

深红酵母 JLC 固态发酵废弃烟梗制备类胡萝卜素研究

郭大城¹, 张可可², 董贵彬², 张旭萍², 刘慧², 朱大恒², 席宇^{2*}

¹河南省疾病预防控制中心, 郑州 450016; ²郑州大学生命科学学院, 郑州 450001

摘要:烟梗是卷烟工业的一种典型固态废弃物,为资源化利用废弃烟梗(waste tobacco stem, WTS),采用 Plackett-Burman (PB) 设计对影响一株深红酵母(*Rhodotorula rubra*) JLC 固态发酵 WTS 生产类胡萝卜素的相关因素进行了评价。PB 设计与统计学分析表明:在选择 10 个相关因素中,装载量、培养时间和酵母粉添加量是影响类胡萝卜素产量的 3 个关键因素。在 PB 实验条件下,深红酵母 JLC 发酵产类胡萝卜素的最高量可达 21.54 $\mu\text{g/g}$ 。

关键词:烟梗; 固态发酵; 类胡萝卜素; Plackett-Burman 设计; 深红酵母

中图分类号: Q932

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.02.007

Carotenoids Production by *Rhodotorula rubra* JLC under Solid State Fermentation of Waste Tobacco Stems

GUO Da-cheng¹, ZHANG Ke-ke², DONG Gui-bin², ZHANG Xu-ping², LIU Hui², ZHU Da-heng², XI Yu^{2*}

¹Henan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Zhengzhou 450016, China;

²School of Life Science, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China

Abstract: Tobacco stem is a typical solid waste in the tobacco industry, to explore technologies for the resource utilization of waste tobacco stems (WTS), Plackett-Burman (PB) design was employed to evaluate some variables which were relevant to carotenoids production of *Rhodotorula rubra* JLC under solid state fermentation of WTS. Among ten selected variables, loading capacity, culturing time and yeast powder, as three key factors, were found to significantly influence carotenoids production via PB design and the following statistic analysis. Under PB design conditions, the maximum production of carotenoids reached 21.54 $\mu\text{g/g}$.

Key words: tobacco stem; solid state fermentation; carotenoids; Plackett-Burman design; *Rhodotorula rubra*

类胡萝卜素(carotenoids)是萜类化合物的羟基化衍生物,在生物体内具有抗炎、增强机体免疫力、防治肿瘤和治疗光敏性疾病等作用^[1],因此在食品、化妆品、医药和饲料添加剂等行业有广泛的应用^[2-4]。利用非粮廉价底物通过微生物的合成作用生产类胡萝卜素,降低生产成本是目前类胡萝卜素生产的一个研究热点^[5]。烟梗是卷烟工业的一种废弃物,约占烟叶总重的 20%~30%^[6],大量的烟梗被废弃,造成资源浪费和环境污染^[7,8]。烟梗中含有大量的可溶性糖类和氮类物质^[9],因此对其进行资源化利用是非常重要的。目前 WTS 多用来提取烟碱、果胶、茄尼醇^[10-12],然而利用酵母发酵 WTS 生产类胡萝卜素尚未见报道。本实验以一株分离的富含类胡萝卜素的深红酵母(*Rhodotorula rubra*) JLC

为出发菌株,以 WTS 为主要基质,对影响菌株 JLC 发酵生产类胡萝卜素的因素利用 PB 设计法进行考察,旨在为 WTS 的资源化利用和天然类胡萝卜素的开发提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

WTS 由河南天昌国际烟草有限公司提供,长度为 0.2~5.0 cm,直径为 0.15~0.50 cm。酵母粉和蛋白胨购自英国 OXOID 公司,琼脂粉购自美国 Sanland 公司,其余实验用试剂均为国产分析纯。

1.2 菌株及培养基

深红酵母 JLC 保藏于郑州大学生命科学学院,其类胡萝卜素最大吸收波长 485 nm。菌种保藏和种子液制备均采用烟梗提取液(tobacco stem extraction, TSE)培养基^[13],其中固体培养基琼脂含量为 2.0%。

收稿日期:2014-04-08 接受日期:2014-07-21

基金项目:国家级大学生创新创业训练计划(201410459092);河南省烟草公司科技项目(HYKJ201125)

* 通讯作者 E-mail: microxy@126.com

1.3 仪器

生化培养箱(MJX-70,上海和呈仪器制造有限公司);电热鼓风干燥箱(101,北京中兴伟业仪器有限公司);立式高压灭菌器(YXQ-LS-30SII,上海博迅实业有限公司);双人双面净化工作台(SW-CJ-2F,苏州净化设备有限公司);紫外可见分光光度计(UV-2450,日本岛津);低温高速离心机(Avanti J-25,Beckman coulter);连续流动分析仪(AA3,德国布朗卢比公司);恒温数显水浴锅(XTMD-8222,上海精宏实验设备有限公司);电子分析天平(BS223S,北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

1.4 方法

1.4.1 烟梗预处理及成分分析

WTS 于 60 °C 干燥箱中干燥 2 h, 去除较粗和较长烟梗后过 16 目标准筛除尘备用。处理后 WTS 采用连续流动分析仪进行主要成分分析。

1.4.2 种子液制备

从菌种斜面挑取一环培养物接种到含有 80 mL 种子培养液的 250 mL 三角瓶中,置于恒温摇床 30 °C 和 180 rpm 条件下培养 36 h,获得的培养物作为固态发酵的种子液。

1.4.3 固态发酵方法

分别称取一定量的 WTS 置于 250 mL 三角瓶中,按照 1.4.4 实验设计加入相应量的添加物,以 WTS 与水 1:3 的比例加入自来水后混匀室温浸泡 10 h,121 °C 灭菌 20 min。冷却后无菌操作将种子液以不同的接种量接种到上述三角瓶中,混合均匀,恒温 30 °C 静置培养,每 24 h 轻摇 1 次。

1.4.4 PB 设计实验方案

PB 设计可利用最少的实验次数,从考查的众多因素中快速筛选出主要影响效应^[3]。根据单因子实验结果,PB 设计(N = 12)对影响 WTS 发酵生产类胡萝卜素的 10 种因素进行了评估,10 种因素的编码、单位及水平见表 1。

表 1 PB 设计试验所选因子、水平及编码

Table 1 The two levels of variables and codes used in the Plackett-Burman design

变量 Variable	因素 Factor	单位 Unit	因素水平 Levels of factors	
			-1	1
X1	装载量	g ^①	10	20
X2	蔗糖	mg/g	0	10
X3	葡萄糖	mg/g	0	10

X4	蛋白胨	mg/g	0	10
X5	酵母粉	mg/g	0	10
X6	NaH ₂ PO ₄	mg/g	0	10
X7	(NH ₄) ₂ SO ₄	mg/g	0	10
X8	NaNO ₃	mg/g	0	10
X9	接种量	% ^②	5	10
X10	培养时间	d	4	7

注:①指 250 mL 三角瓶中装载 WTS 的质量;②指种子液与固态发酵基质比例(v/w)。

Note:① The quantity of WTS in a 250 mL Erlenmeyer flask;② The ratio of the seed broth to fermentation substrates (v/w).

1.5 分析方法

1.5.1 酵母生物量分离及测定

固态发酵培养一定时间后,向含发酵物的三角瓶中加入适量生理盐水,双层纱布过滤获得菌体滤液后定容。20 mL 菌体滤液 8 000 rpm 离心 10 min,弃除上清,收集菌体,无菌水洗涤 2 次,105 °C 烘至恒重,称重并计算生物量^[14]。

1.5.2 菌体类胡萝卜素的提取及含量测定

一定量的湿菌体经盐酸-热处理破壁后,用丙酮抽提类胡萝卜素。类胡萝卜素的提取参照文献^[15]进行。用紫外可见分光光度计测定色素提取液 485 nm 处吸光度,按下式计算类胡萝卜素含量:

$$\text{类胡萝卜素含量}(\mu\text{g/g}) = \frac{A_{\lambda_{\text{max}}} \times D \times V}{0.16 \times W}$$

式中, $A_{\lambda_{\text{max}}}$ 为色素最大吸收波长处的吸光度; D 为测定试样的稀释倍数; V 为提取色素所用溶剂量(mL); W 为菌体重量(g);0.16 为类胡萝卜素的消光系数。根据菌体细胞类胡萝卜素含量计算固态发酵物中类胡萝卜素的产量。

1.5.3 数据分析

实验数据采用 Design-Expert 8.0.6 统计分析软件进行处理。

2 结果与讨论

2.1 WTS 成分分析

WTS 中含有大量可溶性糖、烟碱等水溶性物质,其主要成分如表 2。因此,经水浸泡后 WTS 可作为一种廉价的固态发酵基质。发酵基质颗粒大小在固态发酵过程中起重要的作用,小颗粒基质能够提供更大的微生物作用表面,因此固态发酵中多采用小颗粒基质^[16]。采用小颗粒基质,发酵后酵母细胞很难与基质颗粒分离。本实验中采用大颗粒的 WTS 进行发酵,发酵后通过简单的过滤即可获得高

纯度的酵母细胞,因此有利于规模化生产过程中类胡萝卜素及其它高附加值产物的分离和提取。

表2 预处理烟梗的成分分析(g/L)

Table 2 The main compositions of WTS used in this study(g/L)

主要成分 Main components	总糖 Total sugar	总氮 Total nitrogen	烟碱 Nicotine	钾 Potassium	氯 Chlorine
含量 Content	20.35	1.73	0.84	2.53	2.03

2.2 PB 设计试验方案及其结果

PB 设计实验中,生物量、色素含量及色素产量

表3 PB 设计试验方案及结果

Table 3 Plackett-Burman design matrix with biomass and carotenoid production

试验号 No.	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	生物量 Biomass (mg/g)	色素含量 Pigment content ($\mu\text{g/g}$)	色素产量 Pigment production ($\mu\text{g/g}$)
1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	73.90	205.28	15.17
2	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	70.60	199.15	14.06
3	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	72.80	250.82	18.26
4	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	86.40	249.31	21.54
5	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	78.30	213.86	15.89
6	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	51.30	173.68	8.91
7	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	69.80	231.66	16.17
8	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	83.00	187.35	15.55
9	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	76.40	234.69	17.93
10	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	71.20	238.20	16.96
11	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	89.45	203.02	18.16
12	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	75.55	222.24	16.79

2.3 PB 设计试验的方差分析

Prob > F 值的大小能够表示模型及各个因子的显著性情况,当 Prob > F 值小于 0.05,表明有显著影响,当 Prob > F 值小于 0.01,表明有极显著影响^[19]。对 PB 设计试验结果进行方差分析见表 4,

表4 PB 设计试验结果方差分析

Table 4 Variance analysis of Plackett-Burman design experimental results

因素 Factor	平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	Prob > F ^①
模型 Model	98.93	9	10.99	26.76	0.0365 *
X1	29.18	1	29.18	71.03	0.0138 *
X2	8.13	1	8.13	19.80	0.0470 *
X3	5.37	1	5.37	13.07	0.0687
X4	5.11	1	5.11	12.43	0.0719
X5	14.73	1	14.73	35.85	0.0268 *

的响应值见表 3。从表 3 可看出:对生物量而言,最小的响应值为 51.30 mg/g,最大响应值为 89.45 mg/g;类胡萝卜素的最小和最大响应值分别为 8.91 $\mu\text{g/g}$ 和 21.54 $\mu\text{g/g}$ 。色素含量在试验过程中变化也较大,第 6 次试验中,以烟梗为唯一基质,色素含量为 173.68 $\mu\text{g/g}$,其它 11 次试验中色素含量均不同程度升高,表明添加因子对 JLC 色素的累积有正效应。总的来说,在 12 次试验中生物量、色素含量和色素产量变化均较大,表明在 PB 设计中所选因子对响应值影响较大。

结果表明,实验模型达到显著水平。在实验选择的 10 个因素中,蛋白胨、葡萄糖和 NaNO_3 对实验模型影响不显著,而蔗糖、酵母粉、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、装载量和培养时间对实验模型影响显著。

X6	9.70	1	9.70	23.62	0.0398 *
X8	4.46	1	4.46	10.85	0.0811
X10	17.62	1	17.62	42.90	0.0225 *

注:① $\text{Prob} > F$ 小于 0.05,表明模型或参数有显著影响; $\text{Prob} > F$ 小于 0.01,表明模型或参数有极显著影响。

Note:① $\text{Prob} > F$ less than 0.05, indicates that the model or parameters have a significant effect;② $\text{Prob} > F$ less than 0.01, indicates that the model or parameter has an extremely significant effect.

2.4 供试因子对 PB 设计试验模型的贡献度

贡献度(% contribution)指模型中的某因子的平方和占模型中各因子平方和总和的百分数,其值越大表明该因子对实验结果的影响越大^[17]。供试因子对类胡萝卜素产量的贡献度见表 5,结果表明,装载量、培养时间和酵母粉对模型贡献度相对较大,而蛋白脲、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、蔗糖等因素对模型贡献度相

对较小。

根据因子的贡献度和 $\text{Prob} > F$ 值综合考虑,培养时间、装载量和酵母粉是影响 JLC 固态发酵产类胡萝卜的重要因子,因此在下一步的放大发酵研究中对这 3 个因素进行优化,有望进一步提高类胡萝卜产量。

表 5 PB 设计试验中供试因子对类胡萝卜素产量的贡献度(%)

Table 5 The contribution of the tested variables to carotenoids production in Plackett-Burman design(%)

因素 Factor	X1 *	X2	X3	X4	X5 *	X6	X8	X10 *
贡献度 Contribution	29.43	8.20	5.41	5.15	14.85	9.79	4.50	17.77

3 结论

深红酵母 JLC 固态发酵 WTS,发酵后简单过滤即可获得高纯度酵母细胞,有利于类胡萝卜素的提取,同时也有利于其它高附加值酵母成分的提取。装载量、培养时间和酵母粉是影响类胡萝卜素产量的关键因素。因此,以 WTS 为主要基质,添加适量酵母粉,通过优化装载量和培养时间固态发酵生产类胡萝卜素,既可资源化利用 WTS,又可获得天然类胡萝卜素。通过 PB 实验,菌株 JLC 类胡萝卜素的最高产量为 21.54 $\mu\text{g/g}$,进一步优化有望提高类胡萝卜素产量。

参考文献

- Liu XJ(刘晓娟),Duan SS(段舜山),Li AF(李爱芬). Research advances on the production of carotenoids by microalgae. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发),2007,2:333-337.
- Frengova GI, Beshkova DM. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*; yeasts of biotechnological importance. *J Ind Microbiol Biotechnol*,2009,36:163-180.
- Elsanhoty RM, Al-Turki I, Ramadan MF. Screening of medium components by Plackett-Burman design for carotenoid production using date (*Phoenix dactylifera*) wastes. *Ind Crops Prod*,2012,36:313-320.
- Huang YC(黄延春),Li YX(李云霞). Research progress

on carotenoids in red Pepper. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发),2013,4:562-565.

- Frengova G, Simova E, Beshkova D. Use of whey ultrafiltrate as a substrate for production of carotenoids by the yeast *Rhodotorula rubra*. *Appl Biochem Biotechnol*,2004,112:133-141.
- Li W, Zhanq LB, Peng JH, et al. Tobacco stems as a low cost adsorbent for the removal of Pb(II) from wastewater: Equilibrium and kinetic studies. *Ind Crops Prod*,2008,28:294-302.
- Zhang KH, Zhang K, Cao Y, et al. Co-combustion characteristics and blending optimization of tobacco stem and high-sulfurbituminous coal based on thermogravimetric and mass spectrometry analyses. *Bioresour Technol*,2013,131:325-332.
- Li W, Zhang LB, Peng JH, et al. Preparation of high surface area activated carbons from tobacco stems with K_2CO_3 activation using microwave radiation. *Ind Crops Prod*,2008,27:341-347.
- Sung YJ, Seo YB. Thermogravimetric study on stem biomass of *Nicotiana tabacum*. *Thermochim Acta*,2009,486:1-4.
- Dong ZN(董占能), Bai JC(白聚川), Zhang HD(张皓东). Comprehensive utilization of tobacco waste. *Chin Tob Sci* (中国烟草科学),2008,1:39-42.
- Xu YJ(徐永建), Zhao R(赵睿), Tan HF(谭海风). Research progress on the comprehensive utilization of tobacco waste. *J Shanxi Univ Sci Technol* (陕西科技大学学报),2012,05:16-21.

(下转第 250 页)