文章编号：1000-5773(2008)03-0259-06

高压对米曲霉理化性质影响及诱变的研究*

王 华[1,2]，申斯乐[1,2]，李志慧[1]，崔 航[3]，王彦峰[2]，付欣欣[2]，
杨 帆[2]，常 亮[2]，郑晓一[2]，邹广田[1]

(1. 吉林大学超硬材料国家重点实验室，吉林长春 130012；
2. 吉林大学生命科学学院，吉林长春 130012；
3. 吉林大学环境与资源学院，吉林长春 130012)

摘要：在 100～400 MPa 压力、保压 20 min 的条件下处理酱油酿造菌种——米曲霉，研究高压对米曲霉存活率、形态特征、生理性质、蛋白酶、淀粉酶活性等的影响，并诱变筛选优良菌株。结果表明：高压对米曲霉的存活率、形态特征有明显的影响；压力对蛋白酶及淀粉酶活性的影响也有特异的规律，即在一定压力范围内(0.1～200 MPa)蛋白酶的活性随着压力的增加而减小，但随着压力的进一步升高(200～400 MPa)蛋白酶的活性又逐渐增强，在 300 MPa 时超过对照组，400 MPa 时蛋白酶的活性达到最高值；淀粉酶在 0.1～100 MPa 时活性下降，在 200 MPa时其平均的糊化和糖化活性最强、活力最高，当压力升高活性又开始降低，400 MPa 时几乎又回到对照值。另外，高压处理后获得一株理想的变异菌株 HP300a：生长速度快、孢子数量多、蛋白酶活力高，且不易被杂菌污染。其成曲的几项主要指标均优于对照株，酿出酱油的几项主要指标也明显优于对照株。为利用高压诱变筛选米曲霉优良菌种、提高酿造酱油产品的产量及质量提供了理论依据，并发现了高压处理米曲霉引起其蛋白酶及淀粉酶活性改变的特殊规律。

关键词：高压；米曲霉；致死率；蛋白酶活性；淀粉酶活性；变异
中图分类号：O521.9 **文献标识码**：A

1 引 言

近年来随着高压理论和技术的发展，高压生物学的研究已经深入到生物学的多个领域[1-11]，如高压对蛋白质、核酸等生物大分子结构及功能的影响[2-3]，对细胞凋亡的影响[4]，对高等植物的诱变及机理的研究[5]等。高压技术在食品工业中也有着广泛的应用，如高压能破坏细胞结构造成微生物的死亡，因此可以用来替代高温进行灭菌以保持食品的风味[6-9]，高压也能对微生物的各种代谢产生影响，造成其形态结构、生理活性、生化反应、遗传特性[10-11]等多方面的改变，为诱变、筛选优良菌种提供了基础。

米曲霉(*Aspergillus oryzae*)是广泛运用于酿造工业的一类真菌，它具有一套分解蛋白质和糖化淀粉能力均较强的酶系，适用于酿造酱油及酱类调味品。米曲霉的蛋白酶及淀粉酶的活性，是直接影响大豆、麸皮等酿造原料中蛋白及淀粉的利用率及产品收率的关键因素，因此，利用化学诱变剂、紫外线照射等传统方法诱变筛选蛋白酶及淀粉酶活性较高的米曲霉优良菌种的研究较为广泛[12-13]，但利用高压对米曲霉进行诱变筛选尚未见报道。本实验以目前国内酱油生产中常用的米曲霉 3.042 一级菌种为出发

* **收稿日期**：2007-09-22；**修回日期**：2007-12-07
基金项目：国家重点基础研究项目(2001CB711201)；博士后研究基金
作者简介：王 华(1973—)，女，博士研究生.
通讯作者：申斯乐，教授，主要从事分子生物学研究. E-mail：shensl@jlu.edu.cn
邹广田，教授，博士生导师，主要从事高压物理学研究. E-mail：gtzou@jlu.edu.cn

菌种，探讨高压对米曲霉存活率、形态特征、生理性质、蛋白酶及淀粉酶活性等的影响规律，不仅为高压诱变筛选米曲霉优良菌种提供一定的理论依据，而且也为运用高压技术诱变菌种这一新的领域提供了理论依据。

2 材料与方法

实验材料为米曲霉 3.042，由吉林省长春市北康酿造厂提供。实验用高压设备参见文献[5]。

高压处理：先将菌种在豆汁斜面培养基[14]上 30 ℃活化 72 h，用无菌生理盐水(0.85%)稀释至 10^4 mL^{-1}左右，吸取 1 mL 米曲霉孢子悬液于灭菌的传压袋中，采用 4 个压力梯度 100、200、300、400 MPa 进行保压 20 min 处理，同时设立对照组。

米曲霉致死率测定：处理后各取样 0.1 mL 加 0.5 mL 无菌生理盐水稀释，再各取 0.1 mL 接种到豆汁平板培养基，每样重复 5 次，48 h 后查菌落数，计算致死率[15]。

孢子生长方式的观察：取处理后培养 48 h 的米曲霉孢子，美蓝染色液，显微镜下观察。

淀粉酶活性测定：采用 DNS 法测定淀粉酶活性[12,16]。

蛋白酶活性测定：采用 Fulin 法[17]测定蛋白酶活性。

甲基红和伏-普实验：采用甲基红实验[18]及伏-普实验(V.P 实验)[18]检验糖代谢过程中丙酮酸代谢途径。

柠檬酸盐实验：采用柠檬酸盐实验[18]检验。

诱变株的筛选及其酿造酱油的检测：高压处理后，从 300 MPa、400 MPa 处理样品中筛选蛋白酶及淀粉酶活力均较高的菌株，连续 5 次传代、检测，在 300 MPa 处理组中获得了稳定遗传的理想菌株 HP300a，其特点是生长速度快、孢子数量多、蛋白酶活性高，且不易被杂菌污染。并且按 GB 18186－2000《酿造酱油》中华人民共和国行业标准[19]对 HP300a 酿造酱油进行主要理化指标检测。

3 结果与分析

3.1 致死率随压力的升高而增加

米曲霉在经过高压处理后，致死率随着压力的升高而增加。400 MPa 组在 48 h 检测时，无菌落生长，在 72 h 时，5 个处理中有 4 个各出现 1 个菌落。各处理组的平均存活株数及致死率参见表 1，致死率分析曲线参见图 1。

表 1 压力对米曲霉致死率的影响

Table 1 Effect on death ratio of *Aspergillus oryzae* by high pressure

Pressure /(MPa)	Average survival strains(unit)	Rate of death /(%)
Control	525.2	0
100	409.6	22.01
200	215.7	59.02
300	6.2	98.82
400	0.8	99.85

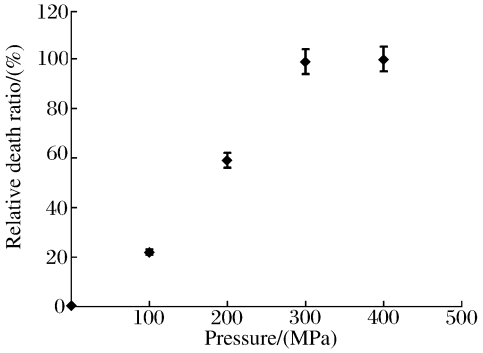
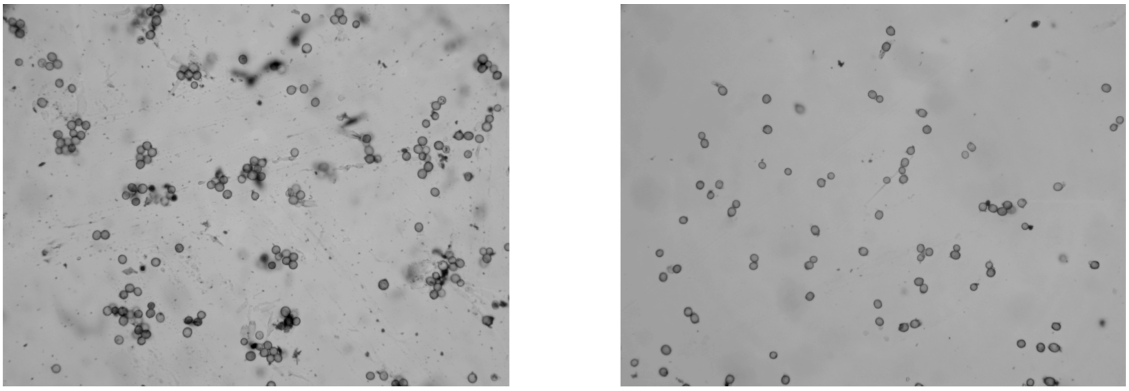


图 1 米曲霉相对致死率

Fig. 1 Relative death ratio of *Aspergillus oryzae*

3.2 高压处理后米曲霉孢子生长方式发生明显变化

经高压处理的米曲霉，其孢子生长方式发生了明显变化，呈现分散趋势。对照组的米曲霉孢子多为聚集生长，随着压力的升高米曲霉孢子生长逐渐出现分散，达 400 MPa 时，米曲霉孢子基本单个生长，少有聚集(见图 2)。



(a) Control　　(b) 400 MPa

图 2　米曲霉孢子生长状态

Fig. 2　Growth state of spores of *Aspergillus oryzae*

3.3　高压处理后淀粉酶及蛋白酶活性明显改变

分别测定总淀粉酶及 α-淀粉酶的活性,发现总淀粉酶的活性随着压力的升高出现先抑制后增强再下降的规律(见表 2 和图 3)。

表 2　压力对米曲霉总淀粉酶活性的影响

Table 2　Effect on amylase activity of *Aspergillus oryzae* by high pressure

Pressure/(MPa)	Amylase activity
Control	0.55
100	0.50
200	0.77
300	0.73
400	0.58

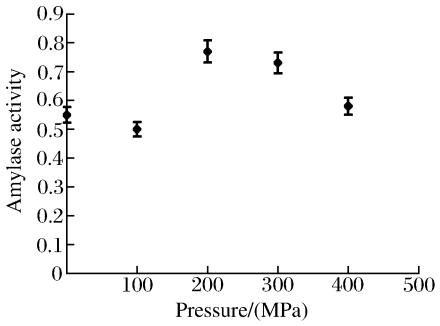


图 3　总淀粉酶活性

Fig. 3　Amylase activity

α-淀粉酶的活性与总淀粉酶的活性的变化规律相似,也是随着压力的升高出现先抑制后增强再下降的规律(见表 3 和图 4)。

表 3　压力对米曲霉 α-淀粉酶活性的影响

Table 3　Effect on α-amylase activity of *Aspergillus oryzae* by high pressure

Pressure/(MPa)	α-amylase activity
Control	0.34
100	0.27
200	0.43
300	0.41
400	0.31

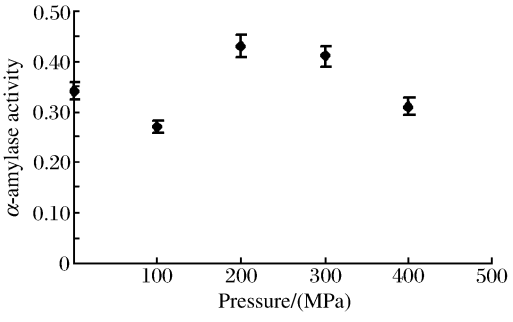


图 4　α-淀粉酶活性

Fig. 4　α-amylase activity

蛋白酶活性虽然也出现先抑制后增强的变化,但蛋白酶活性在 200 MPa 时最低,当压力在 200 MPa 以上活性又开始增加,400 MPa 时达最高值(见表 4 和图 5)。

表 4 压力对米曲霉蛋白酶活性的影响

Table 4 Effect on protease activity of *Aspergillus oryzae* by high pressure

Pressure/(MPa)	α-amylase activity
Control	1 563
100	1 309
200	1 125
300	1 906
400	2 142

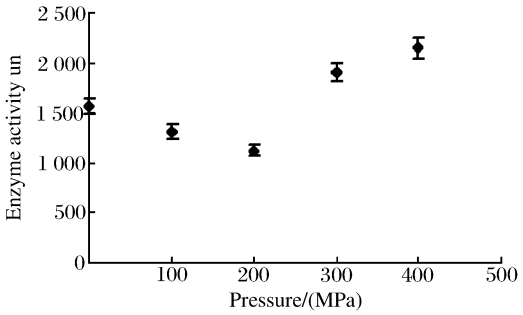


图 5 蛋白酶活性

Fig. 5 Protease activity

3.4 高压处理后米曲霉发酵的几个基本代谢途径未发生改变

色氨酸酶能分解色氨酸产生吲哚,导致发酵产品鲜味下降。米曲霉出发菌种在发酵过程中不产生色氨酸酶,高压后的菌种同样不产生色氨酸酶,所以吲哚试剂均为阴性反应。

米曲霉出发菌种不将培养基中糖代谢产生的丙酮酸分解为甲酸、乙酸、乳酸等,以保持培养基不出现酸化,所以甲基红试验为阴性反应。米曲霉采用另外一种代谢途径将培养基中的丙酮酸进行缩合,脱羧变成乙酰甲醇,因此在 V.P 试验中为阳性反应。高压处理后的米曲霉,其丙酮酸的代谢途径并未发生改变,甲基红试验仍为阴性反应,V.P 试验为阳性反应。

米曲霉能利用柠檬酸钠作为碳源,在分解培养基中的柠檬酸盐及磷酸铵后,产生碱性化合物,以维持米曲霉培养基中正常的 pH 值,因此柠檬酸盐实验是阳性,而高压处理后,米曲霉的这一性质也并未改变。

结果表明,高压并未改变米曲霉的上述代谢途径,因而不会改变发酵产品的品质。

3.5 诱变株 HP300a 酿造酱油的主要理化指标明显高于出发菌株

全氮和氨基态氮分别是酱油原料利用率和质量的主要指标,其含量高低主要取决于酱油曲中各种蛋白酶活力的大小[20]。诱变株 HP300a 的成曲,蛋白酶活性是出发菌株的 1.43 倍,HP300a 酿造酱油的几项主要指标也明显优于对照株:诱变株酿造的酱油氨基酸态氮含量为 8.92 g/L(以氮计),是出发菌株的 1.4 倍;全氮含量是 14.33 g/L(以氮计),为出发菌株的 1.2 倍;而总酸含量为 2.78%,是出发菌株的 1.9 倍;全氮利用率为 81.6%,明显高于出发菌株的 70.8%。其质量达到"GB 18186－2000 低盐固态发酵酱油"特级品[19]的标准,明显优于出发菌株酿造的酱油(一级品)。

4 讨 论

作为一项基本的热力学变量,压力是影响物质性质以及化学反应速度和平衡的重要物理学参数,它同样能影响生物大分子的性质和结构以及生物体内的各种生理生化的反应。

高压能够引起微生物的许多变化,如细胞形态、生化反应、遗传特性等。高压还可以使微生物的细胞膜、细胞壁、蛋白质结构等产生变化,因此高压可被用于灭菌及制备疫苗。但部分微生物在压力高达 1 600 MPa 后还能可逆地恢复正常形态和运动的特性[11]。在高压处理后存活的菌株中能产生可遗传的变异[13]。

本工作研究了高压对米曲霉的形态、生理生化性质、蛋白酶活性等的影响,在实验中发现,高压对米曲霉有明显的致死效应,而且致死率随着压力的升高而升高,在 300 MPa 时致死率超过 98.8%。而经高压后存活下来的米曲霉,其形态、蛋白酶及淀粉酶的活性发生了一系列的变化。但高压对米曲霉的蛋白酶及淀粉酶活性的改变规律与致死率不同。在存活下来的菌株中,蛋白酶及淀粉酶的活性有所变化,但这种变化并非是随着压力的增高而持续下降,而是既有下降也有升高,并且较高压力(300 MPa、400 MPa)处理后存活率较低,而存活下来的菌株的酶活性又普遍较高,这就为菌种的进一步筛选创造了有利条件。

高压后存活下来的菌株,其第一代的各种酶活性的改变既可能是由于高压作为一种外界信号引起基因表达改变造成的,也可以是由于高压导致基因组结构的改变引起的。但经过 5 次以上传代的菌株,其生理生化性质改变是稳定的,可以认定是发生了稳定的可遗传的变异,本研究所获得的 HP300a 即是一株稳定的理想变异菌株。本研究证明高压可以作为米曲霉一种理想的诱变手段,为工业菌种的诱变育种开辟了一种新的途径。

对于本研究中发现的高压对米曲霉中蛋白酶及淀粉酶活性改变的特殊规律,有待于从压力信号引起的基因表达改变的机理方面做进一步探讨。

References:

[1] Claude B, Ruan K C. An Emerging Field in Bioscience: High Hydrostatic Pressure Study [J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 1999, 31(6): 619-624.

[2] Kornblatt J A, Kornblatt M J. The Effects of Osmotic and Hydrostatic Pressures on Macromolecular Systems [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2002, 1595: 30-47.

[3] Robort B, Macgregor J. The Interactions of Nucleic Acids at Elevated Hydrostatic Pressure [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2002, 1595: 226-276.

[4] Takano K J, Takano T, Yamanouchi Y, et al. Pressure-Induced Apoptosis in Human Lymphoblasts [J]. Experiment Cell Research, 1997, 235: 155-160.

[5] Shen S L, Wang Z W, Shan X H. Alterations in DNA Methylation and Genomic Structure in High-Pressure Induced Rice Cultivar [J]. Science in China Series C, 2006, 49(2): 97-104.

[6] Toshi Otsuki, Masanori Kyo. Deep-Sea Environment Exploration Progam and Deep-Sea Microorganisms Collecting-Cultivating System [J]. High Pressure Science and Technology, 1992, 1(3): 226-233. (in Japanese)
大月 利,許正憲. 深海環境プログムと深海微生物実験システム [J]. 高圧力の科学と技術, 1992, 1(3): 226-233.

[7] Yamazaki Akira. Story of Development of High-Pressure processed Foods, Part 1 [J]. High Pressure Science and Technology, 1997, 8(4): 128-131. (in Japanese)
山崎 彬. 高圧食品開発物語(その1) [J]. 高圧力の科学と技術, 1997, 8(4): 128-131.

[8] Yamazaki Akira. Story of Development of High-Pressure processed Foods, Part 2 [J]. High Pressure Science and Technology, 1997, 11(3): 182-186. (in Japanese)
山崎 彬. 高圧食品開発物語(その2) [J]. 高圧力の科学と技術, 1997, 11(3): 182-186.

[9] Ludwig H. Cell Biology and High Pressure: Applications and Risks [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2002, 1595: 390-391.

[10] Gao X, Li J, Ruan K C. Barotolerant E. Coli Induced by High Hydrostatic Pressure [J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2001, 33(1): 77-81. (in Chinese)
高　翔,李　炯, 阮康成. 高压力诱变的耐压大肠杆菌 [J]. 生物化学与生物物理学报, 2001, 33(1): 77-81.

[11] Sharma A, Scott J H, Cody G D, et al. Microbial Activity at Gigapascal Pressures [J]. Science, 2002, 295: 1514-1516.

[12] Xiang Y, Zhu Z R, Gong S. Investigations of Relationship among *Aspergillus Oryza* Strains by Isoenzyme Elenzyme Electrophoresis [J]. Chinese High Technology Letters, 1997, (3): 12-16. (in Chinese)
向　洋,朱泽瑞,龚　岁. 米曲霉及激光诱变菌株间的同工酶亲缘关系研究 [J]. 高技术通讯, 1997, (3): 12-16.

[13] Xiang Y, Wu J H, Chen S R. Physiological and Biochemical Proterties of *Aspergillus Oryzae* Strains Radinted by lasers [J]. J Optoelectronics Laser, 1999, 10(2): 153-159.

[14] Dang M N, Lü D J, Fu L. A Screeing Methed of Soy Sauce *Aspergillus Orgza* [J]. China Condiment, 2004, (9): 17-25. (in Chinese)
党敏娜,吕东津,付　亮. 一种酱油菌种选筛的方法 [J]. 中国调味品, 2004, (9): 17-25.

[15] Wu H Y, Zheng X Q, Yao R. To Obertain High Capacity Carboxypeptidase by Mutagenized with UV Combing LiCl [J]. China Condiment, 2004, (6): 15-17. (in Chinese)
吴红艳,郑喜群,姚　蕤. 紫外线－氯化锂合诱变选育羧肽酶高产菌株 [J]. 中国调味品, 2004, (6): 15-17.

[16] Li H S, Sun Q, Zhao S J. Principles and Techniques of Plant Physiological Biochemical Experiments [M]. Beijing:

Higher Education Press,2000:169-172. (in Chinese)
李合生,孙 群, 赵世杰. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京:高等教育出版社,2000:169-172.
[17] Meng H H. Shanghai Brewing 3.042 the Method of Purification and Renovation on *Aspergillus Orgza* [J]. China Condiment,2001,(7):7-9. (in Chinese)
孟颢华. 泸酿 3.042 米曲霉的纯化复壮 [J]. 中国调味品,2001,(7):7-9.
[18] Shen P,Fan X R,Li G W. Microbiology Experiment [M]. Beijing:Higher Education Press,2002:120-168. (in Chinese)
沈 萍,范秀容,李广武. 微生物学实验 [M]. 北京:高等教育出版社,2002:120-168.
[19] GB 18186—2000. Brewing Soy Sauce [S]. Beijing:China Standard Press,2001. (in Chinese)
GB 18186—2000. 酿造酱油 [S]. 北京:中国标准出版社, 2001.

High Pressure-Induced Changes of Physico-Chemical Properties and Mutagenesis in *Aspergillus Oryzae*

WANG Hua[1,2], SHEN Si-Le[1,2], LI Zhi-Hui[1], CUI Hang[3], WANG Yan-Feng[2], FU Xin-Xin[2], YANG Fan[2], CHANG Liang[2], ZHENG Xiao-Yi[2], ZOU Guang-Tian[1]

(1. *National Laboratory of Superhard Materials, Jilin University, Changchun* 130012, *China*;
2. *College of Life Science, Jilin University, Changchun* 130012, *China*;
3. *College of Environment and Resource, Jilin University, Changchun* 130012, *China*)

Abstract: In order to study the pressure-induced changes of biological and physiochemical properties in fungi, *Aspergillus Oryzae* was treated with high pressure at 0.1～400 MPa for 20 min, and their viability and modality, as well as the activity of protease and amylase were determined. The result showed that high pressure induced obvious changes in the viability and modality of *Aspergillus Oryzae*. The activities of protease and amylase in *Aspergillus Oryzae* showed a specific regular pattern upon high pressure treatment. In the pressure range of 0.1～200 MPa, the protease activities decreased, but enhanced gradually in the range of 200～400 MPa. The protease activity was larger than control strain after treatment fungi with 300 MPa or higher, and reached the maximal at 400 MPa. The activity of amylase also decreased with pressure in the range of 0.1～100 MPa and gradually enhanced in the range of 100～200 MPa, and subsequently decreased again at the range of 200～400 MPa. The activity of amylase is highest in the treatment with 200 MPa, and same as control strain at 400 MPa. A fine mutant strain of fungi, HP300a, was obtained after treatment with 300 MPa. HP300a has a series of excellent characteristic: quick growth, more spores, higher activity of protease, and is rarely polluted by other strains. In addition, several indexes of soy sauce brewaged by HP300a were much better than that by control strains.

Key words: high pressure; *Aspergillus Oryzae*; death rate; protease activity; amylase activity; mutagenesis