

# 短梗茁霉胞外多糖的研究

## 1. 菌株的筛选

谷才恩

(广西科学院生物研究室)

短梗茁霉为半知菌类短梗霉属,一种具有酵母型和菌丝型形态的两型真菌。近年来,人们对于利用短梗茁霉生产单细胞蛋白、细胞壁多糖、胞外多糖等方面作了大量的研究,在应用上也取得了显著的成绩。据文献报道,这种胞外多糖可用作血浆代用品<sup>[1]</sup>,食品包装薄膜,增稠剂和鸡蛋水果的深层保鲜<sup>[1,2]</sup>。为了获得产生胞外多糖的优良菌株,将引自中国科学院微生物研究所和从当地自行分离的菌株,进行了产胞外多糖的对比试验和形态特征观察,现将结果报告于下。

## 材 料 和 方 法

1. 菌种: 短梗茁霉 (*Aureobasidium pullulans*) AS 3.3984 和 AS 3.3694,引自中国科学院微生物研究所菌保室。015 菌株分离自广西桂林雁山的马尾松枯针叶样品。

2. 菌株筛选方法: 采用二级摇瓶培养,用 500ml 三角瓶,内装 200ml 培养液,接入斜面菌种后,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% 种量接到发酵培养液中,于 28℃,在摇瓶机上连续培养 6—7 天,培养物在 3000rpm 离心,取上清液,用乙醇-丙酮提取胞外多糖。

培养液 (g/l): 蔗糖 25.0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5.0;  $\text{CaCl}_2$  1.0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5; 酵母膏 0.5;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2.0; 微量元素液 (mg/l) 1.0ml ( $\text{H}_3\text{BO}_3$  114,  $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  484,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  780,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  16720,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  114);  $\text{FeCl}_3$  溶液 1.0ml ( $\text{FeCl}_3$  1920mg, 水 1000ml); 蒸馏水 1000ml。

3. 形态观察: 将所筛菌株用 PDA 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,以及细胞形态结构。用菌

落涂布或载片活体培养方式制片,用日本 Olympus BHA 型光学显微镜观察。

## 实验结果

### 1. 菌株筛选: 将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。

从表 1 可以看出, AS 3.3984 和 015 号两

表 1 三个菌株胞外多糖产量对比\*

菌号	批次产量 (g/100ml)	81316		81330		81417	
		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		13.6	2.0	12.7	4.3	7.9	3.3

\* 多糖 I 均为提取离心后的多糖胶湿重,“—”表示痕迹量。

菌株产胞外多糖能力较强,产量大大高于 AS 3.3694 菌株,3.3694 菌株几乎不产生多糖胶。从胞外多糖色泽来看,AS 3.3984 菌株在培养 48 小时以后,培养液全部变为黑色,在提取时析出黑色丝状沉淀,分离出黑色的多糖胶,两次提取时可获白色雪花状沉淀,经风干后为白色粉末状的多糖 II。015 号菌株在培养过程中,培养液由粉红色转为黄色,后期略带绿色,但始终不呈黑色,提取时先析出白色丝状沉淀,分离出白色多糖胶,二次提取时又获白色雪花状沉淀,风干后为白色粉末状的多糖 II。结果表明 015 号菌株和 AS 3.3984 菌株产胞外多糖的能力相差无几,但 015 所获多糖胶为乳白色,可

免去繁杂的脱色工序,而优于 AS 3.3984 菌株。初步认为 015 号菌株是初筛所获的优良菌株。

2. 培养特征: 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的观察。在固体培养基上 AS 3.3984 菌株很快就由白色转为黑色,三周后菌落表面呈皮革状,015 号菌株由白色转为粉红或桔黄,但始终不变为黑色(图版 I-6)。在液体培养基中,AS 3.3984 培养 24 小时以后就由橄榄绿色转为黑色,而 015 菌株则由粉红色转为黄色和黄绿色,但始终不变为黑色。现将 PDA 培养基上生长状况列于表 2。

表 2 两个菌株培养特征的比较

项目	菌落质地		颜色		菌落大小 (mm)	
	015	AS 3.3984	015	AS 3.3984	015	AS 3.3984
培养时间(小时)						
24	表面光滑,粘稠	表面光滑,粘稠	白色	白色	5—10	10—15
48	表面光滑,粘稠,边缘有灰白色绒毛状菌丝。	表面光滑,粘稠,边缘有灰黑色绒毛状菌丝	白色,微呈粉红色	灰白色夹有黑色条纹	10—15	15—30
72	表面平滑,微粘稠,边缘有灰白色绒毛菌丝	表面有隆起褶皱,边缘有黑色绒毛状菌丝	粉红色,微带桔红色	黑色	15—20	30—50
96	表面平滑,无粘液,边缘有绒毛菌丝	表面隆起褶皱,干燥边缘有黑色绒毛状菌丝	粉红色,边缘夹有灰黑色	黑色	20—30	50—70
120	表面平滑,较干,边缘有绒毛菌丝	同上	粉红色边缘夹有黑灰色	黑色	30—40	70—80

3. 细胞形态观察: 将 AS 3.3984 和 015 号菌株进行了对比观察。结果表明两个菌株均具有酵母型和菌丝型两种形态特征。酵母型单细胞通常呈长椭圆形, 细胞内含有单核、双核和多核。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  $7-11 \times 3-4 \mu\text{m}$ 。015 号菌株分生孢子的一端略往外突出, 好似有一个脐, 常由此行出芽繁殖, 大小为  $6-10 \times 2-4 \mu\text{m}$  (图版 I-3)。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龄菌丝通常壁薄, 透明, 分隔明显。细胞呈长圆柱形, 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  $4 \times 3 \mu\text{m}$  (图版 I-1, I-4)。随着培养物的老化, 部分菌丝的细胞开始肥大, 胞壁加厚, 颜色渐深, 形成厚壁菌丝(图版 I-2, I-5)。厚壁菌丝的细胞一般宽大于长, 成扁圆柱形, 连成串珠状菌丝链。培养后期, 厚壁菌丝链常溢断为二联的厚壁细胞片段。AS 3.3984 菌株的菌丝在培养后期, 几乎全部溢断为二联厚壁细胞片段, 难见到薄壁菌丝的存在。而 015 号菌株在培养后期仅有少数二联细胞片段, 还有许多薄壁菌丝和酵母型分生孢子的存在。

## 讨 论

1. 015 号菌株, 以其能获不带黑色素的胞

外多糖而优于 AS 3.3984 菌株。选用 015 号菌株作为育种的原始菌株是很有前途的。

2. 015 号菌株的菌落色泽不稳定, 可以是红色、黄色或桔黄色。但始终不变为黑色, 这同 Wickerham<sup>[3]</sup> 从亚热带地区采集分离的短梗茁霉菌株的记载相似。

3. 按不同培养时间取样进行培养物的镜检观察发现, AS 3.3984 菌株黑色素的产生同培养物中厚壁菌丝的形成相关, 随着厚壁菌丝数量的增多, 培养物由灰白色转为橄榄绿色, 最后呈墨黑色。取培养 2 天的培养液检查时, 此时仅有少数厚壁菌丝, 经提取可获白色多糖胶, 而随着厚壁菌丝的增多, 培养物呈黑色, 提取时获黑色多糖胶。

4. 据 Hermanide<sup>[4]</sup> 的观点, 将菌落迅速变为黑色的菌株定为短梗茁霉黑色变种 [*A. Pullulans* (De Bery) var. *melanigenum*]; 将在三周内菌落不变黑的定为短梗茁霉短梗变种 [*A. pullulans* (De Bery) var. *pullulans*]. 对 015 号菌株如何定名还有待进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] Shipma, R. H.: *Piocces Biochem.*, 13(3): 19-21, 1978.
- [2] Sloiki, M. E.: *Advance in Applied Microbiology*, 23: 19-54, 1978.
- [3] Wickerham, L. J.: *Mycology*, 6(2): 342-361, 1975.
- [4] Hermanides-Nijhof, E. J.: *Studies in Mycology*, 5:141-146, 1977.