

N⁺注入选育类胡萝卜素高产菌株及其 固态发酵条件优化

刘 绍^{1,2}, 李 琦^{1,3}, 刘卉琳¹, 贾 涛⁴, 谢达平^{1,*}

(1.湖南农业大学生物安全科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 2.湖南农业大学食品科技学院, 湖南 长沙 410128;
3.湖南利尔康生物有限公司, 湖南 岳阳 414100; 4.江苏省生产力促进中心理化测试中心, 江苏 南京 210042)

摘 要: 为获得类胡萝卜素高产菌株, 利用N⁺注入方法对黏性红圆酵母菌RM-1进行诱变处理, 结果表明, 当注入能量为10keV时, 最适诱变注入剂量为 2.0×10^{14} ion/cm², 筛选所得突变株RM-21产类胡萝卜素的能力明显提高, 较出发菌株增加了60.85%。传代结果表明, 传代10次突变株RM-21遗传性状稳定, 可作为工业生产菌种。以玉米粉和稻米为原料, 对突变株RM-21固态发酵产类胡萝卜素进行条件优化研究, 结果表明, 当 $m_{\text{玉米粉}}:m_{\text{稻米}}=3:1$, 含水量75%时, 固态发酵最适条件为: 葡萄糖4.0g/L、NH₄NO₃ 2.5g/L、初始 pH6.0、接种量10%。在此基础上, 对固态发酵产类胡萝卜素进行变温培养研究, 结果表明, 在96h的发酵时段中, 0~84h温度控制在33℃, 85~96h温度控制在28℃, 类胡萝卜素产量达到7.04μg/g(以干基计), 比恒温发酵提高了20.96%。

关键词: N⁺注入; 类胡萝卜素; 黏性红圆酵母; 固态发酵; 变温培养

Mutation Breeding of High-Yield Carotenoid Producing *Rhodotorula mucilaginosa* by N⁺ Implantation and Optimization of Solid-state Fermentation Conditions for Carotenoid Production

LIU Shao^{1,2}, LI Qi^{1,3}, LIU Hui-lin¹, JIA Tao⁴, XIE Da-ping^{1,*}

(1. College of Bio-safety Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;
2. College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;
3. Hunan Lerkam Biology Co. Ltd., Yueyang 414100, China;
4. Physics and Chemical Test Center of Jiangsu Province, Jiangsu Productivity Centre, Nanjing 210042, China)

Abstract: *Rhodotorula mucilaginosa* RM-1 was mutagenized by means of N⁺ implantation to obtain high-yield carotenoid producing mutants. The optimum dose of 10 keV N⁺ implantation was 2.0×10^{14} ion/cm² and the best mutant (RM-21) revealed a 60.85% increase in carotenoid production when compared with the original strain. This mutant remained stable after the 10th passage and thus could be used for industrial production. Further investigations were conducted to optimize solid-state fermentation conditions for the production of carotenoid from corn flour and rice by mutant RM-21. The optimum fermentation conditions were determined as follows: a 3:1 (m/m) mixture of corn flour and rice with 75% added water as fermentation substrate, 4.0 g/L of glucose concentration, 2.5 g/L of NH₄NO₃ concentration, initial pH 6.0 and 10% of inoculum size. The fermentation time was 96 h and consisted of two stages: the fermentation temperature was 33 °C in the first 84 h and 28 °C in the following 12 h. Under these conditions, the yield of carotenoid was 7.04 μg/g dry matter, which revealed a 20.96% increase compared with constant temperature fermentation.

Key words: N⁺ implantation; carotenoid; *Rhodotorula mucilaginosa*; solid-state fermentation; temperature-shift culture
中图分类号: Q939.99 文献标识码: A 文章编号: 1002-6630(2012)23-0244-05

类胡萝卜素是由两分子的20个碳原子组成的双香叶基双磷酸尾尾相连而成的聚异戊二烯化合物。研究表明类胡萝卜素能够抑制动脉硬化、白内障和癌症^[1-4]等疾病的产生。人们获得类胡萝卜素主要是通过化学合成、

植物提取和微生物发酵途径。其中化学合成法虽然成本低, 但随着人们对化学合成品毒副作用的担心及对天然品的日益崇尚, 化学合成类食品添加剂及其相关产品不会成为市场的主流; 植物提取法获得类胡萝卜素存在季

收稿日期: 2011-09-13

作者简介: 刘绍(1968—), 男, 副教授, 博士, 主要从事食品微生物工程与制剂研究。E-mail: liushao1@sohu.com

*通信作者: 谢达平(1945—), 男, 教授, 本科, 主要从事酶学理论与应用研究。E-mail: xiedaping508@163.com

节性和地域性的限制^[5]。因此,人们逐渐将注意力集中到微生物方法生产类胡萝卜素上。近年来,科研工作者们已经对微生物生产类胡萝卜素进行了大量的研究:分离获得了不少产生类胡萝卜素的微生物菌株,对一些菌株进行了发酵条件优化及诱变高产研究等。其中诱变所采用的方式主要有紫外线、亚硝基胍、高静水压等^[6-12],而关于产类胡萝卜素黏性红圆酵母的低能离子注入诱变选育的报道甚为鲜见。低能离子注入技术应用于诱变育种,是由中国科学家余增亮于1986年率先开始研究的。该项技术将物理和化学诱变育种的许多优点综合为一体,较好的弥补了辐射诱变的一些不足,具有方向性、质量沉积效应、损伤轻、正突变率高、突变谱广的特点^[13],是选育优良品种较理想的方法,应用相当广泛。

本实验在探讨低能 N^+ 注入法诱变黏性红圆酵母的同时,为丰富农产品深加工手段,以玉米粉和稻米为原料,对黏性红圆酵母突变菌株进行固态发酵研究,优化其发酵条件,并对其进行变温培养研究,以期提高类胡萝卜素产量。

1 材料与方法

1.1 菌株与培养基

出发菌株:黏性红圆酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*) RM-1,由湖南农业大学生物安全科学技术学院实验室保存。

斜面培养基: PDA; 种子培养基: 液体YEPD培养基; 固态发酵培养基: 将玉米粉用二乙醚-庚烷体积比1:1萃取,消除可能含有的类胡萝卜素, $m_{\text{稻米}}:m_{\text{玉米粉}}=1:3$,含水量75%,葡萄糖1g/L; 固体YEPD完全培养基; 平板筛选培养基: 葡萄糖20g/L、蛋白胨20g/L、酵母膏10g/L、琼脂20g/L、二苯胺80 $\mu\text{mol/L}$ 。以上培养基均在121 $^{\circ}\text{C}$ 条件下湿热灭菌20min。

1.2 出发菌株抗性实验

在平板筛选培养基中加入20~120 $\mu\text{mol/L}$ 的二苯胺,接种出发菌株,观察并记录菌体的生长及显色情况,以考察筛选用二苯胺浓度。

1.3 离子注入

将出发菌株培养至对数生长期,制成 10^6 个/mL的菌悬液,然后取0.5mL菌悬液均匀涂布于无菌平皿中央,以无菌风吹干。设定低能离子注入设备靶室真空度为 10^{-3}Pa ,能量为10keV,分别以剂量为 0.5×10^{14} 、 1.0×10^{14} 、 1.5×10^{14} 、 2.0×10^{14} 、 2.5×10^{14} 、 $3.0\times 10^{14}\text{ion/cm}^2$ 的 N^+ 注入诱变。每一剂量同时做真空对照。分别以1mL无菌水洗下经 N^+ 注入处理的菌体,将冲洗液适当稀释,取0.1mL涂布于YEPD完全培养基上,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养2d后进行菌落计数,计算存活率,绘制存活曲线以确定最佳注入剂量。根据诱变后菌株类胡萝卜素产量的变化,以出发菌株为对

照,计算正突变率。规定类胡萝卜素产量变化在 $\pm 10\%$ 之间为未突变,高于10%的菌株为正突变株。

1.4 突变株的筛选

将经过诱变处理后的菌株以无菌生理盐水稀释,涂布于含二苯胺的筛选平板上,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养2d。根据筛选平板上菌落的形状、大小、颜色进行初筛,挑选大而红、生长快且较突起的单菌落接入种子培养基中,28 $^{\circ}\text{C}$ 、180r/min振荡培养2d,再以10%接种量转接至固态发酵培养基中,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养4d,测定类胡萝卜素产量,以进行复筛得到最佳突变株。

1.5 遗传稳定性实验

将筛选得到的突变株接种于斜面上传代,连续传代10次,测定1、5、10代的固态发酵类胡萝卜素的产量,以考察其遗传稳定性。

1.6 固态发酵条件优化

1.6.1 单因素试验

1.6.1.1 碳源对突变株RM-21产类胡萝卜素的影响

以限糖固态发酵培养基为基础,分别加入2.0、3.0、4.0g/L的蔗糖、果糖和葡萄糖作为碳源,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养4d,测定类胡萝卜素产量,以确定适宜的碳源及其质量浓度。

1.6.1.2 氮源对突变株RM-21产类胡萝卜素的影响

以固态发酵培养基为基础,分别加入1.0、2.0、3.0g/L的酵母膏、硝酸铵、蛋白胨和尿素为氮源,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养4d,测定类胡萝卜素产量,以确定适宜的氮源及其质量浓度。

1.6.1.3 接种量对突变株RM-21产类胡萝卜素的影响

以固态发酵培养基为基础,分别接种5%、10%、15%、20%、25%的种子培养液,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养4d,测定类胡萝卜素产量,以确定适宜接种量。

1.6.1.4 初始pH值对突变株RM-21产类胡萝卜素的影响

以固态发酵培养基为基础,分别用磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液调节pH值为5.0、5.5、6.0、6.5、7.0,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养4d,测定类胡萝卜素产量,以确定适宜的初始pH值。

1.6.2 正交试验

以单因素试验为基础,进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,进一步考察葡萄糖、硝酸铵、接种量、初始pH值4个因素对类胡萝卜素产量的影响。

1.7 菌体的生长曲线测定

将优化好的固体培养基接种后置于28 $^{\circ}\text{C}$ 培养96h,培养过程中每隔6h称取1.00g冷冻干燥固体发酵物于小烧杯中,加入50mL pH5.6柠檬酸-磷酸缓冲液,称取0.50g 3000IU/g的 α -淀粉酶和0.50g 10000IU/g糖化酶,用8层纱布包裹,将纱布包放入上述小烧杯中,置于40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中恒温加热,反应4h,然后于1000r/min冷冻离心10min,弃上清液,在离心管中加入双蒸水,洗涤,重悬,再以5000r/min离心20min,弃上清液,烘干称质量^[14],以时间为横坐标,生物量为纵坐标,确定菌体的生长曲线。

1.8 变温培养对突变株RM-21产类胡萝卜素的影

在96h的发酵过程中,采用变温培养考察温度对发酵的影响,以菌体生长曲线的4个阶段为因素,各取3个温度水平,进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,测定固态发酵类胡萝卜素产量,以28℃恒温培养作为对照。

1.9 类胡萝卜素产量的测定

准确称取1.00g冷冻干燥固体发酵物,加入0.50g石英砂充分研磨,然后加入10mL丙酮,于28℃振荡浸提30min,将浸提物10000r/min冷冻离心10min,收集上清液。将上清液于450nm波长处测定吸光度,参照Girard等^[15]方法计算类胡萝卜素产量,以干基计。

$$\text{类胡萝卜产量}/(\mu\text{g/g}) = \frac{A_{450\text{nm}} \times D \times V}{0.16 \times m}$$

式中: $A_{450\text{nm}}$ 为类胡萝卜素最大吸收波长处的吸光度; V 为提取所用溶剂体积/mL; D 为测定试样时的稀释倍数; m 为提取所用的发酵培养物质量/g; 0.16为类胡萝卜素的消光系数。

2 结果与分析

2.1 出发菌株抗性实验结果

由出发菌株抗性实验结果可知,当培养基中添加20~80 $\mu\text{mol/L}$ 二苯胺时,菌株RM-1能够生长,菌落颜色由红到浅红变浅,进一步提高二苯胺浓度,菌株不生长。当二苯胺浓度为80 $\mu\text{mol/L}$ 时,菌株生长,但呈白色,说明此时菌体类胡萝卜素的生物合成能力降低或被抑制。因此,可选用80 $\mu\text{mol/L}$ 的二苯胺加入到平板筛选培养基,以供筛选之用。

2.2 N^+ 注入诱变

2.2.1 N^+ 注入诱变RM-1的诱变效应

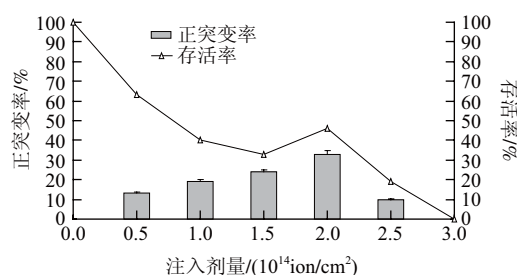


图1 出发菌株RM-1离子注入的诱变效应

Fig.1 Effect of N^+ implantation dose on the positive mutation rate and survival rate of the original strain

由图1可知,当采用10keV能量的 N^+ 注入出发菌株时,注入剂量对菌株存活率具有显著影响。整个存活曲线呈先降后升再降的“马鞍型”曲线变化,与宋道军等^[16]的研究结果相符。当 N^+ 的注入剂量较小时,RM-1存活曲线随注入剂量的增大而降低,这主要是能量沉积效应和动量传

递效应综合作用的结果;在中高剂量 N^+ 注入下,RM-1存活率随注入剂量的增大而上升,一方面由于能量沉积和动量传递效应所造成的损伤仍起主要作用,另一方面可能是注入 N^+ 的电荷积累发挥了作用,再加之离子注入的质量沉积生成新的产物与细胞内的DNA和蛋白质等生物大分子竞争自由基,从而减轻了自由基对细胞的损伤;当 N^+ 的注入剂量继续增大时,其存活率又逐渐下降,说明大剂量注入下能量沉积和动量传递所造成的DNA和生物膜等其他生物大分子的严重损伤已超出了其修复能力,而且大量堆积的电荷达到一定的临界值后产生库仑爆炸,其“保护屏障”作用消失^[16-17]。结果表明,当注入剂量为 $1.0 \times 10^{14}\text{ion/cm}^2$ 和 $2.0 \times 10^{14}\text{ion/cm}^2$ 时有较高的存活率,在 $1.5 \times 10^{14}\text{ion/cm}^2$ 和 $2.0 \times 10^{14}\text{ion/cm}^2$ 时有较高的正突变率,结合两者的最佳剂量,可选择 $2.0 \times 10^{14}\text{ion/cm}^2$ 作为离子注入剂量,以利菌株选育。

2.2.2 突变株的筛选

作为合成抑制剂的二苯胺已被广泛用于抑制细菌和真菌等的类胡萝卜素的生物合成。参与类胡萝卜素代谢的酶发生改变后,会引起该色素不能表达或过量表达,出现白色或深红色的酵母菌落,因此,通过菌落颜色的改变对突变株进行鉴定是可行的^[18]。通过对诱变后菌株的二苯胺平板初筛,得到26株类胡萝卜素产量均有所提高的菌株,再经复筛,可得4株突变株(RM-04、RM-13、RM-19、RM-21),其类胡萝卜素产量变化情况见表1。

表1 N^+ 注入诱变筛选结果

Table 1 Comparison of carotenoid production by the original strain and four mutant strains

菌株	类胡萝卜素产量/($\mu\text{g/g}$)	相对出发菌株的增幅/%
RM-1	2.58 ± 0.00^d	0.00
RM-04	3.28 ± 0.01^c	27.13
RM-13	2.98 ± 0.00^{cd}	15.50
RM-19	3.78 ± 0.00^b	46.51
RM-21	4.15 ± 0.01^a	60.85

注:同列字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。

从表1可以看出,经过固态发酵实验,得到4株突变株的类胡萝卜素产量较出发株RM-1提高了15.50%~60.85%,其中突变株RM-21产类胡萝卜素的能力显著提高,增幅达到60.85%。

2.2.3 遗传稳定性实验结果

经过10次传代,RM-21固态发酵的类胡萝卜素产量几乎稳定在4.15 $\mu\text{g/g}$,说明该诱变菌株具有良好的遗传稳定性。

2.3 发酵条件优化结果

2.3.1 碳源对突变株RM-21产类胡萝卜素的影响

由图2可知,在3种实验碳源中,当以2.0~4.0g/L作为添加量时,葡萄糖作碳源时类胡萝卜素产量最大。发酵时添加3.0~4.0g/L葡萄糖,有利于提高类胡萝卜素产量。

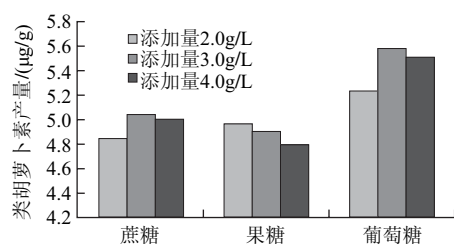


图2 不同碳源对类胡萝卜素产量的影响

Fig.2 Effect of different carbon sources on carotenoid production

2.3.2 氮源对突变株RM-21产类胡萝卜素的影响

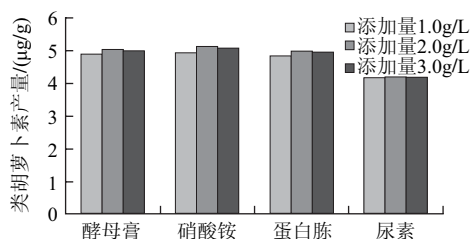


图3 不同氮源对类胡萝卜素产量的影响

Fig.3 Effect of different nitrogen sources on carotenoid production

由图3可知, 硝酸铵对类胡萝卜素产量影响最大, 尿素对黏性红圆酵母产类胡萝卜素影响不大。当硝酸铵的添加量为2.0g/L时, 类胡萝卜素的产量可达5.11μg/g。

2.3.3 接种量对突变株RM-21产类胡萝卜素的影响

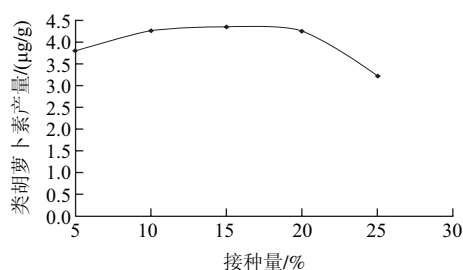


图4 接种量对类胡萝卜素产量的影响

Fig.4 Effect of inoculum size on carotenoid production

由图4可知, 接种量以10%~20%为宜。接种量过小, 造成局部菌种生长缓慢, 影响类胡萝卜素积累; 接种量过大, 菌体初期生长迅速, 过早达到发酵终点, 不利于类胡萝卜素形成和积累。

2.3.4 初始pH值对突变株RM-21产类胡萝卜素的影响

pH 值主要影响微生物对营养物质的吸收、利用和代谢产物的分泌, 影响酶种类和酶活力, 使代谢途径和细胞膜的通透性发生变化等^[9]。由图5可知, 在初始pH值为5.0~7.0的范围内, 类胡萝卜素产量呈先增加后减少的趋势, 在pH值为5.5~6.5时有利于类胡萝卜素的生产, 说明黏性红圆酵母适合在偏酸性环境中生长。

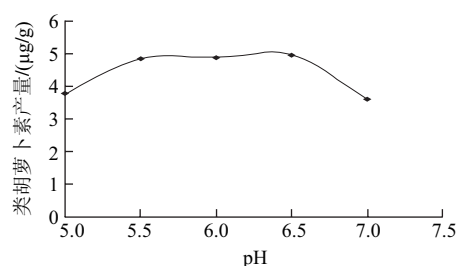


图5 初始pH值对类胡萝卜素产量的影响

Fig.5 Effect of initial pH on carotenoid production

2.3.5 固态发酵条件正交试验及结果

表2 固态发酵条件正交试验设计方案及结果分析

Table 2 Orthogonal array design scheme and results for optimization of solid-state fermentation conditions

试验号	因素				类胡萝卜素产量/(μg/g)
	A葡萄糖添加量/(g/L)	B硝酸铵添加量/(g/L)	C接种量/%	D初始pH	
1	1(3.0)	1(1.5)	1(10)	1(5.5)	3.74
2	1	2(2.0)	2(15)	2(6.0)	3.84
3	1	3(2.5)	3(20)	3(6.5)	4.56
4	2(3.5)	1	2	3	3.52
5	2	2	3	1	4.68
6	2	3	1	2	5.02
7	3(4.0)	1	3	2	5.04
8	3	2	1	3	5.72
9	3	3	2	1	4.88
k_1	4.05	4.10	4.83	4.43	
k_2	4.41	4.75	4.08	4.63	
k_3	5.21	4.82	4.76	4.60	$A_3B_3C_1D_2$
R	1.17	0.72	0.07	0.20	$R_A > R_B > R_D > R_C$

表3 固态发酵条件正交试验结果方差分析表

Table 3 Analysis of variance for carotenoid production with various solid-state fermentation conditions

方差来源	自由度	平方和	均方	F值	显著性
A葡萄糖	2	6.391	3.195	6033.168	0.000
B硝酸铵	2	2.837	1.419	2678.664	0.000
C接种量	2	3.100	1.550	2926.909	0.000
D初始pH	2	0.208	0.104	196.636	0.000
误差	18	0.010	0.001		
总和	27	573.426			

由表2、3的极差和方差分析表明, 各因素对类胡萝卜素产量的影响程度为 $A > B > D > C$, 即葡萄糖是主要的影响因素, 硝酸铵次之, 初始pH值和接种量对类胡萝卜素产量影响较小。最优组合为 $A_3B_3C_1D_2$, 即葡萄糖4.0g/L、硝酸铵2.5g/L、接种量10.0%、初始pH6.0, 按该优化的配方进行固态发酵培养, 得到的实测产量为5.82μg/g, 结果与理论值(5.83μg/g)相近, 高于正交试验各试样产量。

2.3.6 菌体的生长曲线测定

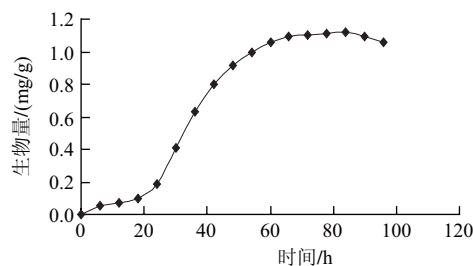


图6 突变株RM-21的生长曲线

Fig.6 Growth curve of mutant strain RM-21

由图6可知, 突变株RM-21固态培养24h左右进入对数生长期, 60h进入稳定期, 84h后进入衰亡期。

2.3.7 变温培养对突变株RM-21产类胡萝卜素的影

表4 变温培养期温度条件正交试验结果及分析

Table 4 Orthogonal array design scheme and results for optimization of temperature changing pattern for solid-state fermentation

试验号	因素				类胡萝卜素产量/(μg/g)
	A 延滞期(0~24h) 温度/℃	B 对数期(25~60h) 温度/℃	C 稳定期(61~84h) 温度/℃	D 衰亡期(85~96h) 温度/℃	
1	1(23)	1(23)	1(23)	1(23)	3.06
2	1	2(28)	2(28)	2(28)	4.12
3	1	3(33)	3(33)	3(33)	5.53
4	2(28)	1	2	3	3.23
5	2	2	3	1	4.18
6	2	3	1	2	5.01
7	3(33)	1	3	2	5.19
8	3	2	1	3	3.40
9	3	3	2	1	6.55
k_1	4.24	3.83	3.82	4.60	
k_2	4.14	3.90	4.63	4.77	
k_3	5.05	5.70	4.97	4.05	$A_3B_3C_3D_2$
R	0.81	1.87	1.14	0.72	$R_B > R_C > R_A > R_D$

表5 变温培养正交试验方差分析表

Table 5 Analysis of variance for carotenoid production with various temperature changing patterns

方差来源	自由度	平方和	均方	F值	显著性
A	2	4.220	2.110	3237.142	0.000
B	2	20.156	10.078	15460.659	0.000
C	2	6.346	3.173	4867.949	0.000
D	2	2.727	1.363	2091.415	0.000
误差	18	0.012	0.001		
总计	27	571.784			

一般情况下, 最适发酵温度是既适合微生物生长又适合代谢产物合成的温度, 但往往最适生长温度和最佳温度能够实现促进细胞生长和增加产物合成的统一^[20]。由表4、5的极差和方差分析表明, 各因素对类胡萝卜素产量的影响程度为 $B > C > A > D$, 即对数生长期的温度是类胡萝卜素产生的主要因素, 因素A、B、C、D的最优搭配 $A_3B_3C_3D_2$, 即0~84h温度为33℃, 85~96h温度为28℃。按该优化的方案进行培养, 得到类胡萝卜素产量为7.04μg/g, 高于正交试验各试样产量, 且与理论值(7.08μg/g)相近。将变温培养的优化产量值与恒温培养的产量值(5.82μg/g)进行比较, 可知类胡萝卜素产量提高了20.96%。

3 结论

利用 N^+ 束注入对黏性红圆酵母RM-1进行诱变, 产生了一定的生物效应, 其注入剂量与黏性红圆酵母存活率间遵循“马鞍型”剂量-效应曲线的关系。本实验在10keV的能量下, 得到黏性红圆酵母诱变的最适 N^+ 注入剂量为 $2.0 \times 10^{14} \text{ ion/cm}^2$ 。经80μmol/L二苯胺初筛与复筛实验, 得到突变菌株RM-21, 其产类胡萝卜素的能力分别提高60.85%。经过传代结果发现, 传代10次, 突变株RM-21的类胡萝卜素产量和遗传性状均稳定。因此可作为生产类胡萝卜素的有效菌株开发利用。通过对主要营养与环境条件的选择及优化, 在单因素试验结果的基础上, 以碳源、氮源、接种量、初始pH值4个因素设计的正交试验优化了突变株RM-21的发酵条件, 结果表明: 最佳固态发酵条件为 $m_{\text{稻米}}:m_{\text{玉米粉}}=1:3$ 、含水量75%、葡萄糖4.0g/L、硝酸铵2.5g/L、初始pH6.0、接种量10%。采用变温培养可提高类胡萝卜素的产量(7.04μg/g), 较28℃恒温培养提高达20.96%。

参考文献:

- BAKER R, GUENTHER C. The role of carotenoids in consumer choice and the likely benefits from their inclusion into products for human consumption[J]. Trends Food Sci Technol, 2004, 15: 484-488.
- CLARK R M, HERRON K L, WATERS D, et al. Hypoand hyperresponse to egg cholesterol predicts plasma lutein and β -carotene concentrations in men and women[J]. J Nutr, 2006, 136: 601-607.
- FORMAN M R, HURSTING S D, UMAR A, et al. Nutrition and cancer prevention: a multidisciplinary perspective on human trials[J]. Annu Rev Nutr, 2004, 24: 223-254.
- GOSWAMI U C, SHARMA N. Efficiency of a few retinoids and carotenoids *in vivo* in controlling benzo[a] pyrene-induced forestomach tumor in female Swiss mice[J]. Br J Nutr, 2005, 94: 540-543.
- DE H A, BURKE R, BONT J. Microbial production of food colorants[J]. Med Fac Landbouww Rijisuniv Gent, 1991, 56: 1655-1660.
- 王岁楼, 吴晓宗, 陈德经, 等. 黏红酵母离子注入诱变及其发酵产生 β -胡萝卜素条件的研究[J]. 食品科学, 2009, 30(5): 135-140.
- 林晓, 周蓬蓬, 鲁明波, 等. 低能离子注入诱变选育高产虾青素红法夫酵母突变株[J]. 激光生物学报, 2007, 16(6): 781-785.
- 牛春华, 丁东红, 徐文静, 等. 用玉米浆发酵生产类胡萝卜素红酵母的紫外诱变选育[J]. 中国酿造, 2010(1): 61-63.
- WANG S L, SUN J S, HAN B Z, et al. Optimization of β -carotene production by *Rhodotorula glutinis* using high hydrostatic pressure and response surface methodology[J]. J Food Sci, 2007, 72: 325-329.
- KIM S K, LEE J H, LEE C H, et al. Increased carotenoid production in *Xanthophyllomyces dendrorhous* G276 using plant extracts[J]. J Microbiol, 2007, 45: 128-132.
- 段楠. 高产虾青素的红发夫酵母菌株进化工程研究[D]. 天津: 天津大学, 2010.
- 孙海宁, 王菊芳, 马爽, 等. 不同LET C离子束对粘红酵母菌的突变效应分析[J]. 原子核物理评论, 2011, 28(1): 122-125.
- 吴跃进, 王学栋, 刘贵富, 等. 离子束注入水稻诱变效应的研究[J]. 安徽农业科学, 1989(2): 12-15.
- 栗敏. 红酵母色素生产及其性质研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2008.
- GIRARD P, FALCONNIER B, BRICOUT J, et al. β -Carotene producing mutants of *Phaffia rhodozyma*[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1994, 41: 183-191.
- 宋道军, 姚建铭, 邵春林, 等. 离子注入微生物产生“马鞍型”存活曲线的可能作用机制[J]. 核技术, 1999, 22(3): 129-132.
- 宋道军, 姚建铭, 吴丽芳, 等. 离子注入对微生物细胞的刻蚀与对DNA的损伤及修复[J]. 遗传, 1999, 21(4): 37-40.
- 王菊芳, 马爽, 陆栋, 等. 不同品质碳离子束对红酵母菌致突变能力的分析[J]. 生物物理学报, 2009, 25(增刊1): 149.
- 张超, 刘军. SCP生产菌海洋红酵母摇瓶培养研究[J]. 四川轻化学院学报, 2000, 13(3): 71-74.
- 曹小红, 赵玉华, 鲁梅芳, 等. 硅藻变温发酵生产二十碳五烯酸的研究[J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(12): 57-60.