

植酸酶产生菌株的液体深层发酵条件研究

张梅申¹, 沈爱光², 熊晓辉², 沈 昌²

(1 河北省农林科学院谷子研究所, 石家庄 050031; 2 南京农业大学食品科技学院, 南京 210095)

摘要: 以植酸钙作为唯一的磷源, 从无花果中分离到一株产植酸酶的菌株, 利用液体发酵对该菌株的发酵工艺进行研究, 获得最适发酵培养基即淀粉 8%, 葡萄糖 2%, NaNO_3 1.0%, KH_2PO_4 0.01%, KCl 0.05%, MgSO_4 0.05%, FeSO_4 0.01%, pH 值为 5.0, 采用 10% 的接种量, 10% 的装液量, 经 30℃, 150 r/min 摇瓶培养 8 d, 发酵液酶活达 870 87 pu/mL; 采用该酶处理豆粕粉 30℃ 下反应 90 min, 植酸(盐)降解率达 75%, 处理液中可溶性蛋白质含量由 0.167 mg/mL 增加到 12.1 mg/mL。

关键词: 植酸酶; 植酸钙培养基; 液体深层发酵

中图分类号: TQ920.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(1999)04-0068-05

植酸酶即肌醇六磷酸水解酶, 属催化肌醇六磷酸(植酸)脱掉磷酸基团反应的一类酶的总称。而植酸是广泛地存在于农作物及动物饲料中的一种抗营养因子, 由于植酸分子中有 6 个磷酸基团, 具有强大的络合能力, 所以植酸在自然界中几乎无游离态存在, 通常与钙、镁、锌和钾等矿物质络合^[1], 形成不溶性的盐类化合物, 所以植酸的存在降低了许多微量矿物质的营养有效性。植酸除了与矿物质络合作用外, 在低 pH 值时可与蛋白质分子上的碱性基团结合, 使蛋白质沉淀, 形成蛋白质-金属-植酸盐三种成分的络合物, 这种络合方式一方面降低了蛋白质的吸收利用, 另一方面使部分酶如淀粉酶^[2]活性受到抑制甚至失活, 并且部分金属离子作为酶的辅助因子当其有效浓度降低时, 不可避免地影响到酶活。因此随着植酸因其螯合作用而成为抗营养物质机理的证实, 植酸酶的研究意义就更为重大。本研究从发霉的无花果中分离的一产植酸酶菌株(*Aspergillus niger* sp.)用液体培养法对其发酵工艺进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 菌株从发霉的无花果(*Ficuum*)上得到。

1.1.2 培养基 斜面培养基 PDA^[3]: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 去离子水 1 L, pH 值自然, 121℃ 灭菌 30 min。

液体种子培养基: 淀粉 80 g, 葡萄糖 30 g, NaNO_3 8.6 g, 玉米浆 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, KCl 0.5 g, FeSO_4 0.1 g, KH_2PO_4 0.2 g, 去离子水 1 L, pH 值 5.0, 121℃ 灭菌 30 min。

基础发酵培养基: 淀粉 80 g, 葡萄糖 20 g, NaNO_3 10 g, KH_2PO_4 0.2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.5 g, KCl 0.5 g, FeSO₄ 0.1 g, 去离子水 1 L, pH 5.0, 121℃灭菌 30 min。

1.2 方法

1.2.1 菌株筛选 在植酸钙作为唯一磷源的选择性培养基上于 30℃培养 96 h, 挑选出产生透明圈较大的菌株, 对透明圈较大的菌株进行琼脂平板表面单(孢)胞菌落挑取^[4,5], 测定所获得的单(孢)胞纯种分离菌株的酶活, 选择酶活较大的菌株为进一步供试菌株。

1.2.2 液体种子培养 将复筛所获菌株接种于液体种子培养基中, 30℃, 150 r/min 培养 36 h。

1.2.3 发酵试验 发酵培养基的选择: 按 10%的接种量, 在基础培养基上分别改变碳源(固定氮源为 0.86% NaNO₃, 磷源为 0.02%的 KH₂PO₄), 氮源(固定碳源为 6%淀粉+3%葡萄糖, 磷源为 0.2% KH₂PO₄)和 KH₂PO₄ 的浓度, 30℃, 150 r/min 摇瓶培养 8 d, 测定发酵上清液的酶活, 根据各单因子试验进行碳、氮、磷源正交试验 L₉(3³)^[6], 确立培养基各组分最适浓度。

种子菌龄: 500 mL 三角瓶中装 100 mL 发酵培养基(发酵液采用最佳培养基配方), 分别接入等量体积生长时间为 12、24、36、48、60、72 h 的液体种子, 30℃, 150 r/min 培养 8 d, 测定发酵上清液中的酶活。

接种量: 500 mL 三角瓶中装 100 mL 发酵培养基, 分别按 6%、8%、10%、12%、15%接入液体种子, 30℃, 150 r/min 培养 8 d, 测定发酵上清液的酶活。

装液量: 在 500 mL 三角瓶中按 5%、10%、15%、20%、25%、30%的量装入发酵培养基, 并以 10%接种量接入液体种子, 30℃, 150 r/min 摇瓶培养 8 d, 测定发酵上清液中的酶活。

发酵培养基起始 pH 值: 在 500 mL 三角瓶中, 装入 10%的 pH 值分别为 1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0 的发酵培养基, 并以 10%接种量接入液体种子, 30℃, 150 r/min 培养 8 d, 测定发酵液中的酶活。

生长曲线和生物量: 采用最佳培养基配方和发酵工艺条件(发酵培养基起始 pH 值为 5.0)于 30℃, 150 r/min 摇瓶培养, 从接种第 2 d 开始取样测定酶活, 同时测定生物量。

1.2.4 植酸酶对豆粕粉中植酸(盐)降解作用的初步研究 准确称取豆粕粉 2.000 g, 加 10 mL 酶液(870 pu/mL)30℃下分别保温 5、15、30、45、60、75、90、105 min, 再加入 10 mL 去离子水混匀, 过滤, 取 25 mL 溶液定容到 50 mL 容量瓶中, 取 1 mL 溶液测定可溶性蛋白质含量, 以发酵原液作对照, 同时滤渣用来测定植酸含量。

1.2.5 测定方法 酶活力可溶性蛋白质含量及 pH 测定参照文献[7]和[8], 植酸含量测定按文献[9]方法。生物量测定, 发酵液用滤纸过滤, 滤纸上菌体用清水反复冲洗, 并放到 80℃烘箱中烘 6 h, 然后称重。

2 结果与讨论

2.1 菌株筛选

能在植酸钙为唯一磷源的选择性培养基上产生透明圈的菌种有细菌、酵母菌和霉菌, 经过在平板上反复筛选, 仍能得到透明圈较大的细菌 1 株, 酵母菌 4 株, 霉菌 9 株, 并且从单(孢)胞所产生透明圈的直径大小来看, 霉菌的产酶能力大于其它菌株的产酶能力, 摇瓶复筛(即酶活

大小的测定)表明, 接种霉菌 W-96(经初步鉴定为曲霉属中黑曲霉种群 *Asp niger* sp.)所获发酵液其酶活最高, 可达 870. 87 pu/mL, 因此选该菌株为本试验测试菌株。

2 2 发酵培养基的确定

2 2. 1 碳源的选择 结果(表 1)表明, 在相同碳源浓度及相同发酵条件下, 菌株产植酸酶利用的碳源主要是淀粉和葡萄糖, 单独使用淀粉和葡萄糖, 酶活较高, 但二者混合使用, 效果更佳, 这说明淀粉和葡萄糖同时使用时, 二者有协同作用。所以我们选用淀粉和葡萄糖混合使用作为测试菌株的最佳发酵碳源。

2 2. 2 氮源的选择 结果(表 2)表明, 菌株生产植酸酶主要是利用无机氮源, 且以 NaNO_3 产

表 1 不同种碳源对产酶的影响

碳 源	淀粉	葡萄糖	淀粉+ 葡萄糖	蔗糖
添加量(%)	9	9	6+3	9
酶活(pu/ mL)	351. 8	313. 7	383. 4	278. 6

表 2 不同种氮源对产酶的影响

氮 源	NH_4NO_3	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	NaNO_3	尿素	蛋白胨	酵母膏	玉米浆	豆粕粉
添加量(%)	0. 4	0. 62	0. 86	0. 3	2	2	2	2
酶活(pu/ mL)	136. 6	33. 7	379. 6	0	15. 1	26. 8	42. 0	0

注: 无机氮源按氮元素含量相同, 有机氮源按 2%添加。

量最高, 酶活达 379. 6 pu/mL, 所以我们选用 NaNO_3 作为菌株生产植酸酶的氮源。

2 2. 3 磷酸盐的选择 磷酸盐作为植酸酶酶解的终产物对酶活有较大影响, 因而我们选用不同浓度的 KH_2PO_4 作为磷源, 测定发酵上清液的酶活。从表 3 可见, 培养基中加 0. 01% KH_2PO_4 最有利于菌株产酶, 减少或增加此值, 不利于产酶。

表 3 KH_2PO_4 用量对产酶的影响

KH_2PO_4 用量(%)	0. 00	0. 005	0. 01	0. 02	0. 04
酶活(pu/ mL)	358. 2	492. 5	611. 2	532. 0	321. 4

表 4 正交试验的因素与水平

测定项目	碳 源	氮 源	磷 源
1	6% 淀粉+ 3% 葡萄糖	0. 5% NaNO_3	0. 01% KH_2PO_4
2	8% 淀粉+ 3% 葡萄糖	0. 86% NaNO_3	0. 02% KH_2PO_4
3	8% 淀粉+ 2% 葡萄糖	1. 0% NaNO_3	0. 04% KH_2PO_4

2 2. 4 正交试验确定碳源、氮源及磷源的最佳使用量 正交试验(表 4、表 5)表明, 主次因素为磷→氮→碳, 初选最佳优化组合为碳₃、氮₃、磷₁, 碳源的 r 值最小, 说明碳源对植酸酶活性影响较小, 为次要因素, 而 KH_2PO_4 的 r 值最大, 说明磷酸盐对产酶影响较大, 而高浓度无机磷使酶活降低, 其原因可能是磷作为植酸酶酶解的终产物对植酸酶的产生有一定的阻碍作用, 因为酶的生物合成受遗传基因和代谢物的双重控制。

综上所述, 可得最佳配方: 淀粉 8%, 葡萄糖 2%, NaNO_3 1. 0%, MgSO_4

表 5 试验设计和试验结果 $\text{L}_9(3^3)$

实验号	碳源	氮源	磷源	酶活(pu/ mL)
1	1	1	1	490. 9
2	1	2	2	488. 2
3	1	3	3	307. 2
4	2	1	2	274. 8
5	2	2	3	371. 4
6	2	3	1	640. 1
7	3	1	3	406. 7
8	3	2	1	622. 8
9	3	3	2	600. 0
i	428. 8	390. 8	584. 6	i+ ii+ iii= 1400. 5
ii	428. 8	494. 1	454. 3	
iii	542. 8	515. 8	361. 8	
r	114. 0	125. 0	228. 5	

0.05%, KCl 0.05%, FeSO_4 0.01%, KH_2PO_4 0.01%, pH 为 5.0。

2.3 发酵条件的确立

2.3.1 种子菌龄、接种量及装液量的选择 试验结果表明,当接种菌龄大于或小于 36 h 时,发酵液中酶含量下降,故接种菌龄为 36 h 为宜;接种量在 10% 左右时,发酵液中酶含量最高,故接种量应为 10%;装液量在 5%~30% 范围内随装液量增加,发酵液中酶含量下降,说明该菌株为需氧菌,从试验数据中可见,装液量在 5%,10% 时,产酶量差别较小,所以从经济角度来考虑,选择 500 mL 三角瓶中装液量 50 mL,即装液量比例为 10%。

2.3.2 发酵培养基的起始 pH 试验结果表明,在 pH 为 2.5、3.5 和 5.0 时,产植酸酶菌株有 3 个产酶高峰,且 pH 为 5.0 时最高,分别比 pH 2.5、3.5 时酶活高 3.66%,10.8%。据文献报导米曲霉有两个不同 pH 值下的植酸酶的同工酶,该菌株是否有 3 种植酸酶的同工酶,还需进一步研究探讨。

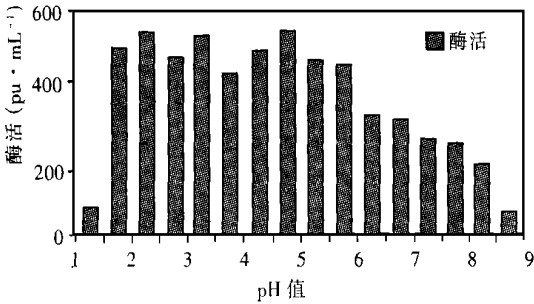


图 1 发酵培养基的起始 pH 值对产酶的影响

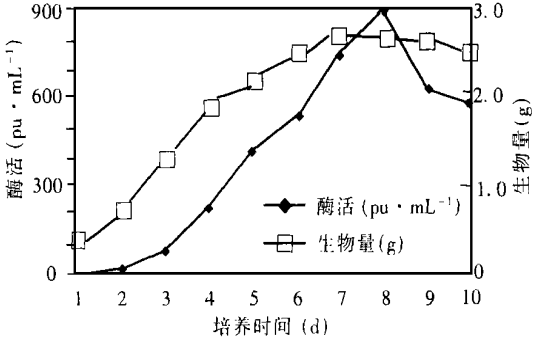


图 2 菌株的生长曲线和生物量

2.3.3 生长曲线及生物量测定 采用最佳培养基配方和最佳发酵条件,摇瓶接种后第 2 d 开始取样测定。从图 2 可见,该菌株产酶量在第 8 d 达到高峰,而生物量在第 7 d 达到高峰,因此该菌株产酶量最高时间为发酵后第 8 d,产酶高峰滞后于生物量高峰,这是因为植酸酶为胞外酶,胞外酶是穿过细胞膜后,可能暂时为细胞壁所限制,最后再扩散到环境中⁹,因此出现了产酶高峰滞后于生物量高峰的现象。

2.3.4 植酸酶对植酸(盐)的降解作用 每 g 豆粕粉加 5 mL 酶液(870 pu/mL)进行处理。从图 3 可见,当酶作用 90 min 时,植酸降解已达 75%,所以植酸酶对豆粕粉中植酸的降解率达 75%以上,同时处理液中可溶性蛋白质含量由原来的 0.167 mg/mL 增至 12.1 mg/mL,这也说明了植酸的抗营养作用,它可与部分蛋白质结合,当植酸被降解的同时,释放出结合在一起的蛋白质,导致处理液中蛋白质含量的增加。

本研究系从无花果中分离到一产植酸酶菌株,并对其液体发酵条件进行了初步研究,以期为进一步研究提供部分理论根据,由于实验条件及经费的限制,未能对菌株所产植酸酶理化性质作进一步的研究,今后在此方面尚待深入

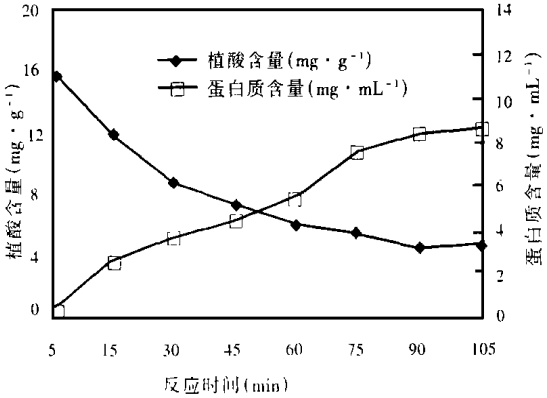


图 3 植酸酶的反应曲线

研究。

参考文献:

- [1] 张梅申,熊晓辉,沈爱光. 发酵对珍珠稗中抗营养因子的影响[J]. 农牧产品开发, 1996, (11): 33— 34.
- [2] Thompson L U, Yoon J H. Complexation of phytate with proteins and cations in corn germ and oilseed meals. [J]. J Food Sci, 1984, 49: 1228— 1229.
- [3] 尹光琳, 战立克. 发酵工业全书[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1992. 534. 539.
- [4] 诸葛健, 王正祥. 工业微生物试验技术手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994. 121— 124.
- [5] 陈祥照. 真菌单孢子分离的简易方法[J]. 微生物通报, 1957, (7): 213.
- [6] 中国现场统计研究会农业优化组, 等. 农业正交设计法[M]. 北京: 冶金工业出版社, 1994.
- [7] 营原洁. 副岛正美[日]. 蛋白质的定量法[M]. 张旭 译. 北京: 农业出版社, 1981. 186— 189.
- [8] 普里斯特 F G [英]. 细胞外酶[M]. 北京: 科学出版社, 1988.
- [9] 张梅申. 植酸酶产生菌株的初步筛选及发酵条件优化的研究[D] : [硕士论文]. 南京: 南京农业大学食品科技学院, 1997.

A Study on Liquid Fermentation of Phytase-production Strain

ZHANG Mei-shen¹, SHEN Ai-guang², XIONG Xiao-hui², SHEN Chang²

(1 Institute of Millet Crops Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences Shijiazhuang 050031;

2 Food Scientific and Technological College Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095)

Abstract: With phytate-Ca as the sole phosphorus source of selected medium, a extracellular phytase-producing strain was screened from the ficuum. Liquid fermentation was studied and a best fermentation medium was obtained, starch 8%, glucose 2%, NaNO₃ 1.0%, KH₂PO₄ 0.01%, KCl 0.05%, MgSO₄ 0.05%, FeSO₄ 0.01% and initial pH 5.0. Inoculating amount 10%, filling liquid volume 10%, extracellular phytase production as much as 870.87 pu/mL fermentation liquid was obtained at 30℃ after 8 days. More 75% phytic acid of soybean was decomposed by the fermenting liquid at 30℃ for 90 min, and soluble protein content in treating liquid was increased from 0.167 mg/mL to 12.1 mg/mL.

Key words: Phytase; Phytate-Ca medium; Liquid fermentation