

产植酸酶菌株的筛选及其产酶条件研究*

杨燕凌¹ 方金铜¹ 黄添孙²

(1. 福建农林大学生命科学学院 福州 350002; 2. 武夷山市农业科学研究所 武夷山 354300)

摘要 本研究筛选出1株稳定的产植酸酶菌株,初步鉴定为黑曲霉,命名为 *Aspergillus niger* FZ41。探索了液体发酵产酶的最佳条件,获得其最适发酵培养基(w/w):可溶性淀粉4%, NH_4NO_3 0.08%,KCl 0.05%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.003%, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.003%,水1 L。培养基起始pH值6.0,种龄为36 h,接种量为5%,装液量为50/500 mL,在30℃、220 r·min⁻¹下培养84 h,酶活可达219 U·mL⁻¹。

关键词 植酸酶 菌株筛选 发酵条件

中图分类号:Q815 文献标识码:A 文章编号:1671-3990(2008)04-0944-04

Screening of phytase producing strain and optimization of fermentation conditions

YANG Yan-Ling¹, FANG Jin-Tong¹, HUANG Tian-Sun²

(1. College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;

2. Wuyishan Institute of Agricultural Sciences, Wuyishan 354300, China)

Abstract A phytase-producing strain was isolated and identified as *Aspergillus niger* FZ41. Liquid fermentation was investigated and the optimal fermentation medium obtained. A 500 mL flask filled with 50 mL inoculums with an initial pH of 6.0 was used in the inoculation. The relative percents of ingredients of fermentation medium were: starch 4%, NH_4NO_3 0.08%, KCl 0.05%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.003%, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.003%. The age of the inoculums was 36 h, with initial medium pH 6.0 and an inoculation dose of 5%. Extra-cellular phytase production was 219 U·mL⁻¹ under fermentation conditions of 30℃ at 220 r·min⁻¹ for 84 h.

Key words Phytase, Strain screening, Fermentation conditions

(Received Sept. 15, 2007; accepted Dec. 28, 2007)

植酸即肌醇六磷酸,化学名称为环己六醇-1,2,3,4,5,6-六磷酸二氢酯^[1],其6个磷酸基团具有强大的络合能力,多与2价的阳离子如钙、镁、锌等矿物质元素结合在一起,形成化学性质稳定的络合物^[2,3]。植酸及其盐类广泛存在于相应粮食产品与植物组织中,其中以谷粒及油料种子中含量最丰富,畜禽常规植物性饲料中约60%~80%的磷以植酸磷形式稳定存在,只有在植酸酶分解的作用下才能被有效分离出来,并被畜禽吸收利用,植酸的存在在很大程度上降低了磷的有效利用^[4-6]。

植酸酶是一类水解植酸及其盐为肌醇与磷酸(磷酸盐)的单酯水解酶的总称,通过催化水解反应将磷酸盐从植酸中释放出来,因而用其作为动物饲料添加剂既可提高磷的利用率,又可降低环境中的磷污染^[7-10]。将植酸酶添加到动物性饲料中释放

植酸中的磷分,可提高食物及饲料对磷的吸收利用率,降解植酸蛋白质络合物;减少植酸盐对微量元素的整合,增加饲料中钙、镁、锰、铜、锌、铁以及氮的生物利用率;促进动物对蛋白质、氨基酸及碳水化合物化合物的消化吸收;减少动物排泄物中有机磷的含量,减少对大自然的污染^[11-13]。

国内研究者先后选育出一些高产植酸酶的菌株^[14-17],并对该酶的酶学性质作了初步探讨。本研究筛选出1株产植酸酶的黑曲霉 *A. niger* FZ41,在最适条件下产酶可达219 U·mL⁻¹。

1 材料与方法

1.1 实验材料

供试土壤样品(大豆根部土壤)取自福州市周边地区。初筛培养基为葡萄糖30.0 g, NH_4NO_3 5.0 g,KCl 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

* 福建省科技计划重点项目(2007N0094)、福建省自然科学基金项目(2007J0243,X0750005)、福建省教育厅科技计划项目(JA07059)资助
杨燕凌(1974~),学士,实验师,主要从事农业微生物和生理方面的科研和教学。E-mail:yylwyh@sina.com

收稿日期:2007-09-15 接受日期:2007-12-28

0.05 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g, 琼脂 20.0 g, 植酸钙 1.0 g, 水 1 L, pH 5.5 ~ 6.5。液体产酶发酵培养基为葡萄糖 30.0 g, 蛋白胨 3.0 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0 g, KCl 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g, 水 1 000 mL, pH 5.4 ~ 5.6。复筛培养基同液体产酶发酵培养基。

1.2 实验方法

1.2.1 产植酸酶菌株的筛选 初筛: 稀释平板划线分离法分离, 称取土壤样品 10 g 于装有 90 mL 无菌水的 250 mL 三角瓶中, 振荡 20 min, 静置 20 ~ 30 s, 取上清液稀释成 $1 \times 10^{-2} \sim 1 \times 10^{-5} \text{ s} \cdot \text{mL}^{-1}$ 并涂布于筛选培养基上, 细菌 37 °C 培养, 真菌 28 °C 培养 3 ~ 4 d, 由于植酸钙在培养基底部形成白色混浊, 产植酸酶的菌株能够水解植酸钙, 在菌落的周围形成透明圈。复筛: 挑取产生透明圈较大的单菌落到筛选培养基中, 待其菌苔表面长满孢子 (培养 2 ~ 3 d), 接种 2 ~ 3 环孢子于装有 50 mL 培养基的 250 mL 三角瓶中, 置于 30 °C 和 220 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养 3 ~ 7 d, 每隔 24 h 测植酸酶活力。

1.2.2 植酸酶活力的测定 采用钒-钼酸铵法测定酶活: 在超净工作台内吸取 10 mL 发酵液, 10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上清液即得粗酶液。取粗酶液 1 mL 经适当稀释于试管中, 37 °C 水浴保温 5 min。再加入已于 37 °C 预热的 2 mL 0.007 6 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 植酸钠溶液, 将试管置于 37 °C 的恒温水浴中, 反应 30 min 后, 立即加入 2 mL 颜色/终点混合液, 4 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min。取上清液, 测酶活 $\text{OD}_{415 \text{ nm}}$ 值。与标准磷曲线比较计算出其酶活^[16,17]。酶活力单位(U)定义为在 37 °C、pH 5.5 条件下, 1 min 内从 0.005 1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的植酸钠溶液中释放出 1 nmol 无机磷所需的植酸酶量为 1 个酶活单位。

1.2.3 培养基条件对产酶的影响 先用不同的碳源、氮源、无机元素作单因子实验, 再以影响产酶的

3 个因子的 3 个水平, 采用 $L_9(3^3)$ 正交表进行分析。

1.2.4 培养条件对产酶的影响 分别测定发酵温度、培养时间、接种量、种子菌龄、接种量、三角瓶装液量对产酶的影响。

1.2.5 遗传稳定性实验 将筛选到的菌株进行连续 4 次传代试验, 30 °C 和 220 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养, 测定其发酵液酶活, 分析其遗传稳定性。

2 结果与分析

2.1 植酸酶产生菌的筛选

利用植酸酶能够水解植酸钙, 形成透明圈, 选择 1 株透明圈大, 且复筛产酶活力强的菌株进行分离培养, 接种于查氏培养基进行菌落形态观察 (图 1a)。培养初期, 菌落扁平, 并渐广铺, 菌落为白色, 未发现孢子; 培养后期 (培养 4 ~ 7 d), 菌落表面部分呈现绒毛状, 并逐渐扩延, 呈现蛛网状, 菌落底部和表面呈放射状皱纹, 中间部分突起, 形成孢子, 表面褐色, 粉末状。培养基较为干燥, 有霉味。图 1 (b) 是在显微镜下观察的结果, 该菌株的分生孢子梗顶端膨大成球形的顶囊, 顶囊表面有放射状小梗, 在小梗上形成分生的串生孢子, 为淡褐色。根据魏景超的《真菌鉴定手册》初步鉴定该菌株为曲霉属的黑曲霉, 命名为 *Aspergillus niger* FZ41。

2.2 培养基条件对产酶的影响

2.2.1 不同碳源对产酶的影响 以 4% 麦芽糖、蔗糖、甘露糖、可溶性淀粉分别代替液体产酶培养基中的碳源, 在 30 °C、220 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡发酵培养 84 h, 测定其发酵液酶活。实验结果表明可溶性淀粉作为碳源, 酶活最高。

2.2.2 不同氮源对产酶的影响 以酵母膏、牛肉膏、蛋白胨、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 NH_4NO_3 、 NaNO_3 分别代替液体产酶培养基中的氮源。有机氮源添加量为 2%, 无机氮源按氮元素含量相同来添加。结果

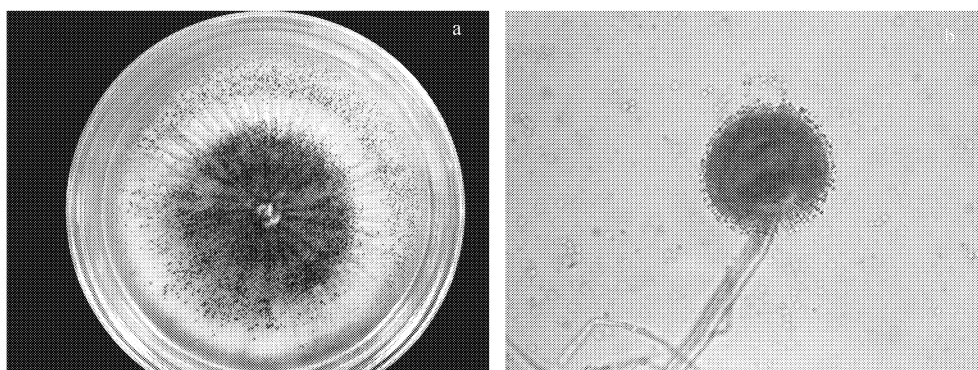


图 1 黑曲霉 FZ41 在查氏培养基上的特征 (a) 及其产孢结构 (400 ×) (b)

Fig. 1 Character of *A. niger* FZ41 in Czapek medium (a) and its conidiogenous structure (400 ×) (b)

表明用 NH_4NO_3 作为氮源,酶活最高。牛肉膏、酵母膏和蛋白胨作为有机氮源,效果均不佳。

2.2.3 无机元素对产酶的影响 分别添加不同浓度的 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 K^+ ,在同一条件下进行发酵培养,测定其发酵液酶活。结果表明 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 有激活作用,能使酶的活性分别提高 29%、19% 和 12.5%, Cu^{2+} 对酶活性具有抑制作用, K^+ 对酶活影响不大。所以可在溶液中添加 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, KCl 0.05%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.003%, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.003%。

表 1 正交试验结果

Tab.1 The result of orthogonal experiments

处理 Treatment	可溶性淀粉 A Starch (%)	NH_4NO_3 B (%)	Mg^{2+} C (%)	酶活 Activity ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)
1	2(1)	0.08(1)	0.03(1)	182
2	2	0.14(2)	0.03	180
3	2	0.20(3)	0.03	175
4	4(2)	0.08	0.05(2)	215
5	4	0.14	0.05	207
6	4	0.20	0.05	210
7	6(3)	0.08	0.07(3)	198
8	6	0.14	0.07	194
9	6	0.20	0.07	192
K_1	537.0	595.0	586.0	
K_2	632.0	581.0	587.0	
K_3	584.0	579.0	580.0	
k_1	179.0	198.3	195.3	
k_2	210.7	193.7	195.7	
k_3	194.7	193.0	193.7	
R	31.7	5.3	2.0	

K_1, K_2 和 K_3 分别为各因素水平 1、2 和 3 的产量总和; k_1, k_2 和 k_3 分别为 K_1, K_2 和 K_3 的平均数; R 为极差 ($k_{\max} - k_{\min}$)。 K_1, K_2 and K_3 is the production summation of the factor 1, 2 and 3, respectively. k_1, k_2 and k_3 is the average of K_1, K_2 and K_3 , respectively. R is range, namely, $k_{\max} - k_{\min}$.

2.2.4 正交试验 以影响产酶的 3 个主要因子,3 个水平,采用 $L_9(3^3)$ 正交表进行分析。由表 1 可知影响产酶的因素依次为淀粉(A) > NH_4NO_3 (B) > Mg^{2+} (C),其最佳组合方案为 $A_2B_1C_2$,即淀粉为 4%, NH_4NO_3 为 0.08%, Mg^{2+} 为 0.05%。

2.2.5 培养基起始 pH 对产酶的影响 配制不同起始 pH 值(2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、8.0、9.0)的液体发酵培养基,30℃、220 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养 84 h,每隔 12 h 测定其发酵液酶活,确定其最佳培养基起始 pH。实验结果表明,pH 为 6.0 时产酶量最多,pH 为 4.0~4.5 时产酶增长最快,pH 为 7.0~8.0 时产酶量迅速下降。因此确定最佳培养基起始 pH 为 6.0。

2.3 培养条件对产酶的影响

2.3.1 发酵温度对产酶的影响 在 20℃、25℃、30℃、35℃、40℃ 发酵温度下,220 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养 84 h,测定其发酵液酶活,实验结果见图 2。发酵温度为 30℃ 时产酶量最高,发酵温度为 25℃ 和 35℃ 时酶活都有所下降,发酵温度为 20℃ 时产酶量最低。因此最佳发酵温度为 30℃。

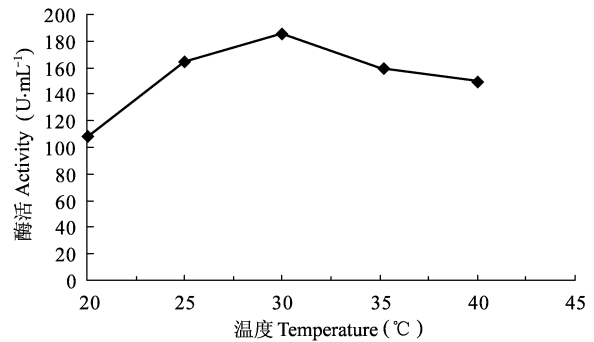


图 2 发酵温度对产酶的影响

Fig.2 Effects of temperature on production of phytase

2.3.2 培养时间对产酶的影响 培养基接种后于 30℃、220 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养 3~7 d,每隔 12 h 测定其酶活,绘制其产酶曲线,实验结果见图 3。接种 84 h 时产酶量最多;接种 84 h 后随时间推移,产酶量下降;接种 24~36 h 间的产酶量增长最快,之后增长较为平缓;接种 96~144 h 间的产酶量趋于平稳。因此,最佳发酵时间为 84 h。

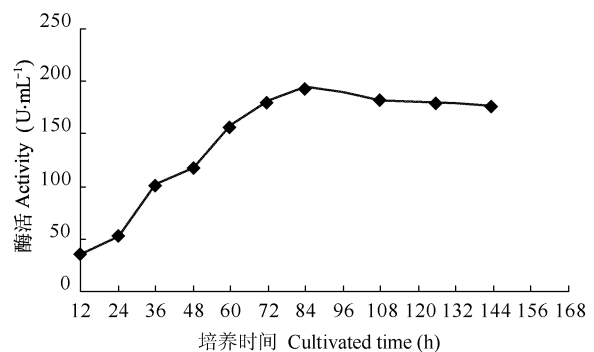


图 3 培养时间对产酶的影响

Fig.3 Effects of cultivation time on phytase production

2.3.3 接种量对产酶的影响 将种子液按 1%、3%、5%、7%、9%、11% 的比例接入装有 50 mL 培养基的 250 mL 三角瓶后,30℃ 和 220 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养 3~8 d,测定其发酵液酶活,确定其最佳接种量,实验结果见图 4。按 5% 的接种量产酶量最大;接种量 1% 左右时,菌体生长缓慢,产酶量低;随着接种量的增加,产酶量相应增加,到接种量 5% 后,随着接种量不断增大,产酶量并未增加,甚至有所下降。因此接种量为 5% 比较适宜。

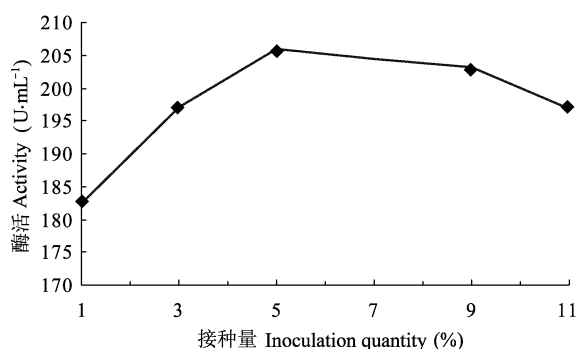


图4 培养基接种量对产酶的影响

Fig. 4 Effects of inoculation quantity on production of phytase

2.3.4 种子菌龄对产酶的影响 500 mL三角瓶中装100 mL发酵培养基,分别接入等量体积生长时间为12 h、24 h、36 h、48 h、60 h、72 h的液体种子,30 ℃和220 r·min⁻¹振荡培养,测定其发酵液酶活。实验结果表明,接种种子菌龄为36 h时产酶量最高;而后随种龄的不断增长,产酶量增加不大。接种种子菌龄为60 h和72 h时,酶活都有一定程度下降。因此,选择接种种龄为36 h最为适宜。

2.3.5 三角瓶装液量对产酶的影响 在500 mL的三角瓶中按25 mL、50 mL、75 mL、100 mL、125 mL的装液量接入液体种子,30 ℃和220 r·min⁻¹振荡培养84 h,测定其上清液酶活。结果表明,装液量在50 mL时发酵液中的酶活最高;随装液量增加,酶活有所下降。因此,选择50 mL的装液量为宜。

2.4 遗传稳定性试验

将筛选到的菌株FZ41进行连续4次传代试验,30 ℃和220 r·min⁻¹振荡培养,测定其发酵液酶活,结果表明,菌株FZ41经4次传代,酶活能稳定在203~219 U·mL⁻¹,说明菌株FZ41具有较好的遗传稳定性。

3 讨论

在筛选培养基中加入植酸钙进行植酸酶产生菌的筛选,植酸钙本身不溶于水,在培养基底部呈现乳白色的沉淀,培养基变得不透明,若培养基上的微生物能够水解植酸钙产生透明圈,就可初步推断为植酸酶产生菌。本研究利用该方法筛选出1株稳定的产植酸酶的黑曲霉,命名为*A. niger* FZ41。

利用液体培养基发酵获得*A. niger* FZ41的最适发酵培养基(w/w):可溶性淀粉4%,NH₄NO₃ 0.08%,

KCl 0.05%,MgSO₄·7H₂O 0.05%,FeSO₄·7H₂O 0.003%,MnSO₄·7H₂O 0.003%,培养基起始pH值6.0,种龄为36 h,接种量为5%,装液量为50/500 mL,在30 ℃、220 r·min⁻¹下培养84 h,酶活可达219 U·mL⁻¹。今后可通过基因工程或诱变育种手段提高菌种的产酶活力。

参考文献

- [1] 施安辉,王光玉,李桂杰,等.目前国内外植酸酶研究进展[J].中国酿造,2005,6(5):5-10
- [2] 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
- [3] 张丽萍,程辉彩,田连生,等.植酸酶高产菌株的紫外线-空气等离子体复合诱变选育[J].中国饲料,2006,13(3):13-15
- [4] 于旭华,冯定远.植酸的抗营养特性和植酸酶的应用[J].中国饲料,2003,8(9):16-18
- [5] 郭松林.植酸酶营养学研究近况[J].上海饲料,2000,1(5):24-27
- [6] 汪世华,吕茂洲,孙长春,等.植酸酶的现状及其研究进展[J].广州食品工业科技,2002,18(1):54-57
- [7] 张勇.植酸酶的研究及应用[J].河南畜牧兽医,2002,2(23):14-15
- [8] 邹立扣,王红宁.植酸酶及其植物基因工程[J].微生物学通报,2005,32(6):128-132
- [9] 黄慧,宋代军.植酸酶的研究进展及应用[J].添加剂与预混料,2006,27(3):27-29
- [10] 苏东海,孙君社,刘萍,等.黑曲霉植酸酶的纯化及性质研究[J].郑州工程学院学报,2003,24(2):63-66
- [11] 罗会颖,石鹏君,李江,等.弗氏柠檬酸杆菌植酸酶的分离纯化及其酶学性质研究[J].微生物学报,2006,46(1):139-142
- [12] Kerovuo J., Lauraeus M., Nurminen P., et al. Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*[J]. Appl. Environ. Microbiol., 1998, 64: 2079-2085
- [13] 褚西宁,王朝健,袁静明.变灰青霉固态发酵降解植酸酶的初步研究[J].微生物学通报,1996,4(6):5-8
- [14] 胡勇,全学军,谭怀琴,等.植酸酶产生菌的选育及产酶条件研究[J].安徽农业科学,2005,33(11):2093-2094
- [15] 汪世华,胡开辉,林文雄,等.植酸酶产生菌的选育及固态产酶条件研究[J].应用生态学报,2005,16(11):2154-2157
- [16] 黄遵锡,章克昌,徐柔,等.植酸酶产生菌的筛选与选育[J].西南农学报,1998,11(4):18-21
- [17] 刘德忠.植酸酶产生菌的选育研究[J].饲料工业,1999,20(1):40-42