

饲用植酸酶热稳定性的研究*

赵海霞¹ 王红宁^{1**} 陈惠²

(四川农业大学动物科技学院 雅安 625014)¹ (四川农业大学生命理学院 雅安 625014)²

摘要: 植酸酶是一种能将植物性饲料中植酸(盐)降解为肌醇和无机磷酸盐的酶类。其作为单胃动物的饲料添加剂,对提高畜禽业生产效益及降低植酸磷对环境的污染有重要意义。针对目前饲用植酸酶存在的热稳定性不高的问题,介绍了国内外近年来的研究进展,并提出了解决的方法。

关键词: 饲用植酸酶,热稳定性,研究进展

中图分类号: Q946.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 01-0105-05

植酸酶是一种能水解植酸(盐)的磷酸酶类。它能将植酸磷(六磷酸肌醇)降解为肌醇和无机磷酸盐。此酶分为两类:3-植酸酶(EC.3.1.3.8)和6-植酸酶(EC.3.1.2.6)。植酸酶广泛存在于植物、动物和微生物中。但前两者来源有限,难以进行工业化生产,并且其作用范围和稳定性不及微生物植酸酶,故微生物来源植酸酶一直是人们研究的热点^[1]。

1 饲用植酸酶的研究现状

植酸酶可作为一种单胃动物的饲料添加剂,它的饲喂效果已在世界范围内得到了确证^[2]。它可使植物性饲料中磷的利用率提高60%,粪便中磷的排泄量减少40%,同时,还可以降低植酸(盐)的抗营养作用。因此在饲料中添加植酸酶对提高畜禽业生产效益及降低植酸磷对环境的污染有重要意义。到目前为止,国外已有植酸酶产品上市。1994年,荷兰Gist-brocaes公司推出了“自然磷”,美国Alltech工商公司推出了“澳洁美”植酸酶,芬兰Novo Nordisk公司推出了“NOVO”植酸酶,BASF公司产的“酶他富”植酸酶等,而我国饲用植酸酶主要依赖进口。目前,饲用植酸酶并没有在饲料中得到广泛的推广和应用,主要原因在于:(1)植酸酶在天然材料中的含量太低,难以大量生产,生产成本昂贵;(2)植酸酶的热不稳定性,不能满足饲料加工的要求。随着基因工程技术的发展,植酸酶在天然材料中含量低的问题已得到解决,即通过构建基因工程菌,实现了植酸酶的高效表达。而植酸酶作为饲用生物酶,除了要求具有较高的催化活性外,还要求具有较好的热稳定性,能耐高温、高湿环境,因为在制粒过程中温度往往要达到85℃~90℃。生物酶制剂固有的弱点也正是热稳定性差,容易失活,即使是在常温条件下长期存放的干燥酶粉也易失活。20世纪60年代以来,国内外的许多生物化学家对生物酶的热稳定性进行了广泛深入的研究,并提出了一些提高酶热稳定性的方法。90年代中期,尤其是近5年内,西欧和北美的有些科研机构在提高饲用酶制剂的热稳定性方面取得了较大进展^[3]。下面就有关方面的研究动态及提高

* 国家“十五”重点科技攻关资助项目(No.2002BA514A-12)

** 联系人

收稿日期:2002-12-11,修回日期:2003-01-22

饲用植酸酶制剂热稳定性的方法做简要叙述。

2 提高饲用植酸酶热稳定性的方法

提高饲用酶热稳定性的方法有很多^[4],对于植酸酶,常用的方法有以下几种:(1)自然选择法,筛选耐高温菌种释放的植酸酶。(2)蛋白质工程法:即通过基因工程重组得到耐高温酶的基因,再表达获得热稳定性酶。(3)化学修饰法:通过化学试剂特异性修饰酶活性中心的某个或某类氨基酸,从而稳定蛋白质的构象,提高其耐热性。(4)添加酶稳定性添加剂。(5)制备包被型颗粒酶。(6)采用合适的固体状态酶的稳定化程序。本文将着重介绍植酸酶的蛋白质工程法。

2.1 自然选择法 从自然界中分离耐高温产植酸酶菌株。因为耐热性是受基因控制的,所以当嗜热酶基因在常温菌细胞中表达时,通常会保留酶的耐热性。Luis Pasamontes^[5]分离一株产植酸酶耐热菌 *A. fumigatus*, 并对其基因进行克隆,转化到 *A. niger* 中,获得了具有更宽 pH 范围和更高的热稳定性的植酸酶。Randy M. Berka^[6]从耐热性真菌中分离到 *Thermomyces lanuginosus* 菌株,也对其基因进行克隆、转化,测得转化子产物中的植酸酶酶活高于对照菌株 150 倍,热稳定性也有所提高。该方法存在的问题是从嗜热微生物中分离的植酸酶虽然在 70℃~80℃有较好的稳定性,但在 37℃往往酶活较低。

2.2 蛋白质工程法 随着基因工程技术及分子生物学技术的发展,蛋白质工程法逐渐成为人们研究蛋白质热稳定性的主要手段。目前在蛋白质热稳定性工程中常用有 3 种方法:(1)推理设计(rational design), (2)定向进化(directed evolution), (3)同序概念(The consensus concept), 3 种方法各有优缺点,都有成功的例子^[7,8]。

(1)推理设计主要是把热稳定蛋白与热不稳定蛋白的氨基酸序列进行比较,分析究竟是哪些氨基酸对蛋白的热稳定性起关键作用。马挺^[9]等人对嗜热菌与常温菌的氨基酸组成做了比较,发现嗜热菌氨基酸中 Ile、Pro、Glu 和 Arg 含量均高于常温菌,而 Cys、Ser、Thr、Asn 和 Asp 含量显著低于常温菌。对于 Pro 是因为其结构熵小,易折叠,且一经折叠,则需要很高的能量才能解开,从而提高蛋白质稳定性。Arg、Glu 分别比带同样电荷的氨基酸有更大侧链,侧链所提供的疏水作用及离子间相互作用能提高蛋白质热稳定性。有人对嗜热菌蛋白与常温菌蛋白进行研究,发现嗜热菌蛋白与常温菌蛋白的大小、亚基结构、螺旋程度、极性大小和活性中心都极为相似,但就是由于构成蛋白质高级结构的非共价力、结构域的包装、亚基与辅基的聚集,以及糖基化作用、磷酸化作用等等的不同而导致热稳定性不同。事实上,酶的热稳定性受到许多因素的影响,如氨基酸序列、三维结构、辅助因子及 pH 值等。由于不知道究竟是那些关键残基控制着温度敏感性的酶,所以在蛋白质工程研究中为获得热稳定性改善的工业用酶,仍缺乏“百发百中”的分子设计手段。目前普遍采用的手段是基因定向突变,通过改变某个或几个氨基酸来改变蛋白质结构,提高热稳定性。其中,脯氨酸残基在稳定蛋白质结构和提高酶热稳定性方面具有不可忽视的作用^[10]。脯氨酸具较大的比咯烷环,偏爱 β -转折或无规卷曲结构,所以只要在主链构象不发生聚变情况下,可在适当的 β -转折或无规卷曲中引入脯氨酸,通过其刚性的比咯烷环,降低脯氨酸去折叠时的骨架熵和肽链骨架的柔性,从而使周围构象更稳定、牢固。对于植酸酶,可把邻近活性中心处的柔性较大的甘氨酸、苏氨酸等替换为脯氨酸不失为一种好方法。但要注意最好不要替换活性中心的氨基酸,因为脯氨酸有较大的侧链,有可能阻止底物的进

入,使植酸酶不表达或表达量少。朱国萍^[11]等为改善葡萄糖异构酶的热稳定性,将 138 位 Gly 突变为 Pro,结果表明突变酶 GIGI38P 比活与野生型酶相当的情况下,其热失活半衰期比野生型 GI 提高了 0.9~1.1 倍,最适反应温度提高了 10℃~12℃。季朝能^[12]将碱性磷酸酯酶活性中心 68 位的 E 突变为 S,获得了在高温下有很高酶活的突变体,原因是 S 残基的侧链较小,在高温下虽然酶活性部位的结构发生了一些改变,但是底物仍可进入活性部位,所以保持了相当高的酶活。以上方法对于植酸酶的改造提供了理论和实践的指导。目前又有一种新的突变方法——结构延伸突变,用于定向改造酶分子,提高热稳定性。所谓结构延伸突变是指在酶蛋白的 C 末端上连接一段随机肽链,从而改变蛋白质结构,提高其热稳定性。李弘剑^[13,14]等已成功地对来自嗜热脂肪芽孢杆菌的过氧化氢酶 I 基因进行突变,获得了热稳定性非常好的突变体。

(2) 定向进化主要包括多轮随机突变 (random mutagenesis) 和 DNA shuffling 技术。多轮随机突变是以目的基因进行第一轮随机突变,然后筛选出最佳突变子作为下一轮突变的亲本,如此循环下去获得性状优良的突变体。DNA shuffling 技术是 1994 年由 stemmer 提出的, DNA 改组是指 DNA 分子的体外重组,通过改变单个基因原有的核苷酸序列,创造新基因,并赋予表达产物以新功能。实际上是一种分子水平上的定向进化,因此也称分子育种。该方法可在短时间内通过重组有效的变异体发掘所有可能的重组体与突变序列。该方法虽然在获得有益突变体方面有很大优势,但有效的筛选方法对试验的成功与否是至关重要的。

(3) 同序概念是一种半推理的方法。Martin 对 13 个来源于子囊菌 (*Ascomycete*) 的植酸酶所有序列组合,运用计算机程序对其进行比较分析,找出共有的序列人工合成一个基因,这个基因的重组表达产生同序植酸酶-1 (consensus phytase-1),它比亲代所有植酸酶的热稳定性高 15℃~26℃,随后又有 6 个野生型植酸酶 (热稳定工程-MARTIN) 增加到这一组合中产生了同序植酸酶-10 (consensus phytase-10),该酶有 2 个氨基酸与同序植酸酶-1 不同, Tm 值也比同序植酸酶-1 增加了 7.4℃。这两个植酸酶与其各自亲代相比都至少有 80 个氨基酸不同,这表明同序概念这一方法可以一步改变多个氨基酸来获得突变体。

2.3 化学修饰法 本方法是通过化学试剂特异性修饰酶活性中心的某个或某类氨基酸,从而稳定蛋白质的构象,提高其耐热性。

2.4 添加酶稳定添加剂 一般而言,酶非常干燥的情况下,构象比较稳定,具有一定的耐热性,而当体系中含有一定水分或是在高温水蒸汽作用下,酶就极易变性失活,究其原因,酶的变性是由其空间三维结构的变化引起的,即构象发生了变化,从而导致酶活性中心的结构受到破坏,使其催化能力降低或丧失^[15]。在热作用下,酶蛋白的分子运动能力加强,当吸收了酶变性所需活化能后,酶就发生变性,失活,温度越高,热作用时间越长,酶失活越严重。氢键在维持酶的空间构象中起着重要的作用,当体系中含有大量自由水时,就会破坏酶分子内部的氢键,使酶分子构象容易发生变化,酶就易于变性失活。在颗粒饲料制粒过程中酶制剂经历的正是高温、高湿、高压的环境,因此在改善酶的热稳定性方面,不仅应考虑改善酶的热稳定性,还应考虑提高其耐湿热性。诸如多羟基化合物、食用胶、盐、氨基酸等盐类的添加能明显改善酶的热机械稳定性和耐热性^[15]。盐类主要存在离子键作用,当酶的活性中心含有离子作为配位体时,盐离子就能稳定酶的构象。另外盐可作为水分子的替代物占据水的位置,排

表 1 MgSO_4 对储存过程中酶活性的影响

MgSO_4 (g/g 酶蛋白)	0	0.31	0.61	1.19	1.84	2.38
酶活损失 (%)	52	37	26	15	15	17

粉, 酶粉储存在棕色瓶中, 避光, 35°C 保存 8 周, 酶活测定结果见表 1。可见, 不加 MgSO_4 时酶活损失达 52%, 每 g 酶蛋白加入 1.2 ~ 1.8g MgSO_4 , 酶活损失可降低至 15%。酶液中海藻糖、蔗糖的添加也能改善酶的热稳定性。为了保持液体酶的活力, 国外大多采用在浓缩液中加入金属离子、多元醇、多糖类化合物等方法。海藻糖作为一种多元醇化合物, 可通过氢键与酶蛋白表面分子相连接, 使酶蛋白分子稳定。

2.5 制备包被型酶颗粒 欧洲著名的酶制剂生产商 BASF 公司和 NOVO 公司自 20 世纪 90 年代开始对饲用酶在饲料高温制粒条件下的热稳定性进行研究, 到 1996 年取得了重大进展。研制生产的包被型饲用植酸酶颗粒酶活高, 热稳定性好, 在饲料工业中取得了广泛应用。其制备过程大致如下。基因工程菌 CBS513.88 (据报道是米曲霉) 发酵获得植酸酶溶液, 酶活为 300 ~ 1,000 FYT/mL。经过滤和超滤以后获得植酸酶浓缩液, 酶活可达 15,000 ~ 20,000 FYT/mL。把浓缩酶液与淀粉、水溶性的无机盐和有机物按一定配比混合, 均匀揉合成面团状, 经挤压、切割、圆整, 制成小颗粒, 再经低温气流干燥、筛分, 获得直径适中的含酶颗粒。颗粒直径一般控制在 0.2mm ~ 1.6mm。然后选用一些合适的水不溶物, 按一定比例喷涂在颗粒表面, 经低温干燥后制成包被型含酶颗粒。

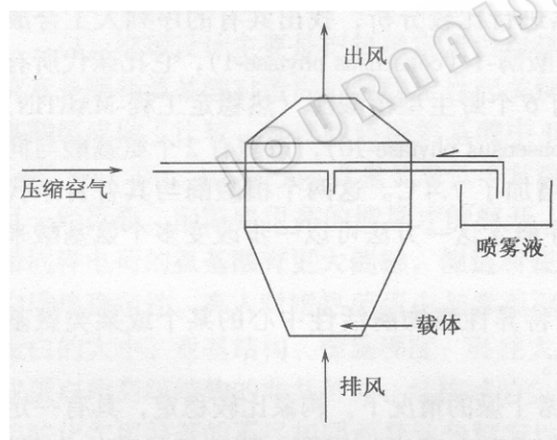


图 1 流化床干燥示意图

2.6 采用合适的固体状态酶的稳定化程序 一个好的稳定化程序可大大降低饲用酶加工过程中的损失。史峰^[4]等人提出一种制备稳定化颗粒酶的方案, 可提高酶的耐热性, 减少制粒时酶活的损失。其方法是: 酶液 + 稳定剂 → 混合 → 造粒 → 干燥。(这里常使用的干燥方法有: 喷雾干燥, 真空烘箱干燥, 滚筒干燥, 鼓风干燥及流化床干燥)。流化床干燥由于条件温和 (温度低), 处理量大且能使产品颗粒化, 因此已越来越多地受到重视。

他们采用流化床干燥法对酶进行稳定化处理, 选用玉米淀粉作为载体, 酶液中添加适量蔗糖, 并含有一定离子强度及 pH 值的缓冲液, 包被剂选用聚阴离子多羟基化合物, 以期提高酶的热稳定性, 尤其是耐湿热性。流化床干燥制备稳定化酶具体实验方法是: 将 3.0kg 玉米淀粉载体置于 FL 型沸腾制粒机的流化床上, 在设定温度下沸腾操作 20min, 然后将事先配好的交联剂酶混合液在一定流速和气雾压力下从上方喷孔喷到载体上, 待其干燥, 再喷入盐类稳定剂, 干燥后间歇式喷入包被剂, 干燥至水分含量 5% ~ 10%, 约需 1 ~ 2h (见图 1)。用该方法制备的稳定化酶酶活回收率可达 90%, 大大减少酶活的损失。

3 研究展望

植酸酶作为单胃动物的饲料添加剂,应用范围广泛,需求量大,而且它对减少环境污染和保护生态环境有重要意义。植酸酶的研究在国际上已开展了几十年,而对其热稳定性的研究起步较晚,还有待进一步深入。笔者认为,后续研究将着重于以下几个方面:①在当前研究的基础上深入研究植酸酶基因的结构与热稳定性的关系,对热稳定基因进行功能定位;②综合运用蛋白质热稳定性工程中的各种方法,力求筛选出一种最优方法可快速、有效获得突变体;③选择合适的酶制剂加工工艺,确保植酸酶在加工过程中有最小损失。

参考文献

- [1] 王红宁, 吴琦, 谢晶, 等. 四川农业大学学报, 2000, 18 (3): 84~87.
- [2] 姚斌, 范云六. 生物工程学报, 2000, 16 (1): 1~5.
- [3] 陆文清, 李德发, 武玉波. 粮食与饲料, 2000, (12): 34~35.
- [4] 史峰, 王璋, 许时婴. 食品与生物技术, 2002, 21 (1): 27~32.
- [5] Pasamontes L, Moruka H, Markus W, *et al.* Applied and Environmental Microbiology, 1997, 5: 1696~1700.
- [6] Randy M B, Michael W R, Kimberly M B, *et al.* Applied and Environment Microbiology, 1998, 64 (11): 4423~4427.
- [7] Martin L, Markus W. Biotechnology, 2001, (12): 371~375.
- [8] Martin L, Claudia L, Anke M, *et al.* Protein Engineering, 2002, 15 (5): 403~411.
- [9] 马挺, 刘如林. 微生物学通报, 2002, 29 (2): 86~88.
- [10] 朱国萍, 滕胜坤, 王玉珍. 生物工程进展, 2000, 20 (4): 48~51.
- [11] 朱国萍, 滕胜坤, 伍传金, 等. 生物化学与生物物理学报, 1998, 30 (6): 607~610.
- [12] 季朝能, 张冰, 姜涛, 等. 遗传学报, 2000, 27 (12): 1100~1107.
- [13] 李弘剑, 张毅, 周天鸿, 等. 遗传, 2000, 22 (2): 96~100.
- [14] 李弘剑, 张毅. 生物化学杂志, 1997, 13 (4): 371~377.
- [15] 史峰, 王璋, 许时婴. 食品与生物技术, 2002, 23 (3): 12~14.