

Instytut Mikrobiologii i Biochemii UMCS
Zakład Biochemii

Andrzej LEONOWICZ

**Fenole jako induktory niektórych oksydaz u *Basidiomycetes*.
Część II. Elektroforeza na żelu poliakrylamidowym rozpuszczalnych białek
i lakazy z mycelium grzyba *Coriolus versicolor* ***

Фенолы как индукторы некоторых оксидаз у *Basidiomycetes*. Часть II. Электрофорез
на полиакриламидовом геле растворимых белков и лаказы мицелия гриба
Coriolus versicolor

Phenols as Inductors of some *Basidiomycetes* Oxidases. Part II. Electrophoresis
on Polycrylamide Gel of Soluble Protein and Laccase from the Mycelium
of *Coriolus versicolor*

Lakaza często występuje w kulturach grzybów z grupy *Basidiomycetes*, rozkładających drewno (1, 3, 5, 7, 13). W warunkach laboratoryjnych aktywność tego enzymu wyraźnie wzrasta po dodaniu do środowiska ligniny bądź jej fenolowych podjednostek (3, 14). W poprzedniej pracy wykazano, że najaktywniejszym induktorem lakazy u *Coriolus versicolor* był kwas ferulowy (4). Przy użyciu radioaktywnych prekursorów stwierdzono, że podwyższenie aktywności lakazy na skutek oddziaływania kwasu ferulowego na mycelium *Coriolus versicolor* poprzedzone było wzmożoną syntezą mRNA. To następstwo czasowe występowania mRNA i lakazy wskazywałoby na biosyntezę lakazy *de novo*, a nie na przykład na aktywację istniejącego już proenzymu.

Celem niniejszej pracy było prześledzenie przy pomocy elektroforezy na żelu poliakrylamidowym zmian zachodzących w składzie białek rozpuszczalnych i lakazy u *Coriolus versicolor* podczas dwugodzinnej inkubacji z kwasem ferulowym. Z poprzedniej pracy wynika, że w tym czasie około 2-krotnie (w porównaniu z kontrolą) wzrasta aktywność lakazy i kilkakrotnie zawartość mRNA (4). Niniejsza praca ma wyjaśnić, czy podczas inkubacji wzrasta aktywność tylko jednej frakcji lakazy, czy może pojawiają się nowe frakcje tego enzymu, podobnie jak to się dzieje w przypadku peroksydazy u grzyba *Inonotus radiatus* (9,10).

MATERIAŁ I METODY

SZCZEP GRZYBOWY I ODCZYNNIKI

Czystą kulturę grzyba *Coriolus versicolor* (L. ex. Fr) Quel nr 188 uzyskano z Muzeum Grzybowego w Paryżu. Szczep przechowywano na skosach

* Praca wykonana w ramach problemu węzłowego 09.3.1. Autor wyraża wdzięczność Prof. Dr Jerzemu Trojanowskiemu za cenne uwagi dotyczące niniejszej pracy.

śliwkowo-agarowych (6). Źródła odczynników do elektroforezy i kwasu ferulowego podano uprzednio (4). Błękit Coomasie B. B. uzyskano z firmy Colab. Laboratories USA, ^{14}C -kwas asparaginowy (120 mCi/mM) otrzymano z Instytutu Radioizotopów w Pradze, $^{64}\text{CuCl}_2$ (8,9 mCi/mg Cu) z Ośrodka Produkcji i Dystrybucji Izotopów w Świerku.

HODOWLA GRZYBA

Hodowlę grzyba wglębną, napowietrzaną, w temp. 27° prowadzono w sposób już opisany (4). Po 4 dniach hodowli mycelium sterylnie sączono, przemywano świeżo przygotowaną, sterylną pożywką „a” (14) — zależnie od wariantu doświadczenia — pozbawioną Cu lub zubożoną o 50% w asparaginę; przenoszono w 100 g porcjach do 50 ml kolb płaskodennych, dodawano 100 ml zmodyfikowanej pożywki „a” i w zależności od wariantu doświadczenia — 1 mg aktidionu (cykloheksimidu), 100 μCi ^{14}C -kwasu asparaginowego lub 1 mCi ^{64}Cu . Kultury po wymieszaniu dopełniano do 247,5 ml zubożoną w Cu lub asparaginę pożywką „a” i preinkubowano z napowietrzaniem (ok. 100 ml sterylnego powietrza na 1 min. na kolbę) w ciągu godziny w temp. 27° . Po preinkubacji do części kolb dodawano po 2,5 ml 2×10^{-2} M kwasu ferulowego w pożywce „a” do końcowego stężenia w kolbie 4×10^{-4} M. Kolby kontrolne uzupełniano 2,5 ml zubożonej pożywki „a” i napowietrzano w warunkach identycznych w czasie 2 godz.

IZOLOWANIE ROZPUSZCZALNEGO BIAŁKA Z GRZYBNI

Po inkubacji kultury schładzano w lodzie, grzybnię odsączano z pożywki i przemywano 3-krotnie mieszaniną imidazolu i histydyny (0,01 M imidazol, 0,01 M histydyna, HCl do pH 7,2), po odsączeniu grzybnię homogenizowano w homogenizatorze ostrzowym, wirowano w chłodzie 10 min. $20\,000 \times g$ i powoli wysalano (do 100% nasycenia) siarczanem amonu. Po wysoleniu i 2-godzinnej inkubacji w siarczanie amonu w temp. 0° białko wirowano (19 min. przy $20\,000 \times g$), rozpuszczano w 3 ml 10-krotnie rozcieńczonej mieszaniny imidazolu i histydyny, a następnie dializowano 3-krotnie do 1000-krotnej objętości tej samej mieszaniny w odstępach 40-minutowych. Tak otrzymany preparat białka grzybowego poddawano elektroforezie.

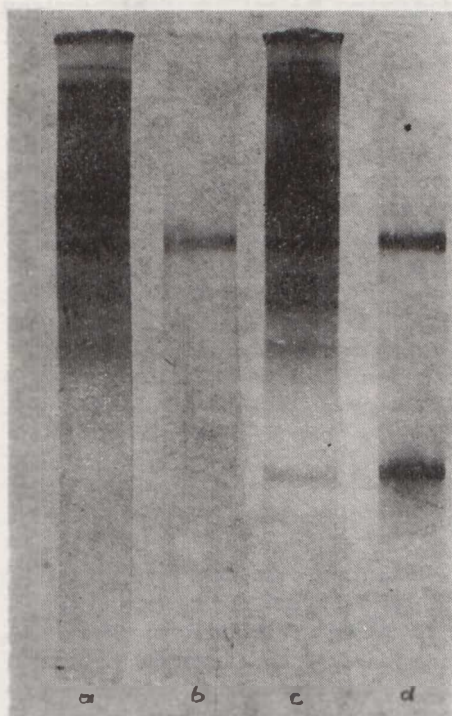
ELEKTROFOREZA

Osiem kolumn do elektroforezy o wymiarach $7 \times 0,5$ cm przygotowywano na drodze polimeryzacji w rurkach szklanych mieszaniny zawierającej 900 mg akrylamidu, 45 mg bisakrylamidu, 30 mg nadsiarczanu amonu, 0,05 ml 10% etanolowego roztworu TEMED i bufor Tris-boran (0,05 M Tris i H_2BO_3 do pH 8,45) do ogólnej objętości 15 ml. Rurki o długości 9 cm z kolumnami poliakryloamidowymi umieszczano w naczyniu do elektroforezy, wypełnionym w obu przestrzeniach elektrodowych wyżej wymienionym buforem Tris-boran. Na kolumny nanoszono po ok. 200 μg białka grzybowego po dializie, rozpuszczonego w ok. 100 μl 15% sacharozy. Jako wskaźnik migrujący podczas elektroforezy na czole frakcji białkowej stosowano fluoresceinę (5 μl na 1 kolumnę 0,1% fluoresceiny rozpuszczonej w buforze Tris-boran). Elektroforezę przy natężeniach prądu 2,5 mA na kolumnę prowadzono do momentu osiągnięcia przez prążek wskaźnika odległości 2 mm od końca kolumny.

IDENTYFIKACJA FRAKCJI

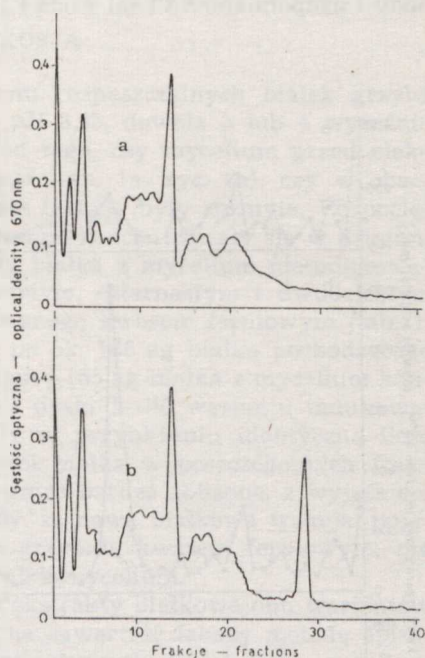
Frakcje białkowe na kolumnach identyfikowano przez wybarwienie forogramów za pomocą błękitu Coomassie, białko po ekstrakcji z żelu kwasem mrówkowym oznaczano metodą Lowry (8). Lakazę na żelach identyfikowano za pomocą barwnej reakcji z p-fenyleneodwuaminą oraz przez pocięcie kolumny na dyski (frakcje) i oznaczenie w nich radioaktywności pochodzącej z ^{64}Cu i ^{14}C -kwasu asparaginowego.

Wybarwianie żeli błękitem Coomassie. Kolumny inkubowano przez godzinę z 0,15% roztworem Coomassie BB w mieszaninie zawierającej metanol, kwas octowy, glicerol i wodę w stosunku 16:2:1:23, następnie wmywano mieszaniną metanolu, kwasu octowego, glicerolu i wody w stosunku



Ryc. 1. Elektroforeza na żelu poliakrylamidowym rozpuszczalnych białek mycelium *Cortolus versicolor* z kultur inkubowanych bez kwasu ferulowego (a i b) oraz w obecności kwasu ferulowego (c i d); wywoływacz: błękit Coomassie (a i c), parafenyleneodwuamina (b i d)

Electrophoresis on polyacrylamide gel of soluble proteins of the *Cortolus versicolor* mycelium from cultures incubated without ferulic acid (a and b) and in the presence of ferulic acid (c and d); reagent: Coomassie blue (a and c), paraphenylenediamine (c and d)

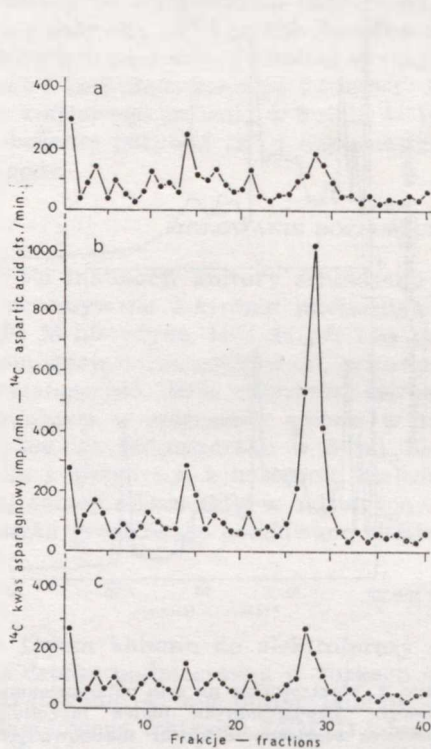


Ryc. 2. Elektroforeza na żelu poliakrylamidowym rozpuszczalnych białek mycelium *Cortolus versicolor* z kultur inkubowanych bez kwasu ferulowego (a) i z kwasem ferulowym (b); wywoływacz: błękit Coomassie
Electrophoresis on polyacrylamide gel of soluble proteins of the *Cortolus versicolor* mycelium from cultures incubated without ferulic acid (a) and with ferulic acid (b); reagent: Coomassie blue

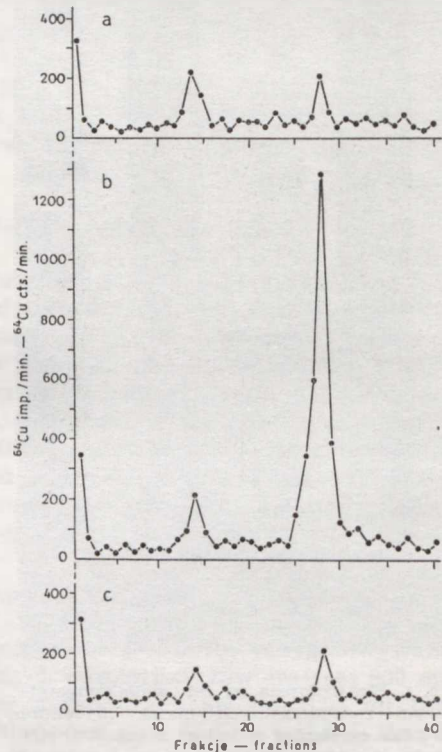
8:2:1:29. Wybarwione żele fotografowano i densymetrowano przy użyciu filtru 670 nm. Wyniki ilustrują ryc. 1 i 2.

Oznaczanie ^{14}C . Wybarwione błękitem Coomassie żele cięto gilotynką wykonaną z zyletek zamocowanych w ramce na 40 dysków. Dyski umieszczano każdy osobno w naczyniu scyntylacyjnym, dodawano 0,5 ml 90% kwasu mrówkowego, inkubowano 12 godz. w temp. pokojowej, następnie odparowywano w temp. 60° , dodawano 5 ml scyntylatora toluenowego (7) i oznaczano radioaktywność w liczniku scyntylacyjnym firmy Packard. Wyniki podano na ryc. 3.

Oznaczanie białka. Dyski pochodzące z pocięcia świeżych żeli (po 10 analogicznych dysków z równoległych elektroforez) inkubowano 12 godz. z 90% kwasem mrówkowym (0,5 ml na dysk) w temperaturze pokojowej, następnie odparowywano w temp. 60° do sucha. Po usunięciu wysuszonego żelu pozostałość rozpuszczano w 1 n NaOH, dodawano 0,1 ml 5% deoksycholanu sodu i uzupełniano do 1 ml wodą i 1 n NaOH do uzyskania 0,5 n stężenia NaOH.



Ryc. 3. Elektroforeza białek *Cortolus versicolor* z kultur inkubowanych w obecności ^{14}C -kwasu asparaginowego bez kwasu ferulowego (a), z kwasem ferulowym (b), z kwasem ferulowym i aktidionem (c)
Electrophoresis of *Cortolus versicolor* proteins from cultures incubated in the presence of ^{14}C -aspartic acid without ferulic acid (a), with ferulic acid (b), with ferulic acid and actidione (c)



Ryc. 4. Elektroforeza białek *Cortolus versicolor* z kultur inkubowanych w obecności ^{64}Cu bez kwasu ferulowego (a), z kwasem ferulowym (b), z kwasem ferulowym i aktidionem (c)
Electrophoresis of *Cortolus versicolor* proteins from cultures incubated in the presence of ^{64}Cu without ferulic acid (a), with ferulic acid (b), with ferulic acid and actidione (c)

Do roztworu dodawano 4 ml 2% Na_2CO_3 , inkubowano 10 min., dodawano 0,5 ml 0,5 M odczynnika Folina i po 30 min. inkubacji w temperaturze pokojowej, mierzono ekstynkcję przy 670 nm. Ilość białka odczytywano z krzywej kalibracyjnej wykonanej dla albuminy wołowej uzyskanej z firmy Miles (USA).

Wybarwienie żeli parafenylenodwuaminą. Kolumny po elektroforezie przepłukiwano 0,2 M buforem octanowym o pH 3,5, następnie inkubowano w temperaturze pokojowej z 1% roztworem p-fenylenodwuaminy w tym samym buforze, aż do uzyskania intensywnego zabarwienia frakcji utleniających p-fenylenodwuaminę. Natychmiast po wybarwieniu żele fotografowano (ryc. 1 b i d).

Oznaczanie ^{60}Co . Wybarwione p-fenylenodwuaminą żele cięto na dyski, które umieszczano (każdy osobno) w naczyniu scyntylacyjnym, suszono w temp. 60° , dodawano po 5 ml scyntylatora toluenowego i mierzono radioaktywność w liczniku jak poprzednio. Wyniki ilustruje ryc. 4.

WYNIKI I DYSKUSJA

Elektroforeza na żelu poliakrylamidowym rozpuszczalnych białek grzyba *Coriolus versicolor* w układzie Tris-boran, pH 8,45, dawała 3 lub 4 wyraźnie zaznaczone frakcje białkowe w zależności od tego, czy mycelium przed elektroforezą inkubowano bez kwasu ferulowego (ryc. 1a, ryc. 2a), czy w obecności tego kwasu (ryc. 1c, ryc. 2b), pozostałe frakcje były rozmyte. Po pocięciu żeli na dyski, frakcje białka ostro zaznaczone koncentrowały się w drugim, czwartym i czternastym dysku elektroforezy białka z mycelium nieindukowanego (tab. 1, ryc. 2a) oraz w drugim, czwartym, czternastym i dwudziestym ósmym dysku dla białka mycelium indukowanego kwasem ferulowym (tab. 1, ryc. 2b). Po nałożeniu na kolumny średnio po ok. 166 μg białka pochodzącego z mycelium indukowanego kwasem ferulowym i 155 μg białka z mycelium kontrolnego dyski 1—40 wariantu kontrolnego i dyski 1—40 wariantu indukowanego po odjęciu białka dyski 28 zawierały w przybliżeniu identyczną ilość białka, równą ok. 155 μg . Średnie zawartości białka w poszczególnych frakcjach obu wariantów elektroforezy były również bardzo zbliżone, z wyjątkiem frakcji 28 (tab. 1). Z powyższego wynikałoby, że nowa białkowa frakcja, pojawiająca się w rezultacie oddziaływania na grzybnię kwasem ferulowym, nie powstaje kosztem innych rozpuszczalnych białek mycelium.

W celu wstępnej identyfikacji frakcji 28 ekstrakty białkowe obu wariantów mycelium analizowano przed elektroforezą na zawartość lakazy metodą opisaną poprzednio (4). Średni wynik z kilku pomiarów wskazywał, że w mycelium indukowanym znajdowało się w przeliczeniu na białko prawie 3-krotnie więcej lakazy niż w mycelium kontrolnym (tab. 2). Chcąc sprawdzić, czy nowa frakcja 28 jest białkiem lakazy, inkubowano forogram z często stosowanym donatorem wodoru dla lakazy — p-fenylenodwuaminą. We wszystkich próbach w przypadku wariantu kontrolnego uzyskiwano na żelu jeden barwny prążek, zaś w wariantach stymulowanych dwa prążki. Prążek znajdujący się w wyższej części kolumny odpowiadał białkowej frakcji 14 i występował w obu wariantach elektroforezy, natomiast prążek położony niżej występował jedynie w wariantcie indukowanym i pokrywał się z białkową frakcją 28 (ryc. 1). Można więc przypuszczać, że frakcja 28 jest nowo syntetyzowanym białkiem lakazy, z uwagi jednak na niską specyficzność p-fenylenodwuaminy jako donatora wodoru lakazy utlenianie tego związku na żelu nie może być dostatecznym dowodem na to, że czynnikiem utleniającym jest enzym lakaza.

Tab. 1. Zawartość rozpuszczalnego białka z mycelium grzyba *Coriolus versicolor* we frakcjach z elektroforezy na żelu poliakrylamidowym *
The soluble protein content from the fungus *Coriolus versicolor* in fractions from electrophoresis on polyacrylamide gel

Nr frakcji (dysku) No. of fraction	Mycelium bez kwasu ferulowego Mycelium without ferulic acid µg	Mycelium z kwasem ferulowym Mycelium with ferulic acid µg	Nr frakcji (dysku) No. of fraction	Mycelium bez kwasu ferulowego Mycelium without ferulic acid µg	Mycelium z kwasem ferulowym Mycelium with ferulic acid µg
1	18,0	20,0	21	4,0	3,0
2	8,0	8,0	22	3,0	2,0
3	3,0	1,0	23	2,4	1,6
4	14,0	13,0	24	2,0	1,0
5	5,0	5,6	25	1,8	1,0
6	4,0	4,0	26	1,6	1,0
7	4,0	4,0	27	1,4	3,0
8	6,0	5,0	28	1,0	11,0
9	7,0	6,0	29	0,8	3,0
10	7,0	6,0	30	0,6	0,6
11	7,0	6,0	31	0,6	0,5
12	7,0	7,0	32	0,6	0,4
13	2,0	5,0	33	0,6	0,4
14	15,6	17,0	34	0,4	0,3
15	4,0	4,0	35	0,4	0,3
16	4,4	5,2	36	0,4	0,3
17	4,4	5,0	37	0,4	0,3
18	3,4	4,2	38	0,2	0,4
19	3,6	4,0	39	0,4	0,4
20	4,4	4,2	40	0,4	0,2
W sumie — Altogether				154,8	165,9

* Białko ekstrahowano łącznie z analogicznych frakcji dziesięciu kolumn. W tabeli podano wyniki po podzieleniu przez 10.

* Protein was extracted together from analogical fractions of ten columns. In the table there were given results after dividing by 10.

Tab. 2. Aktywność lakazy w mycelium *Coriolus versicolor* po 2 godz. inkubacji w warunkach kontrolnych i z kwasem ferulowym
The laccase activity in the mycelium of the *Coriolus versicolor* after 2 hours incubation in control conditions and with ferulic acid

Powtórzenie Repeats	Kontrola — aktywność lakazy Control — laccase activity A _{cn} (4)	Kwas ferulowy — aktywność lakazy Ferulic acid — laccase activity A _{cn}
I	8	25
II	7	23
III	9	27

W celu ostatecznej identyfikacji lakazy wykorzystano fakt, że w cząsteczce tego enzymu znajdują się 4 atomy miedzi oraz prawie 3-krotnie więcej kwasu asparaginowego jak innych aminokwasów (1). ¹⁴C-kwas asparaginowy i ⁶⁴Cu wprowadzono do obu wariantów mycelium *in vivo* podczas 2-godzinnej inku-

bacji w temperaturze pokojowej. Okazało się, że oba radioizotopy znakowały prawie wyłącznie frakcję 28 i to tylko podczas inkubacji mycelium z kwasem ferulowym (ryc. 3b i 4b), natomiast frakcja lakazy występująca w dysku 14 znakowana była w obu wariantach inkubacji tylko w nieznacznym stopniu (ryc. 3a i 4a). Aktidion wprowadzony do kultury razem z kwasem ferulowym obniżał włączanie obu radioizotopów do poziomu wariantów kontrolnych (ryc. 3c i 4c). Wyniki powyższe, potwierdzając obecność lakazy we frakcji 28, wskazywałyby jednocześnie na biosyntezę tej frakcji w warunkach przeprowadzonego doświadczenia.

W literaturze znane jest występowanie dwóch frakcji lakazy tzw. „izozymów A i B” w hodowlach *Polystictus (Coriolus) versicolor* indukowanych wprawdzie nie metoksyfenolem, lecz 2,5-ksylidyną. Oba izozymy zostały wyizolowane z indukowanych kultur i dosyć dokładnie scharakteryzowane (1, 2, 11, 12). Brak jest natomiast danych dotyczących heterogenności lakazy w kulturach nie indukowanych. Wyniki niniejszej pracy, potwierdzając występowanie w hodowlach indukowanych kwasem ferulowym dwu frakcji lakazy, sugerują jednocześnie homogenność tego enzymu w kulturach nie indukowanych.

PIŚMIENICTWO

1. Fahraeus G., Reinhammar B.: Large Scale Production and Purification of Laccase from Cultures of the Fungus *Polyporus versicolor* and some Properties of Laccase. *Acta Chem. Scand.* 21, 2367—2378 (1967).
2. Fee J. A., Malmström B. G.: The Redox Potential of Fungal Laccase. *Biochim. Biophys. Acta* 153, 299—302 (1968).
3. Grabbe K., Koenig R., Halder K.: Die Bildung der Phenoloxydase und die Stoffwechselbeeinflussung durch Phenole bei *Polystictus versicolor*. *Arch. Mikrobiol.* 63, 133—153 (1968).
4. Leonowicz A.: Fenole jako induktory niektórych oksydaz u *Basidiomycetes*. Część I. mRNA i lakaza u grzyba *Coriolus versicolor*. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio C* 29, 11—30 (1974).
5. Leonowicz A., Trojanowski J.: Biological Decomposition of Lignin. US Department of Commerce, National Technical Information Service (1972).
6. Leonowicz A., Trojanowski J.: Exoenzymes in Fungi Degrading Lignin. I. *Photlota mutabilis*. *Acta Microbiol. Polon.* 14, 55—61 (1965).
7. Leonowicz A., Trojanowski J., Nowak G.: Ferulic Acid as the Inductor of Messenger RNA Synthesis Related to Laccase Formation in the Wood Rotting Fungus *Pleurotus ostreatus*. *Microbios (London)* 6, 23—28 (1972).
8. Lowry O. H., Rosebrough H. J., Farr A. L., Randall R. J.: Protein Measurement with the Folin-Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265—275 (1951).
9. Łobarzewski J.: Heterogenność peroksydazy indukowanej kwasem syringowym z mycelium grzyba *Inonotus radiatus*. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Lublin, sectio C* 28, 31—38 (1973).
10. Łobarzewski J.: Peroxidase in Syringic Acid-Stimulated Cultures of *Inonotus radiatus*. *Acta Microbiol. Polon. seria B* 6, 1—7 (1974).
11. Malkin R., Malmström B. G., Vännard T.: The Requirement of the "Non-Blue" Copper (II) for the Activity of Fungal Laccase. *FEBS Letters* 1, 50—54 (1968).
12. Malmström B. G., Reinhammar B., Wännard T.: Two Forms of Copper (II) in Fungal Laccase. *Biochim. Biophys. Acta* 156, 67—76 (1968).
13. Scháněl L.: Heterogeneous Production of Laccase by Mycelium of White-Rot Fungi. *Biol. Plantarum (Praha)* 8, 292—298 (1966).
14. Trojanowski J., Leonowicz A.: The Biodeterioration of Lignin by Fungi. *Microbios* 3, 247—251 (1969).

РЕЗЮМЕ

Применяя электрофорез на полиакриламидовом геле, автор проследил растворимые белки и лаказы у *Coriolus versicolor* во время 2-часовой инкубации культуры с феруловой кислотой. Установлено, что в этих условиях образуется новая фракция лаказы при постоянном качественном и количественном составе других белков.

SUMMARY

Using electrophoresis on polyacrylamide gel, soluble proteins and laccase were investigated in the *Coriolus versicolor* during two-hour incubation of the culture, the medium containing ferulic acid. It was revealed that under these conditions a new laccase fraction appears.