

潘真清, 章兵, 王顺民. 淀粉质原料在普鲁兰多糖生物合成中的作用及生理机制 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(12): 124–129. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022080320

PAN Zhenqing, ZHANG Bing, WANG Shunmin. Effect of Starch Raw Materials on Pullulan Polysaccharide Biosynthesis and the Underlying Physiological Mechanism[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(12): 124–129. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022080320

· 生物工程 ·

淀粉质原料在普鲁兰多糖生物合成中的作用及生理机制

潘真清, 章 兵, 王顺民

(安徽工程大学生物与食品工程学院, 安徽芜湖 241000)

摘 要: 为了考察不同淀粉质原料对出芽短梗霉生物合成普鲁兰多糖的影响, 本文分别选用来源于木薯、玉米、马铃薯、红薯和小麦等作物的淀粉作为碳源发酵生产普鲁兰多糖。结果发现, 木薯淀粉有利于普鲁兰多糖的生物合成, 最高产量达到 23.96 g/L; 红薯淀粉则不利于普鲁兰多糖的合成, 显著 ($P<0.05$) 降低了普鲁兰多糖的产量和分子量。进一步地, 对普鲁兰多糖分批发酵动力学参数和生理学指标进行分析比较, 发现木薯淀粉提高了普鲁兰多糖合成关键酶活性和胞内前体物质尿苷二磷酸葡萄糖的含量, 进而提高了普鲁兰多糖的合成能力和产量; 而红薯淀粉则提高了普鲁兰多糖降解酶活性, 显著 ($P<0.05$) 降低了普鲁兰多糖的分子量。对普鲁兰多糖分批发酵碳源成本进行估算, 发现利用木薯淀粉合成普鲁兰多糖的碳源成本只有葡萄糖对照组的 56.6%。该研究结果为普鲁兰多糖的廉价高效生产提供了可行的技术参考。

关键词: 普鲁兰多糖, 出芽短梗霉, 淀粉质原料, 生理机制

中图分类号: [Q815]

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)12-0124-06

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022080320



本文网刊:

Effect of Starch Raw Materials on Pullulan Polysaccharide Biosynthesis and the Underlying Physiological Mechanism

PAN Zhenqing, ZHANG Bing, WANG Shunmin

(College of Biological and Food Engineering, Anhui Polytechnic University, Wuhu 241000, China)

Abstract: In order to investigate the effect of different starch raw materials on pullulan biosynthesis by *Aureobasidium pullulans*, the starch derived from such crops as cassava, corn, potato, sweet potato and wheat was separately used as carbon source for fermentative production of pullulan polysaccharide. The results showed that cassava starch was beneficial to the biosynthesis of pullulan polysaccharide, and the maximum pullulan yield of 23.96 g/L was obtained. Sweet potato starch was not conducive to the biosynthesis of pullulan polysaccharide, and significantly ($P<0.05$) reduced the yield and molecular weight of pullulan polysaccharide. Moreover, the analysis and comparison of kinetic parameters and physiological indicators involved in batch fermentation of pullulan polysaccharide was carried out. It was found that cassava starch increased the activities of key enzymes for pullulan polysaccharide biosynthesis and intracellular contents of precursor glucose uridine diphosphate, thereby improved the cell biosynthesis capacity and yield of pullulan polysaccharide. However, sweet potato starch increased the activities of pullulan-degrading enzymes and significantly ($P<0.05$) decreased the molecular weight of pullulan polysaccharide. The cost of carbon source for batch fermentation of pullulan polysaccharide was evaluated. The results showed that the cost of carbon source for the biosynthesis of pullulan polysaccharide from cassava starch was only 56.6% of that from glucose control group. The results presented in this study would provide one feasible technical reference for the cheap and efficient production of pullulan polysaccharide.

Key words: pullulan polysaccharide; *Aureobasidium pullulans*; starch raw material; physiological mechanism

收稿日期: 2022-08-31

作者简介: 潘真清 (1973-), 女, 硕士, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: panzhenqing@ahpu.edu.cn.

普鲁兰多糖是一种由出芽短梗霉(*Aureobasidium pullulans*)好氧发酵合成并分泌至胞外的水溶性微生物多糖^[1-2]。普鲁兰多糖无毒无害,具有良好的可食性和被膜性,可用于食品工业中。2006 年 5 月 19 日,中国国家卫生部发布第 8 号公告,新增普鲁兰多糖为食品添加剂^[3]。此外,普鲁兰多糖也已经广泛应用于轻工、医药、环保和化妆品等诸多领域,且市场需求量日益增长。

在普鲁兰多糖生物合成过程中,出芽短梗霉利用葡萄糖等简单糖类物质,经 α -磷酸葡萄糖异构酶(α -phosphoglucose mutase, PGM)和尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶(UDP-glucose pyrophosphorylase, UGP)催化合成前体物质尿苷二磷酸葡萄糖(uridine diphosphate glucose, UDPG),再经葡萄糖基转移酶(glucosyltransferase, GTF)作用聚合成普鲁兰多糖^[4-5]。如今,限制普鲁兰多糖广泛应用的主要原因是其居高不下的生产成本,其中昂贵的糖类物质占据了较大的比例^[6]。为此,有必要选用廉价的原料(如淀粉)进行发酵生产,从而有效降低普鲁兰多糖的生产成本。

我国是淀粉质原料生产大国,既有粮食类淀粉质原料如马铃薯、红薯、玉米、小麦等,也有非粮类淀粉质原料如木薯,这些淀粉质原料具有来源广、价格低等优势^[7],可以用于苹果酸^[8]、乙醇^[9]、氢气^[10]等生物基产品的发酵生产中。已有研究表明,淀粉质原料也可以用于普鲁兰多糖的生物合成。An 等^[11]使用马铃薯淀粉和蔗糖混合糖液发酵生产普鲁兰多糖,在获得 54.57 g/L 多糖产量的同时还缩短了发酵时间;Wu 等^[12]利用红薯淀粉发酵生产普鲁兰多糖,多糖最大产量为 29.43 g/L,且分子量明显高于利用蔗糖和葡萄糖而获得的多糖。除此之外,鲜见其他淀粉质原料替代蔗糖或葡萄糖合成普鲁兰多糖的相关研究,而淀粉质原料影响普鲁兰多糖生物合成的生理机制更是未见报道。

为此,本文研究不同淀粉质原料在普鲁兰多糖生物合成中的作用,重点从发酵动力学、关键酶活性、中间代谢物水平等角度对淀粉质原料影响普鲁兰多糖产量和分子量的生理机制进行解析,研究结果将为普鲁兰多糖的廉价高效生产提供可行的技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

出芽短梗霉(*A. pullulans* ATCC 201253) $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中保藏;木薯淀粉、玉米淀粉、马铃薯淀粉、红薯淀粉和小麦淀粉(淀粉含量均不低于 99%),葡萄糖、酵母粉 生工生物工程(上海)股份有限公司;硫酸镁、硫酸铵、磷酸氢二钾、氯化钠 国药集团化学试剂有限公司;PGM、UGP、GTF 酶活测定试剂盒 上海凡科维生物科技有限公司;种子培养基: 20%(w/v)新鲜土豆汁,葡萄糖 20 g/L,自然 pH;发酵培养基: 葡萄糖 50 g/L,硫酸铵 0.6 g/L,酵母粉 3 g/L,

磷酸氢二钾 5 g/L,氯化钠 1 g/L,硫酸镁 0.2 g/L, pH6.5。

BIOTECH-5BGZ 发酵罐 上海保兴生物设备工程有限公司;HZ-2010K 恒温摇瓶柜 太仓市华利达实验仪器设备有限公司;LD5-2A 离心机 北京京立离心机有限公司;T6 新世纪紫外可见分光光度计

北京普析通用仪器有限责任公司;Waters 1525 高效液相色谱仪 美国 Waters 公司;LDZX-50KB 灭菌锅 上海申安医疗器械厂。

1.2 实验方法

1.2.1 种子培养 将保藏的 1 mL 菌种活化后接种至装有 50 mL 种子培养基中的三角瓶中,在 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 200 r/min 的摇床中培养 24 h 制备种子。

1.2.2 摇瓶发酵 按 10%(v/v)的接种量,将种子接种至装有 50 mL 发酵培养基的三角瓶中,于 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 200 r/min 摇床中培养 72 h。

1.2.3 分批发酵 按 10%(v/v)的接种量,将种子接种至装有 3 L 发酵培养基的发酵罐中,在 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、400 r/min 和通气量 3 L/min 条件下进行分批发酵。在不同培养时间定时取样,样品经处理后检测细胞生长、普鲁兰多糖合成情况。

1.2.4 普鲁兰多糖合成能力测定 取 5 mL 发酵液,12000 r/min 离心 10 min,所得湿细胞重新悬浮于 5 mL 转化液(5 g/L 葡萄糖,0.2 g/L MgSO_4 , pH6.5)中,于 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 摇床中转化 3.5 h,检测普鲁兰多糖含量,计算细胞的普鲁兰多糖合成能力^[13]。

1.2.5 普鲁兰多糖降解酶活性测定 取 5 mL 发酵液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、12000 r/min 离心 10 min,取上清液与普鲁兰多糖标准品混合,于 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下反应 3 h,测定反应前后上清液中还原糖的增加量。一个单位普鲁兰多糖降解酶活性定义为每分钟释放 1 μmol 葡萄糖的当量^[14]。

1.2.6 普鲁兰多糖合成关键酶活性测定 PGM、UGP、GTF 酶活采用试剂盒进行测定,操作方法和步骤参照说明书执行。

1.2.7 细胞干重、普鲁兰多糖产量和分子量测定 取 20 mL 发酵液,12000 r/min 离心 20 min,细胞沉淀用蒸馏水洗涤 3 次后在 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘干至恒重;上清液中加入 2 倍体积无水乙醇, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置处理 12 h,12000 r/min 离心 10 min,将沉淀于 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘干至恒重;细胞干重和普鲁兰多糖产量计算方法参见文献^[15]。普鲁兰多糖分子量的测定采用黏度法^[16]。将 10 mL 稀释后的普鲁兰多糖水溶液与 5 mL 硫酸钠溶液(0.15 mol/L)转移至乌氏粘度计, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下充分混匀,用秒表记录普鲁兰多糖溶液在毛细管内的流动时间,计算普鲁兰多糖的分子量。

1.2.8 胞内 UDPG 测定 胞内 UDPG 含量测定采用高效液相色谱(HPLC)法。色谱柱为 Supelcosil LC-18-DB(4.6 $\times$ 250 mm, Sigma-Aldrich 公司),流动相为 40 mmol/L 三乙胺-乙酸缓冲溶液(pH6.0),流速 1 mL/min,检测波长 254 nm,柱温 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ^[17]。

1.3 数据处理

所有摇瓶实验数据均为3组独立样品的平均值,所有分批发酵实验数据均为两次检测结果的平均值。采用SPSS软件对数据进行统计,数据的可信度采用 t -检验进行分析,当 $P<0.05$ 时认为有显著影响。

2 结果与分析

2.1 不同淀粉质原料对普鲁兰多糖生物合成的影响

分别以来源于木薯、玉米、马铃薯、红薯和小麦的淀粉代替葡萄糖作为碳源,考察摇瓶条件下不同淀粉质原料在出芽短梗霉生物合成普鲁兰多糖中的作用,结果如表1所示。可以看出,各种淀粉均可用于细胞生长和普鲁兰多糖合成,其中利用红薯淀粉时获得最大细胞干重,而利用木薯淀粉获得最大普鲁兰多糖产量。与利用葡萄糖的对照组相比,出芽短梗霉细胞利用各种淀粉合成普鲁兰多糖的分子量均明显下降,其中利用红薯淀粉合成普鲁兰多糖的分子量只有对照组的37.2%。

表1 不同淀粉质原料对普鲁兰多糖生物合成的影响

Table 1 Effect of different starch raw materials on pullulan biosynthesis

碳源	细胞干重 (g/L)	普鲁兰多糖产量 (g/L)	普鲁兰多糖分子量 ($\times 10^6$ Da)
木薯淀粉	10.76 $\pm$ 0.39 ^b	22.11 $\pm$ 0.72 ^a	1.02 $\pm$ 0.07 ^c
玉米淀粉	10.56 $\pm$ 0.37 ^b	21.44 $\pm$ 0.62 ^a	1.22 $\pm$ 0.05 ^b
马铃薯淀粉	9.86 $\pm$ 0.25 ^c	18.64 $\pm$ 0.32 ^c	1.18 $\pm$ 0.09 ^b
红薯淀粉	13.48 $\pm$ 0.32 ^a	12.96 $\pm$ 0.37 ^d	0.54 $\pm$ 0.03 ^d
小麦淀粉	10.28 $\pm$ 0.56 ^b	19.28 $\pm$ 0.44 ^c	1.09 $\pm$ 0.06 ^c
葡萄糖	9.22 $\pm$ 0.28 ^d	20.58 $\pm$ 0.56 ^b	1.45 $\pm$ 0.09 ^a

注:同列中不同小写字母代表差异显著($P<0.05$);字母相同代表差异不显著($P>0.05$)。

2.2 普鲁兰多糖分批发酵过程与分析

在发酵罐中对出芽短梗霉进行培养,细胞利用不同淀粉质原料合成普鲁兰多糖的分批发酵过程如图1所示,各分批发酵过程参数比较总结于表2。出芽短梗霉利用各种淀粉和葡萄糖时具有类似的生长规律,但在利用红薯淀粉时细胞干重明显增加,最大

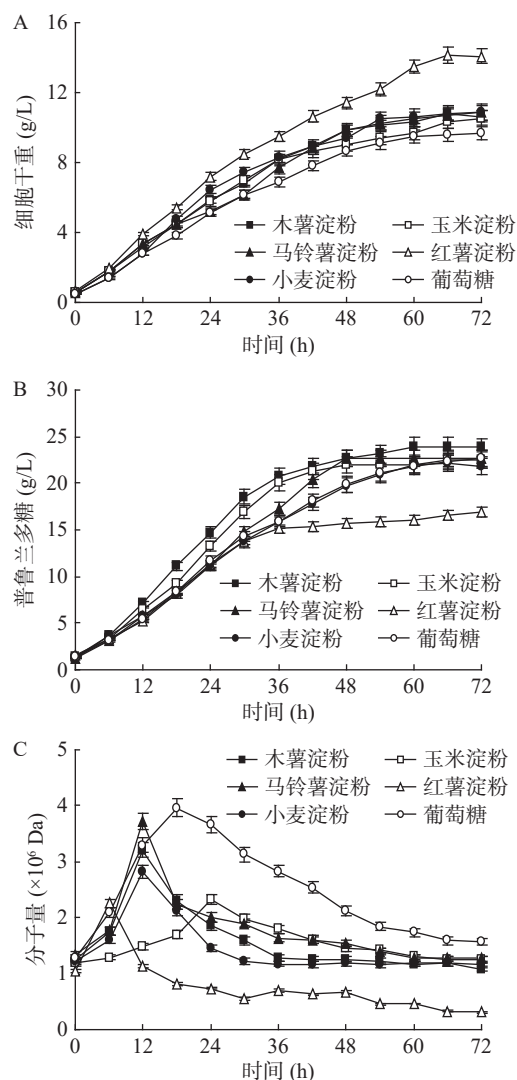


图1 利用不同淀粉质原料合成普鲁兰多糖的分批发酵过程

Fig.1 Batch processes of pullulan polysaccharide production using different starch raw materials

值(14.14 g/L)比葡萄糖对照组高出46.3%。然而,细胞利用红薯淀粉合成的普鲁兰多糖产量最低(16.85 g/L),比对照组低25.4%。利用木薯淀粉合成普鲁兰多糖的产量最高(23.96 g/L),而利用其他淀粉合成的普鲁兰多糖产量与对照组相比没有明显差

表2 利用不同淀粉质原料合成普鲁兰多糖的分批发酵过程参数比较

Table 2 Comparison of kinetic parameters involved in batch pullulan polysaccharide production using different starch raw materials

过程参数	木薯淀粉	玉米淀粉	马铃薯淀粉	红薯淀粉	小麦淀粉	葡萄糖
最大细胞干重(g/L)	10.77 $\pm$ 0.26 ^b	10.53 $\pm$ 0.25 ^b	10.87 $\pm$ 0.42 ^b	14.14 $\pm$ 0.29 ^a	10.81 $\pm$ 0.35 ^b	9.66 $\pm$ 0.27 ^c
最大普鲁兰多糖产量(g/L)	23.96 $\pm$ 0.36 ^a	22.55 $\pm$ 0.39 ^b	22.72 $\pm$ 0.54 ^b	16.85 $\pm$ 0.42 ^c	22.15 $\pm$ 0.45 ^b	22.59 $\pm$ 0.27 ^b
普鲁兰多糖最大分子量($\times 10^6$ Da)	3.21 $\pm$ 0.13 ^b	2.33 $\pm$ 0.15 ^c	3.27 $\pm$ 0.17 ^b	2.25 $\pm$ 0.48 ^c	2.82 $\pm$ 0.36 ^b	3.96 $\pm$ 0.28 ^a
普鲁兰多糖最终分子量($\times 10^6$ Da)	1.19 $\pm$ 0.17 ^b	1.25 $\pm$ 0.23 ^b	1.27 $\pm$ 0.12 ^b	0.33 $\pm$ 0.03 ^c	1.19 $\pm$ 0.13 ^b	1.59 $\pm$ 0.19 ^a
平均比细胞生长速率(h^{-1})	0.042 $\pm$ 0.001 ^b	0.039 $\pm$ 0.001 ^b	0.038 $\pm$ 0.002 ^b	0.044 $\pm$ 0.001 ^a	0.041 $\pm$ 0.002 ^b	0.040 $\pm$ 0.001 ^b
平均比普鲁兰多糖合成速率(h^{-1})	0.106 $\pm$ 0.001 ^a	0.086 $\pm$ 0.001 ^c	0.092 $\pm$ 0.002 ^b	0.056 $\pm$ 0.001 ^d	0.086 $\pm$ 0.001 ^c	0.085 $\pm$ 0.001 ^c
细胞得率(g/g)	0.22 $\pm$ 0.01 ^b	0.21 $\pm$ 0.01 ^b	0.22 $\pm$ 0.01 ^b	0.28 $\pm$ 0.01 ^a	0.22 $\pm$ 0.01 ^b	0.19 $\pm$ 0.01 ^b
普鲁兰多糖得率(g/g)	0.48 $\pm$ 0.01 ^a	0.45 $\pm$ 0.01 ^b	0.45 $\pm$ 0.02 ^b	0.34 $\pm$ 0.01 ^c	0.44 $\pm$ 0.01 ^b	0.45 $\pm$ 0.01 ^b
细胞生长效率(g/L·h)	0.16 $\pm$ 0.01 ^b	0.15 $\pm$ 0.01 ^b	0.15 $\pm$ 0.01 ^b	0.21 $\pm$ 0.01 ^a	0.16 $\pm$ 0.01 ^b	0.13 $\pm$ 0.01 ^c
普鲁兰多糖合成效率(g/L·h)	0.40 $\pm$ 0.01 ^a	0.33 $\pm$ 0.01 ^c	0.38 $\pm$ 0.02 ^b	0.22 $\pm$ 0.01 ^c	0.33 $\pm$ 0.01 ^c	0.30 $\pm$ 0.01 ^d

注:同行中不同小写字母代表差异显著($P<0.05$);字母相同代表差异不显著($P>0.05$)。

异。此外,利用淀粉质原料时,普鲁兰多糖的最高分子量和最终分子量均显著低于对照组,特别地,利用红薯淀粉合成的普鲁兰多糖分子量最小,只有 0.33×10^6 Da。

结合表 2 中的普鲁兰多糖分批发酵动力学参数可以看出,出芽短梗霉在利用红薯淀粉时,平均比细胞生长速率最高,显示出较强的生长能力。与此同时,细胞在利用木薯淀粉时,平均比普鲁兰多糖合成速率最高,体现出较强的普鲁兰多糖合成能力;然而,细胞在利用红薯淀粉时,平均比普鲁兰多糖合成速率最低,最终普鲁兰多糖产量最低。综上,红薯淀粉虽然有利于细胞生长,但不利于普鲁兰多糖的合成,而木薯淀粉最有利于普鲁兰多糖合成。因此,不同淀粉质原料对出芽短梗霉细胞生长和普鲁兰多糖合成的影响具有显著差异,以下将从生理机制的角度对这些差异产生的原因进行解释。

2.3 淀粉质原料影响普鲁兰多糖生物合成的生理机制

2.3.1 普鲁兰多糖合成能力和降解酶活性 出芽短梗霉细胞合成普鲁兰多糖的能力与普鲁兰多糖的合成速率和产量高低正相关^[18],而普鲁兰多糖降解酶活性决定着普鲁兰多糖分子量的大小,降解酶活性越高,则普鲁兰多糖分子量越低^[19-20]。为此,检测了不同培养阶段细胞利用各种淀粉时的普鲁兰多糖合成能力和普鲁兰多糖降解酶活性,结果如图 2 所示。可以发现,在发酵前期(18 h),细胞利用木薯淀粉、玉米淀粉和马铃薯淀粉合成普鲁兰多糖的能力明显较

强;在发酵中期(36 h),细胞利用各种碳源合成普鲁兰多糖的能力均在 22 mg/g/h 左右,但在利用红薯淀粉时,普鲁兰多糖的合成能力显著下降,最终普鲁兰多糖的产量最低(表 2)。与此同时,在发酵的中后期(36 和 60 h),普鲁兰多糖降解酶活性在细胞利用红薯淀粉时显著高于其他淀粉($P < 0.05$),导致合成的普鲁兰多糖分子量最低;而细胞在利用葡萄糖时,普鲁兰多糖降解酶活性处于最低水平,最终合成的普鲁兰多糖分子量则最高。张高川等^[21]在采用转录组测序分析氯化钠对普鲁兰多糖生物合成的影响时,发现部分多糖水解酶基因表达水平上调与普鲁兰多糖分子量下降具有相关性,这也从侧面为本文中红薯不利于维持普鲁兰多糖分子量提供了理论依据。

2.3.2 普鲁兰多糖合成关键酶活性 研究表明,出芽短梗霉细胞合成普鲁兰多糖能力的大小与普鲁兰多糖生物合成途径中的 3 个关键酶 PGM、UGP 和 GTF 密切相关^[22-24]。为此,分别测定了不同发酵阶段的关键酶活性,结果如图 3 所示。从不同发酵时

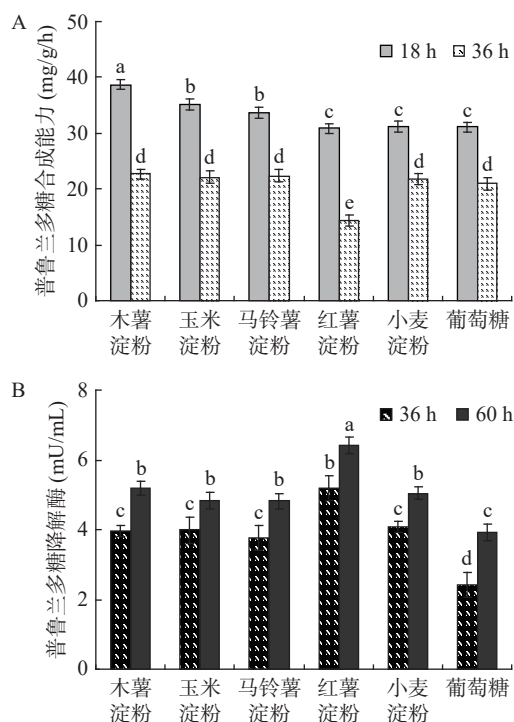


图 2 不同淀粉质原料下的普鲁兰多糖合成能力和降解酶活性

Fig.2 Pullulan biosynthesis capacities and pullulan-degrading activities under different starch raw materials

注:不同小写字母代表差异显著($P < 0.05$);图 3~图 4 同。

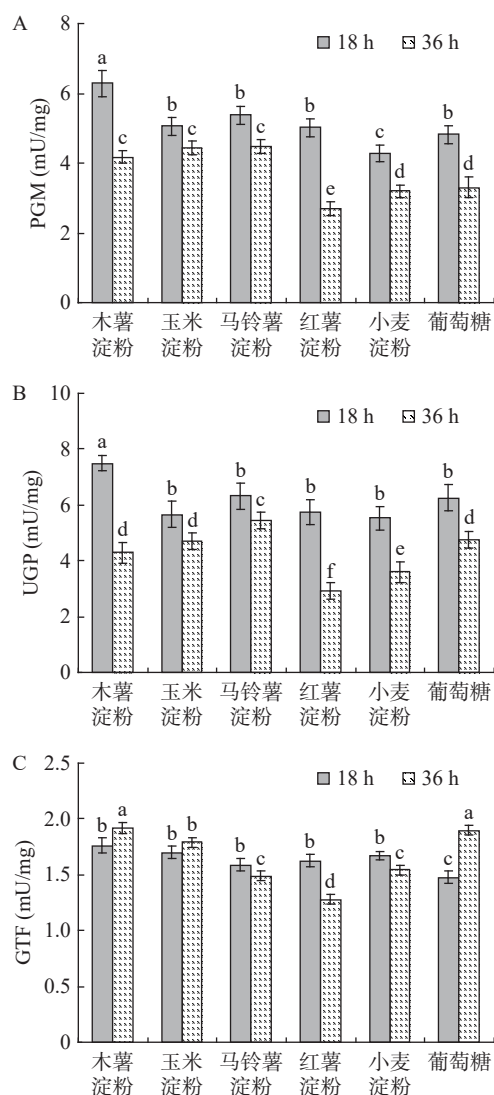


图 3 不同淀粉质原料下的普鲁兰多糖合成关键酶活性

Fig.3 Activities of key enzymes involved in pullulan biosynthesis under different starch raw materials

间来看,细胞在发酵前期(18 h)利用不同底物时的 PGM 和 UGP 活性均高于发酵中期(36 h)时的水平,但 GTF 在这两个阶段的活性差异不大;从不同底物来看,细胞在 18 h 利用木薯淀粉时的 PGM 和 UGP 活性显著高于其他底物,而在 36 h 利用红薯淀粉时的 PGM、UGP 和 GTF 活性显著低于其他底物($P < 0.05$)。因此,细胞利用木薯淀粉有利于提高普鲁兰多糖合成关键酶活性,进而提高普鲁兰多糖合成能力,促进普鲁兰多糖生产;同时,细胞在利用红薯淀粉时,3 个关键酶活性均处于较低水平,降低了普鲁兰多糖生物合成能力,最终普鲁兰多糖产量显著下降。图 3 中不同底物条件下的普鲁兰多糖合成关键酶活性大小与图 2A 中普鲁兰多糖合成能力变化趋势基本一致。

2.3.3 胞内 UDPG 含量 UDPG 是普鲁兰多糖合成的前体物质,充足的 UDPG 供给将有利于普鲁兰多糖产量的提高^[25]。为了考察不同淀粉对普鲁兰多糖合成前体物质 UDPG 含量的影响,测定了分批发酵不同阶段的胞内 UDPG 水平,结果如图 4 所示。可见,在发酵前期(18 h),胞内 UDPG 均维持在较高的水平(>8 mg/g),其中利用木薯淀粉时的胞内 UDPG 含量最高;在发酵中期(36 h),胞内 UDPG 含量均显著下降,特别地,利用红薯淀粉时的胞内 UDPG 含量降至 18 h 时的 50.4%。因此,利用木薯淀粉可以在发酵前期提供更多的 UDPG,促进普鲁兰多糖的生物合成;而利用红薯淀粉在发酵中期即出现 UDPG

供给水平下降,普鲁兰多糖持续合成的内在驱动力不足,最终导致普鲁兰多糖产量明显下降。

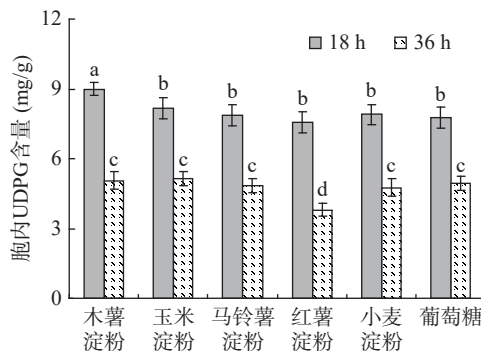


图 4 不同淀粉质原料下的胞内 UDPG 含量
Fig.4 Intracellular contents of UDPG under different starch raw materials

2.4 普鲁兰多糖分批发酵碳源成本分析

普鲁兰多糖属于纯多糖,工业发酵生产通常选用葡萄糖作为碳源物质,而这占据了原料成本的很大比重^[6]。为此,对利用不同淀粉合成普鲁兰多糖的碳源成本进行估算,结果如表 3 所示。可以发现,与葡萄糖对照组相比,除了红薯淀粉以外,利用其他淀粉均可以降低普鲁兰多糖合成的碳源成本,其中利用木薯淀粉的成本下降最多,比对照组降低 43.4%。由于木薯淀粉是廉价易得的非粮物质^[7,26],因此,选用木薯淀粉作为原料,可以有效地降低普鲁兰多糖的生产成本,这对于实现普鲁兰多糖廉价高效生产和应用均具有重要意义。

表 3 普鲁兰多糖分批发酵碳源成本分析

Table 3 Cost evaluation of carbon source for batch pullulan polysaccharide production

碳源物质	木薯淀粉	玉米淀粉	马铃薯淀粉	红薯淀粉	小麦淀粉	葡萄糖
价格(元/kg)*	2.1	2.0	2.4	2.8	3.2	3.5
碳源(g/L)	50	50	50	50	50	50
普鲁兰多糖(g/L)	23.96	22.55	22.72	16.85	22.15	22.59
碳源成本(元/kg普鲁兰多糖)	4.38	4.43	5.28	8.31	7.22	7.75
成本折算(%)	56.6	57.2	68.2	107.3	93.2	100

注: *表示数据来源于食品商务网www.21food.cn, 2022年7月15日查询。

3 结论

分别在摇瓶和 5 L 发酵罐水平上考察了不同淀粉质原料对普鲁兰多糖分批发酵的影响,结果发现木薯淀粉有利于提高普鲁兰多糖产量,而利用红薯淀粉同时降低了普鲁兰多糖的产量和分子量。通过对普鲁兰多糖分批发酵动力学参数和生理学指标进行分析,发现利用木薯淀粉提高了普鲁兰多糖合成途径中的关键酶活性和胞内 UDPG 含量,进而提高了普鲁兰多糖的合成能力和产量;而利用红薯淀粉则提高了普鲁兰多糖降解酶活性,显著降低了普鲁兰多糖的分子量。普鲁兰多糖分批发酵碳源成本分析结果表明,利用木薯淀粉替代葡萄糖合成普鲁兰多糖,可以有效地将普鲁兰多糖生产的碳源成本降低 43.4%。研究

结果部分解析了不同淀粉质原料影响普鲁兰多糖发酵生产的生理机制,同时也为普鲁兰多糖的廉价高效生产提供了可行的技术参考。

参考文献

- [1] SHINGEL K I. Current knowledge on biosynthesis, biological activity, and chemical modification of the exopolysaccharide, pullulan[J]. *Carbohydrate Research*, 2004, 339(3): 447-460.
- [2] 马赛箭, 安超, 薛文娇, 等. 有机氮源对出芽短梗霉发酵普鲁兰多糖的影响[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(11): 169-173. [MA S, AN C, XUE W, et al. Effects of organic nitrogen sources on the fermentation of pullulan by *Aureobasidium pullulans* [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(11): 169-173.]
- [3] 王大慧, 巨晓敏, 卫功元. 表面活性剂在生物转化法合成普鲁兰中的作用及生理机制[J]. *食品科学*, 2019, 40(22): 27-32.

- [WANG D, JU X, WEI G. Physiological mechanism of the effect of surfactants on pullulan production by bioconversion[J]. *Food Science*, 2019, 40(22): 27–32.]
- [4] DUAN X, CHI Z, 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.
- [5] CHENG K, DEMIRCI A, CATCHMARK J M. Pullulan: Biosynthesis, production, and applications[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 92(1): 29–44.
- [6] 朱灿灿, 陈晨, 王大慧, 等. 普鲁兰生物合成中底物的作用及其生理机制[J]. *食品科学*, 2019, 40(14): 63–68. [ZHU C, CHEN C, WANG D, et al. Physiological mechanism underlying the effect of substrates on pullulan biosynthesis[J]. *Food Science*, 2019, 40(14): 63–68.]
- [7] 金征宇, 李佳欣, 周星. 冷水可溶淀粉的物理法制备及应用研究进展[J]. *食品科学技术学报*, 2021, 39(1): 1–12. [JIN Z, LI J, ZHOU X. Research progress on physical preparation and application of cold-water-soluble starch[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2021, 39(1): 1–12.]
- [8] ZENG W, ZHANG B, JIANG L, et al. Poly (malic acid) production from liquefied corn starch by simultaneous saccharification and fermentation with a novel isolated *Aureobasidium pullulans* GXL-1 strain and its techno-economic analysis[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 304: 122990.
- [9] KRAJANG M, MALAIRUANG K, SUKNA J, et al. Single-step ethanol production from raw cassava starch using a combination of raw starch hydrolysis and fermentation, scale-up from 5-L laboratory and 200-L pilot plant to 3000-L industrial fermenters[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2021, 14(1): 68.
- [10] PEERAWAT K, PRAWIT K, BUSSAKORN U, et al. Continuous hydrogen production from cassava starch processing wastewater by two-stage thermophilic dark fermentation and microbial electrolysis[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2017, 42: 27584–27592.
- [11] AN C, MA S J, CHANG F, et al. Efficient production of pullulan by *Aureobasidium pullulans* grown on mixtures of potato starch hydrolysate and sucrose[J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2017, 48(1): 180–185.
- [12] WU S J, JIN Z Y, TONG Q Y. Sweet potato: A novel substrate for pullulan production by *Aureobasidium pullulans*[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2009, 76(4): 645–649.
- [13] JU X, WANG D, ZHANG G, et al. Efficient pullulan production by bioconversion using *Aureobasidium pullulans* as the whole-cell catalyst[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(1): 211–220.
- [14] CHENG K, 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.
- [15] 陈世伟, 唐淑贤, 王舸楠, 等. 基于蛋白质组学分析尿嘧啶对出芽短梗霉产普鲁兰多糖的影响[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(16): 18–25. [CHEN S, TANG S, WANG G, et al. Proteomics analysis of the effect of uracil on pullulan polysaccharide production by *Aureobasidium pullulans*[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(16): 18–25.]
- [16] 余小六. 普鲁兰生物合成及其高产策略研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2013. [YU Xiaoliu. Strategies on the fermentation of *Aureobasidium pullulans* for enhanced production of pullulan [D]. Suzhou: Soochow University, 2013.]
- [17] RAMM M, WOLFENDER J, QUEIROZ E F, et al. Rapid analysis of nucleotide-activated sugars by high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detection, electrospray ionization mass spectrometry and nuclear magnetic resonance[J]. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1034(1–2): 139–148.
- [18] CHEN X, WANG Q, LIU N, et al. A glycosyltransferase gene responsible for pullulan biosynthesis in *Aureobasidium melanogenum* P16[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 95: 539–549.
- [19] WEI X, LIU G L, JIA S L, et al. Pullulan biosynthesis and its regulation in *Aureobasidium* spp.[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 251: 11707.
- [20] WANG D, NI T, JU X, et al. Sodium chloride improves pullulan production by *Aureobasidium pullulans* but reduces the molecular weight of pullulan[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102: 8921–8930.
- [21] 张高川, 何超永, 王崇龙, 等. 转录组测序分析氯化钠对普鲁兰生物合成的影响[J]. *食品科学*, 2021, 42(18): 45–50. [ZHANG G, HE C, WANG C, et al. Understanding the effect of sodium chloride on pullulan biosynthesis by RNA sequencing[J]. *Food Science*, 2021, 42(18): 45–50.]
- [22] WANG G, DIN A, QIU Y, et al. Triton X-100 improves co-production of β -1, 3-D-glucan and pullulan by *Aureobasidium pullulans*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104: 10685–10696.
- [23] SINGH R S, KAUR N, KENNEDY J F. Pullulan production from agro-industrial waste and its applications in food industry: A review[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2019, 217: 46–57.
- [24] WANG D, JU X, ZHANG G, et al. Copper sulfate improves pullulan production by bioconversion using whole cells of *Aureobasidium pullulans* as the catalyst[J]. *Carbohydrate Polymer*, 2016, 150: 209–215.
- [25] LEATHERS T D. Biotechnological production and applications of pullulan[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 62: 468–473.
- [26] 王金梦, 张思维, 赵康云, 等. 不同品种木薯淀粉理化及结构性质的比较[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(2): 115–122. [WANG J M, ZHANG S W, ZHAO K Y, et al. Comparison of physicochemical and structural properties of different varieties of cassava starch[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2023, 44(2): 115–122.]