

# 高压静电场对米曲霉的致死效应 及其酶活性的影响

王国栋<sup>1</sup> 傅志东<sup>1</sup> 罗在碧<sup>2</sup>

(1 西北农业大学基础课部, 2 西北农业大学农化系, 陕西杨陵·712100)

**摘 要** 高压静电场(HVESF)的场强、处理时间及悬浮孢子的萌发时间等对米曲霉菌致死率影响的试验结果表明: 致死率的大小与悬浮孢子萌发时间的长短有密切关系; 在所选处理剂量范围内, 电场对总淀粉酶有较明显的激活作用; 对 $\alpha$ -淀粉酶多呈抑制效果; 蛋白酶活性无明显变化。

**关键词** 高压静电场、米曲霉菌、致死率、酶活性

**中图分类号** S129, Q939.5

物理因子诸如电磁场、激光等在生物学中的应用研究越来越引起生物学和物理学工作者的重视。据报道, 经适当剂量的高压静电场处理的农作物种子, 其发芽率等生理生化指标均有较明显的变化<sup>[1]</sup>。高压脉冲电场对微生物有明显的致死作用<sup>[2]</sup>, 低压静电场(3 000 v/m)和交变电场对大肠杆菌的细胞膜电位和电定位有明显的影响<sup>[3,4]</sup>。高压静电场对微生物的致死作用如何, 能否影响其生化指标的变化而成为一种简便、有效的灭菌和诱变育种手段, 目前报道甚少。为此我们以酱油生产中常用的米曲霉 3042 菌种为材料, 进行了这方面的研究。

## 1 试验材料及方法

### 1.1 出发菌种

米曲霉(*Aspergillus oryzae*) 3042, 由西北农大微生物组菌种室提供。

### 1.2 培养基

平面培养和斜面培养采用 PDA 琼脂培养基(马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 自来水 100 mL, 自然 pH, 10<sup>5</sup>pa 压力下灭菌 20 min)。固体发酵培养基以麸皮:面粉:水=4:1:5(水含 0.5%尿素)的比例搅拌均匀。分称 10 g 3 份各装入 150 mL 的三角瓶中, 备用。

### 1.3 单孢子悬浮液制备

取活化 24 h 的米曲霉菌种试管, 无菌操作将孢子用 0.85% 的生理盐水洗入盛有石英砂的研钵中研磨 15 min, 转入内装玻璃珠的三角瓶中振荡 20 min, 务使孢子打散。用灭菌的脱脂棉过滤, 镜检, 测孢子数。制成单孢子含量为  $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$  个/mL 的孢子悬浮液。在 28~30℃ 下培养萌发数小时。待用高压静电场处理。

#### 1.4 分离与测数

稀释处理后的孢子悬液, 取 2~3 个稀释度。在平皿培养基上涂布分离。每个稀释度重复 3 次, 28~30℃ 下培养 72 h 后测菌落数。

#### 1.5 菌株保存

取各处理中菌落数适宜、重复性好的某一稀释度之平皿, 随机选取各若干菌落分接种于斜面培养皿上。在 28~30℃ 下培养 72 h, 取出置冰箱保存, 以备发酵测其酶活性<sup>[5]</sup>。

#### 1.6 酶液制备

取经活化培养 60 h 的斜面菌种一环, 接入灭菌的固体发酵培养基上, 每个处理重复 3 次, 30℃ 培养, 18 h 后每隔 4 h 摇瓶 1 次, 48 h 培养后将三角瓶倒置, 再培养 12 h<sup>[6]</sup>。取出称取 2 g 研磨 15 min, 转入 100 mL 容量瓶中定容, 38℃ 保温浸泡 3 h<sup>[7]</sup>。后用灭菌脱脂棉过滤即成粗酶液。

#### 1.7 仪器主要参数及处理方法

静电高压电源交流输入电压  $V=220V$ , 直流输出电压  $V=16.5 kV$ 。其场强大小由调节与电源正、负极相连的上、下竖直重叠的两平行平面圆极板 A、B 的间距来实现。两极板与等高仪相对固定, 其间距大小可直接从等高仪上读出(见图 1)。处理时将盛有单孢子悬液的培养皿置于 B 上即可。

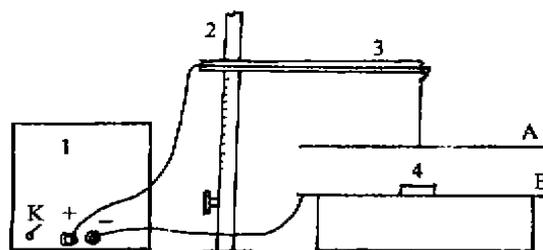


图 1 高压静电场处理米曲霉孢子悬液装置图

1. 直流高压稳压电流; 2. 测高仪; 3. 绝缘套管; 4. 培养皿

#### 1.8 酶活性测定方法

淀粉酶活性测定用二硝基水杨酸法; 蛋白酶活性测定用 Folin 法。

## 2 结果与分析

### 2.1 孢子萌发时间与致死率的关系

在较强场强( $E=500 kV/m$ )下, 对不同萌发时间(0, 2, 4, 6 h)的孢子进行处理。处理时间  $t$  分别为 1, 2, 4, 8, 12, 16, 22, 30 min。米曲霉菌的致死率测定结果见表 1。

表 1 孢子萌发时间与致死率的关系

萌发时间	孢子处理时间 (min)								
	0	1	2	4	8	12	16	22	30
0	0	0.2	0.7	0.4	0.3	2.4	4.2	7.6	12.3
2	0	7.8	13.4	25.1	45.5	44.3	56.7	60.3	61.3
4	0	21.8	52.8	64.2	79.4	83.8	87.3	89.3	90.9
6	0	26.6	46.4	53.3	76.8	79.5	79.4	80.5	81.4

结果表明: ①高压静电场对经适当处理的米曲霉菌有明显的致死作用。对萌发 4 h 的孢悬液, 处理后的致死率为最高(可达 90.9%)。②未经萌发的孢悬液处理后致死率很低, 说明孢悬液的萌发时间是影响致死率高度的一个重要因素(在处理剂量相同的条件

下)。③萌发 6 h 后的致死率低于 4 h 的, 这表明萌发时间有一个最适范围。这方面的研究目前尚未见报道。造成上述结果的可能原因是, 经适当萌发的孢子的细胞代谢活跃, 群体中细胞的生化反应过程对外界因子的影响较为敏感所致<sup>[8]</sup>。④对表 1 中数据作线性回归, 除  $T=0\text{h}$ -组数无规律外, 得到其他三条曲线的回归方程为:

$$T=2\text{h} \quad 1/D=0.0109+0.119/t \quad r=0.998$$

$$T=4\text{h} \quad 1/D=8.66 \times 10^{-3}+0.0342/t \quad r=0.968 \quad r_{0.01}=0.834$$

$$T=6\text{h} \quad 1/D=0.0108+0.0250/t \quad r=0.991$$

这说明对经过萌发后的米曲霉菌, 高压静电场对其致死率  $D$  与处理时间  $t$  有良好的规律性。(其中  $D$  以 % 计,  $t$  以 min 计)。

## 2.2 处理剂量与致死率的关系

选取萌发 4 h 的孢悬液, 在不同场强 ( $E=100, 200, 300, 500 \text{ kV/m}$ ) 下, 选取与 2.1 中相同的处理时间, 致死率的测定结果如图 2 所示。

结果表明: 在最适萌发时间条件下, 处理剂量与致死率有下述规律: ①在场强  $E$  一定时, 致死率随处理时间的增加而增加, 但致死率随处理时间  $t$  的变化率  $\frac{dD}{dt}$  在不断减小(除  $E=100$

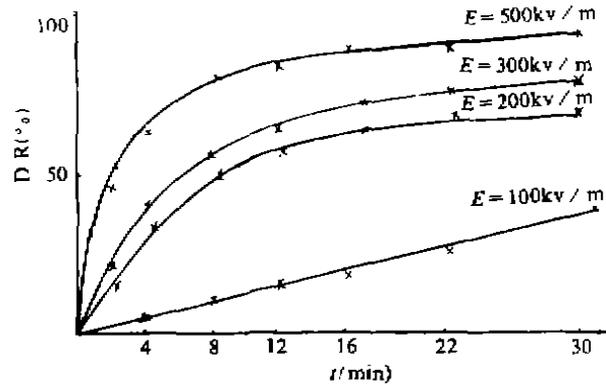


图 2 处理剂量与致死率的关系曲线

$\text{kV/m}$  的曲线外)。②处理时间  $t$  相同, 则场强愈强, 致死率愈高。③4 条曲线线性的结果为

$$E=100 \text{ kV/m} \quad D=-0.097+1.483t \quad r=0.9821$$

$$E=200 \text{ kV/m} \quad 1/D=0.0133+0.0922/t \quad r=0.9984 \quad r_{0.01}=0.834$$

$$E=300 \text{ kV/m} \quad 1/D=9.995 \times 10^{-3}+0.0679/t \quad r=0.9995$$

$$E=500 \text{ kV/m} \quad 1/D=8.67 \times 10^{-3}+0.0369/t \quad r=0.9504$$

说明 HVESF 对米曲霉的致死效应与处理时间有良好的规律性。但所遵从规律因场强的大小而变化。对  $E=100 \text{ kV/m}$ ,  $D$  与  $t$  为线性关系, 即随处理时间的增加, 致死率  $D$  也线性增高。当  $E>200 \text{ kV/m}$  时,  $D$  与  $t$  为非线性关系, 基本遵从 Mitscherlich 模式<sup>[4]</sup>。这表明场强大小是影响致死机制的一个重要因素。

## 2.3 HVESF 对米曲霉中几种主要酶活性的影响

选取萌发 4 h, 在场强  $E=300 \text{ kV/m}$  条件下, 处理时间分别为 1, 2, 4, 8, 12, 16, 22, 30 min 及 CK 的生成菌株发酵后提取的酶液。分别测定其  $\alpha$  淀粉酶、总淀粉酶和蛋白酶活性。结果见表 2。

表2 高压静电场对几种酶活力的影响

菌组号	处理时间 (min)	α-淀粉酶		总淀粉酶		蛋白酶	
		活力 (mg / g · 5 min)	酶活对比 (%)	活力 (mg / g · 5 min)	酶活对比 (%)	活力 (I.U. / g)	对比 (%)
1	CK	7.41	100	108.1	100	5.703	100
2	1	6.73	90.8	101.4	93.8	6.124	107.3
3	2	5.73	77.3	100.8	93.2	5.485	96.1
4	4	6.84	92.3	130.1	120.3	5.649	99.0
5	8	8.03	108.4	144.6	132.9	5.300	92.8
6	12	5.36	72.3	161.6	149.1	9.191	107.5
7	16	2.74	40.0	108.9	100.2	6.132	106.4
8	22	2.58	34.8	96.0	89.8	5.721	100.2
9	30	2.54	34.3	7.71	72.3	5.637	98.8

注: 酶活力系3次测定的平均值。

对上述酶活性影响的方差分析结果(表3表明): HVESF对α-淀粉酶和总淀粉酶活性在处理间有极显著的影响。主要表现在:(1)对α-淀粉酶在大多数处理剂量中表现为酶活性降低。最低的仅为CK的34.3%。(2)对总淀粉酶的影响可使酶活性增加,最大增加率为49.1%,但两种淀粉酶酶活性随处理剂量变化的规律相似。二者变化幅度上的差异可能是由于总淀粉酶中含有其他对静电场作用不太敏感的淀粉酶所致<sup>(6)</sup>。(3)蛋白酶活性在处理剂量范围内无明显变化。

表3 HVESF对酶活影响的方差分析

变异因素	自由度	平方和	方差	F值	F <sub>α</sub>
处理间	8	①: 114.22	14.28	59.19**	F(8,16) <sub>0.05</sub> = 2.59
		②: 15686.4	1960.8	10.0**	F(8,16) <sub>0.01</sub> = 3.89
		③: 43122.3	5390.3	1.49	
重复间	2	①: 0.483	0.241	1.77	F(2,16) <sub>0.05</sub> = 3.63
		②: 678.9	339.4	1.73	F(2,16) <sub>0.01</sub> = 6.23
		③: 23321.2	11660.6	3.22	
误差	16	①: 2.193	0.137		
		②: 3136.3	196.0		
		③: 57942.4	3621.4		
总和	26	①: 116.9			
		②: 19501.6			
		③: 124385.9			

注: ①代表α-淀粉酶; ②表示总淀粉酶; ③为蛋白酶。

高压静电场对酶活性影响的可能机理是由于其对米曲霉孢子中某些生物大分子的电荷分布、排列和运动发生了作用,从而影响了自由基的活动及蛋白质和酶活性<sup>(2)</sup>。由于不同酶的结构及其电性质上的差异,造成其在高压静电场下呈现不同的表象。

### 3 讨论

(1) 高压静电场的杀菌装置简单,调控方便,对经适当处理(萌发)的孢子菌悬液有明显的致死作用,可望成为一种较为理想的杀菌工具。这与紫外线杀菌有相似之处。因

对其机理尚不清楚, 能否作为一种微生物育种的手段, 还有待于进一步研究。

(2) 高压静电场对米曲霉中某些酶活性的极显著影响结果预示, 可以利用其作为提高微生物中某种酶活性的方法。但对其机理仍需进一步研究。

农化系 90 届毕业生盛海彦, 王晋民参加了部分试验工作。

### 参 考 文 献

- 1 黎先林, 王淑惠. 高压静电场对微生物和作物的影响及其在农业中的应用. 生物物理与生物化学进展, 1986(3), 36~39
- 2 Kulsikii L A, Savlus O S *et al*. Intensification mechanism of the action of antimicrobial agents in a constant electric field. *Electron obrab Mater*, 1987(1), 63~65(RUSS)
- 3 Zubkus V, Stamenkovic S. Kinetics of enzymic reactions in a.c electric field. *Biofizika*, 1989(2), 541~544(RUSS)
- 4 樱内雄二郎. 关于高压电场对微生物的杀菌效果(译文). 微生物通报, 1983(4), 35~41
- 5 周德庆主编. 微生物学实验手册. 上海: 上海科技出版社, 1976
- 6 上海市粮油工业公司技校主编. 发酵调味品生产技术(中). 北京: 轻工业出版社, 1984
- 7 孔显良. 产 $\alpha$ 淀粉酶的米曲霉筛选及产酶条件的研究. 应用微生物学, 1989(3), 18~20
- 8 冯清平. 微波对细菌致死及诱变效应的初步研究. 中国调味品, 1988(11), 15~17

## Death-Causing Effects of HVESF on *Aspergillus Oryzae* and Enzyme Activation

Wang Guodong<sup>1</sup> Fu Zhidong<sup>1</sup> Luo Zaibi<sup>2</sup>

(1 Basic Course Department, 2 Agro-chemistry Department, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi, 712100)

**Abstract** The testing effects of High Voltage Electrostatic Field (HVESF), treatment time and germination time of the suspended spores on the death causing rate of *Aspergillus oryzae* showed that the magnitude of death-causing rate was closely related to the length of germination time of suspended spores, and that within the range of the selected treatment dose, the HVESF apparently had an activation effect on total amylases and an inhibition effect on  $\alpha$ -amylase in most cases, and that there are no obvious changes in the activation of proteinase.

**Key words** High Voltage Electric-static Field, *Aspergillus oryzae*, death-causing rate, enzyme activation