

## 枯草芽孢杆菌中性植酸酶的纯化和酶学性质\*

王亚茹<sup>1</sup> 姚 斌<sup>1\*</sup> 曾 虹<sup>1</sup> 史秀云<sup>1</sup> 操时树<sup>1</sup> 袁铁铮<sup>1</sup> 范云六<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>中国农业科学院饲料研究所,<sup>2</sup>中国农业科学院生物技术研究所 北京 100081)

**摘 要:**从土壤中分离到了产中性植酸酶的枯草芽孢杆菌菌株并对所产植酸酶进行了分离纯化。此中性植酸酶的反应最适 pH 为 7.5, 最适温度为 55℃, 在 37℃ 下以植酸钠为底物的  $K_m$  值为 0.19 mmol/L, 植酸酶活性依赖  $Ca^{2+}$  的存在。酶蛋白的分子量大小约为 45 kD, 纯酶蛋白 N 端序列为 Lys-His-Lys-Leu-Ser-Asp-Pro-Tyr-His-Phe-Thr。

**关键词:** 枯草芽孢杆菌, 中性植酸酶, 酶学性质

**中图分类号:** Q55 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2001) 02-198-06

植酸酶(*myo*-Inositol-hexaphosphate phosphohydrolase, EC3.1.3.8)是可以将植酸水解为磷酸和肌醇的一类水解酶的统称。植酸酶作为一种新型的饲料添加剂的作用已得到广泛确证<sup>[1]</sup>。它一方面可有效地提高动物对饲料原料中磷的利用率 60%, 从而减少 70% 以上的饲料中添加的无机磷, 节约磷源, 降低饲料成本<sup>[2]</sup>; 另一方面可将动物粪便中的排磷量减少 40%, 减轻环境的磷污染<sup>[2]</sup>。同时, 它还能降低植酸磷的抗营养作用, 将被植酸螯合的  $Ca^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$  和  $Cu^{2+}$  等多种离子及蛋白质释放出来供动物利用, 并可为动物提供营养元素——肌醇, 因此对提高动物生产性能有重要意义<sup>[3]</sup>。

随着饲料工业的发展, 植酸酶已经成为饲料添加剂和酶制研究的热点。目前植酸酶的研究主要集中在酸性植酸酶的研究上<sup>[4]</sup>。多种酸性植酸酶基因已从不同微生物中得到了分离, 如 *Aspergillus niger* (*ficuum*)、*Myceliophthora thermophila* 和 *Talaromyces thermophilus* 等<sup>[5~9]</sup>。1995 年 Van Gorcomd 等<sup>[10]</sup>将酸性植酸酶基因 *phyA* 重组到黑曲霉中, 使植酸酶在重组菌株中的表达量达到了  $2.8 \times 10^5$  U/mL, 与天然植酸酶产生菌株相比有了大幅度的提高, 大大降低了植酸酶的生产成本。我国在国家“863”项目资助下, 生产酸性植酸酶的基因工程酵母也已研制成功<sup>[11]</sup>, 并已实现产业化规模生产。酸性植酸酶适合应用于胃 pH 值呈酸性的单胃动物畜禽及少数鱼类如虹鳟等, 但不适合应用于消化道为中性的鲤科鱼类, 目前, 对中性植酸酶的分子生物学、编码基因的分离克隆及表达、中性植酸酶在生产上的应用等方面还缺乏较深入的研究。

本文报道了产中性植酸酶的天然菌株的筛选、中性植酸酶的纯化及酶学性质研究。

\* 国家“863”高技术计划资助项目(101-03-05-01)

\*\* 联系作者

**作者简介:** 王亚茹(1973—), 女(汉族), 山西太原人, 中国农业科学院饲料研究所研究实习员, 学士, 1997 年起在中国农业科学院饲料研究所从事饲料用酶制剂生物技术方面的研究。

**收稿日期:** 2000-05-25, **修回日期:** 2000-07-24

# 1 材料和方法

## 1.1 产中性植酸酶菌株的筛选

土样按常规稀释后涂布于细菌营养肉汁平板(1%蛋白胨、0.3%牛肉膏、0.5% NaCl、1.5%琼脂, pH7.0)上, 28℃培养 2~3d, 挑取菌落转接到含植酸钙的筛选平板(2%葡萄糖、0.2% CaCl<sub>2</sub>、0.5% NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>、0.05% KCl、0.05% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、0.001% FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、0.001% MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O、0.1%植酸钙、1.5%琼脂, pH7.0)上, 30℃培养 3d, 挑取产生透明消解圈的菌株。

## 1.2 中性植酸酶的产生及纯化

挑取菌株接种于细菌营养肉汁培养基中, 30℃摇瓶培养过夜, 按 10%接种量接种于 1L 产酶培养基 WBE[100g 麸皮加到 900mL 水中, 121℃处理 60min, 8 层纱布过滤, 滤液定溶到 1L, 加入 0.4g(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.2g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、0.05g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.04g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、2g CaCl<sub>2</sub>、10g Casitone、1.5%琼脂, pH6.5]中, 于 30℃下 300r/min 摇瓶培养 4 d, 每 12 h 取 5mL 培养液, 离心去菌体, 上清液用于酶活性测定。

酶活性标准测定方法如下: 0.2mL 的酶稀释液加入 0.8mL 1.25mmol/L 的植酸钠[用含 1mmol/L CaCl<sub>2</sub> 的 0.25mmol/L Tris-HCl(pH7.5)配制], 37℃保温 30min, 加入 1mL 10% TCA 终止酶活反应, 然后加入 2mL 硫酸亚铁-钼酸铵显色液, 700nm 测定无机磷含量。对照为先在 0.2mL 的酶稀释液中加入 1mL TCA 使酶失活, 再加入同体积的底物保温。酶活性单位(U)定义为: 在一定条件下, 每分钟释放出 1μmol 无机磷所需的酶量为一个酶活性单位。

中性植酸酶的纯化在 4℃下完成。培养 4d 后的培养液 10 000r/min 离心 20min 去菌体, 上清液中加入 CaCl<sub>2</sub> 至终浓度 1mmol/L, 加入 3 倍体积无水乙醇, 混匀后 -20℃过夜, 1 800g 离心 20min, 沉淀用 -20℃乙醇洗两次, 冷冻干燥后重新溶解在 100mL 含 1mmol/L CaCl<sub>2</sub> 的 Tris-HCl(pH7.5)缓冲液中, 缓慢加入硫酸铵至饱和度 65%, 4℃过夜, 9 000g 离心 60min, 取上清液, 加硫酸铵至饱和度达到 85%, 4℃过夜, 9 000g 离心 60min, 弃上清液, 沉淀溶于 1mL 含 1mmol/L CaCl<sub>2</sub> 的 Tris-HCl(pH7.5)缓冲液中。植酸酶蛋白进一步用 HPLC(ÄKTA FPLC Pharmacia 公司)纯化。含酶的浓缩液首先用 HiPrep-26/10-Desalting 柱脱盐, 缓冲液为 20mmol/L Tris-HCl(pH7.0), 流速为 5mL/min, 收集洗脱峰, 用离子交换柱 Hitrip-SP-Sepharose-XL(5mL)分离, A 泵为 20mmol/L Tris-HCl(pH7.0), B 泵为 1mol/L NaCl、20mmol/L Tris-HCl(pH7.0)高盐缓冲液, 流速为 2mL/min, 高盐缓冲液从 0~100%梯度洗脱 10 个柱床, 分部收集洗脱峰, 通过酶活性测定后的洗脱峰进一步用凝胶柱 Superdex-75-HR-10/30 纯化, 缓冲液同样为 20mmol/L Tris-HCl(pH7.0), 流速为 0.5mL/min, 收集洗脱峰得到纯蛋白。

## 1.3 中性植酸酶的酶学性质分析

1.3.1 中性植酸酶的最适 pH 和 pH 稳定性: 经纯化的植酸酶在不同的 pH 值下进行酶促反应以测定其最适 pH。底物植酸钠用不同 pH 的含 1mmol/L CaCl<sub>2</sub> 的 0.2mmol/L 缓冲液配制(pH1.0、pH2.0 为 HCl-KCl 缓冲液; pH3.0 为 HCl-甘氨酸缓冲液; pH4.0、5.0、5.6 为 HAc-AaAc 缓冲液; pH6.0、6.4、6.8 为 Tris-Maleate 缓冲液; pH7.2、7.5、8.0、8.6、

9.0 为 Tris-HCl 缓冲液;pH10 为甘氨酸-NaOH 缓冲液),37℃ 和 55℃ 下测定酶活性。中性植酸酶于上述各种不同 pH 的缓冲液中 37℃ 处理 30min, 再在 Tris-HCl(pH7.5)缓冲液体系中 37℃ 下测定酶活性, 以研究酶的 pH 稳定性。

1.3.2 中性植酸酶的最适温度及热稳定性: 中性植酸酶的最适温度的测定为在 Tris-HCl (pH7.5)缓冲液体系及不同温度下进行酶促反应。耐温性测定为中性植酸酶在不同温度下处理 60min 和 120min, 再在 37℃ 下进行酶活性测定。

1.3.3 中性植酸酶的  $K_m$  值测定: 用不同浓度的植酸钠底物, 在 Tris-HCl(pH7.5)缓冲液体系中, 37℃ 下测定酶活性, 计算出其在 37℃ 下的  $K_m$  值。

1.3.4 中性植酸酶的底物特异性测定: 以不同的磷酸化合物为底物, 测定其酶活性。

1.3.5 阳离子对中性植酸酶活性的影响: 在酶促反应体系中加入不同的阳离子, 研究不同阳离子对酶活性的影响。

2 结果和分析

2.1 菌株的筛选

根据在含有植酸钙的筛选平板上形成的透明消解圈(图 1)粗筛到分泌植酸酶的菌株 8 株, 并对这些菌株进行了进一步分离纯化。为了从中筛选到在中性条件下具有高植酸酶活性的产生菌株, 这些菌株在液体产酶培养基中培养 3d, 培养液经稀释后在 pH 值为

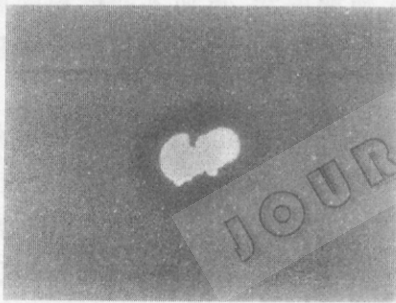


图 1 *Bacillus subtilis* 983 在含植酸钙平板上形成的透明水解圈  
Fig. 1 The hydrolysis bound resulted by *Bacillus subtilis* 983 in plate containing clacium phytate

7.5(Tris-HCl 缓冲液)的酶促反应体系条件下测定其酶活性, 结果发现有 3 株在此条件下有可检测的酶活性, 其酶活性单位分别为 0.8、1.1 和 2.0U/mL 培养液。经生理生化鉴定, 此 3 株菌为枯草芽孢杆菌, 分别定名为 *Bacillus subtilis*981, *Bacillus subtilis* 982 和 *Bacillus subtilis* 983。因 *Bacillus subtilis* 983 分泌植酸酶较稳定且分泌量相对较大, 被选为进一步研究的材料。

2.2 中性植酸酶蛋白的纯化

在纯化过程中的乙醇沉淀、65% 硫酸铵沉淀、85% 硫酸铵沉淀和 HPLC 纯化等各步骤中进行酶活性测定, 结果见表 1。纯化完成后植酸酶蛋白的含量为 362U/mL, 比活性为 150.8U/mg。SDS-PAGE 结果(图 2)表明, 纯化后的植酸酶蛋白仅有一条单一的条带(因未经纯化的培养上清液中植酸酶含量太低, 故带不明显), 中性植酸酶的分子量约为 45kD。

表 1 纯化植酸酶的比活性

Table 1 Specific activity of purified phytase

Enzyme sample	Volum /mL	Protein concentration /(mg/mL)	Specific activity /(U/mg)	Total activity /U	Recovery /%
Culture Supernatant	500	0.3	6.7	1012	100
Rediss. Ethanol precipitate	30	2.4	13.4	963	95

续表 1

Supernatant 65% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	33	0.2	92.0	607	60
Rediss. Pellet 85% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2	1.3	113.5	295	29
HPLC	0.5	2.4	150.8	181	18

2.3 中性植酸酶的酶学性质研究

2.3.1 酶的最适 pH 和 pH 稳定性:纯化的植酸酶在不同 pH 的缓冲体系、37℃ 和 55℃ 下测定的 pH 适性结果(图 3-a)表明,37℃ 时酶最适 pH 为 7.5,在 pH6.5~8.5 这一较宽的范围内,酶活性均在 95% 以上。55℃ 时最适 pH 变为 7.0,与 37℃ 下测定的结果相比,在 pH7.0~7.5 这一范围以外,酶活性下降较快。无论是 37℃ 还是 55℃,pH 在 4.0 以下和 10.0 以上,均检测不到酶活性。植酸酶在一系列不同 pH 缓冲液中 37℃ 处理 30min 后,再在标准条件下测定其酶活性,结果表明(图 3-b),在 pH6~12 的范围内,剩余酶活性维持在 90% 以上,而 pH 低于 6.0 时,酶活性迅速下降,到 pH3.0 以下,已无酶活性,这说明此具有很好的耐碱性,但不耐酸。

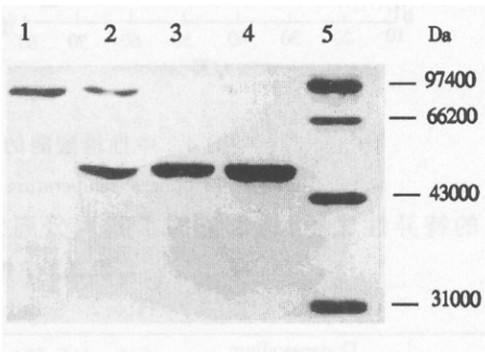


图 2 中性植酸酶的 SDS-PAGE  
Fig.2 SDS-PAGE analysis of neutral phytase  
1.Culture supernatant; 2. Phytase after 85% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> purification; 3, 4.Phytase after HPLC purification; 5.Standard protein molecular weight.

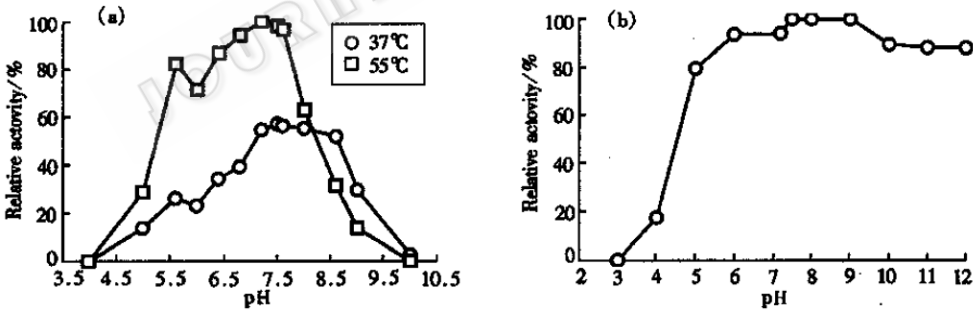


图 3 中性植酸酶的最适 pH(a)和 pH 稳定性(b)  
Fig.2 The optimal pH(a) and pH stability (b) of neutral phytase

2.3.2 酶反应最适温度及热稳定性:酶反应最适温度测定结果(图 4-a)表明,其最适温度为 55℃。酶的热稳定性试验表明(图 4-b),55℃ 处理 60min 和 120min 后,剩余酶活仅有 50% 左右,60℃ 下处理 60min 后,酶活性丧失了近 90%,处理 120min 后酶活性基本上完全丧失。

2.3.3 酶的 K<sub>m</sub> 值:此植酸酶在 37℃ 下以植酸钠为底物的 K<sub>m</sub> 值为 0.19mmol/L。

2.3.4 酶的底物特异性:以植酸钠作为底物时的酶活性为 100%,其它的磷化合物作为底物时的酶活性见表 2。结果表明,以 ATP 和 ADP 为底物时酶的相对活性分别为 52% 和 74%,别的 5 种底物均未有可检测的酶活性,这说明,此酶的底物特异性很强,植酸是

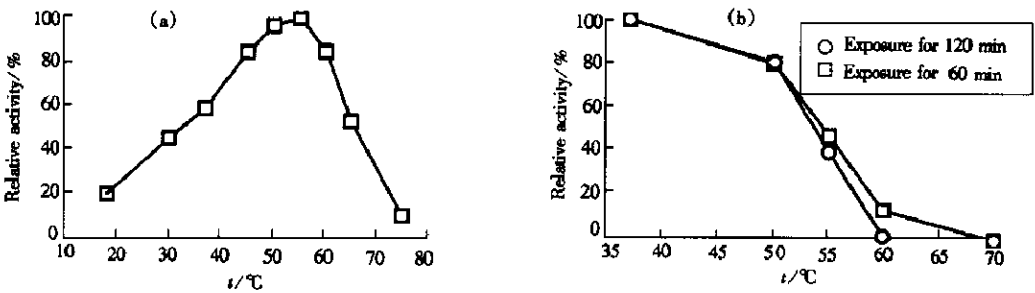


图 4 中性植酸酶的最适反应温度(a)和热稳定性(b)

Fig. 4 The optimal temperature (a) and thermal stability (b) of neutral phytase  
它的特异性底物,这也证明了我们分离到的这种酶是植酸酶。

表 2 中性植酸酶的底物特异性

Table 2 Substrate specificity of neutral phytase

Substrate	Dodecasodium phytate	ADP	ATP	AMP	$\beta$ -glycero-phosphate	D-glucose-6-phosphate	p-nitrophenyl-phosphate	Fructose-1,6-phosphate
Relative activity/%	100	74	52	0	0	0	0	0

2.3.5 阳离子对植酸酶活性的影响:酶反应体系中加入不同浓度的  $\text{Ca}^{2+}$ , 结果表明,反应体系中无  $\text{Ca}^{2+}$  时,检测不到酶活性,随着  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的提高,植酸酶活性逐步提高, $\text{Ca}^{2+}$  浓度达到 1mmol/L 时,酶活性达到最高值,再增加  $\text{Ca}^{2+}$  浓度,酶活性无显著变化。这一结果说明来源于枯草芽胞杆菌的这种中性植酸酶的生物学活性依赖  $\text{Ca}^{2+}$  存在。 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  和  $\text{Zn}^{2+}$  等金属离子对酶活性均有不同程度的抑制作用,其中 1mmol 的  $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  和  $\text{Zn}^{2+}$  抑制作用较为强烈,其剩余酶活性均在 60% 以下。

2.4 中性植酸酶蛋白的 N 端氨基酸序列

经氨基酸序列测定,纯化后的植酸酶蛋白的 N 端氨基酸序列为:Lys-His-Lys-Leu-Ser-Asp-Pro-Tyr-His-Phe-Thr。从这一部分氨基酸序列来看,与目前分离的来源于曲霉、酵母等真菌的植酸酶蛋白的 N 端氨基酸序列均无同源性,综合其分子量比真菌来源的植酸酶蛋白小得多这一事实,说明它可能是另一类新的植酸酶。

3 讨论

我们根据鲤科鱼类的消化道无胃而只有 pH 值呈中性的肠道这一特性,首次提出在鲤科鱼类的饲料中应使用中性植酸酶。鲤科鱼类的肠道的 pH 值在 6.5 到 8.5 的范围内,是植酸酶的主要作用场所,因而适合于在其饲料中使用的植酸酶应在这一 pH 范围内具有较高的酶活性,我们分离到的来源于枯草芽胞杆菌的植酸酶的最适 pH 为 7.5,具备了在鲤科鱼类饲料中使用的基本特性。从进一步利用此酶对鲤鱼的初步动物试验结果(资料未显示)来看,它具有良好的饲喂效果,这不但证明了我们分离到这一中性植酸酶适合于在鲤科鱼类的饲料中使用,而且也说明在鲤科鲤鱼中使用中性植酸酶这一新思路是可行、有效的。

从理论上推断,中性植酸酶也可与酸性植酸酶配合使用于单胃畜禽动物,酸性植酸酶

主要在动物酸性的胃中起作用,而中性植酸酶则可在 pH 值逐渐升高至中性的肠道中起作用,这样将延长植酸酶在整个动物胃肠道中的作用时间、提高其有效性。但其效果还需进一步通过试验证实。

目前,此中性植酸酶的编码基因已成功克隆并在大肠杆菌和毕赤酵母(*Pichia pastoris*)中得到了高效表达,表达产物具有正常的生物学活性,详情将另文报道。

## 参 考 文 献

- [1] Peers F G. *Biochem J*, 1953, **53**:102~107.
- [2] Nelson T S. *Poult Sci*, 1967, **46**:862~871.
- [3] Sharma C B, Goel M, Irshad M. *Phytochemistry*, 1978, **17**:201~204.
- [4] 姚 斌, 范云六. *生物工程学报*, 2000, **16**(1):1~5.
- [5] Piddington C S, Houston C S, Paloheimo M, et al. *Gene*, 1993, **133**:55~62.
- [6] Van Hartingsveldt M, Van Zeijl C M J, Harteveld G M, et al. *Gene*, 1993, **127**:87~94.
- [7] 姚 斌, 张春义, 王建华, 等. *农业生物技术学报*, 1998, **6**(1):1~6.
- [8] Mitchell D B, Vogel K, Weimann B J, et al. *Microbiology*, 1997, **143**:245~252.
- [9] Pasamontes L, Hailer M, Henriquez-Huecas M, et al. *Biochim Biophys Acta*, 1997, **1353**(3):217~223.
- [10] Van Gorcom R. F. M. US Patent 5436156, 1995.
- [11] Bin Y, Chunyi Z, Jianhua W, et al. *Science in China*, 1998, **41**(3):330~336.

## PURIFICATION AND PROPERTIES OF NEUTRAL PHYTASE FROM *BACILLUS SUBTILIS* \*

Wang Yaru<sup>1</sup> Yao Bin<sup>1</sup> Zeng Hong<sup>1</sup> Shi Xiuyun<sup>1</sup>

Cao Shishu<sup>1</sup> Yuan Tiezheng<sup>1</sup> Fang Yunliu<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Feed Research Institute, <sup>2</sup>Biotechnology Research Center, Chinese Academy of  
Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

**Abstract:** A strain *Bacillus subtilis* producing neutral phytase was screened from soil. The protein of phytase was purified by HPLC. Optimal pH value and temperature of the phytase for its activity were 7.5 and 55°C, respectively. The  $K_m$  values of the phytase for dodecasodium phytate under 37°C was 0.19mmol/L. The molecule weight of the phytase protein was determined as about 45kD by SDS-PAGE. The N-terminal amino acids sequence of the phytase protein was determined as Lys-His-Lys-Leu-Ser-Asp-Pro-Tyr-His-Phe-Thr by amino acids sequence analysis.

**Key words:** *Bacillus subtilis*, Neutral phytase, Enzyme properties

\* Project supported by the "863" program (Project Number:101-03-05-01), National Science and Technology Commission, China