

出芽短梗霉(*Aureobasidium pullulans*) 生物合成普鲁兰多糖的研究进展

郭法利, 欧杰, 马晨晨, 董博

(上海海洋大学食品学院上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306)

摘要: 普鲁兰多糖是由出芽短梗霉(*Aureobasidium pullulans*)发酵产生的一种胞外多糖, 其特殊的结构赋予了它许多优良的理化性质, 广泛应用于食品、制药、化工、石油及其他制造业。在普鲁兰多糖生物合成过程中, 普鲁兰多糖的化学结构、产率及颜色的深浅等受到多种营养条件和环境因素的影响。介绍了普鲁兰多糖的结构、性质, 重点综述了国内外学者对发酵条件优化的研究现状, 最后总结了普鲁兰多糖生物合成研究的发展方向。

关键词: 普鲁兰多糖; 出芽短梗霉; 生物合成; 发酵

中图分类号: Q815

文献标识码: A

文章编号: 104-874X(2013)13-0113-03

Advance in biosynthesis of pullulan produced by *Aureobasidium pullulans*

GUO Fa-li, OU Jie, MA Chen-chen, DONG Bo

(College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai Engineering Research Center of Aquatic-Product Processing & Preservation, Shanghai 201306, China)

Abstract: Pullulan, a kind of exopolysaccharides produced by *Aureobasidium pullulans*, has a number of favorable properties given by its special structure. Pullulan has been widely used in food industry, pharmacy, chemical engineering, petroleum and other industries. Pullulan's chemical modification, productivity and pigment were influenced by various factors in the fermentation process of *Aureobasidium pullulans*. This paper simply introduced the structure and properties of pullulan, and mainly overviewed current knowledge on optimization of fermentation conditions. At last, the research trend of pullulan's fermentation process was summed.

Key words: pullulan; *Aureobasidium pullulans*; biosynthesis; fermentation

普鲁兰多糖(**pullulan**)又称为短梗霉多糖、霉多糖或苗霉糖, 是由出芽短梗霉(*Aureobasidium pullulans*)菌株在发酵过程中利用糖代谢产生的一种微生物胞外多糖。R. Bauer 在 1938 年首先发现了这种水溶性多糖, 此后, 经过多年的研究, 普鲁兰多糖结构以及理化特性也逐渐被世人所了解。普鲁兰多糖无色、无味, 对人体无任何毒副作用, 具有优良的理化性质和生物学特性, 广泛应用于食品、化妆品、医药、烟草等领域^[1-4]。普鲁兰多糖的化学结构是葡萄糖经两个 α -1,4 糖苷键连接成麦芽三糖, 由 α -1,6 糖苷键聚合形成无分支结构的直链多糖^[5], α -1,4 与 α -1,6 糖苷键的比例是 2:1, 聚合度为 100~5 000, 分子量一般在 5.0×10^4 ~ 5.0×10^6 之间。普鲁兰多糖的许多优良性质(成膜性、粘结性、乳化性、易加工、吸附性等)都是由这种特殊结构决定的, 其分子结构因菌种和发酵条件的不同而有较大的变化。

1 普鲁兰多糖生物合成机理的研究

普鲁兰多糖的生物合成途径是一个非常复杂的过程, 目前, 普鲁兰多糖的生物合成机理尚未研究清楚。

Catley 等提出了普鲁兰多糖生物合成的反应过程, 首先在尿苷二磷酸葡萄糖(UDPG)的参与下, 基质中的葡萄糖与脂质分子(LPh)结合, 经过第 2 次葡萄糖基转移反应得到异麦芽糖基(isomaltosyl); 然后异麦芽糖基(isomaltosyl)与和脂质分子连接的葡萄糖形成异潘糖基(isopanosyl); 最后异潘糖基(isopanosyl)通过聚合作用形成普鲁兰多糖链^[4]。

2 发酵菌株的选育

普鲁兰多糖发酵生产的主要指标是多糖产量高, 底物糖转化率高, 黏度大, 色素含量低。因此, 选择合适的菌株尤为重要。出芽短梗霉属于半知菌类, 暗丛梗孢科, 有酵母状、菌丝状、厚垣孢子等多种细胞形态, 一般生长于植物材料上或土壤中, 与酵母的关系非常密切。出芽短梗霉适应能力很强, 广泛存在于森林土壤、湖泊、植物材料和动物组织等^[5-6], 甚至有人从海底淤泥分离出来^[7]。但是, 为获取适合工业化生产、性能更加优良稳定的菌株, 需要借助理化诱变、基因工程等方法对自然界中的原始菌株进行诱变育种和定向选育。

目前, 筛选菌株最普遍的方法是利用紫外线(UV)、硫酸二乙酯(DES)等诱变剂进行理化诱变, 然后挑取优良菌株进行培养。国内外科学家在这方面做了大量的工作^[8-10], 得到的诱变菌株多糖产量大多在 10.56~37.84 g/L 范围内, 而且这些方法工作量大、时间周期长、正方向诱变率低。近几年, 基因组重排(genome-shuffling)技术在筛选菌株时更有效率^[11], Kang 等^[11]采用基因组重排技术改变原菌

收稿日期: 2013-03-26

基金项目: 上海市科委工程中心建设项目(11DZ2280300)

作者简介: 郭法利(1987-), 男, 在读硕士生, E-mail: guofali@2008.sina.com

通讯作者: 欧杰(1964-), 男, 硕士, 副教授, E-mail: jou@shou.edu.cn

株 *A. pullulans* N3.387, 经过三次原生质体融合, 得到一株突变菌株 F3-2, 产普鲁兰多糖量为 20.7 g/L, 与原菌株相比提高了 179.7%。

3 普鲁兰多糖发酵优化条件的研究

出芽短梗霉在其生活史中具有酵母状和真菌菌丝体两种形态, 研究表明, 在发酵过程中出芽短梗霉呈酵母形态时, 会分泌大量的普鲁兰多糖, 其机理在于细胞内酶系作用下, 将培养基中的碳源转化为多糖, 然后再分泌到细胞外^[12]。这两种形态的形成受培养基成分、培养条件等各种因素的影响, 它们可以相互转变, 因此选择合适的培养基配方和培养条件, 对普鲁兰多糖的生物合成有极大的促进作用。

3.1 碳源的选择

碳源是发酵所用的培养基最基本的成分之一。研究指出, 碳源在普鲁兰多糖发酵过程中属于显著性因子, 碳源的种类对普鲁兰多糖的产率有至关重要的作用, 因此关于这方面的研究相对较多。有研究指出蔗糖为最佳碳源, 其次为麦芽糖、木糖、葡萄糖、甘露糖和果糖, 以核糖、阿拉伯糖、半乳糖和淀粉为碳源时普鲁兰多糖产量较低^[13]。也有其他研究表明, 葡萄糖是最佳的碳源^[14], 这可能与所用的菌种有关, 因为不同的菌种对碳源的利用能力不尽相同。此外, 碳源的浓度也会影响多糖的产量, 发酵液中蔗糖的最适浓度为 5%~10%, 低于 2.5% 时, 由于碳源限制而不合成多糖; 而浓度高于 12.5% 时, 产生高糖抑制现象, 影响多糖的合成^[15]。

为降低生产成本, 克服单糖或双糖可能产生的抑制作用, 提供诱导物前体和更营养的培养基质, 可以利用工业生产中的副产品或者废液作为发酵液中的碳源。Yekta G öksungur 等^[16]以 *Aureobasidium pullulan* P56 为出发菌株, 土豆淀粉废水作为碳源, 初始浓度和初始 pH 值分别为 79.4 g/L、7.26, 发酵 111.8 h 后, 普鲁兰多糖的产量增加了 20%; Vijayendre 等^[17]用棕榈糖作为出芽短梗霉 CFR-77 发酵所需的碳源, 与蔗糖做碳源相比, 发酵周期短, 黏度较高, 不产色素, 以此作为碳源更具应用前景。此外麦芽根、淀粉废水糖化液, 米糠油饼、豆油饼、棉籽油饼、芥菜种子油饼和玉米浆等都可以作为发酵碳源^[18-21]。

3.2 氮源的选择

氮源是细胞生长的重要影响参数, 氮源的种类和初始浓度会影响多糖产率和黑色素的生成。Jiang^[22]研究了不同氮源对普鲁兰多糖产率的影响, 结果表明, NaNO_2 是最佳氮源, 而且与 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 相比发酵时间也缩短了一天。Cheng 等^[23]研究了不同初始浓度对普鲁兰多糖产率的影响, 结果显示, 发酵液中 NH_4^+ 初始浓度为 5 g/L 时, 产率最高; 当初始浓度过高时, 发酵液中会出现普鲁兰多糖抑制酶, 降低了产率。

3.3 温度的选择

温度会影响出芽短梗霉在发酵液中生长和酶活性, 进而影响普鲁兰多糖的产率。短梗霉多糖的最佳发酵温度根据菌株的不同而变化。Shengjun Wu 等^[24]在 22~36℃ 范

围内分批和连续培养条件下研究温度对多糖形成、细胞生长和菌体形态的影响, 发现发酵最适温度为 26℃; 细胞生长最适温度为 32℃, 本试验还指出, 短梗霉菌在发酵时, 前 2 d 温度为 32℃, 随后在 26℃ 时继续发酵 2 d, 普鲁兰多糖的产量会达到最大。

3.4 pH 值的选择

初始 pH 值不仅影响菌体存在的形态, 也会影响酶的合成, 进而影响菌体的生长与多糖生产能力。出芽短梗霉发酵的最佳初始 pH 值在 5.5~7.5 之间。试验表明^[25], 出芽短梗霉发酵时, 在 pH 值较低时, 大部分菌体呈丝状体, 这种形态的菌体不产多糖但生物量增加较快; pH 值较高时, 大部分菌体呈酵母状, 是产多糖的主要菌体。邵伟等^[26]人采用分批不同 pH 值条件进行培养, 研究 pH 值对发酵的影响, 结果显示, pH 值在 6.5 时, 发酵液中的多糖含量比较高。

3.5 金属离子的影响

培养基中所含有的微量元素, 尤其是一些金属离子对普鲁兰多糖的某些特征如分子量的大小、生长速度、色素的深浅及产率有重要的影响。牛登飞等^[27]先用单因素试验研究了不同金属离子对出芽短梗霉产多糖和产色素的影响, 然后用正交试验优化出金属离子的最佳配比, 结果显示, 在培养基中加入 4 $\mu\text{mol/L}$ 的 Ca^{2+} 、2 $\mu\text{mol/L}$ 的 Fe^{2+} 、4 $\mu\text{mol/L}$ 的 Mn^{2+} 、3 $\mu\text{mol/L}$ 的 Zn^{2+} 、1 $\mu\text{mol/L}$ 的 Fe^{3+} 有利于短梗霉发酵产多糖; 而在培养基中加入 4 $\mu\text{mol/L}$ 的 Ca^{2+} 、4 $\mu\text{mol/L}$ 的 Fe^{2+} 、4 $\mu\text{mol/L}$ 的 Mn^{2+} 、3 $\mu\text{mol/L}$ 的 Zn^{2+} 、3 $\mu\text{mol/L}$ 的 Fe^{3+} , 黑色素产生较少。研究发现 Mg^{2+} 可以促进多糖的分泌, 并且对色素的产生影响较小^[28]。

4 溶氧量对普鲁兰多糖产率的影响

出芽短梗霉属于严格需氧菌, 氧气是出芽短梗霉生长和产普鲁兰多糖所必需的, 因此保证发酵液中有充足的氧气是提高普鲁兰多糖产率前提条件之一。在发酵时提高通气量不仅可以增加发酵液中的溶氧量, 还可以使底物、代谢产物、副产物和氧气得到更好的传递^[29]。此外, 发酵过程中, 对发酵液不断的搅拌也能增加培养基中的溶氧量并且还可以稀释培养基中的大分子物质, 增加了发酵液中碳源的利用率, 进而提高了普鲁兰多糖的产率。当然无论是通气量还是搅拌速度, 如果太高了都会影响到普鲁兰多糖的质量(聚合度、分子量等)和产率, 因此检验不同的通气量和搅拌速度对普鲁兰多糖的影响也是很重要的。有研究表明, 用 5 L 搅拌发酵罐发酵时, 最适通气量和搅拌速度分别是 6.5 L/min 和 300 r/min^[30]。

5 展望

近几年来, 对普鲁兰多糖的研究重点开始发生了转变, 由最初的一些机理性研究逐渐转变为现在的发酵条件优化研究。现代科学技术的发展为进一步研究普鲁兰多糖的合成途径和发酵条件的优化开辟了新的途径: 基因组重排(genome-shuffling)技术, 更能有效的筛选菌株; 应用基因敲除技术^[31]去掉出芽短梗霉产黑色素基因, 选择更适合工业化生产的菌株; 采用响应面法(response surface

methodology)^[32-34]综合分析发酵影响因素,得到最佳配比的培养基和发酵条件;发酵液中K⁺、Na⁺浓度的变化会改变细胞表面渗透压,必然会影响到影响到普鲁兰多糖的产率,所以选择合适的K⁺、Na⁺浓度有利于多糖的产生。但K⁺、Na⁺的最适浓度目前尚未有报道,有待进一步的研究;代谢途径的调控^[35],在不同的发酵时期调节EMP/HMP途径的比例,最大化的提高普鲁兰多糖产率;采用细胞固定化技术^[36]将短梗霉细胞固定化实现连续培养发酵,以使细胞循环产糖,提高多糖的产率。

参考文献

- [1] 杨西江,徐田华,徐玲.普鲁兰多糖的应用及研究现状[J].发酵科技通讯,2010,39(4):25-28.
- [2] Sivakumar P A, Rao K P. The use of pullulan for the preparation of stable vincristine liposomes [J]. Carbohydrate Polymers, 2003(51), 327-332.
- [3] Catley B J. Pullulan, a relationship between molecular weight and fine structure[J]. FEBS Letters, 1970,10(3):190-193.
- [4] Catley B J, McDowell W. Lipid-linked saccharides formed during pullulan biosynthesis in *Aureobasidium pullulans* [J]. Carbohydrate Research, 1982,103(1):65-75.
- [5] Gunde C N, Zalar P. Hypersaline water in saltmarshes -natural ecological niches for halophilic black yeasts [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2000(32):235-240.
- [6] Zamora P, Martinez-Ruiz C, Diez J J. Fungi in needles and twigs of pine plantations from northern Spain[J]. Fungal Diversity, 2008(30):171-184.
- [7] Wu S J, Chen J, Pan S. Optimization of fermentation conditions for the production of pullulan by a new strain of *Aureobasidium pullulans* isolated from sea mud and its characterization [J]. Carbohydrate Polymers, 2012,87(2):1696-1700.
- [8] 靳建忠,王慧娟,孔维甲,等.紫外诱变选育出芽短梗霉高产普鲁兰糖白化突变菌株[J].食品科学,2011,32(11):187-191.
- [9] 张雯,张盛贵.复合诱变选育出芽短梗霉菌高产菌株[J].中国酿造,2008(9):47-50.
- [10] 冯印,苏安祥.复合诱变选育霉多糖高产菌株[J].中国酿造,2011(8):84-86.
- [11] Kang J X, Chen X J, Chen W R, et al. Enhanced production of production in *Aureobasidium pullulans* by a new process of genome shuffling[J]. Process Biochemistry,2011(46):792-795.
- [12] Saha B C, Freer S N, Bothast R J. Production, purification and properties of a thermostable beta-Glucosidase from a Color Variant Strain of *Aureobasidium pullulans*[J]. Appl Environ Microbiol, 1994, 60(10):3774-3780.
- [13] Duan X H, Chi Z M, Wang L, et al. Influence of different sugars on pullulan production and activities of α -phosphoglucose mutase, UDPG-pyrophosphorylase and glucosyltransferase involved in pullulan synthesis in *Aureobasidium pullulans* Y68 [J]. Carbohydrate Polymers, 2008,73(4):587-593.
- [14] Duan X H, Chi Z M, Li H F, et al. High pulullan yield is related to low UDP-glucose level and high pulullan-related synthases activity in *Aureobasidium pullulans* Y68[J]. Annals of Microbiology, 2007,57(2):243-248.
- [15] 王长海,解联合,赵艾霞,等.短梗霉最佳培养条件研究[J].化工冶金,1994,1(1):59-66.
- [16] Yekta G, Pürlen U, Seval D. Optimization of pullulan production from hydrolysed potato starch waste by response surface methodology[J]. Carbohydrate Polymers, 2011(83):1330-1337.
- [17] S V N Vijayendra, Devendra B, M S. Prasad. Jaggery. A novel substrate for pullulan production by *Aureobasidium pullulans* CFR-77[J]. Process Biochemistry, 2001(37):359-364.
- [18] KR Sugumaran, E Gowthami, B Swathi, et al. Production of pullulan by *Aureobasidium pullulans* from Asian palm kernel:A novel substrate[J]. Carbohydrate Polymers, 2013(92):697-703.
- [19] 邵荣,余晓红,刘珊珊,等.利用麦芽根、淀粉废水高产普鲁兰多糖短梗霉菌株选育的研究[J].食品科学,2008,29(9):355-357.
- [20] 章佳佳.利用谷氨酸生产废液发酵生产普鲁兰多糖的研究进展[D].哈尔滨:黑龙江大学,2008.
- [21] Roukas T, Liakopoulou -Kyriakides M. Production of pullulan from beet molasses by *Aureobasidium pullulans* in a stirred tank fermentor[J]. Journal of Food Engineering, 1999(40):89-94.
- [22] Jiang L F, Wu S J, Jin Moon Kim. Effect of different nitrogen sources on activities of UDPG-pyrophosphorylase involved in pullulan synthesis and pullulan production by *Aureobasidium pullulans*[J]. Carbohydrate Polymers, 2011(86):1085-1088.
- [23] Cheng K C, Demirci A, Jeffrey M, et al. Effects of initial ammonium ion concentration on pullulan production by *Aureobasidium pullulans* and its modeling [J]. Journal of Food Engineering, 2011(103):115-122.
- [24] Wu S J, Chen H Q, Jin Z Y, et al. Effect of two-stage temperature on pullulan production by *Aureobasidium pullulans*[J]. World J Microbiol Biotechnol. 2010(26):737-741.
- [25] 付湘晋,童群义.短梗霉多糖的研究[J].食品研究与开发,2005,26(6):16-21.
- [26] 邵伟,刘世玲,唐明,等.霉多糖发酵及提取工艺条件研究[J].生物技术,2004,14(5):69-70.
- [27] 牛登飞,童群义.金属离子对短梗霉多糖发酵的影响[J].食品工业科技,2009(9):154-157.
- [28] 相茂功,朱希强,王凤山,等.普鲁兰多糖衍生物的制备及其应用[J].中国生化药物杂志,2009,30(2):144-146.
- [29] Feng Y Y, He Z M, Ong S L. Optimization of agitation,aeration and temperature conditions for maximum β -mannanase production [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2003(32):282-289.
- [30] 池振明,叶芳,赵双枝.高产酵母菌株(*Rhodotorula bacarum*)产普鲁兰多糖过程中搅拌和通气条件的优化[J].食品与发酵工业,2005(2):1-5.
- [31] 谢承佳,何冰芳,李霜.基因敲除技术及其在微生物代谢工程方面的应用[J].生物加工过程,2007,5(3):10-14.
- [32] Choudhury A R, Saluja P, Prasad G S. Pullulan production by an osmotolerant *Aureobasidium pullulans* RBF-4A3 isolated from flower of *Caesulia axillaris* [J]. Carbohydrate Polymers, 2011(83):1547-1552.
- [33] Chen J, Wu S J, Pan S K. Optimization of medium for pullulan production using a novel strain of *Aureobasidium pullulans* isolated from sea mud through response surface methodology[J]. Carbohydrate Polymers,2012(87):771-774.
- [34] Jiang L F. Optimization of fermentation conditions for pullulan production by *Aureobasidium pullulan* using response surface methodology[J]. Carbohydrate Polymers. 2010,79(2):414-417.
- [35] 陈刚新,谢红国,杨丰科.发酵工艺代谢调控[J].化学与生物工程,2005(5):9-11.
- [36] Thomas P. West. Pullulan production by *Aureobasidium pullulan* cells immobilized on ECTEOLA-cellulose[J]. Ann Microbiol, 2010 (60):763-766.