

文章编号:1004-7271(2003)04-0359-04

·综述·

## 植酸酶开发应用研究进展

### Advance in production and application research of phytase

戈贤平<sup>1,2</sup>

(1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 江苏 无锡 214081;

2. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081)

GE Xian-ping<sup>1,2</sup>

(1. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;

2. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China)

关键词 植酸酶; 基因工程; 应用研究

Key words phytase; genetic engineering; application research

中图分类号:TS201.2\*5 文献标识码:A

植酸(Phytic acid)即肌醇六磷酸,是植物种子中肌醇和磷的主要存在形式,植酸磷占植物总磷量的60%~90%。由于单胃动物无内源植酸酶系,不能利用植酸磷,必需在日粮中添加无机磷酸盐,以满足动物对磷的需求,这不仅提高了饲料成本,且不能被消化吸收的有机磷随粪便排出体外,导致对土壤和水源的污染<sup>[1-2]</sup>。此外,植酸盐络合某些营养物质,降低其利用率,被认为是抗营养因子。研究表明,在中性条件下,植酸可与二价或三价阳离子络合成不溶性盐(如 $Ca^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ )使小肠的吸收力降低,植酸可与蛋白质形成络合物,影响蛋白质的利用;植酸可抑制消化酶(如胃蛋白酶、胰蛋白酶和 $\alpha$ -淀粉酶)的作用效果,这种抑制作用可能是由于植酸的络合作用减少了 $Ca^{2+}$ 离子数量,而 $Ca^{2+}$ 对胃蛋白酶和胰蛋白酶的作用极为重要。 $\alpha$ -淀粉酶的稳定性也需要 $Ca^{2+}$ 离子,也可能是植酸与酶作用底物作用的结果,这些负面作用也解释了植酸对蛋白质利用率的影响<sup>[3]</sup>。植酸酶(Phytase)是催化植酸及植酸盐水解成肌醇与磷酸(或盐)的一类酶的总称。植酸酶包括植酸酶和酸性磷酸酶,植酸酶有2种。植酸酶只能将植酸分解为肌醇磷酸酯,不能彻底分解成肌醇和磷酸,酸性磷酸酶能将肌醇磷酸酯彻底分解成肌醇和磷酸酯<sup>[4]</sup>。在饲料中添加植酸酶可降解植酸盐释放无机磷,提高动物对植酸磷的生物利用率,缓解植酸盐的抗营养作用<sup>[5]</sup>。

### 1 植酸酶的开发研究

二十世纪60年代始,植酸酶就有人研究过,但真正得到肯定并应用于实践是90年代的事情<sup>[4]</sup>。早期研究表明,植物、反刍动物、微生物(细菌、酵母和霉菌)都可产生植酸酶。但自然界中植酸酶产量最高的是真菌,其生产的植酸酶有pH值范围广、活性高、耐热性强等优点,是生产商品植酸酶的主要来源<sup>[5-6]</sup>。研究人员靠筛选和改良方法获得产酶量和酶活力高的菌株。如Nagshine<sup>[7]</sup>从黑曲霉SK-57中发现了一种植酸酶,对植酸有很大的亲和力,并经“四步提纯法”得到均一的酶制剂(该法1987年由美国科学家Ullah A H J发明)。我国苗春霞、贾新成<sup>[8]</sup>筛选出一株产植酸酶较强的根霉(Rhizopus sp.)。在

优化的培养条件下产酶量最高达 4000u/mL。在已发现的几十种植酸酶的来源中,Shiel 和 Ware<sup>[5,9]</sup>所筛选的无花果曲霉(*A. ficuum*)产生的胞外酶活性最高,含有 2 种植酸酶,即植酸酶 A(phyA)和植酸酶 B(phyB)。因此,该菌株成为各国实验室进行植酸酶研究的首选材料。Marisa KChelins<sup>[10]</sup>用紫外线照射法对无花果曲霉(*A. ficuum*)菌株进行改良,获得的突变菌株植酸酶产量为野生型的 3.3 倍。许尧兴<sup>[11]</sup>以无花果曲霉(*A. ficuum*)IFFI2227 为出发株,通过亚硝酸基胍和 Co<sup>60</sup>复合物处理,获得 5 株比出发菌株高 2.1~2.5 倍的高产菌株。但这些处理方法有着一定的随机性,随着生物技术的发展,研究人员致力于以下几个方面的研究。

### 1.1 将植酸酶基因与强启动子连接,使基因高效表达

Van Gorcom 等<sup>[5]</sup>将带有淀粉葡萄糖苷酶的启动子和无花果曲霉(*A. ficuum*)phyA 基因前导序列的 phyA 基因,克隆到 *A. niger* CBS533.88 中,产酶活性最高可提高到原来的 7.3 倍。Wim van Hartingsveldt<sup>[12]</sup>将克隆的黑曲霉多拷贝基因导入表达载体中,使产酶水平比野生型菌株提高了 10 倍。Ullah A H J<sup>[9]</sup>从无花果曲霉(*A. ficuum*)中提纯出 phyA 和 phyB,测得它们的一级结构,在此基础上利用基因工程技术在 1991 和 1993 年,分别得到了 phyA 和 phyB 的第一株工程菌。到 1996 年,植酸酶制剂工业化生产技术已经比较成熟,美国把饲用植酸酶商品投入了市场。Pasamontes 等<sup>[13]</sup>在 1997 年首次从真菌 *Aspergillus fumigatus* 克隆出耐高温植酸酶基因,经重组表达发现,此酶在 100℃高温处理 20min,酶的活力仅损失 10%左右,而且它作用的 pH 范围广,从 2.5 到 8 均可有效水解植酸。国内报道:姚斌等<sup>[14]</sup>从土壤中筛选到产植酸酶的黑曲霉菌株 *A. niger*963,其酶学特性适合于饲用,是我国第一株具有实用价值和应用前景的生产饲用植酸酶的基因工程菌株。黄遵锡等<sup>[15]</sup>克隆出黑曲霉植酸酶的基因,构建出一株基因工程酵母,在 30L 发酵罐中酶活性可达 1000u/mL 发酵液,加入豆饼对释放磷进行测定,与国外进口的商品酶比较没有显著差异。

### 1.2 改造植酸酶基因序列,改变酶学性质

根据分析比较众多植酸酶基因序列和三级结构数据,分析结构和作用的关系,进行基因定点突变,在分子水平上改造植酸酶基因,改变一些酶学性质如耐高温性、pH 适性、催化活性等,从而提高其在饲料中使用的有效性。Lehmann M 等<sup>[16]</sup>研究了植酸酶蛋白质序列,分析了三级结构与酶耐热性之间的关系。Tomschy A 等<sup>[17]</sup>研究表明 *A. fumigatus* 的 Gln27(相对于 *A. niger* 植酸酶的氨基酸位置)与它酶活性低有关,定点突变为 Leu(*A. niger* 植酸酶在此点为 Leu)后,酶活性从 26.5 增加到 92.1U/毫克蛋白质。Tomschy A 等<sup>[18]</sup>定点改变野生 *A. fumigatus* 株 Gly-277 和 Tyr-282 为 Lys 和 His 后,酶最适 pH 降低了 0.5 到 1.0。Mullaney E J 等<sup>[19]</sup>使用在 *A. niger* NRRL 3135 植酸酶基因第 300 氨基酸位点进行定点突变,结果在 37℃,pH4.0、5.0 处酶活力提高了 56%和 19%。

### 1.3 培育转基因植物

植酸酶基因工程的另一研究热点是培育转基因植物,使饲料本身含有丰富的植酸酶。大量的研究证明 *A. niger* 植酸酶能有效地在转基因植物如烟草、紫花苜蓿、大豆等中有效表达<sup>[20]</sup>,转植酸酶基因植物饲喂单胃动物的效果与外加植酸酶的效果一样有效<sup>[21,22]</sup>。Denbow et al.等<sup>[21]</sup>的动物喂养试验表明在肉鸡养殖中,与外加 0.16%无机磷的养殖组比较,添加转基因大豆 1200U 植酸酶可降低 50%磷释放,与添加微生物植酸酶的养殖组比较,磷的释放减少 11%,减少的释放说明了磷的消化吸收提高了约 10%。另外,储藏在种子的植酸酶具很好的热稳定性,将种子磨粉加工,室温下储存一年,植酸酶仍有很好的生物活性。Preben B 等<sup>[23]</sup>总结了把合适的植酸酶基因转入植物中,提高植物的微量元素,Fe<sup>3+</sup>、Zn<sup>2+</sup>等含量和利用率方面的工作。

### 1.4 转植酸酶基因动物的研究

Golovan SP 等<sup>[24]</sup>把植酸酶基因与动物唾液腺分泌蛋白的启动子连接,然后转到鼠中,建立了转植酸酶基因在单胃动物消化道表达是否能提高植酸的生物利用率的模型,结果表明植酸酶基因在唾液腺分泌,并最终使粪便中的磷降低了 11%。在此基础上,他们成功地建立了转植酸酶基因猪亦称“环保

猪”、“环保猪”的养殖实验证明除了在饲料中不需要添加无机磷外,粪便中磷的含量也降低了 75%,大大减轻了对环境的磷污染,并且粪便合适的氮磷比适合作为农田长期使用的肥料<sup>[25]</sup>。

## 2 植酸酶的应用研究

植酸酶的应用研究主要集中在畜禽养殖,对植酸酶在养鸡和猪上的研究较多,大量的研究确定了不同发育阶段鸡或猪所需添加的酶剂量<sup>[1-4]</sup>;对添加植酸酶后动物对有机磷的利用效率、减少磷污染<sup>[1-4,26]</sup>增加了微量元素的生物利用率,其中对钙、锌、锰的作用最明显<sup>[3,27,28]</sup>;改善动物生长性能<sup>[3,4]</sup>,有的研究还显示植酸酶能促进动物对蛋白质、氨基酸及碳水化合物的消化吸收<sup>[29,30]</sup>,但也有研究表明添加植酸酶对蛋白质的消化吸收无明显影响<sup>[31]</sup>。

植酸酶在水产上的使用晚于畜禽,国外科学家在虹鳟养殖中,添加植酸酶,可使总磷的消化率由 47.6% 增加到 71.1% 植酸磷的消化率由 22.3% 增加到 87.5%<sup>[32]</sup>。Schafer 等<sup>[33]</sup>用鲤作实验,在以大豆粉、鱼粉和大麦为基础原料,总磷含量为 7.2 g/kg 的饲料中添加 500 和 1 000 活性单位/kg 的植酸酶,结果鱼体增重和鱼体灰分含量显著提高,比不添加磷组和添加 2g/kg 磷酸二氢钙来源的磷组,磷的排泄量分别低 28% 和 25%。Cain 和 Garling<sup>[34]</sup>以虹鳟为实验对象,用经酶制品处理过的大豆粉配成的饵料进行实验,结果经酶制剂处理组鱼的生长率和饵料系数同商品饵料组相同或有显著改善。Riche 和 Brown<sup>[35]</sup>在虹鳟饲料中添加 1 000U/kg 饵料的植酸酶,结果可使豆粕中磷的利用率从 25% 增加到 57%,提高了 128%。Jackson 等<sup>[36]</sup>在斑点叉尾鮰饵料中用喷涂法添加植酸酶进行实验,结果表明添加植酸酶能促进鱼体增重和骨骼中磷的沉积,使粪便中的磷降低 33%,并认为每千克饲料中添加 500 活性单位的植酸酶制剂即可获得较高的鱼体增重和骨骼中的磷沉积。余丰年等<sup>[37]</sup>在异育银鲫体外进行添加植酸酶的试验,结果发现植酸酶的添加显著降低了豆粕中植酸磷的含量,添加 500 U/kg 的植酸酶可分解 60% 的植酸磷,添加 1000U/kg 的植酸酶可分解 80% 的植酸磷。由此表明,在异育银鲫的体外,植酸磷已经在植酸酶的作用下发生了有效降解。王正凯等<sup>[38]</sup>在斑点叉尾鮰网箱养殖试验中,以植酸酶部分取代磷酸二氢钙,结果发现添加植酸酶不仅每吨饲料成本降低了 25 元,而且鱼的生长没有受到影响,且减少了对水体的污染。上述实验结果说明饲料中添加植酸酶可以有效取代无机磷并能减少磷的排泄量。

## 3 结论

在水产养殖中,投喂高鱼粉含量的饲料是导致产生高磷和高氮污染排放的原因。尤其在湖泊、水库的“三网”养殖和海水鱼类网箱养殖中,如设置不合理,会迅速导致水体富营养化。这不仅污染了我国的水环境,而且影响水产动物的生长,引发灾难性疾病的暴发,造成严重的经济损失。使用植酸酶不仅可以改善水产养殖动物对植物性饲料中磷的利用,可用价格较低的植物蛋白代替昂贵的鱼粉,而且减少了水体中磷的排放。这既有助于解决世界性饲料资源尤其是蛋白源紧缺问题,又有利于解决养殖场所水体的富营养化问题。因此有必要进行植酸酶在水产养殖中的系统应用研究,包括选择适宜的酶制剂,确定合适的添加量,研究最佳的加工方法,以及添加植酸酶后对养殖水环境的影响进行科学的评价。

### 参考文献:

- [1] Yi Z, Kormegay E T, Ravindran V, et al. Improving phytate phosphorus availability in corn and soybean meal for broilers using microbial phytase and calculation of phosphorus equivalency values for phytase[J]. Poultry Science, 1996, 75: 240-249.
- [2] Denbow D m, Ravindran V, Kormegay E T, et al. Improving phosphorus availability in soybean meal for broilers by supplemental phytase[J]. Poultry Science, 1995, 74: 1831-1842.
- [3] 张兴会. 译. 植酸和微生物植酸酶在家禽营养中的应用[J]. 饲料工业, 1999, 20(7): 1-4.
- [4] 黄遵锡, 章克昌. 植酸酶基础与应用研究概况[J]. 食品与发酵工业, 1999, 25(2): 54-58.
- [5] Rudy Jwodzinski, Ullah A H J. Phytase[J]. Advance in applied microbiology, 1999 (42): 263-302.
- [6] 刘雨田, 晏向华, 郭小权. 植酸酶的研究进展[J]. 国外畜牧学(猪与禽), 1999 (6): 23-24.
- [7] Nagashima T, Tange T, Anazawa H. Dephosphorylation of phytate by using the *Aspergillus niger* phytase with a high affinity for phytate[J].

Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(10):4682-4684.

- [ 8 ] 苗春霞, 贾新成. 根霉植酸酶的研究 I. 菌株的分离筛选及发酵条件研究 [ J ]. 菌物系统, 1997, 16(1):70-73.
- [ 9 ] 冯 胜, 胡允松, 王忠彦, 等. 饲用微生物植酸酶的研究进展、现状及前景 [ J ]. 四川畜牧兽医, 1996(3):52-55.
- [ 10 ] 王红宁, 黄 勇, 陈 惠, 等. 饲用微生物植酸酶研究进展 [ J ]. 国外畜牧学(饲料), 1998(5):17-20.
- [ 11 ] 许尧兴, 许少春, 钱玉英. CN-92 植酸酶产生菌的诱变选育及产酶条件的研究 [ J ]. 微生物学杂志, 2000, 20(2):11-13.
- [ 13 ] Pasamontes L, Haiker M, Wyss M, et al. Gene cloning, purification, and characterization of a heat-stable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus* [ J ]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63:1696-1700.
- [ 14 ] 姚 斌, 张春义, 王建华, 等. 高效表达具有生物学活性的植酸酶的毕赤酵母 [ J ]. 中国科学(C辑), 1998, 28(3):237-243.
- [ 15 ] 黄遵锡, 慕跃林, 李凤梅, 等. 基因工程酵母产植酸酶的应用性质研究 [ J ]. 饲料研究, 2000(6):11-12.
- [ 16 ] Lehmann M, Kostrewa D, Wyss M, et al. From DNA sequence to improved functionality: using protein sequence comparisons to rapidly design a thermostable consensus phytase [ J ]. Protein Eng, 2000, 13(1):49-57.
- [ 17 ] Tomschy A, Tessier M, Wyss M, et al. Optimization of the catalytic properties of *Aspergillus fumigatus* phytase based on the three-dimensional structure [ J ]. Protein Sci, 2000, 9(7):11-1304.
- [ 18 ] Tomschy A, Brugger R, Lehmann M, et al. Engineering of phytase for improved activity at low pH [ J ]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 1907-1913.
- [ 19 ] Mullaney E J, Daly C B, Kim T, et al. Site-directed mutagenesis of *Aspergillus niger* NRRL 3135 phytase at residue 300 to enhance catalysis at pH 4. [ J ]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 297(4):20-1016.
- [ 20 ] Brinch-Pedersen H, Olesen A, Rasmussen S K, et al. Generation of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) for constitutive accumulation of an *Aspergillus* phytase [ J ]. Mol Breed, 2000, 6:195-206.
- [ 21 ] Verwoerd T C, Paridon P A, Van Ooyen A J, et al. Stable accumulation of *Aspergillus niger* phytase in transgenic tobacco leaves [ J ]. Plant Physiol, 1995, 109:1199-1205.
- [ 22 ] Denbow D M, Graubau E S, Lacy G H, et al. Soybeans transformed with a fungal phytase gene improve phosphorus availability for broilers [ J ]. Poultry Sci, 1998, 77:878-881.
- [ 23 ] Preben B H, Klaus N K, Henrik B P. Transgenic approaches in commonly consumed cereals to improve iron and zinc content and bioavailability [ J ]. J Nutr, 2002, 132:514S-516S.
- [ 24 ] Golovan S P, Hayes M A, Phillips J P, et al. Transgenic mice expressing bacterial phytase as a model for phosphorus pollution control [ J ]. Nat Biotechnol, 2001, 19(5):415-5.
- [ 25 ] Golovan S P, Meidinger R G, Ajakaiye A, et al. Pigs expressing salivary phytase produce low phosphorus manure [ J ]. Nat Biotechnol, 2001, 19:741-745.
- [ 26 ] Coelho M B, Kornegay E T. Phytase in animal nutrition and waste management [ C ]. BASF Corp, 1996 MT. Olive, NJ.
- [ 27 ] Adeola O, Lawrence B V, Sutton A L, et al. Phytase-induced changes in mineral utilization in zinc-supplemented diets for pig [ J ]. J Anim Sci, 1995, 73:3384-3391.
- [ 28 ] Biehl R R, Baker D H, Deluca H F. 1- $\alpha$ -hydroxylated cholecalciferol compounds act additively with microbial phytase to improve phosphorus, zinc, and manganese utilization in chicks fed soy-based diets [ J ]. J Nutr, 1995, 125:2407-2416.
- [ 29 ] Kornegay E T. Effects of natyphos phytase on protein and amino acid digestibility and nitrogen retention of poultry [ A ]. Phytase in animal nutrition and waste management [ C ]. Mount Olive N J, 493-514.
- [ 30 ] Ravindran V, Cabahug S, Ravindran G, et al. Influence of microbial phytase on apparent ileal amino acid digestibility of feedstuffs for broilers [ J ]. Poultry Sci, 1999, 78:699-706.
- [ 31 ] Christopher M. Peter and David H. Baker. Microbial phytase does not improve protein-amino acid utilization in soybean meal fed to young chickens [ J ]. J Nutr, 2001, 131:1792-1797.
- [ 32 ] Cheng Z J, Hardy R W. Effect of microbial phytase on apparent nutrient digestibility of barley, canola meal, wheat and wheat middlings, measured in vivo using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [ J ]. Aquaculture Nutrition, 2002, 8(4):271-277.
- [ 33 ] Schafer A, Koppe W M, Meyer-Burgdorff K H, et al. Effects of a microbial phytase on the utilization of native phosphorus by carp in a diet based on soybean meal [ J ]. Water Science and Technology, 1995, 31:149-155.
- [ 34 ] Cain K D, Garling D. Pretreatment of soybean meal with phytase for salmonid diets to reduce phosphorus concentrations in hatchery effluents [ J ]. Prog Fish Cult, 1995, 57:114-119.
- [ 35 ] Riche M, Brown P B. Availability of phosphorus from feedstuffs fed to rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [ J ]. Aquaculture, 1996, 142:269-282.
- [ 36 ] Jackson L S, Li M H, Robison E H. Use of microbial phytase in channel catfish *Ictalurus punctatus* diets to improve utilization of phytate phosphorus. Journal of the world aquaculture society, 1996, 27(3):309-313.
- [ 37 ] 余丰年, 王道尊. 植酸酶对异育银鲫生长及饲料中磷利用率的影响 [ J ]. 中国水产科学, 2000, 27(2):106-109.
- [ 38 ] 王正凯, 杨智辉, 吴光剑. 植酸酶在斑点叉尾鮰饲料中的应用 [ J ]. 中国饲料, 1998, (11):19.