

## 微孔板荧光法对土壤糖酶活性的测定研究

张丽莉<sup>1, 2</sup>, 武志杰<sup>1\*</sup>, 陈利军<sup>1</sup>, 李东坡<sup>1</sup>, 马星竹<sup>1, 2</sup>, 史云峰<sup>1, 2</sup>

1. 中国科学院沈阳应用生态研究所, 辽宁 沈阳 110016

2. 中国科学院研究生院, 北京 100039

**摘要** 应用荧光共轭物质作为底物, 将 96 微孔板和荧光检测法结合进行稻麦轮作系统 CO<sub>2</sub> 倍增条件 (FACE) 下土壤两种糖酶 (木聚糖酶和纤维素酶) 活性的测定, 探讨了微孔板结合荧光法测定糖酶活性的可行性。结果表明, 此种方法可以灵敏的检测到土壤稀释液中的糖酶活性, 测定结果重现性较好 (变异系数最大为 4.879%)。与传统的分光光度法相比, 是一种准确、快速、简便的土壤糖酶活性测定方法。CO<sub>2</sub> 倍增条件下土壤木聚糖酶活性高于自然条件, 且在小麦的拔节期, 抽穗期和成熟期及水稻的抽穗期和成熟期显著高于对照 ( $P < 0.05$ ), CO<sub>2</sub> 浓度升高提高作物的生长代谢水平, 进而影响微生物活性造成土壤木聚糖酶活性提高。纤维素酶活性在 CO<sub>2</sub> 倍增条件下未发生显著变化, 说明土壤纤维素酶在短时期内对 CO<sub>2</sub> 增加的响应不显著。

**关键词** 荧光测定; 微孔板; CO<sub>2</sub> 倍增条件; 糖酶活性

**中图分类号**: S154.4 **文献标识码**: A **DOI** 10.3964/j.issn.1000-0593(2009)05-1341-04

### 引言

酶是土壤中生物过程诸如有机质降解、矿化和营养循环的主要催化物质。水解酶决定着所作用底物的分解速率, 由于底物降解后才能被微生物和植物吸收利用, 常常被作为土壤功能的指示者。Kandeler 等<sup>[1]</sup>指出, 酶多样性及相应活性的研究是评价土壤功能多样性的有效方法。土壤酶对环境变化具有很强的敏感性, 因此, 可以作为土壤生物质量的潜在指标<sup>[2]</sup>。

土壤中各种酶活性的测定方法由于底物的自然属性、测定条件、培养时间和检测方法 (分光光度法, 荧光法, 放射性同位素法) 的不同而有差异。目前常用的方法是由 Wilson<sup>[3]</sup>, Tabatabai<sup>[4]</sup>, Gianfreda<sup>[5]</sup> 等所研发, 均为分光光度法, 测试时间较长 (反应体系培养、酶解产物提取等), 操作复杂。荧光法是一种灵敏度较高的物质检测方法<sup>[6]</sup>, 现已应用于诸如湖泊、蒸汽和海洋等酶活性较低的水生态系统酶活性的检测<sup>[7, 8]</sup>。用荧光法检测土壤酶活性是 Femley 等<sup>[9]</sup>最先提出的, 但只阐述了它应用的可能性, Freenan<sup>[10]</sup>使用荧光法对土壤中酶活性进行了测定并阐述其原理。Milja<sup>[11]</sup>应用多功能酶标仪对 96 微孔板内的待测物质同时进行了检测, 由于

荧光法对待测液的需求量较低, 所以将土壤悬液、底物及相应缓冲液置于 96 微孔板内培养, 使酶反应在微孔板内进行而后进行荧光检测, 大大提高了检测效率。本研究应用 96 微孔板, 以荧光物质 4-羟甲基-7-香豆素 (MUB) 共轭物质作为测定底物, 研究稻麦轮作系统 CO<sub>2</sub> 倍增条件 (FACE) 土壤木聚糖酶和纤维素酶活性, 并与传统的分光光度法<sup>[12]</sup>测定木聚糖酶活性进行了比较。

### 1 实验部分

#### 1.1 仪器

Varioskan flash 型多功能酶标仪 (美国 Thermo 公司), 八通道进液器 (比利时 Eppendorf 公司), 培养箱 (日本 EYELA 公司), 分光光度计 (上海尤尼柯公司), 分析天平 (上海精密科学仪器有限公司)。

#### 1.2 供试土壤

稻麦轮作 FACE (free-air carbon dioxide enrichment) 系统平台位于江苏省无锡市安镇镇年余农场 (31°37' N, 120°28' E), 耕作方式为水稻、冬小麦轮作。关于试验区的环境条件及试验地的基本理化性质请参阅文献 [13], 平台共有 3 个 FACE 试验圈和 5 个对照圈, FACE 试验圈保持 CO<sub>2</sub> 浓度比

收稿日期: 2008-01-08, 修订日期: 2008-04-16

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KZCX3-SW-445) 和国家重点基础研究发展计划项目 (2007CB109307) 资助

作者简介: 张丽莉, 女, 1977 年生, 中国科学院沈阳应用生态研究所助理研究员 e-mail: zhanglilisy@yahoo.com.cn

\*通讯联系人 e-mail: wuzhijiesy@yahoo.com.cn

对照圈高  $200 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ , 两试验圈具体设置请参阅文献<sup>[13]</sup>。在冬小麦的生长季内取 4 次样, 取样时间分别为: 越冬期 (1 月 12 日)、拔节期 (3 月 8 日)、抽穗期 (4 月 12 日) 和成熟期 (6 月 3 日); 在水稻的生长季取四次样, 取样时间分别为: 分蘖期 (7 月 13 日)、拔节期 (8 月 10 日)、抽穗期 (8 月 27 日) 和成熟期 (10 月 28 日); 取样深度:  $0 \sim 10 \text{ cm}$ 。将采取的土壤样品在塑料袋中混匀后放置于冰桶中, 带回实验室后放置于  $4^\circ\text{C}$  冰箱中保存, 进行酶活性的测定。

### 1.3 试剂

木聚糖酶、纤维素酶的底物分别为 4-MUB-7- $\text{D}$  木糖苷; 4-MUB- $\text{D}$  纤维二糖苷, 标准品 MUB 及两种底物均购于 Sigma-Aldrich 公司; 分光光度法测定木聚糖酶的底物为木聚糖, 标准物葡萄糖, 二者均购于上海生化试剂公司。其他试剂均为分析纯。

### 1.4 荧光法测定酶活性<sup>[11]</sup>

(1) 原理: 4 羟甲基-7 香豆素 (MUB) 在  $365 \text{ nm}$  波长处激发, 能在  $460 \text{ nm}$  处检测到荧光, 它与某些物质 (例如  $\text{D}$  木糖和  $\text{D}$  纤维二糖) 结合荧光特性消失, 通过酶的水解作用 MUB 释放出来, 通过检测荧光量来表征酶活性。

(2) 步骤:  $4.0 \text{ g}$  鲜土使用  $200 \text{ mL } 0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $\text{pH } 5.5$ ) 的醋酸缓冲液旋涡振荡器混匀。在振荡条件下取  $100 \mu\text{L}$  土壤悬液加入 96 孔板,  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  底物  $100 \mu\text{L}$  ( $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $1 \text{ mL}$  乙二醇甲醚溶解, 而后蒸馏水定容至刻度), 另外, 作无底物对照 ( $100 \mu\text{L}$  土壤悬液 +  $100 \mu\text{L}$  水), 无土壤对照 ( $100 \mu\text{L}$  底物 +  $100 \mu\text{L}$  水)  $30^\circ\text{C}$  振荡培养 3 h 后, 加入  $100 \mu\text{L } 2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaOH 进行荧光测定。荧光测定使用 Varian flash 型多功能酶标仪, 激发光波长  $365 \text{ nm}$ , 测定波长  $470 \text{ nm}$ 。测定处理和对照分别做 4 次重复。

(3) 标准曲线: 使用  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{pH } 5.5$  醋酸缓冲液制备浓度为  $0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.25$  和  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  MUB 标准液, 测定时向孔中加入  $100 \mu\text{L}$  此系列溶液和  $100 \mu\text{L}$  水,  $100 \mu\text{L } 2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaOH 后进行荧光测定, 此系列溶液中含有 MUB  $0, 1, 5, 10, 25, 50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 标准曲线每个点 3 次重复。

### 1.5 传统方法 (分光光度法)<sup>[12]</sup>

(1) 原理: 木聚糖在木聚糖酶作用下生成还原糖 (葡萄

糖), 利用比色法测定还原酶的量代表木聚糖酶活性。

(2) 步骤: 称  $5 \text{ g}$  鲜土 3 份, 置于 3 支  $100 \text{ mL}$  三角瓶中。在其中两支三角瓶中加入  $15 \text{ mL}$  乙酸缓冲液和  $1.2\%$   $15 \text{ mL}$  木聚糖溶液 (配制方法列于步骤之后), 余下的一只中只加入  $15 \text{ mL } 2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  乙酸缓冲液 (作对照),  $50^\circ\text{C}$  培养 24 h 后过滤。吸取  $0.5 \text{ mL}$  滤液于  $20 \text{ mL}$  试管中, 用蒸馏水稀释并定容。吸取  $1 \text{ mL}$  稀释液于试管中, 加入  $1 \text{ mL}$  试剂 A、 $1 \text{ mL}$  试剂 B, 塞上胶塞混匀。在沸水浴中加热  $15 \text{ min}$ , 然后在室温水浴中冷却  $5 \text{ min}$ , 加入  $5 \text{ mL}$  试剂 C, 混匀后在室温条件下显色  $60 \text{ min}$ 。显色后  $30 \text{ min}$  内在  $690 \text{ nm}$  条件下比色。底物 (木聚糖) 溶液: 称  $12 \text{ g}$  木聚糖于  $1000 \text{ mL}$  容量瓶中, 用  $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{pH } 5.5$  的乙酸缓冲液制成悬液后定容。

试剂 A:  $16 \text{ g}$  无水碳酸钠和  $0.9 \text{ g}$  氰化钾于  $1 \text{ L}$  容量瓶中, 用蒸馏水溶解后定容。

试剂 B: 称  $0.5 \text{ g}$  铁氰化钾于  $1 \text{ L}$  容量瓶中, 用蒸馏水溶解后定容。

试剂 C:  $1.5 \text{ g}$  硫酸铁铵、 $1 \text{ g}$  十二烷基硫酸钠于  $1 \text{ L}$  容量瓶中, 加入  $900 \text{ mL}$  蒸馏水和  $4.2 \text{ mL}$  浓硫酸, 在  $50^\circ\text{C}$  条件下溶解, 冷却后定容。

(3) 标准曲线: 吸取  $0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 \text{ mL}$  工作标准液 ( $25 \mu\text{g}$  葡萄糖  $\text{mL}^{-1}$ ) 于试管中, 用蒸馏水补加到  $1 \text{ mL}$ 。其余操作同稀释液显色处理。上述标准分别含葡萄糖  $0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5$  和  $15 \mu\text{g}$ 。

### 1.6 数据处理

采用 Excel 2000 和 SPSS10.0 进行。

## 2 结果和讨论

### 2.1 微孔板荧光法测定木聚糖酶和纤维素酶活性

本试验以荧光物 MUB 共轭物质作为酶活性测定底物, 以 96 微孔板作为反应体系承载物, 通过培养后的 MUB 荧光产生量灵敏的检测出土壤稀释液中的糖酶活性, 测定结果重现性较好, 木聚糖酶活性标准差为  $0.03 \sim 0.96$ , 变异系数最大为  $4.879\%$  (表 1), 纤维素酶活性标准差为  $0.01 \sim 0.09$ , 变异系数最大为  $4.687\%$  (表 2), 无底物对照和无土壤对照去除土壤悬浮颗粒和底物本身产生的荧光干扰。Milja<sup>[11]</sup>在

Table 1 Effects of elevated atmospheric  $\text{CO}_2$  on xylanase activity (fluorescence method)

	小麦				水稻			
	越冬期	拔节期	抽穗期	成熟期	分蘖期	拔节期	抽穗期	成熟期
自然条件	7.31 (0.08)	7.69 a (0.05)	10.10 a (0.35)	9.12 a (0.09)	13.88 (0.34)	17.08 (0.51)	9.98 a (0.03)	9.66 a (0.28)
FACE 条件	8.30 (0.35)	11.32 b (0.46)	13.07 b (0.36)	14.96 b (0.66)	14.14 (0.69)	15.42 (0.62)	14.86 b (0.37)	13.01 b (0.59)

酶活性单位:  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  MUB  $\cdot \text{g}^{-1}$  土  $\cdot 3 \text{ h}^{-1}$ , 不同字母代表酶活性差异显著 ( $P < 0.05$ )

Table 2 Effects of elevated atmospheric  $\text{CO}_2$  on cellulose activity (fluorescence method)

	小麦				水稻			
	越冬期	拔节期	抽穗期	成熟期	分蘖期	拔节期	抽穗期	成熟期
自然条件	2.01 (0.03)	1.28 (0.06)	0.55 (0.01)	2.45 (0.04)	2.45 (0.09)	2.53 (0.06)	0.71 (0.03)	1.80 (0.07)
FACE 条件	1.30 (0.04)	1.14 (0.05)	0.86 (0.02)	2.42 (0.08)	2.27 (0.08)	2.35 (0.09)	0.37 (0.01)	1.11 (0.05)

酶活性单位:  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  MUB  $\cdot \text{g}^{-1}$  土  $\cdot 3 \text{ h}^{-1}$

进行荧光检测之前将生成物 MUB 提取以后测定, 其研究结果证明 MUB 的提取率较低, 不能进行荧光物质的检测, 本研究在微孔板中直接进行荧光物质含量测定, 避免提取过程所产生的损失。Darrah<sup>[14]</sup>在 1986 年的研究证明 MUB 进行荧光检测时不会被土壤所吸附, 保证了测定结果的真实可靠。

由表 1 可知, 随小麦生育的进行, 自然条件和 CO<sub>2</sub> 浓度增高土壤木聚糖酶活性均呈现上升的趋势。小麦的越冬期, 自然条件和 CO<sub>2</sub> 浓度增高土壤木聚糖酶活性基本相同, 而随着小麦生育期的推进, CO<sub>2</sub> 浓度增高时酶活性上升幅度比自然条件下上升的大, 后 3 个时期 CO<sub>2</sub> 浓度增高酶活性高于自然条件, 且差异显著 ( $p < 0.05$ )。对于水稻而言随水稻生育的进行, 两种条件下的土壤木聚糖酶活性在水稻的营养生长时期呈现上升趋势, 而在生殖生长时期呈现下降的趋势, 在水稻生长的大部分时期 (拔节期除外) CO<sub>2</sub> 浓度增高土壤木聚糖酶活性高于自然条件, 差异显著性分析表明在水稻的抽穗期和成熟期 CO<sub>2</sub> 浓度增高酶活性显著高于自然条件。由于大气 CO<sub>2</sub> 浓度增加可提高植物生长代谢水平, 使 C 的利用效率提高, C 输入的增加提高了微生物对能量的利用, 因而提高了微生物的活性, 造成 CO<sub>2</sub> 增加时酶活性高于自然条件。

从表 2 可知, 在小麦的整个生育期内, 自然条件和 CO<sub>2</sub> 浓度增高土壤纤维素酶活性呈现先降低后升高的趋势。整体

上看, FACE 条件比自然条件酶活性低 (抽穗期除外), 但各个时期两处理间无显著差异。而在水稻的整个生育期内, 自然条件和 CO<sub>2</sub> 浓度增高土壤纤维素酶活性都在水稻的分蘖期和拔节期基本不变, 而在抽穗期和成熟期下降, 并均在抽穗期降至最低, 在水稻生长的各个时期, CO<sub>2</sub> 浓度增高土壤纤维素酶活性低于自然条件, 但各个时期两处理间差异不显著, 由于此 FACE 平台试验设置时间较短, 其对土壤中纤维素酶活性的影响需要长期试验进行确认。

## 2.2 分光光度法对木聚糖酶活性的测定及与荧光法的比较

应用传统的分光光度法对土壤木聚糖酶活性的测定结果见表 3。由于测定底物的不同及反应体系和测定步骤的差异, 土壤木聚糖酶活性在数值上与荧光法不同, 但比较表 1 和表 3 中的数据发现, 使用荧光法和分光光度法所得测定结果的变化趋势一致, 即在水稻的整个生育期内, 不论在自然条件亦或 FACE 条件酶活性均随生育期的进行而提高, 在 FACE 条件下其活性提高更快, 在小麦的拔节期、抽穗期和成熟期 FACE 条件酶活性显著高于自然条件 ( $P < 0.05$ ); 在水稻的整个生育期内, 木聚糖酶活性在营养生长时期升高, 而在生殖生长时期降低的趋势, 且在水稻的抽穗期和成熟期 FACE 条件下酶活性显著高于对照 ( $P < 0.05$ )。

Table 3 Effects of elevated atmospheric CO<sub>2</sub> on xylanase activity (spectrophotometric method)

	小麦				水稻			
	越冬期	拔节期	抽穗期	成熟期	分蘖期	拔节期	抽穗期	成熟期
自然条件	2.48 (0.17)	3.07a(0.10)	5.33 a(0.16)	6.47 a(0.29)	7.45 (0.22)	7.84 (0.44)	4.82 a(0.15)	4.15 a(0.12)
FACE 条件	3.29 (0.15)	6.58b(0.14)	8.55 b(0.34)	10.42 b(0.15)	8.45 (0.22)	9.62 (0.07)	8.72 b(0.42)	8.43 b(0.42)

酶活性单位:  $\mu\text{g葡萄糖} \cdot \text{g}^{-1}\text{土} \cdot 24 \text{h}^{-1}$

Table 4 Comparison between microplate fluorimetric assay and spectrophotometric method

微孔板荧光法	分光光度法
产物	
荧光法检测	分光光度法检测
激发波长 365 nm, 检测波长 460 nm	吸光度 690 nm
MUB 荧光检测受 pH 影响	产物吸光度受 pH 影响
高敏感性	低敏感性
测定	
土壤以溶液形式加入 (量少)	土壤以固体形式加入 (量大)
底物需要量小 ( $\mu\text{L}$ )	底物需要量大 (mL)
反应体系培养时间短 (3 h)	反应体系培养时间长 (24 h)
底物难溶解	底物易溶解
可以在反应体系中直接测定	需要终止反应并在测定前提取产物, 且显色后必须在规定时间内完成测定
96 孔数据可以同时得到 (15 s)	使用比色杯 $12 \text{个} \cdot \text{min}^{-1}$
微孔板制备及测定约 6 h	测试准备, 培养产物提取和检测 > 30 h
微孔板, 进液器枪头使用后即丢弃	玻璃器皿用后清洗
其他	
分析仪器昂贵 (荧光酶标仪, 多通道吸液器, 微孔板)	分析成本低
底物需要量小, 价格较高	底物需要量大, 价格便宜

传统方法对酶活性的检测需要较大的工作量, 包括试剂配制、反应体系培养 (24 h) 及酶解产物的提取等过程 (分光光度法和荧光法的比较列于表 4), 而应用微孔板进行酶的

荧光法检测比传统的分光光度法简便, 快速。除本研究所涉及的两种糖酶, 酸性磷酸单酯酶、芳基硫酸酯酶等与 P、S 循环和转化有关的酶同样可以应用荧光法进行检测<sup>[15, 16]</sup>, 其

测定的原理与糖酶活性一样,由此可以推断,这些酶的活性也可应用本文所述方法测定,此推测需要进一步试验验证。

### 3 讨 论

土壤中酶活性受微生物种类,着生植物类型,土壤动物,底物有效性及土壤物理化学性质的影响,在应用土壤酶活性作为土壤功能多样性的指示物时及在进行土壤质量指示

和土壤污染修复研究时,常常需要测定在不同条件下的大量数据来进行支撑和说明<sup>[15]</sup>。另外,酶的催化特性常通过两个动力学参数  $V_{max}$  和  $K_m$  进行表征<sup>[16]</sup>,这两个动力学参数的求取需要测定较多数据(不同底物浓度条件下酶活性,每一底物浓度的测定重复等),应用微孔板结合荧光检测方法对酶活性的测定可提高效率,提供较为便捷有效的办法来进行相关的研究工作。

### 参 考 文 献

- [1] Kandeler E, Kampichler C, Horak O. *Biology and Fertility of Soils*, 1996, 23(3): 299.
- [2] Dick R P. *Defining Soil Quality for A Sustainable Environment* Wisconsin: Soil Science Society of America, Madison, 1994. 107.
- [3] Wilson K, Goulding K H. *A Biologist's Guide to Principles and Techniques of Practical Biochemistry* 3<sup>rd</sup> ed Edward Arnold: Baltimore, 1986. 204.
- [4] Tabatabai M A. *Methods of Soil Analysis, Part 2, Microbiological and Biochemical Properties* Wisconsin: Science Society of America, Madison, 1994. 903.
- [5] Gianfreda L, Bollag J M. *Soil Biochemistry*, vol. 9. New York: Marcel Dekker Inc, 1996. 123.
- [6] ZUO Xiu-jin, WANG Zhen-xin, DAI Xiao-min, et al (左秀锦, 王祯鑫, 戴小敏, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析)*, 2006, 26(6): 1151.
- [7] Marxen J, Schmidt H H. *Hydrobiologia*, 1993, 253(1): 207.
- [8] Sinsabaugh R L, Gollady S W, Linkins A E. *Freshwater Biol*, 1991, 25: 179.
- [9] Femley H N, Walker P G. *Biochemistry Journal*, 1965, 97: 95.
- [10] Freeman C, Liska G, Ostle N J, et al. *Plant and Soil*, 1995, 175: 147.
- [11] Milja V, Sanna K, Mauritz V, et al. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33: 1665.
- [12] Schinner F, Öhlinger R, Kandeler E, et al. *Methods in Soil Biology* Berlin: Springer Verlag, 1996. 174.
- [13] XU Guo-qiang, LI Yang (徐国强, 李 扬). *Chinese Journal of Applied Ecology (应用生态学报)*, 2002, 13(10): 1358.
- [14] Darrah P R, Harris P J. *Plant and Soil*, 1986, 92: 81.
- [15] Nannipieri P, Ceccanti B, Cervelli C. *Soil Biology and Biochemistry*, 1982, 14: 429.
- [16] Marx M C, Wood M, Jarvis S C. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33: 1633.

## A Microplate Fluorimetric Assay for Sacchariase Activity Measurement

ZHANG Li-li<sup>1,2</sup>, WU Zhi-jie<sup>1\*</sup>, CHEN Li-jun<sup>1</sup>, LI Dong-po<sup>1</sup>, MA Xing-zhu<sup>1,2</sup>, SHI Yun-feng<sup>1,2</sup>

1. Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China

2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

**Abstract** With the fluorescent compound conjugates substrates, soil xylanase and cellulose in a free-air carbon dioxide enrichment (FACE) experiment were measured on the base of 96 microplate and fluorescence detection, aiming at testing its feasibility in sacchariase activity measurement. The results show that sacchariase activity can be tested and the data exhibit better repeatability (coefficient of variability 4.879%). Compared with spectrophotometric assay, this method allows a large number of soil samples and/or enzymes to be analyzed in a short time accurately and conveniently. Soil xylanase activity tends to be greater at elevated CO<sub>2</sub> which significantly increases in jointing, heading and ripening stages of wheat and in heading and ripening stages of rice ( $P < 0.05$ ), and the crop metabolizes rapidly under FACE condition and soil microorganisms are affected, which causes elevation of xylanase activity. Compared with ambient CO<sub>2</sub>, soil cellulose activity decreased slightly under elevated CO<sub>2</sub> but there was no significant difference between treatments, indicating the cellulose activity was not influenced intensively in a short time.

**Keywords** Fluorescence detection; Microplate; FACE (free-air carbon dioxide enrichment); Sacchariase activity

\* Corresponding author

(Received Jan. 8, 2008; accepted Apr. 16, 2008)