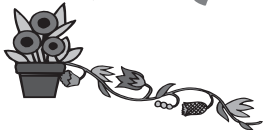


# 金属离子对红酵母菌产类胡萝卜素影响的研究



张颖鑫<sup>1</sup>, 辛嘉英<sup>1,2,\*</sup>, 刘书娟<sup>1</sup>, 董静<sup>1</sup>

(1. 哈尔滨商业大学食品工程学院, 黑龙江哈尔滨 150076;

2. 中国科学院兰州化学物理研究所羰基合成与选择氧化国家重点实验室, 甘肃兰州 730000)

**摘要:** 主要以红酵母 AS2.2241 液态发酵培养基为原料, 添加不同的金属离子( $\text{Na}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  等), 在相同的培养条件下进行培养。采用酸热破壁法破坏红酵母的细胞壁, 同时使用丙酮浸提色素, 提取类胡萝卜素, 通过检测 475nm 下的吸光度, 筛选出对提高类胡萝卜素产量最有利的不同金属离子的添加量。

**关键词:** 红酵母, 金属离子, 吸光度

## Effect of metal ion on carotenoid production by *Rhodotorula sp.*

ZHANG Ying-xin<sup>1</sup>, XIN Jia-ying<sup>1,2,\*</sup>, LIU Shu-juan<sup>1</sup>, DONG Jing<sup>1</sup>

(1. College of Food Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China;

2. State Key Laboratory for Oxo Synthesis & Selective Oxidation, Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

**Abstract:** The *Rhodotorula sp.* AS2.2241 was used as material to study the effect of metal ion on carotenoid production. Different types of metal ion were mixed into the culture medium, such as  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ . Under the same cultivation conditions, the thermal-acid method was used to damage the cell wall of *Rhodotorula sp.*, and extracted the carotenoid by acetone. Then, we examined the absorbance of carotenoid under the wavelength of 475nm. From the results, the optimized cultivation concentrations of each metal ion to improve the production of carotenoid by *Rhodotorula sp.* AS2.2241 were established.

**Key words:** *Rhodotorula sp.*; metal ion; absorbance

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2010)01-0065-04

类胡萝卜素用作食品着色剂、营养添加剂及保健食品功能因子, 被国际权威机构世界粮食组织 (FAO) 和世界卫生组织 (WHO) 认定为 A 类营养色素, 向全世界推荐, 用于黄油、干酪、蛋黄酱等原来含有类胡萝卜素食品的调色等食品领域以及化妆品领域<sup>[1]</sup>。其中最典型的代表—— $\beta$ -胡萝卜素作为一种食用油溶性色素, 其本身的颜色因浓度的差异, 可涵盖由红色至黄色的所有色系, 是非常优良的食品添加剂。此后研究发现, 类胡萝卜素有良好的抗氧化作用, 如植物中的类胡萝卜素的抗氧化作用甚至优于  $\text{V}_E$  和  $\text{V}_C$ , 于是, 类胡萝卜素被添加到非处方药中, 还作为营养保健品在市场销售。而正因为这项用途得到广泛应用, 类胡萝卜素的产品市场规模从此进入快速增长的通道。据报导, 目前对类胡萝卜素的

需求近年来呈直线上升, 美国市场年增长率在 10%~15% 以上。2000 年世界市场用于食品、化妆品方面的  $\beta$ -胡萝卜素已达 1.3 亿美元, 其纯的天然制品售价已达每千克 2000 美元, 而到 2005 年世界市场用于此方面的支出已经达到 9.35 亿美元<sup>[2]</sup>。总之, 类胡萝卜素因其卓越的功能以及良好的应用前景, 正引起众多研究者的关注。目前, 类胡萝卜素的合成研究主要采用微生物发酵的方法。国内外的相关工作从发酵条件包括碳源<sup>[3-6]</sup>、氮源<sup>[7]</sup>、金属离子<sup>[8-9]</sup>以及实验方法等各方面进行了研究, 但仍不足以使酵母生产天然类胡萝卜素的成本达到市场要求。本文以红酵母 AS2.2241 为发酵菌株, 在已建立的优化培养条件下, 采用均匀设计的实验方法, 通过对各种金属离子对类胡萝卜素产量影响的考察, 筛选最利于该酵母菌产类胡萝卜素的最佳条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

红酵母 AS2.2241 其产类胡萝卜素主要为  $\beta$ -胡萝卜素, 华东理工大学反应器工程国家重点实验室

收稿日期: 2009-10-23 \* 通讯联系人

作者简介: 张颖鑫 (1982-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 食品生物技术。

基金项目: 国家自然科学基金 (NCSF 20873034); 教育部新世纪优秀人才支持计划 (NCET05-0356); 龙江学者特聘教授计划资助项目。

交流菌种,以苯乙酮蒸汽为唯一碳源,从土壤中分离筛选获得,现保存于中国普通微生物保藏中心;其他试剂均为国产分析纯。

紫外可见分光光度计 Spectrum 756P,上海精密科学仪器有限公司;低温冷冻离心机 Sigma 2-16K,德国 SIGMA;电热恒温培养箱 DHG-9053A 南京电器三厂;显微镜 Motic-BA 210,麦克奥迪实业集团有限公司(福建)。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 培养基及培养方法

1.2.1.1 优化碳源、氮源的摇瓶发酵培养基组成 葡萄糖 15g/L,蛋白胨 6.0g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.50g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.50g/L, NaCl 1.0g/L,  $\text{MgSO}_4$  0.60g/L, pH 6.8。

1.2.1.2 培养方法 将配制好的培养基分装在若干三角瓶中,每瓶 150mL,其中一个不添加金属离子,作为空白样;在 121℃、150MPa 灭菌 15min 后,晾至室温;无菌操作,取液态菌种 15mL 接种于 250mL 三角瓶中(接种量 10%);在 30℃、180r/min 恒温摇床上培养 36h 后,进行检测。

### 1.2.2 测定方法

1.2.2.1 红酵母细胞破壁方法 酸热破壁法:在每个发酵瓶中加入 50mL 蒸馏水进行洗涤,用四层纱布过滤得发酵液,从中取出 4.0mL 进行离心(4000r/min, 15min),弃上清液,得到湿菌体,直接加入 6mL 盐酸(3.0mol/L),室温下振荡浸泡 1h,在沸水浴中煮沸 4~5min,迅速冷却。

1.2.2.2 酵母细胞生物量测定 恒重法:取 10mL 培养液,5000r/min 离心 15min;倒掉上清液,用蒸馏水洗涤 2 次;再用蒸馏水将菌体移入预先干燥至恒重的称量瓶中,置 105℃ 电热恒温干燥箱中干燥至恒重,用精密电子天平称量称量瓶和菌体总重  $M$ ,则细胞干重  $W(\text{g/L}) = 1000 \times (M - M_0) / 10$ ,式中: $M_0$ -称量瓶的质量(g); $M$ -称量瓶和菌体总重(g);10-发酵液体积(mL)。

1.2.2.3 色素提取方法 丙酮提取法:将酸热破壁后的红酵母湿菌体与酸溶液混合物在 4000r/min 下离心 15min,弃上清液,沉淀用蒸馏水洗涤 2 次后加入 4.0mL 丙酮。室温下振荡浸泡提取类胡萝卜素,然后于 4000r/min 离心 15min,得上清液即为类胡萝卜素提取液,如细胞碎片中仍有色素,加丙酮进一步提取,合并上清液。

1.2.2.4 类胡萝卜素的测定方法 将培养液 4800r/min 离心 20min,弃上清,用双蒸水洗涤 2 遍、重悬、4800r/min 离心 20min,重复 2 遍,所得菌体加入 3N 的盐酸,室温振荡 1.5h,沸水浴煮沸 4min,迅速冷却,4800r/min 离心 20min,弃上清,双蒸水洗涤 2 遍、重悬、4800r/min 离心 20min,所得抽提液适当稀释,于 475nm 处测定其吸光值。参照 P.GIRARD 的方法进行色素含量的测定。

单位体积发酵液的类胡萝卜素产量(mg/L)

$$= \frac{A_{\lambda_{\max}} \cdot D \cdot V}{0.16 \cdot W}$$

式中: $A_{\lambda_{\max}}$ -色素最大吸收波长处的吸光度; $D$ -测定试样的稀释倍数“1”; $V$ -提取色素用丙酮量

(mL); $W$ -发酵液体积(mL);0.16-消光系数( $\text{L} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ );比色皿光径 1cm。

$$\text{单位体积发酵液的类胡萝卜素含量(mg/g)} \\ = \frac{\text{色素产量(mg/L)}}{\text{细胞干重(g/L)}}$$

1.2.3 实验设计 采用均匀设计实验法,运用 DPS(2006 版)数据处理系统,进行数据统计分析。

## 2 结果与讨论

在之前建立的红酵母产类胡萝卜素的最优发酵条件基础上,主要采用均匀实验的方法,设计金属离子( $\text{Na}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 等)的因素与水平,考察金属离子添加量对类胡萝卜素产量的影响。在相同的培养条件下,添加不同金属离子,对其活力进行测定,确定红酵母产类胡萝卜素的最佳条件。

### 2.1 空白样的结果

1L 空白样的培养基组成为:葡萄糖 15g/L,蛋白胨 6.0g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5g/L, NaCl 1.0g/L,  $\text{MgSO}_4$  0.60g/L。空白只取其中 150mL 作为培养基,接种量为 15mL 液态菌种,测定色素产量、生物量、色素含量分别为  $15.57\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $4.16\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $9.37\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,以此作为参照。金属离子在空白样的基础上添加,以达到实验效果。

### 2.2 均匀设计实验方案的结果

均匀设计(Uniform Design)是一种只考虑实验点在实验范围内均匀散布的一种实验设计方法,它可保证实验点具有均匀分布的统计特性,每个因素的每个水平做一次且仅做一次实验,任两个因素的实验点在平面的格子点上,每行每列有且仅有一个实验点。相比于正交实验,此法可以大大减少实验次数。

对于本次研究的内容,如果采用正交实验就要进行 135 次实验,而采用均匀实验,只需要 13 次实验,保证了结果的准确性,同时大大减少了工作量。根据均匀设计实验的原理和优势,设计金属离子( $\text{Na}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 等)的因素与水平(见表 1),并将这些金属离子添加到实验培养基中,其中一个采用原培养基,作为空白样。

### 2.3 数据分析

将均匀设计法获得的实验数据(表 1)运用 DPS(2006 版)数据处理系统,进行数据统计分析。实验数据采用均匀设计偏最小二乘回归建模的方法,在解释变量空间和反应变量空间分别寻找某些线性组合(潜变量),并使得两个变量空间的协方差最大。利用回归分析得出的模型,即可进行影响因素的重要性分析及新条件实验的结果估算、预报和最优化。

2.3.1 二次多项回归方程模型的建立 根据 Predicted Residual Sum of Squares(PRESS)统计量的变化(图 1)和误差统计量(图 2)的下降趋势,选取 1 个潜变量(组分)来建立二次多项式回归模型。图 2 的分析结果表明,当潜变量个数为 1 时, $X_i$ ( $i=1,2,3,4,5,6$ )误差已接近为零,且以后变化渐趋于平缓。要建立二次多项式回归模型,还要以各个效应的标准回归系数作为参考。

表1 均匀设计实验方案的结果

实验号	X <sub>1</sub> K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	X <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	X <sub>3</sub> ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	X <sub>4</sub> MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	X <sub>5</sub> FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	X <sub>6</sub> CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	色素产量 (mg · L <sup>-1</sup> )	生物量 (g · L <sup>-1</sup> )	色素含量 (mg · g <sup>-1</sup> )
1	1	2	6	8	9	10	25.79	1.27	5.08
2	2	4	12	3	5	7	8.21	3.72	5.52
3	3	6	5	11	1	4	1.72	4.04	1.06
4	4	8	11	6	10	1	10.43	1.86	14.02
5	5	10	4	1	6	11	7.81	2.07	9.43
6	6	12	10	9	2	8	7.30	3.27	5.58
7	7	1	3	4	11	5	2.23	2.18	2.56
8	8	3	9	12	7	2	0.99	2.31	1.07
9	9	5	2	7	3	12	7.74	2.25	8.60
10	10	7	8	2	12	9	9.41	2.61	9.01
11	11	9	1	10	8	6	15.73	1.67	16.04
12	12	11	7	5	4	3	15.97	2.02	15.16
13	13	13	13	13	13	13	3.97	0.90	11.03

注:各因素 K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 的水平范围(%)分别为:K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:0~1.0, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>:0~1.0, ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O:0~0.10, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O:0~0.10, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O:0~0.010, CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O:0~0.010;1~13 即在各因素的水平范围中各取 13 个水平点。

表3 多项式系数对因变量作用的标准回归系数

	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	X <sub>4</sub> <sup>2</sup>	X <sub>5</sub> <sup>2</sup>	X <sub>6</sub> <sup>2</sup>
Y	0.0763	0.0409	-0.0626	-0.0681	0.0727	-0.0302	0.0203	-0.0481	-0.0332	0.0275	0.0195	-0.0723

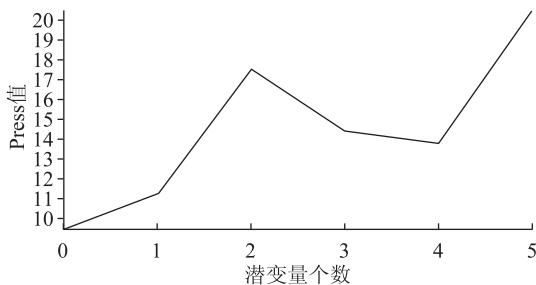


图1 Press 统计量分析图

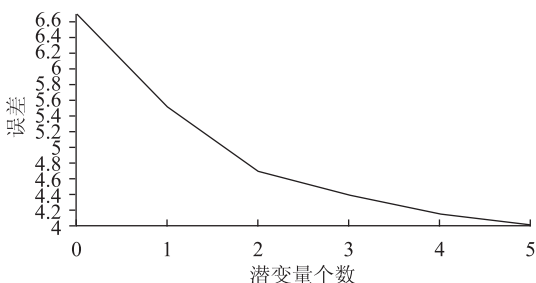


图2 误差统计量分析图

当选择有关参数并确认后,可得到各个自变量对因变量作用的主效应的标准回归系数(表2)。从表2可以看出,各个自变量对这个因变量的影响是相同的,但自变量 X<sub>3</sub>、X<sub>4</sub> 和 X<sub>6</sub> 对因变量的作用为负效应, X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub> 和 X<sub>5</sub> 对因变量的作用为正效应。

表2 各自变量对因变量作用的标准回归系数

	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>
Y	0.0763	0.0409	-0.0626	-0.0681	0.0727	-0.0302

最后,我们根据偏最小二乘回归分析,同时考虑因变量的优化,得到如下二次多项式回归模型:  $Y = 5.9827721 + 3.539403X_1 - 0.834931X_2 + 54.539483X_3 - 42.072108X_4 + 353.940279X_5 + 542.434850X_6 + 1.398884X_1^2 - 3.559605X_2^2 - 238.821016X_3^2 + 195.072523X_4^2 + 13988.841524X_5^2 - 52045.551001X_6^2$

2.3.2 各因素对因变量的影响强弱分析 根据表3所示,将资料排序即可得到各因素对因变量的影响,即各金属离子对红酵母产类胡萝卜素的影响程度,其影响强弱顺序为: X<sub>1</sub> > X<sub>5</sub> > X<sub>2</sub> > X<sub>1</sub><sup>2</sup> > X<sub>5</sub><sup>2</sup> > X<sub>4</sub><sup>2</sup> > X<sub>3</sub><sup>2</sup> > X<sub>6</sub> > X<sub>4</sub> > X<sub>3</sub><sup>2</sup> > X<sub>6</sub><sup>2</sup> > X<sub>3</sub>

此二次多项式回归模型的拟合效果可从误差平方和看出,提取 1 个组分(潜变量)时,各个回归模型的拟合程度都较好。

最后根据所有的分析结果,来确定各因素的极大值(极小值)。为方便起见,在做回归方程时,回归系数各因素都以 0~10(如对于 K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,“0.2”即是 0.2%)计算,结果如下: X<sub>1max</sub> = 1.000, X<sub>2max</sub> = 0.0072, X<sub>3min</sub> = 0.0000, X<sub>4min</sub> = 0.0000, X<sub>5max</sub> = 0.0106, X<sub>6min</sub> = 0.0000。

其他参数的确定:约定的回归系数显著性检验临界值: FIS = 0.1; 最终方程的复相关系数: R = 0.999479; 最终方程的剩余标准差: S = 0.87708204; 最终方程的显著性检验统计量 F = 79.9286。从 F 检验来看,回归方程有一定的显著性。

综上所述,得出最优条件: K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 为 1%, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 为 0.0072%, ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 为 0, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 为 0, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 为 0.0106%, CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 为 0; 预测值 Y(色素含量) = 17.3779mg/L, 比空白对照组提高了 85.46%。

### 3 结论

红酵母 (*Rhodotorula sp.*) 细胞多为球型或卵圆形,大小为(2.3~5.0) × (4.0~5.8) μm, 单个或几个细胞连接成串珠,多端芽殖,不形成菌丝或假菌丝,不形成孢子或担孢子。通过显微镜下观察细胞形态,在添加金属离子的液态培养基中,红酵母生长良 (下转第 70 页)



### 3 结论

不同溶剂地达菜的提取液对 *Escherichia coli* 无抑制作用,但对 *P.aeruginosa* 有一定的抑菌能力,其中丙酮和乙酸乙酯提取液的抑菌效果最好,这可能和地达菜中含有的一些中等极性的苷类物质,如黄酮苷类和胞外二萜类化合物<sup>[14]</sup>有关;甲醇提取液对果蔬腐败菌的抑菌效果非常好,其抑菌率达到 100%,这可能和地达菜中含有极性较大的苷类物质皂苷和脂肽类物质,如  $\beta$ -氨基酸和 3-氨基-6-羟基硬脂酸<sup>[15]</sup>有关。不同溶剂提取出的物质,其抗菌能力有一定的差异性,这和不同溶剂溶出的化学物质有关。

以上结果表明,地达菜提取液具有较好的抑菌活性。我国具有丰富的地达菜资源,可以通过提取地达菜中的抑菌成分,提升地达菜的综合应用价值,而不仅限于它的食用价值。

#### 参考文献

- [1] 王云,彭友林.地木耳资源的开发利用[J].特种经济动植物,2004(4):40.
- [2] 邓中洋,阎春兰,胡强,等.葛仙米研究进展[J].水生生物学报,2008,32(3):393-400.
- [3] 李敦海,刘永定.近十年中国地木耳研究概况[J].水生生物学报,2003,27(4):4-11.
- [4] 范群艳,吴向阳,仰榴青.响应面分析法优化地木耳多糖提取工艺的研究[J].江苏大学学报:医学版,2007,17(3):236-240.
- [5] 李三相,李勃,左国防.陆生蓝藻地木耳中海藻糖研究初

(上接第 67 页)

好,呈卵圆形,并且有的已经开始出芽,菌体活跃,可以看出,向培养基中添加适量的金属离子对微生物生长具有一定的积极作用。

分析结果表明,Na<sup>+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>的添加不同程度地提高了色素产量与生物量,与空白组相比,对红酵母的生长具有显著的影响作用。当 K<sup>+</sup>添加量最高时,得出最大色素含量和产量分别为 19.76mg/g、15.97mg/L,说明 K<sup>+</sup>对红酵母的类胡萝卜素合成途径中的许多酶促反应有较大影响,Fe<sup>2+</sup>次之。添加适量的金属离子可能启动了葡萄糖到乙酰 CoA 的转化以及乙酰 CoA 到类胡萝卜素的合成途径中的一种或几种酶的活性,从一定程度上促进红酵母生物量和类胡萝卜素产量的提高。

研究表明,结合均匀设计实验方法和回归模型的数据分析,在原有发酵条件的基础上,调节红酵母培养基中的金属离子浓度,准确、简捷地筛选出进行发酵生产类胡萝卜素最佳发酵条件,这对降低产品成本、扩大规模的微生物发酵生产类胡萝卜素具有重要的实际意义,具有十分广阔的研究前景。

#### 参考文献

- [1] Z Aksu, A Tuğba Eren. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source[J]. Process Biochemistry, 2005(40):2355-2361.
- [2] Zümriye Aksu, Ayse Tuğba Eren. Production of carotenoids

报[J].天水师范学院学报,2004,24(5):42-43.

- [6] 王晓宇,邹明明,王蓉,等.海藻多糖抗肿瘤机理研究进展[J].大连医科大学学报,2007,29(3):318-319.
- [7] 吴新安,华日茂,岳永德,等.植物源抗菌、杀菌活性物质研究进展[J].安徽农业大学学报,2002,29(3):245-249.
- [8] 徐任生.天然产物化学(第二版)[M].北京:科学出版社,2004.
- [9] Hottiger T, Boller T, Wiemken A. Rapid changes of heat and desiccation tolerance correlated with changes of trehalose content in *Saccharomyces cerevisiae* cells subjected to temperature shifts[J]. FEBS Lett, 1987, 220(1):113-115.
- [10] 王辉,李克寒,吴兵,等.海藻糖对冻干胸腺肽生物活性保护作用的研究[J].兰州大学学报,2001,37(6):72-75.
- [11] 沈萍,范秀容,等.微生物学实验(第三版)[M].北京:高等教育出版社,1996.
- [12] 周日宝.湖南省常见野菜及其食疗作用[J].药膳食疗研究,1997(3):7.
- [13] 汤庚国.江苏省山野菜资源研究初报[J].资源节约和综合利用,1995(1):28.
- [14] Birgit Jaki, Jimmy Orjala, and Otto Sticher. A Novel Extracellular Diterpenoid with Antibacterial Activity from the Cyanobacterium *Nostoc commune*[J]. Journal of Natural Products, 1999, 62(3):502-503.
- [15] Kajiyama S, Kanzaki H, Kawazu K, et al. Nostofungicide, an Antifungal Lipopeptide from the Field-grown Terrestrial Blue-green Alga *Nostoc commune*[J]. Tetrahedron letters, 1998, 39:3737-3740.

by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis* [J]. Biochemical Engineering Journal, 2007(35):107-113.

- [3] 刘月英.红酵母 COS-5 产胡萝卜素条件的研究[J].微生物学通报,1999,26(3):194-197.
- [4] 王岁楼.红酵母类胡萝卜素发酵助剂的筛选及应用[J].食品生物技术,2002,21(1):124.
- [5] Z Aksu, A Tuğba Eren. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source[J]. Process Biochemistry, 2005(40):2985-2991.
- [6] Buzzini P. An optimization study of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* DBVPG 3853 from substrates containing concentrated rectified grape must as the sole carbohydrate source[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2000(24):41-45.
- [7] D Somashekar, R Joseph. Inverse relationship between carotenoid and lipid formation in *Rhodotorula gracilis* according to the C/N ratio of the growth medium [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2000(16):491-493.
- [8] Pietro Buzzini, Alessandro Martini. Optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* DBVPG 7021 as a function of trace element concentration by means of response surface analysis[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2005, 36:687-692.
- [9] 张坤生,翟红梅,任云霞,等.添加剂及金属离子对类胡萝卜素产率的影响[J].食品科学,2004,25(11):144.