

植酸酶产生菌产酶条件研究

赵允麟 金其荣

(生物工程学院)

摘要 经采样、分离,筛选出多株植酸酶产生菌;并将其中产酶水平较高的黑曲霉(*Asp. niger* 70)和无花果曲霉(*Asp. ficuum* NRRL 3135)用固态培养法进行了产植酸酶条件的对比研究。

主题词 植酸;酶;固态发酵 / 植酸酶

中图分类号 TQ464.8

0 前言

植酸酶是催化植酸(肌醇六磷酸)及植酸盐水解成肌醇与磷酸(或磷酸盐)的一类酶的总称。

植酸酶作为新型饲料添加剂现已引起国内外人士的普遍关注。将植酸酶添加到植物性饲料中后,不但能提高植物磷被动物的吸收利用率,而且使植物中的植酸盐蛋白质络合物降解而提高植物蛋白被动物的利用率,减少植酸盐对微量元素的螯合,提高植物饲料的营养价值,同时又减少猪、鸡粪便磷对大自然的污染。另外,植酸酶还有许多其它工业用途:在大豆加工中可对大豆蛋白进行酶催化改性,从而提高其营养和商品价值;将植酸盐(或米糠、菲丁等农副产品)工业化加工生产肌醇或肌醇-磷酸盐;在食品加工中,可提高米面制品的营养;在谷物(玉米、小麦等)淀粉加工中处理废弃物等。

国外植酸酶研究最早的是美国农业部农业资源研究中心,他们从诸多微生物中研究发现无花果曲霉(*Asp. ficuum*)NRRL3135 是较理想的植酸酶产生菌,但该菌株产酶水平较低,无商业开发价值。目前丹麦 NOVO 公司生产的植酸酶就是用该产生菌的基因工程菌生产的;1991 年荷兰的麦斯特·布罗卜德股份有限公司在中国申请了发明专利;微生物植酸酶的克隆与表达,也即是以该 NRRL3135 菌株的基因克隆,并在黑曲霉中表达的基因工程菌。因目前植酸酶产品均是以基因工程菌生产,价格昂贵,所以无法作为饲料添加剂进行商业推广。

为此,本研究旨在通过筛选出产酶水平较高的植酸酶产生菌,用中国传统的固态培养法生产植酸酶,以降低生产成本,以利于作为新型饲料添加剂进行商业推广。

收稿日期: 1996-01-10

1 材料与方法

1.1 菌种

Asp. ficuum NRRL 3135 由美国农业部农业资源研究中心提供。

其它菌种由本实验室筛选。

1.2 固态培养方法

称取 15g 麸皮(含粉量较少的麸皮)或麦芽根置 250ml 三角瓶中,加含适量营养盐的水(或缓冲液)30~45ml,使培养基含水量保持在 65%~75%;121℃ 灭菌 40min,冷却后接种,(30±1)℃ 恒温培养 5~9d。(培养过程中,每天翻动一下)。

1.3 植酸酶酶活的测定

植酸酶活性单位的定义:37℃,pH5.50 条件下,每分钟从植酸钠中释放出 1μmol/L 无机磷所需的酶量。

测定的方法:将 0.1ml 酶液(必要时可稀释)或 0.1ml 去离子水(空白对照)加入到 0.9ml 反应液中(内含 1mmol/L 植酸钠的 0.25mol/L 的乙酸-乙酸钠缓冲液(pH5.5))置 37℃ 恒温水浴中,恒温反应 30min,然后加入 1ml 10% TCA(三氯醋酸)终止反应后,加入 2ml 显色试剂[50ml 含 3.66g FeSO₄·7H₂O 钼酸铵溶液(2.5g (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 和 8ml H₂SO₄ 用去离子水稀释至 250ml)]。在 750nm 处利用分光光度法测定蓝色强度(751 分光光度计)根据磷酸盐比色标准曲线可读出释放出的磷酸盐量,从而计算出酶活。

1.4 酶抽提液的制备^[3]

在培养好的固体培养物中按一定比例加入 2%CaCl₂ 溶液,然后置摇床上以 200r/min 振荡 1h,用 2 层纱布过滤,将滤液置台式离心机中以 3500r/min 离心 10min,上清液即为酶抽提液 I,将滤渣再按一定比例加入 2%CaCl₂ 溶液,同上操作(摇床振荡——过滤——离心)得酶抽提液 II,最后将二次滤渣再按比例加入 2%CaCl₂ 溶液,同上操作得酶抽提液 III。

经三次抽提即能基本上把固体培养物中的植酸酶抽提出来,而且酶抽提液 I 中含酶量是含酶总量的 60%~65%。为统一起见,对比试验数据中均是以酶抽提液 I 为分析样品。

2 结果与讨论

2.1 产酶菌株的分离与筛选

经多方采样后,进行了一系列的分离筛选步骤,先后得到植酸酶产生菌 10 余株,其中有黑曲霉、米曲霉、青霉、酵母等;然后进一步用固态培养法筛选植酸酶产生菌,结果如表 1。

从筛选情况和表 1 可看出:固态培养法生产植酸酶的菌株,基本上全部属于霉菌,其中产酶水平较高的有黑曲霉、米曲霉和青霉。在这些产酶菌株中,发现一黑曲霉菌株(Asp. Niger 70)其产酶水平稳定,且产酶活性最高。

2.2 固体培养基原料的确定^[1]

经多种固体培养基产酶对比试验后,重点选择了麸皮和麦芽根作为植酸酶产生菌固体

表 1 植酸酶产生菌的产酶水平

菌株类别	菌株数	固态培养物抽提液产酶平均水平(u/ml) ¹⁾
黑曲霉	4	3.85
米曲霉	2	3.14
青霉	3	2.78

1) 表列数据为酶抽提液 I 的酶活平均值

培养基的主要原料,除了它们具备作固态培养基原料的多种优点外,还均富含植酸盐,对植酸酶的产生会有一定的诱导作用。但由于麦芽根经培养后色泽较深,对酶活比色测定有一定干扰,所以本试验均以麸皮为培养基的主要原料。

2.3 无花果曲霉(NRRL3135)与黑曲霉(AsN70)产酶条件对比

将筛选到的植酸酶高产株黑曲霉(AsN70)与美国农业资源研究中心提供的无花果曲霉(NRRL3135),通过固态培养法(SSF)进行植酸酶产酶条件的对比研究。

2.3.1 培养温度的确定^[1] 根据国外文献[1],无花果曲霉的培养温度为 30℃。经试验验证,温度高于 30℃或低于 30℃,植酸酶产酶活力确均有下降趋势。因此,确定固体培养温度为(30±1)℃。

作者筛选的黑曲霉,经试验发现也是 30℃培养,产酶活性较高。因此,将固体培养温度均控制在(30±1)℃。

2.3.2 培养时间对产酶的影响 将灭好菌的固体培养三角瓶(16个250ml三角瓶分成两组,每组8瓶,固体培养基相同)分别用 NRRL 3135 与 AsN70 以同样接种量接种后,置 30℃恒温培养箱中培养,3d后,从两组中每天各取出1瓶,并制备成酶抽提液,测定酶活,结果如图1。

从图中可以看出:无花果曲霉(NRRL 3135)需培养 8~9d 才达到产酶高峰期,而黑曲霉(AsN70)培养 5~6d 便能达到产酶高峰。

2.3.3 培养过程中培养基 pH 对产酶的影响

1) 无花果曲霉 将12个称取好培养基的三角瓶分两组(每组6瓶),一组用去离子水配制,另一组用 0.2mol/L 的乙酸-乙酸钠缓冲液(pH4.8)配制,灭菌后培养,经 0,2,4,6,8,9d 培养后,各取一瓶,测定 pH,并测酶活,结果如图2。

从图2可知,无花果曲霉在 9d 的培养过程中,其 pH 值可从 5.4 增加到 8.0 左右(不用缓冲液),而如果用缓冲液控制 pH,其 pH 值变化幅度较小(pH5.1 增加到 pH7.0 左右)。但酶活却是用缓冲液的较高,从而说明控制 pH 对无花果曲霉的产酶是有利的。

2) 黑曲霉(AsN 70) 将10个称取好培养基的三角瓶分成两组,(每组5瓶),一组用去离子水配制,另一组用 0.2mol/L 乙酸-乙酸钠缓冲液(pH4.8)配制。经 0,2,4,5,6d 培养后,各取1瓶,测定 pH,并测酶活,结果如图3。

从图3可知:黑曲霉(AsN 70)经 5~6d 培养,其 pH 值从 5.4 增加到 7.2 左右,如用缓冲液控制 pH,其 pH 值变化幅度也较小(从 pH5.1 增加到 pH6.3),但对酶活并无明显的提高。

以上仅是 NRRL3135 与 AsN70 两种野生型菌株生产植酸酶条件的初步研究,研究结果表明:无花果曲霉(NRRL3135)与黑曲霉(AsN70)产酶培养基与培养温度可以是一致的;但从产酶时间来讲:NRRL3135 需 8~9d 才能达到产酶高峰期,而 AsN70 仅需 5~6d;控制 pH(用缓冲液)对 NRRL3135 产酶是有利的,而对于 AsN70 的产酶无明显的促进作用。

从产酶条件看,培养基的组成是非常重要的,虽做了一些工作,但考虑到所筛选的黑

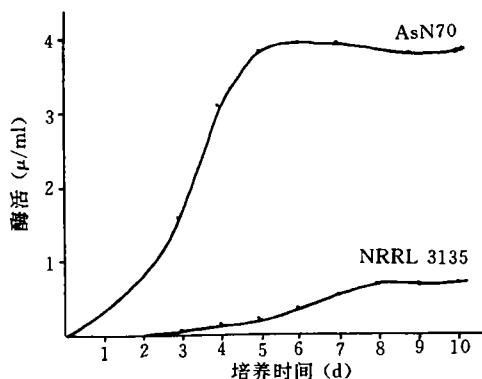


图1 培养时间对产酶的影响

曲霉(AsN70)是野生型菌株,还必须进一步进行菌种定向培育,这一工作有待进一步深化。

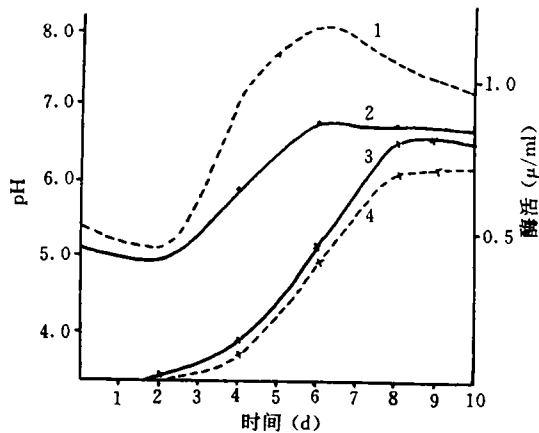


图2 无花果曲霉(NRRL 3135)培养过程中的pH变化及其对产酶的影响

1 pH(不用缓冲液) 2 pH(用缓冲液)
3 酶活(用缓冲液) 4 酶活(不用缓冲液)

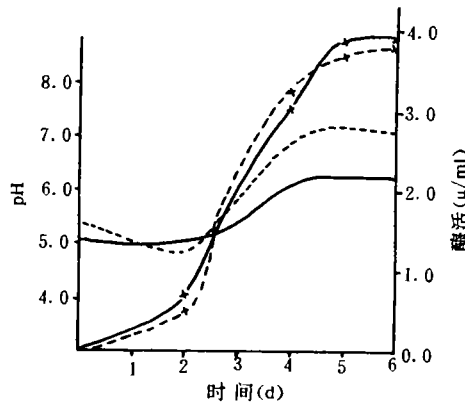


图3 黑曲霉(AsN70)培养过程中的pH变化及其对产酶的影响

1 酶活(不用缓冲液) 2 酶活(用缓冲液)
3 pH(不用缓冲液) 4 pH(用缓冲液)

2.4 酶提取收率计算

2.4.1 无花果曲霉 NRRL 3135 固体培养物植酸酶抽提液酶收率的计算^[1] 将培养 9d 的固体培养物按前述方法分三次抽提,结果如表 2。

三次抽提液总酶活为 $48.3 + 18.8 + 11.0 = 78.1\text{u}$,以每 g 干原料(麸皮)计,则无花果曲霉的产酶水平为 $78.1/15 = 5.2\text{u/g}$ (干基)。

2.4.2 黑曲霉(AsN70)固体培养物植酸酶抽提液酶收率计算 将培养 6d 的固体培养物按前述方法同样分三次抽提,结果如表 3。

表2 NRRL3135 产酶收率

项 目	酶 抽 提 液		
	I	II	III
培养物:抽提剂(W/V)	1:1	1:1	1:1
抽提液体积(ml)	68	40	18
酶 活 (u/ml)	0.71	0.47	0.61
总酶活 (u)	48.3	18.8	11.0
抽提液酶收率(%)	62	24	14

表3 AsN70 产酶收率

项目	酶 抽 提 液		
	I	II	III
培养物:抽提剂(W/V)	1:2	1:1.5	1:1
抽提液体积(ml)	112	74	47
酶 活 (u/ml)	3.92	2.01	1.87
总酶活 (u)	439.0	148.7	87.9
抽提液酶收率(%)	65	22	13

三次抽提液总酶活为 $439.0 + 148.7 + 87.9 = 675.6\text{u}$,以每 g 干原料(麸皮)计,则黑曲霉(AsN70)的产酶水平为 $675.6/15 = 45.0\text{u/g}$ (干基)。

3 结 论

1) 许多微生物可产生植酸酶,而霉菌中的黑曲霉、米曲霉、青霉,无花果曲霉可用固态培养法生产植酸酶,本研究筛选到的黑曲霉(AsN70)是产酶水平较高,产酶稳定的较优良的野生型菌株。

- 2) 黑曲霉(AsN70)与国际上公认的植酸酶优良产生菌无花果曲霉(NRRL3135)用固态培养法生产植酸酶的产酶水平分别为 45u/g(干基)与 5.2u/g(干基)。
- 3) 有关菌种的改良和所产植酸酶的酶学性质研究有待进一步进行。

参 考 文 献

- 1 Duvnjak V C. Reduction of phytic acid content in canola meal by *Asp. ficuum* in solid state fermentation process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1990, 34(2):183~188
- 2 Harland B F. Fermentative Reduction of phytate in rye, white, and whole wheat breads, *cereal chem.* 57(3):226~229
- 3 Ghareib, Biosynthesis, purification and some properties of extracellular phytase from *Asp. carneus*. *Microbiol. Hury* 1990, 37(2):159~164

Study on conditions of producing phytase by *Aspergillus*

Zhao Yunlin Jin Qirong
(School of Bioengineering)

Abstract Some strains producing phytase were selected. We have compared the conditions of producing phytase by *Asp. ficuum* NRRL3135 and *Asp. niger* 70 in solid state fermentation process.

Subject-words Phytic acid; Enzymes; Solid state fermentation / Phytase