

产无色胞外多糖菌株的筛选及其产物鉴定

那淑敏 贾盘兴 余茂勋

(中国科学院微生物研究所,北京)

摘要 从加拿大切叶蜂虫茧上分离到 36 株短梗霉,其中 8 株可程度不等的分泌胞外多糖。此多糖经支链淀粉酶(Pullulanase E. C. 3. 2. 1. 41)酶解产生麦芽三糖,酸水解产生葡萄糖,并与标准品的 RF 值相同。从而证明多糖为麦芽三糖通过 1→6 糖苷键连结聚合的出芽短梗胞糖(pullulan)。它们可利用蔗糖,糖蜜作碳源分泌短梗胞糖,糖的转化率为 25—32%。

关键词 出芽短梗霉;麦芽三糖;出芽短梗胞糖

1938 年 Bauer 发现短梗霉能分泌胞外粘性物质^[1,2]。1958 年 Bernier, Bender 和 Wallenfels^[1,2,3] 等从特制培养基中分离出胞外多糖并对其结构和性质进行研究。近年来,人们对其在食品,医药,化妆品等方面的应用进行了大量的研究。比较系统的研究是生产工艺和产品应用,在这方面日本已取得不少专利。目前已工业化生产不同规格的 pul 产品^[4,5]。淡家林等对 AS3.2756 的变异株 N28 进行了发酵条件及中型扩大试验^[6]。谷才恩^[7]和杜立生^[8]也分别从广西桂林马尾松枯枝叶和海水中,分离到产胞外多糖的短梗霉。为了开发多菌种和优良的产胞外多糖菌株,我们从加拿大切叶蜂虫茧上分离到几株产无色胞外多糖的菌株,对菌株及胞外产物进行了研究。

材料和方法

1. 菌株: 出芽短梗霉 (*Aureobasidium pullulans*) AS3.3984 由本所保藏室提供,编号 A1 到 A36 菌株分离自加拿大切叶蜂虫茧。

2. 培养基: 菌种保藏用马铃薯和麦芽汁培养基,发酵培养基分别以 5—10% 的蔗糖和糖蜜为碳源,配以 0.03% 的硫酸铵及 0.01% 的硫酸镁组成。

3. 菌种的筛选: 用 250ml 三角瓶盛 40—50ml 培养基,接入生长 48—72h 的菌种一环,置 28℃,200r/min 的旋转摇床上培养 5—6 天,离心取上清液测定多糖。

4. 形态观察: 用 PDA 和麦芽汁培养基进行斜面、平板培养,定期观察菌苔,菌落质地,颜色,菌落大小,生长速度。细胞形态用显微镜观察。

5. 多糖的测定见文献[6]。

6. 胞外产物鉴定^[6]: 用薄层及纸层析鉴定产物。

7. 材料: 支链淀粉酶由本所杨寿钧及无锡酶制剂厂提供; 标准茁霉多糖为日本林原公司出产; 麦芽三糖为美国 Sigma 公司产品; 层析硅胶板 GF 产自浙江黄岩化学试验厂。

结 果

(一) 菌株的筛选

分离的 36 株短梗霉 (*Aureobasidium*) 经培养测试,其中 8 株有不同量的胞外多糖产物,结果见表 1。8 株菌的发酵液自始至终为乳白色,发酵终 pH 降至 3.5 左右,稍粘稠,有芳香气味。离心上清液中加入乙醇后会出现长丝状,有弹性的白色胶状物沉淀,可用玻璃棒搅出。低速离心上清液经 2×10^4 分子量中空纤维过滤浓缩,可直接喷雾干燥得到白色粉末。

它们可利用蔗糖,糖蜜作碳源,转化率为 25—32%,糖蜜的转化率比蔗糖高。

(二) 培养特征的观察

将产多糖的 8 株菌与 AS 3.3984 分别在

感谢徐浩、杨寿钧、陈玉梅、江宁等同志的热情帮助。

表 1 初筛菌株胞外多糖产量

菌株	多糖 (mg/100ml)	初始 pH	终 pH
A17	258	6.0	3.5
A18	366	6.0	3.0
A20	236	6.0	3.2
A21	106	6.0	4.0
A22	653	6.0	3.0
A23	106	6.0	3.5
A24	30	6.0	3.5
A35	10	6.0	3.5

PDA 和麦芽汁培养基上培养,对其培养特征进行比较。AS3.3984 在 PDA 及麦芽汁斜面上生长 2 天后均变成黑色皮革状。分离的 8 株菌在麦芽汁斜面上均为乳白色,奶油状,光滑湿润,有粘性。菌苔边缘有密细的绒毛状菌丝。除 A21 生长 15 天后全部变为黑色外,其余菌株均不变黑,呈粉褐色或棕褐色。在冰箱放置数月后,逐渐变成黑色皮革状。而在 PDA 斜面上生长的 8 株菌,放置数月仍保持乳白色,略显粉色光滑状。与谷才恩报道的 1.015 菌株性状不同^[7]。

在液体培养基中,培养 24 小时的 AS3.3984 就已变成黑色,镜检有 1/3 黑色粗大菌丝及厚垣节孢子。随培养时间加长,黑色菌丝、节孢子增多。A22 等 8 株菌的发酵液始终为乳白色,即使摇床培养 11 天也无色素产生。镜检观察均以酵母型细胞存在,不产生厚垣孢子和节孢

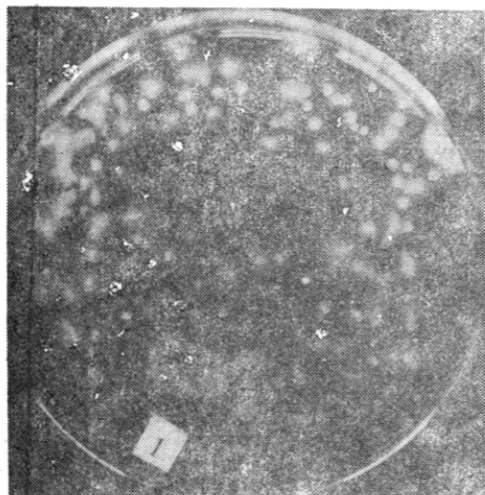


图 1 出芽短梗霉 A22 菌株的菌落形态(培养 72 小时)

子。

培养 48 小时的 A22 菌落为白色,中凸,表面光滑,湿润,边缘有绒毛状菌丝。随培养时间增加,菌落长大扩散,96 小时直径已有 1.2—1.3cm,几乎扁平,中心白色,周围色淡,有同心圈,边缘菌丝加长(见图 1)。AS3.3984 培养 48 小时为肉色雪花状,边缘不太齐,有绒毛状菌丝,中间湿润,也有颜色深浅不同的同心圈,96 小时成黑褐色,直径 1.7—2.2cm,比 A22 生长快。

(三) 细胞形态观察

对 AS3.3984 和多糖产率较高的 A22 的细胞形态进行了比较,结果表明,两株菌均具有酵母型及菌丝型形态特征。A22 酵母型细胞呈椭圆形,大小为(5)7—10 × (2.5)3.5—5(7.5)微米。一端或两端往外突出,好似有一个脐,常由此出芽繁殖。细胞内含有单核,双核和多核,可以进行单极,双极或多极出芽繁殖。AS3.3984 的分生孢子比 A22 略大。

从菌丝型形态观察可以看出,培养初期的幼龄菌丝通常壁薄,透明,分隔,隔距较长。菌丝分枝,在菌丝的各处均可出芽形成芽生孢子。芽生孢子可端生,侧生,或着生在侧枝上。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。菌丝的隔距变短,成扁圆柱形,形成念珠状菌丝链。AS3.3984 的这一变化过程很快,只需几天时间。A22 则变化极慢,在麦芽汁斜面上生长一个月,只有部分分生孢子壁加厚,有的膨大成圆形,冰箱放置数月才可见到部分念珠状黑色厚壁菌丝。部分膨大成圆形的黑的细胞,几乎没有黑色节孢子。而在 PDA 斜面上生长 1.5 月的 A22 则不产生厚壁菌丝,只有极少数壁稍厚的分生孢子(图 2)。

(四) 产物鉴定

将提取的胞外多糖分别用支链淀粉酶(Pullulanase E. C. 3. 2. 1. 41)及盐酸水解,并以标准样品作对照。两种溶剂系统的薄层及纸层析结果表明,分别产生麦芽三糖及葡萄糖,并与标准品的 Rf 值相同,证明胞外多糖是以麦

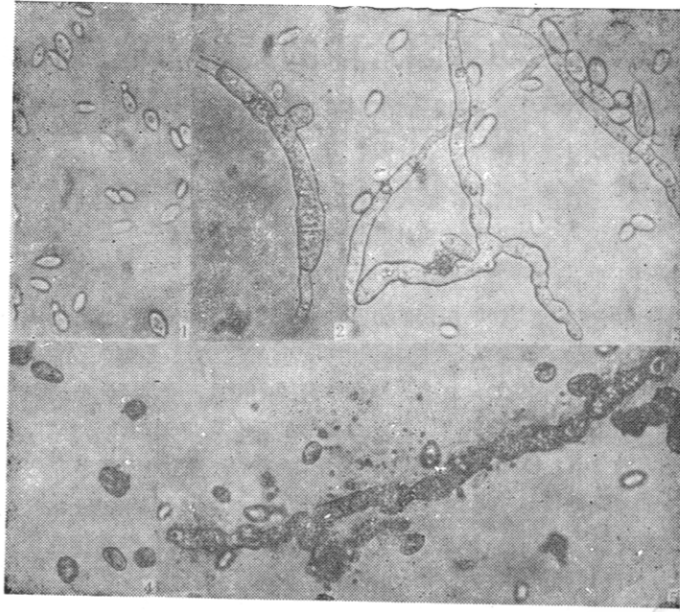


图 2 A22 菌株的菌丝体及孢子形态($\times 480$)

1. 分生孢子; 2-3. 菌丝体; 4. 厚壁孢子; 5. 黑色菌丝



图 3 支链淀粉酶, 酸水解多糖产物薄层析图谱

1. 甘露糖; 2. A22 短梗胞糖酶水解; 3. 标准多糖酶解;
4. A22 多糖酸水解; 5. 标准多糖酸水解

芽三糖为单位经 1 \rightarrow 6 糖苷键连结聚合的出芽短梗胞糖 (pullulan), 分子量在 2×10^4 以上。多糖溶液通过 DE52 纤维素柱后, 经支链淀粉酶酶解, 也得到相同产物 (图 3)。

讨 论

1. A22 菌株具有能获得无色素的胞外多糖和发酵后处理工序简单等优点, 为多糖工业生产提供了另一个有前途、具特色的菌株。

2. 按照 Hermanides-Nijhof^[9] 的分类系统, 经鉴定产无色素胞外多糖的 8 株菌, 均属短梗霉属。其中 A22 根据其培养特征, 显微形态和产孢结构, 黑色素出现晚等特征表明, 它与出芽短梗霉普鲁兰变种 (*Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arn. var. *pullulans*) 相似, 是否完全相同, 尚需进一步鉴定。

3. A22 多糖的水溶液, 通过 DE52 纤维素柱时, 不被吸附。其流出液经支链淀粉酶酶解仍产生麦芽三糖, 说明多糖没有可交换的基团存在。以糖蜜为碳源发酵得到的多糖, 由于糖蜜本身的颜色而带有褐色。这种多糖的水溶液通过 DE52 柱后, 色素被吸附到柱上, 用 0.1 mol/L NaOH 可将色素洗下, 说明色素具有阴离子性质。

4. A22 菌株与 Wickerman 从热带及亚热带分离的出芽短梗霉有色变种不同, 色素的形成对温度不敏感。A22 菌株在 37 $^{\circ}$ C 不生长, 28 $^{\circ}$ C 下才能生长, 未出现色素及其他异常现象。

参 考 文 献

- [1] Perlman, D.: *Adv. Appl. Microbiol.*, 23:40, 1977
(下转第 64 页)

(上接第9页)

- [2] Catley, B. J.; *Microbiol polysaccharides and polysaccharases* (ed by Berkeley, R. C. W.) published for the Society for general Microbiology by Academic Press, 1979, 69—84.
- [3] Catley, B. J. et al.: *Arch. Biochim Biophys.*, **143**: 138—142, 1971.
- [4] 谈家林编著: 短梗霉多糖及其应用, 中国科学院微生物研究所, 北京, 1987.
- [5] 谈家林: *生物工程学报*, **2**(3): 19—24, 1986.
- [6] 徐纯锡等: *微生物学通报*, **10**(3): 109—112, 1983.
- [7] 谷才恩: *微生物学通报*, **12**(2): 67—69, 1985.
- [8] 杜立生等: 山东大学硕士学位论文摘要汇编, 山东大学研究生处, 1985年.
- [9] E. J. Hermanides-Nijhof: *Studies in Mycology*, No 15, 141—177, 1977.
- [10] Wickerman, E. J. et al.: *Mycologia*, **67**: 342—361, 1975.