

N⁺ 注入选育益生菌及其产酶条件的研究

程茂基¹, 陈丽娟¹, 蔡克周¹, 余增亮², 张束清²

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

摘要:出发菌株黑曲霉 AN01, 经离子束多次诱变得变异菌株 AN02。结果表明, 出发菌株 AN01 酸性蛋白酶、纤维素酶和果胶酶的酶活分别由原来的 $1\ 298\ \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $2\ 551\ \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $5\ 620\ \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 相继提高到 $14\ 252\ \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $13\ 016\ \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $13\ 206\ \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。变异菌株 AN02 经传 5 代培养, 产酶特性稳定。该菌株的最佳产酶条件为在培养基基础营养为麸皮、豆粕和玉米芯的条件下, 最佳无机氮源为硫酸铵, 最佳 pH 为 5.0, 最佳含水量为 60%, 最佳发酵温度为 30℃, 最佳发酵周期为 96 h。

关键词:离子束; 黑曲霉; 诱变育种; 复合酶

中图分类号: S816.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X(2005)02-0127-05

一些益生菌可以在动物肠道内分泌消化酶、维生素和氨基酸等营养物质, 进而刺激宿主动物生长。对幼龄动物特别是仔猪来说, 由于内源酶分泌不足导致其痢疾等疾病发生屡见不鲜。一些学者试图通过在饲料中添加产酶益生菌来弥补内源酶分泌不足等难题, 但效果往往不尽人意。其主要原因有二: 一是菌种自身产酶活力差; 二是菌种在动物肠道生存能力弱^[1]。因此, 对产酶益生菌进行诱变选育是十分必要的。

利用离子束选育工业微生物是我国学者首创发明的高新技术, 经过近 20 年的发展已经取得了一系列成就, 并引起美国、日本和澳大利亚等国家学者的密切关注, 逐渐形成了一门新兴学科——离子束生物工程学^[2]。研究表明, 低能离子注入生物体后, 由于电、能、质的综合作用, 引起细胞壁发生溅射、刻蚀, 从而导致能量传递、质量沉积、动量交换和电荷交换效应, 由此形成大量的长寿命自由基, 进而造成细胞内染色体 DNA 键的断裂、畸变, 诱导和激发细胞对 DNA 进行修复、重组, 最终诱使生物体发生变异^[3-5]。已有研究证明离子束作用于生物体具有损伤轻、突变率高、突变谱广的特点, 如许安等利用离子束注入技术使维生素 C 的发酵水平创国内外新高^[6,7]。但该技术目前较少应用到动物益生菌选育研究之中, 为此, 本试验拟利用低能离子束选育产酶益生菌株——黑曲霉, 旨在进一步提高其产酶性能, 增加其益生效果。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株 黑曲霉 (*Aspergillus niger*) AN01, 此前由安徽农业大学生物饲料实验室选育并保存。

1.1.2 培养基 斜面培养基: 土豆培养基^[8]。平皿初筛培养基: 硫酸铵 0.5 g, 干酪素 1 g, 琼脂 2 g, 麸皮汁 100 mL。基础发酵培养基: 麸皮 5 g, 豆粕 5 g, 玉米芯 5 g, 硫酸铵 0.15 g, 水 22.5 mL, pH 为 5.0。

上述培养基用前均须在 121℃ 下灭菌 20 min。

1.2 方 法

1.2.1 菌株分离纯化 采用常规稀释分离法^[8]。

1.2.2 菌株的诱变处理 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, 经滤纸过滤, 滤得菌液倒入预先灭菌的带玻璃珠的装有 30 mL 无菌水的三角瓶中, 于摇床上震荡约 60 min 至镜检为分散单孢子, 即得到单孢子悬液。用血球计数板计数, 调整孢子浓度至 10^7 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 。

收稿日期: 2004-09-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(30100134)资助。

作者简介: 程茂基(1968-), 男, 博士, 副教授。E-mail: chengmaoji@163.net

离子注入: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备用。

离子注入前须用紫外线对离子注入仪小靶室持续消毒 30 min,再将平皿置于小靶室内,注入物质 N^+ 离子需加速到 5 ~ 20 keV,然后以 $1.3 \times 10^4 \text{ ions} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 的脉冲率对平皿的黑曲霉孢子进行剂量为 $2.6 \times 10^{15} \sim 56.9 \times 10^{15} \text{ ions} \cdot \text{cm}^{-2}$ 的注入。试验组采用间歇式脉冲注入,注入 5 s 后间隔 55 s,再进行下一次注入;对照组置于小靶室真空中,不经离子注入。

1.2.3 筛选方法 离子注入后,用 1 mL 无菌水洗下单孢子,适当稀释后,吸取 0.1 mL 涂含有初筛培养基的平皿。恒温 30℃,倒置培养 72 h 后,测菌落和透明圈直径,得 r 值(菌落直径与透明圈直径之比),挑选 r 值小的单菌落接种发酵培养基。

1.2.4 酶活力测定 粗酶液的制备:用接种环挑取一环孢子接种于准备好的发酵培养基上,30℃ 恒温培养 4 d 后,在 500 mL 三角瓶中直接加入总量为培养基 10 倍的 pH5.0 双蒸水,40℃ 水浴震荡抽提 1 h,一层滤纸过滤得粗酶液,测定时取相应的酶液稀释适当的倍数。以每毫升抽提液所含的酶活力表示酶活($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

酸性蛋白酶酶活测定^[9]:以酪蛋白为底物,在(40 ± 0.2)℃, pH3.0 条件下用 Folin 法测定,酶活力以酪氨酸 μg 数表示。

纤维素酶酶活测定^[9]:以羧甲基纤维素为底物,在(40 ± 0.2)℃, pH4.6 条件下用 DNS 法测定,酶活力以葡萄糖 μg 数表示。

果胶酶酶活测定^[9]:以果胶为底物,在(40 ± 0.2)℃, pH5.0 条件下用 DNS 法测定,酶活力以半乳糖醛酸 μg 数表示。

上述 3 种测定酶活方法均使用 722S 可见分光光度计测定吸光值。测定 3 种酶活的底物均来自于 Sigma 公司。

1.2.5 黑曲霉变异菌株 AN02 产酶稳定性测定 变异菌株 AN02 菌株经过连续 5 次斜面转接、活化,并接种于固体发酵培养基,发酵培养。每支斜面 3 个重复,所得结果取平均值。

1.2.6 出发菌株固体发酵条件的优化 试验设计为单因素五水平,每一处理 3 次重复,分别研究不同氮源、碳源、pH、含水量、培养时间和温度对黑曲霉产酶性能的影响。

2 结果与分析

2.1 出发菌株黑曲霉 AN01 初始产酶性能的测定

出发菌株黑曲霉 AN01 在基础发酵培养基上培养,测得其酸性蛋白酶酶活为 $1\,298 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$,纤维素酶酶活为 $2\,551 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$,果胶酶酶活为 $5\,620 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.2 低能离子注入对黑曲霉产酶性能的影响

由图 1 可以看出,出发菌株黑曲霉 AN01,经离子束诱变,酸性蛋白酶酶活由其原来的 $1\,298 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 上升到 $14\,252 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$,提高了 10.9 倍;纤维素酶酶活由其原来的 $2\,551 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 上升到 $13\,016 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$,提高了 5.1 倍;果胶酶酶活由其原来的 $5\,620 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 上升到 $13\,206 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$,提高了 2.4 倍。

2.3 黑曲霉变异菌株 AN02 产酶稳定性的研究

由表 1 可以看出,酸性蛋白酶任意二代之间产酶量的最大差值为 $37 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$,纤维素酶为 $94 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$,果胶酶为 $46 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$,3 种酶的每代产酶量差异都小于 $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$,表明 AN02 菌株的产酶性能较稳定。

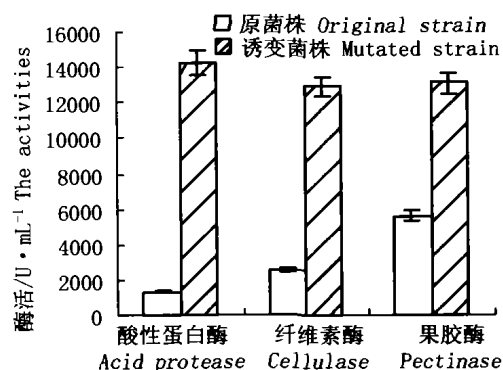


图 1 黑曲霉原菌株 AN01 和变异菌株 AN02 酶活的比较
Figure 1 Comparison of enzymes activities between AN01 strain and AN02 strain

2.4 黑曲霉菌株产酶条件的研究

2.4.1 培养温度对黑曲霉产酶性能的影响 图2(a)结果表明,菌株在30℃下培养可获得较高产酶量,在低于或高于30℃菌株产酶量均显著下降。因此,菌株最适发酵温度为30℃。

表1 黑曲霉变异菌株 AN02 产酶的稳定性

Table 1 Stability of enzyme production in strain AN02

	传代次数 Times of generation				
	1	2	3	4	5
果胶酶/U · mL ⁻¹ Pectinase	13 198 ± 30	13 159 ± 56	13 215 ± 35	13 184 ± 40	13 152 ± 18
纤维素酶/U · mL ⁻¹ Cellulase	13 016 ± 48	12 988 ± 33	13 082 ± 19	13 114 ± 34	13 051 ± 39
酸性蛋白酶/U · mL ⁻¹ Acid protease	14 221 ± 37	14 199 ± 25	14 236 ± 21	14 235 ± 28	14 289 ± 20

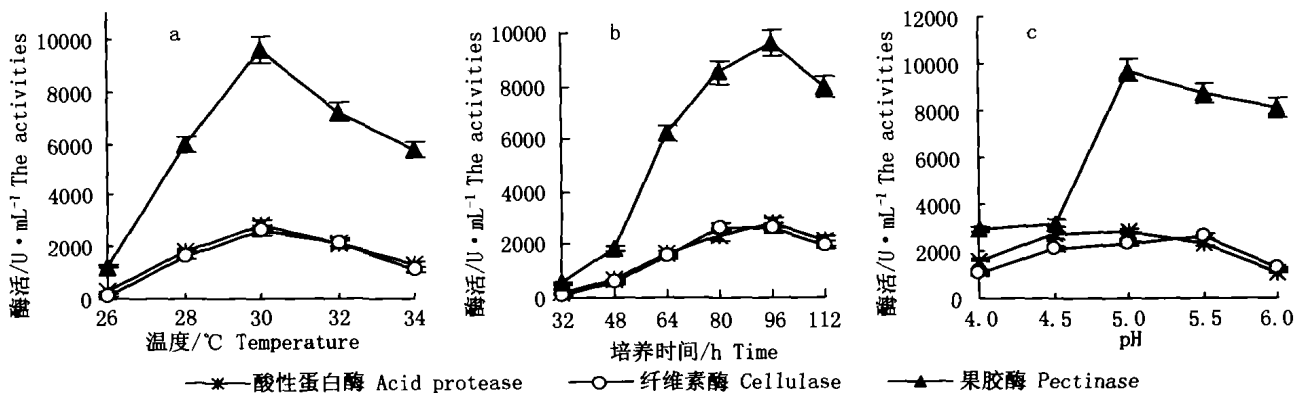


图2 不同培养温度、培养时间和起始 pH 对 AN02 菌株产酶活性的影响

Figure 2 The effect of cultivate temperature, cultivate time and initiative pH on enzyme production in strain AN02

2.4.2 培养时间对黑曲霉产酶性能的影响 由图2(b)可以看出,3种酶酶活在32h到48h均有所上升,但上升缓慢,从48h到96h酶活力急剧上升,纤维素酶在80h已基本稳定,而其他2种酶96h才达到最大值,但3种酶基本在同一时间段达到最大酶活量,然后开始下降,因此,培养时间以96h为宜。

2.4.3 培养基起始 pH 值对黑曲霉产酶性能的影响 从图2(c)中可以看出,纤维素酶在 pH 值达到 5.5 时酶产量最高,而果胶酶和酸性蛋白酶基本在 pH 值达到 5.0 时酶产量最高,考虑本试验的目标产物为复合酶,因此选定培养基的最佳起始 pH 值为 5.0。

表2 培养基含水量对 AN02 菌株产酶的影响

Table 2 The effect of water content of culture medium on enzyme production in strain AN02

含水量/% Content	酸性蛋白酶酶活/U · mL ⁻¹ The activities of acid protease	纤维素酶酶活/U · mL ⁻¹ The activities of cellulase	果胶酶酶活/U · mL ⁻¹ The activities of pectinase
45.5	1 050 ± 24	990 ± 42	3 879 ± 48
53.8	2 380 ± 38	2 224 ± 32	8 965 ± 64
60.0	2 650 ± 31	2 592 ± 27	9 569 ± 71
64.7	2 462 ± 44	2 389 ± 30	9 125 ± 98
68.4	1 126 ± 20	1 057 ± 33	4 021 ± 35

表3 不同碳源对 AN02 菌株产酶的影响

Table 3 The effect of carbon sources on enzyme production in strain AN02

碳源 Carbon sources	酸性蛋白酶酶活/U · mL ⁻¹ The activities of acid protease	纤维素酶酶活/U · mL ⁻¹ The activities of cellulase	果胶酶酶活/U · mL ⁻¹ The activities of pectinase
麦麸 Wheat bran	2 756 ± 30	2 586 ± 36	9 571 ± 61
稻草 Rice straw	1 113 ± 28	1 021 ± 42	3 752 ± 42
麦秸 Straw of wheat	1 423 ± 36	1 254 ± 39	3 657 ± 35
葡萄糖 Glucose	2 486 ± 47	2 421 ± 20	8 942 ± 67
蔗糖 Surcose	2 355 ± 35	2 254 ± 31	8 754 ± 53
玉米芯 Corn cob	2 671 ± 34	2 543 ± 39	9 603 ± 71

2.4.4 培养基含水量对黑曲霉产酶性能的影响 表2结果显示,培养基的含水量小于60%时产酶量随

着含水量的增加而增长,含水量大于60%时产酶量逐渐下降。因此培养基最佳含水量为60%。

2.4.5 不同碳源对黑曲霉产酶性能的影响 表3结果表明,在相同的培养条件下以麸皮和玉米芯为碳源的培养基复合酶产量最高,葡萄糖和蔗糖次之,稻草和麦秸最差。

2.4.6 不同的无机氮源对黑曲霉产酶性能的影响 由表4结果可以看出,无机氮源之中硫酸铵的效果最好,氯化铵和尿素次之,硝酸铵和硝酸钠不但没有促进作用反而有抑制作用。

表4 不同的氮源对AN02菌株产酶的影响

Table 4 The effect of nitrogen sources on enzyme production in strain AN02

氮源 Nitrogen sources	酸性蛋白酶酶活/ $U \cdot mL^{-1}$ The activities of acid protease	纤维素酶酶活/ $U \cdot mL^{-1}$ The activities of cellulase	果胶酶酶活/ $U \cdot mL^{-1}$ The activities of pectinase
硫酸铵 Ammonium sulfate	2 742 ± 23	2 654 ± 38	9 612 ± 99
氯化铵 Ammonium chloride	2 544 ± 29	2 541 ± 44	9 458 ± 103
硝酸铵 Ammonium nitrate	1 356 ± 57	1 425 ± 19	4 327 ± 60
硝酸钠 Sodium nitrate	1 965 ± 40	2 053 ± 36	5 461 ± 62
尿素 Urea	2 304 ± 27	2 412 ± 29	8 753 ± 86

综上所述,本试验所用黑曲霉在培养基基础营养为麸皮、豆粕和玉米芯条件下,最佳无机氮源为硫酸铵,最佳pH为5.0,最佳含水量为60%,最佳发酵温度为30℃,最佳发酵周期为96h。

3 讨论

本试验利用低能离子束注入技术来诱变选育产酶益生菌,通过 N^+ 注入使黑曲霉出发菌株的酸性蛋白酶提高10.9倍,纤维素酶提高5.1倍,果胶酶提高2.4倍,产酶性能稳定。与此一致的是,郝捷等(2000)将 H^+ 、 N^+ 和 Ar^{+3} 种低能离子分别注入黑曲霉菌株中,使其产酸率由诱变前的8.7%提高到了13.8%^[5]。本试验结果表明,低能离子束注入对黑曲霉来说确是一种比较理想的菌种诱变技术,但对于其他益生菌的诱变效果如何尚需探讨。

培养温度不仅影响微生物的生长速度,也影响其产物酶的合成^[10]。本试验研究发现,黑曲霉菌株发酵最适温度为30℃。如果发酵前期温度过高,微生物往往快速生长,出现大量菌丝,过多消耗掉发酵培养基的养分,致使发酵中后期微生物营养供应不足,产酶性能受到严重抑制;反之,如果发酵前期温度过低,微生物生长缓慢,菌丝稀少,而使总体产酶量下降。同样,王水顺等(2001)进行黑曲霉SI2-111复合酶固体发酵工艺研究时也发现黑曲霉的最适发酵温度在30℃左右^[9]。而李江华等(2002)研究黑曲霉固态发酵生产酸性 β -甘露聚糖酶时发现,发酵最适温度为35℃,结果差异可能提示,黑曲霉分泌酶的种类不同,其发酵最适温度也有差异^[11]。但本试验黑曲霉菌株至少分泌3种酶,为何最适温度均在30℃尚须进一步探明。

发酵时间与产酶性能密切相关。如果发酵时间过短,微生物产酶性能得不到充分发挥;反之发酵时间过长,孢子衰老和培养基的营养不足会导致产酶性能迅速下降。因此,发酵时间不宜过长或过短。本试验的发酵最佳时间为96h,比王水顺(2001)报道的72h长24h。可能是由于离子束注入使黑曲霉孢子细胞的损伤程度比较大,修复时间长。而用紫外线等其他方法诱变后所得细胞的孢子损伤程度小,修复时间短。因此作者将在现有的发酵基础上利用离子束注入技术选育出发酵时间相对较短的高酶活黑曲霉菌株,降低产业化的成本。

水是微生物体内和体外的溶媒,绝大多数营养成分通过水来溶解和吸收,代谢物通过水进行排泄。水是细胞质组分,直接参与各种代谢活动。此外水的比热高,传热快,有利于调节细胞温度和保持环境温度的稳定,因此水是微生物生产的一个重要因素,在固体培养基中当培养基含水量过低时孢子的形成速度加快,菌丝稀少而酶活不高。当培养基含水量偏大时培养基结块,透气性差,导致菌丝生长缓慢从而降低产酶量^[12]。本试验研究发现培养基最佳含水量为60%。同样,王淑军等(2001)研究也发现,培养基含水量在65%时,康氏木霉、绿色木霉的产酶性能最好^[13]。

氮源不但是酸性蛋白酶合成蛋白质重要物质而且对菌体生长速度有着很重要的作用,有助于缩短培养时间。本试验中 $(NH_4)_2SO_4$ 的效果最好,可能是由于麸皮和玉米芯中含有一定量的有机氮及各种微量元素,可以满足微生物生长的需要,以麸皮和玉米芯为碳源,添加适量 $(NH_4)_2SO_4$ 后有机氮和无机氮的协

同作用能促进酶的合成^[14]。

参考文献:

- [1] 霍兴云. 饲用酶的研究、生产及应用进展[A]. 第三次全国发酵工程学术讨论会论文集[C]. 北京: 中国轻工业出版社, 2002. 160 ~ 165
- [2] 余增亮, 王纪, 许安等. 低能离子注入在 Vc 高产菌株选育中的应用[J]. 激光生物学报, 1999, 8 (. 3): 217 ~ 220
- [3] 余增亮. 离子束生物技术引论[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1998. 67 ~ 72
- [4] 虞龙. 离子束生物工程在 Vc 高产菌株选育中应用研究[D]. 合肥: 中国科学院等离子所, 1999
- [5] 郝捷. 低能离子注入选育高产柠檬酸黑曲霉的研究[D]. 合肥: 中国科学院等离子所, 2000
- [6] 袁世斌, 卫增泉. 放射性重金属离子束在生命科学领域的应用[J]. 甘肃科学学报, 2002, 14(3)
- [7] 许安, 姚建铭, 余增亮等. 离子注入改良维生素 C 二步发酵混合菌研究[J]. 工业微生物, 1999, 29(2): 16 ~ 19
- [8] 诸葛键, 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
- [9] 王水顺, 林进哲, 张金玮等. 复合酶高产菌株选育的研究[J]. 药物生物技术, 2001, 8(6): 317 ~ 321
- [10] 李平, 宛晓春, 陶文沂等. 黑曲霉生产 β -葡萄糖苷酶发酵条件的研究[J]. 应用生态学报, 1999, 10(6): 732 ~ 734
- [11] 李江华, 邬敏辰, 房峻等. 黑曲霉固态发酵生产酸性 β -甘露聚糖酶[J]. 生物技术, 2002, 12(1): 41 ~ 47
- [12] 孟勇, 王中彦, 苗艳芳等. 关于黑曲霉生产纤维二糖发酵条件的研究[J]. 四川大学学报, 2002, 39(5): 13 ~ 19
- [13] 王淑军, 扬从发, 陈静. 用于降解秸秆的纤维素酶产生菌的筛选研究[J]. 粮食与饲料工业, 2001(12): 21 ~ 23
- [14] 于洋, 姚建铭, 虞龙等. N⁺ 注入选育色素产生菌 *Monascus* 的研究[J]. 中国科学院研究生院学报, 2002, 19(4): 443 ~ 446

Breeding of Probiotic Bacterium by N⁺ Implantation and Optimization of Fermentation Condition

CHENG Mao-ji¹, CHEN Li-juan¹, CAI Ke-zhou¹, YU Zeng-liang², ZHANG Shu-qing²

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

2. Institute of Plasma Physics, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031)

Abstract: A new strain *Aspergillus niger* AN02 was mutated from AN01 by N⁺ implantation. The results showed that activities of acid-protease, cellulase and pectinase in *Aspergillus niger* were raised from 1 298 U · mL⁻¹, 2 551 U · mL⁻¹ and 5 620 U · mL⁻¹ to 14 252 U · mL⁻¹, 13 016 U · mL⁻¹ and 13 206 U · mL⁻¹ respectively. Characteristics of enzymes production in mutated strain *Aspergillus niger* AN02 kept stable by many times subculture. At the same time we study optimum conditions suitable for enzyme production in *Aspergillus niger* AN02, and the results demonstrated that enzymes activities in mutated strain *Aspergillus niger* were highest when the cultivate condition were as follows: fermentation temperature was 30°C, cultivate time was 96 hours, the water content in culture medium was 60 percent, pH was 5.0 and (NH₄)₂SO₄ was nitrogen source.

Key words: N⁺; *Aspergillus niger*; mutation breeding; multicomponent enzyme