

产生细胞外蛋白质和多肽的酵母菌

淡家林 徐纯锡 王世卓 徐冠珠

(中国科学院微生物研究所, 北京)

测定了酵母菌及类酵母菌 31 个属 53 个种共 98 株产生细胞外蛋白质和多肽的情况, 发现酵母菌产生这类物质与它能形成真菌丝这一形态学特征密切相关, 而与假菌丝和子囊的形成无关。

本文还讨论了一些培养条件对酵母菌细胞外蛋白质和多肽产生的影响。

微生物以酶的形式产生细胞外蛋白质, 以抗菌素和毒物形式产生细胞外多肽是人们已熟悉的情况。近年来, 鹤高等^[1, 2]报道了细菌产生细胞外蛋白质的研究; 赤木等^[3]报道了酵母菌产生细胞外蛋白质的研究。我们研究了产生细胞外蛋白质和多肽的酵母菌。

材料和方法

菌种: 中国科学院微生物研究所菌种保藏室供给。

培养基: 丰富培养基组分(%): 按赤木等报道的配制^[3], 葡萄糖 1.0; 蛋白胨 0.5; 麦芽汁 0.5; 酵母浸出汁 0.3。

合成培养基组分(%): 葡萄糖 1.0; 硫酸铵 0.5; 磷酸二氢钾 0.1; 含 7 个结晶水的硫酸镁 0.05; 氯化钠 0.01; 氯化钙(含 2 个结晶水) 0.01; 酵母浸出汁 0.1。分别调成 pH 7.0 和 3.2, 葡萄糖分开杀菌。

培养方法: $\phi 20 \times 200$ 毫米的试管, 加入上述培养液 10 毫升或 15 毫升, 15 磅 30 分钟灭菌, 加葡萄糖后自斜面接接入菌种一环, 斜置于旋转摇床上 (220 rpm, 偏心距 2.5 厘米), 29°C 培养 4 天。

蛋白质和多肽产生菌的初筛: 将 10 毫升培养液倒入离心管, 4000 rpm 离心 15 分钟; 取上清液 2 毫升, 加入 6%(W/V) 的三氯醋酸 (TCA) 溶

液 2 毫升, 4°C 放置 15 分钟, 在 721 型分光光度计上, 用 660 毫微米波长, 1.0 厘米比色杯测 O.D. 值, 以 O.D. 值表示培养液蛋白质沉淀的浊度。

取上清液 2 毫升加入 30% TCA 溶液 2 毫升, 与上述同样操作测定培养液蛋白质和多肽的浊度。

上述测定用未接种的培养基经同样处理作对照。培养液颜色深的则用同一培养液加等量水作对照。

复筛测定: 细胞生长: 培养液 15 毫升, 用 30% 的氢氧化钠溶液调 pH 5—7, 全部倒入已知重量的离心管中, 4000 rpm 离心 20 分钟, 小心吸出上清液, 细胞用蒸馏水洗涤两次后, 在 105°C 烘 24 小时, 称重。

细胞外蛋白质和多肽的测定: 取除去细胞的培养液用 3%(W/V) 的 TCA 沉淀蛋白质, 4°C 放置 30 分钟后, 4000 rpm 离心 20 分钟, 上清液取出测定多肽; 沉淀用 3% 的 TCA 溶液洗涤两次后, 用 0.1 N 的氢氧化钠溶液溶解, 以英制牛血清蛋白为标准, 按微量双缩脲法^[4]测定蛋白质。取已除去蛋白质的上清液, 用 15% (W/V) 的 TCA 沉淀多肽, 0°C 放置 30 分钟后, 在 0°C 10000 rpm 离心 15 分钟, 倾去上清液, 沉淀用 15% 的 TCA 溶液洗涤两次后, 用 1 N 的氢氧化钠溶液溶解, 以杆菌肽为标准, 按微量双缩脲法测定多肽。

本文于 1980 年 1 月 9 日收到。

pH 测定: 用 pH 试纸。

蛋白酶活性的测定: 牛奶离心脱脂, 另用水配制 3.5% 的洋菜, 分别灭菌, 使用时等量混合, 制成平板, 在平板上放置 $\phi 8 \times 10$ 毫米的不锈钢圈, 向钢圈内滴入培养液适量, 30℃ 放置过夜, 在乳白色的背景上产生透明圈的为具有蛋白酶活性。

淀粉酶活性的鉴定: 可溶性淀粉 0.5%, 洋菜 2%, 灭菌后制成平板, 如上法滴入培养液, 30℃ 放置过夜后用 0.2% 的碘液浸没, 蓝色背景上出现无色圈的为具有淀粉酶活性。

结果与讨论

(一) 产生细胞外蛋白质和多肽的酵母菌的种类

实验用的已知酵母菌及类酵母菌为 31 个属 53 个种 87 株, 另有 11 株未定种, 共 98 株。测定结果列于表 1。它们的形态特点与产生细胞外蛋白质和多肽的关系列于表 2。

比较各属酵母菌产生细胞外蛋白质和多肽的情况发现, 产生这两类物质的酵母菌属的形态特征与不产生者有显著差别。几个富有真菌丝的酵母菌属如 *Aureobasidium*、*Endomyces*、*Endomycopsis*、*Monilia*、*Oidium*、*Sporobolomyces*、*Trichosporon*, 等大多数菌株都有细胞外蛋白质和多肽产生; 在部份菌株产生真菌丝的(如 *Candida*、*Hansenula*、*Pichia*、*Rhodotorula*、*Schizosaccharomyces*, 等) 属中, 仅个别菌株产生这两类物质; 在已测 26 株中仅 4 株能产生; 完全不具备真菌丝的属中, 无一菌株能产生这两类物质。因此, 可以认为酵母菌产生细胞外蛋白质和多肽与酵母菌形态上是否具备真菌丝有密切的关系, 也和真菌丝的多少有关, 真菌丝是酵母菌产生细胞外蛋白质和多肽的必备条件。对于其它真菌如 *Spicaria* 也是如此。

Komada 等^[7]调查产生细胞外蛋白酶

表 1 31 个属的酵母菌产生细胞外蛋白质和多肽的情况

属 名	测定菌株数	产细胞外蛋白质和多肽的菌株数	真菌丝 * (±, -)
<i>Ashbya</i>	2	1	+
<i>Aureobasidium</i>	8	6	+
<i>Blastomyces</i>	1	1	+
<i>Candida</i>	7	1	±
<i>Citeromyces</i>	1	0	-
<i>Cryptococcus</i>	1	0	-
<i>Debaryomyces</i>	1	0	-
<i>Endomyces</i>	2	1	+
<i>Endomycopsis</i>	2	2	+
<i>Eremascus</i>	1	1	+
<i>Eremothecium</i>	3	1	+
<i>Geotrichum</i>	7	4	+
<i>Hansenula</i>	3	0	±
<i>Hansenulasporea</i>	1	0	-
<i>Kloeckera</i>	2	0	-
<i>Lipomyces</i>	1	0	-
<i>Monilia</i>	7	7	+
<i>Oidium</i>	2	2	+
<i>Oospora</i>	2	1	+
<i>Pichia</i>	8	1	±
<i>Rhodosporidium</i>	1	0	+
<i>Rhodotorula</i>	3	1	±
<i>Saccharomyces</i>	4	0	-
<i>Saccharomycodes</i>	1	0	-
<i>Schizosaccharomyces</i>	3	0	±
<i>Spicaria</i>	5	2	+
<i>Sporobolomyces</i>	6	6	+
<i>Trichosporon</i>	9	8	+
<i>Williopsis</i>	2	1	±
<i>Zygopichia</i>	1	0	-
<i>Zygosaccharomyces</i>	1	0	-

* +: 有真菌丝; ±: 可能有真菌丝; -: 无真菌丝。

的酵母菌属, 主要是有或可能有真菌丝的 *Candida*、*Endomycopsis*、*Pichia*、*Rhodotorula*、*Rhodosporidium*、*Trichosporon* 等属, 例外的是 *Cryptococcus*, 其他无真菌丝的酵母菌极少产生。我们的结果与这一情况比较接近, 具有真菌丝的较高级的真菌, 例如 *Aspergillus*、*Penicillium*、*Rhizopus* 等属产

表 2 酵母菌形态特征与产生细胞外蛋白质和多肽的关系

形态特征		真 菌 丝						假 菌 丝				子 囊 孢 子			
		有		可能有		无		有		无		有		无	
		属数	株数	属数	株数	属数	株数	属数	株数	属数	株数	属数	株数	属数	株数
测定株数		16	52	6	26	10	14	14	57	16	40	23	54	9	43
产细胞外蛋白质和多肽	株(或属)数	16	40	4	4	0	0	9	28	10	20	13	24	5	22
	百分数(%)	100	77	67	15	0	0	64	49	63	50	57	44	56	51

生各种细胞外酶形式的蛋白质则是比较普遍的情况。因此,广义上讲,真菌丝与真菌产生细胞外大分子含氮物质有比较密切的关系。这一点与细菌的情况很不相同。

在我们测定的酵母菌中,能产生细胞外蛋白质和多肽的菌属中,有无孢子的酵母菌,也有属于内孢霉目 (Endomycetales) 的属,由此可见,产生细胞外蛋白质或多肽与酵母菌发育阶段中是否形成子囊无关。

大多数酵母菌或类酵母菌发育中能形成假菌丝,有假菌丝的属有的能产生细胞外蛋白质和多肽,有的不能。无假菌丝的属也是如此,看不出假菌丝与细胞外蛋白质和多肽的产生有什么关系。

(二) 与酵母菌产生细胞外蛋白质和多肽有关的因素

将初筛得到的细胞外蛋白质和多肽的产生菌 47 株重复培养,定量测定,并同时测定细胞外蛋白酶和淀粉酶活性。将产蛋白质在 100 微克/毫升以上或产多肽在 200 微克/毫升以上的菌株测定结果列入表 3。从 47 株菌的测定结果大致可以看出:

1. 具有真菌丝的酵母菌能产生细胞外蛋白质,也能产生细胞外多肽。多肽量一般多于蛋白量,但也有相反情况,特别是

Endomycopsis fibuliger 只有蛋白质而无多肽产生(数据未列出)。

2. 在丰富培养基和合成培养基中都能产生细胞外蛋白质和多肽。一般情况是,丰富培养基产细胞外蛋白质的量较合成培养基多;产多肽的情况则相反。

3. 培养起始 pH 对酵母在合成培养基中的细胞外蛋白质和多肽的产生无明显的影响。在丰富培养基中,起始 pH 3.2 的细胞外蛋白质产生菌株数和产量高于起始 pH 6.0 的;起始 pH 3.2 的细胞外多肽产生菌株数和产量则明显地高于起始 pH 6.0。

4. 在此实验条件下,大多数菌株都未见蛋白酶活性,少数有淀粉酶活性。即使无此两种酶活性的菌株也不排除其他酶类,如脂肪酶等存在的可能性。因此不能肯定细胞外蛋白质不包括其他的酶形式的蛋白质。

5. 细胞生成量一般在丰富培养基中较多,起始 pH 6.0 的细胞生成量又高于 pH 3.2 的。

6. 酵母菌以外的真菌 *Spicaria* 属也显示出不但产生二类物质,而且无细胞外蛋白酶和淀粉酶活性。这一点启示我们,还可以从酵母菌以外的其他真菌中找寻这二类物质的产生菌。

表 3 几株酵母菌的细胞外蛋白质和多肽的产量

菌 名	培养基	起始 pH	终了 pH	干细胞重 (毫克/毫升)	细胞外蛋白质 (微克/毫升)	细胞外多肽 (微克/毫升)	蛋白酶*	淀粉酶
<i>Ashbya gossypii</i>	丰富	6.0	6.2	4.63	87	2	—	+
		3.2	3.4	0.21	182	0	—	—
	合成	6.0	4.5	3.92	57	77	—	±
		3.2	3.4	0.35	23	19	—	—
<i>Candida arborea</i>	丰富	6.0	5.4	6.29	5	77	—	+
		3.2	3.0	3.96	163	142	—	—
	合成	6.0	2.3	3.88		84	—	—
		3.2	2.4	4.23	0	0	—	—
<i>Monilia humicola</i>	丰富	6.0	5.4	8.52	26	0	—	—
		3.2	3.2	3.14	0	179	—	—
	合成	6.0	2.2	6.37	2	192	—	—
		3.2	2.2	4.67	0	493	—	—
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	丰富	6.0	6.2	4.99	14	0	—	—
		3.2	3.1	1.37	40	201	—	—
	合成	6.0	3.1	2.55	20	159	—	—
		3.2	2.5	1.33	9	259	—	—
<i>Spicaria praeisae</i> (<i>Paecilomyces</i>)	丰富	6.0	3.8	7.15	2	52	—	—
		3.2	3.0	7.69	50	371	—	—
	合成	6.0	2.0	6.58	62	277	—	—
		3.2	2.0	5.58	49	170	—	—
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>	丰富	6.0	5.1	4.56	9	0	—	±
		3.2	2.2	3.77	9	46	—	+
	合成	6.0	2.0	4.30	27	180	—	±
		3.2	2.0	4.34	102	148	—	±
<i>Trichosporon cutaneum</i>	丰富	6.0	5.2	2.99	23	0	—	—
		3.2	3.2	0.87	62	0	—	—
	合成	6.0	2.4	1.96	24	101	—	—
		3.2	3.0	0.80	48	217	—	—
<i>Williopsis</i> sp. (<i>Hansenula</i> 或 <i>Endomycopsis</i>)	丰富	6.0	7.0	3.71	12	10	—	+
		3.2	3.0	3.00	175	21	—	±
	合成	6.0	3.2	3.92	17	58	—	±
		3.2	2.5	2.30	14	16	—	±

* 蛋白酶, 淀粉酶: + 产酶, ± 产酶弱, — 不产酶。

7. 由于使用的酵母菌株较少, 重复次数不多, 以上结果仅作一般情况看待, 产量尚需进一步确定。

参 考 文 献

- [1] Udaka, S.: *Agri. Biol. Chem.*, **40**: 523, 1976.
- [2] Tagawa, M., and S. Udaka: *Agri. Biol. Chem.*, **42**: 1157, 1978.
- [3] Akaki, M. et al.: *Agri. Biol. Chem.*, **42**: 2391, 1978.
- [4] Itghaki, R. F. and D. M. Gill: *Anal. Biochem.*, **9**: 401, 1964.
- [5] Lodder, J. (ed): *The Yeasts- A Taxonomic Study*, North-Holland Pub. Co., Amsterdam 1970.
- [6] Phaff, H. J. et al.: *The life of Yeasts*, 2ed. Harvard Univ. Press USA, 1978.
- [7] Komada, M. S. et al.: *Agri. Biol. Chem.*, **36**: 171, 1972.

EXTRACELLULAR PROTEIN AND POLYPEPTIDE PRODUCING YEASTS

Dan Jialin Xu Chunxi Wang Shizhuo Xu Guanzhu

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

In the detection of extracellular protein and polypeptide producing yeasts and yeast-like fungi, we found that extracellular protein and polypeptide production was related to true mycellium formation,

but not related to the pseudomycellium and asseus formation.

Some effects of culture conditions on the production of proteins and polypeptides are discussed.