

活性氧对白腐真菌漆酶合成的影响

田乔鹏¹, 汪新悦², 张永¹, 管政兵¹, 蔡宇杰¹, 廖祥儒^{*1}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 无锡医学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 分别将不同活性氧在发酵第4天加入发酵产酶培养基中, 一定时间后通过测生物量和漆酶酶活研究外界活性氧对白腐真菌漆酶合成的影响, 并通过活性电泳进一步验证。结果表明: 低浓度的活性氧可以通过信号传导方式调控漆酶合成, 超氧阴离子抑制白腐真菌产漆酶, 过氧化氢和羟自由基促进白腐真菌产漆酶。实验结果对漆酶合成调控、植物-病原菌相互作用以及生物防护具有重要意义。

关键词: 漆酶; 活性氧; 白腐真菌

中图分类号: Q 939.95 文章编号: 1673-1689(2019)05-0103-08 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.05.015

Effect of Reactive Oxygen Species on Laccase Synthesis of White-Rot Fungus

TIAN Qiaopeng¹, WANG Xinyue², ZHANG Yong¹, GUAN Zhengbing¹, CAI Yujie¹, LIAO Xiangru^{*1}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2. Wuxi Medical School, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In this paper, various of reactive oxygen species were respectively added to the fermentation medium on the 4 d. After a certain time, the effect of different reactive oxygen species on laccase synthesis of white-rot fungus, was evaluated by measuring biomass and laccase activity. And then this effect was further investigated by the method of native PAGE. The experiment results show that reactive oxygen species can regulate laccase synthesis of white-rot fungus via redox regulation in cellular signaling. In addition, superoxide anion inhibits laccase synthesis, but hydrogen peroxide and hydroxyl radical promote it obviously. These results are very important for researching biosynthesis regulation of laccase and interaction between plant and pathogen, which can be used for biological protection.

Keywords: laccase, reactive oxygen species, white-rot fungi

植物病原菌在自然界中广泛存在, 包括真菌、细菌、病毒等, 其中真菌是主要的植物病原菌^[1]。病原菌在植物从种子到成树的各个阶段都会对植物

进行侵染, 对植物寿命和繁殖产生严重影响^[1]。白腐真菌就是这样一类重要的病原菌, 能降解活体树木及木材中的木质素, 使木质腐变成白色。白腐菌能

收稿日期: 2016-09-20

基金项目: 江苏省研究生培养创新工程 (KYLX15_1176); 江苏省产学研前瞻项目 (BY2014023-28); 无锡市科技发展农业支撑项目 (CLE01N1310); 江苏合泓创展生物科技有限公司合作项目 (1014320000130700)。

作者简介: 田乔鹏(1989—), 男, 博士, 主要从事白腐真菌胞外氧化还原酶表达调控及应用研究。E-mail: qiaopeng@126.com

* 通信作者: 廖祥儒(1964—), 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事生化与分子生物学与发酵工程研究。E-mail: liaoxiangru@163.com

引用本文: 田乔鹏, 汪新悦, 张永, 等. 活性氧对白腐真菌漆酶合成的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(05): 103-110.

够高效分泌多种胞外氧化酶类,包括漆酶(Lac)、锰过氧化物酶(MnP)和木质素过氧化物酶(LiP)等,这些酶参与木质纤维素基质木质素的降解^[2]。漆酶(EC 1.10.3.2)属于氧化还原酶类,催化底物氧化同时将分子氧还原成水^[3]。金属离子^[4-5]、木质素和芳香族化合物^[6]、氮源^[7]和碳源^[8-9]通常可以诱导漆酶基因的表达。

漆酶参与病原微生物对植物的侵染,是植物病害发生的重要过程。研究其合成的调控,尤其是活性氧对其表达的调控,有利于探明植物与病原微生物相互作用的分子机理,构建植物病害的无公害防控技术模型,为解决农药污染问题提供新的思路。

活性氧(AOS)主要包括超氧阴离子(O_2^-)、过氧化氢(H_2O_2)、羟自由基($\cdot OH$)等,在植物-病原菌相互作用的过程中,具有重要的意义^[10-11]。活性氧是正常细胞代谢或由于接触到一些压力因素产生的一种副产物,比如温度的变化、金属离子或氧化还原循环的存在^[12]。真菌和其他真核细胞一样,都进化出了具有防御过量的活性氧的解毒物质,包括酶和一些低相对分子质量的化合物。当氧化剂的量增加到超出了细胞的抗氧化能力时,可以观察到氧化应激(oxidative stress)现象^[12]。早期的植物-病原真菌研究表明,漆酶参与对抗氧化应激。毕赤酵母中表达白腐真菌漆酶基因可以显著增强酵母细胞抵抗 H_2O_2 介导的氧化胁迫的能力,通过诱导激活酵母谷胱甘肽抗氧化系统(包括谷胱甘肽,谷胱甘肽过氧化物酶, γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶,谷胱甘肽还原酶)^[13],说明白腐真菌漆酶也参与了对抗氧化应激。

近年来,植物-病原菌相互作用研究发现,病原菌本身存在释放活性氧的现象^[14-15]。活性氧的释放很可能与植物病原菌的致病性具有一定的联系^[16-17]。氧化破裂、瞬态和活性氧(ROS)的快速积累,是高等植物对病原菌攻击的广泛防御机制^[16]。病原菌与植物相互作用涉及活性氧的产生与清除,微生物也可能通过产生抗氧化酶和木质纤维降解酶类,通过降低局部的氧和活性氧,防御自己免受活性氧伤害和降解植物细胞壁,并最终入侵成功^[18]。

已有不少研究证实,活性氧参与细胞信号传导,尽管其在高浓度下具有损伤有机大分子进而破坏细胞结构的作用,其也能在一定浓度范围内介导相关信号传导,调节细胞做出应答反应^[19]。所以研究活性氧对白腐真菌漆酶合成的影响具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 产漆酶菌株 *Pycnoporus* sp. SYBC-L₃ (L₃):作者所在实验室筛选到的高产菌株,保藏于江南大学工业生物技术重点实验室内。PDA 固体斜面保藏于 4 °C 冰箱中,每月活化一次。

1.1.2 试剂 葡萄糖、麦芽糖、酵母膏、蛋白胨、酒石酸铵、 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 、 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 、 $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 、 KH_2PO_4 、 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、愈创木酚(DMP)、吐温-80、一水柠檬酸:均为国产分析纯试剂。豆粕:市售产品。

1.1.3 仪器与设备 YXQ-LS-50 立式蒸气压力灭菌锅:上海博迅公司产品;组合式摇床:太仓市强乐实验设备有限公司产品;LRH-250 培养箱:广东省医疗器械厂产品;UV-6000 紫外可见分光光度计:METASH;恒温水浴锅:常州中诚仪器制造有限公司产品;CP313 电子天平:奥豪斯仪器(上海)有限公司产品;TGL-16M 台式高速冷冻离心机:湖南湘仪实验室仪器开发有限公司产品;超净工作台:苏州净化设备有限公司产品;蛋白电泳仪:生工生物工程(上海)股份有限公司产品;凝胶成像仪:生工生物工程(上海)股份有限公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基与培养条件

1) 种子培养 培养基(g/L):葡萄糖(50),酵母膏(10),蛋白胨(5)。115 °C 灭菌 20 min。

培养条件:从活化后(7 d)的平板上用 10 mL 无菌水将孢子冲洗下来,在装有玻璃珠的锥形瓶中摇匀(锥形瓶装玻璃珠一起灭菌后使用),取 1 mL 接种至种子培养基,接种量为体积分数 2%,200 r/min、30 °C 的条件下培养 2 d。

2) 发酵培养 优化培养基^[20](g/L):麦芽糖(12),豆粕(6), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0.5), $MnSO_4 \cdot H_2O$ (0.034), KH_2PO_4 (1), $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ (0.2), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.5),吐温-80(0.5),DMP 0.8 mmol/L。115 °C 灭菌 20 min。

基础培养基^[21](g/L):葡萄糖(10),酒石酸铵(2), KH_2PO_4 (1), $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ (0.2), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.5), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0.01), $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ (0.01)。115 °C 灭菌 20 min。

最佳培养条件^[20]:起始 pH 值 4.0、种龄 2 d、接

种量 10%、转速 200 r/min。

1.2.2 漆酶酶活的测定 粗酶液的制备:发酵液 8 800 g 离心 10 min 得到的上清液即为粗酶液,冰箱 4 ℃ 保存备用。以 DMP 为底物测定漆酶酶活,参照 Wang 等^[22]的测定方法略做调整。

1.2.3 生物量的测定 培养一定时间后取出摇瓶,8 800 g 离心 10 min,收集菌体,上清液用于测定漆酶酶活,菌体在 60 ℃ 烘箱中烘干至恒重,称量获得菌体的干重(以 g/L 表示)^[23]。

1.2.4 活性电泳分析 参考曾等^[24]的方法进行。

1.3 实验设计

1.3.1 菌株胞外漆酶产酶曲线的测量 以发酵优化培养基,在最佳产酶条件下对 L₃ 进行摇瓶发酵,每 24 h 取一次样,测漆酶酶活,确定 L₃ 胞外的产酶曲线和产酶高峰期,为下一步研究活性氧对白腐菌产漆酶的影响确定处理时间。

1.3.2 超氧阴离子对白腐菌产漆酶的影响 以发酵优化培养基,在最佳产酶条件下对 L₃ 进行摇瓶发酵培养,在产酶高峰期前期第 4 天分别向锥形瓶中加入过滤除菌的体积分数 10% AP 溶液,随后分别加入过滤除菌的 TEMED 并迅速摇匀(AP 溶液与 TEMED 溶液的体积比为 10:1),总体积为 40、80、120、160 μL,对照组加 160 μL 的无菌水。第 8 天取样,测漆酶酶活和生物量。

1.3.3 过氧化氢对白腐菌产漆酶的影响

1) 低浓度过氧化氢对白腐菌漆酶合成的影响以发酵优化培养基,在最佳产酶条件下对 L₃ 进行摇瓶发酵培养,在产酶高峰期前期第 4 天分别向锥形瓶中加入无菌水稀释的过氧化氢溶液处理真菌细胞,终浓度为 3、6、9、12、15 mmol/L,对照组加等体积的无菌水。第 8 天取样,测漆酶酶活,生物量。

确定最佳浓度为 12 mmol/L 后,以发酵优化培养基,在最佳产酶条件下再一次对 L₃ 进行摇瓶发酵培养,在产酶高峰期前期第 4 天分别向锥形瓶中加入无菌水稀释的过氧化氢溶液处理真菌细胞,终浓度均为 12 mmol/L,对照组加等体积的无菌水。定时取样,测漆酶酶活,考察添加 12 mmol/L H₂O₂ 之后漆酶分泌随时间变化情况。

以发酵基础培养基,在上述产酶条件下对 L₃ 进行摇瓶发酵培养,在第 4 天分别向锥形瓶中加入无菌水稀释的过氧化氢溶液处理真菌细胞,终浓度为

12 mmol/L,对照组加等体积的无菌水。24 h 后取样,对样品进行活性电泳分析。

2) 高浓度过氧化氢对白腐菌漆酶合成的影响以发酵基础培养基,在上述产酶条件下对 L₃ 进行摇瓶发酵培养,在第 4 天分别向锥形瓶中加入无菌水稀释的过氧化氢溶液处理真菌细胞,终浓度为 50、100、200 mmol/L,对照组加等体积的无菌水。24 h 后取样,测漆酶酶活,生物量。

1.3.4 铁离子对白腐菌产漆酶的影响 以发酵优化培养基,在最佳产酶条件下对 L₃ 进行摇瓶发酵培养,在产酶高峰期前期第 4 天分别向锥形瓶中加入过滤除菌的硫酸亚铁溶液处理真菌细胞,铁离子终浓度为 1、3、5、15、30、60 mmol/L,对照组加等体积的无菌水。为了突出铁离子对白腐菌产漆酶的影响,选择第 8 天取样,测漆酶酶活,生物量。

1.3.5 羟自由基对白腐菌产漆酶的影响 控制 Fe²⁺浓度为 1 mmol/L, H₂O₂ 浓度为 1 mmol/L,初步考察羟自由基对白腐菌产漆酶的影响。以发酵基础培养基,在上述产酶条件下对 L₃ 进行摇瓶发酵培养,在第 4 天向实验组中加入过滤除菌的 Fe²⁺-EDTA 溶液和无菌水稀释的 H₂O₂ 溶液,终浓度均为 1 mmol/L,对照组加等体积的无菌水。24 h 后取样,测漆酶酶活和生物量。

在前期的基础上降低羟自由基的添加量,参考 Belinky 等^[25]方法处理真菌细胞,控制 Fe²⁺浓度为 0.1 mmol/L, H₂O₂ 浓度为 0.5 mmol/L,并设置两组消极对照组,考察羟自由基对白腐菌产漆酶的影响。以发酵基础培养基,在上述产酶条件下对 L₃ 进行摇瓶发酵培养,在第 4 天向实验组(Fenton 组)中加入过滤除菌的 Fe²⁺-EDTA 溶液和无菌水稀释的 H₂O₂ 溶液,终浓度分别为 0.1 mmol/L 和 0.5 mmol/L,加入后迅速摇匀。消极对照组先加入终浓度为 50 mmol/L 过滤除菌的二甲基亚砷(DMSO)或甘露醇(Mannitol)溶液(两种溶液的浓度一样),随后加入过滤除菌的 Fe²⁺-EDTA 溶液和无菌水稀释的 H₂O₂ 溶液,终浓度同实验组,迅速摇匀。对照组加入与实验组等体积的无菌水。24 h 后取样,测漆酶酶活和生物量,对样品进行活性电泳分析。

1.3.6 数据分析 每个实验设置 3 个平行,采用 Origin8.5 软件进行数据分析与绘图。

2 结果与讨论

2.1 菌株胞外漆酶产酶曲线

由图 1 可知,第 8 天外漆酶酶活达到最大值,前 3 天主要为适应期和前期菌体的生长,第 4 天到第 8 天为产酶高峰期,作者选择产酶高峰期前期第 4 天为后续实验的处理时间,研究外界活性氧对白腐菌产漆酶的影响。

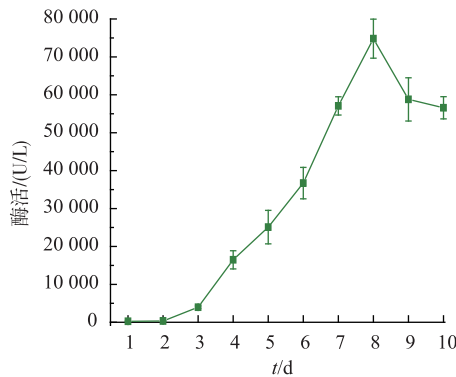


图 1 优化培养基中 *Pycnoporus sp.* SYBC-L₃ 胞外漆酶产酶曲线

Fig. 1 Production of laccase by *Pycnoporus sp.* SYBC-L₃ in the optimal medium

2.2 超氧阴离子对白腐菌产漆酶的影响

AP-TEMED 混合溶液可以产生超氧阴离子,产生多少与体积成正相关。实验结果如图 2 所示。超氧阴离子对白腐菌产酶起抑制作用,酶活随着添加量的增加而逐渐降低($y = -0.17472x + 98.89778$, $R^2 = 0.91076$),当添加量为 160 μL 时酶活为对照组 69%;生物量随着添加量的增加而略有增加($y = 0.0054x + 9.40761$, $R^2 = 0.79842$)。

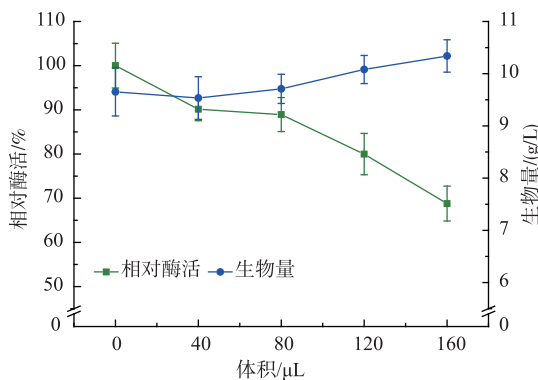


图 2 超氧阴离子对 *Pycnoporus sp.* SYBC-L₃ 产漆酶的影响
Fig. 2 Effect of O_2^- on laccase production in *Pycnoporus sp.* SYBC-L₃

2.3 过氧化氢对白腐菌产漆酶的影响

2.3.1 低浓度过氧化氢对白腐菌漆酶合成的影响

实验结果如图 3 所示,在 0~12 mmol/L 范围内, H_2O_2 对 *Pycnoporus sp.* SYBC-L₃ 产漆酶具有促进作用。酶活随着添加量的增加而逐渐增加,生物量也随着添加量的增加而略有增加。原因可能是 H_2O_2 参与了细胞间的信号传导过程,诱导了特定基因的表达,从而促进漆酶的合成。cGMP 是细胞中一种重要的第二信使,由细胞内鸟苷环化酶催化合成, H_2O_2 对鸟苷环化酶活性具有激活作用, O_2^- 对鸟苷环化酶活性具有抑制作用^[26-27]。这也解释了为什么超氧阴离子加入量越多, *Pycnoporus sp.* SYBC-L₃ 漆酶合成越少。 H_2O_2 浓度过高,对漆酶合成反而又有抑制作用。实验结果显示 H_2O_2 浓度高于 15 mmol/L 时,漆酶合成下降,在 15 mmol/L 时相对酶活仅为 106%。原因是浓度过高,会杀伤或者杀死一定的细胞,对漆酶的分泌不利。

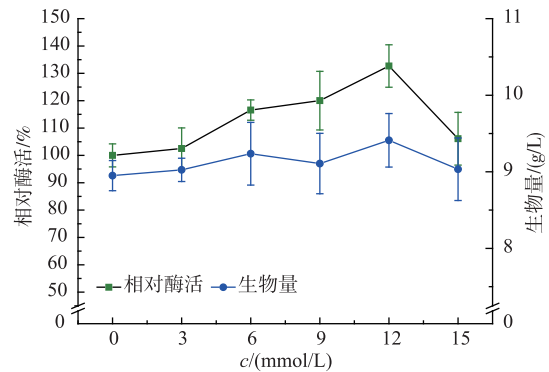


图 3 低浓度 H_2O_2 对 *Pycnoporus sp.* SYBC-L₃ 产漆酶的影响

Fig. 3 Effect of low concentration H_2O_2 on laccase production in *Pycnoporus sp.* SYBC-L₃

由于 12 mmol/L H_2O_2 对 *Pycnoporus sp.* SYBC-L₃ 产漆酶促进作用显著,接着考察添加 12 mmol/L H_2O_2 之后漆酶分泌随时间变化情况,结果如图 4 所示。在加入 H_2O_2 之后的 12 h 内,实验组产酶量明显比对照组低,相比较处理前,酶活基本上没有增加,甚至下降。实验结果说明即使是低浓度的 H_2O_2 对 *Pycnoporus sp.* SYBC-L₃ 细胞仍然有一定的毒害作用,即 H_2O_2 会杀伤或者杀死一定量的正常细胞。但是,在 12 h 之后,实验组漆酶活力反而超过了对照组,在 96 h 时酶活达到对照组 127%,明显高于对照组,说明在 12 h 之前实验组漆酶相关基因就迅速表

达了,事实上这些基因的表达水平还要高于这个测量值。后期实验选择 24 h 为取样时间。

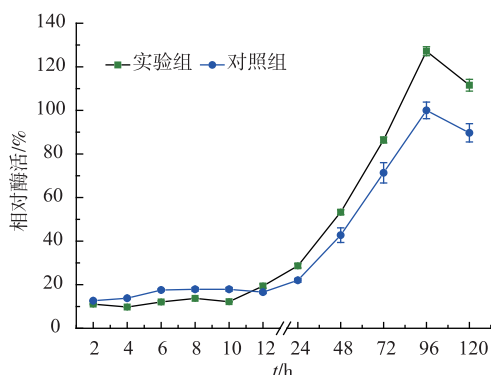
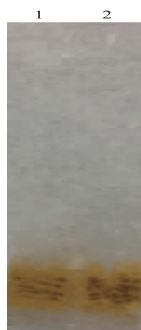


图 4 添加 12 mmol/L H₂O₂ 后 *Pycnoporus* sp. SYBC-L₃ 胞外漆酶产酶曲线

Fig. 4 Profile of laccase production by *Pycnoporus* sp. SYBC-L₃ after added 12 mmol/L H₂O₂ to the medium

优化培养基中 *Pycnoporus* sp. SYBC-L₃ 会同时分泌 3 种同工酶,第 5 天到第 8 天发酵上清液电泳结果能看到两条清晰的条带(lac1, lac2)^[28]。而实验过程中发现,电泳结果显示对照组与实验组均出现一条带和两条带,第二条带(lac1)差异并不明显,说明 lac1 所对应的漆酶基因表达可能不受活性氧直接影响,后期实验改用基础培养基研究活性氧对白腐菌产漆酶的影响。为了使结果更加明显,粗酶液稀释 10 倍,电泳结果如图 5 所示,经底物 DMP 染色后只有一条带,对应漆酶 lac2,实验组颜色明显比对照组要深,说明酶活比对照组高,与测量值相符,进一步证明过氧化氢促进漆酶的表达。



1:对照;2:过氧化氢

图 5 12 mmol/L H₂O₂ 对 *Pycnoporus* sp. SYBC-L₃ 产漆酶的影响(非变性电泳图)

Fig. 5 Effect of 12 mmol/L H₂O₂ on laccase production in *Pycnoporus* sp. SYBC-L₃ (Native PAGE stained with DMP)

2.3.2 高浓度过氧化氢对白腐菌漆酶合成的影响
为突出高浓度 H₂O₂ 对细胞的毒害作用,选择发酵基础培养基,加入更高浓度的 H₂O₂ 进行实验,结果如图 6 所示。随着 H₂O₂ 浓度的增加,发酵液胞外漆酶酶活越来越低,当 H₂O₂ 浓度为 200 mmol/L 时,漆酶活力只有对照组的 16%左右,说明此时大量细胞已被 H₂O₂ 杀死。生物量随着 H₂O₂ 浓度的增加略有增加。

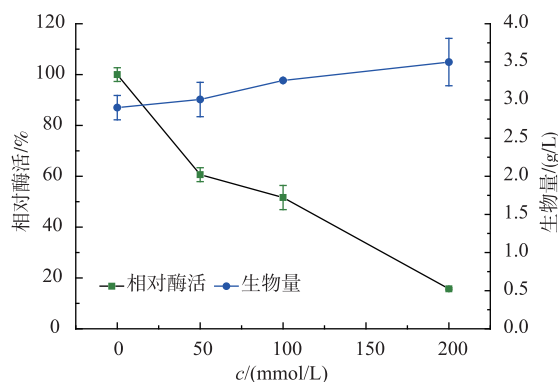


图 6 高浓度 H₂O₂ 对 *Pycnoporus* sp. SYBC-L₃ 产漆酶的影响

Fig. 6 Effect of high concentration H₂O₂ on laccase production in *Pycnoporus* sp. SYBC-L₃

2.4 铁离子对白腐菌产漆酶的影响

铁离子对真菌产漆酶通常具有抑制作用^[29-30],为下一步研究羟自由基对 *Pycnoporus* sp. SYBC-L₃ 产漆酶的影响找到适当的铁离子浓度范围,首先研究了不同浓度 Fe²⁺对 *Pycnoporus* sp. SYBC-L₃ 产漆酶和生物量的影响,结果如图 7 所示。高浓度的 Fe²⁺对 *Pycnoporus* sp. SYBC-L₃ 产漆酶具有严重抑制作用,当 Fe²⁺浓度为 15 mmol/L 时,相对酶活为对照组 1.08%;低浓度的 Fe²⁺对 *Pycnoporus* sp. SYBC-L₃ 产漆酶虽有抑制作用,但不是很明显,当 Fe²⁺浓度为 1 mmol/L 时,相对酶活为对照组 99.0%。后期研究均控制 Fe²⁺浓度在 1 mmol/L 以下。生物量随着 Fe²⁺浓度的增加而迅速增加。

2.5 羟自由基对白腐菌产漆酶的影响

高浓度的羟自由基存在时可以直接杀死病原菌^[31],当羟自由基浓度较低时是否会促进白腐菌漆酶合成,目前还不是很清楚,设计实验研究了低浓度的羟自由基对白腐菌产漆酶的影响。

羟自由基(·OH)的产生一般是通过 Fenton 试剂生成,这是一种经典的产生羟自由基方法,它采用 H₂O₂ 为氧化剂,Fe²⁺为催化体系的氧化反应^[32]。

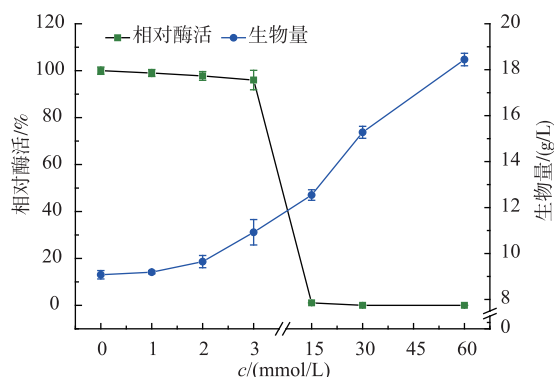


图7 Fe²⁺对 *Pycnoporus sp.* SYBC-L₃ 产漆酶的影响

Fig. 7 Effect of Fe²⁺ on laccase production in *Pycnoporus sp.* SYBC-L₃

控制 Fe²⁺ 浓度为 1 mmol/L, H₂O₂ 浓度为 1 mmol/L, 初步考察羟自由基对白腐菌产漆酶的影响, 结果如图 8(a)、(b)所示。低浓度的羟自由基对 *Pycnoporus sp.* SYBC-L₃ 产漆酶具有促进作用, 效果

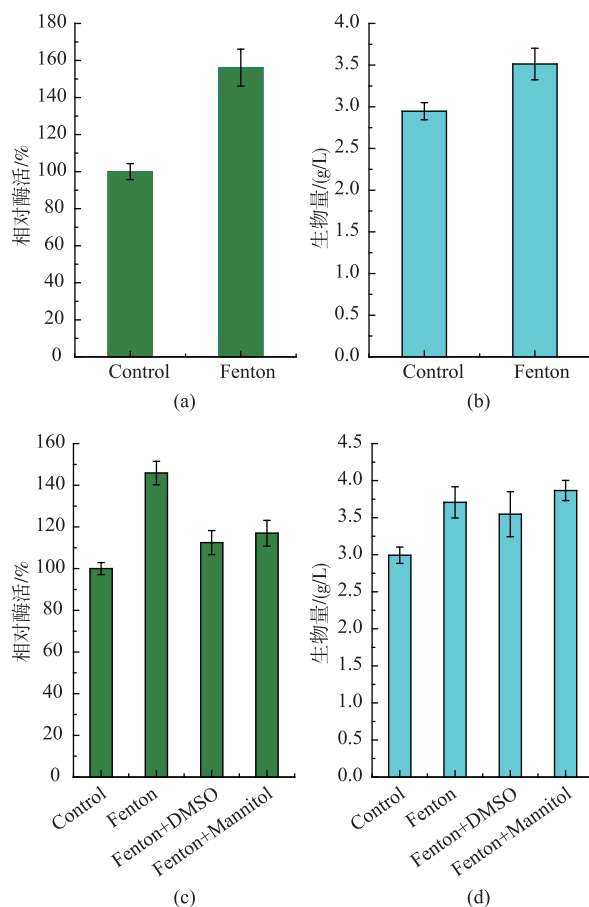


图8 羟自由基 ($\cdot\text{OH}$) 对 *Pycnoporus sp.* SYBC-L₃ 产漆酶的影响

Fig. 8 Effect of hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) on laccase production in *Pycnoporus sp.* SYBC-L₃

比单纯的添加过氧化氢(H₂O₂)更明显。实验组酶活为对照组的 156%, 生物量只有对照组的 119%。

在前期的基础上降低羟自由基的添加量, 控制 Fe²⁺ 浓度为 0.1 mmol/L, H₂O₂ 浓度为 0.5 mmol/L, 并设置两组消极对照组, 考察羟自由基对白腐菌产漆酶的影响, 结果如图 8(c)、(d)所示。实验组酶活为对照组的 145%, 生物量为对照组的 124%。消极对照组酶活也略有提高, 生物量大体和实验组差不多, 均高于对照组, 说明低浓度的羟自由基确实能促进白腐菌漆酶的合成。

电泳结果如图 9 所示, 经底物 DMP 染色后只有一条带, 对应漆酶 lac2, 实验组颜色均比对照组深, 说明酶活比对照组高, 与测量值相符, 进一步证明低浓度的羟自由基促进漆酶的表达。



注 1: 对照 2: 芬顿试剂 3: 芬顿试剂+二甲亚砜 4: 芬顿试剂+甘露醇

图9 羟自由基 ($\cdot\text{OH}$) 对 *Pycnoporus sp.* SYBC-L₃ 产漆酶的影响 (非变性电泳图)

Fig. 9 Effect of hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) on laccase production in *Pycnoporus sp.* SYBC-L₃ (Native PAGE stained with DMP)

在超氧阴离子(O₂⁻)、过氧化氢(H₂O₂)和羟自由基($\cdot\text{OH}$) 3 种活性氧中, 超氧阴离子毒性较强, 对白腐菌产漆酶起抑制作用; 过氧化氢毒性较小, 容易扩散, 可以和过渡金属 Fe²⁺、Cu⁺ 发生 Fenton 反应, 产生毒性最大的羟自由基, 低浓度的过氧化氢和低浓度的羟自由基对白腐菌产漆酶均起到促进作用。

实验结果说明高浓度的活性氧不利于病原菌生长, 低浓度的活性氧(主要指 H₂O₂ 和 $\cdot\text{OH}$) 不但抑制不了病原菌生长, 反而促进病原菌入侵, 这可能就是植物-病原菌相互作用进化的结果。病原菌入侵植物的过程中, 植物想通过产生活性氧抑制病原

菌生长,这个过程是需要氧气的,而漆酶可以消耗氧气,从而使微环境中的氧含量减少,同时漆酶可以增强白腐菌细胞的抗氧化能力,保护了白腐菌免受宿主防御伤害,有利于病原菌入侵。当产生的活性氧浓度较低时,漆酶表达增强,反而有利于白腐菌侵染植物;当产生的活性氧浓度较高时,漆酶表达低,白腐菌侵染能力也就受到了限制,这或许就是为什么植物会在病原菌入侵时大量积累活性氧的原因。不同的病原菌漆酶表达能力不同,所能耐受的活性氧浓度也不同,也就决定了病原菌能否入侵成功。

3 结语

通过研究3种不同的活性氧对白腐菌产漆酶的影响,发现超氧阴离子抑制白腐菌产漆酶,低浓度的过氧化氢和低浓度的羟自由基促进白腐菌产漆酶。找到了受ROS调控的漆酶(lac2)。实验过程中发现不同的培养条件漆酶活力不同,漆酶酶活越高,菌体抗过氧化氢氧化胁迫能力越强,说明漆酶是菌体受到一定的氧化胁迫作用时表达的。实验结果对于理解植物-病原菌相互作用具有重要意义,也为漆酶表达调控提供一些借鉴。

参考文献:

- [1] 黎劫. 病原菌对植物的作用及其受环境因子的影响[J]. 河南科技, 2013, 12: 223-225.
- [2] WESENBERG D, KYRIAKIDES I, AGATHOS S N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents[J]. **Biotechnology Advances**, 2003, 22(1-2): 161-187.
- [3] ANTOSOVA Z, SYCHROVA H. Yeast hosts for the production of recombinant laccases: a review [J]. **Molecular Biotechnology**, 2016, 58(2): 93-116.
- [4] GALHAUP C, GOLLER S, PETERBAUER C K, et al. Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions[J]. **Microbiology-Sgm**, 2002, 148: 2159-2169.
- [5] COLLINS P J, DOBSON A D W. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor* [J]. **Applied And Environmental Microbiology**, 1997, 63(9): 3444-3450.
- [6] TERRON M C, GONZALEZ T, CARBAJO J M, et al. Structural close-related aromatic compounds have different effects on laccase activity and on *lcc* gene expression in the ligninolytic fungus *Trametes sp* I-62 [J]. **Fungal Genetics And Biology**, 2004, 41(10): 954-962.
- [7] SUN Xiao, LIAO Xiangru, LIU Jiayang, et al. Laccase production under solid-state fermentation of rice straw by *Pycnoporus sanguineus* SYBC-L12 and its decolorization of synthetic dyes [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2013(3): 240-249. (in Chinese)
- [8] SODEN D M, DOBSON A D W. Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju* [J]. **Microbiology-Sgm**, 2001, 147: 1755-1763.
- [9] WANG Zhixin, CAI Yujie, LI Yanyan, et al. Effect of fermentation medium and conditions on laccase production by *Pycnoporus sp.* SYBC-L1 [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009(6): 832-839. (in Chinese)
- [10] WOJTASZEK P. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection[J]. **Biochemical Journal**, 1997, 322: 681-692.
- [11] WANG P F, KANG J H, ZHENG R L, et al. Scavenging effects of phenylpropanoid glycosides from *Pedicularis* on superoxide anion and hydroxyl radical by the spin trapping method(95)02255-4[J]. **Biochemical Pharmacology**, 1996, 51(5): 687-691.
- [12] JASZEK M, ZUCHOWSKI J, DAJCZAK E, et al. Ligninolytic enzymes can participate in a multiple response system to oxidative stress in white-rot basidiomycetes: *Fomes fomentarius* and *Tyromyces pubescens* [J]. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 2006, 58(3-4): 168-175.
- [13] YANG Y, FAN F F, ZHUO R, et al. Expression of the laccase gene from a white rot fungus in *Pichia pastoris* can enhance the resistance of this yeast to H₂O₂-mediated oxidative stress by stimulating the glutathione-based antioxidative system [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2012, 78(16): 5845-5854.
- [14] MAYER A M, STAPLES R C, GIL-AD N L. Mechanisms of survival of necrotrophic fungal plant pathogens in hosts expressing the hypersensitive response[J]. **Phytochemistry**, 2001, 58(1): 33-41.
- [15] LI H Y, WANG J S. Release of active oxygen from phytopathogenic bacteria and their regulation [J]. **Chinese Science Bulletin**,

- 1999, 44(1):71-75.
- [16] ROLKE Y, LIU S J, QUIDDE T, et al. Functional analysis of H₂O₂-generating systems in *Botrytis cinerea*: the major Cu-Zn-superoxide dismutase (BCSOD1) contributes to virulence on French bean, whereas a glucose oxidase (BCGOD1) is dispensable[J]. **Molecular Plant Pathology**, 2004, 5(1):17-27.
- [17] DEIGHTON N, MUCKENSCHNABEL I, GOODMAN B A, et al. Lipid peroxidation and the oxidative burst associated with infection of *Capsicum annuum* by *Botrytis cinerea*[J]. **Plant Journal**, 1999, 20(4):485-492.
- [18] TORRES M A. ROS in biotic interactions[J]. **Physiologia Plantarum**, 2010, 138(4):414-429.
- [19] RAY P D, HUANG B W, TSUJI Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling[J]. **Cell Signal**, 2012, 24(5):981-990.
- [20] LIU Jiayang, CAI Yujie, LIAO Xiangru, et al. Screening and optimization of laccase production from a laccase producing fungus[J]. **Food & Machinery**, 2010(4):10-14. (in Chinese)
- [21] 刘家扬. 白腐真菌 *Pycnoporus* sp. SYBC-L3 产漆酶及应用研究[D]. 无锡: 江南大学, 2013.
- [22] WANG Z X, CAI Y J, LIAO X R, et al. Production and characterization of a novel laccase with cold adaptation and high thermal stability from an isolated fungus[J]. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, 2010, 162(1):280-294.
- [23] TEERAPATSAKUL C, PARRA R, BUCKE C, et al. Improvement of laccase production from *Ganoderma* sp KU-alk4 by medium engineering[J]. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 2007, 23(11):1519-1527.
- [24] ZENG X K, CAI Y J, LIAO X R, et al. Decolorization of synthetic dyes by crude laccase from a newly isolated *Trametes trogii* strain cultivated on solid agro-industrial residue[J]. **Journal of Hazardous Materials**, 2011, 187(1-3):517-525.
- [25] BELINKY P A, FLIKSHTEIN N, LECHENKO S, et al. Reactive oxygen species and induction of lignin peroxidase in *Phanerochaete chrysosporium*[J]. **Applied And Environmental Microbiology**, 2003, 69(11):6500-6506.
- [26] GEORGIOU C D, PETROPOULOU K P. Effect of the antioxidant ascorbic acid on sclerotial differentiation in *Rhizoctonia solani* [J]. **Plant Pathology**, 2001, 50(5):594-600.
- [27] SPICKETT C M, SMIRNOFF N, PITT A R. The biosynthesis of erythroascorbate in *Saccharomyces cerevisiae* and its role as an antioxidant[J]. **Free Radical Biology And Medicine**, 2000, 28(2):183-192.
- [28] LIU J Y, CAI Y J, LIAO X R, et al. Efficiency of laccase production in a 65-L air-lift reactor for potential green industrial and environmental application[J]. **Journal of Cleaner Production**, 2013, 39:154-160.
- [29] BIAN Dan, QIU Luhui, YANG Hailong. Effects of diverse metal ions and pH on laccase production of *Ganoderma lucidum*[J]. **Journal of Wenzhou University (Natural Sciences)**, 2015(2):58-62. (in Chinese)
- [30] CHEN Daidi, NIU Jiezheng, YU Xiaoyuan, et al. The factors affecting the expression and activity of laccase in fungi [J]. **Chinese Bulletin of Life Sciences**, 2013, 11:1053-1058. (in Chinese)
- [31] CHEN S X, SCHOPFER P. Hydroxyl-radical production in physiological reactions - a novel function of peroxidase[J]. **European Journal of Biochemistry**, 1999, 260(3):726-735.
- [32] BISHOP D F, STERN G, FLEISCHMAN M, et al. Hydrogen peroxide catalytic oxidation of refractory organics in municipal waste waters[J]. **Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development**, 1968, 7:110-117.

会 议 消 息

会议名称: 第五届生物化学与分子生物学国际研讨会(CABMB 2019)

会议时间: 2019-12-06 至 2019-12-08 会议地点: 海南 三亚

主办单位: Wuhan Irvine Culture & Communication Co. Ltd.

联系人: 张老师 电话: 15071343477 Email: subconf@126.com

官方网址: <http://www.deconf.org/conference/CABMB2019/>

会议简介: 第五届生物化学与分子生物学国际研讨会(CABMB 2019)将于2019年12月6-8日在三亚举行。本届大会将继续遵循学术性、国际性的原则, 特邀国内外生物化学与分子生物学领域内的学者专家前来参会, 并做精彩的报告。CABMB 研讨会是领域内享受盛名的国际学术研讨会之一, 大会旨在为行业内专家和学者分享技术进步和业务经验、聚焦生物化学与分子生物学领域的前沿研究提供一个交流的平台。