

一种筛选胞外纤维素酶产生菌的快捷、灵敏、有效的方法

陈晨^{1,3} 宋华文^{2,3} 王洁^{2,3} 杨晓红^{1,3} 崔丽娇^{2,3} 江黎明^{2,3*} 罗辉^{1,3*}

(1. 广东医学院 化学教研室 广东 湛江 524023)

(2. 广东医学院 生物化学与分子生物学教研室 广东 湛江 524023)

(3. 环北部湾海岸特色微藻与微生物资源产品研发重点实验室 广东 湛江 524023)

摘要:【目的】建立一种能快捷、灵敏、有效筛选高 β -葡萄糖苷酶活性的胞外纤维素酶产生菌的方法,用于胞外纤维素酶产生菌检测筛选。【方法】将以微晶纤维素(Avicel)或羧甲基纤维素(CMC)为底物的胞外纤维素酶产生菌平板筛选法常用的刚果红或碘液浸泡染色改为碘液熏染,减少碘液的消耗和对环境的污染;建立以对硝基苯酚- β -1,4-葡萄糖苷(pNPG)为底物的 β -葡萄糖苷酶发色底物平板筛选法;将两方法串联用于高 β -葡萄糖苷酶活性的胞外纤维素酶产生菌的筛选。【结果】建立了分别以 CMC 和 Avicel 为底物结合碘液熏染的胞外纤维素酶产生菌平板筛选法和以 pNPG 为底物的 β -葡萄糖苷酶发色底物平板筛选法,从 56 株真菌中筛选出了 8 株纤维素酶活性水平为++++的胞外纤维素酶产生菌,从后者筛选出 4 株高 β -葡萄糖苷酶活性的胞外纤维素酶产生菌。【结论】将以 CMC 和 Avicel 为底物结合碘液熏染的平板筛选法和以 pNPG 为底物的发色底物平板筛选法串联,可快捷、灵敏、有效地用于高 β -葡萄糖苷酶活性的胞外纤维素酶产生菌的筛选。

关键词: 胞外纤维素酶, 真菌, 平板筛选, 碘液熏染, β -葡萄糖苷酶, 对硝基苯酚- β -1,4-葡萄糖

A rapid, sensitive and effective method for screening of the fungi excreting extracellular cellulases

CHEN Chen^{1,3} SONG Hua-Wen^{2,3} WANG Jie^{2,3} YANG Xiao-Hong^{1,3}
CUI Li-Jiao^{2,3} JIANG Li-Ming^{2,3*} LUO Hui^{1,3*}

(1. Chemistry Teaching and Research Section, Guangdong Medical College, Zhanjiang, Guangdong 524023, China)

(2. Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical College, Zhanjiang, Guangdong 524023, China)

(3. The key Laboratory of R&D Marine Microorganism and Microalgae in the Beibu Gulf Rim, Zhanjiang, Guangdong 524023, China)

Abstract: [Objective] To establish a rapid, sensitive and effective method for screening of the fungi producing extracellular cellulases with high β -glucosidase activity. [Methods] Iodine vapor staining was used to replace Congo red or iodine dip dyeing in the screening methods of extracellular

*通讯作者: 江黎明: Tel: 86-759-2388582; 邮箱: lmjiang@gdmc.edu.cn

罗辉: 邮箱: gdmcluoahui@139.com

收稿日期: 2015-02-14; 接受日期: 2015-04-13; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-04-20

cellulase producing fungi by agarose plates complemented with avicel or CMC in order to reduce the consumption and pollution of gram's iodine, and the screening method of β -glucosidase producing fungi by the agarose plates complemented with 4-Nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (pNPG) was established. Finally, these two methods were used successively to screening the fungi producing extracellular cellulases with high β -glucosidase activity. **[Results]** The screening methods of both the avicel or CMC agarose plates with iodine vapor staining and the pNPG agarose plates were established successfully, and used successively to screening 8 strains of extracellular cellulase producing fungi with level ++++ cellulase activity out of 56 fungus strains, and from which 4 strains of extracellular cellulase producing fungi with high β -glucosidase activity were screening out. **[Conclusion]** It could be concluded that the method of avicel or CMC agarose plate with iodine vapor staining integrated with pNPG agarose plate assay would be a rapid, sensitive and effective method for screening of the fungi producing extracellular cellulases with high β -glucosidase activity.

Keywords: Extracellular cellulase, Fungi, Plate screening, Iodine vapor staining, β -Glucosidase, pNPG

纤维素物质是地球上最丰富、最廉价的可再生资源,主要由植物光合作用产生,全球每年陆地的基础生产总量约为 560–1 200 亿 $t^{[1-2]}$ 。用纤维素物质生产燃料乙醇技术的发展和应^[3-4],预期不仅可以解决能源危机,而且还可以显著降低碳排放^[5-8]。纤维素是纤维素物质的主要成分,是由许多葡萄糖残基利用 β -1,4-糖苷键连接而成的长链多糖大分子物质,不溶于水和一般有机溶剂,相对分子量约为 40–2 500 kD,相当于含有大约 220–13 800 个葡萄糖基^[9]。能将纤维素降解为葡萄糖的纤维素酶(Cellulase)是一种复合酶,主要由内切 β -1,4-葡聚糖酶(Endo-1,4-glucanase, EC3.2.1.4, 简称内切葡聚糖酶, EG)、外切 β -1,4-葡聚糖酶(Exo- β -1,4-glucanases, 简称外切葡聚糖酶, ExG)或纤维二糖水解酶(Cellobiohydrolases: EC3.2.1.91, 简称 CBH I; EC3.2.1.176, 简称 CBH II)和 β -1,4-葡萄糖苷酶(β -1,4-Glucosidases, EC3.2.1.21, 简称 β -葡萄糖苷酶, BG) 3 种酶组成^[6,9-10]。一般认为,天然纤维素首先在一些非水解性质的解链因子或解氢键酶作用下,使纤维素链间和链内氢键打开,局部形成无序的非结晶纤维素;然后内切葡聚糖酶主要作用于非结晶区内纤维素链中的糖苷键,把纤维素长链随机水解断裂成短链;外切葡聚糖酶主要作用于结晶区内纤维素分子的还原端和非还原端,每次从纤维素上切下一个纤维二糖;最后由 β -葡萄糖苷酶切割纤维二糖和纤维寡糖的非还原

端生成葡萄糖分子^[9,11]。

微生物是纤维素酶的主要来源^[12-15],尤其是真菌^[13,16]。不同真菌产生和分泌出的纤维素酶大多都是含有内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶的复合酶,但绝大多数纤维素酶中的 β -葡萄糖苷酶的活力都很低^[15,17]。产生和分泌纤维素酶的微生物的筛选通常是采用以羧甲基纤维素(CMC)或微晶纤维素(Avicel)为底物制成的琼脂凝胶平皿和固体培养皿结合刚果红或碘液染色的方法^[10,18-19]。这些方法方便、快捷,但最大的缺陷是不能反映出微生物分泌的纤维素酶中 β -葡萄糖苷酶的活力大小。因此,建立一种在以 CMC 或 Avicel 为底物检测纤维素酶总活力的平板法基础上,检测 β -葡萄糖苷酶活力的快捷、有效的筛选方法,对从大量的微生物样品中筛选产生和分泌含有高活力 β -葡萄糖苷酶的纤维素酶的菌株有重要的现实意义和良好的应用前景。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂: CMC、Avicel、对硝基苯- β -D-葡萄糖苷(pNPG)、对硝基苯酚、 β -葡萄糖苷酶、溶细胞酶、酵母提取物、胰蛋白胨、葡萄糖、琼脂、琼脂糖购自 Sigma 公司; 2 \times Taq MasterMix 聚合酶试剂盒购自 Vazyme 公司; Biospin 真菌基因组 DNA 提取试剂盒购自 BioFlux 公司; 真菌通用 PCR 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.1.2 根际土和腐木样品: 黄花夹竹桃根际土样品采于广东省湛江市霞山区海滨公园黄花夹竹桃种植区的 3 个采样点, 采集 10–20 cm 深的带根土; 腐木样品采用贵州省黔南布依族苗族自治州荔波小七孔景区的 5 个采样点, 1–2 cm 表层下的腐木; 密封于无菌试管中带回实验室 4 °C 保存。

1.1.3 培养基: (1) 根际真菌分离培养基(SMA, g/L): KH_2PO_4 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, 蛋白胨 5.0, 葡萄糖 10.0, 琼脂 15.0–20.0, 土壤浸液 1 000 mL, pH 自然。(2) 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA, g/L): 马铃薯 200, 葡萄糖 20, 琼脂 16, 纯水定容至 1 000 mL, pH 自然。(3) 酵母膏胨葡萄糖液体培养基(YPD, g/L): 胰蛋白胨 20, 酵母提取物 10, 葡萄糖 20, 纯水定容至 1 000 mL, pH 自然。(4) 产酶液体培养基(g/L): KH_2PO_4 4.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, 酵母提取物 10.0, NaCl 0.4, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4.0, 微晶纤维素 10.0, 纯水定容至 1 000 mL。(5) Avicel 培养基(g/L): K_2HPO_4 1.00, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25, 酵母提取物 2.00, 琼脂糖 10.00, 加入 Avicel 2.00, 纯水定容至 1 000 mL。(6) CMC 培养基(g/L): K_2HPO_4 1.00, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25, 酵母提取物 2.00, 琼脂糖 10.00, 加入 CMC 2.00, 纯水定容至 1 000 mL。(7) pNPG 培养基(g/L): K_2HPO_4 1.00, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25, 酵母提取物 2.00, 琼脂糖 10.00, 纯水定容至 800 mL。

以上培养基于 1×10^5 Pa 灭菌 20 min; 倒平板前加入青霉素-链霉素溶液(青霉素 10 000 U/mL; 链霉素 10 000 mg/L) 10 mL。其中 YPD 培养基的葡萄糖单独灭菌后加入, pNPG 培养基中 pNPG 取 0.4 g 溶于 200 mL 的醋酸缓冲液, 过滤除菌后加入培养基。

1.2 方法

1.2.1 根际土/腐木样品中真菌的分离纯化: 于装有 40 mL 纯水的 100 mL 三角瓶中放入 18 粒直径为 5–7 mm 的玻璃珠, 1×10^5 Pa 高压灭菌 20 min。无菌条件下加入 2.2 g 根际土/腐木样品和 1% 无菌胆酸钠, 160 r/min 摇床振荡 60 min。无菌条件下 10 倍梯度稀释, 分别吸取 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 稀释液

100 μL , 涂布接种于 SMA/PDA 培养板, 置于 28 °C 恒温箱中培养。菌丝长出, 挑取单一菌落反复多次划线培养纯化。将纯化的真菌转接至 PDA 固体斜面培养基上, 待真菌长满斜面, 于 4 °C 保存。

1.2.2 生产胞外纤维素酶真菌的筛选: 将获得的根际土真菌和腐木样真菌分别接种于 Avicel 培养基、CMC 培养基和 pNPG 培养基上, 置于 28 °C 恒温箱中培养, 每天取出观察。在接种了真菌的 pNPG 培养板上, 能分泌出 β -葡萄糖苷酶的菌落周围, 因凝胶中的 pNPG 被扩散出的 β -葡萄糖苷酶水解产生黄色的对硝基苯酚而出现黄色的晕圈。将接种了真菌的 Avicel 培养皿/CMC 培养皿倒扣在装有革兰氏碘液的小一号平皿盖子上碘熏 5–10 min, 在能分泌出外切葡聚糖酶/内切葡聚糖酶的菌落周围, 因凝胶中的羧甲基纤维素和微晶纤维素被扩散出的内切葡聚糖酶/外切葡聚糖酶水解而出现通透的晕圈。

黄色/通透晕圈的直径或面积与菌落分泌出的 β -葡萄糖苷酶/内切葡聚糖酶和外切葡聚糖酶活性大小正相关; 纤维素酶的活性水平可根据培养 48 h 时 pNPG/纤维素水解产生的黄色/透明晕圈的 D 值(透明圈直径与菌落直径的差值)分别定义为: +++: $D=8-10$ mm; ++: $D=5-7$ mm; +: $D=2-4$ mm; -: $D=0-1$ mm; -: 没有透明/黄色晕圈。

1.2.3 真菌的产酶发酵: 将筛选出的纤维素酶产生菌接种于加入 40 mL 产酶液体培养基的 100 mL 锥形瓶, 于 28 °C、160 r/min 培养约 7 d, 将培养液于离心机上 4 000 r/min 离心 20 min, 取上清液作为粗酶液用于纤维素酶的活性分析。

1.2.4 pNPG 法测定酶活性: 将 0.153 g 对硝基苯酚和 0.1576 g pNPG 分别溶于 100 mL 0.1 mol/L 醋酸缓冲液(pH 4.8)配成 11 $\mu\text{mol/L}$ 对硝基苯酚和 5 mmol/L pNPG, 稀释 10 倍后用 UV5200 紫外分光光度计分别对 pNPG 和对硝基苯酚进行全波长扫描。根据两者的吸收曲线, 参照 Ghose 的方法, 按以下步骤对粗酶液的纤维素酶活性进行分析^[10,20]:

(1) 试管中加入 1 mL 5 mmol/L pNPG 和 1.8 mL 0.1 mol/L 醋酸缓冲液(pH 4.8), 50 °C 温育至平衡;

(2) 分别加入 0.2 mL 各粗酶液和酶标准液混合均匀, 酶液空白对照管以 0.2 mL 0.1mol/L 醋酸缓冲液 (pH 4.8) 替代; (3) 50 °C 孵育 30 min 后加入 4 mL 0.4 mol/L 甘氨酸缓冲液 (pH 10.8) 终止反应; (4) 于 365 nm 波长处测定对硝基苯酚标准液和酶解产物对硝基苯酚的吸光度, 绘制标准曲线, 并根据标准曲线进行酶活计量。酶活力单位按国际酶活力单位定义为: 在特定条件下, 1 min 内转化 1 μ mol 底物, 或者底物中 1 μ mol 有关基团所需的酶量, 称为 1 个国际单位(U)。

1.2.5 生产胞外纤维素酶真菌的鉴定: 将生产胞外纤维素酶真菌接种于 YPD 液体培养基中, 28 °C、160 r/min 振荡约 3 d 至有菌体产生。挑取少量菌体至 1.5 mL 离心管中, 于 12 000 r/min 离心 5 min 除去上清液。将菌体尽量剪碎, 加入 500 μ L 磷酸钠缓冲液 (pH 7.0) 和 100 U 溶细胞酶, 37 °C 水浴 3 h, 12 000 \times g 离心 1 min, 倒掉上清液后参照 Biospin 真菌基因组 DNA 提取试剂盒说明提取真菌基因组 DNA, 最后加入 100 μ L TE 缓冲液将 DNA 溶解。以提取的基因组 DNA 为模板, 采用真菌的通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 对 rRNA 基因中内转录间隔区-1、5.8 S rRNA 基因和内转录间隔区-1 (ITS1-5.8S-ITS2) 片段进行 PCR 扩增^[21]。经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离获得的扩增产物送至上海生工生物工程股份有限公司测序, 测序结果采用 BLAST 与 GenBank 数据库中的 ITS1-5.8S-ITS2 序列进行相似性分析, 从而确定与之一致性最大的物种^[22]。

1.2.6 数据处理: 采用 Excel 和 SPSS 19.0 软件分别对相关数据进行平均数 \pm 标准差和组间 *t* 检验分析, 统计显著水平设定为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 碘液熏染和浸染对 Avicel 和 CMC 培养板上纤维素酶水解圈的显示

将获得的 8 种能分泌出胞外纤维素酶的不同真菌分别接种于 3 组 Avicel 培养板、CMC 培养板和

Avicel+CMC 培养板上, 于 28 °C 培养 24 h。将其中一组直接置透射灯上摄影记录, 另一组培养板加入革兰氏碘液浸染^[19] 5–10 min 后置透射灯上摄影记录, 将第 3 组培养板倒扣在装有革兰氏碘液的小一号平皿盖子上碘熏 5–10 min 后置透射灯上摄影记录。结果显示: 碘液熏染和浸染均能使加有 Avicel、CMC 和 Avicel+CMC 的 3 种培养板上产生纤维素酶的真菌菌落周围呈现清楚且大小相近的纤维素水解圈, 表明碘液熏染和浸染的方法效果相似; 其次, 在 Avicel、CMC 和 Avicel+CMC 3 种培养板上呈现的纤维素水解圈大小无明显差异, 表明 3 种底物或底物组合的效果也很相似(图 1)。

2.2 纤维素培养板和 pNPG 培养板用于胞外纤维素酶产生菌的检测

将获得的 8 种能分泌出胞外纤维素酶的不同真菌分别接种于 Avicel 培养板、CMC 培养板和 pNPG 培养板上, 置 28 °C 培养 24 h。取出将 Avicel 培养板、CMC 培养板倒扣在装有革兰氏碘液的小一号平皿盖子上碘熏 5–10 min 后置透射灯上摄影记录, 将 pNPG 培养板直接置透射灯上摄影记录。结果显示, 在采用 Avicel 培养板和 CMC 培养板加碘液熏染的方法检测出的胞外纤维素酶产生菌中, 只有其纤维素酶中的 β -葡萄糖苷酶活性较强的真菌能在 pNPG 培养板上呈现出因 pNPG 水解而产生的黄色晕圈(图 2), 表明真菌来源的纤维素酶中只有少部分的 β -葡萄糖苷酶活性较强。

2.3 产胞外纤维素酶真菌的筛选

从广东省湛江市霞山区海滨公园黄花夹竹桃种植区的 3 个采样点采回的黄花夹竹桃根际土样品中共分离得到 31 株真菌, 采用 Avicel 培养板加碘液熏染的方法检测筛选出所分泌的胞外纤维素酶的活性水平为++++以上的真菌 6 株(表 1 和图 1); 从贵州省黔南布依族苗族自治州荔波小七孔景区的 5 个采样点采回的腐木样品中共分离得到 25 株真菌, 采用 Avicel 培养板加碘液熏染的方法检测筛选出所分泌的胞外纤维素酶的活性水平为++++以上的真菌 2 株(表 1 和图 1)。采用 Avicel 培养板从

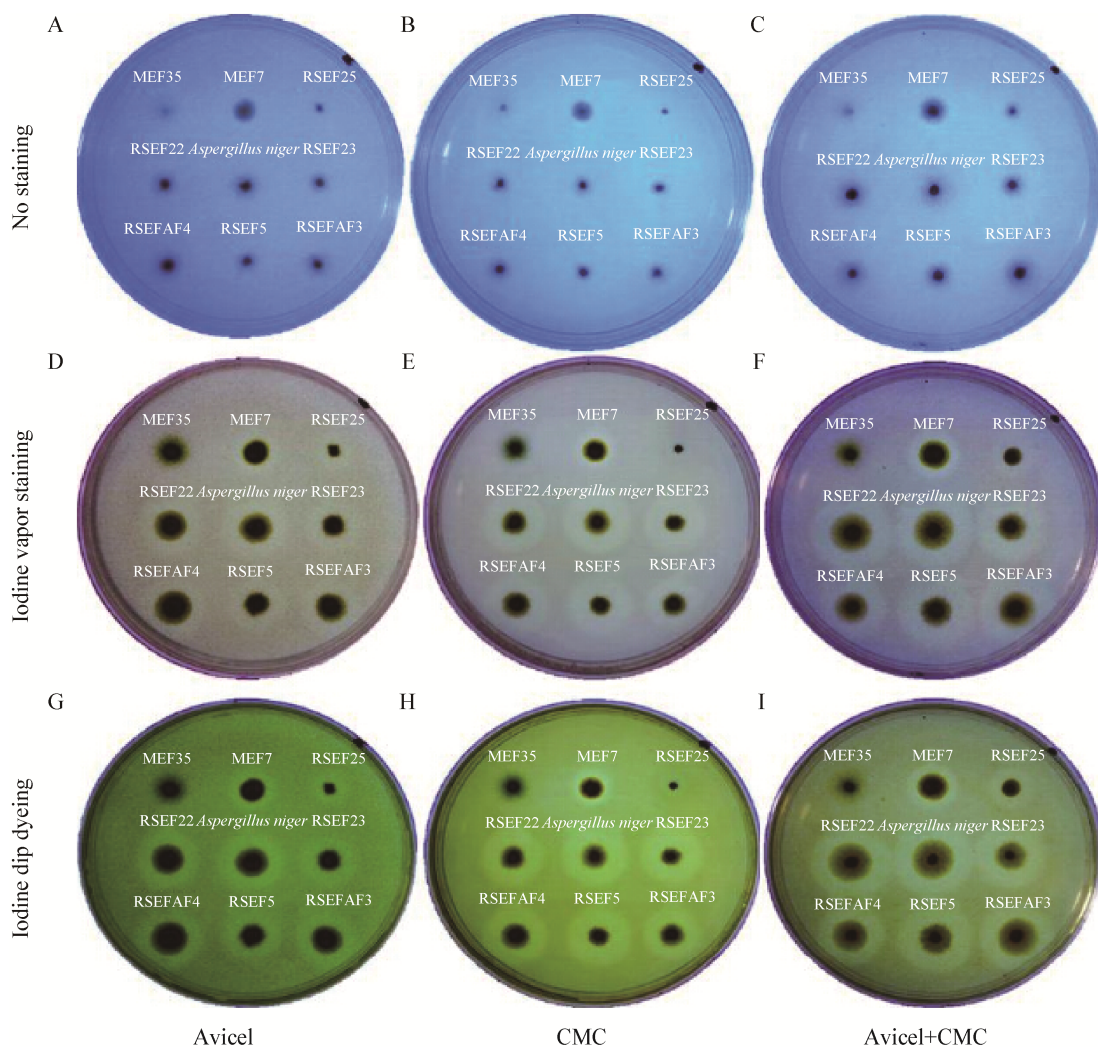


图1 碘液熏染和碘液浸染分别对添加了微晶纤维素或羧甲基纤维素的琼脂糖平板上的纤维素酶水解圈的显示
Figure 1 The cellulolytic zone displayed by both iodine vapor staining and iodine dip dyeing on agarose plates complemented with avicel or CMC

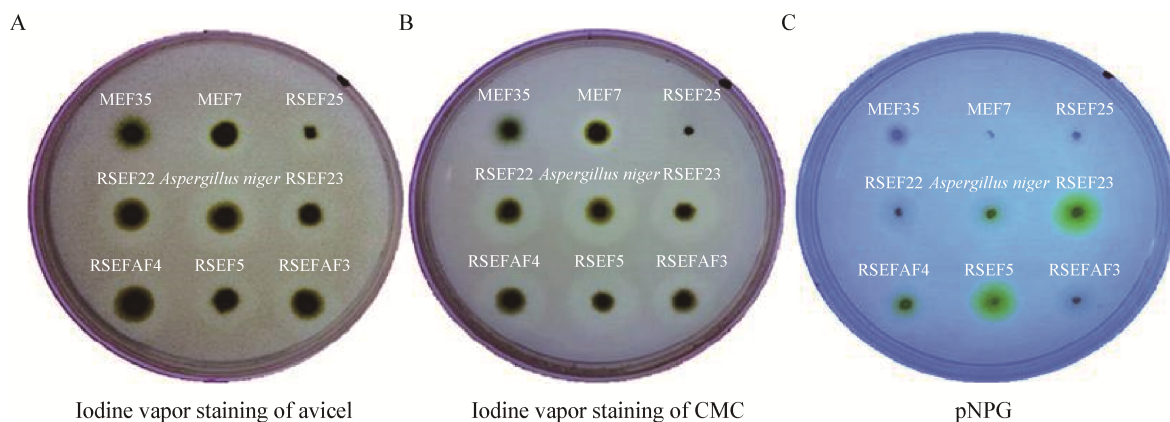


图2 纤维素琼脂糖平板和 pNPG 琼脂糖平板用于胞外纤维素酶产生菌检测的效果比较
Figure 2 Comparison of the detection effects of the strains with extracellular cellulase activity by the agarose plates complemented respectively with avicel/CMC and pNPG

表 1 产胞外纤维素酶可培养真菌 ITS1-5.8S-ITS2 序列的 BLAST 比对分析及其胞外纤维素酶活性检测
Table 1 BLAST alignment analysis of the ITS1-5.8S-ITS2 sequences and extracellular cellulase activity detection of the culturable fungi producing extracellular cellulase

菌株编号 Strain number	最相似物种(序列号) Most similar species (GenBank accession numbers)	一致性 Identity (%)	物种来源 Species source	Avicel 培养板法 Cellulose plate methods	pNPG 平板法 pNPG plate method	酶活性 Enzyme activity (U/mL)
RSEF 05	<i>Aspergillus aculeatus</i> (JQ670921)	100	树际土	++++	+++	0.395
RSEF 11	<i>Aspergillus</i> sp. MI-2011 (JN393254)	99	根际土	++++	—	0.260
RSEF 17	<i>Aspergillus aculeatinus</i> (HE578070)	99	根际土	++++	—	0.235
RSEF 22	<i>Aspergillus niger</i> (KF305756)	99	根际土	++++	+	0.290
RSEF 23	<i>Aspergillus aculeatus</i> (JX501364)	99	根际土	++++	++++	0.420
RSEFAF4	<i>Aspergillus aculeatus</i> (JX501377)	99	根际土	++++	++	0.390
LBF37	<i>Penicillium chermesinum</i> (AY742693)	99	腐木	++++	—	0.100
LBF40	<i>Penicillium chermesinum</i> (AY742693)	97	腐木	++++	—	0.190

注：纤维素酶的活性水平跟 pNPG/纤维素水解产生的透明/黄色晕圈 *D* 值(透明圈直径与菌落直径的差值)分别定义为++++: *D*=8–10 mm; +++: *D*=5–7 mm; ++: *D*=2–4 mm; +: *D*=0–1 mm; —: 没有透明/黄色晕圈。有黄色晕圈以粗体表示。
Note: The cellulase activity levels were designated on the basis of the *D* value (the difference between the transparent yellow halo diameter and the diameter of the colony) of the transparent/yellow halo produced by cellulose/pNPG hydrolysis as: ++++: *D*=8–10 mm; +++: *D*=5–7 mm; ++: *D*=2–4 mm; +: *D*=0–1 mm; —: No transparent circle. The colonies with yellow halo were represented in bold.

这 8 株胞外纤维素酶的活性水平为++++以上的真菌中, 筛选出了所产生的胞外 β-葡萄糖苷酶的活性水平为+以上的真菌 4 株, 包括 RSEF 23、RSEF 05、RSEFAF4 和 RSEF 22 菌株; 其中, RSEF 23 菌株的胞外纤维素酶的活性最强, 其次为 RSEF 05 菌株(表 1 和图 1)。

2.4 产胞外纤维素酶真菌的发酵及上清液中的 β-葡萄糖苷酶活性分析

用紫外分光光度计分别对 pNPG 和对硝基苯酚进行全波长扫描的结果显示, pNPG 的最大吸收峰在 320–330 nm 处, 而对硝基苯酚的最大吸收峰在 350–365 nm 处(图 3A)。因此, 我们选择在 350 nm 和 365 nm 两个波长处, 测定对硝基苯酚标准液和产胞外纤维素酶真菌的发酵及上清液中的 β-葡萄糖苷酶解产生的对硝基苯酚的吸光度(365 nm), 绘制标准曲线(图 3B)和酶反应时间动态曲线(图 3C), 并根据标准曲线进行酶活计量(表 1 和图 3)。结果显示, 在 365 nm 波长处的测定比在 350 nm 波长处的

测定更灵敏(*P*<0.01, 表 2)。

2.5 产胞外纤维素酶生菌的分子生物学鉴定

将采用 Avicel 培养板加碘液熏染方法筛选出的能产生胞外纤维素酶的真菌, 包括酶活水平为++++以上的 8 株真菌, 发酵培养并提取出各自的基因组 DNA 作为模板, 采用真菌通用引物对 ITS1/ITS4 进行 PCR 扩增。反应体系: DNA 模板 50 ng, 2×*Taq* MasterMix 聚合酶 25 μL, 正反引物各 20 μmol/L, ddH₂O 添加至 50 μL。反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 5 min, 52 °C 45 s, 72 °C 60 s, 30 个循环; 72 °C 7 min。产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳分离后测序, 将获得的 ITS1-5.8S-ITS2 序列采用 BLAST 与 GenBank 数据库中的 ITS1-5.8S-ITS2 序列进行相似性分析, 确定与之相似性最大的物种并参考形态学特征做出鉴定。结果显示, 在胞外纤维素酶活性水平为++++以上的 8 株真菌中, 来源于黄花夹竹桃根际土的 6 株均为 *Aspergillus* 属真菌, 而来源于腐木样品的 2 株均为 *Penicillium* 属真菌(表 1)。

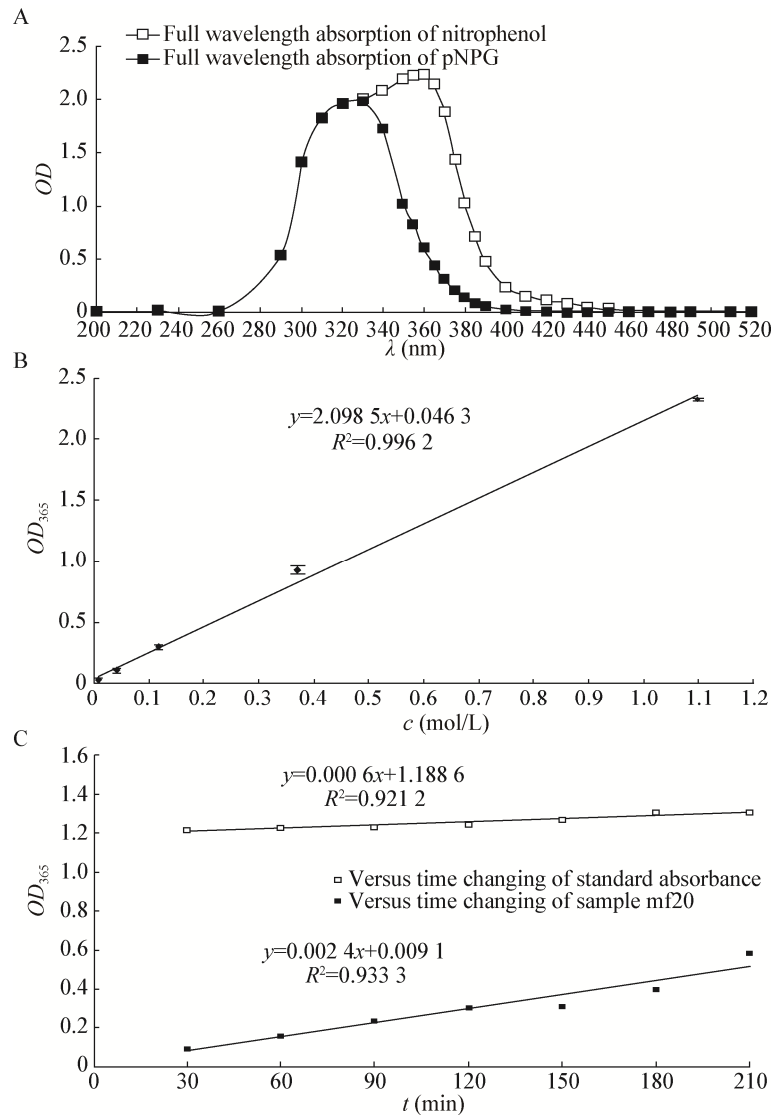


图3 采用对硝基苯-β-D-葡萄糖苷分析 β-葡萄糖苷酶活性

Figure 3 β-Glucosidase assay using p-nitrophenol-β-D-Glucoside

注：A：对硝基苯酚和对硝基苯-β-D-葡萄糖苷的全波长扫描；B：对硝基苯酚的标准曲线；C：酶反应时间曲线。

Note: A: Full wavelength scanning of both p-nitrophenol and pNPG; B: Standard curve of p-nitrophenol; C: Enzyme reaction time curves.

表2 不同波长对采用发色底物 pNPG 分析测定 β-葡萄糖苷酶活性结果的影响
Table 2 The effects of different wavelength on the analysis of β-glucosidase activity with pNPG

样品来源 Sample sources	350 nm 分析结果 Analysis results at 350 nm		365 nm 分析结果 Analysis results at 365 nm	
	净吸光度 A Net absorbance ($\bar{x} \pm s, n=3$)	相应的酶活 Corresponding activity (U/mL)	净吸光度 A Net absorbance ($\bar{x} \pm s, n=3$)	相应的酶活 Corresponding activity (U/mL)
RSEF 05	0.124±0.011	0.120	0.369±0.017	0.395
RSEF 22	0.094±0.014	0.100	0.308±0.015	0.290
RSEF 23	0.216±0.014	0.130	0.371±0.017	0.420
RSEFAF4	0.193±0.018	0.115	0.311±0.018	0.390

3 讨论

纤维素酶在棉纺加工、造纸和废纸回收、水果和蔬菜汁制备及作为洗涤剂酶、食物添加剂和饲料添加剂中已得到广泛的应用,而且随着木质纤维生物质酶解生产的燃料乙醇的技术进步和成本的降低,以及纤维素生物质燃料乙醇推广应用,纤维素酶将会成为世界第一大工业用酶^[13,15,23-24]。但目前国内外生产的纤维素酶产品普遍存在的一个问题就是,其中的 β -葡萄糖苷酶的酶活力较低,致使在纤维素降解过程中出现纤维二糖大量积聚,反馈抑制内切和外切葡聚糖酶的活性,从而影响纤维素酶的水解效率;此外,还存在有在经典的生物反应条件下容易失活,特异性差、纤维素水解活性不高等缺陷^[12,15]。为了获得不受纤维二糖反馈抑制、特异性强、活性高并能适应工业生产反应条件等特性的纤维素酶,一方面可采用分离培养后筛选的传统方法或构建宏基因组表达文库后筛选的方法从海洋等各种特定环境的微生物中筛选分离具有理想特性的新酶^[9,12,25],另一方面可采用理性蛋白质设计或定向进化技术构建现有酶编码基因的变异基因表达文库并从中筛选分离具有理想特性的新酶^[12,23,26]。所有这些方法和策略都需要对大规模的分离培养微生物库、宏基因组表达文库或变异基因表达文库进行酶活性分析筛选。因此,建立快速、灵敏、有效的纤维素酶活性检测方法是至关重要的。

纤维素酶活力分析方法很多^[10,20,27]可分为纤维素酶总活性测定和个别纤维素酶活性测定 2 大类。纤维素酶总活性通常采用 1984 年被国际理论和应用化学协会发酵委员会确定的标准方法,即以滤纸为底物,以 3,5-二硝基水杨酸(DNS)与酶解生成的还原糖反应生成棕红色的氨基化合物的分析方法^[10-11,20,27-28]。个别纤维素酶的活性测定,内切葡聚糖酶活性通常采用以无定形纤维素如 CMC 为底物,外切葡聚糖酶活性通常采用以 Avicel 为底物,以 DNS 与酶解生成的还原糖反应生成棕红色的氨基化合物的分析法^[10-12]; β -葡萄糖苷酶通常采用发

色底物如 pNPG^[10-11]的分析法。其中, pNPG 分析法的优点是所测定的 β -葡萄糖苷酶是催化纤维素糖化限速步骤的关键酶,灵敏、可靠、应用较广。本研究采用波长 430 nm^[10]时,吸光度太低,无法进行分析。用同一台紫外分光光度计分别对 pNPG 和对硝基苯酚进行全波长扫描,并根据两者的吸收曲线(图 3A),采用 365 nm 波长测定方法能获得灵敏、可靠的结果(表 2)。这表明,分析中用同一台仪器对 pNPG 和对硝基苯酚进行全波长扫描来确定测定波长是十分重要的。

产生胞外纤维素酶的微生物筛选通常采用以羧甲基纤维素或微晶纤维素为底物制成的琼脂糖凝胶平皿结合刚果红^[10,29]或碘液浸泡染色^[18-19]的方法。其中,用碘液浸泡染色的方法较刚果红浸泡染色的方法更灵敏,但一是要消耗大量的碘液并对环境造成一定的污染,二是不能反映出纤维素酶中 β -葡萄糖苷酶的活力大小。研究将碘液浸染改为碘液熏染,不仅同样灵敏快捷,而且碘液耗量大减,对环境也更友好(图 1)。在此基础上,研究建立了以 pNPG 为底物的发色底物培养板法,可有效用于从纤维素底物结合碘液熏染方法筛选出的阳性菌株中筛选具有高活力 β -葡萄糖苷酶的纤维素酶产生菌(图 2)。但表 1 中部分 pNPG 培养板法检测结果显示“-”的真菌,在采用 pNPG 分析法测定 β -葡萄糖苷酶时却有活性,表明 pNPG 分析法的灵敏度比 pNPG 培养板法的灵敏度高。采用分别以 CNC 和 Avicel 为底物结合碘液熏染方法,成功从来源于黄花夹竹桃根际土和腐木样品的 56 株真菌中筛选出了 8 株胞外纤维素酶活性水平为++++以上的纤维素酶产生菌,又采用 pNPG 培养板法从中筛选出了 4 株 β -葡萄糖苷酶活性较强的胞外纤维素酶生产真菌(表 1 和图 2)。

参考文献

- [1] Beer C, Reichstein M, Tomelleri E, et al. Terrestrial gross carbon dioxide uptake: global distribution and covariation with climate[J]. Science, 2010, 329(5993): 834-838
- [2] Field CB, Behrenfeld MJ, Randerson JT, et al. Primary

- production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components[J]. *Science*, 1998, 281: 237-240
- [3] Kwok R. Cellulosic ethanol hits roadblocks[J]. *Nature*, 2009, 461(1): 82-83
- [4] Ragauskas AJ, Williams CK, Davison BH, et al. The path forward for biofuels and biomaterials[J]. *Science*, 2006, 311: 484-489
- [5] Zhang YHP. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2008, 35(5): 367-375
- [6] Percival Zhang YH, Himmel ME, Mielenz JR. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies[J]. *Biotechnology Advances*, 2006, 24(5): 452-481
- [7] Bhat MK, Bhat AS. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications[J]. *Biotechnology Advance*, 1997, 15(3/4): 583-620
- [8] Lynd LR, Cushman JH, Nichols RJ, et al. Fuel ethanol from cellulosic biomass[J]. *Science*, 1991, 251: 1318-1323
- [9] Quiroz-Castañeda RE, Folch-Mallola JL. Hydrolysis of biomass mediated by cellulases for the production of sugars[A]//Chandel AK, da Silva aSS. *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass-techniques, Applications and Commercialization*[M]. Rijeka, Croatia: InTech, 2013: 119-155
- [10] Zhang YHP, Hong J, Yea X. Cellulase assays[A]//Mielenz JR. *Methods in Molecular Biology*, Vol 581, *Biofuels: Methods and Protocols*[M]. New York: Humana Press, 2009: 213-231
- [11] Dashtban M, Maki M, Leung KT, et al. Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2010, 30(4): 302-309
- [12] Juturu V, Wu JC. Microbial cellulases: engineering, production and applications[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2014, 33: 188-203
- [13] Kuhad RC, Gupta R, Singh A. Microbial cellulases and their industrial applications[J]. *Enzyme Research*, 2011. DOI: 10.4061/2011/280696
- [14] Lynd LR, Weimer PJ, vanZyl WH, et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2002, 66(3): 506-577
- [15] Sukumaran RK, Singhanian RR, Pandey AA. Microbial cellulases—production, applications and challenges[J]. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 2005, 64: 832-844
- [16] Dashtban M, Schraft H, Qin W. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues: opportunities & perspectives[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2009, 5(6): 578-595
- [17] Li DC, Li AN, Papageorgiou AC. Cellulases from thermophilic fungi: recent insights and biotechnological potential[J]. *Enzyme Research*, 2011. DOI: 10.4061/2011/308730
- [18] Meddeb-Mouelhi F, Moisan JK, Beauregard M. A comparison of plate assay methods for detecting extracellular cellulase and xylanase activity[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2014, 66: 16-19
- [19] Kasana RC, Salwan R, Dhar H, et al. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine[J]. *Current Microbiology*, 2008, 57(5): 503-507
- [20] Ghoset K. Measurement of cellulase activities[J]. *Pure and Applied Chemistry*, 1987, 59(2): 257-268
- [21] White TJ, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[A]//PCR Protocols—a Guide to Methods and Applications[M]. San Diego, CA: Academic Press, 1990: 315-322
- [22] Wang J, Cui LJ, Lan LB, et al. Diversity of culturable extracellular proteases producing marine fungi isolated from the intertidal zone of Naozhou Island in South China Sea[J]. *Microbiology China*, 2015, 42(2): 238-253 (in Chinese)
王洁, 崔丽娇, 兰柳波, 等. 中国南海涠洲岛潮间带产胞外白酶可培养海洋真菌多样性[J]. *微生物学通报*, 2015, 42(2): 238-253
- [23] Singhanian RR, Sukumaran RK, Patel AK, et al. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2010, 46(7): 541-549
- [24] Bhat MK. Cellulases and related enzymes in biotechnology[J]. *Biotechnology Advances*, 2000, 18: 355-383
- [25] Intriago P. Marine Microorganisms: perspectives for getting involved in cellulosic ethanol[J]. *Intriago AMB Express*, 2012, 2(46): 1-12
- [26] Garvey M, Klose H, Fischer R, et al. Cellulases for biomass degradation: comparing recombinant cellulase expression platforms[J]. *Trends in Biotechnology*, 2013, 31(10): 581-593
- [27] Eveleigh DE, Mandels M, Andreotti R, et al. Measurement of saccharifying cellulase[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2009, 2: 21. DOI: 10.1186/1754-6834-2-21
- [28] Luciano Silveira MH, Rau M, Pinto da SilvaBon E, et al. A simple and fast method for the determination of endo- and exo-cellulase activity in cellulase preparations using filter paper[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2012, 51(5): 280-285
- [29] Tiwari P, Misra BN, Sangwan NS. β -Glucosidases from the fungus trichoderma: an efficient cellulase machinery in biotechnological applications[J]. *BioMed Research International*, 2013. DOI: 10.1155/2013/203735