

文章编号: 1001-411X(2002)02-0044-03

青霉植酸酶生产条件及纯化的研究

何平¹, 傅雪琳², 詹福建¹, 赵亚华¹, 高向阳¹, 许少杰¹

(1 华南农业大学生命科学学院, 广东 广州 510642; 2 华南农业大学农学院, 广东 广州 510642)

摘要: 青霉培养液的原始 pH 值为 5.5 时, 植酸酶大量地产生, 酶活性高. 在青霉的生长过程中, 维持培养液 pH 的不降低会抑制青霉的生长. 植酸钙可促进植酸酶活性的提高. 粗酶液经硫酸铵分级沉淀, 再经 Sephadex G-100 凝胶过滤, 洗脱液有 2 个具有酶活力的蛋白峰, 植酸酶被纯化了 3.3 倍, 比活力达 71.3 U/mg.

关键词: 青霉; 植酸; 植酸酶

中图分类号: Q936

文献标识码: A

自从 1907 年 Suzuh 在米糠中首先发现了植酸酶(phytase)之后, 专家们就对动植物体内的植酸酶进行了长期的研究. 到目前为止, 人们已经发现植酸酶存在于细菌、部分真菌及植物中^[1,2]. 由微生物发酵生产的植酸酶才具有真正的开发价值, 目前的研究主要集中在微生物上. 从 60 年代末以来, 人们陆续从十几种微生物中分离到植酸酶, 如枯草杆菌(*Bacillus subtilis*), 假单胞杆菌(*Pseudomonas*), 大肠杆菌(*Escherichia coli*), 酵母(*Saccharomyces*), 曲霉(*Aspergillus*), 青霉(*Penicillium*)^[3,4]等.

植酸酶主要应用在饲料上, 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. 国外现已开始试用食品级植酸酶处理粮食, 以分解粮食中的植酸(盐), 减少植酸对微量元素的螯合, 以提高粮食的营养价值^[5-8].

利用微生物发酵生产植酸酶, 目前的研究主要表现在筛选诱变产酶菌种, 另一方面通过改变发酵条件, 提高产酶率^[4]. 笔者对产植酸酶的青霉菌(*Penicillium* sp.)的生长条件及其酶学特性进行了研究.

1 材料与方法

1.1 菌种

青霉菌(*Penicillium* sp.)是从鸡粪的垃圾堆中筛选出分泌植酸酶的菌种, 其培养条件见文献^[1].

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, pH 5.5. 溶解后倒入培养皿, 冷却后划线培养, 30°C , 3~5 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, pH 5.5. 500 mL 三角瓶中装液体培养基 100 mL, 高压灭菌冷却后, 在固体培养基上挑取 3 环青霉菌到液体培养基, 于 30°C 、120 r/min 振荡摇床上培养 5~7 d.

1.3 植酸酶检测方法^[1]

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 室温下离心 5 min, 取上清液作为粗酶液. 取酶液 0.5 mL 加底物溶液(0.25 mol/L 乙酸-乙酸钠, $1.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 植酸, pH 5.0)1.5 mL, 45°C 保温 30 min, 立即加 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氯乙酸(TCA)水溶液 1 mL, 定磷试剂^[9] 3 mL, 在 660 nm 波长下测定 $D_{660 \text{ nm}}$ 值. 以每毫升粗酶液作用 1 min 放出 1 nmol 无机磷的酶量为 1 个酶活力单位(U).

1.4 植酸酶的部分分离纯化

(1)硫酸铵分级分离: 将发酵液(200 mL)在室温下以 4 000 r/min 离心 10 min, 在 10%~100%硫酸铵饱和度下测定植酸酶活力的变化.

(2)Sephadex 柱层析: 经硫酸铵分级分离后, 在 30%和 70%饱和度各有一酶活性组分, 其中 70%饱和度酶活性较高, 取 70%饱和度下的组分, 上 Sephadex G-100 柱(2.5 cm × 20 cm)层析, 以 pH 4.5、0.20 mol/L 乙酸-乙酸钠缓冲液, 20 mL/h 速度洗脱分离, 每管收集量为 3 mL. 在 280 nm 波长下检测收集结果, 并测定酶活力.

1.5 蛋白质的测定

按 Bradford 方法^[10]. 并以牛血清白蛋白为标准蛋白质.

2 结果与分析

2.1 培养液原始 pH 对产酶的影响

将培养液的 pH 分别调为 2.0、3.5、4.0、4.5、5.5、6.5, 青霉接种培养。从图 1 可以看出当培养液原始 pH 为 5.5 时, 植酸酶活性最高, 因此青霉培养液的原始 pH 值为 5.5 最佳。

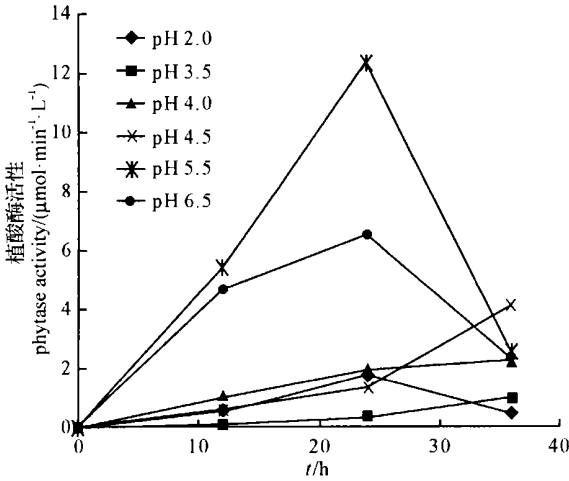


图 1 培养液 pH 与植酸酶活性的关系

Fig. 1 The relationship between pH of the culture fluid and phytase activity

2.2 乙酸-乙酸钠缓冲液对青霉生长的影响

在以蒸馏水 10 倍稀释的培养基母液中, 高压灭菌后 (pH 5.5), 进行青霉的摇瓶培养, 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 时菌液 pH 降低迅速, 随后有大量的植酸酶分泌^[1]。而以 pH 5.0、0.10 mol/L 乙酸-乙酸钠缓冲液取代蒸馏水 10 倍稀释培养基母液, 进行青霉的摇瓶培养时, 培养液的 pH 基本不变, 通过观察发现, 在一开始的 24 h 内菌丝体的生长与对照相似, 但在 24 h 后其菌丝体不见增加, 反而慢慢消失, 同时检测不出植酸酶的活性 (图 2)。因此可认为在青霉的生长过程中, 由于缓冲液保持培养液的 pH 不下降, 会抑制青霉的生长, 同时也可能阻遏了酶的合成。

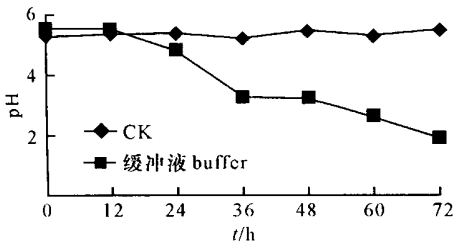


图 2 乙酸-乙酸钠缓冲液对青霉生长中培养液 pH 的影响
Fig. 2 The effect of HAC-NaAc buffer on culture fluid pH of the penicillium growth

2.3 植酸钙对植酸酶活性的促进作用

如图 3 所示, 当培养液中没有加入植酸钙作为

底物供应时, 植酸酶活性较低, 而当提供植酸钙 (浓度为 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 时, 植酸酶活性大幅度的提高。当植酸酶活性大幅度的提高后, 分解植酸提供大量的磷, 过量的磷反过来又抑制植酸酶的活性, 故而其活性又降低。

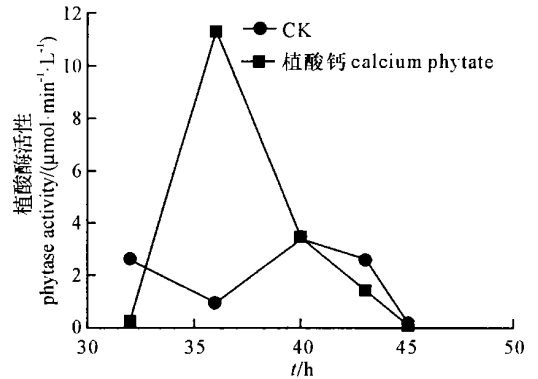


图 3 植酸钙对植酸酶活性的促进作用

Fig. 3 The promotion of calcium phytate on phytase activities

2.4 植酸酶的部分分离纯化

用青霉发酵的酶液, 过滤后, 经硫酸铵分级分离, 在 30% 和 70% 饱和度各有 1 个酶活力组分 (图 4), 取 70% 饱和度的酶液, 上 Sephadex G-100 柱, 洗脱液呈现 2 个蛋白峰, 两峰均有植酸酶活力, 第二峰酶活力相对较低 (图 5)。植酸酶分离纯化结果如表 1。

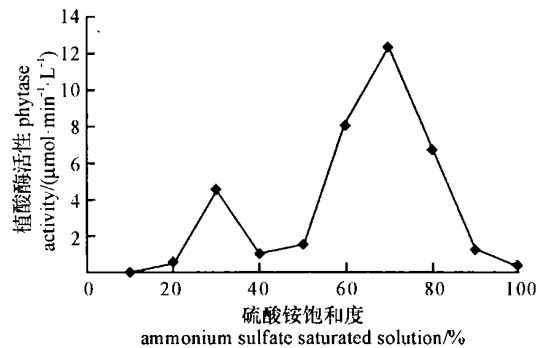


图 4 不同硫酸铵饱和度中青霉植酸酶的活力变化

Fig. 4 Changes of the phytase activity from penicillium in different ammonium sulfate saturated solution

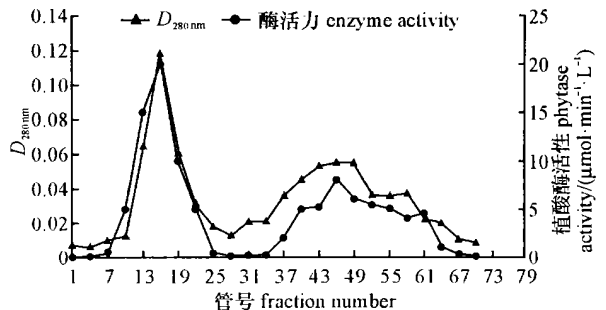


图 5 青霉植酸酶 Sephadex G-100 凝胶过滤结果

Fig. 5 Fraction of the phytase from penicillium by gel filtration on sephadex G-100

表1 菌株胞外植酸酶分离纯化结果

Tab. 1 Yields and specific activities during purification of extracellular phytase from penicillium

提纯步骤 purification stage	总体积 total volume/mL	总蛋白含量 total protein content/mg	总酶活力 total activity/U	比活力 specific activity/(U·mg ⁻¹)	纯化倍数 purification fold	回收率 recovery/%
培养物滤液 culture filtrate	200	350.8	7 472.0	21.3	1.0	100.0
硫酸铵盐析 ammonium sulfate precipitation	35	98.7	3 676.2	37.2	1.7	49.2
葡聚糖凝胶过滤 gel filtration on sephadex G-100	65	28.1	2 002.5	71.3	3.3	26.8

从表1可看出,粗酶液经硫酸铵分级分离、上Sephadex G-100柱后,比活力从21.3 U/mg提高到71.3 U/mg,纯化倍数为3.3,回收率为26.8%。

3 讨论

在酶的活力测定时,不能以双蒸水代替粗酶液作为空白对照,因为粗酶液中本身含有无机磷,这样测出的酶活性会较高,不真实;使粗酶液中的酶失活后作为空白对照,这样测出的酶活性才正常。

从结果还可以看出植酸酶活性的提高,会大量分解植酸钙,使培养液中的无机磷含量升高,而高含量的无机磷又对植酸酶有明显阻遏作用,这与黄遵锡等^[7]的报道一致,如想维持较高的酶活性,可适当滴加CaCl₂溶液,使过剩的磷生成磷酸钙沉淀下来,降低培养液中无机磷的含量,维持较高酶活性。

用双蒸水透析性之后,总酶活性下降很大,说明该酶对pH值敏感,在透析中不宜用双蒸水,应用缓冲液透析。

参考文献:

[1] 何平,傅雪琳,赵亚华,等.植酸酶生产菌的筛选及其

生长条件的研究[J].华南农业大学学报,2001,22(3):47-49.

[2] 褚西宁,裴武红,袁静明.青霉产植酸酶理化性质的初步研究[J].微生物学杂志,1996,16(1):5-8.

[3] 刘德忠.新型酶制剂—植酸酶的应用及开发[J].饲料工业,1998,19(3):19-20.

[4] 姚斌,范云六.植酸酶的分子生物学与基因工程[J].生物工程学报,2000,16(1):1-5.

[5] 陈强,董平祥.植酸酶对鸡、猪生产的作用[J].中国饲料,1996,18:16-18.

[6] 陆文清,刘伟,刘心海,等.固态发酵饲用酶制剂的研究与应用[J].饲料工业,2000,21(1):37-39.

[7] 黄遵锡,慕跃林,张克昌.植酸酶固体发酵条件的研究[J].菌物系统,2000,19(1):102-106.

[8] 武湖平.植酸酶在动物饲料磷营养中的作用[J].中国饲料,1996,10:25-26.

[9] 张龙翔,张庭芳,李令媛.生化实验方法与技术[M].北京:高等教育出版社,1987.164-221.

[10] BRADFORD M A. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J].Anal Biochem,1976,72:248-254.

Studies on the Condition of Phytase Produced by Penicillium and Its Purification

HE Ping¹, FU Xue-lin², ZHAN Fu-jian¹, ZHAO Ya-hua¹, GAO Xiang-yang¹, XU Shao-jie¹

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

2 College of Agriculture, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: When the original pH value of the penicillium's culture fluid was 5.5, the phytase was produced much. While the pH of culture fluid didn't decrease, the growth of penicillium could be inhibited. Calcium phytate could promote the penicillium to increase phytase activities. Two isoenzymes of phytase from penicillium were accepted by ammonium sulfate precipitation, sephadex G-100 gel filtration chromatography. The purification factors of phytase reached 3.3 folds with a specific activity of 71.3 U/mg.

Key words: penicillium; phytate; phytase