

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

邱爱连^{1,2}, 李文燕², 郑耀通^{2*}, 范晓静², 叶友贤², 孟延²

福建农林大学,¹ 生命科学学院,² 应用微生物技术研究所, 福州 350002

摘要:【目的】筛选能抗营养阻遏产漆酶的黄孢原毛平革菌, 论证其产漆酶的确切性及抗营养阻遏产木质素酶的可行性, 为白腐菌产酶代谢调控、木质素降解机理的研究奠定基础。【方法】利用重复紫外诱变法, 以愈创木酚富氮鉴别培养基筛选目标菌株; 比较不同营养条件下菌体生长与产酶动力学差异研究产酶营养调控机理; 通过热处理、排除锰离子和加入过氧化氢酶等不同措施论证黄孢原平毛平革菌能否产生漆酶。【结果】3种不同方法均证实选育到的 pcR5305 和 pcR5324 菌株在限氮与富氮条件下均能产生漆酶, pcR5305 和 pcR5324 在限氮条件下产漆酶分别达到 203.5、187.6 U/L; 在富氮条件下为 220.6、183.9 U/L, 而原菌株 pc530 在两种条件下都基本不产生漆酶。二菌株产漆酶调控方式不同, pcR5305 漆酶产生与菌体生长同步, 而 pcR5324 漆酶产生却受营养氮阻遏。二菌株同时具有抗营养阻遏高产木质素过氧化物酶(LiP)和锰过氧化物酶(MnP)(分别为 LiP 1343.2、MnP 252.2 U/L; LiP 1169.5、MnP 172.4 U/L)的能力。【结论】筛选到的黄孢原毛平革菌变异菌株能产漆酶, 同时表现了抗营养阻遏产漆酶、木质素过氧化物酶和锰过氧化物酶的能力, 具有重要的生产应用与理论研究价值, 为白腐菌产酶代谢调控机理研究提供了原始菌株并奠定了良好的基础。

关键词: 黄孢原毛平革菌, 诱变育种, 漆酶, 抗营养阻遏

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 03-0352-08

木质素是地球上丰富的再生性芳香聚合物, 它的生物降解是自然界碳素循环的关键步骤。由白腐菌产生的非专一性木质素过氧化物酶(lignin peroxidase, LiP)、锰过氧化物酶(manganese peroxidase, MnP)和漆酶(laccase, Lac)是启动木质素降解的关键酶, 这些酶只有在营养饥饿(限氮为主)条件下才能合成^[1-2], 这种营养阻遏产酶特性严重制约了酶产量与白腐菌的现场应用效果。因此, 选育抗营养阻遏产酶白腐菌具有十分重要的应用价值

与理论研究意义, 然而目前却很少有这方面的文献报导。

漆酶是一种含铜酚氧化酶, 因具有作用底物范围广和不需要 H₂O₂ 参与反应等优点而备受关注^[3]。黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)是白腐菌产木质素酶和木质素生物降解研究的模式生物, 普遍认为黄孢原毛平革菌只产 LiP、MnP 而不产 Lac^[4], 然而也曾经有 *P. chrysosporium* 能产漆酶的报道, 但所得结论并不一致^[5-8], 黄孢原

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目——“抗营养阻遏高产木素酶白腐菌的选育与应用基础研究”(2007J0120)

* 通信作者。Tel: +86-591-83789361; E-mail: zyt5188@yahoo.com.cn

作者简介: 邱爱连(1977-), 女, 福建莆田人, 讲师, 研究方向微生物学。E-mail: qial888@sina.com

收稿日期: 2010-09-13; **修回日期:** 2010-12-02

毛平革菌能否产生漆酶还有争议。本文旨在选育抗营养阻遏产漆酶黄孢原毛平革菌,验证白腐菌抗营养阻遏产漆酶的可行性并论证黄孢原毛平革菌产漆酶的确性。为拓展黄孢原毛平革菌木素酶并增进产酶代谢生理与调控、木素降解机理的了解,促进木质素降解酶生产和白腐菌在造纸工业和环境治理中的直接应用提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌种 黄孢原毛平革菌(*P. chrysosporium*)为本研究所保存,编号为 pc530。

1.1.2 培养基 PDA 固体培养基:在经典马铃薯培养基基础上添加 0.005 g/L 的 V_{B1} ,用于白腐菌的斜面接种和固体扩大培养;产酶培养基(g/L):采用 Kirk^[9]经典培养基改良成液体限氮(N-L)和富氮(N-S)培养基,添加 0.28 g/L 酒石酸钠,富氮培养基含酒石酸铵 2.2 g/L,限氮培养基含酒石酸铵 0.22 g/L。用于白腐菌产酶培养;筛选培养基:参考 Archibald 等^[10](1992)方法,在 N-S 产酶培养基中加入 20 g/L 琼脂和 2 g/L 愈创木酚,由菌落周围紫红色变色圈定性检测漆酶的产生。

1.2 紫外诱变

将新接种 pc530 斜面在 37℃ 下培养 7-10 d 后,用无菌生理盐水洗下孢子,1100 × g 离心 5 min,弃去上清液,再洗涤 1 次,沉淀用无菌生理盐水重新悬浮并用血球板计数定量。将装有 6mL 孢子悬浮液的培养皿置于距离灯管 30 cm 磁力搅拌器上,打开盖子后用紫外分别照射 10、30、60、90、120、180、300 和 480 s,计算相应的致死率。选择致死率在 85% - 95% 作为紫外诱变时间,诱变后的孢子悬浮液转入无菌试管内并立即浸入冰水中 1-2h 防止修复。

1.3 抗营养阻遏产漆酶黄孢原毛平革菌选育

取紫外诱变过的孢子悬浮液,用无菌生理盐水稀释后涂布到筛选培养基上,及时观察能在 N-S 培养基上生长且产生紫红色变色圈的菌落,分别将其挑出后纯化,再重复进行诱变、筛选、纯化过程共 2 次,得到能在 N-S 条件下产漆酶的诱变菌株,将其编号并于 4℃ 冰箱中保存备用。将这些初筛菌株接种液体 N-S 培养基进行静置培养产酶比较,每隔 24h

测定酶活,筛选出优良菌株。

1.4 选育菌株生长与产酶动力学

利用改良的 Kirk 液体 N-L 和 N-S 基本培养基,液体接种相应的菌株到装有 30 mL 培养液的 300 mL 三角瓶中,设 4 个重复,37℃ 恒温静置培养,每天取出一瓶发酵液过滤,80℃ 烘干至恒重,称量并计算菌体生物量。滤液经 9300 × g,4℃ 离心 5 min 后制成粗酶液用于测定酶活,作动力学曲线用于比较菌体生长与酶合成之间的关系。

1.5 酶活测定

1.5.1 漆酶测定:在 3 mL 反应体系中,含有 0.5 mL 粗酶液,1.5 mL pH 5.0 0.1 mol/L 乙酸-乙酸钠缓冲液,60U 的 H_2O_2 酶,用 1 mL 0.5 mmol/L ABTS (2, 2-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate)) 启动反应,25℃ 水浴保温 5 min,用分光光度计在 420 nm 测定吸光度随时间的变化。1 个酶活力单位(U)以每分钟催化 1 μ mol ABTS 氧化所需的酶量表示。

1.5.2 木质素过氧化物酶测定:以 LiP 酶在 H_2O_2 存在下氧化 Azure B 染料来表示 LiP 活性,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 μ L,粗酶液 500 μ L,30℃ 下加入 2 mmol/L 的 H_2O_2 溶液 500 μ L 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酶液降低 0.1 个 OD 值来表示。

1.5.3 锰过氧化物酶测定:取 50 mmol/L 的乳酸-乳酸钠缓冲液(pH 4.5) 3.4 mL,1.60 mmol/L 的 $MnSO_4$ 溶液 0.1 mL,0.4 mL 粗酶液,放在 7 mL EP 管中,震荡混匀,室温下加入 1.60 mmol/L 的 H_2O_2 溶液 0.1 mL 启动反应,测反应最初 3 min 内 240 nm 处吸光度变化,以 0.1 mL 缓冲液代替 $MnSO_4$ 做空白对照,1 个酶活力单位用每分钟吸光值增加 0.1 的酶量来表示。

2 结果

2.1 抗营养阻遏产漆酶菌株的筛选与产酶动力学比较

经测定,2 min 紫外照射为最佳诱变时间,将经过 2 min 紫外诱变的孢子悬液稀释涂布于愈创木酚 N-S 培养基上,约 36 h 后在稀释度为 10^{-4} 平板上有

孢子萌发形成单菌落并首先出现变色圈,挑取该菌落经纯化后再重复进行诱变、筛选、纯化过程共2次,得到编号为pcR5301的一株诱变菌株,4℃保藏。重复上述步骤,经过初筛共得到27株在N-S条件下产生紫红色变色圈的诱变菌株。

在N-S条件下对初筛的27株突变菌株分别进行浅层静置培养,每隔24h测定酶活性(表1)。原

菌株pc530在N-S条件下基本不产漆酶,而在N-L条件下在培养的后期出现极微弱酶活性,但27株诱变菌株均能产生不同量的漆酶,其中pcR5305、pcR5306、pcR5309、pcR5312、pcR5313、pcR5324菌株产漆酶活性较高,选取这6株突变株进行产漆酶生物稳定性测定。

表1 不同突变菌株产漆酶特性(U/L)

Table 1 Production laccase characteristics of different mutant strains

Strains number	Time/d									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
pcR5301	0	3.98	16.38	28.61	33.68	75.84	45.21	12.35	7.14	3.82
pcR5302	0	0.36	10.59	38.13	26.97	27.39	42.42	21.92	757	2.92
pcR5303	0	3.09	4.93	10.02	19.67	45.49	43.67	2639	22.56	11.21
pcR5304	0	0	1.64	12.32	32.57	57.65	62.47	48.36	33.24	9.86
pcR5305*	0.31	12.98	31.87	68.26	115.48	136.22	177.36	228.25	213.81	189.22
pcR5306*	0.13	1.35	11.09	31.21	42.64	73.24	109.11	115.67	96.32	81.28
pcR5307	0	2.67	7.39	16.78	21.35	9.36	531	387	214	1.32
pcR5308	0	1.69	9.35	20.38	29.63	16.36	12.78	6.42	358	1.21
pcR5309*	0	2.14	2.86	5.53	62.64	78.76	86.26	89.76	130.41	117.56
pcR53010	0	1.37	6.32	10.28	28.33	12.56	915	8.25	352	2.36
pcR53011	0	2.89	11.23	14.12	25.67	38.39	32.43	22.32	14.57	12.92
pcR53012*	0	16.78	33.72	72.45	107.75	120.54	169.43	188.41	186.82	169.17
pcR53013*	0	3.36	12.38	45.43	76.35	91.35	136.45	124.31	112.98	103.75
pcR53014	0	2.56	7.68	19.46	27.35	16.45	9.64	8.36	3.42	2.39
pcR53015	0	6.14	15.35	2856	34.56	29.87	26.45	23.11	16.74	13.68
pcR53016	0	265	7.69	23.24	3022	15.35	12.22	7.87	6.35	2.15
pcR53017	0	1.22	6.78	12.28	23.33	16.56	12.15	8.26	3.36	2.53
pcR53018	0	0	2.22	6.35	12.54	16.35	19.42	18.66	7.54	6.28
pcR53019	0	12.35	56.32	69.22	76.56	81.25	72.54	35.21	16.64	2.12
pcR5320	0	1.26	8.52	22.58	32.54	16.85	10.25	6.79	5.64	3.18
pcR5321	0	2.63	7.69	12.12	18.04	26.07	15.7	9.43	8.52	3.33
pcR5322	0	0	0.35	4.66	11.04	16.31	11.77	7.64	3.42	0.96
pcR5323	0	0.36	1.87	2.26	7.48	13.22	9.36	4.25	2.81	1.22
pcR5324*	0	7.24	16.55	43.98	86.44	96.26	104.21	125.63	189.32	206.31
pcR5325	0	1.21	1.36	3.44	9.74	16.39	12.87	6.12	2.21	1.98
pcR5326	0	6.34	9.27	13.44	16.54	19.21	15.47	8.48	3.42	2.62
pcR5327	0	0	1.34	4.36	8.96	15.72	21.34	8.35	7.54	3.23
pc530 N-L	0	0	0	0	0	0.39	1.98	2.24	0.56	0.32
pc530 N-S	0	0	0	0	0	0	0	0	0.23	0.19

2.2 产漆酶变异菌株产酶遗传稳定性

将菌株pcR5305、pcR5306、pcR5309、pcR5312、pcR5313、pcR5324分别每隔15d进行斜面继代培养5代,测定各代在N-S条件下第8d的产酶活力。结果pcR5305、pcR53242株突变菌株在每一代都能稳定产酶,pcR5305产酶稳定在256.7-291.8U/L,pcR5324产酶稳定在167.8-172.3U/L,而其它菌株却不能稳定产酶,而且随传代次数的增加,产酶活性逐代降低,由此选取pcR5305、pcR5324作为目

的菌株。

2.3 变异株pcR5305、pcR5324菌体生长与木素酶合成的关系

对上述2株优良变异菌株进行产木素降解酶系能力测定,结果可以发现(图1),变异株pcR5305和pcR5324均能在富氮条件下产生LiP、MnP、Lac木质素酶,且比原菌株pc530在同一条件下产酶活性要高,特别是产漆酶尤为如此。另有一个明显的特征是诱变菌株的产酶时间比原菌株大为提前,诱变菌

株在富营养条件下产酶已呈现出初生代谢产酶的特点,为验证这种可能性,进一步对菌株生长与产漆酶之间的相关性进行了实验。

2.4 变异株 pcR5305、pcR5324 菌体生长与产漆酶动力学比较

变异株菌体生长与产漆酶的相关性实验结果如图 2-3。在 N-S 条件下,原菌株 pc530 在 0-5d 内的生长呈持续增长状态,但随后其菌体生物量并没再增加,说明过量的氮源影响菌体生长。相同培养条件下,菌株 pcR5305、pcR5324 生长快于 pc530,其

生物量也明显高于 pc530 菌株,在 0-7d 内,菌体呈快速生长状态,并在第 7d 生物量达到最大(图 2)。在 N-L 条件下,各菌株的生长状况与 N-S 条件下基本相似,但生长速率与生物量比 N-S 条件下均略低,但 pc530 菌株却在 N-L 条件下略高且出现最高生物量的时间明显延迟(图 3)。

由产酶动力学可以发现,pc530 不管是在 N-S 还是 N-L 条件下仅能产生极其微量的漆酶,其中在 N-L 条件下在第 6 d 达到最高时仅有 7.97U/L,在 N-S 条件下在第 12 d 达到最高时仅有 7.54U/L。而

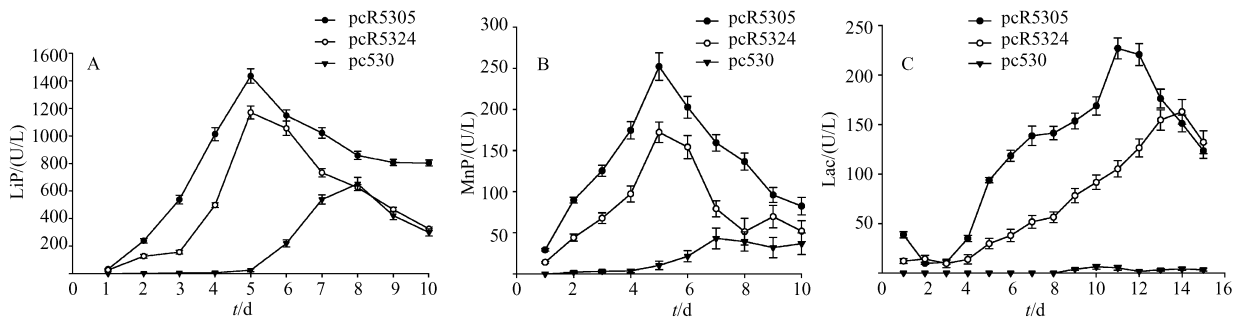


图 1 不同菌株产 LiP (A)、产 MnP (B) 和产 Lac (C) 的性能比较

Fig. 1 Performance of producing LiP (A), MnP (B) and Lac (C) of different strains.

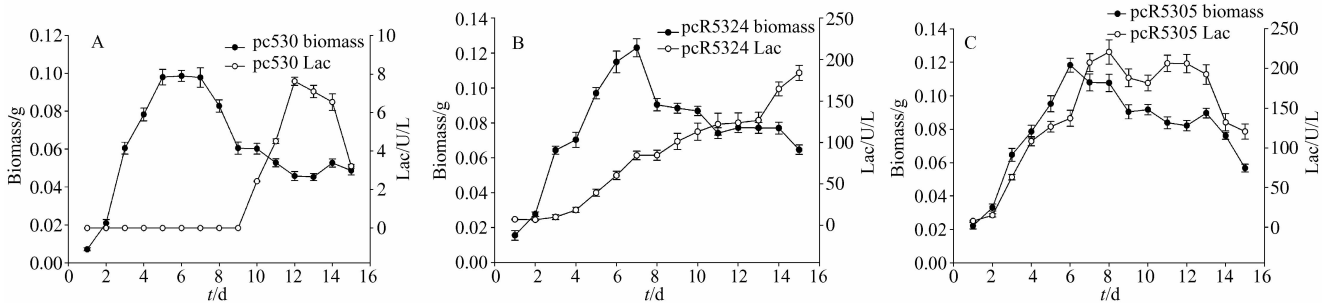


图 2 N-S 条件下菌株菌体生长与产漆酶的关系

Fig. 2 Relationship of cell growth and Lac producing under the condition of N-S. A: pc530 strain; B: pcR5324 strain; C: pcR5305 strain.

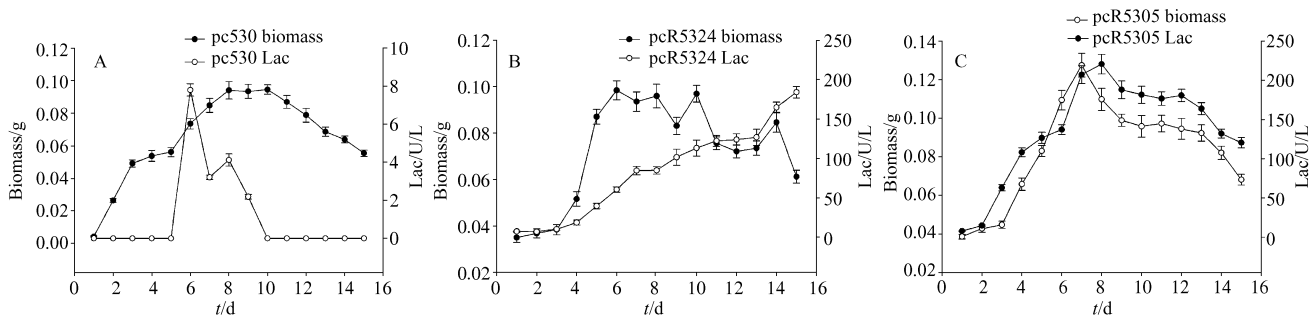


图 3 N-L 条件下菌株菌体生长与产漆酶的关系

Fig. 3 Relationship of cell growth and Lac producing under the condition of N-L. A: pc530 strain; B: pcR5324 strain; C: pcR5305 strain.

pcR5305、pcR5324 则在 N-S 与 N-L 条件下均能高效产生漆酶,但两者产漆酶调控方式显然不同,pcR5305 产漆酶与菌体的生长基本同步,即随菌体生物量的增加产漆酶量同步增加并在第 8d 达到高峰,达到 220.64U/L(N-S)和 203.56(N-L)。而菌株 pcR5324 产漆酶量在菌体快速增长的阶段并不明显,相反在菌株生长进入稳定期后才开始酶活持续增加并在第 15 d 达到最高,分别达到 183.87U(N-S)、187.61U(N-L)。pcR5305 产漆酶与菌体生长呈正相关,说明 pcR5305 产漆酶具有初生代谢的特点,相反 pcR5324 产漆酶则呈现典型的次生代谢特征(图 2-3)。

2.5 诱变菌株产漆酶的平皿验证与菌体特征比较

2.5.1 诱变菌株产漆酶的平皿验证:

用打孔器将 PDA 固体培养基打出 3 个直径 1 cm 的洞,向每个洞里滴加 0.5 mL 0.5 mmol/L ABTS(0.2 mol/L pH4.5 醋酸-醋酸钠缓冲液配制),再分别滴加 2 滴在 N-S 条件下培养 8d 的 pcR5305 粗酶液 A、pcR5324 粗酶液 B 和煮沸 5min 的 pcR5305 粗酶液 C。5 min 后拍照,结果如图 4。

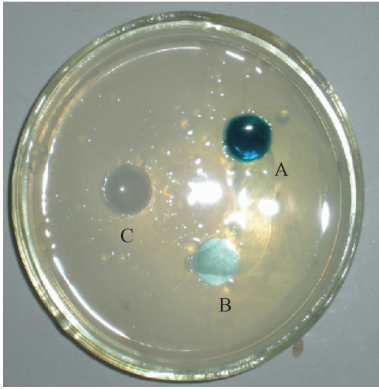


图 4 诱变菌株产漆酶活性平皿验证

Fig. 4 Plate assay for demonstration of laccase activity.

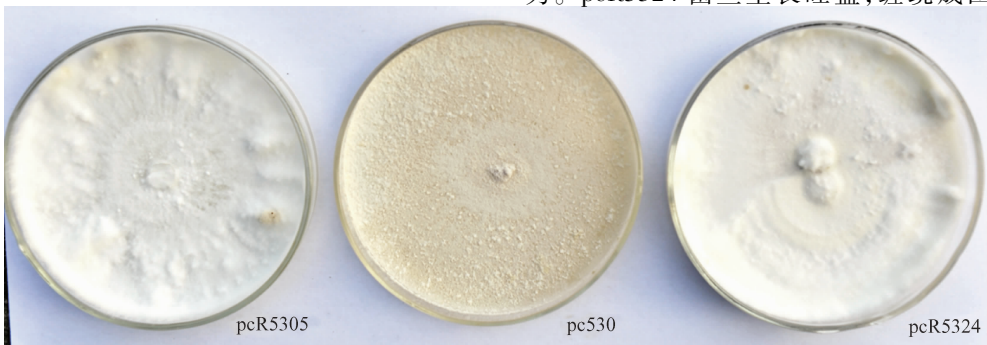


图 5 突变菌株与原出发菌株形态差异

Fig. 5 The shape difference between the original and mutation strains.

煮沸 5 min 后的 pcR5305 菌株粗酶液没有呈蓝绿色(C),没有热处理的 pcR5305 粗酶液出现了较深的蓝绿色(A),而 pcR5324 菌株仅有很浅的蓝绿色(B)。很明显,经煮沸的粗酶液因酶蛋白被破坏而没有与 ABTS 反应变色,没经高温处理的粗酶液则因所含酶量的不同显示出不同深度的蓝绿色,表明变异菌株确能产生漆酶。为进一步验证突变菌株能产生漆酶,再采用两种方法进行验证,其一是确保培养介质与酶测定体系中不含有锰离子,结果发现变异菌株同样能使 ABTS 氧化变色,说明氧化 ABTS 的物质并非是 Mn(III)造成的假象;第二种方法是在粗酶液中加入总浓度为 0.05 mmol/L NaN_3 ,结果测不到漆酶的活性,说明能使 ABTS 氧化变色的确实只有漆酶,因为 0.05 mmol/L NaN_3 可以完全地特异性抑制漆酶的活性^[11]。由此可以肯定筛选到的黄孢原毛平革菌能使 ABTS 氧化变色的只能是产生的漆酶。

pcR5305、pcR5324 菌落形态不同于原菌株 pc530,pc530 在固体培养基上呈淡黄色,菌丝形成较慢,多以孢子形式存在。在相同培养条件下,两变异菌株生长很快,形成大量的白色菌丝,孢子形成不多(图 5)。

2.5.2 诱变菌株的菌体特征比较:

将菌株 pcR5305、pcR5324 和 pc530 分别用载片培养方法培养 5d 后,经固定、系列脱水、干燥和镀膜后用 Philips 扫描电镜进行表面结构观察并拍照,结果如图 6。比较 3 个菌株扫描电镜图,pc530 菌丝小部分缠绕,总体呈稀疏状态,在菌丝上方长满孢子。静置浅层液体培养在培养液表面形成一薄层菌垫,由于菌丝较少,孢子居多,以孢子生长形成的菌垫厚薄较为均。pcR5324 菌丝生长旺盛,缠绕成团。菌丝成扁

长的丝状,大部分为蜷曲状,表面孢子较少。静置培养中,浅层培养液表面会形成以接种菌块为介质的白色绒状菌块,且培养时间延长,菌块体积增大。

pcR5305 的菌体表面形态与 pc530 及 pcR5324 均有所不同。pcR5305 的菌丝呈杆形树枝状分散,表面孢子很少。

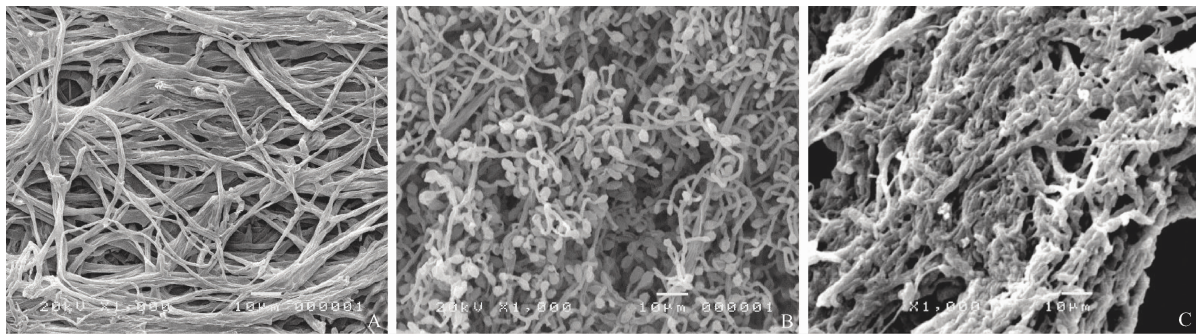


图 6 不同菌株的扫描电镜图 (1000 ×)

Fig. 6 The SEM micrograph of different strains (1000 ×). A: pcR5305 strain; B: pc530 strain; C: pcR5324 strain.

3 讨论

通过选育优良菌株、探索最适宜的培养方式与最佳生理条件等来提高白腐菌木素酶的产量是白腐菌应用基础研究的热点,其中有关抗营养阻遏产酶白腐菌的报导很少。Bootminathan 等^[12]曾分离到 2 株可在富氮条件下产生 LiP、MnP、葡萄糖氧化酶活性的突变株,但其产生的酶活性不如野生型高。同时,长期以来都认为 *P. chrysosporium* 不产漆酶,但已有报导认为 *P. chrysosporium* 能产漆酶,其中 Rodriguez 等^[6-7]采用固体培养得到了相对较高的酶活,但在这种培养条件下,粗酶液成分复杂,据文献对酶活测定的描述,很难排除是由 MnP 及代谢中间产物对底物氧化而造成的假象。Ditter^[8]和 Srinivasan^[5]采用液体培养仅得到极微量的漆酶。与此同时,Podgornik 等^[11]也对 *P. chrysosporium* 产 Lac 能力提出了质疑,他们从不同角度验证了以 ABTS 为底物检测漆酶活性也有可能因 MnP、Mn(III)的存在而造成假阳性现象。段新源等^[13]研究了多种条件下漆酶的产生情况,发现 *P. chrysosporium* 在静置条件下,无论充氧与否均不产生漆酶,在固体与半固体条件下,也不产生漆酶;摇床培养条件下可产极少量的漆酶。因此,他们认为在黄孢原毛平革菌的木素降解过程中,漆酶不起主要作用,其机理还有待于进一步研究。后来 Gnanamani 等^[14]在研究诱导剂与培养方式对 *P.*

chrysosporium NCIM 11997 菌株产漆酶的影响时发现,用麦麸基质固态发酵可在第 5 天产生高达 48.89 ± 1.82 U/L 的漆酶。总之,目前对 *P. chrysosporium* 产漆酶还缺乏更确凿的证据,从已有报导的研究成果看,*P. chrysosporium* 能产生的漆酶量也很低,似乎难以在木素降解中发挥作用,漆酶究竟在黄孢原毛平革菌中发挥何种作用还很不了解。

在 Martine 等^[15]测定的 *P. chrysosporium* RP78 菌株的 3×10^7 bp 基因组序列中虽然没有发现传统的漆酶基因,但发现有 4 种与漆酶存在远缘关系的多铜氧化酶基因成簇存在于基因组中。同时,Gnanamani 等^[14]也发现了两种组成型表达的漆酶。本实验中 *P. chrysosporium* 530 原种在限氮与富氮条件也有极微量的酶活,粗酶液经浓缩后经电泳也有微弱的漆酶条带,这些结果表明 *P. chrysosporium* 具备产漆酶的分子基础。本研究筛选到的两株 pcR5305、pcR5324 突变菌株,通过在培养介质中加入不加锰离子并在反应介质中加入过氧化氢酶以去除过氧化氢而抑制可能形成的 MnP 氧化 ABTS 来测定漆酶活性,而在粗酶液煮沸处理、粗酶液中加入 0.05 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 后检测不到漆酶活性等,排除由 MnP 及代谢中间产物对底物氧化而造成的假象的现象中确信筛选到的 pcR5305、pcR5324 突变菌株能产生漆酶,更有意义的是原菌株 pc530 在 N-L 与 N-S 条件下均基本无漆酶酶活性,而 pcR5305 与 pcR5324 在 N-L 与 N-S 条件下均能产生 Lac,但调控方式明显不同,前者漆酶酶合成与菌体生长同步,后

者漆酶合成却是典型的营养阻遏类型。启动木素酶合成培养基中的总氮浓度阈值、C/N、菌体产酶受氮调控的灵敏度等原菌株与两变异菌株已明显不同(另文报导)。因此,筛选到的 pcR5305 与 pcR5324 菌株为进一步研究黄孢原毛平革菌抗营养阻遏产酶的代谢生理与调控机制,及其产漆酶的生化与分子生物学研究提供了良好的试验材料。这对了解木素酶的基因结构与调控机理、白腐菌降解木素机制等具有重要意义。

参考文献

- [1] Mohamed SA, Sayadi S, Gargouri A. Heterologous expression of lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* in *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters*, 1999,21(10):849-853.
- [2] Faison BD, Kirk TK. Factor involved in the regulation of a ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1985, 49(2): 299-304.
- [3] Murugesan K, Nam IH, Kim YM, Chang YS. Decolorization of reactive dyes by a thermostable laccase produced by *Ganoderma lucidum* in solid state culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 40(7):1662-1672l.
- [4] Thurston CF. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 1994, 140:19-26.
- [5] Srinivasan C, Dsouza TM, Boominathan K, Reddy CA. Demonstration of Laccase in the White Rot Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F1767. *Applied and environmental microbiology*, 1995, 61(12):4274-4277.
- [6] Rodriguez S, Longo MA, Cameselle C, Sanroman A. Production of manganese peroxidase and laccase in laboratory scale bioreactors by *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioprocess and Biosystems engineering*, 1999,20(6):531-535.
- [7] Rodriguez CS, Santoro R, Cameselle C, Sanroman A. Laccase production in semi-solid cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnology letters*, 1997, 19(10):995-998.
- [8] Dittmer JK, Patel NJ, Dhawale SW, Dhawale SS. Production of multiple laccase isoforms by *Phanerochaete chrysosporium* grown under nutrient sufficiency. *FEMS microbiology letters*, 1997, 149(1):65-70.
- [9] Kirk TK, Schultz E, Connors WJ, Lorenz LF, Zeikus JG. Influence of Culture Parameters on Lignin Metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Microbiology*, 1978, 117: 277-285.
- [10] Archibald FS. A new assay for lignin-type peroxidases employing the dye Azure B. *Applied Environmental Microbiology*, 1992, 58(9):3110-3116.
- [11] Podgornik H, M Stegu, E Zibert, A Perdih. Laccase production by *Phanerochaete chrysosporium* -an artefact caused by Mn(III)? *Letters in Applied Microbiology*, 2001, 32:407-411.
- [12] Bootminathan K, Balachandra DS, Randall TA and Reddy CA. Nitrogen-deregulated mutants of *P. chrysosporium*-a lignin-degrading basidiomycete. *Archives of Microbiology*, 1990, 153:521-527.
- [13] 段新源, 卢雪梅, 王蔚, 高培基. 黄孢原毛平革菌合成漆酶能力的研究. 山东大学学报(自然科学版)(*Journal of Shandong University (Natural Science Edition)*), 2002, 37(1):91-94.
- [14] Gnanamani A, Jayaprakashvel M, Arulmani M, Sadulla S. Effect of inducers and culturing processes on laccase synthesis in *Phanerochaete chrysosporium* NCIM 1197 and the constitutive expression of laccase isozymes. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 38(7):1017-1021.
- [15] Martinez D, Larrondo LF, Putnam N, Gelpke MDS, Huang K, Chapman J, Helfenbein KG, Ramaiya P, Detter J C, Larimer F, Coutinho P M, Henrissat B, Berka R, Cullen D, D Rokhsar. Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nature Biotechnology*, 2004, 22(6):695-700.

Breeding and characterization of laccase-producing *Phanerochaete chrysosporium* mutant resistant to nutritional repression

Ailian Qiu^{1,2}, Wenyan Li², Yaotong Zheng^{2*}, Xiaojing Fan², Youxian Ye², Yan Meng²

¹ College of Life Science, ² Institute of Application Microbial Technology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 35002, China

Abstract: [**Objective**] To screen *Phanerochaete chrysosporium* mutants resisting nutritional repression and to characterize laccase produced by the mutants. [**Methods**] We used repeated UV mutagenesis and screened the mutant strains by using the guaiacol nitrogen sufficient differential medium. We characterized enzymes production mechanism of the nutritional regulation through comparing the differences of cell growth and enzyme-production kinetics under different nutritional conditions; We validated production of laccase by *Phanerochaete chrysosporium* through measurements of the heat treatment, removal of manganese ion and addition of the catalase. [**Results**] Three different methods were validated that both strains of pcR5305 and pcR5324 can produce laccase under the nitrogen limitation (N-L) and nitrogen sufficient (N-S) conditions. Under the N-L conditions, pcR5305 can produce 203.5 U/L laccase and pcR5324 can produce 187.6 U/L laccase; Under the N-S conditions, pcR5305 can produce 220.6 U/L laccase and pcR5324 can produce 183.9 U/L laccase. The original strain pc530 only can produce very little laccase under either conditions. The laccase-production regulation mechanisms of the two strains are different; Production of laccase and the cell growth by pcR5305 are in synchronism. However production of the laccase by pcR5324 is repressed by nutrition. Both strains have the capacity of resisting nutritional repression and produce lignin peroxidase and manganese peroxidase with high yield. (LiP 1343.2, MnP 252.2 U/L and LiP 1169.5, MnP 172.4 U/L respectively). [**Conclusion**] The mutants of *Phanerochaete chrysosporium* can produce laccase. At same time they showed the capacity of resisting nutritional repression and production of laccase, lignin peroxidase and manganese peroxidase. Our results possess high value for production, application and fundamental research. We provided new strains and established a very good foundation for the further research of metabolic regulation of ligninolytic enzymes production.

Keywords: *Phanerochaete chrysosporium*, mutagenesis breeding, laccase, resistance of nutritional repression

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province (2007J0120)

* Corresponding author. Tel: +86-591-83789361; E-mail: zyt5188@yahoo.com.cn

Received: 13 September 2010/ Revised: 2 December 2010