

离子注入不动杆菌的降解特性

马睿, 蔡长龙, 梁海锋, 严一心 (西安工业大学离子束生物工程与生物多样性研究中心, 陕西西安 710021)

摘要 [目的] 选育能够高效降解石油烃的不动杆菌。[方法] 采用低能 N^+ 对不动杆菌菌株 a8 进行诱变, 测量离子注入前后不动杆菌对石油烃的降解率, 并研究其降解能力和降解机理。[结果] 当 N^+ 的注入能量和注入剂量分别为 15 keV 和 8.0×10^{15} ions/cm² 时, 不动杆菌的降解率可提高至 95.03%; 利用该注入参数对出发菌株 a8 进行 3 次连续诱变后, 获得 1 株能有效降解 59 种烷烃的突变菌株 AQ-15; 结合分子生物学技术, 对 AQ-15 降解长链石油烃的酶 *AlmA* 基因进行分析, 发现酶结合位点之一的 47th 氨基酸由原来的天冬氨酸 (Asp, D) 变为甘氨酸 (Gly, G), 从而提高了酶的活性, 达到了高效降解长链石油烃的效果, 揭示了离子注入后不动杆菌降解率提高的机理。[结论] 选育出 1 株能够高效降解石油烃的不动杆菌菌株 AQ-15。

关键词 离子注入; 不动杆菌; 降解率; 降解机理

中图分类号 X172 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)07-0001-03

Degradation Characteristics of Ion Implantation *Acinetobacter*

MA Rui, CAI Chang-long, LIANG Hai-feng et al (Xi'an Technological University, Ion Beam Bioengineering and Biodiversity Research Center, Xi'an, Shaanxi 710021)

Abstract [Objective] The aim was to screen out *Acinetobacter* strains which could effectively degrade petroleum hydrocarbons. [Method] We mutated *Acinetobacter* strain a8 by low energy N^+ , measured degradation rate of *Acinetobacter* strain a8 to petroleum hydrocarbons before and after ion implantation, and studied its degradation ability and degradation mechanism. [Result] When the injection energy and injection dosage were 15 keV and 8.0×10^{15} ions/cm² respectively, the degradation rate of *Acinetobacter* reached 95.03%; through three continuous mutation of start strain a8 under above injection parameters, a mutant strain AQ-15 which could effectively degrade 59 kinds of alkanes were obtained. The *AlmA* gene of AQ-15 to degrade long chain paraffin oil was analyzed by combining molecular biology techniques, and it was found that 47th amino acids changed from aspartic acid (Asp, D) into glycine (Gly, G), and enzyme activity was improved to get target of effectively degrading long chain paraffin oil, which revealed the improvement mechanism of degradation rate of *Acinetobacter* after ion implantation. [Conclusion] A *Acinetobacter* strain AQ-15 which could effectively degrade petroleum hydrocarbons was screened out.

Key words Ion implantation; *Acinetobacter*; Degradation rate; Degradation mechanism

石油类产品是重要的能源和工业原料, 随着其使用范围的不断扩大, 石油类产品的排放物对土壤生态系统结构的破坏问题也日益凸显, 石油污染治理刻不容缓^[1]。科研工作者提出了一系列治理石油污染的技术, 包括物理、化学、生物等方式, 其中, 生物治理依据微生物能以烃类为唯一碳源和能源生长, 将烃降解成对环境无害的产物 CO_2 和 H_2O 的特点, 相比物理、化学治污具有安全、效果好、成本低、处理彻底、无二次污染等优点, 是一种经济效益和环境效益俱佳并且能解决复杂环境污染问题的有效治污手段^[2]。目前已有多个菌种被证实能够降解石油烃, 周常义等^[3]从受污海水中筛选出能以 0# 柴油为唯一碳源的不动杆菌, 该菌株在最适 pH 7.0、温度 28 °C 条件下, 经过 3 d 培养, 其降解率仅为 38.7% ~ 56.2%。张子间等^[4]从石油污染的土壤中分离筛选出 1 株能够降解石油烃的绿叶假单胞菌, 并采用 10 mV 的 He-Ne 激光进行辐照, 诱变选育出 1 株高效降解石油烃的不动杆菌, 其在最适生长条件下, 比未受辐照的菌株降解相同石油烃缩短 24 h。因此, 采用新技术诱变选育高效石油烃降解菌株是推广微生物治理生态环境的当务之急。

离子注入诱变育种是将一定能量的离子束射入生物体内, 通过入射离子的能量、质量、动量和电荷 4 种因素作用, 引起生物体细胞内一系列生化反应使基因产生突变, 再从这些变异的种子中筛选出正性变异种类, 经过培育而成为新品

种的一项技术。该技术具有变异频率高、变异谱宽、变异快、变异稳定可靠等优点^[5]。笔者从长庆油田的含油污泥中筛选、鉴定出 1 株不动杆菌, 采用离子注入技术对其诱变, 测定了离子注入前后不动杆菌对石油烃的降解率, 通过连续注入低能 N^+ 培育出 1 株不动杆菌菌株, 利用 GC-MS 法对其降解特性和降解能力进行了研究, 并通过不动杆菌基因组测序, 揭示了其降解率提高的机理, 最终获得了 1 株高效降解石油烃的不动杆菌菌株。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株。从陕西省长庆油田附近提取的含油污泥中筛选出 1 株能以原油为唯一碳源生长的菌株 a8, 通过分子生物学鉴定确认为不动杆菌属 (*Acinetobacter* sp.)。

1.1.2 培养基。无机盐溶液: K_2HPO_4 5.00 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 1.00 g/L, $MgSO_4 \cdot 0.25$ g/L, $NaNO_3$ 2.00 g/L, $NaCl$ 5.00 g/L, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1.00 g/L, pH 7.0 ~ 7.2。LB 培养基: 胰蛋白胍 10.00 g/L, $NaCl$ 10.00 g/L, 酵母粉 5.00 g/L, pH 7.0 ~ 7.2。基础培养基: K_2HPO_4 0.50 g/L, $CaCl_2$ 0.02 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.20 g/L, NH_4NO_3 1.00 g/L, $FeCl_3$ 0.05 g/L, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1.50 g/L, 琼脂粉 13.00 g/L, pH 7.0 ~ 7.2。原油培养基: 无机盐溶液中添加原油 2%, pH 7.0 ~ 7.5; 原油来自于长庆油田 ($C_{15} \sim C_{28}$, 黏度为 128 mPa·s)。

1.1.3 仪器。采用四川成都同创材料表面新技术工程中心研制的生物改性离子注入设备, 该设备的气体离子源加速电压为 10 ~ 70 kV 连续可调, 最大束流为 8 mA, 束斑直径 \geq 100 mm。试验中高纯氮气流量为 6 sccm, 工作气压为 $1.3 \times$

基金项目 陕西省教育厅专项 (14JK1352); 陕西省科学技术研究发展计划项目 (2012K08-05)。

作者简介 马睿 (1983—), 女, 陕西宝鸡人, 讲师, 在读博士, 从事离子束技术及其应用研究。

收稿日期 2017-01-19

10^{-3} Pa, 加速电压为 15 ~ 20 kV, 注入剂量为 2.0×10^{15} ~ 12.0×10^{15} ions/cm² 可调, 灯丝电流为 10 A, 引出电压为 60 V, 抑制电压为 1 kV。

1.2 方法

1.2.1 菌株的活化与分离。将分离保藏的出发菌株 a8 置于 LB 固体培养基上 30 ℃ 活化 24 h 后, 观察其生长形态。挑取活化后的菌落接种到液体基础培养基中, 并于 30 ℃、110 r/min 条件下培养 16 h 得 1[#]菌液。

1.2.2 离子注入不动杆菌。取适量 1[#]菌液, 加入无菌水稀释至浓度为 1.0×10^7 CFU/mL, 取 0.1 mL 菌液均匀涂布于无菌平皿中央, 无菌风吹干制成菌膜, 以 N⁺ 为低能离子注入源, 注入能量为 15 keV, 注入离子剂量分别为 0 和 8.0×10^{15} ions/cm²。离子注入采用间隔式注入方式, 每注入 4 s 后停止 5 s, 重复上述注入模式, 直到达到所要求的注入剂量。注入后, 注入剂量为 0 的记为 M0-a8 平皿, 注入剂量为 8.0×10^{15} ions/cm² 的记为 M0-A8 平皿。取 1.0 mL 无菌水至注入平皿中心, 用无菌刮铲反复洗脱; 取 0.1 mL 洗脱液涂布于已经准备好的原油培养基平板上, 用无菌铲涂抹均匀; 将 M0-a8 平皿和 M0-A8 平皿上培养的不动杆菌培养 24 h 后, 分别挑选菌体生长快、透明圈大的 2 个单菌落点接于含烃平皿上, 记为 M1 代, 编号分别为 M1-a81、M1-a82 (注入剂量为 0), M1-A81、M1-A82 (注入剂量为 8.0×10^{15} ions/cm²)。

1.2.3 GC 法石油烃降解率测定。分别将存活的 M1-a81、M1-a82、M1-A81、M1-A82 不动杆菌按 5% 的接种量转接到含有 2% 原油的液体培养基的三角瓶中 (以石油烃为唯一碳源), 置于往复式振荡器上, 30 ℃、200 r/min 培养 5 d。培养结束后, 8 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 将不同菌株的上清液倒入相应编号的分液漏斗中, 加入 50.0 mL 二氯甲烷, 振荡萃取, 重复该萃取过程 3 次, 收集二氯甲烷层, 40 ℃ 蒸发至近干, 置于比色管中定容至 5.0 mL。以不接种的含相同石油烃浓度的基础液体培养基为对照 (CK)。用 GC9160 气相色谱仪分析并计算石油烃降解率。

GC9160 气相色谱分析条件: 检测器 FID, 载气 N₂, 色谱柱 DB-5, 进样口温度 300 ℃, 检测器温度 300 ℃。升温程序: 40 ℃, 保持 5 min; 100 ℃, 升温速度 10 ℃/min, 保持 5 min; 200 ℃, 升温速度 10 ℃/min, 保持 5 min; 300 ℃, 升温速度 10 ℃/min, 保持 5 min。

1.2.4 高效降解不动杆菌菌株培育。以菌株 a8 为出发菌株, 以离子注入剂量 8.0×10^{15} ions/cm² 和注入能量 15 keV 为注入参数, 对该菌株进行 3 轮低能 N⁺ 注入诱变、培育, 获得 1 株高效降解长链石油烃的菌株, 命名为 AQ-15。

1.2.5 GC-MS 法石油烃降解谱测定。以出发菌株 a8 为对照, 利用 GC-MS 法分析菌株 a8 与菌株 AQ-15 降解谱的变化。将 AQ-15 接入液体培养液中培养 96 h, 用正己烷萃取发酵液, 进行 GC-MS 残油组分检测分析。取重量法中定容后溶液 1.0 mL 稀释 100 倍作为检测样品。气相色谱仪条件: 毛细管色谱柱 RTX-5SM, 内径 0.25 mm, 膜厚 0.25 μm, 长度 20 m, 柱温采用多阶段程序升温, 初温 60 ℃, 保持

5 min, 4 ℃/min 升至 130 ℃, 保持 2 min, 再以 12 ℃/min 升至 180 ℃, 保持 2 min, 最后以 7 ℃/min 升至 280 ℃, 保持 10 min, 进样温度 260 ℃, 载气为高纯氮, 恒流流量 1 mL/min, 分流比 5:1, 进样量 1 μL。质谱仪条件: 电离方式为电子轰击 (EI⁺), 电离能量 70 eV, 离子源温度 200 ℃, 检测温度 250 ℃。

1.2.6 不动杆菌降解机理研究。利用生物信息学分析不动杆菌降解机理, 设计引物 (正向引物: 5'-atgctgtgcaacacctgga-3'; 反向引物: 5'-tcaaccagcgcgtgcaccg-3'), 分别以 A-8 和 AQ-15 菌株基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增, PCR 反应体系 (50.0 μL): 模板 (约 60 ng/μL) 2.0 μL, dNTP (各 2.5 mmol/L) 4.0 μL, 缓冲液 5.0 μL, 正反向引物 (20 μmol/L) 各 2.0 μL, 3 U Taq DNA 聚合酶 1.0 μL, ddH₂O 35.7 μL。PCR 反应条件: 94 ℃ 1 min; 52 ℃ 2 min; 72 ℃ 1 min, 30 个循环。对 PCR 扩增产物进行琼脂糖 DNA 回收后测序, 测序结果用 DNAMAN 软件进行分析并翻译成相应的蛋白质序列。蛋白质三维结果模拟由 I-TASSER 在线服务系统进行处理分析。

2 结果与分析

2.1 不动杆菌的鉴定 对出发菌 a8 在 30 ℃ 下培养 24 h 后, 菌落呈乳白色圆形, 不透明, 边缘不光滑, 表面扁平。生理生化试验结果表明, a8 为革兰氏阴性细菌, 氧化酶接触呈阳性, 淀粉水解呈阳性, 好氧, 对照《伯杰细菌鉴定手册》, 该菌株特征与不动杆菌属一致。

2.2 离子注入前后不动杆菌的降解率 由表 1 可知, 菌落 M1-A82 的降解率最高, 达 95.03%, 结合对二氯甲烷萃取液分液前的观察, M1-A82 菌株的有机相颜色最浅, 说明该菌的发酵液中残留的石油烃相对较少, 该菌对石油烃的降解能力最强。

表 1 离子注入前后不动杆菌对石油烃的降解率

Table 1 The degradation rate of *Acinetobacter* to petroleum hydrocarbons before and after ion implantation

菌落编号 Colony No.	N ⁺ 注入能量 N ⁺ injection energy 15 keV	N ⁺ 注入剂量 N ⁺ injection dosage $\times 10^{15}$ ions/cm ²	石油烃含量 The content of petroleum hydrocarbons mg/L	石油烃 降解率 Degradation rate of petroleum hydrocarbons %
CK	0	0	3 627.75	0
M1-a81	0	0	834.39	77.02
M1-a82	0	0	761.83	79.00
M1-A81	15	8.0	220.75	93.92
M1-A82	15	8.0	180.42	95.03

2.3 高效降解不动杆菌的降解特性 采用 GC-MS 对出发菌株 a8 和诱变菌株 AQ-15 处理的石油残油组分进行分析。由图 1、2 可知, 出发菌株的原油中含有 C₈ ~ C₃₆ 的多种烷烃, 而诱变菌株降解后的残油组分中只能检测少量的长链烷烃, 降解效果明显, 表明诱变菌株具有高效降解长链烷烃的能力。

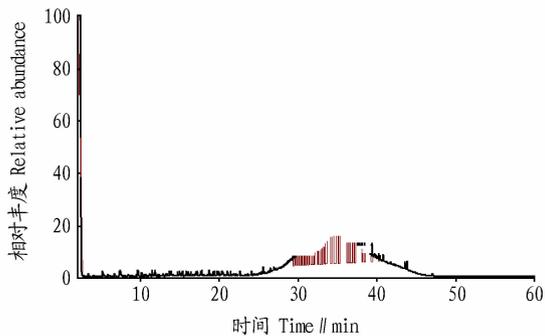


图 1 菌株 a8 降解原油后的 GC-MS 图谱

Fig. 1 GC-MS map for *Acinetobacter* strain a8 after degrading crude oil

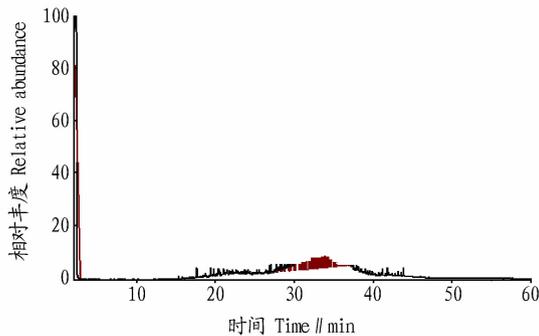


图 2 菌株 AQ-15 降解原油后的 GC-MS 图谱

Fig. 2 GC-MS map for *Acinetobacter* strain AQ-15 after degrading crude oil

Query	1	ATGCCTGTGGAACACCTGGACGTA	ACTCATCGTCGGCGCCGGCCTGTCCGGCATCGGCGCC	60
Sbjct	4310478	ATGCCTGTGGAACACCTGGACGTA	ACTCATCGTCGGCGCCGGCCTGTCCGGCATCGGCGCC	4310419
Query	61	GCCTGCCACCTGACGAAGCACTGCC	CCGGCAAGCGCTTCGCCTGCTCGAAGGGCGCGG	120
Sbjct	4310418	GCCTGCCACCTGACGAAGCACTGCC	CCGGCAAGCGCTTCGCCTGCTCGAAGGGCGCGG	4310359
Query	121	GCGATGGGCGGCACCTGGGCGCTT	TCCGCTACCCCGGCATCCGCTCCGACTCGGACATG	180
Sbjct	4310358	GCGATGGGCGGCACCTGGGCGCTT	TCCGCTACCCCGGCATCCGCTCCGACTCGGACATG	4310299
Query	181	TTCACCTCGGCTACAACCTCAAGCC	TGGAGCGATCCGAAGGCCATCGCCGACGGCCCC	240
Sbjct	4310298	TTCACCTCGGCTACAACCTCAAGCC	TGGAGCGATCCGAAGGCCATCGCCGACGGCCCC	4310239
Query	241	TCGATCCGCGCTACATCGAGGACAC	CCGCGCGGAGAACGGCATCGACCCGGAAGATCCGC	300
Sbjct	4310238	TCGATCCGCGCTACATCGAGGACAC	CCGCGCGGAGAACGGCATCGACCCGGAAGATCCGC	4310179
Query	301	TACCGCCATCGGCTGCTCAAGGCGC	TGGGATTCCGCCAATCGCGCTGGAACCTCGAC	360
Sbjct	4310178	TACCGCCATCGGCTGCTCAAGGCGC	TGGGATTCCGCCAATCGCGCTGGAACCTCGAC	4310119
Query	361	GTGCAGCGGACGACGAGCTCGAGCC	GCTGCGCATGACCCGCGAGTTCCTGCTGATGTGC	420
Sbjct	4310118	GTGCAGCGGACGACGAGCTCGAGCC	GCTGCGCATGACCCGCGAGTTCCTGCTGATGTGC	4310059

Query	1	MPVEHLDVLI	VGAGLSGIGAA	CHLTKHCPGKRF	FALLEGRAAMGGT	WGLFRYPGTRSDSDM	60
Sbjct	1	MPVEHLDVLI	VGAGLSGIGAA	CHLTKHCPGKRF	FALLEGRAAMGGT	WGLFRYPGTRSDSDM	60
Query	61	FTLGYNFKPW	SDPKAIADG	PSIRRYIEDTARE	NGIDRKIRYR	HRLKADWDSANARWNLD	120
Sbjct	61	FTLGYNFKPW	SDPKAIADG	PSIRRYIEDTARE	NGIDRKIRYR	HRLKADWDSANARWNLD	120
Query	121	VQRDDELEPL	RMTAQFLLM	CTGYRYEAGY	TPEFAGREDF	AGRIWHPQLWPEDLDYSGKK	180
Sbjct	121	VQRDDELEPL	RMTAQFLLM	CTGYRYEAGY	TPEFAGREDF	AGRIWHPQLWPEDLDYSGKK	180
Query	181	VVWIGSGATA	VTLVPSMTD	KAAHVMTLQR	SPSYVITLPQ	KDAISNFLRRFLPETWVYRQA	240
Sbjct	181	VVWIGSGATA	VTLVPSMTD	KAAHVMTLQR	SPSYVITLPQ	KDAISNFLRRFLPETWVYRQA	240
Query	241	RARNVAMQM	IFFMLAKG	FPVWRKALLK	LASLQLGKQ	FDMRHFSPRYKPWDERVCAVPDG	300
Sbjct	241	RARNVAMQM	IFFMLAKG	FPVWRKALLK	LASLQLGKQ	FDMRHFSPRYKPWDERVCAVPDG	300
Query	301	DLFKVLRK	GKASVVT	TEHIDRFVDR	GIRLKTGEV	LEADIIVTATGLDLVMFGGABIAVDGK	360
Sbjct	301	DLFKVLRK	GKASVVT	TEHIDRFVDR	GIRLKTGEV	LEADIIVTATGLDLVMFGGABIAVDGK	360
Query	361	PFQVNSM	GYRIMLR	LDLPNLA	AVLGYTNA	SWTLKADLSSEYFCRLINHMDAIGMRQVTA	420
Sbjct	361	PFQVNSM	GYRIMLR	LDLPNLA	AVLGYTNA	SWTLKADLSSEYFCRLINHMDAIGMRQVTA	420
Query	421	RDTSGDV	REEPFLN	LNSGYI	QRAADRMP	KQCDRMPWKLYQNYVLDLALLRYGKVEDGYLV	480
Sbjct	421	RDTSGDV	REEPFLN	LNSGYI	QRAADRMP	KQCDRMPWKLYQNYVLDLALLRYGKVEDGYLV	480
Query	481	FSSPASQR	QGDGAAV	QALG	499		
Sbjct	481	FSSPASQR	QGDGAAV	QALG	499		

注: Query 为诱变菌株; Sbjct 为出发菌株

Note: Query was induced strain; Sbjct was start strain

图 3 a8 和 AQ-15 的 Alma 酶基因核苷酸和蛋白序列比对结果

Fig. 3 The comparison results for nucleotide and protein sequences of Alma gene of a8 and AQ-15

表7 沙糖橘、西番莲、荸荠复合果蔬汁饮料配方正交试验结果

Table 7 Results of orthogonal test of sugar orange, passionflower, water chestnut compound juice

试验号 Test No.	因素 Factor			感官评分 Sensory scoring//分
	A	B	C	
1	1	1	1	73
2	1	2	2	85
3	1	3	3	84
4	2	1	2	87
5	2	2	3	85
6	2	3	1	81
7	3	1	3	76
8	3	2	1	62
9	3	3	2	76
K_1	242	236	216	
K_2	253	232	248	
K_3	214	241	245	
极差 R	39	9	32	

正交试验结果表明,复合果蔬汁配方中复合果蔬汁添加量(A)是影响复合果蔬汁饮料口感和风味的最主要的因素,白砂糖添加量(C)次之,柠檬酸添加量(B)最小。沙糖橘、西番莲、荸荠复合果蔬汁饮料的最优配方为 $A_2B_3C_2$,即在沙糖橘汁:西番莲汁:荸荠汁配比为5:2:3,复合果蔬汁添加量为35%,白砂糖添加量为10%,柠檬酸添加量为0.05%的条件下,复合果蔬汁饮料风味最佳。选出的组合不在试验中,重复试验,确定优化后的配方为 $A_2B_3C_2$ 。

2.3 产品质量标准

2.3.1 感官指标。香味:香味协调,清爽沁人;色泽:呈浅黄色,纯正,颜色明亮;滋味:口感佳,酸甜适中,无异味;组织形态:品质均匀,无沉淀。

(上接第3页)

根据 GC-MS 分析结果,出发菌株 a8 可以完全降解 29 种化合物,而诱变后得到的菌株 AQ-15 可以降解 59 种化合物,比出发菌株能多降解 30 种化合物,降解能力大幅度提高。

2.4 离子注入不动杆菌的降解机理 根据现有研究报道,在石油降解菌的烷烃降解酶系统中,降解长链烷烃主要为长链烷烃羟化酶 AlmA^[6]。为阐明突变菌株高效降解长链石油烷烃的分子机理,依据不动杆菌基因组测序结果,经分析后 AlmA 长链石油烷烃酶基因全长为 1 500 bp,编码 500 个氨基酸,其基因序列经 Blast 比对后,同源性与 NCBI 中报道基因相似度为 98%,诱变前后 AlmA 降解酶 DNA 序列及蛋白质序列比较如图 3 所示,其中 Sbjct 为出发菌株,Query 为诱变菌株,根据比对结果可知,突变位点发生在成熟肽区域,经诱变后 140th 核苷酸由原来的 A 变为 H,相应的 47th 氨基酸由原来的天冬氨酸(Asp, D)变为甘氨酸(Gly, G)。其酶的一个结合位点为 Asp47。由此可知,天冬氨酸为极性带负电荷酸性氨基酸,而甘氨酸为非极性氨基酸,且突变位点发生在酶结合位点 Asp47,说明突变可能改变了结合位点结构,使得酶活性有所提高。

3 结论

将低能 N^+ 注入不动杆菌菌株 a8,测定了 N^+ 注入前后

2.3.2 微生物指标。细菌总数 ≤ 100 个/mL;大肠菌群 ≤ 30 MPN/L;霉菌、酵母 ≤ 20 CFU/mL;致病菌未检出。

由此可知,沙糖橘、西番莲、荸荠复合果蔬汁饮料所含微生物符合国家果、蔬汁饮料卫生标准。

3 结论

该研究得到了沙糖橘、西番莲、荸荠复合果蔬汁饮料的最佳配方,即沙糖橘汁:西番莲汁:荸荠汁 = 5:2:3(体积比),复合果蔬汁添加量为 35%,添加白砂糖 10%、柠檬酸 0.05%。复合果蔬汁饮料成品的色泽为淡黄色且明亮,香味协调清爽,口感细腻,酸甜适中,品质稳定,营养丰富,且微生物指标符合国家标准。

参考文献

- [1] 吴文,黄永敬,马培恰,等. 广东地方特色柑桔生产现状与发展对策[J]. 广东农业科学,2014,41(23):35-38.
- [2] 李本波. 十月金果——沙糖桔[J]. 中国果菜,2010(11):6-11.
- [3] 黄国清,肖仔君,梁小颖,等. 西番莲果汁加工工艺研究[J]. 食品科学,2006,27(8):187-190.
- [4] 蒋依辉,钟云,易定财. 杨桃荸荠复合果汁的工艺研究[J]. 食品工业科技,2007,28(1):143-145.
- [5] 李南薇,刘长海,陈晓薇. 菠萝芒果复合果汁的研制[J]. 食品科技,2011,36(4):74-77.
- [6] 张婷,闵甜,赵超敏,等. 复合果蔬饮料的工艺及稳定性研究[J]. 安徽农业科学,2015,43(28):295-297.
- [7] 刘妍. 番石榴与胡萝卜复合果蔬汁饮料的研制[J]. 新农业,2015(21):18-21.
- [8] 辽宁省卫生监督所. 果、蔬汁饮料卫生标准:GB 19297—2003[S]. 北京:中国标准出版社,2003.
- [9] 侯旭杰,袁艳林,李海伟,等. 红枣山楂枸杞复合果汁饮料的研制[J]. 塔里木大学学报,2010,22(3):1-6.
- [10] 徐文鑫,刘通讯. 营养复合果汁饮料的研制[J]. 饮料工业,2012,15(1):34-36.

不动杆菌的降解率,当 N^+ 的注入能量和注入剂量分别为 15 keV 和 8.0×10^{15} ions/cm² 时,不动杆菌的降解率有所提高,可达 95.03%;利用上述离子注入参数对出发菌株 a8 经过 3 次连续诱变,筛选培育后获得了 1 株降解长链石油烷烃能力较高的突变菌株 AQ-15,该菌株能有效降解 59 种烷烃;以 AQ-15 为研究对象,结合分子生物学技术,对其降解长链石油烷烃的酶 AlmA 基因进行分析,结果表明酶结合位点之一的 47th 氨基酸由原来的天冬氨酸(Asp, D)变为甘氨酸(Gly, G),从而提高了酶的活性,达到了高效降解长链石油烷烃的效果,揭示了离子注入后不动杆菌降解率提高的机理。

参考文献

- [1] 陈丽华. 黄土塬石油污染土壤的降解规律及生物修复优化研究[D]. 兰州:兰州大学,2012:1-3.
- [2] 孙国华,任利华,刘爱英,等. 一株石油降解菌分子鉴定及特性分析[J]. 生物技术通报,2010(9):210-214.
- [3] 周常义,林情员,苏国成,等. 一株海洋石油降解菌的分离鉴定及特性研究[J]. 集美大学学报(自然科学版),2009,14(1):20-24.
- [4] 张子间,刘勇弟,卢杰,等. He-Ne 激光诱变选育高效石油降解菌的研究[J]. 环境工程学报,2012,6(2):677-682.
- [5] 余增亮. 离子束生物技术引论[M]. 合肥:安徽科学技术出版社,1996.
- [6] 吴福顺. 渤海溢油区石油降解菌的筛选鉴定及功能基因研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2013:20-22.