

黄孢原毛平革菌突变株抗碳氮营养阻遏产漆酶碳氮生理调控机理

邱爱连^{1,2}, 李文燕², 范晓静², 孟延², 郑耀通^{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】通过比较不同碳氮营养及其消耗对产漆酶的影响,了解白腐菌模式种黄孢原毛平革菌解除营养阻遏产漆酶代谢的生理生态特性,揭示白腐菌合成漆酶的碳氮生理调控机理。【方法】分别利用限碳限氮(CL-NL)、限碳富氮(CL-NS)、富碳限氮(CS-NL)与富碳富氮(CS-NS)4种条件培养黄孢原毛平革菌野生型(WT)与突变株,比较两者产漆酶动力学、菌体生长、葡萄糖与氨氮消耗差异及其相关性来揭示解除营养阻遏产漆酶调控生理特性,明确C、N营养对产漆酶的生理调控途径。【结果】突变菌株除消耗速率比野生型略慢外,两者氨消耗趋势一致,但对葡萄糖的消耗比野生型快且氨氮浓度对葡萄糖的消耗影响不大。在CL-NL、CL-NS、CS-NL、CS-NS4种培养条件下,野生型分别在培养后期的第11、14、19和19天的次生代谢时期产生0.107、0.029、12.84和18.05U/L漆酶,启动漆酶合成及酶峰值出现的时间与基质中葡萄糖耗尽或接近耗尽的时刻,或同氨氮消耗至最低值的时刻相对应;与WT产漆酶特性不同,突变株产漆酶伴随整个培养过程且均有两个产酶高峰,分别在培养的第8、7、12天和12天出现298.83、343.14、271.22、251.49U/L漆酶第一个产酶高峰,在培养的第12、13、19和19天产生257.69、298.78、213.81、216.93U/L漆酶的第二个产酶高峰。碳氮营养对产酶的影响显示:两菌株只要初始碳源浓度相同(限碳或富碳),各自产酶动力学趋势基本一致;相反,即使初始氮源浓度相同但其产酶动力学趋势却不同,说明碳源对黄孢原毛平革菌产漆酶的影响比氮源更为重要。【结论】野生型黄孢原毛平革菌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氨氮饥饿所激发,以碳或氮菌体负荷表示是否达到启动酶合成的调控阈值比单纯碳或氮浓度更为合理。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。

关键词: 黄孢原毛平革菌, 漆酶, 抗营养阻遏, 碳氮营养调控

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2012)03-0334-11

木素的降解是碳素循环的限速步骤,白腐菌是唯一具有完整木素降解酶系的微生物,并能产生木素酶,降解木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

基金项目:福建省自然科学基金(2007J0120, 2011J05047)

* 通信作者。Tel: +86-591-83789361; E-mail: fafu5188@yahoo.com.cn

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

收稿日期:2011-09-27;修回日期:2011-11-29

与利用等方面具有巨大的应用前景^[1-2]。具有底物非专一性的木素过氧化物酶(LiP)、锰过氧化物酶(MnP)和漆酶(Lac)是触发木素降解的重要木素酶,其中的漆酶是种含铜多酚氧化酶,比LiP、MnP等过氧化物酶应用更广泛,了解白腐菌模式种黄孢原毛平革菌(*P. chrysosporium*)产漆酶特性具有重要的意义。白腐菌产木素酶能力的高低直接决定了菌的应用价值,然而绝大多数白腐菌木素酶的合成是由培养基中碳、氮或硫饥饿所触发的次生代谢过程,因而其产酶量很低且不稳定^[3-7],这种产木素酶营养阻遏的特性严重制约了白腐菌的应用。因此,如何使白腐菌突破营养阻遏产酶和阐明产酶调控机理,特别是解除营养阻遏产酶机理是目前急需解决的重要科学问题。利用诱变或适宜的筛选培养基已获得一些可在富营养条件下产酶的突变菌株^[8-10],但其产酶过程仍然是次生代谢且酶量大多低于野生型(WT)在营养限制条件下的产酶量。Tien等^[11]曾分离到一株赖氨酸营养缺陷型突变体,能在非营养限制且初生代谢产LiP、MnP和乙二醛氧化酶,比较了突变株与WT在限N与富N条件下的菌体生长与产酶特性^[12],然而其解除营养阻遏的产酶机理没有深入研究,而且至今未有黄孢原毛平革菌抗营养阻遏初生代谢产漆酶方面的文献报导。先前的研究发现黄孢原毛平革菌抗碳氮阻遏产酶突变株(以下简称突变株)pcR5305在限氮(0.22 g/L 酒石酸铵)及富氮(2.2 g/L 酒石酸铵)下均能在初生代谢产生三种木素酶,而野生型(pc530,WT)产木素酶却是典型的次生代谢过程^[13]。这种突变菌株为我们了解抗营养阻遏产酶机理提供了良好的实验材料,本文将通过了解WT与突变株在多种不同碳氮营养条件下的产酶动力学差异、菌体生长、碳氮消耗规律及其与产酶的相关性来揭示抗营养阻遏产酶营养调控生理与生态特性,并进一步明确C、N对产木素酶调控是独立起作用还是经由一个共同的调控步骤,以增强对白腐菌木素酶合成代谢调控机理的了解,并可为白腐菌的实际应用提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株:黄孢原毛平革菌原始菌株(WT)(*P. chrysosporium* 530, pc530),诱变选育的抗营养

阻遏高产木素酶菌株(*P. chrysosporium* R5305, pcR5305)由福建农林大学应用微生物技术研究所提供。

1.1.2 培养基:①综合马铃薯固体培养基(g/L):由20%马铃薯煮汁,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组成。用蒸馏水配制,pH自然。其中的 VB_1 先过滤灭菌,在培养基高压灭菌后加入。此培养基用于菌种平皿扩大培养。②液体培养基(g/L):以培养白腐菌经典的KirK培养基^[14]为依据设置限碳、富碳、限氮与和富氮条件,为避免锰离子可能对漆酶活性测定产生误差,去除了KirK培养基无机盐溶液中的锰离子。培养基由葡萄糖40(富碳,CS)或10(限碳,CL)、酒石酸铵2.2(富氮,NS)或0.22(限氮,NL)、酒石酸钠0.28、 CaCl_2 0.01、 KH_2PO_4 0.2、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.125、5 mg/L VB_1 1 mL、1 mL 机盐溶液组成,用0.1 mol/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、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.01、 H_3BO_3 0.01、 $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ 0.01、 NaMoO_4 0.01组成。液体培养基用双蒸水配制,用于白腐菌产酶培养。

1.1.3 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、酒石酸钾钠、 CaCl_2 、 KH_2PO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、甘氨酸、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、NaCl、 CoSO_4 、 CaCl_2 、 ZnSO_4 、 H_3BO_3 、 $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ 、 NaMoO_4 、3,5-二硝基水杨酸、醋酸、醋酸钠、苯酚等,均为分析纯,购于中国上海国药集团化学试剂有限公司。ABTS(2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate))购于上海日初生物科技有限公司(进口分装),过氧化氢酶购于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。

1.2 产酶培养方法与粗酶液的制备

将上述液体培养基设定CL-NL、CS-NL、CL-NS、CS-NS 4种不同营养条件。用无菌打孔器随机取平皿上5个菌塞接种到装有30 mL培养液的300 mL三角瓶中,设3个重复,37℃恒温静置培养。每天隔相同时间取出一瓶发酵液过滤,滤渣在80℃下烘干至恒重,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。

1.3 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 的 0.1 mol/L HAc-NaAc 缓冲液,60U 的过氧化氢酶,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。

1.4 氨氮与葡萄糖浓度测定

采用纳氏试剂比色法测定氨氮,DNS 试剂比色法测定葡萄糖浓度。

2 结果和分析

2.1 pc530(WT)与 pcR5305 在不同初始 C、N 营养条件下的葡萄糖、氨氮消耗

限碳(CL)条件下,WT 菌株葡萄糖消耗经历了

初始缓慢(第 1 天)、随后快速(第 2-4 天)和再缓慢消耗至完全(第 5-15 天)3 个阶段(图 1-A,C),WT 菌株葡萄糖的初期缓慢消耗与文献报导的一致^[15-16]。在富碳(CS)条件下,葡萄糖消耗速率加快且没有初始缓慢期(图 1-B,D)。在相同初始葡萄糖(同是限碳或富碳)浓度下,提高氮源(由限氮提高到富氮)浓度能促进 WT 对葡萄糖的消耗。WT 菌株在培养后期可使葡萄糖消耗至接近完全(限碳、富碳均如此),这与已有报导的野生型黄孢原毛平革菌启动木素酶合成需满足葡萄糖浓度低至一最低值一致^[16]。突变菌株 pcR5305 在 4 种营养条件下的葡萄糖消耗规律与 WT 大体相似,葡萄糖浓度越高启动消耗的速率越快;但 pcR5305 消耗葡萄糖没有初始缓慢期且消耗速度更快,而且氨氮浓度对 pcR5305 消耗葡萄糖影响不大,即在限 N(NL)与富 N(NS)条件下,只要初始葡萄糖浓度一样,pcR5305 对葡萄糖的消耗速率与规律基本一致。令人感兴趣的是培养后期 pcR5305 均有 1g/L 左右葡萄糖残留,

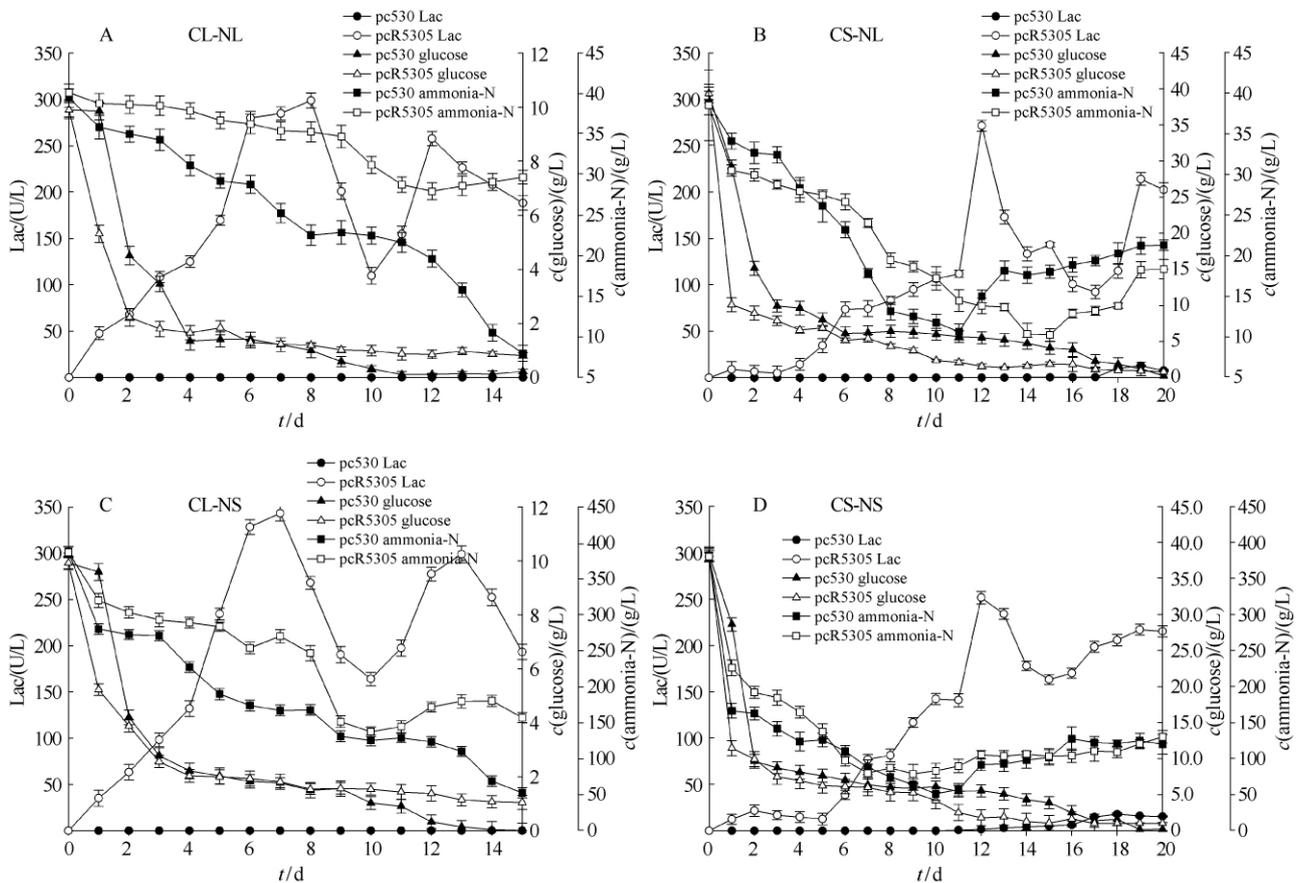


图 1 葡萄糖、氨氮消耗与菌体产酶的关系

Fig. 1 The relationship between laccase production and glucose and ammonia-N consumption.

说明 pcR5305 的 C 代谢调控已发生了变化,同时也说明 pcR5305 合成漆酶已没有象 WT 一样要碳基本耗尽才能启动木素酶合成的营养限制。pcR5305 在较高浓度葡萄糖残留的同时伴随着氮氮的增加和菌体生物量的下降,说明菌体发生了自溶(图 2),这与野生型黄孢原毛平革菌在葡萄糖耗尽才出现细胞自溶,蛋白质水解作为替代能源现象不同^[15-16]。

先前的研究发现,突变株 pcR5305 可在富氮条件下与菌体生长同步合成木素 3 种酶,而 WT 只能在次生代谢时期产木素酶^[13]。不同营养条件下的突变菌株氮氮消耗结果显示,pcR5305 能在富氮条件下快速启动木素酶的合成并不是由于其氮代谢功能受阻造成,pcR5305 与 WT 两者氮氮消耗趋势基本一致,但 pcR5305 在任一营养条件、任一培养时间下氮氮浓度均高于相同时间下的 WT,且在后期均出现氮氮增加现象(图 1),说明 pcR5305 可在比 WT 菌株更高浓度的氮氮环境下合成木素酶,白腐菌中普遍存在的氮抑制酶合成的模式可能发生了变化。在相同初始氮氮浓度下,提高葡萄糖浓度的富碳可促进菌体消耗氮氮,在 pcR5305 中这种促进作用更为明显(图 1-A 与 B,图 1-C 与 D),这与氮可能更多用于菌体酶合成、也与葡萄糖消耗更快一致。而在相同初始葡萄糖浓度下,富氮也可促进菌体消耗氮氮,这在 WT 中更为明显(图 1-A 与 C,图 1-B 与 D)。

2.2 碳、氮消耗与 pc530(WT)、pcR5305 产酶的关系

在 CL 条件下,WT 分别在培养的第 11 天产生 0.107 U/L (NL 条件,图 1-A) 和第 14 天产生 0.029 U/L 漆酶 (NS 条件,图 1-C);由限碳变为富碳,WT 产酶量增加但酶峰值出现时间延后,即分别在培养的第 19 天产生 12.833 U/L (NL,图 1-B) 和第 18 天的 18.049 U/L (NS,图 1-D)。显然,WT 在初生代谢阶段均不产漆酶,仅在次生代谢期产生微量漆酶。只要初始葡萄糖浓度相同(限碳或富碳),WT 产漆酶规律相似(图 1-A 与 C,图 1-B 与 D)。相反,初始氮氮浓度相同(限氮与富氮),产酶趋势却不同(图 1-A 与 B,图 1-C 与 D),说明碳源对 WT 产漆酶的影响比氮源大。WT 启动漆酶合成及酶峰值出现的时间与基质中葡萄糖消耗尽或接近耗尽的时刻相对应,也可能同氮氮消耗至最低值的时刻相对应(表 1),说明 WT 产漆酶既可能由碳饥饿调控,也

可能由氮饥饿调控,碳氮调控可能独立发挥作用。与突变菌株产酶特性不同,WT 在富碳条件下比限碳下酶活高,此时富氮可进一步提高酶活,而与突变菌株相似的是高浓度葡萄糖可使酶峰值出现时间延后。

突变菌株 pcR5305 产酶伴随整个培养过程且产量远高于 WT,还分别在培养的前期和后期各有一个产酶高峰。无论其初始 C/N 如何不同,只要初始葡萄糖浓度一样,pcR5305 产酶动力学在限氮与富氮条件下基本一致,如在 CL 条件下均在第 1 天即进入产酶对数期(图 1-A, C),呈现出典型的产酶与菌体生长对数期同步特性(图 1-A, C;图 2-A, C),同时伴随着葡萄糖的快速消耗。N 浓度的高低对 pcR5305 产酶峰值出现的时间没有影响,但更高的氮氮可提高产酶量,产酶峰值的出现时间对应于葡萄糖消耗的稳定期,而第 2 个峰值的出现则对应于营养消耗的停止,菌体生物量降低的消亡期,这时伴随着氮氮浓度的增加,此时期产漆酶可能是个次生代谢事件,推测可能是由受不同调控机制启动合成的漆酶同工酶造成,通过电泳比较漆酶同工酶产生动力学证实了这种假设(另文报导)。与 CL 条件下的第 1 天即进入产酶对数期不同,虽然也能在第 1 天产酶,CS 显然部分抑制了 pcR5305 产酶活性,使产酶对数期延后,只有当高浓度葡萄糖降低到某一阈值时才开始进入产酶对数期。这种现象说明了突变株 pcR5305 进入快速合成漆酶(产酶对数期)时,介质中碳源特别是速效碳(如葡萄糖)浓度必须低于某阈值,而对 N 浓度的变化,突变菌株则变得不再敏感,pcR5305 在绝大多数培养的时刻氮氮浓度均比 WT 高,但总能合成漆酶但 WT 不能,了解何种原因导致突变株可在比 WT 更高浓度的氮氮环境下合成木素酶,将有助于弄清解除营养阻遏产酶的机理。此外,从提高 N 浓度可使产酶对数期延后进一步加剧,说明 N 并非对突变株产酶没有影响,相反则是证实了产酶必须达到 C 或 N 阈值的必要性,此时的 N 可能通过影响 C 的代谢而发挥作用,这也从另一角度说明了可能存在更高层次 C、N 交互偶联参与产酶调控的可能。而对于 WT,在 CL 条件下培养后期氮氮含量比 CS 下更低,但漆酶的产量反而不如 CS,这从另一方面说明了黄孢原毛平革菌产漆酶碳参与调控比氮更重要,这点与黄孢原毛平革菌产 LiP、MnP 更易受 N 调控不同。

与氮氮浓度的改变对葡萄糖的消耗影响结果

相同,氨氮浓度的改变对 pcR5305 产酶活性基本没有影响,说明 N 对 pcR5305 产酶的调控功能已消失或减弱。而 WT 菌株仅在培养后期,在葡萄糖降至最低时出现很低的 Lac 活性,这种现象在 NS 环境下更为明显,说明 N 源仍然是野生型黄孢原毛平革菌漆酶合成的重要调控因子。在相同初始氨氮浓度下,只要葡萄糖初始浓度不同,pcR5305 产酶动力学明显不同(图 1-A 与 B,图 1-C 与 D),进一步验证了葡萄糖浓度对 pcR5305 及 WT 产酶的重要性。在 CL 条件下,即使氨氮远高于 CS 环境,但仍能快速进入产酶对数期,也说明了突变菌株对氮的敏感性已大大降低,而碳浓度则成为更重要的调控因子。

2.3 pc530(WT)、pcR5305 菌体生长与 C、N 消耗的关系

与葡萄糖、氨氮的消耗以及产酶的变化规律相似,只要初始葡萄糖浓度一样,菌体的生长规律基本相同(图 2)。如果初始葡萄糖浓度不同,则菌体生

长规律变化较大,然而菌体的生长显然比产酶更与氨氮浓度有关。培养初期(第 1-2 天)突变菌株菌体生长快于 WT,这与 pcR5305 快速启动葡萄糖的消耗相对应。葡萄糖浓度提高,菌体前期生长受抑制,生物量峰值出现时间后移但总量明显增加。pcR5305 初期菌体生长与葡萄糖、氨氮的快速消耗并不协调,在 NS 条件下的菌体生长不如 NL(图 2),显然消耗的营养基质更多的被用于合成木素酶,但此时 Lac 并没明显增加,因此更多的是用于合成 LiP^[13](为避免 Mn(III)对漆酶测定带来误差,培养基中去除了锰,因而不会产生 MnP)。而对 WT,葡萄糖的前期慢速消耗则同菌体生长相适应。在相同葡萄糖浓度下,氨氮浓度的提高可使生物量略有提高但远没有碳浓度增加效果明显,说明介质中消耗的氮源并非全用于菌体生物合成,此时更多的氮源可能用于合成进入次生代谢所需的一系列蛋白质,因为黄孢原毛平革菌从初生代谢到次生代谢的转变过程中涉及到大量蛋白质的合成^[17]。

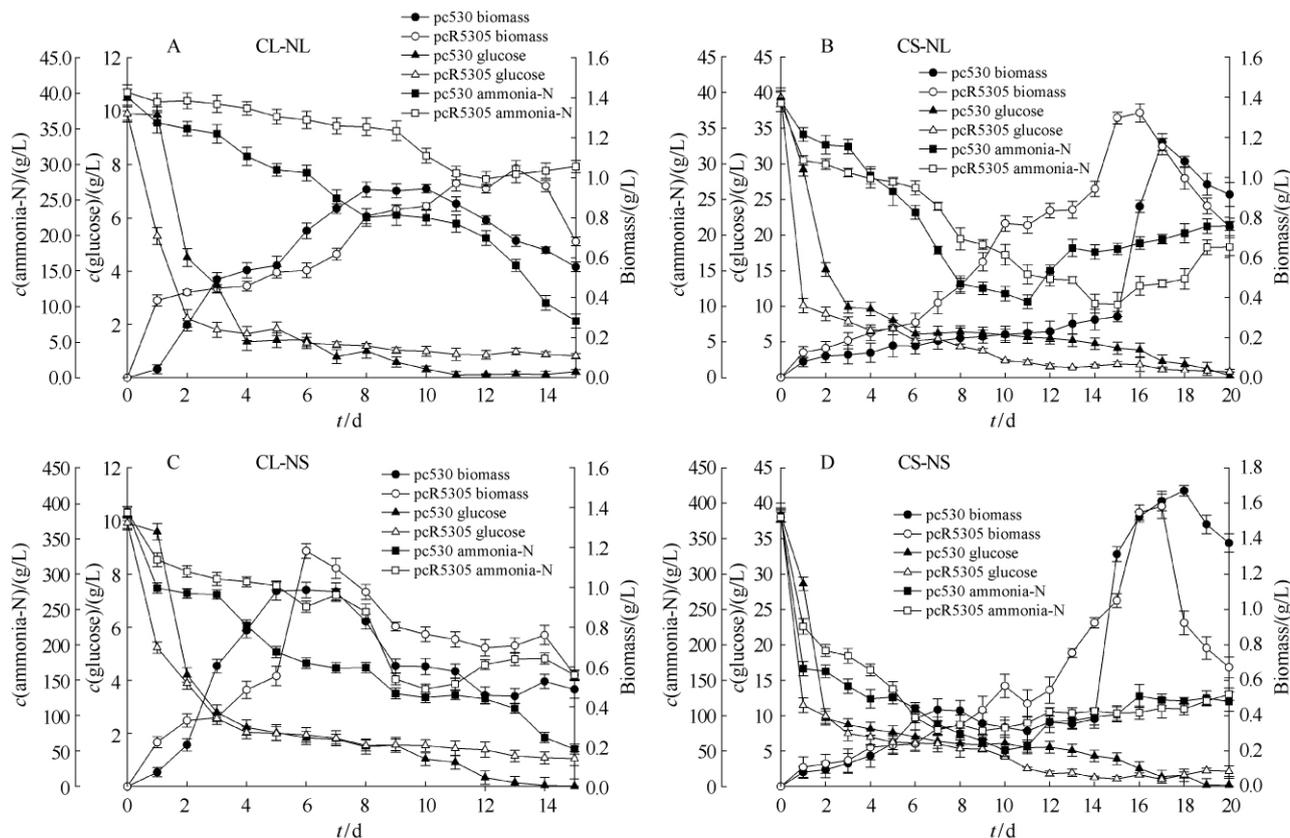


图 2 葡萄糖、氨氮消耗与菌体生长的关系

Fig. 2 The relationship between cell growth and glucose and ammonia-N consumption.

2.4 C、N 及其互作对菌株产酶的调控作用

黄孢原毛平革菌产漆酶也可能受碳氮相互作用影响,各时段培养基中的 C/N 与产酶及生长的关系如图 3 所示。再结合启动漆酶合成介质中的 C、N 临界浓度,菌体葡萄糖或氮氮负荷(定义为某时刻基质浓度除以菌体生物量)及其 C/N 值(表 1)可以发现,这些临界值均不相同且有的差异大,说明激发漆酶合成的关键调控因子并非是不变的 C、N、菌体基质负荷或是 C/N 单一因素,在不同的营养条件下可能具有不同的激发机制。如 WT 在 CL-NL 条件下,启动与产酶高峰的调控因子可能是葡萄糖浓度或葡萄糖菌体负荷,因在第 9 天开始产酶与第 11d 出现产酶峰值时,氮氮浓度及其氮氮菌体负荷基本相同,此条件下氮不可能是调控因子;而在 CS-NL

条件下,WT 产漆酶调控因子则可能是氮氮浓度,氮氮处于最低值时启动酶合成,而在第 19 天出现酶峰值时,虽然氮氮浓度升高但其氮氮菌体负荷下降,从这点看,以菌体基质负荷作为调控的临界点可能更为合理;在 CL-NS 条件下,限制因子为葡萄糖浓度或是其菌体负荷;CS-NS 与 CS-NL 类似,产酶受氮氮饥饿调控。总体而言,WT 合成漆酶受 C 或 N 浓度调控,C、N 各自独立发挥作用且营养条件不同调控因子也不同,关键在于哪个先达到临界点,如在 CL 条件下由葡萄糖调控,而在 CS 条件下则由氮氮调控。显然 WT 合成漆酶是 C 或 N 具有各自不同的独立调控支路,这结果同 Var、Carlos 等的一致^[16-18]。

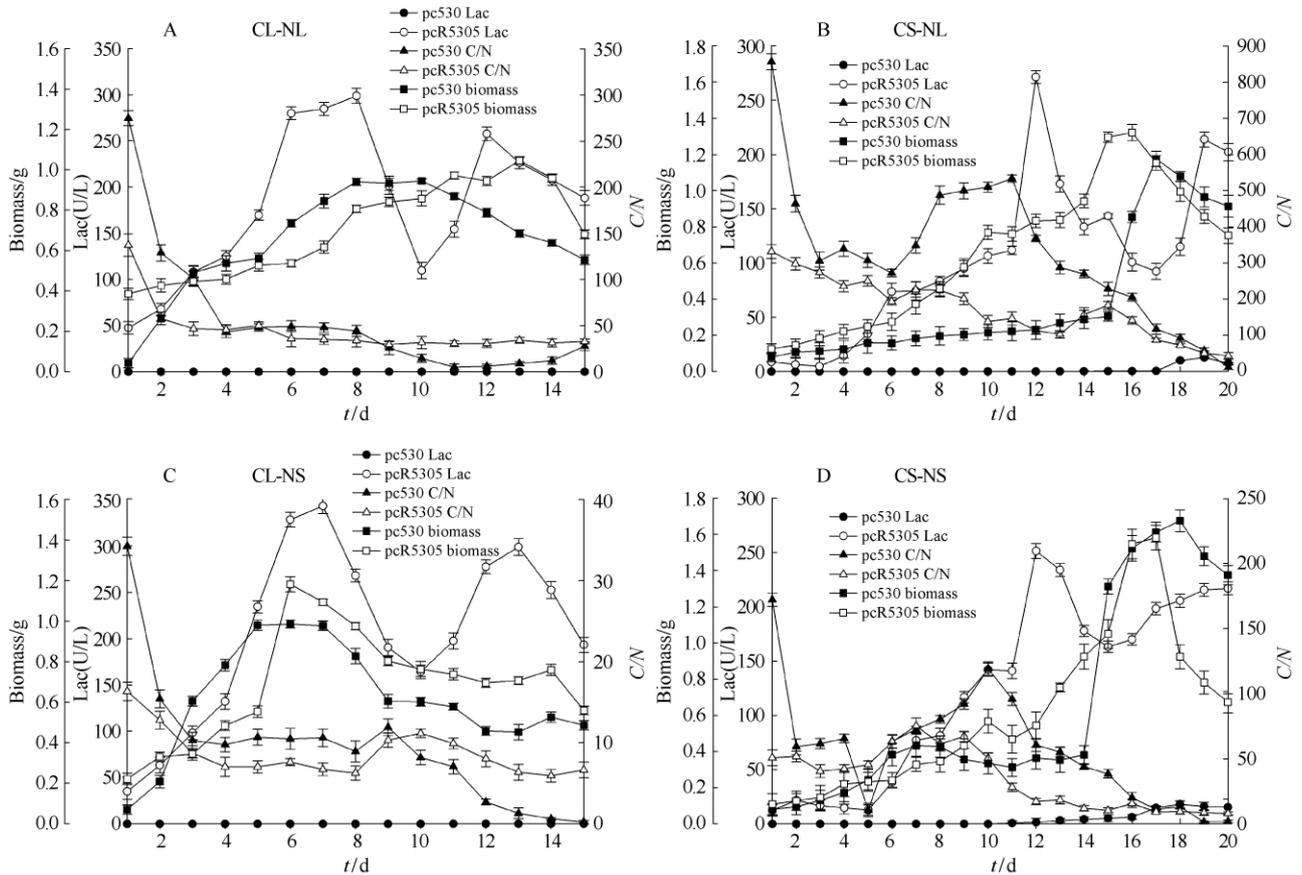


图 3 CN 互作对菌体生长与产酶的影响

Fig. 3 C and N interaction effect of cell growth and laccase production.

pcR5305 启动漆酶合成及峰值的出现与对应时间下 WT 的碳氮消耗可以发现(表 2):pcR5305 与 WT 的氮氮消耗基本是一致的,在相同时间下氮氮浓度基本相同(WT 在同一时间氮氮甚至更低),

pcR5305 启动漆酶合成及峰值的出现与对应时间下 WT 的碳、氮消耗可以发现(表 1),pcR5305 与 WT 的氮氮消耗基本是一致的,在相同时间下氮氮浓度基本相同(WT 在同一时间氮氮甚至更低),氮氮菌

体负荷虽各有波动但也基本相似,如果氮氮是 pcR5305 产酶调控因子,两菌株理应表现出相同的产酶趋势。然而在这些时间点,WT 基本不产酶而 pcR5305 都能开始产酶或达到产酶峰值,说明氮氮并不是 pcR5305 启动产酶的关键调控因子。同时,在 pcR5305 启动酶合成的 4 种营养条件下,虽然葡萄糖浓度及其葡萄糖菌体负荷比同时间下 WT 低,有可能成为产酶调控因素,但 WT 在达到这些葡萄糖浓度或负荷值时也没有产漆酶,说明葡萄糖浓度也不是 pcR5305 产酶的关键调控因素。Var der Woude^[18]等筛选到一株脱氮调控产酶突变菌株 der8-5,其产酶的氮氮调控也已失效,在低氮、富氮及高氮条件下均能产酶,但产酶仍由葡萄糖调控,仍是次生代谢产物。而我们筛选到的突变菌株可在富碳与富氮条件下产酶,可能白腐菌固有的产酶营养阻遏已解除,也可能存在更高水平上的脱离 C 或 N 营养因子的产酶调控机理(如涉及全局性的调控)。

表 1 结果显示,C、N 对 WT 漆酶合成的调控路径是互相独立的,然而本研究结果并不能完全排除比突变菌株更高水平上的存在共同调控步骤的可能,如突变株比 WT 具有更快的葡萄糖消耗和更低的氮氮消耗速率,直接后果是突变株能很快地使介质中的 C/N 下降,这可能也是一条调控路径。当然分离改变 C、N 调控机制的大量突变菌株及其特性的研究可能会增加对这种机制的了解。在 CL 条件下,无关 N 的浓度,两菌株在培养过程中 C/N 波动不大,而在 CS 条件下,则 C/N 变化很大,相应地其产酶影响也更大(图 3),产酶高峰延后,从这点来讲,C/N 对菌体产酶具有调控作用。当 C 浓度一定时,pcR5305 产酶规律基本保持一致,尽管其 C/N 变化很大,说明突变株已脱氮调控。而在相同 N 浓度下,高的 C/N 显然不利于 pcR5305 产酶,这也说明了碳浓度对突变株产酶比氮影响更大。

3 讨论

首先已发现突变菌株可在限 N 与富 N 条件下在初生代谢产 LiP、MnP 和 Lac 木素酶而野生型不能,但突变菌株中存在的 N-调控变化是否是由于菌株氮消耗受损等原因造成还不了解^[13],结果发现除消耗速率比 WT 略慢且后期出现氮氮增加外,两者

氮消耗是一致的,而氮浓度升高也与报导的一致^[15-16]。同时,突变菌株在 4 种营养条件下的葡萄糖消耗规律也与 WT 大体相似,但比 WT 消耗速度更快且氮氮浓度对葡萄糖消耗基本没有影响,说明突变菌株的碳代谢调控方式发生了变化。令人感兴趣的是野生型在富 N 条件下氮氮消耗比突变体快但并不伴随着酶合成的出现,与此不同的是突变株产酶不受氮的抑制,在 4 种不同 C/N 营养条件下均可在初生代谢产酶,然而 WT 在初生代谢阶段均不产生漆酶,仅在培养后期产生微量漆酶,WT 产漆酶是典型的次生代谢过程^[19-21]。pcR5305 产漆酶伴随整个培养过程且产量远高于 WT,初始葡萄糖浓度的高低决定了菌株产酶的基本特性,而氮浓度改变则对产酶特性没有影响,说明突变菌株对氮变得不再敏感。而即使初始氮氮浓度相同但葡萄糖浓度不同,两者产酶动力学均明显不同,显示了黄孢原毛平革菌产漆酶碳参与调控比氮更重要,这点与黄孢原毛平革菌产 LiP、MnP 更易受 N 调控不同。

喻国策等^[17]对黄孢原毛平革菌 BKM-F-1767 的研究显示,在初始较低的氮氮浓度 0.0308 g/L 和 0.154 g/L 下,可检测到漆酶的产生,漆酶峰值出现的时间对应着葡萄糖完全耗尽或接近耗尽以及氮氮处于最低值的时刻,说明黄孢原毛平革菌漆酶的合成是 C、N 联合作用的结果。本研究中,WT 在初始氮氮 2.2 g/L 仍能在营养耗尽的后期检测到漆酶活性,但在不同的 C、N 营养条件下,C 或 N 都可能成为启动漆酶合成的调控因子,而且用 C 或 N 生物负荷阈值比用绝对浓度更为合理。同样酶活峰值的出现也由 C 或 N 单独调控,而且出现的时间并不对应于葡萄糖的完全耗尽,这点与喻等报导的不同,可能是培养条件与菌株不同造成。Carlos^[16]等采用固定化技术培养黄孢原毛平革菌 BKM-F-1767 可在高氮氮条件下产木素酶,高氮条件下产酶是由于造成了碳饥饿而激发木素酶合成,限氮则由氮饥饿调控,也证实了木素过氧化物酶与锰酶可由碳氮独立调控。Orth^[12]描述了黄孢原毛平革菌另一种脱 N 调控突变株 PSBL-1,能在限营养与富营养条件下在初生代谢产木素过氧化物酶、锰过氧化物酶和乙二醛氧化酶,酶活均高于 WT,PSBL-1 与我们筛选的 pcR5305 产酶特性相似,但他们并没有检测漆酶的活性。Liwicki^[22]和 Kelley 等^[23]研究显示,次生代谢产物合成期事件(idiophasic events)能解耦合,说明不同

表 1 产酶启动与产酶高峰时刻营养因子临界值比较*

culture conditions

Items	CL - NL		CS - NL		CL - NS		CS - NS	
	PES(WT, 9d ^h)	eRS305 (9d ^h)	PES(WT, 10d ^h)	eRS305 (10d ^h)	PES(WT, 11d ^h)	eRS305 (11d ^h)	PES(11d ^h)	eRS305 (11d ^h)
glucose(g/L)	0.587	1.0223	6.005	2.379	0.911	1.436	5.464	2.53
C load(g/g)	6.285	12.156	27.839	3.093	15.76	19.457	16.33	5.405
ammonian(g/L)	0.0229	0.03471	0.01179	0.01724	0.1291	0.1447	0.05698	0.08976
N load(g/g)	0.245	0.4127	0.0547	0.0224	2.234	1.961	0.1702	0.1917
C/N	25.65	29.45	509.33	137.99	7.06	9.94	95.89	28.186
Lac(U/L)	0.04	200.97	0.02	106.46	0.018	197.44	0.732	140.91
	PEP(WT, 11d ^h)	peRS305(11d ^h)	PEP(WT, 19d ^h)	peRS305(19d ^h)	PEP(WT, 14d ^h)	peRS305(14d ^h)	PEP(WT, 19d ^h)	peRS305(19d ^h)
glucose(g/L)	0.108	0.8765	1.225	0.9287	0.145	1.076	1.531	1.037
C load(g/g)	1.243	9.017	1.271	1.084	2.751	14.158	0.948	1.1225
ammonian(g/L)	0.02166	0.02878	0.02123	0.01827	0.1102	0.1825	0.1209	0.1093
N load(g/g)	0.2493	0.2961	0.022	0.0213	2.091	2.375	0.0724	0.1184
C/N	4.986	30.46	57.7	50.83	1.316	5.96	13.09	9.48
Lac(U/L)	0.107	154.58	12.84	213.8	0.029	252.33	18.05	205.6
	PES(peRS305, 1d ^h)	WT(1d ^h)	PES(peRS305, 1d ^h)	WT(1d ^h)	PES(peRS305, 1d ^h)	WT(1d ^h)	PES(peRS305, 1d ^h)	WT(1d ^h)
glucose(g/L)	5.317	9.851	10.11	29.208	5.228	9.589	11.469	28.63
C load(g/g)	137.75	2345.5	80.614	367.86	235.49	1350.56	105.12	356.98
ammonian(g/L)	0.03879	0.03586	0.0305	0.03412	0.32	0.02803	0.2262	0.1664
N load(g/g)	1.005	8.538	0.2431	0.429	14.414	39.476	2.073	2.074
C/N	137.07	274.7	331.55	856.06	16.33	34.21	50.71	172.08
Lac(U/L)	47.61	0	8.876	0	35.14	0	12.47	0
	PEP ₁ (peRS305, 8d ^h)	WT(8d ^h)	PEP ₁ (peRS305, 12d ^h)	WT(12d ^h)	PEP ₁ (peRS305, 7d ^h)	WT(7d ^h)	PEP ₁ (peRS305, 12d ^h)	WT(12d ^h)
glucose(g/L)	1.194	1.001	1.565	5.527	1.814	1.777	1.812	5.555
C load(g/g)	14.796	10.64	1.878	23.99	16.57	18.169	3.329	15.269
ammonian(g/L)	0.0353	0.02256	0.01382	0.0151	0.2704	0.1673	0.1054	0.0916
N load(g/g)	0.4374	0.2396	0.01659	0.0651	2.4694	1.71	0.1938	0.2519
C/N	33.824	44.39	113.24	368.22	6.71	10.62	17.19	60.62
Lac(U/L)	298.83	0	271.22	0.003	343.14	0	251.49	1.52
	PEP ₂ (peRS305, 12d ^h)	WT(12d ^h)	EP ₂ (peRS305, 19d ^h)	WT(19d ^h)	PEP ₂ (peRS305, 13d ^h)	WT(13d ^h)	PEP ₂ (peRS305, 19d ^h)	WT(19d ^h)
glucose(g/L)	0.865	0.117	0.9287	1.225	1.147	0.145	1.051	0.187
C load(g/g)	9.058	1.485	1.084	1.271	16.223	3.2	1.34	0.126
ammonian(g/L)	0.02796	0.01964	0.01827	0.0212	0.1799	0.1101	0.1206	0.1247
N load(g/g)	0.2959	0.249	0.02132	0.0221	2.543	2.432	0.1536	0.0843
C/N	30.62	5.96	50.83	57.7	6.379	1.316	8.71	1.499
Lac(U/L)	257.69(12d)	0.037	213.81(19d)	12.833	298.78(13d)	0.29	216.93(19d)	16.11

* PEP₁ refer to produce enzyme start-up, PEP₂ refer to the first enzyme peak, PEP₃ refer to the second enzyme peak

的次生代谢功能有不同的调控机制,如丧失木质素降解功能但并不损失其它次生代谢如孢子形成和其它次生代谢物质的合成^[22]。Kelley 等分离到一株突变体,不能降解木质素且缺失葡萄糖氧化酶活性但仍然具有如形成分子孢子、合成藜芦醇等次生代谢功能。在我们的研究中,在酶合成的同时,菌体仍在生长,证实次生代谢事件可在不同水平调控,特别是原先的次生代谢产物合成发生于初生代谢时期。

白腐菌需培养在 C、N 或 S 缺乏条件的次生代谢状态下才能合成木素酶,原因可能是营养缺乏导致细胞中某些蛋白质多肽不能合成从而经由一系列细胞信号传导影响次生代谢基因的表达^[24],然而营养限制产酶的机理并不十分清楚。我们先前描述了分离到的能在富氮条件下在初生代谢产木素酶(LiP、MnP 和 Lac)且酶产量比 WT 高^[13]的突变菌株,为木质素酶合成的生化与调控研究提供了一个十分有用的工具。在本研究中,进一步探讨了解除营养阻遏产酶的机制。已有许多学者分离到可在非营养限制条件下合成 LiP 的解除调控突变菌株,如 Buswell^[10]分离到 INA-12 黄孢原毛平革菌能在高氮而非谷氨酸氮中产木素酶;Kuwahara^[25]也分离到能在高氮条件下产酶的菌株;Boominathan 等^[9]分离到两株氮解除调控的突变株 der 8-2, der8-5,可在富氮条件下合成 LiP、MnP 和乙二醛氧化酶,突变菌株在限氮条件下酶活高于 WT,但在富氮下的产酶却远低于 WT 在限氮环境下的产酶量。所有这些,加上我们的实验结果,显示可能存在上游广域调控机制在起作用,这种机制控制木质素降解系统的酶合成,而此类系统在其它真菌如构巢曲霉中已发现起作用^[26],如控制氮源代谢操纵子 are A 基因产物,作为一个正调节子通过氮代谢控制一系列酶活性。pcR5305 突变株也可能涉及到一个全局的诸如广域调控蛋白的改变,而这种广域调控蛋白的变化即实现了突变株产木素酶营养阻遏解除。pcR5305 产酶贯穿于整个培养过程且活性高,在实际用中可承受更高污染物浓度与更快的降解速度,具有十分重要的应用前景,同时更是一个深入研究产酶调控机理的有用工具,全面弄清 pcR5305 产木素酶代谢的生理生态效应及其分子调控机理具有十分重要的意义。

参考文献

- [1] Kirk TK, Farrell RL. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. *Annual Review Microbiology*, 1987, 41:465-505.
- [2] Faison BD, Kirk TK. Factor involved in the regulation of a ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Environment Microbiology*, 1985, 49(2): 299-304.
- [3] Tien M, Kirk TK. Lignin degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* burds. *Science*, 1983, 221: 661-663.
- [4] Reddy CA, Trevor MDS. Physiology and molecular biology of the lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiology Reviews*, 1994, 13: 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] Keyser P, Kirk TK, and Zeikus JG. Ligninolytic enzyme system of *Phanerochaete chrysosporium*: synthesized in the absence of lignin in response to nitrogen starvation. *Journal of Bacteriology*, 1978, 135:790-797.
- [7] Jeifries TW, Choi S, and Kirk TK. Nutritional regulation of lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Environment Microbiology*, 1981, 42:290-296.
- [8] Kirk TK, Croan S and Tien M. Production of multiple ligninases *Phanerochaete chrysosporium*: effect of selected growth conditions and use of a mutant strain. *Enzyme and Microbial Technology*, 1986, 8:27-32.
- [9] Boominathan K, Dass SB and Randall TA. Nitrogen deregulated mutants of *Phanerochaete chrysosporium*-a lignin degrading basidiomycete. *Archives of Microbiology*, 1990, 153:521-527.
- [10] Buswell JA, Mollet B, and Odier E. Ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* under nutrient sufficiency. *FEMS Microbiology Letters*, 1984, 25: 295-299.
- [11] 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.

- [12] Orth AB, Michael'denny, and Tien. M. Overproduction of lignin-degrading enzymes by an isolate of *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Environment Microbiology*, 1991, 57(9):2591-2596.
- [13] 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 (Acta Microbiologia Sinica)*, 2011, 51(3):352-359.
- [14] 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.
- [15] 喻国策, 文湘华, 李东锋, 李锐, 钱易. 黄孢原毛平革菌在多种氮浓度下木质素降解酶的产生. *环境科学学报 (Acta Scientiae Circumstantiae)*, 2003, 23(6):802-806.
- [16] Carlos GD, Nathan R, Yitzak H. Overproduction of lignin peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium* (BKM-F1767) under nonlimitation nutrient conditions. *Applied Environment Microbiology*, 1993, 59(6):1919-1926.
- [17] 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. *Journal of Microbiology*, 2009, 47(3):308-318.
- [18] Var der Woude MW, Boominathan K, Reddy CA. Nitrogen regulateon of peroxidase and manganese-dependent peroxidase production is independent of carbon and manganese regulation in *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Microbiology*, 1993, 160:1-4.
- [19] Srinivasan C, D' Souza TM, Boominathan K, and Reddy C A. Demonstration of Laccase in the White Rot Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F1767. *Applied Environment Microbiology*, 1995, 61(12): 4274-4277.
- [20] Prabu PC, Udayasoorian C and Balasubramanian G. Isolation, Molecnlar characterization and reactivity with 2, 6-dichlorophenol of a laccase and isolation of laccase gene specific sequences from lignin degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* (TL1). *Biotechnology*, 2006, 5(4): 522-529.
- [21] Jhadav A, Vamsi KK, Khairnar Y, Boraste A, Gupta N, Trivedi S, Patil P, Gupta G, Gupta M, Mujapara AK, Joshi B, Mishra D. Optimization of production and partial purification of laccase by *Phanerochaete chrysosporium* using submerged fermentation. *International Journal of Microbiology Research*, 2009, 1(2): 9-12.
- [22] Liwicki R, Paterson A, Macdonald MJ, and Broda P. Phenotypic classes of phenoloxidase-negative mutants of the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Bacteriology*, 1985, 162:641-644.
- [23] Kelley RL. Characterization of glucose oxidase-negative mutants of a lignin degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Microbiology*, 1986, 144:254-257.
- [24] Ochi K. *Streptomyces relC* mutants with an altered ribosomal protein ST-L11 and genetic analysis of a *Streptomyces griseus relC* mutant. *Journal of Bacteriology*, 1990, 172:4008-4016.
- [25] Kuwahara M, and Asada Y. Production of ligninases, peroxidases and alcohol oxidases by mutants of *Phanerochaete chrysosporium*, p. 171-176. In E. Odier (ed.), *Lignin enzymic and microbial degradation*. Versailles, France: INRA Publications, 1987.
- [26] Davis MA, Hynes MJ. Regulatory genes *Aspergillus nidulans*. *Trends in Genetics*, 1989, 5:14-19.

Carbon-nitrogen regulation of a laccase-producing mutant of *Phanerochaete chrysosporium* resisting carbon and nitrogen nutritional repression

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

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

Abstract: [Objective] Comparing the effects of different carbon-nitrogen nutrition and their consumption on laccase production, we studied the ecophysiological characteristics of *Phanerochaete chrysosporium* resisting nutritional repression, and the carbon-nitrogen physiological regulation mechanism of the white-rot fungi. [Methods] The mutant and the wild-type strains were respectively cultured under the conditions of: carbon and nitrogen limitation, carbon limitation and nitrogen sufficiency, carbon sufficiency and nitrogen limitation, carbon and nitrogen sufficiency, to compare their laccase-production kinetics, cell growth and glucose and ammonia nitrogen consumption to show the characteristics and the regulation pathway of carbon-nitrogen nutrition on laccase production. [Results] The wild-type strain produced 0.107U/L, 0.029U/L, 12.84U/L and 18.05U/L of laccase respectively on 11th, 14th, 19th and 19th day when glucose or ammonia nitrogen was consumed to the lowest value; the mutant produced laccase throughout the whole process with two peaks respectively on 8th, 7th, 12th and 12th day with laccase of 298.83U/L, 343.14U/L, 271.22U/L and 251.49U/L and on 12th, 13th, 19th and 19th day with laccase of 257.69U/L, 298.78U/L, 213.81U/L and 216.93U/L. The enzyme-production kinetics trends were similar between the two strains on the condition of the same initial carbon concentration but were different on the same initial nitrogen concentration, which showed that carbon source had more effect on laccase production. [Conclusion] The laccase production of the wild-type strain was regulated by carbon or nitrogen starvation. Under different conditions, it was regulated by different nutrient. For example, under carbon limitation condition it was started by the glucose starvation, however under carbon sufficient condition the ammonia nitrogen starvation aroused it. The laccase production of the mutant didn't repress by carbon and nitrogen nutrition. Maybe it referred to a global regulation change which relieved nutritional repression on the laccase production.

Keywords: *Phanerochaete chrysosporium*, laccase, resistant to nutritional repression, regulation of carbon and nitrogen nutrition

(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: 27 September 2011 / Revised: 29 November 2011