

茁霉多糖生物合成及在食品工业中的应用

王烈喜, 王尔茂 (广东食品药品职业学院, 广东广州 510520)

摘要 综述了茁霉多糖的分子结构、性质、生物合成, 并且简要叙述了茁霉多糖在食品工业中的应用。

关键词 茁霉多糖; 发酵; 应用

中图分类号 Q946.4 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)23-10184-02

Biosynthesis and Application of Pullulan in Food Industry

WANG Lie-xi et al (Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou, Guangdong 510520)

Abstract The molecular structure, the characteristics and the biosynthesis of the pullulan were summarized. The paper gave a brief description of the application of pullulan in food industry.

Key words Pullulan; Fermentation; Application

茁霉多糖(Pullulan)又称短梗霉多糖、普鲁兰多糖或普聚多糖, 是出芽短梗霉(*Aureobasidium pullulans*)菌体分泌的一种黏性多糖。Bauder 最早发现这种芽短梗霉的胞外分泌物。Bernier 对该物质进行了分离纯化, 并将它命名为茁霉多糖^[1]。茁霉多糖具有极佳的成膜性、成纤维性、阻氧性、可塑性、黏结性及易自然降解等理化和生物学特性, 无毒无害, 对人体无任何副作用。因此, 它可以被广泛应用于医药制造、食品包装、水果和海产品保鲜、化妆品工业、烟草制造工业和农业种子保护以及工业废水处理等领域, 是一种有极大开发价值和前景的多功能新型生物制品。虽然茁霉多糖用途广泛, 但目前国内外对它研究最多、最透彻的是在食品方面的应用。目前茁霉多糖的生产规模还不小。相对于葡萄糖其他多聚产物, 茁霉多糖生产成本较高。这些因素都限制了茁霉多糖的进一步开发利用^[2]。

1 分子结构和性质

茁霉多糖是以 α -1,6糖苷键连接的聚麦芽三糖, 即3个葡萄糖以2个 α -1,4糖苷键连接形成麦芽三糖, 两端再以 α -1,6糖苷键与另外2个麦芽三糖结合形成的高分子。过氧化和甲基化分析表明, α -1,4糖苷键和 α -1,6糖苷键的比例为2:1, 聚合度为100~5000, 分子量为 $(1\sim200)\times 10^4$ 。

茁霉多糖是一种无色、无味、无毒的葡萄糖, 为非离子性、非还原性多糖, 极易溶于水, 水溶性中性, 不溶于油脂、醇类、丙酮、醚和氯仿等有机溶剂, 可与水溶性高分子物质如羧甲基纤维素、海藻酸钠和淀粉等互溶。茁霉多糖为中性多糖, 在碱溶液中加热会焦化着色。在结构稳定的前提下, 茁霉多糖能承受pH值2~10, 但长时间在pH值3以下能被酸水解而黏度下降^[3]。茁霉多糖可塑性极强, 具有良好的成膜性, 膜光泽而透明, 透气性较其他高分子膜低, 膜的透气性随含水量的增加而增加。在制膜时, 添加一些糖类如山梨醇、甘油等可增加膜的韧性。与玻璃纸、聚丙烯薄膜、聚乙烯薄膜相比, 茁霉多糖薄膜具有更好的阻隔氧气的性能^[4]。

2 生物合成

2.1 菌种的选育 出芽短梗霉在生活史中具有酵母样和真菌菌丝体2种形态, 其中酵母状出芽短梗霉是茁霉多糖的主

要生产者^[5]。目前, 对出芽短梗霉菌种的选育主要集中在对高产茁霉多糖的选育。出芽短梗霉在培养时受光诱导会在发酵48h后向胞外分泌出粉红色、紫色、红色、黄色乃至黑色的色素来阻止光氧化, 这些色素的分泌对茁霉多糖的提取带来诸多不便, 所以在选育中希望能够获得低色素或者色素缺陷型的稳定菌株, 以减少发酵物在下游加工中的脱色次数; 由于在实际生产中茁霉多糖成本较高, 所以希望能够获得对底物利用水平高的菌株。

从自然界获得的出芽短梗霉菌株生产茁霉多糖的能力较低。目前, 一般采用物理方法或化学方法诱变, 可以筛选出优良菌株, 提高出芽短梗霉发酵效率, 减少色素生成。与其他菌种的诱变筛选相比, 低色素产量短梗霉的诱变在筛选上有独特优势。把经过诱变的菌悬液涂布于平板, 通过观察菌落颜色和形态就可以得到目的菌株。朱一暉等利用⁶⁰Co对出发菌株进行诱变, 获得一株产色素能力缺失型菌株。该菌株发酵颜色淡绿色, 大大简化了纯化步骤, 减少了多糖的损失^[6]。方宜均等用紫外(UV)随机诱变, 从出芽短梗霉(A95818)中获得2株多糖产量高、色素含量低的出芽短梗霉突变株ZY047和ZY073, 其产量分别为15.15和14.22mg/ml, 而且发酵状况大为改善^[7]。

化学方法一般使用溴化乙锭、亚硝基胍(NUM)和秋水仙素等诱变剂。利用溴化乙锭和紫外线为诱变剂, 可筛选出不产黑色素且具有酵母样细胞形态的短梗霉多糖生产菌种——出芽短梗霉(SN08)。出芽短梗霉的一个野生菌株在试验条件下产生3g/L胞外多聚糖, 且受黑色素污染, 而紫外线照射使该菌株发生诱变, 得到一个产无色产物的无性系。对该无性系再次进行紫外线照射, 得到一个高产短梗霉多糖(在试验条件下产量为10g/L, 在优化条件下为70g/L)的新无性系^[8]。0.2~1.0mol/L亚硝基胍对出芽短梗霉菌株具有诱变作用, 影响茁霉多糖的产量。当诱变剂剂量为0.02%~8.9%时, 细胞能够存活, 微生物形态变异率较高, 且有利于茁霉多糖的生产。剂量为0.5%的亚硝基胍照射3h, 细胞存活率约1.0%, 对诱导高产量茁霉多糖的效果最佳。在基础培养基中添加适宜浓度的秋水仙素, 可提高出芽短梗霉的变异频率。将浓度3%秋水仙素溶液作用时间从5d延长到9d时, 所产生的活性变异株数目相对减少。某些变异株合成茁霉多糖的能力较高, 但与出芽短梗霉染色体倍数的提高

作者简介 王烈喜(1981-), 男, 江西泰和人, 助教, 从事食品微生物检验及应用方面的研究。

收稿日期 2008-05-30

无关^[9]。

2.2 培养基组分 通过优化营养源和发酵条件,控制出芽短梗霉的菌体生长和生理代谢过程,是获得高产茁霉多糖的重要手段,已成为优化多糖生产工艺的研究热点。

2.2.1 碳源。茁霉多糖的碳源非常广泛,可利用葡萄糖、果糖、山梨糖、蔗糖、麦芽糖、转化糖、淀粉、淀粉糖浆、水解淀粉^[10]。蔗糖被认为是最好的碳源,但是成本相对较高^[2]。Schusster 等以不产黑色素的出芽短梗霉突变株研究不同碳源对茁霉多糖产量的影响,发现不同碳源间存在显著差异,蔗糖为最佳碳源^[11]。Badr-Eldin 等比较了 8 种碳源对出芽短梗霉 NRL6200 合成茁霉多糖的影响,发现浓度 10% 蔗糖是合成茁霉多糖最佳碳源,其次是果糖和麦芽糖^[12]。蔗糖为最佳碳源的原因可能是蔗糖被利用时,首先被水解为葡萄糖和果糖,这一水解作用能激活茁霉多糖合成酶系,加之果糖异构化的刺激作用,茁霉多糖产量大幅度提高^[13]。

为了降低成本,许多研究者利用废糖蜜、酸水解纤维素、土豆淀粉废弃物、甜薯、葡萄渣等作为碳源进行研究。Lazaridou 以甜菜糖蜜作为发酵底物,茁霉多糖产量最高可以达到 49 g/L,干重达到 25 g/L^[14]。其他来自农业和食品工业的废弃物,如去蛋白乳清、甜菜糖浆、甜甘蔗汁、泥炭水解物等都是生产茁霉多糖既经济又高效的底物^[2]。

茁霉多糖的生产水平除了与碳源类型有关,还与碳源起始浓度有密切关系。Le 等以甜菜糖浆为发酵底物,发现在糖浆起始浓度为 50 ~ 100 g/L 的范围内,随着糖浆浓度的增加,茁霉多糖浓度也逐渐升高,但如果进一步增加糖浆浓度,茁霉多糖浓度反而降低^[15]。魏培莲发现,当初始碳源浓度低于 5% 时,因碳源受限而无茁霉多糖的形成;但当初始碳源浓度高于 12.5% 时,因初始碳源对菌体生长的抑制作用,对多糖的合成也有一定的影响^[5]。

2.2.2 氮源。氮源的影响主要表现在氮源种类和浓度会影响出芽短梗霉细胞的形态,从而影响茁霉多糖的分泌^[16]。过高浓度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和酵母膏会导致多糖产量明显下降。这是因为氮源过多、酵母膏中生长刺激素量过大会促使生物量过度增长, NH_4^+ 激活磷酸激酶和丙酮酸酶促进了细胞过度生长,因消耗大量碳源而抑制多糖的合成。菌体生长与多糖生产是一对矛盾。菌体生长是多糖生产的基础,但菌体生长又消耗碳源、氮源,从而降低原料转化率。有研究表明,如果以 NH_4^+ 为唯一氮源,则必须在消耗完氮源以后,多糖才开始分泌,而以 NO_3^- 为氮源就没有这一现象^[10]。West 等研究发现以玉米糖浆或大豆蛋白水解液为氮源并不能促进 *A. pullulans* ATCC 201253 产生茁霉多糖;以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为氮源时,茁霉多糖含量增加,还发现以浓度 2.5% 玉米糖浆为碳源时,用玉米糖浆代替 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,茁霉多糖产量增加^[17]。

2.2.3 其他营养因子。有研究表明,维生素和矿物质是影响茁霉多糖分泌的营养因子之一。徐纯锡等认为,单独或同时加入硫胺素和生物素,都不能满足细胞生长和发酵的需要;由酵母膏或玉米糖浆提供多种维生素,才可促进多糖的产生^[18]。金属离子作为微量元素对茁霉多糖产量具有重要影响。 K^+ 和 PO_4^{3-} 能促进多糖的产生,其中 K^+ 的最佳作用浓度范围是 0.02 ~ 0.04 mol/L; Ca^{2+} 能抑制茁霉多糖酶活

力,使生产的多糖分子量较大,适宜浓度为 0.7 mg/L; Cu^{2+} 可促进黑色素的生成; Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 可抑制黑色素的生成^[10]。以蔗糖为底物的研究表明,如果在发酵体系中加入淀粉酶抑制剂,那么就可以抑制后期酶对茁霉多糖的分解,并且得到的茁霉多糖分子量较大^[2]。

3 在食品工业中的应用

3.1 在保鲜方面的应用 短梗霉多糖膜最特殊的性质是比其他高分子膜的透气性低,氧、氮、二氧化碳等气体几乎不能透过。短梗霉多糖膜作为食品保鲜膜广泛应用于水果、蔬菜、鸡蛋保鲜,特别是含油食品,如火腿、方便面、肉等。殷小梅等把短梗霉多糖用于温州蜜柑常温保鲜,结果表明用浓度 1% 茁霉多糖溶液涂膜的柑橘贮藏 140 d 后好果率仍达 85.95%,比用聚乙烯膜单果包装高 31.90%,有效延长柑橘采后寿命。鸡蛋保鲜中,在 15 ~ 25 °C 下,未做处理的鸡蛋保存 20 d 已不能食用,而短梗霉多糖处理后保鲜期延长 5 ~ 6 倍。有研究表明,以短梗霉多糖溶液为被膜剂,能有效防止海产品水分蒸发,抑制某些营养物质的氧化损耗,保持海产品的原有风味。徐金泽研究表明,短梗霉多糖对绿茶中茶多酚有较好的保护作用。周文化等将茁霉多糖应用于芒果的常温保鲜,发现经浓度 1% ~ 5% 茁霉多糖溶液涂膜的芒果的感官品质变化率、可溶性固形物和酸度等生理指标的变化率均低于未处理的芒果;浓度 3% 茁霉多糖溶液涂膜的芒果在贮藏 18 d 后,果实感官品质和生理指标均好于其他处理^[19]。

3.2 在食品加工方面的应用 短梗霉多糖溶液为中性,黏度受温度、pH 值的影响小,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,增稠效果明显优于其他多糖(如刺槐豆胶、卡拉胶)。最近,美国辉瑞公司将茁霉多糖用于生产一种新型健齿口香糖(如 Listerine Pocketpaks),已在欧美等地成为热销产品。煮饭时,添加相当于米量 0.05% 左右的茁霉多糖,能使饭粒保持蓬松;添加约 0.1% 的茁霉多糖,可有效保持焙烤碎鱼肉制品的形状,还能防止变质,特别是与各种天然多糖一起少量添加,有助于提高肉制品的黏着性和持水性。

参考文献

- [1] BERNIER B. The production of polysaccharides by fungi active in the decomposition of wood and forest litter [J]. Can J Microbiol, 1958, 4: 195 - 204.
- [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] 汤兴俊, 何国庆. 茁霉多糖的微生物发酵及在食品工业中的应用 [J]. 粮油加工与食品机械, 2002(7): 34 - 36.
- [4] 马霞, 关凤梅花, 王瑞明. 新型高分子材料——茁霉多糖 [J]. 中国酿造, 2005(2): 9 - 119.
- [5] 魏培莲. 微生物胞外多糖研究进展 [J]. 浙江科技学院学报, 2002, 14(2): 8 - 12.
- [6] 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.
- [7] 方宜均, 张英. 出芽短梗霉菌株紫外诱变及其发酵条件优化 [J]. 农业生物技术学报, 1998, 6(2): 124 - 128.
- [8] CHRISTOV L P, MYBURGH J, O' NEIL F H, et al. Modification of the carbohydrate composition of sulfite pulp by rebasidium pullulans [J]. Biotechnol Prog, 1999, 15(2): 196 - 200.
- [9] 崔堂兵, 郭勇, 郑德平. 出芽短梗霉的研究进展 [J]. 工业微生物, 2002, 32(2): 41 - 47.
- [10] 付湘晋, 童群义. 茁霉多糖的研究 [J]. 食品研究与开发, 2005, 25(6): 16 - 21.

3 寓禅于农,农中悟禅

将禅寓于农业的劳动之中,禅者又从农业劳动中,领悟禅理,是农禅区别于其他佛教宗派的最大特征。

传统意义的佛性,强调的是“有情即有佛性”,能否成佛的对象,是界定在有情物方面的,无情物则无法成佛。“无情有性说”扩大和丰富了佛性的范畴和意义,为农禅提供了理论依据。

自谋衣食是禅者的第一要务,其余都是次要的。因此,农作物等就是禅者要认知的对象,不谙农事,就不是悟道的禅僧。“祖问佛鉴:‘舒州熟否?’对曰:‘熟。’祖曰:‘太平熟否?’对曰:‘熟。’祖曰:‘诸庄共收稻多少?’佛鉴筹虑间。祖正色厉声曰:‘汝滥为一寺之主,事无巨细悉要究心。常住岁计,一众所系,汝犹罔知。’”^[12]“住心于农事”,就是禅,禅就是农。

从事农业劳动不仅仅是禅者的一种谋生的手段,更是作为触类见道、直指本心的修行方式。在劳动中悟修行,以修行促劳动。邓州香严智闲禅师,就是通过农业劳动而禅悟的。“祐和尚知其法器。欲激发智光。一日谓之曰:‘吾不问汝平生学解及经卷册子上记得者,汝未出胞胎未辨东西时本分事试道一句来,吾要记汝。’师懵然无对,沉吟久之,进数语,陈其所解。祐皆不许。师曰:‘却请和尚为说。’佑曰:‘吾说得是吾之见解,于汝眼目何有益乎?’师遂归堂,遍检所集诸方语句无一言可将酬对。乃自叹曰:‘画饼不可充饥。’于是尽焚之,曰:‘此生不学佛法也。且作个长行粥饭僧,免役心神。’遂泣辞泐山而去,抵南阳,睹忠国师遗迹,遂憩止焉。一日因山中芟除草木,以瓦砾击竹作声,俄失笑间,廓然惺悟。遽归沐浴焚香遥礼泐山赞云:‘和尚大悲,恩逾父母。当时若为我说却,何有今日事耶?’仍述一偈云:一击忘所知,更不假修治,动容扬古路,不堕悄然机。处处无踪迹,声色外威仪,诸方达道者,咸言上上机。’”^[13]

《传灯录》有潭州三角山总印禅师回答弟子的话,充分表明了农禅寓禅于农的特征。“僧问:‘如何是三宝?’师曰:‘禾、麦、豆。’曰:‘学人不会。’师曰:‘大众欣然奉持。’”^[14]。禅僧饥来吃饭,渴来喝水,看似愚夫凡子,实为任性逍遥,独立自由。通过日常的劳动生活,师傅指点学僧,学僧领悟禅道。“因普请撼地次,忽有一僧闻饭鼓鸣,举起撼头大笑便归。师云:‘俊哉!此是观音人理之门。’师归院,乃唤其僧问适来见什么道理便恁么。对曰:‘适来只闻鼓声动归吃饭去

来。’师乃笑。”^[15]

怀海的弟子灵佑,就是在随怀海作务中觉悟的。“一日侍立,百丈问:‘谁。’师曰:‘灵佑。’百丈云:‘汝拨镢中有火否?’师拨云:‘无火。’百丈躬起深拨,得少火,举以示之云:‘此不是火?’师发悟礼谢,陈其所解。”^[16]

农禅的修行方法,是对禅宗的传统的修行方法的一次改革,传统的禅修,重视“坐禅”,而不事劳作,所以,其禅修的境界并不高。而在劳动中的禅悟,则推动了僧人对禅悟更高一个层次的认知,因为它是建立在实践基础之上的禅悟。

农禅是禅宗在中国发展到一定历史时期的独特的一种现象。农禅僧人,定居山林,单纯地从事农业劳动,不事手工业和商品生产,以求生存上的自立,就农禅的本质而言,它仍然是小农经济形态。由于农禅寺院的分布的相对分散,每一禅林的农业生产又是孤立的,因此,生产体制也是封闭的,生产规模就显得相对狭小的。但它有一套行之有效的禅门制度,并与封建经济基础相适应,又远离政治、商业中心,就减少了世间纷争,保证了禅者的纯洁性,从而促进禅宗在中国的大力发展。

参考文献

- [1] 杨曾文. 六祖坛经[M]. 北京:宗教文化出版社,2001:181.
- [2] 道宣. 续高僧传(卷16)[M]. 台北:财团法人佛陀教育基金会出版部,1990:552.
- [3] 杨曾文. 六祖坛经[M]. 北京:宗教文化出版社,2001:178.
- [4] 佚名. 历代法宝记[C]//大正新修大藏经(卷51). 台北:财团法人佛陀教育基金会出版部,1990:182.
- [5] 陈诩. 唐洪州百丈山故怀海禅师塔铭[M]//周绍良. 《全唐文新编》第八册,卷四百四十六. 吉林:吉林文史出版社,2000:5225.
- [6] 赞宁. 《宋高僧传》卷第十[M]. 北京:中华书局,1987:236,256.
- [7] 净觉. 楞伽师资记[M]. 台北:财团法人佛陀教育基金会出版部,1990:1289.
- [8] 中华佛教. 佛垂般涅槃略说教诫经[M]. 台北:财团法人佛陀教育基金会出版部,1990:1110.
- [9] 僧祐高僧传(卷5)[C]//汤用彤全集(卷6). 石家庄:河北人民出版社,2000:145.
- [10] 僧祐. 弘明集(卷5)[M]. 台北:财团法人佛陀教育基金会出版部,1990:35.
- [11] 静. 筠禅师. 《祖堂集》卷第十四[M]. 郑州:中州古籍出版社,2001:485.
- [12] 净善. 禅林宝训(卷1)[M]. 台北:财团法人佛陀教育基金会出版部,1990:1019.
- [13] 释道元. 《景德传灯录》卷第十一[M]. 成都:成都古籍书店,2000:189.
- [14] 释道元. 《景德传灯录》卷第七[M]. 成都:成都古籍书店,2000:108.
- [15] 释道元. 《景德传灯录》卷第六[M]. 成都:成都古籍书店,2000:105.
- [16] 释道元. 《景德传灯录》卷第九[M]. 成都:成都古籍书店,2000:141.

(上接第 10185 页)

- [11] SCHUSSTER R, WENZIG E, MERSMANN A. Production of the fungal exopolysaccharide pullulan by batchwise and continuous fermentation [J]. Appl Microbiol Biotech, 1993, 39:155-158.
- [12] BADR-ELDIN S M, EL-TAYEB O M, EL-MASRY H, et al. Polysaccharide production by *Aureobasidium pullulans* [J]. World J Microbiol Biotech, 1994, 10(4):423-426.
- [13] MADI N S, MCNEIL B, HARVEY L M. Effect of manganese on polysaccharide production and cellular pigmentation in the fungus *Aureobasidium pullulans* [J]. World J Microbiol Biotech, 1997, 13(2):233-235.
- [14] LAZARIDOU A, ROUKAS T, BILLADERIS G C, et al. Characterization of pullulan produced from beet molasses by *Aureobasidium pullulans* in a stirred tank reactor under varying agitation [J]. Enzyme and Microbi-

- al Technology, 2002, 31:122-132.
- [15] LE DUY A, BOA J M. Pullulan production from peat hydralzyate [J]. Can J Microbiol, 1983, 29:143-146.
- [16] 周文化, 唐冰, 钟秋平. 短梗霉多糖的微生物发酵及其在食品工业中的应用 [J]. 食品与机械, 2004, 20(2):56-59.
- [17] WEST T P, REED H B. Effect of pH on pullulan production in relative to carbon source and yeast extract composition of growth medium [J]. Mi Crobios, 1993, 75:75-82.
- [18] 徐纯锡, 王世桌, 徐冠珠, 等. 卜多糖发酵条件试验 [J]. 应用微生物, 1983(4):109-112.
- [19] 周文化, 钟秋平, 周晓媛. 茁霉多糖在芒果常温保鲜中的应用 [J]. 中南林学院学报, 2005, 25(3):63-67.