

研究报告

云南抚仙湖产类胡萝卜素酵母菌的资源调查

樊竹青^{2Δ} 李治滢^{1Δ} 董明华¹ 周斌¹ 欧阳一星¹ 杨丽源¹ 李绍兰^{1*}

(1. 云南大学 云南省微生物研究所 云南 昆明 650091)

(2. 普洱学院 云南 普洱 665000)

摘要:【目的】对分离自云南抚仙湖湖水的 379 株酵母菌进行产类胡萝卜素的筛选,以期获得具有开发应用价值的产类胡萝卜素酵母菌。【方法】采用酸热法提取类胡萝卜素,紫外分光光度计测定类胡萝卜素含量,SPSS 软件分析产类胡萝卜素酵母的分布特征。【结果】318 株酵母菌(占供试菌株的 83.91%)具有产类胡萝卜素的能力,大多数菌株类胡萝卜素产量在 10–300 μg/g 之间,最高达 590.83 μg/g。产类胡萝卜素酵母集中分布于红冬孢酵母属(*Rhodospiridium*)和红酵母属(*Rhodotorula*);担子菌酵母产类胡萝卜素的能力高于子囊菌酵母;筛选到 9 株产类胡萝卜素活性较强的菌株:双倒卵形红冬孢酵母(*Rhodospiridium diobovatum*) 3 株、沼泽生红冬孢酵母(*Rhodospiridium paludigenum*) 2 株、粘红酵母(*Rhodotorula glutinis*)、禾本红酵母(*Rhodotorula graminis*)、瑞纳锁掷孢酵母(*Sporidiobolus ruineniae*)及 *Cystofilobasidium macerans* 各 1 株。【结论】高原湖泊抚仙湖生存着大量产类胡萝卜素的酵母菌,“红色酵母”(Red yeasts)具有较强的产类胡萝卜素的能力,红冬孢酵母属(*Rhodospiridium*)和红酵母属(*Rhodotorula*)是抚仙湖产类胡萝卜素酵母菌的主要类群。

关键词: 抚仙湖, 类胡萝卜素, 酵母菌

Carotenoid-producing yeasts resources in Fuxian Lake, Yunnan

FAN Zhu-Qing^{2Δ} LI Zhi-Ying^{1Δ} DONG Ming-Hua¹ ZHOU Bin¹ OUYANG Yi-Xing¹
YANG Li-Yuan¹ LI Shao-Lan^{1*}

(1. Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming, Yunnan 650091, China)

(2. Puer University, Puer, Yunnan 665000, China)

Abstract: [Objective] To obtain the carotenoid-producing yeast with potential application value,

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31160006); Science and Technology Condition Platform Construction Program of Yunnan Province (No. 2009DA002); National Microbiology Resource Platform Special Service Program for Microbiology Teaching Experiment (No. NIMR-2014-8)

^ΔThese authors equally contributed to this work

*Corresponding author: Tel: 86-871-65033540; E-mail: shlli@ynu.edu.cn

Received: January 21, 2016; **Accepted:** September 14, 2016; **Published online** (www.cnki.net): September 30, 2016

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31160006); 云南省科技条件平台建设计划项目(No. 2009DA002); 国家微生物资源平台专项-面向微生物教学实验的专题服务项目(No. NIMR-2014-8)

^Δ共同第一作者

*通讯作者: Tel: 86-871-65033540; E-mail: shlli@ynu.edu.cn

收稿日期: 2016-01-21; 接受日期: 2016-09-14; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-09-30

379 strains of yeasts were isolated and screened from Fuxian Lake samples. **[Methods]** Carotenoids were extracted using acid-heating method, the content of carotenoids was determined by ultraviolet spectrophotometer, and the distribution features of the carotenoid-producing yeasts were analyzed by SPSS software. **[Results]** 318 yeast strains (83.91% of the tested strains) could produce carotenoids. The yields of carotenoid among most strains ranged from 10 to 300 $\mu\text{g/g}$, and the highest amount was up to 590.83 $\mu\text{g/g}$. These strains mainly belonged to the genera *Rhodospiridium* and *Rhodotorula*; and the carotenoid-producing abilities of basidiomycetous yeasts were higher than those of ascomycetous yeast strains. In this study, 9 strains with high carotenoid-producing abilities were obtained, namely *Rhodospiridium diobovatum* (3 strains), *Rhodospiridium paludigenum* (2 strains), *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula graminis*, *Sporidiobolus ruineniae*, and *Cystofilobasidium macerans* (1 strain respectively). **[Conclusion]** Large numbers of the carotenoid-producing yeasts inhabited Fuxian Lake, and the “red yeasts” were higher yielding yeasts than others. The major groups of carotenoid-producing yeasts were *Rhodospiridium* and *Rhodotorula*.

Keywords: Fuxian Lake, Carotenoid, Yeast

类胡萝卜素色素(Carotenoid)是一类黄色、橙色或红色的多烯类化合物,已明确结构的有600多种。它广泛存在于植物、动物、微生物和人体内,但仅有植物和微生物可自行合成,动物和人体需从外界获取^[1]。类胡萝卜素具有多种重要的生理功能。在光合生物中,它是重要的光合色素,并对光合机构提供保护作用;在非光合生物中,类胡萝卜素可增强细胞的抗逆性。低温环境下,类胡萝卜素与膜结合可增加膜的流动性^[2-3],帮助菌体抵抗紫外辐射、光氧化^[4-5]。细胞通过增加类胡萝卜素的合成有消除胞内氧自由基的作用^[2,6]。作为最安全的着色剂之一,类胡萝卜素广泛用于食品、化妆品、水产养殖业。该色素与人类健康的关系近年来也倍受关注,人体视觉的形成、上皮细胞的正常生长和分化、生殖均与类胡萝卜素有密切关系,而其独特的抗氧化活性,在减少癌症的发生和发展,降低心血管疾病、白内障的发病率等功效也引起了医药领域极大的关注^[7-8]。从自然界筛选性状优良的微生物进行类胡萝卜素的生物合成以替代化学合成是近年来一个研究热点。

Libkind 等^[9-11]对阿根廷北部海拔 1 370 m–1 700 m 湖水中的酵母菌产类胡萝卜素和类菌胞素研究后发现,高原湖泊内存在丰富的产类胡萝卜素酵母菌类群,这与紫外辐射强、水体透明度高有密切关系,尤其紫外线是影响类胡萝卜素和类菌胞素

合成的最主要的因素。在国内对产类胡萝卜素酵母的相关研究中,对酵母菌的优化培养居多^[12-16],对湖泊产类胡萝卜素酵母菌进行系统筛选、分布特征及色素产量的研究则尚未见报道。

抚仙湖是我国第二大深水湖泊,位于云南省东部,海拔 1 722.5 m,湖面积 216.6 km²,湖容积为 206.2 亿 m³,Ⅰ类水质,水体透明度范围 0.5 m–6.2 m,平均值为 4.6 m,是典型高原湖泊^[17-18],也是研究产类胡萝卜素酵母的优良场所。本实验室前期对抚仙湖湖水中的酵母菌进行分离和鉴定,共得到 22 个属 52 个种和 1 个潜在的新分类单元,共计 553 株酵母菌,根据采样点地理位置分布和酵母菌种群挑选了其中 379 株进行了产类胡萝卜素的初步筛选,随后对产类胡萝卜素较高的 31 株酵母菌进行复筛,对其开发利用价值进行初步评价,以期获得具有开发应用价值的产类胡萝卜素酵母菌株。

1 材料与方法

1.1 生境和菌种来源

将抚仙湖水域划分为湖心区、北沿岸区、南沿岸区。湖心区设 4 个采样点:禄充渔村与尖山间湖心表层水(F2),老鹰地与尖山间湖心表层水(F3),牛魔度假村以东湖心表层水(F7),阳光海岸与小凹间湖心表层水(F8);北沿岸区设 4 个采样点:海口表层水(F1),东风旅游度假区旁表层水(F4),万寿游乐中心旁表层水(F5),禄充渔村旁表层水(F6);

南沿岸区设 3 个采样点：阳光海岸旁表层水(F9)，玉带河旁表层水(F10)，小凹与涛境间表层水(F11)。在样点划分上，岸距<1 000 m 的样点归为沿岸区，岸距≥1 000 m 的样点归为湖心区。采样时间为 2013 年 12 月 12 日。

11 个样点共分离到 553 株酵母菌，按采样点地理位置分布和酵母菌种群挑选其中 379 株作为本次实验的供试菌株。菌株现保存于云南大学云南省微生物所。

1.2 主要试剂和仪器

HCl (AR)和丙酮(AR)为国产分析纯。AB204-S 电子天平，瑞士Mettler Toledo公司；TG16-WS台式高速离心机，湖南湘仪实验室仪器开发公司；T6新世纪紫外可见分光光度计，北京普析通用有限公司；G2X-GF101-1-BS电热恒温鼓风干燥箱，上海跃进医疗器械有限公司；Orion 5 star电导率仪，Thermo Scientific 公司；TN100 浊度仪，Eutech Instruments PteLtd；XWW25/450型旋转摇瓶机，乐山长征制药机械有限责任公司。

1.3 培养基及发酵培养

1.3.1 培养基：活化(斜面)培养基(g/L) 酵母膏 5.0，蛋白胨 10.0，葡萄糖 20.0，琼脂 20.0，pH 自然， 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。种子发酵培养基(g/L)：葡萄糖 40.0，酵母粉 10.0，蛋白胨 10.0， $MgSO_4$ 1.0， K_2HPO_4 0.5，pH 6.0， 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。发酵筛选培养基(g/L)：葡萄糖 40.0，酵母粉 10.0，蛋白胨 10.0， $MgSO_4$ 1.0， K_2HPO_4 0.5，pH 6.0， 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

1.3.2 菌株活化及发酵培养：菌株活化：在 25 ± 1 °C、活化(斜面)培养基上划线培养 24 h。种子发酵培养 将活化 24 h 的斜面菌株接入 50 mL/250 mL 的种子发酵培养基中， 28 ± 2 °C、120 r/min 振荡培养 24 h。初筛发酵培养：选用 25 mL 的三角瓶，按 7 mL/25 mL 分装培养基，接入活化好的斜面菌种， 28 ± 2 °C、120 r/min 发酵 120 h 后进行类胡萝卜素测定。复筛发酵培养：使用 250 mL 的三角瓶，按 50 mL/250 mL 分装培养基。按 10% (体积比)的比

例接入发酵种子， 28 ± 2 °C、120 r/min 培养 120 h。每株菌设 3 个平行实验。

1.4 生物量及类胡萝卜素含量的测定

1.4.1 生物量的测定：生物量以菌体干重计。取洁净离心管，称重为 A_1 ；取混合均匀的发酵液 3 mL，10 000 r/min 离心 5 min，弃上清液；将离心管与菌体置于 65 °C 的干燥箱中烘烤 24 h 以上，取出后称重为 A_2 。 $(A_2-A_1)/3$ 即为每毫升发酵液生物量。

1.4.2 类胡萝卜素的测定及计算：采用酸热法进行破壁处理后，用丙酮提取类胡萝卜素^[19]。以丙酮为空白对照，用普析 T6 新世纪紫外可见分光光度计，于 475 nm 处测定样品的吸光度，按下列公式计算类胡萝卜素含量。

类胡萝卜素含量($\mu\text{g/g}$ 干菌体)= $A_{\lambda\text{max}}DV/0.16m$

$A_{\lambda\text{max}}$ —最大吸收波长 475 nm 下的吸光度；

V —提取所用有机溶剂的总体积(mL)；

D —浸提液稀释倍数；

m —干酵母菌体质量(g)；

0.16—类胡萝卜素的消光系数。

1.5 数据处理

采用 SPSS 软件分析产类胡萝卜素酵母的分布特征。

2 结果与分析

2.1 抚仙湖湖水中酵母菌产类胡萝卜素菌株的初筛

初筛实验共计 379 株抚仙湖酵母菌株，包括子囊菌酵母 12 个种、27 株，担子菌酵母 35 个种、308 株，类酵母 2 个种、44 株。初筛结果见表 1。

结果显示，379 株供试酵母菌中有 318 株具有产类胡萝卜素的能力，占总数的 83.91%，其中子囊菌酵母 15 株(占子囊菌酵母供试菌株的 55.56%)，担子菌酵母 270 株(占担子菌酵母供试菌株的 87.66%)，类酵母 33 株(占类酵母供试菌株的 75.00%)；从种群来看，子囊菌酵母有 8 个种(占子囊菌酵母供试菌株种群的 66.67%)、担子菌酵母 33 个种(占担子菌酵母供试菌株种群的 94.29%)和类酵母 2 个种都产类胡萝卜素。

表 1 抚仙湖酵母菌产类胡萝卜素菌株初筛结果
Table 1 The results of carotenoid-producing yeasts from Fuxian Lake

种 Species	菌株数 Number of strains	类胡萝卜素产量 Carotenoid yield (μg/g)				
		11-100	101-200	201-300	301-400	>400
Ascomycetes						
<i>Candida silvae</i>	1					
<i>Candida sojae</i>	4	2				
<i>Candida tropicalis</i>	1					
<i>Candida xylopsoci</i>	1					
<i>Debaryomyces hansenii</i>	6	4				
<i>Galactomyces candidum</i>	2	1				
<i>Geotrichum silvicola</i>	4	2				
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	1					
<i>Pichia kudriavzevii</i>	1	1				
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	2	1				
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	3	3				
<i>Williopsis californica</i>	1	1				
Subtotal	27	15	0	0	0	0
Basidiomycetes						
<i>Cryptococcus albidus</i>	14	6				
<i>Cryptococcus carnescens</i>	1		1			
<i>Cryptococcus chernovii</i>	4	1				
<i>Cryptococcus diffluens</i>	1					
<i>Cryptococcus flavescens</i>	7	5	1			
<i>Cryptococcus fragicola</i>	1	1				
<i>Cryptococcus friedmannii</i>	11	3				
<i>Cryptococcus heimaeyensis</i>	1	1				
<i>Cryptococcus laurentii</i>	1	1				
<i>Cryptococcus luteolus</i>	2	2				
<i>Cryptococcus saitoi</i>	12	2				
<i>Cryptococcus uzbekistanensis</i>	2	1				
<i>Cystofilobasidium macerans</i>	2					1
<i>Filobasidium elegans</i>	5	5				
<i>Filobasidium floriforme</i>	8	7				
<i>Filobasidium uniguttulatum</i>	3	1				
<i>Hannaella zeae</i>	2	1	1			
<i>Leucosporidium scottii</i>	1	1				
<i>Pseudozyma fusiformata</i>	1	1				
<i>Rhodotorula glutinis</i>	10	1	7	1	1	
<i>Rhodotorula graminis</i>	11	1		6	4	
<i>Rhodotorula ingeniosa</i>	1	1				
<i>Rhodotorula mucilaginoso</i>	174	42	87	38	1	5
<i>Rhodotorula slooffiae</i>	1	1				
<i>Rhodotorula taiwanensis</i>	1					1
<i>Rhodospiridium diobovatum</i>	9	1		7	1	
<i>Rhodospiridium fluviale</i>	2		1		1	
<i>Rhodospiridium kratochvilovae</i>	1		1			
<i>Rhodospiridium paludigenum</i>	6				1	5
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	7	2	3	2		
<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	1			1		
<i>Sporobolomyces alborubescens</i>	2	1	1			
<i>Sporobolomyces phaffii</i>	1			1		
<i>Trichosporon gracile</i>	1					
<i>Trichosporon moniliiforme</i>	1	1				
Subtotal	308	90	103	56	9	12
Yeast-like						
<i>Aureobasidium pullulans</i>	39	26	2			
<i>Aureobasidium proteae</i>	5	5				
Subtotal	44	31	2	0	0	0
Total	379	136	105	56	9	12
Percentage (%)		35.88	27.70	14.78	2.37	3.17

从菌株产量看,产量 $\leq 200\text{ }\mu\text{g/g}$ 的菌株共计241株,占供试菌株的63.58%,产量 $>200\text{ }\mu\text{g/g}$ 的共计77株,占供试菌株的20.31%,其中 $>300\text{ }\mu\text{g/g}$ 的菌株21株, $>400\text{ }\mu\text{g/g}$ 的菌株12株,相对高产的菌株仅占很小比例。此外,子囊菌酵母、担子菌酵母及类酵母的类胡萝卜素产量差异也很大。子囊菌酵母产量明显低下,27株供试菌株全都 $\leq 100\text{ }\mu\text{g/g}$;类酵母除2株在 $101\text{--}200\text{ }\mu\text{g/g}$ 外,其余42株产量都 $\leq 100\text{ }\mu\text{g/g}$,产量也普遍低下;担子菌酵母的类胡萝卜素产量在 $11\text{--}400\text{ }\mu\text{g/g}$ 之间均有分布,以产量 $\leq 200\text{ }\mu\text{g/g}$ 的菌株居多。值得注意的是,类胡萝卜素产量 $>200\text{ }\mu\text{g/g}$ 的菌株全是担子菌酵母。总的来看,抚仙湖湖水中产类胡萝卜素酵母菌有着丰富的种群多样性,担子菌酵母则是产类胡萝卜素酵母菌的主要类群。

在产类胡萝卜素酵母的研究中,红冬孢酵母属(*Rhodospiridium*)、红酵母属(*Rhodotorula*)、掷孢酵母属(*Sporobolomyces*)、锁掷酵母属(*Sporidiobolus*)是常见的产类胡萝卜素酵母菌类群,这些类群具有较高的类胡萝卜素产量,并因其培养斜面为红色而被称为“红色酵母”(Red yeasts)^[20]。本次初筛得到的77株类胡萝卜素产量 $>200\text{ }\mu\text{g/g}$ 的酵母菌全为“红色酵母”,也说明“红色酵母”确实具有较强的产类胡萝卜素的能力。

类胡萝卜素产量 $>400\text{ }\mu\text{g/g}$ 的菌株种群相对集中,分布于红酵母属(*Rhodotorula*)、红冬孢酵母属(*Rhodospiridium*)和*Cystofilobasidium*属的4个种中,分别是胶红酵母(*Rh. mucilaginosa*)、台湾红酵母(*Rh. taiwanensis*)、沼泽生红冬孢酵母(*R. paludigenum*)和*Cystofilobasidium macerans*。文献对胶红酵母(*Rh. mucilaginosa*)和沼泽生红冬孢酵母(*R. paludigenum*)产类胡萝卜素的筛选、优化报道比较多^[13-16],但对台湾红酵母(*Rh. taiwanensis*)和*Cystofilobasidium macerans*高产类胡萝卜素的则尚未见报道。此外,本研究还筛选到产类胡萝卜素中等产量的*Hannaella*属、类酵母出芽短梗霉属(*Aureobasidium*)和隐球酵母属(*Cryptococcus*)的菌株。

2.2 抚仙湖湖水中酵母菌产类胡萝卜素的复筛结果

为考查菌株产类胡萝卜素性状的稳定性及潜在应用价值,按照菌株种群及初筛结果选取了14个种、共31株酵母菌进行产类胡萝卜素的复筛(表2)。

从表2看到,仅有3株菌(F314、F7、F281)产类胡萝卜素的复筛结果高于初筛,其余28株菌的复筛结果均出现了不同程度的下降。胶红酵母(*Rh. mucilaginosa*) (F4、F230、F484和F507),台湾红酵母(*Rh. taiwanensis*) (F17)、圆红冬孢酵母(*R. toruloides*) (F92)菌株下降幅度较大;沼泽生红冬孢酵母(*R. paludigenum*)和双倒卵形红冬孢酵母(*R. diobovatum*)初筛、复筛结果有一定波动,多数菌株复筛结果出现不同程度下降,但有1株(F314)略有提高,有2株(F56和F306)较稳定;瑞纳锁掷孢酵母(*S. ruineniae*)和*Cystofilobasidium macerans*初筛和复筛结果较稳定。

复筛共有9株菌株类胡萝卜素产量 $>250\text{ }\mu\text{g/g}$,包括4个属6个种,其中红酵母属(*Rhodotorula*)2株:粘红酵母(*Rh. glutinis*) F420和禾本红酵母(*Rh. graminis*) F19;红冬孢酵母属(*Rhodospiridium*)5株:双倒卵形红冬孢酵母(*R. diobovatum*) F32、F56、F314和沼泽生红冬孢酵母(*R. paludigenum*) F159及F491;掷孢酵母属(*Sporidiobolus*)和*Cystofilobasidium*属各1株:瑞纳锁掷孢酵母(*S. ruinenia*) F7和*Cystofilobasidium macerans* F281。在高原湖泊酵母菌产类胡萝卜素的研究中,Moliné等^[21]在对阿根廷巴塔哥尼亚(Patagonia)地区的Negra Lake、Ilon Lake及Nahuel Huapi Lake的12株胶红酵母(*Rh. mucilaginosa*)进行产类胡萝卜素的测定研究,最高值为 $243\text{ }\mu\text{g/g}$ 。Libkind等^[22]也对Patagonia地区胶红酵母(*Rh. mucilaginosa*)类胡萝卜素产量进行测定,最高值为 $300\text{ }\mu\text{g/g}$ 。Mata-Gómez等^[7]在2014年发表的综述中,把酵母产类胡萝卜素的产量分为三个等级: $<100\text{ }\mu\text{g/g}$ 为低等产量, $101\text{--}500\text{ }\mu\text{g/g}$ 为中等产量, $>500\text{ }\mu\text{g/g}$ 为高等产量。本次复筛获得的9株酵母菌的类胡萝

表 2 抚仙湖酵母菌产类胡萝卜素复筛结果

Table 2 Secondary screening results of carotenoid-producing yeasts from Fuxian Lake

种名 Species	菌号 Strain No.	类胡萝卜素产量 Carotenoid content (μg/g)	
		Primary screening	Rescreening
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	F4	735.71	210.66
	F230	518.70	140.70
	F484	422.45	165.27
	F507	568.35	161.37
<i>Rhodotorula graminis</i>	F19	318.65	260.97
	F146	356.31	245.54
	F506	356.39	208.05
<i>Rhodotorula taiwanensis</i>	F17	407.46	140.95
<i>Rhodotorula glutinis</i>	F40	263.30	168.30
	F420	352.58	323.43
<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	F7	234.26	266.48
<i>Cryptococcus flavescens</i>	F25	162.79	63.96
<i>Cryptococcus carnescens</i>	F106	106.82	58.08
<i>Cystofilobasidium macerans</i>	F281	568.28	590.83
<i>Aureobasidium pullulans</i>	F415	141.70	73.38
<i>Rhodosporidium diobovatum</i>	F32	324.84	251.50
	F56	295.37	285.85
	F303	272.18	139.09
	F306	243.57	216.45
	F314	236.44	320.23
	F332	243.73	178.91
	F355	272.70	182.72
<i>Rhodosporidium fluviale</i>	F469	327.69	203.58
<i>Rhodosporidium toruloides</i>	F92	215.84	68.02
	F98	246.69	220.82
<i>Rhodosporidium paludigenum</i>	F159	358.09	285.83
	F240	427.85	233.14
	F309	421.61	207.28
	F351	448.23	234.38
	F491	480.26	400.88
<i>Sporobolomyces alborubescens</i>	F468	142.23	106.12

胡萝卜素产量>250 μg/g，4 株产量>300 μg/g，最高值为 F281 的 590.83 μg/g，达到了其他学者认为的高产菌株的范畴^[23-26]。这些菌株具有潜在的应用价值，可通过改良营养配方、优化培养条件或基因改造来进行下一步的开发研究。

2.3 红酵母属和红冬孢酵母属产类胡萝卜素优势种在抚仙湖的分布特征

红酵母属 (*Rhodotorula*) 和红冬孢酵母属 (*Rhodosporidium*)在本次实验中,在种群和数量上分布优势明显，反应了这 2 个属酵母菌对抚仙湖生境

良好的适应性。选取这 2 个属产类胡萝卜素较高的 8 个种，采用 SPSS 软件分析它们在抚仙湖湖心区、南沿岸区、北沿岸区的数量分布特点(图 1)。

图 1 结果显示，粘红酵母(*Rh. glutinis*)、禾本红酵母(*Rh. graminis*)、台湾红酵母(*Rh. taiwanensis*)、*R. fluviale* 和沼泽生红冬孢酵母(*R. paludigenum*)在抚仙湖 3 个区域的数量分布不存在显著差异。在数量分布有明显差异的 3 个种中，胶红酵母(*Rh. mucilaginosa*)在湖心区和北沿岸区的的菌株数显著高于南沿岸区；圆红冬孢酵母菌(*R. toruloides*)

在湖心区的菌株数显著高于南沿岸区和北沿岸区；双倒卵形红冬孢酵母(*R. diobovatum*)在南沿岸区的菌株数显著高于湖心区和北沿岸区。总的来看，产类胡萝卜素优势酵母在湖心区相对集中一些。

酵母菌合成类胡萝卜素与紫外辐射及电导率均有关系^[10]。本次抚仙湖湖水 11 个采样点浊度和电导率的测定结果见表 3。

通过 Duncan 检验法分析各区域湖水理化因子差异性，3 个区域浊度、电导率不存在显著性差异($P>0.05$)。但在表 3 中，11 个采样点以湖心区 F3 样点浊度最低，电导率最高。浊度低可让更多的光线包括紫外线进入水体，有利于刺激酵母菌合成更多的类胡萝卜素，这与湖心区产类胡萝卜素酵母相对集中的结果是一致的。

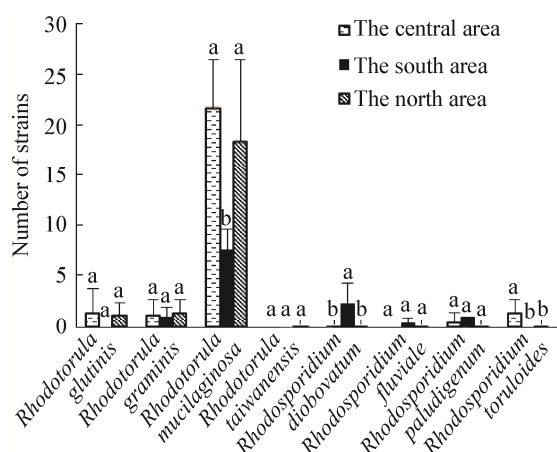


图 1 产类胡萝卜素优势酵母菌在抚仙湖的分布

Figure 1 The distribution of dominant carotenoid-producing yeast species in Fuxian Lake

注：同一个种内，相同字母表示没有差异，字母不同表示差异显著。

Note: Within the same species, the same letter indicates no difference, and the different letter shows significant difference.

3 讨论

3.1 类胡萝卜素含量与酵母菌群落及紫外线胁迫的关系

高原湖泊的一个重要特征就是强光照、强紫外线辐射。尤其是紫外线，对水体生态系统群落结构具有很强的选择作用^[27]，因此光保护化合物普遍存在于水生生物，而产类胡萝卜素是湖泊酵母的重要特点之一。虽然从目前的研究结果没有找到类胡萝卜素含量与菌体对紫外线承受能力之间有比例关系，但大多数酵母均有类胡萝卜素含量低下则对紫外辐射的忍耐力也低下的特征^[28]。

相比子囊菌酵母，担子菌酵母采取了合成更多的色素(如类胡萝卜素)的生存策略来减弱强光照和紫外线辐射的伤害^[2]。本次实验中，类胡萝卜素产量 $>11 \mu\text{g/g}$ 的菌株中，包括担子菌酵母 33 个种 270 株；子囊菌酵母 8 个种 15 株菌，且担子菌酵母类胡萝卜素产量普遍高于子囊菌酵母，充分体现了担子菌酵母对高原湖泊环境更强的适应性，从而成为抚仙湖湖水中的优势种群。Libkind 等^[10]对阿根廷高原湖泊相关研究中，担子菌酵母同样表现出很强的优势，这都反映出高原湖泊生态系统中，紫外线对产类胡萝卜素酵母的群落结构具有重要的影响作用，并与酵母菌类胡萝卜素产量间存在正相关关系。

3.2 产类胡萝卜素菌株复筛值普遍下降的原因分析

在酵母菌产类胡萝卜素的定量测定中，复筛较初筛值出现普遍下降。经过认真对比操作步骤、发酵条件及对数据的反复分析，认为复筛值普遍下降可能与下列两个因素密切相关：一是与溶氧量有关。

表 3 各采样点的浊度和电导率

Table 3 The turbidity and conductivity of each sampling point

项目 Item	湖心区 Central area of the lake				北沿岸区 North area of the lake				南沿岸区 South area of the lake		
	F2	F3	F7	F8	F1	F4	F5	F6	F9	F10	F11
浊度 Turbidity (NTU)	0.39	0.11	0.26	0.18	0.12	0.16	0.15	0.27	0.12	0.54	0.25
电导率 Conductivity ($\mu\text{S/cm}$)	324	384	375	351	343	348	342	341	362	322	321

酵母菌生物量的增加和类胡萝卜素的合成是大量消耗氧气的过程^[15-16],而酵母菌合成类胡萝卜素的量可随环境发生改变^[29-31]。初筛、复筛的装液量分别是 7 mL/25 mL 和 50 mL/250 mL,两种不同装液量在静置时,溶液表面积与三角瓶的体积比分别是 0.50 和 0.19,前者约为后者的 2.6 倍,在相同的转速下发酵 5 d,后者溶氧量相对低下可能是导致复筛普遍下降的主要因素。二是与酵母菌种群有关。红酵母属(*Rhodotorula*)中的胶红酵母(*Rh. mucilaginosa*)和台湾红酵母(*Rh. taiwanensis*)下降幅度较大,但同一个属的禾本红酵母(*Rh. graminis*)和粘红酵母(*Rh. glutinis*)下降幅度则明显收窄;在红冬孢酵母属(*Rhodospiridium*)中,双倒卵形红冬孢酵母(*R. diobovatum*)的下降幅度也明显小于沼泽生红冬孢酵母(*R. paludigenum*);*Cystofilobasidium macerans* 和瑞纳锁掷孢酵母(*S. ruineniae*)的初、复筛值就较稳定,因此认为,产类胡萝卜素的能力和稳定性是跟酵母菌种群有关的。

3.3 胶红酵母、沼泽生红冬孢酵母和双倒卵形红冬孢酵母对高原湖泊的适应性

胶红酵母(*Rh. mucilaginosa*)、沼泽生红冬孢酵母(*R. paludigenum*)和双倒卵形红冬孢酵母(*R. diobovatum*) 3 个种在本次产类胡萝卜素筛选实验中,产类胡萝卜素能力优势明显。在供试菌株中,胶红酵母(*Rh. mucilaginosa*)数量优势明显,占供试菌株 45.91%的比例。阿根廷巴塔哥尼亚尼加拉湖(Negra lake)中,胶红酵母(*Rh. mucilaginosa*)占了 87.5%的比例^[10]。北巴塔哥尼亚 15 个水生环境(湖泊、泻湖、河流)中,胶红酵母(*Rh. mucilaginosa*)占酵母总数的 50%以上^[5]。研究发现,胶红酵母(*Rh. mucilaginosa*)不同菌株间具有多样的表现型和基因型,它主要产生 Torularhodin、Torulene、 β -胡萝卜素和 γ -胡萝卜素 4 种色素,且 4 种色素在胞内的比例会根据环境条件改变而发生变化,该种酵母被认为具有高度的异质性^[32-34]。胶红酵母(*Rh. mucilaginosa*)对强光照、强紫外辐射环境表现出极强的适应性。Villarreal 等^[28]在对亚南极区域酵母菌对紫外辐射耐受性进行研究时,胶红酵母(*Rh. mucilaginosa*)是耐受能力最强的酵母之一。

沼泽生红冬孢酵母(*R. paludigenum*)和双倒卵形红冬孢酵母(*R. diobovatum*)是抚仙湖中另外 2 个重要的优势菌群,它们在类胡萝卜素产量及性状的稳定性方面优势明显。初筛的 9 株双倒卵形红冬孢酵母(*R. diobovatum*)和 6 株沼泽生红冬孢酵母(*R. paludigenum*)中,除 1 株双倒卵形红冬孢酵母(*R. diobovatum*)产量 < 100 $\mu\text{g/g}$ 外,其余 14 株均为中、高产菌株;复筛结果产类胡萝卜素产量 > 250 $\mu\text{g/g}$ 的 9 株菌中,沼泽生红冬孢酵母(*R. paludigenum*)和双倒卵形红冬孢酵母(*R. diobovatum*)就分别占有 2 株和 3 株,为本次筛选研究中高产、稳产特征较为显著的菌株。

上述 3 个种是抚仙湖水中重要的产类胡萝卜素酵母的优势种群,但是是何种机制促进类胡萝卜素高产,相关研究资料却很少。Libkind 等^[9]在对湖泊酵母光保护物质(类胡萝卜素、类菌胞素)的研究中明确指出,细胞内类胡萝卜素或类菌胞素的出现需要菌体持续暴露在光照和紫外辐射条件下才能出现;碳源是影响类胡萝卜素形成最重要的参数,相关研究中发现,以乙醇、甲醇、异丙醇、乙二醇为碳源可刺激类胡萝卜素的合成^[35-36],而氮源(酵母抽提物)是提高类胡萝卜素产量的最重要的变量^[8],这些成果主要从环境因子和营养条件展开研究,而与类胡萝卜素形成的关键因素如促发机制、调控机制甚至完整的生化过程现在都还是知之甚少,这些与菌种本身密切相关的特征还有待进一步研究。

4 结论

高原湖泊抚仙湖生存着丰富的产类胡萝卜素酵母菌,无论从类胡萝卜素产量还是产类胡萝卜素的菌株数量均是担子菌酵母明显高于子囊菌酵母;“红色酵母”具有较强的产类胡萝卜素的活性;红冬孢酵母属(*Rhodospiridium*)和红酵母属(*Rhodotorula*)是抚仙湖产类胡萝卜素的主要类群。紫外线对高原湖泊产类胡萝卜素酵母的分布及种群结构有重要影响。

参考文献

- [1] Hao CM, Luo Y. Applications of carotenoids and their research advances[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2002, 10(4): 42-43 (in Chinese)
郝常明, 罗伟. 类胡萝卜素功用新知[J]. 粮油食品科技, 2002, 10(4): 42-43

- [2] Roy S. Strategies for the Minimisation of UV-induced Damage[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2000: 177-205
- [3] Gruszecki WI, Strzalka K. Carotenoids as modulators of lipid membrane physical properties[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2005, 1740(2): 108-115
- [4] Britton G, Hornero-Méndez D. Carotenoids and Colour in Fruit and Vegetables[M]. Oxford: Clarendon Press, 1997: 11-27
- [5] Libkind D, Brizzio S, Ruffini A, et al. Molecular characterization of carotenogenic yeasts from aquatic environments in Patagonia, Argentina[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2003, 84(4): 313-322
- [6] Sowmya R, Sachindra NM. Evaluation of antioxidant activity of carotenoid extract from shrimp processing byproducts by *in vitro* assays and in membrane model system[J]. Food Chemistry, 2012, 134(1): 308-314
- [7] Mata-Gómez LC, Montañez JC, Méndez-Zavala A, et al. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview[J]. Microbial Cell Factories, 2014, 13: 12
- [8] Jin Q, Bi YL, Liu XM, et al. Recent advances on research of carotenoid metabolism and functions[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2014, 26(12): 3561-3571 (in Chinese)
靳青, 毕宇霖, 刘晓牧, 等. 类胡萝卜素代谢及功能研究进展[J]. 动物营养学报, 2014, 26(12): 3561-3571
- [9] Libkind D, Pérez P, Sommaruga R, et al. Constitutive and UV-inducible synthesis of photoprotective compounds (carotenoids and mycosporines) by freshwater yeasts[J]. Photochemical & Photobiological Sciences, 2004, 3(3): 281-286
- [10] Libkind D, Moliné M, Sampaio JP, et al. Yeasts from high-altitude lakes: influence of UV radiation[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2009, 69(3): 353-362
- [11] Libkind D, Moline M, van Broock M. Production of the UVB-absorbing compound mycosporine-glutaminol-glucoside by *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*)[J]. FEMS Yeast Research, 2011, 11(1): 52-59
- [12] Buzzini P. An optimization study of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* DBVPGG 3853 from substrates containing concentrated rectified grape must as the sole carbohydrate source[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 1999, 24(1): 41-45
- [13] Yang SP, Wu ZH, Jian JC. Culture conditions and carotenoid production by *Rhodospiridium paludigenum*[J]. Journal of Microbiology, 2011, 31(3): 61-66 (in Chinese)
杨世平, 吴灶和, 简纪常. 沼泽生红冬孢酵母生长及产类胡萝卜素培养条件的研究[J]. 微生物学杂志, 2011, 31(3): 61-66
- [14] Aksu Z, Eren AT. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: use of agricultural wastes as a carbon source[J]. Process Biochemistry, 2005, 40(9): 2985-2991
- [15] Yang ZP, Huang QM, Ren J, et al. Screening of *Rhodotorula* producing carotenoid and optimizing its fermentation conditions[J]. Journal of Sichuan Agricultural University, 2009, 27(3): 327-332 (in Chinese)
杨洲平, 黄乾明, 任君, 等. 高产类胡萝卜素红酵母的筛选及发酵条件的优化[J]. 四川农业大学学报, 2009, 27(3): 327-332
- [16] Zhao YQ, Chen LL, Du YJ. Optimization of fermentation conditions for carotenoids production by *Rhodotorula* sp.[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2013, 41(9): 4071-4074 (in Chinese)
赵玉巧, 陈玲玲, 杜云建. 产类胡萝卜素的海洋红酵母的培养条件优化研究[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(9): 4071-4074
- [17] Zhang XM, Dai L, Wang ZY. Analysis of ecological system structure and function in Fuxianhu lake basin[J]. Environmental Science Survey, 2007, 26(6): 54-57 (in Chinese)
张秀敏, 戴丽, 王志芸. 抚仙湖流域生态系统结构与功能分析[J]. 环境科学导刊, 2007, 26(6): 54-57
- [18] Pan JZ, Xiong F, Li WC, et al. Spatial-temporal dynamic changes of the water transparency and their influencing factors in Lake Fuxian, Yunnan Province[J]. Journal of Lake Sciences, 2008, 20(5): 681-686 (in Chinese)
潘继征, 熊飞, 李文朝, 等. 云南抚仙湖透明度的时空变化及影响因子分析[J]. 湖泊科学, 2008, 20(5): 681-686
- [19] Yang W, Ji CM. A simple method of broking cell wall[J]. Microbiology China, 1995, 22(1): 58-59 (in Chinese)
杨文, 吉春明. 一种简单的胞壁破碎方法[J]. 微生物学通报, 1995, 22(1): 58-59
- [20] Mannazzu I, Landolfo S, da Silva TL, et al. Red yeasts and carotenoid production: outlining a future for non-conventional yeasts of biotechnological interest[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2015, 31(11): 1665-1673
- [21] Moliné M, Flores MR, Libkind D, et al. Photoprotection by carotenoid pigments in the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: the role of torularhodin[J]. Photochemical & Photobiological Sciences, 2010, 9(8): 1145-1151
- [22] Libkind D, van Broock M. Biomass and carotenoid pigment production by patagonian native yeasts[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2006, 22(7): 687-692
- [23] Davoli P, Mierau V, Weber RWS. Carotenoids and fatty acids in red yeasts *Sporobolomyces roseus* and *Rhodotorula glutinis*[J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2004, 40(4): 392-397
- [24] Kobayashi M, Kakizono T, Nagai S. Astaxanthin production by a green alga, *Haematococcus pluvialis* accompanied with morphological changes in acetate media[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1991, 71(5): 335-339
- [25] Sarada R, Tripathi U, Ravishankar GA. Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions[J]. Process Biochemistry, 2002, 37(6): 623-627
- [26] Aksu Z, Eren AT. Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*[J]. Biochemical Engineering Journal, 2007, 35(2): 107-113
- [27] Williamson CE. What role does UV-B radiation play in freshwater ecosystems?[J]. Limnology and Oceanography, 1995, 40(2): 386-392
- [28] Villarreal P, Carrasco M, Barahona S, et al. Tolerance to ultraviolet radiation of psychrotolerant yeasts and analysis of their carotenoid, mycosporine, and ergosterol content[J]. Current Microbiology, 2016, 72(1): 94-101
- [29] Shi XY, Liu D, Chen LL, et al. Enhanced carotenoids production by a *Rhodotorula* sp. under stress conditions[J]. Biotechnology Bulletin, 2013, 5(1): 191-197 (in Chinese)
史馨怡, 刘丹, 陈黎黎, 等. 逆境对红酵母发酵生产类胡萝卜素的促进作用[J]. 生物技术通报, 2013, 5(1): 191-197
- [30] Tinoi J, Rakariyatham N, Deming RL. Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate[J]. Process Biochemistry, 2005, 40(7): 2551-2557
- [31] Perrier V, Dubreucq E, Galzy P. Fatty acid and carotenoid composition of *Rhodotorula* strains[J]. Archives of Microbiology, 1995, 164(3): 173-179
- [32] Buzzini P, Innocenti M, Turchetti B, et al. Carotenoid profiles of yeasts belonging to the genera *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces*, and *Sporidiobolus*[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2007, 53(8): 1024-1031
- [33] Blackwell M. The Yeasts-A Taxonomic Study[M]. 4th Edition. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1998: 800-827
- [34] Libkind D, Gadanho M, van Broock M, et al. Studies on the heterogeneity of the carotenogenic yeast *Rhodotorula mucilaginosa*, from Patagonia, Argentina[J]. Journal of Basic Microbiology, 2008, 48(2): 93-98
- [35] Orosa M, Franqueira D, Cid A, et al. Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*[J]. Bioresource Technology, 2005, 96(3): 373-378
- [36] Gu WL, An GH, Johnson EA. Ethanol increases carotenoid production in *Phaffia rhodozyma*[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 1997, 19(2): 114-117