

文章编号:1673 1689(2007)04-0093-04

短梗霉多糖发酵液后处理工艺研究

焦莎莎, 付湘晋, 童群义

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要:研究了低色素出芽短梗霉菌株 G-58 发酵液的后处理工艺。发酵液热处理后,用活性炭脱色,活性炭适宜添加量是 0.6%,多糖得率 94.5%,脱色率为 34.8%;乙醇为沉淀剂,用量为发酵液体积 3 倍;多糖沉淀再用体积分数 75% 乙醇洗涤 3 次脱盐,多糖得率 90.6%,多糖纯度 96.8%;60℃热风干燥;产品白色、易溶,相对分子质量较大;最终多糖得率是 85.6%。

关键词:短梗霉多糖;后处理;脱色;脱盐

中图分类号:Q 539

文献标识码:A

Studies on Downstream Processing of Pullulan Broth

JIAO Sha-sha, FU Xiang-jin, TONG Qun-yi

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In this manuscript, a ex-polysaccharide extraction process was developed. The steps for extraction as follows: after heat process, the broth was de-coloured with 0.6% activated charcoal, and then precipitated using 3 times volume of ethanol, the crude polysaccharide was desalted with diluted ethanol (75%), followed by hot air drying at 60 °C; the product was white and water soluble easy. Furthermore, the obtained polysaccharide has a high molecule weight. With this process a high polysaccharide recovery rate (85.6%) and high purity (96.8%) were achieved.

Key words: pullulan; downstream; decolourization; desalt

短梗霉多糖(pullulan)又称茁霉多糖或普鲁兰,是出芽短梗霉(*Aureobasidium pullulans*)在培养过程中利用糖代谢产生的细胞外水溶性多糖胶质。其分子是由麦芽三糖以 α -1,6-糖苷键连接而成的直链多糖,由于这一独特连接方式,短梗霉多糖具有极佳的粘弹性、乳化性、可塑性^[1],无毒无害,因此广泛应用于食品、医药、化妆品等行业。

短梗霉多糖膜具有玻璃纸样光泽及透明度和强度,耐油、耐热封,可食;最特殊的性质是比其他高分子膜的透气性低,氧、氮、二氧化碳和香气等气

体几乎不能透过,所以作为可食性包装膜广泛应用于水果、蔬菜、鸡蛋,特别是含油食品,如火腿、方便面、肉等,可以显著减缓食品氧化变质。短梗霉多糖溶液为中性,粘度受温度、pH 值影响小,有很好的耐盐和耐酸性能,因此用于高盐食品和调味料的增稠,如酱油、虾酱。短梗霉多糖在动物消化器官内酶作用下消化得很慢,利用它的低消化性,可制低热量食品和饮料。最近发现^[2]短梗霉多糖具有使双歧杆菌增殖、治疗便秘和抑制肿瘤的作用。

目前日本林原公司^[3]有短梗霉多糖生产并垄

收稿日期:2006-09-15.

作者简介:焦莎莎(1982-),女,山西晋城人,食品科学与工程专业本科生。

通讯作者:童群义(1963-),男,湖南桃源人,教授,博导,主要从事碳水化合物研究. Email:qytong@263.net

断了国际市场。制约短梗霉多糖大量生产的首要原因是在发酵过程中,出芽短梗霉分泌黑色素(melanin),使发酵液呈墨绿色或黑色,提取多糖必须有脱色工艺,但黑色素牢固地粘附在多糖上,很难用一般方法除去^[3,6]。作者通过紫外线和硫酸二乙酯(DES)诱变筛选到一株低色素出芽短梗霉变异株 G-58, G-58 发酵液呈白色,大大降低了多糖发酵液脱色的难度。

同时,在实验中发现,即使是白色的发酵液,如果后处理工艺不当,所得的短梗霉多糖颜色发暗,水溶性差,有酸、涩等异味,所以,有必要优化多糖提取工艺,但国内外有关短梗霉多糖发酵液后处理的报道很少。作者研究了出芽短梗霉 G-58 菌株发酵液后处理工艺,确定了发酵液脱色、醇提、脱盐、干燥等工艺的操作参数。

1 材料与方法

1.1 菌种

出芽短梗霉(*Aureobasidium pullulan*) G-58 菌株,实验室选育并保存。

1.2 试剂

短梗霉多糖标准品:日本林原公司产品;其他试剂均为国产分析纯。

1.3 培养基与培养方法

1.3.1 种子培养基(g/L) 蔗糖 50, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.8, K_2HPO_4 4, MgSO_4 0.2, NaCl 1, 酵母膏 1.5, pH 6。

1.3.2 发酵培养基(g/L) 蔗糖 60, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.6, K_2HPO_4 6, MgSO_4 0.4, NaCl 1, 酵母膏 0.4, pH 6.5。

1.3.3 固体培养基 种子培养基添加 20 g/L 琼脂。

1.3.4 培养方法

1) 种子培养:取 28 °C 培养 4 d 的斜面菌种一环,接种于种子培养基,500 mL 三角瓶装 100 mL 种子培养基,温度 28 °C,摇床速度 200 r/min,培养 36 h 即为种子液。

2) 发酵:500 mL 三角瓶装 200 mL 发酵培养基,接种量 2%;温度 28 °C,摇床速度 200 r/min,发酵时间 96 h。

1.4 分析方法

1.4.1 多糖测定 离心上清液加入 2 倍无水乙醇,搅拌,4 °C 放置过夜,使短梗霉多糖充分沉淀。沉淀液以 3 000 r/min 离心 30 min 得短梗霉多糖沉淀,沉淀用体积分数 85% 乙醇溶液洗涤 3 次再依次

用无水丙酮、无水乙醚洗涤,吹干乙醚,溶于蒸馏水^[4],用苯酚-硫酸法测定多糖^[7]。

1.4.2 多糖纯度 多糖纯度(%)=(多糖质量/粗多糖质量)×100%。

粗多糖质量:乙醇沉淀所得的多糖 80 °C 干燥,恒重,电子天平称重^[4]。

1.4.3 颜色评价 采用分光光度计测定发酵液中的色素。蒸馏水为空白,波长扫描,波长调至最大透光率(654 nm),再用此波长测定多糖液的 OD 值^[6]。

1.4.4 pH 值 采用精密 pH 计测定。

1.4.5 粘度 短梗霉多糖产品配成质量分数 2.0% 溶液,旋转粘度计测定粘度,3 号转子,25 °C。

1.4.6 相对分子质量 高压液相色谱法^[7]。

1.4.7 IR 图谱 采用美国 NTCOLET 仪器公司产品 and 日本岛津公司产品进行测定。

1.5 发酵液后处理工艺

过滤→热处理→离心 I (4 000 r/min, 30 min) →脱色→离心 II (3 000 r/min, 20 min) →有机溶剂沉淀→离心 III (2 000 r/min, 10 min) →脱盐→离心 IV (2 000 r/min, 10 min) →干燥

1.5.1 过滤 8 层纱布,真空抽滤。

1.5.2 热处理 发酵液过滤后热处理。用 NaHCO_3 和盐酸调 pH 值 7.0, 80 °C, 20 min。

1.5.3 脱色 离心 I, 上清液用于脱色处理。加入活性炭后 200 r/min, 15 °C 振荡 20 min 脱色,离心 II, 去活性炭,上清液用于测定多糖和 OD 值。

1.5.4 有机溶剂沉淀 离心 II, 上清液加入有机溶剂,搅拌,4 °C 放置 12 h, 使多糖充分沉淀。

1.5.5 脱盐 离心 III, 多糖沉淀用体积分数 75% 乙醇溶液洗涤。

1.5.6 干燥 离心 IV, 多糖沉淀用热风干燥,粉碎,观察颜色;配成质量分数 2.0% 溶液,与标准品对比,观察水溶性,测定吸光度,感官评定,确定干燥温度。

2 结果与讨论

2.1 热处理

发酵液中含有多糖分解酶类,热处理的主要作用是使这些酶变性失活,以免在后续处理中多糖被分解。短梗霉多糖对热稳定性高,蛋白质在高温下变性沉淀,所以加热还有助于除掉发酵液中的蛋白质。

2.2 脱色

经过热处理,发酵液颜色有所加深,如果不脱

色,多糖干燥时颜色还要加深,所以脱色工艺是必要的。活性炭脱色是应用最广泛的脱色方法之一。结果见表 1。

实验结果表明,0.6%的活性炭添加量是适宜的,此时多糖得率 94.5%,脱色率 34.8%;再增加活性炭用量,脱色效果有所改善,但多糖得率大大降低,这是因为活性炭在吸附色素的同时也吸附少量多糖。

表 1 活性炭脱色效果
Tab. 1 Results of decoloration by active carbon

活性炭添加量/%	多糖得率/%	A ₆₅₄
0	100.0	0.46
0.3	95.1	0.42
0.6	94.5	0.30
0.9	90.6	0.25
1.2	87.3	0.17
1.5	84.6	0.44
1.8	81.2	0.59

2.3 有机溶剂沉淀

2.3.1 有机溶剂选择 往脱色后的发酵液中分别加入 2 倍体积有机溶剂乙醇、甲醇、丙酮、异丙醇、正丁醇、异戊醇对多糖进行提取,洗涤后测量多糖提取量,以此来选择合适的沉淀剂,结果如表 2 所示。

表 2 不同有机溶剂的提取效果
Tab. 2 Results of extraction by different organic solvents

有机溶剂	多糖产量/(g/L)
乙醇	17.5
甲醇	16.7
异丙醇	10.4
丙酮	17.3
正丁醇	14.1
异戊醇	17.5

由结果可知,有机溶剂的种类对多糖沉淀效果影响显著。

从提取效果来看,乙醇、甲醇、丙酮、异戊醇较好,且多糖提取量差别不大,从有机溶剂安全性和经济性考虑,甲醇毒性较大,丙酮使用比较危险,异戊醇成本较高,乙醇是常用的低毒性有机溶剂,又易被生物降解,对环境污染少,大部分可以回收再利用,成本较低,残留可以挥发。因此,选用乙醇作为普鲁兰多糖沉淀剂。

2.3.2 乙醇用量 乙醇提取多糖是利用它的溶剂化效应,乙醇使水的介电常数减小,多糖溶解度降低,从水中析出,随着添加量的增加,多糖析出增多,所以必须添加到一定量才能使多糖全部析出。

表 3 不同乙醇用量的沉淀效果
Tab. 3 Results of deposition by different volumes of ethanol

乙醇用量/倍	多糖产量/(g/L)
1	6
2	17.5
3	21.5
4	21.8
5	21.9
6	22

由结果可知,乙醇用量对沉淀效果有比较大的影响,使用 1 倍于发酵液的乙醇基本无法将多糖沉淀,大部分多糖仍溶解在乙醇-水的混合体系中;随着乙醇用量的增加,多糖沉淀量也得以增加,3 倍以上的用量对多糖沉淀量影响不大,但析出的多糖絮状物颜色更为洁白,可见增多的乙醇主要起了溶解色素、纯化多糖的作用。考虑到生产成本,选择添加 3 倍于发酵液体积的乙醇沉淀多糖。

2.4 脱盐

出芽短梗霉的培养基中添加了大量的无机盐类,特别是 MgSO₄、K₂HPO₄、NaCl,它们有苦、涩等异味,短梗霉发酵过程中还产生一些酸性物。不经脱盐的粗多糖的盐质量分数达 5%,口味酸、涩,所以必须脱盐,脱盐有许多方法,实验室提取少量多糖时可以用透析法,孙万儒采用膜超滤的方法去除短梗霉发酵液中盐类等小分子物质^[8],但膜容易堵塞。这些盐类与多糖在乙醇的水溶液中溶解度不一样,当乙醇体积分数较高时,多糖不溶,而盐溶解度较高^[9]。作者利用这一特性,采用体积分数 75%乙醇溶液洗涤粗多糖的方法。这一方法操作简单,成本低,脱盐效果显著,所得多糖无色无味。

表 4 洗涤效果
Tab. 4 Results of washing

洗涤次数	多糖得率/%	多糖纯度/%	A ₆₅₄
1	95.8	92.4	0.27
2	92.5	95.5	0.24
3	90.6	96.8	0.21
4	89.2	97.7	0.20

洗涤的主要作用在于脱盐,由结果可知,洗涤

次数对多糖得率和纯度均有一定的影响;多糖得率随着洗涤次数的增加逐渐减小,而多糖纯度随洗涤次数的增加而增加,多次洗涤虽然可以提高多糖纯度,但洗涤剂的用量也会随之增大。从多糖液的A值也可以看出酒精洗涤还有一定的脱色作用。

综合考虑糖得率、纯度及洗涤剂用量三方面因素,选择洗涤3次为佳,这时多糖得率为90.6%,纯度为96.8%,所得多糖无异味,达到脱盐要求。

2.5 干燥

热风干燥成本低,操作简单,在食品行业中广泛应用。表5表明:40℃干燥效果好,但耗时太长;80℃干燥,产品颜色较差;所以选60℃为干燥温度。产品白色、易溶。

表5 不同干燥温度对产品的影响

Tab. 5 The influence of different drying temperatures on products

温度/℃	颜色	水溶性	A ₆₅₄
40	白色	易溶	0.22
60	白色	易溶	0.24
80	表面浅黄	易溶	0.30

注:标准品A₆₅₄是0.23。

2.6 短梗霉多糖产品感官、理化指标

2.6.1 短梗霉多糖感官要求 色泽均匀一致,乳

白色,组织形态为粉末,加入水迅速溶解,无气味,无肉眼可见杂质。

2.6.2 短梗霉多糖理化要求 纯度97.5%,水溶液pH值为6.0,粘度 2.2×10^3 mPa·S,相对分子质量为 1.05×10^6 。

所得产品相对分子质量较大,达100万以上,而市售产品相对分子质量在10~20万^[1],这也是本产品的特点之一,高相对分子质量多糖有更好的稳定性、成膜性,膜更加致密^[2]。

产品与标准品的IR图谱基本一致,图谱的差别可能由产品纯度引起,另外,产品中还可能少量酸性多糖^[4],这有待进一步深入研究。

2.6.3 卫生指标 符合GB9678.1之规定。

3 结 语

发酵液热处理后,用活性炭脱色,活性炭适宜用量是0.6%,多糖得率94.5%,脱色率为34.8%;乙醇为沉淀剂,乙醇用量为发酵液体积3倍;再用体积分数75%的乙醇溶液洗涤3次脱盐,多糖得率90.6%,纯度96.8%,无盐的异味;60℃热风干燥;产品白色、易溶,相对分子质量较大;最终产品得率是85.6%。该处理工艺设计合理,操作简单,成本低,得率高,产品质量达到要求。

参考文献(References):

- [1] Leathers T D. Biotechnological production and applications of pullulan[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 62(5-6): 468-473.
- [2] Shingel. -k-l, Current knowledge on biosynthesis, biological activity, and chemical modification of the exopolysaccharide pullulan[J]. *Carbohydrate-Research*, 2004, 339(3): 447-460.
- [3] 朱一晖,张丽敏. 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:食品与生物技术,2003,22(1):16-20. ZHU Yi-hui, ZHANG Li-min, ZHAN Xiao-bei. Isolation of aureobasidium pullulans ⁶⁰Co mutagenesis strains that produce pullulan with reduced pigmentation[J]. *Journal of Wuxi University of Light Industry*, 2003, 22(1): 16-20. (in Chinese)
- [4] 曹海石,孙宏,梁放,等. 普鲁兰多糖的分离纯化及结构鉴定[J]. 高等学校化学学报,1999,20(11):1729-1732. CAO Hai-shi, SUN Hong, LIANG Fang, et al. Purification and determination of the structure of pullulan polysaccharide [J]. *Chemical Research in Chinese Universities*, 1999, 20(11): 1729-1732. (in Chinese)
- [5] Dharmendra K. Kachhawa. Studies on downstream processing of pullulan[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2003, 52: 25-28.
- [6] 任永娥,江宁,谢浩旭,等. 几株出芽短梗霉在不同发酵条件下产生多糖的比较[J]. 微生物学通报,1995,22(3): 146-149.
- [7] REN Yong-e, JIANG Ning, XIE Hao-xu, et al. The comparison of various strains of aureobasidium pullulans producing pullulan at different conditions[J]. *Microbiology*, 1995, 22(3): 146-149. (in Chinese)
- [7] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术(第二版)[M]. 杭州:浙江大学出版社,1999.

(责任编辑:朱明)