

变灰青霉固态发酵降解植酸的初步研究

褚西宁 王朝健 袁静明

(山西大学生命科学系, 太原 030006)

摘要 从发霉植酸钠溶液中分离到一株产植酸酶的变灰青霉(*Penicillium canescens*) P4。以麸皮: 玉米面: 黄豆饼粉 = 7 : 2 : 1 为主要培养基成份, 用优选法确定最适培养基为在上述基本培养基中添加 4% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1% 葡萄糖, 1.5 倍水, 自然 pH。发酵过程的动态分析表明, 该菌在上述条件下 28℃ 恒温培养 6d 后植酸降解率可达 90%; 无机磷含量由 0.13% 增至 0.57%; 可溶性蛋白含量由 3.80% 增至 7.60%。用 4% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 水溶液抽提固体发酵物, 植酸酶活性可达 3.12U / g 干曲。

关键词 变灰青霉, 固态发酵, 植酸, 植酸酶

植酸是谷物种皮及油料作物种籽中磷的主要贮存形式, 可占到总磷量的 80% 左右^[1]。如果被单胃动物直接摄入, 不但不能被吸收利用, 而且会因植酸负电性强, 可与体内 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Ca^{2+} , 消化酶类及蛋白质相结合而降低饲料的营养价值。另外, 未被消化的植酸经动物排出体外后易造成有机磷富积, 引起环境污染^[2]。因此, 植酸的去除不仅是饲料与食品工业的重要课题, 而且也是保护环境的重要措施之一。

去除植酸的方法虽然有很多种, 但以微生物酶降解法最为温和有效且不损害营养价值^[3]。我们选用以麸皮为主的混合培养基接种一株青霉, 研究了此菌株在固态发酵过程中对植酸的降解能力及产酶情况。

1 材料和方法

1.1 菌种

变灰青霉(*Penicillium canescens*) P4, 由本实验室分离, 纯化。鉴定和保藏。

1.2 培养基

平板分离与纯化培养基: 察氏琼脂培养基, 以 0.5% 植酸钙代替 K_2HPO_4 。

液体发酵培养基(%): 玉米淀粉 4, 葡萄糖 1, MgSO_4 0.05, KCl 0.05, FeSO_4 0.01, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5, K_2HPO_4 0.02, pH 自然。

斜面培养基: 马铃薯浸汁琼脂培养基

(PDA)。

液体种子培养基(%): 麦芽汁 20, 葡萄糖 2 酵母膏 0.3, pH 5~6。

固体培养基: 麸皮、玉米面、黄豆饼粉以 7 : 2 : 1 比例混匀, 添加 4% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1% 葡萄糖, 加水为料量的 1.5 倍, 自然 pH。

以上培养基均采用 $1 \times 10^5 \text{pa}$ 灭菌 30min。

1.3 产植酸酶菌种的筛选

将发霉植酸钠溶液按常规稀释涂平板法, 28℃ 恒温培养 3~4d, 挑取透明圈直径大的菌落至斜面保存。经再纯化镜检为纯种后, 将斜面菌种挑一环, 接入摇瓶培养基中, 置往复摇床(振幅 7.8cm, 转速 100r / min) 28℃ 恒温培养 5d, 测定酶活性后筛选出高酶活菌株用于固体发酵试验。

1.4 固体发酵条件

取斜面菌种一环接种于液体培养基中, 28℃ 恒温振荡培养 2d, 按 5% 接种量接入固体培养基中, 28℃ 恒温培养 6d。

1.5 分析方法

1.5.1 无机磷测定: 样品用蒸馏水浸泡 1h, 双层纱布过滤, 滤液经 1 2000r / min 离心 10min, 取上清液用钼蓝比色法^[4]定磷。

1.5.2 植酸测定:采用 Haug and Lantzsh^[5]法。称取 3g 样品浸泡于 25ml 3%TCA 中, 1h 后双层纱布过滤, 4000r/min 离心收集上清液。取 2.5ml 上清液加入 5ml 0.1% 硫酸铁铵溶液(用 3%TCA 配制), 沸水浴 30min 离心取上清液 2ml, 加入 3ml 1%2, 2'-双吡啶-巯基乙酸静置 5min 后于 519nm 读取 OD 值。以植酸钙按上法制作标准曲线。

1.5.3 蛋白质测定:采用 Lowry 法^[4], 以 BSA 作标准曲线。

1.5.4 酶液抽提及酶活测定^[6]:用 4%CaCl₂·2H₂O 溶液浸泡样品 1h, 双层纱布过滤, 4℃, 12000r/min 离心, 取上清液作为粗酶液。

取 0.1ml 粗酶液, 加入 0.9ml 0.2mol/L, pH5.4 的醋酸缓冲液及 1.0ml 0.1% 植酸钙溶液(用上述缓冲液配制), 37℃ 准确反应 30min, 用 2ml 10%TCA 中止反应。再取 1ml 反应液以钼蓝比色法定磷。

酶活定义: 在上述测定条件下, 每小时产生 1mg 磷所需酶量为 1u。

2 结果与讨论

2.1 菌种的形态及初步鉴定

察氏琼脂平板 25℃ 培养 14d 后, 菌落直径 21~23mm, 平坦, 呈绒毛状。菌落表面有细小的渗出水珠, 有轻微霉味, 呈河豚灰色, 背面呈浅褐色。帚状枝大多为单轮生, 少数为不规则分枝。梗基自基质或气生菌丝长出。单生, 顶端不膨大, 约 18~22×2~3μm。梗壁光滑; 瓶梗为柱形细胞, 2~6 轮生, 先端逐渐变窄。大小为 6~11×1.5~2.5μm。分生孢子球形或近球形, 壁光滑, 大小为 2.5~3μm。

根据常见与常用真菌青霉属系的检索表^[7], 初步鉴定此菌株属变灰青霉系(*Penicillium canescens*)。

2.2 原料比对植酸降解的影响

选用富含植酸的麸皮作为基础培养料, 同时以不同配比添加黄豆饼粉和玉米面, 以料: 水 = 1: 1, 28℃ 恒温培养, 6d 后测其无机磷含量, 以无机磷增量来衡量其植酸降解能力。结

果(表 1)表明选用麸皮: 玉米面: 黄豆饼粉 = 7: 2: 1 作为基础培养基较适合。

表 1 培养基原料比对植酸降解的影响

麸: 玉: 黄		3: 3: 4	4: 3: 3	5: 2: 3	6: 2: 2	7: 2: 1
磷 含 量	原料	0.958	1.160	1.201	1.282	1.326
	培养 6d 后	2.006	2.210	2.527	2.383	2.974
	磷增量	1.048	1.051	1.326	1.101	1.648

注: 磷含量指原料及培养 6d 后培养基中无机磷含量, 以 mg/g 表示

2.3 基本培养基添加其他诸因素对植酸降解的影响

为考察水分, 初始 pH 值, (NH₄)₂SO₄ 及葡萄糖等因素对植酸降解的影响, 我们采用正交表 L₉(3⁴) 进行如下正交实验。

表 2 正交实验因子水平表

因素与水平	水分: 原料	(NH ₄) ₂ SO ₄ (%)	葡萄糖 (%)	初始 pH
1	2	2	1	4
2	3	3	2	5
3	4	4	3	自然

正交分析结果表明, 水分为最重要因子, 依次为葡萄糖, pH, (NH₄)₂SO₄。表中最佳组合为 A₁B₃C₁D₃, 但从水分的影响趋势来看, 1 水平和 3 水平都较 2 水平好。因此在其它条件不变时研究水分对植酸降解的影响, 结果表明水分: 原料 = 1.5 时效果较好。

表 3 水分对青霉降解植酸的影响

原料: 水	1: 1	1: 1.2	1: 1.5	1: 1.8	1: 2	1: 3
无机磷增量 (mg/g 干曲)	2.384	2.976	3.141	2.869	2.868	2.361

经上述优选, 最适培养基为:

麸皮: 玉米面: 黄豆饼粉 = 7: 2: 1, 4% (NH₄)₂SO₄, 1% 葡萄糖, 料: 水 = 1: 1.5, pH 自然。

2.4 发酵过程的动态分析

植酸含量在第7d基本趋于平衡,这与固体培养基中无机磷含量在7d后达到平台区是一致的。测定期间,培养基pH值基本不变,而湿度在1~6d内稍呈上升趋势,与Han^[8]等报道一致。经发酵,该青霉对固态料的植酸降解达92%以上,可溶性蛋白含量由3.8%增至7.6%。

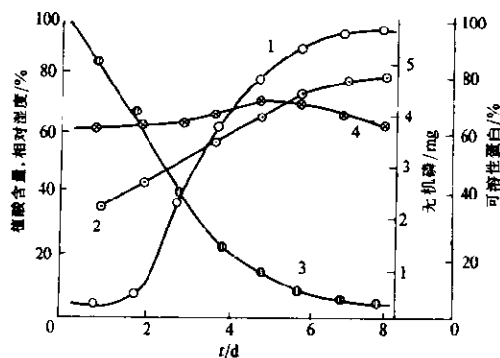


图1 变灰青霉固态发酵过程的动态分析

1.无机磷, 2.可溶性蛋白, 3.植酸含量, 4.相对湿度

2.5 Ca^{2+} 对固体曲抽提液酶活力的影响

在固态发酵过程中,基本培养基中植酸盐被降解后会产生大量无机磷,而高浓度无机磷会抑制酶活力^[9]。我们选用 CaCl_2 溶液浸泡抽提固体曲以排除无机磷对酶活测定的干扰。经选用不同浓度 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶液对不同生长期的样品进行抽提,酶活结果见表4。

由此可初步判定,该菌株在固体培养基中,酶活力在第6d达到高峰,至第7d开始出现异常。第5~6d时氯化钙的加入量与系统中无

机磷量成一定相关性。酶活高峰期用 $4\% \text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 抽提较理想。

Nair等报道无花果曲霉固体发酵6d可完全降解棉籽壳中的植酸^[9]。Harland等用啤酒酵母的三个菌株降解面包团中的植酸,发现降解效果与菌株有关,降解率在34%~75%之间^[10]。我们筛选的这株青霉菌在培养6d后可降解原料植酸(含量3.8%)的92%以上。用固体发酵料饲喂小白鼠,一个月后与对照组相比未发现异常。

表4 氯化钙浓度对抽提液酶活(u/g干曲)影响

t/d	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}(\%)$					
	0	1	2	3	4	5
5	1.590	2.139	2.200	2.688	1.481	—
6	2.050	2.169	2.603	2.734	3.124	2.115
7	0.596	2.218	1.390	1.357	0.298	—

参考文献

- [1] Lolas M M J Food Sci. 1977, 42(4): 1094~1097
- [2] Zyta k. J Microbial of Biotechnol. 1992, 8: 467~472.
- [3] Youn W H. J Agric Food chem. 1988, 36: 259~262.
- [4] 张龙翔,张庭芳,李令媛.生化实验方法与技术.北京:高等教育出版社,1987,221,164.
- [5] Haug w. Lantzsch H J. J sci Food Agric. 1983, 34: 1423~1426.
- [6] Nair V C. Appl Microbiol Biotechnol. 1990, 34: 183~188.
- [7] 中国科学院微生物研究所常见与常用真菌编写组.常见与常用真菌.北京:科学出版社,1973,182~201.
- [8] Han Y W. J Ind Microbiol. 1987, 2: 195~200.
- [9] Nair V. J sci Food Agric. 1991, 54: 355~365.
- [10] Harland B F. Cereal Chem. 1980, 57(3): 226~229.

A PRELIMINARY STUDY OF PHYTATE DEGRADED BY SOLID STATE FERMENTATION OF *PENICILLIUM CANESCENS*

Chu Xining Wang Chaojian Yuan Jingming

(Department of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006)

Abstract A phytase-producing strain separated from the mildewed solution of sodium phytate was studied. The basic medium of solid state fermentation (SSF) is wheat bran: corn meal: bean cake powder = 7 : 2 : 1. The optimal medium from optimization should be added 1% glucose and 4% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ to the basic medium as well as the moisture is 150%. It shows from the dynamic data of SSF

that the degradation rate of phytate could be 90% at 28℃ after 6-d incubation, inorganic phosphorus and soluble protein are increased from 0.13% to 0.57% and from 3.80% to 7.60% respectively. Meanwhile, the activity of phytase is 3.12u / g(DW) when SSF culture is extracted with 4% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Key words *Penicillium canescens*, Solid state fermentation, Phytate degradation, Phytase