

中性植酸酶高产菌株的筛选及产酶条件研究^{*}李朝霞^{**} 王爱民 李小敏

(盐城工学院化学与生物工程学院 盐城 224003)

摘要 :以地衣芽孢杆菌为原始出发菌株,用紫外线反复诱变,最终获得一株中性植酸酶高产菌株 *B. licheniformis* LL8,其酶活性约为原始出发菌株的 2 倍。该菌株具有稳定的遗传性能。通过单因素试验和正交试验对发酵条件进行了优化,当培养温度为 55℃,pH 为 7.5,接种量为 10% 时,经 30h 培养后,中性植酸酶活力最高达到 2268.4U/mL。

关键词 地衣芽孢杆菌 植酸酶 高产菌株 酶活性

中图分类号 :Q93 文献标识码 :A 文章编号 :0253-2654(2007)04-0633-05

Studies on Screening and Conditions of Strains Highly Producing Neutral Phytase^{*}LI Zhao-Xia^{**} WANG Ai-Min LI Xiao-Min

(School of Chemical and Biological Engineering, YanCheng Institute of Technology, YanCheng 224003)

Abstract :A highly phytase-producing strain *B. licheniformis* LL8 was obtained by several mutagenesis of UV with *B. licheniformis* as starting strain. The new strain produced about two folds of phytase activity as compared with the starting strain. The production performance of the strain was stable. The cultivation conditions were optimized by single factor and orthogonal experiment. When the mutant *B. licheniformis* LL8 was cultivated at 55℃, initial pH 7.5 with the inoculation size of 10% for 30h in WBE medUm, the phytase activity was up to 2268.4U/mL.

Key words :*B. licheniformis*, Phytase, High-yield strain, Enzyme activity

植酸酶是催化植酸及其盐类水解为肌醇和磷酸的一类酶的总称,为优良的环保型食用和饲用酶制剂。其生产主要来源于微生物,且绝大多数属于酸性植酸酶。天然植酸酶生产菌株产酶水平一般都较低,无商业开发价值。目前都是以天然菌株进行改良获得的改良菌或通过基因工程技术获得的基因工程菌。诸西宁^[1]等在国内首次分离到一种产植酸酶的青霉菌:变灰青霉(*P. canescens*)。赵允磷^[2]等分离出一株优良植酸酶产生菌黑曲霉菌株(*A. Niger*70)。陈红歌^[3]等以黑曲霉 MAO21(*A. niger*MAO21)为出发菌株,经紫外线、亚硝基胍单独处理和复合处理,获得一株植酸酶高产菌株 UN-12-10,发酵 108h,其植酸酶活力达到 2950U/mL ~ 3015U/mL,是原始出发菌株的 3.6 倍。董生杰^[4]等以无花果曲霉 2123-15 为出发菌株,用 Co⁶⁰ 照射诱变,获得两株产植酸酶菌株 G-2123-15-7 和 C2123-

15-64,其产酶活力比出发菌株提高了 168.57%,发酵时间缩短了 45% 左右。当前国外使用的植酸酶产生菌以 NRRL3135 菌株研究得较为详细。

由于酸性植酸酶酶促反应的 pH 有效作用范围在 2.5 ~ 5.5 之间,所以它仅适用于胃 pH 值呈酸性的单胃畜禽动物及少数鱼类如虹鳟等,不适用于消化道为中性的鲤科鱼类及在单胃动物 pH 值呈中性的肠道段中表现酶活性。研究表明^[5-7],来源于芽孢杆菌的植酸酶为中性植酸酶,可以有效弥补酸性植酸酶的不足。当前,国内关于中性植酸酶高产菌株的报道不多。2001 年中国农业科学院饲料研究所和生物技术研究合作,从枯草芽孢杆菌中提取中性植酸酶,获得初步成功^[8],姚斌^[9]等进一步对此菌株进行了克隆并在大肠杆菌中表达,陈艳^[10]等从淀粉水解芽孢杆菌中分离克隆中性植酸酶基因,并在大肠杆菌中高效表达,产物均具有正常的生物学

^{*} 江苏省第三批省科技发展计划(农业、苏北星火带科技攻关)项目(No. BE2005346)

^{**} 通讯作者 Tel 0515-8219980, E-mail: lzx@ycit.cn

收稿日期:2006-09-26,修回日期:2006-12-14

活性。

本研究主要以地衣芽孢杆菌为出发菌株,用紫外线反复诱变,最终筛选到一株中性植酸酶高产菌株,并对其产酶培养条件进行研究,为植酸酶在饲料工业和养殖业上的大规模应用提供理论依据和技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 出发菌株:地衣芽孢杆菌(主要成分为含 2×10^{10} 个/g 地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*),美国雅来公司提供,商品名为益畜宝。)

1.1.2 主要试剂:植酸钨(北京拜尔迪生物公司,分析纯),0.05 mol/L pH7.5 的 Tris-HCl 缓冲液,10% TCA 溶液,钼酸铵溶液(5.0g 钼酸铵 + 16mL 浓硫酸 + 蒸馏水至 500mL),混合显色液(称 7.3g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 于烧杯中,加入少许钼酸铵,溶解、过滤,用容量瓶定容至 100mL,贮存于棕色试剂瓶中备用)。

1.1.3 主要仪器设备:85-2 型恒温磁力搅拌器(上海司乐仪器厂),SPX-250 型生化培养箱(上海跃进医疗器械厂),7202-B 型可见分光光度计(Unico 公司),SW-CJ-2FD 型双人单面净化工作台(苏州净化),pHS-3C 酸度计(上海雷磁仪器厂)。

1.1.4 培养基:牛肉膏蛋白胨培养基(pH 7.4 ~ 7.6)^[11]。筛选培养基:在细菌琼脂培养基中加入 0.5% 的植酸钨(pH 7.4)。发酵培养基^[8](1L 产酶培养基 WBE):100g 麸皮加到 900mL 的水中,用 8 层纱布过滤,滤液定容至 1000mL,加入 0.4g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.2g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05g KH_2PO_4 , 0.04g K_2HPO_4 , 2g CaCl_2 , 10g Casitone(pH 7.2 ~ 7.6)。

所有培养基均在 1×10^5 Pa 灭菌 30min 后,再用各种缓冲液调 pH 至实验所需条件,贮藏备用。

1.2 方法

1.2.1 出发菌株生长曲线的测定方法:光密度法。每隔 2h 取 10mL 样品菌液,充分混匀,用可见分光光度计在 660nm 波长处测定其 OD 值,可绘制出 OD 值与微生物培养时间的关系曲线,即为出发菌株生长曲线。

1.2.2 紫外线诱变方法^[11]:将待诱变的菌液置于 60mm 的培养皿中,在磁力搅拌器的恒速搅拌下,距 18W 紫外灯 30cm 处照射 3min 后,取样观察降解圈

大小并检测酶活性。

1.2.3 筛选方法:由于植酸钙的螯合作用,使筛选培养基形成白色混浊,植酸酶水解植酸钙,这样就在菌落周围形成透明降解圈,根据透明圈的大小可以初步判断植酸酶的产量大小,但是如果微生物在生长中产生大量酸性物质,同样也会在菌落周围产生透明降解圈,从而引起假阳性,所以根据降解圈大小只能做初步判断,是否真正地具有高的酶活性,还必需依靠测定酶活性来作最终判断^[2~4,12]。

1.2.4 培养液的酸碱度测定方法:采用 pHS-3C 型 pH 计测定培养液的酸碱度。

1.2.5 酶活性的测定方法^[13]:采用 FeSO_4 - 钼蓝法。酶活性定义:在 37℃ pH7.5 的条件下,在底物浓度为 51mmol/mL 时每 min 从底物释放 1nmol 无机磷所需的植酸酶量,用 U 表示,单位为 nmol/min。

1.2.6 遗传稳定性的研究方法:将获得的植酸酶高产菌株 *B. licheniformis* LL8 连续传代。培养条件是:灭菌三角烧瓶加入 20mL 的产酶培养基,接种 10% 菌液,在 37℃、150r/min 培养 36h,静置 10min,取上清液,冷冻离心 20min,得粗酶液,测定酶活性。

1.2.7 中性植酸酶的最适 pH 及 pH 稳定性:取 1mL 粗酶液稀释 100 倍,按文献[8]测定方法,测定酶的最适 pH 和 pH 稳定性。

1.2.8 产酶条件的研究方法:首先分别从培养温度、培养初始 pH、培养时间和微生物接种量这 4 个方面进行了产酶条件的单因素影响试验。

然后在上述单因素试验的基础上,选择 3 个主要因素,选用 $L_9(3^3)$ 正交优化试验表进行 3 因素 3 水平试验,以确定影响酶产量的主要因素的影响次序以及各因素的最佳组合。

2 结果与讨论

2.1 出发菌株生长曲线的测定

图 1 为用 7202-B 型可见分光光度计在 660nm 处测定 OD,得到的出发菌株培养时间与 $\text{OD}_{660\text{nm}}$ 的关系曲线。可见,在培养 0h ~ 4h 微生物处于停滞期,4h ~ 12h,处于指数生长期,12h ~ 18h 处于稳定期,随后进入死亡期;从曲线上还可以看出,22h 后,微生物出现了二次生长现象。

2.2 植酸酶高产菌株的筛选

先用形态观察法初步挑选出透明圈直径与菌

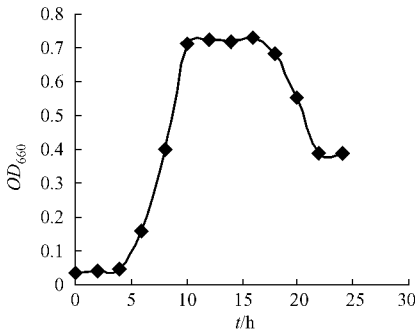


图1 地衣芽孢杆菌的生长曲线

落直径比值(H/C)最大的菌落,后对这些菌落进行植酸酶活性测定,挑选出植酸酶产量最高的菌株,用于下一次的诱变。因第4次与第3次诱变获得的植酸酶产量最高的两株菌株的植酸酶活性没有明显变化,故以第3次诱变获得的植酸酶产量最高的菌株作为本试验研究的菌株。原始菌株植酸酶及4次诱变获得植酸酶产量最高的菌株的植酸酶活性变化如图2所示。

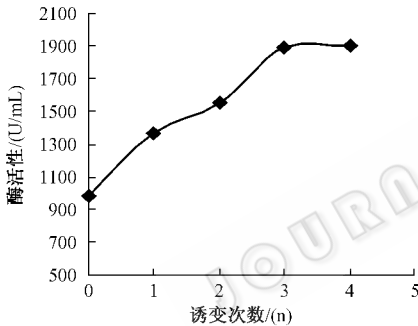


图2 四次诱变的植酸酶活性

2.3 突变株的传代稳定性

将植酸酶高产菌株 *B. licheniformis* LL8 在产酶培养基中每隔 36h 转接一次,共转接 10 次,测定每次传代后的植酸酶活性,结果如图3所示,突变株酶活性在 1860U/mL 附近上下波动,振幅小于 4% ,

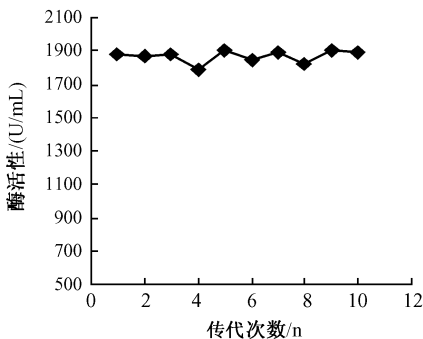


图3 植酸酶高产菌株的传代稳定性

说明该突变株具有较好的传代稳定性。

2.4 酶的最适 pH 和 pH 稳定性

37℃和 55℃时,粗酶液在不同 pH 的缓冲体系中的酶活性结果如图4所示,在 37℃时,在 pH7.0~8.5 范围内,酶活性均较大。在 pH7.5,植酸酶活性最大,为 1377U/mL。在 55℃时,最适 pH 仍为 7.5,其最大酶活性为 2318U/mL,与 37℃时相比,在 pH7.0~7.5 这一范围以外,酶活性下降较快。总之,无论是 37℃还是 55℃,在 pH4.0 以下和 10.0 以上,均检测不到酶活性。以上结果表明,此酶为中性酶,其最适 pH 为 7.5,温度越高,酶活性越大,但相应的温度适应范围越小。

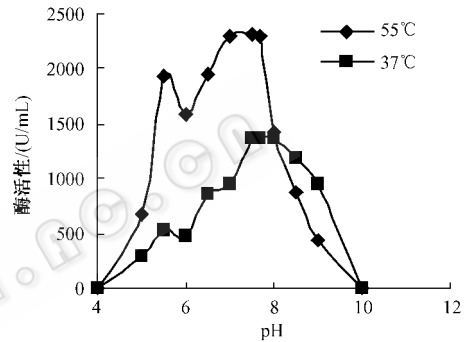


图4 中性植酸酶的最适 pH

植酸酶在一系列不同 pH 缓冲液中 37℃ 处理 30min 后,再在标准条件下测酶活性,结果如图5所示,在 pH6~9 范围内,剩余酶活性维持在 90% 以上,而 pH < 6.0 和 pH > 11 时,酶活性迅速下降,说明此酶在中性范围内稳定,不耐酸和碱。

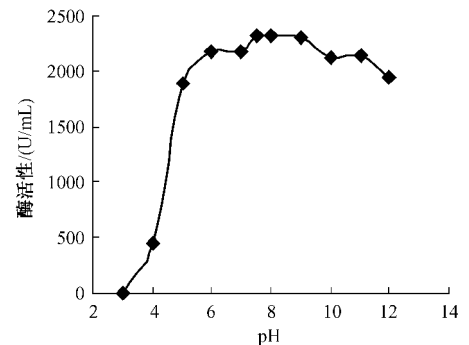


图5 中性植酸酶的 pH 稳定性

2.5 产酶条件研究^[2,12]

在 150r/min, 37℃ 下,分别对培养温度(20℃、25℃、30℃、35℃、40℃、45℃、55℃、60℃、65℃、70℃)培养初始 pH 值(5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0)培养时间(5h、10h、15h、20h、25h、30h、35h、

40h、45h、50h)和接种量(5%、10%、15%、20%、25%菌液)这几个影响产酶量的产酶条件进行单因素试验。培养后静置 10 min,取上清液,冷冻离心 20min后,取粗酶液测酶活,结果分别见图 6~图 9。

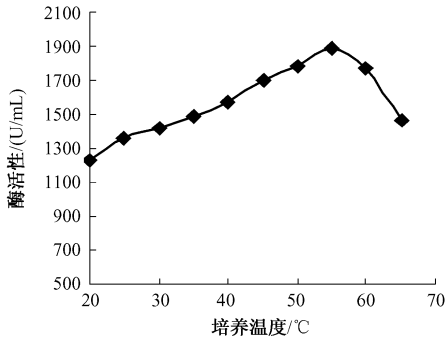


图 6 培养温度对植酸酶活性影响

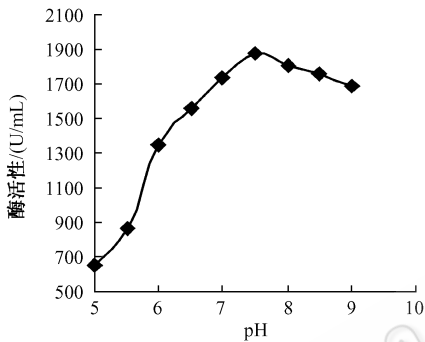


图 7 培养 pH 对植酸酶活性影响

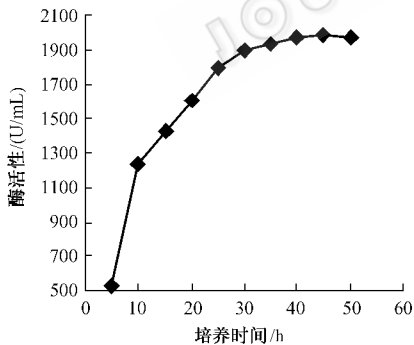


图 8 培养时间对植酸酶活性的影响

由图 6 可见培养温度对植酸酶产量有较大的影响。刚开始,随着温度的升高,植酸酶产量也增加;至 55℃时,植酸酶产量最大,达到 1885.7U/mL;温度继续升高时,植酸酶产量又呈下降趋势,因此,培养温度为 55℃时应该是较佳的产酶条件。

由图 7 可见培养初始 pH 值对植酸酶产量也有较大的影响。刚开始,随着 pH 值升高,植酸酶产量也增加;至 pH7.5 时,植酸酶产量最大;pH 值继续升高,植酸酶产量又呈下降趋势,因此,培养初始 pH

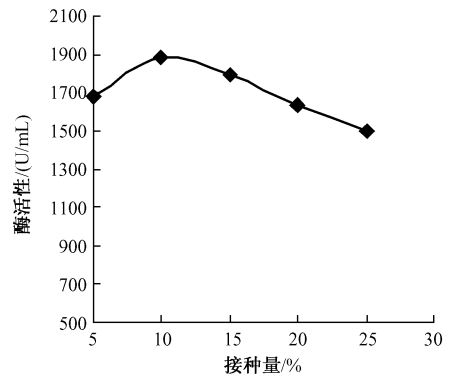


图 9 接种量对植酸酶活性的影响

值为 pH7.5 应该是较佳的产酶条件。

由图 8 可见培养时间对植酸酶产量的影响。刚开始,随着培养时间的延长,植酸酶产量也增加;至 35h 后,植酸酶产量达最大并渐趋平稳,说明以后延长培养时间对植酸酶产量影响不大,为节约成本,可取培养时间为 36 h 作为较佳的产酶条件。

由图 9 可见接种量对植酸酶产量的影响。接种量在 10% 时植酸酶产量最大,接种量过大或过小均使酶产量降低。因此,接种量为 10% 为较佳的产酶条件。

2.6 正交试验因素水平表的确定及正交试验的结果与分析

由上述影响地衣芽孢杆菌中性植酸酶产量的单因素结果分析可知,影响酶产量的主要因素为培养温度、培养初始 pH 值和接种量。选择这 3 个因素,用 L₉(3³)正交优化试验表进行 3 因素 3 水平试验,以确定影响酶产量的主要因素的影响次序以及各因素的最佳组合,结果如表 1 所示。

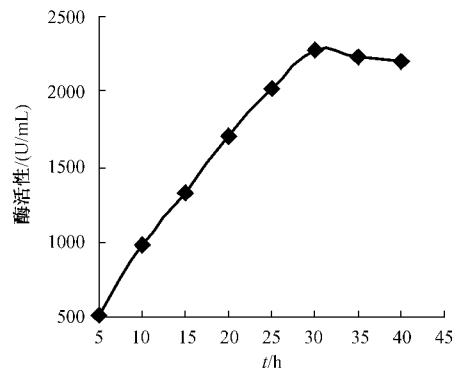


图 10 优化条件下的植酸酶活性

根据表 1 中植酸酶活性极差 R 的大小可以看出,在各因素选定的范围内,影响处理效果各因素的主次关系依次为:培养温度>接种量>培养

初始 pH ,即培养温度是最主要的影响因素 ,最佳培养条件组合是 培养温度为 55℃ ,接种量为 10% ,培养初始 pH 值为 7.5 ,植酸酶产量最高。因表 1 中无此试验项。为此 ,按此方案追加实验 ,结果如图 10。可见 ,培养 30h 后 ,酶活最高达到了 2268U/mL ,酶产量比优化前又提高了约 20% ,确实为最佳产酶条件。

表 1 植酸酶活性正交试验结果与分析

	因 素 水 平			酶活(U/mL)
	温度	pH	接种量	
1	53	7.2	7	1701.8
2	53	7.5	10	1842.8
3	53	7.8	13	1732.0
4	55	7.2	10	1888.2
5	55	7.5	13	1892.9
6	55	7.8	7	1817.7
7	57	7.2	13	1734.7
8	57	7.5	7	1759.0
9	57	7.8	10	1765.1
K ₁	5276.6	5324.7	5278.5	
K ₂	5598.8	5494.7	5496.1	
K ₃	5258.8	5314.8	5359.6	
K ₁ /3	1758.9	1774.9	1759.5	
K ₂ /3	1866.3	1831.6	1832.0	
K ₃ /3	1753.0	1771.6	1786.5	
R	113.4	60	72.5	

3 结论

采用 UV 对地衣芽孢杆菌进行产植酸酶诱变研

究 ,结果表明 经过 3 次反复诱变后 ,可以达到良好的产酶效果 ,结合形态观察法和硫酸亚铁-钼蓝法测酶活 ,获得了一株比原始出发菌株高 94.1% 的高产菌株 ,对该高产菌株在产酶培养基中转接 10 次 ,结果表明 :该菌株具有良好的遗传稳定性 ,可用于工业化生产。随后 ,通过单因素试验并进一步用正交试验对该高产菌株的发酵条件进行了优化研究 ,确定培养温度为 55℃、pH 为 7.5、接种量为 10% 时 ,经 30h 培养后 ,酶活最高可达到 2268.4U/mL ,酶产量比优化前又提高了 20%。

参考文献

[1] 褚西宁,裴武红,袁静明. 微生物杂志,1996,16(1):5 ~ 8.

[2] 赵允麟,金其荣. 食品与发酵工业,1996,3 :42 ~ 45.

[3] 陈红歌,苗雪霞,张世敏,等. 微生物通报,1997,24(5):272 ~ 274.

[4] 董生杰,张苓花,陈海昌. 大连轻工业学院学报,1999,18(4):283 ~ 288.

[5] 王尊生,王升厚,佟 泽. 微生物杂志,2001,21(1):59 ~ 61.

[6] 苗雪霞,贾新成. 菌物系统,1997,16(1):70 ~ 73.

[7] Turk M. J Cereal Sci, 1992,15 :281 ~ 294.

[8] 王亚茹,姚 斌,曾 虹,等. 微生物学报,2001,41(2):198 ~ 203.

[9] 姚 斌,袁铁铮,王元火,等. 生物工程学报,2001,17(1):11 ~ 15.

[10] 陈 艳,孙建义,赵学新,等. 食品与生物技术学报,2005,24(2):60 ~ 64.

[11] 黄秀梨. 微生物学实验指导. 北京 :高等教育出版社,1999. pp. 1 ,102.

[12] 程海娜,莫湘涛,陈 宇,等. 生命科学研究,2002,6(4):343 ~ 346.

[13] 张若寒. 中国饲料,1997,5 :30 ~ 32.