

# 对发酵生产植酸酶过程中植酸酶活性测定方法的初步探讨

杨平平 王 燕 史宝军 陶文沂

(江南大学生物工程学院生物制药室 无锡 214036)

**摘 要** 以钼蓝法、钼钒法,对标准磷溶液和发酵液中的植酸酶酶活进行了测定,并研究了影响测定结果的各个因素。结果表明,钼蓝法、钼钒法均可用于植酸酶酶活的测定,且同样有效,但钼钒法相对快速、简便。研究中同时发现,发酵过程中发酵液含有的无机磷远远大于酶活测定产生的无机磷含量,直接用发酵液测得的植酸酶酶活是不可靠的。文中采用发酵液透析后测定酶活,并修正了测定酶活的计算公式。

**关键词** 植酸酶,微板,透析,发酵,微生物

植物组织和相应的粮食产品中广泛存在着植酸极其盐类,植酸形式的磷不但不能被单胃动物所消化利用,还抑制多种营养成分的吸收和利用,因而被称为抗营养因子(antinutritional factor, ANF)。

植酸酶是催化植酸水解成肌醇与磷酸的一类酶的总称,广泛存在于自然界,但主要存在于植物和微生物中,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。近年来对以微生物发酵生产植酸酶的研究报道得很多,微生物发酵生产植酸酶取得了很大进展,并已在饲料和食品工业中得到应用。但目前植酸酶研究和开发过程中仍然存在发酵酶活低、酶活单位混乱、检测手段落后,测定结果误差大等一些问题。笔者研究发现,造成混乱的原因与植酸酶酶活的测定误差有一定关系,并对此进行了研究和探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 菌 种

黑曲霉为本实验室保藏。

#### 1.1.2 培养基

摇瓶培养基(%) : 葡萄糖 3.0,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0.2,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05,  $\text{KCl}$  0.05,  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.000 5,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.000 5,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.06, 植酸钙 0.5, pH 值自然。

微板培养基(%) : 葡萄糖 3.0,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0.2,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05,  $\text{KCl}$  0.05,  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.000 5,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.000 5, 植酸钠 0.6, pH 值自然。

#### 1.1.3 主要试剂

植酸钠(Sigma 公司产品), 植酸钙为化学纯, 其他试剂均为分析纯。

#### 1.1.4 主要仪器设备

HYG-II 回转式恒温调速摇瓶柜, LS-B50L 型立式圆形压力蒸气灭菌器, FA1004 电子天平, HH-4 数显恒温水浴锅, 751 分光光度计, 酶标仪(BIO RAD3550-uv), 恒温培养箱。

## 1.2 方 法

### 1.2.1 植酸酶酶活测定方法——钼蓝法

将 0.1 mL 酶液或 0.1 mL 灭活酶液为对照(对照也可以用无离子水)加入到 0.9 mL 含有 1 mmol/L 植酸钠的 0.25 mol/L pH5.5 的乙酸-乙酸钠缓冲液的比色管中, 在 37 ℃ 下恒温水浴反应 20 min, 再加入 1 mL 10% 三

氯乙酸(TCA), 2.5 mL 钼酸铵-硫酸, 0.5 mL 定磷试剂(ANS), 继续保温 40 min 后, 取出冷却, 于 660 nm 处测定 OD 值, 再通过钼蓝法测定磷的标准曲线计算出酶活。

### 1.2.2 钼钒法植酸酶酶活测定方法

将 10  $\mu$ L 酶液或 10  $\mu$ L 灭活酶液为对照, (对照也可以用无离子水)加入到 190  $\mu$ L 含有 1 mmol/L 植酸钠的 0.25 mol/L pH5.5 的乙酸-乙酸钠缓冲液的微板孔中, 加入 150  $\mu$ L MVN 定磷试剂, 于 405 nm 处测定 OD 值, 再通过钼钒法定磷的标准曲线计算出酶活。

酶活力单位: 在 37  $^{\circ}$ C, pH 5.5 的乙酸-乙酸钠缓冲液中每分钟释放 1  $\mu$ mol 的无机磷作为 1 个酶活力单位。

## 2 结果和讨论

### 2.1 两种方法标准磷溶液测定曲线

用钼蓝法和钼钒法分别测定不同浓度的标准磷溶液( $K_2HPO_4$ ), 其磷含量与吸光度的相互关系见图 1 和图 2。

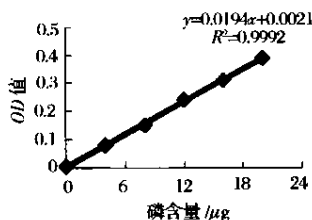


图 1 钼蓝法测定磷的标准曲线

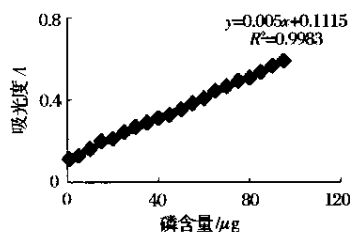


图 2 钼钒法测定磷的标准曲线

从图 1、图 2 可以看出, 2 种方法在标准磷( $K_2HPO_4$ )的测定时磷含量与吸光度均具有良好的相关性, 其相关系数分别为 0.999 2 和 0.998 3。说明这 2 种方法对微量无机磷的测定都是可行的。

### 2.2 发酵液对测定结果的影响

采用微板法培养含有植酸酶的菌种, 每 12 h 测定发酵液中无机磷含量(见表 1)。

表 1 发酵液无机磷含量与培养时间的关系

	发酵时间/h			
	12	24	36	48
发酵液无机磷含量/ $\mu$ g $\cdot$ mL $^{-1}$	174	435	595	1490

由表 1 可知, 随着发酵时间增加, 发酵液中无机磷含量增加, 发酵 48 h 后, 发酵液中无机磷含量已远远大于酶测定反应产生的无机磷含量。由于作为酶液的发酵液中无机磷含量远远大于酶测定时产生的无机磷含量, 因而酶液取样的微小差异将造成酶活测定结果的极大误差。

3 个菌种(496-1, 486-6, 5210)发酵 4 d 后, 以发酵液为酶液, 以灭活酶液作对照, 重复测定 5 次, 其测定结果经方差分析表明(见表 2), 试验间误差远远大于菌种间误差。这也表明以发酵液为酶液进行酶活测定是不可取的, 在已发表的文献中植酸酶酶活测定多以灭活酶液甚至无离子水作对照, 这将导致酶活的偏差及假酶活现象的产生。对发酵液的测定结果也表明直接用发酵液作为酶液测定酶活, 稳定性极差, 从本试验结果可以看出这种酶活测定方法需要改进。

### 2.3 透析液测定结果

发酵液 4 000 r/min 离心后去菌体, 在截留相对分子质量为 10 000 的透析袋用中 0.02 mol/L Tris-HCl(pH 7.0), 缓冲液透析, 不同时间发酵液中无机磷含量见表 3。

由表 3 可见, 透析 1 h 后发酵液中无机磷基本去除, 透析后体积相应有所增加 16%。

表 2 以发酵液为酶液, 以灭活酶液作对照

菌种酶活测定方差分析表				
	自由度 (df)	平方和 (SS)	均方 (MS)	F
菌种间误差	2	0.02	0.01	0.543 5
试验间误差	12	0.220 7	0.018 4	
总变异	14	0.240 7		

表 3 发酵液透析不同时间的结果

	透析 0.5 h	透析 1 h	透析 2 h	透析 3 h
酶液中无机磷含量 / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	3.6	0	0	0
体积(原液)/%	104	116	123	129

对透析 1 h 与未透析的发酵液进行酶活测定,结果见表 4。由表 4 发现透析前后酶活

表 4 去无机磷和未去无机磷发酵液酶活的测定结果

	重复 1	重复 2	重复 3	重复 4	重复 5	变异系数 cv/%
透析后 496-1 发酵液吸光度(A)	0.355	0.345	0.352	0.353	0.347	0.045
未透析 496-1 发酵液吸光度(A)	0.003	0.127	0.005	0.364	-0.015	43.9

## 2.4 反应时间和温度对结果的影响

从不同反应时间和温度条件下,用钼蓝法和钒钼法测定 486 菌株酶活的结果(见表 5)可见,反应时间和温度显著影响钼蓝法的结果,钒钼法基本不受时间和温度的影响。钼蓝法酶反应既需要 TCA 加以终止,颜色反应又需要较严格的反应温度和时间;钒钼法无需添加酶反应的终止物,且对反应时间和温度不敏感,针对植酸酶菌种筛选需要大批量检测这一特点,钒钼法基本符合快速、有效的要求。

表 5 反应时间、温度对测定结果的影响

	温度/ $^{\circ}\text{C}$	吸光度 反应时间/min			
		1	5	10	40
钼蓝法	25	0.313	0.394	0.441	0.462
	65	0.364	0.457	0.463	0.464
钒钼法	25	0.284	0.282	0.285	0.282
	65	0.283	0.286	0.284	0.284

注:钼蓝法和钒钼法测定尽管吸光度不同,但其测得酶活基本一致

## 3 小 结

(1)植酸酶的测定以植酸酶反应的产物磷酸或磷酸盐为依据。实验表明,钼蓝法和钒钼法两者对微量无机磷的测定均有效。但同时也发现钼蓝法对反应时间和反应温度都有一定要求,而且钼蓝法对植酸酶的测定过程还需要酶反应终止液,增加了操作过程。钒钼法采用的颜色反应液既是酶反应终止液,且其颜色反应不受时间和温度限制,操作

有极大差异,发酵液去除无机磷后酶活测定稳定性大大提高,这也表明发酵液中无机磷对酶活测定有严重干扰,以发酵液为酶液测定酶活时去除无机磷很有必要。去除无机磷后测定的酶活其酶活计算公式为  $X\% = \text{测定酶活} \%(100 + \text{透析增加量}) \div 100 \div \text{反应时间} \div \text{酶液毫升数}$ 。

简便且稳定可靠,基本上达到植酸酶测定快速、有效的目的。

(2)植酸酶反应的产物是磷酸或磷酸盐,无机磷又是微生物菌种生长所必须的元素,不管是用无机磷或植酸钙为磷源进行发酵,底物中均积累了大量的无机磷。采用植酸钙为唯一磷源进行培养,通过对不同时间培养液中无机磷含量的测定,表明发酵 48 h 后发酵液中无机磷含量已远远大于酶测定反应所产生的无机磷的含量。而目前文献中对植酸酶的测定采用发酵液为酶液,以无离子水作空白对照或以培养液灭活后为空白对照进行测定,显然用无离子水作对照测定的其酶活大大高于实际酶活;而以培养液灭活后为空白对照应该也是不合适的,一是在大量无机磷中测定微量无机磷难以保证测定的正确性,二是发酵液取样的正常仪器误差的无机磷含量对于酶活测定中产生的无机磷将很大,实际工作中也发现用发酵液直接作为酶液测定酶活,测定结果试验间差异较大,极不稳定。

(3)发酵液经透析 1 h 后无机磷基本去除,用透析后发酵液进行酶活测定其试验重复间差异较小。因而用透析法消除发酵液中的无机磷干扰是保证酶活测定正确性的有利措施。此法酶活计算公式为  $X = \text{测定酶活} \times (100 + \text{透析增加量}) \div 100 \div \text{反应时间} \div \text{酶液毫升数}$ 。

(4)目前文献报道植酸酶酶活测定多以

发酵液为酶液,以无离子水或灭活发酵液为对照,势必造成酶活不稳定、甚至酶活远远低于实际酶活等问题,严重影响了饲料、食品工业的实际应用,同时也使部分研究结果失去了可靠性和真实性。另外目前文献报道植酸酶酶活使用没有标准,有的每毫升一纳克为一个植酸酶酶活单位,有的每毫升一毫克为一个植酸酶酶活单位,容易给消费者以误导,建议有关单位应该尽快制定相关标准,以利饲料、食品添加剂生产、研究工作正规,有序发展。

## 参 考 文 献

- 1 Bae H D et al. J Microb Methods, 1939, 39 :17 ~ 22
- 2 Chen C C. Biotechnol Tech, 1998, 12 :759 ~ 721
- 3 Cheng K J et al. US Patent 5,985,605, 1999, Nov. 16
- 4 Gargova S et al. Biotechnol Tech, 1997, 11(4): 221 ~ 224
- 5 Golovan G et al. Can J microbial, 2000, 46 :59 ~ 71
- 6 Howson S J et al. Microb Technol, 1983, 5 :377 ~ 382
- 7 Lissitskaka T B et al. Mikologiyal Fitopatologiya, 1999, 33(6): 402 ~ 405
- 8 Pandey A et al. Bioresource Technology, 2001, 77 :203 ~ 214
- 9 Wyss M et al. Environ Microbiol, 1999, 65(2): 367 ~ 373
- 10 杨平平,袁婀娜,史宝军等.第三次全国发酵工程学术讨论会文集.北京:中国轻工业出版社, 2002. 230 ~ 233
- 11 Yoon S J et al. Enzyme Microb Technol, 1996, 18 :449 ~ 454
- 12 赵允磷,金其荣.食品与发酵工业, 1996(3): 42 ~ 44

## Preliminary Study on Testing Methods of Phytase Activity during Phytase Produced by Fermentative Method

Yang Pingping Wang Yan Shi Baojun Tao Wenyi

(School of Bio-tech., Southern Yangtze University, Wuxi, 214036)

**ABSTRACT** Phytase activity in standard phosphorus and fermentation liquor was detected by molybdenum-blue method and molybdenum-vanadium method. Every factors which was effected on the detecting results were studied simultaneously. Results showed that above two methods could used to detect the phytase activity, and had a same effect, but molybdenum-vanadium method was a more quick and brief one. The inorganic phosphorus contents was much more than that produced from enzyme activiey detection which was discovered in above experiment, thus the phytase activity obtained from directly detected with fermentation liquor was not reliable. So the phytase activity was detected in fermentation liquor after dialysis, and the calculated formula of enzyme activity was corrected in this study.

**Key words** phytase, microplate, dialysis, fermentation, microorganisms



### 我国关于加强出口日本食品化妆品中曲酸检验有关问题的通知

曲酸用作食品添加剂,可起到保鲜、防腐、抗氧化作用,添加到化妆品中可有效地治疗雀斑、老人斑、色素沉着、粉刺等,因此被世界各国广泛应用。但是,近来的科学研究表明,曲酸具有致癌性。日本官方已作出决定,禁止将曲酸作为食品添加剂使用,禁止进口和生产含有曲酸的化妆品。为此,国家质量监督检验检疫总局通知如下:

(1) 各局将上述信息及时通知当地有关部门和向日本出口食品、化妆品的生产企业,不要将曲酸作为食品添加剂使用,并不得对日本出口含有曲酸的化妆品。(2) 各局要加强对出口日本食品、化妆品的检验和监督管理工作,加强出口日本食品化妆品中曲酸的检测和研究,及时向国家质量监督检验检疫总局食品安全局反馈在执行过程中出现的问题和建议。