

# 复合诱变选育短梗霉多糖高产菌株

王兴华<sup>1</sup>, 韩丛琴<sup>2,\*</sup>

(1.山西大学生命科学学院, 山西 太原 030006; 2.山西大学生物技术研究所, 山西 太原 030006)

**摘 要:** 以本实验室保存的出芽短梗霉 AP8 为出发菌株, 采用甲基磺酸乙酯(EMS)和紫外线(UV)复合诱变, 在 EMS 终浓度 0.4mol/L、作用时间 40~60min 和 30W 的紫外灯照射距离 30cm、照射时间 1.5~2.5min 条件下诱变效果好, 获得一株稳定遗传的多糖产量高、色素含量低的出芽短梗霉突变株 UV60, 产量为 22.1g/L, 对菌落特征和发酵特征的比较发现, 突变株 UV60 在菌落颜色、大小、质地和发酵特性上均明显优于出发菌株 AP8。通过对变异株培养基碳氮比和培养基的组成进行单因素和正交试验, 其最佳摇瓶发酵培养基组成为: 蔗糖 50.0g/L、酵母膏 1.5g/L、NaCl 1.5g/L、MgSO<sub>4</sub> 0.3g/L、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.0g/L、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.7g/L。采用上述优化的发酵培养基, 突变株 UV60 获得的短梗霉多糖产量为 27.24g/L, 多糖转化率达 54.48%。

**关键词:** 出芽短梗霉; 诱变; 多糖; 发酵

## Combined Mutation Screening of High Yield Strain for Pullulan Production

WANG Xing-hua<sup>1</sup>, HAN Cong-qin<sup>2,\*</sup>

(1. School of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China;

2. Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

**Abstract:** *Aureobasidium pullulans* AP8, an original strain conserved in our laboratory, was treated with both EMS (ethyl methyl sulfonate) and UV (ultraviolet) to screen a high yield strain for pullulan production. The best mutation results were obtained through EMS treatment for 40—60 min at a final concentration of 0.4 mol/L followed by UV irradiation for 1.5—2.5 min at a distance of 30 cm. A genetically stable mutant named as UV60 was obtained which is high in pullulan production (22.1 g/L) and low in pigment content. The mutant strain was markedly superior to the starting strain AP8 in terms of colony color, size and texture as well as fermentation performance. Using one-factor-at-a-time and orthogonal array design methods, the optimal shake fermentation medium for this mutant to produce pullulan was composed of 50.0 g/L sugar, 1.5 g/L yeast extract, 1.5 g/L NaCl, 0.3 g/L MgSO<sub>4</sub>, 2.0 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 0.7 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, resulting in a pullulan yield of 27.24 g/L and a conversion rate of 54.48% for polysaccharides.

**Key words:** *Aureobasidium pullulans*; mutation; polysaccharide; fermentation

中图分类号: Q933

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)17-0188-05

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, 其分子是由麦芽三糖以  $\alpha$ -1,6-糖苷键连接而成的高分子线状多糖<sup>[1-2]</sup>。由于这一特点, 普鲁兰多糖具有安全、无毒、耐热、耐盐、耐酸碱、可塑性强、成膜性好、阻氧能力强, 受季节、气候影响不大等独特的理化和生物学特性, 因此被广泛用于食品包装、医药制造、水果和海产品保鲜、化妆品工业、农业种子保护和烟草制造工业众多领域,

为众多科学家所关注, 是一种极具开发价值和应用前景的多功能性的新型生物制品<sup>[1,3-4]</sup>。

将短梗霉多糖浸泡或喷涂于食品表面具有无色、无味、抗菌、透明及抗氧保鲜的作用, 如在鸡蛋保鲜中, 在 15~25℃ 条件下, 未做处理的鸡蛋保存 20d 已不能食用, 而用 1% 短梗霉多糖溶液处理后, 同样条件下, 保鲜期延长 5~6 倍<sup>[5]</sup>。作为食品添加剂可赋予其特殊的质量, 如降低热量、改善口感、赋予色彩及防止干化氧化等, 如在高盐食品中使用短梗霉多糖可起到增稠效

收稿日期: 2011-07-07

基金项目: 山西省高校科技研究开发项目(20091002)

作者简介: 王兴华(1958—), 男, 副教授, 本科, 研究方向为微生物代谢与发酵工程。E-mail: xhwang@sxu.edu.cn

\*通信作者: 韩丛琴(1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为微生物代谢与发酵工程。E-mail: hancongqin0403@gmail.com

果, 能够使酱油、调味品、熬煮食品、腌菜等增稠、增光泽和防止离浆<sup>[6]</sup>。

在发酵过程中, 出芽短梗霉会分泌出与黑色素类似的黑色或墨绿色物质, 这种物质牢固地黏附在短梗霉多糖上, 很难用一般方法除去, 限制了短梗霉多糖的应用<sup>[1,7-9]</sup>。本实验通过对出芽短梗霉进行紫外线和甲基磺酸乙酯(ethyl methanesulfonate, EMS)诱变, 旨在从根本上解决色素问题, 并且使多糖的产率也有所提高, 为工业化生产短梗霉多糖提供基础研究数据和可借鉴的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种、培养基与试剂

本实验室保存的出芽短梗霉 AP8。

菌种活化培养基: PDA 固体培养基<sup>[10]</sup>; 液体种子培养基: PDA 液体培养基<sup>[10]</sup>; 液体发酵培养基(g/L): 蔗糖 50.0、酵母膏 1.5、NaCl 1.5、MgSO<sub>4</sub> 0.2、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.0、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.6, pH 6.5, 115℃灭菌 30min。

甲基磺酸乙酯(EMS) 美国 Sigma 公司; 硫代硫酸钠(Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) 河北省保定化学试剂厂。

### 1.2 诱变

#### 1.2.1 孢子悬液的制备

将斜面菌种接种于 100mL 液体种子培养基中, 28℃、180r/min 培养 30h, 经 4000r/min 离心 30min, 将沉淀移入装有玻璃珠的生理盐水的三角瓶中振荡 20min, 打碎孢子团块。用血球计数板对孢子进行计数, 调整孢子浓度到约 10<sup>8</sup> 个/mL, 制成供诱变处理的孢子悬液。

#### 1.2.2 EMS 诱变处理

取以上制备好的孢子悬液 50mL 于装有转子的三角瓶中, 加入 0.4mol/L EMS 诱变剂, 将三角瓶放到磁力搅拌器上, 于 10、20、30、40、50、60、70、80、90min 取样, 用 2% 硫代硫酸钠终止反应。将处理后的孢子悬液梯度稀释, 然后取 0.1mL 样品涂布于平板上, 28℃避光培养 3d, 计算每个平板中的菌落个数及致死率。以同样操作, 用未经 EMS 诱变的孢子稀释液涂布平板作对照。其中致死率和正突变率按公式(1)、(2)计算。

$$\text{致死率}/\% = \frac{\text{诱变前活菌数}/(\text{CFU/mL}) - \text{诱变后存活菌数}/(\text{CFU/mL})}{\text{诱变前总菌数}/(\text{CFU/mL})} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{正突变率}/\% = \frac{\text{正突变菌数}/(\text{CFU/mL})}{\text{总菌数}/(\text{CFU/mL})} \times 100 \quad (2)$$

#### 1.2.3 紫外诱变处理

取以上制备好的孢子悬液 5mL 于直径 9cm 的内有转子的灭菌平皿中。30W 紫外灯打开预热 20min, 将盛有孢子悬液的平皿放到磁力搅拌器上, 距离灯管 30cm, 打

开皿盖, 边搅拌边照射。采用间歇法取样, 即在紫外光下, 1min 为间隔, 分别于 1、2、3、4、5、6min 取样, 将处理后的孢子悬液梯度稀释, 然后取 0.1mL 样品涂布于平板上, 28℃避光培养 3d, 计算每个平板中的菌落个数及致死率。以同样操作, 用未经紫外线照射的孢子稀释液涂布平板作对照。其中致死率和正突变率计算同 EMS 诱变处理。

#### 1.2.4 突变株的筛选<sup>[11]</sup>

菌落初筛: 28℃避光培养 3d 后, 观察菌落生长并统计菌落数。挑取菌落直径大、表面湿润、颜色淡化的菌株斜面保存。

摇瓶初筛: 将菌落初筛获得的变异菌株接种于发酵培养基中, 28℃摇瓶培养 5d, 每株 1 瓶, 选取多糖产量较对照提高 5% 以上或色素含量明显减少的突变菌株, 进行下一步摇瓶复筛。

摇瓶复筛: 将摇瓶初筛选出的变异菌株继续摇瓶培养, 每株 3 瓶, 选出多糖产量最高的 1 株。

#### 1.2.5 遗传稳定性实验

将变异株连续传代培养发酵 5 代, 测定突变株的多糖产量和色素含量, 分析传代前后产量的变化。

### 1.3 培养及分析方法

取 28℃培养 3d 的斜面菌种一环, 接种于 100mL 液体种子培养基中, 28℃、180r/min 摇瓶培养 30h 达到对数期, 即为种子液; 然后以 2% 接种量转接于发酵培养基, 500mL 三角瓶装 100mL, 28℃、180r/min 摇瓶培养 5d。

#### 1.3.1 多糖含量测定

将发酵液于 4000r/min 离心 20min, 分离上清液与菌体沉淀, 将上清液加入 2 倍体积的无水乙醇, 振荡摇匀, 4℃静置过夜, 使多糖充分沉淀, 再 4000r/min 离心 15min, 弃上清, 沉淀依次用无水丙酮、无水乙醚洗涤, 加入适量的水溶解, 用苯酚-硫酸法测定发酵液中的多糖含量<sup>[12-13]</sup>。

$$\text{多糖产量}/(\text{g/L}) = \frac{\text{多糖含量}/\text{g}}{\text{发酵液体积}/\text{L}} \quad (3)$$

$$\text{多糖转化率}/\% = \frac{\text{发酵液多糖产量}/(\text{g/L})}{\text{培养基蔗糖含量}/(\text{g/L})} \times 100 \quad (4)$$

#### 1.3.2 生物量测定

将发酵液在 4000r/min 条件下离心 20min, 沉淀的菌体用蒸馏水洗涤离心 2 次于 100℃条件下干燥至恒质量, 用称质量法测定生物量。

$$\text{生物量}/(\text{g/L}) = \frac{\text{菌体干质量}/\text{g}}{\text{发酵液体积}/\text{L}} \quad (5)$$

### 1.3.3 色素相对含量测定

采用分光光度计测定提取多糖后的溶液中的色素。以蒸馏水为空白, 波长扫描, 波长调至最大透光率(654nm), 再在此波长处测各发酵液在4000r/min离心20min去菌体后上清液的吸光度, 以吸光度表示黑色素的相对含量<sup>[14]</sup>。

### 1.3.4 pH值测定

采用pH计测定。

## 1.4 发酵培养基的优化

培养基成分是微生物生长和发酵代谢产物的物质基础。在调节培养基组成和各组分比例时, 既要考虑到满足机体生长的需要, 又要有利于代谢产物的形成<sup>[15]</sup>。所以为了研究发酵培养基中不同组分对短梗霉的生长和多糖生产的影响, 以多糖产量作为指标对酵母膏、MgSO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>设计四因素三水平(L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>))正交试验, 得到培养基各组分的最优配比。

## 2 结果与分析

### 2.1 EMS对出芽短梗霉诱变结果

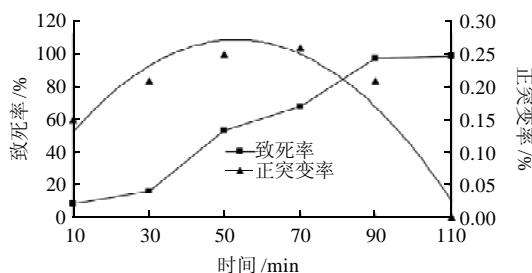


图1 菌株EMS诱变的致死率和正突变率曲线

Fig.1 Lethal rate and positive mutant rate curves of *Aureobasidium pullulans* induced by EMS

由图1可知, 10~30min时, 致死率曲线上升缓慢, 说明此时致死率低。之后随EMS作用时间的延长, 致死率逐渐增加, 90min时达到98%, 之后基本不变, 所以该菌株对EMS诱变是敏感的, 可以用该方法进行菌种诱变筛选。在此时间内, 菌株的正突变率在30~70min时达到最大, 而10~30min正突变率为升高, 70~110min时, 正突变率是逐渐下降的, 最终接近于0。因此, 采用浓度为0.4mol/L的EMS诱变处理孢子悬浮液40~60min。

### 2.2 紫外线对出芽短梗霉的诱变结果

由图2可知, 1~2min时, 致死率曲线上升缓慢, 说明此时致死率低。随后随紫外照射时间的延长, 致死率逐渐增加, 5min时达到98%, 之后基本不变, 所以该菌株对紫外诱变是敏感的。在此时间内, 菌株的

正突变率在2min时达到最大, 而1~2min正突变率为升高, 2~5min时, 正突变率是逐渐下降的, 最终接近于0。综上, 采用紫外线诱变处理的条件为: 30W的紫外灯照射距离30cm、照射时间1.5~2.5min。

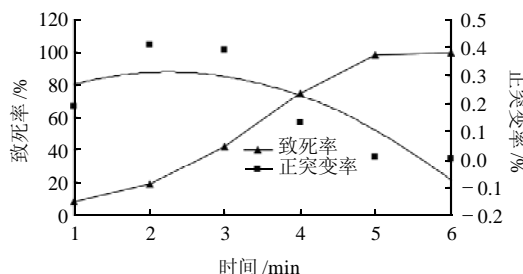


图2 菌株紫外诱变的致死率和正突变率曲线

Fig.2 Lethal rate and positive mutant rate curves of *Aureobasidium pullulans* induced by UV

### 2.3 出发菌株AP8和各突变菌株的比较

以出发短梗霉AP8为出发菌株, 采用EMS和紫外复合诱变(先进行了一次EMS诱变, 再进行两次紫外诱变)的方法对其进行诱变和筛选, 最终得到突变株UV60。在诱变过程中前一次诱变的最优菌株培养并用于下一次的诱变。

采用观察菌落特征的方法筛选多糖产量高且色素相对含量低的优良菌株大大简化了菌种筛选的步骤, 缩短了筛选时间<sup>[16]</sup>。菌落特征反映了菌株的性能, 菌落大小体现了菌体繁殖的快慢与多糖产量的高低, 以大者为优; 发酵液颜色与菌落颜色一致, 菌落颜色浅发酵液颜色也浅, 越淡越优。

表1 出发短梗霉AP8及其变异菌株菌落特征

Table 1 Colony characteristics of AP8 and its mutants

菌株	菌落颜色	菌落直径/cm	菌落形态
AP8	墨绿色	0.8~1.1	菌落呈圆形, 中心隆起, 表面光滑, 湿润
E21	蓝色	1.1~1.2	菌落呈圆形, 中心隆起, 湿润
UV3	深灰色	1.3~1.5	菌落中心隆起, 表面有皱
UV60	淡黄色	1.4~1.5	菌落不规则, 表面光滑, 干燥

表2 出发短梗霉AP8及其变异菌株发酵特征

Table 2 Fermentation characteristics of AP8 and its mutants

菌株	发酵液最终颜色	发酵液A <sub>654nm</sub>	发酵终pH	生物量/(g/L)	多糖产量/(g/L)
AP8	墨绿色	1.304	2.93	8.6	15.6
E21	蓝色	1.221	3.13	10.0	17.0
UV3	深灰色	1.100	3.24	11.3	18.3
UV60	淡黄色	0.508	3.40	13.8	22.1

表1和表2结果表明,变异菌株与原始菌株AP8在菌落特征和发酵特征上有显著不同,UV60与原始菌株相比,菌落颜色变浅为淡黄色,菌落直径变大,菌落不规则;从发酵特征上看,发酵液颜色也变浅为淡黄色, $A_{654nm}$ 由1.304降低为0.508,最终pH值由2.93提高为3.40,多糖产量由15.6g/L提高为22.1g/L,是原始出发菌株的1.42倍。

#### 2.4 突变菌株UV60的遗传稳定性实验结果

突变菌株UV60在PDA斜面上连续进行5次传代实验,每转接1次,同时转接入发酵培养基,最后测定多糖产量和色素相对含量,结果见表3。

表3 诱变菌株UV60的遗传稳定性  
Table 3 Genetic stability of UV60 strain

传代次数	第1代	第2代	第3代	第4代	第5代
多糖产量/(g/L)	21.9	22.6	21.8	22.0	22.2
$A_{654nm}$	0.508	0.500	0.501	0.490	0.499
发酵液颜色	淡黄色	淡黄色	淡黄色	淡黄色	淡黄色

表3结果显示,经5次传代接种培养后,菌株UV60的多糖产量变化不大,最大差值为0.80g/L,色素相对含量变化最大差值为0.018,发酵液颜色为淡黄色,由此可见菌株UV60遗传稳定。

#### 2.5 碳源选择对短梗霉发酵的影响

短梗霉多糖是由诸如蔗糖、葡萄糖、麦芽糖之类的小分子糖转化而成的,碳源不仅为菌体生长所必需,还是多糖合成的原料<sup>[17]</sup>。分别选择葡萄糖、蔗糖、乳糖及麦芽糖(50g/L)作碳源,其他培养基组分及培养条件保持不变。测定短梗霉多糖产量、生物量,观察发酵液颜色,测定发酵液吸光度及发酵终pH值。结果见表4。

表4 不同碳源对短梗霉发酵的影响  
Table 4 Effect of carbon sources on fermentation

碳源	多糖产量/(g/L)	生物量/(g/L)	发酵液 $A_{654nm}$	发酵终pH
葡萄糖	15.6	8.57	0.4248	3.82
蔗糖	22.3	14.0	0.4119	3.41
乳糖	3.1	3.0	0.0779	3.63
麦芽糖	13.6	8.92	0.2881	3.40

表4结果显示,利用乳糖发酵多糖产量和生物量均最低,利用其他几种糖类发酵生产的多糖含量和生物量均比较高,其中以蔗糖效果最好,综合考虑发酵成本等因素,本实验选择蔗糖为最佳碳源。

#### 2.6 蔗糖用量对短梗霉发酵的影响

以不同质量浓度(20、50、80、110、140g/L)的蔗糖作碳源,其他培养基组分及培养条件保持不变,测定多糖产量,计算蔗糖转化率,结果见图3。

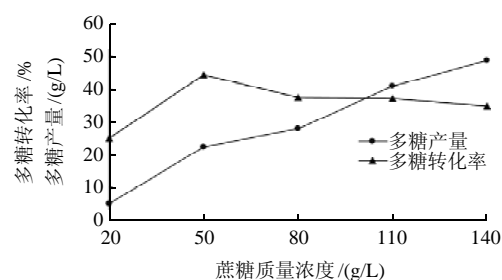


图3 蔗糖质量浓度对短梗霉发酵的影响

Fig.3 Effect of sugar concentration on fermentation

由图3可知,随蔗糖质量浓度的增加,多糖产量也逐渐增加。蔗糖质量浓度低于50g/L,糖转化率随蔗糖质量浓度的增加而增加,蔗糖质量浓度高于50g/L时,糖转化率反而随蔗糖质量浓度的增加而减小。综合考虑多糖产量、多糖转化率、发酵液颜色等因素,最终选择50g/L蔗糖为最佳。

#### 2.7 短梗霉发酵培养基的优化

表5 短梗霉发酵培养基正交试验设计及结果

Table 5 Orthogonal array design arrangement and corresponding results for optimizing fermentation medium components

试验号	A 酵母膏质 量浓度/(g/L)	B $MgSO_4$ 质 量浓度/(g/L)	C $K_2HPO_4$ 质 量浓度/(g/L)	D $(NH_4)_2SO_4$ 质 量浓度/(g/L)	多糖产 量/(g/L)
1	1(1.0)	1(0.1)	1(1.5)	1(0.5)	18.00
2	1	2(0.2)	2(2.0)	2(0.6)	14.78
3	1	3(0.3)	3(2.5)	3(0.7)	14.12
4	2(1.5)	1	2	3	26.14
5	2	2	3	1	15.74
6	2	3	1	2	19.18
7	3(2.0)	1	3	2	11.86
8	3	2	1	3	19.00
9	3	3	2	1	25.40
$K_1$	58.90	56.00	56.18	59.14	
$K_2$	61.61	42.38	66.32	45.82	
$K_3$	56.26	58.7	41.72	59.26	
$k_1$	15.63	18.70	18.73	19.71	
$k_2$	20.35	16.51	22.11	15.30	
$k_3$	18.78	19.57	13.94	19.75	
R	4.72	3.06	8.17	4.45	

表5极差分析表明,4个因素对短梗霉发酵的影响程度依次为 $C > A > D > B$ ,即 $K_2HPO_4$ 对于短梗霉发酵的影响最大,其次是酵母膏和 $(NH_4)_2SO_4$ ,影响最小的是 $MgSO_4$ 。由正交试验确定出短梗霉发酵的最佳提取条件为 $A_2B_3C_2D_3$ ,即酵母膏质量浓度为1.5g/L、 $MgSO_4$ 质量浓度为0.3g/L、 $K_2HPO_4$ 质量浓度为2g/L、 $(NH_4)_2SO_4$ 质量浓度为0.7g/L时发酵的效果最好。由于该组合在正交表中没有出现,需做验证实验,在 $A_2B_3C_2D_3$ 培养基组成的条件下,短梗霉多糖产量最高,为27.24g/L。

### 3 结 论

本实验采用 EMS 和 UV 对出芽短梗霉进行复合诱变, 在 EMS 终浓度 0.4mol/L、作用时间 40~60min 和 30W 的紫外灯照射距离 30cm、照射时间 1.5~2.5min 条件下诱变获得了一株稳定遗传的多糖产量高、色素低的出芽短梗霉突变株 UV60, 产量为 22.1g/L, 比出发菌株 AP8 的多糖产量(15.6g/L)提高了 41.67%。

经过正交试验获得了最优的培养基组成, 即蔗糖 50.0g/L、酵母膏 1.5g/L、NaCl 1.5g/L、MgSO<sub>4</sub> 0.3g/L、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.0g/L、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.7g/L, 此时多糖产量为 27.24g/L。该结论中 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 的用量较文献[18-20]低, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 不仅为菌体生长提供磷源、钾源, 还能起缓冲作用, 稳定 pH 值<sup>[21]</sup>, 说明该菌株对磷源、钾源的依赖程度并不太大, 发酵终 pH 值由初始时的 6.5 降低为 3.4, 说明该短梗霉多糖可能是酸性多糖。所以将继续研究该短梗霉多糖的性质、分子质量和单糖组成以及进一步在发酵罐上研究发酵温度、发酵 pH 值、溶氧对多糖产量的影响等。

### 参考文献:

- [1] 于航, 童群义. 低色素出芽短梗霉 G-58 发酵的初步研究[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(11): 65-68.
- [2] 卢辉官, 彭景, 缪康杰. 普鲁兰的特性及其在食品和医学上的应用[J]. 生物学杂志, 2010, 27(3): 93-95.
- [3] LEATHERS T D. Biotechnological production and applications of pullulan[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 62(6): 468-473.
- [4] 梁金虎. 茁霉多糖的性质和应用[J]. 生物工程学报, 1985, 27(5): 23-27.
- [5] 于航. 低色素出芽短梗霉的选育及其培养条件的优化[D]. 无锡: 江南大学, 2007.
- [6] 崔玉海. 出芽短梗霉 G-58 的发酵条件及动力学研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008.
- [7] 吕蕾, 郭志军, 胡耀辉. 大孔吸附树脂对茁霉多糖发酵液色素吸附性能的研究[J]. 食品与发酵科技, 2009, 45(4): 39-41.
- [8] 马金龙, 王长海. 短梗霉多糖研究进展[J]. 生物技术, 2005, 12(5): 92-95.
- [9] REKHA M R, CHANDRA P S. Pullulan as a promising biomaterial for biomedical applications: a perspective trends biomater[J]. Artificial Organs, 2007, 20(2): 116-121.
- [10] 沈萍, 范秀荣, 李广武. 微生物学实验[M]. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 1999: 215.
- [11] 张雯, 张盛贵. 复合诱变选育出芽短梗霉高产菌株[J]. 中国酿造, 2008, 16(9): 47-50.
- [12] 张建国, 陈晓明, 贺新生. 灵芝胞外多糖分批发酵动力学模型[J]. 生物工程学报, 2007, 23(6): 1065-1070.
- [13] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1994: 16-17.
- [14] SIVAKUMAR P A, RAO K P. The use of cholesteryl pullulan for the preparation of stable vincristine liposomes[J]. Carbohydrate Polymers, 2003, 51(3): 327-332.
- [15] 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.
- [16] 贺红星, 张永茂, 史久英, 等. 高产低色素普鲁兰生产菌株的复合筛选[J]. 食品工业科技, 2008, 29(9): 145-151.
- [17] 张汉波, 程立忠, 沙涛. 控制 pH 环境对出芽短梗霉胞外多糖合成的影响[J]. 微生物学通报, 2001, 28(1): 35-38.
- [18] SINGH R S, SAINI G K, KENNEDY J F. Pullulan: microbial sources, production and applications[J]. Carbohydr Polym, 2008, 73: 515-531.
- [19] 朱永强, 方尚玲, 覃敬羽, 等. 短梗霉多糖菌的复合诱变筛选及培养基优化[J]. 食品与发酵科技, 2010, 46(1): 47-50.
- [20] SHINGEL K I. Current knowledge on biosynthesis, biological activity and chemical modification of the exopolysaccharide, pullulan[J]. Carbohydrate Research, 2004, 339: 447-460.
- [21] 崔玉海, 童群义, 吴胜军. 短梗霉多糖分批发酵动力学模型[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(3): 361-365.