

胶红酵母生产生物活性物质研究进展

庄荣玉^{1,2,*}, 王如晨¹, 邱晓挺^{1,*}, 车嘉豪¹, 李勇勇^{1,2}, 张蔚筱¹, 杨文鸽^{1,2}, 史咏梅¹, 吴祖芳^{1,2}

(1. 宁波大学食品与药学学院, 浙江 宁波 315800;

2. 浙江省动物蛋白食品精深加工重点实验室, 浙江 宁波 315800)

摘要: 胶红酵母为红酵母属物种, 具有较强的环境适应力, 广泛存在于不同生态系统环境中。其菌体含有蛋白质、天然类胡萝卜素、 β -胡萝卜素、虾青素、多不饱和脂肪酸和维生素等多种营养成分和生物活性物质, 是很有潜力的工业生产菌株。本文重点综述了胶红酵母在番茄红素、 β -胡萝卜素、虾青素和 ω -3系列的 α -亚麻酸功能性食用油脂等生物活性物质领域的应用研究进展, 主要包括高产菌株筛选、基因工程菌株的构建、发酵工艺和提取工艺等, 介绍了其在共培养漆酶、角质酶和全细胞生物转化先导化合物制备新型药物方面的应用。

关键词: 胶红酵母; 类胡萝卜素; α -亚麻酸; ω -3多不饱和脂肪酸; 漆酶; 角质酶; 生物催化剂

Bioactive Substances Produced by *Rhodotorula mucilaginosa*: A Comprehensive Review

ZHUANG Rongyu^{1,2,*}, WANG Ruchen¹, QIU Xiaoting^{1,*}, CHE Jiahao¹, LI Yongyong^{1,2}, ZHANG Weixiao¹,
YANG Wenge^{1,2}, SHI Yongmei¹, WU Zufang^{1,2}

(1. College of Food and Pharmaceutical Sciences, Ningbo University, Ningbo 315800, China;

2. Key Laboratory of Animal Protein Foods Deep Processing of Zhejiang Province, Ningbo 315800, China)

Abstract: The red yeast *Rhodotorula mucilaginosa* is a species belonging to the genus *Rhodotorula*. It is widely distributed in various ecosystems because of its strong adaptability to different environments. *R. mucilaginosa* appears to be a very promising industrial strain due to its ability to produce proteins and bioactive substances such as natural carotenoids, β -carotene, astaxanthin, polyunsaturated fatty acids (PUFA) and vitamins. This review summarizes the available data in the literature on the research and application of *R. mucilaginosa* in the production of lycopene, β -carotene, astaxanthin and alpha-linolenic acid and functional edible oils rich in the essential dietary ω -3 fatty acid, α -linolenic acid (ALA). Its focus is on screening for high-yield strains, construction of genetically engineered strains, and the fermentation and extraction processes as well as the applications of *R. mucilaginosa* in production of laccase by co-culture, cutinase and in the preparation of novel drugs from whole-cell biotransformation lead compounds.

Keywords: *Rhodotorula mucilaginosa*; carotenoid; alpha-linolenic acid; ω -3 polyunsaturated fatty acid; laccase; cutinase; biocatalyst
DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181213-169

中图分类号: TS201.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2020) 01-0318-12

引文格式:

庄荣玉, 王如晨, 邱晓挺, 等. 胶红酵母生产生物活性物质研究进展[J]. 食品科学, 2020, 41(1): 318-329. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181213-169. <http://www.spkx.net.cn>

ZHUANG Rongyu, WANG Ruchen, QIU Xiaoting, et al. Bioactive substances produced by *Rhodotorula mucilaginosa*: a comprehensive review[J]. Food Science, 2020, 41(1): 318-329. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181213-169. <http://www.spkx.net.cn>

胶红酵母属于真菌界、双核亚界、担子菌门、柄锈菌亚门、微球黑粉菌纲、锁掷酵母目、隐球酵母科、

红酵母属。其细胞呈圆形或卵形, 无性繁殖为多边芽殖, 无假菌丝; 菌落呈红色或橘红色。胶红酵母是腐生

收稿日期: 2018-12-13

基金项目: 宁波市科技局科技富民项目 (2017C10034); 浙江省科技厅公益技术应用研究计划项目 (2017C33009)

*通信作者简介: 庄荣玉 (1964—) (ORCID: 0000-0001-6170-9054), 女, 副教授, 硕士, 研究方向为食品生物技术、环境生物技术。E-mail: zhuangrongyu@nbu.edu.cn

邱晓挺 (1985—) (ORCID: 0000-0001-5455-3143), 男, 讲师, 博士, 研究方向为生化与分子生物学。

E-mail: qiu Xiaoting@nbu.edu.cn

酵母, 在生长过程中可以利用的营养素范围较广, 能以葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、木糖、废糖蜜、玉米秸秆水解液、马铃薯提取物等多种碳水化合物为碳源, 并能以氯化铵、硫酸铵、硝酸钠等多种无机氮及酵母膏、蛋白胨、三乙醇胺等有机氮为氮源^[1-2]。

胶红酵母广泛分布于自然界：在土壤、动物、植物体内^[3-7]、在污水处理系统中^[8]、在江河、湖泊等淡水水域和含盐的海洋环境均有胶红酵母菌的存在^[9-10]。有很多研究者从上述环境中分离出了胶红酵母，并对其营养成分进行了分析，发现其细胞除了富含蛋白质、多糖等常规营养成分^[11]，还含有类胡萝卜素、虾青素^[12]、多不饱和脂肪酸^[13]、VE和核苷酸等多种生物活性物质^[5]。研究表明胶红酵母能够促进动物的消化吸收，提高其对饲料的利用率，是可以替代鱼粉的优质饲料蛋白源，其细胞含有较高的类胡萝卜素，作为水产养殖饲料添加剂时，能有效地促进个体生长、增强机体免疫力、提高动物的受精率和减少胚胎的病死亡率^[14]。因此，胶红酵母作为水产养殖饵料和饲料^[14-16]及其他动物饲料已经有广泛的应用。例如，毛俊霞^[3]将胶红酵母添加在断奶仔猪日粮中，显著提高了仔猪空肠淀粉酶和脂肪酶的活力，改善了仔猪肠道微生物区系；李貌^[17]在蛋鸡饲养日粮中添加胶红酵母固态发酵产物，显著提高蛋鸡的采食量、产蛋质量、蛋黄的类胡萝卜素含量，改善了蛋品质，提高了蛋鸡免疫功能。

近年来,随着对天然类胡萝卜素、虾青素抗氧化活性物质重要性的认识加深和应用范围的扩大,较多研究者将分离到的胶红酵母作为生产天然类胡萝卜素的菌株。也有研究者发现一些胶红酵母菌株的多不饱和脂肪酸含量较高,将其作为产油脂酵母菌株应用于制造生物柴油^[18-19]。还有少数研究者将此菌的细胞作为特种酶的提取来源,例如,Lario等^[9]从南极海藻中分离出一株海洋南极胶红酵母L7,用于提取胞外酸性蛋白酶。Zimmer等^[8]从污水中筛选出一株胶红酵母saar1,提取出具有低温活性的苯甲酰水解酯酶,将此酶用于医药、化妆品或精细化工行业苯甲酰化合物的合成。总之,胶红酵母在食品、医药、酶工业、农业用生防酵母^[20-21]、饲料、环境保护^[22-25]等领域已有广泛应用,但是缺乏对其生产生物活性物质研究现状的综述。因此,本文重点介绍胶红酵母在生产生物活性物质方面的研究进展,旨在为促进胶红酵母的工业化应用的研究者提供参考。

1 胶红酵母在生产抗氧化活性物质方面的应用研究

1.1 胶红酵母合成类胡萝卜素的途径

类胡萝卜素是一类广泛存在于自然界的重要色素，是C₄₀的碳氢化合物（胡萝卜素）和它们的氧化衍生物

(叶黄素)两大类色素的总称,呈黄色、橙红色或红色。迄今为止已有700多种类胡萝卜素被分离鉴定出来^[26],常见的为番茄红素、 β -胡萝卜素、 α -胡萝卜素、叶黄素、玉米黄素和虾青素等。类胡萝卜素具有很强的抗氧化活性,在人体内可以淬灭单线态氧、消除自由基、防止低密度脂蛋白氧化,避免细胞受到氧化损伤,具有很强的抗癌和抗肿瘤生理活性^[27-28],能够显著降低动脉硬化^[29]等心脑血管疾病的发病率。类胡萝卜素是脂溶性色素,除由植物合成以外,一些细菌、酵母和霉菌也具有合成类胡萝卜素的能力。红酵母属的酵母菌(*Rhodotorula* spp.)都会产生类胡萝卜素^[30]。人类和动物不能合成类胡萝卜素,必须通过摄取富含类胡萝卜素的水果和蔬菜,经过消化吸收后才能利用。

胶红酵母体内的类胡萝卜素合成途径如图1所示，它是由萜类物质或异戊二烯经过一系列合成代谢反应而生成的。首先，通过缩合反应，3个乙酰CoA分子生成了甲羟戊酸（mevalonate, MVA），MVA随后经过磷酸酶和脱羧酶的催化，生成异戊烯焦磷酸（isopentenyl pyrophosphate, IPP），即类胡萝卜素的前体物质。经过一系列合成酶的催化作用，IPP形成了八氢番茄红素，后者通过两种去饱和酶以及胡萝卜素异构酶形成番茄红素^[31]。番茄红素又经过一系列环化酶的催化作用，形成了 α -胡萝卜素、叶黄素和 β -胡萝卜素。 β -胡萝卜素通过 β -胡萝卜素酮醇酶（ β -carotene ketolase, BKT）的催化作用生成海胆酮和角黄素，最后形成虾青素。

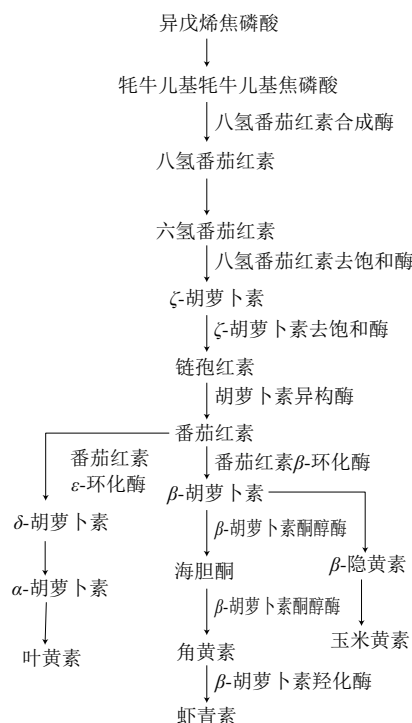


图1 胶红酵母合成类胡萝卜素的代谢途径
Fig.1 Metabolic pathway for carotenoid synthesis by *Rhodotorula mucilaginosa*

与胶红酵母产类胡萝卜素发酵工艺的较多研究报道相比^[32-33], 目前*Rhodotorula*属物种的类胡萝卜素合成相关基因的报道极少, 基因组学及基因组功能注释方面知识的缺乏会阻碍应用这些菌株提高产量的代谢工程效果。最近几年, 已经有少数学者开始在此方面进行研究。Landolfo等^[34]对胶红酵母C2.5t1的胡萝卜素形成作用基因簇(carotenogenesis gene, CAR gene)和产胡萝卜素基因的转录水平进行了研究; Gan等^[35]对从制造牙签的抗菌植物*Distemonanthus benthamianus*中分离出的胶红酵母RIT389菌株进行了全基因组测序, 以阐明*Rhodotorula*的系统发育史和类胡萝卜素的生物合成机制。

目前, 随着现代生活水平和人们对健康的追求不断提高, 天然类胡萝卜素作为重要的抗氧化剂已广泛用于食品添加剂、医药、化妆品及饲料行业^[36], 近年来, 类胡萝卜素在国内外市场需求不断增长, 预计在2018年全球市场对其需求量为14亿美元, 且价格昂贵^[30]。果蔬植物生长周期长, 从中提取天然的类胡萝卜素存在着工艺复杂、提取率低、成本高等制约因素。微生物具有繁殖快、营养需求低以及生长条件不受气候限制等优点, 利用微生物生产类胡萝卜素, 比用植物原料相比, 能节约生产成本、提高生产效率, 具有非常好的商业价值, 这方面的研究已成为近年来国内外的研究热点。以下重点综述胶红酵母在合成番茄红素、 β -胡萝卜素、虾青素3个方面的研究进展。

1.2 胶红酵母生产番茄红素方面的研究进展

番茄红素是由11个共轭及2个非共轭的碳-碳双键组成的直链碳氢化合物, 它是人体血浆和组织中的天然组分之一, 但人体无法自行合成, 必须通过进食摄入。在所有类胡萝卜素中, 番茄红素具有最强的单线态氧消除功能^[37], 其消除单线态氧的能力是 β -胡萝卜素的两倍, 是常用抗氧化剂VE的100倍。因此, 番茄红素能有效保护生物膜, 抑制低密度脂蛋白的氧化, 具有非常好的防治心脑血管疾病, 抑制子宫癌、乳腺癌、肺癌、前列腺癌细胞生长, 降低癌症发病率的功效, 还有防止皮肤受紫外线伤害, 延缓衰老的保健功能^[38-41]。美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)在2005年批准番茄红素为公认安全物质, 我国于2009年将其列入GB 2760—2009《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》, 开始产业化。目前, 高纯度天然番茄红素国际市场价格约为5 000~6 000美元/kg^[38]。

有关胶红酵母与番茄红素的研究, 目前在国内外鲜见报道。但国内对红酵母属同属的其他酵母在这方面的基础研究从2005年起开始有报道, 有些研究涉及未鉴定到种名的*Rhodotorula* sp.^[42-43]。

由图1可知, 番茄红素作为后续类胡萝卜素产物的前体物质, 是类胡萝卜素多种产物合成途径的关键分支

点。提高其产量对后续多种产物如 β -胡萝卜素、虾青素等的产量的提高有一定的促进作用, 对其产量的代谢调控主要有以下3种有效途径:

1) 增加合成过程中关键酶的表达量。牦牛儿基焦磷酸合成酶、八氢番茄红素合成酶、八氢番茄红素脱氢酶、胡萝卜素异构酶等是番茄红素合成过程中的关键酶。其中八氢番茄红素脱氢酶是将类胡萝卜素从无色八氢番茄红素生成红色的类胡萝卜素关键酶^[44], 大部分微生物通过I型Crt酶来完成脱氢反应, 并根据不同的脱氢步骤, 催化八氢番茄红素生成不同的产物—— ζ -胡萝卜素、链孢红素、番茄红素等^[45-46]。八氢番茄红素脱氢酶基因的表达会受到其他类胡萝卜素合成相关基因过表达的影响, 从而促进类胡萝卜素的积累^[47], 同时高产类胡萝卜素相关基因的表达在机体遭遇氧化胁迫时, 通常会发生变化。李春季^[48]研究了一株掷孢酵母(*Sporidiololus pararoseus* CGMCC 2.5 280), 证实在低浓度氯化钠(1.0 mol/L)和高温(35℃)胁迫下, 八氢番茄红素脱氢酶基因发生了显著上调。基因工程、高通量测序等技术的不断发展, 对番茄红素合成过程中关键酶的深入研究, 从分子生物学角度全面系统地提高番茄红素产量的工作, 及后续生产多样化的类胡萝卜素产物大有裨益^[44]。Chen Yan等^[49]在酿酒酵母生产番茄红素的研究中, 将宿主工程(远缘遗传位点和细胞交配类型)与途径工程(酶筛选和基因微调)相结合, 使得番茄红素的产量与原始菌株相比逐步提高了22倍, 最终在5 L发酵罐中获得番茄红素产量为55.56 mg/g细胞干质量(dry cell weight, DCW)。

2) 控制番茄红素转化途径。 β -胡萝卜素是由番茄红素经番茄红素环化酶催化环化形成。阻断剂可与该环化酶结合, 使其丧失活性, 从而阻断生成 β -胡萝卜素的途径, 使最终产物停留在番茄红素的阶段, 造成番茄红素的大量积累^[31]。自2009年起, 华南理工大学吴晓英团队对黏红酵母*R. glutinis*中番茄红素的合成途径进行了深入研究^[40-41, 50-51]。王海兵等^[50-51]针对黏红酵母*R. glutinis*的代谢调控条件, 分别在发酵至24 h添加环化抑制剂烟碱2.5 mL/L和青霉素4 mg/L, 36 h时添加双氧水1.2 mL/L, 60 h时添加酮康唑400 mg/L, 使番茄红素产量达到176.97 mg/L, 比对照组提高了43.2倍。Hernández-Almanza等^[52]同样考虑了抑制剂的影响, 发现使用2-异丙基咪唑环化抑制剂可提高番茄红素产量至18.61 mg/L。

3) 优化发酵培养基成分和发酵工艺参数及产物提取条件。李娜娜等^[41]用液态烷烃作为氢载体, 在初始发酵时添加体积分数4%的正十二烷, 番茄红素合成量达到42.32 mg/L, 增加了50.17%。廉博等^[53]在2 L罐中用甘蔗糖蜜来替代总量75%的葡萄糖, 在温度28℃、初始pH值

为5.0、溶氧15%~25%的条件下发酵*R. glutinis*，所获得的番茄红素产量可达87.71 mg/L。

番茄红素存在于细胞内部，其提取需要先破细胞壁，再用有机溶液浸提。常用的破壁方法包括研磨法、超声波破碎法、酸热法、酶消化法等。王海兵^[51]通过正交试验发现酸热法的破壁效果最佳，但耗时过长，工业上宜使用研磨结合酶法来提高效率。同时以乙酸乙酯-丙酮（1:1，*V/V*）混合液作为溶剂，在30℃、液料比60:1的条件下浸提3 h，番茄红素提取量可达4.55 mg/g，是未优化的141.3%^[40]。

以上研究者的工作为探究胶红酵母生产番茄红素及其分析测定与发酵工艺提供了非常有价值的参考。

1.3 胶红酵母在生产β-胡萝卜素方面的研究进展

1.3.1 β-胡萝卜素的生物合成途径

β-胡萝卜素是良好的自由基淬灭剂，具有增强免疫力的功能，也是动物体内主要的合成VA的前体^[54]，是人体健康不可缺少的营养素，在预防眼疾、白内障上有显著的功能^[55]。刘晓庚等^[56]研究了β-胡萝卜素清除1,1-二苯基-2-三硝基苯肼（1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH）自由基的动力学，结果表明，类胡萝卜素对DPPH自由基有较强的清除作用，且在一定条件下其清除能力与质量浓度成正比，当质量浓度高于80 μg/mL时，其清除DPPH能力与VE相当。

由图1胡萝卜素合成的代谢途径可知，番茄红素在环化酶的作用下可将其末端环化形成γ、β或ε环，由细胞中的*CrtYB*基因编码的环化酶催化，经过环化反应生成β-胡萝卜素^[57]。

1.3.2 胶红酵母高产β-胡萝卜素菌株筛选

诱变育种是一种普遍采取的提高产量的方法。杨清香等^[58]发现一株胶红酵母，可利用螺旋霉素重液发酵废水中的营养物质，在不添加其他营养源的情况下发酵生产类胡萝卜素，产量为0.80 μg/mL。对菌株进行常压室温等离子体诱变，诱变菌株AR62类胡萝卜素的产量可达到2.14 μg/mL，比诱变前的产量提高了167%，同时为类胡萝卜素使用廉价培养基的生产和制药废水的治理提供了一种新方法。刘冬^[59]以诱变菌株胶红酵母K4为基础通过导入并过表达类胡萝卜素合成过程中的关键酶基因（HMG CoA还原酶）获得了基因工程菌株G1，使类胡萝卜素产量提高到17.02 mg/L。

1.3.3 胶红酵母产β-胡萝卜素发酵工艺优化

优化培养基的组成和发酵参数是一种简单地提高β-胡萝卜素产量的可行方案。Jukyoung等^[4]对胶红酵母HP生产β-胡萝卜素的培养基进行了优化：当培养基中酵母提取物、麦芽浸出物、蛋白胨和葡萄糖质量分数分别为2.17%、2.11%、5.79%和12.46%时，β-胡萝卜素

产量为2.87 mg/L。丁重阳等^[60]改善了培养条件，发现将获得的2%胶红酵母接种到发酵培养基成分为葡萄糖10~12 g/L、酵母提取物5~7 g/L、蛋白胨10~12 g/L、氯化钠5~7 g/L，在pH 5~7、28℃的条件下发酵48 h后类胡萝卜素的含量达7.12 mg/L。

Cheng Yuting等^[61]分离到一株胶红酵母，在培养基中分别添加了0.1 g/L的FeSO₄·7H₂O、MgSO₄·7H₂O或CaCl₂，上述正二价金属离子能够增加胶红酵母的生物量和类胡萝卜素的产量，产量分别比对照组提高了37.6%、21.4%和9.2%，达到3 493.8、3 082.4、2 773.7 μg/L。

近年，有研究者发现，红酵母中脂肪酸与β-胡萝卜素代谢间存在一定的关联。Tkáčová等^[62]研究*R. glutinis* CCY 20-2-26发现，在C/N比为70:1条件下，细胞内总脂肪酸积累量最高达48%，产率达8.9 g/L。相反，当C/N比为20:1时，酵母中色素积累量最高（1 268 μg/g细胞）；C/N比为50:1时类胡萝卜素产量（主要为β-胡萝卜素）最高，为12.7 mg/L。这表明，葡萄糖耗竭导致细胞生长减慢，脂质积累减少。而储存脂肪酸，特别是棕榈酸和油酸，被氧化降解形成乙酰辅酶A，用于生物合成β-胡萝卜素。该研究在一定程度上，对获取高产量的β-胡萝卜素提出一种可试方案，即通过对脂肪酸的调控来提高生物合成β-胡萝卜素的效果。

由于目前微生物培养β-胡萝卜素的成本较高，研究者会考虑使用食品工业的下脚料为底物来降低生产成本。Cheng Yuting等^[61]使用废弃的健康饮料、番茄酱和甘蔗糖蜜等食品废料为底物来发酵生产类胡萝卜素，结果显示，使用废糖蜜作为原料最好，类胡萝卜素的产量为2 611 μg/L，β-胡萝卜素占组分的23.8%。也有研究者采用番茄渣和豆粕的酶解产物来作为发酵培养基。

1.3.4 胶红酵母产β-胡萝卜素基因工程菌株构建

目前，工业化生产β-胡萝卜素和番茄红素的唯一微生物菌株为三孢布拉氏霉菌^[63]。但三孢布拉氏霉菌是异宗的接合菌，需要将正、负菌株按照1:1~1:10的比例混合培养发酵生产，工艺复杂、发酵周期长，需120 h以上，耗氧量高，培养基价格昂贵，发酵成本高^[64]。红酵母对类胡萝卜素发酵水平虽然不如霉菌高，但红酵母具有营养要求简单粗放、生长周期短、可以高密度培养，且菌体无毒、营养丰富、可以作为副产物综合利用等优点。近年来，国内外学者对三孢布拉氏霉菌的主要合成途径的研究取得巨大进展，已有150多个参与类胡萝卜素合成的关键酶基因先后得到分离。这些研究成果都可以为胶红酵母在类胡萝卜素生物合成途径、催化各步反应所需酶的基因表达调控、遗传工程研究、基因工程菌株构建等方面的研究提供非常有价值的参考。

高虾青素产量。虾青素的含量与整合的关键虾青素生物合成基因的拷贝数高度相关。有证据显示,提高CrtZ和CrtW的活性将有利于虾青素产量的提高。Chi Shuang等^[47]研究了一株红法夫酵母突变株MK19,发现其细胞高表达虾青素合成酶基因CrtS时,会诱导GGPP/FPP合成酶基因和I型八氢番茄红素脱氢酶(CrtI)等类胡萝卜素合成相关基因的上调,从而使重组菌株CSR19的虾青素产量提高了33.5%。

Lin等^[85]在马克斯克鲁维酵母中整合了虾青素代谢途径中的基因,比较了3种藻类来源的CrtZ,发现雨生红球藻来源的CrtZ催化效率最好,经过重复整合CrtZ和CrtW,在5 L发酵罐上分批进行发酵,最终虾青素的产量达到了9.97 mg/g DCW。

近年来,利用酵母异源合成虾青素研究较多^[49,85-86]。在2018年最新的一个研究报道中,Jin Jin等^[87]采用外源模块工程与ARTP诱变相结合的综合方法,将虾青素产量提高到10.1 mg/g DCW,这是迄今为止酿酒酵母摇瓶水平报道的最高产量,同时新发现CSSI(一种糖原 α -1,4-葡糖苷酶基因)这个分子靶点的单独缺失可以使ARTP诱变得到的菌株虾青素产量提高75.6%,说明CSSI是一个非常具有前途的分子靶点。

1.4.2 产虾青素的胶红酵母新菌株的研究

由于红发夫酵母细胞内虾青素的生物合成受发酵条件的影响较大,发酵成本较高,提取产量较低,因此,筛选新的产虾青素红酵母菌株很有必要^[12]。Yang Keng等^[5]对从野生海鱼的肠道里分离出的胶红酵母营养成分分析中,发现其虾青素含量为1.00 mg/kg。孙建男^[88]在中国南海雷州半岛近岸海水和海泥中采集了317份样品,确定胶红酵母是分离到的71株海洋红酵母样品中的优势种群,对分离到的71株海洋红酵母用酸热法破壁提取,分析类胡萝卜素含量和虾青素含量,发现胶红酵母ZZC1菌株类胡萝卜素产量最高,为608.428 μ g/g DCW;胶红酵母ZTHY2菌株虾青素产量最高,为11.641 μ g/mL丙酮提取液。ZTHY2具有生长周期短、菌体细胞数量多、营养要求简单及虾青素含量高的优点。上述野生ZTHY2菌株能否通过诱变或基因工程等技术,提高该菌发酵虾青素的产量,非常值得进一步的研究。因此,对于胶红酵母发酵生产虾青素的代谢调控研究,提高其产虾青素的产量,可以通过上述改造红发夫酵母代谢研究的文献报道,给出一些方法指导与合理的预期判断。

2 胶红酵母在功能性食用油脂方面的研究

国内外有关胶红酵母可以作为产油微生物候选菌种

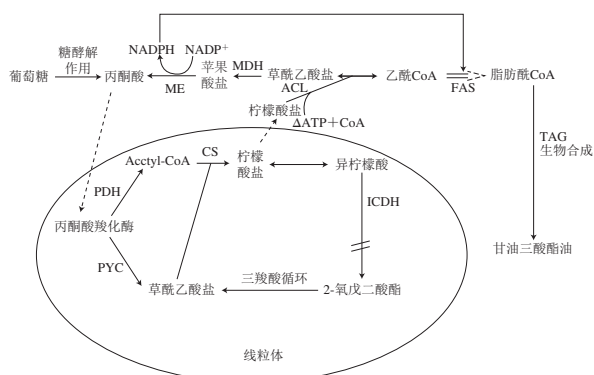
已有少量文献报道,但目前对胶红酵母含有的多不饱和脂肪酸进行利用、开发为功能性食用油脂方面的研究报道极少,多数是研究和分析了胶红酵母生产单细胞油脂(single cell oil, SCO)及其胞内脂肪酸的组成和含量,证明其可用于制造生物柴油^[18,89-91]。目前,产油研究多处在摇瓶发酵的实验室规模,发酵生产多不饱和脂肪酸还没有形成商业化。

国内外均有研究表明,胶红酵母细胞中含有多种脂肪酸,包括饱和脂肪酸的棕榈油酸、油酸、硬脂酸、不饱和脂肪酸的亚油酸(linoleic acid, LA)与亚麻酸等^[5,13,59,92],其成分与植物油相似。

目前,国内外消费市场的 α -亚麻酸(α -linolenic acid, ALA)主要来自于高寒地带的植物,以甘油酯的形式存在于亚麻籽油、红花籽油和核桃仁等中。与植物油生产多不饱和脂肪酸相比,利用酵母发酵获得功能性油脂将会有很多优点,如生长繁殖迅速、易培养、生产周期短、不受季节的影响、与农业生产油脂相比所需劳动力少等。用微生物发酵产生的含ALA的油脂,没有鱼油腥味,不会像植物资源受农药污染的威胁,不含重金属污染,对人体低过敏性,生物安全性好,而且对严格素食者而言不存在深海鱼油等动物源膳食禁区^[93]。

胶红酵母具有向脂肪酸第9位碳原子的甲基端位置引入不饱和双键的去饱和酶,从而在细胞内可将油酸向LA和ALA转变,而哺乳动物缺乏此去饱和酶,自身不能合成LA和ALA,因此,LA和ALA是人体真正必需脂肪酸。LA是人体细胞膜的重要构成成分,参与线粒体的合成,同时胆固醇必须与LA结合后,才能在体内进行正常的运转和代谢。如果缺乏LA,胆固醇就会与一些饱和脂肪酸结合,发生代谢障碍,在血管壁上沉积下来,逐步形成动脉粥样硬化,引发心脑血管疾病。ALA在体内代谢可生成同属 ω -3系列的二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)和二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)^[94-95],具有较好的医疗保健前景。Gupta等^[13]对其分离出的一株菌株进行分析,证实以7%的葡萄糖为碳源培养72 h,可得到最高ALA含量,达总不饱和脂肪酸的(6.21 $\pm$ 0.02)%。此时LA含量也接近最高,为(22.78 $\pm$ 0.01)%。此研究证实,胶红酵母在功能性食用油脂的制备上是一种具有发展潜力的微生物。

油脂是细胞次级代谢产物之一,在细胞中有两种存在形式:一种是构成细胞结构的体质脂;另一种是由多种脂肪酸形成的80%以上的甘油三酯和10%以上的磷脂即贮藏脂。油脂在酵母体内积累代谢途径如图3所示。



NADPH.还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸; NADP^+ .烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸; ME.苹果酸酶 (malic enzyme); MDH.苹果酸脱氢酶 (malic dehydrogenase); ACL. ATP-柠檬酸裂解酶 (ATP-citrate lyase); ATP.腺苷三磷酸 (adenosine triphosphate); CoA.辅酶A (coenzyme A); FAS.脂肪酸合成酶 (fatty acid synthase); TAG.三酰甘油 (triacylglycerol); ICDH.异柠檬酸脱氢酶 (dehydrogenase); PYC.丙酮酸羧化酶 (pyruvate carboxylase); PDH.丙酮酸脱氢酶 (pyruvate dehydrogenase); CS.柠檬酸合酶 (citrate synthase)。

图3 产油酵母油脂积累代谢调控途径简图^[59]

Fig. 3 Oil accumulation and metabolic regulation pathway in oleaginous yeast^[59]

2.1 胶红酵母高产油脂菌株的育种方法

野生型酵母产油量一般不高,一般会采取诱变处理来提高油脂产量。诱变育种方法主要有化学诱变^[96]、紫外线诱变、 γ 射线诱变、常压室温等离子诱变 (atmospheric and room temperature plasma, ARTP) 和原生质体融合。

常压室温等离子诱变^[97],是近年来发展的一种新的辐射诱变技术,有别于其他常规辐射,能在常压室温下进行诱变,拥有离子注入、电荷交换、能量沉积和动量传递的多种诱变机制,可以更强烈地改变亲本的DNA中的碱基排序,提高变异率,同时对环境无污染,保证实验者身体无损伤,其正突变的效率较高。杨清香^[97]、刘冬^[59]等对一株胶红酵母菌进行多次ARTP诱变,提高油脂产量达 $(2.38 \pm 0.02) \text{ mg/L}$ 。目前国内其他研究者对胶红酵母高产油脂育种研究得极少。

2.2 胶红酵母高产油脂基因工程菌株的构建

在产油酵母的研究中^[98],通过脂质积累或脂质降解相关基因的过表达、缺失或失活可以构建高产的微生物菌株。具体来说,一个或多个编码脂源酶的基因,如乙酰辅酶A羧化酶 (acetyl CoA carboxylase, ACC)、乙酰辅酶A合成酶 (acetyl CoA synthetase, ACS)、ACL、ME、FAS和二酰基甘油酰基转移酶 (diacylglycerol acyltransferase, DGAT) 基因,会导致高脂质积累。当这些修饰与抑制参与脂质代谢的基因相结合时,脂质积累就会最大化。

目前,因缺乏可以用于胶红酵母的分子生物学操作的载体质粒,所以在基因工程菌的构建上有一定难度。李红红^[99]研究了同属的红酵母,采取与黏红酵母 *R. glutinis* 具有较高亲缘关系菌株的基因序列设计引物以及兼并引物来扩增细胞内油脂代谢的关键酶基因,最终发现苹果酸酶的扩增比较成功,并以易错基因组为诱变方法,结合尼罗红荧光法筛选最终获得油脂含量比亲本高21%的突变菌株。

王致鹏^[100]使用基因敲除技术,删除了ACA-DC50109菌株中与碳源阻遏相关的 *MIG1* 基因,得到敲除菌株 M25,使 *Yarrowia lipolytica* 油脂含量从原始菌株产量 36.0% 提高到 48.7%,并发现敲除菌株中 21 个与脂肪酸和三酰甘油合成有关的大部分基因的转录水平大大提高。这些其他属产油酵母菌的产油机理研究,为胶红酵母高产油脂基因工程菌株的构建提供了很有价值的参考。

2.3 胶红酵母发酵油脂工艺的优化

影响胶红酵母的产油因素较多。研究表明,当培养过程中缺少氮源时,由于腺苷酸脱氨酶活性的提高,腺苷酸转化为大量的氨和肌苷酸,抑制线粒体中的腺苷酸依赖性脱氢酶,大量柠檬酸被堆积并被转运至胞浆最终形成脂肪酸甘油酯^[101]。因此可以通过控制C/N比调节油脂产量。Yousuf^[102]和Angerbauer^[103]等推荐接近100的C/N比作为脂质积累的理想值,然而作为一般趋势,观察到低C/N比会导致饱和脂肪酸含量低、不饱和脂肪酸含量增加。Mondala等^[104]报道了类似的发现:随着初始C/N比的增加,发现 $\text{C}_{16:0}$ 和 $\text{C}_{18:0}$ 的水平增加。因此需要针对目标是获取较高的饱和脂肪酸用作生物柴油原料,还是注重获取不饱和脂肪酸来权衡发酵原料的C/N比。

Saenge等^[105]发现,提高通气量有利于提高好氧微生物的 *R. glutinis* 的脂质产量。研究发现,产油酵母在供氧不足条件下,甘油三酯的合成过程会受到强烈阻碍,同时造成磷脂和游离脂肪酸的大量积累;而在适宜的通气条件下,部分游离脂肪酸会转化成含2个及以上双键的脂肪酸,从而提高不饱和脂肪酸含量。

培养时间的长短对微生物油脂含量也是一个重要的影响因素,培养时间过短未达到菌体最适培养时间会导致菌体密度过低,减少油脂产量;培养时间过长则会发生菌体自溶等现象,同样会降低油脂产量。有关研究证明,产油酵母油脂在生长指数期积累较少,在指数期末期积累量会急速增加,并在稳定期后达到峰点^[106]。多个研究均可证明,胶红酵母产油脂的最佳培养时间为 3~5 d^[18,107]。

无机盐与微量元素对酵母产油也有影响。马丽娟等^[108]发现,在培养基中增加 Fe^{3+} 的浓度,会提高产油酵母的油脂积累速率;在培养基中增加 Zn^{2+} 的浓度,会提高油脂的产量;限磷和限硫可抑制细胞中核酸、蛋白等的合

成,影响细胞增殖,使油脂累积期提前^[100]。该调控对运用含氮粗原料生产油脂,改良培养基条件具有重要意义。需要提醒的是,制备无机盐的盐浓度和微量元素的量稍高于最适浓度即可,过高则会产生抑制效果^[109]。

微生物油脂的高生产成本是影响其商业化生产的主要障碍,寻找低廉的原材料替代葡萄糖至关重要,是微生物油脂生产能够工业化发展的必要因素之一^[110-111]。稻草、甘薯淀粉废水、玉米秸秆水解液、废糖蜜、甘蔗渣、木薯淀粉、菊粉等廉价原材料,都可以作为酵母菌发酵合成油脂的碳源,并且,这些废弃物的再利用,有利于环境保护,缓解动植物油脂资源紧缺的局面。马素梅等^[107]研究能利用木糖产油脂的胶红酵母菌株,证实其能够利用啤酒糟酶解液的单糖并将其转化为油脂,不饱和脂肪酸含量可达76.9%。李梅^[18]利用木薯淀粉水解液作为碳源,油脂产量达到52.9%。

3 胶红酵母在生物制酶、催化方面的应用

3.1 胶红酵母生产酶制剂

漆酶是一种含铜多酚氧化酶,在食品、造纸、生物漂白、新兴的生物修复领域有广泛应用。漆酶的合成产量一般较低,尚不能满足工业需求,且目前已发现的有效诱导剂一般价格昂贵或具有毒性。近年来的研究发现,微生物共培养可以提高漆酶产量^[112]。Wang Han等^[113]将阿魏蘑与胶红酵母共培养,漆酶活力达到8 000 U/L,是单培养的1.2倍左右,此研究对漆酶在共培养中表达量的提高有重要意义^[114]。有研究发现,从酵母菌中提取出的 β -胡萝卜素可促进漆酶产生,因此,可以选择高产 β -胡萝卜素的胶红酵母菌株来提高真菌漆酶的产量或利用 β -胡萝卜素的粗提物来大规模地诱导漆酶的产生^[115]。

角质酶是多功能裂解酶,被广泛应用于食品、制药、化工及印染工业等许多领域^[116],角质酶可以水解植物的叶片组织角质保护层,以便能温和有效地从药科植物叶片中提取天然活性成分化合物。在自然界中,只能从微生物和花粉两个来源获得角质酶,来源非常有限。冉琴琴^[117]、张效宁^[118-119]等从感染的杜仲叶中筛选得到产角质酶的野生胶红酵母菌株,其酶活力较高,产酶量可达10 U/mL左右。张效宁等^[119]探究了胶红酵母角质酶的酶学性质,发现当pH值为9时稳定性最好,其最佳反应温度为45℃。另外,金属离子 Fe^{2+} 和 Mg^{2+} 在终浓度为10 mmol/L时会酶产生激活作用。这一发现具有重大意义,因为通常高产角质酶的微生物很少,主要是植物的病原真菌,在培养病原真菌产角质酶时必须严格控制生产条件,避免对环境植物的破坏。而胶红酵母是安全的,因此大规模进行微生物培养来批量生产角质酶不会对环境带来危害。

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD),是一类广泛存在于生物体中的金属酶,也是一种重要的氧自由基清除剂,金连豆等^[120]对海洋胶红酵母菌CD-008产SOD发酵条件进行了优化,结果表明,在pH 5.34、转速150 r/min、温度21.4℃的条件下,发酵液SOD活力达到6 430.52 U/g湿菌体。Ünlü等^[121]通过对同属*R. glutinis*采用不同的操作策略研究了溶解氧(dissolved oxygen, DO)对SOD活性的影响,发现SOD活性只有在培养开始时提供高浓度的DO时才会被诱导。该研究在一定程度上为胶红酵母高产SOD的培养条件提供了参考。

3.2 胶红酵母作为生物催化剂的应用

3.2.1 在酿酒工业方面的应用

胶红酵母可以降解氨基甲酸乙酯,可控制发酵食品中的氨基甲酸乙酯含量^[122]。陶永胜等^[123]分离提取媚丽葡萄新酒中的香气糖苷,添加优选野生胶红酵母的糖苷酶液,进行催化水解实验,结果表明,胶红酵母的糖苷酶对媚丽葡萄酒的制造具有良好的增香酿造应用潜力。李爱华等^[124]将胶红酵母和酿酒酵母顺序接种发酵‘爱格丽’干白葡萄酒,结果表明,48 h后顺序接种酿酒酵母有助于减慢发酵速率,延长胶红酵母生长时间,提高糖苷酶活性。

3.2.2 在全细胞生物转化制备新型药物方面的应用

桦木醇可以降低铬诱导的细胞毒性,并且极易转化成具有抗HIV和抗肿瘤细胞毒性的桦木酮醇^[125],桦木酮醇生物活性远高于桦木醇,抗细胞毒性活性更高,新近发现的桦木醇衍生物显示出与以往药物不同的作用机制,使其成为在癌症和艾滋病治疗中有巨大应用潜力的新型药物。Mao Duobin等^[126]以桦木醇为唯一碳源从土壤中筛选到一株胶红酵母,在5 L发酵罐中,在培养基中添加桦木醇为先导化合物,胶红酵母可将桦木醇转化成衍生物桦木酮醇,其对DPPH自由基的清除能力是桦木醇的2倍。胶红酵母具有催化先导化合物转化成更高效药物的能力,具有反应条件温和、绿色环保和选择性高等优点,显示了胶红酵母在全细胞催化剂改造药物结构和微生物药物转化方面的重要价值。

4 结 语

综上所述,胶红酵母能产生较多类别的生物活性物质,并在很多领域具有广阔的应用前景。

目前在胶红酵母中的类胡萝卜素包括番茄红素、 β -胡萝卜素、虾青素的合成途径、高产类胡萝卜素菌株的筛选、发酵条件的优化、合成途径中相关的酶及其调控机理均有较多研究,然而,采用胶红酵母发酵产番茄红素、 β -胡萝卜素、虾青素的产率仍然较低,缺乏稳定的胶红酵母基因工程菌株,尚难以利用胶红酵母工业化

生产类胡萝卜素。鉴于三孢布拉氏霉菌中多个参与类胡萝卜素合成的关键酶基因先后得到分离,为胶红酵母的类胡萝卜素生物合成途径、催化各步反应所需酶的基因表达调控及其遗传工程的研究提供了参考,下一步要加强高产类胡萝卜素胶红酵母菌株的构建、提高基因工程菌株的稳定性,并进一步优化发酵条件、加强类胡萝卜素合成促进因子、类胡萝卜素提取工艺及其活性保护等后续研究,为最终的工业化生产提供依据。

胶红酵母含有丰富的多不饱和脂肪酸,目前的研究主要集中于胶红酵母胞内脂肪酸的组成和含量、利用胶红酵母制造生物柴油,但对胶红酵母所含的人体必需脂肪酸ALA的研究报道较少。未来研究应重点关注构建高产油脂的胶红酵母基因工程菌株及代谢调控工程,以提高胶红酵母油脂的产率,实现商业化发酵生产胶红酵母多不饱和脂肪酸,开发基于胶红酵母的功能性食用油脂。

此外,胶红酵母能产漆酶、角质酶和SOD等多种酶类,胶红酵母可以降解氨基甲酸酯,同时可将桦木醇转化成清除自由基能力更强的衍生物桦木酮醇,展现了胶红酵母在酿酒和制备新型药物方面的应用前景。但目前这方面的研究还比较零碎而不够深入,后续需要进一步加强对产酶条件、酶的分离纯化及其降解氨基甲酸酯、转化桦木醇能力的研究,尤其需要通过构建新型的胶红酵母菌株,全方位同时提高多种生物活性物质的产量及其功能。

总之,随着微生物研究技术的不断发展,酵母菌独特的生物合成能力将被更深度地发现利用,尤其是胶红酵母这一带有迷人橙红色彩的微生物资源,更值得食品科学工作者去挖掘,胶红酵母在食品、医药、酶工业、农业用生防酵母、饲料、环境保护等领域将会有更广阔的开发和应用前景。

参考文献:

- [1] FATTAKHOVA A N, OFITSEROV E N, GARUSOV A V. Cytochrome P-450-dependent catabolism of triethanolamine in *Rhodotorula mucilaginosa*[J]. Biodegradation, 1991, 2(2): 107-113. DOI:10.1007/BF00114600.
- [2] MAROVA I, CARNECKA M, HALIENOVA A, et al. Use of several waste substrates for carotenoid-rich yeast biomass production[J]. Journal of Environmental Management, 2012, 95(2): S338-S342. DOI:10.1016/j.jenvman.2011.06.018.
- [3] 毛俊霞. 胶红酵母*Rhodotorula mucilaginosa* TZR(2014)的分离鉴定及其在断奶仔猪上的应用研究[D]. 重庆: 西南大学, 2017: 1-14.
- [4] JUKYOUNG O H, JEONG H, SEJONG O H. Characterization of optimal growth conditions and carotenoid production of strain *Rhodotorula mucilaginosa*, HP isolated from larvae of *Pieris rapae*[J]. Entomological Research, 2009, 39(6): 380-387. DOI:10.1111/j.1748-5967.2009.00250.x.
- [5] YANG Keng, YANG Yingying, LI Zhuojia, et al. Analysis on nutrition components in *Rhodotorula mucilaginosa*[J]. 广东农业科学, 2014, 41(5): 146-149; 154. DOI:10.16768/j.issn.1004-874x.2014.05.040.
- [6] 管志荣, 朱研, 童志霞, 等. 骆驼刺青贮中胶红酵母菌分离鉴定和菌株特性研究[J]. 畜牧与饲料科学, 2014, 35(7/8): 25-27. DOI:10.16003/j.cnki.issn1672-5190.2014.z1.085.
- [7] 王蓉, 伍时华, 赵东玲, 等. 一株能产类胡萝卜素的粘性红酵母的分离与鉴定[J]. 中国调味品, 2015, 40(4): 16-20. DOI:10.3969/j.issn.1000-9973.2015.04.004.
- [8] ZIMMER C, PLATZ T, CADEZ N, et al. A cold active (2R,3R)-(-)-di-O-benzoyl-tartrate hydrolyzing esterase from *Rhodotorula mucilaginosa*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 73(1): 132-140. DOI:10.1007/s00253-006-0463-x.
- [9] LARIO L D, CHAUD L, ALMEIDA M D G, et al. Production, purification, and characterization of an extracellular acid protease from the marine Antarctic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* L7[J]. Fungal Biology, 2015, 119(11): 1129-1136. DOI:10.1016/j.funbio.2015.08.012.
- [10] 孙建男, 谢为天, 刘颖, 等. 海洋红酵母的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(4): 84-88. DOI:10.13989/j.cnki.0517-6611.2015.04.029.
- [11] 章霞, 徐志进, 柳敏海, 等. 一株海洋红酵母的鉴定及营养成分分析[J]. 大连海洋大学学报, 2017, 32(4): 434-439. DOI:10.16535/j.cnki.dlhyxb.2017.04.010.
- [12] 黄开森, 廖志赢, 徐春厚, 等. 胶红酵母虾青素纯品提取及分离纯化方法优化[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(11): 1858-1862; 1877. DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.11.002.
- [13] GUPTA A, VONGSVIVUT J, BARROW C J, et al. Molecular identification of marine yeast and its spectroscopic analysis establishes unsaturated fatty acid accumulation[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2012, 114(4): 411-417. DOI:10.1016/j.jbiosc.2012.05.013.
- [14] GATESOUE F J. Live yeasts in the gut: natural occurrence, dietary introduction and their effects on fish health and development[J]. Aquaculture, 2007, 267(4): 20-30. DOI:10.1016/j.aquaculture.2007.01.005.
- [15] 张坤, 刘金凤, 董琦, 等. 饵料中添加胶红酵母对刺参性能的影响[J]. 大连工业大学学报, 2017, 36(1): 6-9. DOI:10.19670/j.cnki.dlgydxb.2017.01.002.
- [16] 夏冬梅. 胶红酵母对凡纳滨对虾、罗非鱼、卵形鲳鲷生长、消化酶活力和免疫的影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2014.
- [17] 李貌. 胶红酵母固态发酵工艺优化及其发酵产物对蛋鸡品质和免疫性能的影响[D]. 重庆: 西南大学, 2017: 56-63.
- [18] 李梅. 海洋胶红酵母菌TJY15a菌株产油脂的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010: 1-50.
- [19] 赵春海. 产油脂酵母菌的遗传改良和油脂的发酵生产[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011: 37-55.
- [20] 束兆林, 杨红福, 陈红州, 等. 胶红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*)对梨果采后青霉病、灰霉病的控制效果[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(8): 110-112. DOI:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.08.035.
- [21] 杨其亚. 胶红酵母控制苹果展青霉素及降解的应答调控机制[D]. 镇江: 江苏大学, 2017: 9-11.
- [22] 汤鸣强, 尤民生. 抗草甘膦酵母菌ZM-1的分离鉴定及其生长降解特性[J]. 微生物学通报, 2010, 37(9): 1402-1409. DOI:10.13344/j.microbiol.china.2010.09.012.
- [23] 薛德林, 胡江春, 王国安, 等. 海洋胶红酵母、光合细菌、生化黄腐酸在海参育苗和养成中的应用效果[J]. 腐植酸, 2009(4): 19-24. DOI:10.19451/j.cnki.issn1671-9212.2009.04.007.
- [24] GRUJIĆ S, VASIĆ S, RADOJEVIĆ I, et al. Comparison of the *Rhodotorula mucilaginosa* biofilm and planktonic culture on heavy metal susceptibility and removal potential[J]. Water, Air, and Soil Pollution, 2017, 228: 73-81. DOI:10.1007/s11270-017-3259-y.
- [25] 李国辉, 高剑平, 丁重阳, 等. 胶红酵母JB401降解脱色三苯甲烩染料[J]. 生物加工过程, 2014, 12(3): 26-31. DOI:10.3969/j.issn.1672-3678.2014.03.005.

- [26] 田明, 徐晓云, 范鑫, 等. 柑橘中主要类胡萝卜素及其生物活性研究进展[J]. 华中农业大学学报, 2015, 34(5): 138-144. DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2015.05.024.
- [27] STAHL W, SIE H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids[J]. Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease, 2005, 1740(2): 102-107. DOI:10.1016/j.bbdis.2004.12.006.
- [28] 尤新. 类胡萝卜素功能和国际发展动向[N]. 中国食品质量报, 2009-12-19(7).
- [29] 刘洋, 陈明骏, 宋翔, 等. 叶黄素对颈动脉粥样硬化斑块炎症反应程度的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(9): 170-175. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201809026.
- [30] MANNAZZU I, LANDOLFO S, SILVA T L, et al. Red yeasts and carotenoid production: outlining a future for non-conventional yeasts of biotechnological interest[J]. World Journal of Microbiological and Biotechnology, 2015, 31(11): 1665-1673. DOI:10.1007/s11274-015-1927-x.
- [31] 吴军林, 吴清平, 张菊梅, 等. 番茄红素的微生物合成及发酵生产研究进展[J]. 食品科学, 2013, 34(19): 336-340. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201319069.
- [32] 孔维宝, 杨洋, 陈冬, 等. 1 株类胡萝卜素产生菌的鉴定及其发酵培养基优化[J]. 食品科学, 2018, 39(24): 108-115. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201824017.
- [33] 汪洋. 一株胶红酵母的鉴定及其产类胡萝卜素的性能研究[D]. 兰州: 西北师范大学, 2015: 40-55.
- [34] LANDOLFO G, IANIRI G, CAMIOLO S, et al. CAR gene cluster and transcript levels of carotenogenic genes in *Rhodotorula mucilaginosa*[J]. Microbiology, 2018, 164(1): 78-87. DOI:10.1099/mic.0.000588.
- [35] GAN H M, THOMAS B N, CAVANAUGH N T, et al. Whole genome sequencing of *Rhodotorula mucilaginosa* isolated from the chewing stick (*Distemonanthus benthamianus*): insights into *Rhodotorula* phylogeny, mitogenome dynamics and carotenoid biosynthesis[J]. PeerJ, 2017, 2017: e4030. DOI:10.7717/peerj.4030.
- [36] 刘冬松, 邵剑钢, 韩培涛, 等. β -胡萝卜素在高原功能食品中的应用[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(13): 147-149. DOI:10.3969/j.issn.1005-6521.2015.13.039.
- [37] MASCO P D, DEVASAGAYAM T P, KAISER S, et al. Carotenoids, tocopherols and thiols as biological singlet molecular oxygen quenchers[J]. Biochemical Society Transactions, 1990, 18(6): 1054-1056. DOI:10.1042/bst0181054.
- [38] 尤新. 食品安全和食品添加剂发展动向[J]. 粮食加工, 2010, 35(2): 9-14. DOI:10.3969/j.issn.1007-6395.2010.02.001.
- [39] POHAR K S, GONG M C, BAHNSEN R, et al. Tomatoes, lycopene and prostate cancer: a clinician's guide for counseling those at risk for prostate cancer[J]. World Journal of Urology, 2003, 21(1): 9-14. DOI:10.1007/s00345-003-0318-3.
- [40] 王海兵, 吴晓英, 刘世龙, 等. 红酵母番茄红素提取工艺优化[J]. 食品科学, 2011, 32(16): 45-48.
- [41] 李娜娜, 吴晓英, 吴振强. 液态烷烃氧载体对粘红酵母发酵产番茄红素的影响[J]. 生物技术通报, 2015, 31(2): 196-201. DOI:10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2015.02.029.
- [42] 汪福源. 诱变红酵母 RY-17 生物合成番茄红素的研究[J]. 药物生物技术, 2005, 12(6): 375-378. DOI:10.19526/j.cnki.1005-8915.2005.06.007.
- [43] 邱连芳, 潘平平, 邓开野. 产番茄红素红酵母筛选及其培养条件的优化[J]. 中国食品添加剂, 2015(7): 65-70. DOI:10.3969/j.issn.1006-2513.2015.07.003.
- [44] 李春季, 李炳学, 韩晓日. 八氢番茄红素脱氢酶的研究进展[J]. 微生物学报, 2016, 56(11): 1680-1690. DOI:10.13343/j.cnki.wsxb.20160089.
- [45] FURUBAYASHI M, SAITO K, UMENO D. Evolutionary analysis of the functional plasticity of *Staphylococcus aureus* C30 carotenoid synthase[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2014, 117(4): 431-436. DOI:10.1016/j.jbiosc.2013.10.003.
- [46] LEDETZKY N, OSAWA A, IKI K, et al. Multiple transformation with the *crtYB* gene of the limiting enzyme increased carotenoid synthesis and generated novel derivatives in *Xanthophyllomyces dendrorhous*[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2014, 545(3): 141-147. DOI:10.1016/j.abb.2014.01.014.
- [47] CHI Shuang, HE Yanfeng, REN Jie, et al. Over expression of a bifunctional enzyme, CrtS, enhances astaxanthin synthesis through two pathways in *Phaffia rhodozyma*[J]. Microbial Cell Factories, 2015, 14(1): 90. DOI:10.1186/s12934-015-0279-4.
- [48] 李春季. 掷孢酵母类胡萝卜素合成关键酶基因的克隆表达与功能分析[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2016: 61-79.
- [49] CHEN Yan, XIAO Wenhui, WANG Ying, et al. Lycopene overproduction in *Saccharomyces cerevisiae* through combining pathway engineering with host engineering[J]. Microbial Cell Factories, 2016, 15(1): 113. DOI:10.1186/s12934-016-0509-4.
- [50] 王海兵, 吴晓英, 洪秀云. 代谢调控物对红酵母累积番茄红素的影响[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(12): 64-67. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.2010.12.021.
- [51] 王海兵. 高产番茄红素红酵母的筛选及其发酵、提取条件的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2011: 40-42.
- [52] HERNÁNDEZ-ALMANZA A, NAVARRO-MACIAS V, AGUILAR O, et al. Carotenoids extraction from *Rhodotorula glutinis* cells using various techniques: a comparative study[J]. Indian Journal of Experimental Biology, 2017, 55(7): 479-484.
- [53] 廉博, 吴晓英, 谢小玉, 等. 黏红酵母在 2 L 罐中发酵糖蜜合成番茄红素的优化[J]. 食品科技, 2013, 38(1): 21-25. DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2013.01.028.
- [54] NYBO S E, KHAN N E, WOOLSTON B M, et al. Metabolic engineering in chemolithoautotrophic hosts for the production of fuels and chemicals[J]. Metabolic Engineering, 2015, 30(7): 105-120. DOI:10.1016/j.ymben.2015.04.008.
- [55] WILHELM S, HELMUT S. β -Carotene and other carotenoids in protection from sunlight[J]. American Journal of Clinical Nutrition, 2012, 96(5): 1179-1184. DOI:10.3945/ajcn.112.034819.
- [56] 刘晓庚, 袁磊, 高梅, 等. 类胡萝卜素清除自由基的动力学及体外模拟消化对清除率的影响[J]. 食品科学, 2016, 37(11): 65-73. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201611012.
- [57] ZHAO X, SHI F, ZHAN W. Overexpression of ZWF1 and POS5 improves carotenoid biosynthesis in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Letters in Applied Microbiology, 2015, 61(4): 354-360. DOI:10.1111/lam.12463.
- [58] 杨清香, 王瑞飞, 葛洪欣, 等. 利用胶红酵母处理抗生素发酵废水生产类胡萝卜素的方法: CN103993062A[P]. 2014-08-20.
- [59] 刘冬. 高产油脂和类胡萝卜素红酵母的选育[D]. 新乡: 河南师范大学, 2015: 1.
- [60] 丁重阳, 李国辉, 刘元法, 等. 一株胶红酵母及其在染料降解脱色和类胡萝卜素生产中的应用: CN103409328A[P]. 2013-11-27.
- [61] CHENG Yuting, YANG Chufang. Using strain *Rhodotorula mucilaginosa* to produce carotenoids using food wastes[J]. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2016, 61: 270-275. DOI:10.1016/j.jtice.2015.12.027.
- [62] TKÁČOVÁ J, KLEMPHOVA T, ČERTIK M. Kinetic study of growth, lipid and carotenoid formation in β -carotene producing *Rhodotorula glutinis*[J]. Chemical Papers, 2018, 72: 1-11. DOI:10.1007/s11696-017-0368-4.

- [63] DUFOSSEÉ L. Red colourants from filamentous fungi: are they ready for the food industry?[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2018, 69: 156-161. DOI:10.1016/j.jfca.2017.11.002.
- [64] 王红波, 吴华, 陈禅友, 等. 微生物发酵生产高品质番茄红素的研究进展[J]. 中国酿造, 2015, 34(5): 7-10. DOI:10.11882/j.issn.0254-5071.2015.05.002.
- [65] IWAMOTO T, HOSODA K, HIRANO R, et al. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by astaxanthin[J]. Journal of Atherosclerosis and Thrombosis, 2011, 7(4): 216-222. DOI:10.5551/jat1994.7.216.
- [66] DAVINELLI S, NIELSEN M E, SCAPAGNINI G. Astaxanthin in skin health, repair, and disease: a comprehensive review[J]. Nutrients, 2018, 10(4): 522-533. DOI:10.3390/nu10040522.
- [67] 贾立壮, 王远山, 郑裕国. 红发夫酵母积累虾青素的代谢调控机理研究进展[J]. 微生物学通报, 2008, 35(1): 103-106. DOI:10.13344/j.microbiol.china.2008.01.013.
- [68] RAO A R, PHANG S M, SARADA R. Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications: a review[J]. Marine Drugs, 2014, 12(1): 128-152. DOI:10.3390/md12010128.
- [69] 裘娟萍, 王普, 沈寅初. 虾青素高产菌株的选育[J]. 工业微生物, 2001, 31(2): 5-9. DOI:10.3969/j.issn.1001-6678.2001.02.002.
- [70] 赵樑, 王锡昌, 吴旭干. 饲料中虾青素对水产动物品质影响的研究进展[J]. 水产科学, 2016, 35(4): 440-445. DOI:10.16378/j.cnki.1003-1111.2016.04.023.
- [71] JOHNSTON R K, SIEGFRIED E J, SNELL T W, et al. Effects of astaxanthin on *Brachionus manjavacas* (rotifera) population growth[J]. Aquaculture Research, 2018, 49(6): 2278-2287. DOI:10.1111/are.13688.
- [72] 周萍萍. 酿酒酵母中虾青素生物合成及其代谢调控的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2018: 6-7.
- [73] AMBATI R R, MOI P S, RAVI S, et al. Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications: a review[J]. Marine Drugs, 2014, 12(1): 128-152. DOI:10.3390/md12010128.
- [74] STOKLOSA R J, JOHNSTON D B, NGHIEM N P. Utilization of sweet sorghum juice for the production of astaxanthin as a biorefinery co-product by *Phaffia rhodozyma*[J]. ACS Sustainable Chemistry and Engineering, 2018, 6(3): 3124-3134. DOI: 10.1007/s10068-012-0139-5.
- [75] 裘娟萍, 沈寅初. 红发夫酵母高产虾青素突变株的选育方法[J]. 工业微生物, 2000, 30(4): 55-57. DOI:10.3969/j.issn.1001-6678.2000.04.013.
- [76] 郑裕国, 沈寅初. 虾青素生产技术及其应用[J]. 化工科技市场, 2001, 24(2): 24-25.
- [77] 郑裕国, 沈寅初. 微生物发酵生产虾青素[J]. 生物工程进展, 2002(2): 19-22. DOI:10.3969/j.issn.1671-8135.2002.02.004.
- [78] 朱明军. 红发夫酵母*Phaffia rhodozyma*培养生产虾青素的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2001: 14-115.
- [79] 朱明军, 梁世中. 装液量和接种量对红发夫酵母生长和虾青素积累的影响[J]. 氨基酸和生物资源, 2002, 24(4): 28-30. DOI:10.14188/j.ajsh.2002.04.010.
- [80] 朱明军, 杜顺堂, 王菊芳, 等. 产虾青素红发夫酵母*Phaffia rhodozyma*的反应器培养[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2005, 33(12): 25-28. DOI:10.3321/j.issn:1000-565X.2005.12.006.
- [81] 沈宁燕, 肖安风, 蔡慧农. 乳酸钠促进法夫酵母虾青素合成代谢流作用分析[J]. 微生物学通报, 2015, 42(4): 634-645. DOI:10.13344/j.microbiol.china.140568.
- [82] 张枫, 沈宁燕, 吴昌正, 等. 关键酶抑制剂对法夫酵母合成虾青素的代谢调控[J]. 中国食品学报, 2018, 18(9): 76-89. DOI:10.16429/j.1009-7848.2018.09.011.
- [83] HARA K Y, MORITA T, MOCHIZUKI M, et al. Development of a multi-gene expression system in *Xanthophyllomyces dendrorhous*[J]. Microbial Cell Factories, 2014, 13(1): 175. DOI:10.1186/s12934-014-0175-3.
- [84] BARBACHANOTORRES A, CASTELBLANCOMATIZ L M, RAMOSVALDIVIA A C, et al. Analysis of proteomic changes in colored mutants of *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*)[J]. Archives of Microbiology, 2014, 196(6): 411-421. DOI:10.1007/s00203-014-0979-x.
- [85] LIN Y, CHANG J J, LIN H Y, et al. Metabolic engineering a yeast to produce astaxanthin[J]. Bioresource Technology, 2017, 245: 899-905. DOI:10.1016/j.biortech.2017.07.116.
- [86] KILDEGAARD K R, ADIEGO-PEREZ B, BELDA D D, et al. Engineering of *Yarrowia lipolytica* for production of astaxanthin[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2017, 2(4): 287-294. DOI:10.1016/j.synbio.2017.10.002.
- [87] JIN Jin, WANG Yangzihan, YAO Mingdong, et al. Astaxanthin overproduction in yeast by strain engineering and new gene target uncovering[J]. Biotechnology for Biofuels, 2018, 11(1): 230. DOI:10.1186/s13068-018-1227-4.
- [88] 孙建男. 雷州半岛近岸海域红酵母多样性分析及其代谢产物研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2015: 9-19.
- [89] ENSHAEIEH M, ABDOLI A, MADANI M. Single cell oil (SCO) production by *Rhodotorula mucilaginosa* and its environmental benefits[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2015, 17(2): 387-400.
- [90] SITEPU I R, JIN M J, FERNANDEZ J E, et al. Identification of oleaginous yeast strains able to accumulate high intracellular lipids when cultivated in alkaline pretreated corn stover[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(17): 7645-7657. DOI:10.1007/s00253-014-5944-8.
- [91] KHOT M B, GHOSH D. Lipids of *Rhodotorula mucilaginosa* IIP132 with biodiesel potential: oil yield, fatty acid profile, fuel properties[J]. Journal of Basic Microbiology, 2017, 57(4): 345-352. DOI:10.1002/jobm.201600618.
- [92] BHUIYAN M, TUCKER D, WATSON K. Determination and differentiation of triacylglycerol molecular species in Antarctic and non-Antarctic yeasts by atmospheric pressure-chemical ionization-mass spectrometry[J]. Journal of Microbiological Methods, 2013, 94(3): 249-256. DOI:10.1016/j.mimet.2013.06.012.
- [93] RIEDIGER N D, OTHMAN R A, SUH M, et al. A systemic review of the roles of *n*-3 fatty acids in health and disease[J]. Journal of the American Dietetic Association, 2009, 109(4): 668-679. DOI:10.1016/j.jada.2008.12.022.
- [94] 吴俏樵, 杜冰, 蔡尤林, 等. α -亚麻酸的生理功能及开发研究进展[J]. 食品工业科技, 2016, 37(10): 386-390. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2016.10.072.
- [95] 高颂雄, 张坚. α -亚麻酸体内转化为二十碳五烯酸和二十二碳六烯酸的研究进展[J]. 中国油脂, 2015, 40(9): 27-31. DOI:10.3969/j.issn.1003-7969.2015.09.008.
- [96] 张鹏鹏. 油脂高产菌株深黄被孢霉的诱变选育及发酵培养基的优化[D]. 洛阳: 河南科技大学, 2013: 20-25.
- [97] 杨清香, 张昊, 蒿洪欣, 等. 一株胶红酵母及其在发酵生产类胡萝卜素和油脂中的应用 CN104130952A[P]. 2014-11-05[2018-12-13].
- [98] BELLOU S, TRIANTAPHYLIDOU I E, AGGELI D, et al. Microbial oils as food additives: recent approaches for improving

- microbial oil production and its polyunsaturated fatty acid content[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2016, 37(5): 24-35. DOI:10.1016/j.copbio.2015.09.005.
- [99] 李红红. 油脂基因工程菌的构建[D]. 北京: 北京化工大学, 2014: 13-40.
- [100] 王致鹏. 产油酵母菌合成生物油脂的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014: 22-42.
- [101] 张艳芬. 产油酵母的筛选及其利用葡萄糖和木糖的产油特性[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2014: 4-5.
- [102] YOUSUF A. Biodiesel from lignocellulosic biomass: prospects and challenges[J]. Waste Management, 2012, 32(11): 2061-2067. DOI:10.1016/j.wasman.2012.03.008.
- [103] ANGERBAUER C, SIEBENHOFER M, MITTELBAACH M, et al. Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(8): 3051-3056. DOI:10.1016/j.biortech.2007.06.045.
- [104] MONDALA A H, HERNANDEZ R, FRENCH T, et al. Enhanced lipid and biodiesel production from glucose-fed activated sludge: kinetics and microbial community analysis[J]. AIChE Journal, 2012, 58(4): 1279-1290. DOI:10.1002/aic.12655.
- [105] SAENGE C, CHEIRSLIP B, SUKSAROGUE T T, et al. Efficient concomitant production of lipids and carotenoids by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultured in palm oil mill effluent and application of lipids for biodiesel production[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2012, 16(1): 23-33. DOI:10.1007/s12257-010-0083-2.
- [106] HUANG Chao, ZONG Minhua, WU Hong, et al. Microbial oil production from rice straw hydrolysate by *Trichosporon fermentans*[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(19): 4535-4538. DOI:10.1016/j.biortech.2009.04.022.
- [107] 马素梅, 曹钰, 宋春艳, 等. 利用木糖产油脂酵母的筛选、鉴定及发酵条件优化[J]. 中国油脂, 2017, 42(10): 115-120. DOI:10.3969/j.issn.1003-7969.2017.10.025.
- [108] 马丽娟, 邢大辉, 王红蕾, 等. 培养条件对产油微生物生长的影响[J]. 生物工程学报, 2009, 25(1): 55-59. DOI:10.3321/j.issn:1000-3061.2009.01.009.
- [109] 杨旭. 油脂酵母的筛选及发酵产物的研究[D]. 太原: 山西大学, 2015: 19-26.
- [110] LI Yonghong, ZHAO Zongbao, BAI Fengwu. High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 41(3): 312-317. DOI:10.1016/j.enzmictec.2007.02.008.
- [111] YUSUF N, KAMARUDIN S K, YAAKUB Z. Overview on the current trends in biodiesel production[J]. Energy Conversion and Management, 2011, 52(7): 2741-2751. DOI:10.1016/j.enconman.2010.12.004.
- [112] 李静, 方泽民, 洪宇植, 等. *Chaetomium globosum*与*Panus rudis*共培养发酵合成漆酶[J]. 安徽大学学报(自然科学版), 2011, 35(6): 93-97. DOI:10.3969/j.issn.1000-2162.2011.06.016.
- [113] WANG Han, PENG Lin, DING Zhongyang, et al. Stimulated laccase production of *Pleurotus ferulae* JM301 fungus by *Rhodotorula mucilaginosa*, yeast in co-culture[J]. Process Biochemistry, 2015, 50(6): 901-905. DOI:10.1016/j.procbio.2015.03.004.
- [114] 郭超林, 丁重阳, 陆健, 等. 阿魏蘑与胶红酵母共培养中促进产漆酶物质的初步研究[J]. 生物加工过程, 2017, 15(4): 40-44. DOI:10.3969/j.issn.1672-3678.2017.04.007.
- [115] GUO Chaoling, ZHAO Liting, WANG Feng, et al. β -Carotene from yeasts enhances laccase production of *Pleurotus eryngii* var. *ferulae* in co-culture[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1101. DOI:10.3389/fmicb.2017.01101.
- [116] BAKER P J, POULTNEY C, LIU Z, et al. Identification and comparison of cutinases for synthetic polyester degradation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(1): 229-240. DOI:10.1007/s00253-011-3402-4.
- [117] 冉琴琴, 张效宁, 张文坤, 等. 产角质酶酵母菌的发现与鉴定及产酶条件的优化[J]. 生物技术通报, 2014, 13(5): 148-154. DOI:10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2014.05.028.
- [118] 张效宁. 胶红酵母产角质酶的研究及应用[D]. 贵阳: 贵州大学, 2015: 13-25.
- [119] ZHANG Xiaoning, RAN Qinqin, ZHANG Xuejun. Screening and identification of a cutinase-producing *Rhodotorula mucilaginosa* and properties of the cutinase[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2015, 175(2): 1221-1233. DOI:10.1007/s12010-014-1291-6.
- [120] 金连豆, 李晓艳, 王晓辉, 等. 海洋胶红酵母菌CD-008产超氧化物歧化酶发酵条件优化及酶分离纯化[J]. 中国酿造, 2016, 35(3): 17-22. DOI:10.11882/j.issn.0254-5071.2016.03.005.
- [121] ÜNLÜ A E, TAKAÇ S. Improvement of superoxide dismutase activity using experimental design and radical promoters[J]. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2017, 31(5): 1-9. DOI:10.1080/13102818.2017.1353923.
- [122] 赵雅敏, 吴群, 徐岩, 等. 胶红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*)及其降解氨基酸乙酸酯的研究[J]. 工业微生物, 2013, 45(5): 44-48. DOI:10.3969/j.issn.1001-6678.2013.05.008.
- [123] 陶永胜, 牟含, 李国, 等. 野生胶红酵母糖苷酶水解媚丽新酒中香气糖苷研究[J]. 农业机械学报, 2014, 45(12): 249-254. DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2014.12.037.
- [124] 李爱华, 王星晨, 彭文婷, 等. 胶红酵母与酿酒酵母混合酒精发酵中酵母生长与糖苷酶活动力[J]. 西北农业学报, 2018, 27(6): 1-8. DOI:10.7606/j.issn.1004-1389.2018.06.018.
- [125] ALAKURTTI S, MÄKELÄT, KOSKIMIES S, et al. Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin[J]. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2006, 29(1): 1-13. DOI:10.1016/j.ejps.2006.04.006.
- [126] MAO Duobin, FENG Yongqiang, BAI Yanhong, et al. Novel biotransformation of betulin to produce betulone by *Rhodotorula mucilaginosa*[J]. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2012, 43(6): 825-829. DOI:10.1016/j.jtice.2012.06.006.