ -carotene-4-one, carotenoids, diphenylamide



- A. Fat droplets formed under normal condition ($\times 10,000$)
- B. Few fat droplets formed from diphenylamide added culture ($\times 10000$)
- C. Fat droplets formation recovered when soy oil and diphenylamide co-existing in the culture ($\times 7,000$)