

文章编号: 1001-1498(2007)03-0381-04

松墨天牛纤维素酶的研究

取食条件对松墨天牛纤维素酶活性的影响

索风梅^{1,2}, 王浩杰^{1*}, 丁中文³, 徐天森¹

(1. 中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400; 2. 中国医学科学院、中国协和医科大学药用植物研究所, 北京 100094; 3. 浙江省富阳市林业局, 浙江 富阳 311400)

摘要:纤维素酶是天牛体内重要的消化酶类, 本文以松墨天牛为对象, 研究了该虫肠道纤维素酶随禁食时间、取食时间不同的变化规律。结果显示, 随着禁食时间的延长, 纤维素酶 3 种组分酶活性均表现为先升高, 后降低; 而随着取食时间的延长, 松墨天牛体内的纤维素 3 种组分酶活性变化规律相一致, 由开始的低活性逐渐升高, 并最终趋于稳定。

关键词:松墨天牛; 纤维素酶; 取食条件

中图分类号: S763.7

文献标识码: A

Study on the Character of Cellulase in *Monochamus alternatus* Effect of Feeding Conditions on the *Monochamus alternatus* Cellulase Activity

SUO Feng-mei^{1,2}, WANG Hao-jie¹, DING Zhong-wen³, XU Tian-sen¹

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

2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Chinese Peking Union Medical College, Beijing 100094, China;

3. Forestry Bureau of Fuyang City, Zhejiang Province, Fuyang 311400, Zhejiang, China)

Abstract: Cellulase is an important enzyme in the *Monochamus alternatus*. The effect of feeding time, no-feeding time and other conditions on cellulase of *M. alternatus* showed cellulase activity increased in the initial stage and then declined under the controlled conditions. At the same time, the cellulase activity was proportional to the abundance of twigs. Along with extend of the feeding time, cellulase (Cx-ase, C₁-ase and -1, 4-glucosidase) activity of *M. alternatus* increased in the initial stage and then declined, and eventually tended to be stable.

Key words: *Monochamus alternatus*; cellulase; feeding conditions

松墨天牛 (*Monochamus alternatus* Hope) 幼虫主要在松树 (*Pinus* spp.) 树干和枝条的韧皮部及木质部蛀食危害。在松材线虫 (*Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhner) Nickle) 病疫区, 松墨天牛还是松材线虫的主要携带者和传播者, 已成为我国南方广大松林最具危险性的天牛^[1]。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。对松墨天牛虽然通过诸多防治措施在一定程度上遏制了其成灾蔓延的速度, 但猖獗危害的局面尚未得到有效控制。该虫主要以马尾松 (*Pinus massoniana* Lamb.) 为主的林木

韧皮部和木质部为食物, 通过消化其中的纤维素获得养分, 而纤维素酶是其肠道内消化纤维素的重要消化酶类。目前, 有关纤维素酶在微生物 (真菌和细菌) 方面研究得较为深入^[2-4], 而在天牛上的研究较少, 而且这些研究大多局限在松墨天牛作为松材线虫病的传播媒介方面, 而对于作为松墨天牛重要消化酶——纤维素酶的性质及其机理方面没有进行深入的研究, 尤其对松墨天牛取食特征的研究更是空白。本文研究禁食、取食时间长短对松墨天牛消化道纤维素酶的影响, 以进一步揭示松墨天牛的取食规律及其取食效应和体内纤维素酶活性的相关性。

收稿日期: 2006-11-14

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, 现为中国医学科学院、中国协和医科大学药用植物研究所研究实习生。

*通讯作者: 王浩杰 (1961—), 男, 江苏东台人, 研究员。

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 m²养虫室内,次年初锯成小段,放入纱笼内,收集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 试验设计

松墨天牛(幼虫、成虫)不同禁食时间纤维素酶活性变化测定:取松墨天牛 3 龄(头壳宽度 0.201 ~ 0.285 cm)和 4 龄(头壳宽度 0.287 ~ 0.341 cm)幼虫若干头,室温下根据禁食时间梯度(0、1、2、4、12、24、48、120 h,死亡)分别按幼虫纤维素酶液制备方法^[5-7]进行处理,测定其纤维素酶活性。

采用已经人工喂养 1 周、大小一致的一批松墨天牛成虫,按照不同禁食时间(0、1、2、3、4、5、6 d)分别按成虫纤维素酶液制备方法^[5-7]进行处理,测定其纤维素酶活性。

松墨天牛成虫不同取食时间纤维素酶活性变化测定:收集刚羽化出孔且大小一致的松墨天牛成虫,取食时间设 0、0.25、0.5、1.5、2.5、3.5、6、0、48、0 h,到时间后,立即测定其体内纤维素酶活性,数据均取平均值。

1.3 纤维素酶活性测定

用 DNS 法^[8]测定纤维素酶的活性。以 1% 微晶纤维素(MC)、1% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)和 1% 水杨素(Salicin)作底物分别测定 45 °C 下外切

-1,4 葡聚糖酶(C₁酶)、内切-1,4 葡聚糖酶(C_x酶)和-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 值约为 4)配制。

上述 3 种底物各取 2 mL,3 种酶液各取 0.1 mL 混匀,45 °C 水浴保温 1 h 后,加入 DNS 显色剂 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。每个处理重复 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,单位为:μmol(葡萄糖)·g⁻¹·min⁻¹。

2 结果与分析

2.1 禁食对松墨天牛幼虫体内纤维素酶活性的影响

松墨天牛幼虫经过不同时间梯度的禁食处理后体内纤维素酶活性变化如图 1。从图 1 可以看出,松墨天牛 3 龄幼虫经过短暂(4 h)禁食处理后,其体内纤维素酶 3 种组分酶(C_x酶、C₁酶和-1,4 葡萄糖苷酶)活性均有不同程度的增加(C_x酶由 4.211 3 增至 9.048 6 μmol(葡萄糖)·g⁻¹·min⁻¹;C₁酶由 0.544 4 增至 1.943 2 μmol(葡萄糖)·g⁻¹·min⁻¹;-1,4 葡萄糖苷酶由 0.962 1 增至 3.822 8 μmol(葡萄糖)·g⁻¹·min⁻¹),其中 C_x 尤其显著,酶活性增加 1 倍以上,在曲线上表现为上升趋势;但是随着禁食时间的延长,3 种组分酶活性都表现为不同程度的下降趋势(C_x酶由 9.048 6 减至 6.557 1 μmol(葡萄糖)·g⁻¹·min⁻¹,C₁酶由 1.943 2 μmol(葡萄糖)·g⁻¹·min⁻¹ 减至 0.000 1 μmol(葡萄糖)·g⁻¹·min⁻¹,-1,4 葡萄糖苷酶由 3.822 8 μmol(葡萄糖)·g⁻¹·min⁻¹ 减至 1.831 5 μmol(葡萄糖)·g⁻¹·min⁻¹)。禁食处理导致松墨天牛纤维素酶活性的这种变化趋势在 4 龄幼虫也有所体现,且变化规律大致相同(图 2)。

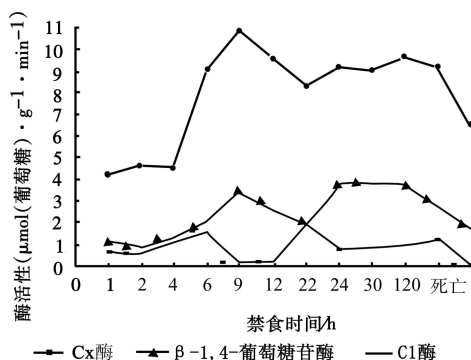


图 1 禁食处理对松墨天牛 3 龄幼虫纤维素酶活性的影响

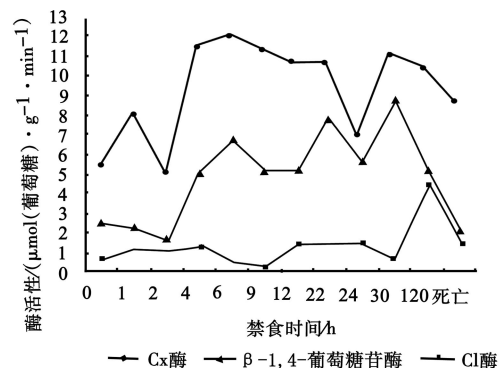


图 2 禁食处理对松墨天牛 4 龄幼虫纤维素酶活性的影响

2.2 禁食对松墨天牛成虫体内纤维素酶活性的影响

图 3 反映了不同时间梯度禁食处理对松墨天牛成虫纤维素酶活性的影响。在初期,禁食处理对松墨天牛成虫纤维素酶具有刺激作用,表现为体内活性增强,但是随着禁食时间的延长,纤维素酶活性开始减弱,最终其活性低于未禁食处理时的活性,这种变化趋势在纤维素酶的 3 个组分酶中均有不同程度的体现,也与禁食处理对松墨天牛幼虫纤维素酶活性影响趋势一致。以对松墨天牛消化纤维素具有重要作用的 C_1 酶为例,在禁食处理的初期该酶的活性增强,表现为 0.135 (未经禁食处理时的酶活性) $0.143 \sim 0.149 \mu\text{mol}(\text{葡萄糖}) \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, 具有明显的上升趋势;但是随着禁食时间的进一步延长,该酶的活性减弱,其酶活性变化为 $0.149 \sim 0.133 \sim 0.130 \sim 0.124 \sim 0.111 \mu\text{mol}(\text{葡萄糖}) \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, 最终低于没有经过禁食处理时的酶活性。

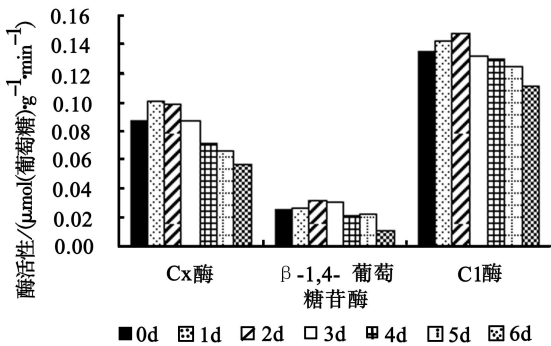


图 3 禁食处理对松墨天牛成虫纤维素酶活性的影响

此外,图 3 还揭示,不论是在同一时间梯度的禁食处理,还是基于整体上禁食时间处理,松墨天牛成虫纤维素酶各组分酶的活性大小都是: C_1 酶 $>$ C_x 酶 $>$ $-1,4$ 葡萄糖苷酶,这与文献 [5] 研究松墨天牛纤维素酶的性质时发现的规律具有一致性^[6],也说明禁食处理对松墨天牛纤维素酶的 3 种组分酶 (C_1 酶、 C_x 酶和 $-1,4$ 葡萄糖苷酶)具有相同的效应。

2.3 松墨天牛成虫取食时间长短对纤维素酶活性的影响

不仅不同时间梯度的禁食处理会影响松墨天牛(幼虫、成虫)体内纤维素酶的活性,研究表明,取食时间长短的改变也会导致松墨天牛纤维素酶活性的变化。表 1 显示了不同取食时间条件下松墨天牛纤维素酶活性的测定结果。从表 1 可以看出,在松墨天牛刚取食之时,体内纤维素酶的活性相对较低, C_1 酶、 C_x 酶和 $-1,4$ 葡萄糖苷酶的活性分别为

$0.1339, 0.0745, 0.0177 \mu\text{mol}(\text{葡萄糖}) \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, 随着取食时间的延长,肠道内积累的纤维素增多,这 3 种纤维素酶组分酶的活性都有不同程度的增强,最终达到稳定的酶活性: C_1 酶、 C_x 酶和 $-1,4$ 葡萄糖苷酶活性分别为 $0.1940, 0.1554, 0.0410 \mu\text{mol}(\text{葡萄糖}) \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。从酶活性的绝对增量角度比较分析发现,三者的增幅大小顺序依旧是 $-1,4$ 葡萄糖苷酶最小,仅 $0.0233 \mu\text{mol}(\text{葡萄糖}) \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, 而 C_x 酶和 C_1 酶则分别高达 $0.0809, 0.0541 \mu\text{mol}(\text{葡萄糖}) \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$;但是,与松墨天牛体内纤维素酶 3 种组分酶的活性强弱顺序 (C_1 酶 $>$ C_x 酶 $>$ $-1,4$ 葡萄糖苷酶)相反,取食一段时间后这几种酶活性与刚取食时相比, $-1,4$ 葡萄糖苷增加最多,高达 131.64% , C_x 酶次之,而 C_1 酶最小,只有 38.67% ,这可能也显示 C_1 酶是松墨天牛纤维素酶的重要组成部分,其活性受体内纤维素影响相对较小,其敏感性没有后两者高,但有待于进一步研究。

表 1 松墨天牛成虫纤维素酶活性随取食时间长短的变化

取食时间 / h	纤维素酶活性 / ($\mu\text{mol}(\text{葡萄糖}) \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)		
	C_1 酶	C_x 酶	$-1,4$ 葡萄糖苷酶
0.00	0.1399	0.0745	0.0177
0.25	0.1675	0.1244	0.0212
0.50	0.1864	0.1227	0.0332
1.50	0.2019	0.1451	0.0470
2.50	0.1795	0.1588	0.0435
3.50	0.1933	0.1537	0.0298
6.00	0.1915	0.1571	0.0418
48.00	0.1940	0.1554	0.0410

3 结论

以松墨天牛幼虫(3、4龄)、成虫为主要试验材料,研究其在经过禁食处理、不同取食时间受到限制时体内纤维素酶活性的变化,以进一步阐明松墨天牛活体纤维素酶的性质和对纤维素的消化机理。研究表明,短时间的禁食处理会导致松墨天牛体内纤维素酶的活性升高,但是随着禁食时间的进一步延长,酶活性减弱,甚至趋于零,这一变化在松墨天牛幼虫和成虫中均得到一致的体现。同时,经过禁食处理后纤维素酶 3 种组分酶活性大小依旧是: C_1 酶 $>$ C_x 酶 $>$ $-1,4$ 葡萄糖苷酶,与文献 [5] 研究松墨天牛纤维素酶的性质时发现的规律具有一致性,说明禁食处理对松墨天牛纤维素酶 3 种组分酶具有相

同的效应。

通过测定不同取食时间松墨天牛纤维素酶的活性发现,取食时间长短的改变也会导致松墨天牛纤维素酶活性的变化。在取食初期,松墨天牛体内纤维素酶的活性相对较低, C_1 酶、 C_x 酶和 $-1,4$ 葡萄糖苷酶的活性分别为 $0.1339, 0.0745, 0.0177 \mu\text{mol}(\text{葡萄糖}) \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$;随着取食时间的延长,肠道内积累的纤维素增多,这 3 种纤维素酶组分酶的活性都有不同程度的增强,并最终达到稳定的酶活性: C_1 酶、 C_x 酶和 $-1,4$ 葡萄糖苷酶分别为 $0.1940, 0.1554, 0.0410 \mu\text{mol}(\text{葡萄糖}) \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$,与刚取食时相比, $-1,4$ 葡萄糖苷酶活性增加最多,达 131.64%, C_x 酶次之, C_1 酶增加最少,仅 38.67%,表明 C_1 酶活性受取食条件影响较小。此外,研究还发现,食物缺乏也会导致松墨天牛体内纤维素酶活性下降,反之,松墨天牛得到充足食物后体内消化酶的活性会不断增强,表明活体纤维素酶的活性不仅随着禁食处理和取食时间的改变而变化,而且还会因为自然条件下食物供给的改变而发生改变。

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] 杨叶东,韩君,张金龙.纤维素酶的研究、生产及其在纺织上的应用[J].激光生物学报,2000,9(2):150~153
- [3] Divne C, Stahlberg J, Reinikainen T, *et al* The three-dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase I from *Trichodema reesei*[J]. Science, 1994, 265: 524~528
- [4] 吴显荣,穆小民.纤维素酶分子生物学研究进展及趋向[J].生物工程进展,1994,14(4):25~27
- [5] 索风梅,林长春,王浩杰,等.松墨天牛纤维素酶的研究.纤维素酶性质的研究[J].林业科学研究,2004,17(5):583~589
- [6] 索风梅,王浩杰,陈洪宝,等.松墨天牛纤维素酶的研究.离体条件下金属离子对松墨天牛纤维素酶活性的影响[J].林业科学研究,2006,19(2):205~210
- [7] 王浩杰,索风梅,郭付新,等.松墨天牛纤维素酶的研究.活体条件下金属离子对松墨天牛纤维素酶活性的影响[J].林业科学研究,2006,19(4):472~476
- [8] Paulson K Z, Kurtz L T. Michaelis constants of urease[J]. Soil Sci Soc Proc, 1970, 34: 70~72