

嘉南藥理科技大學 98 年度教師專題研究計畫成果報告

一、基本資料

計畫類型	<input type="checkbox"/> 重點研究 <input checked="" type="checkbox"/> 一般個人型研究				
計畫主持人	劉坤湘	單位	生物科技系	職級	助理教授
計畫名稱	熱逆境誘導樟芝漆氧化酶基因表現及其啟動子之分析				
執行期限	民國 98 年 1 月 1 日起至民國 98 年 12 月 31 日止				
※計畫編號：	CN9831				



中華民國 99 年 2 月 26 日

研究計畫內容

(一) 摘要

自然界存量最多的大分子物質為纖維素、半纖維素、木質素，以結構複雜的木質素最難以分解。目前已知白腐型真菌中主要分佈著具有分解木質素之功能的酵素，分別為漆氧化酶 (laccases)、含錳過氧化酶 (manganese-dependent peroxidases) 及木質素過氧化酶 (lignin peroxidases)。而樟芝雖屬於褐腐型真菌的一種，但於先前實驗中發現經光誘導後可偵測出漆氧化酶的活性，外觀上也會由紅褐色菌絲轉為白色菌絲。同時藉由以白腐型真菌的漆氧化酶基因之保守性序列設計對漆氧化酶具有專一性的引子對，已成功分離出樟芝漆氧化酶基因之cDNA全長 (相關報告成果已建檔於「嘉南藥理科技大學機構典藏」)。根據先前實驗結果，本計畫模擬樟芝於自然環境生長時，除受光照因素外，亦有可能因光照而造成菌體溫度上升而引起熱逆境之環境，繼續探討誘導樟芝產生漆氧化酶基因表現與蛋白質活性的機制。結果發現固態培養之樟芝菌絲體於42°C熱逆境處理24小時後可誘導產生漆氧化酶活性、液態培養之樟芝菌絲體經42°C熱逆境處理一天及三天，漆氧化酶活性亦明顯增加；檢測漆氧化酶基因表現情形，顯示液態培養之樟芝菌絲體經42°C熱逆境處理一至七天，基因表現情形持續增加。未來希望確認誘導條件，以期能夠對於漆氧化酶的純化與利用，有更進一步的發展。

(二) 結果與討論

1. 熱逆境誘導固態培養之樟芝菌絲體產生漆氧化酶活性

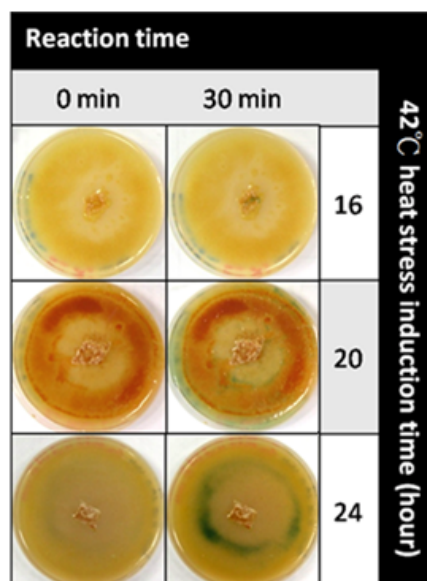


圖 1. 樟芝菌株 BCRC35398 經 42°C 熱逆境處理 16~24 小時後，以 ABTS 初步進行酵素活性測試之檢測結果。

如圖 1 所示，加入 ABTS 做為漆氧化酶作用基質，藍色呈色顯示菌絲具有漆氧化酶活性。檢測方式於剛加入 ABTS (0 分鐘) 與加入 ABTS 反應 30 分鐘後觀察，結果顯示熱逆境誘導 24 小時可測得漆氧化酶活性。

2. 熱逆境誘導液態培養之樟芝菌絲產生漆氧化酶活性

液態培養菌絲體於培養七天後，經 42°C 熱逆境處理三天內，漆氧化酶活性明顯增加；熱逆境處理七天後，有可能因為逆境處理時間過久，菌絲體本身生長狀況已然不佳，故漆氧化酶活性隨之下降。

3. 熱逆境誘導液態培養之樟芝菌絲體中漆氧化酶基因表現情形

液態培養菌絲體於正常培養七天後，若繼續培養之，漆氧化酶基因 (*tclac*) 表現幾乎無變化；若更換為新鮮培養基以正常狀態繼續培養，三天後 *tclac* 表現略為增加、但隨後便下降。若更換為新鮮培養基並以 42°C 熱逆境處理之，*tclac* 表現則有持續增加的狀況。

4. 漆氧化酶胺基酸序列比對

以樟芝漆氧化酶基因 cDNA 序列轉換胺基酸序列，與相近物種漆氧化酶胺基酸序列比對，結果顯示樟芝漆氧化酶胺基酸序列與相近物種之相似度高；且同樣具有四個高度保守的銅離子結合區域 (copper binding regions, cbr)，符合真菌漆氧化酶胺基酸序列的特徵。

5. 未來展望

目前初步結果顯示，樟芝固態與液態培養之菌絲體均可經熱逆境誘導產生漆氧化酶活性，而於液態培養之菌絲體亦顯示熱逆境誘導漆氧化酶基因表現增加。與相近物種之其他真菌類漆氧化酶胺基酸序列比對，亦均具有高度保守特徵。此計畫未來可朝以下方向進行：(1) 確認誘導條件；(2) 分離並選殖出漆氧化酶基因完整啟動子，可對基因調控機制有所了解，以期未來能夠對於漆氧化酶的誘導、純化與利用，有更進一步的發展。

(三) 參考文獻

Galhaup, C., Goller, S., Peterbauer, C.K., Strauss, J., and Haltrich, D. (2002) Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. *Microbiology* 148: 2159-2169.

Hoegger, P.J., Navarro-Gonzalez, M., Kilaru, S., Hoffmann, M., Westbrook, E.D., and Kues, U. (2004) The laccase gene family in *Coprinopsis cinerea* (*Coprinus cinereus*). *Curr. Genet.* 45: 9-18.

Kumar, S.V., Phale, P.S., Durani, S., and Wangikar, P.P. (2003) Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. *Biotechnol. Bioeng.* 83: 386-94

Leonowicz, A., Cho, N.S., Luterek, J., Wilkolazka, A., Wojtas-Wasilewska, M., Matuszewska, A., Hofrichter, M., Wesenberg, D., and Rogalski, J. (2001) Fungal laccases: properties and activity on lignin. *J. Basic Microbiol.* 41: 185-227.

Palmieri G., Bianco, C., Cennamo, G., Giardina, P., Marino, G., Monti, M., and Sannia, G. (2001) Purification, characterization, and functional role of a novel extracellular protease from *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2754-2759.

Yaver, D.S, Xu, F., Golightly, E.J., Brown, K.M., Brown, S.H., Rey, M.W., Schneider, P., Halkier, T., Mondorf, K., and Dalboge, H. (1996) Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 834-841.

Zang, M. and Su, C.H. (1990) *Ganoderma comphoratum*, a new taxon in genus *Ganoderma* from Taiwan, China. *Acta. Bot. Yunnanica* 12: 395-396.