

施雅青, 郑耀通. 活性氧在黄孢原毛平革菌产木质素过氧化物酶中的调控机制[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(3): 514-520.  
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2016.03.005

## 活性氧在黄孢原毛平革菌产木质素过氧化物酶中的调控机制

施雅青, 郑耀通

(福建农林大学资源与环境学院, 福建 福州 350002)

**摘要:** 为了探究活性氧对黄孢原毛平革菌产木质素过氧化物酶的调控机制, 以黄孢原毛平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium*) 野生菌株 pc530 及突变菌株 pcR5305 为研究对象, 研究两菌株在富氮液体培养基及外加不同浓度活性氧供体条件下, 羟自由基 ( $\cdot\text{OH}$ ) 浓度与木质素过氧化物酶 (*LiP*) 活性的动态变化规律。结果表明, 两菌株均能产生较高浓度的  $\cdot\text{OH}$ , 且  $\cdot\text{OH}$  浓度与 *LiP* 活性变化趋势相一致, 但  $\cdot\text{OH}$  的绝对浓度与 *LiP* 的产生量并不相关; 不同浓度的  $\text{H}_2\text{O}_2$  均能提高两菌株 *LiP* 的产生量; 外加二甲亚砜 (DMSO) 和芬顿试剂 (Fenton) 均能对两供试菌株合成 *LiP* 及产生  $\cdot\text{OH}$  起作用。因此推测,  $\cdot\text{OH}$  不直接参与或影响两菌株合成 *LiP*, 更可能是作为一种信号分子在起作用。活性氧作为一种胁迫因子对两菌株的产酶具有极为重要的作用。

**关键词:** 活性氧; 黄孢原毛平革菌; 木质素过氧化物酶; 调控机制

**中图分类号:** X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)03-0514-07

## Regulation mechanism of reactive oxygen species in the lignin peroxidase production of *Phanerochaete chrysosporium*

SHI Ya-qing, ZHENG Yao-tong

(College of the Resource and Environment, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

**Abstract:** *Phanerochaete chrysosporium* wild type pc530 and mutant strain pcR5305 were cultured to study the dynamic changes of hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ ) concentration and lignin peroxidase (*LiP*) activities in nitrogen-rich liquid medium and in the medium added with various concentrations of reactive oxygen species (ROS) donor ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Both strains produced high concentrations of  $\cdot\text{OH}$ , and the change of  $\cdot\text{OH}$  concentration was similar to that of *LiP*. No correlation was found between the absolute concentration of  $\cdot\text{OH}$  and the *LiP* yield. The yield of *LiP* produced by the two strains was enhanced by  $\text{H}_2\text{O}_2$  despite of concentration. Additional DMSO and Fenton influenced *LiP* synthesis and  $\cdot\text{OH}$  production for both strains. The results suggest that  $\cdot\text{OH}$  is likely to act as a signalling molecule instead of being directly involved in the synthesis of the *LiP*, and active oxygen as a stress factor plays an important role in enzyme production by the two strains.

**Key words:** reactive oxygen species; *Phanerochaete chrysosporium*; lignin peroxidase; regulation mechanism

白腐真菌是一类具有引起木质白色腐烂功能的丝状真菌的总称, 以白腐真菌为代表的真菌技术体

系是生命科学与环境保护相结合的新兴学科<sup>[1]</sup>。白腐真菌能降解各种结构相异的化学物质, 它通过木质素过氧化物酶、锰过氧化物酶和漆酶等关键酶催化自由基链式反应, 有效降解各种异生物质<sup>[2]</sup>, 对环境中难降解的有机污染物具有高效、广谱的降解功能, 在环境治理方面显示出富有希望的应用前

收稿日期: 2015-12-14

作者简介: 施雅青 (1990-), 女, 福建晋江人, 硕士研究生, 研究方向为环境微生物学。 (E-mail) 471793212@qq.com

通讯作者: 郑耀通, (E-mail) zyt5188@aliyun.com

景<sup>[3]</sup>。在白腐真菌中,对黄孢原毛平革菌的研究最久、最多、最透<sup>[4]</sup>,它作为白腐真菌首选模式生物被广泛用于木质素生物降解研究中。

近年来,国内外对白腐真菌的研究主要体现在4个方面:一是白腐真菌产酶发酵条件的优化及提高产酶能力的措施<sup>[5-8]</sup>;二是利用白腐真菌处理有毒、难降解有机物及在生物制浆、造纸工业、漂白废水等方面的应用<sup>[9-12]</sup>;三是白腐真菌漆酶酶学特性的研究及其应用<sup>[13-17]</sup>;四是白腐真菌产木素酶的生理、代谢与调控机制研究。目前,前三方面的研究相对较多,而后一方面的研究十分有限。在白腐真菌木质素降解酶合成过程中,活性氧(ROS)不仅作为氧化胁迫因子,而且直接参与酶的合成,是木质素降解酶调控因子的主要组成部分,目前尚未见到该方面的研究报道。因此,研究活性氧在启动黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)的木质素降解过程中的作用及其机制具有非常重要的意义。另外,白腐菌野生菌株 pc530 需要在营养饥饿特别是氮浓度很低的条件下才能启动木质素降解酶的合成,而在富氮条件下,经紫外诱变的突变菌株 pcR5305 却能抗营养阻遏产酶<sup>[18]</sup>。为了弄清黄孢原毛平革菌启动木质素降解酶特别是诱变菌株能在富氮条件下合成木质素降解酶的机制,本研究以白腐真菌的模式种黄孢原毛平革菌野生菌株 pc530 及突变菌株 pcR5305 为研究对象,分析在富氮条件下,活性氧对黄孢原毛平革菌产木质素过氧化物酶(LiP)的影响及其与酶活性之间的动态关系,再通过添加外源活性氧供体、活性氧消除剂和活性氧生成剂等研究活性氧(ROS)对两菌株合成 LiP 的影响,弄清 ROS 在白腐真菌产酶过程中的调控作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 供试菌种 黄孢原毛平革菌野生菌株(*P. chrysosporium* 530, pc530)及其经紫外诱变所得的突变菌株(*P. chrysosporium* R5305, pcR5305)由福建农林大学应用微生物技术研究所提供。其中, pcR5305 生长较快且能在富氮条件下高效合成木质素过氧化物酶。

1.1.2 液体培养基 以 Kirk 液体限氮基本培养基<sup>[19]</sup>为基础改良的液体富氮基本培养基成分如下:葡萄糖 10.0 g/L, 酒石酸铵 2.2 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.0

g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g/L,  $\text{CaCl}_2$  0.1 g/L,  $\text{V}_{\text{B}_1}$  微量,微量元素溶液 70 ml, 0.2 mol/L 醋酸钠-醋酸缓冲液(pH=4.5) 50 ml。其中,微量元素溶液:甘氨酸 0.6 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  3.0 g/L,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.01 g/L,  $\text{NaCl}$  1.0 g/L,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g/L,  $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.1 g/L,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g/L,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.01 g/L,  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  0.01 g/L,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.01 g/L,  $\text{Na}_2\text{MnO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.01 g/L。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 富氮培养基下 pc530 及 pcR5305 产酶培养

将 pc530 及 pcR5305 菌块分别接种到装有 80 ml 富氮液体培养基的 500 ml 三角瓶中,每瓶培养液接种 8 个直径 6 mm 的菌块,设 3 个重复,分别置于 37 °C、80 r/min 振荡培养。在培养过程中,每隔 24 h 用微量进样器(5 000  $\mu\text{l}$ )吸取 3 ml 置于试管,经 10 000 r/min、4 °C 冷冻离心后测定其 LiP 活性和  $\cdot\text{OH}$  浓度。

#### 1.2.2 不同浓度外源活性氧供体( $\text{H}_2\text{O}_2$ )的添加对 pc530 及 pcR5305 的 LiP 活性和 $\cdot\text{OH}$ 产生量的影响

配制富氮液体培养基,再分别于第 3 d 添加 0.125 ml、0.250 ml 的 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,使其终浓度分别为 0.05%、0.10%,以不添加为空白对照,500 ml 三角瓶装液量为 80 ml,每瓶接种直径 6 mm 的菌块各 8 个,设 3 个重复,分别置于 37 °C、80 r/min 振荡培养,以 1 d 为测定周期,测定其 10 d 内两菌株 LiP 活性和  $\cdot\text{OH}$  浓度。

1.2.3 活性氧消除剂二甲亚砜(DMSO)与活性氧生成剂(芬顿试剂)的添加对 pc530 及 pcR5305 的 LiP 活性和  $\cdot\text{OH}$  产生量的影响 配制富氮液体培养基,再分别于第 3 d 添加 0.125 ml、0.250 ml 的 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,于第 5 d 添加 0.2 ml DMSO 溶液,于第 7 d 添加 0.3 ml 60 mg/L  $\text{H}_2\text{O}_2$  和 90 mg/L  $\text{FeSO}_4$  的混合液。以不添加为空白对照,500 ml 三角瓶装液量为 80 ml,每瓶接种直径 6 mm 的菌块各 8 个,设 3 个重复,分别置于 37 °C、80 r/min 振荡培养,以 1 d 为测定周期,测定其 10 d 内两菌株的 LiP 活性和  $\cdot\text{OH}$  浓度。

1.2.4 LiP 酶活性测定方法 以 LiP 在  $\text{H}_2\text{O}_2$  存在下氧化 Azure B 染料来表示 LiP 活性<sup>[20]</sup>。在 2.5 ml 反应体系中,含有酶液 0.5 ml 和 0.125 mol/L 酒石酸钠缓冲液(pH=3.0) 1.0 ml,随后向反应体系中添

加 0.5 ml 0.160 mmol/L 天青 B 溶液,在比色皿中振荡混匀后加入 7%  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液 0.5 ml 启动反应,在 651 nm 波长处测定反应最初 3 min 内  $OD$  值减小速率,1 个酶活性单位以 1 min 1 ml 培养基滤出液  $OD$  值降低 0.1 表示。

**1.2.5 羟自由基( $\cdot\text{OH}$ )浓度的测定** 采用改良的邻二氮菲法<sup>[21]</sup>。具体方法如下:10.0 ml 反应体系中依次加入 5 mmol/L 邻二氮菲溶液 1.5 ml、0.5 mmol/L PBS 缓冲液( $\text{pH}=7.4$ ) 3.0 ml、7.5 mmol/L  $\text{FeSO}_4$  溶液 1.0 ml,立即摇匀,再加入适当稀释的待测滤液样品 0.5 ml、0.10%  $\text{H}_2\text{O}_2$  1.0 ml,蒸馏水补足至 10.0 ml,迅速摇匀。反应物于 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴 1 h,随后测定其在 510 nm 波长处吸光值。再利用  $\text{H}_2\text{O}_2$  标准曲线计算羟自由基浓度。绘制标准曲线方法:配制一组浓度梯度分别为 3.3 mmol/L、6.6 mmol/L、13.2 mmol/L、26.4 mmol/L、52.8 mmol/L、105.6 mmol/L、211.2 mmol/L 的  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液,以  $\text{H}_2\text{O}_2$  代替待测样品,测定其在 510 nm 处的吸光值。以  $\text{H}_2\text{O}_2$  的吸光值为横坐标,以  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度为纵坐标,绘制标准曲线  $C=kA+b$ ,得到标准曲线的斜率  $k$  和截距  $b$ 。再将吸光值  $A$  代入标准曲线方程计算即可得到浓度  $C$ 。

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS 18.0 统计软件对试验数据进行方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 富氮培养基下两菌株 pc530 及 pcR5305 产 $\cdot\text{OH}$ 及 $\text{LiP}$ 活性的动态变化

为验证 pcR5305 是否解除富营养限制,弄清活性氧(ROS)在 pcR5305 和 pc530 合成  $\text{LiP}$  中的调控作用,比较了两菌株在富氮(NS)条件下产  $\text{LiP}$  的差异,分析两菌株产  $\text{LiP}$  与  $\cdot\text{OH}$  浓度间的关系。结果(图 1)显示,两菌株均能在富氮条件下产生  $\cdot\text{OH}$ ,且产生的动力学趋势相似,都具有前期上升随后下降的特点。抗营养阻遏产酶菌株 pcR5305 不仅产生  $\cdot\text{OH}$  的量显著高于野生菌株 pc530 ( $P<0.05$ ),而且其出现  $\cdot\text{OH}$  峰值时间也提前。具体表现为 pcR5305 在第 1 d  $\cdot\text{OH}$  浓度为 91 mmol/L,在第 6 d 达到峰值;野生菌株 pc530 在第 1 d  $\cdot\text{OH}$  的浓度仅为 73 mmol/L,在第 8 d 达到峰值。显然,pcR5305 和 pc530 在富氮条件下产生  $\cdot\text{OH}$  随时间的动态变

化存在显著差异,这可能由于两菌株产生  $\cdot\text{OH}$  的机理不同,说明 pcR5305 可能存在另一种机制能使其产生更多  $\cdot\text{OH}$ ,也可能是由于该机制与解除富营养限制有关。而从  $\cdot\text{OH}$  的浓度与  $\text{LiP}$  活性变化的关系看,较高浓度的  $\cdot\text{OH}$  大致对应于较高的  $\text{LiP}$  活性,从而说明  $\cdot\text{OH}$  的产生与两菌株合成  $\text{LiP}$  相关。但  $\cdot\text{OH}$  的绝对浓度并不直接对应于  $\text{LiP}$  的产生量,具体表现为不管是 pcR5305 还是 pc530,其合成  $\text{LiP}$  的量峰值出现时间总是迟于  $\cdot\text{OH}$  浓度峰值的出现,说明  $\cdot\text{OH}$  可能不直接参与两菌株合成  $\text{LiP}$ , $\cdot\text{OH}$  更可能作为一种信号分子在起作用。

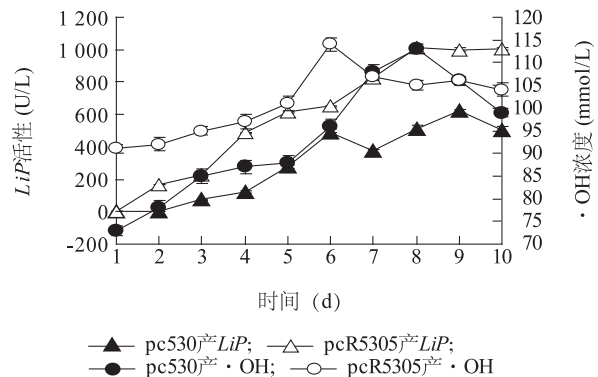


图 1 黄孢原毛平革菌富氮条件下产  $\cdot\text{OH}$  与  $\text{LiP}$  的动态变化

Fig.1 The dynamic changes of  $\text{LiP}$  and  $\cdot\text{OH}$  levels produced by *Phanerochaete chrysosporium* under nitrogen-rich condition over time

### 2.2 添加外源活性氧对 pc530 及 pcR5305 产 $\text{LiP}$ 的影响

为进一步验证活性氧在黄孢原毛平革菌合成  $\text{LiP}$  中的调控作用,于第 3 d 在培养基中加入外源活性氧供体  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,分别使其终浓度达到 0.05% 和 0.10%,再动态监测  $\text{LiP}$  活性和  $\cdot\text{OH}$  浓度。结果(图 2~图 5)显示,不同浓度的  $\text{H}_2\text{O}_2$  均能提高两菌株的  $\text{LiP}$  产量,且  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度越高,促进作用越明显,说明外源活性氧对菌株合成  $\text{LiP}$  具有正方向的调控作用,两菌株合成  $\text{LiP}$  受外源活性氧浓度的影响。但  $\text{H}_2\text{O}_2$  对 pcR5305 产酶量的促进作用不如 pc530,特别是当  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度为 0.10% 时,这可能由于 pcR5305 所产生的  $\cdot\text{OH}$  浓度超过自身细胞维持平衡的活性氧浓度,进而对  $\text{LiP}$  的合成产生了一定的抑制作用。说明当两菌株面对氧化胁迫时,其自身的抗氧化系统起到了有效的防御作用,氧化胁迫对

两菌株的产酶有极为重要的调控作用。而从 $\cdot\text{OH}$ 浓度的动态变化与 $\text{LiP}$ 活性变化趋势的关系看,较高浓度的 $\cdot\text{OH}$ 对应较高的 $\text{LiP}$ 活性,而且其合成 $\text{LiP}$ 的量峰值出现时间总是迟于 $\cdot\text{OH}$ 浓度峰值的出现,说明 $\cdot\text{OH}$ 与黄孢原毛平革菌合成 $\text{LiP}$ 相关,这也进一步说明较高浓度的活性氧有利于提高 $\text{LiP}$ 的活性。结果还显示,当 $\text{H}_2\text{O}_2$ 浓度达到0.10%时, $\cdot\text{OH}$ 的浓度变化趋势接近于浓度为0.05%时,说明两菌株面对氧化胁迫时,其自身的抗氧化系统起到了有效的防御作用。

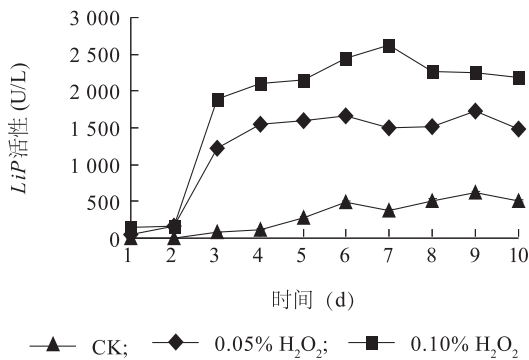


图2 外源活性氧供体 $\text{H}_2\text{O}_2$ 对pc530合成 $\text{LiP}$ 的影响  
Fig.2 Effect of exogenous active oxygen donor ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) on  $\text{LiP}$  produced by pc530 over time

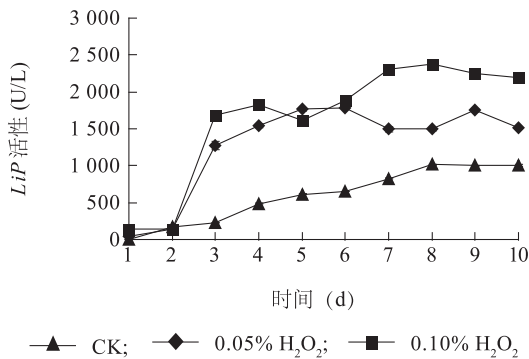


图3 外源活性氧供体 $\text{H}_2\text{O}_2$ 对pcR5305合成 $\text{LiP}$ 的影响  
Fig.3 Effect of exogenous active oxygen donor ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) on  $\text{LiP}$  produced by pcR5305 over time

### 2.3 DMSO 和 Fenton 的添加对 pc530 及 pcR5305 的 $\text{LiP}$ 活性和 $\cdot\text{OH}$ 产生量的影响

由图6~图9可见,第5 d时,在外加0.05%或0.10% $\text{H}_2\text{O}_2$ 的培养基中,pcR5305和pc530产 $\cdot\text{OH}$ 量和 $\text{LiP}$ 活性均显著下降( $P<0.05$ )。但在外加

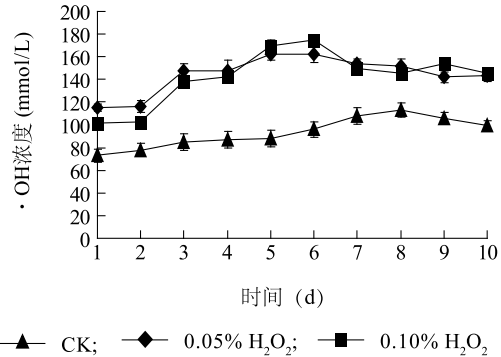


图4 外源活性氧供体 $\text{H}_2\text{O}_2$ 对pc530产 $\cdot\text{OH}$ 的影响

Fig.4 Effect of exogenous active oxygen donor ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) on  $\cdot\text{OH}$  concentration produced by pc530 over time

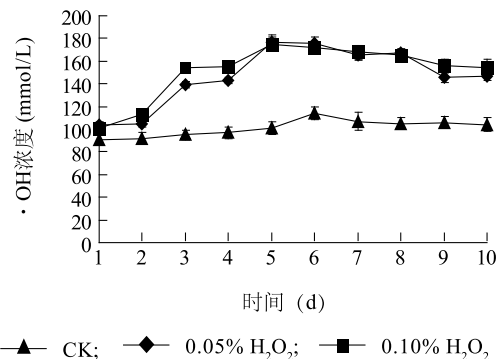


图5 外源活性氧供体 $\text{H}_2\text{O}_2$ 对pcR5305产 $\cdot\text{OH}$ 的影响

Fig.5 Effect of exogenous active oxygen donor ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) on  $\cdot\text{OH}$  concentration produced by pcR5305 over time

0.05% $\text{H}_2\text{O}_2$ 的培养基中,pc530的 $\text{LiP}$ 合成量下降幅度远大于 $\cdot\text{OH}$ 产生量的下降幅度,而pcR5305二者的下降幅度几乎持平;在外加0.10% $\text{H}_2\text{O}_2$ 的培养基中,pcR5305和pc530产 $\cdot\text{OH}$ 量和 $\text{LiP}$ 合成量的抑制程度更明显。这些结果均说明 $\cdot\text{OH}$ 产生量与 $\text{LiP}$ 合成量相关, $\cdot\text{OH}$ 在pcR5305和pc530合成 $\text{LiP}$ 中起重要的调控作用。加入DMSO后,两菌株所产生的 $\cdot\text{OH}$ 并未被完全消除,且 $\cdot\text{OH}$ 浓度的维持与 $\text{H}_2\text{O}_2$ 浓度有关。第7 d加入Fenton后,两菌株 $\text{LiP}$ 合成量和 $\cdot\text{OH}$ 浓度均显著回升( $P<0.05$ ),说明菌株合成 $\text{LiP}$ 的变化趋势与 $\cdot\text{OH}$ 的生成呈正相关,证明 $\cdot\text{OH}$ 是黄孢原毛平革菌合成 $\text{LiP}$ 的正调控因子。

## 3 讨论

有研究表明,白腐真菌的木质素降解过程



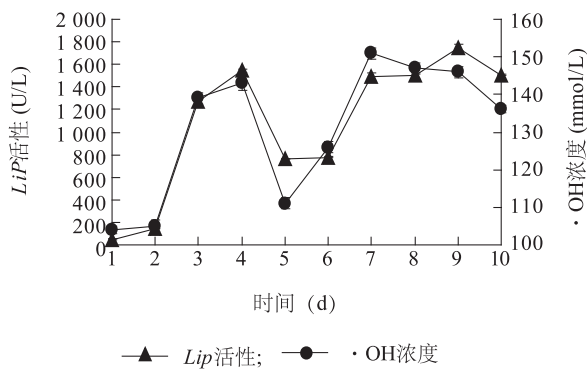


图 6 在外加 0.05% $\text{H}_2\text{O}_2$  条件下 DMSO 和 Fenton 对 pcR5305 合成的 *LiP* 酶活性与  $\cdot\text{OH}$  浓度关系的影响

Fig.6 Effect of DMSO and Fenton on the *LiP* production and  $\cdot\text{OH}$  levels of pcR5305 added with 0.05%  $\text{H}_2\text{O}_2$

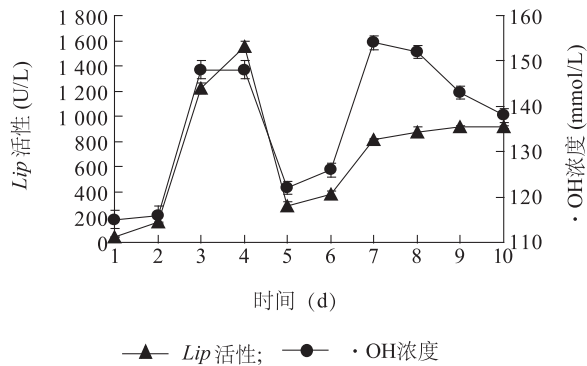


图 7 在外加 0.05% $\text{H}_2\text{O}_2$  条件下 DMSO 和 Fenton 对 pc530 合成的 *LiP* 酶活性与  $\cdot\text{OH}$  浓度关系的影响

Fig.7 Effect of DMSO and Fenton on the *LiP* production and  $\cdot\text{OH}$  levels of pc530 added with 0.05%  $\text{H}_2\text{O}_2$

与活性氧之间有很大的相关性,活性氧是胞外木质素降解系统中的重要成分<sup>[22-23]</sup>,是木质素降解的启动因子<sup>[24-25]</sup>。在正常情况下细胞自身活性氧的产生和清除代谢是平衡的,但当活性氧的水平超过细胞的抗氧化能力时,对细胞产生氧化胁迫<sup>[26]</sup>。活性氧作为一种氧化胁迫因子,同时又参与白腐真菌对木质素的降解。木质素降解酶的产生是白腐真菌对氧化胁迫的应激反应,活性氧在一定程度上能引起木质素降解酶活性的增加。本试验中, $\text{H}_2\text{O}_2$ 对黄孢原毛平革菌合成 *LiP* 具有显著促进作用,且在一定范围内, $\text{H}_2\text{O}_2$ 浓度越高,菌株 *LiP* 的合成量越大,说明 *LiP* 活性的增加是为适应外源氧化胁迫而形成的一种策略,并且活性氧极有可能直接或间接地参与

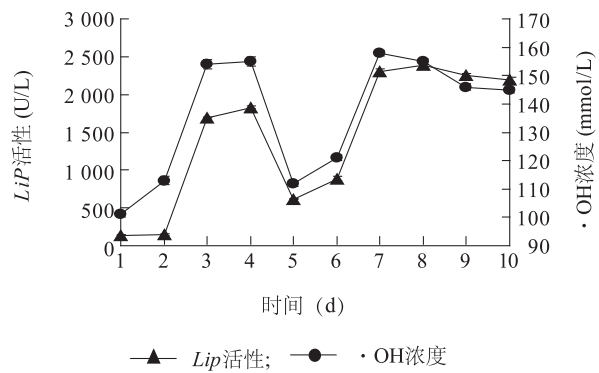


图 8 在外加 0.10% $\text{H}_2\text{O}_2$  条件下 DMSO 和 Fenton 对 pcR5305 合成的 *LiP* 酶活性与  $\cdot\text{OH}$  浓度关系的影响

Fig.8 Effect of DMSO and Fenton on the relationship between *LiP* production and  $\cdot\text{OH}$  levels of pcR5305 added with 0.10%  $\text{H}_2\text{O}_2$

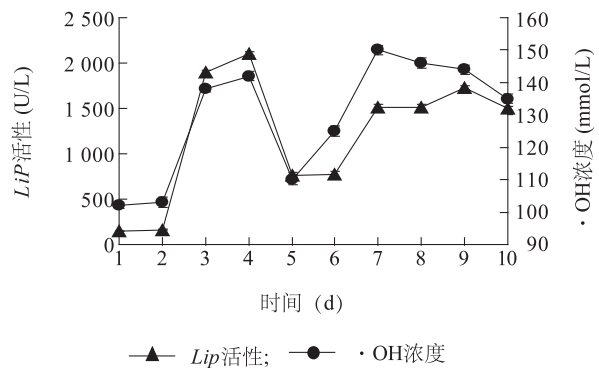


图 9 在外加 0.10% $\text{H}_2\text{O}_2$  条件下,DMSO 和 Fenton 对 pc530 合成的 *LiP* 酶活性与  $\cdot\text{OH}$  浓度的关系

Fig.9 Effect of DMSO and Fenton on the relationship between *LiP* production and  $\cdot\text{OH}$  levels of pc530 added with 0.10%  $\text{H}_2\text{O}_2$

了菌株的 *LiP* 合成。

早期对 *P. chrysosporium* 的研究结果表明,木质素降解酶产生于真菌的次生代谢期间,主要在限碳、限氮条件下产生基因转录或酶活性<sup>[27-29]</sup>。我们的研究也证实,在富营养条件下,突变菌株 pcR5305 产  $\cdot\text{OH}$  的量远高于野生菌株 ( $P < 0.05$ ),峰值也相应提前,说明了突变菌株产生  $\cdot\text{OH}$  的机制与野生菌株不同,可能是由于高氮培养导致碳迅速耗竭所致,也可能存在另外一种机制在起调控作用。另外,有研究表明,不同的 *LiP* 同工酶间具有底物和动力学差异<sup>[30]</sup>,基因调控的结果也表明不同的基因响应不同的环境信号。可以认为,具有广泛底物的木质

素降解酶,在不同的底物诱导下,主要的应答基因以及产生的优势同工酶是不同的。Zacchi 等<sup>[31]</sup>利用透射电镜观察,发现在以纤维素为碳源的培养条件下菌丝因氧毒性导致超微结构破坏,可见胞质凝结,线粒体虽能维持其结构,但功能严重受损,因而菌丝只能通过无氧代谢维持能量平衡,对 O<sub>2</sub> 的摄取量大大降低。若向这些菌丝通入纯氧,则易造成菌丝细胞内活性氧自由基累积。据此, *LiP* 可能是响应活性氧累积的应激蛋白。对其他菌种的研究结果也提示,氧化胁迫可能是诱导 *LiP* 产生的机制之一<sup>[32]</sup>。

本试验结果还表明,白腐真菌中的抗氧化酶系统能够使菌体受到的活性氧胁迫保持在较低水平,使细胞不受到进一步的氧化伤害。在本试验中, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对 pcR5305 产酶量的促进作用不如对 pc530 的促进作用,特别是当 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度为 0.10% 时,这可能由于 pcR5305 所产生的 ·OH 浓度超过自身细胞维持平衡的活性氧浓度,其自身的抗氧化系统起到了有效的防御作用,使 ROS 对细胞的伤害水平下降。另外,在第 7 d 加入 ROS 生成剂 Fenton 后,尽管 ·OH 浓度开始有不同程度的提高,但随后的几天并没有持续上升,而是缓慢下降或趋于稳定。

综上所述,外源活性氧可以有效地调节黄孢原毛平革菌木质素过氧化物酶的活性,使木质素降解酶的活性增加;菌株的抗氧化系统能够充分阻止外源氧化胁迫,使细胞免受进一步伤害。因此,外源活性氧可以作为一种有效的氧化胁迫剂,通过提高木质素降解酶活性,提高白腐真菌对环境污染物的降解。

#### 参考文献:

- [1] 李慧蓉. 白腐真菌生物学和生物技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 5-6.
- [2] MIKI K, KONDO R, RENGANATHAN V, et al. Mechanism of aromatic ring cleavage of a biphenyl ether dimmer catalyzed by lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Biochemistry, 1988, 27(13): 4787-4794.
- [3] 张克强, 高怀友. 畜禽养殖业污染物处理与处置[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 3-5.
- [4] 冯晓静, 谢益民, 洪卫. 白腐菌木质素降解酶的作用机理及其在中段废水处理的应用[J]. 湖南造纸, 2008(1): 21-23.
- [5] WANG P, HU X, COOK S, et al. Effect of culture conditions on the production of ligninolytic enzymes by white rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* (ATCC 20696) and separation of its lignin peroxidase [J]. World Journal Microbiology and Biotechnology, 2008, 24(10): 2205-2212.
- [6] ZHANG K, XU Y, HUA X, et al. An intensified degradation of phenanthrene with macroporous alginate-lignin beads immobilized *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Biochemical Engineering Journal, 2008, 41(3): 251-257.
- [7] LU Y, YAN L, WANG Y, et al. Biodegradation of phenolic compounds from coking wastewater by immobilized white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Journal of Hazardous Materials, 2008, 165(1-3): 1091-1097.
- [8] MOHAMMADI A, ENAYATZADEH M, NASERNEJAD B. Enzymatic degradation of anthracene by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* immobilized on sugarcane bagasse [J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 161(1): 534-537.
- [9] DING J, CONG J, ZHOU J, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation and extracellular enzyme secretion in agitated and stationary cultures of *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Journal of Environmental Sciences, 2008, 20(1): 88-93.
- [10] ZENG G, YU M, CHEN Y, et al. Effects of inoculation with *Phanerochaete chrysosporium* at various time points on enzyme activities during agricultural waste composting [J]. Bioresource Technology, 2009, 101(1): 222-227.
- [11] WEN X, JIA X, LI J. Enzymatic degradation of tetracycline and oxytetracycline by crude manganese peroxidase prepared from *P. chrysosporium* [J]. Journal of Hazardous Material, 2010, 177(1-3): 924-928.
- [12] ZENG J, SINGH D, CHEN S. Biological pretreatment of wheat straw by *Phanerochaete chrysosporium* supplemented with inorganic salt [J]. Bioresource Technology, 2011, 102(3): 3206-3214.
- [13] 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.
- [14] 赵美丽, 边风根, 曹秀云. 白腐真菌漆酶对染料降解的研究 [J]. 中国化工贸易, 2014, 6(19): 79-81.
- [15] 杨雪梅, 刘彦中, 刘志莲, 等. 产漆酶菌株的筛选及其对烟秆降解效果的研究 [J]. 中国农学通报, 2014, 30(7): 52-57.
- [16] 卢庆华, 刑孟兰, 王蕾, 等. 青霉菌产漆酶条件及酶学性质的研究 [J]. 科学技术与工程, 2014, 14(4): 170-173.
- [17] 刘友勋, 黄娟, 闫明阳, 等. 活性电泳切胶法分离白腐菌 (*Trametes* sp. B1) 2 种漆酶同工酶及其性质研究 [J]. 江苏农业科学, 2015, 43(9): 54-57.
- [18] 邱爱连, 李文燕, 郑耀通, 等. 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 [J]. 微生物学报, 2011, 51(3): 352-359.
- [19] TIEN M, MYER S B. Selection and characterization of mutants of *Phanerochaete chrysosporium* exhibiting ligninolytic activity under nutrient-rich conditions [J]. Applied Environment Microbiology, 1990, 56: 2540-2544.
- [20] FREDERICK S A. A new assay for lignin-type peroxidase employing the dye azure B [J]. Applied Environmental Microbiology, 1992, 58(9): 3110-3116.
- [21] 金鸣, 蔡亚欣, 李金荣, 等. 邻二氮菲-Fe<sup>2+</sup> 氧化法检测

- $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ 产生的羟自由基[J]. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23(6): 553-555.
- [22] HAMMEL K E, KAPICH A N, JENSEN K A, et al. Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 30(4): 445-453.
- [23] GUILLEN F, MUNOZ C, GOMEZ-TORIBO V, et al. Oxygen activation during oxidation of metoxyhydroquinones by laccase from *Pleurotus eryngii*[J]. Applied Environment Microbiology, 2000, 66: 170-175.
- [24] KEYSER P, KIRK T K, ZEIKUS J G. Ligninolytic enzyme system of *Phanerochaete chrysosporium*: synthesized in the absence of lignin in response to nitrogen starvation [J]. Journal of Bacteriology, 1978, 135: 790-797.
- [25] KIRK T K, CROAN S, TIEN M. Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*: effect of selected growth conditions and use of a mutant strain[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1986, 8: 27-32.
- [26] NEILL S J. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine[J]. Analytical Biochemistry, 1980, 106(1): 207-212.
- [27] REDDY C A, TREVOR M D S. Physiology and molecular biology of the lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* [J]. FEMS Microbiology Reviews, 1994, 13: 137-152.
- [28] GETTEMY J M, MA B, ALIC M, et al. Reverse transcription-PCR analysis of the regulation of the manganese peroxidase gene family[J]. Applied Environmental Microbiology, 1998, 64(2): 569-574.
- [29] FENG H, ZHANG Y Z. Transcriptional responsiveness of lignin peroxidase genes to nutrition in *Phanerochaete chrysosporium*[J]. Journal of Sichuan University, 2000, 37: 153-160.
- [30] GLUMOFF T, HARVEY P J, MOLINARI S, et al. Lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*: molecular and kinetic characterization of isozymes [J]. European Journal of Biochemistry, 1990, 187: 515-520.
- [31] ZACCHI L, PALMER J M, HARVEY P J. Respiratory pathways and oxygen toxicity in *Phanerochaete chrysosporium*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2000, 183(1): 153-157.
- [32] DUENAS R F J, GUILLEN F, CAMARERO S, et al. Regulation of peroxidase transcript levels in liquid cultures of the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*[J]. Applied Environmental Microbiology, 1999, 65(10): 4458-4463.

(责任编辑:张震林)