

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^{*}

池振明 叶 芳 赵双枝

(中国海洋大学海洋生命学院微生物研究组, 青岛 266003)

摘 要 在过去的研究中发现普鲁兰多糖高产酵母菌株摇瓶发酵的最佳条件是 180 r/min 28℃ 60h, 在此条件下该菌株可以产生质量体积分数为 5.9% 的普鲁兰多糖。本文研究发现在 5 L 发酵罐中通气量和搅拌速度对该酵母菌株的普鲁兰多糖产量有很明显的影响。研究结果表明产普鲁兰多糖的最适通气量和搅拌速度分别是 6.5 L/min 和 300 r/min。相应的, 用每升含 80g 的葡萄糖做发酵培养基, 在 28℃ 条件下培养 72 h, 其普鲁兰多糖的产量质量体积分数为达到 7.5%, 这是迄今为止所报道的产普鲁兰多糖酵母中产量最高的菌株。作者发现这株酵母菌产普鲁兰多糖高效合成过程的原因是其有很高的葡萄糖转化率。

关键词 普鲁兰多糖 发酵 搅拌速度 通气量 酵母菌

近几年来, 微生物产的胞外多糖在食品、化妆品、药品以及化工企业^[6, 10, 11, 20]中的应用越来越广泛。例如, 普鲁兰多糖 (pullulan) 是由麦芽三糖的重复单位通过 $\alpha(1\rightarrow6)$ 糖苷键结合而成的线形 $\alpha-D$ -葡聚糖, 它是一种水溶性的同聚多糖, 产生菌是多形态的普鲁兰短梗霉 (*Aureobasidium pullulans*)^[18]。由于普鲁兰多糖具有良好的成膜性质, 其形成的薄膜是透明的、抗油和不透氧的, 所以它有许多潜在应用。普鲁兰多糖可作为包装材料、纸的粘胶剂, 可以作为淀粉的替代品而成为低热卡食品的组分, 作为化妆品组分, 并且在药品和其他工业中还有重要的用途。普鲁兰多糖通过化学修饰后可以作为抗血凝固剂、抗血栓剂或者抗病毒的药品以及可以作为其他化工企业的一些重要原料^[1, 16]。

在以前的研究^[22, 4]中, 从我国的树叶上分离到了普鲁兰多糖高产酵母菌株 Y68。通过 BIOLOG 系统分析和常规鉴定方法, 此菌株已被鉴定为 *Rhodotorula bacarum*, 这是首次报道红酵母属种可以产普鲁兰多糖。在最佳条件 28℃, 180 r/min 培养下, 在含 50 mL 培养基摇瓶中经过 60 h 培养最高普鲁兰多糖产量是 59 g/L。

本研究的目的是研究在 5L 发酵罐中高产菌株 *Rhodotorula bacarum* 转化葡萄糖产普鲁兰多糖过程中通气量和搅拌速度对产普鲁兰多糖的影响。

1 材料和方法

1.1 酵母菌菌株和细胞培养

酵母菌株 *Rhodotorula bacarum* Y68 保存在 YPD 培养基中, 该培养基成分 (质量分数) 为 1.0% 酵母粉, 2.0% 蛋白胨, 2.0% 葡萄糖, 2.0% 琼脂。适量的酵母细胞在 pH 值为 7 的种子培养基中 28℃, 180 r/min 条件下培养 24 h 得到种子液。种子培养基的组成 (质量分数) 是 8.0% 葡萄糖, 2.0% 豆饼粉水解液, 0.5% K_2HPO_4 , 1.0% NaCl, 0.02% $MgSO_4$, 0.06% $(NH_4)_2SO_4$ 。

1.2 豆饼粉水解液的制备

32 g 豆饼粉中加 62.5 mL 1 mol/L HCl 和 187.5 mL 蒸馏水后混匀, 使此混合物在 14 磅下高温灭菌 25 min, 冷却, 用浓度为 1 mol/L 的 NaOH 溶液调 pH 值至 7.0, 然后在 12 000 r/min 下 8 min 离心得澄清的上清液, 上清液用蒸馏水定溶至 800 mL, 此溶液即为豆饼粉水解液^[5]。

1.3 发 酵

发酵罐是 5 L 搅拌发酵罐 (FMG-5L, 上海国强生物工程装备公司)。发酵培养基的成分 (质量分数): 含 8.0% 葡萄糖, 2.0% 豆饼粉水解液, 0.5% KH_2PO_4 , 0.1% NaCl, 0.02% $MgSO_4$, 0.06% $(NH_4)_2SO_4$, pH 值为 7。玻璃罐内的 pH 值, 溶氧量, 搅拌速度, 温度和通气量可以进行自动监测和控制, 并可以被计算机自动记录。把装有 2 700 mL 发酵培养基的发酵罐在 115℃ 高压灭菌 30 min, 冷却, 然后把准备好的 300 mL 种子液接到灭菌后的发酵培养

第一作者 博士 教授。

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 30370015) 和山东省自然科学基金重点项目 (No. Z2003D01)

收稿时间 2004-09-02, 改回时间 2004-12-07

基里,使最终培养基在 600 nm 下的吸光度值在 0.5~0.8 之间最好。发酵分别在恒温 28℃,不同的通气量 5.0 6.5 8.0 L/min 和不同的搅拌速度 200 300 400 r/min 下分别进行。相应的,发酵开始后,每隔 12 h 收集一定量的发酵培养基分别测其胞外多糖含量、细胞干重以及还原糖的量。

1.4 胞外多糖的分离和纯化

把收集的发酵培养基在沸水中煮 15 min,冷却至室温,然后在 12 000 r/min 4℃ 下离心 8 min 去除酵母细胞和其他一些沉淀物,取 3 mL 上清液移至试管中,再往试管中加 6 mL 冷冻乙醇(纯乙醇或 95% 乙醇),充分混匀在 4℃ 下放置 12 h 后再离心得到的沉淀物即为胞外多糖。去除剩余乙醇,把离心所得的沉淀物溶于 3 mL 80℃ 无离子水中,使此溶液在无离子水中透析 48 h,目的是去除溶液中小分子物质,最后再加 6 mL 冷冻乙醇在 12 000 r/min 4℃ 下离心 8 min,离心得沉淀物在 80℃ 下烘干至恒重即为普鲁兰多糖的干重^[11]。

1.5 发酵培养基中还原糖的测定

发酵培养基经过离心去除胞外多糖后,上清液中还原糖用 Nelson-Somogy 方法^[17]测定。

1.6 细胞干重的测定

取 3 mL 定时收集的发酵培养基,在 4 000 r/min 下离心 5 min,用蒸馏水洗涤沉淀物后再离心,重复操作 3 次。所得离心沉淀物即酵母细胞,在 100℃ 下烘干至恒重即为细胞干重^[5]。

2 结果和讨论

2.1 不同的通气量对胞外多糖产量的影响

为了使酵母细胞产更多的胞外多糖,在培养基里生长合适的酵母细胞是很重要的。在以前的研究中^[22-24],我们发现 Y68 是严格好氧的酵母菌,不能发酵任何碳水化合物,所以为了使细胞更好地生长有必要给该酵母菌提供足够的氧气。通气可以使底物、代谢产物、副产物和氧气得到更好地传递和使有关的微生物细胞发挥更好地作用。关于这点已有大量的报道^[10-14]。通气能使产物、培养基更好地混合,进而帮助细胞保持内外成分的浓度梯度。通气还有利于气体的去除和细胞内微环境的副产品代谢。空气供给有利于细胞 O₂ 的供给,它对高生物量浓度的形成是非常重要的。一般来说,不断增加的进入液体中的气体仅仅是提高 O₂ 质量传递系数,而使细胞得到更多的 O₂,结果是使生物量浓度更高,产物更多。所

以,首先研究了在 300 r/min 的搅拌速度下不同通气量对 *RhodotoruLa bacarum* Y68 在 5 L 可搅拌发酵罐中发酵产普鲁兰多糖的影响。图 1 结果表明当通气量为 5 L/min 时,不足量的 O₂ 供给明显地使普鲁兰多糖产量降低,但是在 8 L/min 的搅拌速度下,过量的 O₂ 供给也导致普鲁兰多糖产量的降低。^[14]报道的胞外多糖的积累随着搅拌速度的提高而增加直至 10 L/min 为止,这些报道与文中的结论有些不同。作者发现 6.5 L/min 通气量下的 O₂ 供给对该菌株产普鲁兰多糖是最适合的。例如当通气量为 6.5 L/min 时,经过 72 h 的发酵普鲁兰多糖产量达到 7.5%,相反,在相同条件下,当通气量为 5.0 L/min 和 8.0 L/min 时,其普鲁兰多糖的产量分别是 4.9% 和 7.1%。

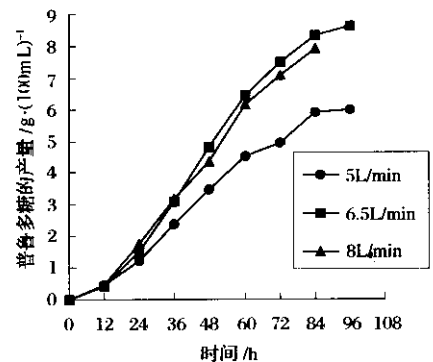


图1 不同的通气量对普鲁兰多糖产量的影响
(数值为两个独立实验的平均值)

2.2 不同通气量对细胞生长的影响

从图 2 可以看出,在较高的 8 L/min 的通气量下的细胞生长要好于在 6.5 L/min 和 5 L/min 的通气量下的细胞生长。相应的比较图 1 和图 2 可以得出太旺盛的细胞生长对酵母菌株产普鲁兰多糖的产生负面影响,其原因可能是过量的 O₂ 供给加强了葡萄糖向细胞量和 CO₂ 转化。在通气量为 5 L/min 和 6.5 L/min 时其细胞的生长量几乎相同,但是通气量

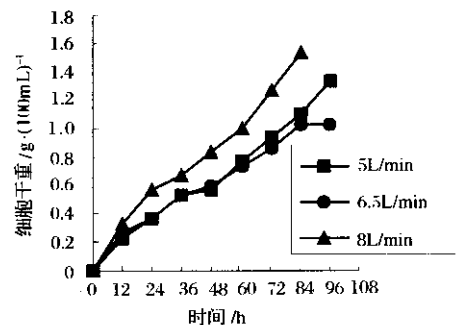


图2 不同通气量对细胞生长的影响
(数值为 2 个独立实验的平均值)

为 6.5 L/min 时的普鲁兰多糖的产量要比通气量为 5 L/min 时的普鲁兰多糖的产量高。这些结果表明, 由于好氧酵母细胞需要较多的 O_2 产生 ATP 而促进胞外多糖的生物合成, 所以在胞外多糖的合成过程中, 获得适量的氧气是必要的。

2.3 不同的通气量对葡萄糖利用的影响

从图 3 可以清楚的知道, 葡萄糖消耗越多, 普鲁兰多糖产量越高。高产量的普鲁兰多糖是由高量的葡萄糖转化来的, 这是合理的。在发酵最后, 在适宜条件下, 99% 以上的葡萄糖被转化成普鲁兰多糖, 这表明着由于此酵母菌株的葡萄糖的高转化率很高, 所以其产普鲁兰多糖的合成过程也比较高效。

2.4 不同通气量对溶氧量的影响

图 4 表明 3 种不同的通气量对 68 h 发酵过程中的溶氧量的影响很小。这意味着, 尽管在不同通气量的条件下其细胞生长不同, 但在发酵开始后, 培养基中几乎所有的溶氧都被细胞所利用(图 2), 发酵 68 h 后, 当通气量为 6.5 L/min 和 8.0 L/min 时, 其细胞都开始利用越来越少的 O_2 , 相应的溶氧量快速升高, 但是在通气量为 5.0 L/min 时发酵 68 h 后, 细胞生长仍需利用大量的 O_2 。

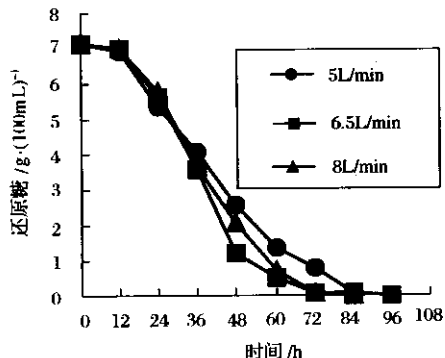


图 3 不同搅拌速度对还原糖利用的影响
(数值为 2 个独立实验的平均值)

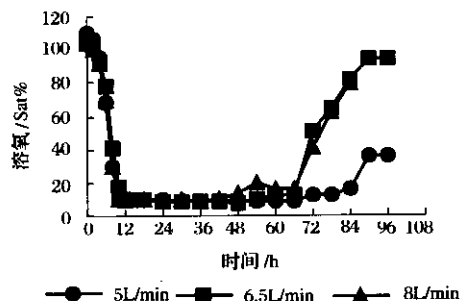


图 4 不同通气量对溶氧的影响,
(数值为 2 个独立实验的平均值)

2.5 不同通气量对 pH 值的影响

图 5 说明通气量对 pH 值有较大的影响。观察结果表明不同通气量条件下, 细胞内代谢发生变化, 当大量的葡萄糖转化成普鲁兰多糖时, 来自于 TCA 循环的有机酸的积累减少, 相应的培养基中的 pH 值较高^[8]。当通气量为 6.5 L/min 时, 培养基 pH 值在发酵 68 h 内保持最高, 这可能意味着使发酵培养基内的 pH 值恒定的保持在 7 左右对提高普鲁兰多糖的产量是至关重要的, 关于这点正在本实验室的研究之中。

2.6 不同的搅拌速度对普鲁兰多糖产量的影响

较高的搅拌速度不但能增加培养基的溶氧量还可以稀释培养基中的大分子物质。关于这点已被清楚的报道过^[8, 14]。高搅拌速度可能有助于细胞和普鲁兰多糖更好的生长和生产, 但是高搅拌速度对细胞和酶活性单纯影响对细胞生长和酶活的稳定性是不利的, 所以检验不同的搅拌速度对 *Rhodotoru La bacarum* Y68 产普鲁兰多糖的影响也是重要的。

前面也论述过, 很明显当通气量为 6.5 L/min 时, 普鲁兰多糖的产量最高。图 6 表示当温度和通气量为 28°C 和 6.5 L/min 时, 可以比较出 200 300 400 r/min 不同搅拌速度对产普鲁兰多糖的影响。图 6 结果表明, 300 r/min 是此酵母菌株产普鲁兰多糖的最适搅拌速度。在最适宜的此条件下此酵母菌株 72 h 发酵的普鲁兰多糖产量为 7.5%。当搅拌速度为 400 r/min 时, 其对 60 h 发酵的普鲁兰多糖的生产没有影响, 但在发酵 60 h 后, 细胞生长停止, 培养基颜色变深(数据未显示), 这可能是高搅拌速度加快了细胞的破坏进而抑制了细胞内普鲁兰多糖的合成。而在 200 r/min 的低搅拌速度下, 普鲁兰多糖的产量很

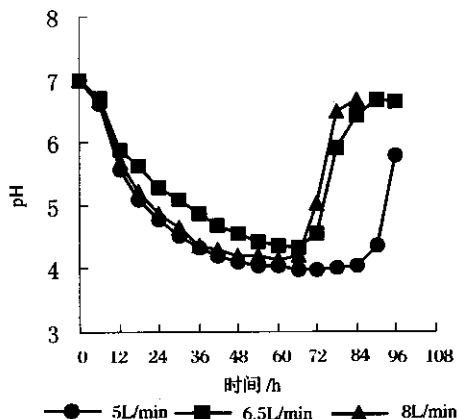


图 5 不同的通气量对 pH 值得影响
(数值为 2 个独立实验的平均值)

低。

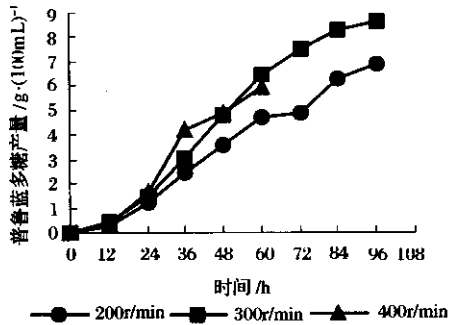


图6 同搅拌速度对普鲁兰多糖产量的影响
(数值为2个独立实验的平均值)

2.7 搅拌速度对细胞生长的影响

从图7我们可以清楚地看到,细胞生长随着搅拌速度从200 r/min增加到400 r/min而加强。普鲁兰多糖的积累并未随着搅拌速度的提高而增加(图6)。比较图6和图7,能再一次得出这样的结论即太旺盛的细胞生长负面影响酵母菌株产普鲁兰多糖。200 r/min的低搅拌速度导致细胞密度很低,从而使普鲁兰多糖产量也很低(图7)。

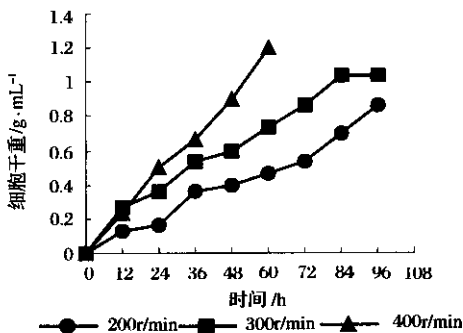


图7 不同搅拌速度对细胞生长的影响
(数值为2个独立实验的平均值)

2.8 搅拌速度对还原糖利用的影响

发酵过程中培养基中还原糖的浓度是伴随着生物量的增加而降低的(图7和图8)。图8说明还原糖的吸收伴随着搅拌速度的提高而提高,这是因为搅拌速度提高时,生物量也提高(图7)。

2.9 搅拌速度对溶氧量的影响

发酵开始之后,溶氧降低很快(图9),此图说明在不同搅拌速度下发酵48 h内,溶氧量有很小差别。这说明在细胞旺盛生长过程中,培养基中所有溶氧都被利用。

2.10 不同搅拌速度对pH值的影响

从图10可以清楚地看到,搅拌速度越高,培养基中的pH值越低,比较图6和图10,可以得出这样的

结论,即细胞生长越好,来自细胞内TCA循环的有机酸越多,从而培养基中pH值越低^[8]。

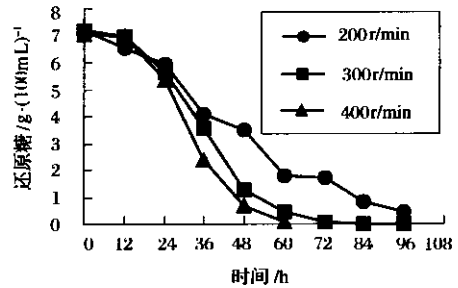


图8 不同搅拌速度对葡萄糖利用的影响
(数值为2个独立实验的平均值)

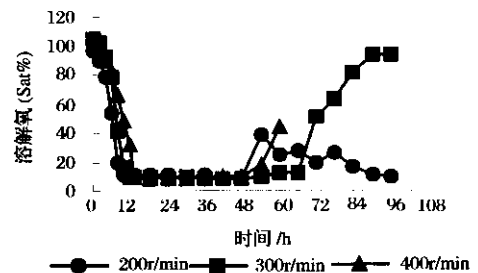


图9 不同搅拌速度对溶解氧的影响
(数值为2个独立实验的平均值)

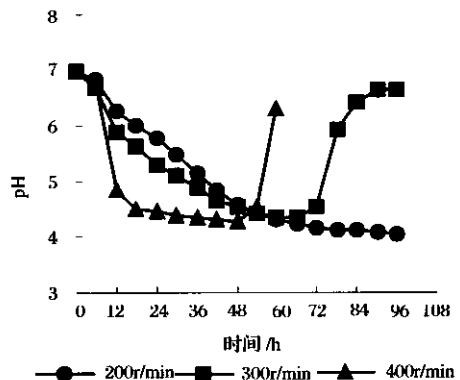


图10 不同搅拌速度对pH值影响
(数值为2个独立实验的平均值)

近20年来,由多形态的类酵母 *Aureobasidium pullulans* 产的普鲁兰多糖已被广泛应用^[21,9,11,13,7,19,15,12],然而至今为止, *Aureobasidium pullulans* 的普鲁兰多糖的最高产量没超过5.19%^[10,19,14]。这意味着,研究中所使用的 *Rhodotorula bacarum* Y68 菌株所产生的7.5%普鲁兰多糖产量是最高的,同时也意味着产普鲁兰多糖的不同酵母菌株利用碳源向普鲁兰多糖转化的效率也不同。正如前述,普鲁兰多糖在食品、化妆品、化工和制药工业有很多应用^[6,10,11,20]。近年来,很多研

究^[18,11]已经报道硫酸化和磷酸化的普鲁兰多糖有抗凝血、抗血栓以及抗病毒作用,而且被氯化的、亚磺酰乙基化的、醚化的、羧基化的、乙酰化的、酯化的普鲁兰多糖还可作为一种重要的原料用于化学工业。而通过基因工程方法得到高产胞外多糖的新菌株是不可能的^[3],所以为了提高产量和降低生产成本获得高产普鲁兰多糖的野生型菌株是非常重要的,由此看来,本研究所用的 *Rhodotorula bacarum* Y68 是发酵工业大规模生产普鲁兰多糖的最好菌株。

致谢:感谢国家自然科学基金和山东省自然科学基金对本项目的支持(No.30370015 和 No.Z2003D01)。

参 考 文 献

- 1 Alban S, Schauerte A, Franz G. Anticoagulant sulfated polysaccharides: part I: Synthesis and structure-activity relationships of new pullulan sulfate[J]. Carbohydrate Polymers 2002, 47: 267~276
- 2 Badr-ELDin SM, EL-Tayeb OM. Polysaccharide production by Aureobasidium pullulans: factors affecting polysaccharide formation[J]. World J Microbiol Biotechnol, 1994, 10: 423~26
- 3 Becker A, Katzen F. Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1998, 50: 145~152
- 4 Chi Z, Zhao S. Optimization of medium and cultivation conditions for pullulan production by a new pullulan-producing yeast[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2003, 33: 206~211
- 5 Chi Z, Liu J, Zhang W. Trehalose accumulation from soluble starch by *Saccharomycopsis fibuligerula* strain[J]. Enzyme Microb Technol, 2001, 28: 240~24
- 6 Deshpande MS, Rale VB. Aureobasidium pullulans in Applied Microbiology: a status report[J]. Enzyme Microb Technol, 1992, 14: 514~527
- 7 Dufresne R, Thibault J. The effects of pressure on the growth of Aureobasidium pullulans and the synthesis of pullulan[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1990, 32: 526~532
- 8 Feng Y, He Z, Ong SL. Optimization of agitation, aeration, and temperature conditions for maximum β -mannanase production[J]. Enzyme Microb Technol, 2003, 32: 282~289
- 9 Kim JH, Kim MR, Lee J. Production of high molecular weight pullulan by Aureobasidium pullulans using glucosamine[J]. Biotechnol Lett, 2000, 22: 987~990
- 10 Lazaridou A, Roukas T, Biladeris CG, Varikousi H. Characterization of pullulan produced from beet molasses by Aureobasidium pullulans in a stirred tank reactor under varying agitator[J]. Enzyme Microb Technol, 2002, 31: 122~132
- 11 Lee JH, Kim JHK, Zhu ZI, et al. Optimization of conditions for the production of pullulan and high molecular weight pullulan by Aureobasidium pullulans[J]. Biotechnol Lett, 2001, 23: 817~820
- 12 McNeil B, Kristiansen B. Temperature effects on polysaccharide formation by Aureobasidium pullulans in stirred tanks[J]. Enzyme Microb Technol, 1990, 12: 521~526
- 13 Rho D, Mulchandani A, Luong JHT, LeDuy A. Oxygen requirement in pullulan fermentation[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1998, 28: 361~366
- 14 Roukas T, Liakopoulou-Kyriakides M. Production of pullulan from beet molasses by Aureobasidium pullulans in a stirred tank fermentor[J]. J Food Eng, 1999, 40: 89~94
- 15 Seviour RJ, Stasinopoulos SJ, Auer DPF, et al. Production of pullulan and other exopolysaccharides by filamentous fungi[J]. Crit Rev Biotechnol, 1992, 12: 279~98
- 16 Shibata M, Asahina M, Teramoto R, et al. Chemical modification of pullulan by isocyanate compound[J]. Polymer, 2001, 42: 59~64
- 17 Spiro RG. Meth Enzymol, 1966, 8: 3~26
- 18 Sutherland LW. Novel and established application of microbial polysaccharide. Trends in Biotechnology, 1998, 16: 41~46
- 19 Vijayendra SVN, Bansal D, Prasad MS, et al. A novel substrate for pullulan-production by Aureobasidium pullulans[J]. Process Biochemistry, 2001, 37: 359~364
- 20 Yuen SP. Pullulan and its applications[J]. Process and Biochemistry, 1974, 22: 7~9
- 21 Zhang HB. Effects of pH on exopolysaccharide production by Aureobasidium pullulans[J]. Microbiol, 2001, 28: 35~38
- 22 Zhao S, Chi Z. A new pullulan-producing yeast and medium optimization for its exopolysaccharide production[J]. J Ocean University of China, 2003, 3: 20~2

Optimization of Agitation and Aeration Conditions for High Pullulan-producing Strain of *Rhodotorula bacarum*

Chi Zhenming Ye Fang Zhao Shuangzhi

(College of Life Science Ocean University of China Qingdao, 266003 China)

ABSTRACT In the previous studies, we found that *Rhodotorula bacarum* could produce 5.9% pullulan within 60 h at 28°C under the optimal conditions in shaking flasks at 180 r/min. In this study, effects of agitation and aeration levels on pullulan production in 5 L fermentor by the strain were examined. The optimal agitation and aeration levels for pullulan production were found to be 300 r/min and 6.5 L/min, respectively. Under these conditions, 7.5% pullulan was obtained from the fermentation medium with 80 g/L glucose within 72 h at 28°C. This was the highest yield of pullulan produced by the yeast strain reported so far. The synthetic process for pullulan production by this strain was very efficient because of a high conversion rate from glucose.

Key words pullulan fermentation agitation speed aeration rate yeast