无机氮源对出芽短梗霉发酵普鲁兰多糖分子量的影响

安超，马赛箭，薛文娇，上官亦卿，丁浩
（陕西省微生物研究所，陕西西安 710043）

摘要：以出芽短梗霉（*Aureobasidium pullulans*）CGMCC No.11062 为出发菌株，研究五种无机氮源对普鲁兰多糖产量、结构、纯度及分子量的影响。结果表明：无机氮源种类对普鲁兰多糖产量和分子量产生显著影响，未影响普鲁兰多糖结构和纯度。其中，以硫酸铵（1.5 g/L）为唯一氮源时普鲁兰多糖产量达到 32.84 g/L，重均分子量（Weight-average Molecular Weight，Mw）最大，为 799823 ku。硫酸铵浓度对普鲁兰多糖的产量和分子量影响显著，而未显著影响普鲁兰多糖结构。随着硫酸铵浓度的增加，普鲁兰多糖产量和分子量同时增加；当硫酸铵浓度为 1.5 g/L 时，普鲁兰多糖的产量出现最大值，为 32.45 g/L；而当硫酸铵浓度为 2.1 g/L，普鲁兰多糖重均分子量（Mw）最大，达到 1236958 ku。所有制得的普鲁兰多糖纯度在 95%~99%之间。这些研究可为不同分子量普鲁兰多糖生产提供技术指导。

关键词：出芽短梗霉；普鲁兰多糖；分子量；无机氮源；重均分子量
文章篇号：1673-9078(2017)5-213-219 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.5.034

Effects of Inorganic Nitrogen Sources on the Molecular Weight of Pullulan Produced by *Aureobasidium pullulans*

AN Chao, MA Sai-jian, XUE Wen-jiao, SHANGGUAN Yi-qing, DING Hao
(Microbiology Institute of Shanxi, Xi'an 710043, China)

Abstract: The effects of five types of inorganic nitrogen sources on the yield, structure, purity, and molecular weight of pullulan were studied using *Aureobasidium pullulans* CGMCC No. 11062 as the parental strain. The results showed that the yield and molecular weight of pullulan were significantly influenced by the types of inorganic nitrogen source, whereas the structure and purity of pullulan were not affected. When ammonium sulfate (1.5 g/L) was used as the sole nitrogen source, the yield of pullulan was 32.84 g/L, and the maximum weight-average molecular weight (Mw) of pullulan (799823 ku) was obtained. Furthermore, the yield and molecular weight of pullulan were significantly influenced by the concentration of ammonium sulfate, which did not significantly affect the structure of pullulan. With increasing concentration of ammonium sulfate, the yield and molecular weight of pullulan increased simultaneously. The maximum yield of pullulan (32.45 g/L) was reached at 1.5 g/L ammonium sulfate, and the peak Mw of pullulan (1236058 ku) was obtained at 2.1 g/L ammonium sulfate. The purity of pullulan produced from all experiments was between 95% and 99%. These studies could provide technical guidance for the production of pullulan with different molecular weights.

Key words: *Aureobasidium pullulans*; pullulan; molecular weight; inorganic nitrogen sources; weight-average molecular weight

普鲁兰多糖是由出芽短梗霉（*Aureobasidium pullulans*）发酵产生的细胞外纯天然高分子多糖，它是一种无味、无嗅、无毒、可食用的天然碳水化合物，呈非结晶不定型粉末，具有极好的成膜性、成纤维性、阻氧性、可塑性、粘结性和易自然降解等独特的理化和生物学特性，对人体无任何副作用。并且，普鲁兰多糖的水溶液其黏度、特性几乎不受 pH、盐类、酶的影响，因此被广泛应用于医药制造（胶囊和药物载体）、食品包装、水果和海产品保鲜、化妆品、烟草制造、和农业种子保护等领域，是一种有极大开发价值和前景的多功能新型生物制品[1]。普鲁兰多糖的发酵已经被研究很多年了，先前的研究主要集中在发酵培养基

收稿日期：2016-05-20
基金项目：国家自然科学基金面上项目（21576160）；中国科学院“西部之光”人才培养计划项目（2013DF01）；陕西省科学院科技计划重点项目（2014K-01）；陕西省自然科学基金项目（2014JM2-2015）
作者简介：安超（1985-），男，助理研究员，在职研究生，主要从事微生物发酵技术的研究
通讯作者：薛文娇（1976-），女，博士，副研究员，主要从事微生物代谢产物资源的研究

及培养条件的优化上，主要目标是提高普兰多糖的产量[2,3]。然而，近年来，普鲁兰多糖在药物载体、药物控释、生物材料（如水凝胶和人工骨）等方面被广泛研究并应用[4,5]。这些领域的开发将直接提升普鲁兰多糖的价值，但同时也对普鲁兰多糖的生产也提出了新的要求，如纯度、结构及分子量分布等等。

普鲁兰多糖的分子量决定了普鲁兰多糖的应用范围及医用价值，高分子量的普鲁兰多糖更适用于商业用途。但是，针对不同的方向，对于普鲁兰多糖的要求不同，特别是对分子量及其分布的要求。例如，作为生物材料及组织工程而言，要求高分子量普鲁兰多糖且分布相对均一；作为血浆代用品则需要分子量低的普鲁兰多糖（大概 60 u 左右）且要求其分子量分布范围相对窄，因为高分子量的普鲁兰多糖可能产生高的静脉压；作为一般的食品添加剂，中等分子量的普鲁兰多糖就能满足需求。因此，不同分子量级别的普鲁兰多糖的制备能够更好地满足普鲁兰多糖应用要求，增加产品的附加值，同时，也满足不同分子量普鲁兰多糖的科学研究与市场需求。

发酵过程调控是控制微生物多糖分子量分布重要途径。Wiley 和 Lin 等[6]人研究了碳源、氮源和磷酸盐对普鲁兰多糖分子量分布的影响，其中氮源是影响分子量的最大因素，特别是铵盐对普鲁兰多糖合成具有显著的影响，且铵离子被证实比硝酸根离子更有利于生产高分子量的普鲁兰多糖。本文选用低色素出芽短梗霉 CGMCC No. 11602 为目标菌株，系统地研究了五种不同无机氮源及不同浓度硫酸铵对普鲁兰多糖产量、纯度、结构及分子量的影响，为不同大小分子量的普鲁兰多糖生产制备提供技术指导。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

出芽短梗霉（*A. pullulans*）CGMCC No.11062，由本课题组选育获得，20%甘油管于-80 ℃超低温冰箱冻存，现作为专利菌株保藏于中国微生物菌种保藏中心。

活化培养基：马铃薯去皮去芽眼、洗净、切块，称 200 g 放入 1000 mL 蒸馏水中用文火煮沸 30 min，双层纱布过滤，滤液加水补至 1000 mL，加 20 g 蔗糖，15 g 琼脂粉，121 ℃，20 min 灭菌。

种子培养基：葡萄糖 50.0 g/L，$MgSO_4·7H_2O$ 0.2 g/L，K_2HPO_4 5.0 g/L，酵母粉 1.7 g/L，$(NH_4)_2SO_4$ 0.6 g/L，NaCl 1.0 g/L，初始 pH 6.5，113~116 ℃，20 min 灭菌。

基础发酵培养基：蔗糖 50 g/L，$MgSO_4·7H_2O$ 0.2 g/L，K_2HPO_4 5.0 g/L，NaCl 1.0 g/L。不同种类无机氮源研究以发酵培养基中 1.5 g/L $(NH_4)_2SO_4$ 所含氮元素为基准，计算培养基中其他四种无机氮源的含量（0.91 g/L，NH_4NO_3；1.773 g/L，$(NH_4)_2CO_3$；1.217 g/L，NH_4Cl；1.932 g/L，$NaNO_3$）不同硫酸铵浓度：（0.6 g/L、0.9 g/L、1.2 g/L、1.5 g/L、1.8 g/L、2.1 g/L）。初始 pH 6.5，113~116 ℃，20 min 灭菌。

标准品：普鲁兰酶 P1067-250U（Sigma），普鲁兰多糖标准品 P4516-25G（Sigma），不同分子量普鲁兰多糖标准品（峰位分子量（Peak Position Molecular Weight，Mp）范围 9600~2560000 ku，96351-1KT，05287-25MG，04661-25MG，Sigma）。

1.2 仪器与设备

BSA224S 万分之一天平（Sartorious），UB-7 型 pH 测定仪（Sartorious），5804R 离心机（eppendorf），SW-CJ-2FD 超净工作台（苏净安泰生物科技有限公司），HUA-85 型灭菌锅（HIRAYAMA），恒温培养箱 SPX-250(北京科伟永兴仪器有限公司)，ZHWY-2012 型恒温摇床（上海智诚科技有限公司），傅立叶变换红外光谱仪 Nicolet IS 50（Thermo Scientific），高效液相色谱仪(Waters 1515)，示差检测器（Waters 2414），凝胶色谱柱（UltrahydrogelTM Linear 7.8×300 mm column），预柱（Ultrahyfrogel TM 6×40 mm Guard Column）。

1.3 方法

1.3.1 菌种活化与发酵培养

活化培养方法：将菌种在 28 ℃恒温培养箱培养 5 d；种子培养方法：将活化好的菌株接种在装有 50 mL 种子培养液的 250 mL 三角瓶中，置于恒温摇床上（230 r/min），28 ℃条件下培养 48 h，即为种子液；发酵培养方法：按照 5%接种量将种子接种到装有 20%培养液的三角瓶中，置于恒温摇床上（230 r/min），28 ℃条件下培养 96 h。

1.3.2 菌体生物量

将发酵液 30 mL 装入 50 mL 离心管中，8000 r/min，离心 10 min，取沉淀于 105 ℃干燥至恒重，生物量计算公式如下：

生物量(g/L)=($M_{实重}$-$M_{空重}$)×1000/30

1.3.3 普鲁兰多糖产量

取上清液 15 mL 加入 2 倍体积的 95%乙醇，4 ℃静置 12 h，8000 r/min 离心 10 min，收集沉淀，加水重溶，再次加入 2 倍体积 95%乙醇进行沉淀，将沉淀

于 80 ℃烘至恒重，精确称重，多糖含量计算公式如下：

多糖含量(g/L)=(M 实重-M 空重)×1000/15

1.3.4 残糖含量

苯酚硫酸法。

1.3.5 结构测定

应用傅里叶变换衰减全反射红外光谱法(ATR-FTIR)直接测定制备获得的普鲁兰多糖粉末[7]。

1.3.6 纯度测定

将普鲁兰多糖标准品配制成 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 g/L 的水溶液，利用普鲁兰酶降解普鲁兰多糖，然后 DNS 法测定酶解产物的含量，绘制标准曲线。待测样品配制成 1.0 g/L 水溶液，待测样品与标准曲线相同的处理，从而计算普鲁兰多糖的纯度[8]。

1.3.7 分子量测定

利用高效液相色谱法(GPC)测定普鲁兰多糖分子量分布范围。以 0.1 M $NaNO_3$ 作为流动相，流速 0.5 mL/mim，柱温 35 ℃，样品浓度 1 g/L，进样量 20 μL，数据处理使用 Waters 自带的 Breeze 软件积分获得[9]。

1.3.8 数据统计分析

试验结果数据采用 Origin Pro 8 软件进行统计、分析并制图，试验测定三组平行。

2 结果与讨论

2.1 无机氮源种类对出芽短梗霉发酵普鲁兰多糖的影响

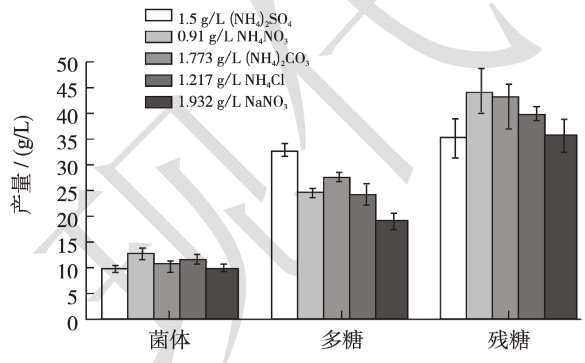


图 1 无机氮源种类对菌体、普鲁兰多糖产量及残糖含量的影响

Fig.1 Effects of the types of inorganic nitrogen sources on the yields of biomass and pullulan, and the content of residual sugars

无机氮源种类对出芽短梗霉发酵生产普鲁兰多糖的影响如图 1 所示。由图 1 可以看出，无机氮源的种类对普鲁兰多糖产量及底物转化率影响显著，而对菌体浓度影响不显著。其中，在以 1.5 g/L 硫酸铵为底物发酵时，普鲁兰多糖的产量最高，达到了 32.84 g/L，其他依次分别为碳酸铵 27.49 g/L、硝酸铵 24.5 g/L、氯化铵 24.27 g/L、硝酸钠 22.05 g/L；同时，残糖含量由小到大依次为硫酸铵 35.35 g/L、硝酸钠 38.57 g/L、氯化铵 39.94 g/L、硝酸铵 43.21 g/L、碳酸铵 44.38 g/L。结果表明，硫酸铵作为氮源更有利于出芽短梗霉利用碳源，促进普鲁兰多糖的合成。同时，我们的研究也进一步证明 NH_4^+比 NO_3^-更有利于普鲁兰多糖的合成[10]。卢辉官等学者研究表明，氮源种类及浓度通过影响出芽短梗霉的形态进而影响普鲁兰多糖的合成[11]。

2.2 无机氮源种类对普鲁兰多糖结构的影响

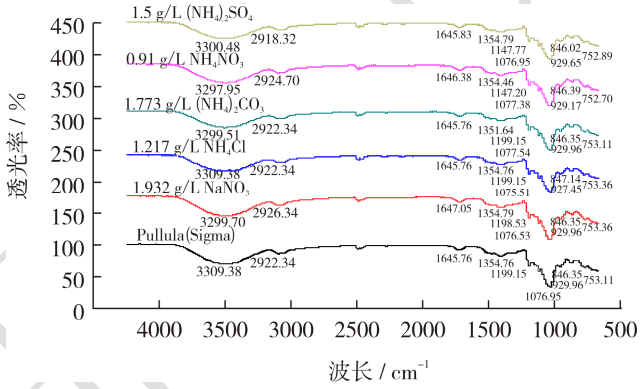


图 2 无机氮源种类对普鲁兰多糖结构的影响

Fig.2 FT-IR spectra of pullulan produced with different inorganic nitrogen sources

目前研究多糖结构的方法有很多种，如紫外光谱、红外光谱、核磁共振波谱、气相色谱-质谱联用以及多糖的分子修饰等。其中，红外光谱成为糖结构研究的重要手段之一。红外色谱分析的结果见图 2 所示，含不同种类无机氮源的培养液发酵合成的普鲁兰多糖样品具有明显的多糖特征吸收峰，与普鲁兰多糖标准品具有一致的红外吸收。普鲁兰多糖在 4000~400 cm^{-1} 范围内大致可分为：3600~3200 cm^{-1} 出现一宽峰，是糖类存在的分子间或分子内的 O-H 伸缩振动产生的；3000~2800 cm^{-1} 存在吸收较弱的 C-H 的伸缩震动吸收峰；此两组吸收峰是糖类的特征峰。1400~1200 cm^{-1} 的吸收峰是由两个 C-O 伸缩振动产生，其中一个属于 C-O-H，另一个是糖环 C-O-C；1000~700 cm^{-1} 包含着糖类特征吸收峰，主要表现为糖的吡喃环的振动谱[12]。因此，我们得出结论：无机氮源种类对普鲁兰多糖的结构未产生显著性影响，产物为单一的普鲁兰多糖，有利于工业化生产。然而，据报道有些出芽短梗霉菌株在发酵过程中可能合成多种聚合物，例如胡丹等人的研究证明，出芽短梗霉 *Aureobasidium pullulans* IFO6353 在发酵过程中同时产生聚苹果酸 Poly（*β*-L-

malic acid）（PMLA）和普鲁兰多糖[13]。

2.3 无机氮源种类对普鲁兰多糖纯度的影响

表 1 无机氮源种类对普鲁兰多糖纯度的影响

Table 1 Effect of inorganic nitrogen sources on pullulan purity

	硫酸铵	硝酸铵	碳酸铵	氯化铵	硝酸钠
纯度/%	98.43	97.38	98.16	95.35	96.54

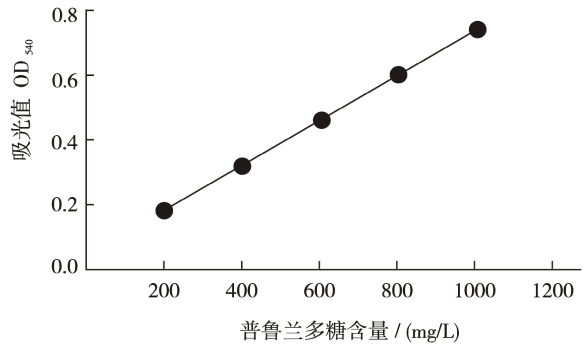


图 3 不同浓度普鲁兰多糖标准品酶解产物测定标准曲线

Fig.3 Standard curve of enzymatic hydrolysates of pullulan standards

本研究中利用 DNS 法测定不同浓度普鲁兰多糖标准品酶解产物的还原糖，绘制标准曲线，结果如图 3 所示，在普鲁兰多糖标准品浓度 200~1000 mg/L 的范围内，其测定标准曲线的回归方程为 Y=0.0008X+0.0386，R^2=0.9951，具有很好的相关性。本研究中，不同无机氮源对普鲁兰多糖纯度的影响结果如表 1 所示，普鲁兰多糖的纯度在 95%~99%之间，纯度较高，这可能与本研究使用的菌株有关。另外，本研究中选用蔗糖为底物、无机氮源，且未使用有机氮源，因而杂质较少，避免有机氮源中大分子物质对普鲁兰多糖纯度的影响；同时，采用摇瓶发酵方式、避免了搅拌式发酵罐机械搅拌造成的细胞破碎，发酵周期比较短，出芽短梗霉细胞活力较高，自溶不明显，离心效果好，上清液中胞内蛋白、细胞碎片等大分子残留比较少，从而获得的普鲁兰多糖纯度较高。West 和 Strohfu 利用琼脂和藻酸钙珠固定化出芽短梗霉细胞发酵生产普鲁兰多糖，结果产生的普鲁兰多糖纯度只有 36%。可能是由于这些材料相对较小的孔径阻碍了大分子普鲁兰多糖的释放[14]。于航通过研究最终获得普鲁兰多糖的产量约为 20 g/L，提取得率为 89.2%，最终产品纯度为 95.2%。Cheng 等人研究表明：75 g/L 蔗糖，3 g/L 酵母粉和 5 g/L 的硫酸铵组合下，普鲁兰多糖的产量最高，培养 7 d 后，收获 25.8 g/L 的普鲁兰多糖，纯度达到 94.5%[15]。刘娜等研究了脱色和干燥方式对普鲁兰多糖品质的影响，结果表明选用 ZY-24×48-B 型活性炭，添加量为 1.0%（*m/V*）、pH 5.0，时间 40 min，温度 40 ℃，此时脱色率为 94.98%，多糖得率为 91.24%，通过喷雾干燥，所得样品纯度为 91.07%。王长海等在实验室制备的短梗霉多糖纯度为 96.8%[16]，与本实验结果相接近。

2.4 无机氮源种类对普鲁兰多糖分子量的影响

表 2 不同分子量普鲁兰多糖标准曲线测定

Table 2 Standard curve of pullulan samples with different molecular weights

序号	洗脱体积/mL	保留时间/min	重均分子量/ku	Log Mw
1	7.037	14.074	2350000	6.371068
2	7.220	14.440	1220000	6.086360
3	7.486	14.927	642000	5.807535
4	8.085	16.170	194000	5.287802
5	8.375	16.75	107000	5.029384
6	8.822	17.644	47000	4.673021
7	9.184	18.368	21100	4.324282
8	9.501	19.002	9600	3.982271

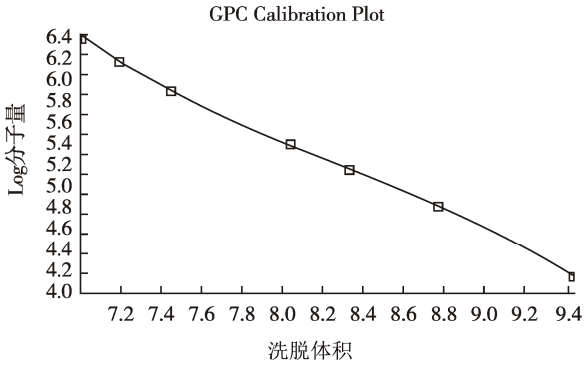


图 4 不同分子量普鲁兰多糖标品标准曲线测定

Fig.4 Standard curve of pullulan standards with different molecular weights

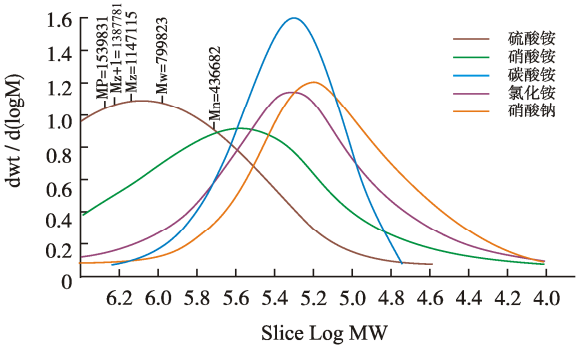


图 5 无机氮源种类对普鲁兰多糖分子量的影响

Fig.5 Standard curve of pullulan standards with different molecular weights

本研究中选用 Sigma 普鲁兰多糖分子量标准品，

使用 Waters 1515-2414（示差检测器）检测平台，获得了普鲁兰多糖分子量的标准曲线，具体数据如表 2 和图 4 所示。由表 2 可以看出，分子量越大，出峰时间越早；由图 4 可以看出，普鲁兰多糖的重均分子量在 9600~2350000 ku 范围内，GPC 测定时具有很好的线性关系，R^2 为 0.999。通过 GPC 测定不同无机氮源条件下的普鲁兰多糖分子量大小，如图 5 所示，生成的普鲁兰多糖分子量由大到小依次为：硫酸铵>硝酸铵>碳酸铵>氯化铵>硝酸钠。通过 Waters GPC 自带的 Breeze 软件，依据普鲁兰多糖分子量标准生成标准曲线，进而对不同无机氮源制备的普鲁兰多糖的分子量积分计算，具体参数见表 3 所示，其中 1.5 g/L 硫酸铵为有机氮源生产的普鲁兰多糖分子量最大，重均分子量 Mw 为 799823 ku，而以 1.932 g/L 硝酸钠为无机氮源生产的普鲁兰多糖分子量最低，重均分子量 Mw 为 165818 ku，由此可见，无机氮源的种类对普鲁兰多糖的分子量影响很大。

相比于右旋糖酐和透明质酸，国内关于普鲁兰多糖分子量发酵调控的研究偏少，特别是针对高分子量普鲁兰多糖的研究。Wiley 等人通过对出芽短梗霉 *Aureobasidium pullulans* NRRL-Y 6220 发酵过程中的碳源、氮源、磷酸盐种类和浓度、发酵和提取过程进行优化，获得了 1.0×10^5~4.0×10^6 ku 之间分子量的普鲁兰多糖[17]；Sugumaran 等人使用菠萝蜜种子作为廉价的底物，通过响应面优化培养基组成，最大的普鲁兰多糖产量为 34.22 g/L，获得的普鲁兰多糖的平均分子量为 1733000 ku[18]；Seo 等人优化了以出芽短梗霉 *A.pullulans* HP-2001 为出发菌株，豆渣和酵母提取物组成对普鲁兰多糖合成的影响，获得了 1.32×10^6~5.66×10^6 ku 之间分子量的普鲁兰多糖[19]。

表 3 无机氮源种类对普鲁兰多糖分子量分布的影响

Table 3 Effect of the type of inorganic nitrogen source on the molecular weight distribution of pullulan

无机氮源/(g/L)	保留时间/min	Mn/ku	Mw/ku	Mp	Mz+1/ku	多分散性	Mz/Mw	Mz+1/Mw
NH_4Cl (1.217)	16.253	164830	229130	182840	474640	1.390133	1.45029	2.701456
$NaNO_3$ (1.932)	16.450	79590	161850	152650	613110	2.033459	1.97076	3.787976
$(NH_4)_2CO_3$ (1.773)	16.150	105150	250520	201370	910920	2.382415	2.10741	3.636025
NH_4NO_3 (0.91)	15.300	180110	493710	498290	1238110	2.741042	1.83543	2.507779
$(NH_4)_2SO_4$ (1.5)	14.500	436680	799820	1539830	1387780	1.831593	1.43421	1.735110

注：Mn 表示数据分子量（Number-average Molecular Weight）；Mw 表示重均分子量（Weight-average Molecular Weight）；Mp 表示峰位分子量（Peak position Molecular Weight）。

2.5 硫酸铵浓度对出芽短梗霉发酵普鲁兰多糖的影响

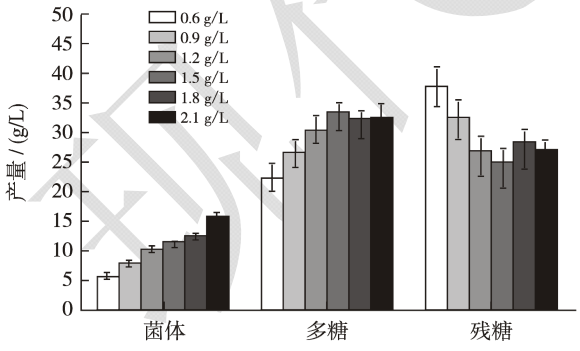


图 6 硫酸铵浓度对普鲁兰发酵的影响

Fig.6 Effects of the concentration of ammonium sulfate on the yields of biomass and pullulan, and the content of residual sugars

不同硫酸铵浓度对普鲁兰多糖发酵的影响如图 6 所示。由图 6 我们可以看出，硫酸铵浓度对菌体、普鲁兰多糖产量影响显著。其中，在硫酸铵浓度为 0.6 g/L 时，菌体产量 6.18 g/L，普鲁兰多糖产量 22.35 g/L，残糖含量 37.79 g/L。随着硫酸铵浓度的增加，菌体含量和普鲁兰多糖产量逐渐升高，同时，残糖含量减少。特别是当硫酸铵浓度为 1.5 g/L 时，普鲁兰多糖的产量出现最大峰值，达到了 32.45 g/L。而当硫酸铵浓度超过 1.5 g/L，多糖含量逐渐降低，根据文献报道，过多氮源供给会促使碳源流向生物体自身而非胞外多糖[20]。

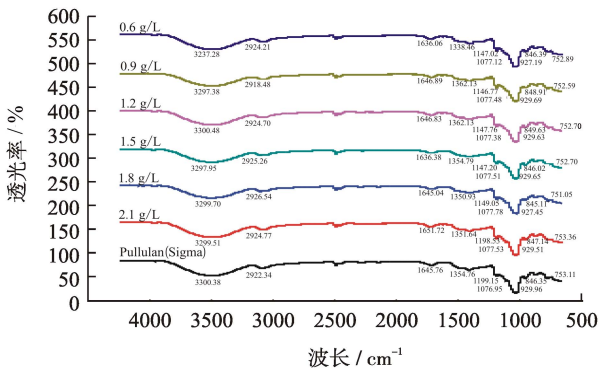


图 7 普鲁兰多糖的红外光谱曲线

Fig.7 IR spectra of pullulan

Cheng 等人研究了初始硫酸铵浓度对出芽短梗霉

发酵生产普鲁兰多糖的影响，结果表明：当初始硫酸铵的浓度为 5 g/L 时，普鲁兰多糖的产量最高，为 23.1 g/L，此时，获得的普鲁兰多糖的纯度为 94.6%，当硫酸铵的浓度为 7 g/L 时，生物量显著增加，同时，在发酵的后期，发酵液中有普鲁兰多糖降解酶的产生，从而导致普鲁兰多糖产量下降[21]。

2.6 硫酸铵浓度对普鲁兰多糖结构的影响

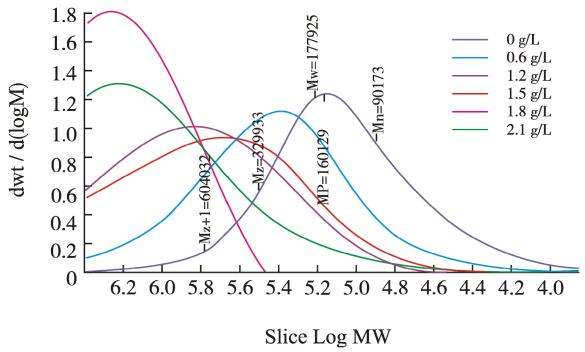


图 8 硫酸铵浓度对普鲁兰多糖分子量大小的影响

Fig.8 Effects of ammonium sulfate concentrations on the molecular weight of pullulan

不同硫酸铵浓度制备的普鲁兰多糖的红外色谱分析结果见图 7 所示，含不同浓度硫酸铵的培养液发酵合成的普鲁兰多糖样品具有明显的多糖特征吸收峰，与普鲁兰多糖标准品具有一致的红外吸收。因此，我们得出结论：硫酸铵浓度对普鲁兰多糖的组成未产生显著性影响。

2.7 硫酸铵浓度对普鲁兰多糖分子量的影响

通过 GPC 测定不同浓度硫酸铵条件下的普鲁兰多糖分子量大小，如图 8 所示，普鲁兰多糖的分子量随着硫酸铵浓度的增加而增大，具体参数见表 4 所示。由表 4 可以看出，随着硫酸铵浓度的增加，重均分子量 Mw 从 177925 ku 增加到 11236958 ku。Campbell 等人发现在碳源被消耗完后且发酵液中仍然有很高的氮源浓度下，会诱导普鲁兰多糖降解酶的产生，并导致普鲁兰多糖分子量及产量的降低[22]。在本研究中，我们使用高浓度的碳氮比，由实验结果 2.5 可知，在发酵结束时，发酵液中含有大量残糖剩余，减少普鲁兰酶的产生。一般而言，微生物多糖的分子量分布受菌株差异、培养基组分、发酵过程调控以及分离纯化等因素的影响，其中分离纯化是定向获得不同规格分子量多糖最有效的办法，但是相比于发酵条件控制，通过分离纯化制备不同分子量多糖，不仅会引入其他物质，影响纯度，而且成本偏高。因此，通过发酵条件控制是生产制备不同分子量多糖经济可行的手段。

表 4 有机氮源种类对普鲁兰多糖分子量分布的影响

Table 4 Effect of ammonium sulfate concentrations on the molecular weight distribution of pullulan

硫酸铵浓度/(g/L)	保留时间/min	Mn/ku	Mw/ku	Mp	Mz+1/ku	多分散度	Mz/Mw	Mz+1/Mw
0.6	16.325	90170	177920	160120	604030	1.973157	1.854336	3.394859
0.9	15.679	185560	392540	297060	1108500	2.115438	1.845551	2.823883
1.2	14.878	332340	678450	724730	1417910	2.041403	1.614623	2.089917
1.5	14.705	406330	752610	902440	1426550	1.852199	1.507232	1.895461
1.8	14.161	418100	991420	1958910	1571180	2.371250	1.361902	1.584771
2.1	14.158	1007440	1236950	1967820	1612060	1.227816	1.169510	1.303254

3 结论

3.1 近年来，随着普鲁兰多糖在生物材料方面的应用研究，对普鲁兰多糖的生产提出更高的要求，特别是分子量分布。分子量分布是聚合物特性非常重要的参数，它决定了聚合物的应用范围。文献报道氮源种类和浓度是影响普鲁兰多糖分子量的主要因素，但在大多数情况下，高分子量多糖的生产是以牺牲产量为代价的。本文通过调控初始硫酸铵的浓度，生产出不同分子量普鲁兰多糖产品，这将会拓展普鲁兰多糖产品的开发与利用。

3.2 本文选择实验室常见的无机氮源，研究了有机氮源对出芽短梗霉 CGMCC No. 11602 发酵生产普鲁兰多糖的产量、结构、纯度和分子量的影响，结果表明：在相同发酵条件下，不同无机氮源所生成的普鲁兰多糖产量由高到低依次为：硫酸铵>碳酸铵>硝酸铵>氯化铵>硝酸钠，以 1.5 g/L 硫酸铵为无机氮源时，普鲁兰多糖产量达到 32.84 g/L，且此时普鲁兰多糖的重均分子量（Mw）达到最大值为 799823 ku；普鲁兰多糖的结构和纯度受无机氮源种类的影响不显著，表明该菌株能够适用于各种无机氮源生产普鲁兰多糖，相对稳定，适合工业化生产；不同无机氮源所产生的普鲁兰多糖分子量由大到小的顺序依次为：硫酸铵>硝酸铵>碳酸铵>氯化铵>硝酸钠。重均分子量(Mw)在 165820~799820 ku 之间，分子量分散指数在 2.0~2.4；同时，研究了不同浓度硫酸铵对出芽短梗霉 CGMCC

No.11602 发酵生产普鲁兰多糖的产量、结构、分子量的影响。结果表明硫酸铵浓度对出芽短梗霉的产量和分子量影响显著，而对普鲁兰多糖结构不大。当硫酸铵浓度为 1.5 g/L 时，普鲁兰多糖的产量出现最大峰值，达到了 32.45 g/L，同时，随着硫酸铵浓度的增加，生成的普鲁兰多糖分子量逐渐增加，重均分子量 Mw 从 177930 ku 增加到 1236960 ku。这些研究为不同特性普鲁兰多糖的生产提供技术指导。

参考文献

[1] 于航.低色素出芽短梗霉的选育及其培养条件优化[D].无锡:江南大学,2007
YU Hang. Screening of *Aureobasidium pullulans* with reduced pigmentation and optimization of cultivation conditions [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2007

[2] Göksungur Y, Kuğbağlı S, Uçan A, et al. Optimization of pullulan production from synthetic medium by in a stirred tank reactor by response surface methodology [J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2005, 80(7): 819-827

[3] Wu S, 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

[4] Singh R S, Kaur N, Kennedy J F. Pullulan and pullulan derivatives as promising biomolecules for drug and gene targeting [J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 123: 190-207

[5] Xu E, Jiang W, Xu Y, et al. Pullulan-modified spray-dried powders for pulmonary drug delivery [J]. Journal of Controlled Release, 2015, 213: e30-e31

[6] Kang B K, Yang H J, Choi N S, et al. Production of pure beta-glucan by *Aureobasidium pullulans* after pullulan synthetase gene disruption [J]. Biotechnology Letters, 2010, 32(1): 137-142

[7] Wu S J, Kim J M, Chao Z, et al. Estimation of pullulan by hydrolysis with pullulanase [J]. Biotechnology Letters, 2010, 32(8): 1143-1145

[8] Zou J, Zhang F, Chen Y, et al. Responsive organogels formed by supramolecular self assembly of PEG-block-allyl-functionalized racemic polypeptides into *β*-sheet-driven polymeric ribbons [J]. Soft Matter, 2013, 9(25): 5951-5958

[9] Sugumaran K R, Sindhu R V, Sukanya S, et al. Statistical studies on high molecular weight pullulan production in solid state fermentation using jack fruit seed [J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 98(1): 854-860

[10] 卢辉官.出芽短梗霉的胞外多糖在氮源作用下的积累及其应用[D].扬州:扬州大学,2010
LU hui-guan. The accumulation and application of extracellular polysaccharide from *Aureobasidium pullulans* under the effect of nitrogen source [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2010

[11] R S Singh, G K Saini. Biosynthesis of pullulan and its applications in food and pharmaceutical industry [M]. Microorganisms in Sustainable Agriculture and Biotechnology, 2012

[12] 夏朝红,戴奇,房韦,等.几种多糖的红外光谱研究[J].武汉理工大学学报,2007,29(1):45-47
XIA Chao-hong, DAI Qi, FANG Wei, et al. Research on the IR spectrscopy of kinds of polysaccharide [J]. Journal of Wuhan University of Technology, 2007, 29(1): 45-47

[13] 胡丹.出芽短梗霉双产物发酵及其应用研究[D].天津:南开大学,2009
HU Dan. The fermentation and application research of two products from *Aureobasidium pullulans* [D]. Tianjing: Nankai University, 2009

[14] West T P, Strohfus B. Polysaccharide production by immobilized *Aureobasidium pullulans* cells in batch bioreactors [J]. Microbiological Research, 2001, 156(3): 285-288

[15] Cheng K C, Demirci A, Catchmark J M. Evaluation of medium composition and fermentation parameters on pullulan production by *Aureobasidium pullulans* [J]. Food Science & Technology International, 2011, 17(2): 99-109

[16] 刘娜.茁酶多糖生产菌的复合诱变筛选及发酵条件研究[D].长春:吉林农业大学,2005
LIU Na. The research of compound mutagenesis screening and fermentation conditions for the strain produced pullulan [D]. Chang Chun: Jilin Agricultural University, 2005

[17] Wiley B J, Ball D H, Arcidiacono S M, et al. Control of molecular weight distribution of the biopolymer pullulan produced by the fungus *Aureobasidium pullulans* [J]. Journal of Environmental Polymer Degradation, 1993, 1(1): 3-9

[18] Sugumaran K R, Sindhu R V, Sukanya S, et al. Statistical studies on high molecular weight pullulan production in solid state fermentation using jack fruit seed [J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 98(1): 854-60

[19] Seo H P, Son C W, Chung C H, et al. Production of high molecular weight pullulan by *Aureobasidium pullulans*, HP-2001 with soybean pomace as a nitrogen source [J].

Bioresource Technology, 2004, 95(3): 293-299

[20] Cheng K C, Demirci A, Catchmark J M. Pullulan: biosynthesis, production, and applications [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2011, 92(1): 29-44

[21] Cheng K C, Demirci A, Catchmark J 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(2): 115-122

[22] Campbell B S, Ugall B M, Seviour R J. Why do exopolysaccharide yields from the fungus *Aureobasidium pullulans* fall during batch culture fermentation? [J]. Enzyme & Microbial Technology, 2003, 33(3): 104-112

现代食品科技