

原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的科研成果。对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本声明的法律责任由本人承担。

论文作者签名： 杨磊 日期： 2006.5.29

关于学位论文使用授权的声明

本人完全了解山东大学有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留或向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅；本人授权山东大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文和汇编本学位论文。

(保密论文在解密后应遵守此规定)

论文作者签名： 杨磊 导师签名： 张明 日期： 2006.5.29

摘要

植酸及其盐类广泛存在于自然界的各种植物组织和粮食产品中,是磷和肌醇的主要存储形式,同时对保持机体磷的平衡起重要作用。植酸酶作为一种单胃动物的饲料添加剂,可以提高植物饲料中磷的利用率,减少磷排泄对环境的污染,同时还能降低植酸的抗营养作用。

本文通过对米曲霉进行发酵,优化其产植酸酶的条件,提高植酸酶的产量,以期可以直接用于生产。通过分离、纯化,得到电泳纯的米曲霉植酸酶组分。对该组分进行分析,确定该酶的分子量及热稳定性等理化性质。并通过化学修饰的方法,对该酶的活性中心进行分析,通过实验,确定了该酶的活性中心包括精氨酸、组氨酸等,从氨基酸的角度证明该酶属于 phyA 类植酸酶。

为建立基因和蛋白质之间的联系,本文采用 PCR 方法从米曲霉染色体 DNA 中扩增得到植酸酶基因 (phyA),克隆至载体 pMD18-T 上,构建了重组质粒 pMD18-T-phyA。对 pMD18-T-phyA 上插入的植酸酶基因外源片段进行了测序和序列分析。测序结果表明:米曲霉植酸酶结构基因由 1400 个核苷酸残基组成,编码 466 个氨基酸,与报道基本相同。将该序列提交 NCBI GeneBank,获得 Accession Number 为 DQ464124。对植酸酶进行同源构建,米曲霉植酸酶属于组氨酸酸性磷酸酶家族

关键词: 米曲霉,发酵,植酸酶,纯化,植酸酶基因

Abstract

Phytic acid and phytates exist in all kinds of plant tissues and foodstuff products in the biosphere. As the primary storage form of phosphorus and inositol, they play an important role in keeping the balance of physical phosphorus. Phytase is an important feed additive for monogastric animals. It improves the using rate of phosphorus in feeds, decreases the environment pollution of excretive phosphorus and debases the anti-nutritious function of phytates.

In submerged culture, the production of phytase from *Aspergillus oryzae* was optimized and the enzyme activity was improved. Through experiments, protein was deposited, separated, purified and the electrophoretic grade phytase was got. The characterization such as Mw and thermostable activity et al of this enzyme was got. The chemical modification of *Aspergillus oryzae* phytase was confirmed that Arg, His and some other amino acids were at the catalyzed center. It is another way to provide that *Aspergillus oryzae* phytase belongs to HAPs.

The *phyA* was amplified by PCR from *Aspergillus oryzae* chromosome DNA and cloned into plasmid pMD18-T. The recombinant plasmid pMD18-T-*phyA* was constructed and transformed into *E. coli* DH5 α and then sequenced. The sequencing result reveals that an Open Reading Frame of 1400 nucleotides that encoded a protein of 466 amino acids is detected. There is little difference between this result and the reported DNA sequence of phytase. The nucleotide sequence was submitted to the NCBI GeneBank and the Accession Number is DQ464124. The figure of the 3D structure of the phytase was constructed by Swiss-mode, an automated homology modelling server. The model indicated that the phytase is a typical family of histidine acidity phosphatase.

Key words: *Aspergillus oryzae*; fermentation; phytase; purification;
phyA

第一章 绪论

1 植酸及植酸盐

植酸 (Phytic Acid or Inositol Hexakis-phosphate), 缩写为 PA 或者 IP₆, 分子式为 C₆H₁₀O₂₃P₆, 通式为 C₆H₆[OPO(OH)₂]₆, 是肌醇六磷酸酯, 比重 1.56, 分子量 660.08, 由 6 分子磷酸与 1 分子环己六醇形成的磷酸酯。分子中所含 6 分子磷酸可以解离出 12 个氢离子, 在通常条件下, 带有很强的负电荷, 因而具有很强的络合或连接阳极复合体的能力, 且形成的络合物很稳定。植酸存放时间过长则容易分解。植酸结构如图 1-1 所示

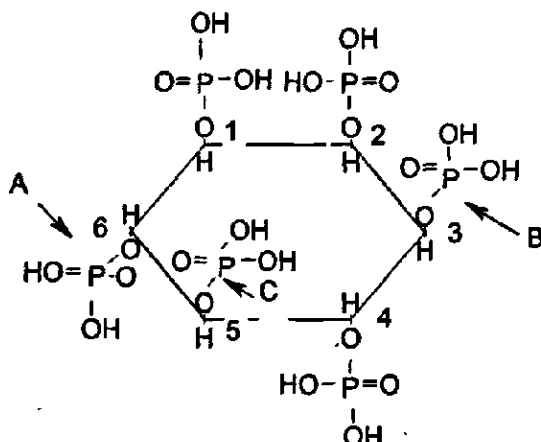


图 1-1 植酸结构及 3—植酸酶, 6—植酸酶, 碱性植酸酶的酶切位点

植酸水解过程如下: 植酸 → D-1, 2, 4, 5, 6-五磷酸肌醇和 D-1, 2, 3, 4, 5-五磷酸肌醇 → 1, 2, 5, 6-四磷酸肌醇 → 1, 2, 5 三磷酸肌醇或 1, 2, 6-三磷酸肌醇 → 1, 2-三磷酸肌醇 → 2-磷酸肌醇^[1]。

植酸是一种淡黄色或淡褐色的粘稠液体, 呈强酸性, 易溶于水、95%乙醇混和丙酮, 几乎不溶于苯、氯仿、醚和乙烷。本身毒性很小, 具有很强的螯合能力, 与 EDTA 接近, 可以与金属阳离子如 Mg²⁺、K⁺、Ca²⁺、Mn²⁺、Fe²⁺、Zn²⁺整合形成稳定的不溶性复合物。植酸在植物体中一般以各种盐的形式存在。植物性饲料中的植酸常与上述矿物质结合成植酸钙、镁、钾的复块, 通常被称为菲丁 (phytin)。菲丁存在于谷物的子实中, 早在 1872 年, P. Fetter 就由谷粒糊粉层的蛋白质

中发现。菲丁纯品为无味、无嗅的白色粉末，难溶于水，其总磷和植酸磷在糠、麸中的含量大体一致，一般分别为 16.5%和 15.1%左右^[2]，同时，植酸还可与蛋白质整合生成植酸—蛋白质复合物^[3]。当介质 pH 值低于等电点时，生成植酸—蛋白质复合物；高于等电点时，形成植酸—金属离子—蛋白质复合物；在中性条件下，可以和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。植酸及其盐类在不同条件下形成的络合物的分子结构如图 1-2 所示。

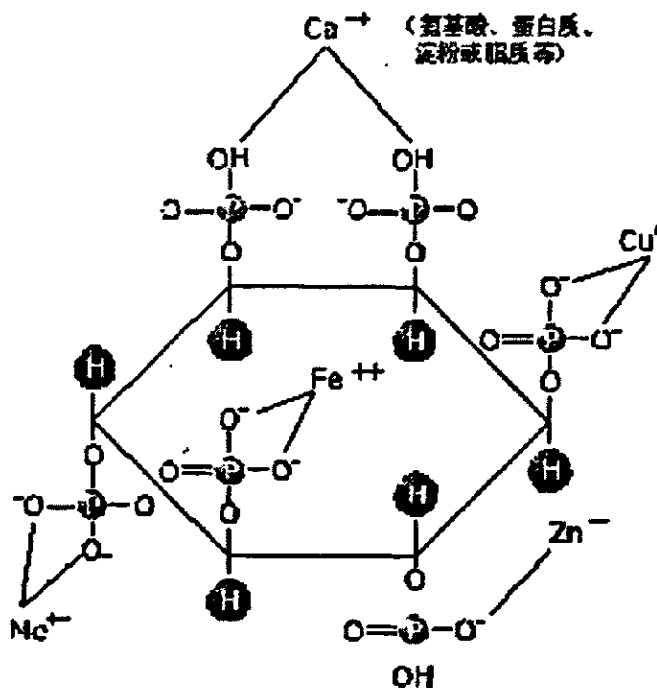


图 1-2 植酸盐复合物 (Metal-phytate Complex)

植酸可抑制消化酶(如胃蛋白酶、胰蛋白酶和 α -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，因为 Ca^{2+} 对胃蛋白酶和胰蛋白酶的作用极为重要， α -淀粉酶的稳定性也需要 Ca^{2+} 离子；也可能是因为植酸与酶的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；植酸对维生素也存在不利影响。因此动物采食高植酸含量的饲料后常表现厌食、消瘦、繁殖机能衰退等都说明了植酸具有抗营养作用^[4]。

植酸的提取物为白色粉末，难溶于水。当植酸盐受到高热时，可转化为 5, 4,

3-磷酸环己酯，其螯合能力依次下降，降至 3-磷酸肌醇时，对动物钙磷吸收的影响就不大了。

植酸盐大量存在于植物成熟的子实中，在谷类的小麦稻谷大麦和黑麦中，多数植酸盐存在于种皮表层附近。在玉米中，胚芽含有最高浓度的植酸盐。豆科植物的植酸盐分布于整个中子的蛋白质络合物中。油粕、糠麸与谷物相比，含磷较高，且含有较大比例的植酸盐^[5]。畜禽饲料主要以玉米和豆饼粕为主，但这些植物性饲料所含的磷一半以上（40%-70%）以植酸磷形式存在如表 1-1 所示^[6]。由于单胃动物体内都缺少内源植酸酶系统，仅消化道上皮细胞和后肠微生物产生少量植酸酶，故不能充分利用植酸中的大量磷和肌醇。大约 85%左右的磷都被畜禽排出体外，导致对土壤和水源的污染。另一方面，还必须在畜禽的日粮中额外添加无机磷酸盐，以满足猪、鸡畜禽的每日对磷酸盐的需求量。然而添加无机磷又会带来很大的负面效应：尽管添加的无机磷满足了畜禽对磷的需求，但植酸磷仍滞留在粪便中未被消化吸收而以植酸盐的形式排出体外。虽然磷被吸附于土壤表面，不能渗透，对地下水没有多大危害。但是，磷能与钙、铝、铜等元素形成不溶性复合物而保留在土壤中，一方面会引起土壤板结而影响种植业的发展；另一方面，积聚在土壤中的磷最终因积聚过多而随地表径流的冲刷到江河湖海，与氮一起造成水体的富营养化，导致水体缺氧，鱼类等水生动物窒息死亡，水体腐败变质，进而影响到人们赖以生存的生态环境。我国是磷矿石较为缺乏的国家，目前，国内最常见的磷源为磷酸氢钙。而国内投产的饲料级磷酸氢钙产品质量难以保证，氟含量常超过国家标准，畜禽氟中毒时有发生，给畜禽生产带来极大危害。因此，如何提高饲料中植酸磷的利用率，降低饲料中无机磷的使用，减少环境中磷的污染，引起了很多饲料科学工作者的兴趣。所以，对植酸酶的研究成为迫切需要，近年来发展非常迅速^[7]。

除上述之外，植酸在某些领域仍有其积极的正面效应。据报道，植酸及植酸盐类可作为米曲霉的发酵促进剂而对其代谢产生促进作用，从而缩短发酵时间，提高米曲霉产糖化酶的能力^[8]。植酸酶在食品工业中可以作为天然的食品添加剂，可以用作油脂的抗氧化剂，稳定剂，螯合剂，护色剂，发酵辅助剂，调节剂及缓冲剂等。同时，植酸在化工上也被广泛应用，比如医药和化妆品^[9]。植酸

表 1-1 饲料中的植酸磷含量分布

来源	总磷 (g/kg 干物质)	植酸磷 (g/kg 干物质)	植酸磷占总磷的 百分数 (%)
小米	3.5	2.4	68.5
大米	3.5	1.91	55.5
小麦	3.3	2.2	67
燕麦	3.6	2.1	59
玉米	2.8	1.9	68
高粱	2.7	1.9	70
青贮玉米	3	1.3	43
豌豆	3.8	1.7	45
野生豆	5	2.3	46
羽扇豆	2.5	0.5	20
亚麻子	8.2	4.7	57
葵花子 (浸提)	10	4.4	44
大豆 (浸提)	7.1	3.8	54
菜籽 (浸提)	11.2	4	36
土豆	1	0	0
米糠	12	3.6	30
大豆粕	7	2.5	35.7
大麦	3.7	2.2	60

酶在特定条件下 (pH, 温度等) 将植酸分解为肌醇和无机磷酸。无机磷酸是动物生长的必要元素, 肌醇是微生物和人类细胞生长和内环境稳定的基本因子之一, 对治疗糖尿病、神经炎均有重要作用, 在植物中, 肌醇是尿酸和细胞壁多糖或者戊糖残基的前体物质; IP₆ 能调节鸟类、爬行动物和两栖动物红细胞中血红蛋白与氧结合的亲和力。IP₆ 与 IP₃ 联合作用可以有效调节细胞内的钙离子水平。因此, 对此丰富资源应该加以开发研究, 使之得到更好的应用。

2 植酸酶的研究背景

2.1 植酸酶的研究历史及现状

有关植酸酶的研究已有将近 100 年的历史, Suzuki 和其他学者 (1907) 就报道了磷能从有机含磷底物中被释放出来。1915 年, Anderson 提出天然植酸磷利用率不同于化学分离纯化产品的一个可能原因是饲料成分中存在能水解植酸磷

为无机磷的酶——植酸酶,并对植酸酶的来源、理化特性及作用机理进行了研究,从而引起了许多学者的广泛关注。Nelson(1968)首次发现无花果曲霉(*A. ficuum*)能产生植酸酶,体外实验时这种植酸酶能水解豆粕中97%的植酸磷。此后,植酸酶的研究开始转入微生物领域。Shiel和Ware(1968)从200种微生物中筛选出30种能产生胞外植酸酶的微生物,均属于真菌。结果表明大量的曲霉菌能产生胞外植酸酶,而从土壤中分离得到的无花果曲霉NRRL3135能产生最大的酶活性。产植酸酶的曲霉有米曲霉(*A. oryzae*)、土曲霉(*A. terreus*)、黑曲霉(*A. niger*)和无花果曲霉(*A. ficuum*)等,它们能分泌具有高度活力的胞外植酸酶^[10]。在已发现的几十种植酸酶的来源中,Shiel和Ware(1968)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phyA和phyB。phyA的最适pH为2.5和5.5,phyB的最适pH为2.0。pH值为2.5和2与动物胃中pH值相适应,pH值为5.5与动物肠中pH值相适应。因此,该菌株成为各国实验室进行植酸酶研究的首选材料。目前,对植酸酶已由60-80年代的酶的分离纯化及性质方面为主的研究转向对植酸酶的分子领域研究,比如植酸酶基因的克隆和表达,植酸酶工程菌的构建,以及植酸酶作用分子机理的研究。另外还有具有耐热优良性能植酸酶的筛选和耐热分子机理的研究。随着对植酸酶越来越深入的研究,人们对其性质和机理了解越来越彻底,这为其产业化和应用打下良好基础。

2.2 植酸酶的分类

2.2.1 传统植酸酶的分类方法

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,包括植酸酶和酸性磷酸酶。植酸酶只能将植酸分解为肌醇磷酸酯,不能彻底地分解成肌醇和磷酸,酸性磷酸酶能将肌醇磷酸酯彻底分解成肌醇和磷酸。

传统的分类方法将植酸酶分为三类:①肌醇六磷酸-3-磷酸水解酶(3-磷酸水解酶,EC-3.1.3.8),主要存在于植物和微生物中,它首先使肌醇的第3位C的磷酸解离,然后逐个水解,此过程需 Mg^{2+} 参与;②肌醇六磷酸-6-磷酸水解酶(6-磷酸水解酶,EC-3.1.3.26)主要存在于植物种子中,在干燥状态和休眠状态下没有活性,只有在种子发芽时,有充足水份存在才被激活。它首先使肌醇的第6

位 C 的磷酸解离, 最终酶解整个分子并释放出磷; ③非特异的正磷酸盐单酯磷酸水解酶。

2.2.2 新的植酸酶分类方法

植酸酶是从植酸(肌醇六磷酸)水解磷酸酯键, 释放无机正磷酸的一类酶。但是在过去的十年里, 这类植酸酶或是植酸降解酶种类增加了很多。然而, 并不是所有的植酸酶的结构都相似或者是裂解磷酸基团的机制都一样。

表 1-2 植酸酶新的分类方法

Enzyme class	Examples	Molecular mass of monomer(kDa)	NCBI structure No.
HAP	PhyA	85	1HP
	PhyB	68	1QFX
	AppA	45	1DKP:
BPP	TS-Phy	44	1H6L
	PhyC	43	-
PAP	GmPhy	72	-

既然叫植酸酶, 就必须有磷酸酶的活性, 根据最适作用的 pH 值不同, 分为酸性, 中性及碱性磷酸酶。因为近年来大多数对于植酸酶的研究都集中在该酶能否作用于单胃动物的消化道, 所以, 主要集中在对酸性磷酸酶的研究。故, 对酸性磷酸酶又分为以下的三类: ① 组氨酸酸性磷酸酶 (histidine acid phosphatases, HAP); ② β 螺旋桨式植酸酶 (β propeller phytase, BPP); ③ 紫色酸性磷酸酶 (purple acid phosphatases, PAP)。

2.2.2.1 组氨酸酸性磷酸酶

绝大多数的植酸酶都是 HAPs (EC-3.1.3.8)。这一类酶都有这样两个特点: 拥有一个活性位点 RHGXRXP 和一个两步作用水解磷酸单酯的机制。Wyss 及其合作者^[11]根据植酸酶对于底物降解的特性, 又将 HAP 分为两类, 即 phyA 和 phyB。phyA 有广泛的底物, 但对于底物的特异性较低; phyB 的底物谱比较窄, 但是有比较高的特异性。另外, phyA 是一个单体酶, 而 phyB 的活性形式是一个四聚体, 这种四聚体的结构为 phyB 类植酸酶提供了热稳定性, 但是这同时也解释了, 为

什么当 phyB 类植酸酶热变性后，不能像 phyA 类酶那样复性。phyA 类植酸酶广泛存在于丝状真菌，细菌，酵母菌和植物中。目前商业上生产的植酸酶都属于这类酶。phyB 植酸酶目前只在某些曲霉中有报道，还没有投入商业生产的。

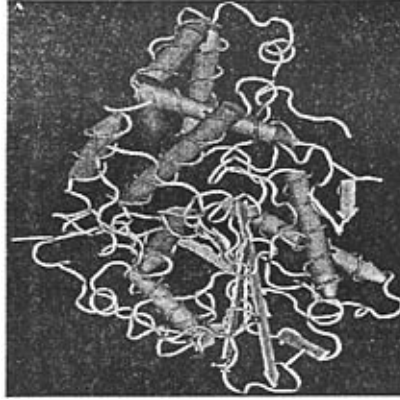


图 1-3 组氨酸酸性磷酸酶

2.2.2.2 β 螺旋桨式植酸酶

与HAP不同，BPP (EC-3.1.3.8)是最近发现的一类有新的水解底物机制的植酸酶。现已纯化出的BPPs为来源于*Bacillus subtilis* 的植酸酶（属于phyC）和来源于*Bacillus amyloliquefaciens* 的植酸酶（属于TS-phy），其基因均也已被克隆。从三维模型上看，这类植酸酶像是有六个叶片的螺旋桨一样。从PDB中搜索，还没有发现有类似的植酸酶。这类植酸酶的热稳定性和催化活性都依靠其所结合的 Ca^{2+} ，这与其它的植酸酶不同^[12]。

BPP通常都有两个结合位点，底物水解出现在“裂开位点”，在其临近的“紧密结合位点”是用来增加类似于植酸的磷酸基团的紧密结合能力。钙离子通过创造一个合适的离子环境来帮助底物与酶的结合。

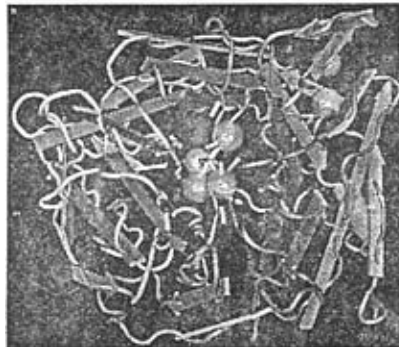


图1-4 β 螺旋桨式植酸酶三维结构模型 (1H6L)

2.2.2.3 紫色酸性磷酸酶

另一类植酸酶 GmPhy (EC 3.1.1.3.2), 是最近从大豆中分离出来的^[13]。GmPhy 拥有紫色酸性磷酸酶 (PAP) 的活性位点, 这类的金属酶已经被广泛的研究^[14]。这类植酸酶的三维结构和其可能催化机制都几经知道。通过基因组数据库的比对, 在植物, 哺乳动物, 真菌和细菌中都有PAP类似的序列。纯化出的GmPhy分子量大约在70-72kD, 其分子大小与源于植物的PAPs相类似, 然而, GmPhy是唯一一个报导的具有明显植酸酶活性的PAP。

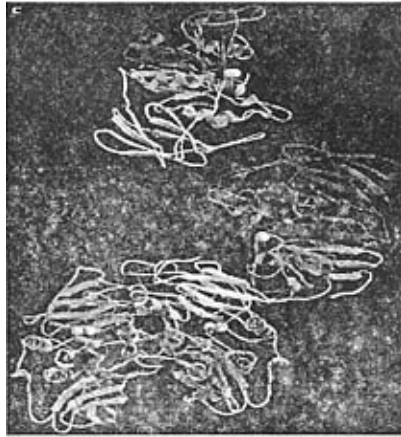


图 1-5 紫色酸性磷酸酶 (1KBP)

2.3 植酸酶研究热点

2.3.1 植酸酶耐热性研究

随着基因工程和蛋白质工程的发展, 植酸酶的研究也不再只局限于对酶的纯化和性质研究上, 在积极寻找能大量产酶的微生物菌株同时, 也开始对通过基因工程的方法来获得高产耐热的植酸酶做出尝试。德国的 BASF 公司通过对构建高产的工程菌株, 已经成功的生产了注册商标为“Natuphos”的商用植酸酶, 与有着同样盛名的丹麦 NOVO 公司也有属于自己知识产权的 Phytase NOVO CT, 这两种商用植酸酶每年都可以带来数以千万美元的收入。

植酸酶生产中一个非常现实的问题是酶的活性如何保存, 在酶制剂的颗粒化过程中, 要经过差不多 90℃或者更高的温度, 但在这个温度下, 植酸酶酶活损失很严重, 只能保持 10-30%左右。如何解决酶活损失, 维持其在单胃动物消化

道中的生物活性,与构建工程菌株,大规模生产植酸酶都是目前所面临的问题。

段学辉等比较了三种不同类型的植酸酶制剂,发现添加海藻酸钠、无机盐和多羟基化合物颗粒化的植酸酶具有更高的热稳定性,在95℃高温下处理20 min,酶活基本能保持在80%以上,比液体酶和普通固体化处理的植酸酶制剂提高了50%^[15]。台湾学者将高粱糖浆废弃液和淀粉的混合物添加到植酸酶溶液中,在80℃处理10 min,仍有67%的酶活,而未加保护剂的酶在此温度下完全失活,这是一种非常经济的方法。欧洲的BASF公司和NOVO公司发明了制备包被型的含酶颗粒,经90℃高温处理30 s,酶活残留率达93%,而未包被的酶仅有20%^[16]。

由于商用植酸酶的运用目的是增加单胃动物对磷的吸收和利用,其作用的位点是在动物的消化道内,故现在研究的重点是酸性植酸酶,pH值通常在2.5-5.5之间,工业上所用的菌株大多是曲霉属,属于PhyA。对于酶的热稳定性,蛋白质结构改造等等也大多集中在对这类植酸酶研究。

2.3.2 植酸酶空间构象研究

Hartingsveldt等^[17]利用基因工程技术将无花果曲霉(*A. ficuum*)植酸酶的基因进行测序,从其DNA碱基推断出氨基酸序列,首次将植酸酶一级结构完整列出。Ullah等^[18]在1993年,用内切蛋白酶Glu-C、溴化氰、梭菌蛋白酶等五种方法断裂无花果曲霉植酸酶,从多肽的重叠区推断出植酸酶的氨基酸组成及二级结构。发现去糖基化的植酸酶是由441个氨基酸残基组成,分子量为48.5kDa。在氨基酸组成中,是由37%的非极性的氨基酸、42%的极性氨基酸、11.5%的酸性氨基酸及9.5%的碱性氨基酸组成,推断出的二级结构包括17.3%的 α -螺旋、29.1%的 β -折叠、32.6%转角及24.7%线圈。由于大部分植酸酶属于酸性磷酸酶家族,所以其空间结构与酸性磷酸酶有很大的相似性,基本上都有两个结构域组成。

植酸酶活性部位在植酸酶的空间构象中,都有一个底物结合的口袋,这个口袋一般都是活性部位的一些保守氨基酸形成的。植酸酶的活性部位包括两个功能部位,一是位于N端的“RHGX RXP”元件的“结合部位”,另一个是位于C端的“HD”元件的“催化部位”。在1991年Ullah等^[19]用1,2-环己二酮修饰无花果曲霉植酸酶的精氨酸后,植酸酶完全失活,说明了有精氨酸位于酶的活性中心,把含精氨酸的植酸酶片段与已报道的各种来源的酸性磷酸酶进行序列比较,发现有一

段同源序列 SRHGARYP, 该片段是酸性磷酸酶的活性中心。1993 年 Ullah 等^[20]用溴化氰等断裂无花果曲霉的最适 pH2.5 的酸性磷酸酶, 确定了与真菌植酸酶活性部位同源的 23 个氨基酸残基, 这一片段中, 第 11R、12H、13G、15R、17P 是高度保守的, 其中第 11、15 位的精氨酸涉及到底物磷酸集团与酶活性中心的最初排列, 第 12 位组氨酸与底物形成磷酸-His “E-S” 复合物, 第 13 位甘氨酸的作用还不清楚, 但由于它高度保守, 可能在结构上起重要作用。第 2、4、5 和 20 位残基是亲水性的, 而第 8、16、22 位残基是疏水性的, 这些残基构成了酶的催化环境。位于 C 端的“HD”元件中的天冬氨酸为底物离去集团供体质子。实验表明, Ca²⁺对维持 *Bacillus* 植酸酶的活性和稳定性都起着很重要的作用, Shin 等^[21]在 2001 年发现 *B. amyloliquef-aciens* 植酸酶的活性部位不仅有 4 个 Ca²⁺, 而且还有两个不同的磷酸离子(Pho1 和 Pho2)的结合位点, 一个是“切割位点”(Pho1 位点), 负责对底物的水解, 另一个是“亲和位点”(Pho2 位点), 可提高底物对酶的亲和性。该酶的 4 个 Ca²⁺离子与结合在 Pho1 位点的磷酸离子发生螯合, 在亲和位点的 Lys76、Arg122、Tyr159、Lys179 残基侧链与结合在 Pho2 位点的磷酸离子发生相互作用。

2.3.3 植酸酶的晶体结构分析

对植酸酶的高级结构研究较多的是来源于 *Aspergillus ficuum* NRRL3135 的 phyA 编码的植酸酶 PHYA, Kostrewa 等^[38]利用 X 衍射分析了它的晶体结构。phyA 类植酸酶的高级结构中有 5 对二硫键: Cys8、Cys17、Cys 48 Cys 391、Cys 192 Cys 442、Cys 241、Cys 295、Cys 413、Cys 421, 用盐酸胍变性处理后, 植酸酶活性丧失, 说明二硫键在植酸酶的折叠上扮演着重要的作用。phyA 类植酸酶的晶体结构可分为两部分: 一个大的 $\alpha\beta$ 结构域和一个较小的 α 结构域, $\alpha\beta$ 结构域的中心是一个由 6 片组成的 β 折叠片。结构中共有 14 个 α 螺旋, 对应的氨基酸序列的位置分别为: 8 +82; +88 +95; +107 +123; +141 +159; 193 +197; 200 +210; 213 +223; 231 +246; 257 +261; 264 +281; 290 +305; 334 +345; 423 +429; 439 +443。 β 折叠片中的 6 个片相对应的氨基酸序列的位置分别为: 48 +82; 134 +138; 173 +177; 332 +337; 383 +391; 398 +403。在两个结构域的内表面有一很深的凹套, 凹套中有酶催化活性的必需氨基酸——Arg58 和 His59, 它们是植酸酶活性

位点保守序列RHGXRXRP中的前两个氨基酸,在以前的研究中利用化学修饰的方法就已证实RHGXRXRP序列中的Arg58直接涉及其酶活性,Arg58在其晶体结构中的位置也与它的作用相吻合。phyA的晶体结构与鼠的低分子量酸性磷酸酶的晶体结构有很高的结构相似性,说明它属于组氨酸酸性磷酸酶家族。

从无花果曲霉的一级结构可以看出,在氨基酸序列中,存在着10个半胱氨酸残基,形成了5个二硫键,这个结果是通过X-光晶体衍射的方法得到的^[38]。在所有这5个二硫键中,只有第二和第三对是“HAPs”蛋白质中严格存在的。序列中第一对二硫键在真菌phyB型植酸酶中是不存在的。另外的两对二硫键在稳定分子结构中起作用。这些二硫键在真菌植酸酶的折叠途径中究竟起了什么样的作用,就是通过这种方法得到的^[43]。

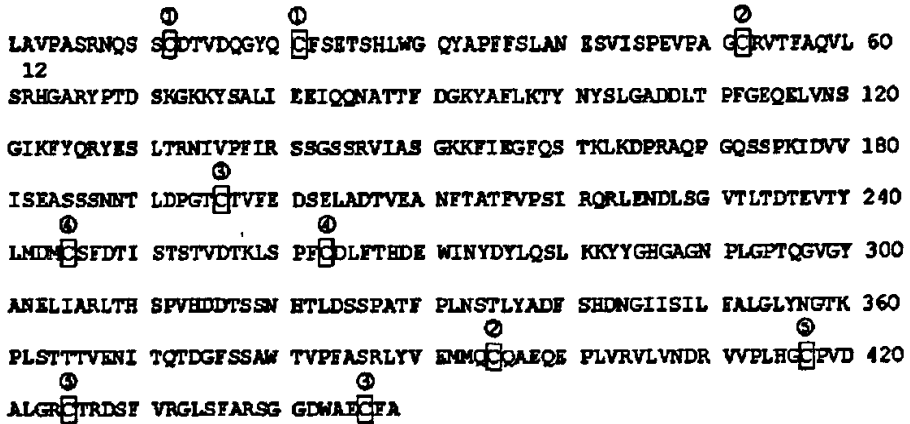


图 1-6 *A. ficuum* 植酸酶一级结构及其5个二硫键 由三维X-光衍射图推测得到

在研究最多的黑曲霉和无花果曲霉植酸酶中,我们发现其结构中都有5对二硫键^[39],这些二硫键的存在对于维持植酸酶的热稳定性有非常重要的作用。根据最近的研究发现,在真菌产生的植酸酶和酸性磷酸酶的热变性过程中,会发生酶的快速失活和慢的结构变化,而失活是在结构变化之前发生的^[40]。使用变性剂盐酸胍(Gu.HCl)来研究植酸酶的折叠和去折叠,通过检测酶活性损失的情况来确定蛋白质变化的情况。同时可以使用巯基乙醇来辅助确定该实验的严谨性。研究Gu.HCl对无花果曲霉植酸酶的变性浓度,我们发现在Gu.HCl浓度到1mol/L时,酶的活性就完全消失了,而在0.55mol/L的Gu.HCl中,有50%的植酸

酶酶活可以检测的到,一种可能就是,有一半的酶在该浓度的变性剂条件下,仍然维持着原来的活性蛋白结构,所以还可以活性。该酶在1mol/L Gu.HCl, pH 5.0的条件下,在酶活测定缓冲液中(50mmol/L的乙酸钠 pH 5.0),随着变性剂浓度由1mol/L降到0.5mol/L时,会有70%的酶活恢复。

phyA 类植酸酶和其它酶不同,该类酶有两个最适 pH (5.0 和 2.5)。在 pH 条件更低的条件下,0.2mol/L 的 Gu.HCl 就可以植酸酶该酶完全失活。酶变性后,在变性剂浓度降低的情况下,也更容易复性。也就是说,重新折叠成有活性的表型是一个可逆的过程,并且在低 pH 下,复性折叠得动力学常数比较快。这就表明了真菌植酸酶在 pH2.5 比 pH5.0 条件下,其去折叠和变性更容易受到影响^[39]。

2.4 植酸酶的分子研究

2.4.1 植酸酶基因高效表达

Van Gorcom等^[20]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 Hartingsveledt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 HJ^[18, 20]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^[22]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^[23]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。

2.4.2 植酸酶基因的分子改造

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

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^[24]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^[25]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/mg 蛋白质。Tomschy A 等^[26]定点改变野生 *A. fumigatus* 株 Gly2277 和 Tyr2282 为 Lys 和 His 后，酶最适 pH 降低了 0.5 到 1.0。Mullaney E J 等^[27]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 °C，pH 4.0、5.0 处酶活力提高了 56% 和 19%。

2.4.3 转植酸酶基因植物的研究

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^[28]，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^[29, 30]。Denbow et al 等^[29]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有很好的热稳定性，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^{3+} 、 Zn^{2+} 等含量和利用率方面的工作。

2.4.4 转植酸酶基因动物的研究

Golovan S P 等^[31]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能分泌，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^[32]。

3. 植酸酶的序列分析

3.1 来源于丝状真菌的植酸酶基因

最先分离出的植酸酶基因是 *Aspergillus ficuum* NRRL3135 的 *phyA* 基因^[34]。来源于 *Aspergillus ficuum* NRRL3135 的 *phyA* 结构基因全长 1506bp, 其中+46~+147 的 102bp 的核苷酸序列是一典型的真菌内含子序列, 其上有真菌内含子的特征保守序列: Donor 序列-GTATGC、Lariat 序列-GCTGAC 及 Acceptor 序列-CAG。它的基因编码 467 个氨基酸, 根据信号肽序列的结构规则推断, N 端的 19 个氨基酸为信号肽, 信号肽的切割位点在+19 位的 Gly 之后。来源于 *Aspergillus ficuum* NRRL3135 的植酸酶是一种糖基化蛋白, 在 *phyA* 编码的氨基酸序列上, 发现了 10 个潜在的 N 糖基化位点 (Asn-X-Ser/Thr, X 为任意氨基酸)。从氨基酸推断出的理论分子量约为 51.4kDa, 糖基化后的表观分子量在 85kDa 左右。氨基酸序列上存在组氨酸酸性磷酸酶的活性位点保守序列 (Active site sequence): CQVTF~~AS~~QVLSRHGARYPTDSKGK, 它位于氨基酸序列的+52~+74, 可归为组氨酸酸性磷酸酶这一家族^[21]。*Aspergillus ficuum* NRRL3135 的 *phyA* 基因中 G+C 含量达到 68.3%, 这是丝状真菌中高表达蛋白编码序列所具有的特征之一^[35]。

来源于丝状真菌, 尤其是曲霉的 *phyA* 基因无论在核苷酸来源、编码的氨基酸序列等基因结构上, 还是在基因产物的酶学特征上均有较高的相似性, 例如它们的编码基因长度相当, 核苷酸同源性较高, 编码的氨基酸个数都在 460~480 之间, 氨基酸序列上也有较高同源性, 均具有活性位点保守序列 RHGX~~AS~~RP (X 为可变氨基酸), 在氨基酸序列上有数量不等的潜在糖基化位点, 翻译后的蛋白都需进行糖基化修饰后才具有正常的生物学活性。

phyB 基因与 *phyA* 相比, 虽然也属于组氨酸酸性磷酸酶家族, 有活性位点保守序列 RHGX~~AS~~RP, 但核苷酸序列及编码的氨基酸序列同源性较低, 实际上它的最适底物不是植酸盐, 它仅是具有植酸酶活性的酸性磷酸酶^[36]。

3.2 来源于细菌的植酸酶基因

来源于细菌的植酸酶编码基因较短, 编码蛋白的分子量也较小, 它的核苷酸序列及编码的氨基酸序列与 *phyA* 和 *phyB* 及已报道的磷酸酶基因没有同源性, 它也没有普遍存在于 *phyA* 和 *phyB* 编码蛋白上的活性位点保守序列 RHGX~~AS~~RP, 这说

明它不属于组氨酸酸性磷酸酶家族。对这一类植酸酶的研究仅在近年来才开始涉及, 1998年 Kerovuuo 等才首次从 *Bacillus subtilis* 中分离出其完整的编码基因^[37]。来源于 *Bacillus subtilis* 的植酸酶基因 *phyC* 全长 1152, 编码 383 个氨基酸, 其中 N 端的 26 个氨基酸是信号肽序列。生物学活性依赖钙离子的存在。

3.3 来源于植物的植酸酶基因

Maugenset 等于 1998 年从萌发的玉米种子中分离的, 成熟酶由两个相同的亚基组成, 亚基的结构基因 (cDNA) 全长 1167bp, 编码 387 个氨基酸, 理论分子量为 41kDa。它与微生物来源的植酸酶没有氨基酸序列同源性, 但存在一个包含活性位点保守序列 RHGXRXRP 的 33 个氨基酸的同源区, 与来源于 *Aspergillus ficuum* NRRL3135 的 *phyA* 和 *phyB* 相比, 这一段氨基酸序列的同源性分别达到 48% 和 51%。丝状真菌来源的 *phyA* 基因编码的植酸酶, 其 RHGXRXRP 序列一般位于 N 端, 如 *Aspergillus ficuum* NRRL3135 的 *phyA* 中它的位置在 +81~+87, 而玉米植酸酶中, RHGXRXRP 序列位置较靠后, 在 +204~+210 的区域上^[25]。

4 植酸酶的商品化

植酸酶作为一种饲料用酶, 现在已经大量的运用在动物饲养上。在上个世纪八十年代末, 英国只有少于 5% 的禽类养殖使用了植酸酶添加剂, 而在 1995 年左右, 这个数字已经增加到了 90% 以上。植酸酶工业化建立在基因工程发展的基础上, 将基因克隆出来, 转入到能够进行大量表达的载体中进行表达, 从而达到大量生产植酸酶的目的。

进行商业生产中最富盛名的植酸酶是添加的动物饲料中 “Natuphos” (Gist Brocades, the Netherlands)。该植酸酶是德国 BASF 公司生产, 来源于 *Aspergillus niger* NRRL 3135 的 *phyA* 基因在 *A. niger* CBS 513.88 中重组表达的产物。这个产品从 1990 年的几乎为 0 到现在的每年销售额在 5000 万美元左右, 这个数字几乎占到了整个饲料用酶市场的三分之一 (Sheppy, 2001)。丹麦的 NOVO 公司, 以米曲霉作为植酸酶基因的表达宿主, 生产出最适 pH 值为 5.5 的植酸酶 NOVO CT, 该酶在欧洲市场上也占有很大的比例。

丹麦的 Novozymes 从 1995 年开始生产植酸酶。这种来源于微生物的 RONOZYME[®]

P5000 是作为猪和家禽等单胃动物的饲料添加剂使用的,它能够在消化过程中将植酸水解,从而使饲料中需要添加的无机磷的量降低了30%,这就使得原来需要购进无机磷的成本降低了。RONOZYME P5000作为最新型投放市场的植酸酶产品,已经在饲料业中取得了巨大的成功。至今,在市场上植酸酶已经大面积的取代了无机磷添加剂的使用,并且已经有效的减少了磷对环境的污染。(——引自 Novozymes公司官方网站)

5 本课题研究意义

作为世界上农牧业大国,我国对于饲料的生物添加剂做的远远不够,欧盟及美国等发达国家开始对我国出口的农牧业产品进行安全检测。我国农副产品所含的抗生素超标,这对于产品的出后有很大的影响。

植酸酶作为生物添加剂,可以广泛的用在单胃动物的饲料中,这被认为是安全并且有效的。我国目前生产的植酸酶几乎都是低附加值的产品,高质量的植酸酶都是进口而来的,价格昂贵,这就造成了植酸酶应用上的一个难题。米曲霉作为工业上应用十分广泛的菌种,经过多年的验证,其菌株及发酵产物是安全的,本课题选用该菌株就是从这方面出发,当可以进行生产的时候,不会存在安全问题。

从该菌出发得到的植酸酶,从产量,活性,耐热性上进行研究,为以后的工作打下基础。从蛋白质结构、性质及基因的角度进行互相验证,尽可能详细的考虑实验内容。同时克隆得到米曲霉植酸酶基因,为以后的基因改造做出铺垫。

第二章 米曲霉产植酸酶发酵条件优化

本实验所用菌种本实验室保存，鉴定为米曲霉 (*A. oryzae*)。对该菌株的产酶培养基的组成、产酶时间等进行优化，使期达到产植酸酶的最佳条件，同时为以后植酸酶的分离纯化打下基础。

1 材料与方方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

高产植酸酶米曲霉菌株 (*Aspergillus.oryzae*) 由本实验室保存

1.1.2 培养基

种子培养基：10%麸皮 煮沸 30 min，补足水分，pH 值自然，115℃，30min 灭菌

优化后的发酵培养基：可溶性淀粉 3%，蛋白胨 0.5%，硝酸钾 1%，FeSO₄ 0.015%，1% 100×痕量无机盐母液 (7% MgSO₄，0.1% MnSO₄)

1.1.3 试剂

米曲霉孢子悬液：茄形瓶斜面培养 3 天的新鲜孢子，用带玻璃珠的灭菌去离子水洗入到 100mL 三角瓶内，4℃冰箱保存备用

测酶活缓冲液 (乙酸-乙酸钠缓冲液)：1.48mL 乙酸，30.02g 乙酸钠，1.11gCaCl₂ 定容到 1L，pH5.5^[41]

钼酸铵溶液：100g 钼酸铵，10mL 25%氨水/1LH₂O

钒酸铵溶液：2.35g 偏钒酸铵溶于 200mLH₂O，60℃搅拌加入 22.75%HNO₃ (7mL 浓 HNO₃+13mL H₂O) 20mL 定容至 1L

颜色终止液：250mL 钼酸铵溶液加入 250mL 钒酸铵溶液，然后，边搅拌边缓慢加入 65%的 HNO₃165mL，冷却稀释至 1L，现用现配

酶反应底物溶液：8.4g/L 植酸钠，乙酸-乙酸钠缓冲液配制，现配

植酸钠：Sigma 公司

1.1.4 仪器

彩虹 752 型分光光度计 山东高密

布氏漏斗收集装置

奥立龙 808pH 计: 上海奥立龙公司

2 实验方法与步骤

2.1 发酵

2.1.1 孢子悬液的制备 准备麸皮汁茄形瓶, 将米曲霉菌种划线, 30℃培养 4d, 25mL 灭菌的含玻璃珠去离子水洗孢子, 制备成孢子悬液, 每 mL 含有 5×10^7 个孢子。孢子悬液可以在 4℃冰箱中保存。

2.1.2 菌种发酵 将米曲霉孢子悬液以 1.5%的接种量接入 50mL 种子培养基于 300mL 三角瓶中, 30℃, 80rpm 摇床培养 24h 后获得一级种子将一级种子。以 5%接种量接入 100mL 液体发酵培养基于 500mL 三角瓶中, 30℃, 110rpm 摇床培养 37h 后, 即可获得植酸酶发酵液

2.2 粗酶液的制取

将发酵产物用布氏漏斗抽滤, 得到清液, 即为粗酶液

2.3 植酸酶酶活的定义及检测

2.3.1 酶活定义

植酸酶活性用植酸酶活力单位来表示, 酶活的国际单位采用以下定义方法: 某温度下, 每分钟从一定浓度的植酸钠溶液中释放出 1 纳摩尔的无机磷为 1 个酶活单位。在相关的文献报道中, 大都采用 37℃作为酶活测定温度, 本文主要进行酶动力学方面的研究, 故在测定酶活时选用该酶的最适作用温度 50℃作为反应温度。

2.3.2 酶活测定方法

钒-钼酸铵法: 该方法是利用植酸酶可以水解植酸钠释放出无机磷的原理, 通过加入酸性钒-钼试剂使水解反应停止, 同时与水解释放出来的无机磷产生颜色反应, 形成黄色的钒钼磷络合物, 在 415nm 波长下测定磷的含量。以标准植酸酶为参照物, 间接计算被测样品中植酸酶的含量。本法于 1994 年列入 AOAC (美国分析化学家协会) 标准, 我国也将此法的测定结果作为审批商品注册许可证和验收进口产品的法定商检依据。

取 10 倍稀释的粗酶液 20-60 μ L (稀释度可根据实际调整), 加入 180-140 μ L

测酶活缓冲液，50℃水浴预热 5min，加入 400μL 植酸钠底物溶液，50℃水浴反应 10min，然后立即加入 400μL 颜色终止液，振荡混匀，13000rpm 离心 1min，取上清液，在 415nm 处测其吸光度。根据定磷标准曲线计算酶活。将上述的颜色终止液和酶底物加入顺序颠倒，即先加入颜色终止液，使酶变性，再加入酶底物，剩余步骤同上，此即为对照。实际酶活是测量值减去对照值的差。以每分钟从 10mmol/L 的植酸钠溶液中释放出 1nmol 的无机磷为 1 个酶活单位。

2.3.3 定磷标准曲线

精确称取干燥的 KH_2PO_4 0.2195g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2518g 用重蒸水溶解，定容为 50mL，即含磷 1mg/mL 作原液。取原液 10mL 定容至 100mL (含磷 100μg/mL)，用于测定。根据试验数据作出标准定磷曲线，推导得到标准曲线和 R^2 。

3 结果与讨论

3.1 定磷标准曲线的绘制

表 2-1 定磷标准曲线绘制数据

No.	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A. mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
P. mL	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
Buf. mL	1	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1
B. mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
OD ₄₁₅	0.038	0.084	0.121	0.164	0.206	0.258	0.307	0.347	0.385	0.422

No.: 试验管号; A.: 植酸钠底物; P.: 标准磷溶液; Buf.: 醋酸-醋酸钠缓冲液; B.: 反应终止液

由图 2-1 中直线，推导出测定植酸酶酶活的标准定磷曲线为 $y=4.254x$ ， $R^2=0.9989$ ，最终确定通过此方程计算酶活。

定磷标准曲线

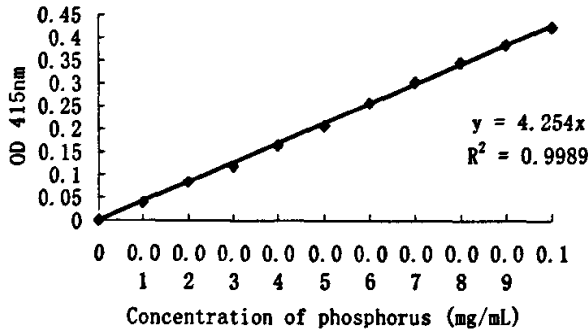


图 2-1 定磷标准曲线

根据该方程计算, 1 OD_{415nm} = 7830 U.

3.2 米曲霉植酸酶产酶进程及接种量对产酶的影响

根据菌体生长情况和酶活的测定, 确定米曲霉植酸酶产酶进程及接种量。

3.2.1 米曲霉产植酸酶的产酶进程 将 750 μ L 孢子悬液接到 50mL 液体麸皮培养基中, 30 $^{\circ}$ C, 110rpm 培养一天, 即得到发酵种子。将种子 5mL 接入 100mL/500mL 三角瓶发酵培养基中, 摇瓶培养, 每过 6h 测定酶活, 确定其发酵进程。

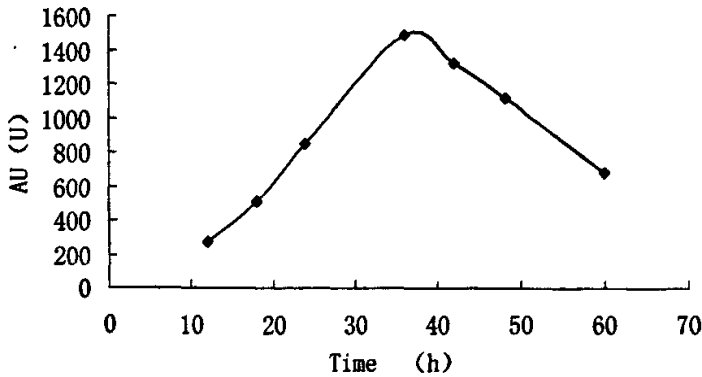


图 2-2 米曲霉植酸酶产酶进程

图 2-2 显示, 米曲霉由于较高的产蛋白酶能力, 所以发酵周期不能太长, 当超过 40h 以后, 植酸酶活性明显下降, 这可能是由于在这个时期, 开始有蛋白酶大量产生, 导致了这个结果的发生。这个情况也与 Jin Fujita^[44] 报道类似, 该文献中所用的米曲霉菌种发酵周期是 30h。

根据菌体生长情况和酶活的测定发酵周期选择在 37h。

3.2.2 接种量对产酶的影响

使用同一批种子，采用不同接种量对米曲霉发酵进行优化，来确定米曲霉植酸酶发酵的最适接种量。

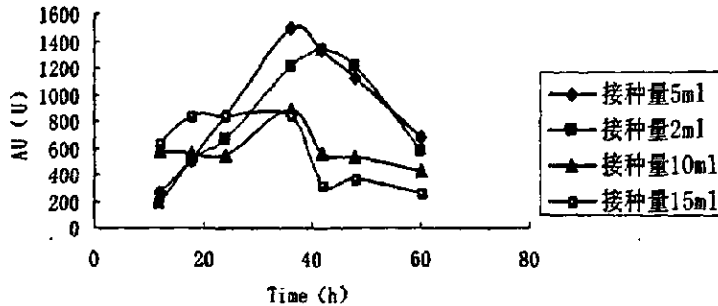


图 2-3 接种量对米曲霉植酸酶发酵的影响

根据图 2-3 所示，并不是接种量越大越好，米曲霉生长非常快，接种量太大，则早期生长过快，酶活性很快提高，但是随之则下降，也可能与产生蛋白酶时间提早有关系。也存在另外一种可能，就是菌体量太大，开始吸附发酵液中的各种酶类，所以在高接种量下显示类似的曲线，并且酶活比较低。

所以，在以后的米曲霉植酸酶发酵中，采用 5% 的接种量进行发酵。

3.3 通气量对米曲霉产植酸酶的影响

采用 500mL 三角瓶，在瓶中分别添加 30、50、70、90、100、120、140mL 的发酵培养基，对其进行发酵培养，确定最适装液量。经过实验发现，装液量太小时，虽然通气量比较好，但是菌体量太少，积累植酸酶的能力较差，酶的活性不高；而当装液量大于 100mL，由于溶氧差酶活开始下降，从而导致了发酵不充分，所以，选择了每 500mL 的三角瓶中装液量为 100mL，这种情况下，基本可以达到比较好的情况。

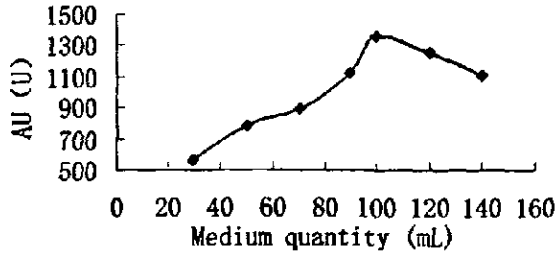


图 2-7 通气量对米曲霉植酸酶发酵的影响

3.4 碳源对米曲霉产植酸酶的影响

由于本实验室对丝状真菌发酵进行了很多摸索,故以下的实验没有在进行正交实验来优化发酵条件,而是在青霉发酵培养基的基础上进行了一定的优化。

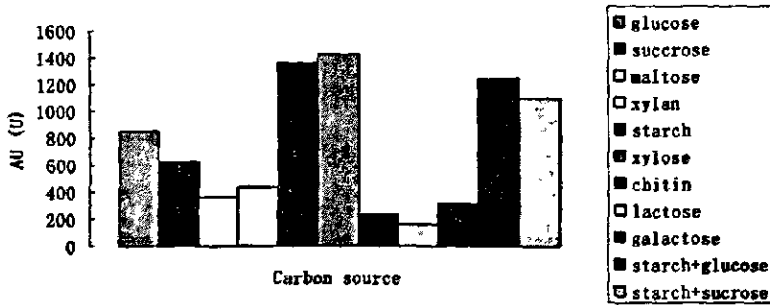


图 2-4 碳源对于米曲霉产植酸酶的影响

以上的碳源都选用 3% 的浓度,根据图 2-4,选择淀粉作为碳源而不选择木糖,原因是木糖的价格太过于昂贵,不适合作为大量培养时的碳源。从以上的结果也可以看出,米曲霉在产植酸酶的时候,对大部分的碳源都可以利用,而真正在工业生产中,淀粉质原料比较常用,所以适合于工业生产。有某些文献报道,在培养基中使用混合碳源比较好,如采用淀粉+葡萄糖、淀粉+蔗糖之类的,根据图 2-4,此方法对米曲霉产酶活性提高没有明显效果。通过实验图 2-5,研究不同淀粉浓度对米曲霉产植酸酶活力的影响,发现 3% 淀粉为最适浓度。

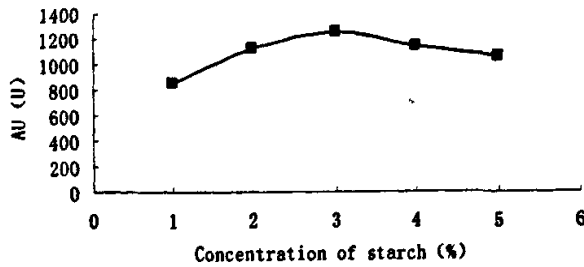


图 2-5 可溶性淀粉对于米曲霉产植酸酶的影响

3.5 氮源对米曲霉产植酸酶的影响

本实验以 3%可溶性淀粉为碳源，然后研究了几种无机氮源、有机氮源对产酶的影响，氮源浓度均为 2%。在此基础上，对米曲霉植酸酶发酵进行优化。

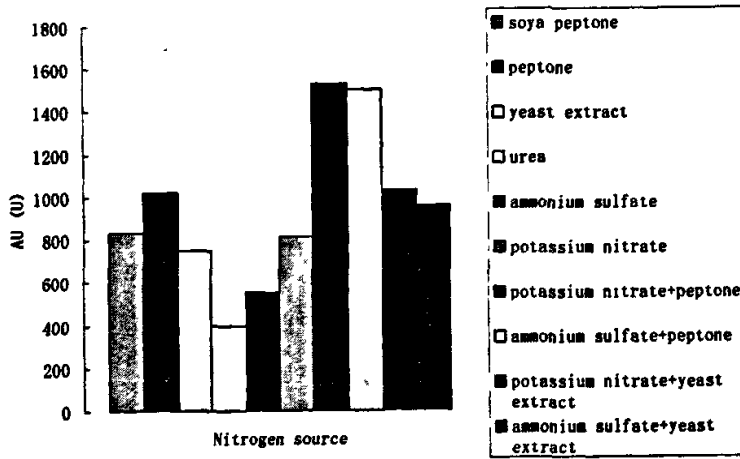


图 2-6 氮源对米曲霉产植酸酶的影响

根据图 2-6，以蛋白胨做为氮源，酶活虽比较高，但菌体生长比较差，而单一硝酸钾作氮源菌体生长非常旺盛，酶活相对比较高。采用复合氮源进一步进行优化，含量都取 1%。通过实验，还发现铵盐作为氮源，发酵液出现不同色素，硝酸铵产生粉色色素，硫酸铵产生黄色素。虽然硫酸铵和蛋白胨的酶活也比较高，但是由于产生色素，后期处理不易，故放弃了该种组合。在后来的实验中发现，加入 0.5%的蛋白胨也可以达到相似的结果，出于对于实验成本的考虑，在以后的发酵中，都采用了 0.5%的蛋白胨加上 1%硝酸钾作为氮源。

3.6 植酸钙对米曲霉产植酸酶的影响

通过试验还发现，在发酵培养基中加入植酸盐对于米曲霉的发酵有促进作用。在加入低浓度植酸钙后，在原来基础上的发酵培养基可以提高酶的活性约

20%。这种情况表明，在米曲霉植酸酶发酵过程中，植酸盐对其有一定的诱导作用，但如果浓度太高，则会抑制植酸酶的产生。如果要用于生产，则要对含植酸盐类的原料进行测定，以防原料抑制植酸酶的产生。

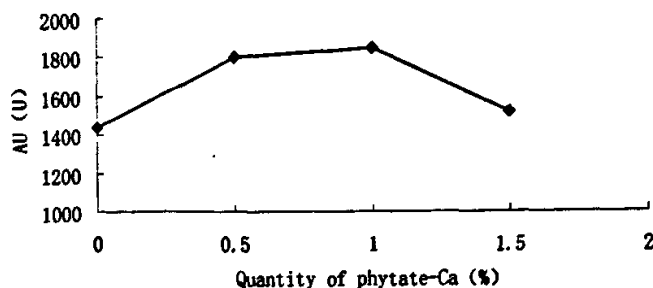


图 2-8 添加植酸钙对米曲霉产植酸酶的影响

添加植酸钙之后，虽然酶的活性提高了，但也会带来一些问题，就是由于培养基中被降解的磷增多，导致了在测定酶活时的背景升高，所以在检测植酸酶活性的时候，需要对样品进行一定量的稀释。

3.7 优化后的产酶曲线

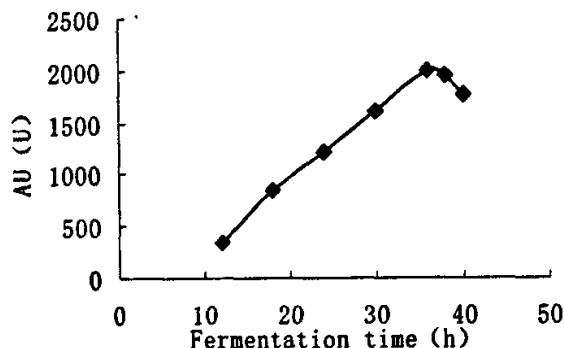


图 2-9 优化后的米曲霉产植酸酶曲线

通过优化，使得米曲霉植酸酶发酵产酶提高到原来的 1.5 倍左右。

4 小结

本部分内容对米曲霉产植酸酶的发酵条件进行了优化，确定了培养基的组成及发酵条件，为以后的工作奠定基础。

发酵培养基如下：可溶性淀粉 3%，蛋白胨 0.5%，硝酸钾 1%， FeSO_4 0.015%
1% 100×痕量无机盐母液（7% MgSO_4 0.1% MnSO_4 ）。

选择发酵时间为 37h, 接种量 5%, 装液量为 100mL/500mL 三角瓶, pH 值自然, 摇床原则 110 rpm, 30℃ 培养。

如果进行酶的纯化及性质研究时, 培养基中不加入植酸钙, 这样后期检测及处理比较容易。在不含植酸盐的培养基中, 加入 0.5% 的植酸钙, 对于提高酶活性有一定的好处。

第三章 米曲霉植酸酶的纯化及性质研究

通过上一章的实验结果,采用优化后的培养基对米曲霉进行发酵,得到粗酶液,进行以下的实验。本部分内容是对米曲霉植酸酶分离,纯化,并对该酶的部分性质进行研究和讨论,并对该酶是否有价值进行工业生产组出评价。通过实验发现,该酶的最适作用温度为 50℃,但与其它的植酸酶不同,该酶在 37℃(即动物消化道内温度)能保持最适温度酶活的 60%左右,比其它酶在该温度下的相对活性要略高。根据实验得出,米曲霉植酸酶基本的性质是属于 HAPs。并且,该酶对于金属离子不敏感,这对于以后工业生产中的制作工艺将减少很多的麻烦。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

米曲霉

1.1.2 培养基

种子培养基:参照第二章

液体发酵培养基:可溶性淀粉 3%,蛋白胨 0.5%, KNO_3 1%, FeSO_4 0.015%,
100×trace (7% MgSO_4 +0.1% MnSO_4)1%

1.1.3 试剂

相同部分参见第二章

SDS-PAGE 试剂(参见蛋白质电泳手册)

10%SDS:10g SDS,加蒸馏水至 100mL

50%甘油:50mL 100%甘油,加蒸馏水至 50mL

1%溴酚蓝:100g 溴酚蓝,加蒸馏水至 10mL,搅拌至完全溶解

A 液:29.2g 丙烯酰胺,0.8g 甲叉双丙烯酰胺,100mL 蒸馏水

B 液:75mL 2mol/L Tris-HCl(pH8.8),4mL 10% SDS,21mL 蒸馏水

C 液:50mL 1mol/L Tris-HCl(pH6.8),4mL 10% SDS,46mL 蒸馏水

10% 过硫酸铵:0.1g 过硫酸铵,1mL 蒸馏水

电泳缓冲液:3g Tris,14.4g 甘氨酸,1g SDS,加蒸馏水至 1000mL

5×样品缓冲液:0.6mL 1mol/L Tris-HCl(pH6.8),5mL 50%甘油,2mL 10%SDS

0.5mL β -巯基乙醇, 1mL 1%溴酚蓝, 0.9mL 蒸馏水

TaKaRa 公司的蛋白质 Marker

Native-PAGE 用试剂

在以上 SDS-PAGE 中所用试剂中, 除去 SDS 即可

Commassie 亮蓝染液: 1g 考马斯亮蓝 R250 40%甲醇 10%冰醋酸 定容到 1L

脱色液: 0.8mol/L NaCl 溶液

0.01mol/L Tris-HCl(pH7.7): 500mL 0.1mol/L Tris, 362mL 0.1mol/L HCl, 加蒸馏水至 1L

将此配好缓冲液用时稀释 5 倍

0.6mol/L NaCl 缓冲液: 用 0.01mol/L pH7.7 Tris-HCl 缓冲液配制 0.6mol/L NaCl 溶液

DEAE-Sepharose Fast Flow 凝胶: Amersham 进口

Sephacryl S-100: Amersham 进口

透析袋(8000-14400Dal, 27mm): 购自济南爱博公司

植酸钠: Sigma 公司

丙酮: 上海国药

聚乙二醇: 分子量 20000Dal, 分析纯, 上海第一试剂厂

甘氨酸: 分析纯, Amersco

丙烯酰胺: Amersco

甲叉丙烯酰胺, TEMED: 上海生工

透析袋处理液: 10mmol/L NaHCO₃, 1mmol/L EDTA, 煮沸 30min

1.1.4 仪器

752 型紫外光栅分光光度计: 山东高密 彩虹精密仪器有限公司

SHB-B 型循环水式多用真空泵: 郑州长城科工贸有限公司

冷冻离心机: Sigma 公司

DYCZ-24D 型电泳仪: 北京六一仪器厂

BSZ-100 型自动部分收集器: 上海沪西分析仪器厂

XWT-S 小型台式记录仪: 上海自动化仪表三厂

TH-500 型梯度混和器: 上海沪西分析仪器厂

JB-90-2 定时恒温磁力搅拌器: 上海天平仪器厂

超滤器: Amicon 杯式超滤器

滤膜: Millipore 5K

超滤管: Millipore 2mL 5K

FPLC: BIO-RAD 公司

1.2 方法

1.2.1 粗酶液制备

1.2.1.1 丙酮分级沉淀

将发酵 37h 的产物抽滤, 弃去菌体, 得到上清液即粗酶液。将粗酶液放置 4℃ 冰箱中冷却。

将-20℃ 预冷的丙酮缓慢加入到 4℃ 保存的粗酶液中, 磁力搅拌器搅拌, 终浓度为 30%。继续搅拌 10-15min, 0℃, 12000rpm, 冷冻离心 15min, 弃去沉淀。将上清继续加入丙酮, 至丙酮终浓度为 60%, 搅拌 10-15min 后, 0℃, 12000rpm, 离心 15min。弃去上清, 用 pH7.7, 0.01mol/L Tris-HCl 溶解沉淀。

1.2.1.2 透析

将透析带在 10mmol/L NaHCO₃, 1mmol/L EDTA 的处理液中煮沸 30min 后, 用蒸馏水冲洗干净。将上述得到的缓冲液溶解蛋白放入透析带, 在 pH7.7, 0.01mol/L Tris-HCl 中透析, 放于 4℃ 冰箱中。其间换几次缓冲液, 用以保证其离子浓度及 pH 值与缓冲液一致。将透析好的蛋白质溶液冷冻离心, 弃去不溶的沉淀 (大多为变性蛋白)。收集澄清溶液, 准备进行以后的分析。

1.2.1.3 聚乙二醇浓缩

将收集到的澄清酶液, 放入新的透析带中, 在冰箱中包埋在 PEG20000 中, 将酶液浓缩, 准备进行离子交换。

1.2.2 米曲霉植酸酶的分离纯化

1.2.2.1 米曲霉植酸酶与 DEAE-Sephrose Fast flow 的吸附实验

配制 pH7.1—8.9 的 0.01mol/L Tris-HCl 缓冲液, 进行 DEAE-Sephrose Fast flow 凝胶吸附试验, 确定最佳的缓冲液条件。取 1mL 的 DEAE-Sephrose Fast flow 阴离子交换树脂, 不同 pH 值的缓冲液处理好后, 分别加入 1mL 酶液, 混匀, 置

于4℃冰箱中静置1h后,测定上清的植酸酶活性。

1.2.2.2 Sephacryl S-100 的准备

将置于乙醇中保存 Sephacryl S-100 用缓冲液多次浸洗,至凝胶 pH 的稳定、整体均一,装柱,备用。

1.2.2.3 离子交换树脂和分子筛的装柱

DEAE-Sephacryl S-100 和 Sephacryl S-100 在真空泵下抽气。S-100 要抽气时间比较长,因为分子筛中气泡比较多。将洗净的层析柱保持垂直位置,关闭出口,柱内留下约 2.0mL 缓冲液。装 DEAE 柱时,将凝胶加入层析柱内,打开柱底部出口,调节流速 0.3mL/min,凝胶随柱内溶液慢慢流下而均匀沉降到层析柱底部。装 S-100 柱时关闭出口,使凝胶慢慢下沉,且在此过程中不能出现分层。两种凝胶都要一次装完,否则会影响柱子的均一性,使实验结果出现偏差,影响准确性。

1.2.2.4 米曲霉植酸酶的纯化流程、纯度检验及收率的计算

植酸酶的纯化:发酵好的粗酶液→4℃冰箱中保存→加入预冷的无水乙醇或丙酮(经过实验发现,丙酮的效果好于无水乙醇,但价格偏贵)→有机溶剂浓度到 30%分级沉淀→冷冻离心,除去沉淀→再次加入有机溶剂到浓度 60%→冷冻离心,取得沉淀→沉淀在缓冲液中溶解,透析,至上样标准→DEAE Sepharose Fast Flow 进行离子交换→将收集到的有酶活样品浓缩→浓缩后样品上 S-100 进行分离→电泳检测,纯度分析

得到的蛋白质用缓冲液溶解,装入透析袋中,放到缓冲液里进行体系平衡,要保证在上柱时与上样缓冲液保持相同的 pH 值。这个过程中,透析袋最好用新的,一是用于保证不受其它蛋白的污染,二是因为曲霉的发酵液中会含有少量的纤维素酶活性,如果使用时间太久,会导致透析袋破裂,造成不必要的损失。

处理好的样品可以用来上 DEAE Sepharose Fast Flow 离子交换树脂,上样后用 0-0.6mol/L NaCl 溶液梯度洗脱,收集有酶活的组分,透析除盐,然后再进行分子筛 S-100 分离。

分离后的组分,进行变性蛋白质电泳(SDS-PAGE),用以鉴定组分的纯度。

通过实验确定,采用 pH7.7, 0.01mol/L 的 Tris-HCl 作为分析过程中的缓冲液,进行离子交换及分子筛分离。

1.3 SDS-PAGE 垂直板电泳

采用垂直板 SDS-PAGE 电泳。

分离胶浓度为 12%，浓缩胶浓度 5%，电泳过程中恒压 160V。电泳后，考马斯亮兰 R-250 染色 0.5h，用 0.8mol/LNaCl 脱色。

1.4 植酸酶收率的计算

采用 Bradford 法测定蛋白质含量，以牛血清白蛋白（BSA 1mg/mL）做标准曲线。

2 植酸酶性质的研究

2.1 作用温度对米曲霉植酸酶活性的影响

在 30℃、37℃、40℃、50℃、60℃、70℃、80℃等一系列温度下，测定植酸酶酶活，确定最适作用温度。

2.2 米曲霉植酸酶最适作用 pH 值的测定

在最适作用温度下，在 0.1mol/L 不同 pH 下，反应 10min 测植酸酶的酶活力，确定该酶的最适作用 pH 值。

2.3 米曲霉植酸酶热稳定性的测定

将酶液分别在 30℃、37℃、40℃、50℃、60℃、70℃、80℃等温度下保温不同时间，然后在 50℃，10min 测定残余酶活力，研究米曲霉植酸酶的热稳定性。

2.4 米曲霉植酸酶对于金属离子的耐受

将 1mmol/L 浓度的不同金属离子加入到植酸酶中，4℃放置 30min 后测定残余酶活，确定金属离子对酶活力的影响。

3 结果与讨论

3.1 米曲霉植酸酶的分离与纯化流程

用离子交换处理大量的样品，收集有酶活部分，经过除盐，浓缩后，用 FPLC 系统进行处理，这样既省去了很多人工，也大大加快了样品处理速度，并且减少了蛋白质变性的机会。用本实验室的离子交换系统处理后，再用相同的条件用 FPLC 进行处理，将几次得到的样品浓缩后，再用 S-100 分离，得到了电泳纯的

样品。

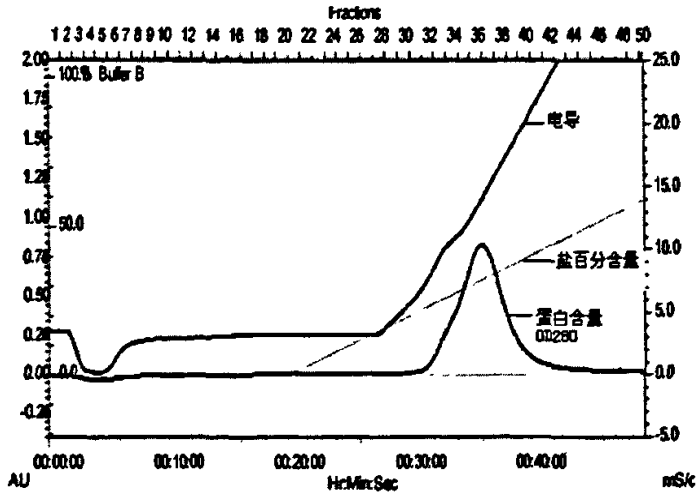


图 3-1 米曲霉植酸酶 DEAE Sepharose Fast Flow FPLC 图谱

图 3-1 是经过一次离子交换后，在 FPLC 上使用 Sepharose Fast Flow 的纪录图谱，在这种情况下，第一次上柱时的色素和透过峰基本上都没有了，收集到相应酶活的组分，对该部分收集也进行脱盐处理，然后在上分子筛进行分离。

使用 FPLC 时要注意，要使用抗压的凝胶，由于该系统是一个加压系统，所以才使这个分离过程加速，如果凝胶不抗压，将导致柱中填料变短，以至于最后缓冲液根本无法经过凝胶等一系列的问题。

将几次收集到的有活性的部分除盐后，用超滤管进行浓缩。将浓缩后的酶液采用 S-100 进行分离，缓冲体系仍然用 pH7.7 0.01mol/L Tris-HCl。再次在 FPLC 上进行分离，得到以下的结果。

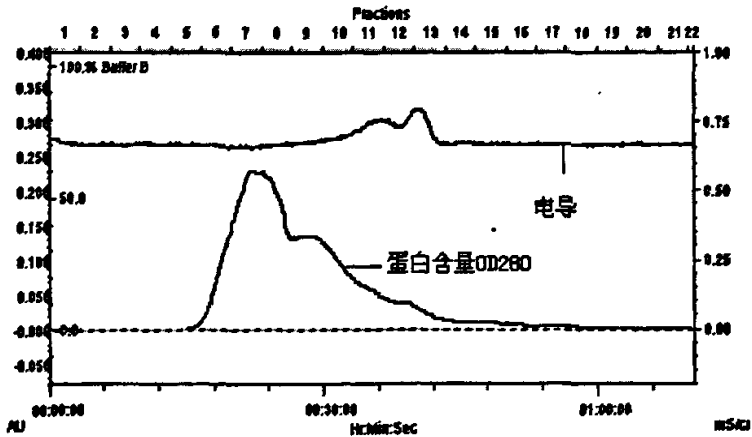


图 3-2 米曲霉植酸酶 S-100 FPLC 图谱

表 3-1 米曲霉植酸酶的纯化

纯化步骤	总蛋白 (mg)	总酶活 (10^3 U)	比活力(U/mg)	收率 (%)	纯化倍数
粗酶液	3150	230	73.0	100	1
丙酮沉淀 (60%)	520	150	288.5	65.2	3.95
DEAE-Sepharose FF	42.5	43.4	1021.2	18.8	14
S-100	7.5	20.4	2720	8.8	39.2

在用 S-100 分离的时候, 第六、七两管为收集到的有活性的组分。SDS-PAGE 电泳分析, 得到电泳纯的单带。

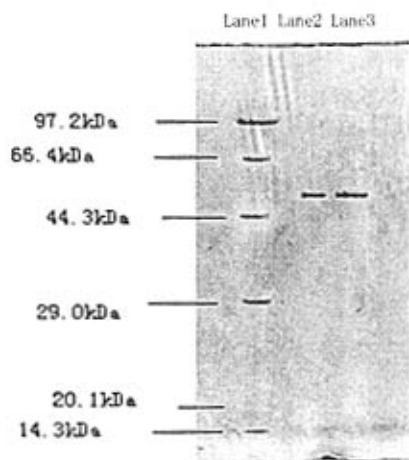


图 3-3 米曲霉植酸酶 SDS-PAGE

Lane1 蛋白质 Mark Lane2, Lane3 米曲霉植酸酶蛋白

经过电泳迁移率计算, 得到米曲霉植酸酶的分子量为 57200Da。在已知的真菌植酸酶中, 分子量属于比较小的。

3.2 作用温度对植酸酶活性的影响

实验结果表明, 米曲霉植酸酶作用的最适温度为 50℃。动物消化道中最适的作用温度为 37℃, 在该温度下, 植酸酶活性可以保持最适温度下的 60%左右。

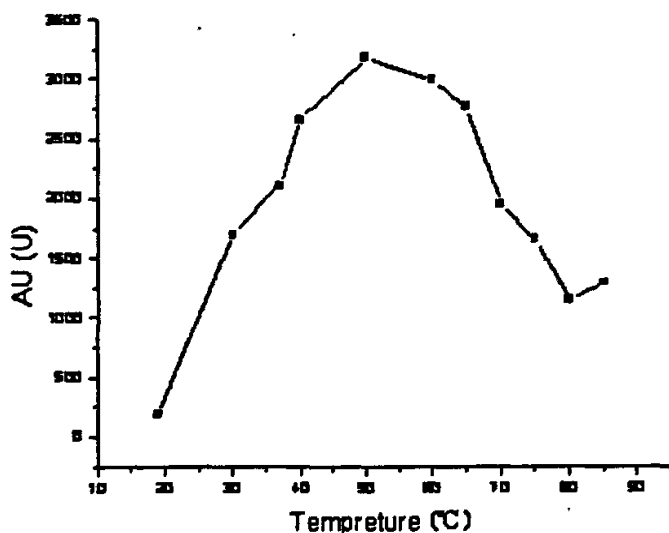


图 3-4 米曲霉植酸酶最适反应温度

从图 3-4 中可以看出，米曲霉植酸酶在 80°C 处出现一个拐点，酶活又开始升高，这种情况多有报导。由于实验中所用的底物是植酸钠，通过查阅资料，植酸钠在高温下会自行分解，释放出磷，这可能是植酸酶酶活测定时出现拐点的的一个原因。

3.3 pH 值对植酸酶活性的影响

根据参考文献，植酸酶可以分为酸性、中性、碱性，由于单胃动物消化道内 pH 值表较低，往往起作用的植酸酶也需要在酸性条件下发挥其作用，所以，考查植酸酶的最适作用 pH 值是非常必要的。

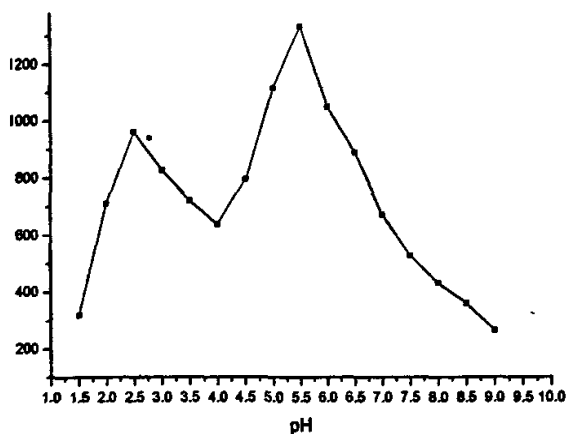


图 3-5 米曲霉植酸酶的最适 pH 值

根据实验结果图 3-5，米曲霉植酸酶的作用 pH 峰值有两个，分别在 2.5 和 5.5，这与文献中报导的 phyA 类植酸酶一致。而在 pH5.5 时酶的活性更高，pH2.5 相对低一些。这个情况基本适应动物体内的情况。米曲霉产植酸酶作为饲料添加剂使用。

3.4 米曲霉植酸酶热稳定性

本实验将酶在不同温度下保温不同时间，然后再测定其酶活。在日常生产和应用中，饲料用植酸酶产品的储藏和使用都是比较粗放的。所以，植酸酶的热稳定性就是该类产品能否广泛应用的一个重要标准之一。本实用来检测究竟米曲霉植酸酶对环境的要求是否严格，能否在较高温度下维持酶的活性。由实验结果图 3-6 可以看出，在常温下，米曲霉植酸酶还是比较稳定的，当温度超过 70℃，米曲霉植酸酶较容易失活。本实验结果为植酸酶产品的保存提供一个指导。

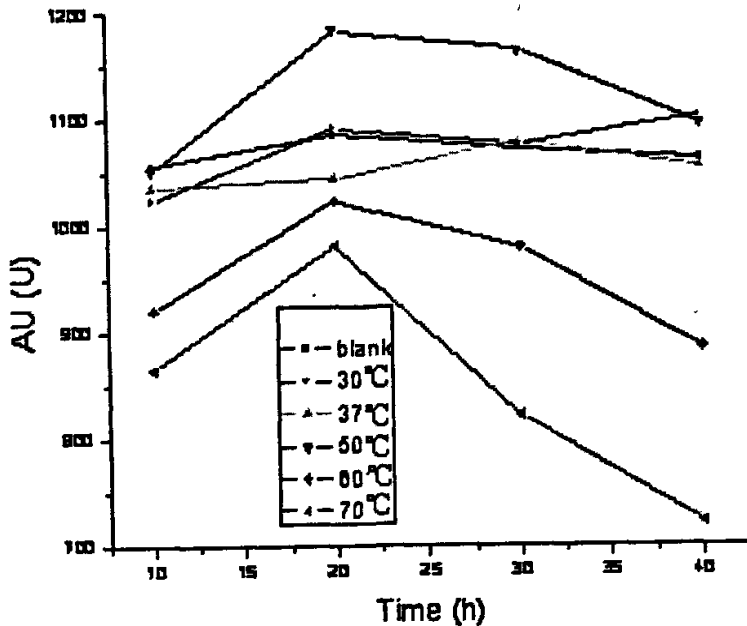


图 3-6 米曲霉植酸酶热稳定性测定

实验结果图 3-6，米曲霉植酸酶在 70℃时，30min 稳定性还是很好的。植酸酶产品在最后的处理中，要经过一步高温制粒过程，该过程需要几到十几分钟，这一步正是植酸酶产品活性损失最大的步骤。米曲霉植酸酶在 70℃时稳定性较好，30min 处理仍可维持较高的活性，在该温度下进行制粒，酶活损失不会太大。可以对米曲霉植酸酶进行热稳定性改造，有一定的应用价值。

3.5 金属离子对米曲霉植酸酶活性的影响

金属离子往往会影响到酶的活性,造成某些酶的使用受到影响,本实验测定了不同离子对米曲霉植酸酶的影响。

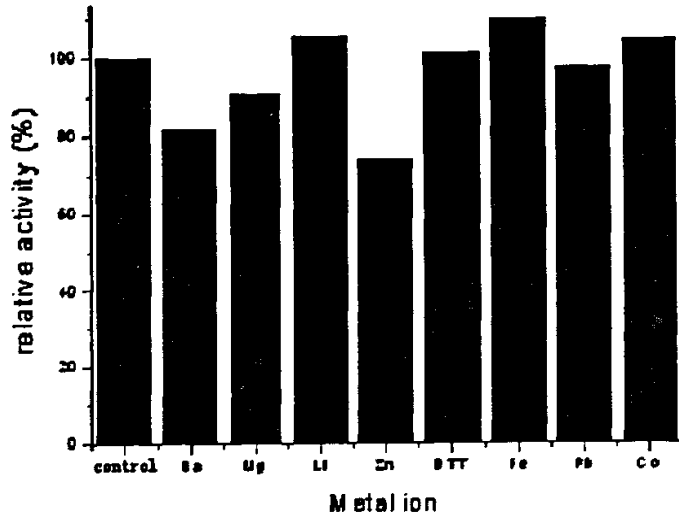


图 3-7 离子对米曲霉植酸酶的影响

实验结果图 3-7 表明,发现 1mmol/L Li^+ , Fe^{2+} , Co^{2+} 对米曲霉植酸酶的活性有轻微的促进作用, Zn^{2+} , Ba^{2+} 对该酶的活性稍有抑制作用。该植酸酶的活性基本上不受离子的影响,这与有关报导符合^[49]。在发酵过程中,不可避免的会接触到各种金属离子,如果离子对米曲霉植酸酶的活性影响很大,则对发酵设备及程序要求比较严格。从图 3-7 看来,铁离子对于米曲霉植酸酶活性略有增强作用,采用普通的钢铁容器进行发酵不会有副作用。

加入金属离子对于米曲霉植酸酶活性没有太大的影响,所以,我考虑如果加入 EDTA 除去金属离子会不会影响酶活,做了以下实验,用酶与不同浓度的 EDTA 保温处理,半个小时后测定酶活。

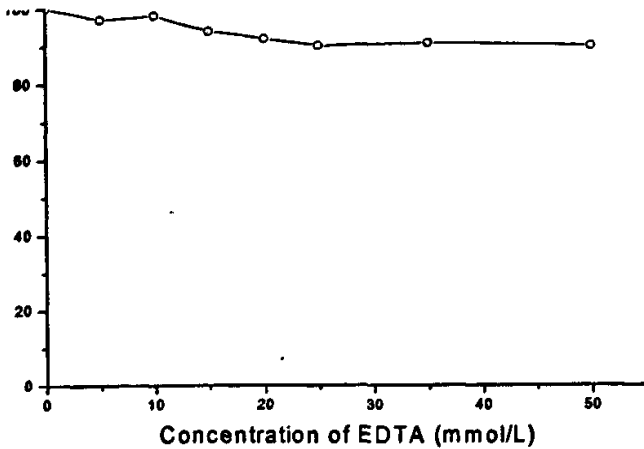


图 3-8 EDTA 对米曲霉植酸酶的活性影响

通过图 3-8 可以看到, 在 50mmol/L 的 EDTA 存在下, 酶活性不会有太大的变化, 这说明米曲霉植酸酶对于金属离子不依赖, 或者在不剧烈的情况下, EDTA 不能除去可能存在于米曲霉植酸酶内部的金属离子, 所以不会有太大的影响。

4 小结

本章的内容主要是对米曲霉植酸进行纯化及基础的性质研究。发现该酶无法用硫酸铵沉淀下来, 因此采用有机溶剂沉淀, 这种方法代价比较大。经过 DEAE-Sephacryl S-100 和 Sepharose Fast Flow 分离, 得到电泳纯的米曲霉植酸酶蛋白。

在米曲霉植酸酶纯化的过程中, 最早使用硫酸铵分级沉淀, 结果发现, 即使将盐浓度加大到 100%, 得到的沉淀仍然没有酶活, 故采用有机溶剂进行沉淀, 这个结果与国外报道的类似, 文献中记载的关于米曲霉植酸酶沉淀是采用 70% 的无水乙醇实现的。但是, 用有机溶剂沉淀蛋白质, 容易使蛋白变性, 这就要求要尽快的处理样品, 而且尽可能的保持低温。

米曲霉植酸酶的最适作用温度为 50℃, 最适 pH 值为 2.5 和 5.5, 测定酶活时一般采用 pH5.5。该酶在常温下稳定性较好, 超过 60℃则活性下降很快。金属离子对于该酶没有太大的影响。Li⁺, Fe²⁺, Co²⁺ 对米曲霉植酸酶的活性有轻微的促进作用, Zn²⁺, Ba²⁺ 对该酶的活性稍有抑制作用。在温和的状况下, EDTA 对该酶没有作用, 从现有数据看, 该酶不属于金属酶。从以上的结果看, 米曲霉植酸酶应该属于 HAPs。

第四章 米曲霉植酸酶活性中心氨基酸残基的研究

通过第三章的分析研究,基本确定米曲霉植酸酶属于 HAPs (EC 3.1.3.8)。该类酶都有一个相同的活性位点 R-H-G-X-R-X-P 和两步催化水解磷酸单酯键的机制^[50, 51]。所以,以下的实验是根据化学修饰的方法对活性位点中的精氨酸 (Arg)、组氨酸 (His)、甘氨酸 (Gly) 等位点进行分析。此外,在已经报导的植酸酶中,其结构中都有 5 组二硫键的存在,这对于蛋白质的耐热性,蛋白质结构的稳定性都有很大的作用,故该部分内容中包括对二硫键的一些分析。

蛋白质的化学修饰是指蛋白质分子化学结构的改变,有的时候化学结构的改变并不影响蛋白质的生物学性质,这些修饰称为非必需部分的修饰。但是大多数情况下,蛋白质化学结构的改变将引起生物学活性的改变(如下降或者完全消失)。蛋白质的化学修饰主要包括两个方面:(1)蛋白质分子的侧链基团的改变;(2)蛋白质分子中主链结构的改变。化学修饰是研究蛋白质的结构与功能关系的一种重要手段,也是定向改造蛋白质性质的一种有力工具。

在以前的报道中,对植酸酶的化学修饰做得比较少。本部分内容主要对植酸酶活性中心的氨基酸进行分析。

1 材料与方法

1.1 试剂

焦炭酸二乙酯 (DEPC, diethylpyrocarbonate Sigma)、巯基乙醇、甲醛、乙酰丙酮为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 精氨酸的化学修饰

用乙酰丙酮(0-0.87mol/L)在 pH8.9 的 Tris-HCl 缓冲液中(5mmol/L),25℃ 下保温 30min 进行化学修饰,然后检测酶的剩余活力。

1.2.2 组氨酸的化学修饰

组氨酸中的咪唑基团是化学修饰的主要作用位点,可以通过氮原子的烷基化或碳原子的亲核取代来进行修饰。焦炭酸二乙酯 (DEPC, Diethylpyrocarbonate) 是最常用的修饰组氨酸残基的试剂。DEPC 用冷乙醇溶解 (0℃),其浓度用咪唑

滴定测定。以不同浓度的 DEPC (0-28mmol/L) 与植酸酶 pH 5.6 的 NaAc-HAc 缓冲液中 (5mmol/L), 25℃保温处理 30min 进行修饰, 然后检测酶的剩余活力 (对照加等体积的乙醇)。

1.2.3 氨基的化学修饰

甲醛 (0-4.26mol/L) 在 pH 5.6 NaAc-HAc 缓冲液中 (5mmol/L), 25℃下与酶作用 30min 后, 检测酶的剩余活力。酶蛋白中的氨基主要是赖氨酸游离的 ϵ -氨基, 因此可以确定赖氨酸是否与活性中心有关。

2 结果与讨论

2.1 精氨酸残基的化学修饰结果

乙酰丙酮在一定的 pH 条件下能特异地与蛋白质中的精氨酸残基起化学反应, 从而改变精氨酸侧链基团的性质。倘若精氨酸是酶活性必需的, 酶被修饰后活力将丧失。用乙酰丙酮 (0-1mol/L) 在 pH8.9 的 Tris-HCl 缓冲液中 (5mmol/L), 进行化学修饰, 检测酶的剩余活力, 结果如图 4-1 所示。

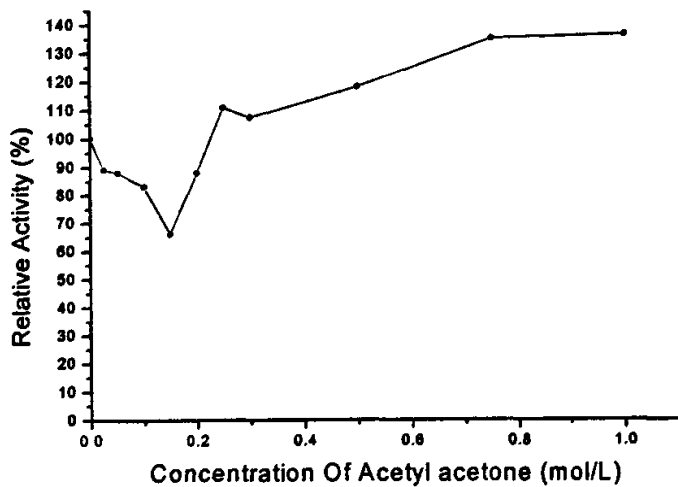


图 4-1 乙酰丙酮对米曲霉植酸酶活性的影响

实验结果图 4-1 有些让人迷惑, 经过几次重复, 仍然是如此。经过查阅资料, 乙酰丙酮对于用本实验中测酶活的方法有一定的影响, 即在不加入酶的情况下, 随着乙酰丙酮浓度的升高, 也会出现在 415nm 下, 吸光度增加的情况。

但在乙酰丙酮浓度小于 0.2mol/L 的情况下, 还是可以清楚地看到植酸酶的酶活是下降的, 由此也可以确定精氨酸的确是在米曲霉植酸酶的活性中心, 并且

起着非常重要的作用。

2.2 组氨酸的化学修饰结果

图 4-2 不同浓度的 DEPC (0-45mmol/L) 与米曲霉植酸酶 在 pH 6.0 的 NaAc-HAc 缓冲液中 (5mmol/L), 25℃ 保温处理 30min 进行修饰, 检测酶的剩余活力。随着 DEPC 浓度的增加, 植酸酶活力下降, 到 10mmol/L 的时候, 相对酶活降至 50% 以下, 并且, 随着 DEPC 浓度增加, 酶活基本上呈现直线下降, 由此可见, 组氨酸是该酶活性中必需基团之一。

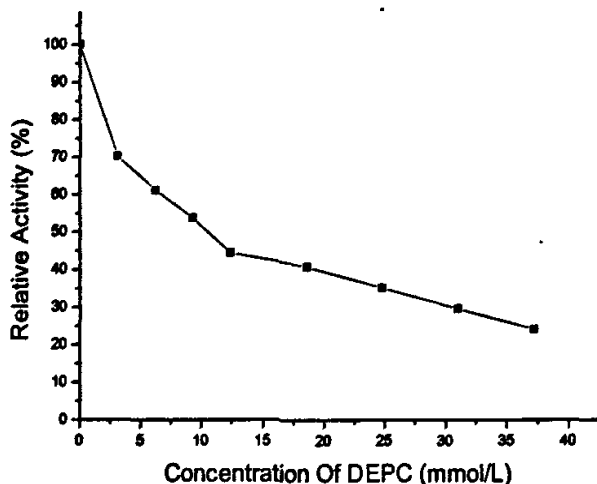


图 4-2 DEPC 对米曲霉植酸酶活性的影响

2.3 氨基的化学修饰结果

甲醛对米曲霉植酸酶进行化学修饰, 探讨赖氨酸的氨基酶催化活力的关系。不同浓度的甲醛 (0-6mol/L) 在 pH 5.6 NaAc-HAc 缓冲液中, 25℃ 下与酶作用 30min 后, 检测酶的剩余活力。

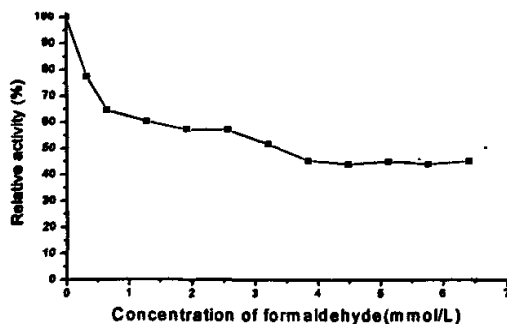


图 4-3 甲醛对米曲霉植酸酶活性的影响

结果见图 4-3。随着修饰剂浓度的增大, 植酸酶活力逐渐下降, 当甲醛浓

度为 1.28mol/L 时，残留酶活力降到 60.21%，然后随着甲醛浓度增高，酶活缓慢降低，最后基本维持不变，说明酶活性与赖氨酸残基保持游离的 ϵ -氨基有关系，但赖氨酸 ϵ -氨基并不在该酶的活性中心

2.4 二硫键的化学修饰

在已经报道的文献中，phyA 类植酸酶有五对二硫键的存在，对于维持酶的活性有非常重要的作用，所以，下面的实验使用巯基乙醇来还原二硫键，并测定随巯基乙醇浓度增加酶活的变化情况。实验采用 0-100mmol/L 的巯基乙醇和米曲霉植酸酶反应。

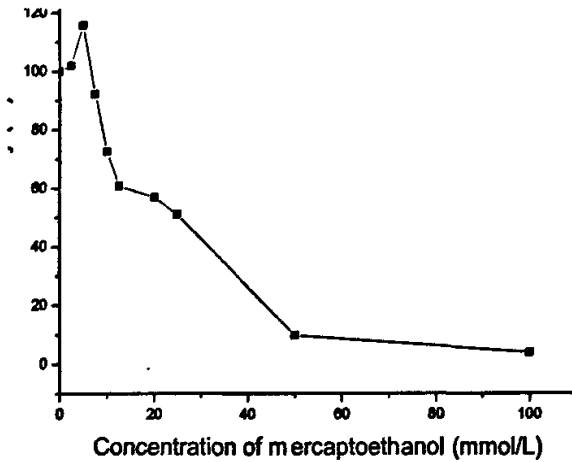


图 4-4 巯基乙醇对米曲霉植酸酶活性的影响

在实验结果中，发现巯基乙醇浓度低于 8mmol/L 的时候，植酸酶酶活是增加的，这可能是因为在低浓度的情况下，并不能使蛋白中的二硫键完全遭到破坏，而是使蛋白质的结构相对打开，这样，更有利于底物与酶结合，所以，表现出来的情况是酶活有所提高。

当随着巯基乙醇浓度增大，这时候，分子结构中的二硫键遭到严重的破坏，这种情况下，底物无法和酶结合，或是酶的活性中心无法再维持原来的结构，无法再完成酶分子原来作用。在这样的情况下，植酸酶分子失去了水解磷酸酯键的功能，表现为酶活性的丧失。

3. 小结

据已报道文献可知，phyA 类植酸酶具有保守的 RHGXRXP 结构，并是植酸酶的活性位点。本章内容利用化学修饰的方法来确定米曲霉植酸酶是否属于

phy-A 类植酸酶。

研究表明,由于乙酰丙酮能够影响精氨酸(Arg)侧链的胍基,从而导致了米曲霉植酸酶活性的下降,这也就表明了精氨酸的确处在米曲霉植酸酶活性中心。DEPC可以定点修饰组氨酸(His),实验中的数据也表明,随着DEPC浓度的增加,米曲霉植酸酶的活性迅速下降,所以,组氨酸也是米曲霉植酸酶活性中心之一。赖氨酸(Lys)的 ϵ -氨基往往对酶活性有很大的影响,从实验结果可以看出,虽然甲醛液可以影响到米曲霉植酸酶的活性,但是并不能完全抑制,这可能是由于赖氨酸 ϵ -氨基所形成的区域对于该酶活性有一定的影响,但并不位于该酶的活性中心。

由于在 phyA 类植酸酶中都有多对的二硫键存在,而且对于维持植酸酶的活性有很重要的作用,通过用巯基乙醇破坏二硫键实验发现,低浓度的巯基乙醇有利于打开蛋白质的结构,使得米曲霉植酸酶活性稍有提高,但随着浓度增加,则二硫键被破坏,使得酶活性丧失,这说明,二硫键对于维护米曲霉植酸酶活性有着非常重要的作用。

第五章 米曲霉植酸酶基因的克隆

酶学性质及化学修饰研究发现,米曲霉植酸酶与已报道的 phyA 类植酸酶非常相似,并且该酶具有较高活性,有很好的工业生产利用价值。因此,克隆该酶的基因,构建工程菌,从分子角度对该酶基因进行改造,进行体外酶的高效表达,提高其工业生产应用价值。

本文通过检索 GeneBank 中已发表米曲霉植酸酶序列,进行比对,根据同源性设计引物,PCR 克隆 1.5kb 的 DNA 片段。将该片段连接到载体 pMD18-T 中,进行全序列测定。通过分子生物学软件及国际互联网检索,对该片段的核苷酸序列及其编码的蛋白质序列进行了分析比较。

1 材料与amp;方法

1.1 菌株与质粒

表 1 菌株和质粒

菌株与质粒	基因型与主要特征	来源及参考文献
<i>Aspergillus oryzae</i>	丝状真菌 F, recA1, endA1, gyr96, hsdR17(mk',	本实验室保存
<i>E. coli</i> DH5- α	rk), supE44, λ , thi1, relA1, lacZya	本实验室保存
pMD 18-T	TA cloning vector, Amp ^r , lacZ α	购于 TaKaRa 公司
pMD18-T-phyA	以 pMD 18-T 为载体,克隆有米曲霉 phyA 染色体基因的质粒	本文构建

1.2 试剂

DNA 分子量 Marker (λ DNA HindIII 酶切), Taq DNA 聚合酶, RNase A, 琼脂糖凝胶 DNA 回收、纯化试剂盒, IPTG, X-gal 均购自 TaKaRa 公司,其他试剂为国产分析级纯。

丝状真菌染色体提取液:

200mmol/L Tris · Cl (pH 8.5); 250mmol/L NaCl; 25mmol/L EDTA; 2%SDS

丝状真菌染色体 DNA 提取试剂盒

TE 溶液: 10mmol/L Tris · Cl, 1mmol/L EDTA, pH8.0

NaAc 溶液: 3mol/L NaAc, 调 pH 值至 5.2

碱法提取质粒试剂:

溶液 I: 50mmol/L 葡萄糖; 25mmol/L Tris · Cl; 10mmol/L EDTA;

溶液 II: 200mmol/L NaOH; 1%SDS;

溶液 III: 3mol/LKAc, pH4.8

小批量提取质粒试剂盒

1.3 培养基及培养条件

米曲霉产植酸酶培养基: 3%可溶性淀粉, 0.5%蛋白胨, 1%KNO₃, 0.05%MgSO₄ · 7H₂O, 0.015%FeSO₄ · 7H₂O, 0.001%MnSO₄ · H₂O

大肠杆菌 LB 培养基: 1%胰蛋白胨, 0.5%酵母提取物, 1%NaCl, 用 NaOH 调 pH 至 7.5, 15 磅高压灭菌 20min。固体培养基添加 1.5%的琼脂粉。

含 IPTG 和 X-gal 的筛选培养基: 在事先准备好的含 50μg/mL Amp (氨苄青霉素)的 LB 平板表面加 40μL X-gal 储液(20mg/mL)和 4μL IPTG 储液(200mg/mL), 用无菌刮刀将溶液涂匀, 置于 37℃下放置 3~4 小时, 使培养基表面的液体完全吸收。

1.4 DNA 克隆技术^[45, 46]

1.4.1 米曲霉染色体总 DNA 的提取和纯化^[47]

1. 在固体麸皮培养基上划线, 28℃培养三天, 活化菌种。用无菌去离子水制成孢子悬液, 接种于装有 100mL 麸皮液体培养基的 500mL 三角瓶中 200rpm 培养三天

2. 将生长良好的菌丝体实心小球, 用放有灭菌滤纸的布氏漏斗中, 真空泵抽干, 放到烘箱中烘干

3. 取 0.5g 干燥菌体, 加入液氮研磨约 0.5h

4. 将研磨菌体加入 10mL SDS 提取液, 63℃水浴 0.5~2h

5. 加入等体积的酚:氯仿:异丙醇, 混匀 10min, 11000rpm 离心 10min, 时间可适当延长至 30min

6. 取上清, 重复上一步

7. 取上清, 加入等体积氯仿:异丙醇, 混匀 10min, 11000rpm 离心 10min
8. 取上清, 重复上一步
9. 取上清, 加入 2/3 体积预冷异丙醇, 颠倒混匀, 出现絮状沉淀
10. 将絮状沉淀小心挑至 Ep 管中, 加洗 buffer 洗涤 2~3 次
11. 将纤维状 DNA 转移至另一 Ep 管中, 加入 0.5mL TE 溶解, 4℃ 保存
12. 加入 1mg/mL RNase 100 μ L, 使其终浓度为 50~70 μ g/mL, 37℃ 保温 30min

除 RNA

13. 加入 10mg/mL 蛋白酶 K 30 μ L, 30℃ 保温 5min, 使其终浓度为 0.2 μ g/mL
14. 加入等体积的酚: 氯仿: 异戊醇, 颠倒 30sec, 除蛋白及酶, 11000rpm 离心 10min
15. 取上清水相, 加入 1/10 体积 3mol/L NaAc 和 2 倍体积预冷无水乙醇, -20℃ 放置 0.5h, 挑取絮状 DNA 沉淀至 Ep 管中
16. 加 400 μ L TE 溶解, -20℃ 保存

1.4.2 PCR 引物设计合成

根据从互联网上 GeneBank 中检索到的植酸酶 cDNA 序列, 利用引物设计软件 Primer Premier5.0 设计了上下游引物 Primer A 和 Primer B, 将设计好的引物提交给上海生工生物技术公司合成。

Primer A: 5' -ATGGCGTCCTTAGCGTGCT-3'

Primer B: 5' -TTAAGCAAAGCACTCTCCCA-3'

1.4.3 PCR 扩增反应

在 50 μ L 反应体系中分别加入 10 \times Taq DNA 聚合酶 buffer 5 μ L, 上下游引物至 20 μ mol/L, dNTP100 μ mol/L, MgCl₂1mmol/L, 模板 DNA 10ng/ μ L, 加灭菌的去离子水补足到 50 μ L, 充分混匀并离心。放入 PCR 仪 (DNA Thermal Cycler2400) 中, 使用 Touchdown PCR, 94℃ 充分变性 4min, 然后迅速加入 1 μ L TaqDNA 聚合酶, 混匀。设定反应条件: 94℃ 变性 30s, 61℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 2min, 2 个循环; 94℃ 变性 30s, 60℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 2min, 2 个循环, 以此类推, 到 94℃ 变性 30s, 47℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 2min, 2 个循环; 然后 72℃ 保温 10min,

程序结束。

另外设立阴性对照：除了不加模板外，所有步骤同上。

1.4.4 琼脂糖凝胶电泳技术

采用 Tris · HAc (TAE: 40mmol/L Tris · HAc, 1mmol/L EDTA, pH8.0), 琼脂糖浓度为 0.8% (w/v)。称取适量的琼脂糖, 加入电泳缓冲液, 加热溶化后倒入制胶模具中, 插入梳子。

DNA 样品在电泳前加入 1/5~1/10 体积的上样缓冲液 (1% SDS, 50%甘油, 0.05%溴酚蓝), 混匀, 取适量体积的样品加入凝胶点样孔中, 控制电压在 3~6V/cm 为宜。电泳结束后将胶板放入 0.5 μ g/mL 的溴化乙锭 (EB) 溶液中, 室温下染色 15~30min, 蒸馏水中脱色 10min 后, 置于紫外灯下观察。

1.4.5 PCR 样品的纯化 (DNA 琼脂糖凝胶回收)

PCR 扩增样品经过琼脂糖电泳后, 利用琼脂糖凝胶 DNA 回收纯化试剂盒从凝胶中回收目的 DNA 片段, 其操作步骤如下:

1. 用手术刀片将含有目的 DNA 片段的凝胶块切下来 (应保留尽可能少的凝胶), 转入已称重的 Eppendorf 管中

2. 按每 100mg 凝胶加入 300 μ L 琼脂糖溶解 DR-I buffer, 混匀后 62 $^{\circ}$ C 加热融化胶块

3. 向融化的胶中加入 DR-I Buffer 1/2 体积的 DR-II Buffer

4. 将试剂盒中的 spin column 安置于 collection tube 上

5. 将 3 中的溶液转至新 spin column 中, 3600rpm 离心 1min, 弃滤液

6. 加入 500 μ L Rinse A 加入 spin column 中, 3600rpm 离心 30sec, 弃滤液

7. 加入 700 μ L Rinse B 加入 spin column 中, 3600rpm 离心 30sec, 弃滤液

8. 重复上步, 然后 12000 rpm 离心 1min

9. 将 spin column 按置于新的 1.5mL 离心管中, 加入 60 $^{\circ}$ C 预热的洗脱液 25 μ L, 室温静置 1min, 12000rpm 离心 1min 洗脱 DNA

1.4.6 连接反应

1. 取 0.1 μ L 载体 DNA (pMD18-T 质粒) 转移到无菌离心管中, 加入 4 倍的外源 DNA 片段 (PCR 回收样品)。

2. 加入连接酶 Solution I 5 μ L, 轻轻混匀, 短暂离心, 将液体都甩到管底。
3. 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。

同时做一组对照, 用无菌水代替外源载体, 其他同上

1.4.7 CaCl₂法转化大肠杆菌

1. 按 1:100 比例将过夜培养的菌液加入到 200mL 新鲜 LB 培养液中, 37 $^{\circ}$ C 通气培养至 OD₆₀₀ 约 0.4, 冰浴 10min, 5000rpm 离心, 弃上清
2. 用少量 CaCl₂-MgCl₂ 洗涤, 冰浴 20min, 加入 1/15 体积的 CaCl₂-甘油, 200 μ L 分装, -70 $^{\circ}$ C 保存备用
3. -70 $^{\circ}$ C 保存的感受态细胞置于冰上融化, 加入不超过 10 μ L 的质粒 (浓度应小于 10 ng/ μ L), 混匀, 冰浴 30min
4. 42 $^{\circ}$ C 热冲击 90sec, 勿摇, 冰浴 5min
5. 加入 800 μ L LB 液体培养基, 37 $^{\circ}$ C 轻摇 60min 后
6. 涂布于含 IPTG 和 X-gal 的筛选培养基

1.4.8 重组质粒的筛选

将转化后的菌液涂布在含 IPTG 和 X-gal 的筛选培养基平板上, 37 $^{\circ}$ C 倒置培养 12~16h, 待菌落长到直径 1~2 mm 后将平板拿出。自身发生连接的载体和宿主菌有 α -互补作用, 在筛选培养基平板上为蓝色菌落; 而含有带外源片段的重组质粒的转化子由于缺乏 β -半乳糖苷酶活性, 在该平板上应为白色菌落。

用无菌牙签挑取白色菌落, 接于 3mL 含 100 μ g/mL Amp 的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 摇床, 过夜培养, 小样提取质粒, 电泳检测质粒的大小, 挑出可疑的质粒, 进一步做限制性内切酶酶切验证。

1.4.9 转化质粒的提取

1. 挑取白色单菌落接种于 3mL 含 Amp (100 μ g/ μ L) 的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 摇床培养过夜
2. 取 1.5mL 培养物倒入 Eppendorf 管中, 高速离心 30sec
3. 将 Eppendorf 管倒扣于吸水纸上, 尽量空干培养基
4. 加入 100 μ L 溶液 I, 用枪头抽吸混匀
5. 加入 200 μ L 溶液 II, 颠倒混匀, 冰浴放置 5min
6. 加入 150 μ L 溶液 III, 颠倒混匀, 冰浴放置 10min

7. 12000rpm 离心 5~10min, 将上清转入一新 Eppendorf 管中
8. 加入等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提一次, 12000rpm 离心 5min, 取上清
9. 加入 1ml 异丙醇, 颠倒混匀, 室温放置 15min, 12000rpm 离心 5min, 弃上清
10. 将沉淀物用 70%乙醇洗涤一至两次, 真空干燥
11. 将沉淀物用无水乙醇洗涤一至两次, 真空干燥
12. 将质粒沉淀物溶于 10 μ L 含 RNaseA(10mg/mL)的双蒸水中, 37 $^{\circ}$ C 保温 0.5h, 除去 RNA, -20 $^{\circ}$ C 保存备用

2 结果与讨论

2.1 米曲霉植酸酶基因的克隆

以米曲霉染色体 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增得到约 1.5kb 的 DNA 片段, 琼脂糖电泳结果如图 5-1。将该片段凝胶回收纯化, 与载体 pMD18-T 直接连接, 转化大肠杆菌 DH5 α , 在含 IPTG 和 X-gal 的筛选培养基平板上挑选白色菌落, 得到 5 株阳性克隆, 所携带的质粒命名为: pMD18-T-phyA。

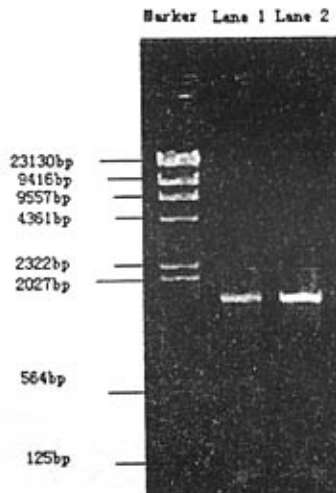


图 5-1 米曲霉植酸酶基因克隆产物 Lane 1 Lane 2 分别为总基因组克隆产物

2.2 米曲霉植酸酶基因 phyA 的鉴定

2.2.1 限制性内切酶酶切分析

碱法小量提取质粒。载体 pMD18-T-phyA 进行 PCR 验证, 结果如图 5-2。从

该图中可见，重组质粒确实能被克隆出约 1.5kb 的片段。

2.2.2 PCR 验证

分别以重组质粒 pMD18-T-*phyA* 和米曲霉染色体总 DNA 为模板，用上述的引物进行 PCR 扩增所得到的 DNA 片段同时进行琼脂糖凝胶电泳，比较二者的大小，电泳结果如图 5-2。

可以看出，两组 PCR 扩增产物大小相同，这初步说明了目的片段已经克隆到载体中。

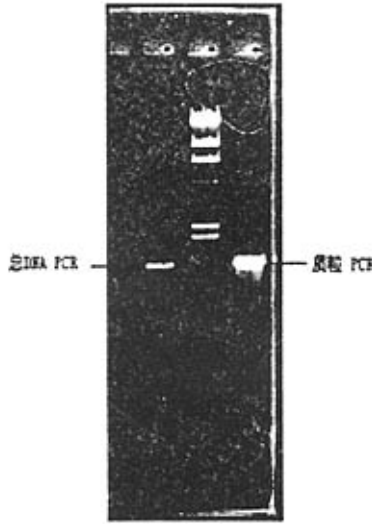


图 5-2 米曲霉植酸酶总 DNA PCR 产物和质粒 PCR 产物

2.3 分析

2.3.1 重组质粒 pMD18-T-*phyA* 所携带的外源片段的核苷酸全序列测定

2.3.1.1 米曲霉植酸酶基因序列 用双脱氧链终止法测定重组质粒

pMD18-T-*phyA* 中所携带外源片段的序列，其核苷酸序列和推测的氨基酸序列见

图 5-3

```
ATGGCGGTCCTTAGCGTGCTCCTCCATTACCTTCCTTCTCTCGAGTGTT
ACCGGCACTCCGGTGACCAGCCCGAGACAACAGTCGTGCAATACCGTTG
ACGAAGGCTACCAGTGCTTCTCCGGGGTCTCTCACTTGTGGGGCCAGTA
TTCGCCTTACTTCTCGGTCGACGACGAGTCTTCCTTGTCCGAAGACGTTT
CAGACCACTGCCAGGTTACCTTTGCCCAAGTGCTCTCCCGTACCGGTGC
ACGGTATCCAACGAAGAGCAAGTCTGAGAAGTACGCCAAGCTCATCAAG
GCCGTCCAGCATAATGCTACCTCGTTCTCCGGGAAGTATGCGTTTCTGAA
```

ATCTTACAACACTCCCTCAGCGCCGATGACCTTACGCCTTTTGGAGAGA
 ACCAGTTGGTGGATTTCGGGGATCAAGTTCTACCAGCGCTATGAGGAGCT
 CGCCAAGAACGTCGTTCTTTTCATTAGGGCATCGGGTTCGGATCGGGTAA
 TCGCATCCGGCGAGAAATTCATCGAGGGCTTCCAGAAGGCAAAGCTTGG
 TGA CTCTAAGTCTAAGCGGGGCCAGCCTGCTCCTATTGTCAACGTAGTTA
 TTA CTGAGACCGAGGGTTTCAACAACACGTTGGACCACAGTCTCTGCAC
 GGCCTTTGAGAACAGCACAAACAGGGGATGACGCAGAGGACAAGTTCAC
 CGCTGTTTTTACGCCCTCGATTGTTGAGCGTCTGGAGAAGGACCTCCCAG
 GAACCACGCTCTCCAGCAAAGAGGTGGTTTATCTGATGGACATGTGCTCA
 TTCGACACCATCGCCTTGACCCGTGACGGCAGTCGGCTATCCCCCTTCTG
 CGCTTTGTTACCCAGGAGAATGGGCACAATATGACTACCTGCAGTCA
 GTCTCTAAGTACTACGGCTACGGTGGAGGAAACCCTCTCGGACCTGCGC
 AGGGCATCGGCTTCGCTAACGAGCTGATCGCTCGCCTGACCAAGTCTCC
 GGTTAAGGATCACACCACCACCAATACCACGCTGGACTCAAATCCCGCC
 ACCTTCCCGCTGAATGCTACGCTCTATGCGGACTTCTCGCACGATAACAC
 GATGACCTCCGTTTTCTTCGCGCTTGGTCTGTATAATACGACCGAGCCCCT
 CTCTCAGACTTCGGTGCAGTCCACTGAGGAGACGAACGGATATTCATCC
 GCCCGGACCGTTCATTTCGGGGCCAGAGCCTACGTCGAGATGATGCAGT
 GCACGGATGAGAAGGAGCCTCTCGTCCGCGTACTGGTCAACGACCGGGT
 CATTCCGCTGCAAGGCTGTGATGCTGATGAGTATGGCCGGTGTAACGG
 GACGATTCGTCTGAAGGACTGAGCTTCGTTACATCGGGTGAAACTGGG
 GAGAGTGCTTTGCTTA

图 5-3 米曲霉植酸酶基因序列

2.3.1.2 对米曲霉植酸酶基因的分析

将测得的序列提交 NCBI, 得到序列号为 DQ464124

gi|13536998|dbj|AB042805.1| *Aspergillus oryzae* phyA mRNA for phytase,

complete cds Length=1553 进行比对, 相似度达到 99%, 该酶属于米曲霉植酸酶无异。

2.3.2 序列分析

2.3.2.1 测序蛋白质序列

MAVLSVLLPITFLLSSVTGTPVTSRQQSCNTVDEGYQCFSGVSHLWGQYSP
YFSVDESSLSEDVDPDHCQVTFQAQVLSRHGARYPTKSKSEKYAKLIKAVQH

NATSFSGKYAFLKSYNYLSADDLTPFGENQLVDSGIKQRYEELAKNVVP
 FIRASGSDRVIASGEKFIIEGFQKAKLGDGSKSRGQPAPIVNVVITETEGFNNT
 LDHSLCTAFENSTTGDDAEDKFTAVFTPSIVERLEKDLPGTTLSSKEVVYLM
 DMCSFDTIALTRDGSRLSPFCALFTQEEWAQYDYLQSVSKYYGGGNPLG
 PAQGIGFANELIARLTKSPVKDHTTTNTTLDSNPATFPLNATLYADFSHDNTM
 TSVFFALGLYNTTEPLSQTSVQSTEETNGYSSARTVPFGARAYVEMMQCTDE
 KEPLVRVLVNDRVIPLQGCDADHEYGRCKRDDFVEGLSFVTSGGNWGECA

图 5-4 米曲霉植酸酶氨基酸序列

2.3.2.2 氨基酸序列分析

根据基因序列得到该植酸酶的氨基酸序列，将该序列提交 ExPASy 网站服务器，应用 ProtParam 软件对蛋白质的一级结构的一些理化性质进行了分析。该序列编码区共 1400 个核苷酸，翻译成 466 个氨基酸。计算的理论分子量为：

51287.1Da。推测其分子式为 $C_{2274}H_{3482}N_{594}O_{727}S_{16}$ 共含有带负电的氨基酸(Asp+Glu) 57 个，带正电的氨基酸 (Lys+Arg) 39 个，酶蛋白的理论等电点为：4.87。

2.3.2.3 氨基酸疏水性分析

应用 ProtScale 对该蛋白序列进行了疏水性分析和极性分析，结果显示在其 N 末端有较强的疏水区和极性区，推测为信号肽序列。目前对信号肽的功能做了广泛的研究，从结构上确定了 3 个明确的区域：N-末端、中间疏水区和信号肽的切割位点。

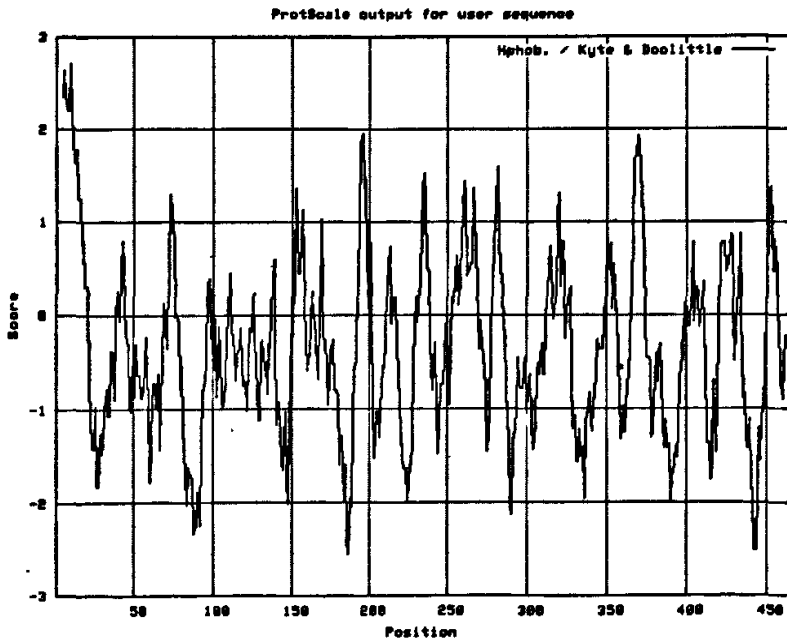


图 5-5 米曲霉植酸酶疏水性分析图

2.3.2.4 信号肽分析 将氨基酸序列提交,使用 Signalp3.0 进行分析,得到一下结果。信号肽分析见下图^[48]。

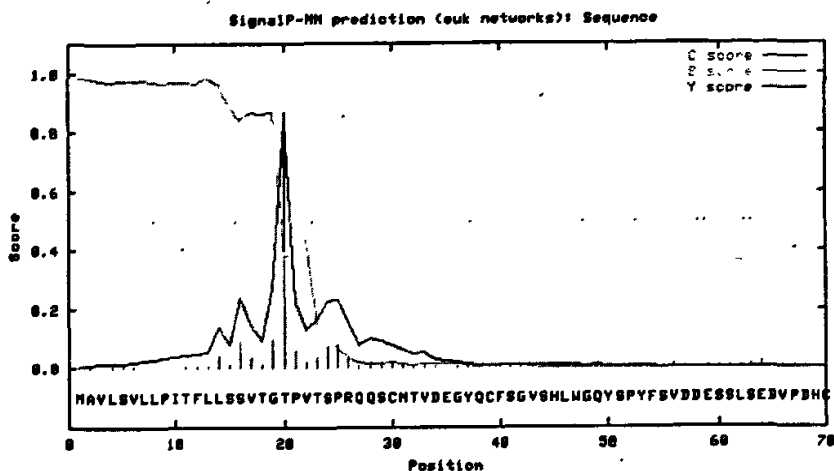


图 5-6 米曲霉植酸酶信号肽序列分析图

C-score 自然切割位点值,用以区分切割位点与其他位点;S-score 是信号肽值,用以区分信号肽序列和非信号肽序列;Y-score 是组合切割位点值,是 C-score 的高度和 S-score 的斜率组合,可较准确的预测切割位点。

从图中可以看到, C 值和 Y 值在第 20 个氨基酸处达到峰值,而 S 值在第 20 个氨基酸出陡然下降,属于典型的信号肽序列。信号肽的切割位点很可能在 19 和 20 位氨基酸之间(软件分析数据为 0.987)。

2.3.3 米曲霉植酸酶结构预测

生物大分子的三维空间结构是进一步了解生物分子功能的重要前提。目前多采用将目的样品结晶后做 X-射线衍射或核磁共振等方法来测定其三维结构。由于实验条件有限,本文不可能完成这些实验。但是由于该酶的氨基酸全序列都已知,可以用分子生物学软件通过同源模建的方法预测样品的空间三维结构。首先将米曲霉植酸酶的氨基酸序列提交给 ExPASy 网站的 Swiss-Model 服务器。该服务器会自动将该蛋白的原子空间分布坐标的有关数据反馈给用户。再用专用浏览软件 spdbv 就可以看到目的蛋白的三维结构。图 5-7 是米曲霉植酸酶的同源模建图。

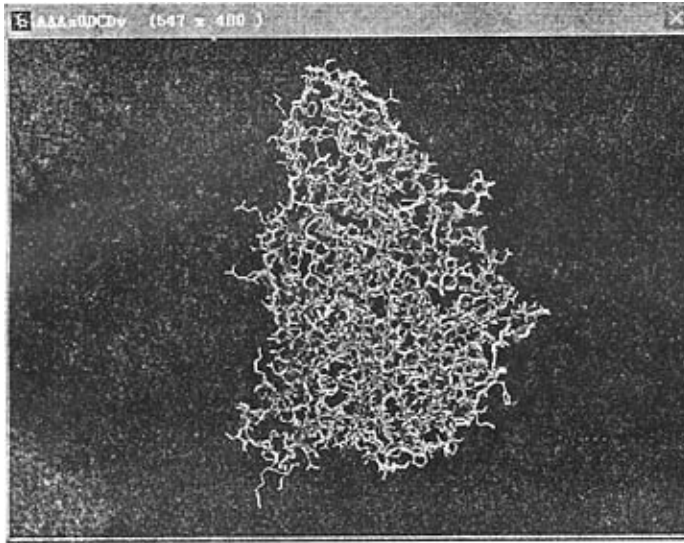


图 5-7 米曲霉植酸酶结构预测

3 小结

本章内容主要是通过对米曲霉总 DNA 进行克隆,得到的 PCR 产物连接载体并测序得到了米曲霉植酸酶的基因。对该基因进行序列分析。

利用生物信息学的手段,对米曲霉植酸酶的高级结构进行预测,确定信号肽切割位点,为以后该酶的分子改造打下基础。

文章总结及展望

本论文通过对米曲霉产植酸酶的发酵条件优化,提高米曲霉植酸酶产量。并对米曲霉植酸酶的部分性质作了一定的研究,从化学实验的角度鉴定米曲霉植酸酶属于组氨酸酸性磷酸酶(HAP)。发现该酶在37℃时的活性为最适反应温度下的60%以上,且该酶在70℃时30分钟处理酶活性损失不是很大,金属离子对于米曲霉植酸酶没有太大的影响。通过研究发现,米曲霉植酸酶有一定的工业利用价值。

本文还对米曲霉植酸酶的基因进行了克隆,并对该基因进行了序列分析,发现该基因与已经报导过的即应相似度达到99%。由于时间所限,没有能对该酶的基因进行表达及构建高产的工程菌。

本文采用了化学修饰的方法对米曲霉植酸酶活性中心进行确定,发现该酶的活性中心中包括精氨酸,组氨酸,并且二硫键对于该酶的催化活性极稳定性有很大的影响。这也是国内首次用化学方法确定植酸酶的活性中心。

本文中并没有测定米曲霉植酸酶的N-末端,希望以后的工作可以完成。

以后的工作可以放在以下方面:对米曲霉植酸酶发酵产物进行动物喂养实验,来确定该酶的实际利用价值;对米曲霉植酸酶基因进行改造,希望得到更加稳定的米曲霉植酸酶蛋白;构建工程菌。

参考文献

- 1 张勇, 林东康. 植酸酶的研究及其应用. 河南畜牧兽医. 2002, 23(2):14-15
- 2 杨建军, 李蔚忠. 植酸酶的研究概况. 西部粮油科技. 2002, 5:44-46
- 3 胥传来, 赵玉莲. 植酸酶的研制与开发——菌种筛选与酶活的提高. 饲料研究. 1999, 2:1-8
- 4 许尧兴, 许少春. 植酸酶应用前景. 饲料工业. 1994, 15(12):12-13
- 5 史东辉, 许文阁. 植酸酶的研究进展. 辽宁农业职业技术学院学报. 2002, 4(4):19-24
- 6 朱靖环, 杨永红, 毛华明. 植酸酶的研究与应用进展. 微生物学杂志. 2002, 22(1):43-46
- 7 张勇, 林东康. 植酸酶的研究及其应用. 河南畜牧兽医. 2002, 23(2):14-15
- 8 楼洪兴, 许尧兴. 植酸酶在饲料中的应用. 中国饲料. 1994, 8:16-18
- 9 刘德忠. 新型酶制剂—植酸酶的应用和开发. 饲料工业. 1998, 19(3):19-20
- 10 陈子平, 丁利敏. 植酸酶的应用浅析. 兽药与饲料添加剂. 1998, 3:8-9
- 11 Edward J. Mullaney and Abul H.J. Ullah The term phytase comprises several different classes of enzymes
- 12 B.C. Oh, B.S. Chang, K.H. Park, N.C. Ha, H.K. Kim, B.H. Oh, T.K. Oh, Calcium-dependent catalytic activity of a novel phytase from *Bacillus amyloliquefaciens* DS11. *Biochemistry* 40 (2001) 9669-9676
- 13 C.E. Hegeman, E.A. Grabau, A novel phytase with sequence similarity to purple acid phosphatases is expressed in cotyledons of germinating soybean seedlings, *Plant Physiol.* (2001) 1598-1608
- 14 T. Klabunde, B. Stahl, H. Suerbaum, S. Hahner, M. Karas, F. Hillenkamp, B. Krebs, H. Witzel, The amino acid sequence of the red kidney bean Fe(III)-Zn(II) purple acid phosphatase: determination of the amino acid sequence by a combination of matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and automated Edman sequencing, *Eur. J. Biochem.* 226 (1994) 369-375.
- 15 Chang-Chih Chen, Ching-Tsan Huang. *Biotechnology letter* 23:331-333
- 16 世界专利 WO97/16076
- 17 Van Hartings veldt W, C.M.J. Van Zeiji, et al. Cloning, characterization and over expression of the phytase encoding gene (phyA) of *Aspergillus niger*, [J]. *Gene*, 1993, 127(1):87-94.
- 18 Ullah A.H.J, Dischinger Jr H.C. *Aspergillus ficuum* phytase: complete primary structure elucidation by chemical sequencing [J] *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, 192(2): 747-753
- 19 Ullah A H J, Cummins B J, Dischinger Jr H C. Cyclohexanedione modification of arginine at the active site of *Aspergillus ficuum* phytase [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, 178(1):45-53
- 20 Ullah A H J, Dischinger Jr H C. Identification of active-site residus in *Aspergillus ficuum* extra cellular pH2.5 optimum acid phosphatase [J] *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, 192(2):754-759
- 21 Ha N C, Oh B C, Shin S, et al. Crystal structures of a novel, thermostable phytase impartially and fully calcium-loaded states [J] *Nat Struct Biol*, 2000, 7(2):147-153
- 22 Rudy Jwodzinski, Ullah A H J. Phytase [J]. *Advance in Applied Microbiology*, 1999,

(42):263 - 302

- 23 Luis Pasamontes. Gene cloning purification and characterization of a hest stable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus* [J]. Appl Enviroment Microbiol,1997,5:1696-1700
- 24 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.
- 25 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.
- 26 Tomschy A, Tessier M, Wyss M, et al. Optimization of the catalytic properties of *Aspergillus fumigatus* phytase based on the three 2 dimensional structure [J]. Protein Sci,2000,9 (7):11 - 1304.
- 27 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
- 28 Mullaney E J, Daly C B, Kim T, et al. Site 2 directed mutagenesis of *Aspergillus niger* NRRL 3135 phytase at residue 300 to enhance catalysis at pH 4. 0 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002,297(4):20 - 1016.
- 29 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.
- 30 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.
- 31 Denbow D M, Graubau E S, Lacy G H, et al. Soybeans transformed with a fungal phytase gene improve phosphorus availability for broilers [J]. Poult Sci, 1998,77:878 - 881.
- 32 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.
- 33 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.
- 34 Yamada K, Minoda Y, Yamamoto S, *Agri Biol Chem*,1968,32(10):1275~1282
- 35 Kostrewa D, Gruninger-Leitch F, Arcy AD, Nature Structrual Biology, 1997,4(3):185~190
- 36 Ullah A.H.J,Gibson D.M, Extracellular phytase(EC3.1.3.8) from *Aspergillus ficuum* NRRL3135:purification and characterization, Prep Biochem,1987,17(1):51~63
- 37 Kerovuo J, Lauraeus M, Nurminen P, Appl. Enviroment Microbiol, 1998,64(6):2079~2085
- 38 Kostrewa D, Gruninger-Leith F, D. Arcy A, et al. Crystal structure of phytase from *Aspergillus ficuum* 2.5 Å resolution [J] Nat.Struct.Biol,1997,4(3):185-190
- 39 A. H. J. Ullah, E.J. Mullaney, Disulfide bonds are necessary for structure and activity in *Aspigills ficuum* phytase, Biochem.Biophys.Res.Commun.227 1996 (311-317)
- 40 X.Y.Wang, F.G.Meng, X.Y.Wang, The role of disulfide bonds in the conformational stability and catalytic activity of phytase, Biochem. Cell Biol. 82 (2004) 329-334
- 41 李建武等.生物化学试验原理和方法.北京,北京大学出版社,2001
- 42 Rudy. J. Wodzniski and A.H.J. Ullah Phytase Adv. in. Appl. Microbiology 1996 (42) 262-301
- 43 Abul H.J.Ullah, Kandan Sethumadhavan, Edward J. Mullaney Monitoring of unfolding and refolding in fungal phytase (phyA) by dynamic light scattering B.B.R.C 327 (2005) 993-998

- 44 Jin Fujita, Nisa Budda, Makoto Tujimoto Isolation and characterization of phytase isozymes produced by *Aspergillus oryzae* *Biotechnology Letters* 22: 1797-1802 2000
- 45 F. 奥斯伯, R. 布伦特等, 《精编分子生物学实验指南》, 1998, 科学出版社
- 46 J. 萨姆布鲁克, E. F 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯, 《分子克隆实验指南》第二版, 1998, 科学出版社
- 47 U. Raeder, P. Brod, *Letters in Applied Microbiology*, 1985, 1:17~20
- 48 Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage site *Protein Eng.* 1997 Jan;10(1):1-6
- 49 孙军, 郭美锦, 储炬, 庄英萍, 张嗣良 经DNA改组的植酸酶纯化和酶学性质 应用与环境生物学报 2004, 10(6):766-770
- 50 A.H.J. Ullah, B.J. Cummins, H.C. Dischinger Jr., Cyclohexanedione modification of arginine at the active site of *Aspergillus ficuum* phytase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178 (1991) 45-53.
- 51 R.L. Van Etten, R. Davidson, P.E. Stevis, H. MacArthur, D.L. Moore, Covalent structure, disulfide bonding, and identification of reactive surface and active site residues of human prostatic acid phosphatase, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 2313-2319.

致谢

本论文是在导师张玉臻教授的悉心指导下完成的。能在张老师的指导下攻读硕士学位，是我人生的幸运。三年来，张老师在论文工作中倾注了大量的心血，论文的每一处都凝结着张老师的汗水和智慧。在论文完成之际，我首先将这份喜悦与深深的敬意献给我的导师——张玉臻教授。

三年来，令我难以忘怀的不仅仅是张老师那渊博的知识、活跃的思维方式、孜孜不倦的钻研精神和勤勉的工作作风，更重要的是老师对科研的热爱、严谨的治学态度，还有正直的人品和宽容豁达的生活态度。在外求学的这三年中，是张老师给予我精神上的鼓励，使我克服了学业和生活上的重重困难，完成硕士论文。在此，再一次表达学生对张老师的敬意。

感谢孙昌魁师兄在实验思路上的指导，并在生活中给予的关怀。

感谢李强师兄在实验方法上的指导。

感谢夏蕊蕊师妹在酶的分离纯化工作中提供的帮助；感谢蒋利平师弟在基因克隆工作中提供的帮助。感谢本实验室的张正红，白云峰，钊情情等同学在生活中帮助，与大家度过的美好时光，将成为我一生美好的回忆。

感谢陈明，在攻读硕士学位的三年中，无论是遇到困难还是快乐，都有这个好朋友和我一起应对，使我在异乡之中从来没有觉得自己是异客。

感谢已经毕业的吴远征，屠晓平，张晓东，宋晓飞，车程川师兄，他们让我在生活中都感受到了友情的温暖。

感谢资料室任红卫老师在资料查询过程中提供的热情的帮助。

在论文完成过程中得到了孔健老师，陈冠军老师和张长铠老师实验室的大力帮助，在此特地提出感谢。

感谢董艳芝给予我精神上的鼓励和支持。

在此，还要感谢我的父母，是他们给我提供了让我继续读书的机会，他们的关心、理解和支持是我完成学业的动力。

感谢所有关心和帮助我的人。

2006年5月 于 山东大学