

大枣炭疽病菌 ZJ01 菌株的分离鉴定及纤维素酶活性分析

朱姗颖¹, 何华纲², 王文兵^{3*}

(1. 江苏大学环境学院, 镇江 212013; 2. 江苏大学食品与生物工程学院, 镇江 212013;

3. 江苏大学生命科学研究院, 镇江 212013)

摘要: 从腐烂大枣中筛选到 1 株产纤维素酶的菌株 ZJ01, 利用 ITS 序列进行分子鉴定, 该菌株属于围小丛壳 (*Glomerella cingulata*), 为大枣炭疽病菌。对菌株 ZJ01 所产羧甲基纤维素酶 (CMCase)、滤纸酶 (FPase) 和 β -葡萄糖苷酶 (BG) 等 3 种纤维素酶的最适 pH 值、最适反应温度进行了分析, 并比较了不同 pH 值、温度、金属离子等对 3 种纤维素酶活性的影响。采用 CMC-SDS-PAGE 技术对 CMC 酶进行活性染色, 发现 3 个透明条带, 分子量大小在 31.0~42.7 ku 之间, 结果表明该菌种能分泌 3 种类型的内切纤维素酶。

关键词: 大枣炭疽病菌; 纤维素酶; 酶学性质; 活性染色

中图分类号: Q936

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2011)06-0827-04

Isolation, characterization of *Glomerella cingulata* strain ZJ01 and activity analysis of cellulases

ZHU Shan-ying¹, HE Hua-gang², WANG Wen-bing³

(1. School of Environment, Jiangsu University, Zhenjiang 212013;

2. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013;

3. Institute of Life Sciences, Jiangsu University, Zhenjiang 212013)

Abstract: A fungus strain ZJ01 producing cellulases was isolated from rotted Chinese date. This strain was identified as *Glomerella cingulata* by molecular biological method according to ITS (internal transcribed spacer) sequence. The optimum pH value and temperature of cellulases including endoglucanase (CMCase), exoglucanase (FPase) and β -glucosidase (BG) were studied. Effects of different pH, temperature and metal ions on the activities of the three cellulases were also analyzed. Activity staining of CMCase were performed after CMC-SDS-PAGE. Three bands were observed and their molecular weights were between 31.0 ku and 42.7 ku. These results indicated that the ZJ01 strain could secret three different types of endoglucanases.

Key words: *Glomerella cingulata*; cellulases; enzymatic properties; activity staining

纤维素是地球上最丰富的可再生生物质资源, 但绝大部分尚未被人类利用, 仅 11%用于农作物产品、饲料、造纸等方面。因此, 纤维素的开发和利用对于解决环境污染和能源危机等问题具有重要意义^[1]。由内切葡聚糖酶 (简称 CMC 酶)、外切葡聚糖酶 (FP 酶) 和 β -葡萄糖苷酶 (BG) 等纤维素酶参与的生物降解是利用纤维素的有效途径之一。自然界的许多微生物都能产生纤维素酶, 如细菌、放线菌、真菌等。目前纤维素酶的开发与研究主要集

中于木霉、曲霉、青霉等腐生性真菌^[2], 而对植物病原真菌所产纤维素酶的研究较少。本实验室从腐烂的大枣中筛选到 1 株能产纤维素酶的真菌, 利用分子生物学技术对其进行了鉴定, 并对该菌株所产纤维素酶的酶学性质进行了初步研究, 利用 CMC-SDS-PAGE 及活性染色技术分析 CMC 酶的种类。

收稿日期: 2011-07-21

基金项目: 江苏省普通高校研究生科研创新计划 (CX09B_211Z) 资助。

作者简介: 朱姗颖, 女, 博士, 讲师。

* 通讯作者: 王文兵, 男, 博士, 研究员。E-mail: wenbingwang@ujs.edu.cn

1 材料与方 法

1.1 菌株的分离纯化

将腐烂的大枣捣碎，悬浮于 99 mL 无菌水，再逐步稀释成 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} 倍。各吸取 1 mL 于装有 50 mL 增殖培养基^[3]的 250 mL 三角瓶中，28℃ 恒温摇床上 $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养 3 d。将培养物涂布于 CMC-刚果红筛选培养基^[3]，置于 28℃ 恒温箱培养 7 d，将形成透明圈的单菌落接种到 CMC-刚果红筛选培养基上进一步纯化。

1.2 菌株的分子鉴定

采用 SDS-CTAB 法提取真菌基因组 DNA^[4]。ITS (Internal Transcribed Spacer) 序列的扩增使用通用引物：

ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')^[5]，PCR 热循环条件为：95℃，3 min；94℃，30 s，60℃，40 s，72℃，60 s，32 个循环；72℃，10 min。经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测后，PCR 产物连入 pMD18-T 载体，转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞，将所获阳性克隆送上海生工生物工程有限公司测序。DNA 序列同源性比较采用 BLAST 软件，进化树的构建采用 MEGA3.1 软件。

1.3 纤维素酶活性的测定

纯化的菌落经产酶培养基^[2]发酵后，离心收集上清液，加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 粉末使之达到 90% 饱和度，过夜沉淀，高速离心后弃上清液，将沉淀物溶于 $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液 (pH 6.0)，稀释至适当浓度后作为粗酶液。采用 DNS 法^[6]测定羧甲基纤维素酶 (CMCase) 活性和滤纸酶 (FPase) 活性，pNPG 法^[7]测定 β -葡萄糖苷酶 (BG) 活性。试验设置 3 个重复。

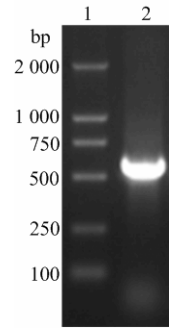
1.4 CMC 酶的活性染色

将粗酶液分别稀释 100 倍和 1 000 倍，与 $2\times\text{SDS}$ 加样缓冲液 ($0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 6.8, $0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT, 4% SDS, 0.2% 溴酚蓝, 20% 甘油) 1:1 混合，95℃ 加热 3 min，冰上骤冷。取 15 μL 样品用于 CMC-SDS -PAGE (0.1% CMC, 0.1% SDS, 10% 丙烯酰胺, 0.33% 甲叉双丙烯酰胺) 分析。用复性液 ($0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 7.0, 1% Triton-X 100) 将凝胶浸洗 3 次，每次 10 min，将凝胶浸泡在 $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 7.0) 中，37℃ 过夜复性。用 0.5% 刚果红对凝胶染色 15 min， $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 脱色 15 min，再用 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl 处理 0.5 min^[8]。照相后反色处理。

2 结果与分析

2.1 ZJ01 菌株的分离和鉴定

以腐烂大枣为材料，利用 CMC-刚果红培养基作为筛选培养基，筛选到 1 株能形成透明圈的真菌，命名为 ZJ01 菌株。通过 PCR 技术扩增该菌株的 ITS 区，获得 1 条约 600 bp 条带 (图 1)。测序结果表明，该 DNA 片段长度为 598 bp，在 GeneBank 数据库中的登录号为 FJ200360。Blast 分析显示，该序列与围小丛壳 (*G. cingulata*) ZE0439 菌株和 P013 菌株的 ITS 区序列完全一致。利用 ITS 序列构建进化树，发现 ZJ01 菌株与围小丛壳菌亲缘关系最近 (图 2)。因此将 ZJ01 菌株鉴定为围小丛壳 (*G. cingulata*)。



1. DNA Marker; 2. PCR 产物; 1. DNA Marker; 2. PCR product

图 1 ZJ01 菌株的 ITS PCR 产物

Figure 1 PCR product of ITS sequence of the ZJ01 strain

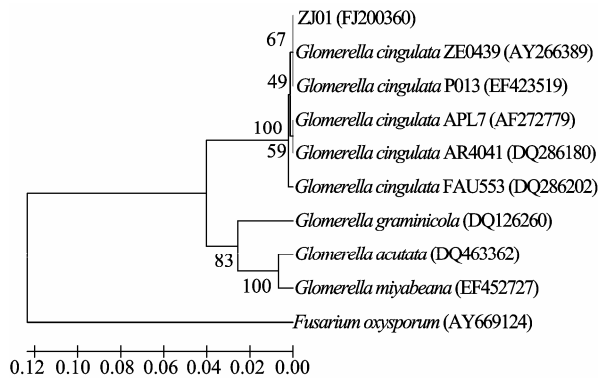


图 2 基于 ITS 序列的进化树

Figure 2 Phylogenetic tree based on ITS sequences

2.2 纤维素酶的最适 pH 值和最适反应温度

将缓冲液调成不同 pH 值 (3~9) 或在不同温度 (30~80℃) 下测定 CMC 酶、FP 酶和 β -葡萄糖苷酶的活性，分别以酶活最高者为 100%，计算各种酶的相对酶活。结果显示，在柠檬酸缓冲体系中，CMC 酶的最适 pH 值约为 5.5，FP 酶的最适 pH 值

有两个峰值, 分别约为 pH 6.0 和 pH 8.0 (图 3); 两者的最适反应温度分别为 50°C 和 60°C。在柠檬酸-NaH₂PO₄ 缓冲体系中, β-葡萄糖苷酶的最适 pH 值约为 5.5, 最适反应温度约为 65°C (图 4)。

2.3 pH 值和温度对纤维素酶活性的影响

将粗酶液在不同 pH 值 (3~10) 的缓冲液中放置 1 h 后立刻调回原 pH 值, 或在不同温度 (30~80 °C) 下放置 1 h 后立刻冰上冷却, 用于相关酶活的测定。结果表明, 在 pH 3~9 之间, CMC 酶和 FP 酶都显示了较高的稳定性, 且都有多个峰值出现。其中 CMC 酶在 pH 4.0、pH 6.0 和 pH 8.0 处各有 1 个峰值, FP 酶在 pH 6.0 和 pH 9.0 处各有 1 个峰值。β-葡萄糖苷酶在 pH 6.0~9.0 之间也能保持较高酶活 (图 5)。CMC 酶在 30~50°C 范围内较稳定, 温度高于 50°C 时酶活急剧下降, FP 酶在 30~40°C 范围内较稳定, 温度高于 40°C 时酶活急剧下降。β-葡萄糖苷酶在 20~40°C 之间较稳定 (图 6)。

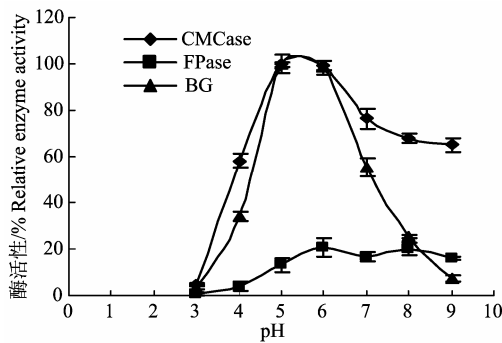


图 3 最适 pH 值
Figure 3 The optimum pH

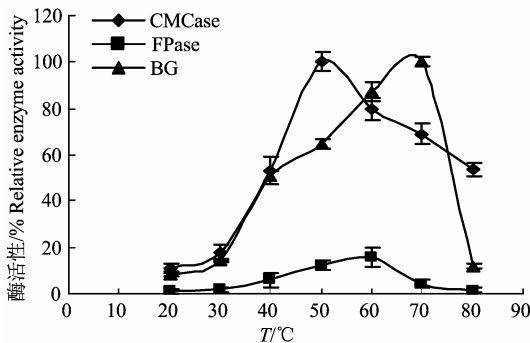


图 4 最适反应温度
Figure 4 The optimum temperature

2.4 金属离子对纤维素酶活性的影响

在缓冲液中分别加入终浓度为 10 mmol·L⁻¹ 的各种金属离子 (Mg²⁺、Zn²⁺、Fe³⁺、Al³⁺、Cu²⁺、Co²⁺、

Ca²⁺、Na⁺、K⁺), 测定纤维素酶的活性。结果表明, Mg²⁺和 Ca²⁺均能激活 CMC 酶, 激活率分别为 5% 和 10%; Co²⁺、Fe³⁺和 Al³⁺均能抑制 CMC 酶, 分别可抑制 15%、51.7%和 86.6%的酶活。Mg²⁺、Ca²⁺、Cu²⁺和 K⁺能不同程度地激活 FP 酶, 其中 Ca²⁺能使 FP 酶活增加 100%; Fe³⁺、Al³⁺、Zn²⁺和 Na⁺能不同程度地抑制 FP 酶, 其中 Fe³⁺和 Al³⁺能完全抑制 FP 酶活。Mg²⁺、Zn²⁺、Fe³⁺、Cu²⁺、Ca²⁺能不同程度地激活β-葡萄糖苷酶, 而 Al³⁺、Co²⁺能部分抑制其活性 (图 7)。

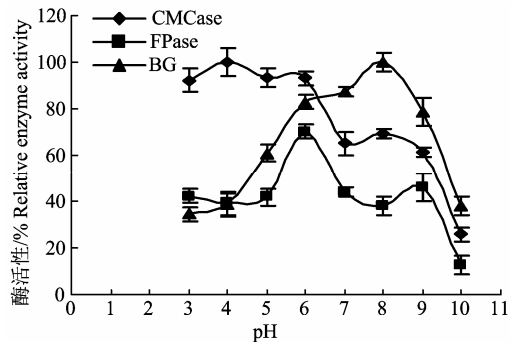


图 5 pH 值对酶活的影响
Figure 5 Effects of pH on enzyme activity

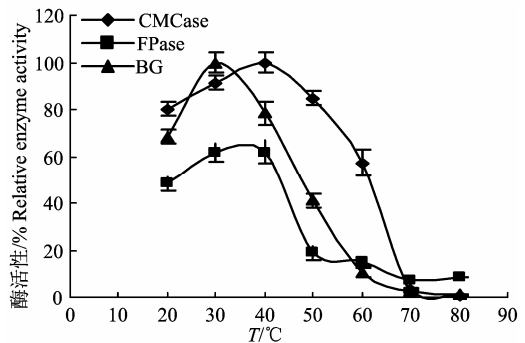


图 6 温度对酶活的影响
Figure 6 Effects of temperature on enzyme activity

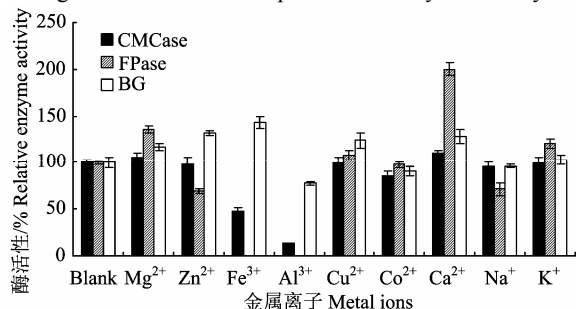
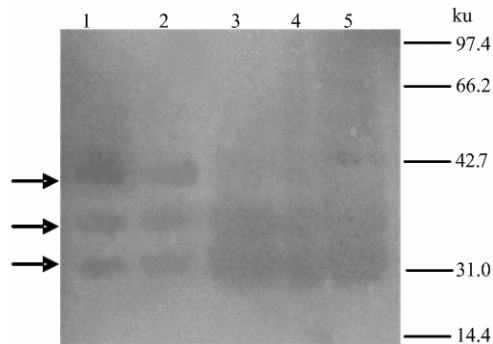


图 7 金属离子对酶活的影响
Figure 7 Effects of metal ions on enzyme activity

2.5 CMC 酶的活性染色

在 CMC 酶的 pH 稳定性研究中发现 3 个峰值, 推测这 3 个峰值与 CMC 酶的种类有关。结合 CMC-SDS-PAGE 技术进行 CMC 酶的活性染色分析, 结果表明, 经活性染色的聚丙烯酰胺凝胶中出现 3 个透明条带, 分子量大小在 31.0~42.7 ku 之间 (图 8), 它们代表了不同类型的 CMC 酶, 每种类型的 CMC 酶可能具有特定的 pH 稳定性。



1, 2: 1: 1000 稀释的粗酶液; 3-5: 1: 100 稀释的粗酶液
1, 2: 1: 1000 dilution of crude enzyme; 3-5: 1: 100 dilution of crude enzyme

图 8 CMC 酶活性染色

Figure 8 Activity staining of CMCases

3 讨论

植物细胞壁是病原菌定植的主要障碍之一, 为了穿透细胞壁并利用其降解产物作为营养, 植物病原菌会分泌一系列细胞壁降解酶, 包括纤维素酶、木聚糖酶、多聚半乳糖醛酸酶、果胶酶等^[9], 其中纤维素酶在病原菌的侵染和定植过程中可能起到关键性的作用^[10]。因此, 从植物病原真菌中开发和利用纤维素酶是一个比较有意义的课题^[11], 但至今只有少数实验室从事这方面的工作^[12-13]。本研究从腐烂的大枣中筛选并鉴定出 1 株炭疽病菌, 该菌株能在含有 CMC 的产酶培养基中产生内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶等多种纤维素酶。对酶学性质的研究表明, 大枣炭疽病菌纤维素酶与大多数纤维素酶类似, 最适 pH 为 4.0~6.0, 最适温度为 40~65 $^{\circ}\text{C}$ ^[14], Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 是其激活剂, 而 Fe^{3+} 、 Al^{3+} 则是其抑制剂^[1]。但是, 本研究在分析炭疽病菌纤维素酶的最适 pH 值时发现, FP 酶有两个峰值 (pH 6.0、pH 8.0), 在分析 pH 稳定性时发现, FP 酶有两个峰值 (pH 6.0、pH 9.0), CMC 酶有 3 个峰值 (pH 4.0、pH 6.0、pH 8.0), 推测这种多峰现象可能与大枣炭疽病菌中存在多种外切葡聚糖酶和多种内切葡聚糖酶有关。由于外切葡聚糖酶的作用底物滤纸或

微晶纤维素难以用于 SDS-PAGE 的制备, 本试验仅利用 CMC-SDS-PAGE 技术检测了内切葡聚糖酶 (CMC 酶) 的种类。结果显示, 经活性染色的凝胶中确实存在着 3 个透明条带, 这与 CMC 酶的 pH 稳定性研究的结果一致, 由此推测, pH 稳定性研究中出现的 3 个峰值分别对应了 3 种类型的内切葡聚糖酶, 这可能与植物病原菌对寄主不同 pH 微环境的适应有关。本研究为大枣炭疽病菌纤维素酶的分纯化及鉴定等奠定了基础, 也为从植物病原菌中发掘新的纤维素酶资源提供了依据。

参考文献:

- [1] 陈洪章. 纤维素生物技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 1-47.
- [2] 洪玉梅, 李建中. 利用纤维素酶生产燃料酒精的研究进展[J]. 农村能源科学, 2007, 23(2): 462-464.
- [3] 王淑军, 扬从发, 陈静. 用于降解秸秆的纤维素酶产生菌的筛选研究[J]. 粮食和饲料工业, 2001, 12: 21-23.
- [4] 刘少华, 陆金萍, 朱瑞良, 等. 一种快速简便的植物病原真菌基因组 DNA 提取方法[J]. 植物病理学报, 2005, 35(4): 362-365.
- [5] 赵杰. ITS 序列分析及其在植物真菌病害分子检测中的应用[J]. 陕西农业科学, 2004, 4: 35-37.
- [6] 李日强, 辛小芸, 刘继青. 天然秸秆纤维素分解菌的分离选育[J]. 上海环境科学, 2002, 21 (1): 8-11.
- [7] 车建美, 刘波, 朱育菁, 等. 尖孢镰刀菌中 β -D-葡萄糖苷酶活性测定条件的研究[J]. 江西农业大学学报, 2006, 28 (1): 126-128.
- [8] Park Y, Lim S, Cho S, et al. Characterization of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* LY34 endo-1,4- β -glucanase genes and rapid identification of their gene products[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 241: 636-641.
- [9] Juge N. Plant protein inhibitors of cell wall degrading enzymes[J]. Trends in Plant Science, 2006, 11(7): 359-367.
- [10] Müller U, Tenberge K, Oeser B, et al. Cell, probably encoding a cellobiohydrolase lacking the substrate binding domain, is expressed in the initial infection phase of *Claviceps purpurea* on *Secale cereale*[J]. Mol Plant Microbe Interact, 1997, 10: 268-279.
- [11] Wang H, Jones R. A unique endoglucanase -encoding gene cloned from the phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*[J]. Appl Environ Microbiol, 1995, 61(5): 2004-2006.
- [12] Cohen R, Suzuki M, Hammel K. Processive endoglucanase active in crystalline cellulose hydrolysis by the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*[J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(5): 2412-2417.
- [13] Zhou J, Zheng X, Lan L, et al. Biochemical and molecular characterization of a putative endoglucanase in *Magnaporthe grisea*[J]. Current Genetics, 2008, 53(4): 217-224.
- [14] 闫训友, 刘志敏, 史振霞, 等. 纤维素酶在食品工业中的应用进展[J]. 食品工业科技, 2004(10): 140-142.