

N⁺ 注入选育黑曲霉益生菌及其突变菌株产酶条件的研究

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 :以益生菌株黑曲霉 AN01 为材料 ,经 N⁺ 多次诱变得突变益生菌株 AN03。结果表明 ,出发益生菌株 AN01 酸性蛋白酶、纤维素酶和果胶酶的酶活分别由原来的 71.6U/g、141.7U/g 和 264.8U/g 相继提高到 996.5U/g、940.4U/g 和 906.5U/g。突变益生菌株 AN03 经传 5 代培养 ,产酶特性稳定。试验还研究了突变益生菌株 AN03 最佳产酶条件 ,培养基为 :每升含麸皮 105g、玉米芯 105g、豆粕 105g、氯化铵 16g、pH5.0。30℃ 培养 4d。

关键词 :离子注入 ,益生菌 ,诱变育种 ,复合酶

中图分类号 :Q936 文献标识码 :A 文章编号 :1001-6209(2005)04-0534-05

黑曲霉可分泌植酸酶、蛋白酶、纤维素酶等多种消化酶 ,消耗动物肠道内氧气 ,能促进饲料养分消化吸收 ,是经美国 FDA 批准 ,允许直接添加到饲料中的益生菌之一^[1]。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^[1,2]。因此 ,须对产酶益生菌进行选育。

离子注入育种是我国学者首创发明的高新技术 ,经过近 20 年的发展取得了一系列成就 ,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^[3,4] ,并在工业微生物选育上取得了成功。如许安等(1999 年)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^[5]。但该技术目前尚未应用到动物益生菌选育研究之中 ,为此 ,本试验拟利用 N⁺ 选育产多种生物酶的益生菌株—黑曲霉 ,旨在进一步提高其产酶性能 ,以增加其益生效果。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 :黑曲霉(*Aspergillus niger*)AN01 ,由本试验室选育并保存。

1.1.2 培养基^[6] :斜面培养基即土豆培养基(麸皮汁 :麸皮 :水 = 1 :10 ,煮沸 30min ,用四层纱布过滤得滤液) ;平皿初筛培养基(硫酸铵 0.5g ,干酪素 1g ,琼脂 2g ,麸皮汁 100mL) ;基础培养基即筛选培养基(麸皮 909g ,豆粕 273g ,水 1000mL ,自然 pH)。上述培养基用前均须在 121℃ 下灭菌 20min。

1.1.3 主要试剂和仪器 :福林酚、L-酪氨酸、羧甲基纤维素钠、β-半乳糖醛酸购自 Sigma 公司 ;乳酸、乳酸钠、3,5-二硝基水杨酸、柠檬酸购自上海化学试剂公司 ;醋酸、醋酸钠、磷酸氢二钠购自广东省汕头西陇化工厂。722s 可见分光光度计为上海精密科学仪器有限公司有限责任公司生产 ;低能离子注入仪生产商为中国科学院等离子体物理研究所。

1.2 菌株的分离纯化

采用常规的稀释分离法^[6]。

1.3 菌株的诱变处理

1.3.1 单孢子悬液的制备 :取新鲜活化斜面 ,加入 10mL 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 30mL 无菌水的三角瓶中 ,于摇床上震荡约 60min 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 10⁷ 个/mL。

1.3.2 离子注入 :将制备好的黑曲霉单孢子悬液 0.1mL 均匀涂布在直径为 90mm 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

基金项目 :国家自然科学基金(30100134)

作者简介 :程茂基(1968 -) ,男 ,安徽六安人 ,博士 ,副教授 ,主要从事饲料生物技术研究。Tel :86-551-2810103 ;Fax :86-551-5171019 ;E-mail :chengmaoji@163.net

其他作者 :赵彩艳 ,石秀霞 ,汤海鸥

收稿日期 :2005-02-25 ,修回日期 :2005-04-20

须用紫外线对离子注入仪小靶室持续消毒 30min ,再将平皿置于小靶室内 ,注入物质 N⁺ 离子需加速到 5 ~ 20keV ,再对平皿中黑曲霉孢子进行 N⁺ 注入 (注入脉冲率为 1.3 × 10⁴ N⁺ /cm² · s ,注入量为 2.6 ~ 56.9 × 10¹⁵ N⁺ /cm² · s) 。 试验组采用间歇式脉冲注入 ,注入 5s 后间隔 55s ,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。

1.4 菌株的筛选

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

1.5 酶活力测定

1.5.1 粗酶液的制备 :将菌种接种于准备好的发酵培养基上 ,30℃ 恒温培养 96h 后 ,在 500mL 三角瓶中直接加入培养基总量 10 倍的双蒸水(pH = 5.0) ,40℃ 水浴震荡抽提 1h ,单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。以每克鲜曲所含的酶活力表示酶活(U/g)。

1.5.2 酸性蛋白酶酶活测定 :Folin 法测定^[7]。以酪蛋白为底物 ,在 40 ± 0.2℃ ,pH = 3.0 条件下 1min 水解酪素 ,产生 1μmol 酪氨酸所需要的酶量为一个酶活单位。

1.5.3 纤维素酶酶活测定 :DNS 法测定^[7]。以羧甲基纤维素钠为底物 ,在 40 ± 0.2℃ ,pH = 4.6 条件下 1min 水解羧甲基纤维素钠 ,产生 1μmol 葡萄糖所需要的酶量为一个酶活单位。

1.5.4 果胶酶酶活测定 :DNS 法测定^[7]。以果胶为底物 ,在 40 ± 0.2℃ ,pH = 5.0 条件下 1min 水解果胶 ,产生 1μmol 半乳糖醛酸所需要的酶量为一个酶活单位。

1.6 黑曲霉突变菌株 ANO3 产酶稳定性测定

突变菌株 ANO3 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。

1.7 黑曲霉突变菌株 ANO3 固体发酵条件的优化

试验以基础发酵培养为基础进行单因素 5 水平研究 ,每个条件重复 3 次 ,在 250mL 的三角烧瓶中 ,分别研究氮源、碳源、含水量、pH、培养时间、温度对黑曲霉产酶性能的影响。

2 结果和分析

2.1 N⁺ 注入对黑曲霉产酶性能的影响

图 1 结果显示 ,出发菌 ANO1 和突变菌 ANO3 同

在最佳培养基发酵产酶条件下 ,ANO1 的酸性蛋白酶、纤维素酶和果胶酶的酶活分别为 71.6U/g、141.7U/g 和 264.8U/g ;ANO3 的酸性蛋白酶、纤维素酶和果胶酶的酶活分别为 996.5U/g、940.4U/g 和 906.5U/g。经过 N⁺ 反复诱变 ,ANO1 的酸性蛋白酶酶活提高了 12.9 倍 ,纤维素酶酶活提高了 5.6 倍 ,果胶酶酶活提高了 2.4 倍。

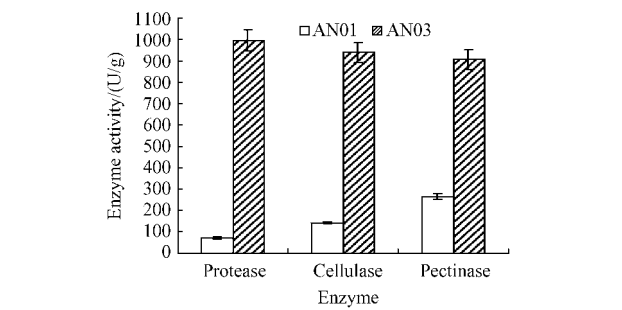


图 1 N⁺ 注入对黑曲霉产酶性能的影响

Fig.1 The effects of N⁺ implantation on *Aspergillus niger* enzyme production

2.2 黑曲霉突变菌株 ANO3 产酶的稳定性

由表 1 结果可以看出 ,在最佳产酶条件下进行培养 ,酸性蛋白酶任意二代之间产酶量的最大差值为 45U/g ,纤维素酶为 29U/g ,果胶酶为 25U/g ,3 种酶的每代产酶量差异分别小于 50U/g ,表明 ANO3 菌株的产酶性能较稳定。

表 1 黑曲霉突变菌株 ANO3 产酶性能稳定性研究

Times of generation	Enzyme activity(U/g)		
	Pectinase	Cellulase	Acid protease
Original strain	71.6 ± 3.0	141.7 ± 2.9	264.8 ± 13.5
1	905.1 ± 6.6	940.9 ± 5.6	953.1 ± 6.8
2	893.5 ± 5.6	958.3 ± 4.7	976.4 ± 5.2
3	911.3 ± 7.3	932.6 ± 8.6	977.4 ± 7.2
4	918.0 ± 7.5	947.3 ± 8.1	990.8 ± 8.4
5	901.8 ± 6.9	929.7 ± 6.7	998.3 ± 5.8

2.3 培养基的优化

2.3.1 不同碳源对黑曲霉突变菌株产酶性能的影响 :在其它培养条件皆相同情况下 ,以玉米芯为碳源时突变菌株的蛋白酶、纤维素酶和果胶酶活性均最高 ,葡萄糖、蔗糖次之 ,稻草和麦秸效果最差 (表 2)。

2.3.2 玉米芯不同添加量对黑曲霉突变菌株产酶性能的影响 :突变菌株分泌的生物酶种类不同 ,其对碳源玉米芯的需求量也有别 (表 3)。玉米芯添加量为 4.5g 时 ,酸性蛋白酶酶活最高 ,而玉米芯添加量在 4.5 ~ 5.5g 之间时 ,纤维素酶活随着玉米芯添加量的增大而增加。果胶酶酶活在玉米芯添加量 5.0g 时最大。综合评判 ,玉米芯最佳添加量应该为 5.0g。

表 2 不同碳源对黑曲霉突变菌株产酶性能的影响
Table 2 The effect of carbon source on enzyme production in *Aspergillus niger* mutative strain

Carbon source	Enzyme activity(U/g)		
	Acid protease	Cellulase	Pectinase
Straw	80.3 ± 2.8	93.4 ± 3.6	75.8 ± 3.1
Wheat straw	451.3 ± 3.6	378.6 ± 3.5	408.6 ± 4.6
Glucose	879.4 ± 4.8	907.5 ± 5.9	890.6 ± 6.7
Sucrose	658.3 ± 3.5	708.5 ± 3.1	897.7 ± 3.6
Corn straw	952.6 ± 5.4	948.9 ± 6.7	915.2 ± 5.9

表 3 玉米芯不同添加量对黑曲霉突变菌株产酶性能的影响
Table 3 The effect of wheat bran on enzyme production in *Aspergillus niger* mutative strain

Corn straw/g	Enzyme activity(U/g)		
	Acid protease	Cellulase	Pectinase
3.0	741.6 ± 5.0	816.4 ± 3.8	785.6 ± 4.6
4.5	879.5 ± 4.6	856.5 ± 5.1	806.7 ± 4.1
5.0	851.4 ± 3.9	882.9 ± 5.1	852.6 ± 4.6
5.5	809.7 ± 5.4	910.1 ± 6.5	796.5 ± 3.9
6.0	679.4 ± 3.8	852.3 ± 2.9	723.8 ± 4.0

2.3.3 豆粕不同添加量对黑曲霉突变菌株产酶性能的影响 突变菌株分泌的生物酶种类不同 ,其对氮源豆粕的需求量也不一(表 4)。培养基中豆粕添加量越大 ,酸性蛋白酶的酶活越高 ,添加量达到 5.5g 时酸性蛋白酶最高 ,达到 6.0g 时 ,蛋白酶活又开始下降。突变菌株分泌纤维素酶和果胶酶时 ,似乎对氮源的需求量不多。培养基中豆粕添加量达到 4.5g 时 ,纤维素酶酶活达到最高水平 ,培养基中豆粕添加量达到 5.0g 时 ,果胶酶酶活达到最高水平。

表 4 豆粕不同添加量对黑曲霉突变菌株产酶性能的影响
Table 4 The effect of bean cake on enzyme production in *Aspergillus niger* mutative strain

Bean cake/g	Enzyme activity(U/g)		
	Acid protease	Cellulase	Pectinase
3.0	698.3 ± 4.9	797.4 ± 4.1	638.4 ± 4.0
4.5	803.4 ± 5.1	913.5 ± 5.3	855.4 ± 4.6
5.0	974.6 ± 7.5	866.7 ± 4.9	906.3 ± 5.3
5.5	943.8 ± 6.4	716.8 ± 4.1	789.3 ± 3.1
6.0	674.5 ± 5.1	421.4 ± 3.7	501.6 ± 3.4

2.3.4 不同的无机氮源对黑曲霉突变菌株产酶性能的影响 在其它培养条件皆相同情况下 ,以氯化铵为氮源时突变菌株的蛋白酶、纤维素酶和果胶酶活性均最高 ,硫酸铵和尿素次之 ,硝酸铵和硝酸钠不但没有促进作用反而有抑制作用(表 5)。

表 5 不同的无机氮源对黑曲霉突变菌株产酶性能的影响
Table 5 The effect of nitrogen sources on enzyme production in *Aspergillus niger* mutative strain

Nitrogen sources	Enzyme activity(U/g)		
	Acid protease	Cellulase	Pectinase
(NH ₄) ₂ SO ₄	845.0 ± 4.1	816.4 ± 3.8	785.6 ± 4.6
NH ₄ Cl	975.3 ± 3.7	902.7 ± 4.4	874.9 ± 4.0
NH ₄ NO ₃	357.6 ± 2.9	338.9 ± 5.4	306.1 ± 3.7
NaNO ₃	256.7 ± 3.5	274.1 ± 3.6	219.8 ± 2.2
(NH ₂) ₂ CO	207.5 ± 2.7	188.2 ± 2.9	174.5 ± 2.6

2.3.5 氯化铵不同添加量对黑曲霉突变菌株产酶性能的影响 培养基的氯化铵含量为 1.6% 时 ,突变菌株的蛋白酶、纤维素酶和果胶酶活性均最高 ,低于或高于 1.6% 酶活量均出现不同程度的下降现象(表 6)。

表 6 氯化铵不同添加量对黑曲霉突变菌株产酶性能的影响
Table 6 The effect of culture medium 's NH₄Cl on enzyme production in *Aspergillus niger* mutative strain

NH ₄ Cl/%	Enzyme activity(U/g)		
	Acid protease	Cellulase	Pectinase
1.0	785.6 ± 3.1	467.8 ± 4.8	405.6 ± 4.2
1.4	907.8 ± 3.5	785.9 ± 5.4	684.6 ± 5.0
1.6	1110.6 ± 5.3	973.4 ± 7.6	946.5 ± 4.9
1.9	816.5 ± 4.9	792.2 ± 6.1	734.9 ± 4.3
2.1	671.5 ± 4.7	507.6 ± 3.5	489.6 ± 3.5

2.3.6 培养基含水量对黑曲霉突变菌株产酶性能的影响 培养基的含水量小于 47.4% 时 ,突变菌株的产酶量随着含水量的升高而增加 ,培养基的含水量大于 47.4% 时 ,突变菌株的产酶量随着含水量的升高而下降。因此培养基最佳含水量为 47.4% 左右(表 7)。

表 7 培养基含水量对黑曲霉突变菌株产酶性能的影响
Table 7 The effect of culture medium's water on enzyme production in *Aspergillus niger* mutative strain

Water/%	Enzyme activity(U/g)		
	Acid protease	Cellulase	Pectinase
28.6	405.1 ± 3.2	387.5 ± 2.1	318.5 ± 3.4
37.5	803.6 ± 4.1	739.6 ± 3.2	654.3 ± 4.9
47.4	994.3 ± 7.6	932.5 ± 8.9	891.7 ± 5.6
52.4	705.4 ± 5.2	795.2 ± 5.9	734.9 ± 4.3
56.5	203.5 ± 4.9	310.7 ± 4.1	289.6 ± 3.5

2.4 发酵条件优化研究

2.4.1 培养温度对黑曲霉突变菌株产酶性能的影响 突变菌株在 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℃(图 2-A)。

2.4.2 培养时间对黑曲霉突变菌株产酶性能的影响 3 种酶活在 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 ,而其他二种酶 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 左右为宜(图 2-B)。

2.4.3 培养基起始 pH 值对黑曲霉突变菌株产酶性能的影响 纤维素酶和酸性蛋白酶在 pH 值均达到 4.5~5.0 之间时酶产量最高 ,而和果胶酶基本在 pH 值达到 5.5 时酶产量最高 ,考虑本实验的目标产物为复合酶 ,因此选定培养基的最佳起始 pH 值应为

5.α (图 2-C)

综上所述 本试验黑曲霉最佳产酶条件为 麸皮

105g ,玉米芯 105g ,豆粕 105g ,氯化铵 16g ,水 1000mL pH5.0 30℃培养 4d。

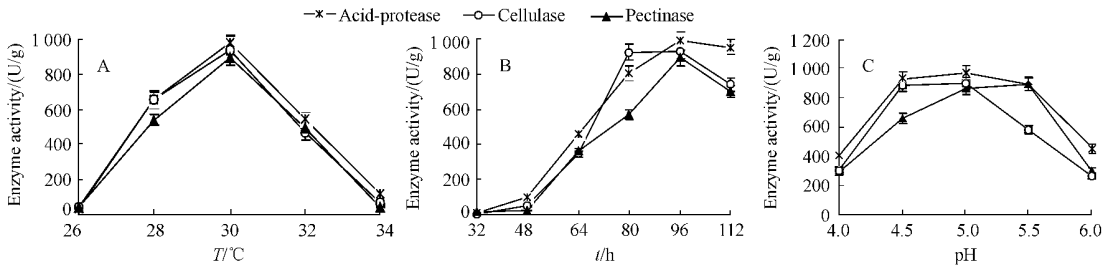


图 2 (A)培养温度对黑曲霉突变菌株产酶性能的影响 (B)培养时间对黑曲霉突变菌株产酶性能的影响 ; (C)培养基起始 pH 值对黑曲霉突变菌株产酶性能的影响

Fig.2 (A)The effect of cultivate temperature on enzyme production in *Aspergillus niger* mutative strain ; (B)The effect of cultivate time on enzyme production in *Aspergillus niger* mutative strain ; (C)The effect of cultivate temperature on enzyme production in *Aspergillus niger* mutative strain

3 讨论

注入离子与生物体相互作用是一个复杂的过程。从离子注入那一刻起到终点生物学效应,时间跨越 10^{17} - 10^9 秒,经历物理、化学和生物学阶段,注入离子通过动量传递、质量沉积、动能沉积和电荷交换效应联合作用而对遗传物质产生直接或间接的损伤,同时生物体内各种修复机制被激活,对损伤进行修复,在修复过程中可能出错或者损伤超过了生物体的修复能力,就会引起突变和致死,而部分突变还有可能被稳定遗传下来^[8]。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、刻蚀和细胞膜重新修饰,细胞内发生的能量传递、质量沉积、动量交换和电荷交换效应,引发一系列电离事件,形成大量的长寿命自由基,造成 DNA 链断裂和细胞膜过氧化反应,致使细胞内染色 DNA 键出现断裂、畸变,诱导和激发细胞对 DNA 进行修复、重接,最终诱使生物体发生突变^[3,4]。蔡克周等(2005 年)研究首次证实了发现离子注入可以引起微生物 DNA 碱基发生突变,在被测的序列中,碱基突变率为 1.09%,其中碱基置换占 87.5%,缺失为 12.5%,而碱基置换中,碱基转换占 72.5%,碱基颠换为 25%。同时,提取出发菌 ANO1、诱变菌 ANO3 及其传代菌 DNA 进行 RAPD 标记时还发现,出发菌株可以扩增出 5 条带,分子量大小不一,用 MARK 标记显示,从大到小,依次为:2000bp,1300bp,1250bp,1000bp 和 730 bp。而诱变菌株 ANO3 及其 5 次传代菌明显缺失 2000bp 这条带,结果证实氮离子注入能够引起黑曲霉的 DNA 结构突变,并且这种结构突变可以被稳定遗传[附注:蔡克周(导师程茂基)。N⁺注入选育产蛋白酶益生菌及其分子机理研究。2005,安徽农业大学硕士论文]。

离子注入育种具有损伤轻、正突变率高和选育效果好等特点^[3,6]。本试验首次利用低能离子束注入技术来诱变选育产酶益生菌,通过将 N⁺注入使黑曲霉出发菌株的产酶性能大幅度提高。与此一致,袁成凌等(2003 年)利用低能离子反复注入技术

选育花生四烯酸产生菌,突变高产菌花生四烯酸产量高达 4.66g/L,与出发菌株相比,花生四烯酸产量提高了 126.2%,且继代遗传功能稳定^[9]。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,但对于其它益生菌的诱变效果如何尚需探讨。

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。王水顺等(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^[10]。与此一致,本试验也发现硝酸铵和硝酸钠对产酶具有抑制作用,但不同的是最佳氮源是氯化铵而不是硫酸铵。

麸皮作为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^[10]。本试验用玉米芯部分取代麸皮作为碳源,结果发现玉米芯有利于产酶,可能与玉米芯结构蓬松,有利于培养基溶氧有关。

水是微生物体内和体外的溶媒,直接参与各种代谢活动。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,菌丝生长缓慢从而降低产酶量^[11]。本试验研究发现培养基最佳含水量应该在 47.4%。同样,王淑军等^[12](2001 年)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。

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。本实验研究发现,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营养,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。但李江华等(2002年)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^[13]。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℃尚无法解释。

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。本实验的发酵最佳时间为96h,比王水顺等^[10](2001年)报道72h延长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孢子细胞的损伤程度小,修复时间短。

大多数真菌在室温条件下降解作用往往最好,不需要进行温度控制。Asther等^[14](1988年)研究发现真菌生长温度可能比产酶温度偏高。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。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。酶只有在最适宜的pH值时才能发挥其最大活性。此外,过高或过低的pH值都会降低微生物对高温的抵抗能力。大多数微生物生长的pH范围是3~6。本试验研究也发现培养基最佳pH为5,与李平等^[15](1999年)的研究结果基本一致。

参 考 文 献

- [1] 蔡辉益,霍启光.饲用微生物饲料添加剂研究进展与应用.动物营养研究进展.北京:中国农业科技出版社,1994,239-248.
- [2] Zhang Z, Kornegay E T, Radcliffe J H, et al. Comparison of phytase from genetically engineered *Aspergillus* and *canola* in weanling pig diets. *J Anim Sci*, 2000, 78: 2868-2878.
- [3] 袁成凌,余增亮.低能离子束在生物技术中的应用研究.中国生物工程杂志,2003,23(4):57-61.
- [4] 余增亮.离子束生物技术引论.合肥:安徽科学技术出版社,1998.
- [5] 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.工业微生物,1999,29(2):16-19.
- [6] 诸葛键,王正祥.工业微生物实验手册.北京:中国轻工业出版社,1994,35-36.
- [7] 王水顺,林进哲,张金玮.复合酶高产菌株选育的研究.药物生物技术,2001,8(6):317-321.
- [8] 余增亮,霍裕平.离子注入生物学研究述评.安徽农业大学学报,1994,21(3):221-225.
- [9] 袁成凌,姚建铭,王纪,等.低能离子注入在花生四烯酸(AA)高产菌株选育中的研究.辐射研究与辐射工艺学报,2003,21(4):237-242.
- [10] 王水顺,袁彩,陈静蓉,等.黑曲霉复合酶固态发酵工艺复合酶研究.工业微生物,2001,31(4):26-30.
- [11] 李永泉,赵小立,贺筱蓉,等.单尿酸酶产生菌氮离子注入的诱变效应研究.真菌学报,1995,14(3):226-233.
- [12] 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.粮食与饲料工业,2001(12):21-23.
- [13] 李江华,邱敏辰,房峻,等.黑曲霉固态发酵生产酸性 β -甘露聚糖酶.生物技术,2002,12(1):41-47.
- [14] Asther M, Capdevila C, Corrieu G. Control of lignin peroxidase production by *Phanerochaete chrysosporium* INA-12 by temperature shifting. *Appl Environ Microbiol*, 1988, 54(12):3194-3196.
- [15] 李平,宛晓春.黑曲霉生产 β -葡萄糖苷酶发酵条件的研究.应用生态学报,1999,10(6):732-734.

Study on breeding of probiotic *Aspergillus niger* by N⁺ implantation and fermentation condition of its mutant

CHENG Mao-ji^{1*} CHEN Li-juan¹ CAI Ke-zhou¹ YU Zeng-liang² ZHANG Shu-qing²

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

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

Abstract: Using *Aspergillus niger* AN01 as original strain, mutated strain *Aspergillus niger* AN03 was obtained by N⁺ implantation. The results showed that activities of acidic protease, cellulase and pectinase of *Aspergillus niger* were raised from 71.6U/g, 141.7U/g and 264.8U/g to 996.5U/g, 940.4U/g and 906.5U/g respectively. Characteristics of enzymes production in the mutant *Aspergillus niger* AN03 kept stable by 5 times subculture. In addition, the optimum conditions for enzymes production of *Aspergillus niger* AN03 were investigated. The optimum components of medium consisted of bran 105.0g, corn straw 105.0g, bean cake 105.0g, NH₄Cl 6.0g, H₂O 1000mL. The optimum fermentation condition was incubated for 4d in the condition of pH 5.0 and temperature 30℃.

Key words: N⁺ implantation, Probiotic, Mutation breeding, Multicomponent enzymes

Foundation item: National Natural Science Foundation of China(30100134)

* Corresponding author. Tel 86-551-2810103 Fax 86-551-5171019 E-mail: zhengmaoji@163.net

Other authors: ZHANG Cai-an, SHI Xiu-xia, TANG Hai-ou

Received date: 02-25-2005