

## Studies on the *Pullulans* Polysaccharide Produced by Biostat<sup>®</sup> B Fermentor

Jinlong Ma<sup>1,2</sup>, Guobin Jiang<sup>3\*</sup>, Shanjing Yao<sup>2</sup>, Hua Jin<sup>3</sup>, Changhai Wang<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Life Science College, Dalian Nationalities University, Dalian

<sup>2</sup>Department of Chemical and Biological Engineering, Zhejiang University, Hangzhou

<sup>3</sup>Environment and Resources College, Dalian Nationalities University, Dalian

<sup>4</sup>Department of Biochemical Engineering, Nanjing Agricultural University, Nanjing  
Email: \*jgb@dlnu.edu.cn

Received: Dec. 5th, 2011; revised: Jan. 1st, 2012; accepted: Jan. 19th, 2012

**Abstract:** *Pullulans* polysaccharide, produced from *Aureobasidium pullulans*, is a kind of extracellular polysaccharide. In the current study, in order to change the permeability of cell membrane and solve the problem of linked group of fungi mycelium, the method adding tween-80 and different Ca<sup>2+</sup> resources was established. The utilized strain with relatively high polysaccharide yield and low pigment level was obtained after the rejuvenation and riddling of long-preserved *Aureobasidium pullulans* strain. The transformation ratio of polysaccharide was increased by 10% - 20% and the pigment content was greatly reduced. By adopting Biostat<sup>®</sup>B5L fermentor according to the optimum formula, and find the optimum aerate speed is 1.5 vvm, and the rate of circle is 500 rpm and culture temperature is 28°C ± 1.5°C, and initial pH is 6.5, so a high conversion rate of 65% (35 g/L polysaccharide yield) was obtained from the light colour medium. The fermenting liquor is between milk white and light yellow, and the white primary product can be gained without decoloration step.

**Keywords:** *Pullulans* Polysaccharide; Conditions of Fermentation; Biostat<sup>®</sup>B5L; Yield of Polysaccharide

## Biostat<sup>®</sup> B 发酵罐生产低色素短梗霉多糖的研究

马金龙<sup>1,2</sup>, 姜国斌<sup>3\*</sup>, 姚善泾<sup>2</sup>, 金 华<sup>3</sup>, 王长海<sup>4</sup>

<sup>1</sup>大连民族学院生命科学学院生物工程系, 大连

<sup>2</sup>浙江大学化学工程与生物工程学系, 杭州

<sup>3</sup>大连民族学院环境与资源学院, 大连

<sup>4</sup>南京农业大学, 南京

Email: \*jgb@dlnu.edu.cn

收稿日期: 2011年12月5日; 修回日期: 2012年1月1日; 录用日期: 2012年1月19日

**摘 要:** 所用菌株是从长期保存的出芽短梗霉菌种经复壮、筛选后得到的一株多糖产量相对高、色素水平相对低的菌株, 通过摇瓶发酵确定最佳培养条件, 并解决了短梗霉发酵的一些问题, 例如: 菌丝结团, pH 下降过快影响多糖的产量等, 使其多糖转化率提高了 10%~20%, 色素含量明显减少, 后通过 Biostat<sup>®</sup>B5L 发酵罐发酵培养, 确定了最适发酵条件, 通气量为 1.5 vvm, 转速为 500 rpm, 发酵液颜色在乳白到淡黄之间, 无需脱色处理, 即可得到白色粗糖产品, 多糖产量达到 35 g/L, 转化率达到 65% 左右, 较好的平衡了多糖量和色素量的关系。

**关键词:** 短梗霉多糖; 发酵条件; Biostat<sup>®</sup>B5L 发酵罐; 多糖产量

### 1. 引言

短梗霉多糖是由出芽短梗霉经次级代谢产生的

\*通讯作者。

一种胞外多糖, 出芽短梗霉又称出芽侧苗霉(*Aureobasidium pullulans* 或 *Pullularia pullulans*)属半知菌纲真菌, 是短梗霉属中唯一的一个种, 由于遗传上的不稳定性, 形成许多变种。其细胞形态多样化, 包括芽

生孢子、酵母状细胞、膨胀细胞、菌丝体、厚垣孢子和其他形态各异的中间细胞形态,其不同细胞形态具有不同的胞外多糖合成能力,研究表明酵母状细胞是产多糖能力最强的一种细胞形态<sup>[1]</sup>。短梗霉多糖具有极好的成膜性,无色、无味、抗油脂,且不透气,易生物降解,对人体和环境无毒无害等优点,受到国际上广泛关注,是一种极具研究潜力和经济价值的新型生物环保材料,可广泛用于食品包装材料,尤其在抗油脂、阻氧等特性方面优于其他材料。另一方面,短梗霉多糖是水溶性的,不被体内消化酶消化,是一种无危害的低热量食品配料,充分满足摄入热量限制的要求,如满足糖尿病人的需求。还有短梗霉多糖对食品中的高分子蛋白有特殊作用,可作为各种食品添加剂和黏合剂<sup>[2]</sup>。

目前,仅日本有少量工业化生产,因此研究如何工业化生产短梗霉多糖不仅有重要的经济效益,更具有消灭“白色污染”,坚持可持续发展的重要社会效益。出芽短梗霉在发酵过程中伴有深绿色和黑色的色素产生,对短梗霉多糖的提取和纯化造成困难,降低其品质,因此在发酵过程中要控制色素的产生,同时还要提高多糖的转化率,在实际研究过程中往往不能二者兼备<sup>[3]</sup>。我们知道在遗传水平上优化短梗霉多糖的生物合成代谢途径,阻断色素合成途径,是根本解决办法,但由于出芽短梗霉的生活史复杂,生理代谢及菌体形态变化的调控机理仍不清楚,因此通过优化营养源和发酵条件,调控出芽短梗霉的菌体生长和生理代谢过程,仍是获得高产短梗霉多糖的重要手段,已成为优化多糖生产工艺的研究热点<sup>[4]</sup>。本研究通过前期摇瓶发酵的实验基础,解决了真菌菌丝结团及发酵液 pH 降低过快的问题,优化了发酵条件,最后通过进行 Biostat®B5L 发酵罐发酵,找到最佳发酵条件,多糖转化率达到 65%左右,色素含量少,发酵液颜色为浅黄色,对短梗霉多糖发酵法的工业生产进行了有益探索。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 菌种

实验初始菌种来源于烟台大学,后经本课题组前期实验筛选得到的编号为 C714 的一支复壮活化后菌

种作为本实验研究菌株。

### 2.2. 培养基

#### 2.2.1. 固体培养基(g/L)

用于菌种斜面保存和平板筛选

蔗糖: 50.0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 0.2, 酵母膏: 3.0 琼脂粉: 15.0, 加 50% 豆芽汁 200 ml, 自然 pH(测试在 6.5 左右)。

#### 2.2.2. 种子培养基(g/L)

蔗糖: 50.0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 5.0, 酵母膏: 3.0, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O: 0.2, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 0.6 g, NaCl: 0.05 pH 为 6.0。

#### 2.2.3. 发酵培养基(g/L)

蔗糖: 50.0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 5.0, 酵母膏: 3.0, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O: 0.4, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 0.6, NaCl: 1.0, CaCO<sub>3</sub>: 0.5, 吐温-80: 2 ml pH 为 6.5。

### 2.3. 培养与筛选方法

#### 2.3.1. 平板筛选

采用平板筛选和液体发酵结合进行,经反复筛选确认其中 C714 菌株最理想,实验数据略。

#### 2.3.2. 种子制备

取 1 环新鲜斜面菌种接种于种子瓶(500 ml 锥型瓶,装液 50 ml), 29℃, 180 rpm, 摇床培养 36 小时。

#### 2.3.3. 发酵培养

取 90 ml 种子液接种于 5 L 发酵罐中,装液体积为 3 L, 发酵温度控制在 28℃ ± 1℃, 其他条件待定。

### 2.4. 分析方法

#### 2.4.1. 粗多糖制备

取 0.5 ml 发酵液, 10 倍稀释后离心(3500 rpm, 20 min)除菌体。取上清液 1 ml, 加 2 ml 无水乙醇, 摇匀静置后离心(同上)得到沉淀即为粗多糖。

#### 2.4.2. 菌体干重的测量

取 10 ml 发酵液, 离心后倒掉上清, 80℃ 烘干。

#### 2.4.3. 短梗霉多糖的测定

取 1 ml 经稀释的样品以蒽酮法测定。

多糖转化率

$$= \frac{\text{发酵液多糖产量(g/L)}}{\text{培养基中蔗糖含量(g/L)}} \times 100\%$$

#### 2.4.4. 总糖的测定

取发酵液离心除菌体后上清液 1 ml, 经稀释后以蒽酮法测定。

#### 2.4.5. 残糖的测定

1 ml 发酵液去除粗多糖后剩余液体, 经稀释后以蒽酮法测定。

#### 2.4.6. 粘度的测量

采用旋转式粘度计测量发酵液不同时期的粘度。

### 3. 结果与讨论

#### 3.1. 菌种的活化

长期保存的菌种会发生退化和变异, 菌种退化是发生在细胞群体中一个由量变到质变的逐渐演化过程。首先, 在细胞群体中出现个别发生负变的菌株, 这时如不及时发现并采取有效的措施, 而一味地移种传代, 则群体中这种负变个体的比例逐渐增大, 最后占据了优势, 整个群体发生严重的退化。所以, 开始时, 所谓“纯”的菌株, 实际上其中已包含着一定程度的不纯因素; 同样, 到了后来, 整个菌种虽已“退化”, 但也是不纯的, 即其中还会有少数尚未退化的个体存在。因此需要进行活化和复壮, 活化是将低温保藏的菌株通过缓慢升温 and 转接, 得到新鲜的菌株; 复壮则是将菌种中未发生退化和变异的菌株筛选出来, 或者说将发生有益变异的菌株筛选出来<sup>[5]</sup>。

在短梗霉菌株的固体培养基选择上, 采用三种固体培养基作比较(此三种固体培养基都为文献记载适合于霉菌培养)。培养方法: 从原始菌株斜面的最里面, 取一接种环菌种, 培养温度均为 29℃, 试管斜面培养,

结果如表 1。

由此可以看出, 短梗霉菌的固体培养基选择豆芽汁和马铃薯培养基(PDA 培养基)都可以, 综合考虑培养基颜色和菌落生长快慢程度, PDA 培养基颜色为乳白色, 而豆芽汁培养基为黄色, 且杂质比 PDA 培养基多, 因此选择马铃薯培养基(PDA 培养基)更合适。

#### 3.2. 摇瓶发酵条件的优化

先对每个培养基中的组成成分进行单因素实验, 以确定其最适区间, 之后通过考察一些特殊的添加物, 达到改善发酵性能, 其中用碳酸钙取代氯化钙, 对发酵液 pH 值起到一个缓冲作用, 提高了多糖的转化率, 而吐温-80 的运用更是解决了菌丝结团的问题, 进而使发酵液颜色变浅, 青霉素的运用没有明显效果。

试验中蔗糖、硫酸铵、酵母膏和磷酸氢二钾对短梗霉发酵都具有显著性影响, 通过方差分析和一系列的验证实验确定了短梗霉发酵的最适配比: 蔗糖(50.0 g/L)、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(5.0 g/L)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(0.6 g/L)、酵母膏(3.0 g/L)、CaCO<sub>3</sub>(0.5 g/L), 可使多糖转化率达到 70%, 发酵液中多糖浓度达到 35 g/L, 发酵液颜色接近淡乳黄色。

在发酵条件方面, 考察了初始 pH 值、种龄、接种量和装液量对短梗霉发酵产多糖的影响, 由结论可知, 最适初始 pH 值在 6.5, 种龄为 24 h, 接种量为 3%, 装液量为 300 ml 锥形瓶装 30 ml 发酵液(以上实验数据略)。

#### 3.3. 5L 发酵罐发酵培养

发酵技术在生物制药、饲料、酒精、酵母生产、酶类生产、蛋白质衍生物、碳水化合物、食品、活性

Table 1. Comparison of three kinds of solid culture medium

表 1. 三种固体培养基比较

	察式培养基	豆芽汁培养基	马铃薯培养基
配方	蔗糖: 30.0 g, NaNO <sub>3</sub> : 2.0 g, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> : 1.0 g, KCl: 0.5 g, MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O: 0.5 g, FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O: 0.01 g, 水 1000 ml, pH 7.0 - 7.5	葡萄糖: 25.0 g, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> : 0.1 g, 酵母膏: 1.5 g, 50%豆芽汁 100 ml, 水 500 ml	去皮马铃薯 100 g 煮沸处理, 蔗糖 10.0 g, 水 500 ml, 自然 pH
培养基颜色	白色	茶黄色	乳白色
培养时间	72 h 才出现菌落	48 h 开始出现	48 h 开始出现
菌落颜色	白色	白色	白色
菌落形态	菌落较小, 沿划线处生长	菌落中, 划线处粗	菌落较大, 布满

污泥处理等过程中应用非常广泛<sup>[6]</sup>。发酵过程所使用的容器称为发酵罐。Biostat®5L 发酵罐的罐体是用硬质化学玻璃制作, 适合观察, 而且高光洁度使得罐体更容易清洁, 减低了污染几率。一般发酵过程分为有氧发酵和无氧发酵, 短梗霉多糖发酵属于有氧发酵, 对搅拌条件的影响非常敏感, 发酵过程中的搅拌作用会涉及到气体分散、固液悬浮、传热和混匀等<sup>[7]</sup>。

按照上阶段实验取得的成果, 应用到发酵罐中, 选用条件通气量: 1.0 vvm; 转速: 300 rpm, 其中每隔 12 h 进行一次取样和记录数据, 所取样品均放置在灭菌后的样品瓶并于-20℃冷冻保存, 实验结束后统一进行多糖产量测定(注: 前期试验已验证, 样品冷冻保存一个月内测量结果没有明显改变, 此种多糖性状很稳定)。

在实验过程中会产生大量泡沫, 是发酵中的一个难题, 采用硅酮消泡剂, 可以取得较好效果, 实验过程中需要密切关注发酵液的变化, 及时补充消泡剂, 一般在发酵 24 h 后泡沫开始大量出现, 通气量和搅拌速度增大都会使泡沫大量产生, 因此需要适度控制。由之前实验结果得知, 菌体细胞数量在发酵过程中一直增加, 多糖从 24 h 后, 开始大量产生, 到 120 h 达到最大值, 残糖量从一开始就急剧下降, 达到最大多糖产量后开始趋于平缓, 发酵液粘度随着多糖的增加

也逐渐增加, 120 h 后开始下降, 这是短梗霉多糖酶降解短梗霉多糖所致, 但在后期又有一个回升, 可能是多糖的二次产生。但在此次实验中, 多糖产量仅为 23~24 g/L 左右, 产量低, 多次发酵结果都基本相同, 远没有达到摇瓶发酵的结果。出芽短梗霉菌在发酵生产多糖时, 对溶氧的需求很高, 但当多糖产量增加时, 发酵液粘稠度极高, 达到 0.9 Pa.S 以上, 溶氧迅速下降接近 0, 基本测不到溶氧的数据, 因此通气量和搅拌速度不够会导致产量偏低<sup>[8,9]</sup>。因此, 采用最大通气量和搅拌条件如下, 进行下一步实验。选用条件通气量: 1.5 vvm; 转速: 500 rpm 的实验结果见表 2 和图 1, 从图 1 可以看出发酵时间 120 h, 多糖产品浓度最大时发酵液粘度最大, 之后多糖浓度缓慢下降, 菌体质量增加速度加快, 发酵过程中发酵液的 pH 变化如图 2, 前 36 h, 发酵液 pH 值急剧降低, 之后缓慢回升, 这与前期摇瓶发酵研究结果一致, 只有这样的 pH 变化过程, 多糖才可以高产, 出芽短梗霉指数生长期, 整体发酵液 pH 值下降且呈现酸性, 但在成熟期 pH 的缓慢回升有助于多糖的生产, 前期试验研究发现此时通过人为改变 pH 值变化趋势, 并不能提高多糖产量, 反而起到反效果。所以试验证明在发酵液用碳酸钙取代氯化钙, 对发酵液 pH 值起到一个缓冲作用, 提高了多糖转化率。

Table 2. Parameters and experiment result of 5L fermentor  
表 2. 5L 发酵罐发酵参数和实验指标

序号	时间	pH	温度	瓶重(g)	总重(g)	菌体重(g/L)	粘度(Pa.S)
1	0 h	6.70	28.0	3.3690	3.3693	0.03	0.143
2	12 h	5.93	29.5	3.3642	3.3653	0.11	0.156
3	24 h	4.41	29.0	3.3721	3.3735	0.14	0.187
4	36 h	3.50	29.7	3.3678	3.3700	0.22	0.212
5	48 h	3.48	29.2	3.3740	3.3762	0.22	0.272
6	60 h	3.53	28.7	3.3735	3.3761	0.26	0.372
7	72 h	3.62	28.4	3.3674	3.3701	0.27	0.514
8	84 h	3.78	28.5	3.3684	3.3714	0.30	0.628
9	96 h	3.94	28.3	3.3578	3.3613	0.35	0.748
10	108 h	4.08	28.1	3.3649	3.3691	0.42	0.907
11	120 h	4.22	28.4	3.3616	3.3656	0.40	0.493
12	132 h	4.25	29.0	3.3691	3.3741	0.50	0.685
13	144 h	4.52	29.2	3.3708	3.3756	0.54	0.764
14	156 h	4.70	29.5	3.3515	3.3572	0.57	0.868
15	168 h	4.87	28.7	3.3682	3.3738	0.56	0.799

粘度测量: 1~10 号, 转速 V6, 1 号转子; 11~15 号, 转速 V12, 2 号转子。

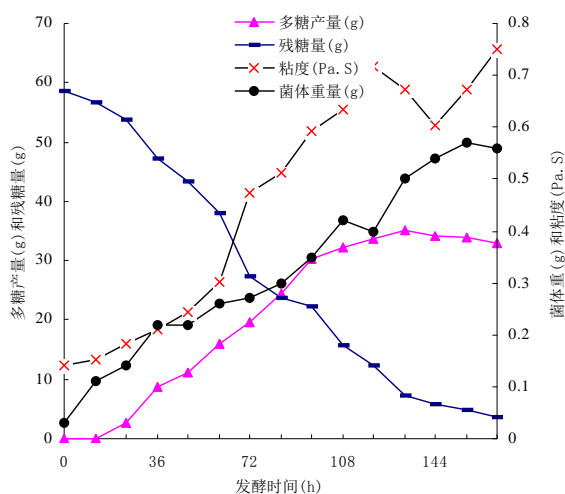


Figure 1. Pullulan fermentation in 5L auto-controlling fermentor  
图 1. 5L 发酵罐中短梗霉多糖的发酵过程

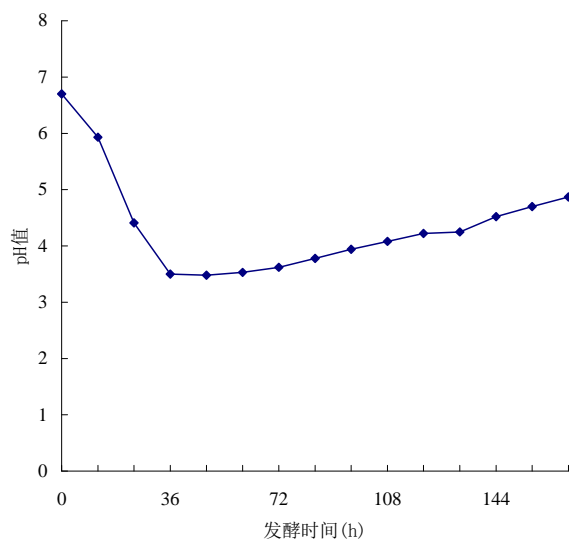


Figure 2. The variation of pH in 5L fermentor  
图 2. 5L 发酵中 pH 的变化

由实验结果可以看出, 多糖产量可以达到 35 g/L 左右, 接近摇瓶的产量, 有一定差距, 但是发酵罐的通气量和搅拌速度不能再增加, 一方面泡沫控制有难度, 需要改进发酵罐的类型, 加大通气量和搅拌速度进行继续实验, 另一方面, 发酵液粘度极大, 基本呈现半固体状态, 搅拌动力不足, 此种发酵罐不能满足要求。从图中还可以看出, 残糖量减少很快, 几乎充分利用了底物中的还原糖, 到 144 h 之后, 菌体干重开始缓慢减少, 说明菌体开始自溶, 同时粘度有二次增加, 多糖也有增加, 根据前人文献推断可能是菌体自溶导致菌体内的多糖随之释放到发酵液当中<sup>[10,11]</sup>,

其他实验现象同上。

## 4. 讨论

CaCO<sub>3</sub> 取代 CaCl<sub>2</sub> 提高了多糖产量, 初步认为是碳酸根离子对发酵液 pH 的缓冲作用, 并且可以缓慢释放钙离子, 起到很好的提供钙缘并同时微调发酵液 pH 值的作用, 所以单纯用钙离子并没有达到相同效果, 在前期试验中也试图在发酵过程中人为改变发酵液 pH 值包括采用恒定 pH 值和和在初期 pH 值迅速降低时增加 pH, 但并不会提高产量, 相反调节不当会导致产量明显降低。吐温-80 的使用, 避免了菌丝结团, 对产量的提高不是很明显, 但在达到最高多糖产量时的色素产量明显减少, 发酵液颜色浅, 后续提纯无须脱色步骤, 这一点尤其在大规模生产和实际应用中有重要意义。通过 5L 发酵罐发酵, 取得了较好的结果。实现了提高多糖产量的同时降低色素水平, 对今后的工业生产有一定的借鉴意义。

## 参考文献 (References)

- [1] B. S. Campbell, A.-B. M. Siddique, B. M. McDougal, et al. Which morphological forms of the fungus *Aureobasidium pullulans* responsible for pullulan production? *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 232(2): 225-228.
- [2] 张剑波, 时春娟, 付杰. 茁霉多糖生物合成的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(6): 1041-1047.
- [3] 付湘晋, 童群义, 于航. 低色素出芽短梗霉菌株的诱变筛选[J]. 工业微生物, 2006, 36(3): 24-31.
- [4] 张盛贵, 张雯, 韩丽. 产茁霉多糖菌株的筛选和初步发酵[J]. 食品科技, 2008, 8: 1-5.
- [5] 朱一晖, 张丽敏, 詹晓北. 出芽短梗霉产色素能力弱化菌株的筛选[J]. 无锡轻工大学学报, 2003, 22(1): 16-20.
- [6] D. Hamendra, K. Kachhawa, P. Bhattacharjee, et al. Studies on downstream processing of pullulan. *Carbohydrate Polymers*, 2003, 52: 25-28.
- [7] 王长海, 宋振响, 王新力等. 短梗霉多糖 30 立升发酵罐发酵研究[J]. 烟台大学学报(自然科学与工程版), 1993, 2: 35-38.
- [8] B. S. Campbell, M. B. McDougal and R. J. Seviour. Why do exopolysaccharide yields from the fungus *Aureobasidium pullulans* fall during batch culture fermentation? *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, 33(1): 104-112.
- [9] P. A. Gibbs, R. J. Seviour. Does the agitation rate and/or oxygen saturation influence exopolysaccharide production by *Aureobasidium pullulans* in batch? *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1996, 46: 503-510.
- [10] M. Reeslev, B. B. Jorgensen, et al. Exopolysaccharide production and morphology of *Aureobasidium pullulans* grown in continuous cultivation with varying ammonium-glucose ratio in the growth medium. *Journal of Biotechnology*, 1996, 51(2): 131-135.
- [11] A. Lazaridou. Characterization of pullulan produced from beet molasses by *Aureobasidium pullulans* in a stirred tank reactor under varying agitation. *Enzyme on Microbial Technology*, 2002, 31: 122-132.