

红/蓝光对粘红酵母生长及产物产量的影响

Effect of blue/red light on growth and properties of red yeast

马丹丹¹ 张艳杰²

MA Dan-dan¹ ZHANG Yan-jie²

(1. 江西科技学院, 江西 南昌 330022; 2. 江西师范大学, 江西 南昌 330022)

(1. Jiangxi University of Technology, Nanchang, Jiangxi 330022, China;

2. Jiangxi Normal University, Nanchang, Jiangxi 330022, China)

摘要:为深入了解光信号对酵母菌生长发育的影响,研究红光和蓝光对粘红酵母菌生长及产物产量的影响。结果表明,红光培养促使粘红酵母生物量显著增加,还可提高粘红酵母中蛋白质和核酸的含量,提高粘红酵母类胡萝卜素和麦角固醇含量,因此可考虑在粘红酵母工业化生产类胡萝卜素和麦角固醇时引入红光这一参数。蓝光在提高粘红酵母生物量方面不明显,但可增加粘红酵母细胞质膜的通透性,并提高粘红酵母油脂和麦角固醇含量。光质在粘红酵母生长过程中的确有重要作用,其作用机制和原理尚需进一步深入研究与探讨。

关键词:红光;蓝光;粘红酵母;生物量;麦角固醇产量;类胡萝卜素产量

Abstract: In order to understand the effect of the light signal on the growth and development of yeast, the effects of red and blue light on the growth and yield of the growth of the yeast were studied. Results showed that the red culture could prompt the *Rhodotorula glutinis* biomass increased significantly, improve the content of protein and nucleic acid in *Rhodotorula glutinis*, improve *Rhodotorula glutinis* kind of carotene and ergosterol content. The red light can be considered to introduced into *Rhodotorula glutinis* industrialized production of carotene and ergot solid alcohol. The Blue ray in improving the *Rhodotorula glutinis* biomass was not obviously, but can be increased *Rhodotorula glutinis* cell membrane permeability, and improve the *Rhodotorula glutinis* grease and ergosterol content. Light quality in *Rhodotorula glutinis* growth process does have an important role, its mechanism and principle still need further in-depth study and discussion.

Keywords: red; blue; *Rhodotorula*; biomass; ergosterol yield; class carotene yield

基金项目:江西省科技厅项目(编号:20151BAB204007)

作者简介:马丹丹(1983—),女,江西科技学院讲师,硕士。

E-mail:blueclearwater@163.com

通讯作者:张艳杰

收稿日期:2015-09-25

光质对高等植物和藻类的碳水化合物和蛋白质代谢有调节作用。在蓝光下生长的植物的蛋白质含量较高,而红光下的通常碳水化合物含量较高^[1]。目前有关光对真菌生长方面的研究较少,主要集中在有限的几种真菌如黑曲霉、木霉等^[2],红、蓝光对霉菌生长有重要影响,包括霉菌的孢子萌发、菌丝生长等^[2]。但对酵母菌影响的研究基本是空白,酵母菌培养过程中光的作用,光对及酵母菌生物量的影响,酵母菌重要产物产量的影响更是无人涉及。

粘红酵母可以生产的产物种类很多:含麦角固醇量较高,可用来生产维生素 D₂;可合成油脂,从粘红酵母中提取油脂是当前的研究热点;粘红酵母作为生产单细胞蛋白的优良饲料,因为其富含类胡萝卜素而备受欢迎,若能同时提高蛋白质含量和类胡萝卜素含量,则能达到双倍收益的效果;粘红酵母菌体中 RNA 含量普遍高于其他微生物,因粘红酵母易于收集和连续培养, RNA 提取容易,且可以得到较高纯度的 RNA。因此本试验选用粘红酵母作为试验材料,分别以蓝光、红光作为光源与黑暗中培养进行比较,研究蓝红单色光质对酵母菌生长,核酸、蛋白质、麦角固醇、类胡萝卜素产量等的影响,既能实现在工业发酵中提高粘红酵母的麦角固醇和类胡萝卜素产量,又可为酵母菌培养提供光参数的理论资料。

1 材料与方法

1.1 菌种与培养基

1.1.1 菌种

粘红酵母:南昌大学科技学院保存;

1.1.2 培养基

改进后的麦芽汁培养基:麦芽膏粉 130 g, 氯霉素 0.1 g 最终 pH 5.6±0.2, 将麦芽汁培养基离心后,保留上清液,再将沉淀部分用有机溶剂重新溶解,将溶解部分与前一步离心后的上清液合并作为粘红酵母的培养基;

醋酸钠培养基:葡萄糖 0.1 g,KCl 0.18 g,酵母膏 0.25 g,醋酸钠 0.82 g,琼脂 1.5 g,蒸馏水 100 mL^[3]41-44;

豆芽汁液体培养基:豆芽汁 200 mL,葡萄糖 50 g,水 800 mL,自然 pH^[3]35-39。

1.2 主要试剂与仪器

麦角固醇标准品:美国 Sigma 公司;

分光光度计:SZK-730 型,上海元析仪器有限公司;

精密酸度计:PHS-3C 型,上海雷韵试验仪器制造有限公司;

电子天平:AB104-N 型,上海第二天平仪器厂;

离心机:DT5-2 型,上海安亭科学仪器厂;

恒温超声提取机:T650CT 型,上海启前电子科技有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 光培养和基本形态观察 红色、蓝色荧光灯均为 40 W,分别将红色光源通过红色滤膜,最强波长为 660 nm,蓝色光源透过蓝色滤膜,最强波长为 460 nm。光源装置都放在遮光的培养箱中,温度为 37 ℃。

将培养在豆芽汁液体培养基上的粘红酵母分别在持续的蓝光、红光以及黑暗环境下,200 r/min 的恒温(37 ℃)摇床上培养。每隔 24 h 取样检测生物量、pH 值等指标。取样放置于光学显微镜下观察粘红酵母外观形态变化。

1.3.2 测定项目及方法

- (1) 基本形态观察:取酵母菌培养液置于载玻片上,加美蓝染色后显微镜下观察。
- (2) 生物量的测定:培养好的酵母经 6 000 r/min 离心 20 min,弃掉上清,小心用蒸馏水洗涤沉淀 3 次,放置烘干箱内 105 ℃烘干,测定干重。
- (3) pH 值的测定:采用精密酸度计测定。
- (4) 蛋白质含量的测定:采用双缩脲法^[3]46-50。
- (5) 核酸含量的测定:参照文献^[3]58-62。
- (6) 类胡萝卜素含量的测定:称取红酵母干菌体 1 g,先加入 5 mL 浓度为 2%的蜗牛酶液,30 ℃裂解 1 h,4 000 r/min 离心 15 min,离心弃上清,沉淀水洗后再次离心(4 000 r/min,15 min),按 20 mL/g 干细胞量加入丙酮—石油醚(比例为 1:1)混合液震荡,28 ℃浸提 30 min,上清液即为类胡萝卜素浸提液,重复浸提,直至浸提后细胞碎片基本呈无色,用分

光光度计在 475 nm 下测定吸光度值,参照文献^[4]的方法计算类胡萝卜素含量。

(7) 麦角固醇含量的测定:先取麦角固醇样品,按文献^[5]的方法绘制出标准曲线。取 10 mL 红酵母发酵液,4 000 r/min 离心 15 min,沉淀用蒸馏水洗涤 2~3 次,采用微波辅助法提取麦角固醇(以 KOH 作为皂化剂,95%乙醇为提取剂,微波功率 520 W,料液比 1:1(*m*:*V*),提取时间 1 min),冷却至室温,用正庚烷作萃取剂(料液比 2:1(*m*:*V*)),剧烈震荡 15 min,静止等待分层后,取上层萃取液在波长 280 nm 处测吸光值,根据文献^[5]的方法计算麦角固醇含量。

(8) 油脂含量的测定:采用酸水解法^[6]。

(9) 粘红酵母细胞质膜通透性测定:参照文献^[7]。

(10) SOD 活性的测定:在研钵里加入少量石英砂和沥干的菌泥,人工研磨,而后加入 3 倍体积 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 7.0),每克干酵母加入 9 mL 90%异丙醇提取,采用丙酮二次分级沉淀纯化 SOD,用邻苯三酚自氧化法测定 SOD 活性^[8]。

2 结果与分析

2.1 光质对粘红酵母菌外观形态及繁殖情况的影响

蓝光下,粘红酵母外观形态略有畸形,且随着试验时间的不断延长,粘红酵母细胞多边芽殖现象越来越明显,荚膜变厚,色素含量增多,菌落颜色越来越深,与黑暗中培养相比,其菌落颜色更红。在红光培养条件下,粘红酵母细胞体积明显增大,多边芽殖现象不明显,但同样出现菌落色泽加深现象(见图 1)。

2.2 蓝/红光培养下粘红酵母蛋白质和核酸含量的变化

由图 2(a)和(c)可知,红光能导致生物量的增加,明显提高菌体蛋白质含量,在培养第 8~10 天时增长最为迅速,但蓝光没有明显促进作用,反而有所下降,推测原因是蓝光波长接近紫外光,对酵母菌生长有抑制作用。因此,在生产酵母菌作为单细胞蛋白饲料方面,可采用红光这一参数。由图 2(b)可知,红光培养下酵母菌核酸含量有较明显的增长,推测因为红光作为可见光中波长最长的波段,可以使细胞供能增加,ATP 增多,核酸含量的增长而导致生物量的增长快。在培养第 8 天时,红光下核酸含量比黑暗中增长 1/3,蓝光在此方面作用不明显。

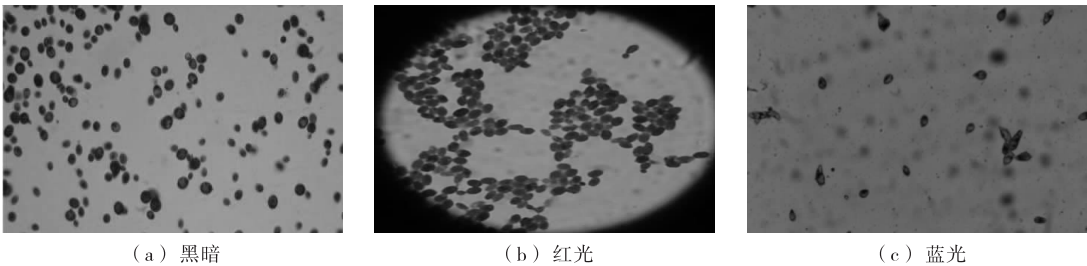


图 1 不同条件下培养的粘红酵母形态

Figure 1 Morphology of the cultured sticky red yeast under different conditions

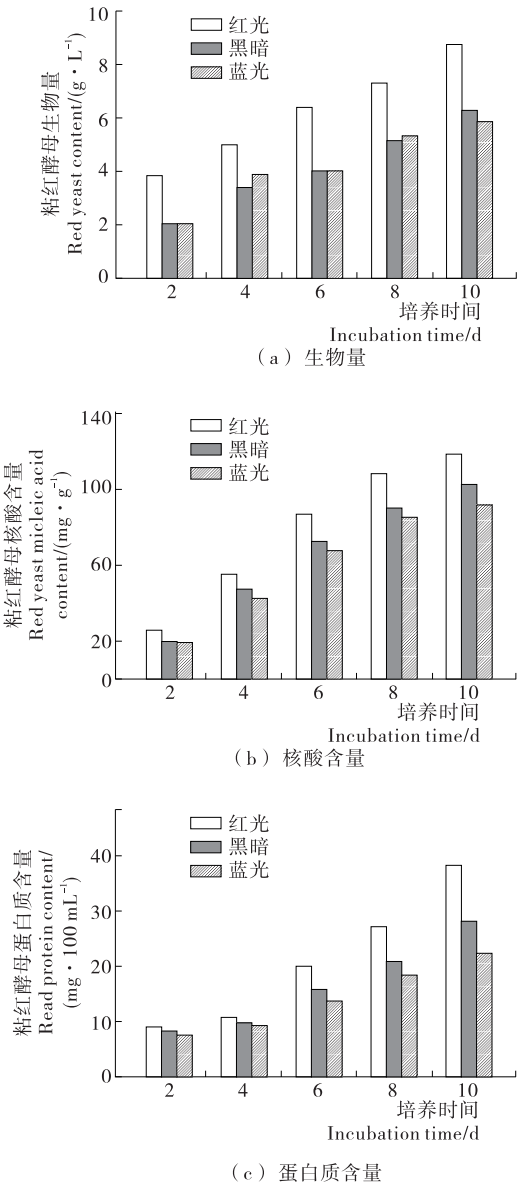
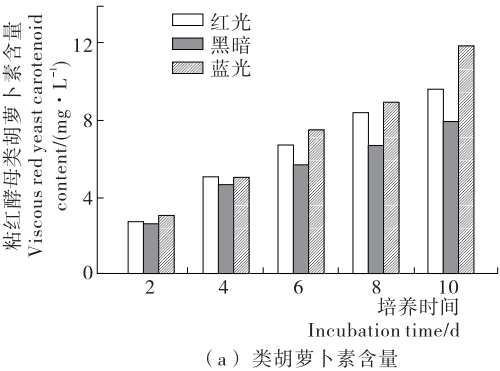
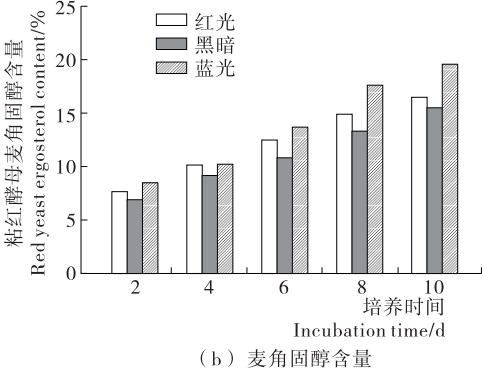


图 2 光质对粘红酵母生物量、核酸含量及蛋白质含量的影响

Figure 2 The quality of r. glutinis biomass, content and protein content of nucleic acid



(a) 类胡萝卜素含量



(b) 麦角固醇含量

图 4 光质对粘红酵母类胡萝卜素及麦角固醇含量的影响

Figure 4 Effect of light quality on Rhodotorula carotenoid and ergosterol content

2.3 蓝/红光培养下粘红酵母细胞质膜通透性的变化

由图 3 可知,蓝光培养下,粘红酵母细胞质膜通透性增加,表明外渗电解质增多,蓝光起了较强的刺激作用。通透性增加为以后重要产物产量的提高奠定良好基础,因为可以在一定程度上消除反馈抑制。红光和黑暗中相比,细胞质膜通透性也有所增加,但没有蓝光明显。

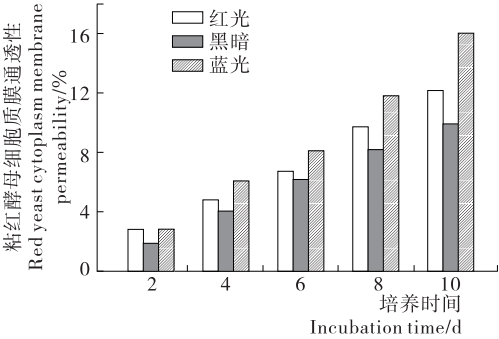


图 3 光质对粘红酵母细胞质膜通透性的影响

Figure 3 Effect of light quality on the cytoplasmic membrane permeability of Rhodotorula glutinis

2.4 蓝/红光培养下粘红酵母中类胡萝卜素及麦角固醇含量的变化

由图 4 可知,两种光质在提升粘红酵母类胡萝卜素和麦角固醇方面效果显著,其中类胡萝卜素增产以蓝光下最多,可能与蓝光明显增加酵母菌细胞质膜通透性有关;在培养第 8~10 天时,产量与黑暗中培养相比大约提高 20%。麦角固醇增产也以蓝光效果最好,在培养第 8 天时,与黑暗中对,增产达到 25%。因此可考虑在粘红酵母工业化生产类胡萝卜素和麦角固醇时引入蓝光这一参数。

2.5 蓝/红光培养下粘红酵母菌油脂含量的变化

由图 5 可知,蓝光、红光都可促进红酵母中油脂含量增加,和黑暗中相比产量增加明显,尤其是蓝光,在培养第 8 天时产量增加 35%。油脂是粘红酵母的初级代谢产物,合成途径也存在反馈抑制现象,细胞质膜通透性的增加可有效提高油脂产量,而蓝光与红光相比提高细胞质膜通透性效果更好,因此油脂产量更高。

2.6 粘红酵母 SOD 活性

SOD 活性在红光培养下活性升高最为明显,和黑暗中培养相比增加 25%,在培养第 6~8 天时表现最为明显(图 6)。SOD 的提取相对是一个复杂的过程,提取中的各种因素都会影响到 SOD 的活性,可能因为蓝光作为短波长高能量的光对酵母菌超氧化物歧化酶刺激较强,其活性没有红光那样提高明显。

3 结论

本试验研究了光质对粘红酵母菌生长及重要产物产量的

影响。结果表明,在增加菌种产量方面红光效果最好,但在增加油脂、类胡萝卜素、麦角固醇产量方面则是蓝光效果明显,可能与蓝光大幅增加酵母菌细胞质膜通透性有关。综合生物量等因素考虑,在利用粘红酵母生产麦角固醇、类胡萝卜素等代谢产物时,完全可以在培养时引入红光这一参数,可以预见与黑暗中培养相比能起到良好的增产作用。

红光最大吸收体是线粒体。在红光照射下会导致 ATP 产量增加,细胞形态变大,繁殖速度变快。目前红光治疗仪已广泛应用于临床治疗,可以促进伤口和溃疡的愈合^[9],促进毛发的生长^[9],但现有资料中,光质对真菌的影响研究甚少。本研究的研究填补了酵母菌方面的空白,但相关的作用机理和具体作用机制尚需进一步地研究,同时光质对单细胞酵母和多细胞假丝酵母表现出的作用是不同的,因此有关多细胞酵母的试验在以后也会陆续展开,后期的研究会更着重于光应答相关的基因调控和表达。

参考文献

1 邓江明,蔡群英,潘瑞炽. 光质对水稻幼苗蛋白质,氨基酸含量的影响[J]. 植物学通报,2000,17(5):419~423.

2 朱俊晨,王小菁. 蓝光促进黑曲霉分生孢子发育和产糖化酶的研究[J]. 微生物学报,2005,45(2): 275~278.

3 沈萍,陈向东. 微生物学实验[M]. 北京:高等教育出版社,2008.

4 王岁楼. 利用红酵母发酵生产类胡萝卜素的研究进展[J]. 微生物学杂志,2000,20(2):41~43.

5 惠丰立,魏明卉,褚学英. 粘红酵母麦角固醇含量测定[J]. 生物技术,2003,13(6):28~30.

6 徐华顺,罗玉萍. 微生物发酵产油脂的研究进展[J]. 中国油脂,1999,24(2):34~36.

7 刘晓艳,丘泰球,黄卓烈. 不同方法对酵母细胞膜通透性的影响[J]. 华南农业大学学报,2004(1):51~56.

8 李宏,单振秀. 红酵母提取 SOD 的研究[J]. 食品科学,2003,24(12):81~84.

9 种康,王台,钱前,等. 2014 年中国植物科学若干领域重要研究进展[J]. 植物学报,2015,8(4):85~90.

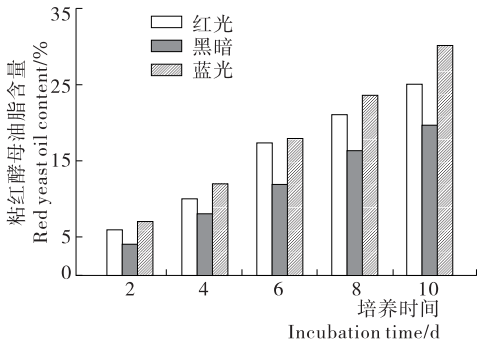


图 5 光质对粘红酵母菌油脂含量的影响

Figure 5 Effect of light quality on the oil content in red yeast strain

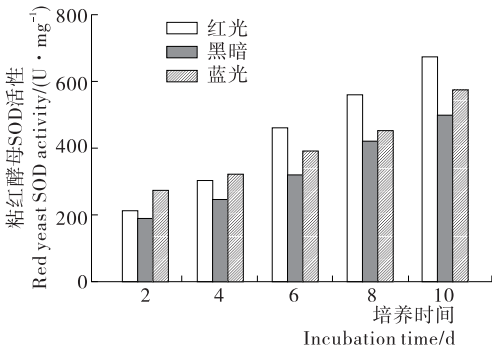


图 6 光质对粘红酵母 SOD 活性的影响

Figure 6 Effect of light quality on r. glutinis SOD activity

(上接第 32 页)

14 Waters. ACQUITY UPLC H-Class 和 H-Class Bio 氨基酸分析系统指南(修订 B)[Z]. USA: Waters Corporation, 2012.

15 杨俊,王文辉,李翼,等. 柱前衍生超高效液相色谱法测定核桃仁中的氨基酸含量[J]. 食品与发酵工业, 2011, 32(2): 182~185.

16 孙昕. 分光光度法测定豆类及其粗蛋白质中的色氨酸[J]. 生物学杂志, 2000, 17(5): 33~34.

17 杨慧敏,周文华,李维敏,等. 椰子水及其饮料中氨基酸组分分析[J]. 食品与机械, 2013, 29(6): 63~66.

18 陈巧玲,李忠海,陈素琼. 5 种产地食用菌氨基酸组成比较及营养评价[J]. 食品与机械, 2014, 30(6): 43~46.

19 FAO/WHO. Protein quality evaluation in human diets[R]. Rome: Food and Agriculture Organization, 1991.

20 Germain K, Dominique C M, Alain B S, et al. Nutrient content

of some mushroom species of the genus termitomyces consumed in Cameroon[J]. Nahrung-Food, 2003, 47(3): 213~216.

21 钱爱萍,颜孙安,林香信,等. 家禽肉中氨基酸组成及营养评价[J]. 中国农学通报, 2010, 26(13): 94~97.

22 赵凤敏,李树军,张晓燕,等. 不同品种马铃薯的氨基酸营养价值评价[J]. 中国粮油学报, 2014, 29(9): 13~18.

23 严孙安,林香信,钱爱萍,等. 闽产柑橘果实氨基酸含量及组成分析[J]. 中国食物与营养, 2012, 18(6): 66~70.

24 谷镇,杨焱. 食用菌呈香呈味物质研究进展[J]. 食品工业科技, 2013, 34(5): 363~367.

25 张婷,杨波,罗瑞明,等. 苦苦菜发酵过程中主要发酵菌种及滋味物质的变化[J]. 食品与机械, 2015, 31(3): 23~27.

26 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所. 中国食物成分表 2002[M]. 北京:北京大学医学出版社, 2002: 234~239.

27 彭惠蓉,黄丽华,陈训. 顶坛花椒幼嫩茎叶必需氨基酸质量评价[J]. 贵州科学, 2011, 29(4): 33~35.