

真菌产纤维素酶培养基中刚果红转移机理研究*

张超¹ 李艳宾² 张磊^{2**} 张琴² 魏世清²

(重庆市农业科学院果树研究所 重庆 402260)¹ (西南大学资源与环境学院 重庆 400716)²

摘要:通过对产纤维素酶真菌在纤维素刚果红液体培养基中刚果红染料移动情况研究,表明刚果红染料进入真菌的机制为纤维素分解真菌首先分解纤维素物质为含有葡聚糖等结构的多聚糖类物质,多聚糖与刚果红形成多聚糖-刚果红复合物,复合物不仅被吸附到产纤维素酶活的菌丝外表面,而且能被进一步转运吸收至该部分菌丝内部,使菌丝体和菌落呈现红色。所以,纤维素刚果红培养基可作为分离、筛选纤维素分解真菌的特异性培养基。

关键词:刚果红,纤维素酶,真菌,多聚糖-刚果红复合物,机理

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 [2006] 06-0012-05

Study on Transition Mechanism of Congo-red in Cellulase-producing Fungi Medium*

ZHANG Chao¹ LI Yan-Bin² ZHANG Lei^{2**} ZHANG Qin² WEI Shi-Qing²

(Fruit Research Institute, Chongqing Academy of Agricultural, Chongqing 402260)¹

(College of Resources and Environment, Southwest University, Chongqing 400716)²

Abstract: Transition of congo-red in cellulose congo-red liquid medium was studied by cellulase-producing fungi. Results showed that cellulose was decomposed and turned into polysaccharides by cellulase-producing fungi, which possessed of glucans structure, then polysaccharides bonded congo-red to form polysaccharides-congo red complex. The complex was not only adhered on the surface of hyphae, but also absorbed inside them. With that, congo-red deposited in hyphae, and colored the colony red. So, congo-red medium can be used as a special medium to identify fungi possessing cellulase.

Key words: Congo-red, Cellulase, Fungi, Polysaccharides-congo red complex, Mechanism

目前,纤维素分解菌分离方法有很多种,如CMC-天青法(CMC-azure)、凉乙醇沉淀法(precipitation with chilled ethanol)、台盼兰法(trypan blue)、刚果红法(congo red)等^[1]。其中,刚果红法是目前比较公认的一种有效分离方法。Wood^[2-4]研究发现,刚果红与结构中具有 β -1, 4-D-吡喃型葡萄糖的多糖有强烈相互作用,与 β -1, 3-D-葡聚糖及一些半纤维素的乳糖-葡甘露糖聚合糖存在明显相互作用。认为刚果红同纤维素水解后的多糖水解物形成了一个颜色浓郁的多聚糖-刚果红复合物,刚果红对鉴定多糖水解物具有明显的指示作用,为纤维素刚果红培养基分离、筛选纤维素分解菌提供了理论基础。Teather和Wood^[5]用纤维素刚果红固体培养基,对牛瘤胃中的厌氧纤维素分解细菌进行计数和特征描述,认为纤维素刚果红培养基能够快速、灵敏地检测出纤维素分解菌。Herdicks等^[6]将其进一步发展成为一个鉴别性培养基,用于测定土壤中纤维素分解菌的数量。叶姜瑜^[7]则用纤维素刚果红培养基测定土壤中好氧纤维素分解菌的数量,用以评估土壤肥力和不同土壤之间肥力的差异,认为根据透明圈能够清

* 重庆市高等学校优秀青年骨干教师资助计划专项课题资助

** 通讯作者 Tel: 023-68250437, E-mail: echo@swau.cq.cn

收稿日期: 2006-01-13, 修回日期: 2006-03-02

晰、准确地判定微生物是否具有产纤维素酶的能力。高榕等^[8]提出以透明圈直径与菌落直径比值作为筛选产纤维素菌株酶活高低的一个指标,更符合菌株产酶的实际情况,并将此结论应用于实际生产中。

在笔者根据上述资料所做的实验中,也观察到纤维素刚果红固体培养基上,纤维素被水解后,菌落周围颜色变浅形成透明圈,颜色浓郁的红色物质主要集中在菌落生长区域;在纤维素刚果红液体培养基中,红色物质主要集中在菌丝中,溶液的红色显著变浅甚至无色。但是刚果红与纤维素类物质水解后的多糖产物形成的红色多聚糖-刚果红复合物,究竟是附着在真菌菌丝表面,还是进入了菌丝的内部?如果是进入菌丝内部,其进入机理如何?这些问题至今未见深入的研究报道。而对此类问题的研究有助于明确纤维素分解菌分解纤维素的机理,更好地发挥纤维素刚果红培养基的作用。本文研究了产纤维素酶真菌及其菌丝体在纤维素刚果红液体培养基中对刚果红的反应,对上述问题进行了初步探讨。

1 材料与方法

1.1 菌种

Penicillium rugulosum F160, 产纤维素酶真菌,本实验室保藏菌种。

1.2 培养基

1.2.1 培养基 1^[9]: CMC-Na 2.0g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, K_2HPO_4 1.0g, NaCl 0.5g, 刚果红 0.4g, 琼脂 20g, 用去离子水定容至 1,000mL, pH7.0。 1×10^5 Pa 灭菌 30min。

1.2.2 培养基 2^[10]: CMC-Na 2.0g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3g, KH_2PO_4 2.0g, CaCl_2 0.3g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5mg, MnSO_4 1.6mg, ZnCl_2 1.7mg, CoCl_2 1.7mg, 刚果红 0.2g, 去离子水定容至 1,000mL, pH7.0。分装在 250mL 三角瓶中,每瓶 100mL, 1×10^5 Pa 灭菌 30min。

1.2.3 培养基 3: 成分同培养基 2, 不加刚果红。

1.2.4 培养基 4: 刚果红 0.2g, 生理盐水定容至 1,000mL, pH7.0。分装在 250mL 三角瓶中,每瓶 100mL, 1×10^5 Pa 灭菌 30min。

1.3 培养方法

接种后液体培养基在 30℃, 150r/min 旋转摇床振荡培养;固体培养基在 30℃ 生化培养箱静置培养。

1.4 样品处理及观察

1.4.1 处理 I: 观察纤维素刚果红固体和液体培养基中颜色变化及转移方向。

1.4.2 处理 II: 将产纤维素酶真菌 F160 接种于培养基 2, 30℃、150r/min 振荡培养 1.5d 后,在 10,000r/min 离心 15min,倾去上清液。将菌丝球用无菌生理盐水充分悬浮,反复离心洗涤 5 次,用解剖针挑开菌丝球,再用生理盐水反复充分冲洗 5~6 次,尽可能洗去菌丝上吸附的刚果红等物质。挑取冲洗后的菌丝球在载玻片上,盖上盖玻片,在显微镜下观察菌丝的颜色。

1.4.3 处理 III: 将产纤维素酶真菌 F160 接种于培养基 3,在 30℃、150r/min 振荡培养 1.5d 后停止振荡。无菌操作,在 10,000r/min 离心 15min,倾去上清液,将菌丝球用无菌生理盐水充分悬浮,反复离心洗涤 5 次,尽可能洗去菌丝球中残留的营养物质。将

洗涤好的菌丝球转入培养基4中, 30℃、150r/min 旋转摇床振荡培养1.5d, 然后10,000r/min 离心15min, 将菌丝球用无菌生理盐水充分悬浮, 反复离心洗涤5次, 用解剖针挑开菌丝球, 再用无菌生理盐水反复、充分冲洗5~6次, 尽可能洗去菌丝上吸附的刚果红等物质。挑取冲洗后的菌丝球在载玻片上, 显微镜下观察菌丝的颜色。

1.4.4 处理IV: 将产纤维素酶真菌F160接种于培养基3, 在30℃、150r/min 振荡培养1.5d后停止振荡。25℃静置、“饥饿”培养7d, 尽可能使培养基中的多糖类物质被消耗, 以消除多糖对刚果红的影响。其余步骤与处理III方法相同。显微镜观察结果。

2 结果与讨论

2.1 培养过程中颜色变化

在培养基1的平板上, 浓郁的红色主要集中在菌落生长部位, 菌落周围形成颜色变浅的透明圈(图1A)。由于真菌F160本身不产色素, 菌落生长部位的红色只能来自于颜色变浅的透明圈部位原有的刚果红, 即刚果红与纤维素水解后多糖形成多聚糖-刚果红复合物, 这与Wood等人的报道相一致, 证明F160是产纤维素酶真菌。

在培养基2中, 培养1.5d后三角瓶中形成大量直径2mm~3mm的菌丝球。与不接种的培养基2溶液相比(图1C), 接种处理的培养液颜色发生明显变化, 溶液变无色, 菌丝球变为深红色(图1B)。联系Wood^[2~4]的理论, 判断发生这种改变的原因可能为: 纤维素类物质水解后形成大量含有 β -1, 4-D-吡喃型葡萄糖、 β -1, 3-D-葡聚糖及乳糖-葡甘露糖聚合糖等结构的物质, 与刚果红染料结合形成大量的红色多聚糖-刚果红复合物, 菌丝吸收多聚糖-刚果红复合物, 使刚果红也伴随着多聚糖进入了菌丝体中, 所以液体培养基的颜色变浅甚至无色。而进入菌丝中的多聚糖-刚果红复合物进一步被真菌分解为可以利用的小分子多糖而加以吸收, 无法被利用的刚果红染料则沉积在菌丝中; 或者进入菌丝与真菌细胞中的葡聚糖成分再次结合, 形成多聚糖-刚果红复合物, 使刚果红固定在细胞内, 让菌丝呈现红色。

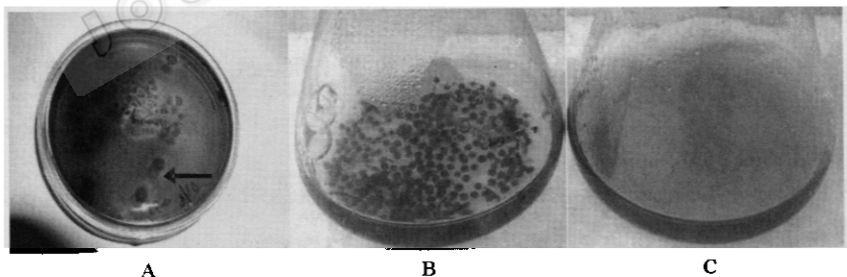


图1 不同培养基中颜色的变化

A 培养基1平板, 箭头所指为透明圈, B 培养基2中菌丝球, C 培养基2未接种

2.2 显微观察

2.2.1 刚果红培养菌丝形态观察: 经过处理II步骤后, 观察菌丝, 发现经过洗涤菌丝红色并未褪去, 洗涤液清亮, 滤纸上也无红色物质残留。在低倍镜及油镜下观察, 发现红色物质处于菌丝的内部。说明红色物质并不是吸附在菌丝的表面, 而是进入了菌丝内部(图2B)。这也印证了2.1的推测结果, 即刚果红是伴随着菌体对多聚糖-刚果红复合物的吸收而进入真菌细胞的。

2.2.2 无刚果红培养菌丝形态观察: 经过处理III步骤后, 观察菌丝。把经过离心洗涤

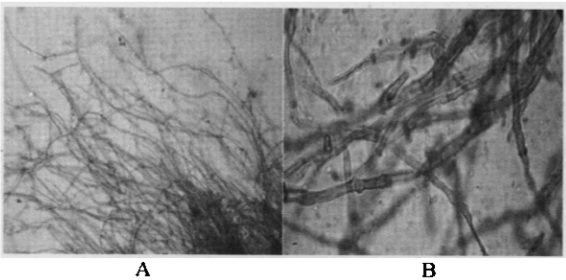


图 2 处理Ⅱ显微观察照片
A 低倍镜 (16×20), B 油镜 (16×100)

的菌丝球转入培养基 4 后, 菌丝球很快变成鲜艳红色。转入培养基 4 中培养 1.5d 后, 显微镜油镜下观察, 在菌丝球外周新生菌丝中没有红色物质 (图 3B), 红色物质主要集中在菌丝球中心部分, 一部分红色复合物进入了菌丝, 另一部分红色复合物包裹在菌丝外, 形成絮状包裹物 (图 3C)。该现象的可能原因是: 在培养 1.5d 后, 培养基中营养充分, 位于菌丝球中心的菌丝代谢旺盛, 处于稳定期前后, 其纤维素酶分解纤维素形成的多种多糖附着在菌丝上或进入菌丝, 离心洗涤时不能被洗下, 转入培养基 4 后与刚果红结合, 使胞外附着的多糖和菌丝着色。而菌龄较短菌丝没有或较少纤维素酶活性, 所以菌丝内外无色。上述结果形象地验证了 Wood 等人的结论, 即刚果红与纤维素分解多糖有强烈相互作用, 同时说明纤维素酶的产物产生后并未扩散开来, 而是与菌丝较紧密地结合在一起。

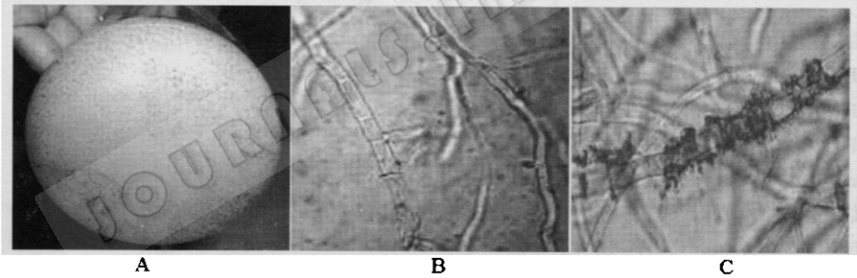


图 3 处理Ⅲ显微观察照片 (16×100)
A 培养基 3 中菌丝球, B 菌丝球外周菌丝, C 菌丝球中心菌丝

2.2.3 无刚果红培养菌丝“饥饿”后形态观察: 经过处理Ⅳ步骤后, 刚果红的红色被吸收到菌丝球中, 溶液变清亮; 反复离心洗涤后, 洗涤液为无色, 菌丝球仍然为红色, 但在油镜下观察红色的菌丝球, 发现完整的菌丝内外均呈现无色 (图 4A)。

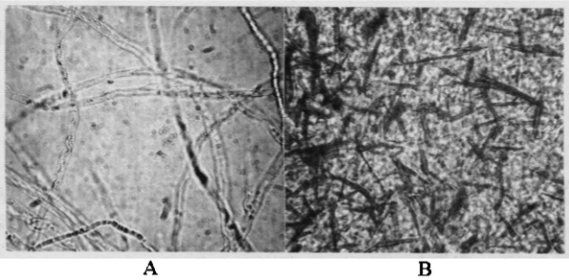


图 4 处理Ⅳ显微观察照片 (16×100)
A 完整未着色菌丝, B 红色物质集中的菌丝碎片

那么经过处理Ⅳ步骤后的菌丝球为什么是红色的呢?由图 4B 可以看出,处理Ⅳ得到的菌丝球呈现红色的部分是处于菌丝球中心的菌丝碎片。“饥饿”处理使菌丝球中心的老化菌丝首先自溶成菌丝碎片,刚果红染料同细胞壁中残余的含有甘露聚糖、葡聚糖等结构的物质着色^[11],而不能使没有纤维素分解多糖的菌丝球外围完整菌丝着色。此结果再次证明刚果红染料与多糖结合的特异性,印证了 2.1 中对刚果红进入菌丝机制的推测。

3 结论

根据文献[12],虽然纤维素酶是外切酶,但作用于纤维二糖和纤维寡糖的纤维二糖水解酶(CBH)大部分酶活仍然处于细胞壁上,这些密切结合在细胞壁上的 CBH 酶可以水解纤维二糖和纤维寡糖为葡萄糖,并使葡萄糖被菌丝体迅速吸收,减少葡萄糖流向外部环境。结合 Wood 等的刚果红同纤维素水解后多糖水解物形成了一个颜色浓郁的多聚糖-刚果红复合物的结论^[2~4],可以推测,刚果红在培养产纤维素酶真菌的纤维素刚果红培养基中可能的转移机理为:具有纤维素酶活性的真菌首先分解纤维素类物质为含有葡聚糖等结构的多糖类物质,多糖与刚果红发生特异性结合而形成多聚糖-刚果红复合物,复合物在细胞壁上被 CBH 酶等分解成葡萄糖而被利用,解离出来的刚果红则沉积在菌丝中,使菌丝体变为红色,进而使菌落呈现红色。

这一机理有待于进一步用多糖分布等试验证明。

参考文献

- [1] 赵新刚. 微生物学通报, 1999, **26** (1): 63 ~ 65.
- [2] Wood P J, Fulcher R G. Cereal Chem, 1980, **55**: 952 ~ 966.
- [3] Wood P J. Ind Eng Chem Prod Res Dev, 1980, **19**: 19 ~ 23.
- [4] Wood P J. Carbohydr Res, 1980, **85**: 271 ~ 287.
- [5] Teather R D, Wood P J. Appl Environ Microbiol, 1982, **43** (4): 777 ~ 780.
- [6] Hendrick C W, Doyle J D, Hugley B A. Appl Environ Microbiol, 1995, **61** (5): 2016 ~ 2019.
- [7] 叶姜瑜. 微生物学通报, 1997, **24** (4): 251 ~ 252.
- [8] 高 榕, 邓迎达. 纤维素科学与技术, 2004, **12** (3): 20 ~ 24.
- [9] 张宇昊, 王 颖, 张 伟, 等. 纤维素科学与技术, 2004, **12** (1): 33 ~ 36.
- [10] 王淑军, 杨从发, 陈 静. 淮海工学院学报, 1999, **7** (1): 42 ~ 45.
- [11] 周德庆. 微生物教程. 北京: 高等教育出版社, 1993. 57 ~ 58.
- [12] 高培基, 许 平主编. 资源环境微生物技术. 北京: 化学工业出版社, 2004. 23.