

微生物植酸酶研究进展

杨平平 许正宏 王 燕 陶文沂

(江南大学生物工程学院, 工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214036)

摘要: 植酸酶作为一种新型酶制剂, 引起了国内外专家的广泛关注, 对植酸酶进行了大量的研究工作。综述了近年来微生物胞内和胞外植酸酶分类、酶性质、酶活测定方法、酶作用机理、基因工程、酶的应用等方面的研究进展。

关键词: 植酸酶, 微生物, 基因, 酶性质

中图分类号: **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 03-0111-05

Advances in the Research on Microbial Phytases

YANG Ping-Ping XU Zheng-Hong WANG Yan TAO Wen-Yi

(School of Bio-tech., Key Lab. of Industrial Biotech., Ministry of Education,
Southern Yangtze University, Wuxi 214036)

Abstract: Phytases are studied widely in plants and microorganisms. Interest in these enzymes has been stimulated by the fact that phytase has the advantage in forage, food process and medicine. This paper reviews recent trends on the production, purification, properties and gene of microbial phytases.

Key words: Phytase, Microorganism, Gene, Properties

1 植酸酶概况

植酸 (phytic acid, 简称 PA) 是维生素 B 族的一种肌醇六磷酸酯, 化学名称是环己六醇-1,2,3,4,5,6-六磷酸二氢酯。植酸及其盐类广泛存在于植物组织和相应粮食产品中, 占其总重的 1% ~ 3%, 其中磷的含量占植物总磷的 60% ~ 90%, 是磷和肌醇的主要储存形式^[1]。

磷是动物生长所必需的无机元素, 以植酸盐形式存在的磷不易被人 and 单胃动物所消化利用而随粪便排出体外, 因而必须在动物饲料中添加无机磷 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 。从而导致了畜牧业发达地区磷污染的加重。另一方面, 在动物胃肠条件下, 植酸能强烈地整合 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 等金属离子而形成不溶性的复合物, 严重影响金属离子的吸收和利用^[2]; 而且植酸也能和蛋白质、维生素等形成复合物, 抑制其吸收和生物活性; 研究还发现植酸是淀粉酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶、酸性蛋白酶等许多酶的强抑制剂。由于植酸对各种营养成分的吸收和利用具有广泛的抑制作用, 因而被称为抗营养因子 (anti-nutritional factor ANF)^[3]。

植酸酶 (E.C.3.1.3.8, E.C.3.1.3.26) 是催化植酸及植酸盐水解成肌醇与磷酸 (或磷酸盐) 的一类酶的总称。植酸酶广泛存在于自然界, 植物、微生物动物中均发现有此酶存在。但真正具有开发价值的仅限于利用微生物生产的植酸酶, 尤其是微生物

胞外酶。

2 国内外微生物产植酸酶研究的现状

对微生物植酸酶的研究工作始于 20 世纪 60 年代, 主要进行植酸盐的生理功能研究, 随着科学家们逐步认识到去除饲料中植酸盐的必要性以及科学技术的进步, 20 世纪 80 年代以后逐步开展了植酸酶的实际应用研究, 包括植酸酶菌种筛选, 植酸酶性质研究, 植酸酶基因的定位、克隆等, 并且都已取得了很大的进展。到 20 世纪 90 年代植酸酶真正得到了应用, 并已经有产品问世。如美国的 Allzeech 公司、丹麦的 NOVO 公司、德国的 BASF 公司、芬兰的 ALKO 生物技术公司等先后应用发酵法生产出植酸酶产品。而国内近两年有几家单位开始了此项工作的研究和开发, 并取得了一定的成效。

2.1 产植酸酶的微生物 植酸酶存在于多种植物的种子和花粉及反刍动物消化道和多种微生物中。但由于植物和动物来源的植酸酶没有微生物来源的植酸酶作用范围广, 稳定性差, 因此植酸酶的研究主要集中于微生物酶的鉴定和开发。科学家研究发现自然界中细菌, 酵母都分泌一定的植酸酶, 但霉菌分泌的植酸酶量相对较高。Shimizu 研究了米曲霉, 筛选出高产菌株并对其所产生的植酸酶进行了纯化^[4]; 1978 年 Skowronski 等首先研究了黑曲霉 IIIAn/8 所产生的植酸酶^[5]。Ullah 等检测了来自 25 个种的 84 株产细胞外植酸酶的真菌菌株, 筛选到编号为 *Aspergillus ficuum* NRRL 3135 高产菌株^[6]。我国的一些研究主要也是采用曲霉类。

2.2 植酸酶测定方法的研究 植酸酶活测定的准确性是保证植酸酶研究和生产顺利的基础, 目前关于植酸酶测定方法的报道较多^[6]。目前应用较广的有 4 种方法: 钼酸铵- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 钼酸铵-Vc, 钼酸铵-氨基萘酚磺酸, 钼钒法。其中钼钒法于 1994 年列入 AOAC。但在分析植酸酶活性时, 也发现蒸馏水作空白对照, 往往会发现植酸酶的活力很高, 而以灭活酶液作空白对照, 往往会出现负值, 研究表明造成这种现象的原因主要是: 一是发酵原料中原来含有一部分无机磷; 二是菌株生长过程中代谢合成的植酸酶不断降解原料中的植酸盐, 释放无机磷, 由于发酵时间较长, 造成培养基中的无机磷大量积累, 采用常规方法很难准确测出实际酶活。因为在较短的反应时间内, 植酸酶分解底物(植酸钠)释放出的无机磷比粗酶中本身含有的无机磷低得多。陆文清等(2000 年, 2001 年)认为解决上述问题的方法是, 在测定植酸酶活时, 应适当加大稀释倍数, 使粗酶中本身所含的无机磷浓度降低, 同时增加反应时间, 使水解植酸钠释放的无机磷所占比例加大, 总磷与粗酶中本身所含的无机磷浓度均处在线性定量范围内, 以灭活稀释酶液作空白对照。但仍未去除粗酶中本身所含的无机磷的干扰作用^[7]。杨平等采用透析法去除粗酶中本身所含的无机磷, 排除了植酸酶测定过程中的干扰因素, 解决了植酸酶测定准确性的问题^[8]。

2.3 植酸酶的种类及其性质 微生物中植酸酶种类繁多, 性质各有差异^[9]。目前在各种微生物中已分离出胞内和胞外的多个植酸酶(表 1)。

由表 1 可知, *A. niger* 中的植酸酶, 分子量在 60 ~ 100 kD, 最适 pH 和最适温度分别为 5.0 ~ 7.0 和 55℃ ~ 60℃, 其对植酸钙和植酸钠的 K_m 值分别为 0.44 和 0.45^[10]。*B. subtilis* 菌种中的植酸酶, 分子量为 36 ~ 38 kD, 等电点 6.25, K_m 值 0.5 mol/L, 最适 pH 和温度分别为 6.0 ~ 7.0 和 55℃ ~ 60℃的胞外植酸酶。*E. coli* 中的植酸酶分子量同为 44.7 kD 的两个植酸酶, 其等电点分别为 6.5 和 6.3, 最适 pH 4.5, pH 2 ~ 10 之间都有酶

活存在。Tamber 等 (1994) 在 *K. aerogenes* 菌种中也分离到仅仅在 Km 值, 最适 pH 及温度敏感性有所不同, 但不能分离开的两个植酸酶。Yoon 等 (1996 年) 在 *Enterobacter* sp.4 菌种中分离得到了最适 pH、温度分别为 7.0~7.5、50℃ 的胞内植酸酶。Segueiha 等在 *Schwanniomyces castellii* 菌种中分离得到分子量达到 490 kD 的大分子植酸酶, 该酶具有一个分子量 125 kD 的大亚基和 3 个分子量 70 kD 的小亚基, 并有很好的耐高温能力, 其最适反应温度为 77℃。

表 1 微生物胞内和胞外植酸酶一览表

微生物	酶数	pH		最适温度 (℃)	分子量 (kD)
		范围	最适		
<i>B. subtilis</i> (natto)	1	—	6.0~6.5	60	36~38
<i>E. coli</i>	2	2.0-10.0	4.5	60	44.7
<i>Pichia pastoris</i>	1	—	2.5, 5.5	60	95
<i>S. cerevisiae</i>	1	—	2.0~2.5 5.0~5.5	55~60	120
<i>S. castellii</i>	1	—	4.4	77	490
<i>A. ficuum</i>	1	—	5.0	50	—
<i>A. niger</i>	1	—	5.0	55	100
<i>A. niger</i>	1	—	—	—	60

2.4 植酸代谢机理的研究 植酸的代谢机理早在 20 世纪 60 年代就开始了研究, 但直到目前对于植酸的代谢过程和形成的产物仍然是植酸酶研究的一个热点问题。近年来由于分离技术的提高, 特别是色谱技术在微生物植酸酶代谢产物中的应用, 发现不同来源的植酸酶作用机理有一定差异。Greiner 等和 Kaay 等对 *E. coli* 植酸代谢产物和 *Paramecium* 植酸代谢产物研究分别发现 D-1,2,3,4,5-五磷酸肌醇、D-1,2,5,6-四磷酸肌醇是植酸分解的主要产物^[11]。Skoglund 等 (1997 年) 在研究了 *A. niger* 和小麦植酸酶 (商业用酶) 的代谢产物及结合前人工作基础上, 提出了新的植酸代谢途径: 禾谷类植物植酸的代谢途径为: 植酸→L-1,2,3,4,5-五磷酸肌醇→D-1,2,5,6-四磷酸肌醇、L-1,2,3,4-四磷酸肌醇→D-1,2,6-三磷酸肌醇、1,2,3-三磷酸肌醇→DL-1,2-二磷酸肌醇→2-一磷酸肌醇、DL-1-一磷酸肌醇; 微生物植酸酶的代谢途径为: 植酸→D-1,2,4,5,6-五磷酸肌醇→D-1,2,5,6-四磷酸肌醇→D-1,2,5-三磷酸肌醇、D-1,2,6-三磷酸肌醇→DL-1,2-二磷酸肌醇→2-一磷酸肌醇。

尽管目前关于植酸的代谢途径的研究取得了很大进程, 但也有研究认为代谢过程可能比目前提出的代谢途径的假设要复杂。Skoglund 等^[12] 在研究了多个植物和微生物植酸酶分解植酸的降解产物后, 发现在分离得到的代谢产物中每个磷酸肌醇均有多个产物。

2.5 植酸酶的基因工程进展 随着微生物植酸酶研究的不断深入, 微生物植酸酶基因克隆和表达也取得了较大进展, 到目前为止, 已有 10 多个植酸酶编码基因得到了克隆并在宿主中得到表达。1993 年 Wim van Vartingsveldt 等首先在 *A. niger* NRRL3135 菌种中克隆得到全长 1,791 bp 的 *phyA* 基因。此后中国农业科学院的姚斌等于 1998^[12] 年在 *A. niger* 963 中也克隆到 1,506 bp 的 *phyA* 基因, 在对该基因的 Arg 密码子进行了定点诱变的基础上, 将诱变后的基因整合到 *Pichia pastoris* 中表达, 其植酸酶的表达量为原始

菌种的3,000倍,酶活达5,000 u/mL,得到了当时国内外报道的最高植酸酶酶活^[13]。2001年中山大学贝锦龙等将*A. niger* NRRL3135的*phyA*基因中*Pichia pastoris*低偏爱的密码子替换成高偏爱的密码子,进行表达,得到了酶活16,500 u/mL基因工程菌^[14]。近年来Gorcom等和Marjat等相继得到了*phyB*基因工程菌,Kerovuo等(1998)在*B. subtilis*菌中克隆到*phyC*基因,Luei等成功的从*A. fumigatus*中克隆到耐高温植酸酶基因。Lehmann等利用蛋白质比较设计改造基因获得了耐高温稳定性较好的植酸酶基因工程菌。

尽管植酸酶基因工程取得了很大的发展,但有报道认为也存在一些问题。主要是生产的植酸酶比较单一,不能完全分解植酸,难以满足饲料工业的要求。二是生产菌种的纯化与成本问题比较突出,由于目前基因工程菌多以抗生素为菌种的选择压力,生产过程中需要加入大量抗生素,从而大大增加了成本。

2.6 植酸酶的应用 植酸酶作为一种新型酶制剂,早已引起国内外专家学者的高度重视。自20世纪90年代以来,美国、荷兰、芬兰、丹麦、德国等酶制剂公司已先后开发成功了植酸酶,并先后生产出了商品级饲料用植酸酶。因此对植酸酶在饲料工业的基础及实际应用研究也大量地开展起来,植酸酶在猪禽养殖上的作用已基本肯定。主要包括以下几个方面:

①提高饲料中营养物质的利用率:在猪和鸡的养殖过程中,可以采用植酸酶部分或全部替代无机磷,能使饲料中植物有机磷得到有效地利用提高磷的利用率。同时提高蛋白质和氨基酸的利用率(蛋氨酸提高标准2.0%~2.5%,赖氨酸1.5%~2.0%)和钙、铁、锌等金属离子的利用率,从而提高饲料产品的质量,降低饲料成本。

②植酸酶的添加可以减少磷污染。采用植酸酶替代无机磷可以使猪禽粪便中磷含量减少25%~65%,可以使畜牧业地区的磷污染大大降低。

③提高畜禽的生产性能和饲养业的经济效益。饲料中添加植酸酶能改善禽兽、鱼类生长性能。主要表现在增重效应、改善饲料利用率和减少料肉比有明显的作

用。植酸酶在食品加工中应用主要包括:面包烤制过程中利用植酸酶水解植酸提高面包的营养价值、大豆加工、玉米淀粉加工过程加入植酸酶去除食用植物中的植酸。

此外,随着近年来植酸酶降解产物低磷酸肌醇在生物体内生理功能的发现,低磷酸肌醇作为药物的开发和利用的研究工作也正在成为关注的焦点。研究表明植酸酶水解植酸产生的低磷酸肌醇和肌醇,可以在动植物及微生物体内相互转化,并具有非常重要的生理功能。Streb等1983年首先发现1,4,5-IP₃是生物体内的第二信使,为Ca²⁺运输,细胞信号传递所不可缺少^[15]。进一步研究表明不同低磷酸肌醇异构体,例如1,2,6-IP₃和1,2,3-IP₃在治疗糖尿病、高血压、抗血小板聚集、消除体内自由基以及抗炎方面有着非常好的作用,是正在被开发的重要药物^[16];IP₄,IP₅等在生物体内在营养调节等一些方面有着特殊的作用和功能。低磷酸肌醇在生物体内的重要生理作用的发现,给植酸酶在药物方面的应用带来了光明的前景。

参 考 文 献

- [1] 黄遵锡,章克昌,徐柔. 饲料工业, 1999, 20 (12): 20~22.
- [2] Ahmad T, Rasool S, Sarwar M, et al. Animal Feed Science and Technology, 2000, 83 (2): 103~114.
- [3] 楼宏兴. 中国饲料, 1994, 8: 16~18.
- [4] Shimizu M. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 1993, 57 (8): 1364~1365.
- [5] Skowronski T. Acta Microbiologica Polonica, 1978, 27 (1): 41~47.

- [6] Ullah A H J, Cummins B J. *Preparative Biochemistry*, 1987, **17**: 63 ~ 91.
- [7] 陆文清. 饲料研究, 2000, **1**: 29 ~ 30.
- [8] 杨平平, 陶文沂. 食品与发酵工业, 2003, **29** (9): 52 ~ 55.
- [9] Pandey A, Szakacs G, Soccol C, *et al.* *Bioresource Technology*, 2001, **77**: 201 ~ 214.
- [10] Dvorakova J, Hova O, Kopecky J. *Folia Microbiologica*, 1997, **42** (4): 349 ~ 352.
- [11] Greiner R, Haller E, Konietzny U, *et al.* *Journal of Biotechnology*, 1996, **48** (1 ~ 2): 153 ~ 159.
- [12] Skoglund E, Carlsson N G, Sandberg A S. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 1998, **46**: 1877 ~ 1882.
- [13] 姚斌, 张春义, 王建华, 等. 中国科学 (C 辑), 1998, **28** (3): 237 ~ 2436.
- [14] 贝锦龙. 生物工程学报, 2001, **17** (3): 254 ~ 258.
- [15] Streb H. *Nature*, 1983, **306**: 67 ~ 69.
- [16] Claxon. *Agents Actions*, 1990, **29** (1 ~ 2): 68 ~ 70.