

果胶酶产生菌白色孢子突变株的诱变选育

杨天波

屈龙庆 詹高越* 丁万杰

(河北大学生物系,保定)

(河北省微生物研究所,保定)

果胶酶当前在国内外已普遍应用于水果加工工业^[1]。果胶酶可将高分子果胶分解成半乳糖醛酸,能有效地增强果汁,果酒的澄清,改善过滤条件,提高出汁率,并可代替酸碱法脱桔子囊衣,此外,果胶酶在麻纺工业上的应用亦较广泛。因而,目前果胶酶的需用量与日俱增。当前一般采用的果胶酶产生菌炭黑曲霉 ASP. 3.396,菌体孢子黑色。在果汁,果酒加工过程中影响产品的色泽,降低质量。本试验通过辐射诱变,对果胶酶产生菌 ASP. 3.396 进行了诱变处理,筛选孢子色泽及产酶性能等有利于水果加工工业的优良菌株。

材 料 和 方 法

(一) 菌种

炭黑曲霉 (*Aspergillus Carbonarius*) 3.396 由上海工业微生物所提供。

(二) 培养基及培养条件

1. 培养基

(1) 麦芽汁斜面培养基: 4—5°Be 麦芽汁 100ml, 琼脂 2 克, 1kg/cm² 灭菌 25 分钟。

(2) 分离单菌落用 K. R. Sreekeekantiah 培养基 (g): 蔗糖 20, 酵母膏 0.1, KH₂PO₄ 1.0, MgSO₄ · 7H₂O 0.5, FeSO₄ · 7H₂O 0.02, MnSO₄ · H₂O 0.01, ZnSO₄ · 7H₂O 0.01, NH₄NO₃ 2.0, 自来水 100ml, pH4.5, 1kg/cm² 蒸汽灭菌 25 分钟。

(3) 发酵用麦麸培养基: 麦麸 5g, (NH₄)₂SO₄ 0.05g, 自来水 6ml, 直径 9 cm 平皿装, pH5, 1kg/cm² 蒸汽灭菌 25 分钟。

2. 培养条件

菌种: 将菌种接种麦芽汁斜面培养基, 28℃温箱培养 7 天, 孢子成熟。

北京师范大学低能物理研究所核物理室张荫芬等同志提供了高能电子辐照, 谨此致谢。

河北大学生物系毕业同学王士奎、李宗悟、周佩燕、李淑平、张旭晨、杨金晓、王晨光、李路滨、李晓燕、丁振华参加了此项工作。

* 詹高越同志现调到天津市经济协作办公室。

分离单菌落：将稀释的孢子悬液，接 0.1ml 于 K. B. Sreecheekantiah 平板培养基，28℃—30℃ 温箱培养 48 小时，形成单菌落，挑取单株接种于试管斜面培养基上，30℃ 温箱培养 6—7 天，孢子成熟后，冰箱保存备用。

发酵：将成熟孢子接种于麦麸培养基，28℃ 温箱培养到 48 小时，发酵完成，浸提酶液后进行酶活测定。

(三) 酶液浸提及酶活力测定

1. 酶液浸提：将斜面成熟孢子接种于麦麸培养基中，28℃ 温箱培养，48 小时后发酵完成装入 100ml 三角瓶中，加入 10 倍 0.85% 生理盐水，置 30℃ 恒温水浴浸提 1 小时后，用脱脂棉过滤，滤液即酶液，冰箱保存备用。

2. 酶活测定：本试验采用脱胶作用时间测定法测定果胶酶活力^[1]。

方法：在 100ml 三角瓶中，加入 1% 果胶溶液 5ml。再加入 pH 4.2 的柠檬酸——柠檬酸钠缓冲液 4.5 ml，置 30℃ 恒温水浴中保温 2 分钟后，加入经适当稀释的酶液 0.5ml，计时，取反应液 1 ml 于刻度试管中，立即加入二滴碘液摇匀，再加入 2ml 异丙醇，轻微转动试管 2 分钟，然后将此反应液倾于白瓷盘中，观察脱胶作用结果。当瓷盘中的反应液胶性物消失时，为脱胶作用阳性，以脱胶作用结束的时间计算酶活力。

酶活力计算：在 30℃ 和 pH4.2 条件下，30 分钟使 1mg 苹果果胶脱胶作用结束时所需的酶量为 1 个酶活单位。

测定待测酶液脱胶作用结束的时间（分），求其时间倒数，计算酶活力。

$$\text{酶活单位/ml} = \frac{30}{x} \cdot 100 \cdot f$$

x = 脱胶时间(分)，f = 稀释倍数

(四) 辐照处理

1. 孢子悬浮液制备：由斜面菌种取两环成熟孢子，接种于麦麸试管培养基，28℃ 温箱培养 48 小时，孢子成熟后加入 0.85% 生理盐水 20ml，搅匀，倒入 50ml 三角瓶中，用玻璃珠打成孢子悬浮液，脱脂棉过滤，适当稀释，使孢子浓

度为 10^6 — 10^7 /ml。

2. 辐照方法

(1) 紫外线处理：15W 紫外灯管，照射距离 30 厘米，照射时间 5 分钟。取孢子悬浮液 5 ml，加入直径为 9 厘米平皿中，磁力搅拌条件下进行辐照。

(2) 高能电子处理：取 0.85% 生理盐水配制的孢子悬液 2.5ml，置于小安瓿瓶中，火焰封口后进行辐照处理。

高能电子辐照条件为 f:100Hz。I:5μA，R:靶距 12cm。

试验结果

(一) 致死率

1. 紫外线辐照致死率：试验采用紫外线对 ASP. 3.396 进行辐射，辐照时间为 5 分钟，致死率为 84.5%。

2. 高能电子辐照致死率：高能电子和高能电子加紫外线复合处理对 ASP. 3.396 的致死率见表 1。

表 1 高能电子和高能电子加紫外线辐照对 ASP. 3.396 的致死率

高能电子辐射 剂量 (rad)	致死率 (%)	
	高能电子辐射	高能电子辐射+紫外线辐照 5 分钟
0.02×10^6	44.06	79.74
0.04×10^6	49.20	
0.05×10^6	60.00	
0.08×10^6	61.74	96.00
0.10×10^6	73.00	98.00
0.15×10^6	79.00	
0.30×10^6	96.81	

(二) 高能电子及紫外线对 ASP. 3.396 进行复合处理

ASP.3.396 经高能电子(辐射剂量为 0.08×10^6 rad)加紫外线(辐射时间为 5 分钟)复合处理后，从大量菌落中筛选到 1 株白色孢子突变株—626 菌株。该突变株除在形态上发生白色突变外，其产酶性能也略高于亲株 ASP.3.396，酶活单位较亲株提高 4.24% (表 2)。

表 2 626 白孢子突变株与亲株 3.396 的比较

菌 株	主要形态变异		酶活单位/ml	酶活提高%
	孢子颜色	酶液色泽		
ASP. 3.396	黑 色	深 棕 色	1111	—
白孢子突变株	白 色	无 色	1158.3	4.24

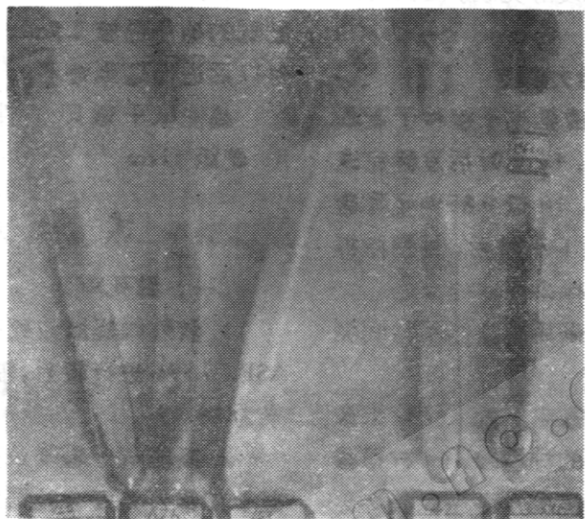


图 1 原始亲株 3.396 和白孢子突变株及其分离单株 41, 42, 43

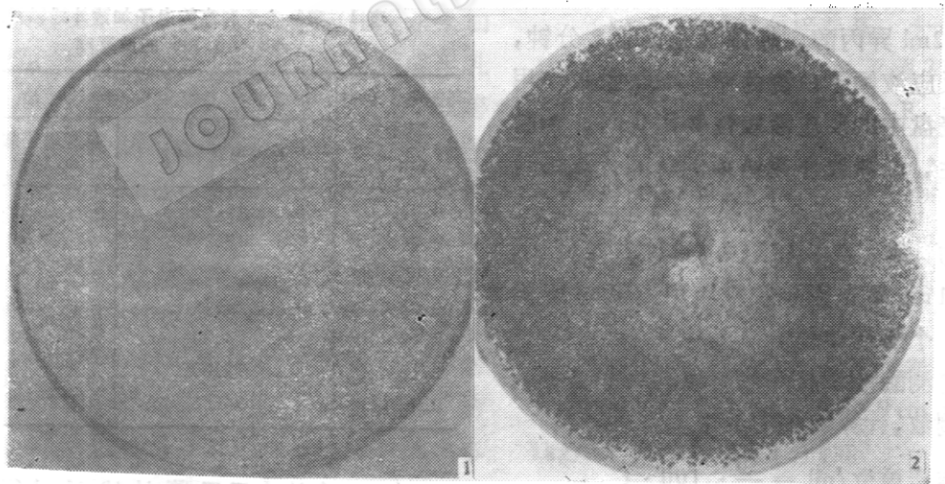


图 2 白色突变分离株 41(1) 及其亲株 ASP. 3.396(2)

(三) 白孢子突变株的性状和产酶性能的稳定性的

1. 白色孢子突变性状的稳定性：
将白孢子突变株 626 进行传代共 14 次，其白色孢子突变性状稳定，无回复突变，并从中筛选出几个单株，编号为 41, 42, 43(图 1)。

将白孢子分离株 41 和亲株 ASP. 3.396 分别进行平皿扩大培养，进一步观察其形态 (图 2)。

2. 白色孢子突变株产酶性能的稳定性的：将白色孢子突变分离株中的 42 菌株与原始亲株 ASP. 3.396 的产酶性能进行了比较，测定其酶

活,经多次试验结果表明,白色孢子突变株分离单株的产酶量比 ASP. 3.396 提高 11.06%,产酶性能稳定。

为了进一步提高产酶活力,将分离单株 42 菌株进行高能电子诱变处理,辐射剂量为 15、30、45 秒。以 45 秒处理效果最好,采用改进的

透明圈筛选果胶酶菌株方法^[2]从中筛选出 29.3 和 29.20 菌株,其酶活力分别比 42 号菌株提高 20% 和 2.9%。

参 考 文 献

- [1] 詹高越等:食品与发酵工业,4: 15,1983。
- [2] 杨天波等:河北大学学报,4(2): 46—52,1984。