

植酸酶的纯化及其酶学性质初步研究*

杨燕凌 汪世华** 胡开辉

(福建农林大学生命科学学院 福州 350002)

摘要 从绿色木霉 LH374 固态发酵产物中提取植酸酶。粗酶液经硫酸铵沉淀、凝胶过滤、离子交换层析纯化后,提纯倍数可达 13.3,回收率为 27.1%。酶学性质研究表明,植酸酶最作用温度为 55℃、最作用 pH 为 6.0,米氏常数 K_m 为 0.15mmol/L。

关键词 植酸酶 纯化 酶学

中图分类号: 文献标识码:A 文章编号: 0253-2654(2007)06-1142-04

Studies on Purification and Properties of Phytase from *Trichoderma viride**

YANG Yan-Ling WANG Shi-Hua** HU Kai-Hui

(College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002)

Abstract The phytase was extracted from solid state leavening of *Trichoderma Viride* LH374. The crude product was purified by $(NH_4)_2SO_4$ precipitation, gel filtration and ion exchange chromatography. The purified phytase was 13.3 times of the raw products, and the extraction ration was 27.1%. The study on the enzymology of phytase showed that the optimal temperature and pH were 55℃ and 6.0, respectively. The K_m value of the phytase was 0.15mmol/L.

Key words Phytase, Purification, Enzymology

植酸酶(Phytase, EC3.1.3.8)是催化植酸及其盐类水解成肌醇和磷酸的一类酶的总称。植酸酶添加到饲料中,不但可以提高粮食和饲料中磷的吸收利用率,还可减少植酸对微量元素的螯合,提高动物对植物蛋白的利用率及植物饲料的营养价值。植酸酶的应用还可减少畜禽粪便中磷的排泄量,缓解磷对环境特别是对水体的污染,对我国农业的可持续发展和生态环境的保护具有重大意义^[1-3]。

国内外已先后选育出一批植酸酶生产菌株,但普遍产酶量不高^[4-11]。本课题组自承担植酸酶高产菌株选育研究项目以来,经多年研究,分离纯化出 1 株酶活高的产植酸酶的菌株,在实验室研究其发酵条件的基础上进行了中试研究,结果发现该菌株产酶量高且性能稳定^[12,13]。

本课题组在高产植酸酶菌株的基础上,进行了植酸酶的纯化和酶学性质初步研究。粗酶液经硫酸

铵沉淀、凝胶过滤、离子交换层析纯化后获得了高纯度的植酸酶。本文报道此酶的纯化过程及酶学性质的初步研究。

1 试验材料与方法

1.1 菌种

绿色木霉 LH374 为本课题组诱变后的高产株。

1.2 试剂

植酸钙、植酸钠购于 Sigma 公司;颜色/终点混合液:250mL 钼酸铵(100g/L) + 250mL 钒酸铵(2.35g/L) + 165mL 65%硝酸 + 335mL 水。

1.3 仪器

722 型分光光度计测定分光光度值。

1.4 培养基及培养条件

固体发酵培养基 麸皮 80%,米糠 20%,按质量比 1:1.4 的比例加入营养液。在 250mL 三角瓶中装

* 国家自然科学基金项目(No. 30500325),福建省青年科技人才创新项目(No. 2005J017),福建省自然科学基金项目(No. B0610008, X0750005),福建省教育厅科技计划项目(No. JA05240, JB06115, JA07059)

** 通讯作者 Tel: 0591-83789492, E-mail: wshyyl@sina.com

收稿日期: 2007-04-03, 修回日期: 2007-06-02

入产酶培养基约 15g, 于 1×10^5 Pa 灭菌 30min, 按 5% 的量接入液体菌种, 于 30℃ 培养 96h。

1.5 酶的分离纯化

参照文献^[7,14]进行纯化, 将抽提制备的粗酶液经过硫酸铵沉淀、Sephadex G-100 凝胶过滤和 DEAE52-cellulose 离子交换层析后, 得到纯化的植酸酶。在纯化的每一步每 5min 收集一管, 分别测定各管的植酸酶酶活。

1.6 植酸酶酶活的测定方法

酶活的测定方法参照文献^[7,15]进行, 粗酶液适当稀释后, 取 0.2mL 加入 0.6mL 0.25 mol/L 乙酸缓冲液 (pH5.5), 37℃ 保温 5min 后加入 8.4g/L 植酸钠 1.6mL, 继续保温 30min, 加入颜色/终点混合液 1.6mL, 415nm 测定无机磷含量。酶活力单位定义为: 在 37℃、pH5.5 的条件下, 每分钟从底物释放 1mmol 无机磷所需要的植酸酶量, 用 U 表示。比活力定义为: 每毫克酶蛋白所具有的酶活力单位。

1.7 蛋白质含量测定

采用 Folin-酚法测定蛋白质含量, 以牛血清白蛋白 (BSA) 做标准曲线。

1.8 植酸酶米氏常数 K_m 的测定

用双倒数法求得米氏常数^[8,16]。

2 结果与分析

2.1 植酸酶的分离纯化

2.1.1 不同浓度 $CaCl_2$ 对酶提取的影响: $CaCl_2$ 对植酸酶有稳定作用, 分别用 0%、1%、2%、3%、4%、5% 的 $CaCl_2$ 对发酵物进行提取。结果 (图 1) 表明 2% $CaCl_2$ 为植酸酶提取时的最适浓度。

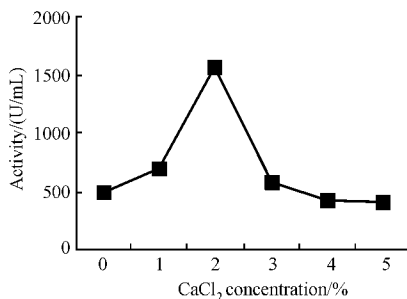


图 1 不同浓度 $CaCl_2$ 提取对酶活的影响

2.1.2 提取次数与酶的得率的关系: 用浓度为 2% 的 $CaCl_2$ 抽提植酸酶多次, 计算抽提次数与得率之间的关系, 其结果如表 1, 表明 3 次抽提可得到约 98% 以上的酶, 继续抽提则意义不大。因此本研究

采用 3 次抽提得到的酶液作为试验结果。

表 1 提取次数与酶得率的关系

处理次数	第一次	第二次	第三次	第四次	第五次
得到总酶活 (U)	3558.9	821.3	254.9	51.9	33.0
每次得率 (%)	75.4	17.4	5.4	1.1	0.7
总得率 (%)	75.4	92.8	98.2	99.3	100

2.1.3 植酸酶纯化结果: 将抽提的粗酶液经过硫酸铵沉淀、Sephadex G-100 凝胶过滤和 DEAE52-cellulose 离子交换层析后, 得到仅有一个活力峰的纯化结果, SDS-PAGE 结果表明酶的纯度很高。表 2 说明了各步纯化结果, 经过纯化后, 酶的比活力为 113.5U/mg, 提纯倍数为 13.3, 回收率为 27.1%。

表 2 植酸酶的纯化结果

处理	总蛋白 (mg)	总活力 (U)	比活 (U/mg)	回收率 (%)	纯化倍数
粗酶液	15.210	130	8.55	100	1.0
硫酸铵沉淀	4.231	110	26.0	84.6	3.0
凝胶过滤	0.427	44.3	103.6	34.1	12.1
离子交换层析	0.310	35.2	113.5	27.1	13.3

2.2 植酸酶的性质

2.2.1 植酸酶的最适反应温度: 在不同温度下测定酶活力, 其结果见图 2。结果表明植酸酶最适反应温度为 55℃, 65℃ 以后随温度升高, 酶迅速失活。

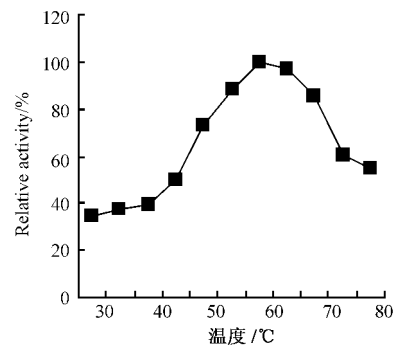


图 2 温度对酶活的影响

2.2.2 植酸酶的热稳定性: 酶的热稳定性实验表明 (图 3), 在 60℃ 下保温 30min, 酶活损失不大, 90min 剩余酶活为 68%, 70℃ 下保温 30min, 剩余酶活为 29%, 保温 90min, 酶活性基本上完全丧失。

2.2.3 植酸酶的最适反应 pH: 在 55℃、不同 pH 值下处理 10min 后测定酶活。结果 (图 4) 表明最适 pH 为 6.0。

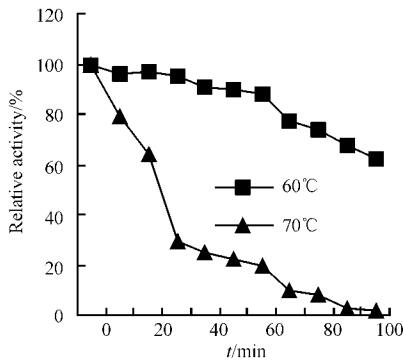


图3 植酸酶的热稳定性

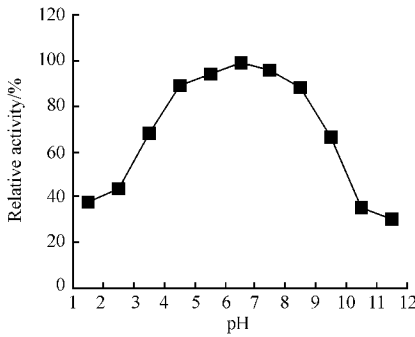


图4 pH对酶活的影响

2.2.4 植酸酶的 pH 稳定性: 纯化的植酸酶于 55℃ 在一系列不同 pH 值的缓冲液中处理 60min 后测定酶活性, 结果表明(图 5), 在 pH 3.0~8.0 较稳定, 剩余酶活性保持在 70% 以上, 说明此酶具有较好的 pH 稳定性。但当 pH 高于 8.0 或低于 3.0, 酶活下

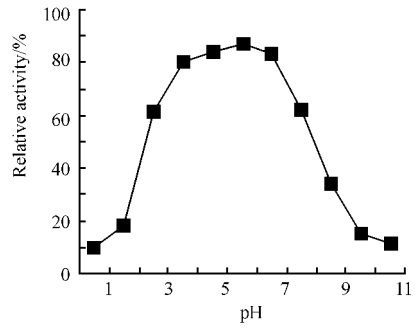


图5 植酸酶的 pH 稳定性

降较快。

2.2.5 干燥酶耐高温实验: 将纯化的酶冷冻干燥, 将干燥的酶在 90℃ 处理不同时间。从试验结果看(表 3) 酶在干燥的情况下短时间(10min 内) 高温处理后, 酶活损失不大, 均在 14% 以下。

表3 植酸酶耐高温实验

时间 (min)	1	3	5	7	10	15	20	30
剩余酶活 (%)	97	93	89	88	86	65	41	38

2.2.6 金属离子对酶活的影响: 在酶促反应体系中加入 2mmol/L 不同的金属离子, 分别测定酶活性, 以对照(未加任何金属离子)的酶活性为 100%。结果表明(表 4), 大部分金属离子对酶活影响不大。只有 Ca²⁺ 及 Mg²⁺ 对植酸酶有激活作用, Zn²⁺ 和 Hg²⁺ 对酶有较强的抑制作用。

表4 不同金属离子对酶活的影响

加入试剂	对照	CuSO ₄	ZnCl ₂	MgSO ₄	CaCl ₂	NaNO ₃	FeSO ₄	AgNO ₃	CaCl ₂	MnSO ₄	HgCl ₂
相对酶活 (%)	100	77.4	33.6	116.2	86.9	107.8	102.5	96.3	129.6	78.4	42.3

2.2.7 植酸酶米氏常数(K_m)的测定: 用 pH6.0 的柠檬酸缓冲液配制不同浓度的植酸钠反应液, 用双倒数作图法作图, 测定酶的米氏常数和最大反应速度。结果测得, 以植酸钠为底物, 提纯后植酸酶的 K_m 为 0.15mmol/L。

2.2.8 底物专一性试验: 分别以淀粉、纤维素、羧甲基纤维素、植酸钠、蔗糖为底物进行反应, 结果表明该酶仅对植酸钠有降解作用。

3 讨论

许多科研工作者对植酸酶的分离纯化做了大量研究。程海娜^[17]等得到一株产植酸酶较高的黑曲霉 AN00101 菌株, 对酶的提取条件进行了摸索, 发

现 3% CaCl₂ 提取效果较好。罗会颖等^[18]从弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*) 中分离纯化了一种植酸酶, 其反应最适 pH 为 4.0~4.5, 最适温度为 40℃。苏东海等^[19]分离纯化到的黑曲霉植酸酶, 其相对分子质量为 63kD, 在 37℃ 以植酸钠为底物的 K_m 为 0.31mmol/L, 该酶最适 pH 为 5.5, 最适作用温度为 55℃。李春明等^[20]分离纯化到的黑曲霉植酸酶在 37℃ 对植酸钠的 K_m 为 0.4mmol/L。

本课题组经多年研究, 筛选出 1 株高产植酸酶的菌株且性能稳定^[12, 13], 并对其提取分离作了大量的工作。本研究通过硫酸铵沉淀、凝胶过滤和离子交换层析后, 得到仅有一个活力峰的纯化结果, 最适反应温度为 55℃, 在 50℃~65℃ 均保持较高的酶活。

同时酶在干燥的情况下短时间(10min内)高温处理(90℃)后,酶活损失不大,显示了该酶良好的热稳定性。该酶的最适pH值为6.0,在pH3.0~8.0较稳定,剩余酶活性保持在70%以上,说明此酶具有较好pH稳定性。显示了该酶良好的应用前景。

大部分金属离子对酶活影响不大,只有Ca²⁺及Mg²⁺对植酸酶有激活作用,因此为了最大限度地利用该酶,可以在使用过程中加入微量的Ca²⁺和Mg²⁺,或者与含Ca²⁺和Mg²⁺的物质一起使用,提高酶的活性。由于Zn²⁺和Hg²⁺对酶有一定的抑制作用,所以在使用时尽量减少与含有Zn²⁺和Hg²⁺的物质接触或同时使用。

参考文献

[1] Cowieson A J, Acamovic T, Bedford MR. *Br Poult Sci*, 2004, **45**(Suppl 1): S5~6.

[2] Dvorakova J. *Folia Microbiol*, 1997, **42**(4): 349~352.

[3] 李书生, 张丽萍, 程辉彩, 等. *饲料研究*, 2003, **8**: 31~33.

[4] Leenhardt F, Levrat-Verny M A, Chanliaud E, *et al.* *J Agr Food Chem*, 2005, **53**(1): 98~102.

[5] Nampoothiri K M, Tomes G J, Roopesh K, *et al.* *Appl Biochem Biotech*, 2004, **118**: 205~214.

[6] 刘红蕾, 吴远征, 李强, 等. *生物技术*, 2003, **13**(1): 10~11.

[7] 杨平平, 王燕, 史宝军, 等. *无锡轻工大学学报*, 2003, **22**(5): 34~37.

[8] Xiong A S, Yao Q H, Peng R H, *et al.* *J Biochem Mol Biol*, 2004, **37**(3): 282~291.

[9] Zinin N V, Serkina A V, Gelfand M S, *et al.* *FEMS Microbiol Lett*, 2004, **236**(2): 283~290.

[10] 李桂兰, 祝建洪, 孙建, 等. *农业生物技术学报*, 2003, **11**(5): 520~524.

[11] 张桂敏, 张晚鸣, 何国帮, 等. *华中农业大学学报*, 2003, **22**(6): 529~532.

[12] 汪世华, 胡开辉, 林文雄. *应用生态学报*, 2005, **16**(11): 2154~2157.

[13] 汪世华, 杨燕凌, 胡开辉. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2006, **35**(1): 82~86.

[14] Juanpere J, Perez-Vendrell A M, Angulo E, *et al.* *Poult Sci*, 2005, **84**(4): 571~580.

[15] Yuong O K, Hyung K K. *Enzyme Microb Tech*, 1998, **22**(3): 2~6.

[16] Ullah A H J. *Prep Biochem*, 1998, **18**: 443~458.

[17] 程海娜, 莫湘涛, 陈宇, 等. *生命科学研究*, 2002, **6**(4): 343~346.

[18] 罗会颖, 石鹏君, 李江, 等. *微生物学报*, 2006, **46**(1): 139~142.

[19] 苏东海, 孙君社, 刘萍, 等. *郑州工程学院学报*, 2003, **24**(2): 63~66.

[20] 李春明, 彭远义, 等. *西南农业大学学报*, 2006, **30**(4): 643~647.