

文章编号: 1001-411X(2001)03-0047-03

植酸酶生产菌的筛选及生长条件的研究

何平¹, 傅雪琳², 赵亚华¹, 高向阳¹, 陈海涛¹, 徐凤彩¹

(1 华南农业大学生物技术学院, 广东 广州 510642; 2 华南农业大学农学系, 广东 广州 510642)

摘要: 从单胃动物的粪便垃圾堆中分离出一种可分泌植酸酶的青霉。进一步的研究表明这种青霉培养液最佳的淀粉含量为 $40\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。青霉生长与其分泌植酸酶之间存在矛盾。青霉生长旺盛时产酶少, 测出的酶活性低。青霉生长缓慢时产酶多, 测出的酶活性高。植酸酶大量分泌前伴随着培养液 pH 值的急剧下降。

关键词: 青霉; 植酸; 植酸酶

中图分类号: Q936

文献标识码: A

植酸(phytate)又称肌醇六磷酸酯, 是植物组织中磷的主要贮存方式, 在谷物、豆类、油料等作物种子中 $w(\text{植酸})$ 约为 $1\% \sim 3\%$, 它不能为人和单胃动物消化吸收, 随粪便排出体外, 不仅浪费磷资源, 还污染环境; 植酸能与体内某些蛋白质和金属阳离子形成络合物而降低其食品营养价值。

植酸酶可以降解植酸为肌醇和无机磷。在动物饲料中添加植酸酶, 不仅为动物提供所需的磷, 而且通过解除螯合作用提高动物对矿物元素及蛋白质的利用率, 促进动物生长发育, 减少环境污染^[1~3]。

许多植物饲料中都含有植酸酶, 但其含量极少, 热、酸不稳定, 在饲料加工过程中和动物胃中往往使之失活。微生物生产的植酸酶不仅耐酸, 而且热稳定性相对于植物自身植酸酶要高。目前国内应用的植酸酶均属进口产品, 价格昂贵。国内仅在近几年有几家单位开始此项工作的实验室研究, 但产酶活力低, 成本高, 因而至今仍无商品级植酸酶面世^[4~5]。因此, 培育和筛选产植酸酶高并具有广泛的生长适应性的菌株在目前显得尤为重要。作者已从单胃动物的粪便垃圾堆中分离出一种青霉菌(*Penicillium* sp.), 并对其生长条件及产酶特性进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 植酸钙的制备

在植酸($\text{pH}1 \sim 2$, 密度 $1.1\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$)中加入饱和 CaCl_2 溶液, 滴入高浓度的 NaOH 溶液至中性, 过滤, 用大量蒸馏水冲洗沉淀后烘干至恒质量。

1.2 培养基及培养方法

(1) 培养基母液的制备: $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O} +$

$50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{NH}_4\text{NO}_3 + 5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{KCl} + 1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{MnSO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O} + 0.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 使用时稀释 10 倍。

(2) 固体培养基的制备及培养方法: $15\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖 + $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂 + 稀释 10 倍的培养基母液, $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 植酸钙, $\text{pH}5.5$, 溶解后倒入培养皿, 冷却后划线培养, 30°C , $3 \sim 5\text{ d}$ 。

(3) 液体培养基的制备及培养方法: $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖 + $20 \sim 80\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 淀粉 + $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 植酸钙 + 稀释 10 倍的培养基母液, $\text{pH}5.5$ 。500 mL 三角瓶中装液体培养基 100 mL, 在固体培养基上挑取 3 环青霉菌到液体培养基, 于 30°C , 120 次/min 振荡摇床上培养 $5 \sim 7\text{ d}$ 。

1.3 菌种的来源

在鸡粪的垃圾堆中, 取 1 g 湿泥稀释 1 000 倍, 吸取 1 mL 在固体培养基上划线培养, 初步筛选出分解植酸钙的菌落。

1.4 植酸酶检测方法^[6]

在固体培养基上挑取 3 环青霉菌到液体培养基, 30°C 振荡培养, 将菌液在 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液作为粗酶液。取酶液 0.5 mL 加底物缓冲液(0.25 mol/L 乙酸-乙酸钠, $1.4\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 植酸, $\text{pH}5.0$)1.5 mL, 45°C 保温 30 min, 然后加 $0.1\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ TCA 1 mL, 定磷试剂 3 mL, 在 660 nm 下测定 $A_{660\text{ nm}}$ 值。以每毫升粗酶液作用 1 min 放出 1 nmol 无机磷为 1 酶活力单位($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$)。

1.5 青霉生长量测定

采用质量法, 先称量滤纸质量, 作好记录和标号。取 10 mL 菌液进行过滤, 烘干称质量, 减去滤纸质量得菌丝净质量。

收稿日期: 2000-12-27 作者简介: 何平(1967-), 男, 讲师, 硕士。

基金项目: 华南农业大学校长基金资助项目(99003)

2 结果与分析

2.1 植酸酶野生菌的筛选

从单胃动物(鸡、猪)的粪便垃圾堆中取湿泥进行多次稀释培养,发现了一种能自然产生植酸酶的菌落,对其进行了初步提纯复壮,繁殖培养,经鉴定确认为青霉,如图 1 所示,菌落为青绿色,有白色边缘,四周的植酸钙白色沉淀被分解,培养基呈透明,初步表明此青霉具有产生植酸酶的能力,挑选出有透明斑、生长旺盛的大菌落,进行酶活性测定.

2.2 培养液中淀粉含量对青霉生长的影响

在液体培养基中添加不同含量的淀粉(20、40、60、80 g·L⁻¹),对青霉进行培养,培养温度为 30℃,结果表明(表 1):淀粉经过高温高压灭菌后,晶格化被破坏,呈糊状.培养液淀粉含量 80 g·L⁻¹时,菌液受淀粉糊化影响,粘稠摇动困难,溶解氧量少,浪费营养.20 g·L⁻¹时菌液呈水状,溶解氧量多,但浪费发酵空间,产率低.初步认为培养液中淀粉含量为 40 g·L⁻¹较合适,此时淀粉利用充分,产率高.

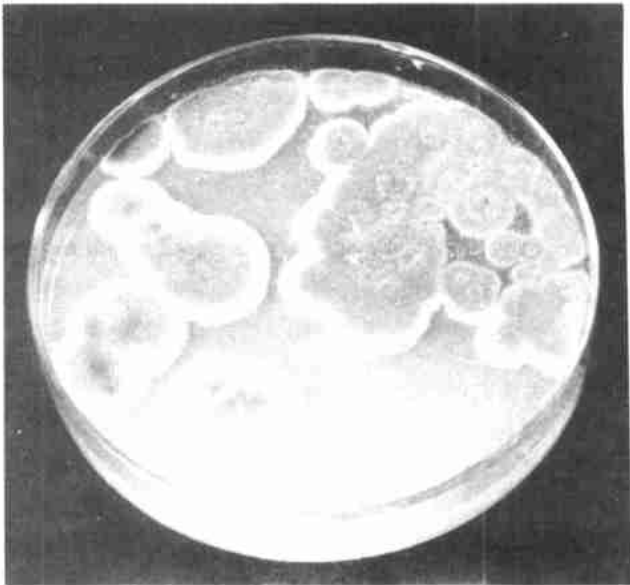


图 1 产生植酸酶的青霉菌落
Fig. 1 *Penicillium* sp. colony producing phytase

表 1 培养基中淀粉含量对青霉生长的影响

Tab 1 Effects of starch content on *Penicillium* sp. growth

ρ (淀粉 starch) /(g·L ⁻¹)	t (培养 culture)		
	36 h	60 h	5 d
80	白色,呈稠粘的浆糊状	深紫色,呈稠粘的浆糊状	青色,呈浆糊状,有较多的淀粉剩余
60	微红色,呈稀糊状	深紫色,呈稀糊状	青色,呈稀糊状,有少量的淀粉剩余
40	粉红色,呈稀糊状	深紫色,呈稀糊状	青色,菌液呈水状,大量青霉菌落悬浮于水中,无淀粉剩余
20	紫红色,呈水状	深紫色,呈水状	青色,呈水状,菌落稀疏,无淀粉剩余

2.3 青霉生长曲线

青霉的培养温度为 30℃.从图 2 看出,在培养初期(12 h 内),青霉的生长表现出快速生长的趋势,以后交替出现快→慢→快→慢的动态,且间隔时间为 6 h,青霉生长总体呈阶梯状上升趋势.

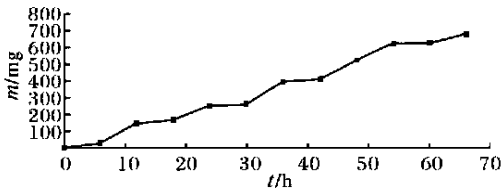


图 2 青霉生长曲线
Fig. 2 Growth curve of *Penicillium* sp.

2.4 植酸酶活性与青霉生长时间的关系

从图 3 可以看出随青霉生长时间的延长,其分泌的植酸酶活性呈波浪状变化,培养的第 24、36、54、66 h 的酶活性较高,而且是对应发生在青霉生长的平缓期(图 2),这可能是由于青霉大量产生植酸酶,

消耗很多蛋白和能量,导致生长减慢.尤其在 36 h 出现了短时间的植酸酶活性高峰后,酶活性很快降低.以后呈较平缓的波浪状变化.这种变化似可说明当培养液中缺乏磷时,生产植酸酶的基因被激活,植酸酶大量产生,大量植酸被分解而产生大量的磷,磷不能马上被完全利用,不断积累的磷反而抑制植酸酶的产生,从而使植酸酶的活性呈一高一低的波浪状变化.

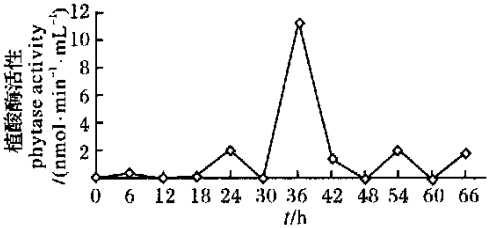


图 3 植酸酶活性与青霉生长时间的关系
Fig. 3 The relationship between phytase activity and growth time of *Penicillium* sp.

2.5 培养液中 pH 随青霉生长变化

从图 4 看出随着青霉培养时间的延长培养液 pH 缓慢降低, 最终降至 2 左右, 在 24~30 h 菌液 pH 降低迅速. 这一时段正好是在酶活性急剧增高之前, 可能由于青霉在大量产酶前代谢旺盛, 产生一些酸性的代谢产物所致.

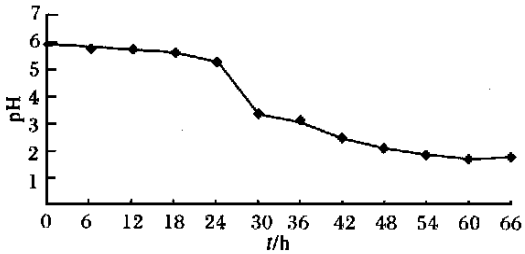


图 4 培养液 pH 与青霉生长时间的关系
Fig. 4 The relationship between pH of liquid medium and growth time of *Penicillium* sp.

3 结论

在植酸酶野生菌的筛选过程中, 有些菌并不分泌植酸酶, 但它也能形成透明的菌斑. 后来发现是这些菌分泌大量酸性物质, 溶解植酸钙 (pH<3 时开始溶解) 的缘故. 这是初步筛选中应注意的问题.

植酸酶活性随着青霉的生长而呈波浪状变化, 当植酸酶活性升高时, 对应时期的青霉生长就变得缓慢, 这可能是由于青霉大量产生植酸酶, 消耗很多

蛋白和能量, 导致生长减慢. 植酸酶活性的变化是由什么来决定的呢? 笔者在试验中发现培养液中的无机磷含量变化与植酸酶活性的变化一致, 所以推测无机磷对植酸酶有反馈抑制的作用.

植酸酶大量分泌前伴随着培养液 pH 值的急剧下降, 这可能与青霉的代谢加快有关, 并分泌出酸性物质, 或是产生的 CO₂ 形成 HCO₃⁻, 在生产上可作为一项指标, 预示着植酸酶分泌高峰的到来, 因为植酸酶活性的测定不仅较培养液 pH 值的测定要复杂得多, 而且需要 2 h 以上, 不能及时预报植酸酶分泌的情况, 难以及时控制生产.

参考文献:

[1] 武素平. 植酸酶在动物饲料磷营养中的作用[J]. 中国饲料, 1996 (10): 25—26.
[2] SHARMA C B, GOELM, IRSHAD M. Myo-inositol hexaphosphate as a potential inhibitor of α -amylases of different origins [J]. Phytochemistry, 1978 17: 201—204.
[3] ULLAH H J. *Aspergillus ficuum* phytase: partial primary structure substrate selectivity, and kinetic characterization[J]. Preparative Biochem, 1988, 18: 459—471.
[4] 楼洪兴, 许尧兴. 植酸酶在饲料中的应用[J]. 中国饲料, 1994 (8): 16—18.
[5] 苏基双, 梁 琳, 刘汉林. 添加植酸酶对肉鸡钙、磷利用的研究[J]. 中国饲料, 1997, (17): 5—6.
[6] 陈红歌, 苗雪霞, 张世敏, 等. 植酸酶高产菌株的诱变选育[J]. 微生物学通报, 1997, 24 (5): 272—274.

The Screening of Phytase-Producing *Penicillium* sp. and Study of Its Growth Requirements

HE Ping¹, FU Xue-lin², ZHAO Ya-hua¹, GAO Xiang-yang¹, CHEN Hai-tao¹, XU Feng-cai¹

(1 College of Biotechnology, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China;

2 Dept. of Agronomy, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: A strain of the fungus *Penicillium* sp. which could produce phytase was isolated from a heap of monogastric animal feces. The optimal concentration of the starch in the penicillium (*Penicillium* sp.) liquid medium was 40 g·L⁻¹. Phytase production of the penicillium was inversely related to its growth. When the penicillium grew fast, phytase was produced slowly and in small quantity. When the penicillium grew slowly, much phytase was produced. Before a great deal of phytase was produced the pH of the penicillium liquid medium decreased sharply.

Key words: *Penicillium* sp.; phytate; phytase

【责任编辑 柴 焰】