

doi: 10.11707/j.1001-7488.20130123

## 4 种植食性甲虫肠道内纤维素酶活性的比较\*

李燕利<sup>1,2</sup> 薛怀君<sup>2</sup> 胡春祥<sup>1</sup> 杨星科<sup>2</sup>

(1. 东北林业大学林学院 哈尔滨 150040; 2. 中国科学院动物研究所动物进化与系统学国家重点实验室 北京 100101)

**摘要:** 为比较和客观评价昆虫体内纤维素酶的活性,在不同温度及 pH 值下测定杨叶甲、二纹柱萤叶甲、紫榆叶甲成、幼虫及双条杉天牛幼虫消化道内 3 类纤维素酶的活性。结果表明: 4 种甲虫体内均有消化纤维素的完整酶系, 3 种叶甲成、幼虫体内各纤维素酶的最适温区为 40~60 °C、最适 pH 值范围为 4~6, 在高温和强碱条件下均未能检测出酶活性; 双条杉天牛幼虫  $C_1$  酶活性在强碱 pH=9 和 70 °C 条件下活性最高,  $C_x$  酶和  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性低于 3 种叶甲的成虫和幼虫,  $C_1$  酶活性显著高于 3 种叶甲的成虫和幼虫。温度和 pH 值对昆虫体内纤维素酶活性有显著的影响, 甲虫取食习性的不同可能导致体内纤维素酶活性的差异, 酶活性的差异是否受到昆虫亲缘关系的影响还需要进一步研究。

**关键词:** 叶甲; 天牛; 纤维素酶; 温度; pH 值

**中图分类号:** S718.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-7488(2013)01-0161-08

### Comparison of Gut Cellulase Activity in Four Herbivorous Beetles

Li Yanli<sup>1,2</sup> Xue Huaijun<sup>2</sup> Hu Chunxiang<sup>1</sup> Yang Xingke<sup>2</sup>

(1. School of Forestry, Northeast Forestry University Harbin 150040; 2. Key Laboratory of Zoological Systematics and Evolution, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences Beijing 100101)

**Abstract:** To compare and estimate the cellulose enzyme activity in different insects, the paper presented a comprehensive analysis of enzyme activity from the gut juices of four herbivorous insect species (larvae and adults of three leaf-eating beetles, *Chrysomela populi*, *Ambrostoma quadriimpressum* and *Gallerucida bifasciata*, and larva of a trunk-borer, *Semanotus bifasciatus*). The results showed that there were complete cellulase systems in these four beetles, and that both temperature and pH had a significant impact on the enzyme activity in the gut contents. For both larvae and adults of three leaf beetles, the optimal conditions of enzyme activity were 40~60 °C and pH 4~6, and the enzyme activity could not be detected under high temperature and high pH conditions. However, in trunk-borer of *S. bifasciatus* the highest enzyme activity of exoglucanase ( $C_1$ ) was observed at pH 9 and 70 °C. In addition, the enzyme activities of endoglucanase ( $C_x$ ) and  $\beta$ -glucosidase in *S. bifasciatus* were lower than that of the leaf beetles, while the enzyme activity of  $C_1$  was much higher than that of these leaf beetles. The results indicated that temperature and pH had significant influence on insect cellulose enzyme activity. The different feeding habits and the phylogenetic relationship may result in different enzyme activity.

**Key words:** leaf beetle; longhorn beetle; cellulose; temperature; pH value

地球上每年通过光合作用合成的纤维素约 1 000 亿吨(杨天赐等, 2006)。纤维素是地球上分布最广、最丰富的可再生生物资源, 纤维素的利用和转化对于解决目前世界能源危机、粮食短缺、环境污染等问题具有十分重要的意义(顾方媛等, 2008; 段旭等, 2009; Shi *et al.*, 2011)。利用纤维素酶对纤维素进行降解利用是最为有效的方法。近年来, 昆虫纤维素酶在工业生产和能源领域的潜在利用价值备受关注(Scharf *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2010;

Sun *et al.*, 2010; Willis *et al.*, 2010)。

一些昆虫能够利用纤维素酶消化食物中的纤维素, 以获得生长发育所需的营养。昆虫体内共生微生物分泌的纤维素酶最早发现于白蚁和蜚蠊肠内(Cleveland, 1924; 1934), 此后其他昆虫体内也检测到了纤维素酶的存在(蒋书楠等, 1996; 殷幼平等, 1996; 2000; 杨天赐等, 2003; 索风梅等, 2004; Lee *et al.*, 2005; 2006; Wei *et al.*, 2005; 2006; Nakonieczny *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2008; 黄祥财等,

收稿日期: 2012-02-27; 修回日期: 2012-05-03。

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-EW-G-4; KSCX1-YW-11E2)。

\* 胡春祥为通讯作者。

2008; Oppert *et al.*, 2010; Shi *et al.*, 2011)。研究表明:除了昆虫肠内共生微生物产生纤维素酶以外,一些昆虫体内还存在内源的纤维素酶,至少有 7 个目 28 个种的昆虫纤维素酶基因已经被发现或克隆(Watanabe *et al.*, 2010; Calderón-Cortés *et al.*, 2010)。

鞘翅目昆虫(甲虫)是生物界最大的类群,目前已记录的种类超过 35 万种,其中一半以上为植食性,取食各种植物及植物的不同组织和部位(Beutel *et al.*, 2000)。复杂的食性很可能使其纤维素酶的特性存在很大差异,为进一步寻找和开发高效纤维素酶系提供了丰富的资源。目前对鞘翅目昆虫纤维素酶的研究还很有限,特别是缺乏同种条件下不同昆虫肠道内纤维素酶活性的综合比较研究。蒋书楠等(1996)比较了隶属于不同亚科的 3 种天牛的纤维素酶的活性;段旭等(2009)比较研究了松墨天牛(*Monochamus alternatus*)和中国圆田螺(*Cipangopaludina chinensis*)体内纤维素酶系;Shi 等(2011)比较研究了分属于 3 个目的 3 种食性不同的昆虫木聚糖酶和纤维素酶活性,其中包括 1 种天牛;Oppert 等(2010)对昆虫纲 8 个目 68 个种的植食性昆虫的纤维素酶活性进行了比较研究,其中涉及鞘翅目昆虫 7 科 10 种,是迄今为止涵盖类群和种类最多的纤维素酶活性的比较研究。

由于纤维素酶的活性于受到底物浓度、反应时间等诸多因素的限制,检测结果也容易受到蛋白质定量方法等因素的影响,很难和其他人的研究结果直接进行定量比较(Oppert *et al.*, 2010)。因此,在相同反应条件下对不同昆虫肠道内纤维素酶活性的比较研究具有重要意义。本文在不同温度和 pH 值条件下检测了 3 种叶甲的成、幼虫及 1 种天牛幼虫体内纤维素酶的活性,希望在同等条件下客观评价甲虫体内的纤维素酶活性,为寻找高效昆虫源纤维素酶系提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 虫体来源

杨叶甲(*Chrysomela populi*)和二纹柱萤叶甲(*Gallerucida bifasciata*)成虫及幼虫采于北京门头沟区泗家水,紫榆叶甲(*Ambrostoma quadriimpressum*)成虫和幼虫采于东北林业大学校园,双条杉天牛(*Semanotus bifasciatus*)幼虫采于北京植物园。

### 1.2 试剂来源

羧甲基纤维素(CMC)和水杨素(Salicin)均由 Sigma 公司生产,微晶纤维素(MCC)由 Fluka 公司生产,其他试剂未有特别说明均为国产分析纯。

### 1.3 酶液的制备

分别取试验用虫 10 头,冰浴解剖,取出肠道,用  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  pH7.4 的磷酸缓冲液在冰上充分匀浆后于  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$   $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min,上清液即为原酶液,分装后置于  $-70 \text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存备用。

### 1.4 纤维素酶活性的测定

酶液的蛋白含量测定采用考马斯亮蓝 G-250 染色法测定(Bradford, 1976)。纤维素酶活性的测定采用 DNS 法(Oppert *et al.*, 2010; Shi *et al.*, 2011),略有改进。本研究在 5 个温度和 7 个 pH 值(共计 35 个组合)条件下分别对内切  $\beta$ -1,4-葡聚糖酶( $C_x$  酶)、外切  $\beta$ -1,4-葡聚糖酶( $C_1$  酶)和  $\beta$ -葡萄糖苷酶的活性进行比较测定。

$C_x$  酶的测定用 1% 羧甲基纤维素为底物, $C_1$  酶的测定用 2% 微晶纤维素为底物, $\beta$ -葡萄糖苷酶的测定用 2% 水杨素为底物。各底物分别用 pH 值为 3,4,5,6,7,8 的磷酸二氢钠-柠檬酸缓冲液( $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )和 pH 为 9 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液( $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )配制。

取稀释酶液 0.1 mL 与 0.5 mL 上述底物充分混匀,分别在 30,40,50,60,70  $^{\circ}\text{C}$  水浴中温育 2 h 后,加入 DNS 显色剂 2 mL,沸水浴显色 5 min,流水冷却,在 540 nm 下测定 OD 值,每测定重复 3 次,取平均值,同时设空白对照。以试验条件下酶液蛋白含量(mg)在单位时间(min)内酶促反应产生的还原糖(葡萄糖)量( $\mu\text{mol}$ )计算酶活性,即  $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (Shi *et al.*, 2011)。

### 1.5 数据分析

温度和 pH 值对甲虫体内纤维素酶活性影响采用方差分析法,各甲虫纤维素酶最适温度和 pH 值条件下的活性值采用多重比较分析。所有数据处理均使用统计软件 SPSS 18.0。

## 2 结果与分析

### 2.1 杨叶甲成虫和幼虫体内纤维素酶活与 pH 值和温度的关系

从图 1 可以看出:pH 值和温度的变化对杨叶甲成虫 3 种纤维素酶活性有显著影响。 $C_x$  酶、 $\beta$ -葡萄糖苷酶的最适温区为  $40 \sim 60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,最适 pH 在 4~6 之间,但  $C_1$  酶活性在各组合条件下都很低。

杨叶甲幼虫  $C_x$  酶最适温区在  $40 \sim 60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,最适 pH 为 4~6,最高酶活性是  $0.12 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (pH=4,  $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ); $\beta$ -葡萄糖苷酶的最适温区为  $30 \sim 60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,最适 pH 为 5~6; $C_1$  酶活性在各个条件下都较低,pH 为 4~7 时有相对高的活性(图 1)。

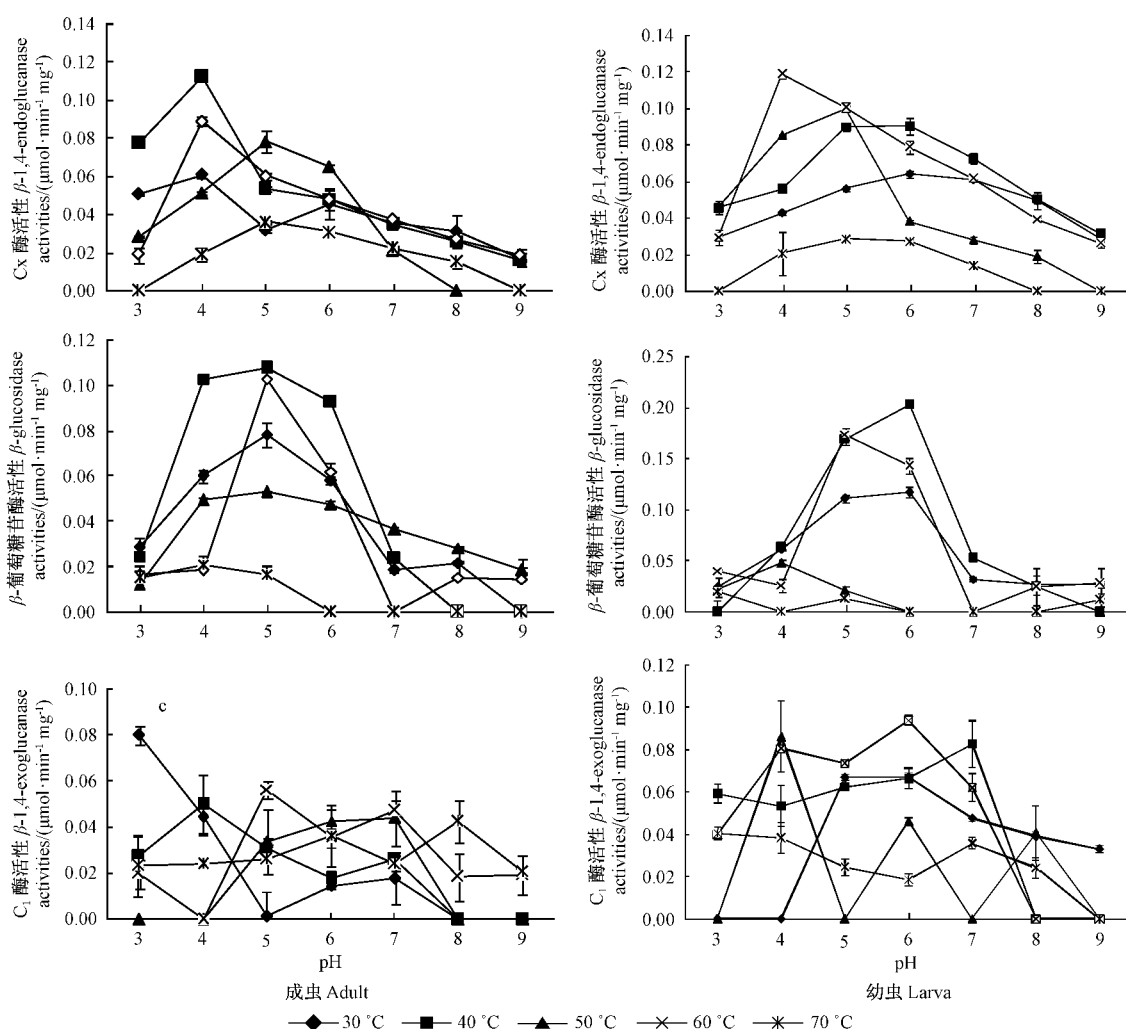


图 1 杨叶甲 3 种纤维素酶活性

Fig. 1 Cellulase activities of *C. populi*

2.2 紫榆叶甲成虫和幼虫体内纤维素酶活性与 pH 值和温度的关系

图 2 表明: 对于紫榆叶甲成虫, Cx 酶活性最适温区为 40~60 °C, 最适 pH 为 5~6; β-葡萄糖苷酶只有在温区 30~50 °C, pH 为 5~6 时有很高酶活性; 在 pH = 3, 4, 9 时, 各温区 C<sub>1</sub> 酶活性均较低。

紫榆叶甲幼虫 Cx 酶最适温区为 30~60 °C, 最适 pH 为 4~6 (pH = 3 除外), 其中 pH = 5 时酶活性最高, 为 0.30 μmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>; β-葡萄糖苷酶在 40~50 °C, pH 为 5~6 条件下有很高酶活性; C<sub>1</sub> 酶只有在 pH 为 5, 6, 7 条件下有相对较高的酶活性(图 2)。

2.3 二纹柱萤叶甲成虫和幼虫体内纤维素酶活性与 pH 值和温度的关系

图 3 表明: 二纹柱萤叶甲成虫 Cx 酶在最适温区 30~40 °C, pH = 4 时的活性明显高于其他 pH 条件;

β-葡萄糖苷酶活性很低; C<sub>1</sub> 酶在 50 °C 时酶活性较高, 且 pH = 7 条件下达到最高值 (0.20 ± 0.03 μmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>)。

二纹柱萤叶甲幼虫 Cx 酶活性最适温区为 40~50 °C, 最适 pH 为 5~6; β-葡萄糖苷酶活性只有在 40~50 °C 温区内, pH 为 5, 6 时有很高酶活性, 其他 pH 条件下酶活性均很低; C<sub>1</sub> 酶活性都很低(图 3)。

2.4 双条杉天牛幼虫体内纤维素酶活性与 pH 值和温度的关系

图 4 表明: 双条杉天牛幼虫体内 Cx 酶活性很低, 在 60 °C 温度下 pH 为 5, 6, 7 时较高, 最高活性只有 0.08 μmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>。β-葡萄糖苷酶在所有条件下活性都很低; C<sub>1</sub> 酶在温区 30~60 °C 时酶活性很低, 在 70 °C 下 pH 为 6, 7, 8, 9 时 C<sub>1</sub> 酶活性逐渐升高, pH = 9 时达到最高值 (0.32 μmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>)。

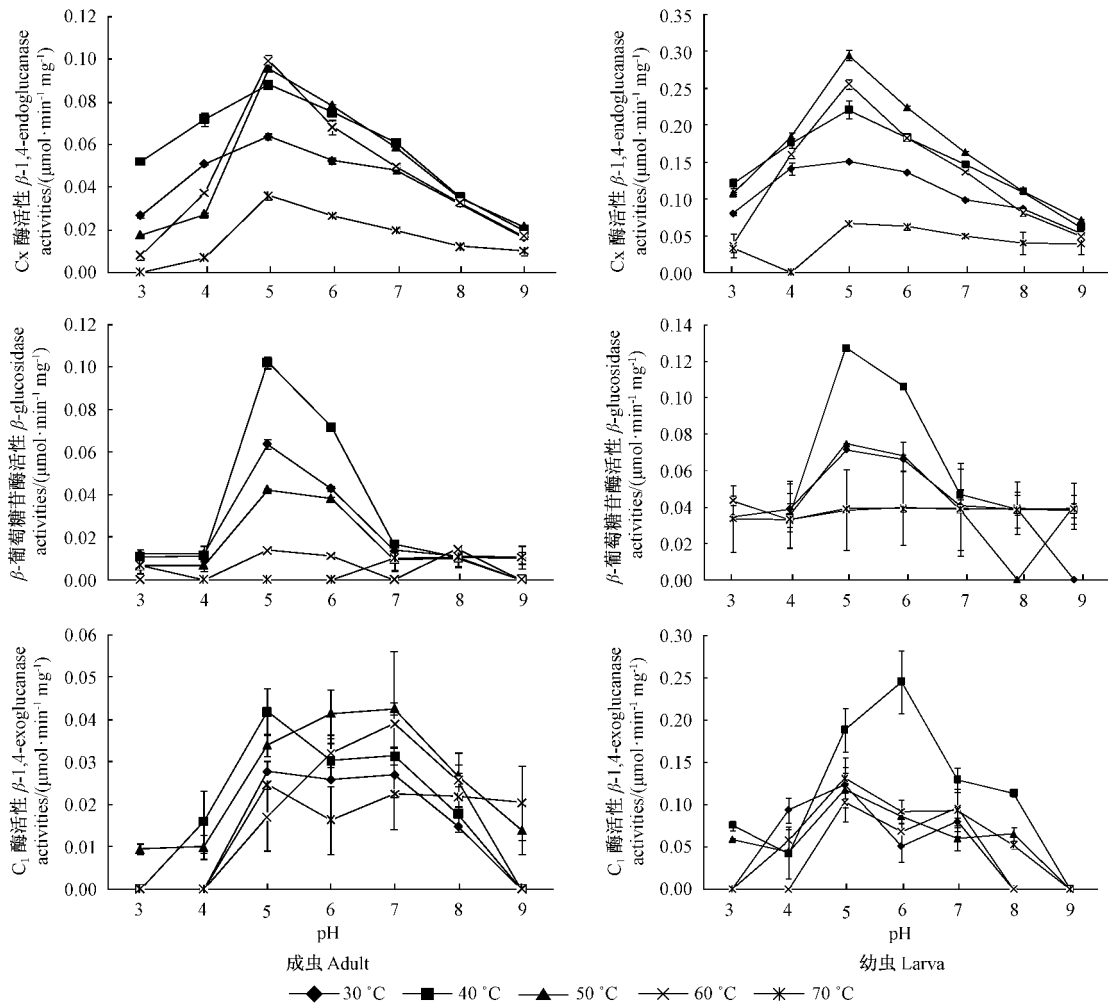


图2 紫榆叶甲3种纤维素酶活性

Fig.2 Cellulase activities of *A. quadriimpresum*

## 2.5 温度和 pH 值对 3 种纤维素酶活性的影响

2 因素方差分析结果表明(表 1): 温度和 pH 值对 4 种甲虫 7 种虫态的纤维素酶活性均影响显著 ( $P < 0.01$ ), 温度和 pH 值的互作也显著影响纤维素酶的活性 ( $P < 0.01$ )。

## 2.6 最适条件下各甲虫体内纤维素酶活性比较

表 2 表明: 在各自的最适条件下 4 种甲虫 7 种虫态的 C<sub>x</sub> 酶 ( $df = 6, F = 157.65, P < 0.01$ )、 $\beta$ -葡萄糖苷酶 ( $df = 6, F = 1003.13, P < 0.01$ )、C<sub>1</sub> 酶活性均存在显著差异 ( $df = 6, F = 31.97, P < 0.01$ )。其中, C<sub>x</sub> 酶活性在紫榆叶甲、二纹柱萤叶甲的成、幼虫间均有显著差异性, 杨叶甲成、幼虫间无显著差异, 双条杉天牛幼虫酶活性最低, 紫榆叶甲幼虫最高;  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性在 3 种叶甲成、幼虫间差异显著, 杨叶甲幼虫酶活性最高, 双条杉天牛幼虫最低; C<sub>1</sub> 酶活性在杨叶甲成、幼虫间无明显差异, 紫榆叶甲、二纹柱萤叶甲成、幼虫间均有显著差异性, 双

条杉天牛幼虫酶活性最高。

## 3 讨论

本文研究的 4 种甲虫体内均存在完整的纤维素酶系, 但各甲虫体内纤维素酶活性不尽相同。3 种叶甲类昆虫体内各纤维素酶的最适温区为 40 ~ 60 °C, 最适 pH 范围为 4 ~ 6, 而高温、强碱条件下均未能检测出酶活性。其他一些甲虫也多有类似的规律, 例如, 赤拟谷盗 (*Tribolium castaneum*) (Rehman, 2009)、芫菁 (*Mylabris pustulata*) (Sami *et al.*, 2011) 和几种天牛在酸性条件下酶活性较高(殷幼平等, 1996; Scrivener *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2004; 索风梅等, 2004)。这可能是因为植物中含有的纤维素、半纤维素和木质素等结晶组织需要酸性条件下分解。酸性处理纤维素底物能够产生非结晶末端, 使纤维素更容易被分解 (Sami *et al.*, 2011)。但不同温度和 pH 值条件下叶甲科 3 种甲

虫成、幼虫纤维素酶活性的变化似乎没有一致的规律可循,这是否与成、幼虫取食特性的差异有关尚缺

乏证据。

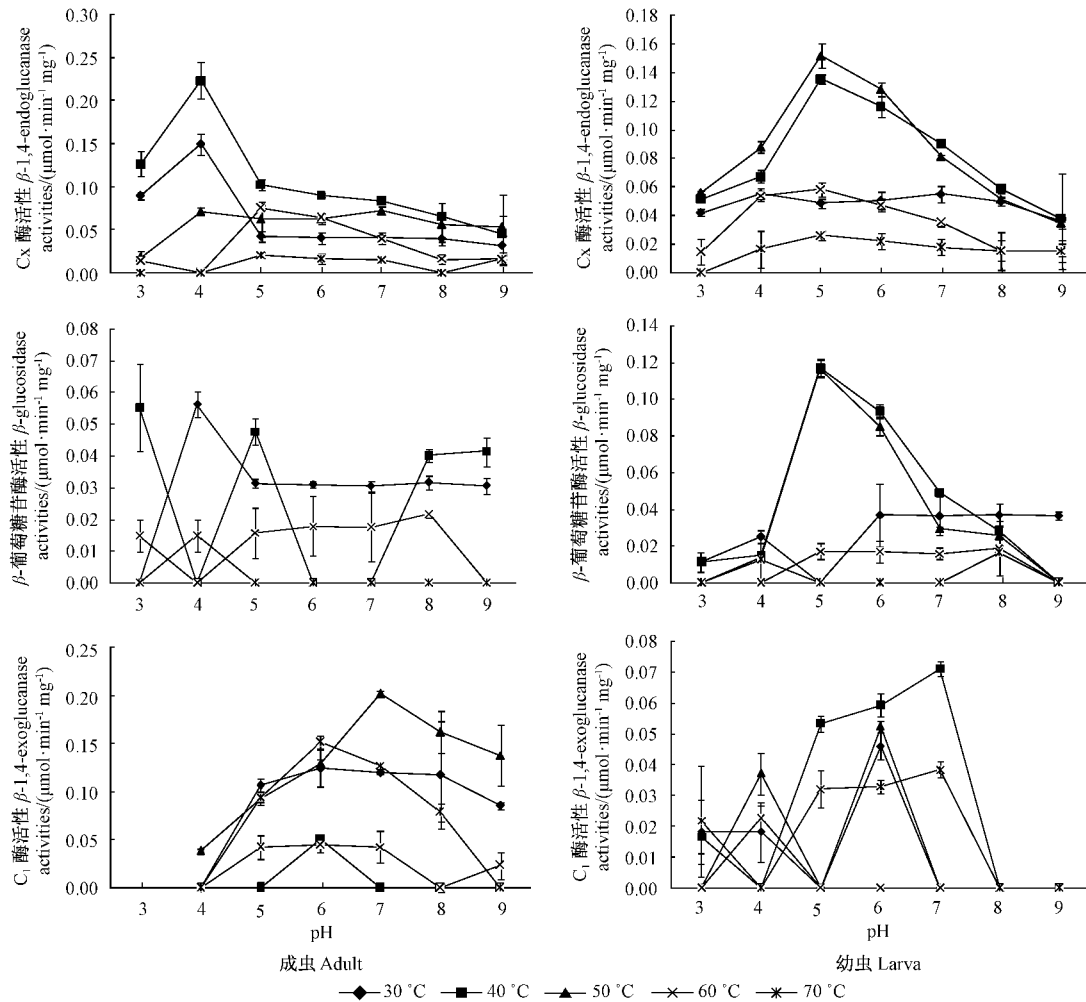


图 3 二纹柱萤叶甲 3 种纤维素酶活性

Fig. 3 Cellulase activities of *G. bifasciata*

本试验发现双条杉天牛幼虫  $C_1$  酶活性显著高于另外 2 种酶,且在强碱 ( $\text{pH} = 9$ ) 和高温 ( $70\text{ }^\circ\text{C}$ ) 条件下活性最高,这跟以往对天牛的研究结果不同。殷幼平等 (1996) 发现桑粒肩天牛 (*Apriona germari*) 的 Cx 酶最适 pH 值为 4.4,最适温区为  $30\text{ }^\circ\text{C} \sim 45\text{ }^\circ\text{C}$ ;  $\beta$ -葡萄糖苷酶的活性最适 pH 值为 5.6,最适温区为  $45\text{ }^\circ\text{C} \sim 50\text{ }^\circ\text{C}$ ;  $C_1$  酶在各种条件下活性均很弱,最适 pH 值为 4.6 ~ 6.4。蒋书楠等 (1996) 对 3 种隶属于不同亚科的天牛的纤维素酶活性进行比较分析,同样发现  $C_1$  酶活性很低。Chen 等 (2002) 研究光肩星天牛 (*Anoplophora glabripennis*) 幼虫纤维素酶的特性,结果表明: Cx 酶和  $\beta$ -葡萄糖苷酶的最适温度均为  $40\text{ }^\circ\text{C}$ ,最适 pH 值分别为 4.4 ~ 5.6 和 4.8;  $C_1$  酶活性很低。索风梅等 (2004) 对松墨天牛 (*Monochamus alternatus*) 幼虫

的研究结果与双条杉天牛类似,3 种纤维素酶中  $C_1$  酶活性最高,但  $C_1$  酶、Cx 酶和  $\beta$ -葡萄糖苷酶的最适温区分别为  $35\text{ }^\circ\text{C} \sim 55\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $45\text{ }^\circ\text{C} \sim 55\text{ }^\circ\text{C}$  和  $40\text{ }^\circ\text{C} \sim 50\text{ }^\circ\text{C}$ ,最适 pH 值分别为 5.0、5.6 和 5.0。总体来看,不同种类天牛体内各种纤维素消化酶的活性最适温区主要集中在  $30\text{ }^\circ\text{C} \sim 50\text{ }^\circ\text{C}$ ,最适 pH 值范围为 4.4 ~ 5.6,与本研究情况类似。但 Shi 等 (2011) 测定了一种未定名天牛体内的 Cx 酶,发现在 pH 值为 10 的条件下仍具有较高活性;很多金龟幼虫肠道呈碱性,碱性肠道环境可以提高有机聚合物的溶解性,促进木质素水解 (Biggs *et al.*, 1996; Cazemier *et al.*, 1997; Egert *et al.*, 2003; 2005)。昆虫体内这种耐高温耐强碱酶的存在为高效纤维素酶系的开发和利用提供了新的方向。

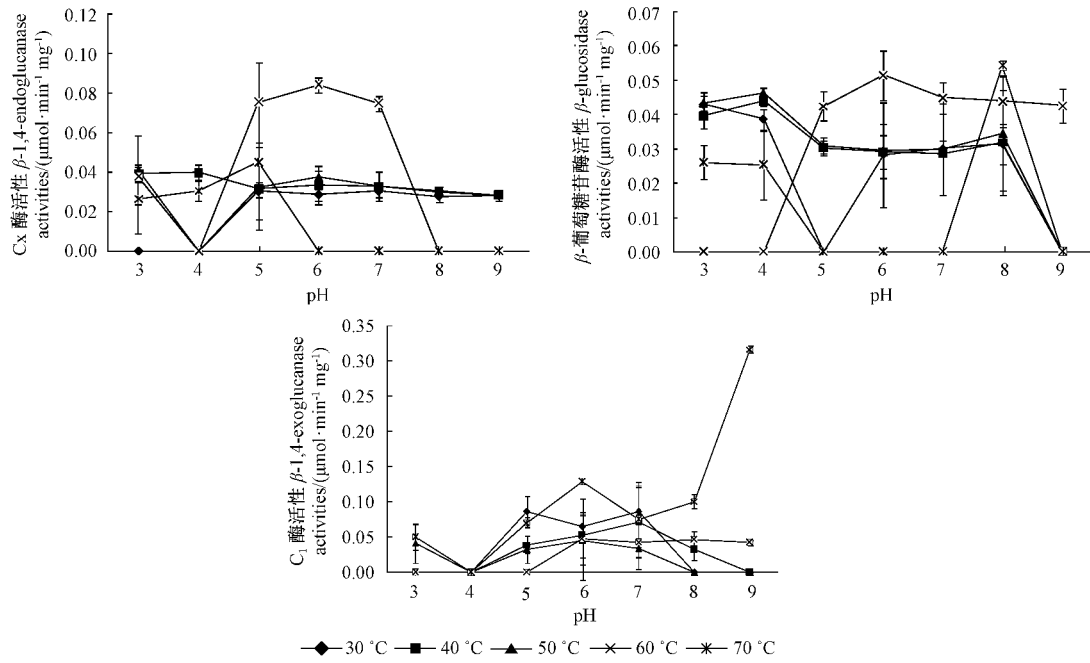


图 7 双条杉天牛幼虫 3 种纤维素酶活性

Fig. 7 Cellulase activities of *S. bifasciatus* larva

表 1 温度和 pH 值对 3 种纤维素酶活性的交互作用

Tab. 1 Interactions between temperature and pH effects on three kinds of cellulase activities

虫种 Beetle	因素 Factor	Cx 酶 β-1,4-endoglucanase			β-葡萄糖苷酶 β-glucosidase			C <sub>1</sub> 酶 β-1,4-exoglucanase		
		df	F	Sig.	df	F	Sig.	df	F	Sig.
杨叶甲成虫 <i>C. populi</i> adult	pH	6	508.547	<0.01	6	320.587	<0.01	6	19.423	<0.01
	温度 Temperature	4	309.172	<0.01	4	187.080	<0.01	4	4.713	<0.01
	pH × 温度 pH × Temperature	24	82.842	<0.01	24	45.462	<0.01	24	15.692	<0.01
杨叶甲幼虫 <i>C. populi</i> larva	pH	6	728.937	<0.01	6	837.713	<0.01	6	27.342	<0.01
	温度 Temperature	4	1 057.876	<0.01	4	752.200	<0.01	4	13.526	<0.01
	pH × 温度 pH × Temperature	24	107.208	<0.01	24	190.350	<0.01	24	11.180	<0.01
榆紫叶甲成虫 <i>A. quadripunctum</i> adult	pH	6	257.163	<0.01	6	882.051	<0.01	6	48.323	<0.01
	温度 Temperature	4	162.783	<0.01	4	690.598	<0.01	4	9.295	<0.01
	pH × 温度 pH × Temperature	24	13.607	<0.01	24	189.075	<0.01	24	2.873	<0.01
榆紫叶甲幼虫 <i>A. quadripunctum</i> larva	pH	6	905.469	<0.01	6	41.410	<0.01	6	63.849	<0.01
	温度 Temperature	4	1 175.261	<0.01	4	8.404	<0.01	4	28.894	<0.01
	pH × 温度 pH × Temperature	24	75.678	<0.01	24	12.912	<0.01	24	6.672	<0.01
二纹柱萤叶甲成虫 <i>G. bifasciata</i> adult	pH	6	6.283	<0.01	6	6.843	<0.01	6	79.361	<0.01
	温度 Temperature	4	44.557	<0.01	4	130.476	<0.01	4	128.628	<0.01
	pH × 温度 pH × Temperature	24	5.113	<0.01	24	25.856	<0.01	24	12.920	<0.01
二纹柱萤叶甲幼虫 <i>G. bifasciata</i> larva	pH	6	142.189	<0.01	6	199.604	<0.01	6	31.301	<0.01
	温度 Temperature	4	337.475	<0.01	4	257.809	<0.01	4	28.589	<0.01
	pH × 温度 pH × Temperature	24	20.638	<0.01	24	82.869	<0.01	24	12.424	<0.01
双条杉天牛幼虫 <i>S. bifasciatus</i> larva	pH	6	26.571	<0.01	6	12.369	<0.01	6	6.612	<0.01
	温度 Temperature	4	20.171	<0.01	4	5.137	<0.01	4	14.405	<0.01
	pH × 温度 pH × Temperature	24	13.317	<0.01	24	7.810	<0.01	24	3.139	<0.01

表 2 最适条件下各甲虫 3 种纤维素酶活性比较<sup>①</sup>

Tab.2 Comparison of the beetles' three cellulase activities in optimum condition

虫种 Beetle	Cx 酶活性 $\beta$ -1 <i>A</i> -endoglucanase ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ )		$\beta$ -葡萄糖苷酶 $\beta$ -glucosidase/ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ )		C <sub>1</sub> 酶活性 $\beta$ -1 <i>A</i> -exoglucanase activities/( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ )	
	最适条件 Optimum condition	酶活性 Cellulase activity	最适条件 Optimum condition	酶活性 Cellulase activity	最适条件 Optimum condition	酶活性 Cellulase activity
	杨叶甲成虫 <i>C. populi</i> adult	pH = 4.40 °C	0.11 ± 0.00d	pH = 5.40 °C	0.11 ± 0.00d	pH = 3.30 °C
杨叶甲幼虫 <i>C. populi</i> larva	pH = 4.60 °C	0.12 ± 0.00d	pH = 6.40 °C	0.20 ± 0.00a	pH = 6.60 °C	0.09 ± 0.00c
紫榆叶甲成虫 <i>A. quadriimpressum</i> adult	pH = 5.60 °C	0.10 ± 0.00de	pH = 5.40 °C	0.10 ± 0.00e	pH = 5.40 °C	0.04 ± 0.01c
紫榆叶甲幼虫 <i>A. quadriimpressum</i> larva	pH = 5.50 °C	0.30 ± 0.01a	pH = 5.40 °C	0.13 ± 0.00b	pH = 6.40 °C	0.25 ± 0.06b
二纹柱萤叶甲成虫 <i>G. bifasciata</i> adult	pH = 4.40 °C	0.22 ± 0.02b	pH = 4.40 °C	0.06 ± 0.01f	pH = 7.50 °C	0.20 ± 0.03b
二纹柱萤叶甲幼虫 <i>G. bifasciata</i> larva	pH = 5.50 °C	0.15 ± 0.01c	pH = 5.40 °C	0.12 ± 0.00c	pH = 7.40 °C	0.07 ± 0.02c
双条杉天牛幼虫 <i>S. bifasciatus</i> larva	pH = 6.60 °C	0.08 ± 0.04e	pH = 8.70 °C	0.05 ± 0.00f	pH = 9.70 °C	0.32 ± 0.048a

① 表中酶活性数据为平均值 ± 标准误, 同一行内数据后不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ , 邓肯氏新复极差测验)。Data of cellulose activities are mean ± SE, and those in the same row followed by different small letters are significantly different by Duncan's test ( $P < 0.05$ ).

一些研究认为: 昆虫体内酶的活性与其系统地位存在相关性, 系统发育关系比食性对昆虫纤维素酶活性的影响更大 (Yokoe *et al.*, 1964; Watanabe *et al.*, 2001; Oppert *et al.*, 2010)。本研究中的 3 种叶甲纤维素酶系组成和活性更为相似, 一种可能的解释是它们的亲缘关系更为接近, 另外一种可能的原因则是由于食性的差异。这种“酶的活性和系统发育相吻合”规律是否真实存在, 并且在什么层次上的分类阶元上才能得以体现还需要更进一步的研究工作。本研究通过提取完整的消化道制取酶液, 初步检测和比较了几种甲虫体内纤维素酶的活性, 而纤维素酶在肠道内的具体分布位置、是否存在共生微生物(纤维素酶的外源性和内源性)等问题还需要进一步研究探讨。

### 参 考 文 献

- 段旭, 张晶晶, 朱静. 2009. 松墨天牛和中国圆田螺体内纤维素酶系的比较研究. 云南农业大学学报, 24(4): 545-551.
- 顾方媛, 陈朝银, 石家骥. 2008. 纤维素酶的研究进展与发展趋势. 微生物学杂志, 28(1): 81-87.
- 黄祥财, 王国红. 2008. 黄粉虫纤维素酶性质的研究. 江西植保, 31(2): 67-70.
- 蒋书楠, 殷幼平, 王中康. 1996. 几种天牛纤维素酶的来源. 林业科学, 32(5): 441-446.
- 索风梅, 林长春, 王浩杰, 等. 2004. 松墨天牛纤维素酶的研究 I. 纤维素酶性质研究. 林业科学研究, 17(5): 583-589.
- 杨天赐, 莫建初, 程家安. 2001. 白蚁消化纤维素机理研究进展. 林业科学, 42(1): 110-115.
- 杨天赐, 莫建初, 程家安. 2003. 黄胸散白蚁纤维素酶的研究. 中国森林病虫, 22(6): 4-7.
- 殷幼平, 曹月青, 何正波. 2000. 桑粒肩天牛 3 种纤维素消化酶的分布. 林业科学, 36(6): 82-85.
- 殷幼平, 程惊秋, 蒋书楠. 1996. 桑粒肩天牛纤维素酶的性质研究. 林业科技, 32(5): 454-459.
- Biggs D R, McGregor P G. 1996. Gut pH and amylase and protease activity in larvae of the New Zealand grass grub (*Costelytra zealandica*; Coleoptera: Scarabaeidae) as a basis for selecting inhibitors. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 26(1): 69-75.
- Beutel R G, Haas F. 2000. Phylogenetic relationships of the suborders of Coleoptera (Insecta). Cladistics, 16(1): 103-141.
- Bradford M M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72(1/2): 248-254.
- Calderón-Cortés N, Watanabe H, Cano-Camacho H, *et al.* 2010. cDNA cloning, homology modelling and evolutionary insights into novel endogenous cellulases of the borer beetle *Oncideres albomarginata* chamele (Cerambycidae). Insect Molecular Biology, 19(3): 323-336.
- Cazemier A E, Op den Camp H J, Hackstein J H P, *et al.* 1997. Fibre digestion in arthropods. Comparative Biochemistry and Physiology A, 118(1): 101-109.
- Chen M, Lu M Z, Zhang Z Y. 2002. Characteristics of cellulases from *Anoplophora glabripennis* Motsch. (Coleoptera: Cerambycidae). Forestry Studies in China, 4(2): 43-47.
- Cleveland L R. 1924. The physiology and symbiotic relationships between the intestinal protozoa of termites and their host, with special reference to *Reticulitermes flavipes*. The Biological Bulletin, 46(5): 203-227.
- Cleveland L R. 1934. The wood-feeding roach *Cryptocercus*, its protozoa, and the symbiosis between protozoa and roach. Memoirs of the American Academy of Sciences, 17(2): 185-342.
- Egert M, Stingl U, Bruun D L, *et al.* 2005. Structure and topology of microbial communities in the major gut compartments of *Melolontha melolontha* larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). Applied and Environmental Microbiology, 71(8): 4556-4566.
- Egert M, Wagner B, Lemke T, *et al.* 2003. Microbial community structure in midgut and hindgut of the humus-feeding larva of *Pachnoda ephippiata* (Coleoptera: Scarabaeidae). Applied and Environmental Microbiology, 69(11): 6659-6668.
- Huang S W, Zhang H Y, Marshall S, *et al.* 2010. The scarab gut: A

- potential bioreactor for bio-fuel production. *Insect Science*, 17(3): 1-9.
- Kim N, Choo Y M, Lee K S, et al. 2008. Molecular cloning and characterization of a glycosyl hydrolase family 9 cellulase distributed throughout the digestive tract of the cricket *Teleogryllus emma*. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 150(4): 368-376.
- Lee K S, Je Y H, Woo S D, et al. 2006. Production of a cellulase in silkworm larvae using a recombinant *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus lacking the virus-encoded chitinase and cathepsin genes. *Biotechnology Letters*, 28(9): 645-650.
- Lee S J, Kim S R, Yoon H J, et al. 2004. cDNA cloning, expression, and enzymatic activity of a cellulase from the mulberry longicorn beetle, *Apriona germari*. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 139(1): 107-116.
- Lee S J, Lee K S, Kim S R, et al. 2005. A novel cellulase gene from the mulberry longicorn beetle, *Aprion agermari*: gene structure, expression, and enzymatic activity. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 140(4): 551-560.
- Nakoneczny M, Michalczyk K, Kedziorski A. 2006. Midgut glycosidases activities in monophagous larvae of Apollo butterfly *Parnassius apollo* ssp. *frankenbergeri*. *Comptes Rendus Biologies*, 329(10): 765-774.
- Oppert C, Klingeman W E, Willis J D, et al. 2010. Prospecting for cellulolytic activity in insect digestive fluids. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 155(2): 145-154.
- Rehman F U, Aslam M, Tariq M I, et al. 2009. Isolation of cellulolytic activities from *Tribolium castaneum* (red flour beetle). *African Journal Biotechnology*, 8(23): 6710-6715.
- Sami A J, Anwar M A, Rehman F U, et al. 2011. Digestive cellulose hydrolyzing enzyme activity (endo- $\beta$ -1,4-d-glucanase) in the gut and salivary glands of blister beetle *Mylabris pustulata*. *Pakistan Journal of Zoology*, 43(2): 393-401.
- Scharf M E, Tartar A. 2008. Termite digestomes as sources for novel lignocellulases. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2(6): 540-552.
- Scrivener A M, Watanabe H, Noda H. 1997. Diet and carbohydrate digestion in the yellow-spotted longicorn beetle *Psacotha hilaris*. *Journal of Insect Physiology*, 43(11): 1039-1052.
- Shi W B, Ding S Y, Yuan J S. 2011. Comparison of insect gut cellulase and xylanase activity across different insect species with distinct food sources. *Bioenergy Research*, 4(1): 1-10.
- Sun J Z, Scharf M E. 2010. Exploring and integrating cellulolytic systems of insects to advance biofuel technology. *Insect Science*, 17(3): 163-165.
- Watanabe H, Tokuda G. 2001. Animal cellulases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58(9): 1167-1178.
- Watanabe H, Tokuda G. 2010. Cellulolytic systems in insects. *Annual Review of Entomology*, 55: 609-632.
- Wei Y D, Lee K S, Gui Z Z, et al. 2006. Molecular cloning, expression, and enzymatic activity of a novel endogenous cellulase from the mulberry longicorn beetle, *Apriona germari*. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 145(2): 220-229.
- Wei Y D, Lee S J, Lee K S, et al. 2005. N-glycosylation is necessary for enzymatic activity of a beetle (*Apriona germari*) cellulose. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 329(1): 331-336.
- Willis J D, Oppert C, Jurat-Fuentes J L. 2010. Methods for discovery and characterization of cellulolytic enzymes from insects. *Insect Science*, 17(3): 184-198.
- Yokoe Y, Yasumasu I. 1964. Distribution of cellulose in invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 13(4): 323-338.

(责任编辑 朱乾坤)