

短梗霉多糖发酵条件的研究

孙万儒 周铁锁 谢浩旭 任永娥 江 宁

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

摘 要 在摇瓶发酵条件研究的基础上, 于 16L 自控发酵罐上进行了罐上发酵条件优化研究, 发现以 10% 淀粉水解物为碳源时, 淀粉水解物的最适 DE 值为 40—50, 发酵培养基中的硫酸铵最适用量不同于摇瓶发酵时的量, 种龄和接种量、通气量、罐压、搅拌速度和搅拌叶轮挡数等均对多糖的产生有较大的影响。另外还进行了发酵过程的动力学的研究。

关键词 短梗霉多糖, 发酵, 出芽短梗霉

短梗霉多糖 (Pullulan, 又称普鲁兰, 茁霉多糖) 是由出芽短梗霉 (*Aureobasidium pullulans*) 利用糖发酵产生的一种胞外多糖, 它水溶性极好, 水溶液粘度较低, 有很好的粘合、可塑、成膜、成纤维性, 机械强度高, 膜的透气性很低。它无色, 无味, 无毒^[1-5]。因此, 它广泛地应用于医药、食品、化妆品、包装、印刷、保鲜、粘合、电子器件及导电、光敏等特种材料制造上。短梗霉多糖首先于 1972 年在日本林原公司投产^[2]。我国早在 1982 年就开始有关研究, 取得一定进展^[3]。本文是在摇瓶发酵条件研究基础上于小型发酵罐上进行条件研究的结果。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌种: 出芽短梗霉 (*Aureobasidium pullulans*) 325 由毛维颖先生提供。

1.1.2 培养基组成 (%): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.02, K_2HPO_4 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02, NaCl 0.1, 淀粉水解物 10, pH 6.5, 于 0.05MPa 下灭菌 30 分钟。

1.1.3 种子培养基组成 (%): 除了将淀粉水解物改用 5% 蔗糖外, 其他同基础培养基组成。

1.1.4 斜面培养基: 土豆-麦芽汁培养基。

1.1.5 试剂: 萘酚, 葡萄糖, 以及其他试剂均为市售分析纯试剂。

1.2 方 法

1.2.1 斜面种子培养: 用接种针从原斜面上取 1 环细胞接种在斜面上, 于 28℃ 下培养 5 天。

1.2.2 摇瓶培养: 在 25ml 的斜面种子培养试管中加入 10ml 无菌水, 使细胞悬浮, 每个摇瓶中加入 1.0ml 菌悬液, 于 28℃ 下, 在旋转摇床上培养 5 天, 摇床速度 200r/min, 如果用做发酵罐种子, 培养 24—48 小时。

1.2.3 罐上发酵条件: 在 16L 自控发酵罐 (NBS 产品) 内装入 10L 发酵培养基, 0.06MPa

灭菌 30 分钟, 冷却至 28℃ 接种进行发酵, 定时取样, 测定发酵结果。

1.2.4 生物量: 定量取发酵液, 加入蒸馏水稀释 5 倍, 4000r/min 下离心 30 分钟, 倾出上清液用于糖测定。沉淀的菌体用蒸馏水洗涤离心 2 次, 于 100℃ 下干燥至恒重, 用称重法测定生物量。

1.2.5 总糖测定: 将离心后的上清液进行适当稀释, 用蒽酮法测定^[7]。以无水葡萄糖制作标准曲线。

1.2.6 短梗霉多糖测定: 取一定量离心后的上清液, 加入 5 倍乙醇进行多糖沉淀, 将离心后的多糖沉淀溶解, 稀释一定倍数后用蒽酮法测定^[7], 以右旋糖苷为标准样品制作标准曲线。

1.2.7 发酵液粘度测定: 用 broockfield 粘度计 (LVT) 的 1 或 2 号转头测定。

2 结果与讨论

2.1 硫酸铵用量对多糖发酵的影响

在保持其他培养基组分恒定条件下, 改变硫酸铵用量, 于 16L 自控罐上进行发酵, 其结果如表 1。结果表明随着培养基中硫酸铵用量增加, 发酵终了 pH 和残糖降低, 而生物量增加, 最适的硫酸铵用量为 0.06%, 而在摇瓶中量适的硫酸铵用量为 0.02%, 这主要是由于在罐上通气量大, 细胞增殖需要增加氮源所致。

表 1 硫酸铵用量对发酵的影响

Table 1 Effect of ammonium sulfate on pullulan fermentation

Ammonium sulfate (%)	0.03	0.06	0.09
Final pH	4.0	3.5	3.5
Pullulan (mg/ml)	23.2	41.2	34.7
Residual sugar (mg/ml)	28.8	12.4	12.1
Biomass (g/L)	16.0	17.2	21.7
Conversion (%)	32.56	47.03	39.48

表 2 酵母膏用量对多糖发酵的影响

Table 2 Effect of yeast extract on pullulan fermentation

Yeast extract (%)	0.06	0.12	0.15
Final pH	3.5	3.5	3.5
Pullulan (mg/ml)	41.8	45.1	38.6
Residual sugar (mg/ml)	11.8	5.9	8.1
Biomass (g/L)	14.64	17.0	20.15
Conversion (%)	47.39	47.93	42.00

2.2 酵母膏用量对多糖发酵的影响

在保持 0.06% 的硫酸铵用量和其他培养基成分不变的条件下, 加入不同量的酵母膏, 其对多糖发酵的影响如表 2。结果表明, 发酵终了 pH 与使用的酵母膏用量无关, 生物量随酵母膏用量增加而增加, 酵母膏用量为 0.12% 时, 多糖产量最高, 残糖最低, 但对转化率影响不大, 这说明酵母膏主要作为氮源被利用, 从而使生物量增加, 过多的生物量会消耗更多的碳源对多糖合成不利。

2.3 淀粉水解物 DE 值的影响

通过控制淀粉水解条件可制备不同 DE 值的淀粉水解物, 按 10% 的量配制培养基进行发酵, 结果如图 1。说明多糖转化率随着淀粉水解物的 DE 值的变化有一最大值, 即 DE 值为 50 左右时多糖

转化率最高, 且发酵液中残糖最低。在 DE 值低于 40 时, 寡糖含量高, 发酵利用率低, 多糖转化率低, 而在高 DE 值时, 葡萄糖含量高, 葡萄糖效应明显增加, 菌体的转化能力降低, 多糖产量下降, 残糖也增加。生物量随着 DE 值增加而增加。但 DE 值高于 60 以后, 由于葡萄糖量增加生物量反而下降, 说明葡萄糖效应对生物量也有影响。

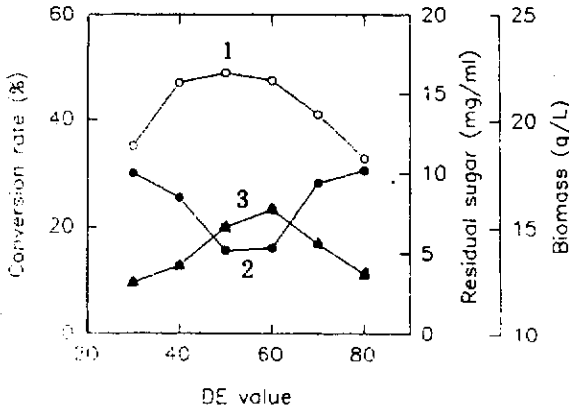


图 1 淀粉水解物的 DE 值对多糖发酵的影响
Fig. 1 Dependence of the conversion rate on DE value of hydrolysate of starch

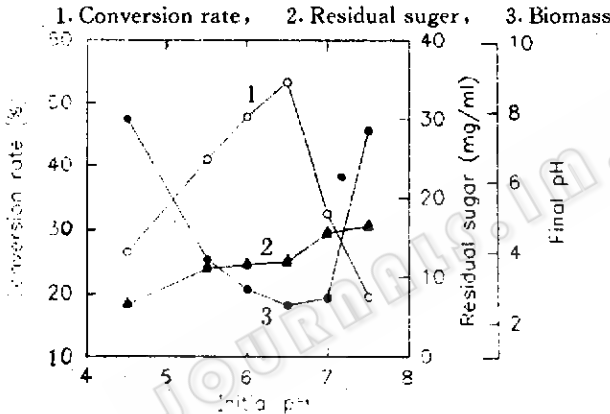


图 2 初始 pH 对多糖发酵的影响
Fig. 2 Effect of initial pH on the fermentation of pullulan
1. Conversion rate, 2. Biomass, 3. Residual sugar

2.6 种龄的影响

用不同种龄的一、二级种子接种进行发酵，列于表 4 的结果表明，随着一级和二级种子的种龄的增加均使多糖产量降低，以一、二级种子的种龄为 24 小时的为最佳种子，其多糖产量最高。

2.4 初始 pH 的影响

分别将发酵培养基的初始 pH 用酸或碱调到不同值，灭菌后发酵，结果如图 2。多糖发酵的最适 pH 为 6.0—6.5，超过此范围，多糖产量下降，发酵液中残糖随 pH 的增加有一最小值，在初始 pH6.0—6.5 范围内，终了 pH3.5 左右，残糖最低。

2.5 控制发酵过程的 pH 对发酵的影响

在多糖发酵 24 小时后通过加入酸或碱的办法控制发酵液 pH，保持在 pH 2.5 或 4.5，或调到 pH 4.0 后不再控制发酵过程的 pH，列于表 3 的结果表明，发酵过程控制 pH 2.5 时转化率低，残糖高，发酵液粘度也低；控制 pH 4.5 时，情况略好，但不如对照。而发酵到 24 小时将发酵液 pH 调到 4.5 再任其自然变化，结果略好于对照。这说明在发酵 24 小时后，将发酵液 pH 降到 4.5 或控制终了 pH 在 3.5 左右对多糖合成有利。这可能与多糖合成关键酶的最适 pH 有关。

表 3 控制发酵过程 pH 的影响

Table 3 Effect of controlling pH on pullulan fermentation

Controlling mode of pH	Keep on pH2.5	Keep on pH4.5	Not control after pH4.5	Not control
Final pH	2.5	4.5	3.5	3.5
Pullulan (mg/ml)	17.0	36.5	45.1	42.0
Residual sugar (mg/ml)	22.7	15.9	6.9	10.9
Viscosity of the broth (cp)	500	900	1100	700

表 4 一、二级种子的种龄对多糖产量的影响
Table 4 Dependence of pullulan fermentation on ages of the first and the second seed

Conversion of pullulan (%)	First seed age (h)			
	24	36	48	
Second seed age (h)	24	54.9	51.4	42.0
	36	49.1	48.1	45.4
	48	41.0	42.8	—

表 5 接种量对发酵的影响

Table 5 Effect of seed volume on pullulan fermentation

Seed volume (% v/v)	1.0	2.5	5.0	10.0
Pullulan (mg/ml)	40.1	45.6	37.3	37.0
Residual sugar (mg/ml)	11.9	7.0	7.3	6.9
Biomass (g/L)	15.9	15.4	16.6	24.4
Final pH	4.5	3.5	3.5	3.5

表 6 通气量、搅拌速度及搅拌叶轮组合的影响

Table 6 Dependence of pullulan fermentation on the aeration rate, agitating speed and the number of vane group

Conversion of pullulan (%)	Air flow rate (vvm)				
	0.5	1.0	1.5		
Agit. speed (r/min)	Numb. of vane group	2	—	37.5	40.9
900	3	37.6	43.0	37.3	—

2.7 接种量的影响

在以上实验结果的基础上, 以培养 24 小时进入对数生长的种子按不同接种量接种进行发酵, 结果如表 5 所示, 接种量为 2.5% 时多糖产量最高, 低于或高于此接种量, 多糖产量均会减少。随接种量增加, 残糖减少, 生物量增加。而生物量的多少对多糖合成无明显的直接关系。生物量增加必然要消耗大量的底物, 使残糖减少。

2.8 通气量、搅拌速度和搅拌叶轮组合的影响

在 16L 自控发酵罐中, 使用二组或三组搅拌叶轮在不同搅拌速度及通气量下进行发酵, 结果如表 6。提高通气量、搅拌速度和增加搅拌叶轮的档数均可提高溶氧。多糖发酵需要一定的溶氧, 但溶氧过高或过低均会使多糖产量降低。结果表明, 在通气量为 1:1 的条件下, 使用三档搅拌叶轮组, 搅拌速度 700r/min, 对多糖产生最有利, 也说明通气量是三个因素中最有影响力的因素。搅拌

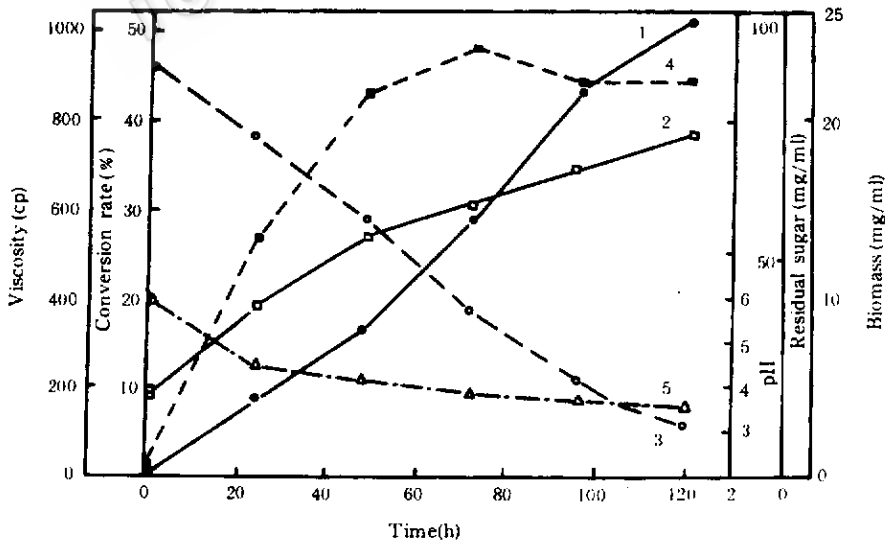


图 3 在 16L 自控罐上短梗霉多糖的发酵过程
Fig. 3 Pullulan fermentation in 16L auto-controlling fermentor

1. Pullulan, 2. Biomass, 3. Residual sugar, 4. Viscosity, 5. pH.

速度和搅拌叶轮档数相比, 后者要比前者对提高溶氧和增加多糖产量有较大影响。

2.9 发酵过程

在以上单项因子对多糖合成的影响研究基础上, 综合最佳条件进行发酵, 测定发酵过程中的多糖、生物量、残糖、发酵液的 pH 和粘度等的变化, 结果见图 3。在最佳发酵条件下短梗霉多糖发酵转化率可达到 58%, 残糖为 4mg/ml。多糖合成与生物量的增加几乎为平行关系, 与底物消耗成负相关。

参 考 文 献

- [1] Yuen S. *Process Biochemistry*, 1974, Nov. 7—10.
- [2] Paul Francois *et al.* *Biotechnol Adv*, 1986, 4 (2) : 245—59.
- [3] Gorin P A J and Bergter J B. *The Polysaccharides*, Ed. by Aspinnall G O. Academic Press, New York, 1983, Vol. 2 : 412—490.
- [4] Sutherland I W, *Biotechnology of Microbial Exopolysaccharides*, Cambridge University Press, Cambridge, 1990.
- [5] 孙万儒. 淀粉水解工业, 1992, 2 : 24—6.
- [6] 徐纯锡等, 微生物学通报, 1983, 10 (3) : 109—112.
- [7] 张推杰, 《复合多糖的生化研究技术》, 北京: 科学出版社, 1988, p. 1—9.

Studies on the Conditions of Fermentation of Pullulan by *Aureobasidium pullulans*

Sun Wanru Zhou Tiesuo Xie Haoxu Ren Yonge Jiang Ning

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080*)

Abstract The studies on suitable conditions for pullulan fermentation according to the results obtained from the shaking flask tests was carried out in 16L auto-controlling fermentor. It found that the optimal DE value of starch hydrolyzate was 40—50 when 10% starch was used as carbon source. The optimal concentration of ammonium sulfate in the medium for fermentor was different from that of the shaking flask. The fermentation kinetics and effects of seed age, seed volume, airflow rate, pressure of tank, agitation speed and number of vane group on the production of pullulan were investigated.

Key words *Aureobasidium pullulans*, pullulan, fermentation