

文章编号: 100F 1498(2004) 05 0583 07

# 松墨天牛纤维素酶的研究

## I. 纤维素酶性质研究

索风梅<sup>1</sup>, 林长春<sup>1</sup>, 王浩杰<sup>1</sup>, 尹文<sup>2</sup>, 徐天森<sup>1</sup>

(1. 中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400; 2. 浙江省富阳市林业局, 浙江 富阳 311400)

摘要: 以松墨天牛幼虫为实验材料, 研究了其肠道内纤维素酶的组成和酶解动力学特征等。结果表明, 松墨天牛幼虫肠道内有完整的纤维素酶系, 其中以  $C_1$  酶活性最强,  $C_x$  酶次之,  $\beta$ -1, 4 葡萄糖苷酶活性最弱;  $C_1$  酶、 $C_x$  酶和  $\beta$ -葡萄糖苷酶 3 者的最适作用温区分别为 35~ 55、45~ 55、40~ 50  $^{\circ}\text{C}$ , 最适 pH 值分别为 5.0、5.6、5.0;  $C_x$  酶具有最强的热稳定性(65  $^{\circ}\text{C}$ , 2 h),  $C_1$  酶次之(55  $^{\circ}\text{C}$ , 2 h),  $\beta$ -1, 4 葡萄糖苷酶最低(50  $^{\circ}\text{C}$ , 1 h)。此外动力学参数比较揭示,  $C_1$  酶具有最大的  $V_{\max}$  和  $K_m$ , 分别为 1.083 8 和 0.763 2,  $\beta$ -1, 4 葡萄糖苷酶和  $C_x$  酶分别具有最小的  $K_m$ (0.183 2) 和  $V_{\max}$ (0.433 9), 但  $\beta$ -葡萄糖苷酶具有最大的酶解初速度(0.593 8)。

关键词: 松墨天牛; 纤维素酶; 组成; 性质; 动力学特征

中图分类号: S763 文献标识码: A

松墨天牛(*Monochamus alternatus* Hope), 又名松褐天牛, 幼虫主要在树干和枝条的韧皮部及木质部蛀食危害。在松材线虫疫区, 它还是松材线虫病害的主要携带者和传播者; 因此, 有说“松墨天牛已成为我国南方广大松林最具危险性的天牛”<sup>[1]</sup>。天牛具有较完善的保护机制, 尤其是其幼虫期长, 活动较隐蔽, 因此传统的防治方法往往效果不佳。通过诸多防治措施, 虽然在一定程度上遏制了松墨天牛成灾蔓延的速度, 但没有从根本上扭转其猖獗危害的局面, 严重发生的趋势尚未得到有效控制。

天牛主要以林木韧皮部和木质部为食物, 通过消化其中纤维素获得养分, 而纤维素酶是其肠道内消化纤维素的重要消化酶类。研究松墨天牛消化道纤维素酶的性质和组分相关内容, 对于阐明天牛消化生理、寻求防治天牛的新方法都具有重要的理论和实践意义。有关纤维素酶在微生物(真菌和细菌)方面研究得较为深入<sup>[2]</sup>, 而在天牛上的研究较少, 对于松墨天牛纤维素酶的系统研究几乎还属空白。鉴于此, 本研究以松墨天牛为对象, 围绕松墨天牛肠道纤维素酶性质、天牛取食特征、金属离子等对纤维素酶活性的影响及纤维素酶随松墨天牛幼虫生长发育的变化动态进行比较系统的研究, 本文报道其中的纤维素酶性质部分。

收稿日期: 2003 09 16

基金项目: 浙江省自然科学基金项目“松墨天牛消化酶演变规律和抑制效应的研究”(303318)

作者简介: 索风梅(1977—), 女, 河北邯郸人, 中国林科院森林保护学专业硕士研究生。

# 1 材料与方 法

## 1.1 材料来源

1.1.1 幼虫来源 马尾松 (*Pinus massoniana* L.) 虫害木产于浙江省富阳市, 于 2002 年 8 月从虫害木段中收集个体均匀、龄期一致的松墨天牛大龄幼虫供试( 头壳宽度 0.342~ 0.418 cm, 于木质部中取食)。

1.1.2 试剂来源 羧甲基纤维素钠为实验试剂(LR), 中国医药(集团)上海化学试剂公司产; 水杨素, 进口分装, 由上海化学试剂采购供应站分装厂生产; 微晶纤维素由上海化学试剂公司生产。

## 1.2 纤维素酶液的制备

取松墨天牛幼虫 5 头, 室温饥饿 1 d 后称其质量。按每个虫体 5 mL 乙酸-乙酸钠缓冲液 (pH 值 4.6,  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 进行冰浴匀浆, 迅速在  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $15\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  条件离心匀浆液 10 min。取上清液作为测试用酶液, 贮于  $-30 \text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中备用。

## 1.3 纤维素酶活性测定

用 DNS 法<sup>[3]</sup>测定纤维素酶的活性。分别以 1% 微晶纤维素(MC)、1% 羧甲基纤维素钠(CMG-Na) 和 1% 水杨素(Salicin) 作底物测定  $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$  下外切  $\beta$ -1,4 葡聚糖酶( $C_1$  酶)、内切  $\beta$ -1,4 葡聚糖酶( $C_x$  酶) 和  $\beta$ -1,4 葡萄糖苷酶的活性。3 种底物均用乙酸-乙酸钠缓冲液(pH 值 4.6,  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 配制。

取上述底物 2 mL、酶液 0.1 mL 混匀, 在  $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴保温 1 h 后, 加入 DNS 显色剂 2 mL, 立即在沸水浴显色 5 min, 流水冷却, 稀释定容至 25 mL。于 490 nm 处测 OD 值, 每处理重复 3 次, 同时设空白对照。以实验条件下单位虫体质量(g)、单位时间(min) 酶促反应生成的还原糖(葡萄糖)量( $\mu\text{mol}$ ) 计算酶活性, 即:  $\mu\text{mol}(\text{葡萄糖}) \cdot \text{g}^{-1}(\text{FW}) \cdot \text{min}^{-1}$ 。

## 1.4 纤维素酶性质测定<sup>[4]</sup>

1.4.1 纤维素酶最适 pH 值的测定 以 pH 值 2.2、2.6、3.2、3.8、4.4、5.0、5.6、6.2、6.8、7.4、8.0 等梯度的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液( $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 配制底物, 同上测定纤维素酶的活性。

1.4.2 纤维素酶最适作用温度 分别以 25、30、35、40、45、50、55、60、70、80、100  $^{\circ}\text{C}$  恒温水浴保温反应液 0.5 h 后进行酶活性测定, 测定方法同上。

1.4.3 热稳定性测定 酶液分别放入 37、50、55、60、65、75、90、100  $^{\circ}\text{C}$  水浴中加热 0.5、1、2 h 后取出, 加入底物再保温 0.5 h。按上述方法测定并比较各个酶的活性。

## 1.5 纤维素酶动力学参数测定

根据 Michaelis-Menten 方程<sup>[3]</sup>, 并参考 Lineweaver-Burk 作图法<sup>[5]</sup> 和樊军等<sup>[6]</sup> 的方法, 测定和计算松墨天牛纤维素酶促反应动力学参数(最大反应速度  $V_{\text{max}}$ 、米氏常数  $K_m$  和初速度  $V_0$ )。分别以 0、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、3.0% 不同浓度梯度的 MC、CMG-Na 和水杨素作底物, 按上述纤维素酶活性测定的方法分别测定  $C_1$  酶、 $C_x$  酶和  $\beta$ -1,4 葡萄糖苷酶的活性。然后以底物浓度  $S$ /酶活性  $V$  对底物浓度作图, 求出截距  $d$  和斜率  $k$ , 由  $d$  和  $k$  的函数意义( $d = K_m / V_{\text{max}}$ ,  $k = 1 / V_{\text{max}}$ ), 进而得到米氏常数  $K_m$  和最大反应速度  $V_{\text{max}}$ , 而  $V_{\text{max}}$  与  $K_m$  之比即为反应初速度( $V_0$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 松墨天牛幼虫纤维素酶的组成和活性差异

松墨天牛幼虫消化道中存在  $C_1$  酶、 $C_x$  酶和  $\beta$ -1,4-葡萄糖苷酶 3 种消化酶组分, 它们构成了完整的消化纤维素的酶系统, 其中  $C_x$  酶和  $C_1$  酶具有相对较高的酶活性,  $\beta$ -1,4-葡萄糖苷酶的活性较小, 它们的酶活性(单位:  $\mu\text{mol}(\text{葡萄糖}) \cdot \text{g}^{-1}(\text{FW}) \cdot \text{min}^{-1}$ ) 大小分别为:  $C_1$  酶(1.585 3) >  $C_x$  酶(1.302 3) >  $\beta$ -1,4-葡萄糖苷酶(1.027 1)。

### 2.2 温度对松墨天牛幼虫纤维素酶活性的影响

图 1 表明, 随着温度的升高, 松墨天牛幼虫体内的纤维素酶活性在一定温度范围内有不断增加的趋势。以纤维素酶的重要组分  $C_1$  酶为例, 随温度的升高该酶的活性变化为:  $0.751\ 6(25\ ^\circ\text{C}) \rightarrow 1.128\ 9(30\ ^\circ\text{C}) \rightarrow 1.302\ 3(35\ ^\circ\text{C}) \rightarrow 1.585\ 3(45\ ^\circ\text{C}) \rightarrow 1.679\ 6\ \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}(\text{FW}) \cdot \text{min}^{-1}(50\ ^\circ\text{C})$ , 但温度升高到一定程度, 纤维素酶的活性开始减弱, 并表现出反应体系的温度越高, 纤维素酶的活性将越小的规律。如  $C_1$  酶的活性与温度上升的变化为:  $1.679\ 6(50\ ^\circ\text{C}) \rightarrow 1.050\ 3(60\ ^\circ\text{C}) \rightarrow 0.767\ 3(80\ ^\circ\text{C}) \rightarrow 0.002\ 8(100\ ^\circ\text{C})$ 。

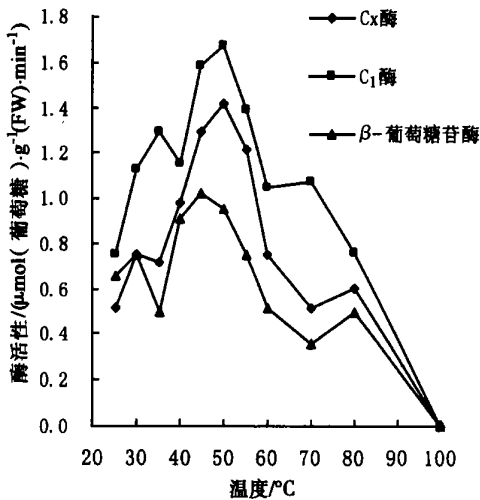


图 1 温度对松墨天牛纤维素酶活性的影响

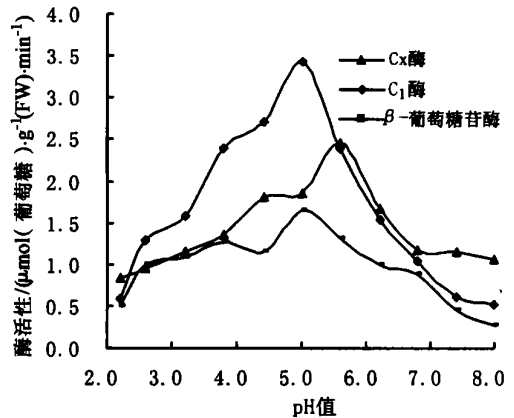


图 2 松墨天牛纤维素酶活性随溶液 pH 值的变化

图 1 还表明, 松墨天牛纤维素酶系 3 种组分的最适作用温度明显不同, 各自具有适宜的作用温区(酶活性均在最适点的 80% 以上)。  $C_1$  酶的适宜温区为  $35 \sim 55\ ^\circ\text{C}$ , 最适作用温度为  $50\ ^\circ\text{C}$ (酶活性为  $1.679\ 6\ \mu\text{mol}(\text{葡萄糖}) \cdot \text{g}^{-1}(\text{FW}) \cdot \text{min}^{-1}$ ), 低于或高于该温度酶的活性都将减小;  $C_x$  酶的适宜温区为  $45 \sim 55\ ^\circ\text{C}$ , 尤其在  $50\ ^\circ\text{C}$  左右具有最强的酶活性( $1.428\ 1\ \mu\text{mol}(\text{葡萄糖}) \cdot \text{g}^{-1}(\text{FW}) \cdot \text{min}^{-1}$ ); 而  $\beta$ -1,4-葡萄糖苷酶的适宜作用温区和最适作用温度分别为  $40 \sim 50\ ^\circ\text{C}$  和  $45\ ^\circ\text{C}$ (酶活性  $1.027\ 1\ \mu\text{mol}(\text{葡萄糖}) \cdot \text{g}^{-1}(\text{FW}) \cdot \text{min}^{-1}$ )。

### 2.3 松墨天牛幼虫纤维素酶活性随溶液 pH 值的变化

酶是生物催化剂, 在本质上是蛋白质, 因此其催化活性受反应体系 pH 值变化的影响。图 2 显示,  $C_x$  酶活性在 pH 值 5.6 左右达到最大( $2.465\ 8\ \mu\text{mol}(\text{葡萄糖}) \cdot \text{g}^{-1}(\text{FW}) \cdot \text{min}^{-1}$ ), 是其最

适 pH 值,但在 pH 值 5.0~5.6 之间均具有较高的酶活性( $1.852\ 5\sim 2.465\ 8\ \mu\text{mol}(\text{葡萄糖})\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})\cdot\text{min}^{-1}$ );相对于  $C_x$  酶,  $C_1$  酶的最适 pH 值稍低些,在 pH 值 5.0 时有最大消化纤维素的能力( $3.425\ 2\ \mu\text{mol}(\text{葡萄糖})\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})\cdot\text{min}^{-1}$ ),但其适宜 pH 值范围相对较宽,为 3.8~5.6(酶活性  $2.387\ 2\sim 3.425\ 1\ \mu\text{mol}(\text{葡萄糖})\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})\cdot\text{min}^{-1}$ ); $\beta$ -1,4 葡萄糖苷酶的最适 pH 值也在 5.0 左右,在该 pH 值时酶的活性为  $1.648\ 1\ \mu\text{mol}(\text{葡萄糖})\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})\cdot\text{min}^{-1}$ ,比  $C_x$  酶、 $C_1$  酶的最大活性均小,但是其适宜 pH 值范围比前两者都宽(在 2.6~6.2 之间),低于或高于这幅度,其酶活性都迅速下降。

## 2.4 松墨天牛幼虫纤维素酶的热稳定性

经温度梯度 37、50、55、60、65、70、80、100 °C 和时间梯度( $T$ ) 0.5 h、1、2 h 热处理纤维素酶液后,分别测定其组分酶的活性。表 1 是松墨天牛幼虫纤维素酶的重要组分  $C_x$  酶在温度梯度和时间梯度下的酶活性测定值及酶活性下降值(与原酶活性  $T_0$  比较)。从表 1 中可以看出,  $C_x$  酶具有较强的热稳定性,37 °C 下处理 2 h,酶活性变化较小(只下降了 13.02%);50 °C 下加热 2 h,酶活性仅下降 21.89%;55 °C 为  $C_x$  酶活性热稳定性变化的第一转折点,在此温度下处理 1 h,酶活性仅存 65.61%,加热 2 h 后,酶活性下降仅约为原酶活性的 55.61%;65 °C 是  $C_x$  酶活性变化的第 2 转折点,在此温度下处理 2 h,酶活性已很低( $0.134\ 8\ \mu\text{mol}(\text{葡萄糖})\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})\cdot\text{min}^{-1}$ ,只有原酶活性的 17.13%),几乎完全丧失。这也印证了前文  $C_x$  酶的适宜作用温区在 45~55 °C 的结论。

表 1 松墨天牛纤维素酶( $C_x$  酶)的热稳定性

温度/°C	处理时间( $T$ )			
	$T_0$	$T_{0.5}(< T_0/\%)$	$T_{1.0}(< T_0/\%)$	$T_{2.0}(< T_0/\%)$
37	0 786 2	0 735 8(- 6 38)	0 704 4(- 10 39)	0 684 0(- 13.02)
50	0 786 2	0 678 1(- 13.77)	0 673 0(- 14 39)	0 614 0(- 21.89)
55	0 786 2	0 594 3(- 24.39)	0 515 7(- 34 39)	0 437 1(- 44.39)
60	0 786 2	0 547 2(- 30.39)	0 484 3(- 38 39)	0 358 5(- 54.39)
65	0 786 2	0 358 5(- 54.39)	0 272 8(- 65 32)	0 134 8(- 82.87)
70	0 786 2	0 307 3(- 60.87)	0 204 8(- 73 93)	0 114 4(- 85.45)
80	0 786 2	0 201 3(- 74.40)	0 130 1(- 83 46)	0 066 0(- 91.59)
100	0 786 2	0 047 2(- 94.00)	0 047 2(- 94 00)	0 003 1(- 99.58)

注:  $T_0$ 、 $T_{0.5}$ 、 $T_{1.0}$ 、 $T_{2.0}$  分别表示处理时间为 0、0.5、1.0、2.0 h。

与  $C_x$  酶相比,  $C_1$  酶的热稳定性显然差得多。图 3(左)表明,  $C_1$  酶在 37 °C 温度处理 0.5 h 后仍然具有较强的酶活性( $0.987\ 4\sim 0.937\ 5\ \mu\text{mol}(\text{葡萄糖})\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})\cdot\text{min}^{-1}$ ),但是温度上升到 65 °C 以上时酶活性显著减小( $0.750\ 0\sim 0.032\ 6$ )。随着处理时间的延长,该酶的活性急剧下降,经 55 °C 加热 2 h,酶活性只有 0.200 5,只有原酶活性的 19.6%,70 °C 加热 2 h 后酶活性下降到 0.042 8,占原酶活性的 4.19%,活性几乎完全丧失。

$\beta$ -1,4 葡萄糖苷酶的热稳定性和  $C_1$  酶相似,即经 37 °C 处理后酶活性下降不大,在该温度下处理 2 h,酶活性也仅仅下降 23.2%,但在 50 °C 的温度下加热 1 h,酶活性下降 42.9%,处理 2 h 后,酶活性只剩下原来的 37.8%。高于该温度,  $\beta$ -1,4 葡萄糖苷酶即使被处理 0.5 h,酶活性也迅速下降,几乎完全丧失(图 3 右)。

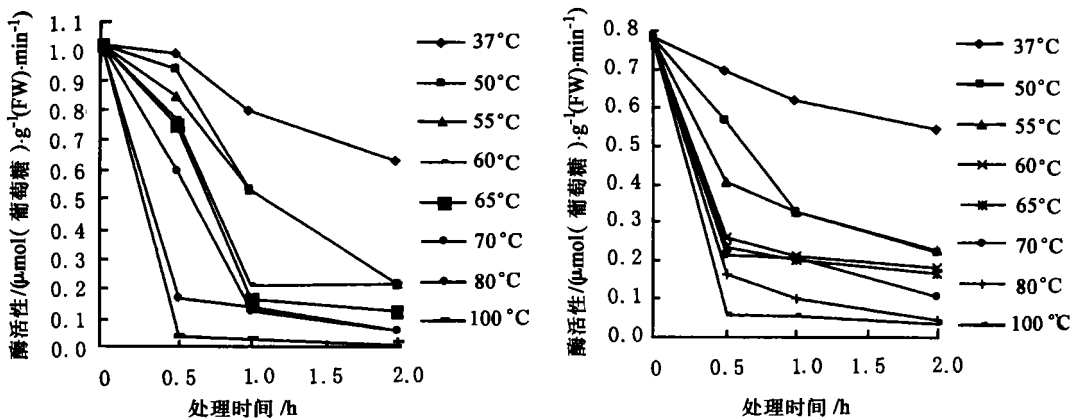


图 3 C<sub>1</sub> 酶(左)和β-葡萄糖苷酶(右)的热稳定性

### 2.5 松墨天牛幼虫纤维素酶的酶解动力学性质

分别将 MC、CMC-Na 和水杨素作底物(配制成不同的浓度梯度)在 45 °C 进行酶促反应,用 DNS 法测定生成的葡萄糖量。结果表明,当底物浓度低时,酶促反应速率与底物浓度成正比;但当底物浓度高到一定程度后,反应速率趋于恒定。这种规律在松墨天牛纤维素酶的 3 种组分酶(C<sub>1</sub> 酶、C<sub>x</sub> 酶和 β-1, 4-葡萄糖苷酶)均有较好的体现,尤其 C<sub>1</sub> 酶的酶促反应速率受底物微晶纤维素(MC)的浓度影响最为明显(图 4)。

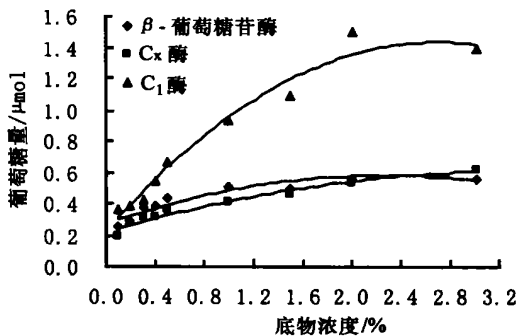


图 4 底物浓度变化对松墨天牛纤维素酶解速度的影响

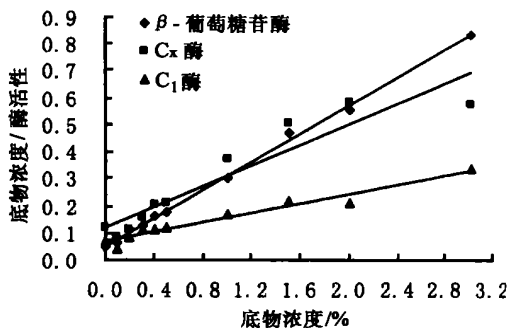


图 5 松墨天牛纤维素酶组分酶的动力学参数

$V_{max}$  和  $K_m$  都是生物酶重要的动力学特征

参数。图 5 和表 2 为参考 Michaelis-Menten 方程计算的松墨天牛纤维素酶的水解动力学参数。在纤维素酶的 3 种组分酶中, C<sub>1</sub> 酶具有最大的  $V_{max}$  ( $1.0838 \mu\text{mol}(\text{葡萄糖}) \cdot \text{g}^{-1}(\text{FW}) \cdot \text{min}^{-1}$ ), 2 倍于 C<sub>x</sub> 酶 ( $0.4339 \mu\text{mol}(\text{葡萄糖}) \cdot \text{g}^{-1}(\text{FW}) \cdot \text{min}^{-1}$ ) 和 β-葡萄糖苷酶 ( $0.7780 \mu\text{mol}(\text{葡萄糖}) \cdot \text{g}^{-1}(\text{FW}) \cdot \text{min}^{-1}$ ), 表明在酶浓度相同条件下, C<sub>1</sub> 酶在底物 MC 饱和时具有最大的反应速率。各组分酶  $K_m$  的大小关系也与  $V_{max}$

表 2 松墨天牛纤维素酶的水解动力学参数

酶类	$V_0$	$V_{max}$	$K_m$
	$(\mu\text{mol}(\text{葡萄糖}) \cdot \text{g}^{-1}(\text{FW}) \cdot \text{min}^{-1})$		
C <sub>x</sub> 酶	0.2733	0.4339	0.6299
C <sub>1</sub> 酶	0.1986	1.0838	0.7632
β-葡萄糖苷酶	0.5938	0.7780	0.1832

规律一样,即  $C_1$  酶( $0.7632 \mu\text{mol}(\text{葡萄糖}) \cdot \text{g}^{-1}(\text{FW}) \cdot \text{min}^{-1}$ ) >  $C_x$  酶( $0.6399 \mu\text{mol}(\text{葡萄糖}) \cdot \text{g}^{-1}(\text{FW}) \cdot \text{min}^{-1}$ ) >  $\beta$ -葡萄糖苷酶( $0.1832 \mu\text{mol}(\text{葡萄糖}) \cdot \text{g}^{-1}(\text{FW}) \cdot \text{min}^{-1}$ ),但是,在相同条件下, $\beta$ -葡萄糖苷酶具有最大的酶解初速度( $0.5938 \mu\text{mol}(\text{葡萄糖}) \cdot \text{g}^{-1}(\text{FW}) \cdot \text{min}^{-1}$ ), $C_x$  酶次之( $0.2733 \mu\text{mol}(\text{葡萄糖}) \cdot \text{g}^{-1}(\text{FW}) \cdot \text{min}^{-1}$ ), $C_1$  酶最小,仅为  $0.1986 \mu\text{mol}(\text{葡萄糖}) \cdot \text{g}^{-1}(\text{FW}) \cdot \text{min}^{-1}$ ,这种关系在图4也有所体现。

### 3 结论与讨论

已有研究表明一些天牛体内具有消化纤维素的完整酶系<sup>[3,7,8]</sup>,能真正消化、利用食物中的纤维素成分。本文结果表明,与桑粒肩天牛相似,松墨天牛肠道内也具有包括  $C_1$  酶、 $C_x$  酶和  $\beta$ -1,4-葡萄糖苷酶等3种组分的完整纤维素酶系,可以消化食物中的纤维素,且3种组分酶活性均较强( $1.0271 \sim 1.5833 \mu\text{mol}(\text{葡萄糖}) \cdot \text{g}^{-1}(\text{FW}) \cdot \text{min}^{-1}$ )。

对松墨天牛幼虫纤维素酶性质的研究发现,纤维素酶活性在一定温度范围内随温度的升高而增强,但超过该温度范围酶的活性将下降;与  $C_x$  酶和  $\beta$ -1,4-葡萄糖苷酶相比, $C_1$  酶有较为广泛的最适作用温区( $35 \sim 55 \text{ }^\circ\text{C}$ ),表明  $C_1$  酶可以在较大温度范围内水解  $\beta$ -1,4-糖苷键,生成纤维二糖。 $\beta$ -1,4-葡萄糖苷酶的适宜 pH 值范围最大,为  $2.6 \sim 6.2$ , $C_1$  酶次之, $C_x$  酶最窄(pH 值  $5.0 \sim 5.6$ )。经温度梯度( $37 \sim 100 \text{ }^\circ\text{C}$ )和时间梯度热处理酶液研究其热稳定性发现,松墨天牛纤维素酶3种组分酶中  $C_x$  酶具有相对较强的热稳定性( $65 \text{ }^\circ\text{C}$ , 2 h),其次为  $C_1$  酶( $55 \text{ }^\circ\text{C}$ , 2 h), $\beta$ -1,4-葡萄糖苷酶的热稳定性最低( $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , 1 h),从比较可以得出: $\beta$ -1,4-葡萄糖苷酶只能在天牛肠道的小范围适宜区域内消化纤维寡糖和纤维二糖。

有关纤维素酶的酶解动力学研究早有报道并建立了其动力学模型<sup>[9,10]</sup>,但由于纤维素酶的酶系构成复杂,各组分酶的底物性质不一,且纤维素酶与纤维素的作用是多相催化反应,因而对其作用机理研究难度较大。通过对松墨天牛纤维素酶各组分酶进行动力学参数的测定,研究发现,当底物浓度较低时,酶促反应速率与底物浓度成正比,底物浓度高到一定程度后,反应速率趋于恒定。比较3种组分酶的酶解动力学参数, $C_1$  酶具有最大的  $V_{\max}$ ( $1.0838 \mu\text{mol}(\text{葡萄糖}) \cdot \text{g}^{-1}(\text{FW}) \cdot \text{min}^{-1}$ ),比  $C_x$  酶( $0.4339 \mu\text{mol}(\text{葡萄糖}) \cdot \text{g}^{-1}(\text{FW}) \cdot \text{min}^{-1}$ )和  $\beta$ -1,4-葡萄糖苷酶( $0.7780 \mu\text{mol}(\text{葡萄糖}) \cdot \text{g}^{-1}(\text{FW}) \cdot \text{min}^{-1}$ )都大;各组分酶  $K_m$  值的大小为: $C_1$  酶( $0.7632 \mu\text{mol}(\text{葡萄糖}) \cdot \text{g}^{-1}(\text{FW}) \cdot \text{min}^{-1}$ ) >  $C_x$  酶( $0.6299 \mu\text{mol}(\text{葡萄糖}) \cdot \text{g}^{-1}(\text{FW}) \cdot \text{min}^{-1}$ ) >  $\beta$ -葡萄糖苷酶( $0.1832 \mu\text{mol}(\text{葡萄糖}) \cdot \text{g}^{-1}(\text{FW}) \cdot \text{min}^{-1}$ )。相同条件下, $\beta$ -葡萄糖苷酶却具有最大的酶解初速度( $0.5938 \mu\text{mol}(\text{葡萄糖}) \cdot \text{g}^{-1}(\text{FW}) \cdot \text{min}^{-1}$ )。

此外,虽然松墨天牛肠道内存在完整的纤维素酶系,但其来源问题却尚未准确定位和证实。笔者曾用选择性培养基对其肠道微生物进行研究,发现松墨天牛肠道微生物数量与取食密切相关,刚羽化尚未取食的松墨天牛肠道内几乎没有微生物的存在,但取食后肠道微生物迅速增加,并在以结晶纤维素为唯一营养来源的培养基中发现了少量的菌落,因此也不能排除肠道微生物在松墨天牛消化纤维素过程中发挥作用,所以松墨天牛纤维素酶的来源问题仍有待于进一步研究,以明确其消化纤维素的机制。

## 参考文献:

- [1] 嵇宝中, 刘曙雯. 天牛防治措施和对策分析[J]. 林业科技开发, 2001, 15(2): 7~ 9
- [2] Klyosov A A. Trends in biochemistry and enzymology of cellulase degradation[J]. Biochemistry, 1990, 29: 10577~ 10585
- [3] Paulson K Z, Kurtz L T. Michaelis constants of urease[J]. Soil Sci Soc Proc, 1970, 34: 70~ 72
- [4] 殷幼平, 程惊秋, 蒋书楠. 桑粒肩天牛纤维素酶的性质研究[J]. 林业科学, 1996, 32(5): 454~ 459
- [5] 北京大学生物系生物化学教研室. 生物化学实验指导[M]. 北京: 人民教育出版社, 1979. 22~ 25
- [6] 樊军, 郝明德. 旱地农田土壤脲酶与碱性磷酸酶动力学特征[J]. 干旱地区农业研究, 2002, 20(1): 35~ 37
- [7] 蒋书楠, 殷幼平, 王中康. 几种天牛纤维素酶的来源[J]. 林业科学, 1996, 32(5): 441~ 446
- [8] Zhang J, Scrivener A M, Slaytor M, et al. Diet and carbohydrase activities in three cockroaches, *Calolampra degans* Roth and Princis, *Geoscaphus dilatatus* Saussure and *Panhdia cribrata* Saussure[J]. Comp Biochem Physiol, 1993, 104A: 155~ 161
- [9] Yong Hyun Lee. Kinetic studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose: Analysis of the initial rate[J]. Biotech Bioeng, 1982, xxiv, 2383~ 2406
- [10] Okazaki M, Yong M. Kinetic studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose: Analytical description of a mechanistic model[J]. Biotech Bioeng, 1978, 20

## Study on the Character of Cellulase in *Monochamus alternatus*

SUO Feng-mei<sup>1</sup>, LIN Chang-chun<sup>1</sup>, WANG Hao-jie<sup>1</sup>, DING Zhong-wen<sup>2</sup>, XU Tian-sen<sup>1</sup>

(1. Research Institute of Subtropical Forestry, CAF, Fuyang 311400, Zhejiang, China;

2. Fuyang Forestry Bureau, Zhejiang Province, Fuyang 311400, Zhejiang, China)

**Abstract:** *Monochamus alternatus* is one of the most perilous wood-boring insect pests in pine plantations in southern China, and the enzyme cellulase plays the major function to digest the ingested woody tissue in its gut. The cellulase extracted from larvae of *M. alternatus* was tested to determine its constitution and kinetic properties in this paper. The results revealed that the longicorn borers had integrated cellulolytic enzyme complex: endo- $\beta$ -1, 4 glucanase ( $C_x$ -ase), exo- $\beta$ -1, 4 glucanase ( $C_1$ -ase) and  $\beta$ -1, 4-glucosidase in their gut, among which the activity of  $C_1$ -ase was the strongest, and  $\beta$ -1, 4-glucosidase the weakest. For  $C_1$ -ase,  $C_x$ -ase and  $\beta$ -1, 4-glucosidase, the optimum temperature range was between 35~ 55 °C, 45~ 55 °C and 40~ 50 °C respectively, while their optimum pH at 5.0, 5.6 and 5.0. Besides,  $C_x$ -ase had the stronger stability to heat, which still had strong activity after being heated at 65 °C for 2 h. After comparison of the kinetic parameters among the cellulases of *M. alternatus*, it was found that  $C_1$ -ase had greater  $V_{max}$  and  $K_m$ , which was 1.083 8 and 0.763 2 respectively, however,  $\beta$ -1, 4 glucosidase had greater relatively muzzle velocity.

**Key words:** *Monochamus alternatus*; cellulose; constitution; kinetic properties