

# 松墨天牛纤维素酶的研究

## II. 离体条件下金属离子对松墨天牛纤维素酶活性的影响

索风梅<sup>1</sup>, 王浩杰<sup>1</sup>, 陈洪宝<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:** 本文研究了  $\text{Cu}^{++}$ 、 $\text{Mn}^{++}$ 、 $\text{Ca}^{++}$ 、 $\text{Pb}^{++}$ 、 $\text{Ag}^{+}$ 、 $\text{Zn}^{++}$ 、 $\text{Na}^{+}$ 、 $\text{Fe}^{++}$  8种金属离子对松墨天牛(幼虫、成虫)消化道纤维素酶活性(离体条件下)的影响。结果表明:不同的金属离子对纤维素酶有不同程度的影响,除  $\text{Fe}^{++}$ 有激活作用外,其它7种金属离子对纤维素酶各组分酶活性在实验所取浓度范围内(0.1~50  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )表现为程度不同的抑制作用,其中  $\text{Cu}^{++}$ 和  $\text{Pb}^{++}$ 的抑制效应最强,这在纤维素酶的组分(Cx酶、 $\beta$ -1,4-葡萄糖苷酶、 $\text{C}_1$ 酶)都有很鲜明的体现,与对照相比较,在不同浓度梯度下使 Cx酶的活性下降 13.19%~99.98%和 42.27%~100%。

**关键词:** 松墨天牛; 离体条件; 金属离子; 纤维素酶系; 酶活性

中图分类号: S718.7 文献标识码: A

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

### II. Effect of Same Ions on the *Monochamus alternatus* Cellulase Activity in Vitro

SUO Feng-mei<sup>1</sup>, WANG Hao-jie<sup>1</sup>, CHEN Hong-bao<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** The effects of eight ions on the *Monochamus alternatus* cellulase activity in vitro were studied in this paper. The results indicated that the activity reduced differently when concentration of ions were added except  $\text{Fe}^{++}$  in experiment conditions. Among which the effects of  $\text{Cu}^{++}$  and  $\text{Pb}^{++}$  were obvious on cellulytic enzyme complex endo- $\beta$ -1,4-glucanase (Cx-ase), exo- $\beta$ -1,4-glucanase ( $\text{C}_1$ -ase) and  $\beta$ -1,4-glucosidase in their gut, and activity had declined by 13.19%~99.98% and 42.27%~100% respectively under different concentration gradients.

**Key words** *Monochamus alternatus*; invitro ions; cellulase; activity

松墨天牛(*Monochamus alternatus* Hope)是我国松树的主要蛀干害虫之一,在松材线虫(*Bursaphelenchus xylophilus* Steiner et Buhner)疫区,它还是松材线虫病的主要携带者和传播者。目前,控制天牛危害的方法包括化学防治、物理防治、营林技术防治、生物防治、检疫措施等方面<sup>[1]</sup>,其中化学防治由于其简单便捷、见效快等特点而被人们普遍使用;但

迄今为止尚未筛选出高效、安全的杀虫剂,从总体上讲,天牛研究工作有待深化,在思路 and 关键技术方面均有待创新。

纤维素酶系是松墨天牛消化道内已知的主要消化酶类。据报道,纤维素酶具有广谱或专性的抑制剂,包括一些无机和有机化合物,广泛存在于自然界中<sup>[2]</sup>。虽然关于金属离子对酶的活性的影响国内外

已有不少研究<sup>[3,4]</sup>, 其中也有少数涉及对纤维素酶的活性, 但这些研究都局限于对工业上的酶, 对天牛尤其是活体和离体条件金属离子对纤维素酶的影响鲜有报道。为了更好地了解金属离子和纤维素酶的配伍关系, 采用合适的酶抑制剂, 通过一定的途径作用于松墨天牛体内的纤维素酶系, 迫使天牛由于缺少能量来源, 无法完成其世代而死亡, 从而达到防治的目的, 因此有必要探讨各种离子和酶活力之间的关系。另一方面, 探索可抑制纤维素酶的金属离子种类和浓度范围, 对天牛的有效、无公害防治和其它领域的应用都有一定的指导意义<sup>[5]</sup>。

鉴于此, 本研究以松墨天牛为对象, 对松墨天牛肠道纤维素酶性质<sup>[6]</sup>, 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规律进行研究, 本文报道其中的金属离子对纤维素酶活性(离体条件下)的影响部分。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料来源

虫源: 马尾松虫害木采集于浙江省富阳市郊区, 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)。置一定数量的马尾松虫害木于 250 m<sup>2</sup> 养虫室内, 次年初锯成小段, 放入纱笼内, 收集刚刚羽化的松墨天牛成虫供试。

试剂: 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 2002 年 8 月产; 水杨素, 进口分装, 由上海化学试剂采购供应站分装厂 1986 年 12 月产; 微晶纤维素由上海化学试剂公司 1985 年 9 月产; 其它试剂均为分析纯。

### 1.2 纤维素酶液的制备

参考殷幼平等的酶液制备方法<sup>[7]</sup>, 并适当修改。取松墨天牛成虫、幼虫各 5 头, 室温饥饿 1 d 后称质量, 整体处理, 加 5 mL 乙酸-乙酸钠缓冲液(pH 值 4.6, 0.2 mol·L<sup>-1</sup>)进行冰浴匀浆, 迅速在 4℃、15 000 r·min<sup>-1</sup> 条件下离心 10 min, 取上清作为测试用酶液, 贮于 -30℃ 冰箱中备用。

### 1.3 金属离子对松墨天牛纤维素酶的离体作用试验

为明确不同金属离子在离体条件下对松墨天牛纤维素酶活性的影响, 在酶活性测定前将金属离子盐溶液与松墨天牛纤维素酶溶液在缓冲液中混合, 反应 10 min 后, 分别加入 3 种组分酶的专性底物(羧甲基纤维素钠、微晶纤维素、水杨素), 测定相应

纤维素酶的活力变化。金属离子在反应混合液内的浓度不同的试验要求, 分别为 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 50.0 mmol·L<sup>-1</sup>。以不加金属离子的作为对照(CK), 重复 3 次。

### 1.4 纤维素酶活性测定

用 DNS 法<sup>[9]</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(CMC-Na)和 1% 水杨素(Salicin)作底物测定 45℃ 下外切 β-1,4-葡聚糖酶(C<sub>1</sub> 酶)、内切 β-1,4-葡聚糖酶(C<sub>x</sub> 酶)和 β-1,4-葡萄糖苷酶的活性。3 种底物均用上述乙酸-乙酸钠缓冲液配制。

取上述底物 2 mL、酶液 0.1 mL 混匀, 45℃ 水浴保温 1 h 后, 加入 DNS 试剂 2 mL, 立即放入沸水浴显色 5 min, 流水冷却, 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鲜质量(g)单位时间(min)酶促反应生成的还原糖(葡萄糖)量(μmol)计算酶活性, 即: μmol(葡萄糖)·g<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同金属离子对松墨天牛幼虫纤维素酶活性的影响

实验设计的 8 种金属离子(浓度 1.0 和 2.0 mmol·L<sup>-1</sup>)对松墨天牛幼虫纤维素酶活性的离子种类效应如表 1(C<sub>x</sub> 酶)和图 1(β-1,4-葡萄糖苷酶与 C<sub>1</sub> 酶)所示。表 1 显示, 在低浓度下(1.0 mmol·L<sup>-1</sup>)与对照条件下 C<sub>x</sub> 酶活性(1.5314 μmol(葡萄糖)·g<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>)相比较, Cu<sup>++</sup>、Mn<sup>++</sup>、Ca<sup>++</sup>、Pb<sup>++</sup>、Ag<sup>+</sup>、Zn<sup>++</sup>、Na<sup>+</sup> 处理后纤维素酶活性下降, 表明这 7 种金属离子抑制纤维素酶的活性, 对纤维素酶具有抑制效应; 而 Fe<sup>++</sup> 则与这几种金属离子相反, 低浓度下 C<sub>x</sub> 酶活性达到 1.9155 μmol(葡萄糖)·g<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>, 比对照高 25.08%, 说明能激活纤维素酶的活性, 对纤维素酶有促进作用。

表 1 不同金属离子种类对松墨天牛幼虫 C<sub>x</sub> 酶活性的影响

离子种类	离子浓度/(mmol·L <sup>-1</sup> )			
	1.0		2.0	
	酶活性	> CK %	酶活性	> CK %
Cu <sup>++</sup>	0.4758	(-70.11)	0.1514	(-90.11)
Mn <sup>++</sup>	1.1314	(-26.12)	1.0994	(-28.21)
Ca <sup>++</sup>	1.0914	(-28.73)	0.7073	(-53.81)
Pb <sup>++</sup>	0.0956	(-93.76)	0.0633	(-95.67)
Ag <sup>+</sup>	0.6353	(-58.51)	0.3393	(-77.85)
Zn <sup>++</sup>	0.6673	(-56.43)	0.4673	(-69.49)
Na <sup>+</sup>	1.4194	(-7.31)	1.3474	(-12.01)
Fe <sup>++</sup>	1.9155	(25.08)	2.0915	(36.58)

图 1 则形象地说明了这 8 种金属离子对松墨天牛幼虫  $\beta$ -1, 4 葡萄糖苷酶和  $C_1$  酶活性的影响。与  $C_x$  酶相类似, 除了  $Fe^{++}$  对这两个酶有激活效应外, 其余 7 种金属离子都在一定程度上起抑制效应, 不论在低浓度 ( $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 还是高浓度 ( $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 条件下。

此外, 表 1 和图 1 还表明, 尽管  $Cu^{++}$ 、 $Mn^{++}$ 、

$Ca^{++}$ 、 $Pb^{++}$ 、 $Ag^+$ 、 $Zn^{++}$ 、 $Na^+$  对纤维素酶 ( $C_x$  酶、 $\beta$ -1, 4 葡萄糖苷酶、 $C_1$  酶) 都有抑制效应, 但是它们的抑制效果却大不相同。其中  $Cu^{++}$ 、 $Pb^{++}$  和  $Ag^+$  的抑制效果较强, 低浓度下就表现出很好的抑制效应, 而  $Mn^{++}$ 、 $Ca^{++}$ 、 $Zn^{++}$  和  $Na^+$  的抑制效果稍微差一些, 尤其是  $Na^+$  即使在高浓度下抑制效果也不明显。

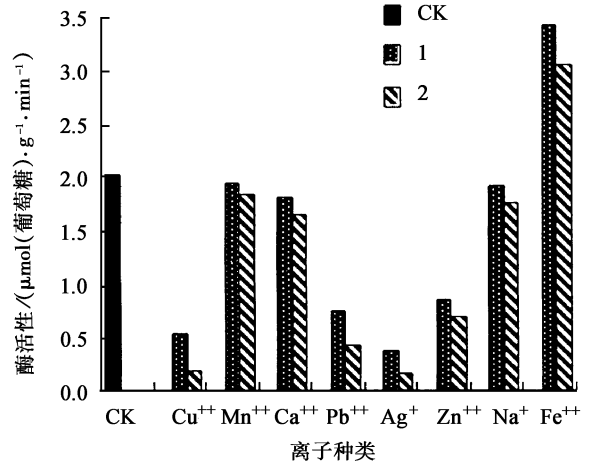
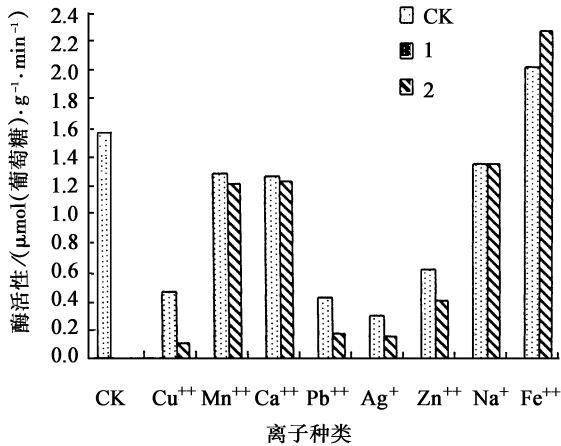


图 1 金属离子种类对松墨天牛幼虫  $\beta$ -1, 4 葡萄糖苷酶(左)和  $C_1$  酶(右)活性的影响

(图例中 CK、1、2 分别代表浓度为 0、1.0、2.0  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )

## 2.2 金属离子浓度梯度对松墨天牛幼虫纤维素酶活性的影响

6 种常见的金属离子 ( $Cu^{++}$ 、 $Ca^{++}$ 、 $Mn^{++}$ 、 $Fe^{++}$ 、 $Pb^{++}$  和  $Zn^{++}$ ) 及其浓度梯度 ( $0.1 \sim 50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 对松墨天牛幼虫纤维素酶 ( $C_1$  酶、 $C_x$  酶和  $\beta$ -1, 4 葡萄糖苷酶) 的影响见表 2 ( $C_x$  酶) 和图 2 ( $\beta$ -1, 4 葡萄糖苷酶与  $C_1$  酶)。

从表 2 可以看出: 6 种金属离子对  $C_x$  酶的作用效应并不相同, 有起抑制作用的 ( $Cu^{++}$ 、 $Ca^{++}$ 、 $Mn^{++}$ 、 $Pb^{++}$  和  $Zn^{++}$ ), 也有起激活作用的 ( $Fe^{++}$ ), 而且即使具有抑制效应, 它们的抑制效果也存在很大的区别。具体而言,  $Fe^{++}$  对  $C_x$  酶具有较强的激活作用, 与对照 (离子浓度为 0) 的  $C_x$  酶活性 ( $1.5715 \mu\text{mol}(\text{葡萄糖}) \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) 相比, 用不同浓度梯度  $Fe^{++}$  处理后酶的活性得到不同程度的增加 ( $1.6435 \sim 4.5159 \mu\text{mol}(\text{葡萄糖}) \cdot \text{g}^{-1} \cdot$

$\text{min}^{-1}$ ), 而且  $Fe^{++}$  离子浓度越大对  $C_x$  酶活性具有越大的激活效应,  $C_x$  酶活性增加  $4.58\% \sim 187.36\%$ 。研究发现  $Cu^{++}$ 、 $Ca^{++}$ 、 $Mn^{++}$ 、 $Pb^{++}$  和  $Zn^{++}$  对  $C_x$  酶的活性具有抑制作用:  $Cu^{++}$ 、 $Pb^{++}$  的抑制效应最强, 在不同浓度梯度下其抑制效应分别为  $1.3643 \sim 0.0003$ 、 $0.9073 \sim 0.0000 \mu\text{mol}(\text{葡萄糖}) \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ , 与对照相比较, 使酶活性下降  $13.19\% \sim 99.98\%$  和  $42.27\% \sim 100\%$ , 尤其是  $Pb^{++}$  抑制效果最为显著; 相对而言,  $Ca^{++}$ 、 $Mn^{++}$  和  $Zn^{++}$  虽然对该酶也有抑制作用, 但是它们的抑制效应却没有前两者那么显著, 在对应的梯度浓度下该酶的活性为  $1.5314 \sim 0.3592$ 、 $1.3074 \sim 0.8833$  和  $1.1074 \sim 0.1751 \mu\text{mol}(\text{葡萄糖}) \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ , 抑制效率也只有  $2.53\% \sim 77.14\%$ 、 $16.81\% \sim 43.79\%$  和  $29.53\% \sim 88.86\%$ 。可以看出它们只有在高浓度下 ( $10.50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 才具有相对较大的抑制作用。

表 2 金属离子浓度梯度对松墨天牛幼虫离体 C<sub>x</sub>酶活性的影响  $\mu\text{mol}(\text{葡萄糖}) \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 

离子浓度 / (mmol · L <sup>-1</sup> )	Cu <sup>++</sup>	Ca <sup>++</sup>	Mn <sup>++</sup>	Fe <sup>++</sup>	Pb <sup>++</sup>	Zn <sup>++</sup>
0(CK)	1 571 5	1 571 5	1 571 5	1 571 5	1 571 5	1 571 5
0.1	1 364 3	1 531 4	1 307 4	1 643 5	0 907 3	1 107 4
0.5	0 978 1	1 331 5	1 235 9	1 819 5	0 455 3	0 923 9
1.0	0 475 8	1 091 4	1 131 4	1 915 5	0 095 6	0 667 3
2.0	0 151 4	0 707 3	1 099 1	2 091 5	0 063 3	0 467 7
5.0	0 083 7	0 663 2	1 059 4	2 275 6	0 005 2	0 347 3
10.0	0 001 3	0 499 9	1 027 2	2 643 6	0 001 2	0 299 2
50.0	0 000 3	0 359 2	0 883 3	4 515 9	0 000 0	0 175 1

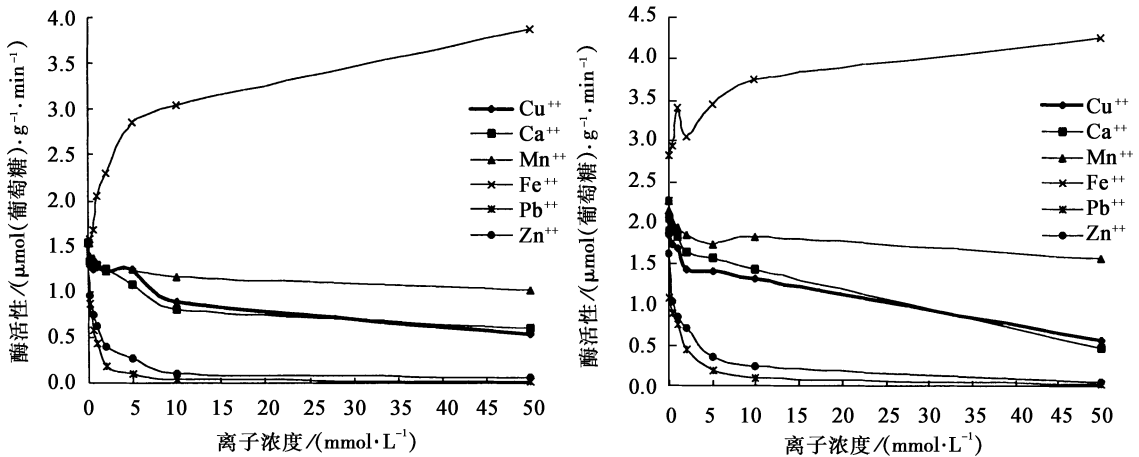
图 2 金属离子浓度梯度对松墨天牛幼虫离体  $\beta$ -1,4-葡萄糖苷酶(左)和 C<sub>1</sub>酶(右)活性的影响

图 2(左)则反映了这 6 种金属离子对  $\beta$ -1,4-葡萄糖苷酶的离子效应和浓度效应 (0.1~50 mmol · L<sup>-1</sup>)。显然,除了 Fe<sup>++</sup> 激活该酶活性外, Zn<sup>++</sup>、Ca<sup>++</sup>、Mn<sup>++</sup>、Pb<sup>++</sup> 和 Cu<sup>++</sup> 对其只有抑制效应。与对照条件下的酶活性 (1 531.4  $\mu\text{mol}(\text{葡萄糖}) \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) 相比,经过 Fe<sup>++</sup> 激活后该酶活性达到 1 571.5~3 883.8  $\mu\text{mol}(\text{葡萄糖}) \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ , 活性比对照增 2.62%~153.61%, 表明在高浓度下具有较强的激活作用。相比之下, Zn<sup>++</sup>、Ca<sup>++</sup>、Mn<sup>++</sup>、Pb<sup>++</sup> 和 Cu<sup>++</sup> 在不同梯度浓度下其酶活性分别为 1.291 4~0.531 3、1.323 4~0.611 3、1.395 4~1.019 4、0.867 3~0.013 6 和 0.955 4~0.067 2  $\mu\text{mol}(\text{葡萄糖}) \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ , 相应的酶活性降幅为 15.67%~65.31%、13.58%~60.08%、8.88%~33.44%、43.38%~99.11% 和 37.62%~95.61%, 说明 Pb<sup>++</sup> 和 Cu<sup>++</sup> 对  $\beta$ -1,4-葡萄糖苷酶也具有强烈的抑制效果。

不同金属离子及其梯度浓度对 C<sub>1</sub> 酶的作用效应如图 2(右)所示。与前两种酶活性较为相似, Zn<sup>++</sup>、Ca<sup>++</sup>、Mn<sup>++</sup>、Pb<sup>++</sup> 和 Cu<sup>++</sup> 对 C<sub>1</sub> 酶只有抑制效应, 酶活性分别为 1.843 5~0.563 3、1.891 5~0.

459 3、2 155 5~1 571 5、1 803 4~0 016 0、1 619 5~0 051 2  $\mu\text{mol}(\text{葡萄糖}) \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ , 与对照 (2 267.6  $\mu\text{mol}(\text{葡萄糖}) \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) 相比使该酶活性下降 18.70%~75.16%、16.58%~79.75%、4.94%~30.70%、52.22%~99.29% 和 28.58%~97.74%, 而 Fe<sup>++</sup> 则能激活该酶活性 (酶活性和增幅分别为 2 811.6~4 259.9  $\mu\text{mol}(\text{葡萄糖}) \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  和 24.00%~87.87%)。

### 2.3 金属离子对松墨天牛成虫纤维素酶活性的影响

松墨天牛除了其幼虫蛀食树干致使松树枯死外,成虫还因为补充营养,啃食嫩枝皮,造成寄主树木衰弱。基于这种原因,本文还研究了不同金属离子及其浓度对成虫纤维素酶活性的影响。表 3 反映了实验设计下 8 种金属离子 (Ca<sup>++</sup>、Na<sup>+</sup>、Ag<sup>+</sup>、Zn<sup>++</sup>、Pb<sup>++</sup>、Mn<sup>++</sup>、Fe<sup>++</sup> 和 Cu<sup>++</sup>) 在两个浓度梯度 (1.0、2.0 mmol · L<sup>-1</sup>) 下该酶系的活性测定值。与对照相比较,这 8 种离子对纤维素酶的效应可以划为起激活作用和起抑制作用两类。前者包括 Ca<sup>++</sup> 和 Fe<sup>++</sup> 2 种,后者包括 Na<sup>+</sup>、Ag<sup>+</sup>、Zn<sup>++</sup>、Pb<sup>++</sup>、Mn<sup>++</sup> 和 Cu<sup>++</sup> 共 6 种。

表 3 松墨天牛成虫纤维素酶活性与金属离子种类和浓度的关系

离子种类	$\mu\text{mol}(\text{葡萄糖}) \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$					
	C <sub>x</sub> 酶		$\beta$ -1, 4葡萄糖苷酶		C <sub>1</sub> 酶	
	a	b	a	b	a	b
CK	0.298 2	0.298 2	0.153 7	0.153 7	0.255 2	0.255 2
Ca <sup>2+</sup>	0.304 9	0.381 2	0.209 9	0.224 4	0.279 1	0.315 3
Na <sup>+</sup>	0.294 8	0.296 5	0.150 2	0.143 4	0.251 8	0.244 9
Ag <sup>+</sup>	0.219 1	0.178 7	0.033 2	0.028 1	0.181 1	0.104 7
Zn <sup>2+</sup>	0.170 9	0.215 6	0.053 9	0.043 5	0.136 5	0.134 8
Pb <sup>2+</sup>	0.021 2	0.019 4	0.033 2	0.024 6	0.067 6	0.029 8
Mn <sup>2+</sup>	0.217 4	0.182 9	0.111 6	0.092 9	0.150 2	0.114 1
Fe <sup>2+</sup>	0.301 8	0.321 6	0.171 7	0.173 4	0.269 6	0.285 6
Cu <sup>2+</sup>	0.139 9	0.127 9	0.036 7	0.026 3	0.069 4	0.038 4

注: a反应液中金属离子终浓度为  $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; b反应液中金属离子终浓度为  $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

就 C<sub>x</sub>酶而言,用两种浓度的 Mg<sup>2+</sup>和 Fe<sup>2+</sup>溶液孵育后,酶活性分别上升到  $0.304 9$   $0.301 8 \mu\text{mol}(\text{葡萄糖}) \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  (低浓度)和  $0.381 2$   $0.321 6 \mu\text{mol}(\text{葡萄糖}) \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  (高浓度),后者增幅分别为 27.83%和 7.85%;而对 C<sub>1</sub>酶,这两种离子处理后的酶活性分别达到  $0.279 1$   $0.269 6 \mu\text{mol}(\text{葡萄糖}) \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  (低浓度)和  $0.315 3$   $0.285 6 \mu\text{mol}(\text{葡萄糖}) \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  (高浓度),Ca<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>分别比对照增加 9.37%~23.55%和 5.64%~11.91%。 $\beta$ -1,4-葡萄糖苷酶也同样受到它们的激活作用,在这两种离子作用下,酶活性增加了 36.56%~46.00%和 7.85%~11.71%。

相对而言,Na<sup>+</sup>、Ag<sup>+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Pb<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>和 Cu<sup>2+</sup>这 6 种金属离子则表现为抑制效应,其中 Na<sup>+</sup>、Zn<sup>2+</sup>和 Mn<sup>2+</sup>的抑制作用相对较弱,即使用高浓度的离子溶液对 C<sub>x</sub>酶、 $\beta$ -1,4葡萄糖苷酶和 C<sub>1</sub>酶抑制效果也分别只有 0.57%、6.70%、4.04% (Na<sup>+</sup>)、27.70%、71.70%、47.18% (Zn<sup>2+</sup>)和 38.67%、39.56%、55.29% (Mn<sup>2+</sup>),尤其是 Na<sup>+</sup>的抑制效果最差;Ag<sup>+</sup>、Pb<sup>2+</sup>和 Cu<sup>2+</sup>对纤维素酶的抑制效果比 Na<sup>+</sup>、Zn<sup>2+</sup>和 Mn<sup>2+</sup>要好得多,在低浓度下它们的抑制效率依 C<sub>x</sub>酶、 $\beta$ -1,4葡萄糖苷酶和 C<sub>1</sub>酶分别达到 40.07%、81.72%、58.97% (Ag<sup>+</sup>)、93.49%、83.99%、88.32% (Pb<sup>2+</sup>)和 57.11%、82.89%、84.95% (Cu<sup>2+</sup>),其中 Pb<sup>2+</sup>抑制效果要比 Cu<sup>2+</sup>和 Ag<sup>+</sup>好。

#### 2.4 Cu<sup>2+</sup>对松墨天牛成虫纤维素酶活性的影响

由于生产实际中 Cu<sup>2+</sup>具有 Pb<sup>2+</sup>和 Ag<sup>+</sup>不可多得的优越性,本文进一步研究不同浓度梯度下 Cu<sup>2+</sup>

对松墨天牛成虫纤维素酶的抑制效应。表 4 是实验设计的 7 种浓度下成虫纤维素酶的活性值。显然,不同浓度的 Cu<sup>2+</sup>对松墨天牛成虫纤维素酶抑制效应不同,抑制效果在 17.87%~95.20% (C<sub>x</sub>酶)、47.04%~91.80% ( $\beta$ -1,4葡萄糖苷酶)和 51.92%~95.06% (C<sub>1</sub>酶)。进一步比较发现,在低浓度 ( $0.1 \sim 1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )下, C<sub>x</sub>酶所受到的抑制作用没有  $\beta$ -1,4葡萄糖苷酶和 C<sub>1</sub>酶明显,其抑制作用低于 30%,但是在高浓度 ( $5 \sim 50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )下 Cu<sup>2+</sup>对 3 个组分酶抑制效果基本相同 (70.39%~95.20%、86.21%~91.80%、82.25%~95.06%),表明在生产实际中用 Cu<sup>2+</sup>作为松墨天牛的抑制剂其浓度不能太低,否则会影响抑制效果而无法达到预期目标。

表 4 Cu<sup>2+</sup>对松墨天牛成虫纤维素酶活性的抑制效应

浓度 / ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	$\mu\text{mol}(\text{葡萄糖}) \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$					
	C <sub>x</sub> 酶		$\beta$ -葡萄糖苷酶		C <sub>1</sub> 酶	
	酶活性	> CK /%	酶活性	> CK /%	酶活性	> CK /%
CK	0.298 2		0.153 7		0.255 2	
0.1	0.244 9	-17.87	0.081 4	-47.04	0.122 7	-51.92
0.5	0.226 0	-24.21	0.067 6	-56.02	0.112 4	-55.96
1.0	0.217 4	-27.10	0.036 7	-76.12	0.069 4	-72.81
2.0	0.182 9	-38.67	0.026 3	-82.89	0.038 4	-84.95
5.0	0.088 3	-70.39	0.021 2	-86.21	0.045 3	-82.25
10	0.029 8	-90.01	0.014 3	-90.70	0.017 7	-93.06
50	0.014 3	-95.20	0.012 6	-91.80	0.012 6	-95.06

### 3 结论

本文在研究金属离子对松墨天牛活体条件纤维素酶的影响的基础上,继续研究这些离子对离体条件纤维素酶活性的效应。研究表明:实验条件下 Cu<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Pb<sup>2+</sup>、Ag<sup>+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Na<sup>+</sup> (浓度  $1.0$ 和  $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )对松墨天牛幼虫纤维素酶活性的效应不同,与对照相比,用 Cu<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Pb<sup>2+</sup>、Ag<sup>+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Na<sup>+</sup>处理后酶活性下降,表明这 7 种金属离子对纤维素酶具有抑制效应;而 Fe<sup>2+</sup>则能激活纤维素酶的活性,对纤维素酶有促进作用。这种现象不论离子浓度的高低、纤维素酶的组分 (C<sub>x</sub>酶、 $\beta$ -1,4葡萄糖苷酶、C<sub>1</sub>酶)都有很鲜明的体现。进一步比较这些抑制性金属离子,发现 Cu<sup>2+</sup>、Pb<sup>2+</sup>和 Ag<sup>+</sup>的抑制效果较好,低浓度下就表现出很强的抑制效应,而 Mn<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>和 Na<sup>+</sup>的抑制效果稍微差一些,尤其是 Na<sup>+</sup>即使在高浓度下的抑制效果也不太明显。这些金属离子对纤维素酶的效应与对松墨天牛活体下纤维素酶的效应

相似。

金属离子浓度梯度对纤维素酶活性影响的研究结果表明: 参试 6 种常见的金属离子 ( $\text{Cu}^{++}$ 、 $\text{Ca}^{++}$ 、 $\text{Mn}^{++}$ 、 $\text{Fe}^{++}$ 、 $\text{Pb}^{++}$  和  $\text{Zn}^{++}$ ) 浓度梯度 ( $0.1 \sim 50.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 对松墨天牛幼虫纤维素酶 ( $\text{C}_1$  酶、 $\text{C}_x$  酶和  $\beta$ -1,4-葡萄糖苷酶) 的影响差异显著。 $\text{Fe}^{++}$  对纤维素酶具有较强的激活作用, 用不同浓度梯度  $\text{Fe}^{++}$  孵育后酶的活性得到不同程度的增加 ( $1.6435 \sim 4.5159 \mu\text{mol}(\text{葡萄糖}) \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ), 而且  $\text{Fe}^{++}$  浓度越大对  $\text{C}_x$  酶活性具有越大的激活效应; 而  $\text{Cu}^{++}$ 、 $\text{Ca}^{++}$ 、 $\text{Mn}^{++}$ 、 $\text{Pb}^{++}$  和  $\text{Zn}^{++}$  5 种对  $\text{C}_x$  酶的活性具有抑制作用:  $\text{Cu}^{++}$  和  $\text{Pb}^{++}$  的抑制效应最强, 相对而言,  $\text{Ca}^{++}$ 、 $\text{Mn}^{++}$  和  $\text{Zn}^{++}$  抑制效果只有在高浓度 ( $10 \sim 50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 下才具有相对较大的抑制作用。

此外, 进一步研究了  $\text{Cu}^{++}$  不同浓度梯度对松墨天牛成虫纤维素酶的抑制效应。结果表明,  $\text{Cu}^{++}$  对松墨天牛成虫纤维素酶抑制作用存在浓度梯度效应, 在试验所用的浓度梯度范围抑制效果在  $17.87\% \sim 95.20\%$  ( $\text{C}_x$  酶)、 $47.04\% \sim 91.80\%$  ( $\beta$ -1,4-葡萄糖苷酶) 和  $51.92\% \sim 95.06\%$  ( $\text{C}_1$  酶), 这也与活体条件下的研究结果相似; 但是, 在低浓度下,  $\text{C}_x$  酶所受到的抑制效果没有  $\beta$ -1,4-葡萄糖苷酶

和  $\text{C}_1$  酶明显, 其抑制作用较低 (不到  $30\%$ ), 但是在高浓度下这 3 个组分酶抑制效果基本相同 (大于  $70\%$ )。因此, 在生产实际中用  $\text{Cu}^{++}$  作为松墨天牛的抑制剂其浓度不能太低, 否则会影响抑制效果而无法达到预期的目标。

#### 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] 赵军, 小仓信夫, 矶野昌弘. 光肩星天牛的人工饲养(I) [J]. 北京林业大学学报, 1999, 21(4): 58~61
- [3] 李卫芬, 许梓荣, 孙建义, 等. 金属离子对糖化酶活性的影响 [J]. 浙江农业大学学报, 1999, 25(3): 296~298
- [4] 单谷, 罗廉, 余世袁. 金属离子对纤维素酶制备的影响 [J]. 林产化学与工业, 1998, 18(3): 53~57
- [5] 张丽萍, 董超, 王迎春, 等. 几种离子对纤维素酶活力的影响 [J]. 河北省科学院学报, 2000, 17(4): 235~238
- [6] 索风梅, 林长春, 王浩杰, 等. 松墨天牛纤维素酶性质的研究 [J]. 林业科学研究, 2004, 17(5): 583~589
- [7] 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
- [8] Paulson K Z, Kutz L T. Michaelis constants of urease [J]. Soil Sci Soc Proc, 1970, 34: 70~72