

从短梗茁霉 *Aureobasidium pullulans*

获胞外多糖的研究

菌种的筛选和鉴定

广西科学院生物研究室 谷才恩

提 要

短梗茁霉 *A. Pullulans* 是一种具有酵母型和菌丝型的两型真菌。该菌在深层培养过程中具有产生胞外多糖的能力。据文献报导,这种胞外多糖可用作血浆代用品,也可用作食品包装薄膜,增稠剂和水果鸡蛋的涂层保鲜。为了获得短梗茁霉胞外多糖的优良菌株,我们进行了菌株的筛选,初步认为AS3.3984和015号菌株具有产胞外多糖能力,由于015号菌株不产生黑色素而优于AS3.3984菌株。经鉴定AS3.3984为短梗茁霉黑色变种 *A. pullulans* var. *melanigenum*, 015号为短梗茁霉原变种 *A. Pullulans* var. *pullulans*。

短梗茁霉 *Aureo basidium pullu lans* (de Bary) 属于半知菌类短梗霉属,是一种具有酵母型和菌丝型两种形态的两型真菌。近年来,人们对利用短梗茁霉来生产单细胞蛋白,细胞壁多糖,胞外多糖和制备原生质体等方面作了大量的研究,在应用上也取得了显著的成绩。尤其是对短梗茁霉胞外多糖的研究较为深入,其应用范围极其广泛。据文献报导,这种胞外多糖可用作血浆代用品,也可用作食品包装薄膜,增稠剂和水果鸡蛋的涂层保鲜。

为了获得短梗茁霉胞外多糖的优良菌株,我们选用了中国科学院微生物所的保藏菌株AS 3.3694和AS 3.3984两个菌号。同时进行了菌种的分离和筛选。经培养和胞外多糖提取表明,AS 3.3694菌株产生胞外多糖的能力极弱,只好弃而不用。AS 3.3984菌株产胞外多糖的能力较强,但在培养过程中产生大量的黑色素,在提取胞外多糖时,黑色素随多糖沉淀而沉淀,使提取过程增加了脱去黑色素的繁杂工序,故AS 3.3984也不是理想的菌株。为了寻找优良的菌株,我们进行了菌种的分离和筛选,而获015号菌株。该菌株产胞外多糖的能力较强,且在培养过程中不产生黑色素。为了深入了解其种性特征,我们对产胞外多糖能力较强的AS 3.3984和015号菌株的培养特性和细胞形态特征进行了观察,根据E. J. Hermannide-Nijhof关于短梗霉属的描述和检索表进行了菌种的初步鉴定,认为AS 3.3984菌株是短梗茁霉黑色变种 *Aureobasidium Pullulans* (de Bary) var. *melanigenum*, 015号菌株是短梗茁霉(原变种) *A. Pullulans* (de Bary) var. *pullulans*。

一、材料和方法

1. 菌种

A₃ 3.3984 和 A^S 3.3694 两菌株由中科院微生物所菌保室提供。015号菌株系笔者从广西桂林雁山采集的马尾松样品, 经用无菌蒸馏水洗涤, 再将洗涤液稀释, 用稀释液划线接种到马铃薯—葡萄糖琼脂平板上, 于28℃培养, 然后挑单菌落, 经分离纯化获短梗霉野生菌株。

2. 菌种筛选方法

将参试菌株 AS 3.3984, AS3.3694 和 015号菌株采用二级摇瓶培养, 用500毫升三角瓶, 内装200毫升培养液, 用斜面母种分别接到种子培养液内, 将培养物置180转/分旋转摇瓶机上, 于28℃培养48小时。然后再按10%接种量接种到发酵培养液中, 于28℃, 在摇瓶机上连续培养6—7天。将所获培养物用3000 r.m.p离心机上离心分离, 取离心上清液, 用乙醇—丙酮提取胞外多糖, 以获多糖的数量和多糖的色泽作为筛选菌株的指标。

种子培养基(克/升): 蔗糖25.0, KH₂PO₄ 5.0, NaCl 1.0, MgSO₄·7H₂O 0.5, 酵母膏2.0, (NH₄)₂SO₄ 2.0, 蒸馏水1000毫升。

发酵培养基(克/升): 蔗糖25.0, KH₂PO₄ 5.0, NaCl 1.0, MgSO₄·7H₂O 0.5, 酵母膏0.5, (NH₄)₂SO₄ 2.0, 微量元素⁽¹⁾ 1.0毫升, FeCl₃溶液⁽²⁾ 1.0毫升, 蒸馏水1000毫升。

(1) 微量元素液(毫克/升): H₃BO₃ 114, (NH₄)₂MO₇O₂₄·4H₂O(毫克/升) 484, CuSO₄·5H₂O 780, ZnSO₄·7H₂O 16720, MnCl₂·4H₂O 144。

(2) FeCl₃溶液: FeCl₃ 1920 毫克, 水1000毫升。

3. 菌种鉴定方法

根据 E. J. Hermanida—Nijhof 关于短梗霉属 *Aureobasidium* 的描述和典型种的记载进行菌种鉴定。由于国内书刊尚未见有该属检索表的记载, 故将发表在“*Studies in mycology*” (1977 NO. 5 P141—146) 杂志上该属检索表中对我们鉴定有关的部分列于下:

- 1 分生孢子的平均长度少于22微米…… 2
- 1 分生孢子的平均长度超过22微米…… 15
- 2 (1) 分生孢子直立或近直立…… 3
- 2 (1) 分生孢子弯曲(至少大多数弯曲)…… 12
- 3 (2) 有子座存在(植物寄生菌)…… 4
- 3 (2) 无子座存在(腐生菌或寄生菌)…… 9
- 9 (3) 在老培养物中褐色菌丝壁厚…… 10
- 9 (3) 在老培养物中褐色菌丝壁薄…… *A. microstictus* (49)
- 10 (9) 分生孢子长11—16微米, 厚壁菌丝链的溢断作用不明显…… *A. lini* (48)
- 10 (9) 分生孢子长11—16微米, 厚壁菌丝链的溢断作用明显…… 11
- 11 (10) 培养物至少在三星期内为淡红, 黄色或浅褐色…… *A. Pullulans* var. *pullulans* (52)
- 11 (10) 培养物迅速变黑或橄榄绿色…… *A. Pullulans*

var. melanigenum (53)

鉴定观察的培养物采用PDA和麦芽琼脂培养基, 进行斜面, 平板和载片培养。定期观察菌落质地, 颜色和生长速度。用菌落涂布或载片活体培养的方法制片, 用日本 Olympus BHA 型光学显微镜进行观察和测量, 并拍摄显微照片。

结 果

1. 菌株筛选

将参试的三个菌株经液体培养所获培养液用乙醇-丙酮提取后获胞外多糖。一步提取获粘胶状多糖, 称多糖 I; 二步提取获白色雪花状沉淀, 风干后为白色粉末, 称多糖 II。现将试验所获多糖的产量列于表 1。

三个菌株胞外多糖产量对照表 表 1

菌号	批次产量 g/l	8 1 3 1 6		8 1 3 3 0		8 1 4 1 7	
		多糖 I	多糖 II	多糖 I	多糖 II	多糖 I	多糖 II
As 3.3694		-	0.5	-	1.2	-	1.0
As 3.3984		10.6	0.9	16.0	1.3	9.0	2.4
015		13.3	2.0	12.7	4.3	7.9	3.3

从表 1 可以看出, As 3.3984 和 015 两菌株产胞外多糖的能力较强, 产量大大高于 As 3.3694 菌株, 该菌株几乎不产生多糖胶。从胞外多糖的色泽来看, As 3.3984 菌株在培养 48 小时以后, 培养液全部变为黑色, 在提取时, 先折出黑色丝状沉淀, 成为黑色的多糖胶, 但多糖 II 为白色粉末。015 号菌株在培养过程中培养液由粉红转为黄色, 后期略带绿色, 始终不呈黑色, 提取时先折出白色丝状沉淀, 获白色多糖胶, 多糖 II 为白色粉末。

实验结果表明, 015 号菌株产胞外多糖的能力同 As 3.3984 菌株相差无几, 但多糖胶为乳白色, 可免去繁杂的脱色工序。故我们认为 015 号菌株是初筛所获的优良菌株。

2. 菌种鉴定

根据菌株筛选的结果, 我们把具有产胞外多糖能力的 AS 3.3984 和 015 号菌株进行了培养特征和细胞形态的观察, 两菌株各有异同, 按检索表的记载进行了菌种的鉴定。

菌株培养特征是在 PDA 和麦芽琼脂平板培养过程中进行观察。As 3.3984 菌株在培养 24 小时的菌落表面为脏白色, 48 小时呈粘稠橄榄绿色, 50 小时以后全部为黑色, 以后粘液逐渐减少, 菌落表面微见皱褶, 并见有黑色基内菌丝, 长 0.1~0.2cm。在培养三星期后菌落表面干皱呈皮革状。015 号菌株在培养 1—2 天内菌落表面光滑, 粘稠, 呈粉红色, 培养三星期后菌落仍然呈粉红或棕黄色。

细胞形态观察是按不同培养时间, 定期挑取培养物或将载片培养物进行镜检观察, 观察表明 As 3.3984 和 015 号菌株均具有酵母型和菌丝型两种形态特征。酵母型单细胞通常为长

椭圆形,细胞内含有单核,双核或多核。观察表明每个酵母型细胞就是一个分生孢子,它可以进行单极,双极或多极出芽繁殖。AS 3.3984 菌株的分生孢子两端钝圆,大小为 $7(-7) \sim 11(-16) \times 3(-4) \div (-7)$ 微米。015号菌株的分生孢子的一端略往外突出,好似一个脐,常由此进行出芽繁殖,大小 $6(-8) \sim 10(-16) \times 2(-3) - 4(-6)$ 微米,见图 I-1, II-1。从对菌丝型形态观察中,可以看出两个菌株在培养初期的幼年菌丝常常壁薄,透明,分隔明显。细胞呈长园柱形,细胞内常含有双核或多核,菌丝多分枝,菌丝细胞没有明显分化的分生孢子原细胞,在菌丝的各处均可出芽形成芽生孢子,芽生孢子可端生,间生或着生在侧生小枝上,一般大小为 $4(-8) \times 3(-4)$ 微米,见图 I-2, II-2。随着培养物的老化,部份菌丝的细胞开始肥大,胞壁加厚,颜色渐深,形成厚壁菌丝,见图 I-3, II-3。厚壁菌丝的细胞常宽大于长,成扁园柱形,连成串珠状菌丝链。培养后期,厚壁菌丝链溢断为二联的厚壁细胞片断,见图 I-4, II-4。AS 3.3984 菌丝在培养后期,几乎全部菌丝均为溢断的二联厚壁细胞片断,难见到薄壁菌丝的存在。而015号菌株在后期仅有少数二联厚壁细胞片断,还有许多薄壁菌丝和酵母型分生孢子存在。

根据上述观察表明,AS 3.3984 和015号菌株的分生孢子大小未超过22微米,且没有子座存在,在老培养物中均形成厚壁菌丝,而且厚壁菌丝链的溢断作用明显,由此可确定两菌株均为短梗菖霉 *Aureobasidium pullulans*。根据观察 AS 3.3984 菌株在培养2天以后,培养物迅速变黑,而定为短梗菖霉菌黑色变种 *A. Pullulans var. melanigenum*。015号菌株在培养阶段培养物为粉红,黄色或棕色,有时夹有少量灰黑菌丝,但始终不变为黑色,鉴定为短梗菖霉(原变种) *A. Pullulans var. pullulans*。

三、讨 论

1. 为了获得具有生产性能的短梗菖霉优良菌株,还需要进行大量的选育种工作。本试验筛选的015号菌株,以其能获不带黑色的胞外多糖而优于AS 3.3984菌株。我们认为选用015号菌株作为选育生产用种的原始菌株是很有前途的。

2. 015号菌株的菌落色泽是极不稳定的,可以是红色,黄色或棕色,每次传代培养的颜色变化不完全相同,但始终未见变成黑色。这同Wickerham, L. A. 从亚热带地区采集分离的短梗菖霉色变种的记载相似。

3. 酵母型分生孢子形态观察表明,在培养48和72小时时,有较多的双核和多核细胞存在。这同Sintskaya, I. A. 的观察相一致。

4. 按不同培养时间取样镜检观察中发现,AS 3.3984菌株黑色素的逐步产生是同培养物中厚壁菌丝逐步形成相关。随着厚壁菌丝数量的增多,培养物由脏白色转为绿色,最后成为墨黑色,此时培养物中几乎全部是溢断的厚壁菌丝。如果按不同培养时间取样提取,发现二天内培养物提取获灰白色多糖胶,三天时提取获橄榄绿色多糖胶,四天以上提取获黑色多糖胶。



图 I - 1 酵母型分生孢子

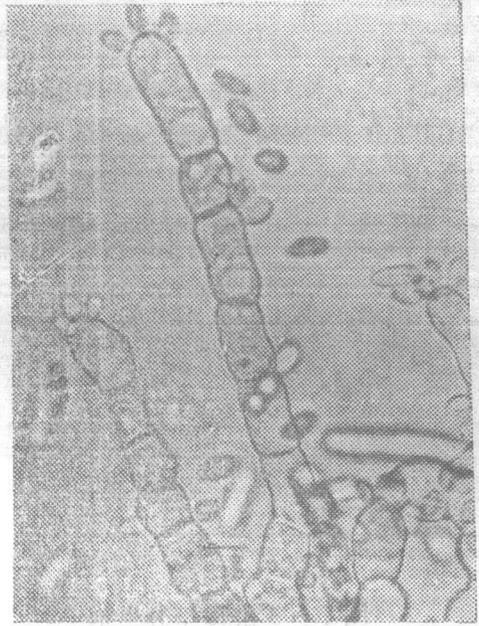


图 I - 2 菌丝型出芽繁殖

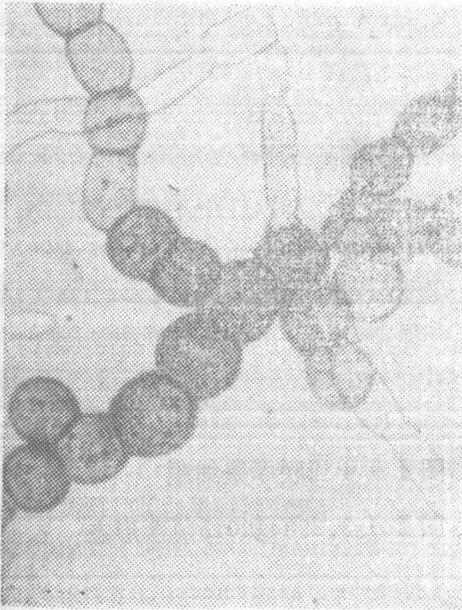


图 I - 3 厚壁菌丝



图 I - 4 二联厚壁细胞



图 I - 1 酵母型分生孢子

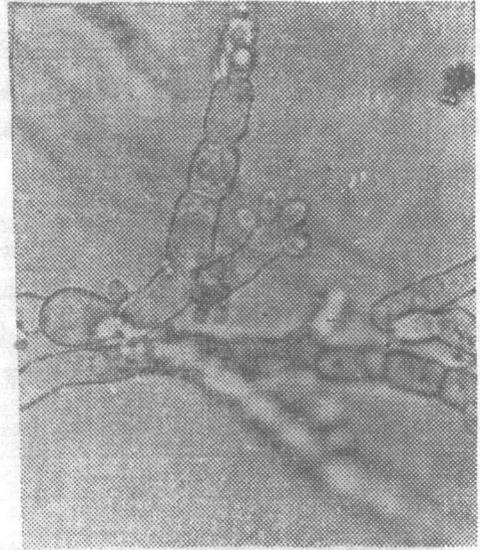
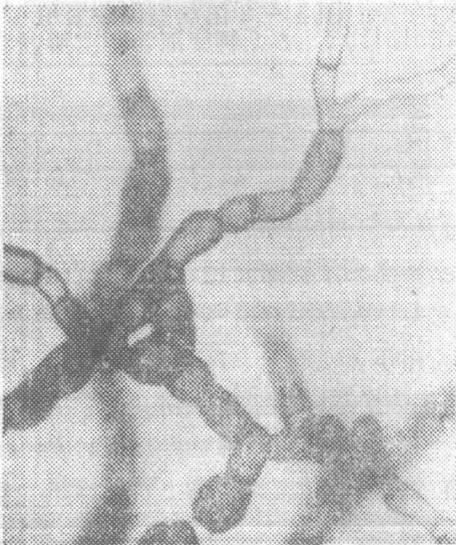


图 II - 2 菌丝型出芽繁殖



I - 3 厚壁菌丝



图 II - 4 二联厚壁细胞

图 III $A_{53,3984}$ 和015菌落形态

参 考 书

1. Hermanides - Nijhof, E.J. Studies in mocology NO.5 P141 - 146, 1977.
2. Wickerham, L.J. Mocology, 6, (2): 342 - 361, 1975.
3. Shipma, R. H. Pioces Biochem. , 13 (3): 19 - 21, 1978