

担子菌组成型漆酶产生特性的研究*

钞亚鹏 叶 军 钱世钧**

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 运用平板筛选法从 20 株不同来源的菌株中得到一株产组成型漆酶的担子菌(*Basidiomycete* sp.)。它在自制 DC 培养基上产酶能力达到 0.58IU/mL,振荡培养的产酶效果约是静置培养的 4 倍。漆酶的产生与生物量在培养 8d 内呈现平行关系,但随后酶量并不随之而继续上升。4g/L 的酪氨酸和胰蛋白胨有利于酶的产生,分别可使酶活力最高增加到 2.49IU/mL 和 2.0IU/mL。某些化学试剂对酶的产量尚未达到诱导效果,但丁香醛连氮和邻联甲苯胺对酶产量有一定的促进作用。40℃ 下刺激 1h 后,可使酶活力提高 1.3 倍。

关键词: 担子菌, 漆酶, 组成型

中图分类号: Q814 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2000)06-0628-32

漆酶是一种发现较早的含铜酚氧化酶。近年来研究表明,它具有广泛的底物作用范围,可以氧化降解单酚、邻苯二酚和对苯二酚在内的多种酚类化合物及其衍生物^[1],也可以氧化降解一些不含酚羟基的酚类类似物^[2],近来有人报道它还可以氧化降解一些有机磷毒物^[3]。因此,它在许多方面有较大的应用价值,比如它可以用于改善油漆的性能^[4],处理含有酚类物质的多种污水,改进造纸工艺,进行环境监测,酶法合成有用的化合物等等^[5~7]。

漆酶最初发现于一种漆树的汁液中,但更广泛存在于真菌特别是担子菌中,它在真菌的发育和形态发生中起作用^[8]。目前对糙皮侧耳、栓菌、立枯丝核菌和多孔菌等属种漆酶的生化 and 分子生物学研究较多^[9~10]。这些漆酶的产生有一个共同特点,即都需要加入特定的诱导剂,如抑制蛋白合成的抗生素类物质、酚类化合物等,才能有效促进该酶的产生,而对其组成型的研究则鲜有报道,这可能是因为许多菌株在一般培养条件下漆酶表达量极低甚至不表达之故。Olga 等人发现担子菌(*C. hirsutus*)产生相当量的组成型漆酶,并且化学试剂丁香醛连氮对其有显著的诱导作用^[11]。本文研究了另一属种的担子菌(*Basidiomycete* sp.)的漆酶产生情况,发现它在菌丝生长过程中可以较大量的产生该酶,且不需额外添加诱导剂,这对进一步研究该酶的分子生物学特性及其应用有重要意义。

1 材料和方法

1.1 菌株来源

一部分菌株源自云南省土样,分别编号为:E₀, E₁, A₀, A₄;一部分来源于菌种保藏中

* 中国科学院特别基金资助项目(STZ98-3-02)

作者简介:钞亚鹏(1974-),男,山西省临县人,1998 年于中国科学院武汉病毒研究所获理学硕士学位,现为中国科学院微生物研究所研究实习员,主要从事酶学和糖类的基础和开发应用方面的研究

** 通讯作者

收稿日期:1999-11-01,修回日期:2000-04-18

心,分别编号为 $C_1 \sim C_8$; RH-1、RH-2、RH-3、RH-4、RH-5、RH-6、RH-7、RH-8 为本实验室保存丝状真菌。

1.2 仪器和试剂

756MC 紫外可见分光光度计,低温水浴锅;2,2'-azino-bis(3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS),丁香醛连氮(syringaldazine),麦芽糖、Remal Brilliant Blue R(RB-BR)染料购自 Sigma 公司;其它试剂均为国产分析纯或生化试剂。

1.3 实验方法

1.3.1 培养基:麦芽糖培养基(MLM)、麦芽汁培养基(ME)、合成培养基(SM)和土豆综合培养基(PD)参阅文献[12];洋葱培养基(YC)参见文献[13];DC 培养基自制。

1.3.2 平板培养:平板培养参照文献[14],MLM 培养基和 PDA 培养基中分别加入 RB-BR(终浓度 0.1g/L),高压灭菌后将不同来源的菌株接种于该两种平板培养基中,28℃ 培养,每天观察菌落周围的透明圈大小。分别在培养 7d、14d、21d 的菌苔上滴加溶于 95% 乙醇的萘酚和丁香醛连氮,分别放置 1h 和 5min 观察颜色变化。

1.3.3 营养因子试验:以 DC 培养基为基础(每 250mL 实验瓶中培养基体积皆为 50mL),根据不同实验要求进行配制。在营养因子试验中,酵母膏、牛肉膏、胰蛋白胨、葡萄糖、木糖、蔗糖、山梨醇、硫酸铵和淀粉终浓度分别为 10g/L,DL-蛋氨酸、L-门冬氨酸、天冬酰胺和 L-谷氨酸终浓度分别为 2g/L,以不加任何营养因子的基础培养液作对照;在胰蛋白胨梯度试验中,每瓶基础液中分别含有下列终浓度(g/L):0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0,酪氨酸浓度梯度试验以酪氨酸代替胰蛋白胨,梯度不变。接种后 28℃ 振荡培养 7d,测定培养上清中的酶活力。

1.3.4 漆酶的诱导试验:在 DC 培养基中,分别加入下列化学物质:丁香醛连氮、邻联甲苯胺、对苯二酚、间苯二酚,终浓度达 0.06g/L,培养条件同前,测定上清液中的漆酶活力。

1.3.5 温度对漆酶产生的刺激作用:在 DC 培养基中培养担子菌 4d,分别在 36℃、40℃、45℃、55℃ 和 65℃ 水浴保温 1h/1.5h,再转入 28℃ 继续培养,每隔 2d 取样测定上清中的漆酶活力。

1.3.6 生物量的测定:收集培养物,抽滤除去上清液,用蒸馏水洗涤三次残留固体物,置平皿中 37℃ 烘干。

1.3.7 漆酶活力的测定:参阅文献[15]进行。3mL 反应总体积中,含有 0.15mmol/L 底物 ABTS,0.09mol/L NaAc-HAc 缓冲液, pH4.5,适量的酶液,20℃ 保温 5min,测定 A_{420} 值。酶活力单位定义为 1min 内产生 1 μ mol 产物所需的酶量。

2 实验结果

2.1 平板筛选结果

将各种来源的菌种分别在 MLM 培养基和 PDA 培养基上培养后,大部分菌株生长情况良好,但是颜色反应却大相径庭。其中 C_8 菌株最为突出,三种颜色反应过程中均表现出强烈的正反应:平板培养时菌落中及菌落附近的 RB-BR 染料的兰色褪去,并且菌丝几乎无有吸附现象发生,说明 RB-BR 都被菌丝产生的酶降解;丁香醛连氮反应呈现明显的粉红色,萘酚反应为深紫色。别的菌株虽然在培养过程中周围也出现不同程度的透明圈。

但是菌丝也因为吸附而变黑 ,并且随着培养时间的推移不褪色 ,说明他们在该培养条件下并不能真正降解 RBBR。据报道本试验中所用有些菌株在诱导剂存在下可以产生漆酶 ,但是在 MLM 和 PD 丰富培养基上却没有任何反应 ,这表明 C_8 是以组成型产生该酶的。

2.2 C_8 在不同培养基上的产生漆酶能力

比较了该菌在土豆培养基、麦芽汁培养基、合成培养基、麦芽糖培养基、洋葱培养基和 DC 培养基上培养过程中的产酶能力(表 1)。结果表明 ,在不同培养基中其酶活力有较大的差异。比较培养 7d 之内培养时的产酶情况 ,以 DC 培养基为好。虽然合成培养基在 12d 时其酶反应的 A_{420} 达到 0.31 ,但培养时间较长。

2.3 营养因子对酶产量的影响

营养因子对该菌株产生漆酶的作用如表 2 所示。各种碳源对漆酶的产生都有不同程度的抑制作用。氮源中酪氨酸的作用最明显 ,培养液中的漆酶活力达到了 2.0IU/mL ,胰蛋白胨也对酶产生有一定的好处。进一步的最佳浓度选择实验表明 ,培养基中含有 4g/L 酪氨酸或胰蛋白胨时 ,分别可使酶活力最高达到 2.49IU/mL 和 2.00IU/mL。这暗示了该菌在碳源相对贫乏的状况下有利于酶的产生 ,而这正是导致真菌由营养生长转向子实体发育过程的诱因之一 ,说明它可能在形态发生中产生并起相应的生理功能。

表 2 营养因子在产酶中的作用

Table 2 Effects of some nutrients on the enzyme production

Nutrient factors		Enzyme activities/(IU/mL)	
Blank	1.48	Glucose	0.11
Sucrose	0.76	D-xylose	0.63
Yeast extract	0.16	Starch	0.12
Polypeptone	1.78	D-sorbitol	1.13
Beef extract	0.98	Tyrosine	2.00
DL-methionine	1.50	Amminum sulfate	0.07
L-aspartate	1.09	L-glutamate	1.07
asparaginate	0.14		

2.4 生物量与产酶的关系

在培养过程中 ,测定担子菌十天内的生物量和产酶量的变化情况 ,发现二者遵循不同的规律(图 1)。生物量呈现持续上升的趋势 ,而产酶量则在第七天达到高峰后略微下降。

2.5 培养条件对产酶量的影响

静置和振荡培养条件下担子菌的产酶能力显著不同(图 2) ,振荡培养效果要远优于静置培养。但是对它们的产酶趋势却并无改变。

2.6 化学试剂对产酶的影响

不同化合物对漆酶产生的影响差异较大。间苯二酚和对苯二酚对酶产量有抑制作用 ,对苯二酚还抑制菌丝生长 ;丁香醛连氮和邻联甲苯胺对产酶量和生物量都有促进作用。

表 1 产酶培养基的选择

Table 1 Optimum medium for the production of laccase

Cultivating time/d	Laccase production on different media/ A_{420nm}					
	MLM	ME	PD	SM	DC	YC
3	0.00	0.02	0.02	0.06	0.12	0.04
6	0.08	0.05	0.00	0.11	0.27	0.18
9	0.00	0.21	0.06	0.18	0.17	0.02
12	0.00	0.09	0.08	0.31	0.01	0.00
14	0.00	0.00	0.11	0.26	0.02	0.00

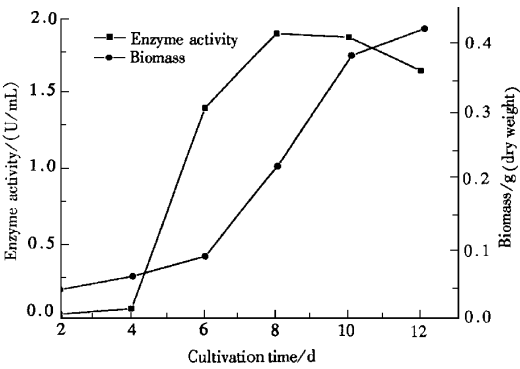


图1 生物量与产酶的关系

Fig.1 Time course of mycelial growth and enzyme production of the strain

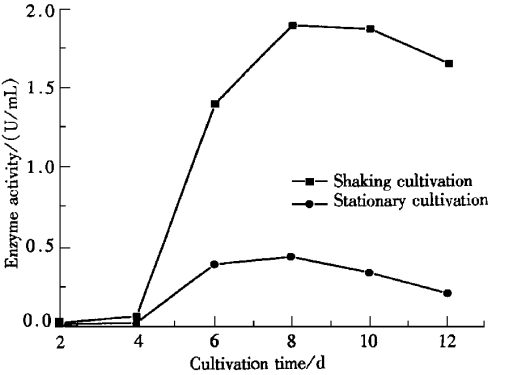


图2 培养条件对产酶量的影响

Fig.2 Effects of cultivating conditions on the enzyme production

2.7 温度刺激对产酶的影响

不同温度条件下刺激菌丝体后,继续培养,测定酶活力的变化(表3)。结果发现,在40℃处理1h后的样品产酶量有显著的增加,培养10d后产酶量达到1.47IU/mL,是对照的2.3倍。另外,55℃处理1.5h的样品也有较明显的变化。说明一定的温度刺激可能促进担子菌的形态发生,从而提高了产酶量。

表3 温度刺激对产酶的影响

Table 3 Influence of heatshock on the enzyme production

Days	Control	36℃		40℃		45℃		55℃		65℃	
		1h	1.5h	1h	1.5h	1h	1.5h	1h	1.5h	1h	1.5h
6	0.29	0.17	0.12	0.78	0.14	0.12	0.17	0.22	0.56	0.24	0.29
8	0.52	0.39	0.44	1.37	0.12	0.17	0.65	0.12	1.06	0.30	0.19
10	0.64	0.44	0.71	1.47	0.22	0.39	0.65	0.12	0.94	0.17	0.076
12	0.45	0.12	0.48	1.38	0.12	0.097	0.43	0.14	0.6	0.048	0.093

3 讨论

一般认为,营养碳和氮的限制有利于漆酶的产生;本文结果表明,碳源的补加都不同程度上抑制漆酶的产生,而氮源中的酪氨酸和胰蛋白胨能明显促进漆酶的产生,说明限氮对漆酶产生不是一个好方法^[9,16,17]。另外,本研究发现,该菌株在用固体培养的种子效果远远好于液体菌丝体接种。

漆酶产生与菌丝的形态发生有关^[5],而恶劣环境如某些营养的限制、外界环境条件的变异等都有可能促进真菌的发育分化。因此,适当控制外界条件,可能有利于进一步提高漆酶的产量。

参 考 文 献

[1] Yaropolov R I , Skorobogat'ko O V , Vartanov S S , et al . *Applied Biochemistry and Biotechnology* , 1994 **49** (3) : 257~280 .

[2] Bourbonnais R , Michael G P . *PEBS* , 1990 **267** (1) : 99~102 .

中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [3] Amitai G , Adani R , Sod-Moriah G , *et al.* *FEBS letters* , 1998 , **438** :195~200.
- [4] Ooyabu Y. *Mokuzai Kogyou*(in Japanese) , 1993 , **48** :350~355.
- [5] Christopher F T. *Microbiology* , 1994 , **140** :19~26.
- [6] 黄峰 陈嘉翔 余家鸾 ,等. 中国造纸学报 , 1997 , **12** :109~116.
- [7] Ghindilis A L , Makover A , Bauer C G , *et al.* *Anal Chim Acta* , 1995 , **304** :25.
- [8] Leather G F and Stahanman M A , *J Gen Microbiol* , 1981 , **125** :147~157.
- [9] 周金燕 张发群. 微生物学报 , 1993 , **33** (5) :387~391.
- [10] Reddy C A , D 'Souza T M. Application of PCR in studying lignocellulose degradation by *Basidiomycetes* . In : Bridge P D , *et al.* Ed. Application of PCR in Mycology. New York : CAB international , 1998. 205~243.
- [11] Koroljova-Skorobogatko O V , Stepanova E V , Gavrilova VP , *et al.* *Biotechnol Appl Biochem* , 1998 , **28** :47~54.
- [12] 中国普通微生物菌种保藏中心编. 菌种目录. 北京 : 中国农业科技出版社. 1997.
- [13] 方自若. 真菌学报 , 1985 , **4** (3) :147~157.
- [14] Soponsathien S. *J Gen Appl Microbiol* , 1998 , **44** :337~345.
- [15] Wolfenden B S , Willson R L. *J Chem Soc Perkin Trans II* , 1982 , **805**~812.
- [16] Kimura Y , Asada Y , Kuwalura M. *Appli Microbiol Biotechnol* , 1990 , **32** :436~442.
- [17] Kawai S , Umezawa T , Higudi T. *Arch Biochem Biophys* , 1988 , **262** :99~110.

PRODUCING CHARACTERIZATION OF CONSTITUTIVE-FORM LACCASE BY *BASIDIOMYCETE* *

Chao Yapeng Ye Jun Qian Shijun**

(Institute of Microbiology , The Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080)

Abstract : A constitutive-laccase-producing fungus was gained from 20 strains of different sources with plate method. Laccase activity reached 0.58IU/mL when the strain grew on DC medium with shaking cultivation , which was superior to stationary method by 4 times. The enzyme production paralleled with biomass in early 8 days , subsequently activities declined slightly though its biomass continued upward. Tyrosine and tryptone at the concentration of 4g/L improved the enzyme production , reaching 2.49 and 2.0IU/mL respectively. Some tested chemical agents seemed not to contribute to the increase of the enzyme production effectively except for syringaldazine and *o*-tolidine. Heatshock at 40℃ for 1h made 1.3 times more enzyme expression.

Key words : *Basidiomycete* , Laccase , Constitutive

* Project Granted by Chinese Academy of Sciences Especially Fund (STZ98-3-02)

** To whom correspondence should be addressed