

# 一种鉴定多糖水解酶类及其产生菌的新方法

马向东<sup>1</sup> 柯 涛<sup>2</sup> 熊 兰<sup>1</sup> 严 红<sup>1</sup> 马立新<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>湖北大学生命科学院 武汉 430062)

(<sup>2</sup>南阳师范学院 南阳 473061)

**摘 要** 利用曲里苯蓝能与多糖形成复合物的原理,建立起一种简便、快捷、灵敏的筛选多糖水解酶类及其产生菌的平板鉴定方法。曲里苯蓝对供试微生物无毒害作用,不影响酶的活性,并可高温灭菌。其最适浓度在 0.005% ~ 0.01%(W/V)之间。可用于纤维素水解酶类、淀粉水解酶类、甘露聚糖酶、普鲁兰酶等多糖水解酶,与传统方法相比,该方法不仅有着同样高的灵敏度,而且能够提高筛选效率,避免污染问题,同时适合于多种多糖底物。但不能用于木聚糖酶和菊粉酶的检测。

**关键词** 平板鉴定;多糖水解酶类;曲里苯蓝;筛选方法

中图分类号:Q936 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2007)06-1112-03

多糖水解酶类是自然界中广泛分布的酶类,几乎每种生物——动物、植物、藻类、细菌、古细菌、真菌,甚至噬菌体中都发现这类酶的存在。微生物来源的多糖水解酶类已成为工业酶制剂中应用范围最广、产量最高的酶类,各种新型的多糖水解酶以及多糖水解酶的新用途也不断被发现和报道。近年来多糖水解酶的研究已引起更加广泛的关注。

为筛选水解多糖的微生物及对多糖水解酶进行分子水平上的操作,完善的、快速有效的平板筛选技术显得非常必要。已有多种传统的基于酶与底物作用的平板筛选技术,这些方法基本上都是基于多糖的溶解性<sup>[1]</sup>、多糖的成胶性<sup>[2]</sup>、多糖与染料形成可溶或者不溶的交联复合物<sup>[3,4]</sup>、多糖与染料形成复合物<sup>[5]</sup>等为基础建立起来的。但这些方法大部分仍然存在很多缺点,如容易造成污染和菌株的死亡、显色时间长、鉴定方法烦琐和分辨力不强等。一些新的筛选技术如交联底物法,制作过程复杂,商品化试剂成本高难以满足大规模筛选的要求。

本实验室建立了一种新的鉴定方法,利用曲里苯蓝(Trypan blue,又名锥虫蓝)与多糖类分子结合生成蓝色复合物的特性,以及多糖底物经相应的水解酶水解后蓝色褪去,出现透明水解圈的原理来鉴定多糖水解酶及其产生菌,可以快速鉴定多种水解酶。用此种方法已从各种环境中筛选到一系列产多糖水解酶的菌株,并为快速克隆和表达多种相关基因提供了便利<sup>[6]</sup>。本文以常用的几种典型多糖底物为实验材料,总结了这一鉴定方法及其适用范围,以飨读者。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 供试质粒和菌株 大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$ 本

室保藏,用于质粒的转化,质粒为分别带有  $\alpha$ -淀粉酶、纤维素酶基因、甘露聚糖酶基因、木聚糖酶基因、普鲁兰酶基因、菊粉酶基因的大肠杆菌表达质粒。

**1.1.2 主要试剂和药品** 酵母提取物(Oxoid),蛋白胨(Oxoid),琼脂粉(日本进口分装),曲里苯蓝(Sigma),菊粉(Sigma),木聚糖(Sigma),魔芋精粉(四川魔芋粉厂),可溶性淀粉(上海生化试剂公司),普鲁蓝(Pullulan,华中科技大学康建雄教授赠送),羧甲基纤维素(上海生化试剂公司)。淀粉酶,普鲁兰酶由诺维信公司提供。其它试剂等均均为国产分析纯。

**1.1.3 培养基和培养条件** 基础培养基采用 LB 培养基中加氨苄青霉素。培养基中各种多糖底物的浓度按 1%(W/V)添加。曲里苯蓝的浓度、每平皿培养基的厚度以及灭菌条件等参照文献<sup>[7]</sup>确定的方法,每皿培养基使用量为 15mL/皿左右( $\varphi$ 90mm),曲里苯蓝的最适浓度为 0.01%。培养基灭菌压力为 53 ~ 100kPa,灭菌时间为 30min。平板放置 37℃过夜培养。

### 1.2 分子生物学操作

参照文献<sup>[8]</sup>方法进行。

### 1.3 曲里苯蓝法对不同多糖水解酶产生菌的灵敏度检测

将含相应水解酶基因的质粒转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,获得可水解相应多糖底物的转化菌株,以只转化 pUC18 质粒的大肠杆菌为负对照分别点接在含曲里苯蓝的底物平板上,菌落长出后,比较测量平板上的透明圈的大小。

### 1.4 曲里苯蓝法与传统鉴定方法比较灵敏度检测

选取相同体积的 2、4、8、16 倍不同稀释倍数的酶液,分别点加在含和不含曲里苯蓝的相应底物平皿上(15mL/皿)。于 37℃保温 4 ~ 6h,观察水解圈清晰度并分别与传统鉴定方法的水解圈比较以判定其灵敏度。

基金项目:国家“十五”科技攻关(2004BA713B04-05)

\* 通讯作者。Tel/Fax: 86-27-88666349; E-mail: malixing@hubu.edu.cn

作者简介:马向东(1961-)男,湖北仙桃人,副教授,博士,主要从事酶工程分子生物学研究。E-mail: mabo1978@163.com

收稿日期:2007-02-25;接受日期:2007-04-13;修回日期:2007-07-05 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

1.5 曲里苯蓝对多糖水解酶产生菌生长的影响

以枯草芽胞杆菌、酿酒酵母和黑曲霉为供试菌种 ,分别稀释到合适的菌浓度 ,涂布接种在含和不含曲里苯蓝的相应底物平皿培养基上 ,并在最适温度下培养 24 ~ 48h ,对单菌落进行记数 ,并观察曲里苯蓝是否影响菌生长。

2 结果

2.1 曲里苯蓝法对不同多糖水解酶产生菌的灵敏度检测

分别以羧甲基纤维素、魔芋精粉、可溶性淀粉、普鲁蓝、菊粉、木聚糖为纤维素酶、甘露聚糖酶、淀粉酶、普鲁兰水解酶、菊粉酶、木聚糖酶的水解底物。以上几种多糖水解酶的曲里苯蓝染色法的结果见图 1 所示 ,表达纤维素酶、甘露聚糖酶、淀粉酶、普鲁兰水解酶的大肠杆菌转化子周围有清晰可见的水解透明圈。对照无透明圈。而曲里苯蓝对木聚糖酶和菊粉酶的鉴定效果不佳 ,转化子周围无明显透明圈。以上结果表明曲里苯蓝法可适用于纤维素酶、甘露聚糖酶、淀粉酶、普鲁兰水解酶等 4 种多糖水解酶。

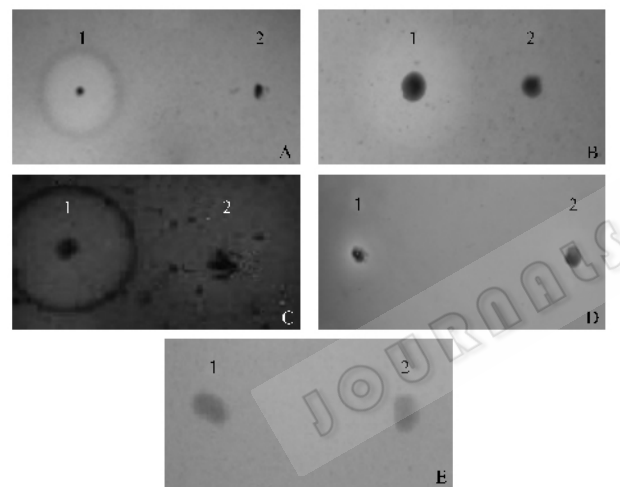


图 1 曲里苯蓝法对多糖水解酶及产生菌的影响

Fig.1 The affection of trypan blue method on polysaccharide-degrading enzymes and its producing strain. A : cellulase ; B : α-amylase ; C : mannase ; D : pullulanase ; E : xylanase. 1. the transformant of polysaccharide-degrading enzyme ;2. control .

2.2 曲里苯蓝法与传统鉴定方法的灵敏度比较

选取相同体积的 2、4、8、16 倍不同稀释倍数的多糖水解酶液 ,分别点加在含和不含曲里苯蓝的相应底物平皿上 ( 15mL/皿 )。于 37℃保温 4 ~ 6h ,观察水解圈清晰度并分别与传统鉴定方法的水解圈比较 ,以判定其灵敏度。纤维素酶、甘露聚糖酶、α-淀粉酶、普鲁兰水解酶的传统鉴定方法分别为刚果红染色法、刚果红染色法、碘-淀粉染色法和酒精沉淀法。实验结果表明( 图 2 所示为其中 2 个稀释度的酶液的水解圈 ) ,曲里苯蓝法和传统鉴定方法相比 ,其相同酶液浓度下的两种供试平板上的水解圈直径相同 ,两者的清晰度没有明显差异 ,稀释度越低 ,水解圈直径越小。从而证明曲里苯蓝的灵敏度与传统鉴定方法的灵敏度相同。

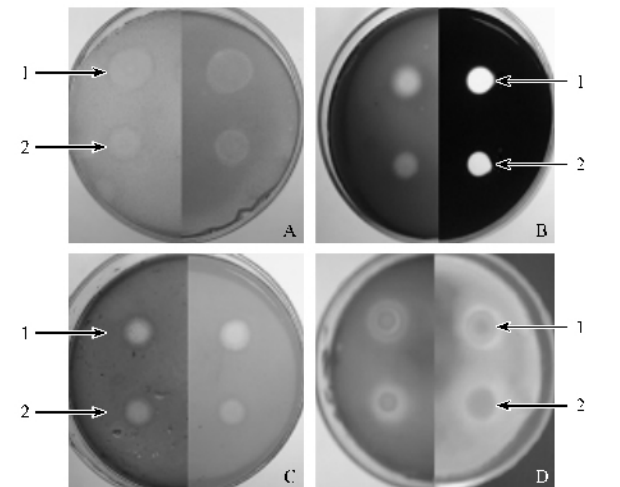


图 2 曲里苯蓝法与传统鉴定方法的灵敏度比较

Fig. 2 Compared with the sensitivities of trypan blue method and traditional identify methods of polysaccharide-degrading enzymes. A : cellulase ; B : α-amylase ; C : mannase ; D : pullulanase. The left was trypan blue method ; The right was traditional identify methods ; 1 , 2 dilution ratio enzyme solution ; 2 , 8 dilution ratio enzyme solution .

2.3 曲里苯蓝对多糖水解酶产生菌生长的影响

许多有机物质能影响生物的生理活性而对生物有害。以枯草芽胞杆菌、酿酒酵母和黑曲霉为供试菌种 ,检测曲里苯蓝对多糖水解酶产生菌生长的影响。实验结果表明( 图 3 ) ,在相同生长条件下 ,3 种供试菌种均能旺盛的生长 ,培养基中是否含曲里苯蓝不影响菌落记数的结果 ,菌落形态和大小也相同 ,因此曲里苯蓝的存在不影响菌的生长和代谢。本实验室还将曲里苯蓝法应用于毕赤酵母、解脂酵母等其他菌种 ,均未发现曲里苯蓝影响菌种生长的情况。

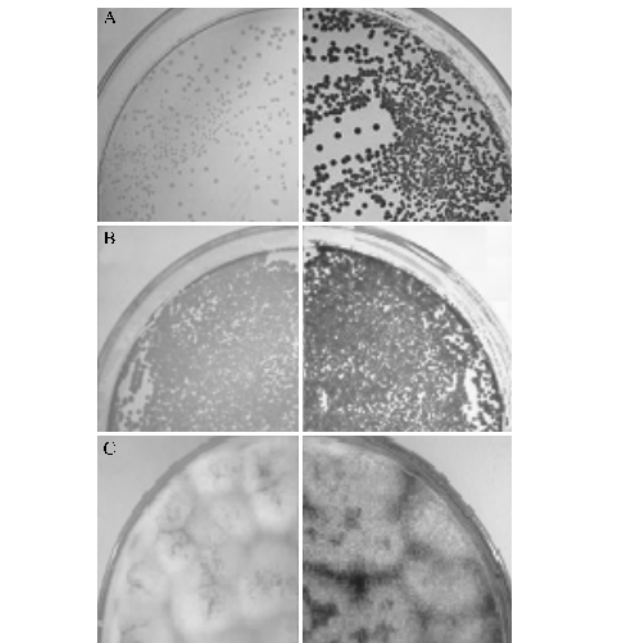


图 3 曲里苯蓝对多糖水解酶产生菌生长的影响

Fig.3 The effect of trypan blue on the growth of three strains. A : *Bacillus Subtilis* ; B : *Saccharomyces cerevisiae* ; C : *Aspergillus niger* . Left ,

### 3 讨论

纤维素是自然界中分布最广、含量最多的一种多糖,由不分支的葡萄糖残基通过  $\beta$ -1,4-糖苷键连接成的长链分子。一般有 8000 个残基以上。甘露聚糖作为半纤维素的第二大组分分布广泛,来源丰富,聚合度比较大。普鲁兰多糖为无分枝链的线性结构无定型多糖,聚合度在 200 ~ 5000 个葡萄糖残基左右。淀粉的聚合度也比较高,因此,实验表明上述 4 种多糖水解酶均可以应用曲里苯蓝染色法作为鉴别方法。木聚糖则是一类分子结构变化范围很大的多糖,不同来源的木聚糖的结构和组成均不同。菊粉是 D-呋喃果糖以  $\beta$ -2,1-糖苷键连结而成的多聚果糖,聚合度一般在 30 左右,聚合度小,分子量偏小,无法与曲里苯蓝形成稳定的复合物结构,因此使用曲里苯蓝没有明显效果。

和其他方法比较,本方法的主要优点有:底物不需要特殊处理过程;可鉴别的酶种类丰富;对菌种无毒无害;可持续培养;灵敏可靠;简单快速;成本低;在基因克隆和表达过程中便于挑取表达目的蛋白的单菌落,避免传统方法中需加溶液在平板上造成的菌落间污染和死亡;应用范围广,改变了传统方法的限制。这种便利的筛选条件,使糖苷水解酶基因成为基因工程操作中一类标记基因成为可能。

本实验证实,曲里苯蓝染色法适用于多种聚合度较高和均一的多糖底物,由于材料来源问题,本实验采用了一些常

见的多糖为实验材料,本方法的适用范围应该更广。

### 参 考 文 献

- [1] Hankin L, Anagnostakis SL. Solid media containing carboxymethyl-cellulose to detect Cx cellulase activity of microorganisms. *J Gen Microbiol*, 1977, **98**: 109 - 115.
- [2] Kennedy L, Sutherland IW. Gellan lyases-novel polysaccharide lyases. *Microbiology*, 1994, **140**: 3007 - 3013.
- [3] Castro GR, Baigori MD, Sineriz F. A plate technique for screening of unulin degrading microorganisms. *J Microbiol Methods*, 1995, **22**: 51 - 56.
- [4] McCleary BV. Soluble, dye-labelled polysaccharides for the assay of endohydrolases. *Methods Enzymol*, 1988, **160**: 74 - 86.
- [5] Teather RM, Wood PJ. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from bovine rumen. *Appl Environ Microbiol*, 1982, **43**: 777 - 780.
- [6] 谭秀华, 武玉永, 马立新, 等. 耐碱性甘露聚糖酶基因的克隆及其在毕赤酵母中的表达. *微生物学报*, 2005, **45**(4): 543 - 546.
- [7] 马向东, 马立新, 薛征峰, 等. 一种鉴定  $\alpha$ -淀粉酶基因活性及其产生菌的新方法. *华中农业大学学报*, 2000, **19**(5): 456 - 460.
- [8] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1992.

## A new plate method for screening of polysaccharide-degrading enzymes and their producing microorganisms

MA Xiang-dong<sup>1</sup>, KE Tao<sup>2</sup>, XIONG Lan<sup>1</sup>, YAN Hong<sup>1</sup>, MA Li-xin<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> College of Life Science, Hubei University, Wuhan 430062, China)

(<sup>2</sup> Nan Yang Normal University, Nanyang 473061, China)

**Abstract:** A plate assay based on the formation of haloes on Petri dishes, containing the trypan blue dye and polysaccharides as substrates, provides a specific, reliable and rapid detection of corresponding polysaccharide degrading enzymes and their producing microorganisms. A blue complex was formed by mixing trypan blue and polysaccharides as substrates. It has been proved by testing three strains that the trypan blue was neither harmful to microorganisms nor enzymes and could stand the normal sterilization. It's optimum concentration was from 0.005 % to 0.01 % (W/V). It do not need to prepare dye-labelled polysaccharides, so is a money and time-consuming method. The sensitivity of trypan blue method was the same as traditional method and it has potential for increasing the efficacy of screening of microorganisms, utilizing different polysaccharides, especially for large-scale searching programs, such as screening of large numbers of natural samples and engineering bacteria. Using this method, polysaccharide-degrading enzyme genes also has potential of as a new kind of marker gene in gene engineering techniques. According to the result, this method is suitable for detecting cellulase, amylase, pullulanase and mannase, but not suitable for detecting xylanase and inulinase.

**Keywords:** plate assay; polysaccharide-degrading enzyme; trypan blue; screening method