

大戟科 4 种药用植物内生真菌 3 种胞外酶活性的比较

史 央¹, 戴传超^{1,2}, 陆 玲¹, 余伯阳²

(1. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210097; 2. 中国药科大学, 江苏 南京 210009)

摘要: 利用分光光度计比色测定大戟科乌柏 (*Sapium sebiferum* Roxb.)、大戟 (*Euphorbia pekinensis* Rupr.)、泽漆 (*Euphorbia helioscopia* Lével)、重阳木 (*Bischofia polycarpam* Airy Shaw) 4 种药用植物新鲜叶和茎中内生真菌的纤维素酶、漆酶和多酚氧化酶活性, 并比较它们的差异。结果表明: 茎内的真菌漆酶活性和多酚氧化酶活性普遍比叶内真菌高; 重阳木内生真菌的漆酶及多酚氧化酶活性比乌柏、大戟和泽漆的内生真菌高。不同植物以及同一植物不同部位的内生真菌的胞外酶活性存在较大差异, 推测其机理可能与内生真菌的种类和宿主植物之间的相互关系等因素有关。从乌柏和重阳木茎内皮中筛选到的漆酶和多酚氧化酶活性较高的 2 个菌株有良好的应用前景。

关键词: 大戟科; 内生真菌; 纤维素酶; 漆酶; 多酚氧化酶

中图分类号: Q55; Q949.32; Q949.753.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2002)02-0017-04

Comparison of the extracellular enzyme activities of the endophytic fungi in four species of medicinal plants from Euphorbiaceae SHI Yang¹, DAI Chuan-chao^{1,2}, LU Ling¹, YU Bo-yang² (1. Biology Sciences College, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China; 2. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2002, 11(2): 17-20

Abstract: The activities of three extracellular enzyme including cellulase, laccase and polyphenol oxidase of thirty-six strains of endophytic fungi isolated from four species of medicinal plants (*Sapium sebiferum* Roxb., *Euphorbia pekinensis* Rupr., *Euphorbia helioscopia* Lével and *Bischofia polycarpam* Airy Shaw) in Euphorbiaceae were detected spectrophotometrically and compared. The results showed that the activities of laccase and polyphenol oxidase of endophytic fungi isolated from stems were higher than those from leaves; the activities of laccase and polyphenol oxidase isolated from *Bischofia polycarpam* were higher than those from other three plants. It suggested that there were great discrepancy at the extracellular enzyme activities of isolates from different plants or different sites of the same plant, which possibly related with the sorts of endophytes and the relationship between endophytes and host plants. The two strains isolated from *Sapium sebiferum* and *Bischofia polycarpam* with high activities of laccase and polyphenol oxidase have good application prospects.

Key words: Euphorbiaceae; endophytic fungi; cellulase; laccase; polyphenol oxidase

木质素和纤维素与半纤维素是构成植物骨架的主要成分, 就总量而言, 木质素的数量仅次于纤维素, 全世界每年由植物生长可产生 $1\ 500 \times 10^8$ t 木质素^[1]。其基本结构是苯丙烷类结构单元组成的芳香族高分子化合物, 很难为大多数生物直接利用, 因此造成这一丰富自然资源的巨大浪费^[2]。加快木质素降解和提高木质素的降解率已成为当前关注的重要课题之一。目前对于木质素降解的研究主要集中在高等担子菌^[3-6], 但担子菌的生长周期一般较长, 生长条件有一定的局限性, 实际应用的可操作性较小。因此, 筛选生长周期短, 同时降解木质素能力强的菌株是关键所在。植物内生真菌在和植物长期共同进化过程中和植物建立了共生关系^[7], 真菌要侵

入植物组织内部并生存, 首先要降解一部分植物组织, 所以植物内生真菌中有一部分应具有很强的降解木质素和纤维素的能力。

大戟科植物乌柏、大戟、泽漆和重阳木具有广泛的药用价值, 是重要的中药材^[8,9], 常被用于抗癌抑菌。近两年来对大戟科 4 种药用植物内生真菌进行了研究^[10], 分离获得 40 余株内生真菌, 本文试图从这些内生真菌中筛选高产木质素降解酶的菌种, 以期能应用于造纸、秸秆降解等实际生产中。

收稿日期: 2001-12-07

基金项目: 中国科学院红壤生态开放试验站项目(2000-K-02)

作者简介: 史 央(1977-), 女, 江苏无锡人, 在读硕士生, 主要从事微生物学研究。戴传超为联系作者。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

乌桕枝条样品于1999年10-12月采自南京紫金山,叶样品于2000年5月采自江西省余江县中国科学院红壤生态站林地中;大戟和泽漆于2000年4月采自南京紫金山;重阳木于1999年10月采自南

京师范大学,为多年生栽培株。4种植物叶均取叶脉之外部分,枝条取2~3年生。原植物由江苏省·中国科学院植物研究所徐增莱同志鉴定。

1.1.1 内生真菌 内生真菌分离方法为:在严格的表面消毒后,取小块样品于PDA培养基上培养,具体方法同文献[10]。真菌纯化方法见文献[11]。菌种鉴定另文发表。内生真菌来源分布见表1。

表1 大戟科4种植物内生真菌株来源及分布

Table 1 The sources and distribution of the endophytic fungi in four species of Euphorbiaceae

植物 Host plant	内生菌株采集部位 Site	内生菌株编号 Number of fungi
乌桕 <i>Sapium sebiferum</i> Roxb.	茎内皮 Stem's inner bark	S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9, S10
	叶 Leaf	S11
大戟 <i>Euphorbia pekinensis</i> Rupr.	叶 Leaf	E1, E2, E3, E4
	根 Root	E5
泽漆 <i>Euphorbia helioscopia</i> Lével	茎内皮 Stem's inner bark	H6
	叶 Leaf	H1, H2, H3, H4, H5
重阳木 <i>Bischofia polycarpam</i> Airy Shaw	茎内皮 Stem's inner bark	B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9, B10, B11, B12, B13, B14

1.1.2 培养基 菌种保藏培养基为PDA培养基^[10]。发酵培养基成分:马铃薯200 g/L,淀粉20 g/L,玉米粉5 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g/L, V_B 10 mg/L,微量元素混合液7 mL/L。纤维素平板成分:羧甲基纤维素钠20 g/L,蛋白胨2.5 g/L,酵母膏0.5 g/L, KH_2PO_4 1.5 g/L, Na_2HPO_4 2.5 g/L,琼脂20 g/L, pH 7.0~7.5。木质素平板成分:木质素20 g/L, NaCl 6 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0 g/L, KH_2PO_4 0.5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/L, CaCl_2 0.1 g/L, 酵母膏1.0 g/L, 琼脂20 g/L, pH 7.0~7.5。

1.2 实验方法

1.2.1 平板点接种 用灭菌的牙签挑取斜面菌丝分别接种到纤维素平板和木质素平板上,培养5 d,测量菌落直径。

1.2.2 真菌培养方法 将纯化获得的菌株在25℃培养3 d,倒入无菌水,刮取菌丝,转移至发酵培养基上,置摇床于25℃, 150r/min, 震荡培养4 d。

1.2.3 粗酶液制备 将上述培养液过滤,上清液即为粗酶液。

1.2.4 酶活测定方法 纤维素酶,漆酶和多酚氧化酶活性测定方法参照文献[4,12]。

1.2.5 酶活定义 参照文献[4,12],略有改动,具体如下:纤维素酶,每分钟使底物生成1 μmol 葡萄糖

所需的酶量为一个活力单位;漆酶,每分钟使 $\text{OD}_{400\text{nm}}$ 值改变0.001为一个酶活力单位;多酚氧化酶,每分钟使 $\text{OD}_{400\text{nm}}$ 值改变0.001为一个酶活力单位。

1.2.6 生物量测定 测干重法,将粗酶液制备过程中过滤所得菌丝球置80℃烘干至恒重即为生物量。

2 结 果

2.1 乌桕内生真菌3种胞外酶活性

乌桕内生真菌点接种菌落大小及3种胞外酶活性见表2。结果表明,乌桕茎内皮中真菌株S1~S10的3种胞外酶活性均高于乌桕叶的内生真菌(S11),就S1~S10而言,各菌株之间的差异也较大。如漆酶活性,最高S8(55.87 U)是最低S2(0.03 U)的1862倍,S10活性也较强,S5和S9活性相近,其余则较低;纤维素酶活性普遍较低,这是由于纤维素酶是一种诱导酶,而发酵培养基所采用的碳源不是纤维素酶的最佳诱导源,因而所测定的纤维素酶活性较低。

2.2 大戟内生真菌3种胞外酶活性

大戟叶中4个内生真菌株(E1~E4)和根中1株内生真菌(E5)3种胞外酶活性结果见表3。结果表明,大戟的内生真菌纤维素酶活力较低,漆酶和多酚氧化酶活力差异不大。

表2 乌桕内生真菌点接种菌落大小及3种胞外酶活性¹⁾
Table 2 The width of colonies and 3 extracellular enzyme activities of the endophytic fungi from *Sapium sebiferum* Roxb.¹⁾

编号 No.	菌落大小(cm) Width of colonies		酶活性(U) Extracellular enzyme activities			生物量 Biomass (g/L)
	纤维素 平板 Cellulose	木质素 平板 Lignin	纤维素酶 Cellulase	漆酶 Laccase	多酚氧化酶 Polyphenol oxidase	
S1	7.2	-	0.56	0.90	3.43	8.094
S2	3.3	-	0	0.03	1.97	15.516
S3	3.4	-	0.41	1.03	2.47	15.250
S4	2.8	0.7	0.06	3.97	0.80	14.772
S5	5.3	-	1.39	14.47	31.37	5.602
S6	-	-	0.34	0.37	0	11.092
S7	2.3	-	0.27	2.53	0	8.356
S8	1.7	2.1	0.01	55.87	17.10	18.020
S9	2.0	0.5	0.10	15.37	6.00	21.451
S10	1.7	0.5	0	29.07	6.43	12.780
S11	1.7	0.8	0	0.03	0	7.102

¹⁾ S1~S10来源于茎内皮, S11来源于叶。S1~S10 were isolated from stem's inner bark, S11 from leaves.

表3 大戟内生真菌点接种菌落大小及3种胞外酶活性¹⁾
Table 3 The width of colonies and 3 extracellular enzyme activities of the endophytic fungi from *Euphorbia peginensis* Rupr.¹⁾

编号 No.	菌落大小(cm) Width of colonies		酶活性(U) Extracellular enzyme activities			生物量 Biomass (g/L)
	纤维素 平板 Cellulose	木质素 平板 Lignin	纤维素酶 Cellulase	漆酶 Laccase	多酚氧化酶 Polyphenol oxidase	
E1	5.2	2.2	0	3.93	1.80	14.858
E2	5.4	3.1	0	3.67	1.73	12.567
E3	3.3	2.4	0	5.17	2.23	7.182
E4	2.1	-	0.53	0.63	1.67	4.444
E5	2.0	2.0	0.31	1.07	0.07	6.056

¹⁾ E1~E4来源于叶, E5来源于根。E1~E4 were isolated from roots, E5 from leaves.

2.3 泽漆内生真菌3种胞外酶活性

泽漆叶中5株内生真菌(H1~H5)和茎内皮中1株内生真菌(H6)的3种胞外酶活性见表4。结果表明, H1, H3和H4的3种胞外酶活性均很低。

2.4 重阳木内生真菌3种胞外酶活性

重阳木茎内皮中的14株内生真菌(B1~B14)的3种胞外酶活性见表5。结果表明, B3的漆酶活性和多酚氧化酶活性均为最高, 而纤维素酶活性极低, 此外, 重阳木内生真菌的漆酶活性和多酚氧化酶活性的总体水平较前3种植物的内生真菌高。

2.5 内生真菌3种胞外酶活性与点接种菌落大小及生物量的相关性分析

将内生真菌3种胞外酶活性分别和点接种菌落大小及生物量做相关性分析, 具体结果见表6(仅列出乌桕内生真菌, 其他3种植物内生真菌类似)。

从表6可以看出, 乌桕内生真菌平板点接种的菌落大小与酶活性并不呈正相关, 这是由于各菌落的生长速度不同, 致密程度也不尽相同; 生物量与酶活性也无相关性, 可能是因为发酵培养基利于一些菌的生长, 但并不是其最佳的产酶培养基。其他3种植物的内生菌做相关分析也得到类似结果。

表4 泽漆内生真菌点接种菌落大小及3种胞外酶活性¹⁾
Table 4 The width of colonies and 3 extracellular enzyme activities of the endophytic fungi from *Euphorbia helioscopia* Lével.¹⁾

编号 No.	菌落大小(cm) Width of colonies		酶活性(U) Extracellular enzyme activities			生物量 Biomass (g/L)
	纤维素 平板 Cellulose	木质素 平板 Lignin	纤维素酶 Cellulase	漆酶 Laccase	多酚氧化酶 Polyphenol oxidase	
H1	3.0	-	0	0	0	6.562
H2	4.0	1.8	0	5.87	1.57	14.404
H3	4.8	2.7	0	0.13	0	6.110
H4	4.9	2.4	0	0.17	1.13	14.874
H5	5.3	2.9	0.98	2.33	0.87	11.118
H6	2.1	1.5	0.10	1.43	0.40	3.668

¹⁾ H1~H5来源于叶, H6来源于茎内皮。H1~H5 were isolated from leaves, H6 from stem's inner bark.

表5 重阳木内生真菌点接种菌落大小及3种胞外酶活性¹⁾
Table 5 The width of colonies and 3 extracellular enzyme activities of the endophytic fungi from *Bischofia polycarpam* Airy Shaw¹⁾

编号 No.	菌落大小(cm) Width of colonies		酶活性(U) Extracellular enzyme activities			生物量 Biomass (g/L)
	纤维素 平板 Cellulose	木质素 平板 Lignin	纤维素酶 Cellulase	漆酶 Laccase	多酚氧化酶 Polyphenol oxidase	
B1	1.4	0.5	0.32	3.90	5.27	6.658
B2	2.0	0.5	0.36	1.57	2.73	20.412
B3	1.4	-	0.07	66.90	17.03	15.904
B4	1.6	-	0	10.63	0.77	16.118
B5	1.8	-	0.34	20.30	4.37	16.226
B6	1.8	-	0.24	5.27	0.67	7.17
B7	1.6	-	0.24	15.83	11.67	16.484
B8	1.7	0.6	0	4.23	4.13	10.498
B9	2.2	0.7	0.02	3.13	8.80	20.982
B10	2.6	0.5	0.13	14.83	3.40	11.768
B11	-	-	0	0.37	2.23	5.604
B12	2.2	0.5	0.03	1.27	21.20	7.104
B13	2.2	0.7	0.08	17.77	11.13	17.022
B14	2.4	0.7	0.02	0.87	1.90	15.372

¹⁾ B1~B14来源于茎内皮。B1~B14 were isolated from stem's inner bark.

表 6 乌柏内生真菌 3 种胞外酶活性与点接种菌落大小及生物量的相关性分析

Table 6 The relativity analysis of the three extracellular enzyme activities and the width of colonies and the biomass of endophytic fungi isolated from *Sapium sebiferum* Roxb.

酶活性 Extracellular enzyme activity	纤维素平板菌落大小 Width of colonies on cellulose	木质素平板菌落大小 Width of colonies on lignin	生物量 Biomass
纤维素酶活性 Cellulase activity	0.593 9	-	-0.561 6
漆酶活性 Laccase activity	-	0.809 4	0.397 2
多酚氧化酶活性 Polyphenol oxidase activity	-	0.218 9	-0.146 3

3 讨 论

(1) 内生真菌在植物体内具有一定的组织专一性^[7]。Carroll 认为,松柏类植物叶柄的内生真菌对纤维素和木质素的分解能力比叶片的内生真菌强,本文的结果与此相符,从茎内皮分离到的内生真菌漆酶活性和多酚氧化酶活性高于叶内分离到的内生真菌。这是由于茎内皮中木质素含量相对较高,而漆酶和多酚氧化酶是降解木质素的主要酶,所以茎内皮的内生真菌具有较强的降解木质素的能力,才能侵入植物组织。

内生真菌与植物的关系较为复杂,一些内生真菌在某些宿主中为共生,在另一些宿主中却为寄生^[13,14]。本实验中内生真菌株 H1, H3 和 H4 的 3 种胞外酶活性均较低,可能这 3 种菌株是营寄生生活,直接吸收宿主营养或以其他内生菌分解的次级代谢物为生。

(2) 平板点接种的菌落大小与酶活性不呈正相关,因为各个菌株生长速度、致密程度和蔓延速度不尽相同。有些内生真菌在平板上不能生长,却表现出酶活性,可能是由于平板的 pH 值抑制了酶的分泌,阻止内生真菌对基质的利用,研究表明,漆酶分泌的最佳 pH 值为 3.0~6.0, pH 值达到 7.0 时,酶活性大大降低^[15]。此外,生物量与酶活性也无对应关系,发酵采用的是一种基础培养基,对有些菌可能利于其生长,但并不利于产酶;对另一些菌而言,可能是其产酶的最佳培养基,但不利于生物量的积累。Nilsson 曾发现类似结果^[16]。因此点接种只能作为初筛的手段之一,发酵测定酶活力复筛菌种是必要的。

(3) 目前,筛选高产木质素分解酶的菌种多集中于白腐菌^[17],而白腐菌有一定的生长局限性,所以,将其应用于秸秆降解的生产中还有一定的困难。内生真菌生长在植物内部,其侵染植物的过程就是水解木质素和纤维素的过程,因此内生真菌为人们提供了一个新的筛选高产木质素降解酶菌种的范围。

实验证明,有些菌株有希望作为生产菌株进行开发。

参考文献:

- [1] 蒋挺大. 木质素[M]. 北京:化学工业出版社,2001.243.
- [2] 邓振旭,王宜磊. 碳源和氮源对毛栓菌菌丝体生长和漆酶分泌的影响[J]. 微生物学杂志,2000,20(2):60-61.
- [3] Dorado J, Almendros G, Camarero S, et al. Transformation of wheat straw in the course of solid-state fermentation by four ligninolytic basidiomycetes[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1999, 25(3): 605-612.
- [4] 秦小琼,傅庭治,曹幼琴,等. 红栓菌胞外漆酶的诱导、纯化及部分特性研究[J]. 微生物学报,1996,36(5):360-366.
- [5] 钞亚鹏,叶 军,钱世钧. 担子菌组成性漆酶产生特性的研究[J]. 微生物学报,2000,40(6):628-632.
- [6] Youn H D, Kim K J, Maeng J S, et al. Single electron transfer by an extracellular laccase from the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* [J]. Microbiology, 1995, 141(2): 393-398.
- [7] 郭良栋. 内生真菌研究进展[J]. 菌物系统,2001,20(1):148-152.
- [8] 中国药材公司. 中国中药资源志要[M]. 北京:科学出版社,1994. 618-641.
- [9] 周荣汉. 药用植物化学分类学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1988. 269-273.
- [10] 戴传超,余伯阳,徐增莱,等. 大戟科 4 种药用植物及其内生真菌脂肪酸组分研究[J]. 中国中药杂志,2001,26(9):592-595.
- [11] 范秀李,李广武,沈 萍. 微生物学实验[M]. 北京:高等教育出版社,1980. 267.
- [12] 宋爱荣,郭立忠,刘作亭,等. 七个白色金针菇菌株发酵液中四种胞外酶活性的测定与分析[J]. 中国食用菌,1999,18(4):31-33.
- [13] 梁 宇,高玉葆. 内生真菌对植物生长发育及抗逆性的影响[J]. 植物学通报,2000,17(1):52-59.
- [14] Carroll G, Petrini O. Patterns of substrate utilization by some fungal endophytes from coniferous foliage[J]. Mycologia, 1983,75(1): 53-63.
- [15] 王佳玲,余惠生,付时雨,等. 白腐菌漆酶的研究进展[J]. 微生物学通报,1998,25(4):233-236.
- [16] Nilsson, T. The degradation of cellulose and the production of cellulase, xylanase, mannanase and amylase by wood-rotting microfungi[J]. Stud Forest Suec, 1974, 114(1): 1-61.
- [17] 徐海娟,梁文芷. 白腐菌降解木素酶系及其作用机理[J]. 环境污染治理技术与设备,2000,1(3):51-54.