

# 出芽短梗霉发酵产 liamocin 的培养条件研究

David Machaku<sup>1</sup>, 周丹凤<sup>1</sup>, 林琳<sup>1</sup>, 司振军<sup>3</sup>, 刘士旺<sup>1,2</sup>, 魏培莲<sup>1,2</sup>

(1. 浙江科技学院 生物与化学工程学院, 杭州 310023; 2. 浙江省农产品化学与生物加工技术  
重点实验室, 杭州 310023; 3. 浙江大学 生物工程研究所, 杭州 310027)

**摘要:** liamocin 是出芽短梗霉(*Aureobasidium pullulans*)的某些菌株在发酵过程中分泌的一种多元醇酯, 现已证明其具有抗肿瘤、抗菌、表面活性剂等多种作用。我们筛选获得一株出芽短梗霉 liamocin 高产菌株, 对其产 liamocin 的发酵条件进行初步研究, 并建立了一种滤纸片法测定 liamocin 含量的简便方法。研究结果显示: 菌株以葡萄糖、蔗糖、木糖作碳源, 都可以有效产生 liamocin; 酵母提取物、硝酸钠、玉米浆是比较适合的氮源; 发酵过程中培养基 pH 值变化较大, 培养基初始 pH 值为 4~8 时, liamocin 都可以较好地产出; 培养基装量对 liamocin 产量的影响较大。该研究结果可为 liamocin 发酵条件的进一步优化提供参考。

**关键词:** 出芽短梗霉; 重油; liamocin; 发酵

中图分类号: Q93-335

文献标志码: A

文章编号: 1671-8798(2017)06-0414-05

## Fermentative production of liamocin by *Aureobasidium pullulans*

David Machaku<sup>1</sup>, ZHOU Danfeng<sup>1</sup>, LIN lin<sup>1</sup>, SI Zhenjun<sup>3</sup>, LIU Shiwang<sup>1,2</sup>, WEI Peilian<sup>1,2</sup>

(1. School of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology,  
Hangzhou 310023, Zhejiang, China; 2. Zhejiang Provincial Key Laboratory for Chemical and  
Biological Processing Technology of Farm Produce, Hangzhou 310023, Zhejiang, China;  
3. Institute of Biological Engineering, College of Chemical and Biological Engineering,  
Zhejiang University, Hangzhou 310027, Zhejiang, China)

**Abstract:** Liamocin, a kind of polyol lipid produced by some strains of *Aureobasidium pullulans* during fermentation, has been proved to have anticancer activity, antibacterial activity and can function as biosurfactant. The research screened out a high-producing strain of liamocin, conducted a preliminary study on media and culture conditions for liamocin production, and developed a simple method for determining the amount of liamocin by filter paper. The results

收稿日期: 2017-05-12

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(LY15C200014)

通信作者: 魏培莲(1976—), 女, 山东省邹城人, 副教授, 博士, 主要从事微生物菌种选育与发酵工程研究。E-mail: weipeilian@126.com。

showed that glucose, sucrose and xylose were efficient carbon sources, and yeast extract,  $\text{NaNO}_3$  and corn steep liquor were efficient nitrogen sources for liamocin production. During the fermentation, pH value of the media changed greatly, with the initial pH of media ranged from 4 to 8, liamocin could be efficiently produced. Moreover, the filling volume of the media affected the production of liamocin greatly. This study has paved a foundation for further fermentation optimization of liamocin fermentation conditions.

**Keywords:** *Aureobasidium pullulans*; heavy oils; liamocin; fermentation

出芽短梗霉(*Aureobasidium pullulans*)广泛用于普鲁兰多糖(pullulan)<sup>[1-3]</sup>和聚苹果酸(poly malic acid)<sup>[4-5]</sup>的生产,1993年日本的 Nagata 等<sup>[6]</sup>在研究出芽短梗霉发酵产聚苹果酸时,发现某些菌株可分泌一种密度比水重的多元醇酯。该物质在静止时沉在培养基的底部,因此又称重油(heavy oil),后被称作 liamocin。结构分析显示该多元醇酯头部基团为甘露醇或阿拉伯醇,尾部为 3,5-二羟基癸酸的三联体或四联体<sup>[7-8]</sup>。现已证明该多元醇酯具有抗肿瘤<sup>[9-10]</sup>、抗菌<sup>[11]</sup>、表面活性剂<sup>[10,12]</sup>等多种作用,具有广泛的应用前景。目前出芽短梗霉发酵产 liamocin 的研究刚刚起步,已有研究主要集中在结构鉴定、生物活性测定等方面,关于发酵条件的研究非常少。Price 等<sup>[13]</sup>研究了不同糖和多元醇作为碳源对出芽短梗霉菌株 NRRL50380 产 liamocin 的影响,结果表明包括葡萄糖、蔗糖、木糖、果糖等在内的多种糖都可以产 liamocin,其中以蔗糖的产量较高。使用不同碳源时,liamocin 的结构有所不同,其结构主要与多元醇有关,与尾部的关系不大。Leathers 等<sup>[14]</sup>对出芽短梗霉以燕麦木聚糖、玉米纤维、小麦秸秆水解物等生物质发酵产 liamocin 进行了研究,结果表明,燕麦木聚糖和小麦秸秆水解物可以较好地生产 liamocin。以上主要是关于碳源的研究,而其他发酵条件诸如氮源、pH 值、溶氧等对 liamocin 的影响尚缺乏系统的研究。本课题组在进行聚苹果酸发酵研究的时候分离到一株产 liamocin 的菌株,为提高其发酵产量,对其发酵条件进行了初步研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 微生物

出芽短梗霉(*Aureobasidium pullulans*)(本实验室筛选保存),马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)冰箱斜面保存,每2个月转接1次。

### 1.2 培养基

#### 1.2.1 斜面保藏培养基

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA):马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,水 1 000 mL,琼脂 15~20 g,pH 值自然。

#### 1.2.2 种子培养基

葡萄糖 50 g,蛋白胨 1 g,酵母提取物 1 g, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.4 g,NaCl 1 g,水 1 000 mL。

#### 1.2.3 摇瓶发酵培养基

葡萄糖 50 g,蛋白胨 0.6 g,酵母提取物 0.6 g, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.4 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.4 g,NaCl 1 g,水 1 000 mL。其中,在进行碳源优化时,其他成分均不变,使用质量浓度 50 g/L 的不同碳源;在进行氮源优化时,其他成分均不变,使用质量浓度 1 g/L 的不同氮源。

### 1.3 培养方法

#### 1.3.1 斜面培养

菌种接种于 PDA 培养基,28 ℃培养箱中培养 2 d 备用。

#### 1.3.2 种子培养

250 mL 三角烧瓶装入 50 mL 培养基,接入两环培养好的斜面菌种,于 28 ℃、180 r/min 摇床培养 2 d。

#### 1.3.3 摇瓶发酵培养

250 mL 三角烧瓶装入 50 mL 培养基,接入 2 mL 培养好的种子培养液,于 28 ℃、180 r/min 摇床培

养 8 d。培养基装量在优化时有所不同。所有试验均做 3 个摇瓶,结果取平均值。

#### 1.4 pH 值的测定

用数显台式酸度计(上海越平 PHS-3C)进行测定。

#### 1.5 liamocin 的测定方法

liamocin 的测定采取滤纸吸取称重法。滤纸在 60 ℃ 的烘箱中烘干至恒重,称取滤纸重量得  $W_1$ 。摇瓶发酵结束后室温静置 1 h,使 liamocin 沉淀聚集在摇瓶底部,小心地将上层清液缓慢倒出,然后加入少量蒸馏水轻轻摇晃洗涤 liamocin,静置几分钟,将上层清液小心地倒出,如此反复洗涤 3~5 次,使上层清液澄清为止。将预先干燥的滤纸过滤吸取 liamocin,尽量使 liamocin 完全吸收到滤纸上去,然后将含有 liamocin 的滤纸片置于 60 ℃ 的烘箱中烘 3~4 h,称重得到  $W_2$ 。发酵液中 liamocin 质量浓度的计算公式为:liamocin 质量浓度(g/L) =  $(W_2 - W_1)$  / 摇瓶中发酵液体积 × 1 000,其中  $(W_2 - W_1)$  / 摇瓶中发酵液体积为每毫升发酵液中的 liamocin 克数,换算成 1 L 中的含量则乘以 1 000。

## 2 结果与讨论

### 2.1 liamocin 测定方法的建立

liamocin 的测定文献中均采用有机溶剂提取法<sup>[8,10]</sup>,即发酵结束后用甲基乙基酮提取发酵液及菌体中的 liamocin,先用脱水剂除去 liamocin 中的水,然后采用旋转蒸发或气流干燥的方法将有机溶剂除去,最后称重。这种方法操作比较复杂,所需时间也较长,不太适合发酵优化时进行大量样品的测定。根据 liamocin 的特点,本课题组建立了一种较为简单快速的方法,即滤纸片吸取称重法,其具体操作流程和条件见 1.5 节。该方法仅吸取发酵液中的 liamocin 进行测定,而菌体中尚未分泌出来的 liamocin 则无法测定。因此,相对于有机溶剂提取法,该方法测定的数值会偏低。另外,该方法是根据干燥前后的重量差来计算 liamocin 含量的,因此,干燥条件的控制可能会影响最终的测定结果。但只要严格控制固定的干燥条件,该方法用于发酵优化中 liamocin 的测定还是可行的。图 1 和图 2 分别为发酵液中和滤纸吸取后 liamocin 的状态。



图 1 发酵液中 liamocin 的状态

Fig. 1 Liamocin in the broth

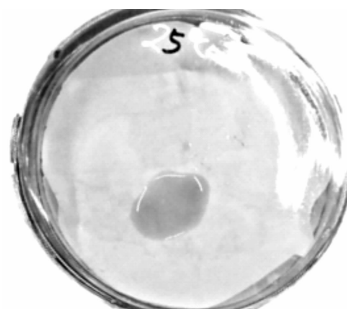


图 2 滤纸吸取后 liamocin 的状态

Fig. 2 Liamocin in the filter paper

### 2.2 liamocin 发酵条件的优化

#### 2.2.1 不同碳源对 liamocin 产量的影响

分别以质量浓度 50 g/L 的葡萄糖、蔗糖、木糖、麦芽糖、果糖和阿拉伯糖为碳源进行摇瓶发酵试验,其产 liamocin 情况见表 1。

由表 1 可知,麦芽糖作碳源的时候 liamocin 的产量最高,木糖、蔗糖和葡萄糖作碳源时,菌株也能较好地产生 liamocin,产量均在 2.5~3.5 g/L,而果糖和阿拉伯糖的产量则较低,因此不适合产生 liamocin。从发酵过程来看,虽然麦芽糖为碳源 liamocin 产量最高,但麦芽糖并不是最先产生 liamocin 的。葡萄糖和蔗糖先于麦芽糖产生 liamocin,但发酵结束时产量却不高。分析其原因可能是在发酵后期,由于碳源的缺乏,liamocin 被作为一种备用碳源而被利用。目前,已有文献主要使用葡萄糖<sup>[8]</sup>和蔗糖<sup>[7,15]</sup>作为碳源,其中尤以蔗糖为多。由表 1 可以看出,木糖作为碳源也能够较好地产生 liamocin,虽然麦芽糖的产量比较高,但因其价格较高,不太适合大规模生产的需要。因此,出芽短梗霉产 liamocin 的适宜碳源可选用葡萄

糖、蔗糖和木糖。

表 1 发酵过程中不同糖产 liamocin 的情况

Table 1 Liamocin production in the fermentation process with different carbon sources

发酵时间/d	不同碳源的 liamocin 产量/(g · L <sup>-1</sup> )					
	葡萄糖	蔗糖	木糖	麦芽糖	果糖	阿拉伯糖
1	—	—	—	—	—	—
2	—	—	—	—	—	—
3	—	—	—	—	—	—
4	—	—	—	—	—	—
5	✓	—	—	—	—	—
6	✓	✓	—	—	—	—
7	✓	✓	✓	✓	—	—
8	2.66±0.25	2.99±0.65	3.27±0.17	3.70±0.43	1.59±0.47	0.45±0.03

注：“✓”表示有肉眼可见的 liamocin 产生；“—”表示无肉眼可见的 liamocin 产生，表 2 同。

2.2.2 不同氮源对 liamocin 产量的影响

以质量浓度 50 g/L 的葡萄糖作为碳源，分别以质量浓度 1 g/L 的酵母提取物、硝酸钠、玉米浆、牛肉膏、蛋白胨和硫酸铵为氮源进行摇瓶发酵试验，其产 liamocin 情况见表 2。

由表 2 可知，在所试验的氮源中，酵母提取物、硝酸钠和玉米浆作氮源时，菌株能够较好地产生 liamocin，牛肉膏、蛋白胨和硫酸铵作氮源时菌株则不产生 liamocin。酵母提取物、硝酸钠也被其他研究者<sup>[8]</sup>广泛用于 liamocin 的生产，蛋白胨也在使用，但通常是与酵母提取物一起使用<sup>[7,15]</sup>。氮源对 liamocin 产量的影响比较复杂，不仅仅受氮源种类的影响，氮源质量浓度、C/N 比值，甚至不同氮源使用导致的菌体量生长情况、培养基 pH 值变化等都会影响产量。因此，今后有必要对氮源的影响作进一步研究。

2.2.3 培养基初始 pH 值对 liamocin 产量的影响

调整培养基的初始 pH 值分别为 4、5、6、7、8 进行发酵试验，发酵结束时测定 liamocin 产量和发酵液 pH 值，测定结果见表 3。

由表 3 可知，培养基初始 pH 值在 4~8 范围内对 liamocin 产量的影响并不是很大，初始 pH 值为 8 时产量略高于其他 pH 值。对发酵结束时的 pH 值进行测定，结果表明在发酵过程中，培养基的 pH 值变化幅度比较大，无论初始 pH 值为多少，发酵结束时培养基的 pH 值均降到 3~4 之间，这在一定程度上解释了为什么初始 pH 值对 liamocin 的产量影响不大。因摇瓶发酵无法在线进行 pH 值的调节，pH 值对 liamocin 产量的影响有待通过发酵罐培养进一步研究。

2.2.4 培养基装量对 liamocin 产量的影响

以 250 mL 三角烧瓶进行摇瓶培养，调整培养基装量分别为 30、40、50、60 mL，发酵结果见表 4。由表 4 可见，随着培养基装量的增加，liamocin 产量有明显的下降趋势，此结果揭示溶解氧可能对 liamocin 的产生具有较大的影响。但目前文献中尚无关于装量或溶解氧情况对 liamocin 发酵影响的报道，因此，此结论有待通过发酵罐发酵进一步验证。

表 2 氮源种类对 liamocin 产量的影响

Table 2 Effects of nitrogen sources on liamocin production

氮源	liamocin 产量/(g · L <sup>-1</sup> )
酵母提取物	3.08±0.08
硝酸钠	3.37±0.16
玉米浆	2.91±0.07
牛肉膏	—
蛋白胨	—
硫酸铵	—

表 3 培养基初始 pH 值对发酵的影响

Table 3 Effects of initial pH of media on liamocin production

培养基初始 pH 值	liamocin 产量/(g · L <sup>-1</sup> )	发酵结束时 pH 值
4	2.74±0.17	3.02±0.01
5	2.52±0.05	3.29±0.03
6	2.37±0.02	3.42±0.01
7	2.57±0.11	3.61±0.03
8	3.05±0.02	3.72±0.08

表 4 培养基装量对 liamocin 产量的影响

Table 4 Effects of the media filling volume on liamocin production

培养基装量/mL	liamocin 产量/(g · L <sup>-1</sup> )
30	3.99±0.58
40	2.70±0.08
50	2.22±0.14
60	1.94±0.21

### 3 结 论

本研究建立了一种滤纸片快速测定 liamocin 含量的方法,该方法比有机溶剂提取法操作简便,更适用于发酵优化时大批量样品的测定。通过发酵条件的初步研究,得到了适合 liamocin 发酵的一些基本数据:葡萄糖、蔗糖、木糖作碳源,菌株都可以有效产生 liamocin,氮源以酵母提取物、硝酸钠、玉米浆较好,发酵过程中培养基 pH 值变化较大,发酵过程中 pH 值的及时有效控制有可能进一步提高 liamocin 产量,培养基装量对 liamocin 产量的影响较大。该研究结果为 liamocin 发酵条件的进一步优化提供了参考。但该研究结果均为摇瓶发酵得到,因摇瓶发酵中 pH 值、溶解氧等均无法在线监测和调节,有些结论还需要通过发酵罐发酵进一步验证。

#### 参考文献:

- [1] CHI Z, WANG F, CHI Z, et al. Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 82(5): 793.
- [2] LI Y, CHI Z, WANG G Y, et al. Taxonomy of *Aureobasidium spp.* and biosynthesis and regulation of their extracellular polymers[J]. Critical Reviews in Microbiology, 2015, 41(2): 228.
- [3] SINGH R S, SAINI G K, KENEDY J F. Pullulan: microbial sources, production and applications[J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 73(4): 515.
- [4] LEATHERS T D, MANITCHOTPISIT P. Production of poly( $\beta$ -L-malic acid) (PMA) from agricultural biomass substrates by *Aureobasidium pullulans* [J]. Biotechnology Letters, 2013, 35(1): 83.
- [5] WEI P L, CHENG C, LIN M, et al. Production of poly(malic acid) from sugarcane juice in fermentation by *Aureobasidium pullulans*: kinetics and process economics[J]. Bioresource Technology, 2017, 224: 581.
- [6] NAGATA N, NAKAHARA T, TABUCH T. Fermentative production of PMA, a polyelectrolytic biopolyester by *Auerobasidium sp.* [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 1993, 57(4): 638.
- [7] PRICE N P J, MANITCHOTPISIT P, VERMILLION K E, et al. Structural characterization of novel extracellular liamocins(mannitol oils) produced by *Aureobasidium pullulans* strain NRRL 50380[J]. Carbohydrate Research, 2013, 370: 24.
- [8] KUROSAWA T, SAKAI K, NAKAHARA T, et al. Extracellular accumulation of the polyol lipids, 3, 5-dihydroxydecanoyl and 5-hydroxy-2-decanoyl esters of arabitol and mannitol, by *Aureobasidium sp.* [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 1994, 58(11): 2057.
- [9] ISODA H, NAKAHARA T. Antiproliferative effect of polyol lipids, 3, 5-dihydroxydecanoyl and 5-hydroxy-2-decanoyl esters of arabitol and mannitol on lung cancer cell line A549[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1997, 84(5): 403.
- [10] MANITCHOTPISIT P, PRICE N P J, LEATHERS T D, et al. Heavy oils produced by *Aureobasidium pullulans* [J]. Biotechnology Letters, 2011, 33(6): 1151.
- [11] BISCHOFF K M, LEATHERS T D, PRICE N P J, et al. Liamocin oil from *Aureobasidium pullulans* has antibacterial activity with specificity for species of *Streptococcus* [J]. Journal of Antibiotics, 2015, 68(10): 642.
- [12] KIM J S, LEE I K, YUN B S. A novel biosurfactant produced by *Aureobasidium pullulans* L3-GPY from a tiger lily wild flower, *lilium lancifolium thunb* [J]. Plos One, 2015, 10(4): e0122917.
- [13] PRICE N P J, BISCHOFF K M, LEATHERS T D, et al. Polyols, not sugars, determine the structural diversity of anti-streptococcal liamocins produced by *Aureobasidium pullulans* strain NRRL 50380 [J]. Journal of Antibiotics, 2016, 70(2): 1.
- [14] LEATHERS T D, PRICE N P J, MANITCHOTPISIT P, et al. Production of anti-streptococcal liamocins from agricultural biomass by *Aureobasidium pullulans* [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2016, 32(12): 199.
- [15] MANITCHOTPISIT P, WATANAPOKASIN R, PRICE N P J, et al. *Aureobasidium pullulans* as a source of liamocins (heavy oils) with anticancer activity [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2014, 30(8): 2199.