

# Identification of Marine Red Yeast ZOR1 and Extraction of Both Mannan and Carotenoids from ZOR1

Yukun Cui, Xueming Liu, Shiqi Luo, Ruiyan Zhu

School of Environmental and Chemical Engineering, Yanshan University, Qinhuangdao Hebei  
Email: zhuruiyan\_22@126.com

Received: Mar. 2<sup>nd</sup>, 2020; accepted: Mar. 17<sup>th</sup>, 2020; published: Mar. 24<sup>th</sup>, 2020

---

## Abstract

A marine red yeast ZOR1 isolated from the Bohai Bay was identified by amplified IST sequence and designated as *Rhodotorula mucilaginosa* (*R. mucilaginosa*) ZOR1. Harvested *R. mucilaginosa* ZOR1 after cultivation was treated with snailase and proteinase to release both mannan and carotenoids. Then mannan and carotenoids were extracted from aqueous phase and cell fragments, respectively. The results showed that maximal yield of mannan was 10.36-fold that of the control when *R. mucilaginosa* ZOR1 cells were treated with 3% snailase and 0.2% proteinase. Carotenoids yield reached maximum about 753  $\mu\text{g/g}$  CDW, which was 10.76-fold that of the control when the cell fragments of *R. mucilaginosa* ZOR1 treated with 3% snailase and 0.6% proteinase were hydrolyzed with 0.6% proteinase for another 30 min.

## Keywords

*Rhodotorula mucilaginosa*, Identification, Mannan, Carotenoids

---

# 海洋红酵母ZOR1的鉴定及联合提取甘露聚糖和类胡萝卜素的研究

崔玉坤, 刘雪明, 罗诗琪, 朱瑞艳

燕山大学环境与化学工程学院, 河北 秦皇岛  
Email: zhuruiyan\_22@126.com

收稿日期: 2020年3月2日; 录用日期: 2020年3月17日; 发布日期: 2020年3月24日

文章引用: 崔玉坤, 刘雪明, 罗诗琪, 朱瑞艳. 海洋红酵母 ZOR1 的鉴定及联合提取甘露聚糖和类胡萝卜素的研究[J]. 微生物前沿, 2020, 9(1): 10-16. DOI: 10.12677/amb.2020.91002

## 摘要

对PCR扩增的IST序列的分析比对及进化树的建立确定了一株从渤海湾水域分离的红酵母为海洋胶红酵母,命名为*Rhodotorula mucilaginosa* ZOR1 (*R. mucilaginosa*); 发酵培养*R. mucilaginosa* ZOR1后收集菌体,向菌体中加入不同浓度的蜗牛酶和蛋白酶进行破壁,并在破壁水相中提取甘露聚糖,细胞碎片中提取类胡萝卜素,结果表明当蜗牛酶和蛋白酶浓度分别为3%和0.2%时,甘露聚糖的提取率与对照相比提高10.36倍;提取甘露聚糖后的细胞碎片中继续加入0.6%的蛋白酶作用30 min,则类胡萝卜素的提取率可达到753  $\mu\text{g/g}$  CDW,与对照相比提高10.76倍。

## 关键词

海洋胶红酵母, 鉴定, 甘露聚糖, 类胡萝卜素

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

类胡萝卜素是一类 8 个类异戊二烯基本单位构成的碳氢化合物及其氧化衍生的脂溶性萜烯类化合物,呈现黄色、橙红色或红色,已被广泛应用于食品、保健品和医药等领域[1] [2]。类胡萝卜素的多烯链赋予其抗氧化的特性,能够氧化单线态氧从而保护机体免受氧化损伤,具有抗氧化和防癌等生物学功效。大部分动物和人类不能自行合成类胡萝卜素,因此需要从食物中摄取类胡萝卜素,类胡萝卜素的来源多为植物和微生物[3]。微生物生产类胡萝卜素与从富含类胡萝卜素的植物中提取相比,不受季节和生物量限制,且植物含水量较高导致类胡萝卜素提取效率较低[4] [5],因此微生物已成为类胡萝卜素的主要资源来源。过去的几十年中,人们开发了物理或化学方法进行类胡萝卜素提取工艺,以期提高类胡萝卜素的提取效率,但是类胡萝卜素的抗氧化特性限制了其长时间暴露于热、光、酸等条件,类胡萝卜素的提取效率依旧较低,例如从红酵母中提取类胡萝卜素的提取率为 50~350  $\mu\text{g/g}$  CDW。从微生物中提取类胡萝卜素的限制因素主要为类胡萝卜素从细胞/细胞壁中释放及有机溶剂的萃取,酶解细胞为一种新型的细胞破壁可提高类胡萝卜素释放的方法,且酶的作用条件相对温和,对类胡萝卜素破坏作用较小。甘露聚糖是一种无色无味的以  $\alpha$ -1,6 糖苷键为主链  $\alpha$ -1,2 或  $\alpha$ -1,3 糖苷键为支链的高度分支的功能性多糖[6],可免受肠道消化酶的水解[7];甘露聚糖主要存在于酵母细胞壁外层,与膜蛋白共价结合,约占细胞壁干重的 40%,具有抗肿瘤、抗辐射和抗氧化等功能,能够显著增强机体免疫力,刺激肠道益生菌生长及功效发挥;此外,甘露聚糖可作为天然的防腐剂,可在果蔬表面形成薄膜有效隔绝氧气和减少水分蒸发,并抑制果蔬表面微生物的生长繁殖从而保障果蔬保鲜。甘露聚糖主要来源于植物和酵母细胞壁,开发酵母源甘露聚糖可综合性利用酵母资源提高其附加值同时可解决工业废酵母的无害化处理问题。植物源甘露聚糖的提取多采取酸碱法,对环境有一定的污染,酵母源甘露聚糖的提取目前尚处于实验室阶段,并未形成成型的工艺,张澎湃等采用自溶法破碎啤酒废酵母细胞并通过热水浸提酵母甘露聚糖[8]。红酵母是一类广泛分布于水域、细胞呈现红色或黄色的微生物,细胞富含类胡萝卜素和甘露聚糖,培养过程营养要求简单,因此红酵母成为了联合提取类胡萝卜素和甘露聚糖的重要微生物资源。甘露聚糖位于细胞外壁,类胡萝

卜素为红酵母的胞内色素，因此，破碎细胞成为从红酵母中提取类胡萝卜素和甘露聚糖的障碍，本文以从渤海湾水域分离得到的一株海洋红酵母为研究材料，对其进行菌株的鉴定，并开展酶法破壁提取类胡萝卜素和甘露聚糖的研究。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 菌株及主要试剂

海洋红酵母 ZOR1：从渤海湾水域分离，光学显微镜下直径为 4~5  $\mu\text{m}$  酵母，菌落为橘红色，保存于本实验室。蜗牛酶(Ruibio)与胰蛋白酶(Phygene)为生物纯级；酵母菌基因组提取试剂盒(DP6201)购自 BioTeke，酵母菌 IST 序列扩增引物和 IST 序列测序由北京三博远志生物技术有限责任公司完成。

### 2.2. 试验方法

#### 2.2.1. 海洋红酵母鉴定

挑取斜面培养的海洋红酵母接入到改良 LB 培养基中(g/L: 酵母浸膏粉 5, 蛋白胨 10, NaCl 30, pH 自然, 121 $^{\circ}\text{C}$  灭菌 20 min), 30 $^{\circ}\text{C}$ 、180 rpm 摇床振荡培养 24 h。取 1 ml 培养液于 10,000 g 室温下离心 1 min, 弃上清收集海洋红酵母菌体；采用酵母 DNA 提取试剂盒提取海洋红酵母总 DNA, 利用酵母 IST 引物(primer: 1 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'; primer: 2 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')和提取的 ZOR1 总 DNA 扩增酵母 IST 序列, PCR 产物测序后, 将测序拼接的序列进行 BLAST 比对并利用 GEGA6.0 软件建立菌株系统发育进化树。

#### 2.2.2. 生物酶破壁并提取甘露聚糖和类胡萝卜素及测定

##### 1) 甘露聚糖的提取

挑取活化好的海洋红酵母单菌落于改良的 LB 液体培养基中, 180 rpm 30 $^{\circ}\text{C}$  培养 48 h, 10,000 g 离心 3 min 收集海洋红酵母菌体 ZOR1, 向海洋红酵母 ZOR1 菌体中加入山梨醇缓冲液配置的 3% 蜗牛酶溶液(1:2, m/v), 37 $^{\circ}\text{C}$  水浴处理 1 h; 酶作用结束后, 10,000 g 离心 3 min, 弃去上清并收集细胞碎片; 向细胞碎片中加入等质量的蒸馏水, 30 $^{\circ}\text{C}$  水浴处理 30 min, 10,000 g 离心 3 min 取上清, 获得富集于水相的甘露聚糖溶液, 在收集的水相中加入无水乙醇(1:5, v/v)4 $^{\circ}\text{C}$  醇沉 25 h, 10,000 g 离心 3 min 获得甘露聚糖沉淀粗品; 向甘露聚糖沉淀中加入 5 倍质量的蒸馏水溶解, 加入三氯乙酸至终浓度 10% (m/v), 置于冰上 30 min, 然后于 4 $^{\circ}\text{C}$  10,000 g 离心 3 min, 上清为含有甘露聚糖的溶液。

##### 2) 甘露聚糖的测定

取提取的甘露聚糖溶液 1 ml, 加入 57  $\mu\text{l}$  硫酸并于 100 $^{\circ}\text{C}$  水浴水解 7 h 然后定容至 100 ml; 取两支试管 A 和 B, 在 A 试管中加入 0.2 ml 样品, 0.2 ml NaCl-H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 溶液(12 g NaCl + 2 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 定容至 100 ml) 和 0.1 ml 蒸馏水; 在 B 试管中加 0.2 ml 甘露糖溶液(样品)和 0.3 ml 蒸馏水。然后各加入浓 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4.5 ml 轻轻摇匀, 立刻置入 70 $^{\circ}\text{C}$  水浴中, 准确计时 25 min, 取出用自来水冷却至室温。以蒸馏水为空白, 在 280 nm 处测得吸光值 OD<sub>A</sub>、OD<sub>B</sub>, 二者之差为  $\Delta\text{OD}$  [9] (计算公式中的  $x$ ), 甘露聚糖提取量可通过公式(1)计算得到:

$$\text{甘露聚糖含量 } y \left( \frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) = (x - 0.0384) \times 1000 \div 859.39 \div 0.486 \quad (1)$$

##### 3) 类胡萝卜素的提取及测定

向提取甘露聚糖离心得到的细胞碎片中加入丙酮 1:20 (m/v), 35 $^{\circ}\text{C}$  下浸提 30 min, 重复三次, 10,000 g 离心 10 min 获得提取液并将三次提取液合并得到类胡萝卜素提取液, 测定合并液在 470 nm 的吸光值并通过(2)计算类胡萝卜提取量。

$$\text{类胡萝卜素含量 } y \left( \frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) = (x + 0.0013) \div 53.84 \times 7.56 \times 10 \div 0.486 \quad (2)$$

两阶段酶解破壁时,向提取甘露聚糖后的细胞碎片中加入 0.6% 的蛋白酶,37℃ 水浴 30 min 后再加入丙酮 1:20 (v/v),35℃ 下浸提 30 min,重复三次,10,000 g 离心 10 min 获得提取液并将三次提取液合并得到类胡萝卜素提取液进行测定和计算。

### 3. 结果与讨论

#### 3.1. 海洋红酵母 ZOR1 的鉴定

提取的海洋红酵母 ZOR1 总 DNA 作模板 PCR 扩增其 IST 序列,电泳结果表明扩增的 IST 序列约为 700 bp (图 1)。

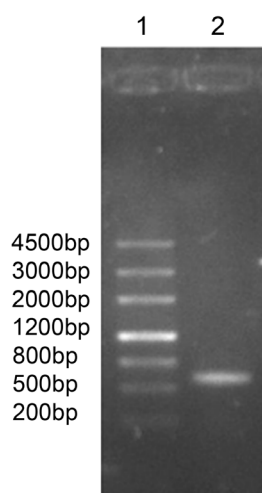


Figure 1. Amplified IST sequence of ZOR1

图 1. ZOR1 菌株 IST 序列 PCR 扩增图

将 PCR 产物进行测序并将测序得到的序列拼接,对拼接后序列进行 BLAST 比对,并采用邻接法建立其系统发育进化树(图 2),该海洋红酵母菌株鉴定为海洋胶红酵母,并将其命名为 *Rhodotorula mucilaginosa* ZOR1,该菌株保存于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏号为 CGMCC18364。

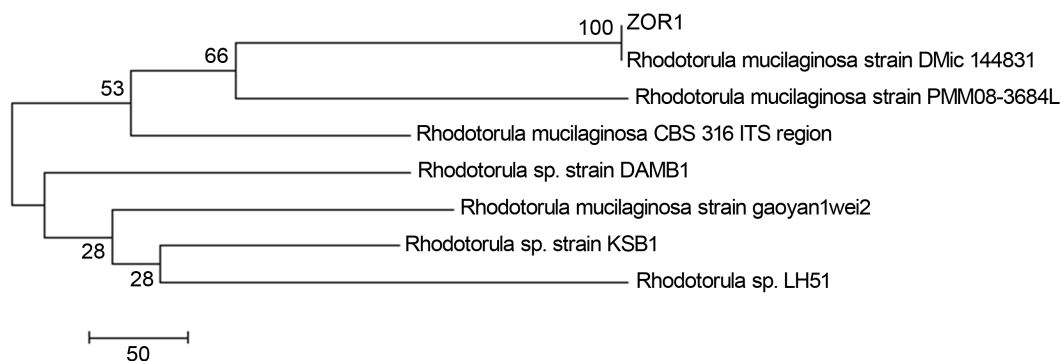
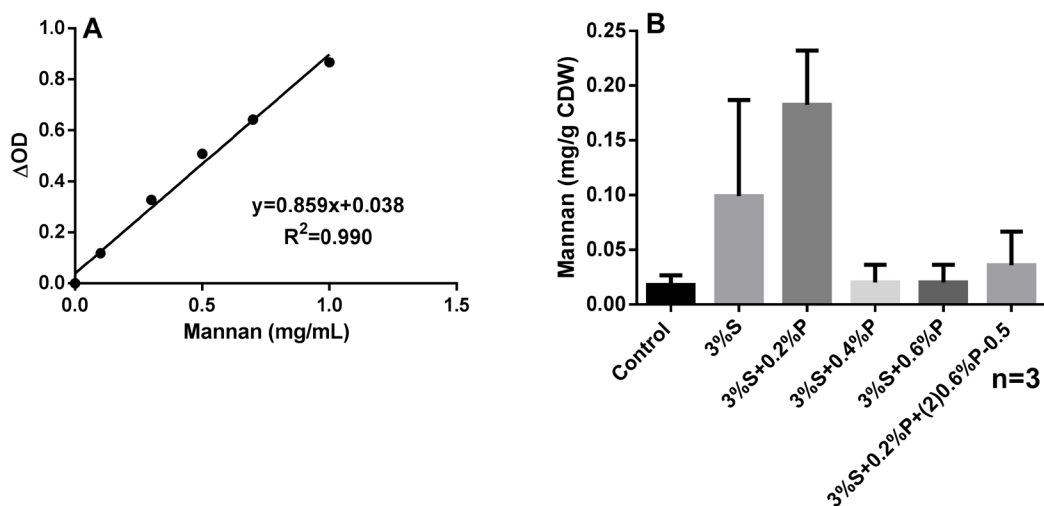


Figure 2. Phylogenetic tree of *R. mucilaginosa* ZOR1

图 2. *R. mucilaginosa* ZOR1 系统发育进化树

### 3.2. 生物酶破壁提取甘露聚糖和类胡萝卜素

甘露聚糖位于酵母细胞外壁，与蛋白结合在一起，因此细胞壁破碎有助于甘露聚糖的释放；同时细胞壁阻碍有机溶剂进入细胞溶解类胡萝卜素，因此从微生物细胞中提取甘露聚糖类胡萝卜素通常会对细胞进行物理或化学的预处理以消除细胞壁的物理障碍[10]。甘露聚糖水溶性较高尤其是热水中，孔凌云等采用热水浸提法进行甘露聚糖的提取[11]。Michelon 等人的研究结果表明细胞壁的有效破坏将使类胡萝卜素的提取率提高 8~10 倍[12] [13]。酶法破壁反应条件温和，操作简单易行且不易破坏提取的目标产物，是目前从微生物细胞内提取目标产物常用的破壁方法[14]。蜗牛酶是来自于蜗牛消化道的混合酶，富含纤维素酶、果胶酶和蛋白酶等二十多种酶，可用于酵母细胞壁的破碎；酵母细胞壁中的多糖多数都是与蛋白结合形成糖蛋白结构，因此本研究采用蜗牛酶对 *R. mucilaginosa* ZOR1 细胞壁进行酶解处理，同时辅以蛋白酶共同作用。类胡萝卜素提取的溶剂选择多种多样，通常丙酮、二氯甲烷、乙醇和正己烷等分别用于提取极性和非极性类胡萝卜素，但是工业过程中考虑有机溶剂对人和环境的影响，则大多选择丙酮和乙醇作为类胡萝卜素提取溶剂而非选择正己烷和二氯甲烷等有机溶剂[15] [16]。本研究选择使用蜗牛酶和蛋白酶进行细胞破壁后，先水提甘露聚糖然后丙酮提取类胡萝卜素，结果表明当蜗牛酶浓度为 3%、蛋白酶浓度为 0.2% 作用 *R. mucilaginosa* ZOR1 细胞破壁时，甘露聚糖提取量可达 183  $\mu\text{g/g}$  CDW，是无酶作用的对照甘露聚糖的提取量的 10.36 倍，是 3% 蜗牛酶作用甘露聚糖提取率的 1.84 倍(图 3)；随着蛋白酶浓度的继续增加则甘露聚糖的提取率呈现下降的趋势，分析原因可能为蛋白酶浓度增加对蜗牛酶有水解作用导致酵母菌细胞破壁效率下降从而导致甘露聚糖提取率下降。

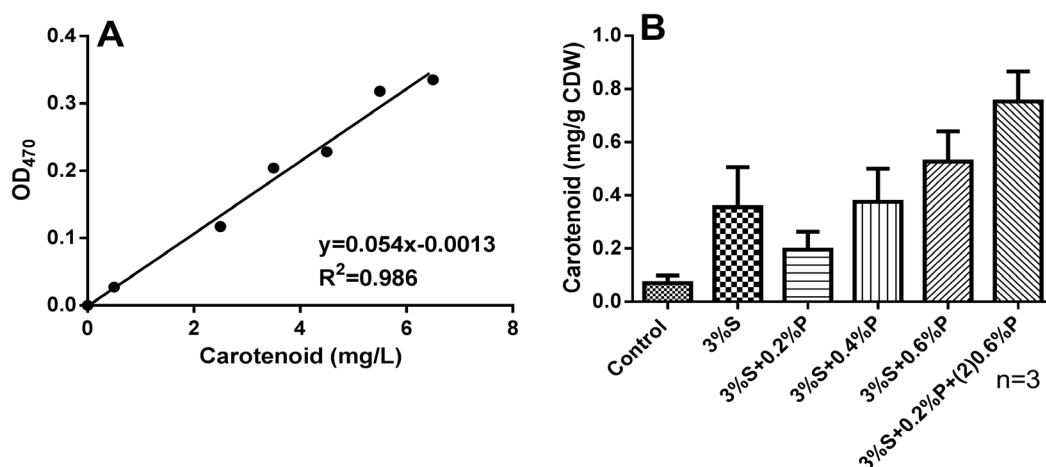


**Figure 3.** Effect of enzyme concentration on mannan extraction from *R. mucilaginosa* ZOR1. A: Standard curve of mannan, B: Effect of enzyme on mannan extraction (S and P indicated snailase and proteinase, respectively), 3% S + 0.2% P + (2) 0.6% P indicated that *R. mucilaginosa* ZOR1 lysis occurred with 3% snailase and 0.2% proteinase for 60 min and then with 0.6% proteinase for another 30 min

**图 3.** 酶浓度对 *R. mucilaginosa* ZOR1 甘露聚糖提取的影响。A: 甘露聚糖标准曲线, B: 酶作用对 *R. mucilaginosa* ZOR1 甘露聚糖提取的影响(S 和 P 分别表示蜗牛酶和蛋白酶), 3% S + 0.2% P + (2) 0.6% P 表示 3% 蜗牛酶 + 0.2% 蛋白酶先作用海洋胶红酵母 *R. mucilaginosa* ZOR1 细胞破壁, 提取甘露聚糖后的细胞碎片在此用 0.6% 的蛋白酶作用 30 min

结果表明加入生物酶破壁后类胡萝卜素提取率都有不同程度的提高, 3% 蜗牛酶作用破壁后的类胡萝卜素提取率是对照的 5.07 倍, 双酶作用随着蛋白酶浓度的增加类胡萝卜素的提取率增加, 当 3% 蜗牛酶和 0.6% 蛋白酶作用 *R. mucilaginosa* ZOR1 时, 类胡萝卜素提取率最高, 为对照的 7.53 倍。此外, 3% 蜗牛酶 + 0.2% 蛋白酶作用提取甘露聚糖后的细胞继续使用 0.6% 蛋白酶作用 30 min, 类胡萝卜素的提取率继

续增加,为对照类胡萝卜素提取率的 10.76 倍,表明两阶段酶处理 *R. mucilaginosa* ZOR1 细胞有助于类胡萝卜素的提取(图 4)。



**Figure 4.** Effect of enzyme concentration on carotenoid extraction from *R. mucilaginosa* ZOR1. A: Standard curve of carotenoid, B: Effect of enzyme on carotenoid extraction (S and P indicated snailase and proteinase, respectively), 3%S + 0.2%P + (2)0.6%P indicated that *R. mucilaginosa* ZOR1 lysis occurred with 3% snailase and 0.2% proteinase for 60 min and then with 0.6% proteinase for another 30 min

**图 4.** 酶作用对 *R. mucilaginosa* ZOR1 类胡萝卜素提取的影响。A: 类胡萝卜素标准曲线, B: 酶浓度对 *R. mucilaginosa* ZOR1 类胡萝卜素提取的影响(S 和 P 分别表示蜗牛酶和蛋白酶), 3% S + 0.2% P + (2) 0.6% P 表示 3% 蜗牛酶 + 0.2% 蛋白酶先作用海洋胶红酵母 *R. mucilaginosa* ZOR1 细胞破壁, 提取甘露聚糖后的细胞碎片在此用 0.6% 的蛋白酶作用 30 min

#### 4. 结论

本文对从渤海海域筛选得到的一株海洋红酵母 ZOR1 的 IST 序列扩增测序和进化树建立, 鉴定 ZOR1 为海洋胶红酵母, 命名为 *Rhodotorula mucilaginosa* ZOR1; 3% 蜗牛酶和 0.2%~0.6% 不同浓度蛋白酶作用 *R. mucilaginosa* ZOR1 后水提甘露聚糖和丙酮提取类胡萝卜素结果表明: 3% 蜗牛酶 + 0.2% 蛋白酶作用 *R. mucilaginosa* ZOR1 后甘露聚糖提取率最高为对照的 10.36 倍, 此条件下类胡萝卜素的提取率为对照的 2.79 倍; 提取甘露聚糖后的细胞进一步使用 0.6% 蛋白酶作用, 类胡萝卜素提取率达到最高, 为对照的 10.76 倍。

#### 基金项目

本项目由大学生创新训练计划项目资助(项目编号: CXXL2018397)。

#### 参考文献

- [1] Chandi, G. and Gill, B. (2011) Production and Characterization of Microbial Carotenoids as an Alternative to Synthetic Colors: A Review. *International Journal of Food Properties*, **14**, 503-513. <https://doi.org/10.1080/10942910903256956>
- [2] Corol, D., et al. (2002) Diversity of Biological Functions of Carotenoids. *Romanian Biotechnological Letter*, **8**, 1067-1074.
- [3] Moran, N.A. and Jarvik, T. (2010) Lateral Transfer of Genes from Fungi Underlies Carotenoid Production in Aphids. *Science*, **328**, 624-627. <https://doi.org/10.1126/science.1187113>
- [4] Saini, R.K. and Keum, Y.S. (2018) Carotenoid Extraction Methods: A Review of Recent Developments. *Food Chemistry*, **240**, 90-103. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.099>
- [5] Durante, M., Lenucci, M.S. and Mita, G. (2014) Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Carotenoids from Pumpkin (*Cucurbita* spp.): A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, **5**, 6725-6740. <https://doi.org/10.3390/ijms15046725>

- 
- [6] Oyamada, H., *et al.* (2008) Structural Analysis of Cell Wall Mannan of *Candida sojae*, a New Yeast Species Isolated from Defatted Soybean Flakes. *Archives of Microbiology*, **189**, 483-490. <https://doi.org/10.1007/s00203-007-0339-1>
- [7] Gomez, B., *et al.* (2017) Manufacture and Properties of Glucomannans and Glucomannooligosaccharides Derived from Konjac and Other Sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **65**, 2019-2031. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b05409>
- [8] 张澎湃, 毕赞文, 钟详, 等. 啤酒酵母来源甘露聚糖的环境友好型提取工艺研究[J]. 化学研究, 2019, 30(1): 72-75.
- [9] 张运涛, 谷文英. 紫外分光光度法测定啤酒酵母中甘露糖[J]. 食品与发酵工艺, 1999, 25(2): 32-36.
- [10] Pasquet, V., *et al.* (2011) Study on the Microalgal Pigments Extraction Process: Performance of Microwave Assisted Extraction. *Process Biochemistry*, **46**, 59-67. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.07.009>
- [11] 孔凌云, 史咏华, 吴炜. 从啤酒废酵母中提取甘露聚糖的工艺条件优化[J]. 食品与机械, 2014, 30(5): 216-219.
- [12] Michelon, M., *et al.* (2012) Extraction of Carotenoids from *Phaffiarhodozyma*: A Comparison between Different Techniques of Cell Disruption. *Food Science and Biotechnology*, **21**, 1-8. <https://doi.org/10.1007/s10068-012-0001-9>
- [13] Uquiche, E., Antilaf, I. and Millao, S. (2016) Enhancement of Pigment Extraction from *B. braunii* Pretreated Using CO<sub>2</sub> Rapid Depressurization. *Brazilian Journal of Microbiology*, **47**, 497-505. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.01.020>
- [14] Mezzomo, N., *et al.* (2011) Pink Shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) Residue: Influence of Extraction Method on Carotenoid Concentration. *Talanta*, **85**, 1383-1391. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.06.018>
- [15] Alfonsi, K., *et al.* (2008) Green Chemistry Tools to Influence a Medicinal Chemistry and Research Chemistry Based Organisation. *Green Chemistry*, **10**, 31-36. <https://doi.org/10.1039/B711717E>
- [16] Capello, C., Fischer, U. and Hungerbuehler, K. (2007) What Is a Green Solvent? A Comprehensive Framework for the Environmental Assessment of Solvents. *Green Chemistry*, **9**, 927-934. <https://doi.org/10.1039/b617536h>