

采用 D-饱和试验设计确定产植酸酶菌株 代谢的营养条件

张 娜^{1,2} 郭庆启³ 赵新淮^{1*}

(1. 东北农业大学食品学院 哈尔滨 150030)

(2. 哈尔滨商业大学食品工程学院 哈尔滨 150076)

(3. 东北林业大学林学院 哈尔滨 150040)

摘要: 本研究对黑龙江海伦市种植大豆作物的黑色土壤中筛选得到的产植酸酶菌株(穗霉属 26-13-4)的最佳营养条件进行优化。针对发酵培养基中的碳源、氮源、麸皮的添加量进行 D-饱和最优化设计,拟合三者之间的方程,并确定最优化添加量。

关键词: 产植酸酶菌株, D-饱和最优化设计, 植酸酶, 液体培养

The Research About Nutritional Condition of Phytase-producing Strain by D-saturation Optimization Design

ZHANG Na^{1,2} GUO Qing-Qi³ ZHAO Xin-Huai^{1*}

(1. Institute of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030)

(2. College of Food Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076)

(3. College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040)

Abstract: This research is to optimise the best nutrition condition of the phytase-producing strain (*Spicaria Harting* 26-13-4) which is from the black soil growing soy bean in Hailun City, Heilongjiang Province. The D-saturation and optimization design are carried out on the added amount of carbon, nitrogen and bran on the ferment substrate. The equation is made according to the three material then the best added amount can be confirmed.

Keywords: Phytase-producing strain, D-saturation optimization design, Phytase, Liquid-culture

国外对植酸酶的应用研究始于环保考虑。将植酸酶添加到动物饲料中,从而对动物饲料中其它未分解的植酸(盐)进行有效分解,所产生的磷及时被动物利用,一方面有利于动物对营养物质的吸收,促进动物的健康生长,另一方面更能够降低牲畜粪便中磷的排泄量。由于畜牧业发达的地区磷污染问

题十分严重,未分解的植酸(盐)造成磷污染的事实早已被证实。加强农田管理的呼声也日益高涨,并且过去一向不受重视的粪便处理法也开始立法管理。欧洲和亚洲的部分地区已经针对牲畜养殖场所等一系列问题制定了严格的条例,以此作为限制污染的手段。营养学家考虑,改变营养方案以降低牲畜

粪便中氮和磷的排泄量是保护环境的有效解决办法。

事实上,植酸酶的最大受益者是生活在地球上的人及子孙后代。在赖以生存的环境中,植酸酶轻而易举地消除了一个污染源,比目前使用的后期治理的方法更为经济有效。建议中国放弃养殖业,用进口畜产品换取生存环境是不现实和不负责的,只有治理和保护才能持续发展。可以预期,植酸酶将以显著的经济效益和社会效益对整个行业的可持续发展产生巨大的影响和促进,社会各方面都因植酸酶获得更高的回报^[1]。

有研究称,在植酸含量较高的作物(大豆)所生活的土壤中植酸酶的含量相对较高,因此,本课题选择从黑龙江海伦市的大豆高产区进行土壤采集,分离并且选育出 26-13-4(产酶活力达 0.151 FTU/mL),对该菌株进行初步鉴定后发现,该菌株属于穗霉属(未曾有过该菌属产植酸酶的相关报道)。为了深入

研究该菌株代谢特性,对培养基组分中不同浓度的碳源、氮源、促产物生成因子做单因素试验及 D-饱和和试验,通过对数据进行回归模拟得出预测值与各因子之间的函数,从而计算出最佳的营养成分的组合。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株来源:实验室选育出的 26-13-4 号产植酸酶菌株(关于该菌株的筛选、诱变工作,另有文章报道)^[2,3]。

1.1.2 培养基的组成:初始培养基参考 Seong Jun Yoon 等采用的培养基组成^[4]。斜面培养基的组成 5° Bé 的麦芽汁琼脂培养基。

1.2 方 法

1.2.1 单因素试验:对碳、氮源种类,添加量,代谢促进因子的种类和添加量分别进行单因素试验。

表 1 单因素试验设计表
Table 1 Single factor trial

项目 Item	水平 Level				
碳源种类 Carbon sources	葡萄糖	蔗糖	乳糖	半乳糖	可溶性淀粉
碳源添加量(g/L) Carbohydrate concentration	30	40	50	60	70
氮源种类 Nitrogen sources	硫酸铵	硝酸钠	蛋白胨	硝酸铵	
氮源添加量(g/L) Nitrogen concentration	5	10	15	20	
促代谢因子及其添加量 Promoting factors on phytase production	麸皮(%) Bran	0.1	0.3	0.5	0.7
	磷酸二氢钾(g/L) KH ₂ PO ₄	0.002	0.008	0.02	
	植酸(mL/L) Phytic acid	2	4		
	植酸钙(g/L) Pytic acid-calcium	0.002	0.006	0.02	

1.2.2 D-饱和试验:将单因素试验后得到的结果利用 D-饱和和分析软件进行优化设计,采用优化后的方案按照 1.2.3 方法进行发酵试验,一段时间后进行植酸酶活力测定,通过软件分析,得到碳源添加量、氮源添加量、促代谢因子添加量三者之间关系的方程式,拟合得到优化后的营养成分添加量。

1.2.3 培养方法:称取 0.25 g 麸皮于 300 mL 三角瓶中,加入 50 mL 复筛培养基,灭菌后冷却至室温,将分离纯化后保存的菌种接入复筛培养基中,每瓶接 1~2 环,29 ± 1 °C, 150 r/min 培养,摇瓶培养 72 h 后,以 4000 r/min 的速度将发酵液离心 10 min,上清液为粗酶液,测定粗酶液中植酸酶的活力^[5]。

1.2.4 植酸酶活力测定方法:测定植酸酶作用植酸释放出的无机磷的量,从而计算出植酸酶的活力^[6]。

1.2.5 植酸酶酶活力单位定义为:在 37 °C, pH 5.5 条件下,每分钟释放 1 μmol 无机磷所需要的植酸酶的量定义为一个酶活力单位,简称为 1 FTU (Fy-tase Unit)^[7]。

1.2.6 生物量的测定:细胞干重法。

1.2.7 pH 值的测定:采用 PHS-3C 型精密 pH 计进行 pH 值的测定^[8]。

2 结果和讨论

2.1 发酵培养基的碳源

(1) 碳源种类的确定。以可溶性淀粉为唯一碳源,发酵后的酶活和生物量都低于含其它碳源的培养基(见图 1);以蔗糖和半乳糖为碳源,发酵后产生的生物量虽很高,但是产酶活力却不高,尤其是半

乳糖产生的植酸酶的活力远远小于以葡萄糖为碳源的发酵培养基的产酶活力;以乳糖为碳源的发酵培养基中的生物量,基本和以葡萄糖为碳源的发酵培养基中产生的生物量相当,但是产生的酶的活力略小于以葡萄糖为碳源时的产酶活力,综合考虑后,选择葡萄糖作为发酵培养基的碳源。

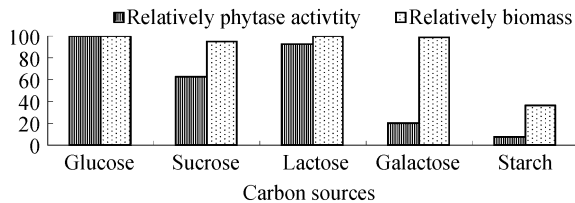


图 1 发酵培养基中添加不同碳源产生的生物量及酶活的数据结果

Fig. 1 Effects of different carbon sources on phytase production

(2) 碳源添加量的确定。随着碳源添加量的增加,酶的活力和生物量均呈上升趋势(如表 2 所示),当碳源添加量达到 40 g/L 时,酶活力和生物量达到最大值,当碳源添加量继续增加,酶活力开始下降,产生这种现象的原因可能是由于营养物浓度太高,微生物的生长异常迅速,自溶现象提前,自溶时消耗掉已经产生的植酸酶,导致植酸酶活力下降,不过生物量的下降趋势不明显,基本呈现稳定。根据测定结果,将碳源的添加量定为 40 g/L。

葡萄糖添加量(g/L) Glucose concentration(g/L)	相对酶活(%) Relatively phytase activity(%)	相对生物量(%) Relatively biomass(%)
30	96.21	89.71
40	100	100
50	95.45	95.10
60	84.85	93.14
70	83.33	93.14

2.2 发酵培养基的氮源

(1) 氮源种类的确定。从 4 种氮源产植酸酶活力及生成的生物量情况的分析可知(如图 2 所示),当以硝酸钠做氮源时,菌株产生的生物量最大,并且产生的植酸酶的活力也最大。采用硝酸钠或蛋白胨作发酵培养基的氮源,发酵后对生物量的影响不大,但是以蛋白胨做氮源产生的植酸酶的活力稍低

于以硝酸钠做氮源时产生的酶活力。当以硝酸铵做氮源时,单位体积菌体产生的酶活力很高。由于菌株 26-13-4 在产生植酸酶时受高浓度无机磷的反馈阻遏,因此在产植酸酶液体培养基中加入能被菌株迅速利用的碳、氮源,如葡萄糖和硝酸钠,能迅速促进菌丝生长,消耗掉培养基中的无机磷,解除无机磷的反馈抑制作用,从而大幅度提高植酸酶的产量。

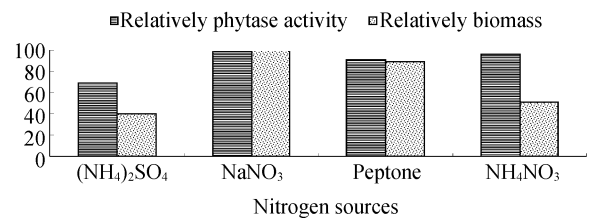


图 2 发酵培养基中添加不同氮源产生的生物量及酶活
Fig. 2 Effects of different nitrogen sources on phytase production

(2) 氮源添加量的确定。通过单因素试验发现当硝酸钠的添加量为 20 g/L 时生成的生物量最大(见表 3),此时植酸酶的活力也最高。考虑到有机氮与无机氮配合使用可能会对产酶更有利,所以选用硝酸钠与蛋白胨相配合,试验结果如表 4 所示。硝

氮源添加量(g/L) Nitrogen concentration(g/L)	相对酶活(%) Relatively phytase activity(%)	相对生物量(%) Relatively biomass(%)
5	81.62	56.79
10	82.16	85.02
15	90.27	96.29
20	100	100
25	75.68	80.25

氮源(W/W) Nitrogen	相对酶活(%) Relatively phytase activity(%)
S	100
S: P = 1:1	36.48
S: P = 1:2	41.76
S: P = 2:1	55.58
S: P = 3:1	113.63
S: P = 4:1	107.31

注: S:硝酸钠; P:蛋白胨
Note: S: NaNO₃; P: Peptone

酸钠与蛋白胨配合使用使产酶增加。当硝酸钠与蛋白胨添加量的比例为 3:1 时, 植酸酶的酶活比单一添加硝酸钠作氮源的发酵液中的酶活增加了 1.13 倍, 所以从生物量和产酶活力两方面考虑本实验选用硝酸铵和蛋白胨做氮源, 且硝酸钠与蛋白胨配合使用的比例为 3:1。

2.3 发酵培养基中的促进物质

适量的植酸、麸皮、磷酸二氢钾、植酸钙均可以促进植酸酶的产生(如表 5 所示)。

可能的促进物质 Simulation	添加量 Concentration	相对酶活(%) Relatively phytase activity(%)	相对生物量(%) Relatively biomass(%)
麸皮 Bran	0.1%	100	100
	0.3%	99.70	127.55
	0.5%	98.22	140.82
	0.7%	96.45	157.14
磷酸二氢钾 KH ₂ PO ₄	0.002 g/L	5.03	87.76
	0.008 g/L	53.30	90.82
	0.02 g/L	-	93.27
植酸(20%) Phytic acid	2 mL/L	84.57	25.52
	4 mL/L	89.33	25.65
植酸钙 Pytic acid-Calcium	0.002 g/L	99.14	59.78
	0.006 g/L	96.70	51.32
	0.02 g/L	95.50	44.17
不添加诱导物质 Blank	0	52	51.02

随着培养基中添加的麸皮的量的增多, 得到的植酸酶的酶活发生轻微减少, 不过生物量发生大幅度的增加。原因可能是由于麸皮中含有一定数量的氮源、碳源和少量的无机磷, 这些营养物质促进了菌株的生长, 麸皮添加量越大生物量越大, 但是添加大量的麸皮时, 菌株生长过于旺盛, 对数生长期短, 所以单位体积菌株产酶能力反而下降。当培养基中磷酸二氢钾的添加量高于 0.008 g/L 时, 对菌株产酶起明显的阻遏作用, 说明菌株产酶存在着明显的反馈阻遏现象, 可能是随着产酶的进行, 无机磷的生成量增加, 所以抑制了植酸酶的进一步生成。当无机磷的添加量为 0.02 g/L 时, 菌株产植酸酶的量几乎为零。培养基中加入植酸后, 生物量明显降低, 是不添加任何诱导物质时生物量的一半, 说明

添加植酸后可能抑制菌体的生长, 但是植酸对产酶还是有促进作用的, 这种促进作用不是十分明显, 随着植酸添加量的改变, 产酶活力提高不多。随着培养基中植酸钙的添加量的增加, 产生的植酸酶的活力稍有下降, 不过幅度不大。

研究结果不能说明磷酸二氢钾、植酸和植酸钙不适合作为产酶促进物质添加到培养基中, 少量的磷酸二氢钾、植酸和植酸钙的确起到了促进产酶的作用, 而且使单位菌体产酶量增加, 不过麸皮中不仅含有碳、氮源, 还含有少量的无机磷和植酸(盐), 价格低廉、操作上容易控制。如果在试验中添加麸皮作产酶促进物质, 麸皮的种类、产地、化学组成等是必须考虑的问题。

2.4 培养基营养组成的 D-饱和试验优化

三个因素分别为 X₁: 葡萄糖添加量, 20 g/L~60 g/L; X₂: 硝酸钠和蛋白胨添加总量, 10 g/L~30 g/L; X₃: 麸皮的添加量, 0.05%~0.25%。根据 D-饱和试验方案, 对产植酸酶菌株的进行摇床培养, 对发酵液进行植酸酶活力测定, 结果如表 6 所示。其中, X₁表示葡萄糖的量(g/L); X₂表示硝酸钠与蛋白胨添加的总量(g/L); X₃表示麸皮的量(%)。运行 D-饱和试验设计软件输入试验结果, 可得如下方程:

$$y = -0.744 + 0.006x_1 + 0.027x_2 + 0.7x_3 - 0.005x_2x_3 - 0.001x_2^2 - 0.198x_3^2$$

通过软件分析得到最优化设计值为: 当培养基中葡萄糖添加量为 42.1 g/L, 硝酸钠和蛋白胨的总量为 20.5 g/L, 麸皮的添加量为 0.152% 时, 发酵产生最大植酸酶活力, 且最大酶活力为 0.20 FTU/mL。单因素试验中已经确定硝酸钠和蛋白胨的添加比例为 3:1, 所以优化后的硝酸钠的最适添加量为 15.4 g/L, 蛋白胨的添加量为 5.13 g/L。

为了验证回归方程是否与实际情况相吻合, 对方程进行验证, 在优化后的适宜营养物质添加水平的附近取值进行验证试验。将验证试验测得的酶活, 与方程求得的预测值进行简单比较, 结果见表 7。通过对 |y-y₀| 的比较发现, 实际测得的植酸酶的活力和由方程预测得到的植酸酶的活力值之间的差别不大。通过 F 检验进一步对预测值与真实值之间的显著性进行检验, $F_{0.05(1, 7)} = 237 > F = 2.39$, 差异不显著, 即优化后所得回归方程的预测值与实际测定值相吻合。

表 6 D-饱和和试验结果
Table 6 D-saturation design of three factors

	X ₁	X ₂	X ₃	酶活(FTU/mL) Phytase activity(FTU/mL)
1	40	20	0.25	0.147
2	40	20	0.137	0.196
3	23	11.5	0.209	0.174
4	57	11.5	0.209	0.131
5	23	28.5	0.209	0.103
6	57	28.5	0.209	0.174
7	60	20	0.05	0.145
8	20	20	0.05	0.134
9	40	30	0.05	0.143
10	40	10	0.05	0.128

表 7 验证试验
Table 7 Test results to verify experiment

序号	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	实际酶活力(FTU/mL) Actual phytase activity(FTU/mL)	预测酶活力(FTU/mL) Forecast phytase activity(FTU/mL)	y-y'
1	42.1	15.4	5.13	1.52	0.22	0.20	0.002
2	40	15.8	5.25	1.7	0.050	0.061	0.011
3	38	11.3	3.75	1	0.112	0.091	0.021
4	41	14.3	4.75	1.5	0.120	0.116	0.004
5	41	16	4	1.6	0.096	0.095	0.001
6	43	14.3	4.75	1.55	0.108	0.128	0.020
7	42	13.5	4.5	1.6	0.150	0.139	0.011
8	45	11.25	3.75	1.5	0.182	0.198	0.016

注: X₁: 葡萄糖添加量(g/L); X₂: 硝酸钠添加量(g/L); X₃: 蛋白胨添加量(g/L); X₄: 麸皮添加量(%)

Note: X₁: The adding amount of Glucose(g/L); X₂: The adding amount of NaNO₃ (g/L); X₃: The adding amount of the Peptone (g/L); X₄: The adding amount of the bran(%)

3 结论

采用 D-饱和和优化设计对实验室分离出的产植酸酶菌株 26-13-4 的代谢营养条件进行优化, 确定培养基组成为葡萄糖 42.3 g/L; 硝酸钠 15.4 g/L; 蛋白胨 5.2 g/L; 麸皮的添加量为 0.152%; 硫酸镁 0.50 g/L; 硫酸锰 0.03 g/L; 硫酸亚铁 0.03 g/L; 氯化钾 0.50 g/L, 优化后产植酸酶活性达到 0.220 FTU/mL。

参 考 文 献

- [1] 程海娜. 产植酸酶菌株的筛选及产酶条件的研究. 生命科学研究, 2002, 6(4): 343-346.
- [2] 张 娜, 郭庆启, 赵新淮. 发酵液中植酸酶活力测定方法的改进. 食品工业科技, 2006, 27(12): 173-174.
- [3] 张 娜, 郭庆启, 赵新淮. 东北土壤中产植酸酶菌株的筛选及鉴定. 东北农业大学学报, 2008, 39(1): 112-116.
- [4] Seong JY, Yun JC, Hae KM, *et al.* Isolation and identification of phytase-producing bacterium, *Enterobacter* sp.4, and enzymatic properties of phytase enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*, 1996, 18(1): 449-453.
- [5] 王亚林, 严建芳. 黑曲霉植酸酶液体发酵工艺研究. 武汉科技学院学报, 2001, 14 (3): 31-34.
- [6] Grasshoff K, M Ehrhardt, K Kremling editors. Methods of sea water analysis(II). Weinheim: Verlag Chemie. 1983, pp.125-131.
- [7] 张若寒. 植酸酶含量测定的必要性与两步测定方法的评价. 饲料工业, 2001, 22(9): 1-5.
- [8] 许尧兴, 许少春, 钱玉英. CN-92 植酸酶产生菌的诱变选育及产酶条件的研究. 微生物学杂志, 2000, 6(20): 11-13.