

植酸酶对大豆中植酸降解作用的研究^{*}

张梅申¹ 沈爱光² 熊晓辉² 沈 昌²

(1 河北省农林科学院 石家庄 050051 2 南京农业大学食品科技学院 南京 210095)

摘 要

以植酸钙作为唯一的磷源,从无花果中分离到一株产植酸酶的菌株,利用该菌株液体发酵所得到的粗酶处理脱脂大豆粉,30℃下反应 90 分钟,植酸(盐)降解率过 75%,处理液中可溶性蛋白质含量由 0.167 mg/ml 增加到 12.1 mg/ml

关键词 植酸酶;大豆;植酸

大豆作为我国主要的粮油食品,是我国人民蛋白质的主要来源之一。但大豆中含有一种抗营养成分—植酸(盐)却罕为人知,其含量高达 17.9 mg/g 干重。植酸又称为肌醇六磷酸,具有强大的络合能力,通常与大豆中的钙、镁、锌和钾等矿物质络合^[1],形成不溶性的盐类化合物,同时在低 pH 值时还与蛋白质分子上的碱性的基团结合,使蛋白质沉淀,形成蛋白质—金属—植酸盐三种成分的络合物,这种络合方式一方面降低了蛋白质的吸收利用,另一方面使部分酶如淀粉酶^[2]活性受到抑制甚至失活,所以植酸的存在降低了大豆中蛋白质、微量矿物质的营养效价。据文献报导,某些微生物中含有植酸酶,植酸酶能将植酸水解,从而破坏它的抗营养作用,本文利用发酵法得到植酸酶后对大豆中抗营养成分植酸的降解作用进行了详细的研究。

材料和方法

1 材料

1.1 菌株来源 作者自己筛选

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基 PDA^[3]: 马铃薯 200g 葡萄糖 20g 琼脂 20g 去离子水 1L, pH 值自然,121℃灭菌 30 分钟

1.2.2 液体种子培养基: 淀粉 80g 葡萄糖 30g NaNO₃ 8.6g 玉米浆 2g MgSO₄·H₂O 0.5g KCl 0.5g FeSO₄ 0.1g KH₂PO₄ 0.2g 去离子水 1L, pH 值 5.0, 121℃灭菌 30 分钟

* 收稿日期 1998-06-02

Received on June 2, 1998

1.2.3 液体发酵培养基: 淀粉 80g 葡萄糖 20g NaNO_3 10g KH_2PO_4 0.2g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g KCl 0.5g FeSO_4 0.1g 去离子水 1L, pH 5.0, 121°C 灭菌 30分钟。

2 方法

2.1 菌株筛选 以植酸钙作为唯一磷源的选择性培养基,在 30°C 培养 96小时后,挑选出产生透明圈较大的菌株,并对透明圈较大的菌株进行琼脂平板表面单(孢)胞菌落挑取^[4-5],测定所获得的单(孢)胞纯种分离菌株的酶活,选择酶活较大的菌株为进一步供试菌株。

2.2 液体种子培养 将复筛所获菌株接种于液体种子培养基中, 30°C , 150rpm培养 36小时。

2.3 发酵试验

采用最佳培养基配方和发酵工艺条件于 30°C , 150rpm进行摇瓶培养。

2.4 酶液制备

发酵结束后,将发酵液过滤,得粗酶液。

2.5 酶活测定

采用 WO94/03612PCT/F193/00310法对粗酶液进行测定。

2.6 植酸酶对大豆中植酸的降解作用

准确称取过 40目筛的脱脂大豆粉 2.000g,加 10ml酶液(870pu/ml) 30°C 下分别保温 5, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105分钟,再加入 10ml去离子水混匀,过滤,取 0.5ml溶液定容到 50ml容量瓶中,取 1ml溶液测定可溶性蛋白质含量,以原酶液作对照,同时滤渣用来测定植酸含量。

2.7 测定方法

2.7.1 酶活力测定: 参见 WO94-03612PCT/F193/00310^[7]。

2.7.2 可溶性蛋白质含量测定: 考马斯亮蓝 G-250染色法^[8]。

2.7.3 植酸含量测定: 离子交换测定法^[10]。

2.7.4 生物量测定: 发酵液用滤纸过滤,滤纸上的菌体用清水反复冲洗,并放到 80°C 烘箱中烘 6个小时,然后称重。

结果与讨论

1 菌株筛选

能在植酸钙为唯一磷源的选择性培养基上产生透明圈的菌种有细菌、酵母菌和霉菌,经过在平板上反复筛选,仍能得到较大透明圈的细菌 1株,酵母菌 4株,霉菌 9株,并且从单(孢)胞所产生透明菌的直径大小来看(见表 1),霉菌的产酶能力大于其它菌株的产酶能力。摇瓶复筛(即酶活大小的测定)表明,接种霉菌 W-96(通过镜检菌落特征和个体形态特征,查阅曲霉属分群检索表,经初步鉴定为曲霉属中黑曲霉种群 *Asp Niger* Sp.)获发酵液其酶活最高,可达 870.87pu/ml,因此选该菌株为本试验测试菌株。

2 发酵试验

采用最佳培养基配方和最佳发酵条件,摇瓶接种后第二天开始取样测定,结果见图

1

表 1 初选 菌株情况

Table 1 The results of screening

菌名	菌株来源	培养时间 (h)	透明圈直径 大小 (cm)	备注
细菌 W ₁	无花果	24	0.2	在平板的反复筛选中逐渐失去了产酶能力
啤酒酵母 2001	保存菌种	96	0.053	
酿酒酵母 3	同上	96	0.042	
酿酒酵母 4	同上	96	0.067	
酵母 I	同上	96	0.035	
霉菌 T ₁	土壤	96	0.033	复筛后酶活最高并命名为 W-96 菌株
黑曲霉菌 M-85	保存菌种	96	1.093	
黑曲霉 M-35	同上	96	1.107	
黑曲霉 (淮)	同上	96	1.424	
米曲霉	同上	96	0.070	
霉菌 W ₂	无花果	96	0.967	
霉菌 W ₃	同上	96	0.852	
霉菌 T ₂	土壤	96	0.220	
霉菌 T ₃	土壤	96	0.552	

图 1 表明: 该菌株产酶量在第 8 天达到高峰, 而生物量在第 7 天达到高峰, 因此该菌株产酶量最高时间为发酵后第 8 天, 产酶高峰滞后于生物量高峰, 这是因为植酸酶为胞外酶, 胞外酶是穿过细胞膜后, 可能暂时为细胞壁所限制, 最后再扩散到环境中^[9], 因此出现了产酶高峰滞后于生物量高峰的现象。利用菌株的这种特性, 菌株培养到第八天时所得到的粗酶液作为降解大豆中植酸 (盐) 的酶源。

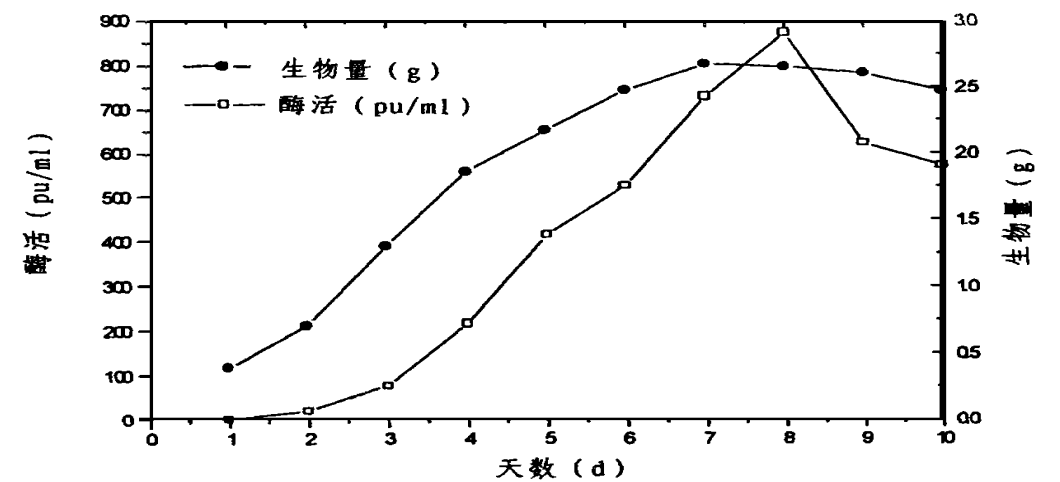


图 1 菌株的生长曲线和生物量

Fig. 1 The growth curve and biomass of the strain

3 植酸酶对植酸(盐)的降解作用

每克脱脂豆粉加 5ml 酶液 (870pu/ml) 进行处理, 结果见图 2

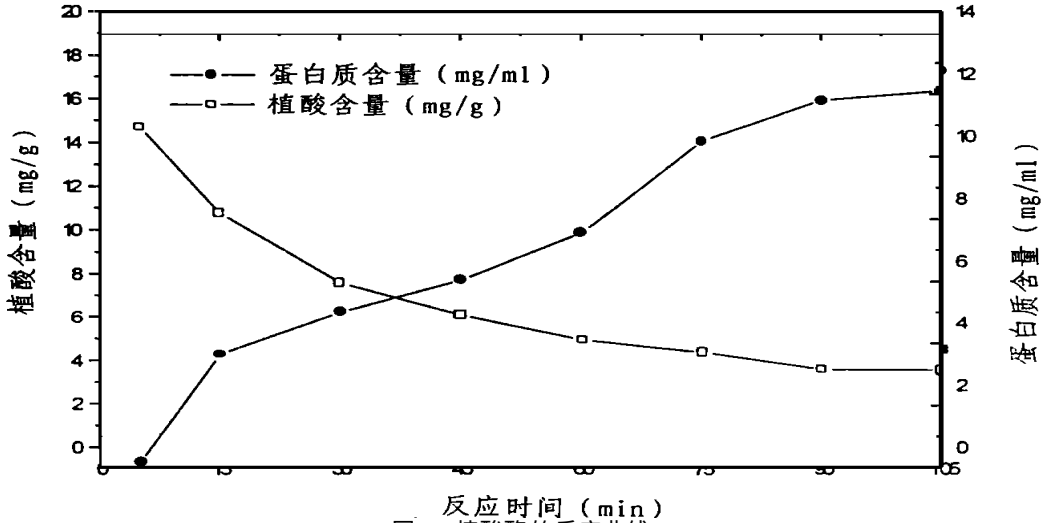


图 2 植酸酶的反应曲线

Fig. 2 The reaction curve of phytase

图 2 表明: 当酶作用 90 分钟时, 植酸降解已达 75%, 所以植酸酶对豆粉中植酸的降解率达 75% 以上, 同时处理液中可溶性蛋白质含量由原来的 0.167mg/ml 增至 12.1mg/ml, 这也说明了植酸的抗营养作用, 它可与部分蛋白质结合, 当植酸被降解的同时, 释放出结合在一起的蛋白质, 导致处理液中蛋白质含量的增加。

结 论

利用植酸钙作为唯一的磷源的选择性培养基上, 从发霉的无花果上筛选一产植酸酶菌株, 以该菌株进行液体发酵得粗酶液, 用该酶液作用于大豆粉, 使之植酸降解率达 75% 以上, 同时处理液中蛋白质含量由原来的 0.167mg/g 增至 12.1mg/g

参 考 文 献

- [1] 张梅申, 熊晓辉, 沈爱光, 1996, 农牧产品开发, (11): 33- 34
- [2] Lilian U. Thompson and Jane H. yoon. J. 1984, Food Sci., 49 1228- 1229
- [3] 尹光琳, 战立克, 1992, 发酵工业全书, 北京: 中国医药科技出版社, 534, 539
- [4] 诸葛健, 王正祥, 1994, 工业微生物试验技术手册, 北京: 中国轻工业出版社, 121- 214
- [5] 陈祥照, 1957, 微生物通报, (7): 213
- [6] 中国现场统计研究会农业优化组等, 1994, 农业正交设计法, 北京: 冶金工业出版社
- [7] WO94/03612PCT/F193/00310
- [8] (日) 菅原洁, 副岛正美著, 张旭译, 1981, 蛋白质的定量法, 北京: 农业出版社, 186- 189
- [9] (英) F. G. 普里斯特著, 1988, 细胞外酶, 北京: 科学出版社
- [10] 吕耀昌, 张玉良等著, 1990, 农作物子粒中植酸盐离子交换测定方法的研究, 作物品种资源, (2): 28- 31