

·离子束生物工程·

N^+ 注入选育产蛋白酶益生菌及其生物学效应研究

程茂基¹, 陈丽娟¹, 蔡克周¹, 计 峰¹, 孟秀丽¹, 赵彩艳¹, 石秀侠¹, 余增亮², 张束清², 虞 龙²

(1. 安徽农业大学动物科技学院, 中国安徽 合肥 230036; 2. 中国科学院等离子物理研究所, 中国安徽 合肥 230031)

摘 要: 试验研究了 N^+ 注入选育产蛋白酶益生菌及其生物学效应。经 N^+ 反复注入诱变筛选, 突变高产菌株的酶活由出发菌株的 $75.8 \text{ IU} \cdot \text{g}^{-1}$ 提高到 $631.6 \text{ IU} \cdot \text{g}^{-1}$; 利用中心组合设计原理摸索出了突变菌株最佳产酶条件: 即麸皮 24.83%, 豆粕 23.68%, 水 50%, 硫酸铵 1.49%, 发酵温度 30°C , 发酵时间 66 h, 培养基 pH 5.5。生物学效应研究发现: 真空处理对活细胞有明显伤害; 孢子存活率是随着注入剂量加大而迅速降低, 当注入剂量加大到 $50 \times 2.6 \times 10^{13} \text{ ions/cm}^2$ 时存活率出现平缓回升, 注入剂量超过 $100 \times 2.6 \times 10^{13} \text{ ions/cm}^2$ 时存活率又再次开始下降; 注入剂量越大, 孢子突变率越高, 中等注入剂量 $30 \times 2.6 \times 10^{13} \text{ N}^+/\text{cm}^2 \sim 80 \times 2.6 \times 10^{13} \text{ N}^+/\text{cm}^2$ 可引起较高的正突变率; ESR 谱研究结果表明, N^+ 注入前和注入后都有自由基 ESR 波谱单一峰, 随着注入剂量的增大, 孢子内的自由基 ESR 波谱的强度也逐渐增大; SEM 观察发现, 未经 N^+ 注入的孢子较为完整、饱满且表面光滑, 而经注入后的孢子表面粗糙, 可见明显的刻蚀损伤和破壁现象, 并且注入剂量越大, 伤痕也越深宽。试验结果提示: N^+ 注入是一种有效的动物益生菌选育方法。

关键词: 离子注入; 益生菌; 突变; 刻蚀损伤; 自由基**中图分类号:** Q691; Q939.9**文献标识码:** A**文章编号:** 1007-7146(2005)03-161-07

Studies on Breeding of Probiotic *Aspergillus niger* and its and Biological Effects by N^+ Implantations

CHENG Mao-ji¹, CHEN Li-juan¹, CAI Ke-zhou¹, JI Feng¹, MENG Xiu-li¹,
ZHAO Cai-yan¹, SHI Xiu-xia¹, YU Zeng-liang², ZHANG Shu-qing², YU Long²

(1. College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui, China;

2. Institute of Plasma Physics, Chinese Academy of Science, Hefei 230031, Anhui, China)

Abstract: Breeding of probiotic *Aspergillus niger* and its biological effects by N^+ implantations were studied. The activities of protease of mutated strain *Aspergillus niger* AN02 was raised from $75.8 \text{ IU} \cdot \text{g}^{-1}$ to $631.6 \text{ IU} \cdot \text{g}^{-1}$; the optimum factors of mutated strain *Aspergillus niger* AN0 was tested by the theory of center combination; That is medium bran 24.83%, bean cake 23.68%, water 50%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.49%, fermentation temperature, 30°C , time period, 66 h, pH, 5.5. The biological effects showed: the treatment of vacuum harm live cell; The survival rate of spores was decreased with increasing of implantation dose and increased gradually when the dose of implantation was $50 \times 2.6 \times 10^{13} \text{ ions/cm}^2$; but that of spores decreased when the implantation ion dose was $100 \times 2.6 \times 10^{13} \text{ ions/cm}^2$; There was high positive mutation rate when $30 \times 2.6 \times 10^{13} \text{ N}^+/\text{cm}^2 \sim 80 \times 2.6 \times 10^{13} \text{ N}^+/\text{cm}^2$. The lager the implantation dose was, the higher the spore mutation rate was. The ESR results showed that free radicals have existed in the control and increased with added implantation dose. The SEM indicated that the control were integrity, while the surface of spores was coarseness, moreover the damage of ionic etching and phenomenon of dilapidating cell wall could be seen, When dose increased continually, the damage to cells became more and more serious. Thus a conclusion may be drawn that it is a effective way of breeding probiotics by N^+ implantation.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30100134)**收稿日期:**2005-03-12

Key words: ion implantation; probiotics; mutation; etching damage; free radicals

近年来益生菌作为一种绿色安全饲料添加剂而倍受关注,其中黑曲霉(*Aspergillus niger*)是有效益生菌之一。研究表明,黑曲霉主要通过分泌消化酶,弥补动物自身内源消化酶分泌不足而起到益生作用^[1]。然而,遗憾的是绝大多数黑曲霉都直接分离于自然界,由于它们本身的产酶活力差或者难以适应肠道内环境,实际应用时往往难以达到预期效果。为此,提高黑曲霉益生菌的产酶性能十分必要。

离子注入育种技术具有损伤轻、突变率高、突变谱广的特点,已在工业微生物育种上多次获得成功,但迄今为止该技术尚未应用于动物益生菌的选育^[2]。有鉴于此,本试验探讨了低能离子注入产酶益生菌的生物学效应,确定离子最佳辐照参数,旨在进一步选育酸性蛋白酶高产菌株,以增加其益生效果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌种 黑曲霉(*Aspergillus niger*) ANS1, 此前由本试验室分离并保存。

1.1.2 培养基 斜面培养采用 PDA 培养基^[3]; 平皿培养采用查氏培养基^[3]; 初筛培养采用查氏培养基加入 1% 脱脂奶粉; 基础发酵培养采用麸皮: 豆粕 = 1:1, 加等量水拌匀, pH 自然。所有培养基用前均须在 121 °C 下灭菌 20 min。

1.1.3 主要试剂和仪器 Poly-L-Lysine 试剂购自 Sigma 公司; ESR 波谱仪, 型号为 ER200D-SRC; 显微扫描电镜; 722 s 可见分光光度计。

1.2 方法

1.2.1 单孢子悬液的制备 取新鲜活化斜面, 加入 10 ml 无菌水, 用接种环小心刮下孢子, 移 5 ml 于预先灭菌三角瓶, 瓶中装有玻璃珠和 30 ml 无菌水, 在

摇床上震荡约 30 min 经滤纸过滤, 菌液镜检为分散单孢子即可。用血球计数板计数, 调整孢子浓度至 2×10^6 个/ml ~ 5×10^6 个/ml。

1.2.2 孢子存活率的测定 真空处理后孢子存活率的测定: 将制备好的黑曲霉单孢子悬液 0.1 ml 均匀涂布在直径为 90 mm 的无菌空白平皿中央, 置于超净台下由无菌风吹干。置于真空靶室中, 分别放置时间 0 s、30 s、60 s、90 s、120 s、150 s、180 s, 然后取出用 1 ml 无菌水洗下, 适当稀释后, 吸取 0.1 ml 涂于平板培养基的平皿。恒温 30 °C, 倒置培养 60h ~ 70 h 后计数, 对照经同样处理。

离子注入后孢子存活率的测定: 注入前用紫外线对离子注入仪小靶室消毒 30 min, 注入 N^+ 离子需加速到 10 keV, 然后以 $10 \times 2.6 \times 10^{13}$ ions/cm²·s ~ $120 \times 2.6 \times 10^{13}$ ions/cm²·s 的剂量对平皿上孢子进行注入。每次连续注入 5 s, 间隔 30 s ~ 60 s, 以消除离子注入热效应。对照组经相同时间真空处理, 不经离子注入。

1.2.3 孢子突变率的测定 黑曲霉孢子经过不同注入剂量处理并培养后, 随机挑选 20 株菌落, 转接斜面恒温 30 °C 培养 60 h 后, 按 10^7 孢子/瓶接种基础发酵培养基 30 °C 培养 72 h, 测定粗酶液酶活。酶活高于出发株 10% 为正突变, 反之为负突变, 否则为无义突变。

1.2.4 突变高产菌株最佳产酶条件的研究 突变高产菌株最佳发酵条件试验: 以基础发酵培养为基础进行单因素试验, 分别研究培养温度、时间和起始 pH 黑曲霉产酶性能的影响。

响应面试验优化突变高产菌株发酵条件: 根据中心组合设计原理, 以豆粕、含水量、硫酸铵三个因素为自变量, 以酶活为响应值设计了三因素的分析试验, 共 20 个处理^[4]。其中变量及水平如表 1。

表 1 中心组合试验变量及其水平

Tab.1 Variation and level of central test

因素	水 平 Level				
Factors	1.682	-1	0	1	1.682
豆粕 Soybean meal (X_1)	33.2	40	50	60	66.8
水 Water (X_2)	41.6	45	50	55	58.4
硫酸铵 $(NH_4)SO_4$ (X_3)	1.32	2	3	4	4.68

1.2.5 酶活力测定 参照王水顺等(2001年)的研究方法, 测定发酵底物蛋白酶活性^[5]。

1.2.6 SEM 观察样品制备^[6] 取适量多聚赖氨酸于干净盖玻片上, 涂匀, 静置约 50 min, 用无菌水反

复冲洗去多聚赖氨酸,凉干。取适量制备好的新鲜孢子悬液于含有多聚赖氨酸的盖玻片上静置约 30 min,用无菌水轻轻冲洗去多余的孢子悬液,自然干燥后在光镜下镜检至观察到无重叠孢子后用于 SEM 观察。N⁺ 注入能量为 15 keV,注入剂量为 0(对照) ~ 10¹⁴ ions/cm²,每次连续注入 10 s,间隔时间为 50 s ~ 90 s。

1.2.7 ESR 测定样品制备^[6] 取适量制备好的新鲜孢子悬液均匀涂布于培养皿中,在超净台上自然干燥后进行 N⁺ 注入,处理后每个样品用灭菌后刀片刮下 5 mg 孢子粉末,用于 ESR 测定。N⁺ 注入能量和剂量同上。

2 结果与分析

2.1 最佳产酶条件对突变高产菌株产酶性能的影响

2.1.1 发酵条件对突变高产菌株产酶性能的影响

从图 1 ~ 图 3 可以看出,ANS2 菌株最适产酶温度为 30 ℃,温度过高或过低均显著影响其产酶;当培养时间达到 66 h 时,已基本稳定并达到最高值,延长酶活反而下降;在初始培养基 pH 值位于 5.0 ~ 6.0 之间,对产酶影响不是很大,其中在 pH 5.5 时最适产酶。

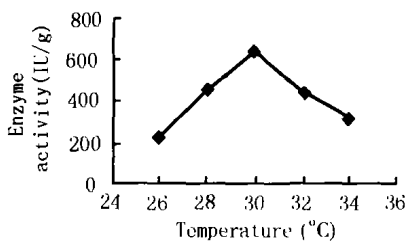


图 1 不同培养温度对突变菌株产酶活性的影响
Fig.1 The effect of cultivate temperature on enzyme production in mutative strain

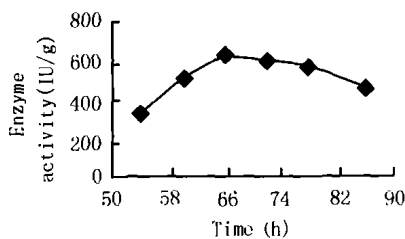


图 2 不同培养时间对突变菌株产酶活性的影响
Fig.2 The effect of cultivate time on enzyme production in mutative strain

2.1.2 培养基优化对突变高产菌株产酶性能的影响 由 SAS6.0 逐步回归拟合试验数据得到二次模

型为: $y = -15072.24 + 146.96x_1 + 474.37x_2 + 1006.95x_3 - 1.49x_1^2 - 4.74x_2^2 - 161.79x_3^2$, 模型显著性检验表明: $F_{失拟} = S_{失拟}^2/S_e^2 = 11.5 > F_{0.05}(6, 7) = 3.87$, $F_{回归} = S_{回归}^2/S_{剩余}^2 = 9.33 > F_{0.05}(6, 13) = 2.92$ 。因此,该模型失拟不显著,回归显著。同时计算得该模型 $R^2 = 0.8716$,表明该回归方程可以较好的代替试验真实点对试验结果进行估测分析。在对此非线性模型方程求一级偏导并令其等于零,求得曲面最大点: $x_1 = 49.3$, $x_2 = 50.0$, $x_3 = 3.1$ 。

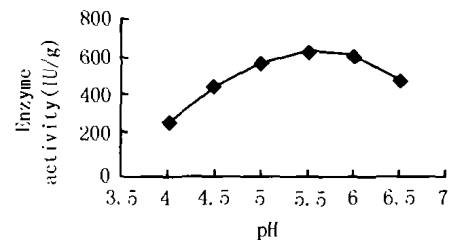


图 3 不同起始 pH 对突变菌株产酶活性的影响
Fig.3 The effect of pH on enzyme production in mutative strain

经优化,黑曲霉固态发酵的最佳培养基为:麸皮:豆粕:硫酸铵 = 51.7:49.3:3.1,加等量的水,即培养基中含麸皮 24.83%、豆粕 23.68%、硫酸铵 1.49%、水添加量为 50%。

2.2 靶室真空处理时间对孢子存活率的影响

由图 4 可以看出,黑曲霉孢子在靶室真空环境中随着时间的延长,其存活率明显下降。当滞留靶室真空时间达到 1 min 时,其存活率降到 58.6%,当真空时间达到 3 min 时,其存活率只有 37.7%。

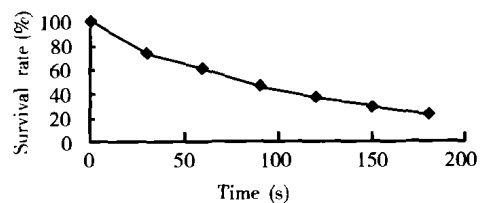


图 4 靶室真空时间对黑曲霉孢子存活率的影响
Fig.4 The effect of vacuum time on survival rate of *A. niger* spore

2.3 N⁺ 注入剂量对孢子存活率的影响

图 5 显示,当 N⁺ 离子注入剂量低于 $20 \times 2.6 \times 10^{13}$ ions/cm² 时,黑曲霉孢子的存活率随着注入剂量的增大而迅速降低,其后随着注入剂量的增大,其存活率呈平稳而又稍有上升趋势,在注入剂量 $50 \times$

2.6×10^{13} ions/cm² 时呈现一个较小波峰值;当注入剂量注入大于 $100 \times 2.6 \times 10^{13}$ ions/cm² 时,孢子存活率又迅速下降,总体上存活曲线呈现先快速下降后略微平缓上升再下降的“马鞍型”曲线变化。

2.4 N⁺ 注入剂量对孢子突变率的影响

由表 2 结果可以看出,离子注入剂量偏小时,突变率较低;随着剂量的加大,突变率上升,而整个过程中,负突变率一直呈现上升趋势,正突变在中等致死剂量 $80 \times 2.6 \times 10^{13}$ ions/cm²·s 处较高。

表 2 不同剂量 N⁺ 注入对黑曲霉孢子突变率的影响

Tab.2 Effections of N⁺ different implantation dose on mutation rate of *A. niger* spore

剂量 $\times 2.6 \times 10^{13}$ Implantation dose	统计 Statics	突变(%) Mutation rate	正突变(%) Positive mutation rate	负突变(%) Negative mutation rate
10	20	5	0	51
20	20	15	5	102
30	20	25	10	154
50	20	45	20	253
80	20	50	35	156
100	13	61.5	23	38.5
120	5	60	20	40

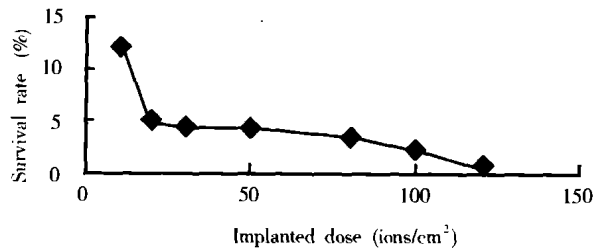
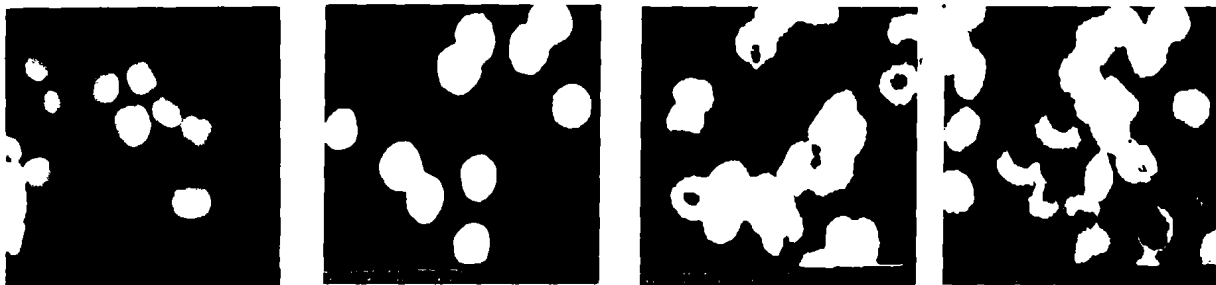


图 5 离子注入剂量对黑曲霉孢子存活率的影响
Fig.5 The effect of N⁺ implantation doses on survival rate of *A. niger* spore



A: Control B: 15×10^{14} ions/cm² C: 60×10^{14} ions/cm² D: 100×10^{14} ions/cm²

图 6 低能 N⁺ 注入黑曲霉孢子刻蚀损伤的显微观察

Fig.6 Reactive SEM photograph of *Aspergillus niger* by N⁺ implantation.

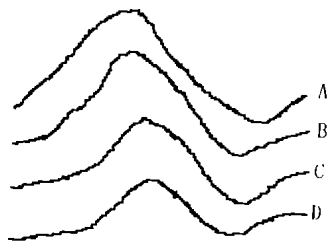


图 7 低能 N⁺ 注入对黑曲霉孢子内自由基含量的影响

Fig.7 ESR spectrum of free radical of *Aspergillus niger* by N⁺ implantation

A: 80×10^{14} ions/cm²; B: 60×10^{14} ions/cm²; C: 20×10^{14} ions/cm²; D: Control.

2.5 N⁺ 注入黑曲霉孢子刻蚀损伤的显微观察

图 6 显微照片显示了 N⁺ 在 15 keV 能量下,逐渐加大注入剂量时对黑曲霉孢子所造成的不同刻蚀损伤程度。N⁺ 注入剂量越大,细胞表面及深入到内部的刻蚀损伤越严重,刻蚀面积由小变大,刻蚀深度由浅变深。未经 N⁺ 注入的黑曲霉孢子表面光滑平整、饱满,立体空间呈现近似球体。经过 15×10^{14} ions/cm² 剂量 N⁺ 注入后,表面粗糙度增加,孢子表面呈现出轻微的刻蚀损伤。当注入剂量增加到 60×10^{14} ions/cm² 时,孢子表面呈现出明显的刻蚀损伤现象,孢子表面可见到明显的缺损和凹陷。当注入剂量增加到 100×10^{14} ions/cm² 时,积累损伤达到一定程度,孢子壁塌陷,缺损面积明显加大,形成了明晰的空洞。

2.6 N⁺ 注入对黑曲霉孢子内自由基含量的影响

图 7 显示了黑曲霉孢子经不同剂量的 N⁺ 注入 8 h 后的孢子内自由基 ESR 波谱变化规律。N⁺ 注入前和注入后都有自由基 ESR 波谱单一峰, 但对照组自由基含量明显少于 N⁺ 注入后的样品。另外, 随着注入剂量的增大, 孢子内的自由基 ESR 波谱的强度也逐渐增大。

3 讨论

3.1 最佳产酶条件对突变高产菌株产酶性能的影响

碳源主要作用是为微生物活动提供能源。王水顺等(2001 年)研究产复合酶黑曲霉时发现, 黑曲霉碳源以 40% 的米糠为最佳, 而麸皮只要达到 21.4 % 即可基本满足曲霉菌的生长^[5]。同样, 本试验研究也发现麸皮含量过高, 不利于黑曲霉产酶, 麸皮含量达到 24.83 % 时为最佳。氮是微生物细胞内蛋白质代谢和酶分泌活动的重要营养要素之一。在培养基中有少量无机氮的条件下, 有机氮源比无机氮源的效果好, 其原因可能是菌体对无机氮源的利用较快, 而地有机氮源利用较慢, 但适量的有机氮源如豆饼粉可以为菌体提供充足而又延续的氮源^[7]。王永顺等(2001 年)研究发现, 黑曲霉有机氮源以 15 % 豆饼为最佳, 超过此量反而对产酶不利; 无机氮源以硫酸铵为最佳, 对黑曲霉产酶有明显促进作用, 最佳添加量为 2.0 %; 而硝酸钾、硝酸钠和碳酸氢铵等无机氮源反而有抑制作用^[5]。与此一致, 本试验也发现硫酸铵添加量为 2.0 % 时, 黑曲霉产酶性能最好。

水是微生物体内和体外的溶媒。培养基含水量过低, 发酵中后期培养基表面容易干化, 可造成培养基利用率下降, 发酵不彻底; 含水量过高, 培养基容易结块成团, 部分培养基溶氧不足, 也会导致发酵不彻底^[8]。本试验研究也发现, 培养基含水量为 56.06 % 时, 黑曲霉产酶性能最好。王永顺等(2001 年)报道培养基最佳含水量为 56.06 % 与此一致。

pH 的改变可引起微生物体表面的电荷改变, 进而影响微生物对营养物的吸收, 它还能影响培养基中有机化合物的离子化作用, 从而对微生物有间接影响。此外, 过高或过底的 pH 值都会降低微生物对高温的抵抗能力^[9]。大多数微生物生长的 pH 范围是 3~6。与此一致, 本试验研究也发现培养基最佳 pH 为 5.5。大多数真菌在室温条件下产酶性能往往最好, 不需要进行温度控制。Asther 等(1988 年)研究发现真菌生长温度可能比产酶温度偏高^[10]。本试验仅仅探讨黑曲霉整个周期最佳发酵

温度, 发现为 30 ℃, 至于发酵前期、中期和后期最佳温度是否存在差异尚有待于进一步研究。

3.2 靶室真空时间对孢子存活率的影响

在离子注入操作过程中, 真空明显降低孢子存活率与活细胞冻伤有关。尹若春(2000 年)用西瓜胚芽做试验材料, 发现当胚芽在真空中失水达到 26 % 时, 其存活率依然保持在 98 %, 如果经过离子注入之后, 失水率只是略微有所上升, 但死亡率却上升到 41 %^[11], 表明真空处理过程中的冻伤是离子注入生物材料的限制因素。焦焱(2003 年)研究发现用 50% 甘油作为防冻剂可以降低烟草叶片真空处理时冷冻的伤害^[12], 此外用一定浓度的 DMSO 处理西瓜胚芽也具有较好防冻效果^[11]。这可能主要是由于甘油和 DMSO 是一种低分子物质, 它可以溶于水, 进入细胞, 与胞内水分子形成结合水, 降低溶液冰点, 减弱结晶对胞膜和细胞内其它生物大分子的伤害作用。在微生物材料进行离子注入时, 向砥(2002 年)证实用甘油作防冻剂对微生物具有很好的保护效果, 在真空时间长达 5 min 时, 存活率仍保持在 90 % 以上, 而未进行防冻处理时, 真空中持续时间达到 3 min 时, 存活率就降到 10 % 左右^[13]。本试验黑曲霉孢子未经防冻处理在较短时间内, 存活率受到很大的影响, 当真空中时间达到 3 min 时, 存活率仍达到 17 %, 与向砥报道的有一定的差距, 这可能是由于生物个体之间的差异性。不同生物之间细胞壁、细胞膜结构的差异都会影响其对冻害的耐受性。

3.3 离子注入剂量对孢子存活率的影响

低能离子注入生物活体瞬间往往同时发生能量与动量刻蚀损伤和质量与电荷保护两种相互对立的现象^[14]。在离子注入初期, 低剂量离子注入时所产生的能量沉积可引起一系列电离事件, 导致 DNA 链断裂和细胞膜过氧化反应, 动量传递通过细胞表面的溅射与刻蚀, 对细胞壁、细胞膜进行修饰致使其细胞损伤、突变、死亡^[15]。因此, 在离子注入剂量较低情况下, 注入剂量越大, 生物体存活率越低。吕树娟等(2003 年)利用 N⁺ 和 H⁺ 离子选育氧化葡萄糖酸杆菌时发现, 注入剂量低于 2.6×10^{13} ions/cm² 时, 杆菌的存活率随着注入剂量加大而迅速下降; 注入剂量 $2.6 \sim 3.2 \times 10^{13}$ ions/cm² 时, 存活率不降反升; 注入剂量高于 3.2×10^{13} ions/cm² 时, 存活率又开始快速下降^[16]。吴健等(2003 年)研究也发现了类似的现象^[17]。本试验研究结果也证实了上述论断, 在离子注入剂量小于 $20 \times 2.6 \times 10^{13}$ ions/cm² 时, 黑曲霉孢子存活率随注入剂量加大而快速下降。当注入剂

量增加时,存活率几乎不再下降,出现平台期,当注入剂量进一步加大时,存活率快速下降,存活率随 N^+ 注入剂量的增加而呈现“马鞍形”曲线。

大量连续注入的电荷堆积可形成很强的库仑斥力,对被注入细胞形成一个“保护屏障”,进而阻碍后续注入离子对细胞的损伤;同时堆积的电荷形成弱电场可激活生物体内的各种酶和诱导修复机制的启动;另外,正离子俘获电子,使水分子激发产生OH自由基的几率减少;氮离子的沉积与周围自由基竞争性反应清除自由,也都对生物体具有保护作用,从而在中等注量时可以减轻对生物体的伤害,表现为存活率并非随着注量的增加而持续降低^[18]。本试验黑曲霉孢子在中等注量时($30 \times 2.6 \times 10^{13}$ ions/cm² ~ $80 \times 2.6 \times 10^{13}$ ions/cm²),存活率有一定幅度上升,但仍然显著低于对照组,这个可能的解释为:注入离子的动量传递和能量沉积效应仍然存在,并且起着主要作用;注入离子的保护作用只是相对的,会因为生物材料不同的辐射敏感性而有差别。当注入剂量进一步加大,电荷的大量堆积达到一定临界值后将导致库仑保护屏障崩溃,对离子注入具有保护作用的屏障不复存在,离子辐照的损伤已超过生物体的修复能力,致使孢子存活率又迅速下降。与此一致,本试验中注入剂量达到 $120 \times 2.6 \times 10^{13}$ ions/cm²时,存活率迅速降低到0.69%以下。

3.4 离子注入剂量对孢子突变率的影响

生物体离子注入突变率与注入剂量呈现密切相关。向砥等(2002年)利用低能氮离子注入选育高产壮观链霉素时发现,随着注入剂量的增加,突变率也呈正向递增,但是正突变率,却随着注入剂量增加而出现先递增后又递减的趋势^[13]。本试验也发现,伴随着离子注入剂量的加大,突变率上升,而有意思的是负突变率一直呈现上升趋势。可能的解释可能是:在小剂量时未能激活DNA修复系统,导致低存活率;当剂量增大至某一阈值后激活DNA修复系统,从而使存活率反而上升。随着剂量的增加,错配修复造成的诱变增加,致使正突变率也增加。然而随着剂量的进一步增大,DNA被破坏占了主导地位,致使存活率下降,正突变率也大幅度降低。

3.5 离子注入剂量对孢子细胞壁刻蚀损伤的影响

离子注入剂量越大,细胞的刻蚀损伤越严重。低能离子注入生物材料时,载能离子通过动量传递效应对生物体的主要损伤是细胞壁刻蚀,随着剂量的增加,入射离子通过刻蚀而成的穿孔进入生物体内,通过动量传递和级联碰撞,不断减薄孢子壁,直至损伤细胞器膜和遗传物质,使孢子破裂、死亡^[19]。

本试验研究也发现 N^+ 注入剂量小于 15×10^{14} ions/cm²情况下,孢子仍然呈现圆滑球体,几乎未见刻蚀损伤;当注入剂量超过 60×10^{14} ions/cm²时,孢子刻蚀损伤清晰可见;注入剂量达到 60×10^{14} ions/cm²时,孢子壁破损面积过半,内陷呈现深洞状,而受到如此严重刻蚀损伤的孢子是否还具有生物活性以及能否自我修复损伤尚不清楚,有待于进一步探讨。

3.6 离子注入剂量对孢子内自由基含量的影响

自由基在细胞内积聚可损伤细胞。高活性自由基很容易与细胞内靶分子发生加成、抽氢和电子转移等反应,使靶分子的损伤特别是遗传物质的损伤加重,损伤修复难度加大,进而导致生物体突变^[20]。研究表明,离子注入剂量愈大,生物体内自由基愈多,细胞损伤的程度往往愈严重^[21]。当荷能离子注入生物体时,靶分子的激发和电离等连锁反应诱使细胞内产生了大量自由基^[19,20],同时随着注入剂量的增加,原来稳定的长寿命自由基也可能变得不稳定,或者逐级反应变成非自由基粒子。龚加顺等(1999年)研究发现,自由基强度随 N^+ 注入剂量的增加而呈现“马鞍形”曲线;当注入剂量达到 4×10^{15} ions/cm²时,自由基强度反而下降,当注入剂量增加 5×10^{15} ions/cm²时,自由基强度由再次上升。该自由基“马鞍形”曲线与本试验上述存活率“马鞍形”曲线完全一致,表明 N^+ “马鞍底部”注入剂量对细胞孢子细胞壁刻蚀损伤较轻^[6]。本试验发现伴随着 N^+ 注入剂量的增加自由基强度持续加大,但并没有发现自由基强度随 N^+ 注入剂量的增加而呈现“马鞍形”曲线的现象。后者可能与本试验注入剂量之间的差距偏大有关, N^+ “马鞍底部”注入剂量可能被掩盖。结果提示: N^+ “马鞍底部”注入剂量的范围可能较窄。

References

- [1] GOLDEN B R. Health benefits of probiotic [J]. British Journal of Nutrition, 1998, 80(2): 203-207.
- [2] YUAN Cheng-ling, YU Zeng-liang. The grand progress of low-energy ion beam in life sciences [J]. China Biotechnology, 2003, 23(4): 57-61. 袁成凌, 余增亮. 低能离子束在生物技术中的应用研究 [J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(4): 57-61.
- [3] ZHU Ge-jian, WANG Zheng-xiang. Experimental manual of industrial microbiology [M]. Beijing: Chian Light Industry Press, 1994. 35-36. 诸葛健, 王正祥. 工业微生物实验手册 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994. 35-36.
- [4] MONTGOMERY D C. Design and analysis of experiments [M]. New York: John Wiley and Sons, 1991. 92-93.
- [5] WANG Shui-shun, LIN Jin-zhe, ZHANG Jin-wei. Screening of *Spergillus niger* SL2 111 with high yield multicomponent enzymes [J]. Pharmaceutical Biotechnology, 2001, 8(6):

- 317-321.王水顺,林进哲,张金玮.复合酶高产菌株选育的研究[J].药物生物技术,2001,8(6):317-321.
- [6] GONG Jia-shun, LIU Qiu-jin, XIAO Lin. Study on mutagenic effects of tannase-producing strain with nitrogen ions implantation [J]. Food and Fermentation Industries, 1999, 26(5): 10-13. 龚加顺,刘勤晋,肖琳.单宁酸酶产生菌氮离子注入的诱变效应研究[J].食品与发酵工业,1999,26(5):10-13.
- [7] SONG Qin-xun. Studies on corn stalk solid fermentation dealt as feed [D]. Jinan: Shandong University, 1999. 宋庆训.混合固态发酵玉米秸秆为饲料添加剂研究[D].济南:山东大学硕士学位论文,1999.
- [8] LI Yong-quan, ZHAO Xiao-li. Studies on the solid fermentation technique of compound hydrolase strain *Aspergillus niger* HD-1 [J]. Acta Mycologica Sinica, 1995, 14(3): 226-233. 李永泉,赵小立.复合水解酶黑曲霉 HD-1 固体发酵工艺研究[J].真菌学报,1995,14(3):226-233.
- [9] PAN Feng. Studies on SCP of general fermentation with stalk and microorganism [D]. Nanjing: Nanjing University of Science & Technology, 2001. 潘锋.秸秆微生物共发酵生产单细胞蛋白研究[D].南京:南京理工大学,2001.
- [10] ASTHER M. Control of lignin peroxidase production by *Phanerochaete chrysosporium* INA-12 by temperature shifting [J]. Appl Environ Microbiol, 1988, 54(12): 3194-3196.
- [11] YIN Rou-chun, WU Li-fang. Study on survival rate of watermelon shoots implanted with low energy ion beams [J]. Acta Laser Biology Sinica, 2002, 11(3): 207-211. 尹若春,吴丽芳.低能氮离子注入西瓜胚芽的存活率的初步研究[J].激光生物学报,2002,11(3):207-211.
- [12] JIAO Zhen, QIN Guang-yong. Callus inducement from tobacco leaf and its tolerance to vacuum [J]. Journal of Zhengzhou University, 2003, 35(1): 46-48. 焦焱,秦广雍.烟草叶片愈伤组织诱导及真空耐受性研究[J].郑州大学学报,2003,35(1):46-48.
- [13] XIANG Di, LI Jiong. The breeding of *Streptomyces spectabilis* 1043 by ion beam implantation [J]. Acta Laser Biology Sinica, 2002, 11(4): 276-279. 向砥,李炯.离子注入选育高产壮观链霉菌的研究[J].激光生物学报,2002,11(4):276-279.
- [14] SONG Dao-jun, YAO Jian-ming. A possible mechanism of dose related survival of microorganism implanted by N⁺ ions [J]. Nuclear Technique, 1999, 22(3): 274-278.
- [15] YU Zeng-liang, HOU Yu-ping. Review in low energy ion biology [J]. Journal of Anhui Agriculture University, 1994, 21(3): 221-225. 余增亮,霍裕平.离子注入生物学研究评述[J].安徽农业大学学报,1994,21(3):221-225.
- [16] LV Shu-juan, WANG Jun, YAO Jian-ming. Mutagenic effect of ion implanting on *Gluconobacter oxydan* [J]. Acta Laser Biology Sinica, 2003, 12(5): 383-387. 吕树娟,王军,姚建铭.离子注入氧化葡萄糖酸杆菌的研究[J].激光生物学报,2003,12(5):383-387.
- [17] WU Jian, SU Ming-jie. Preliminary study on the effects of low energy N⁺ ions, UV and ⁶⁰Co- γ on the gentamicin yield of radiat [J]. Res Radiat Process, 2003, 21(2): 120-124. 吴健,苏明杰.低能N⁺离子、紫外线和⁶⁰Co γ 射线对绛红小单孢菌产庆大霉素的诱变效应初步研究[J].辐射研究与辐射工艺学报,2003,21(2):120-124.
- [18] SHAO Chun-lin, XU An, YU Zeng-liang. Charge exchange effect of ion implantation to biomolecules [J]. Nuclear Techniques, 1997, 20(2): 70-73. 邵春林,许安,余增亮.离子注入生物分子的交换效应[J].核技术,1997,20(2):70-73.
- [19] YU Zeng-liang, YANG Jian-bo. Preliminary studies on the biological samples by ion beam etching [J]. Journal of Anhui Agricultural University, 1994, 21(3): 260-264. 余增亮,杨剑波.离子刻蚀生物样品的初步研究[J].安徽农业大学学报,1994,21(3):260-264.
- [20] WANG Ji, JIANG Hai-bo, YAO Jian-ming. Mutation breeding of ergosterol-producing yeast strain by ions injection and its fermentation technology [J]. Journal of Microbiology, 1998, 18(4): 25-27. 王纪,蒋海波,姚建铭.离子注入麦角甾醇酵母选育及发酵工艺[J].微生物学杂志,1998,18(4):25-27.
- [21] SONG Dao-jun, YU Xun, YAO Jian-ming. Studies on etching and damage action of low energy ion beam on microbial cells [J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica. 1998, 30(6): 570-574. 宋道军,余汛,姚建铭.低能离子束对微生物细胞的刻蚀与损伤研究[J].生物化学与生物物理学报,1998,30(6):570-574.



作者简介

程茂基:男,博士,1968年出生,安徽农业大学副教授,主要从事饲料生物技术研究。
联系电话:0551-2810103/13856087901

Biography

CHENG Mao-ji: male, Doctor, born in Dec 1968, occupies deputy Profess of Anhui Agricultural University, devoting to the research in feed biotechnology and ruminant nutrition. E-mail: Chengmaoji@163.net