

眉斑并脊天牛纤维素酶性质的研究^{*}

Research on *Glenea cantor* Cellulase Characteristics

杨登峰, 关妮, 米慧芝, 杜奇石, 张穗生, 黄日波^{**}

YANG Deng-feng, GUAN Ni, MI Hui-zhi, DU Qi-shi, ZHANG Sui-sheng, HUANG Ri-bo

(广西科学院非粮生物质酶解国家重点实验室、国家非粮生物质能源工程技术研究中心、广西生物炼制重点实验室, 广西南宁, 530007)

(State Key Laboratory of Non-Food Biomass and Enzyme Technology, National Engineering Research Center for Non-food Biorefinery, Guangxi Key Laboratory of Biorefinery, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China)

摘要: 为了了解眉斑并脊天牛 (*Glenea cantor*) 纤维素酶的性质, 选取以木棉树 (*Bombax ceiba*) 为食的眉斑并脊天牛为研究对象, 按照 IUPAC 的标准测定方法, 测定和定位眉斑并脊天牛肠道中的内切- β -1, 4 葡聚糖酶、纤维二糖酶以及滤纸酶活力, 考察内切- β -1, 4 葡聚糖酶的最适 pH 值和最适温度。结果表明: 在眉斑并脊天牛肠道中同时存在以上 3 种纤维素酶, 3 种纤维素酶都具有酶活力, 并且主要集中在天牛肠道的中肠。内切- β -1, 4 葡聚糖酶具有广泛的 pH 值和温度适应范围, 最适 pH 值为 9.2, 最适温度为 50 $^{\circ}$ C。

关键词: 眉斑并脊天牛 纤维素 纤维素酶

中图分类号: Q55 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2011)03-0261-03

Abstract: According to the standard method from IUPAC, the activities of endo- β -1, 4-glucoamylase, cellobiase and filter paper enzyme from *Glenea cantor* were analyzed and their locations were determined. Optimal pH value and optimal temperature of endo- β -1, 4-glucoamylase were measured. The results showed that there were activities of all above three cellulases in *Glenea cantor*. They were mainly located in the midgut. The endo- β -1, 4-glucoamylase had activity in a broad pH value and temperature range. Optimal pH value and optimal temperature of the endo- β -1, 4-glucoamylase were 9.2 and 50 $^{\circ}$ C, respectively.

Key words: *Glenea cantor*, cellulose, cellulase

21 世纪, 随着社会经济的快速发展, 人类面临着社会经济快速增长、环境保护、生存发展与能源消耗之间的多重矛盾与压力。目前, 人类对石油、天然气等矿物能源的消耗正在以比它们自然形成的速度快大约 100 万倍的速度增长。因此, 如何改变能源的生产方式, 积极探索并寻找矿物替代能源, 加快包括生物质能源在内的可再生能源、资源的开发与利用, 促进人类经济社会的可持续发展, 已引起世界各国的广泛关注^[1]。

纤维素类生物质, 来源于植物, 每年地球上植物的光合作用产生大约 2200 亿吨干生物质, 相当于全球能源消费总量的 10 倍左右。它不仅数量巨大、种类繁多, 而且分布地域广、价格低廉, 是最具有开发意义的生物质资源。亿万年的长期进化使作为陆生植物骨架材料的植物纤维素物质具有非常强的自我保护功能。纤维素的 3 类主要成分——纤维素、半纤维素和木质素本身均为具有复杂空间结构的高分子化合物, 它们相互结合形成复杂的超分子复合物, 并进一步形成各种各样的植物细胞壁结构。这些复杂的三维空间结构使植物体得以避免微生物以及各种物理化学因素的攻击。木质纤维素的这种难降解性是其未得到有效利用的主要原因。已有的提高其降解率的物理、化学预处理方法, 往往因为能耗大、成本

收稿日期: 2011-01-07

作者简介: 杨登峰(1979-), 男, 硕士, 主要从事生物质能源方面的研究。

^{*} 广西科学基金项目(桂科青 0832016)资助。

^{**} 通讯作者。

高、污染环境等问题未能得以实际应用。实现有效利用木质纤维素材料这一目标的最可行的方法是用微生物酶法降解。目前,由于自然界中主要的纤维素降解酶类的比活都较低,致使酶的降解成本较高,影响了酶的广泛使用^[2]。

动物源纤维素酶,尤其是来自于以木质纤维素为食物的节肢动物和软体动物,如白蚁、福寿螺、线虫以及贻贝等的纤维素酶由于其比活高^[3~5],成为人类研究的热点。之前,关于动物纤维素酶来源的问题一直困扰着研究人员,随着研究的深入,这个问题逐渐明朗。反刍动物的纤维素酶主要是来源于其体内的厌氧微生物,而天牛等则是自身分泌纤维素酶^[6~9]。尽管人类已经开始关注天牛纤维素酶,但对它的研究还在起步阶段。目前尚未见任何关于眉斑并脊天牛纤维素酶的研究报道。本实验结合广西的资源特色,考虑到天牛的生活以及采食特性,选取以木棉树(*Bombax ceiba*)为食物的眉斑并脊天牛作为研究对象,对其体内的纤维素酶进行测定。目的是判断其纤维素酶是否有进一步研究的价值;掌握其粗酶液的酶学特性,为进一步研究分离该天牛的纤维素酶奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

眉斑并脊天牛也称眉斑楔天牛(*Glenea cantor*)幼龄幼虫(5条幼虫称重:0.2g)由广西大学陆温老师提供。

羧甲基纤维素、纤维二糖购于Sigma公司,1号滤纸购于Whatmen公司,葡萄糖测定试剂盒购于上海荣盛药业有限公司,葡萄糖、NaCl、KCl、CaCl₂购于国药集团化学试剂有限公司。所有化学药品均为分析纯。

1.2 分析仪器

DU 800 紫外可见分光光度仪(美国 Beckman 公司出品),SUB28 水浴锅(英国 Grant 公司出品)。

1.3 粗酶液的制备

取培养皿,按 1:10(虫体重:昆虫生理盐液, *m/V*)加入昆虫生理盐液(NaCl 8.6g/L, KCl 0.3g/L, CaCl₂ 0.33g/L),清洗虫体。将虫体移入冰浴研钵,按 1:10(虫体重:NaAc-HAc 缓冲液, *m/V*)加入 NaAc-HAc 缓冲液(pH 值 4.4),研磨。研磨液移入预冷的 EP 管中,4℃以下离心,将上清移入干净、预冷的 EP 管,冷冻备用。

1.4 眉斑并脊天牛纤维素酶的酶活力的测定

内切葡聚糖酶、纤维二糖酶、滤纸酶的酶活力测

定均参考 IUPAC 推荐的方法^[10],内切葡聚糖酶、滤纸酶活还原糖含量的测定使用 DNS 法,纤维二糖酶所产生的葡萄糖用葡萄糖测定试剂盒检测,所有实验均重复 3 次。

标准曲线的绘制:葡萄糖标准溶液加入定量的 DNS 试剂,沸水浴显色后定容,在 540nm 波长下测吸光值 *A*,以 *A* 为横坐标、葡萄糖含量为纵坐标绘制葡萄糖标准曲线。

葡萄糖含量的计算:葡萄糖(mmol/L)=样品吸光度(*A*)/校准吸光度(*A*)×校准液浓度;

葡萄糖(mg/L)=葡萄糖(mmol/L)×18。

酶活的计算:标准条件下,每分钟由底物生成 1μM 葡萄糖所需的酶量为 1 U。

酶活力(U/g)=葡萄糖含量(mg)×酶液定容总体积(mL)×1/[0.18×反应液中酶液加入量(mL)×样品重(g)×时间(min)]。

1.5 内切葡聚糖酶最适 pH 值和最适温度的测定

为了进一步研究内切-β-1,4 葡聚糖酶的酶学特性,在 pH 值 2.2~10.4 的范围内,进行酶活力的测定,以确定 pH 值对内切-β-1,4 葡聚糖酶的影响;在 30~80℃的范围内,进行酶活力的测定,以确定温度对内切-β-1,4 葡聚糖酶的影响。所有实验均重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 眉斑并脊天牛 3 种纤维素酶的酶活力

根据 IUPAC 的标准测定方法,对眉斑并脊天牛匀浆粗酶液中内切-β-1,4 葡聚糖酶、纤维二糖酶和滤纸酶的活力进行了测定。结果显示,眉斑并脊天牛含有以上 3 种纤维素酶的活力,内切-β-1,4 葡聚糖酶、纤维二糖酶、滤纸酶活力分别是(146.2±0.36)U/g、(18.2±0.45)U/g、(1.52±0.035)U/g。测到的活力不高,一方面可能是由于采用的是眉斑并脊天牛整个虫体,其中存在大量干扰物质;另一面可能是由于标准条件下的 pH 值或温度不是眉斑并脊天牛纤维素酶所适合的。

2.2 眉斑并脊天牛体内 3 种纤维素酶的分布

根据文献[11]报道,天牛体内的纤维素酶主要分布在肠道中,中肠通常是产生纤维素酶的主要场所。我们对眉斑并脊天牛的前肠、中肠以及后肠进行了纤维素酶活力的定位测定。在前肠和后肠未检测到活力,在中肠检测到活力(表 1),测定结果与文献报道的一致。为了进一步确定眉斑并脊天牛纤维素酶所在的位置,又将中肠分为前中肠、中中肠和后中肠进行测定。发现纤维素酶主要集中在前中肠,其次是中

中肠,再次是后中肠(表1)。

表1 眉斑并脊天牛3种纤维素酶在肠道中的分布

Table 1 Proportion of activity of three cellulases in the alimentary canal of *Glenea cantor*

酶活 Enzyme(U/g)	前肠 Foregut	前中肠 Anterior- midgut	中中肠 Mid- midgut	后中肠 Post- midgut	后肠 Hindgut
内切- β -1,4 葡聚糖酶 Endo- β -1,4-glycanase	0	321.1 \pm 0.74	115.3 \pm 0.54	30.6 \pm 0.18	0
纤维二糖酶 Cellobiase	0	26.6 \pm 0.42	15.4 \pm 0.27	6.2 \pm 0.21	0
滤纸酶 Filter paper enzyme	0	2.68 \pm 0.053	1.3 \pm 0.037	0.4 \pm 0.067	0

2.3 眉斑并脊天牛内切- β -1,4 葡聚糖酶的最适 pH 值和最适温度

内切- β -1,4 葡聚糖酶在广泛的 pH 值范围里都具有活力,在碱性条件下活力较高。当 pH 值低于 2.5 或高于 10.4 时,酶活力急剧下降,最适 pH 值为 9.2(图1)。这个结果与眉斑并脊天牛肠道中的天然 pH 值恰好吻合。由于是以粗酶液进行测定的,测得的酶活力很可能是复合酶作用的结果,但可以确定眉斑并脊天牛肠道中至少存在一种碱性纤维素酶。

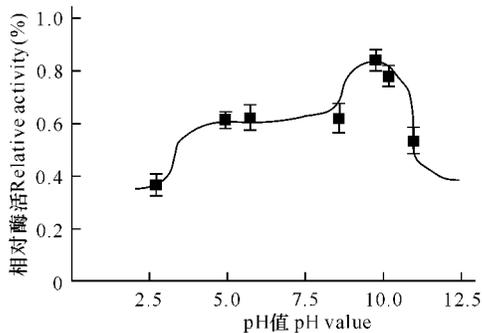


图1 眉斑并脊天牛内切- β -1,4 葡聚糖酶最适 pH 值的测定

Fig.1 Optimal pH value assay of endo- β -1,4-glycanase from *Glenea cantor*

内切- β -1,4 葡聚糖酶属于嗜温酶,有一个相对较宽的温度范围,在低于 75 $^{\circ}$ C 时,均具有较高的酶活力,但是当温度超过该值时,酶活力明显的下降(图2)。从纤维素酶的酶学特性以及眉斑并脊天牛的生活环境考虑,这个结果对眉斑并脊天牛非常有利,是符合进化的需要的。

3 讨论

纤维素酶的重要来源之一是动物,动物源纤维素酶是新型的纤维素酶。研究人员在越来越多的节肢动物和软体动物体内发现了内源性的纤维素酶,这些

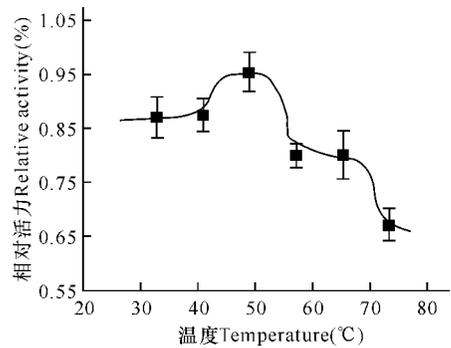


图2 眉斑并脊天牛内切- β -1,4 葡聚糖酶最适温度的测定

Fig.2 Optimal temperature assay of endo- β -1,4-glycanase from *Glenea cantor*

酶由于比活高、适应性强,在工业生产上应用性较强。除了纤维素酶本身,动物利用纤维素酶的机制也成为人类关注的焦点。这些机制将为人类更好地利用纤维素提供一些更为新颖的思路。

据文献报道,桑粒肩天牛 (*Apriona germari*)、星天牛 (*Anoplophora chinensis* Forster) 和枯褐天牛 (*Nedezhdiella cantori* Hope) 消化道组织含有内源性纤维素酶。桑粒肩天牛的内切葡聚糖酶酶活力最强,纤维二糖酶酶活力次之,葡聚糖外切酶酶活力最弱。桑粒肩天牛的内切葡聚糖酶适应较宽的 pH 值范围,具有热耐受性^[8,11,12]。可见天牛的内切葡聚糖酶具有较好的适应性,生产应用潜力较大。

本研究直接以眉斑并脊天牛幼虫虫体匀浆液作为材料,测定其纤维素酶活力,结果与前人报道的相接近。天牛幼虫消化道较细,分离其消化道的步骤较多,需要一定的时间,并且所用材料必须是大龄幼虫。在眉斑并脊天牛纤维素酶3种组分中,各组分酶活力从高到低依次为:内切葡聚糖酶酶活力>纤维二糖酶酶活力>滤纸酶活力,相比来看,滤纸酶活力微弱,内切葡聚糖酶酶活力较强并且具有较强的碱耐受性和热耐受性。目前尚未见任何关于眉斑并脊天牛纤维素酶研究的报道,本研究可以为天牛纤维素酶研究与应用提供一些参考,为下一阶段的研究奠定基础。

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.
- [2] 程备久. 生物质能学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008.
- [3] Smant G, Stokkermans J P, Yan Y, et al. Endogenous cellulases in animals; isolation of β -1,4-endoglycanase genes from two species of plant-parasitic cyst nematodes [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998, 95: 4906-4911.

(下转第 268 页 Continue on page 268)

- [9] Salovuori I, Makarow M, Rauvala H, et al. Low molecular weight high-mannose type glycans in a secreted protein of the filamentous fungus *Trichoderma Reesei* [J] . Nature Biotechnology, 1987, 5: 152-156.
- [10] Gao P J, Yinbo Q, Zunong Wang. Effects of endoglucanase from *Trichoderma Viride* A10 in cellulose hydrolysis[J] . Progress in Natural Science, 1992, 2(5): 449.
- [11] Wang H, Jones R W. Cloning, characterization and functional expression of an endoglucanase - encoding gene from the phytopathogenic fungus *Macrophomina Phaseolina* [J] . Gene, 1995, 158(1): 125-128.
- [12] 吴志红, 汪天虹, 黄卫, 等. 简便易行的丝状真菌染色体 DNA 提取法 [J] . 菌物系统, 2001, 20(4): 575-577.
- [13] 艾云灿, 赵学慧, 汪履绶. 黑曲霉与里氏木霉原生质体形成和再生条件选择 [J] . 华中农业大学学报, 1993, 12(4): 376-381.
- [14] Qi X H, Huang R B. Improve and application of DNA shuffling on microbiology enzyme [J] . Biotechnology, 2005, 14: 72-74.
- [15] Okada H, Tada K, Sekiya T, et al. Molecular characterization and heterologous expression of the gene encoding a low - molecular - mass endoglucanase from *Trichoderma Reesei* Qm9414 [J] . Appl Environ Microbiol, 1998, 64(2): 555-563.
- [16] Olmedo-Monfil V, Cortés-Penagos C, Herrera-Estrella A. Three decades of fungal transformation: key concepts and applications [J] . Methods Mol Biol, 2004, 267: 297-313.
- [17] Zhang Y H, Lynd L R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: non-complexed cellulase systems [J] . Biotechnol Bioeng, 2004, 88(7): 797-824.
- [18] 傅力, 丁友昉, 张箴. 纤维素酶测定方法的研究 [J] . 新疆农业大学学报, 2003, 23(2): 45-48.

(责任编辑: 尹 闯)

(上接第 263 页 Continue from page 263)

- [4] 李燕红, 赵辅昆. 纤维素酶的研究进展 [J] . 生命科学, 2005, 17(5): 392-397.
- [5] Watanabe H, Tokuda G. Animal cellulases [J] . Cellular and Molecular life Sciences, 2001, 58: 1167-1179.
- [6] Sugimura M, Watanabe H, Lo N, et al. Purification, characterization, cDNA cloning and nucleotide sequencing of a cellulase from the yellow-spotted longicorn beetle, *Psacotha hilaris* [J] . European Journal of Biochemistry, 2003, 270(16): 3455-3460.
- [7] Lee S J, Kim S R, Yoon H J, et al. cDNA cloning, expression, and enzymatic activity of a cellulase from the mulberry longicorn beetle, *Apriona germari* [J] . Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2004, 139(1): 107-116.
- [8] Lee S J, Lee K S, Kim S R, et al. A novel cellulase gene from the mulberry longicorn beetle, *Apriona germari*: gene structure, expression, and enzymatic activity [J] . Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2005, 140: 551-560.
- [9] Wei Y D, Lee K S, Gui Z Z, et al. Molecular cloning, expression, and enzymatic activity of a novel endogenous cellulase from the mulberry longicorn beetle, *Apriona germari*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2006, 145(2): 220-229.
- [10] Ghose T K. Measurement of cellulase activities [J] . Pure and Applied Chemistry, 1987, 59: 257-268.
- [11] 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: 441-446.
- [12] 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: 454-459.

(责任编辑: 陈小玲)