

# Optimization of Conditions of Carotenoid Production by *Rhodotorula mucilaginosa*

Yin-Feng Chen, Yuan-Tay Shyu, Sz-Jie Wu\*

Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University, Taipei Taiwan  
Email: \*chiehwu@ntu.edu.tw

Received: Jan. 27<sup>th</sup>, 2017; accepted: Feb. 13<sup>th</sup>, 2017; published: Feb. 16<sup>th</sup>, 2017

## Abstract

Carotenoids are natural pigments found in many fruits and vegetables. These important nutrients play significant roles in mental and physical health of humans. The advantages of microbial production of carotenoids are short cycles, easy to retrieve, and not affected by climate. For this study, a colony of pigment-producing red yeast, *Rhodotorula mucilaginosa*, was screened from fruits and vegetables as a strain of fungi with the potential to produce carotenoids. This study discussed the optimization of carotenoid production in *Rhodotorula mucilaginosa*. A 0.1% inoculum of the yeast was shaken in a shake flask at 125 rpm. The controlled conditions of culture were the following: temperature, 27.5°C; pH 5.0; carbon source, 15 g/L glucose; and nitrogen source, 2.5 g/L yeast extract. The optimal time for pigment collection was 24 hours after the yeast had reached the stationary phase of growth. Pigment production was 1469.29  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . When a culture is subjected to stress, its biomass and physiological metabolism changes. Therefore, after the culture had reached the stationary phase of growth, different amounts of stress were applied to obtain higher pigment accumulation. The stress conditions tested included a six-hour short-term high temperature of 37°C, a six-hour short-term low temperature of 10°C, and cultivation at a sustained low temperature of 22.5°C. The results showed that short-term temperature changes could not effectively increase pigment accumulation in yeast cells. After 72 hours of incubation, continued cultivation at a sustained low temperature of 22.5°C could increase pigment production to a maximum of 1533.27  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . High pigment production was prolonged and sustained, while degradation of pigment slowed. The results of this study can potentially be used in future in continuous fermentation to extend high pigment yield times and sustain pigment production.

## Keywords

*Rhodotorula mucilaginosa*, Carotenoids

# 胶红酵母生产类胡萝卜素最适化探讨

陈尹丰, 徐源泰, 吴思节\*

台湾大学园艺暨景观学系, 台湾 台北

\*通讯作者。

## 摘要

类胡萝卜素为许多蔬果所具有的天然色素, 是重要营养物质并对于人体身心健康扮演重要角色。以微生物生产色素具有短周期、易于回收且不受气候影响等优势。本研究自蔬果中, 筛选得一个产色菌落为胶红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*), 为一株具有生产类胡萝卜素潜力之真菌。研究中探讨生产类胡萝卜素最适化探讨, 以接种量0.1%、转速125 rpm摇瓶培养, 控制条件温度于27.5℃、pH 5.0、碳源为15 g/L Glucose、氮源为2.5 g/L Yeast extract条件下, 菌生长到静止期(stationary phase)后24小时为最佳色素收菌时间, 可得1469.29 µg/L色素产量。当菌株给予逆境刺激可改变菌株培养的生物量和其生理代谢, 待菌体生长至稳定期后, 给予不同逆境处理, 以期得到较高的色素累积量, 试验以短时高温37℃逆境六小时、短时低温10℃逆境六小时和持续低温22.5℃培养。研究得知, 短时温度变化无法有效提升菌体色素产量的累积, 而培养72小时后, 再以22.5℃持续培养, 可提升色素产量最高至1533.27 µg/L, 并延长维持色素之高产量且减缓菌体色素的降解, 此研究结果应用于未来连续发酵生产上, 可延长色素高收率时间与维持色素产量的潜力。

## 关键词

胶红酵母, 类胡萝卜素

Copyright © 2017 by authors 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

食用色素为食品添加剂功能分类下之重要着色剂, 依来源不同可分为两大类: 人工色素和天然色素, 食用天然色素主要是从动植物细胞和微生物细胞中分离萃取而来。在天然食用色素里类胡萝卜素(Carotenoids)是一类呈现淡黄、橙色至深红色的天然色素。大部分约为四十个碳原子组成的多烯类化合物, 主结构单元为异戊二烯, 具有抗氧化特性、预防心血管疾病、增强免疫功能等生物活性[1], 依不同目的, 常添加于动物饲料、保健食品、化妆品中。在目前日益重视食品、药品的天然、无毒、健康等要求下, 天然类胡萝卜素的需求于全球市场上占一定重要性。

因近年来消费者对于合成色素的疑虑, 使得食品工业渐渐以天然色素来取代合成色素[2]。一般情况下, 天然色素多由植物材料萃取, 而其他如昆虫、藻类、细菌、真菌亦为类胡萝卜素的萃取来源[3]。其中, 利用微生物发酵生产类胡萝卜素具营养需求简单、生长周期短、易调控生长条件、不受外在自然环境影响等优点[4], 使得利用微生物生产多样化色素之相关研究相继展开[5] [6]。故以微生物发酵法生产食用天然色素将可能成为色素食品添加剂的重要来源。

目前已商业化生产类胡萝卜素之菌株, 为三孢布拉霉菌(*Blakeslea trispora*) [7]经研究证实无细胞毒性, 是唯一在俄罗斯(Russia)、乌克兰(Ukraine)、西班牙(Spain)等国家先行实施工业化生产的菌株。但因发酵过程复杂在色素生产的过程上难度增加[8] [9]。故研究者陆续开发其他具有产类胡萝卜素潜力之微生物,

以期降低培养过程中之生产成本和发酵问题。

研究从蔬果中分离纯化具产色能力的胶红酵母菌，以作为类胡萝卜素之生产来源。并进行生产类胡萝卜素最适化条件探讨以确立培养时间、pH 值、温度、碳源、氮源，同时探讨变温逆境条件对生物量、色素含量、色素产量的影响。

## 2. 材料与amp;方法

### 2.1. 材料

胶红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*)菌株，本实验室由葡萄柚(*Citrus paradisi*)果实中纯化分离而得，以基因组中 rDNA ITS 区域片段设计之引子组 ITS1 与 ITS4，对红色菌株 DNA 进行扩增。此引子放大片段大小为 700 bp，将扩增定序出的 DNA 序列与 GenBank 数据库进行比对，与 *Rhodotorula mucilaginosa* 菌株达 100% 相似度。

### 2.2. 最适化培养

试验采用单因子设计探讨，将基础培养基 PDB(Potato Dextrose Broth)的结果作为未调整之原条件，以作后续优化比较。

#### 2.2.1. 最适收菌时间

接种 0.1% 经 48 小时活化培养之胶红酵母菌配(yeast starter)至三角支架摇瓶中，依真菌培养基 PDB (Potato Dextrose Broth)进行培养，设置回转式震荡恒温培养箱温度 30℃、转速 125 rpm，每隔 12 小时取样一次，进行吸光值 OD600 测定、菌体干重、培养基终 pH 值及色素含量测定，经上述分析结果，以求出最适收菌时间。

#### 2.2.2. 最适培养温度

以 22.5、25、27.5、30、32.5℃ 温度范围进行培养，每隔 12 小时取样一次，进行吸光值 OD600 测定、菌体干重、培养基终 pH 值及色素含量(Carotenoids content)测定。

#### 2.2.3. 最适培养碳源

设定液态培养基之总体积为 50 mL，分别以蔗糖(Sucrose)、乳糖(Lactose)、麦芽糖(Maltose)、果糖(Fructose)、葡萄糖(Glucose)、半乳糖(Galactose)作为碳源，碳源浓度皆为 15 g/L。

#### 2.2.4. 最适培养氮源

设定液态培养基之总体积为 50 mL，分别以酵母萃取物(Yeast extract)、硫酸铵(Ammonium sulfate)作为氮源，氮源浓度皆为 2.5 g/L。

### 2.3. 变温逆境探讨

#### 2.3.1. 短时高温

以转速 125 rpm，最适温度 27.5℃ 将菌体培养至稳定期，给予 6 小时 37.5℃ 高温刺激后，回复最适温度 27.5℃ 培养，每隔 12 小时取样一次，进行吸光值 OD600 测定、菌体干重、培养基终 pH 值及色素含量测定。

#### 2.3.2. 短时低温

以转速 125 rpm，最适温度 27.5℃ 将菌体培养至稳定期，给予 6 小时 10℃ 低温刺激后，回复最适温度 27.5℃ 培养，每隔 12 小时取样一次，进行吸光值 OD600 测定、菌体干重、培养基终 pH 值及色素含量

测定。

### 2.3.3. 持续低温

以最适温度 27.5℃将菌体培养至稳定期，持续给予 22.5℃低温培养直至收菌完成。

## 2.4. 生物量测定

菌液进行离心(9,500 rpm, 4℃, 10 min)，分离上清液，以 ddH<sub>2</sub>O 轻轻润洗菌块，倒去润洗菌块水，注入绝对酒精使菌块表面剩余水分挥发，将菌块放至-80℃ 冷冻隔夜，以冷冻干燥机冻干后秤得菌体干重。

生物量(Biomass)(g/L) = 菌体干重(g)/培养基(L)

## 2.5. 色素萃取

依据 Michelon 等人利用 DMSO 与丙酮进行萃取[10]。DMSO 可提升细胞通透性，均质震荡一小时，进行离心(10,000 rpm, 4℃, 10 min)，收集上清液至新的离心管，若胶红酵母细胞沉淀物(pellet)尚有颜色，则再注入新的 DMSO。纪录所添加 DMSO 的量，重复上述步骤直至菌块呈现微白透明。

## 2.6. 色素含量测定

将所萃取出之色素取 200 μL 至 96 well flat-bottom microtiters plates 中，分析 475 nm 波长下之吸光值，依数值代入公式，即为色素含量

Carotenoid yield (μg/g of dry yeast) = (A<sub>λmax</sub>) × D × V/E × W

A<sub>λmax</sub>: 测定最大吸收波长 475 nm 之吸光值

D: 样本稀释倍数

V: 萃取溶液体积(mL)

E: 类胡萝卜素莫耳消化系数(molar extinction coefficient) (0.16 mol<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>)

W: 秤取萃色干菌体质量(g)

## 2.7. 产量计算

将计算所得总类胡萝卜素含量(μg/g)和生物量(Biomass)(g/L)相乘积，即可得到总类胡萝卜素产量(μg/L)。

Carotenoid content (μg/g) × Biomass (g/L) = production (μg/L)

## 2.8. 统计分析

实验结果以平均值 ± 平均标准偏差(mean ± SEM)表示，数据以 Statistical Analysis System (SAS) V.9.4 版软件执行单向变异分析(one-way ANOVA)，并以邓肯氏多变域测法(Duncan's Multiple Range Test)比较各处理组间平均值是否有显著差异。

# 3. 结果与讨论

## 3.1. 色素光谱分析

本试验将色素萃取液进行全光谱扫描，在波长 287 nm 有最高之吸光值，与 Von Oppen-Bezalel 所研究之各色素在不同波段的吸光值之特性结果相同[11] (图 2)，皆在 287 nm 下有一最高吸收峰，故在定性方面初步判定为八氢西红柿红素(Phytoene)。文献指出，八氢西红柿红素(Phytoene)属于无色类胡萝卜素，可作为 SPF 促进剂，具有抗紫外线刺激、抗眼部衰老、保护肌肤减少色斑的产生、美白等功效[12]。

而实际放入检测之胶红酵母色素萃取液为红色，故色素除八氢西红柿红素之外，尚有其他色素于其中。文献指出，胶红酵母菌可能包含 $\beta$ -胡萝卜素、圆酵母素、红酵母红素等[13]。

### 3.2. 最适培养条件

胶红酵母菌(*Rhodotorula mucilaginosa*)在培养初期菌体生长速度较快。当胶红酵母菌被接种至新的培养基中，菌体的生长随时间的变化情形呈现典型的生长曲线。随着培养时间变化培养时间 0~3 小时即诱导期(Lag phase)结束，随即 3~36 小时进入对数生长期(Log phase)，直至 48 小时进入平稳期(stationary phase)。在平稳期，菌体生长速率等于死亡速率，呈现动态平衡，胶红酵母菌细胞的总体数量无增加，且平稳期的细胞具有与对数期细胞不同的化学组成，于 72 小时有一色素累积高峰为最佳收菌时间。将胶红酵母菌(*Rhodotorula mucilaginosa*)于 20℃~40℃以 5℃为组距的培养实验中发现，在不同温度下菌落生长结果以温度 25℃、30℃生长较旺盛，温度下至 20℃则生长缓慢，而上至 35℃即停滞生长，40℃以上无生长迹象。故再将适温度设置为 25℃~32.5℃组距缩小为 2.5℃，进行培养，以期得到最适温度条件。分析结果，以生物量(Biomass)和类胡萝卜素含量在 27.5℃表现较佳，其色素含量为 210.93 ( $\mu\text{g/g}$ )、生物量 4.49 (g/L) (图 1)，菌体在 27.5℃下培养、色素产量 934.25 ( $\mu\text{g/L}$ ) (图 2)皆有最佳表现。故后续以 27.5℃作为最适温度条件进行试验。

最适碳源研究由图 3、图 4 得知，单糖培养胶红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*)的色素含量(Carotenoids content)依序为 fructose 184.02 ( $\mu\text{g/g}$ )、glucose 206.98 ( $\mu\text{g/g}$ )、galactose 191.36 ( $\mu\text{g/g}$ )；双糖的类胡萝卜素

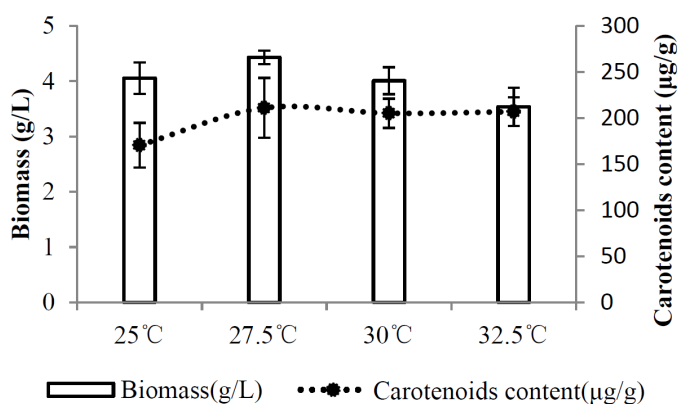


Figure 1. Effect of temperature on carotenoids content and biomass by *Rhodotorula mucilaginosa*

图 1. 温度对胶红酵母生物量及类胡萝卜素含量之影响

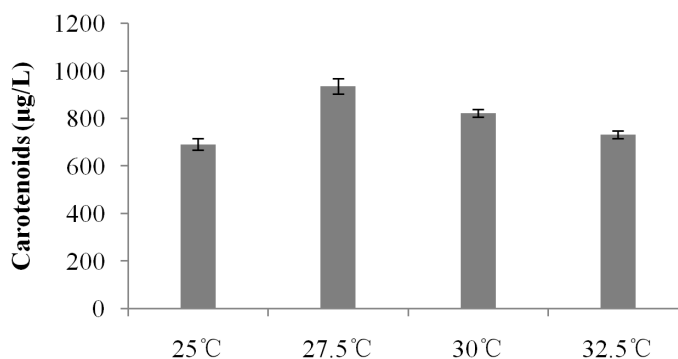
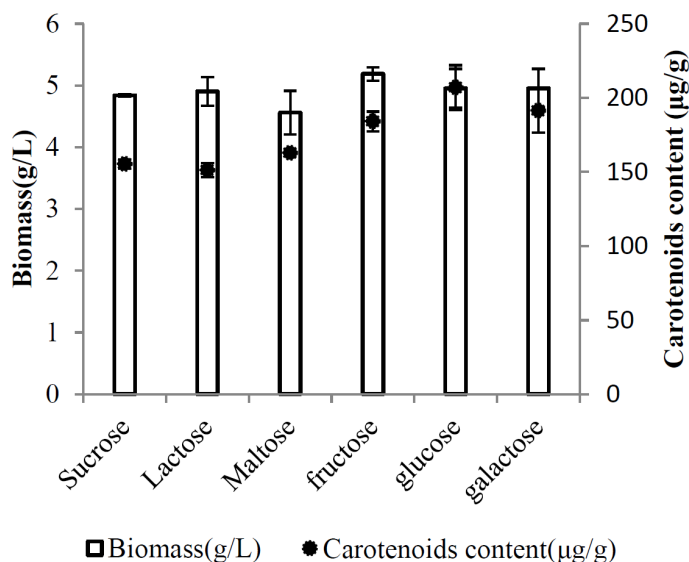
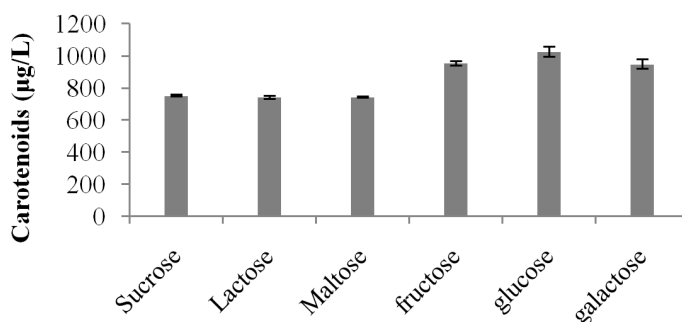


Figure 2. Effect of temperature on production of carotenoids by *Rhodotorula mucilaginosa*

图 2. 温度对胶红酵母类胡萝卜素含量之影响



**Figure 3.** Effect of different carbon sources on carotenoids content and biomass by *Rhodotorula mucilaginosa*  
**图 3.** 不同碳源对胶红酵母生物量和类胡萝卜素含量之影响



**Figure 4.** Effect of different carbon sources on production of carotenoids by *Rhodotorula mucilaginosa*  
**图 4.** 不同碳源对胶红酵母类胡萝卜素产量之影响

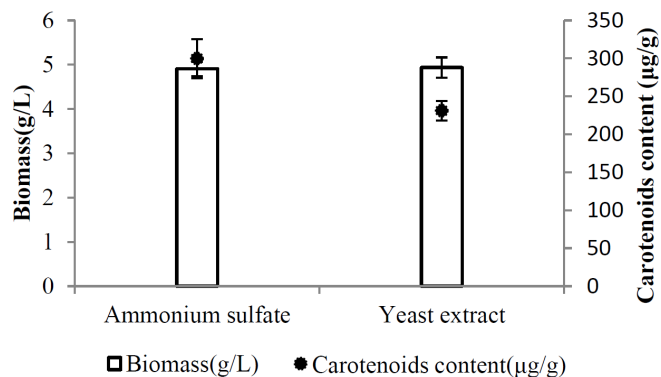
含量(Carotenoids content)依序为 Sucrose 155.34 (µg/g)、Lactose 151.17 (µg/g)、Maltose 162.82 (µg/g), 单糖培养在菌体色素含量(Carotenoids content)皆优于双糖, 推论碳源在单糖使用上对胶红酵母有较好的利用性。菌体在单糖 glucose 下培养, 其类胡萝卜素含量、生物量(Biomass)表现较佳, 且色素产量 1025.25 (µg/L) 为各碳源中最高。

最适氮源研究由图 5、图 6 得知, 菌体在 Ammonium sulfate 下培养, 其色素含量为 299.53 (µg/g)、生物量(Biomass) 4.91 (g/L)、色素产量 1139.44 (µg/L)皆有中上的表现。而菌体在 Yeast extract 下培养, 其色素含量为 231.00 (µg/g)、生物量(Biomass) 4.93 (g/L)、色素产量 1469.29 (µg/L)具有比 Ammonium sulfate 更好的表现。

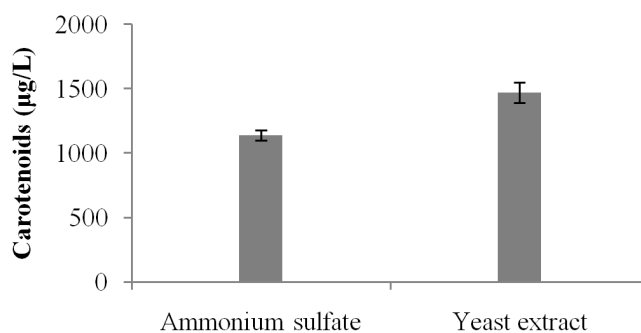
将最适条件整合后进行动态生长曲线测定(图 7), 即温度 27.5℃、pH 5、葡萄糖(glucose)浓度为 15 g/L 作碳源、酵母萃取物(Yeast extract)浓度为 2.5 g/L 作氮源于于 84 小时有最高色素产量 1494.67 (µg/L), 与未优化时的最高色素产量 1104.63 (µg/L)比较, 优化后色素产量有 26.1%的增幅。

### 3.3. 变温逆境条件探讨

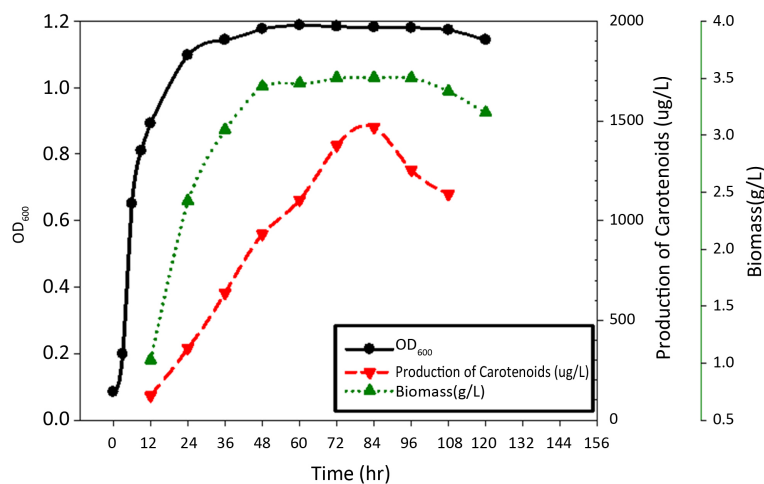
于最适条件培养至 72 小时后, 给予 37.5℃之短时高温逆境 6 小时, 对胶红酵母之生长无显著变化。



**Figure 5.** Effect of different inorganic nitrogen and organic nitrogen sources on carotenoids content and biomass by *Rhodotorula mucilaginosa*  
**图 5.** 不同氮源对胶红酵母生物量和类胡萝卜素含量之影响



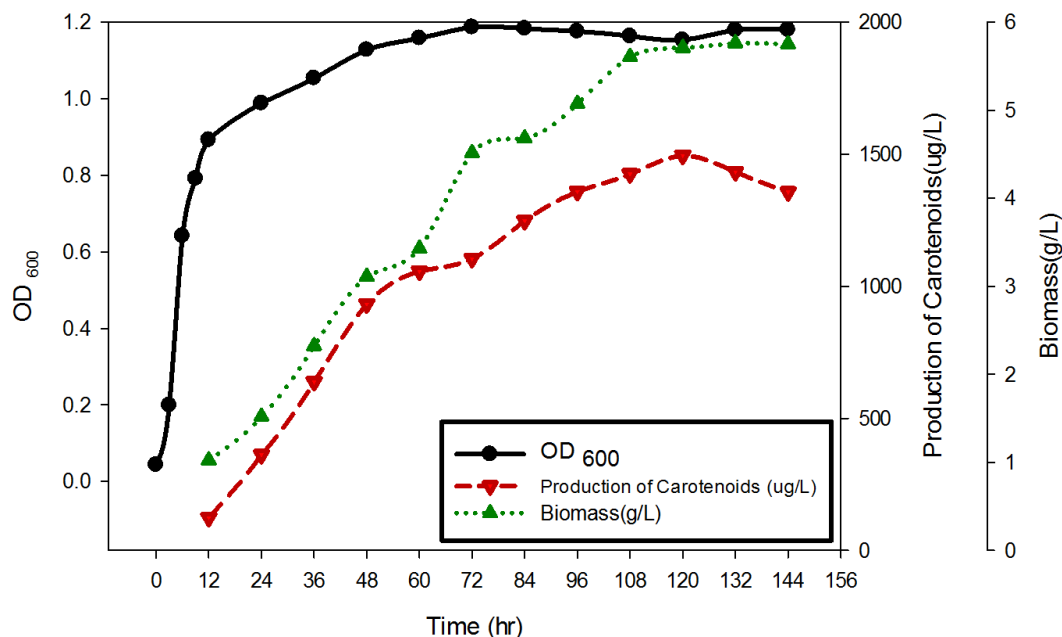
**Figure 6.** Effect of inorganic nitrogen and organic nitrogen sources on production of carotenoids by *Rhodotorula mucilaginosa*  
**图 6.** 不同氮源对胶红酵母类胡萝卜素产量之影响



**Figure 7.** Optimum conditions for dynamic curve

**图 7.** 最适动态生长曲线

降回 27.5℃后, 其生物量(Biomass)和菌体浓度(OD600)于其生长皆停滞在平稳状态。在最适条件培养至 72 小时后, 给予 10℃之短时低温逆境六小时, 对胶红酵母之生长无显著变化, 其生物量(Biomass)和菌体浓度(OD600)于给予低温后, 其生长皆停滞在平稳状态。持续低温系以初始将菌体以最适温度 27.5℃培养至 72 小时稳定期, 持续给予 22.5℃低温培养直至收菌完成。持续低温动态生长曲线结果显示(图 8), 经



**Figure 8.** Continued cold growth dynamic curve  
**图 8.** 持续低温生长动态曲线

过 72 小时 27.5℃ 最适条件培养后, 菌体经过 22.5℃ 低温适应, 生物量(Biomass)于 72~84 小时生长迟滞, 在 96 小时上升至 4.51(g/L), 再缓慢上升至 108 小时达到平衡, 可见在菌体生长的部分, 于 22.5℃ 仍具有减缓菌体生长速度的效果。从色素产量曲线可得在 120 小时有最大值 1533.27 (μg/L)。

#### 4. 结论

确立本研究室分离培养出之胶红酵母最适培养条件, 即温度 27.5℃、pH 5、葡萄糖(glucose)浓度为 15 g/L 作碳源、酵母萃取物(Yeast extract)浓度为 2.5 g/L 作氮源, 于 84 小时有最高色素产量 1494.67 (μg/L)。逆境处理下, 经短时低温 10℃ 和短时高温 37℃ 刺激, 不会影响色素产量的动态曲线结果, 以长时低温 22.5℃ 培养, 可将色素产量提升至 1533.27 (μg/L), 此研究结果应用于未来连续发酵生产上, 可延长色素高收率时间与维持色素产量的潜力。

#### 基金项目

本研究经费部分承蒙勇源教育发展基金会支持, 谨申谢忱。

#### 参考文献 (References)

- [1] Rock, C.L. (1997) Carotenoids: Biology and Treatment. *Pharmacology & Therapeutics*, **75**, 185-197. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(97\)00054-5](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(97)00054-5)
- [2] Aberoumand, A. (2011) A Review Article on Edible Pigments Properties and Sources as Natural Biocolorants in Foodstuff and Food Industry. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, **6**, 71-78.
- [3] Goodwin, T.W. (1980) Biosynthesis of Carotenoids. In: Goodwin, T.W., Ed., *The Biochemistry of the Carotenoids*, Springer, Netherlands, 33-76. [https://doi.org/10.1007/978-94-009-5860-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-94-009-5860-9_2)
- [4] Malik, K., Tokkas, J. and Goyal, S. (2012) Microbial Pigments: A Review. *International Journal of Microbial Resource Technology*, **1**, 361-365.
- [5] Malisorn, C. and Suntornsuk, W. (2008) Optimization of β-Carotene Production by *Rhodotorulaglutinis* DM28 in Fermented Radish Brine. *Bioresource Technology*, **99**, 2281-2287. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.05.019>



- [6] Dufossé, L. (2006) Microbial Production of Food Grade Pigments. *Food Technology and Biotechnology*, **44**, 313-323.
- [7] 王强、余晓斌. 三孢布拉霉发酵产西红柿红素的研究进展. *微生物学通报*, 2015, 42(2): 420-426.
- [8] Sutter, R.P. and Rafelson, M.E. (1968) Separation of  $\beta$ -Factor Synthesis from Stimulated  $\beta$ -Carotene Synthesis in Mated Cultures of *Blakesleatrispora*. *Journal of Bacteriology*, **95**, 426-432.
- [9] Lampila, L.E., Wallen, S.E. and Bullerman, L.B. (1985) A Review of Factors Affecting Biosynthesis of Carotenoids by the order Mucorales. *Mycopathologia*, **90**, 65-80. <https://doi.org/10.1007/BF00436853>
- [10] Michelon, M., de Borba, T.D.M., da Silva Rafael, R., Burkert, C.A.V. and de Medeiros Burkert, J.F. (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>
- [11] Von Oppen-Bezalel, L. (2009) Lightening, Boosting and Protecting with Colorless Carotenoids. *Cosmetics and Toiletries*, **124**, 423-444.
- [12] Rojas, J., Londoño, C. and Ciro, Y. (2016) The Health Benefits of Natural Skin UVA Photoprotective Compounds Found in Botanical Sources. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **8**, 13-23.
- [13] 郑羽莲. 利用不同废弃基质进行分离酵母菌之类胡萝卜素生产优化[D]. 云林科技大学, 2014: 1-80.

**期刊投稿者将享受如下服务:**

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: [hjas@hanspub.org](mailto:hjas@hanspub.org)