

中国博士丛书

云南科技出版社

# 植酸酶的研究

## 研究

黄遵锡 王政昆 著

STUDIES ON  
PHYTASE

3

云南科技出版社

# 植酸酶的

# 研究

黄遵锡 王政昆 著

STUDIES ON  
PHYTASE



图书在版编目 (CIP) 数据

植酸酶的研究/黄遵锡, 王政昆著. —昆明: 云南科技出版社, 2000. 3

(中国博士丛书)

ISBN 7-5416-1351-7

I. 植... II. ①黄... ②王... III. 酶, 植酸酶—研究 IV. Q814

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (1999) 第 54515 号

书 名: 植酸酶的研究

作 者: 黄遵锡 王政昆 著

出 版 者: 云南科技出版社 (昆明市书林街 100 号, 650011)

责任编辑: 李 红 王超超

封面设计: 行 文

责任校对: 金 坤

印 刷 者: 昆明新星印刷厂印装

发 行 者: 云南科技出版社发行

开 本: 850×1168 1/32 印张: 7.75 字数: 250 千

版 次: 2000 年 3 月第 1 版

印 次: 2000 年 3 月第 1 次印刷

印 数: 001~600

书 号: ISBN 7-5416-1351-7/Q·49

定 价: 29.80 元

若发现印装错误请与承印厂联系

## 出版说明

《植酸酶的研究》专著由云南省攻关项目“植酸酶为主体酶的饲用复合酶研制与开发”、云南省院省校合作项目“耐热植酸酶基因的克隆、表达、调控及第二代高效、高产植酸酶”以及云南省中青年学术和技术带头人培养经费支持。

## 前 言

随着近代酶技术及生物技术的高速进展，高效能生物活性物质——酶制剂已经能够大规模地工业化生产，并被广泛应用于饲料工业中。许多实验和实际应用结果都表明，饲用酶制剂作为一种饲料添加剂，能有效地提高饲料的利用率，促进动物生长和防治某些动物疾病的发生，已成为高效、实用、安全、无公害的新一代“绿色”添加剂，因此，引起了全球范围内饲料行业的高度重视。

酶制剂作为饲料添加剂，国外于 20 世纪 70 年代开始研究、应用。我国于 20 世纪 80 年代有人开始研究。1987 年国家批准进口美国的福美多（FERMACTO）和保增乐（BOSPRO）用于牛、羊、兔、马等动物。1991 年又批准进口八宝威（KEMZYME），主要用于猪和鸡。这些产品有相当好的效果，但价格相当昂贵。近两年来，国内的广东省和江苏省也出现了专业饲用酶生产厂家，其产品行销全国许多省区，也都证明有良好的效果。

饲用复合酶包括两大类酶制剂，一类以促进消化难分解大分子物质为主的酶类，有纤维素酶、半纤维素酶、果胶酶、淀粉酶、蛋白酶等。它们的主要作用有：①提高禽畜消化及利用饲料营养物质的能力，提高饲料的利用率。②补充动物内源消化酶的不足，可帮助幼龄畜禽提早利用饲料中的营养物质，有利于其消化道的早期发育。同时还可维护病畜正常的消化功能。③提高低质、廉价饲料的营养价值及生物利用率。另一类是以消除饲料中的植酸、皂角素、鞣酸等抗营养因子为目的的酶类。它们的主

要作用是排除或抑制饲料中的抗营养因子，从而可大大地提高饲料的营养价值。植酸酶就属于这一类。

植酸酶是一种能将植酸分解为磷酸和肌醇单磷酸至五磷酸的一种酶，它能有效地分解饲料中的植酸。植酸酶作为饲料工业一种专业用酶，它在饲料工业中的作用，主要包括以下几个方面：①由于植酸酶能将饲料中的植酸分解，解除了其与矿质元素、蛋白质、维生素的螯合作用，使这些营养物质能够得到有效地利用，大大提高了饲料的营养价值；②能使饲料中植物有机磷得到有效地利用，减少添加无机磷。由于饲料主要以植物种子和果仁作为原料，它们含有极为丰富的磷源，但这些磷源 60% ~ 90% 以植酸磷的形式存在。而猪、鸡等单胃动物消化道中由于缺乏分解植酸的酶，不能利用植物中的植酸磷，必须在饲料中添加无机磷才能满足动物生长发育的需要，而大部分植物饲料中的磷随粪便排出体外，这样一方面造成磷源的大量浪费，使饲料价格升高（目前在我国磷酸氢钙的价格已接近豆粕的价格），另一方面造成土壤和水体的严重污染，据估计，每 100 吨家禽畜粪便中就含有 1 吨磷。美国大型养鸡场每年共排出粪便 1 亿吨，其中就含有 100 吨磷。目前这一问题已引起人们普遍关注，美国、丹麦、荷兰等养殖大国对猪禽业粪便排放已立法限制。欧共体也在制订类似法规。因此在饲料中添加植酸酶，将植酸分解成肌醇和磷酸，一方面能使植酸中的磷源得到有效地利用，可以减少添加无机磷（据研究 300 个单位的植酸酶相当于 1.15 克的无机磷），降低了饲料成本，同时大大地减轻了禽畜粪便排放中的磷污染。③许多实验和实际应用效果表明，在饲料中添加植酸酶后，能对猪、鸡有明显的增重效果。并对骨骼强度、采食量有明显改善。特别是幼禽幼兽效果更加明显。④可以有效地预防与植酸有关的动物消化系统疾病。有时虽然在饲料中添加有 Zn、Ca、Fe 等元素，但有些动物仍表现缺乏这些元素的症状，这种疾病是由于饲

料中的植酸与这些元素形成动物难以吸收的复合物所致，加入植酸酶分解植酸后，这些元素被释放，动物的疾病得到有效的防治。正是由于植酸酶一举多得的效果，它作为饲料用酶的一个重要酶种，在 20 世纪 70 年代末期就已引起国外饲料工业的广泛兴趣。近两年来已成为饲料工业中热点中的热点。因此植酸酶是一种非常有前途的饲料添加剂。

作者从 20 世纪 90 年代初期至今，一直从事微生物植酸酶的研究工作，从菌种的筛选、选育、改良到发酵工艺的研究，植酸酶基因工程菌的构建，植酸酶生产的小试、中试放大，植酸酶的分离、纯化、酶学及酶应用性质的研究，植酸酶的应用及作用机理等进行了较为详细的研究。其中王政昆博士参与完成第八章第一节和第二节饲用植酸复合酶的应用研究工作。本书全面系统的介绍了上述各方面的研究工作。因此该专著的出版，对以后植酸酶的应用和开发乃至我国畜牧业的发展都具有重大的意义。

本专著主要介绍菌种的筛选、传统方法的选育、发酵条件的优化、植酸酶的应用性质及酶学性质，植酸酶的应用及作用机理。有关植酸酶基因工程菌的构建，植酸酶中试放大工艺，植酸酶的畜禽饲养试验等研究内容将另册阐述。相信通过本专著的出版，对植酸酶的基础与应用研究以及植酸酶的应用将具有重要的指导意义。

由于作者的水平有限，缺点和错误难免，敬希读者给予批评指正。

著 者

## 中文摘要

1. 植酸酶的酶活是以一定量的酶样品从一定量的植酸中释放的无机磷的含量作为标准。因此在植酸酶活测定过程中, 必须准确地测定样品中的磷含量。目前测定磷的方法有丙酮法、磷钒钼法、硫酸亚铁-钼蓝法和维生素 C-钼蓝法, 通过对这几种方法灵敏度及稳定性研究表明, 丙酮法较其他两种方法的灵敏度稍低, 但稳定性好, 系统误差和随机误差小, 抗还原剂及表面活性剂的干扰能力强, 并且操作简便、时间短。因此确立丙酮法作为定磷方法。在此方法的基础上在酶活测定时引入微板法, 微板法是源于酶联免疫测定的一种新方法, 微板上有 96 孔, 每孔相当于一个小试管, 它是将通常在试管内进行的化学反应及利用比色皿在光度计上测定光密度值的手动宏观操作变成利用微板进行化学反应和光密度值测定的微量自动操作。通过对微板法的灵敏度、稳定性和误差分析表明, 微板法与传统的利用试管进行反应, 利用比色皿进行光密度测定的方法相比具有下列优点:

(1) 大大地提高工作效率: 每块微板上有 96 孔, 每孔相当一支试管, 化学反应和光电比色都在上面进行; 当加入试剂时可以采用多枪头一次加入试剂; 光电比色时, 一块 (96 个样品) 可以一次完成。而且微板是一次性使用, 省去了大量的清洗工作。可以减少工作量的 60% ~ 70%, 因此可以大大提高工作效率。

(2) 经济实惠: 相当于 96 支试管的一块微板只需 1 ~ 10 元, 另一方面把以前的宏量操作变为微量操作后, 可以节省大量的试剂, 这一优点在底物较贵的酶促反应中更显出其优越性。



(3) 准确性高：由于用微量加样器加样，加样更加准确，多枪头加样时，减少了加样时的人为误差。

2. 在固体发酵植酸酶高产菌株筛选时，一方面由于在液体发酵时产酶较高的菌株，在固体发酵时产酶并不一定高；另一方面由于固体发酵所用原料如麦麸等其无机磷含量已超过 80~250 微摩尔/克干基，而原始菌株产酶都较低，酶活在 0.1~1 单位/克干基，也就是说由原料本身所含无机磷所构成的假酶活是实际酶活的几十至几百倍以上。因此在固体发酵高产菌株选育时，菌株酶活的增加往往被假酶活所掩盖，所以很难筛选出固体发酵产酶较高的菌株。因此我们在固体发酵高产菌株筛选时先提取原始菌株在液体发酵时产生的植酸酶，经纯化得到植酸酶的纯酶，再利用此酶制备单克隆抗体。再通过植酸酶单克隆抗体的酶联免疫反应测定固体曲中植酸酶蛋白质的含量，由于此方法灵敏度高，可以测定纳克级的物质含量，并且由于其特异性相当强，可以完全排除固体曲中无机磷、杂蛋白质及其他物质的干扰，所以可以非常灵敏地测出植酸酶的微量的增加，能非常有效地筛选出植酸酶高产菌株。

3. 经大量的样品初筛，筛选出具有产胞外植酸酶能力的霉菌 9 株，其中 G2 株液体发酵产酶达到 2.6 单位/毫升发酵液，固体发酵产酶达 1.714 单位/克干基。G2 株经 UV 诱变处理，多粘菌素作筛子进行初筛，三角瓶固体和液体发酵进行复筛，结合反复的自然分离和压力选择，分别获得在固体发酵产酶较高的菌株 G2.1 和液体发酵产酶较高的菌株 G2.16，酶活分别为 3.5 单位/克干基和 3.5 单位/毫升发酵液。并且考察了碳源、氮源、无机磷、pH、温度等单因子对液体发酵产酶的影响。对液体发酵产酶影响较大的 Triton X-100、玉米糊精、酵母膏、pH 进行了四因子三水平的正交实验，优选出菌株液体发酵最佳培养基配方为：每升培养基中含：6% 玉米糊精，1.5% 酵母膏， $MgSO_4$  0.5

克, KCl 0.5 克,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01 克, TritonX - 100 75ppm, pH4.5。在此条件下菌株酶活可达 7.14 单位/毫升发酵液。

4. G2.1.1 进一步采用 UV、NTG 诱变处理, 高磷及多粘菌素作筛子进行初筛, 三角瓶固体发酵结合植酸酶单克隆抗体酶联免疫反应测定酶活进行复筛。获得了固体发酵高产菌株 G2.1.1.1.4, 酶活可达 17.31 单位/克干基, 并且考察了碳源、氮源、无机磷、pH、温度、湿度、表面活性剂等单因子对固体发酵酶活产生的影响。对固体发酵中的碳源、氮源和水分子作了三因素三水平的正交实验, 通过响应面分析优化出最佳培养基。并对最佳培养基进行了验证, 在最佳培养条件下, G2.1.1.1.4 酶活 (PhytA) 可达 61~66 单位/克干基。并讨论了诱变机理、策略、表面活性剂、无机磷对菌株产酶的影响。

5. 在三角瓶固体发酵条件研究的基础上, 对 G2.1.1.1.4 固体发酵进行了浅盘放大实验, 通过正交实验优化了培养基, 并对浅盘培养过程中的关键工艺条件: 湿度及保湿方式、温度及翻曲方式、接种方式及无菌要求等进行了研究。确定了浅盘扩大实验最佳培养基为每 100 克麸皮中加入 2% 葡萄糖、1.5%  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、水分: 原料 1.2:1, 附加水 pH 为 5.0。最佳工艺条件为: 保湿方式采用托盘盛水上面放支架, 支架上再放浅盘, 浅盘上覆以纱布, 纱布四周浸入水中保湿效果最好; 翻曲方式为第一次翻曲为接种后 18 小时, 第二次为接种后 52 小时; 接种方式最佳为: 麸皮种曲, 混合接种。在此条件下较大规模浅盘 (每盘 1 千克) 小试酶活可达 27~46 单位/克干基。无菌条件要求不严格。

6. G2.1.1.1.4 固体发酵其他酶系研究表明, G2.1.1.1.4 在三角瓶固体发酵时, 除产生 61~66 单位/克干基的 PhytA 外, 还能产生 28~34 单位/克干基的 PhytB, 386~406 单位/克干基的酸性磷酸酶, 69~73 单位/克干基的纤维素酶, 3200~3651 单位/克干基的果胶酶, 550~532 单位/克干基的酸性蛋白酶,

220 ~ 231 单位/克干基的中性蛋白酶, 1855 ~ 1936 单位/克干基的糖化酶, 447 ~ 532 单位/克干基的淀粉酶, 不产生脂肪酶。1 千克料的浅盘固体发酵的酶系为 PhytA27 ~ 46 单位/克干基, PhytB13 ~ 27 单位/克干基, 355 ~ 401 单位/克干基的酸性磷酸酶, 71 ~ 105 单位/克干基的纤维素酶, 2339 ~ 3700 单位/克干基的果胶酶, 548 ~ 695 单位/克干基的酸性蛋白酶, 265 ~ 320 单位/克干基的中性蛋白酶, 1015 ~ 1872 单位/克干基的糖化酶, 581 ~ 747 单位/克干基的淀粉酶, 不产生脂肪酶。这些结果说明 G2.1.1.1.4 产生酶系很全, 其中植酸酶, 酸性磷酸酶, 纤维素酶, 果胶酶酶活都很高, 不产生脂肪酶, 因此特别适合于生产饲用酶制剂。

7. 酶提取实验表明: 采用缓冲液抽提, 酶活损失较采用其他溶液抽提的损失少。抽提过程加  $\text{CaCl}_2$  对酶抽提有好处, 浓度以 2% 最佳, 浓度过高酶回收反而下降; 不同的酶抽提最适 pH 不同, PhytA、Pa 抽提最佳 pH 在 3 左右, 在此范围内比较稳定, PhytB、Pb 抽提最佳 pH 为 5 左右; 酶抽提最佳时间是 4 小时。 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  沉淀酶比乙醇沉淀酶回收率高, 当加入 80% 饱和度的  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  时, 酶完全沉淀, 回收率为 100%。

8. 粗酶含 PhytA、PhytB、Pa、Pb。最适 pH 分别为 3.2、5、2.8、5, 它们都比较耐酸, 对低 pH 不敏感。PhytA、PhytB、Pa、Pb 最适温度分别为 55℃、53℃、58℃、53℃, 这几种酶都比较耐热, 70℃ 作用 10 分钟, 残活分别为 59%、29%、29%、63%。在饲料添加的常规浓度下, 无机离子对酶活影响不明显,  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$  对酶活有促进作用,  $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Pi}$  有抑制作用。胃蛋白酶对酶活有影响。

9. 采用 DEAE - Sepharose CL - 6B 结合植酸酶单克隆抗体亲和层析技术使植酸酶得到了彻底的纯化, PhytA 纯化倍数 66 倍, PhytB 纯化倍数 103 倍。SDS - PAGE 测得 PhytA 分子量为 56kda,

PhytB 为 76kda; 凝胶过滤测得 PhytA、PhytB 分子量分别为 60kda、82kda; 含糖量测定结果表明两种植酸酶均为糖蛋白; 氨基酸组成分析表明 PhytB 分子中, 天门冬氨酸、谷氨酸等酸性氨基酸含量特别高, 赖氨酸、组氨酸、精氨酸等碱性氨基酸含量不高, 含硫氨基酸含量很低, PhytA 分子中也含有丰富的酸性氨基酸, 谷氨酸含量达 23.44%, 与 PhytB 不同, 它含有色氨酸; 紫外吸收测定结果表明, 两种植酸酶在 OD280 处都有最大吸收峰; 两种植酸酶等电点分别为 4.3 ~ 4.4 和 4.6 ~ 4.7; PhytA 最适 pH 为 3.2, PhytB 最适 pH 为 5.0; PhytA、PhytB 最适温度分别为 55℃、53℃。热灭活实验表明纯酶比粗酶对温度敏感, 70℃作用 10 分钟, 酶残活分别为 46%、22%; 纯酶对金属离子的敏感程度比粗酶大。 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{I}^-$ 、 $\text{Se}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 对粗酶酶活没有影响, 但对纯酶表现一定抑制作用; 纯酶受胃蛋白酶影响也加大; 底物选择性研究表明植酸酶除对植酸钠等高磷酸脂有水解作用外, 对单磷酸脂及寡磷酸脂也具有一定的水解作用。酶动力学研究结果为 PhytA 的  $k_m$  为 3.69 $\mu\text{M}$ , PhytB 的  $k_m$  为 21.72 $\mu\text{M}$ 。

10. 植酸酶对以麦麸为主要原料的配合饲料体外模拟水解实验表明, 每千克饲料中加入 300 单位我们的植酸酶产品, 可以使无机磷  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、维生素  $\text{B}_1$ 、维生素  $\text{B}_2$ 、蛋白质、氨基酸、还原糖溶出量分别增加 329.9%、130%、63%、283%、25%、118%、78%、105%、47%。有些指标优于国外植酸酶; 采用我们的产品处理米糠, 饲喂种公鸡, 测定代谢能及磷的利用率的实验结果表明, 添加植酸酶后可使代谢能提高 20%, 有效磷提高 1~2 倍, 而且米糠对植酸酶有较好的保护作用, 使其热稳定性提高。

11. 以植酸酶为主体酶的饲用复合酶对肉鸡生长性能的影响研究表明, 添加试制的饲用复合酶制剂, 可以明显地改善肉鸡的生长性能, 可使肉鸡的增重提高 9.90%, 饲料转化率提高

16.59%，粪便磷的排放量减少 41.38%，具有非常显著的经济效益和社会效益。植酸酶在产蛋鸡饲料中的应用效果实验中利用 33 周龄产蛋鸡 288 只，分为三组，每组 96 只。一组用植酸酶代替饲料中的全部磷酸氢钙，二组用植酸酶代替一半的磷酸氢钙，三组采用基础日粮作为对照组。预试期 10 天，正试期 21 天。实验表明：一组无论是产蛋率、蛋重、料蛋比、每千克鸡蛋的饲料成本均好于二组的 0.30%、0.30%、1.30%、2.41%；好于三组的 0.91%、0.90%、3.46%、3.73%；二组好于三组的 0.61%、0.60%、2.14%、1.28%。各组间经 F 检验，差异不显著 ( $P > 0.05$ )。这说明植酸酶在本实验中能代替饲粮中的全部磷酸氢钙。

12. 电喷雾电离—质谱联用仪分析结果表明，植酸酶水解植酸是以分步方式进行的，植酸酶能将植酸水解成植酸五磷酸脂至植酸一磷酸脂不同的中间产物。但最终产物主要为二磷酸肌醇，与此同时形成的无机磷分子能与未水解的植酸以 “—O—O—” 或 “—O—” 键形成多磷酸肌醇的更复杂的分子形式。

## Abstract

The main purpose of these studies was to isolate a high phytase producer and to study some properties of the produced enzyme with further exploration of its application for the feed stuff.

1. The activity of phytase being defined as the amount of inorganic phosphorus released from a certain amount of enzyme substrate samples. Meanwhile, to determine accurately the phosphorus content of a given sample is important for the determination of phytase activity.

Presently the methods for the determination of phosphorus are : acetone - phosphomolybdate, Vanadate - phosphomolybdate,  $\text{FeSO}_4$  - molybdenum blue and Vc - molybdenum blue. Comparative studies of sensitivity and stability have shown that the method of acetone - phosphomolybdate is stable, with low systematic and random error. In addition, the anti - reducing agents and surfactants are strong. On the basis of the method of acetone - phosphomolybdate method, the microplate method is developed. This method is originated from ELISA whose plate has 96 holes somewhat like small test tubes so as to make the determination of OD values using micro - quantity.

The advantages of using micro - plate are as follows: ① Great increasing of efficiency. The micro - plate having 96 holes allows to add the solvents with multi - droplets in one time. ② Economy of solvent and substrate, the micro - plate turns the macro - operation into the micro - operation, so that the amount of solvents used diminished. When the substrates are expensive, the merits of this decreasing are more obvious.

③ High accuracy, because of the usage of micro - injector, more accuracy of injection is obtained. (the multi - droplets' injections reduce the random errors).

2. During the screening of high phytase producers with solid state fermentation, two main difficulties had to overcome. First the strains showing high yield of enzyme in liquid state fermentation, most of the time did not give the same yield in the solid state fermentation. Second, because of high inorganic phosphorus content in wheat - bran, it was not easy to assay the actual phytase activity ( $0.1$  to  $1\text{u/g ssc}$ ) and tend to yield pseudo - phytase activity which was higher than the actual one, this due to the presence of high amount of inorganic phosphorus (beyond  $80 \sim 250 \mu\text{mol/g.ssc}$ ). Meanwhile a little increase in enzyme activity was sometimes overshadowed by pseudo - enzyme activity complicating the decision of selecting the high producer in solid state fermentation.

In order to solve these problems, monoclonal antibodies directed to strain G2.1 was prepared. The phytase protein content was determined by the ELISA method of monoclonal antibodies. This method was very sensitive and could determine the presence of phytase in nano - gram scale. In addition, this method was specific and could eliminate the influences of inorganic phosphorus and other proteins, also detect the slight addition of phytase sensitively and help in screening high phytase producer effectively.

3. Using the above - mentioned method, 9 strains (molds) which could produce extracellular phytase were isolated from 155 samples of soil. Among them, G2, which was identified as *A. niger*, could produce  $2.6\text{u/ml}$  phytase in liquid state fermentation.

G2 was mutagenized by U. V. light. By adding repression agent in the screening medium to inhibit growth of some microorganisms, the mu-

tants G2.16 and G2.1 were obtained. The mutant G2.16 produced 3.5u/ml of phytase in liquid state fermentation, whereas mutant G2.1 produced 3.5u/g. ssc of phytase in solid state fermentation.

The fermentation medium conditions were optimized for phytase production with respect to G2.16 by the methods of single factor assay and orthogonal test. Under the optimum culture condition, the G2.16 could produce 7.14u/ml phytase in liquid state fermentation. On the other hand G2.1 was also mutagenized by U. V. light and NTG several times, adding high inorganic phosphorus as inhibitor of phytase production, combined with phytase - monoclonal antibody ELISA for assaying the phytase activity. A mutant G2.1.1.1.4 was obtained, which produced 17.14u/g.ssc of phytase in solid state fermentation. The culture condition for production of phytase from G2.1.1.1.4 in solid state fermentation was optimized by the method of signal factor assay and RSA. G2.1.1.1.4 produced 61 u/g.ssc to 66u/g.ssc of phytase.

4. Large - scale koji fermentation for phytase production was optimized. Under optimum culture condition, G2.1.1.1.4 produced 27 ~ 46u/g.ssc of phytase, and aseptic conditions were not very strict.

5. In the flask solid state fermentation, a part the production of 61 u/g.ssc ~ 66u/g.ssc of phyt. A., G2.1.1.1.4 could also produce 28 ~ 34u/g.ssc phyt.B., 386 ~ 406u/g.ssc acid phosphatase, 69 ~ 73u/g.ssc FPA, 3200 ~ 3651u/g.ssc pectase, 550 ~ 532u/g.ssc acid proteinase, 220 ~ 231 u/g.ssc neutral proteinase, 1855 ~ 1936 u/g.ssc glucoamylase, 447 ~ 532 u/g.ssc amylase. During the large scale koji solid fermentation, in addition of 27 ~ 46 u/g.ssc phyt.A., G2.1.1.1.4 also produced 13 ~ 27 u/g.ssc phyt.B., 355 ~ 401u/g.ssc acid phosphatase, 71 ~ 105u/g.ssc FPA, 2339 ~ 3700u/g.ssc pectase, 548 ~ 695u/g.ssc acid proteinase, 265 ~ 320 u/g.ssc neutral proteinase,



1015 ~ 1827 u/g.ssc glucoamylase, 581 ~ 747 u/g.ssc amylase. G2.1.1.1.4 could not produce lipase in neither solid state fermentation nor liquid state fermentation. These results show that G2.1.1.1.4 was suitable for producing enzymes for feedstuff.

6. The effects of several phytase extraction methods were compared, Enzyme solution was precipitated with 80% of saturated  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , the recovery of phytase was almost 100%. Application properties of crude enzyme were studied. Crude enzyme had two phytases (phyt.A, phyt.B) and two acid phosphatases (Pa, Pb). The optimum pH for phyt.A, phyt.B, Pa, and Pb were 3.2, 5.0, 2.8, 5.0 respectively, and the optimum temperatures for phyt.A, phyt.B, Pa, and Pb were 55°C, 53°C, 58°C, 53°C respectively.

Both phyt.A and phyt.B were inhibited by  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Pi}$ , and stimulated by  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ . They were affected by pepsin under high concentrations.

7. The two phytases (phyt.A, phyt.B) from crude cultures of *A.niger* G2.1.1.1.4 were purified to homogeneity using ion exchange chromatographic and phytase monoclonal immunoaffinity column. SDS - PAGE of the purified phyt.A and phyt.B.gave a single stained band at approximately 56 kda and 76 kda. The mobility of the active enzymes in gel filtration chromatography indicated that the molecular mass of phyt.A and phyt.B were 60kda and 82 kda respectively, and indicated that phyt.A and phyt.B were isomer. Both phytases were glycoprotein as shown during sugar assay.

The isoelectric points of enzymes were 4.3 ~ 4.4 for phyt.A and 4.6 ~ 4.7 for phyt.B. Amino acid composition analysis showed high presence of acidic amino acids, such as Asp, Glu in both phyt.A and phyt.B. Nevertheless, phyt.A had Tyr.