

文章编号 :1009-038X(2003)05-0034-04

黑曲霉 496-1 菌株植酸酶的分离纯化及酶学性质

杨平平, 王 燕, 史宝军, 邵蔚蓝, 陶文沂
(江南大学 教育部工业生物技术重点实验室 江苏 无锡 214036)

摘 要:黑曲霉(*A. niger*)496-1 菌株所产胞外植酸酶,经透析浓缩、DEAE-cellulose 离子交换层析及 Sephadex G-75, Sephacryl 100 凝胶过滤,获得了 2 个植酸酶,其相对分子质量分别为 64 200 及 41 100. 该 2 个植酸酶的最适 pH 分别为 6.0 和 3.0,最适温度分别为 55 ℃ 和 40 ℃. 初步确定一个是中性植酸酶,另一个为酸性植酸酶.

关键词:黑曲霉;植酸酶;纯化;酶学性质

中图分类号:Q 814.1

文献标识码:A

Purification and Properties of Phytase from *A. niger* 496-1

YANG Ping-ping, WANG Yan, SHI Bao-jun, SHAO Wei-lan, TAO Wen-yi
(School of biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract:The properties of phytase from *A. niger* 496-1 were studied. The results showed that, two phytases existed in the extract of *A. niger* 496-1; the optimal pH, the optimal temperature, and the molecular weight of the two phytases were 6.0, 3.0, 40 ℃, 55 ℃, and 64 200, 41 100, respectively.

Key words:*Aspergillus niger*; phytase; purification; enzymological property

植酸酶可将植物性饲料中植酸及其盐类分解为肌醇和磷酸,增加可用磷的含量,抑制植酸对矿物质和蛋白质的亲和力,解除植酸的抗营养作用. 它作为一种饲料添加剂,有着广泛的应用价值. 各国科学家非常重视不同来源植酸酶的酶学性质的研究,目前在各种微生物中已分离出胞内和胞外的多个植酸酶^[1~14]. 从文献报道来看,各种微生物间甚至同种微生物其植酸酶存在极大差异. 作者对经诱变筛选得到的黑曲霉 496-1 菌株所产植酸酶进行纯化,并对该酶进行了酶学性质研究.

1 材料与方法

1.1 材料

菌种:作者所在实验室保存菌种黑曲霉(*A. niger*)496-1;DEAE-纤维素层析:柱为 pharmacia 公司的 HiPrepTM 16/10 DEAE;分子筛柱:HiPrepTM16/10 的 Sephacryl 100 及 Hiload^R 16/60 的 Sephadex G75;牛血清白蛋白:购自上海华美试剂公司;植酸钠:Sigma 公司产品;其余试剂为国产生化试剂或分析纯.

1.2 方法

1.2.1 培养基 保藏斜面为察氏培养基,培养条件为 32 ℃,72 h;摇瓶培养基(g/dL):葡萄糖 3.0,

收稿日期 2003-03-13; 修回日期 2003-04-08.

作者简介:杨平平(1961-)男,山东单县人,副研究员,发酵工程博士研究生.

万方数据

NH_4NO_3 0.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, KCl 0.05, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.000 5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.000 5, K_2HPO_4 0.06, 植酸钙 0.4, pH 值自然。

1.2.2 菌体培养 菌体液体培养采用摇瓶培养基, 30℃摇瓶 160 r/min, 振荡条件下培养 5~6 d。

1.2.3 粗提液的制备 取摇瓶培养菌液, 2 000 r/min离心 10 min, 去除沉淀, 再经 8 000 r/min 离心 30 min, 收集的上清液即为粗酶液。粗酶液经 10 000 截留分子质量透析袋用无离子水透析 1~2 h, 透析后酶液用 PEG 20000 浓缩, 将 1 849 mL 酶液浓缩到 100 mL, 放入容器备用。

1.2.4 酶活力测定 10 μL 酶液或 10 μL 灭活酶液为对照(对照也可以用无离子水), 加入到 190 μL 含有 1 mmol/L 植酸钠的 0.25 mol/L pH 5.5 的乙酸-乙酸钠缓冲液的微板空中, 加入 150 μL 定磷试剂, 于 405 nm 处测定 A 值, 再通过钼钒定磷的标准曲线计算出酶活。

酶活力单位(U): 在 37℃, pH 5.5 的乙酸-乙酸钠缓冲液中每分钟释放 1 μmol 的无机磷作为一个酶活力单位。

1.2.5 DEAE-cellulose 离子交换层析 将无细胞粗提液直接上样于先用 pH 7.0, 25 mmol Tris-HCl 平衡的 DEAE-纤维素柱, 用含 0.2~0.6 mol/L NaCl 同种缓冲液线性梯度洗脱, 体积流量 2.5 mL/min, 分步收集有酶活的洗脱液。215, 254, 280 nm 波长在线检测, 纯化设备使用 Pharmacia 公司的 AKTA-explorer 快速纯化开拓系统。酶活测定方法同上。

1.2.6 Sephadex G-75 Sephacryl 100 凝胶过滤 取 DEAE-cellulose 离子交换层析得到的酶 I、酶 II, 分别上样于先用 pH 7.0, 25 mmol Tris-HCl 平衡的 Sephacryl 100, 用含 0.2 mol/L NaCl 同种缓冲液洗脱, 体积流量 0.5 mL/min, 分步收集有酶活的洗脱液。215, 254, 280 nm 波长在线检测, 纯化设备使用 Pharmacia 公司的 AKTA-explorer 快速纯化开拓系统。酶活测定方法同上。

取 DEAE-cellulose 离子交换层析得到的酶 II, 上样于先用 pH 7.0, 25 mmol Tris-HCl 平衡的 Sephadex G-75, 洗脱条件、检测, 及酶活测定方法同 Sephacryl 100 凝胶过滤。

1.2.7 纯度鉴定和相对分子质量的测定 采用 PAGE 凝胶电泳测定分离得到的植酸酶的纯度, 碱性系统, 凝胶体积分数为 7.5%, 考马斯亮兰 R-250 染色。纯酶相对分子质量用凝胶体积分数 12% 的 SDS-PAGE 在 120 V 电压下电泳后, 根据已知相对分子质量的标准蛋白在 SDS-PAGE 中的相对迁移

率计算得到。

1.2.8 最适温度、最适 pH 及稳定性的测定 在 pH 为 2.5 至 9.0 的反应体系中进行, 按酶活力测定方法分别测定不同 pH 条件下的酶活力, 确定反应的最适 pH 值, 然后在最适 pH 条件下, 分别测定反应在 37~90℃时的酶活力, 考察酶的最适反应温度。

2 结果与讨论

2.1 植酸酶的分离纯化

黑曲霉 496-1 发酵的酶液透析、浓缩后经 DEAE-cellulose 离子交换层析洗脱, 结果见表 1, 得到了 2 个具有植酸酶酶活的蛋白峰见图 1, 命名为酶 I 和酶 II; 将具有酶 I 和酶 II 酶活的蛋白峰分别在 Sephadex G-75 洗脱, 仅仅酶 I 得到了分离的蛋白峰见图 2。在酶 II 未测定到具有酶活的蛋白峰后, 用 Sephacryl 100 凝胶过滤得到了具有酶 II 酶活的蛋白峰见图 3。初步判断黑曲霉 496-1 菌株发酵液中有两个植酸酶, 各分离步骤过程测得的酶活结果见图 4, 由图 4 可见在本试验条件下, 酶 I 的酶活高于酶 II。

经过两步提取, 植酸酶(酶 I、酶 II 合计)被纯化了 21 倍, 纯化后的酶 I、酶 II 在 PAGE 电泳中分别清晰地呈现一条带, 见图 5。

表 1 496-1 菌株胞外植酸酶的分离纯化结果
Tab. 1 Yields and enzyme activities during purification of extracellular phytase from *A. niger* 496-1

纯化步骤	总蛋白质量/mg	总活力/U	比活力/U/mg	纯化倍数	收率/%
Culture filtrate	634.7	94776.3	149.3	1.0	100.0
DEAE-cellulose	42.1, 18.6	37609.1, 9298.9	893.3, 499.9	9.3	49.5
Sephadex G-75	8.4	19706.7	2346.0	21.1	21.9
Sephacryl S100	1.3	1048.3	806.4	21.1	21.9

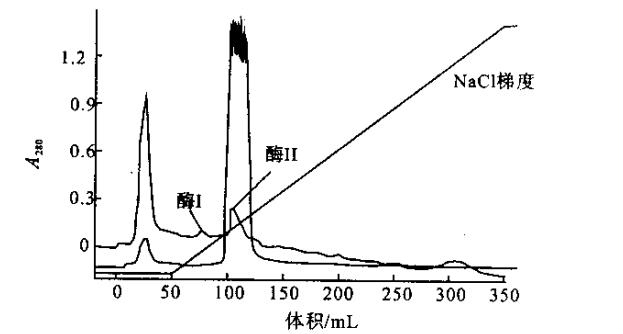


图 1 粗酶液经 DEAE-纤维素柱的洗脱图
Fig.1 Elution pattern of phytase from DEAE-cellulose column

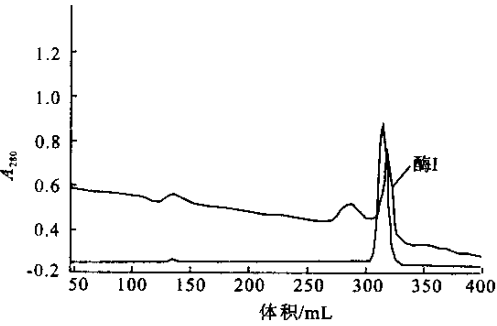


图 2 酶液经 Superdex G75 柱的洗脱图

Fig.2 Elution pattern of phytase I from Hiload 16/60 Superdex 75 column

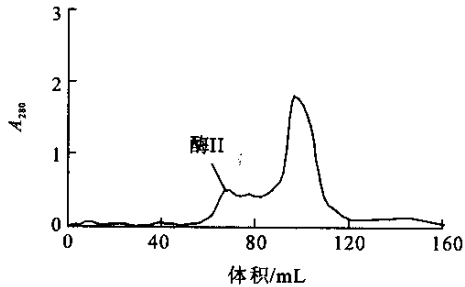


图 3 酶液经 Sephacryl 100 柱的洗脱图

Fig. 3 Elution pattern of phytase II from Sephacryl S100 column

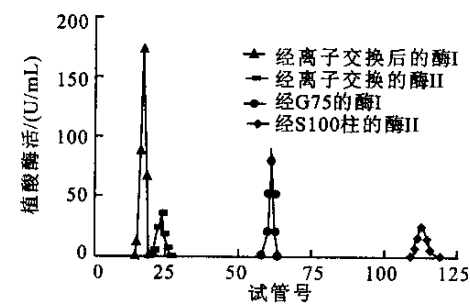
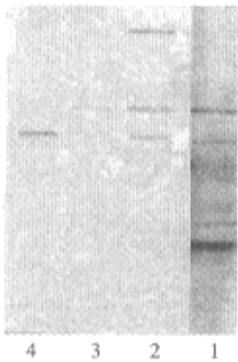


图 4 对应洗脱峰的植酸酶酶活

Fig.4 Phytase activity corresponding to the peak in elution pattern



1. Extract ; 2. DEAE-cellulose ; 3. Sephadex G-75 4. Sephacryl 100

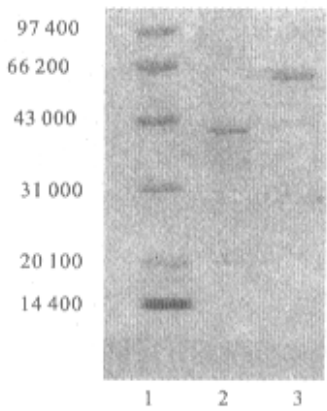
图 5 纯化酶 PAGE 电泳图

万方数据

Fig.5 PAGE of phytase

2.2 酶的相对分子质量

纯化后的酶 I、酶 II 在 SDS-PAGE 电泳 ,见图 6 ,测得酶 I、酶 II 相对分子质量分别为 64 200 及 41 100.



1. Marker ; 2. Sephacryl 100 ; 3. Sephadex G-75

图 6 纯化酶 SDS-PAGE 电泳图

2.3 植酸酶的最适反应 pH 及范围

在 pH 2.5~9.0 不同条件下测得植酸酶的酶活性结果见图 7.

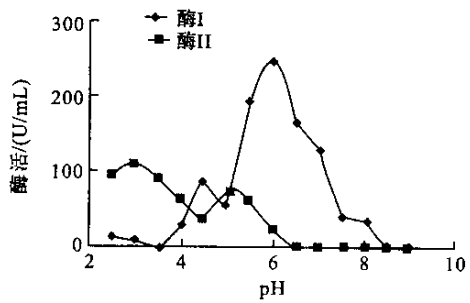


图 7 pH 对酶活的影响

Fig.7 Effect of pH on phytase activity

图 7 表明 pH 对植酸酶有显著影响 ,酶 I 最适 pH 为 6.0 ,在 pH 5.5~7.0 的范围内保持很高的酶活性 ,pH 高于 7.5 ,低于 5.0 酶活力逐渐下降. 酶 II 最适 pH 为 3.0 ,在 pH 3.0~5.5 的范围内保持较高的酶活性 ,pH 高于 5.5 ,酶活力逐渐下降. 可以看出 2 个酶的酶活 pH 范围是不同的 ,酶 I 属于中性植酸酶 ,酶 II 属于酸性植酸酶.

2.4 植酸酶的最适反应温度及范围

在其它条件一定时 ,不同温度条件(37~90 ℃)下分别测定酶 I、酶 II 活性 ,结果见图 8. 图 8 表明温度对植酸酶有显著影响 ,酶 I 的最适反应温度为 40 ℃ ,在 37~55 ℃ 的范围内保持很高的酶活性 ,酶 II 的最适反应温度为 55 ℃ ,在 37~65 ℃ 之间保持很高的酶活性.

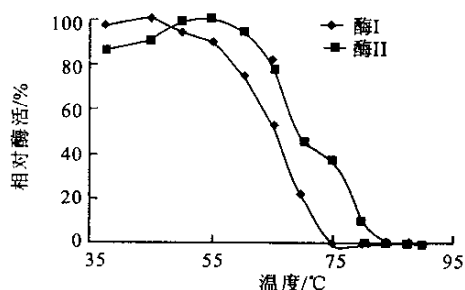


图8 温度对酶活的影响

Fig.8 Effect of temperature on phytase activity

3 结 论

不同来源的植酸酶,纯化方法和酶学特性不尽相同. Dvorakova 等(1997)从黑曲霉中分离得到最适反应 pH 5.0,最适反应温度 55 °C,相对分子质量 100 000 的植酸酶;而 Nagashima 等(1999)通过离子交换、凝胶过滤等 4 步过程,在黑曲霉 SK-57 菌种中分离得到了相对分子质量 60 000 的植酸酶,与 Dvorakova 等分离得到植酸酶的相对分子质量完全不同.而 Golovan 等(2000)从 *E. coli* 中分离得到相对分子质量同为 44 700 的 2 个植酸酶,其等电点分别为 6.5 和 6.3,最适 pH 4.5, pH 2~10 之间都有酶活存在. Tamber 等(1994)在 *K. aerogenes* 菌种中

也分离到仅仅在 K_m 值、最适 pH 及温度敏感性有所不同,但不能分离开两个酶.而本试验从黑曲霉 496-1 菌株的发酵液中分离得到的植酸酶,相对分子质量分别为 64 200 及 41 100,最适 pH 分别为 6.0 和 3.0,最适反应温度为 40 °C 和 55 °C,是 2 个性质完全不同的植酸酶.该结果与有关报道的植酸酶是不同的,初步认为是 2 个新的植酸酶.

在分离过程中发现在不同发酵时期两个酶的活性在互为改变,试验的结果为发酵 5 d 的发酵液分离得到的结果,用发酵 7 d 的发酵液进行分离,分离得到的酶 II 大大增加,而酶 I 却有所减少.由此可见,黑曲霉 496-1 菌株植酸酶的产生受发酵液条件的影响,在不同条件下,将导致酶 I、酶 II 的产生量的改变.因此进行发酵条件优化以提高该两种酶的产量.

随着微生物植酸酶研究的不断深入,微生物植酸酶基因克隆和表达也取得了较大进展,到目前为止,已有 10 余个植酸酶编码基因得到了克隆并在宿主得到表达.但绝大多数已克隆的基因都已经申请了专利,而具有我国自己知识产权的还比较少.因而对该 2 植酸酶的基因克隆和高效表达方面的工作还有待进一步开展.

参考文献:

- [1] Choi Y M. Isolation of a phytase - producing *Bacillus* sp, KHU - 10 and its phytase production[J]. *Journal of microbiology and biotechnology*, 1999, 9(2): 223 - 226.
- [2] Dvorakova J. characterization of phytase produced by *Aspergillus niger*[J]. *Folia microbiologica*, 1997, 44(4): 349 - 352.
- [3] Golovan S. characterization and overproduction of the escherichia coli *appA* encoded bifunctional enzyme that exhibits both phytase and acid phosphatase activities[J]. *Canadian Journal of microbiology*, 2000, 46(1): 59 - 71.
- [4] Han Y M. Role of glycosylation in the functional expression by *Aspergillus niger* phytase (phyA) in *Pichia pastoris*[J]. *Archives of biochemistry and biophysics*, 1999, 364(1): 83 - 90.
- [5] Jareonkitmongkol S. Partial purification of phytase from a solid isolate bacterium *Klebsiella oxytoca* MO - 3[J]. *Journal of fermentation and bioengineering*, 1997, 83(4): 394 - 394.
- [6] Kerovuo J. Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*[J]. *Applied and environmental microbiology*, 1998, 64(6): 2079 - 2085.
- [7] Liu B L. Effect of immobilization on pH and thermal stability of *Aspergillus ficuum* phytas[J]. *Enzyme and microbial technology*, 1999, 25(6): 517 - 521.
- [8] Nagashima T. Dephosphorylation of phytate by using the *Aspergillus niger* phytase with a affinity for phytate[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(10): 4682 - 4684.
- [9] Nair V C. Production of phytase by *Aspergillus - ficuum* and reduction of phytic acid content in *canola - mea*[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1991, 54(3): 355 - 365.
- [10] Sano K. Phytase of the yeast *Arxula adenivorans*[J]. *Biotechnology letters*, 1998, 21(1): 33 - 38.
- [11] Sequeilha L. Purification and properties of the phytase from *Schwanniomyces castellii*[J]. *Journal of fermentation and bioengineering*, 1999, 74(1): 7 - 11.

a simplified mode[J]. **Agr Biol Chem** , 1964 , 28(11) : 779 – 787.

[5] 大连轻工业学院 , 华南理工大学 , 郑州轻工业学院 , 等 . 食品分析[M]. 北京 : 中国轻工业出版社 , 1994.

[6] Kintner P K , Van Buren J P. Carbohydrate interference and its correction in pectin analysis using the m-hydeoxydiphenyl metho[J]. **J Food Sci** , 1982 , 47(3) : 756 – 759 , 764.

[7] Sajjaannantakul T , Van Buren J Pm , Downing D L. Effect of methyl ester content on heat degradation of chelator-soluble car-rot pectir[J]. **J Food Sci** , 1989 , 54(5) : 1272 – 1277.

[8] Pitifer L A , Mclellan M R , Van Buren J P. Analysis of pectin content and degree of polymerization in orange juice[J]. **Food Chemistry** , 1994 , 50 : 29 – 32.

[9] 施特尔马赫 . 酶的测定方法[M]. 钱嘉渊译 . 北京 : 中国轻工业出版社 , 1992.

[10] 蔡敬民 , 张洁 . 芽孢杆菌木聚糖酶的发酵条件研究[J]. 工业微生物 , 1996 , 26(2) : 17 – 20.

[11] Shahadan S , Abdullah A. Optimizing enzyme concentration , pH and temperature on banana juice extractior[J]. **ASEAN Food Journal** , 1995 , 10(3) : 107 – 111.

[12] Ishii S , Ylkotsuko T. Clarification of fruit juice by pectin trans-eliminase[J]. **J Agri Food Chem** , 1972 , 20(2) : 787 – 791.

[13] Godfrey T , West S. Industrial Enzymology[M]. Now York : Stockton Press , 1996.

[14] 何曼君 . 高分子物理(修订版) [M]. 上海 : 复旦大学出版社 , 1990.

[15] Wong D W S. Food Enzymes : Structure and Mechanism[M]. New York : Chapman & Hall , 1995.

[16] Dickinson E. An Introduction to Food Colloids[M]. London : Oxford University Press , 1992.

(责任编辑 : 李春丽 , 杨 萌)

(上接第 37 页)

[12] Shimizu M. Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* (Natto) n – 77[J]. **Bioscience biotechnology and biochemistry** , 1992 , 56(8) : 1266 – 1269.

[13] Tambe S M. Two distinct molecular forms of phytase from *Klebsiella aerogenes* evidence for unusually small active enzyme pep-tid[J]. **Journal of fermentation and bioengineering** , 1994 , 77(1) : 23 – 27.

[14] Yoon Y H. Isolation and identification of phytase – producing bacterium *Enterobacters* sp z4 and enzymatic properties of phy-tase enzym[J]. **Enzyme and microbial technology** , 1996 , 18(6) : 449 – 454.

[15] 杨平平 , 袁婀娜 , 史宝军 , 等 . 产植酸酶菌株 *A. niger* 496 – 1 产酶条件的初步研究[A]. 发酵工程学科的进展 – 第三次全国发酵工程学术讨论会文集[C]. 北京 : 中国轻工业出版社 , 2002 . 230 – 233.

[16] 赵允磷 , 金其荣 . 无花果曲霉与黑曲霉植酸酶产酶条件研究[J]. 食品与发酵工业 , 1996 , (3) : 42 – 44.

(责任编辑 : 杨 萌)