

放射型根瘤杆菌植酸酶对麸皮中植酸的脱磷作用

李文, 王陶, 杨克

(徐州工程学院食品(生物)工程学院, 江苏 徐州 221000)

摘要: 采用放射型根瘤杆菌植酸酶粗酶液水解麸皮中的植酸, 研究其脱磷的最适条件。依据单因素试验和正交试验获得脱磷的最优条件为加酶量 750U/g、底物质量浓度 40mg/mL、温度 45℃、pH7、时间 5h。最优条件下, 麸皮中植酸的水解率在 5h 达最大, 为 81.50%。

关键词: 植酸酶; 脱磷; 麸皮

Dephosphorization of Phytic Acid in Wheat Bran by Phytase from *Agrobacterium radiobacter*

LI Wen, WANG Tao, YANG Ke

(School of Food Engineering, Xuzhou Institute of Technology, Xuzhou 221000, China)

Abstract: Crude phytase solution separated from *Agrobacterium radiobacter* fermentation broth was used to hydrolyze wheat bran for phytic acid dephosphorization. Using one-factor-at-a-time combined with orthogonal array design method, such process conditions as enzyme amount, substrate concentration, pH, temperature and hydrolysis time were optimized to be 750 U/g, 40 mg/mL, 7, 45 °C, and 5 h, respectively. Under the optimized conditions, the hydrolysis rate of phytic acid was up to 81.50%.

Key words: phytase; dephosphorization; wheat bran

中图分类号: S816.7; Q933

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)22-0105-04

植酸, 即肌醇六磷酸, 是谷物中磷的主要贮藏形式^[1]。动物因体内缺乏能分解植酸的酶而难以利用食物中的植酸, 最终导致高磷粪便污染环境^[2], 同时额外添加昂贵的无机磷酸盐造成饲料成本增加并加剧了磷矿资源危机^[3-4]。植酸还会与多种金属离子和蛋白质螯合成不溶性复合物, 降低了动物对这些营养物质的有效利用^[5-6]。植酸酶, 即肌醇六磷酸磷酸水解酶, 催化植酸水解生成低级肌醇磷酸衍生物和无机磷酸^[7]。它可使植物性饲料中磷的利用率提高 60%, 粪便中磷排泄量减少 40%^[8]; 而且能够通过降低植酸盐的抗营养作用, 增加动物对蛋白质和一些金属离子的吸收能力^[9]。广泛应用于食品工业和饲料工业中^[10-12]。

由于植酸酶的重要意义, 已经成为饲料添加剂和酶

制剂研究的热点。其中, 去磷效果研究是植酸酶利用研究的基础; 通过去磷实验验证植酸酶对植物性饲料中植酸钠中植酸磷的降解效果是利用植酸酶的突破口^[13]。王丽^[14]比较了来源于曲霉、大肠杆菌、酵母的植酸酶对米糠、豆粕、菜粕、玉米中植酸磷的脱磷效率, 发现原料和植酸酶对植酸磷降解率都有极显著的影响。麸皮为小麦最外层的表皮, 是一种糠类饲料, 麸皮干物质中植酸磷的含量为 6.8g/kg^[15]。未添加植酸酶的饲用麸皮中植酸磷的利用率很低, 故要在饲料中添加外源的植酸酶来提高动物对于磷的利用率。本研究利用筛选到的放射型根瘤杆菌所产的植酸酶水解麸皮中的植酸, 从而得到植酸酶脱磷的最优条件, 为进一步开发利用此植酸酶提供有价值的参考数据。

收稿日期: 2011-06-21

基金项目: 江苏省高校自然科学研究面上项目(10KJD180006); 徐州工程学院科研基金青年课题(XKY2009122);

徐州工程学院科研基金培育课题(XKY2010112)

作者简介: 李文(1982—), 女, 讲师, 硕士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: wenlisony@126.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

放射型根瘤杆菌由徐州工程学院微生物遗传育种实验室保存;植酸钠(高纯试剂) 美国 Sigma 公司;四水合钼酸铵(分析纯) 合肥工业大学化学试剂厂;三氯乙酸(分析纯) 天津市河东区红岩试剂厂;偏钼酸铵(分析纯)、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (分析纯) 天津福晨化学试剂有限公司;磷酸二氢钾(分析纯) 宜兴市正盛化工厂;其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

HH.B11.600-S- II 型电热恒温培养箱 上海跃进医疗器械厂;HYG 旋式恒温调速摇瓶柜 上海欣蕊自动化设备有限公司;DL-5 低速大容量离心机 上海安亭科学仪器厂;TU-1810 紫外-可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司。

1.3 培养基

牛肉膏蛋白胨斜面培养基:蛋白胨 10g/L, 酵母膏 5g/L, 氯化钠 5g/L, 水, pH7.0。

产酶培养基:葡萄糖 15g/L, 蛋白胨 3g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2g/L, KCl 0.5g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03g/L, pH7.0。

1.4 方法

1.4.1 斜面活化

刮取一环菌种接种于斜面培养基中, 30℃培养 3d。

1.4.2 液态发酵及粗酶液的提取

活化好的菌株接至液体产酶培养基摇床发酵产酶, 150r/min, 30℃培养 84h。装液量 100mL(250mL 摇瓶)。转速 150r/min。发酵完毕, 以 4000r/min 的速度将发酵液离心 10min, 上清液即为粗酶液。

1.4.3 植酸酶活测定

参照文献[16]方法进行。酶活单位定义: 在温度 37℃、pH5.5 条件下, 每分钟从 5.0mmol/L 植酸钠溶液中释放 1μmol 无机磷即为 1 个植酸酶活性单位, 以 U 表示。

1.4.4 无机磷浓度的测定

采用 Harland 等^[17]的微量比色法定磷。

1.4.5 脱磷条件的优化

将植酸酶粗酶液加入麸皮中, 水解麸皮中的磷酸。基础条件为加酶量 500U/g、底物质量浓度 50mg/mL、pH7、温度 45℃、时间 4h。

加酶量: 将粗酶液加入麸皮中, 考察加酶量分别为 250、500、750、1000、1250U/g 对麸皮上清液中无机磷量的影响, 确定最佳加酶量; 底物质量浓度: 采用最佳酶量, 考查麸皮质量浓度分别为 40、50、60、80、100mg/mL 对无机磷量的影响, 确定最佳底物质量

浓度; 温度: 采用最佳酶量、底物质量浓度, 考查温度分别为 25、37、45、50、55℃对无机磷量的影响, 确定最佳温度; pH 值: 采用最佳酶量、底物质量浓度、温度, 考查 pH 值分别为 4、5、6、7、8 对无机磷量的影响, 确定最佳 pH 值; 时间: 采用最佳酶量、底物质量浓度、温度、pH 值, 考查处理时间为 2、4、5、6、8h 对无机磷量的影响, 确定最佳时间; 正交试验: 结合前面的单因素试验, 以加酶量、底物质量浓度、温度、pH 值、时间为影响因素, 选用 $L_{16}(4^5)$ 正交表进行试验, 确定最佳条件。

1.4.6 麸皮中无机磷的释放曲线

最优条件下考察麸皮中的磷释放量与时间的关系。从 1h 起, 每 1h 测定上清中的无机磷含量, 测定 8h。

1.4.7 麸皮中植酸磷降解率的计算

$$\text{植酸磷降解率} / \% = \frac{\text{麸皮中已降解植酸磷量}}{\text{麸皮中总植酸磷量}} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 脱磷条件的优化

2.1.1 加酶量对脱磷作用的影响

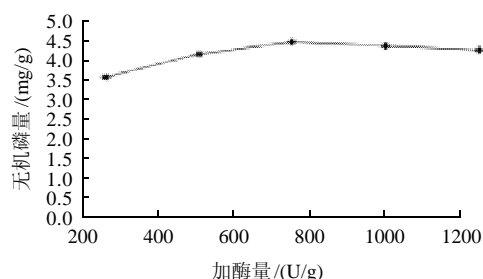


图1 加酶量对无机磷量的影响

Fig.1 Effect of enzyme amount on inorganic phosphorus content of wheat bran hydrolysate supernatants

由图 1 可以看出, 随着加酶量的增加无机磷量先增加后趋于平稳。在加酶量为 750U/g 时无机磷量最大, 为 4.49mg/g。可能的原因是随着加酶量的增加, 底物先是与酶反应, 而后底物达到饱和, 无机磷量趋于平稳。因此, 最佳加酶量为 750U/g。

2.1.2 麸皮质量浓度对脱磷作用的影响

由图 2 可以看出, 随底物质量浓度的增大, 无机磷量先逐渐增加, 然后再趋于平稳, 在底物质量浓度为 50mg/mL 时无机磷量最大, 为 5.84mg/g。此变化趋势可能的原因是开始时, 随底物质量浓度的增大, 酶促反应的速度增大, 但当达到一定底物质量浓度时, 酶

达到饱和, 酶催化反应速度不会再增加, 使得磷释放量变化不大。因此, 最佳底物质量浓度为 50 mg/mL。

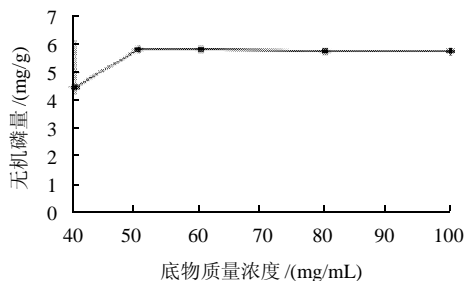


图2 底物质量浓度对无机磷量的影响

Fig.2 Effect of substrate concentration on inorganic phosphorus content of wheat bran hydrolysate supernatants

2.1.3 温度对脱磷作用的影响

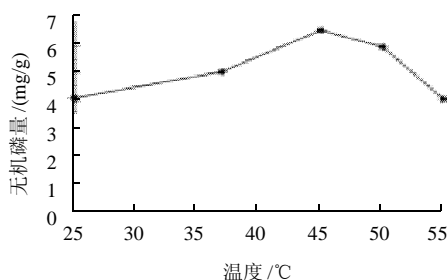


图3 温度对无机磷量的影响

Fig.3 Effect of reaction temperature on inorganic phosphorus content of wheat bran hydrolysate supernatants

由图3可以看出, 随着温度的升高无机磷量先逐渐增加, 然后降低。在温度为 45 °C 时无机磷量最大。此温度为酶的最适反应温度, 过高或过低的温度都会降低酶的催化效率, 即降低酶促反应速度。因此, 最佳温度为 45 °C。

2.1.4 pH 值对脱磷作用的影响

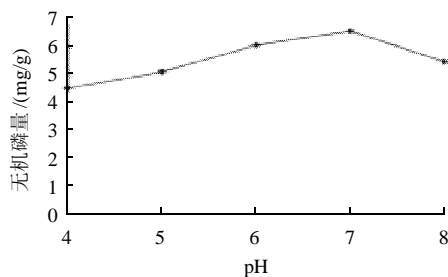


图4 pH 值对无机磷量的影响

Fig.4 Effect of reaction pH on inorganic phosphorus content of wheat bran hydrolysate supernatants

由图4可以看出, 随着 pH 值的升高, 无机磷量先增加后降低, 在 pH 值为 7 时无机磷量最大。根据前期研究结果, 此植酸酶为中性植酸酶, 最适作用 pH 值为 7, 因此, 该 pH 值时, 酶可发挥最大的活性。当 pH 值高或低时, 可能会改变底物分子和酶分子的带电状态, 从而影响酶和底物的结合; 过高或过低的 pH 值又会影响酶的稳定性, 从而对脱磷作用产生不良影响。因此, 最佳 pH 值为 7。

2.1.5 作用时间对脱磷的影响

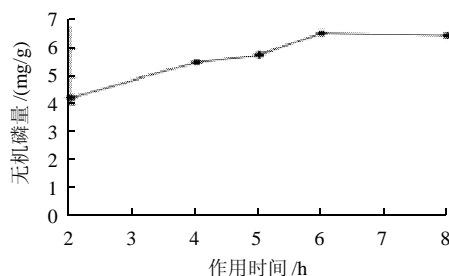


图5 作用时间对无机磷量的影响

Fig.5 Effect of reaction time on inorganic phosphorus content of wheat bran hydrolysate supernatants

由图5可以看出, 随着时间的延长麸皮中的植酸磷在植酸酶的作用下逐渐释放, 在 6 h 无机磷量最大, 为 6.59 mg/g。因此, 最佳作用时间为 6 h。

2.1.6 正交试验确定脱磷作用的最优条件

表1 脱磷条件正交试验设计及结果

Table 1 Orthogonal array design experimental results and range analysis

试验号	A 底物质量浓度/(mg/mL)	B 加酶量/(U/g)	C pH	D 温度/°C	E 作用时间/h	无机磷量/(mg/g)
1	1(40)	1(500)	1(6)	1(37)	1(4)	6.02
2	1	2(750)	2(7)	2(45)	2(5)	7.50
3	1	3(1000)	3(8)	3(50)	3(6)	6.10
4	1	4(1250)	4(9)	4(55)	4(7)	6.38
5	2(50)	1	2	3	4	5.94
6	2	2	1	4	3	6.44
7	2	3	4	1	2	5.96
8	2	4	3	2	1	6.61
9	3(60)	1	3	4	2	5.77
10	3	2	4	3	1	5.82
11	3	3	1	2	4	6.47
12	3	4	2	1	3	6.72
13	4(80)	1	4	2	3	5.71
14	4	2	3	1	4	6.05
15	4	3	2	4	1	6.30
16	4	4	1	3	2	5.74
k ₁	6.500	5.860	6.168	6.188	6.188	
k ₂	6.237	6.453	6.615	6.572	6.242	
k ₃	6.195	6.207	6.133	5.900	6.239	
k ₄	5.950	6.363	5.968	6.223	6.210	
R	0.550	0.593	0.647	0.672	0.054	

因素主次

$D > C > B > A > E$

最优方案

$A_1B_2C_2D_2E_2$

结合单因素试验,选择不同底物质量浓度、加酶量、pH值、温度以及时间为影响因素,选用 $L_{16}(4^5)$ 正交表进行试验,因素水平及结果见表1。由表1可知,各因素对植酸酶活性的影响次序为 $D > C > B > A > E$,即温度 $>$ pH值 $>$ 加酶量 $>$ 底物质量浓度 $>$ 时间;麸皮中植酸脱磷的最优条件最优方案为 $A_1B_2C_2D_2E_2$,即底物质量浓度40mg/mL、加酶量750U/g、pH7、温度45℃、时间5h。

2.2 麸皮中的无机磷释放曲线

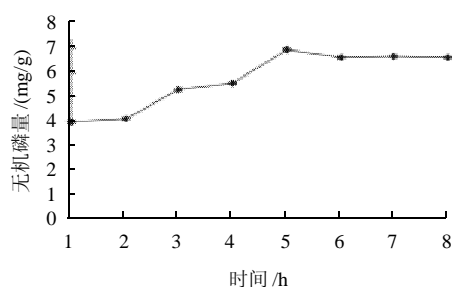


图6 最优脱磷条件下的无机磷释放曲线

Fig.6 Time course of inorganic phosphorus release

由图6可知,随着时间的延长麸皮中的植酸磷在植酸酶的作用下逐渐释放,在5h无机磷量最大,为6.596mg/g,之后趋于平稳。

通过对照实验,即用水代替植酸酶粗酶液去处理麸皮得到的无机磷量见表2,由表2可看出,磷量随时间变化不大,为1.4mg/g左右。根据中国饲料成分及营养价格表(1998年修订版)报道,麸皮干物质中的植酸磷含量为6.8g/kg,所以麸皮中植酸的水解率为81.50%。此植酸酶对于麸皮中植酸磷的水解有显著的作用。

表2 水浸泡麸皮后的无机磷含量

Table 2 Inorganic phosphorus contents in water after wheat bran soaking for different times

时间/h	2	4	6	8
无机磷含量/(mg/g)	1.43	1.42	1.39	1.40

3 结 论

本实验利用放射型根瘤杆菌发酵得到的植酸酶粗酶液水解麸皮中的植酸,研究其脱磷的最适作用条件。先进行单因素试验,研究加酶量、底物质量浓度、温度、pH值、时间对麸皮中植酸的脱磷作用,在此基础上,进行正交试验获得最佳脱磷条件为底物质量浓度为40mg/mL、加酶量750U/g、pH7、温度45℃、时间

5h。最优条件下,麸皮中植酸的水解率在5h达到最高,为81.50%。

为了避免饲料制粒过程中的高温对酶活的不利影响,下一步可对此菌株的耐热性进行改良,以加强其在动物饲料中的应用效果。

参考文献:

- [1] LABOURE A M, GAGNON J, LESCURE A M. Purification and characterization of a phytase (myo-inositol-hexakisphosphate phosphohydrolase) accumulated in maize (*Zea mays*) seedlings during germination[J]. Biochem J, 1993, 295(2): 413-419.
- [2] 周紫雨, 张俊红. 植酸酶在饲料中的应用[J]. 饲料研究, 2006(7): 55-57.
- [3] BILYER K D, ZENG P Y, COELLO P, et al. Managing agricultural phosphorus for protection of surface waters: issues and options[J]. J Environ Qual, 1994, 23(3): 437-451.
- [4] ZHANG Weifeng, MA Wenqi, JI Yuexiu, et al. Efficiency, economics, and environmental implications of phosphorus resource use and fertilizer industry in China[J]. Nutrient Cycling in Agroecosystems, 2008, 80(2): 131-144.
- [5] FRONTELA C, SCARINO M L, FERRUZZA S, et al. Effect of dephytinization on bioavailability of iron, calcium and zinc form infant cereals assessed in the Caco-2 cell model[J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(16): 1977-1984.
- [6] LIU N, RU Y J, LI F D, et al. Effect of diet containing phytate and phytase on the activity and messenger ribonucleic acid expression of carbohydrase and transporter in chickens[J]. J Anim Sci, 2008, 86(12): 3432-3439.
- [7] MULLANEY E J, DALY C B, ULLAH A H. Advances in phytase research[J]. Adv Appl Microbiol, 2000, 47: 157-199.
- [8] 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.
- [9] WYSS M, PASAMONTES L, FRIEDLEIN A, et al. Biophysical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): Molecular size, glycosylation pattern, and engineering of proteolytic resistance[J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(2): 359-366.
- [10] 李路胜, 冯定远. 生物技术生产饲料添加剂植酸酶[J]. 饲料广角, 2003(11): 27-28.
- [11] MAGA J A. Phytate: its chemistry, occurrence, food interactions, nutritional significance, and methods of analysis[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1982, 30(1): 1-9.
- [12] 陈惠, 王红宁, 吴崎. 饲用植酸酶蛋白质工程研究进展[J]. 微生物学通报, 2004, 31(3): 106-110.
- [13] 张必武, 乐国伟. 植酸酶在饲料中的应用及其研究进展[J]. 饲料博览, 2001(11): 13-14.
- [14] 王丽. 不同来源植酸酶对常用饲料中植酸盐降解效率的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2007.
- [15] 中国农业科学院畜牧研究所. 中国饲料成分及营养价值表[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 295.
- [16] 中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所. GB/T 18634—2009 饲用植酸酶活性的测定: 分光光度法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- [17] HARLAND B F, HARLAND J. Fermentative reduction of phytase in rye, white, and whole wheat breads[J]. Cereal Chemistry, 1980, 57(3): 226-229.