

一氧化氮在启动黄孢原毛平革菌木质素降解酶合成中的作用

郑耀通, 邱爱连, 李文燕, 郑锋, 张力, 施雅青, 郑罡, 邹艳琼

福建农林大学应用微生物技术研究所, 福州 350002

摘要: 【目的】通过了解一氧化氮在启动黄孢原毛平革菌合成木质素过氧化物酶 (LiP) 中的作用及其作用机制, 弄明白腐菌启动次生代谢的调控机制。【方法】以黄孢原毛平革菌原种 pc530 及突变种 pcR5305 为研究对象, 弄清在不同营养条件下 NO 含量的动态变化及其与合成 LiP 之间的关系, 再通过添加外源 NO 供体 SNP、NO 淬灭剂 cPTIO 对两菌株合成 LiP 的影响分析, 揭示 NO 在白腐菌启动合成 LiP 中的作用和作用机理。【结果】两菌株均能在两种不同营养条件下产生 NO, 但 NO 的产生量与菌株及其营养状况有关, 富营养使 pc530 产生 NO 量低且严重延后, 而 pcR5305 产生 NO 并不需要营养饥饿激发且产生量显著高于 pc530。除了 LiP 峰值出现时间迟于 NO 峰值时间外, NO 含量与 LiP 合成呈正相关性; 外施 SNP 对合成 LiP 有促进作用, 但对 pcR5305 的促进作用没有 pc530 明显; 15 mmol/L cPTIO 使黄孢原毛平革菌合成 LiP 均大为降低, 但并没有完全抑制产生 LiP。【结论】黄孢原毛平革菌可能通过产生 NO 启动 LiP 的合成, 但 NO 并不直接参与或影响合成 LiP, NO 更可能是作为一种上游的信号分子起作用。除了 NO 外, 可能还有其它与 NO 有相互促进作用的信号分子也参与了 LiP 合成的调控。与 pc530 具有不同的产生 NO 的机制可能就是 pcR5305 抗营养阻遏合成木质素降解酶的机理。

关键词: 黄孢原毛平革菌, 一氧化氮, 木质素过氧化物酶, SNP, cPTIO

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2013) 03-0249-10

以黄孢原毛平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium*) 为模式种的白腐菌 (white-rot fungi, WRF) 因能产生非专一性的木质素降解酶 (Lignin degrading peroxidases, LDPs), 降解木质素及其结构类似物而在生物制浆与漂白、环境污染治理和修复、木质纤维素的生物处理与利用等方面具有巨大的应用前景^[1-2]。然而, WRF 合成 LDPs 要求营养饥饿的特性及其产酶量低且不稳定的缺陷, 则严重制约了 WRF 的实际应用^[3-5]。因此, 解决 WRF 合成 LDPs 需要营养饥饿的缺陷、阐明 WRF 启动 LDPs 合

成的机理具有十分重要的科学与实际意义。以往的研究显示, 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 可能是 WRF 合成 LDPs 的信号分子, 也意识到 WRF 合成 LDPs 可能与胁迫产生的抗氧化机制有关^[6-7], 重金属胁迫能诱导 *P. chrysosporium* 产生抗氧化性酶等^[8,9]。然而, WRF 启动 LDPs 合成的机制还不清楚, 与胁迫防卫反应密切相关的 NO 信号分子在 WRF 合成 LDPs 中的可能作用及其机制还没有报导。NO 作为一种信号分子首先在动物细胞中发现, 随后证实 NO 同样存在于植物当中, 并且发挥

基金项目: 福建省自然科学基金 (2007J0120, 2011J05047)

作者简介: 郑耀通 (1965 -), 浙江丽水人, 男, 博士, 教授, 研究方向环境微生物学。E-mail: fafu5188@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012-10-21; 修回日期: 2012-11-26

着重要的作用^[10-11]。作为一个具有广泛作用的重要信号分子, NO 愈来愈受到广泛关注, 许多生物的次生代谢调控、环境胁迫、防卫反应等都受 NO 的调节^[12-13]。基于以上研究进展, 我们认为, WRF 在营养饥饿(特别是氮饥饿)时才能启动合成 LDPs, 可能就是 WRF 抗营养饥饿胁迫而产生的一种防御反应机制, 因 NO 在调节植物细胞对逆境胁迫反应过程中发挥着重要的作用, NO 同样也可能是 *P. chrysosporium* 启动 LDPs 合成的重要信号分子。为了验证这种假设, 本试验以 *P. chrysosporium* 野生型 pc530 及其选育的能在富营养条件下产生 LDPs 的 pcR5305 突变菌株为研究对象, 分析两菌株在限营养与富营养条件下产生 NO 含量的动态变化及其与合成 LDPs 之间的关系, 再通过添加外源 NO 供体亚硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)、NO 专一淬灭剂 cPTIO (2, 4-carboxyphenyl-4, 4, 5, 5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide) 对两菌株合成 LDPs 影响的分析, 以期揭示 NO 在 WRF 启动合成 LDPs 中的作用和作用机理。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株: 黄孢原毛平革菌野生株 (*P. chrysosporium* 530, pc530), 紫外诱变选育的抗营养阻遏产酶黄孢原毛平革菌突变株 (*P. chrysosporium* R5305, pcR5305) 等菌株由福建农林大学应用微生物技术研究所提供。

1.1.2 主要试剂和仪器: 主要试剂包括葡萄糖、 KH_2PO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、酒石酸铵、酒石酸钠、 CaCl_2 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、甘氨酸、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 NaCl 、 CoSO_4 、 ZnSO_4 、 H_3BO_3 、 $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ 、 NaMoO_4 、氨基苯磺酸、N-萘基-乙二胺、磷酸、亚硝酸钠等, 均为分析纯, 购于中国上海国药集团化学试剂有限公司。SNP、cPTIO 购于 Sigma 公司。主要仪器包括 SPX-250B-Z 生化培养箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂)、VIS-723G 分光光度计(北京瑞利分析仪器公司)、GL-20G-H 冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂)等。

1.1.3 培养基: ①PDA 固体培养基(g/L): 马铃薯 200, 葡萄糖 20, KH_2PO_4 3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5, VB_1 0.005, 琼脂 20, 用蒸馏水配制, pH 自然, 其中 VB_1 先经过滤灭菌后加入到灭菌的培养基中。此培养基

用于菌种扩大培养。②液体培养基(g/L): 采用经典的 Kirk 培养基并略作修改^[14], 由葡萄糖 10、酒石酸铵 2.2(富氮, NS) 或 0.22(限氮, NL)、酒石酸钠 0.28、 CaCl_2 0.1、 KH_2PO_4 0.2、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5、5 mg/L VB_1 1 mL(先过滤灭菌, 再加入到灭菌后的液体培养基中)、1 mL 无机盐溶液组成, 用 0.1 mmol/L HAc-NaAc 缓冲液调节至 pH4.5。无机盐溶液(g/L): 由甘氨酸 1.5、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3.0、 NaCl 1.0、 CoSO_4 0.1、 CaCl_2 0.082、 ZnSO_4 0.1、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.01、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.01、 H_3BO_3 0.01、 $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ 0.01、 NaMoO_4 0.01 组成。此培养基用于 WRF 产酶培养。

1.2 菌株的液体培养与产酶动力学

利用改良的 Kirk 经典液体培养基, 设置限氮(NL)和富氮(NS)两种营养条件。在装有 20 mL 液体培养基的 250 mL 三角瓶中以每瓶 4 个 Φ 6 mm 的菌塞接种, 设 3 个重复, 分别置于 37°C 静置培养, 此后每天取出 1 瓶培养液过滤, 滤液经 9300 × g, 4°C 离心 5 min 后得粗酶液用于测定酶活力及 NO 含量。外源 NO 供体及其淬灭剂的添加试验, 先将 NO 外源供体 SNP、NO 淬灭剂 cPTIO 配制成一定浓度的母液, 经微孔滤膜过滤灭菌后加入到已灭菌的液体培养基中, 按实验要求控制 SNP、cPTIO 的添加量使培养液中的浓度达到所需值, 其它培养条件相同。每组实验重复 3 次取平均值。

1.3 木质素过氧化物酶(LiP)活力的测定

以 LiP 在 H_2O_2 存在下氧化 Azure B 染料来表示 LiP 的活力^[15], 具体方法为取 125 mmol/L 的酒石酸钠缓冲液(pH 3.0) 1 mL, 0.160 mmol/L 的 Azure B 溶液 500 μL , 粗酶液 500 μL , 30°C 下加入 2 mmol/L 的 H_2O_2 溶液 500 μL 启动反应, 测定反应最初 3 min 内 651 nm 处 OD 值减小速率, 1 个酶活力单位以每分钟每毫升的培养基滤出液降低 0.1 个 OD 值来表示。

1.4 NO 浓度的测定

细胞中 NO 的浓度按文献测定^[16-17], 在酸性条件下, 将 NO 氧化成亚硝酸盐, 利用 Griess 试剂(1% 对氨基苯磺酸, 0.1% N-萘基-乙二胺, 5% 磷酸)测定所生成的亚硝酸含量推算细胞中 NO 的浓度。不同时间及介质中培养液经过滤并冷冻离心后, 取 2 mL 滤液加入 2 mL Griess 试剂振荡混匀, 室温下放置 30 min 后在 550 nm 测吸光值, 根据吸光值利用

NaNO₂标准曲线计算 NO 含量。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 18.0 统计软件对实验数据进行分析,组间比较用 *t* 检验, $P < 0.05$ 时表示组间存在显著性差异。

2 结果和分析

2.1 *P. chrysosporium* 产生 NO 的动态变化及其与合成 LDPs 的相关性

P. chrysosporium 野生菌株 pc530 启动 LDPs 的合成,需要满足营养饥饿特别是氮浓度要很低的要求,在富氮(NS)环境下 pc530 不能合成 LDPs,经诱变筛选的抗营养阻遏产酶 pcR5305 菌株却能在 NS 条件下合成木质素降解三种主要酶^[18-19],为了弄清 *P. chrysosporium* 启动 LDPs 合成特别是诱变菌株能在 NS 条件下合成 LDPs 的机制,验证 NO 在 *P. chrysosporium* 合成 LDPs 中是否具有调控作用,实验比较了 pc530 与 pcR5305 在 NL、NS 培养条件下产生 NO 的动态变化,以及 NO 对木质素过氧化物酶 LiP 产量的影响,结果如图 1。结果表明,两菌株均能在两种培养条件下产生 NO,且产生的动力学趋势相似,都具有在前期快速上升,随后下降,后期 NO 产生不明显的特点。然而,抗营养阻遏产酶菌株 pcR5305 不仅产生 NO 的量显著高于野生菌株 pc530 ($P < 0.05$),而且其出现 NO 峰值时间也提前,如在 NL 条件下,pcR5305 在第一天就能产生 0.811 μmol/L 的 NO,在第 4 天达到高峰 2.822 μmol/L;野生菌株 pc530 在第一天仅产生 NO 0.052 μmol/L,并在第五天达到峰值 1.241 μmol/L(图 1-A)。在 NS 条件下,两菌株因富氮而使 NO 产生的变化明显不同,NS 抑制了 pc530 产生 NO,而 pcR5305 在 NS 条件下产生 NO 反而更高(图 1-B)。pc530 在第 1-4 天产生的 NO 量很少且 LiP 产量也非常低,产生的 NO 及 LiP 的峰值远低于 NL 条件下的产生量且滞后 2 天(图 1-B),说明富氮抑制了野生菌株产生 NO。从富营养不利于野生菌株 NO 的产生现象,推测野生菌株开始产生 NO 可能是营养饥饿造成的结果。再从突变菌株 pcR5305 不管是在 NL 还是 NS 条件下,均比 pc530 产生更多的 NO 且不受高氮抑制,证实 pcR5305 与 pc530 产生 NO 的机理不同,说明 pcR5305 可能通过某种机制形成更高浓度的 NO

并因此启动富营养条件下 WRF 合成 LDPs,这可能就是筛选的菌株能抗营养阻遏产酶的原因。

从 NO 含量的动态变化与 LiP 活性变化趋势的关系看,较高浓度的 NO 大致对应于较高 LiP 的活性,而从 NO 的产生总是发生于 LiP 合成之前的现象,说明 NO 与黄孢原毛平革菌合成 LiP 相关。但 NO 的绝对浓度并不直接对应于 LiP 的产生量,因为 LiP 峰值出现时间总是迟于 NO 峰值的出现,说明 NO 并不直接参与或影响 *P. chrysosporium* 合成 LiP, NO 更可能是作为一种上游的信号分子在起作用。实验结果还显示,不管是在 NL 还是 NS 条件下,2 菌株产生的 NO 对 LiP 合成的影响总趋势相似,说明 NO 对 LDPs 合成所起的作用并不因营养条件的改变而改变,这也进一步说明了 NO 的作用可能仅仅是作为第二信使而依浓度变化启动 LDPs 的合成。

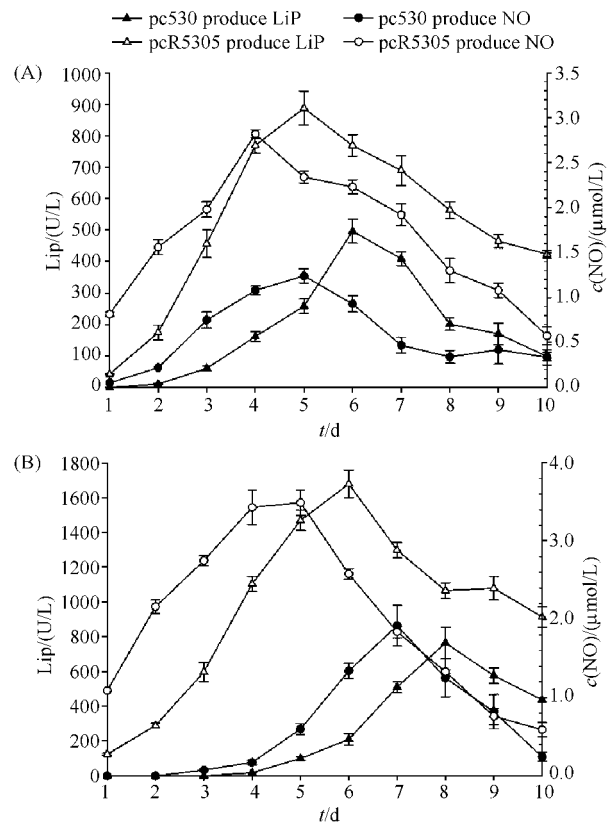


图 1 *P. chrysosporium* 产生 NO 与 LiP 的动态变化

Fig. 1 The relationship between LiP production and NO levels. A: nitrogen limitation; B: nitrogen sufficiency.

2.2 外源 NO 对 *P. chrysosporium* 合成 LiP 的影响

为了进一步验证 NO 在调控 *P. chrysosporium* 合成 LiP 中的可能作用,在培养基中加入外源 NO 供体亚硝酸钠(SNP),分别使其终浓度达到 0.05、0.1、0.5、

1.0 mmol/L,再测定培养过程中合成 LiP 的动态变化,结果如图 2。结果显示,外源 NO 均能提高两菌株在 NL 及 NS 条件下 LiP 的产量,特别是能显著提高 pc530 在 NS 条件下的产酶量,说明 NO 对 *P. chrysosporium* 合成 LiP 有促进作用。但外源 NO 对不同菌株的产酶促进效果又有不同,一定浓度的 SNP (<0.5 mmol/L) 对 pc530 合成 LiP 有明显促进作用,也使 LiP 峰值出现时间提前,其中 0.5 mmol/L SNP 作用最为明显,但更高浓度如 1.0 mmol/L SNP 的促进作用则明显减弱,说明 NO 对 *P. chrysosporium* 合成 LiP 的影响与其浓度有关。在 NS 条件下加入 SNP 后对 LiP 合成的促进作用比在 NL 条件下更为有效,也说明了在 NS 条件下 pc530 产生的内源 NO 比在 NL 条件下低,这与图 1 结果一致。

与 pc530 菌株不同,pcR5305 在 NL 条件下,加入外源 SNP 产生的效果比在 NS 条件下明显,这可能是因为在 NS 条件下 pcR5305 产生内源 NO 量高于 NL 环境,也说明了 pcR5305 可能具备了由氮源直接合成 NO 的机制,使 pcR5305 菌株在 NS 条件下产生更多的 NO,这有待于进一步证实。此外,pcR5305 不管是在 NL 还是 NS 条件下,加入 SNP 后对 LiP 合成的促进作用都没有 pc530 菌株明显,高于 0.1 mmol/L 的 SNP 加入则明显抑制 pcR5305 合成 LiP,这可能是 pcR5305 由于本身能合成更多的 NO 还者因其它突变导致能产生更多的 NO,外源 SNP 使细胞中的 NO 浓度太高产生硝化胁迫,对细胞产生毒性效应。高浓度的 NO 不利于细胞生命活动,已得到充分证实^[20]。

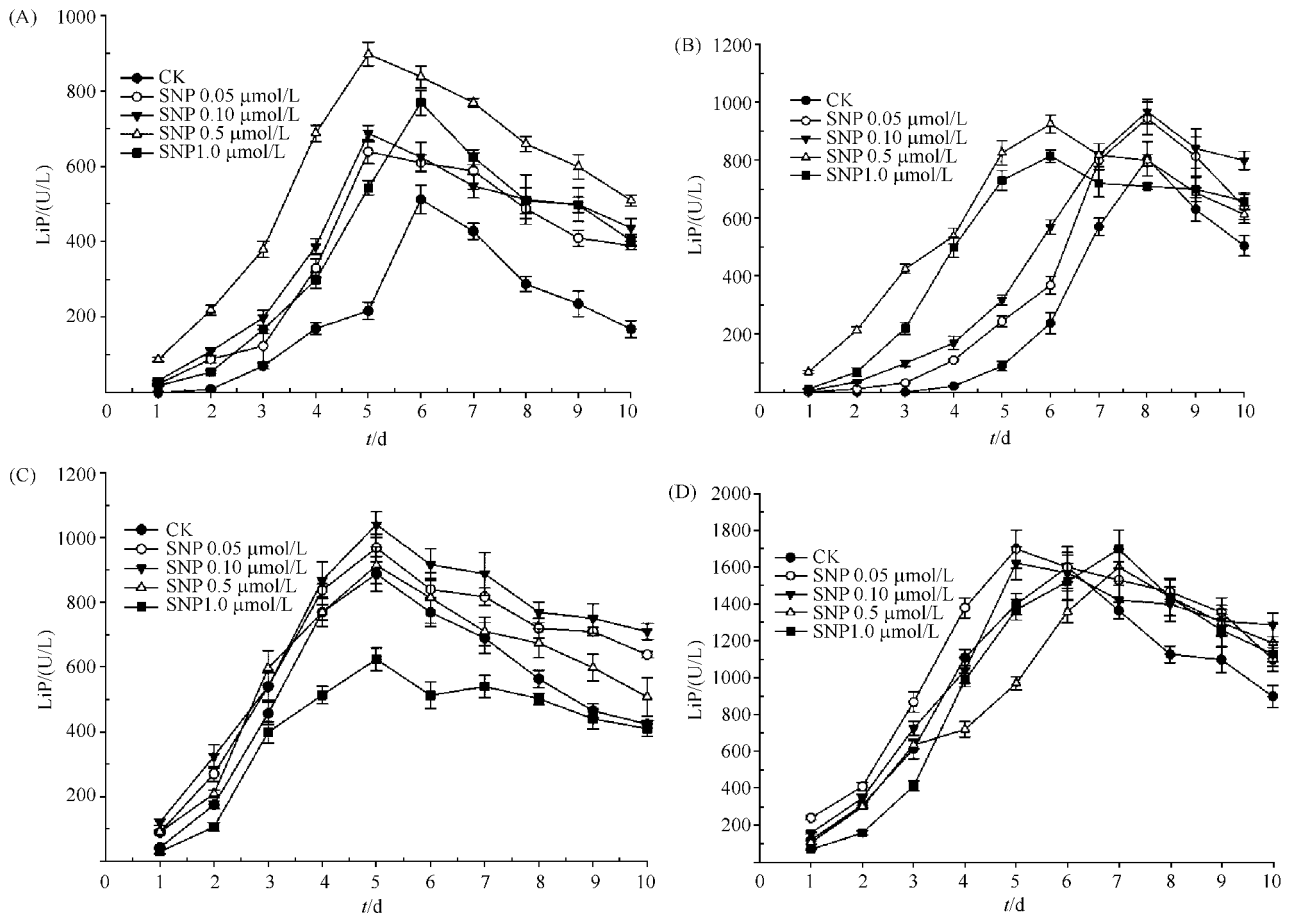


图 2 外源 NO 供体 SNP 对菌株合成 LiP 的影响

Fig. 2 Effect of exogenous NO donor SNP on LiP production. A: pc530 nitrogen limitation; B: pc530 nitrogen sufficiency; C: pcR5305 nitrogen limitation; D: pcR5305 nitrogen sufficiency.

2.3 NO 专一淬灭剂 cPTIO 对 *P. chrysosporium* 合成 LiP 的影响

外源 NO 供体均可使两菌株合成 LiP 增加,显

示 NO 可能是合成的 LDPs 正调控子,为进一步确证 NO 的作用及其作用机理,比较了 15 mmol/L NO 清除剂 cPTIO 对 *P. chrysosporium* 合成 LiP 的影响(图

3)。结果显示,加入15 mmol/L cPTIO 均可使两菌株在两种不同的营养条件下合成 LiP 下降,但 cPTIO 对不同菌株及其在不同营养条件下对产酶的抑制作用又有区别,pc530 产酶受抑制在 NL 条件下更明显,进一步说明了营养饥饿是野生菌株合成 NO 及 LiP 的基础。相反,pcR5305 则在 NS 条件下受 cPTIO 的影响更大,说明 pcR5305 发生的突变可能直接涉及到 NO 的合成的增强。加入15 mmol/L

的 cPTIO 能使 NO 完全被清除,也没有影响菌株对碳、氮源的消耗(数据未显示),说明 cPTIO 对产酶的抑制作用并不是由 cPTIO 产生的毒性效应。cPTIO 能完全清除基质中的 NO 但并没有完全抑制 *P. chrysosporium* 产生 LiP,进一步说明除了 NO 外,*P. chrysosporium* 合成 LiP 可能还涉及到其它正调控因子在起作用。

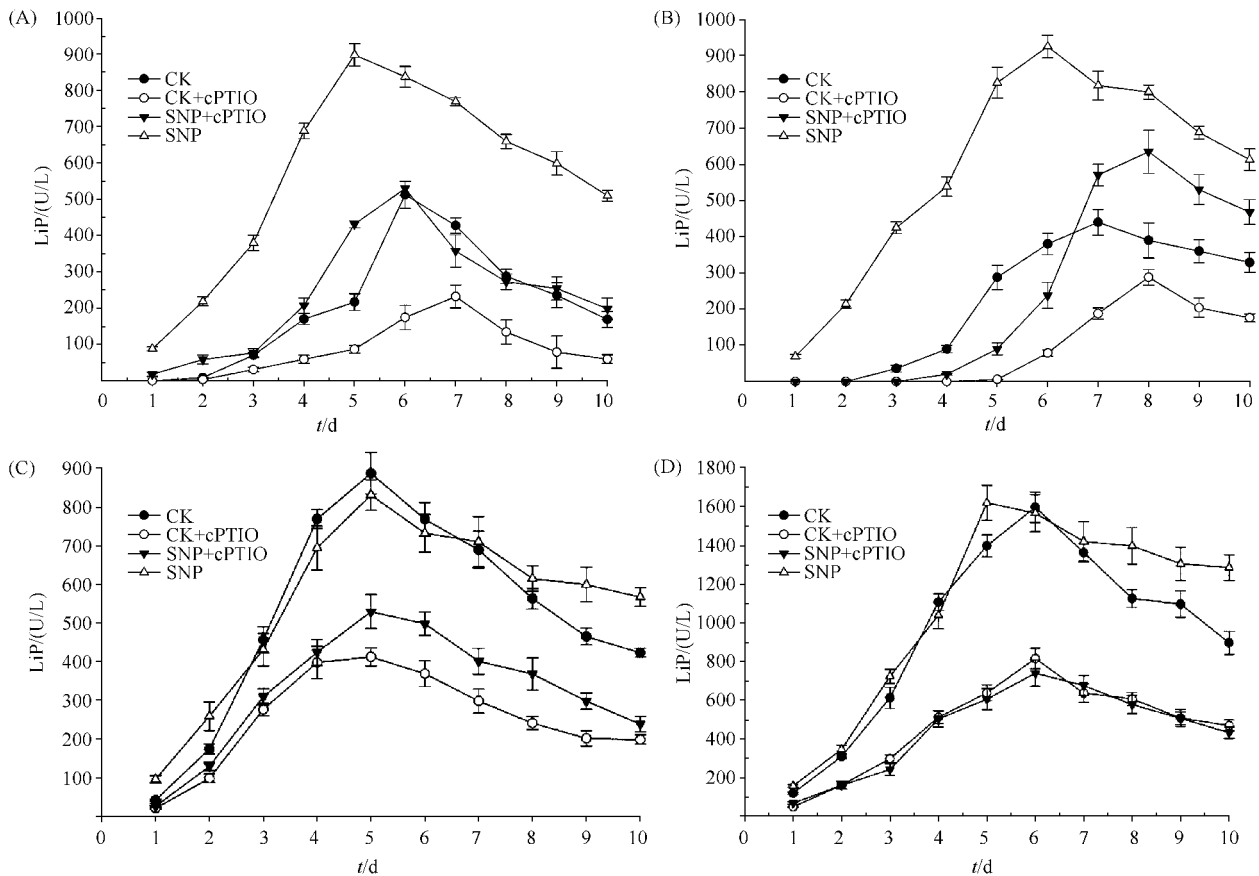


图3 NO清除剂cPTIO对菌株合成LiP的影响

Fig. 3 Effect of NO scavenger cPTIO on LiP production. A: pc530 nitrogen limitation; B: pc530 nitrogen sufficiency; C: pcR5305 nitrogen limitation; D: pcR5305 nitrogen sufficiency.

3 讨论

随着动、植物细胞中 NO 的来源及功能研究的不断深入,NO 在真菌中的存在及其合成途径的研究也日益受到重视。研究显示,真菌细胞中 NO 可通过氧化、还原两种途径产生,好氧条件下细胞质中的 NO 主要由类一氧化氮合酶(NOS)经 L-精氨酸氧化合成^[21-22],而在低氧或缺氧条件下,线粒体通过

NO₂⁻ 还原生成 NO^[23-25]。目前,已在盘基网柄(*Dictyostelium*)、须雷(*Phycomyces*)及脉孢菌(*Neurospora*)^[26]以及球刺盘孔菌(*Colletotrichum coccodes*)、盾壳霉(*Coniothyrium minitans*)等真菌中发现类 NOS^[27]。最近又在桦褐孔菌(*Inonotus obliquus*)白腐菌中发现了 NOS,并证实 NO 参与次生代谢调控^[28-30]。因此,*P. chrysosporium* 中也可能存在 NOS 并催化 NO 的生成;同时,*P. chrysosporium* 中的 NO 还可能来自于在初生代谢到次生代谢的转

换期大量产生的细胞色素氧化酶合成^[31-32]；此外，早在1991年 Servent 等^[33-34]就发现 *P. chrysosporium* 还可能由谷胱甘肽转移酶(GST)系统参与由硝化甘油产生 NO。众所周知，谷胱甘肽转移酶在生物的初级和次级代谢、胁迫防御和细胞信号传导中发挥重要作用，江明锋等^[35]也发现 *P. chrysosporium* 从初级代谢到次生代谢的转换期，有一个与氮代谢相关的基因转录显著上调，而 *P. chrysosporium* 进入次生代谢阶段的触发因子就是氮饥饿。在 KOG 分类中，该基因编码的蛋白质与信号传递相关，被称之为寡肽转运蛋白，其中一个参与谷胱甘肽的转运，而谷胱甘肽对于代谢调控特别是氧自由基介导的信号传导和调节有重要作用^[36]。结合 Servent 等^[33-34]研究结果，可以认为在 *P. chrysosporium* 中谷胱甘肽转移酶系统参与了 NO 的合成并在该菌的代谢转换期和次生代谢期的调控中起重要作用，但由谷胱甘肽转移酶系统合成 NO 的具体机制还不清楚。

我们的实验结果也证实了 *P. chrysosporium* 能产生 NO，但 NO 的产生与菌株及其营养状况有关，营养饥饿有利于野生型菌株产生 NO，富营养使野生菌株 pc530 产生 NO 量低且延后，说明营养饥饿胁迫可能是野生型菌株产生 NO 的重要条件。与野生菌株不同，突变菌株 pcR5305 产生 NO 并不需要营养饥饿激发，不仅产生 NO 的量明显高于野生菌株 pc530 ($P < 0.05$)，而且出现 NO 的峰值时间也提前，说明突变菌株产生 NO 的机制发生了变化，可能涉及到 NO 合成途径的直接或间接改变，使其能产生更高浓度的 NO，而这可能就是筛选的菌株能抗营养阻遏产酶的原因。而对于 *P. chrysosporium* 细胞中 NO 的产生机制，如是否存在 NOS、谷胱甘肽转移酶系统在合成 NO 的作用与机制、由苯丙氨酸裂解酶(PAL)裂解苯丙氨酸产生 NO 的可能性、由其它信号分子诱导产生 NO、突变菌株在富营养条件下产生 NO 的分子机制等等则需要进一步研究与证实。

目前，有关 NO 在真菌细胞中的功能与作用了解不多，有研究认为真菌孢子萌发、形态发生与 NO 有关，如在森氏小芽枝霉(*Blastocladiella emersonii*)孢子形成过程中发现 NO 含量增加^[37]。我们先前的研究发现 pcR5305 菌株菌落形态明显不同于野生菌株 pc530，pc530 在固体培养基上菌落呈淡黄色，孢子萌发成菌丝速度很慢，菌落因多以孢子形式存在而呈粉状。相反，突变菌株 pcR5305 菌丝生长

很快，形成大量的白色菌丝，相同培养时间内很少见到孢子^[18]。这种现象证实了在 *P. chrysosporium* 中的 NO 也同样控制孢子的形成与萌发，因 pcR5305 能不受营养饥饿激发产生 NO，使孢子形成与萌发速度远远快于野生菌株。

NO 除了影响真菌孢子的萌发和形态发生外，还与真菌的应激反应有关，如在某些真菌中发现 NO-cGMP 信号通路^[21-22]、NO 直接控制某些基因转录水平^[38-41]、NO 通过 S-亚硝基化^[42]或酪氨酸硝基化^[43]来减轻或加重氧化应激反应等等，使 NO 在真菌细胞体内稳态中起重要作用，而最近的研究则证实了 NO 是真菌激发子提升桦褐多孔菌白腐菌次生代谢产物酚类化合物积累的信号传导分子^[28-30]。然而，对 NO 在 WRF 合成 LDPs 中的作用等还不为人知，本实验结果显示，NO 对两菌株合成 LiP 的影响机制相同，即 NO 对合成 LiP 有促进作用。从产生 NO 发生于 LiP 合成之前，LiP 峰值总是迟于 NO 峰值出现等现象说明 NO 极有可能参与了 LiP 的合成，但 NO 又不直接影响 LiP 的产生，而更可能是作为一种上游的信号分子在起作用。我们先前的研究还发现，pc530 产漆酶受碳或氮饥饿调控，碳、氮各自独立发挥作用且在不同的营养条件下由不同营养素所调控，如在限碳条件下产漆酶主要由葡萄糖饥饿启动，而在富碳条件下则由氮饥饿所激发。相反，突变菌株漆酶合成的启动不受碳、氮营养所阻遏，可能涉及一个全局调控的改变，解除了漆酶合成的营养阻碍或通过某种正调控因子直接促进了漆酶的合成^[19]。这些结果不仅证实了营养饥饿胁迫(碳源或氮源饥饿)是野生型 *P. chrysosporium* 启动 LDPs 合成的条件，同时也将 NO 与 LDPs 合成的相关性联系起来。原先认为 WRF 启动次生代谢必须满足营养饥饿的观点可能需要重新认识，现在看来，营养饥饿可能仅仅是产生 NO 的一种条件，而 NO 的产生及达到必要的浓度才是激发 WRF 启动 LDPs 合成的关键。如果 WRF 能通过其它途径产生 NO，可能不需要营养饥饿也会启动 LDPs 的合成，这极有可能就是突变菌株能在富营养条件下合成 LDPs 的机制。这种新观点，对于 WRF 的工业应用提出了一种新的思路，而对于次生代谢产酶微生物育种也提供了一种新的手段，这种思路对于微生物特别是真菌次生代谢产物的提高及其次生代谢调控机制的研究与了解具有重要指导意义。

NO 对 *P. chrysosporium* 合成 LiP 的影响与其浓度有关, 外施 NO 对合成 LiP 的影响随菌株以及营养状况的不同而不同, 如野生菌株 pc530 在 NS 条件下加入 SNP 对 LiP 合成的促进作用比在 NL 条件下更为有效, 这与野生菌株本身在 NS 条件下内源 NO 生成量很少结果相一致, 而 NL 形成的营养胁迫以及可能因此产生的某些信号分子是启动合成 LiP 的基础。突变菌株 pcR5305 不管是在 NL 还是 NS 条件下, 加入 SNP 后对 LiP 合成的促进作用都没有野生菌株效果明显, 而且产生抑制 LiP 合成的 SNP 浓度也比 pc530 低, 原因可能是 pcR5305 能合成或因其它突变导致能产生更多的内源 NO, 更容易达到 NO 的细胞毒性浓度。但令人费解的是 pcR5305 在 NS 条件下受高浓度 SNP 抑制产酶的影响反而比 NL 低, 可能是更高浓度的 NO 会导致其它信号传导分子浓度的增加, 如徐茂军等^[44] 研究发现, NO 信号分子与 H₂O₂ 信号分子对彼此的合成反应具有促进作用, NO 处理可以提高细胞中 H₂O₂ 的水平, 而外源 H₂O₂ 对细胞 NO 合成积累也有促进作用。在白腐菌中也可能存在这种信号分子的相互促进作用, 而本身 ROS 在 WRF 合成 LDPs 中也有激活作用^[6, 45-47]。此外, 野生菌株 pc530 即使在 0.5 mmol/L 的最佳浓度 SNP 加入后也无法达到突变菌株 pcR5305 的产酶水平, 说明 NO 并非唯一的参与 WRF 合成 LDPs 的调控因子, pcR5305 菌株发生的变异除了可能导致生成 NO 反应直接发生变化外, 也可能是由于其它因素的改变, 而这种改变却又能影响 NO 的产生, 同时这种改变本身又能对 WRF 合成 LDPs 的启动有效或者是必须的, 徐茂军等人在植物细胞中的研究结果似乎也证实了这种可能性^[44]。

利用 NO 专一清除剂 cPTIO 去除 NO 后对 *P. chrysosporium* 合成 LiP 影响显示, 两菌株在两种营养条件下合成 LiP 均大为降低, 进一步说明了 NO 对 *P. chrysosporium* 启动 LiP 合成在起作用, 当加入 15 mmol/L cPTIO 能使培养介质中的 NO 完全清除, 但并没有完全抑制 *P. chrysosporium* 产生 LiP, 说明除了 NO 外, *P. chrysosporium* 合成 LiP 可能还涉及到其它正调控因子。当 cPTIO 与 SNP 同时存在时的产酶活性高于不含有 SNP 的处理, 可能原因是 SNP 在起作用或其产生的 NO 能快速刺激其它正调控因子的产生。除了这些共性外, cPTIO 对不同的菌株及其在不同的营养条件下, 对产酶的抑制作用又有

区别, 野生菌株 pc530 产酶抑制在 NL 条件下受 cPTIO 影响更明显, 进一步证实了营养饥饿是野生菌株合成 NO 的条件。相反, 突变菌株 pcR5305 则在 NS 条件下受 cPTIO 的影响更大, 也说明 pcR5305 发生的突变极有可能直接涉及到 NO 的合成, 图 1 结果也显示, 在 NS 条件下 pcR5305 产生 NO 更高, 更高浓度的 NO 也可能促进产生更有效的其它信号分子如 ROS 等, cPTIO 不仅清除了 NO, 也间接减少了其它信号分子如 ROS 的产生量。从 pcR5305 受 cPTIO 的抑制影响比野生菌株 pc530 低的现象也证实了还有其它存在相互促进作用的信号分子存在。

WRF 是一类以木材为基质的腐生真菌, 木质材料的含氮量在 0.3% 以下, 因此利用木质材料存活的腐生真菌的生存环境应是一个限氮环境, WRF 限氮条件下启动木质素降解酶的合成则是长期进化适应的结果。长期以来, 尽管采用了多种先进的方法进行了研究, 但对 WRF 营养限制产酶的机理研究一直进展不大, 对有报导的白腐菌可在富氮(非营养饥饿)的条件下产木素酶没法解释清楚, 应该说, 木素酶合成的机理同真菌对氮饥饿胁迫响应并启动的一系列防御体系有关, 如果从胁迫及其防御响应机制去研究能够解释非营养饥饿产酶的机理。因此, 利用富营养产酶突变菌株生物材料, 深入弄清其启动木质素降解酶的信号分子产生机制、信号分子的传导途径、信号分子间的相互关系, 将是有重要科学意义与应用价值的工作。

参考文献

- [1] Kirk TK, Farrell RL. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. *Annual Review Microbiology*, 1987, 41: 465-505.
- [2] Bumpus JA, Tien M, Wright D. Oxidation of persistent environmental pollutants by white rot fungus. *Science*, 1985, 228: 1434-1436.
- [3] Kirk TK, Schultz E, Connors WJ, Lorenz LF, Zeikus JG. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *phanerochaete chrysosporium*. *Arch Microbiology*. 1978, 117: 277-285.
- [4] Reddy CA, Trevor M, Souza D. Physiology and molecular biology of the lignin peroxidases of *phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiology Reviews*, 1994, 13(2): 137-152.
- [5] Singh D, Chen S. The white-rot fungus *phanerochaete chrysosporium*: conditions for the production of lignin-

- degrading enzymes. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2008, 81: 399-417.
- [6] Paula A, Belinky NF, Sergey L, Shimon G, Dosoretz CG. Reactive oxygen species and induction of lignin peroxidase in *phanerochaete chrysosporium*. *Applied Environment Microbiology*, 2003, 69 (11) :6500-6506.
- [7] Belinky A, Nufar F, Dosoretz CG. Induction of lignin peroxidase via reactive oxygen species in manganese-deficient cultures of *phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 39:222-228.
- [8] Ozcan S, Yildirim V, Kaya L, Albrecht D, Becher D, Hecker M, Ozcengiz G. *Phanerochaete chrysosporium* soluble proteome as a prelude for the analysis of heavy mental stress response. *Proteomics*, 2007, 7:1249-1260.
- [9] Yildirim V, Ozcan S, Becher D, Knut B, Hecker M, Ozcengiz G. Characterization of proteome alteration in *phanerochaete chrysosporium* in response to lead exposure. *Proteome Science*, 2011, 9:1-15.
- [10] Mayer B, Hemmens B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochemistry Science*, 1997, 22: 477-481.
- [11] Stamler JS, Lamas S, Fang FC. Nitrosylation, the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell*, 2001, 106: 675-683.
- [12] Garcia-Mata C, Lamattina L. Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. *Plant Physiology*, 2001, 126 (3) :1196-1204.
- [13] Zhang Y, Wang L, Liu Y. Nitric oxide enhances salt tolerance in maize seedlings through increasing activities of proton pump and Na^+/H^+ antiport in the tonoplast. *Planta*, 2006, 224: 545-555.
- [14] Tien M, and Myer SB. Selection and characterization of mutants of *phanerochaete chrysosporium* exhibiting ligninolytic activity under nutrient-rich conditions. *Applied Environment Microbiology*, 1990, 56: 2540-2544.
- [15] Frederick SA. A new assay for lignin-type peroxidase employing the dye azure B. *Applied Environment Microbiology*, 1992, 58 (9) : 3110-3116.
- [16] Delledonne M, Xia Y, Dixon RA. Nitric oxide functions as a secondary signal in plant disease resistance. *Nature*, 1998, 394: 585-588.
- [17] Hu XY, Fang JY, Cai W M, Tang ZC. Nitric oxide mediates elicitor-induced non-compatibility of suspension cells of rice hypersensitive response. *Chinese Science Bulletin*. 2003, 48 (2) : 157-161. (in Chinese)
- 胡向阳, 方建颖, 蔡伟明. 一氧化氮介导非亲和性激发子诱发水稻悬浮细胞过敏反应. *科学通报*, 2003, 48 (2) : 157-161.
- [18] Qiu AL, Li WY, Zheng YT, Fan XJ, Ye YX, Meng Y. Breeding and characterization of laccase-producing *Phanerochaete chrysosporium* mutant resistant to nutritional repression. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51 (3) :352-359. (in Chinese)
邱爱连, 李文燕, 郑耀通, 范晓静, 叶友贤, 孟延. 黄孢原毛平革菌抗营养阻遏产漆酶诱变育种及其产酶特性. *微生物学报* 2011, 51 (3) :352-359.
- [19] Qiu AL, Li WY, Fan XJ, Ye YX, Meng Y, Zheng YT. Carbon-nitrogen regulation of a laccase-producing mutant of *Phanerochaete chrysosporium* resisting carbon and nitrogen nutritional repression. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52 (3) :334-344. (in Chinese)
邱爱连, 李文燕, 范晓静, 孟延, 郑耀通. 黄孢原毛平革菌突变菌株抗碳氮营养阻遏产漆酶碳氮营养调控机理. *微生物学报*, 2012, 52 (3) :334-344.
- [20] Li DD, Wang Y, Li Y, Jiang YY. Influence of nitric oxide on growth of microorganisms: a double-edged sword. *Academic Journal of Second Military Medical University*, 2010, 31 (12) :1356-1358. (in Chinese)
李德东, 王彦, 李莹, 姜远英. 一氧化氮对微生物生长影响作用的两面性. *第二军医大学学报*, 2010, 31 (12) :1356-1358.
- [21] Vieira AL, Linares E, Augusto O, Gomes SL. Evidence of a Ca^{2+} -NO-cGMP signaling pathway controlling zoospore biogenesis in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. *Fungal Genetic Biology*, 2009, 46:575-584.
- [22] Li B, Fu Y, Jiang D, Xie J, Cheng J, Li G, Hamid MI, Yi X. Cyclic GMP as a second messenger in the nitric oxide mediated conidiation of the mycoparasite *Coniothyrium minitans*. *Applied Environment Microbiology*, 2010, 76:2830-2836.
- [23] Castello PR, David PS, McClure T, Crook Z, Poyton RO. Mitochondrial cytochrome oxidase produces nitric oxide under hypoxic conditions: implications for oxygen sensing and hypoxic signaling in eukaryotes. *Cell Metabolism*, 2006, 3:277-287.
- [24] Castello PR, Woo DK, Ball K, Wojcik J, Liu L, Poyton RO. Oxygen-regulated isoforms of cytochrome c oxidase have differential effects on its nitric oxide production and on hypoxic signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105:8203-8208.
- [25] Zhou S, Fushinobu S, Kim SW, Nakanishi Y, Maruyama J, Kitamoto K, Wakagi T, Shoun H.

- Functional analysis and subcellular location of two flavohemoglobins from *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genetic Biology*, 2011, 48:200-207.
- [26] Ninnemann H, Maier J. Indications for the occurrence of nitric oxide synthases in fungi and plant and the involvement in photoconidiation of *Neurospora crassa*. *Photochemistry and Photobiology*, 1996, 64:393-398.
- [27] Gong X, Fu Y, Jiang D, Li G, Yi X, Peng Y. L-arginine is essential for conidiation in the filamentous fungus *coniothyrium minitans*. *Fungal Genetic Biology*, 2007, 44:1368-1379.
- [28] Zheng W, Miao K, Zhao Y, Pan S, Zhang M, Jiang H. Nitric oxide mediates fungal elicitor-induced biosynthesis of antioxidant polyphenols in submerged cultures of *inonotus obliquus*. *Microbiology-SGM*, 2009, 155: 3440-3448.
- [29] Zhao YX, Miao KJ, Zhang MM, Zheng WF, Effects of fungal elicitor on production of phenolic compounds by *Phaeopus obliquus*, *Mycosystema*, 2010, 29(3): 437-441. (in Chinese)
赵艳霞, 缪康杰, 张梅梅, 郑维发, 真菌激发子对桦褐孔菌多酚积累的影响. 菌物学报, 2010, 29(3): 437-441.
- [30] Zheng W, Liu Y, Pan S, Yuan W, Dai Y, Wei J. Involvements of S-nitrosylation and denitrosylation in the production of phenolic compounds by *inonotus obliquus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 99: 1763-1772.
- [31] Basha SA, Sarma BK, Singh DP, Annapurna K, Singh UP. Differential methods of inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria induces synthesis of phenylalanine ammonia-lyase and phenolic compounds differentially in chickpea. *Folia Microbiologica*, 2006, 51: 463-468.
- [32] Subramanian V, Doddapaneni H, SyedK, and Yadav JS. P450 redox enzymes in the white rot fungus *phanerochaete chrysosporium*: gene transcription, heterologous expression, and activity analysis on the purified proteins. *Current Microbiology*, 2010, 61:306-314.
- [33] Servent D, Ducrocq C, Henry Y, Guissani A, Lenfant M. Nitroglycerin metabolism by *phanerochaete chrysosporium*: evidence for nitric oxide and nitrite formation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1991, 1074: 320-325
- [34] Servent D, Ducrocq C, Henry Y, Servy C, Lenfant M. Multiple enzymatic pathways involved in the metabolism of glyceryltrinitrate in *phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 1992, 15:257-266.
- [35] Jiang, MF, Li X, Zhang L, Feng H, Zhang YZ, Gene expression analysis of *phanerochaete chrysosporium* during the transition time from primary growth to secondary metabolism. *The Journal of Microbiology*. 2009, 47(3): 308-318.
- [36] Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, Storz G, Botstein D, and Brown PO, Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Molecular Biology Cell*, 2000, 11(12): 4241-4257.
- [37] Kig C, Temizkan G. Nitric oxide as a signaling molecule in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Protoplasma*, 2009, 238:59-66
- [38] Horan S, Bourges I, Meunier B. Transcriptional response to nitrosative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 2006, 23:519-535
- [39] Chiranand W, McLeod I, Zhou H, Lynn JJ, Vega LA, Myers H, Yates JR, Lorenz MC, Gustin MC. CTA4 transcription factor mediates induction of nitrosative stress response in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*, 2008, 7:268-278.
- [40] Kim HJ, Jung HY, Lim CJ. The pap1+ gene of fission yeast is transcriptionally regulated by nitrosative and nutritional stress. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, 280: 176-181.
- [41] Lushchak OV, Inoue Y, Lushchak VI. Regulatory protein Yap1 is involved in response of yeast *Saccharomyces cerevisiae* to nitrosative stress. *Biochemistry (Mosc)*, 2010, 75:629-664.
- [42] Lee PY, Bae KH, Jeong DG, Chi SW, Moon JH, Kang S, Cho S, Lee SC, Park BC, Park SG. The S-nitrosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2 is reduced by interaction with glutathione peroxidase 3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecules and Cells*. 2010, 31:255-259.
- [43] Castello PR, David PS, McClure T, Crook Z, Poyton RO. Mitochondrial cytochrome oxidase produces nitric oxide under hypoxic conditions: implications for oxygen sensing and hypoxic signaling in eukaryotes. *Cell Metabolism*, 2006, 3:277-287.
- [44] Xu MJ, Dong JF, Zhang XB. Signal interaction between nitric and hydrogen peroxide in induction producing hypericin by *Hypericum perforatum* through heat-shock, *Science in China Series C(Life Sciences)*, 2008, 38(7): 643-653. (in Chinese)
徐茂军, 董菊芬, 张新波. NO 和 H₂O₂ 在介导热诱导发金丝桃细胞合成金丝桃素中的信号互作, 中国科学 C 辑: 生命科学, 2008, 38(7): 643-653.

- [45] Rothschild N, Hadar Y, Dosoretz CG. Ligninolytic system formation by *phanerochaete chrysosporium* in air. *Applied and Environment Microbiology*, 1995, 61:1833-1838.
- [46] Rothschild N, Levkowitz A, Hadar Y, Dosoretz CG. Manganese deficiency can replace high oxygen levels needed for lignin peroxidase formation by *phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environment Microbiology*, 1999, 65:483-488.
- [47] Zacchi L, Burla G, Zuolong D, Harvey PJ. Metabolism of cellulose by *phanerochaete chrysosporium* in continuously agitated culture is associated with enhanced production of lignin peroxidase. *Journal of Biotechnology*, 2000, 78:185-192.

Function of nitric oxide in initiating production of lignin degrading peroxidases by *Phanerochaete Chrysosporium*

Yaotong Zheng^{*}, Ailian Qiu, Wenyan Li, Feng Zheng, Li Zhang, Yaqing Shi, Gang Zheng, Yanqiong Zou

Institute of Application Microbial Technology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

Abstract: [Objective] By analyzing the function and mechanism of nitric oxide in initiating producing lignin peroxidases by *phanerochaete chrysosporium*, we studied the regulation mechanism triggering the secondary metabolism of white-rot fungi. [Methods] Mutant (pcR5305) and wild-type (pc530) strains of *phanerochaete chrysosporium* were respectively cultured under both the conditions of nitrogen limitation and nitrogen sufficiency. To compare their lignin peroxidases (LiP) production and nitric oxide (NO) production kinetics and their different influences on producing LiP after the NO donor Sodium Nitroprusside (SNP) and scavenger cPTIO were respectively added to the nitrogen limitation or sufficiency culture medium to show the function and mechanism of nitric oxide in initiating production of lignin peroxidases by white-rot fungi. [Results] Both strains produced nitric oxide (NO) under the two opposite nutritional conditions, but the levels of NO produced were related with the type of strain and the nutritional conditions. Strain pc530 produced NO requiring nutrition depletion and producing of NO was strongly delayed and reduced when it was cultured under nitrogen sufficiency condition. On the contrary, pcR5305 did not require nitrogen depletion to trigger and the levels of NO were higher than that of pc530. The results indicate that LiP content had positive correlation with NO value except the occurrence time of LiP peak value was later than that of NO. The ability of producing LiP was promoted after the NO donor SNP added, but SNP affected more on pc530 than pcR5305 in promoting producing LiP. 15mM cPTIO would greatly repress producing LiP, but could not completely restrain the synthesis of LiP for both strains. [Conclusion] By producing NO, *Phanerochaete chrysosporium* triggers LiP synthesis. However, the evidences do not indicate that NO participates or effect directly in LiP synthesis. It is more likely that NO is reacting as an upstream signal molecule. Besides NO, there are other signal molecules that have a positive effect on NO levels also involving in the regulation producing LiP. The mechanism of the resistance to nutritional repression of pcR5305 in synthesizing lignin degrading peroxidases may be the answer to the different NO production mechanism of pcR5305 from pc530.

Keywords: *phanerochaete chrysosporium*, nitric oxide, lignin peroxidases, SNP, cPTIO

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Fujian Provincial Natural Science Foundation of China (2007J0120, 2011J05047)

^{*} Corresponding author. Tel: +86-591-83789361; Fax: +86-591-83776849; E-mail: fafu5188@yahoo.com.cn

Received: 21 October 2012/Revised: 26 November 2012