

胶红酵母发酵新会柑汁制备类胡萝卜素工艺优化

柳明罕 蹇华丽 钟武杰

(华南农业大学食品学院, 广东 广州 510642)

摘要: [目的]为提高废弃新会柑肉的利用率,探讨以其为低成本原料制备类胡萝卜素培养基的可能性。[方法]以新会柑汁作为发酵培养基,以胶红酵母总类胡萝卜素产量及生物量为考察指标,采用单因素及响应面试验对培养基组分及发酵条件进行优化。[结果]最优工艺条件:新会柑汁总糖 95~100 g/L、总氮量 3 g/L、初始 pH 6;在接种量 4 mL/100 mL、摇床转速 240 r/min、装液系数 0.08、发酵温度 28 ℃、摇瓶振荡培养 96 h,胶红酵母生物量可达 44.62 g/L,其类胡萝卜素产量达 13.08 mg/L。该条件下得到的色素提取物的 DPPH 自由基清除能力高于维生素 C。[结论]新会柑汁培养基相对于基础培养基在相同发酵条件下摇瓶产量提升了 2.17 倍,为高效开发利用废弃的新会柑肉提供了新的途径。

关键词: 新会柑;胶红酵母;工艺优化;类胡萝卜素

Optimization of carotenoid production from Xinhui mandarin juice fermented by rhodotorula mucilaginosa

LIU Minghan JIAN Huali ZHONG Wujie

(College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China)

Abstract: [Objective] To improve the utilization of waste Xinhui mandarin pulp and explore the feasibility of preparing low-cost carotenoid-producing culture media. [Methods] By using Xinhui mandarin juice as the fermentation medium, with the total carotenoid yield and biomass of rhodotorula mucilaginosa as the evaluation indexes, the components of the medium and fermentation conditions were optimized via single-factor experiments and response surface methodology. [Results] The fermentation medium is prepared with Xinhui mandarin juice, with the total sugar content controlled at 95~100 g/L, total nitrogen content at 3 g/L, and initial pH at 6. Under the conditions of 4 mL/100 mL inoculum size, 240 r/min shaker rotation speed, 0.08 liquid loading coefficient, 28 ℃ fermentation temperature, and 96 h shake-flask fermentation, the biomass of rhodotorula mucilaginosa reaches 44.62 g/L, and its carotenoid yield reaches 13.08 mg/L. The DPPH radical scavenging activity of the pigment extract obtained under these conditions is higher than that of Vitamin C. [Conclusion] Compared with the basal medium under the same fermentation conditions, the shake-flask yield of carotenoid from the Xinhui mandarin juice medium increases by 2.17 times, which provides a new approach for the efficient exploitation and utilization of waste Xinhui mandarin pulp.

Keywords: Xinhui mandarin; rhodotorula mucilaginosa; process optimization; carotenoid

中国作为全球最大的柑橘生产国,占全球总产量的 28%,其中新会陈皮柑作为国家地理标志产品,已成为广东江门新会区的支柱产业,2023 年全产业链产值突破 230 亿元^[1]。然而其产业发展面临显著挑战:柑肉因酸涩口感和纤维粗糙难以利用,年产量超 20 万 t 的柑肉常被废

弃,造成资源浪费与环境污染的双重压力。

新会柑富含类胡萝卜素。类胡萝卜素作为具有抗氧化、增强免疫和抗癌功效的萜类化合物,在医药、保健品和化妆品领域应用广泛^[2]。相较于传统的化学合成法,微生物发酵法因环境友好、产物活性高等优势成为主流生

基金项目: 广东省科技创新战略专项资金(重点领域研发计划项目)(编号:2020B020226008)

通信作者: 蹇华丽(1977—),女,华南农业大学副教授,博士。E-mail: jianhualij@scau.edu.cn

收稿日期: 2025-01-15 **改回日期:** 2025-10-31

引用格式: 柳明罕,蹇华丽,钟武杰. 胶红酵母发酵新会柑汁制备类胡萝卜素工艺优化[J]. 食品与机械, 2026, 42(3): 149-157.

Citation: LIU Minghan, JIAN Huali, ZHONG Wujie. Optimization of carotenoid production from Xinhui mandarin juice fermented by rhodotorula mucilaginosa[J]. Food & Machinery, 2026, 42(3): 149-157.

产工艺。但现有技术受制于发酵原料成本高(占生产成本 30%~50%),急需开发廉价的发酵原料。这为新会柑肉资源化利用提供了重要契机,其富含糖类、类胡萝卜素及维生素 C 等营养物质,具备理想的发酵原料的特性。

目前,学界在柑肉资源化方面已进行多维度的探索:包括传统产品的开发如醋和酵素等^[3-4]。吴林达等^[5]利用新会柑果汁发酵制备细菌纤维素生物膜。李义勇等^[6-7]利用新会柑果浆培养海洋假丝酵母,并构建水产养殖尾水净化系统。Xu 等^[8]发现乳酸菌发酵能够显著改变柑橘汁中的生物活性物质的组成,提升其营养价值和功能特性,为开发富含生物活性成分的功能性发酵柑橘饮品提供了理论支持。Oberoi 等^[9]则利用柑橘类废弃物生产乙醇,通过优化同步糖化发酵工艺,提高乙醇产量,同时实现农业废弃物的资源化利用。然而这些技术普遍存在反应条件严苛、预处理复杂等问题,导致成本居高不下。

胶红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*)具备三大优势:①广谱底物利用能力,可高效利用柑肉的糖类物质且耐受酸性环境,尤其是含有大量柠檬酸的柑肉;②高产类胡萝卜素的能力;③发酵后菌体富含蛋白质、维生素和油脂,可直接作为饲料添加剂,形成“类胡萝卜素+单细胞蛋白”双产品体系,提升资源利用率。研究拟采用废弃的新会柑肉作为培养基,通过组分改良及发酵工艺优化,以期获得使胶红酵母高效生产类胡萝卜素的天然廉价培养基及相应的发酵条件,为新会陈皮柑高附加值产品开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株

胶红酵母 GDMCC2.30;广东省微生物研究所菌种保藏中心。

1.1.2 主要材料与试剂

新会柑果:当年 11 月中旬于广东省江门市新会区咏琪加工场果园采集;

蛋白胨、酵母粉、马铃薯葡萄糖水(PDB)、胰蛋白胨、琼脂粉:分析纯,北京奥博星生物技术有限责任公司;

葡萄糖、硫酸铵、氯化钾:分析纯,广州化学试剂厂;
磷酸氢二钾、七水合硫酸镁、硫酸亚铁:分析纯,广州市金华大化学试剂有限公司;

盐酸、氢氧化钠、硫胺素:分析纯,广东光华化学厂有限公司;

二甲基亚砩、丙酮、无水乙醇:分析纯,广东广试试剂科技有限公司;

2,2-联苯胺-1-苦基肼基(DPPH):分析纯,上海麦克林生化科技股份有限公司;

基础培养基:硫酸铵 3 g/L,葡萄糖 95 g/L,七水合硫酸镁 0.5 g/L,磷酸氢二钾 1 g/L,硫酸亚铁 0.01 g/L,氯化钾 0.5 g/L,硫胺素 0.4 μg/L,蒸馏水 1 000 mL,pH 6。

1.1.3 主要仪器与设备

恒温培养振荡器:SPH-2102C 型,上海世平实验设备有限公司;

电子天平:AL204 型,梅特勒—托利多仪器(上海)有限公司;

台式高速冷冻离心机:TGL-16gR 型,上海安亭科学仪器有限公司;

鼓风干燥箱:DHG-9140A 型,上海一恒科学仪器有限公司;

超净工作台:SW-CJ-1FD 型,苏州安泰空气技术有限公司;

灭菌锅:LDZX-30KBS 型,上海申安医疗器械厂;

电热恒温水浴锅:KD-8D 型,上海精宏实验设备有限公司;

紫外—可见分光光度计:UV-1240 型,日本岛津公司;

pH 计:TL-48R 型,上海万柏生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 工艺流程

新会柑拣选→清洗、去核→粉碎→榨汁→纱布粗滤→离心(4 000 r/min,10 min)→灭菌(115 ℃、15 min)→冷却→调配→接种→发酵→离心→洗涤→发酵液进行类胡萝卜素产量测定

1.2.2 新会柑汁主要营养成分测定

(1)总糖:按 SN/T 4260—2015 执行

(2)还原糖:按 NY/T 2742—2015 执行。

(3)总氮含量:按 NY/T 2017—2011 执行。

(4)可溶性固形物含量:按 NY/T 2637—2014 执行。

1.2.3 种子液制备与摇瓶发酵条件

(1)种子液制备:取胶红酵母菌株接入装有 50 mL 马铃薯葡萄糖水的 250 mL 三角瓶中,于 28 ℃、180 r/min 下培养至 OD₆₀₀ 值≥1.0。

(2)摇瓶发酵基础条件:装液量 20 mL/250 mL,接种量 5 mL/100 mL,发酵温度 28 ℃,摇床转速 180 r/min,培养基初始 pH 6,培养时间 96 h。

1.2.4 生物量及类胡萝卜素产量测定

(1)生物量:取 5 mL 发酵液于提前烘干并称重的 EP 管中,5 000 r/min 离心 5 min,弃去上层培养基,加入无菌水洗涤 2 次,5 000 r/min 离心 10 min 得湿菌体,置于 105 ℃鼓风干燥箱中烘至恒重(前后 2 次质量差不超过 2 mg),然后称量计算生物量。

(2)类胡萝卜素提取及产量测定:类胡萝卜素提取参照 Huang 等^[10]的方法进行修改。5 mL 发酵液于 10 mL 离心管中,10 000 r/min 离心 10 min,去除培养基,用蒸馏水

洗涤两次,弃上清液,用5 mL 95%乙醇洗涤1次,弃上清液,用9 mL 99%无水乙醇洗涤1次,弃上清液,加入2 mL 二甲亚砜混匀,置于65℃水浴1.5 h。待破壁完全后,加6 mL 丙酮摇匀10 min,直至菌体呈无色后,以5 000 r/min离心6 min,取上清液于紫外分光光度计480 nm处测定吸光度值。按式(1)计算总类胡萝卜素产量。

$$X = \frac{A \times C \times V}{0.16 \times z} \quad (1)$$

式中:

X ——总类胡萝卜素产量, mg/mL;

A ——类胡萝卜素最大波长处吸光度;

C ——稀释倍数;

V ——提取用有机溶剂体积, mL;

z ——提取用发酵液, mL;

0.16——有机溶剂消光系数。

1.2.5 新会柑清汁培养基的单因素试验 在无添加的新会柑清汁作为培养基的基础上,参考1.2.1工艺流程,其他因素固定为:发酵时间96 h,接种量5 mL/100 mL,摇床转速180 r/min,发酵温度28℃。分别考察碳源质量浓度(38~40, 57~60, 76~80, 95~100, 105~110, 115~120, 125~130, 135~140 g/L)、氮源质量浓度(1, 2, 3, 4 g/L)、初始pH(pH 4.0, 5.0, 5.5, 6.0, 7.0)对胶红酵母生长及总类胡萝卜素产量的影响。

1.2.6 培养条件的单因素试验 参考1.2.1工艺流程及1.2.5优化后的培养基,其他因素固定为:碳源质量浓度95~100 g/L,氮源质量浓度3 g/L,初始pH为6。分别考察发酵时间(24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 h)、发酵温度(24, 26, 28, 30, 32℃)、装液系数(0.08, 0.12, 0.16, 0.20)、接种量(2, 4, 6, 8, 10 mL/100 mL)、摇床转速(100, 150, 200, 250, 300 r/min)对胶红酵母生长及总类胡萝卜素产量的影响。

1.2.7 发酵工艺响应面试验 在单因素试验的基础上,选取摇床转速、接种量、发酵温度3个因素进行响应面分析,采用Design Expert 13.0.1软件进行Box-Behnken设计,以总类胡萝卜素产量为响应值,优化胶红酵母摇瓶发酵的工艺参数。

1.2.8 胶红酵母所产类胡萝卜素清除DPPH自由基能力测定 参照邓永平等^[11]的方法,将制备好的胶红酵母类胡萝卜素丙酮提取液初步纯化,再用无水乙醇配制质量浓度为10, 20, 40, 60, 80, 100 μg/mL的胶红酵母类胡萝卜素样品溶液及维生素C(V_c)作为参照物,测定DPPH自由基清除率。

1.3 数据处理与分析

试验均重复3次,数据分析采用SPSS 22.0,并通过Duncan's进行显著性差异分析($P < 0.05$)。结果以平均值±标准差的形式呈现,使用OriginPro 2021进行绘图。

2 结果与分析

2.1 新会柑汁主要营养成分

新会柑汁的主要营养成分见表1。

表1 新会柑汁的主要营养成分

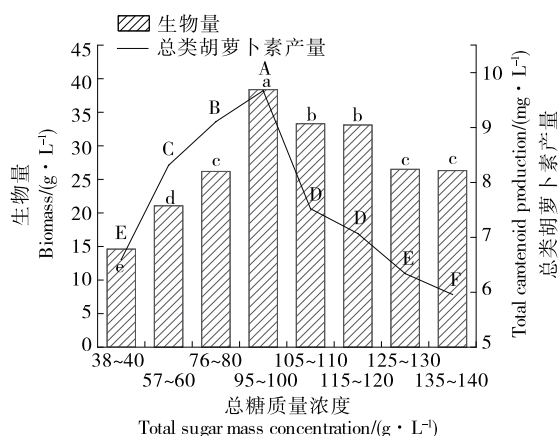
Table 1 Main nutritional components of Xinhui

mandarin juice				
总糖/ (g·L ⁻¹)	还原糖/ (g·L ⁻¹)	pH	可溶性糖/ °Brix	总氮/ (g·L ⁻¹)
97.5±2.5	41±1	3.95±0.15	11.23±0.65	1.01±0.05

2.2 发酵培养基优化

2.2.1 碳源对胶红酵母生长及总类胡萝卜素产量的影响 碳源是胶红酵母生长代谢的核心营养物质^[12],直接影响菌体生物量与次级代谢产物(如类胡萝卜素)的合成效率^[13]。如图1所示,随着柑清汁的稀释,菌体生物量呈减少趋势,说明稀释柑清汁可能造成营养成分不足,新会柑清汁的原液有利于该菌株的生长。随着总糖质量浓度的上升,胶红酵母的总类胡萝卜素产量及生物量均有明显下降,说明总糖质量浓度过高会抑制酵母的生长。而且新会柑清汁含丰富的柠檬酸、硫酸素和类胡萝卜素等,对酵母的生长及类胡萝卜素的积累有促进作用^[10, 14]。因此,选择新会柑清汁原液进行后续试验,此时生物量达到38.4 g/L,总类胡萝卜素产量为9.6 mg/L。

胶红酵母能在总糖质量浓度为95~100 g/L的高糖环境下生长且不受抑制,显著高于文献[15]报道的最适碳源质量浓度为41.24 g/L。可能是因为新会柑清汁中碳源组成为蔗糖、果糖及葡萄糖,而柑汁中的复合糖不仅可以克服葡萄糖浓度过高导致的系列问题,还有利于降低成



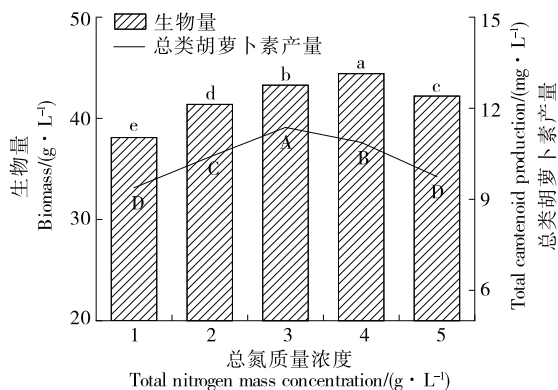
大写字母不同表示总类胡萝卜素产量差异显著($P < 0.05$);小写字母不同表示生物量差异显著($P < 0.05$)

图1 总糖质量浓度对胶红酵母发酵的影响

Figure 1 Effect of total sugar mass concentration on fermentation of rhodotorula mucilaginosa

本,降低糖消耗速度,为发酵后期类胡萝卜素的转化提供足够原料物质^[16]。也有可能是因为新会柑清汁中含大量类黄酮物质如橙皮苷、槲皮素等,能在高糖胁迫环境下保护酵母^[17]。

2.2.2 氮源对胶红酵母生长及总类胡萝卜素产量的影响 氮的供应会影响细胞代谢和碳氮比,较低的氮含量可能会导致营养缺乏,对微生物的生长和次生代谢物的合成起着至关重要的调节作用^[18]。新会柑清汁以有机氮为主,而无机氮如铵盐能快速促进 TCA 循环,缩短迟滞期^[19]。因此,为更好满足胶红酵母生长需求,综合考虑成本等因素,选用硫酸铵作为补充氮源^[19]。如图 2 所示,以不外加氮源的新会柑清汁培养基作为对照组,当添加硫酸铵作为补充氮源发酵,总氮质量浓度 <3 g/L 时,随着总氮质量浓度的增加,菌体生物量及总类胡萝卜素产量增加;当发酵液总氮质量浓度为 3 g/L 时,总类胡萝卜素的产量达最高,为 11.36 mg/L,生物量为 43.3 g/L;总氮质量浓度 >3 g/L 时,菌体生物量上涨而总类胡萝卜素产量显著降低,可能过高的总氮质量浓度会使碳氮比降低从而对酵母合成类胡萝卜素合成产生不利的影响^[20]。因此选择总氮质量浓度 3 g/L 进行后续试验。

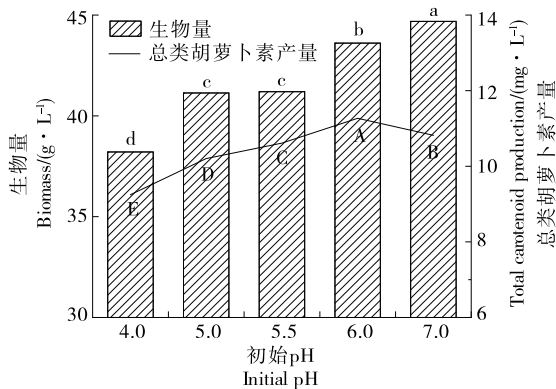


大写字母不同表示总类胡萝卜素产量差异显著 ($P < 0.05$); 小写字母不同表示生物量差异显著 ($P < 0.05$)

图 2 总氮质量浓度对胶红酵母发酵的影响

Figure 2 Effect of total nitrogen mass concentration on fermentation of *rhodotorula mucilaginosa*

2.2.3 初始 pH 对胶红酵母生长及总类胡萝卜素产量的影响 如图 3 所示,在偏酸性时,随着 pH 的升高,生物量及总类胡萝卜素产量同时升高,在弱酸偏中性即 pH 6 时,总类胡萝卜素产量达到峰值,为 11.27 mg/L,生物量为 43.61 g/L。进一步提高 pH,类胡萝卜素产量下降,可能是过高或过低的 pH 会影响酵母对培养基中营养物质的吸收与利用效率^[21],同时削弱其分泌代谢产物的能力,进而导致代谢途径的调整以及细胞膜通透性的改变。结果表明,中性略偏酸有利于红酵母生物量和类胡萝卜素产量



大写字母不同表示总类胡萝卜素产量差异显著 ($P < 0.05$); 小写字母不同表示生物量差异显著 ($P < 0.05$)

图 3 初始 pH 对胶红酵母发酵的影响

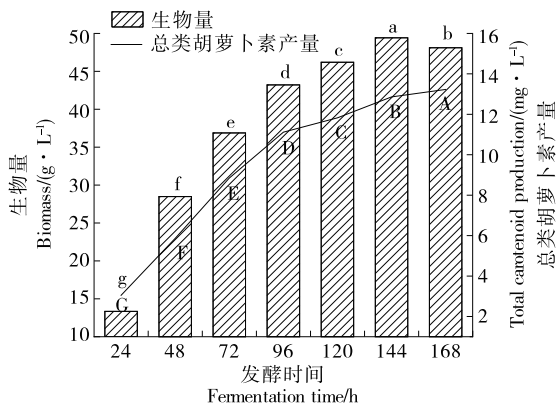
Figure 3 Effect of initial pH on fermentation of *rhodotorula mucilaginosa*

的提高,因此选择初始 pH 6 进行后续试验。

2.3 发酵工艺优化

2.3.1 发酵时间对发酵胶红酵母生长及总类胡萝卜素产量的影响 如图 4 所示,发酵时间为 0~72 h 总类胡萝卜素产量增长速度快,生物量快速积累;发酵 96 h 后菌体生长增速放缓,类胡萝卜素积累速度也变慢;发酵 144 h 生物量达到最大值,为 49.42 g/L。发酵时间超过 144 h 之后,胶红酵母的生物量开始减少,主要原因可能是发酵液营养物质消耗完全,菌体生长停滞或是一些发酵副产物的产生导致菌体自溶。综合时间成本等因素考虑,选择 96 h 为最佳发酵时间。

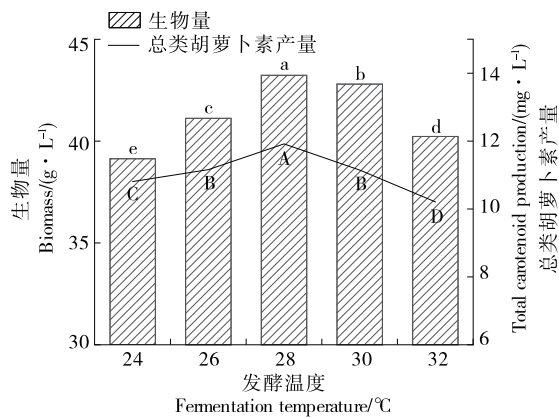
2.3.2 发酵温度对发酵胶红酵母生长及总类胡萝卜素产量的影响 如图 5 所示,发酵温度为 24~28 °C 时,总类胡萝卜素产量以及生物量均随着发酵温度升高而增加,



大写字母不同表示总类胡萝卜素产量差异显著 ($P < 0.05$); 小写字母不同表示生物量差异显著 ($P < 0.05$)

图 4 发酵时间对胶红酵母发酵的影响

Figure 4 Effect of fermentation time on fermentation of *rhodotorula mucilaginosa*



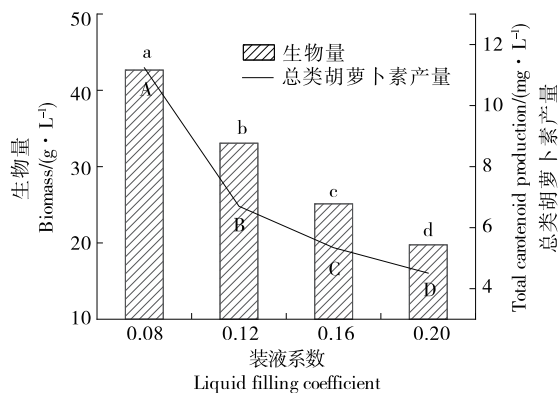
大写字母不同表示总类胡萝卜素产量差异显著 ($P < 0.05$); 小写字母不同表示生物量差异显著 ($P < 0.05$)

图5 发酵温度对胶红酵母发酵的影响

Figure 5 Effect of fermentation temperature on fermentation of *rhodotorula mucilaginosa*

28 °C时菌体生物量最高,为43.2 g/L,总类胡萝卜素产量为11.9 mg/L。随着发酵温度升高,生物量及总类胡萝卜素产量逐渐减少。因此,确定28 °C为发酵的最适温度。

2.3.3 装液系数对发酵胶红酵母生长及总类胡萝卜素产量的影响 装液系数的大小影响发酵培养基中的溶氧量,红酵母需要足够的溶氧量来满足生长的需要^[22]。实际生产应用中,装液系数低于0.08时水分蒸发会导致摇瓶内的发酵液过于黏稠,相对体积变化太大,不利于产物浓度的测量,故选择0.08作为装液系数的边界条件。如图6所示,随着装液系数的提高,会影响培养基中的溶氧量,从而使总类胡萝卜素产量及生物量呈下降趋势,在装液系数为0.08时,生物量及总类胡萝卜素产量达到最大。故选择0.08的装液系数进行后续试验。

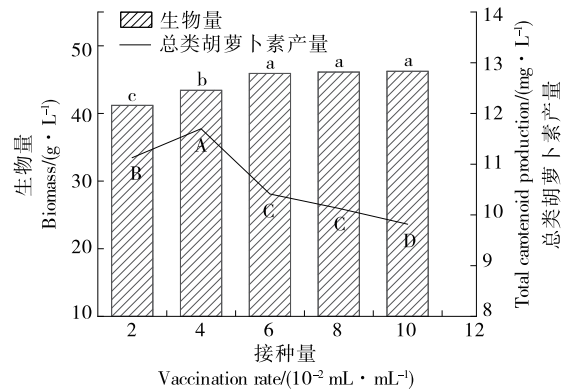


大写字母不同表示总类胡萝卜素产量差异显著 ($P < 0.05$); 小写字母不同表示生物量差异显著 ($P < 0.05$)

图6 装液系数对胶红酵母发酵的影响

Figure 6 Effect of liquid loading coefficient on fermentation of *rhodotorula mucilaginosa*

2.3.4 接种量对发酵胶红酵母生长及总类胡萝卜素产量的影响 如图7所示,随着培养基接种量的加大,红酵母的色素产量呈先上升后下降的趋势,可能是接种量的提高使发酵液黏度过大,导致体系溶氧不足,产物积累变慢。接种量为4 mL/100 mL时,总类胡萝卜素产量达到最大值(11.70 mg/L)且生物量(43.42 g/L)也处于较高水平,故选择4 mL/100 mL的接种量进行后续试验。

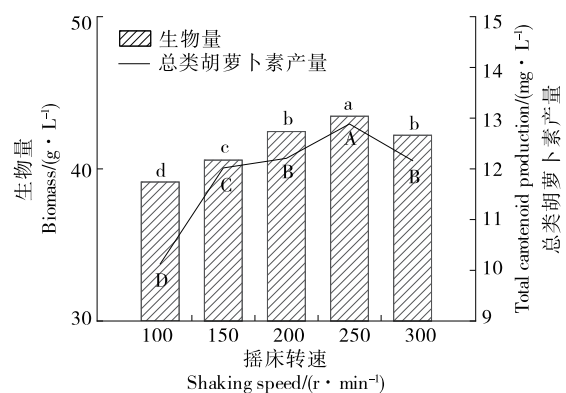


大写字母不同表示总类胡萝卜素产量差异显著 ($P < 0.05$); 小写字母不同表示生物量差异显著 ($P < 0.05$)

图7 接种量对胶红酵母发酵的影响

Figure 7 Effect of inoculum size on fermentation of *rhodotorula mucilaginosa*

2.3.5 摇床转速对发酵胶红酵母生长及总类胡萝卜素产量的影响 当装液量一定时,摇床转速成为影响瓶内氧气含量的重要因素。如图8所示,在100~250 r/min范围内,提高摇床转速有利于菌株生长和类胡萝卜素的积累。摇床转速为250 r/min时,总类胡萝卜素产量达到12.88 mg/L,生物量达到43.46 g/L。但摇床转速达到



大写字母不同表示总类胡萝卜素产量差异显著 ($P < 0.05$); 小写字母不同表示生物量差异显著 ($P < 0.05$)

图8 摇床转速对胶红酵母发酵的影响

Figure 8 Effect of shaker rotation speed on fermentation of *rhodotorula mucilaginosa*

300 r/min 后,总类胡萝卜素产量及生物量反而下降,可能由于随着摇床转速增加,瓶内流体受到的剪切速率增大,最终影响红酵母的生长及类胡萝卜素的积累。故选择 250 r/min 的摇床转速进行后续试验。

2.4 响应面试验

2.4.1 模型建立 响应面试验因素水平及结果分别见表 2 和表 3。通过数据分析,得到了响应值总类胡萝卜素产量对摇床转速、接种量、发酵温度的二次多项式回归模型:

$$Y=12.99-0.388\ 75A+0.287\ 5B+0.146\ 25C+0.525AB+0.417\ 5AC+0.12BC-0.661\ 25A^2-0.693\ 75B^2-0.816\ 25C^2。$$
 (2)

由表 4 可知,模型极显著($P<0.000\ 1$),失拟项不显著($P>0.05$),回归系数 $R^2=0.984\ 3$,修正后为 0.964 1,变异系数为 1.34%,说明该模型拟合程度较好,能准确预测出胶红酵母总类胡萝卜素的产量。其中 A、B、C、 A^2 、 B^2 、 C^2 、AB、AC 的 P 值均小于 0.05,表明其是显著模型项,对总类胡萝卜素产量有显著影响,而 BC 对响应值未达到显著水平,说明不同因素之间存在相互作用。由 F 值可知,各因素影响总类胡萝卜素产量的次序为摇床转速>接种量>发酵温度。

表 2 响应面试验因素和水平

Table 2 Factors and levels of response surface experiment

水平	A 摇床转速/ ($r\cdot min^{-1}$)	B 接种量/ ($10^{-2}\ mL\cdot mL^{-1}$)	C 发酵温 度/ $^{\circ}C$
-1	200	2	26
0	250	4	28
1	300	6	30

2.4.2 各因素的交互作用 胶红酵母发酵工艺条件各项单因素交互作用对产类胡萝卜素的响应面和等高线图如图 9 所示。从图 9 可以看出,回归模型存在极大值点。摇床转速与接种量以及摇床转速和发酵温度之间的等高线呈椭圆形,说明交互作用显著。发酵温度与接种量的等高线呈圆形,说明交互作用较弱,其结果与方差分析结果相对应。

2.4.3 胶红酵母最佳条件的确定及验证 经 Design-Expert 13.0.1 软件分析,得到胶红酵母产类胡萝卜素的最佳条件:摇床转速 238.35 r/min,接种量 4.246 mL/100 mL,发酵温度 28.079 $^{\circ}C$ 。该条件下预测的总类胡萝卜素产量为 13.06 mg/L。为便于实际操作,将最佳培养条件修正为摇床转速 240 r/min,接种量 4 mL/100 mL,发酵温度 28 $^{\circ}C$,在此条件下重复 3 次验证实验,总类胡萝卜素产量分别为 12.97, 13.23, 13.04 mg/L,均值为 13.08 mg/L,与预测

表 3 响应面试验设计及结果

Table 3 Design and results of response surface experiment

试验号	A	B	C	总类胡萝卜素产量/ ($mg\cdot L^{-1}$)
1	0	0	0	13.07
2	-1	-1	0	12.15
3	0	-1	1	11.14
4	0	0	0	13.07
5	0	0	0	12.91
6	0	1	1	11.91
7	0	0	0	12.88
8	1	1	0	12.17
9	1	0	1	11.70
10	0	1	-1	11.58
11	0	0	0	13.02
12	-1	0	1	11.82
13	1	0	-1	10.37
14	-1	0	-1	12.16
15	0	-1	-1	11.29
16	1	-1	0	10.50
17	-1	1	0	11.72

表 4 回归方程及方差分析[†]

Table 4 Regression equation and analysis of variance

因素	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	11.35	9	1.26	48.69	<0.000 1	**
A	1.21	1	1.21	46.69	0.000 2	**
B	0.66	1	0.66	25.53	0.001 5	*
C	0.17	1	0.17	6.61	0.037 0	*
AB	1.10	1	1.10	42.57	0.000 3	**
AC	0.70	1	0.70	26.92	0.001 3	**
BC	0.06	1	0.06	2.22	0.179 5	不显著
A^2	1.84	1	1.84	71.09	<0.000 1	**
B^2	2.00	1	2.03	78.25	<0.000 1	**
C^2	2.81	1	2.81	108.32	<0.000 1	**
残差	0.18	7	0.03			
失拟项	0.15	3	0.05	6.17	0.055 0	不显著
纯误差	0.03	4	0.01			
总和	11.53	16				

[†] **表示对结果影响极显著($P<0.01$);*表示对结果影响显著($P<0.05$)。

值相差 0.02,生物量的均值为 44.62 g/L,说明模型准确性高。该最优条件下菌株摇瓶发酵的总类胡萝卜素产量是未优化前(9.6 mg/L)的 1.36 倍,生物量是未优化前(38.37 g/L)的 1.16 倍。说明优化发酵条件使得总类胡

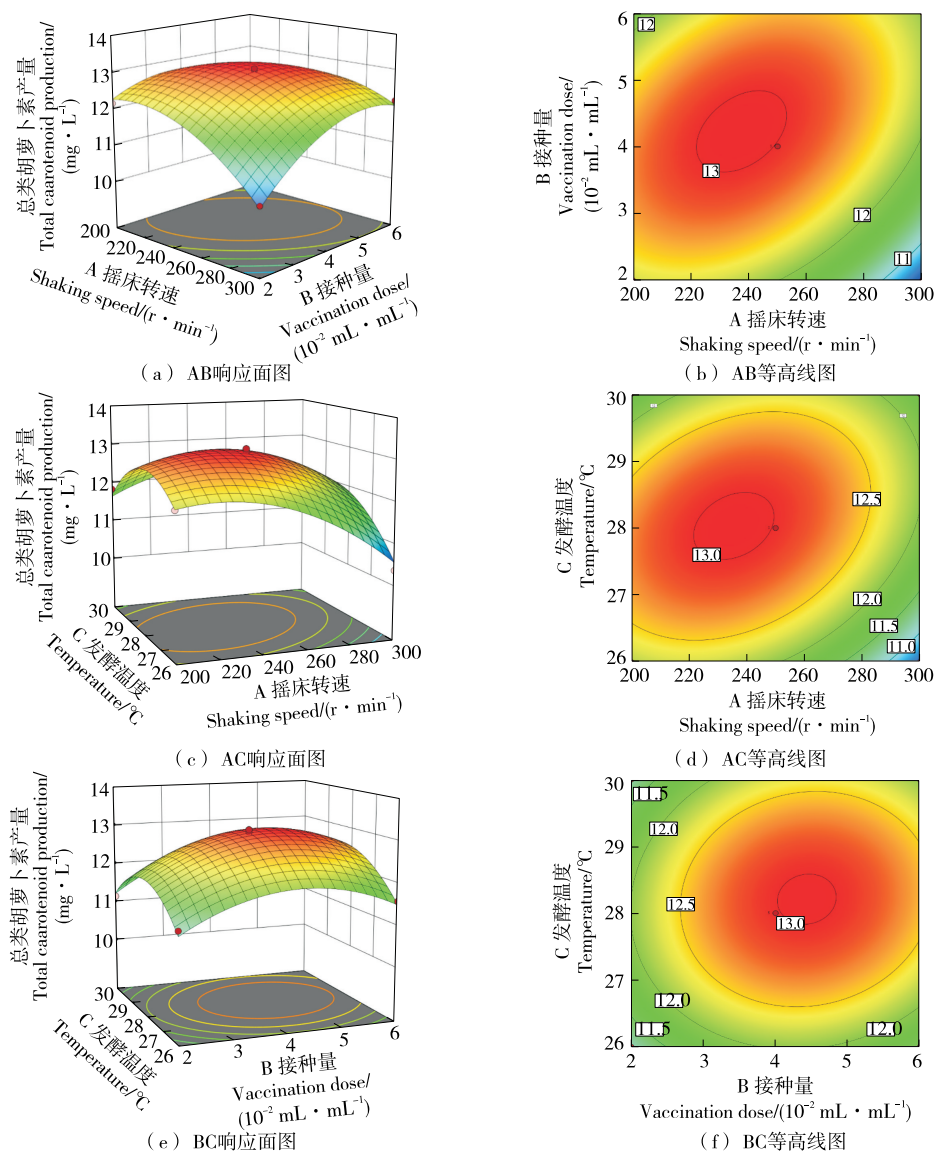


图9 响应面和等高线图

Figure 9 Response surfaces and contour plots

胡萝卜素产量进一步提升。与基础培养基相比,新会柑清汁培养的胶红酵母可以有效提高生物量及类胡萝卜素产量(见表5)。

2.5 发酵上清液、完整胶红酵母细胞及类胡萝卜素的体外抗氧化活性

如图10所示,发酵上清液的抗氧化性强于完整胶红酵母细胞强于类胡萝卜素。如图11所示,在不同浓度下,色素提取物的清除率均略高于 V_c ,说明发酵上清液,完整胶红酵母细胞及色素提取物均有较强清除DPPH自由基的能力。

发酵上清液的抗氧化性最强,可能是柑汁本身含有大量的黄酮类与酚类物质^[23],并且胶红酵母代谢过程中也会分泌一些具有一定抗氧化作用的胞外多糖^[24]。胶红

酵母的完整细胞也具有较高抗氧化性,可能是细胞表面的活性物质对自由基的清除作用,也可能是酵母胞内的抗氧化酶类的作用^[25]。综上,无论是发酵上清液、从胶红酵母中提取的色素还是完整细胞都具有良好的体外抗氧化

表5 验证实验及优化培养基与基础培养基对比结果

Table 5 Results of validation experiment and comparison between optimized medium and basal medium

培养基	总类胡萝卜素产量/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)			
	第1次	第2次	第3次	均值
基础培养基	6.03	6.16	5.88	6.02 ± 0.14
未优化的柑汁培养基	9.45	9.77	9.58	9.60 ± 0.16
优化的柑汁培养基	12.97	13.23	13.04	13.08 ± 0.13

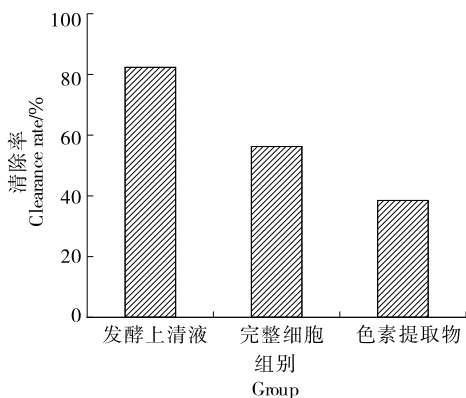


图 10 胶红酵母各组别的 DPPH 自由基清除率

Figure 10 DPPH radical scavenging activity of different rhodotorula mucilaginosa groups

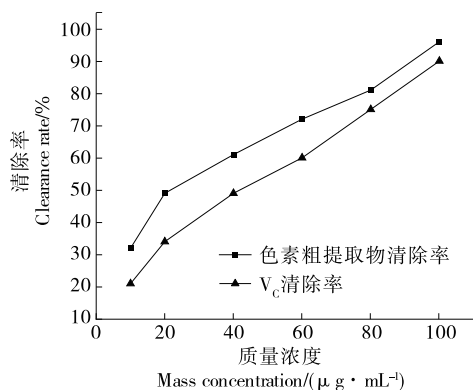
图 11 类胡萝卜素和 V_C 的 DPPH 自由基清除作用

Figure 11 DPPH radical scavenging activity of carotenoids and vitamin C

化活性,显示出胶红酵母发酵物具有开发成饲料添加剂产品的潜力。

3 结论

该研究以废弃的新会柑果肉为原料,通过优化发酵工艺,确定培养胶红酵母产类胡萝卜素的最佳工艺为初始总糖质量浓度 95~100 g/L,初始总氮质量浓度 3 g/L,初始 pH 6,摇床转速 240 r/min,接种量 4 mL/100 mL,发酵温度 28 ℃,发酵时间 96 h。在该培养基及发酵条件下培养胶红酵母,其总类胡萝卜素产量为 13.08 mg/L,生物量为 44.62 g/L。胶红酵母的色素提取物的 DPPH 自由基清除率强于维生素 C。相较目前基础的胶红酵母产类胡萝卜素培养基来说,废弃的新会柑易于获取,方便廉价,对环境友好。下一步拟开展利用胶红酵母的发酵液作为饲料添加剂,解决新会柑果肉废弃导致环境污染的问题,同时生产附加值较高的富含类胡萝卜素益生菌饲料及饲料添加剂。

参考文献

- [1] 杨于昕. 基于乡村振兴政策的新会陈皮产业发展路径研究[J]. 广东经济, 2024(13): 24-27.
YANG Y X. Study on the development path of Xinhui tangerine peel industry based on rural revitalisation policy[J]. Guangdong Economy, 2024(13): 24-27.
- [2] OCHOA-VINALS N, ALONSO-ESTRADA D, PACIOS-MICHELENA S, et al. Current advances in carotenoid production by *Rhodotorula* sp.[J]. Fermentation-Basel, 2024, 10(4): 190.
- [3] 白卫东, 赵文红, 陈颖茵, 等. 新会柑果醋的研究[J]. 中国调味品, 2006(8): 12-15.
BAI W D, ZHAO W H, CHEN Y Y, et al. Study on Xinhui orange vinegar[J]. China Condiment, 2006(8): 12-15.
- [4] 周映君, 谢纯良, 陈柏忠, 等. 不同酵母菌与植物乳杆菌复合发酵对新会柑酵素品质的影响[J]. 食品工业科技, 2022, 43(6): 118-125.
ZHOU Y J, XIE C L, CHEN B Z, et al. Effect of different Yeast and *Lactobacillus plantarum* combined fermentation on the quality of Xinhui citrus ferment[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(6): 118-125.
- [5] 吴林达, 林兴奋, 黄晓慧, 等. 新会柑果汁发酵制备细菌纤维素技术研究[J]. 广东农业科学, 2022, 49(8): 129-136.
WU L D, LIN X F, HUANG X H, et al. Study on the production of bacterial cellulose by fermenting Xinhui citrus juice[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2022, 49(8): 129-136.
- [6] 李义勇, 陈柏忠, 曾嘉佳, 等. 新会柑汁发酵物对水产养殖尾水的净化效果研究[J]. 水产养殖, 2020, 41(10): 5-10.
LI Y Y, CHEN B Z, ZENG J J, et al. Purification effect of the Xinhui citrus juice culture on the aquaculture tail water[J]. Journal of Aquaculture, 2020, 41(10): 5-10.
- [7] 李义勇, 陈柏忠, 沈许源, 等. 利用新会柑果浆培养海洋假丝酵母的发酵工艺[J]. 食品工业, 2022, 43(6): 55-58.
LI Y Y, CHEN B Z, SHEN X Y, et al. The fermentation process of the Xinhui citrus pulp for *Candida orthopsilosis* culture[J]. The Food Industry, 2022, 43(6): 55-58.
- [8] XU H Y, FENG L X, DENG Y, et al. Change of phytochemicals and bioactive substances in *Lactobacillus* fermented Citrus juice during the fermentation process[J]. LWT-Food Science and Technology, 2023, 180: 114715.
- [9] OBEROI H S, VADLANI P V, NANJUNDASWAMY A, et al. Enhanced ethanol production from kinnow mandarin (*Citrus reticulata*) waste via a statistically optimized simultaneous saccharification and fermentation process[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(2): 1593-1601.
- [10] HUANG J Y, YANG S J, JIAN H L. Comparative genomic analysis of the mutant *Rhodotorula mucilaginosa* JH-R23 provides insight into the high-yield carotenoid mechanism[J].

- Fermentation, 2024, 10(4): 176.
- [11] 邓永平, 车鑫, 艾瑞波, 等. 好食脉孢霉发酵产类胡萝卜素的鉴定、抗氧化性及稳定性研究[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(4): 15-20.
- DENG Y P, CHE X, AI R B, et al. Identification, antioxidant and stability of carotenoids from a GRAS fungus *Neurospora sitophila*[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(4): 15-20.
- [12] WANG S K, WANG X, TAO H H, et al. Heterotrophic culture of *Chlorella pyrenoidosa* using sucrose as the sole carbon source by co-culture with immobilized yeast[J]. Bioresource Technology, 2018, 249: 425-430.
- [13] PAUL D, KUMARI P K, SIDDIQUI N. Yeast carotenoids: cost-effective fermentation strategies for health care applications[J]. Fermentation, 2023, 9(2): 147.
- [14] 肖安风, 倪辉, 李利君, 等. 几种糖代谢产物对法夫酵母产虾青素影响的对比研究[J]. 食品科学, 2009, 30(19): 268-272.
- XIAO A F, NI H, LI L J, et al. Comparative study on effects of various carbohydrate metabolic products on astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma*[J]. Food Science, 2009, 30(19): 268-272.
- [15] 杨素晶, 蹇华丽, 魏锋, 等. 航天诱变菌株 JH-R23 产虾青素培养条件优化[J]. 食品科技, 2021, 46(11): 1-8.
- YANG S J, JIAN H L, WEI F, et al. Optimization of culture conditions for astaxanthin production by space mutation strain JH-R23[J]. Food Science and Technology, 2021, 46(11): 1-8.
- [16] 官雪芳, 陈舒莹, 赖恭梯, 等. 基于豆渣为氮源的红法夫酵母产虾青素的发酵条件优化[J]. 福建农业学报, 2024, 39(9): 1102-1110.
- GUAN X F, CHEN S Y, LAI G T, et al. Optimization of astaxanthin-producing fermentation by *Phaffia rhodozyma* using okara as nitrogen source[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2024, 39(9): 1102-1110.
- [17] 徐晓丹, 潘宇, 柯尊丽, 等. 高糖胁迫下槲皮素对酿酒酵母胞内损伤的保护作用与机制[J]. 食品科学, 2017, 38(12): 63-68.
- XU X D, PAN Y, KE Z L, et al. Protective effect and mechanism of quercetin against high glucose-induced intracellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Food Science, 2017, 38(12): 63-68.
- [18] DEL DILAR ANZOLA-ROJAS M, GONCALVES DA FONSECA S, CANEDO DA SILVA C, et al. The use of the carbon/nitrogen ratio and specific organic loading rate as tools for improving biohydrogen production in fixed-bed reactors[J]. Biotechnology Reports, 2015, 5: 46-54.
- [19] MUSSAGY C U, GUIMARAES A A C, ROCHA L V F, et al. Improvement of carotenoids production from *Rhodotorula glutinis* CCT-2186[J]. Biochemical Engineering Journal, 2021, 165: 107827.
- [20] SINHA S, SINGH G, ARORA A, et al. Carotenoid production by red yeast isolates grown in agricultural and "Mandi" waste [J]. Waste Biomass Valor, 2021, 12(7): 3939-3949.
- [21] 王倩倩. 红酵母和好食脉孢霉发酵糟渣产类胡萝卜素的研 究[D]. 晋中: 山西农业大学, 2016: 30.
- WANG Q Q. Study on carotenoid production with dregs fermentation by *Rhodotorula* and *Neurospora sitophila*[D]. Taigu: Shanxi Agricultural University, 2016: 30.
- [22] SHARMA R, GHOSH G. Optimization of carotenoids production by *Rhodotorula mucilaginosa* (MTCC-1403) using agro-industrial waste in bioreactor: a statistical approach[J]. Biotechnol Rep (Amst), 2020, 25: e407.
- [23] 朱晓婷, 肖更生, 邢东旭, 等. 产地及肥料对新会茶枝柑果实品质的影响[J]. 食品工业科技, 2025, 46(5): 267-276.
- ZHU X T, XIAO G S, XING D X, et al. Influence of place of origin and fertilizer on fruit quality of *Citrus reticulata* 'chachiensis' in Xinhui district[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(5): 267-276.
- [24] 康雨芳, 陈雪峰, 常相娜, 等. 胶红酵母胞外多糖的抗疲劳作用[J]. 食品工业科技, 2018, 39(9): 301-305.
- KANG Y F, CHEN X F, CHANG X N, et al. Antifatigue effect of extracellular polysaccharide from *Rhodotorula mucilaginosa* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(9): 301-305.
- [25] 汤伟, 李佳欣, 王悦, 等. 胶红酵母 CYJ03 的体外体内抗氧化活性研究[J]. 工业微生物, 2022, 52(1): 1-8.
- TANG W, LI J X, WANG Y, et al. Studies on antioxidative activities of *Rhodotorula mucilaginosa* CYJ03 in vitro and in vivo[J]. Industrial Microbiology, 2022, 52(1): 1-8.