

酵母细胞外蛋白质和多肽的产生及分泌

徐冠珠

(中国科学院微生物研究所, 北京)

白地霉 (*Geotrichum candidum*) AS 2.498 的突变株 NX47 和橙黄红酵母 (*Rhodotorula aurantiaca*) AS 2.280 蛋白质的合成与分泌和多肽的合成均在培养前期与细胞生长同步进行。合成的蛋白质全部或大部分贮存在胞周间,并随即通过细胞壁从胞周间分泌到细胞外,培养基的组成和培养时间对蛋白质的组份无显著的影响。合成的多肽全部贮存在细胞内。

突变株 NX47 缓慢地分泌蛋白质,快速分泌多肽。其分泌能力取决于分为三层的细胞壁结构。多肽在培养前期不分泌,直到进入对数生长期后期,才通过原生质膜和细胞壁由细胞内迅速地分泌到细胞外。分泌时间比其合成滞后一天以上。

菌株 AS 2.280 的细胞壁没有三层结构,却能快速分泌蛋白质,但不分泌多肽。

关键词 橙黄红酵母;白地霉;细胞外蛋白质;细胞外多肽

近年来,已见到多篇有关酵母产细胞外蛋白质培养条件的报告^[1-3],但对酵母蛋白质和多肽的合成及分泌的研究则极少。前文报道了培养条件对两株酵母菌产生细胞外蛋白质和多肽的影响^[4]。本文报道两种物质的合成和分泌的初步研究结果。

材料和方法

(一) 菌种

橙黄红酵母 (*Rhodotorula aurantiaca*) AS 2.280 和白地霉 (*Geotrichum candidum*) AS 2.498 由本所菌种保藏室提供。

以 AS 2.498 为出发菌株,经诱变筛选得突变株 NX47。

(二) 培养方法

培养基: A(%) : 葡萄糖 2.0, 酵母浸出汁 0.5, 蛋白胨 0.6, 灭菌前调 pH3.2。
B₁(%) : 葡萄糖 2.0, 酵母浸出汁 0.5, NH₄Cl 0.2, KH₂PO₄ 0.1, MgSO₄·7H₂O 0.05, NaCl 0.01, CaCl₂·2H₂O 0.01, 自然

pH₇。B₂(%) : 以 0.25% 尿素代替 NH₄Cl, 其它成份与 B₁ 相同。尿素配制成 25% 的水溶液分开灭菌,接种前加入培养基中。

250ml 三角瓶装 50ml 上述培养基,接入成熟的种子液 0.5 ml, 旋转摇床 28—30℃ 培养。

(三) 检测方法

1. 细胞生长: 发酵液稀释 10 倍, 在分光光度计上于 562nm 比浊, 以 A 值表示。

2. 细胞外蛋白质、多肽、RNA、DNA 的测定: 培养液离心除去细胞后, 按文献 [5] 测定。

3. 胞周间物质的测定: 参照 Akaki 等的方法^[6], 将培养液离心, 收集细胞, 室温下悬浮于等体积的 0.05 mol/L NaOH 溶液中, 5 分钟后, 离心移去细胞, 所得清液用 50% 的三氯醋酸 (TCA) 溶液中和后, 同上法测定蛋白质、多肽等。

本文于 1990 年 9 月 19 日收到。

本所技术室初昭嶈、刘如臻和谢家仪等同志帮助完成细胞包埋、切片和电镜观察, 特此致谢。

4. 细胞内物质的测定: 参照 Tagawa 等的方法^[6], 将经过 0.05mol/L NaOH 溶液洗涤后的细胞, 悬浮于 1mol/L NaOH 溶液中, 沸水浴加热 10 分钟, 冷却后离心除去细胞, 上清液用 50% 的 TCA 溶液中和后, 同上法测定蛋白质等。

5. 细胞形态结构的观察: 酵母细胞按常规方法包埋, 超薄切片后用电子显微镜观察。

6. 聚丙烯酰胺凝胶电泳: 参考莽克强等^[7]所述方法, 作高 pH 不连续圆盘电泳。

结 果

(一) 细胞外、胞周间、细胞内三位区的蛋白质、多肽等物质的分布及比较

1. 三位区各物质的浓度: 将发酵液和细胞按上述方法处理测定的结果列于表

1。表 1 显示, 突变株 NX47 的蛋白质只分布在胞周间和细胞外, 细胞内未检出; 多肽只分布在细胞内和细胞外, 胞周间未检出; 三位区都有 RNA, 以胞周间浓度最高。

菌株 AS 2.280 的三位区都有蛋白质和 RNA, 但浓度各不相等: 多肽只存在于细胞内, 其它位区均未检出。

两菌株三位区均未检出 DNA, 说明经 1mol/L NaOH 溶液处理后, 酵母细胞核仍未破裂。

2. 各位区蛋白质的电泳图谱: 将菌株 AS 2.280 三位区的蛋白质进行电泳, 获得聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱见图版 I-1。AS 2.280 的细胞外蛋白质为多组分蛋白质, 其电泳图谱与胞周间蛋白质相似, 与细胞内蛋白质完全不同。不同培养基和不同培养

表 1 细胞外、胞周间、细胞内三位区的蛋白质、多肽和 RNA 的浓度

Table 1 Concentration of protein, polypeptide and RNA in extracellular, periplasmic and intracellular space

菌株 Strains	培养基 Medium	位区 Site	蛋白质 Protein ($\mu\text{g/ml}$)	多肽 Polypeptide ($\mu\text{g/ml}$)	RNA ($\mu\text{g/ml}$)
突变株* Mutant NX47	A	细胞外 Extracellular	242	385	14.0
		胞周间 Periplasmic	248	0	98.3
		细胞内 Intracellular	0	264	15.5
	B ₁	细胞外 Extracellular	208	174	4.2
		胞周间 periplasmic	319	0	65.6
		细胞内 intracellular	0	268	21.0
深红酵母** <i>R. Aurantiaca</i> 2.280	B ₂	细胞外 Extracellular	316	0	69.0
		胞周间 Periplasmic	118	0	86.0
		细胞内 intracellular	283	45	73.0

注 * 培养 4 天 Cultured four days

** 培养 3 天 Cultured three days

时间所产生的各位区蛋白质的电泳图谱均各自相似。对 NX47 的研究也获得上述同样的结果(图谱未列出,其图谱显示 NX47 所分泌的蛋白质组份少,且数量也较集中在一条带上)。这与 Tsuchida 等^[8]对细菌的研究结果有些不同。

(二) 细胞形态结构的观察

在不同培养基中培养 4 天的细胞,经包埋切片后,在电子显微镜中拍摄的照片见图版 I-2 至 I-6。

突变株 NX47 在起始 pH5.6 的 A 培养基中,不产生细胞外蛋白质和多肽^[9]。图版 I-4 显示,其细胞壁电子密度较小,外壁薄而光滑,无三层结构。该菌在 B₁ 和起始 pH3.2 的 A 培养基中,能积累细胞外蛋白质和多肽,图版 I-2 和 I-3 显示,其细胞壁分为清晰的三层,且电子密度大,外壁表面粗糙。可见, NX47 的蛋白质释放取决于分为三层的细胞壁结构。此结果与 Tsukagoshi 等^[2]对细菌的研究结果一致。与他们不同的是,细菌在培养过程中,因细胞壁外面两层脱落而泄漏蛋白质;我们用 0.05mol/L 和 1mol/L 的 NaOH 处理细胞后, NX47 细胞壁的三层结构仍清晰完整,未见细胞壁脱落,培养过程中也未见胞壁脱落。

菌株 AS 2.280 在 A 和 B₂ 培养基中都积累细胞外蛋白质^[9],图版 I-5 和 I-6 均显示其细胞壁电子密度大,外壁表面粗糙,培养期间和碱处理后也未见细胞壁脱落。但与前者显著不同的是它的细胞壁没有三层。

(三) 培养过程

用 B₁ 和 B₂ 培养基分别培养两株酵母菌,不同时间取样测定三位区的蛋白质和多肽。结果见图 1 和图 2。

图 1 显示,突变株 NX47 细胞外和胞周间蛋白质的浓度均随细胞生长而增加;

培养全过程中,始终未检出细胞内蛋白质。培养早期,细胞内多肽也随细胞生长而增加,一天以后,胞外多肽急剧增加,胞内多

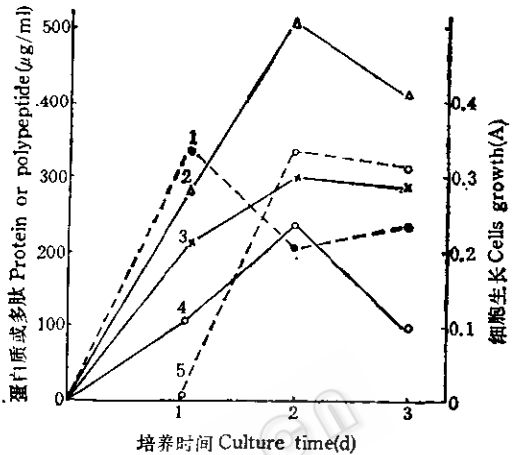


图 1 突变株 NX47 在 B₁ 培养基中的发酵过程

Fig. 1 Fermentation course of mutant NX47 in B₁ medium

1. 细胞内多肽 Intracellular polypeptide; 2. 胞周间蛋白质 Periplasmic protein; 3. 细胞生长 Cells growth; 4. 细胞外蛋白质 Exoprotein; 5. 细胞外多肽 Extracellular polypeptide

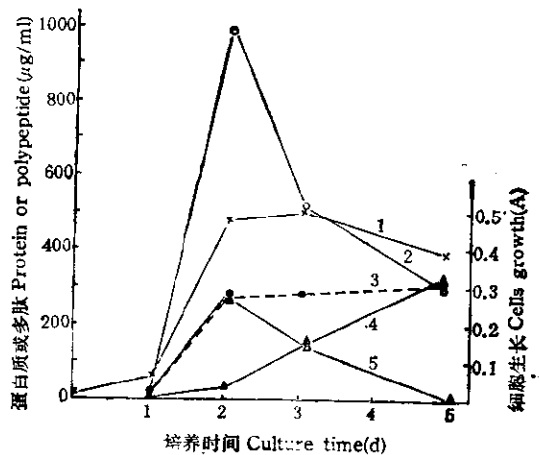


图 2 菌株 2.280 在 B₂ 培养基中的发酵过程

Fig. 2 Fermentation course of 2.280 in B₂ medium

1. 细胞生长 Cells growth; 2. 细胞外蛋白质 Exoprotein; 3. 细胞内多肽 Intracellular polypeptide; 4. 细胞内蛋白质 Intracellular protein; 5. 胞周间蛋白质 Periplasmic protein

肽则迅速减少;培养后期,两部份多肽浓度变化不大;培养全过程中,始终未检出胞周间多肽。

图 2 显示,在培养前期,菌株 AS 2.280 细胞外和胞周间蛋白质均随细胞生长迅速增加。培养 2 天,细胞外蛋白质浓度高达 $900\mu\text{g/ml}$;但在培养后期则有所减少。胞内蛋白质在培养前期极少,后期增加较多。细胞内多肽也随细胞生长而增加,细胞外和胞周间始终未检出多肽,可见,AS 2.280 只合成但不分泌多肽。

讨 论

(一) 酵母菌蛋白质的合成和分泌

橙黄红酵母 AS 2.280 和白地霉 AS 2.498 的突变株 NX47 蛋白质的合成和分泌均在培养前期即伴随细胞生长同步进行。培养基的组成和培养时间对两菌株产生的蛋白质的组份均无显著的影响。细胞外蛋白质的电泳图谱与细胞内的完全不同而与胞周间的相似,不存在细胞壁脱落现象。因此,可以认为,酵母细胞外蛋白质既不是由细胞裂解产生,也不是因细胞壁脱落泄漏,而是通过细胞壁从胞周间分泌到细胞外的。蛋白质的分泌取决于细胞壁的结构及其分泌特性,其共同特征是,细胞壁电子密度大,外表面粗糙。突变株 NX47 合成的蛋白质全部贮存在胞周间,同时通过细胞壁缓慢地向细胞外分泌,胞周间蛋白质的浓度始终大大高于细胞外。可见该菌株合成蛋白质的能力大于分泌能力。其分泌能力取决于分为三层的细胞壁结构,无三层结构则不分泌。

AS 2.280 合成的蛋白质主要贮存在胞周间,也有少量贮存在细胞内,两部份蛋白质的组份和分子量都不相同。其细胞壁的结构与 NX47 菌株明显不同,虽然没有三层结构,但分泌蛋白质的能力却比

NX47 强得多。细胞外蛋白质的浓度始终远高于胞周间,培养到一定时间,胞周间几乎没有蛋白质存在。

上述结果提示,两株酵母菌细胞壁结构不同,蛋白质的分布和分泌也有所不同。突变株 NX 47 试称蛋白质缓慢分泌型,与已见到的报道相似^[3]。提高细胞壁的分泌能力,或许可以提高它们细胞外蛋白质的积累。AS 2.280 试称快速分泌型,尚未见报道,进一步提高它们合成蛋白质的能力,也许能将酵母细胞外蛋白质的积累提高到工业化应用的水平。

(二) 酵母细胞外多肽的合成和分泌

两菌株在合成蛋白质的同时也合成多肽。合成的多肽全部贮存在细胞内。

突变株 NX47 既分泌蛋白质也分泌多肽。但培养早期不分泌多肽,直到进入对数生长后期才突然通过原生质膜和细胞壁迅速地将多肽从细胞内直接分泌到细胞外。培养全过程中,胞周间始终未检出多肽,可见,多肽在分泌过程中不在胞周间停留。

AS 2.280 能合成多肽,分泌蛋白质的能力远大于 NX47 菌株,但始终不分泌多肽。上述结果说明,多肽的合成和分泌与蛋白质不同,两菌株细胞壁结构不同,分泌特性也不相同。

1. 蛋白质合成后,全部或大部分贮存在胞周间。多肽合成后,则全部贮存在细胞内。

2. 蛋白质在合成的同时,即通过细胞壁从胞周间向细胞外分泌,NX47 合成的多肽必须到培养进入对数生长后期,才通过原生质膜和细胞壁从细胞内向细胞外分泌。

3. NX47 缓慢地分泌蛋白质,却快速分泌多肽,显示对蛋白质和多肽的双重分泌能力。AS 2.280 菌株快速分泌蛋白质,

却不分泌多肽, 显示对蛋白质的单一分泌能力。

(三) AS 2.280 培养后期蛋白质的去向

在培养后期, AS 2.280 的细胞外和胞周间蛋白质均大量减少, 同时胞内蛋白有一定增加, 但两者的量不相适应, 本菌株不产蛋白酶^[9], 胞内多肽无明显增加, 胞外和胞周间也未检出多肽, 由此推测, 蛋白质不是被降解。有趣的是, 在这期间细胞内出现了大量水溶性物质, 它不同于培养前期合成的蛋白质, 能被 TCA 沉淀, 显示较少的蛋白质含量, 经酸水解后显示较多的还原性(数据未列出)。此类物质可能是糖蛋白或经酸水解后即具有还原性的物质。它们的特性及与蛋白质的关系也许是

个值得研究的问题。

参 考 文 献

- [1] Akaki, M. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **42**(12):2391—2392, 1978.
- [2] Tsukagoshi, N.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **42**(2):370—374, 1981.
- [3] Weller, J. et al.: *Antonie Van Leeuwenhoek*, **47**(3):193—207, 1981.
- [4] 徐冠珠等: 真菌学报, **2**(2): 127—133, 1983.
- [5] 淡家林, 徐冠珠等: 微生物学通报, **9**(5): 235—239, 1982.
- [6] Tagawa, M. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **42**(6): 1157—1166, 1978.
- [7] 秦克强等: 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 第 32 页, 科学出版社, 北京, 1975.
- [8] Tsuchida, T. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **44**(10):2291—2295, 1980.
- [9] 淡家林, 徐冠珠等: 微生物学报, **21**(3): 324—328, 1981.

PRODUCTION AND EXCRETION OF EXTRACELLULAR PROTEIN AND POLYPEPTIDE BY *RHODOTORULA AURANTIACA* AND *GEOTRICHUM CANDIDUM*

Xu Guanzhu

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Mutant NX47 of *Geotrichum candidum* AS 2.498 and *Rhodotorula aurantiaca* AS 2.280 synthesized and excreted protein and synthesized polypeptide in keeping with the cells growth. Most or all of the protein was stored in the periplasmic space. The protein was excreted through the cell wall from the periplasmic space to extracellular the moment it was synthesized. The fraction of the protein was not affected obviously by the medium component and culture time. All of the polypeptide was stored in intracellular.

NX47 strain excreted protein slowly,

and excreted polypeptide rapidly. The excretive ability is depend on its three layered cell wall structure. It was not untill the late of logarithmic phase of the growth that the polypeptide was excreted rapidly through the plasmic membrane and cell wall from intracellular to extracellular. The polypeptide excretion was a day later than itself's synthesis.

Although the structure of cell wall of AS 2.280 has not three layers. but it excreted the protein rapially. However, it did not excreted polypeptide.

Key words

Rhodotorula aurantiaca; *Geotrichum**candidum*; Extracellular protein; Extracellular polypeptide

图 版 说 明

Explanation of plate

I-1. 菌株 2.280 各部分蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

Polyacrylamide gel electrophoresis of 2.280 strain proteins

- a. 细胞外蛋白质, B₂培养基培养 2 天
Exoprotein, cultured two days in B₂ medium
- b. 细胞外蛋白质, B₂培养基培养 3 天
Exoprotein, cultured three days in B₂ medium
- c. 细胞外蛋白质, A 培养基培养 3 天
Exoprotein, cultured three days in A medium
- d. 胞周间蛋白质, B₂培养基培养 2 天
Periplasmic protein, cultured two days in B₂ medium
- e. 胞周间蛋白质, B₂培养基培养 3 天
Periplasmic protein, cultured three days in B₂ medium
- f. 胞周间蛋白质, A 培养基培养 3 天
Periplasmic protein, cultured three days in A medium
- g. 细胞内蛋白质, B₂培养基培养 2 天
Intracellular protein cultured two days

in B₂ medium

- h. 细胞内蛋白质, B₂培养基培养 3 天
Intracellular protein, cultured three days in B₂ medium

- i. 细胞内蛋白质, A 培养基培养 3 天
Intracellular protein, cultured three days in A medium

I-2-4. 突变株 NX47 的细胞 Cell of mutant NX47

2. B₂培养基培养, 放大 10000 倍
Cultured in B₂ medium (×10000)
3. 起始 pH3.2 的 A 培养基培养, 放大 15000 倍
Cultured in A medium, initial pH 3.2 (×15000)
4. 起始 pH5.6 的 A 培养基培养, 放大 15000 倍
Cultured in A medium, initial pH 5.6 (×15000)

I-5-6. AS 2.280 的细胞 Cell of AS 2.280

5. 初始 pH5.6 的 A 培养基培养, 放大 15000 倍
Cultured in A medium, initial pH 5.6 (×15000)
6. B₂培养基培养, 放大 15000 倍
Cultured in B₂ medium (×15000)