米曲霉发酵液中蛋白动态变化的研究

冯广莉，刘洪伟，许喜林，李晓凤
（华南理工大学轻工与食品学院，广东广州 510640）

摘要：本文利用葡萄糖和吐温 80 作为额外碳源培养米曲霉，对其生物量积累，胞链接蛋白以及发酵液蛋白随培养时间的变化情况进行了研究。以葡萄糖作为额外碳源时，米曲霉生物量积累速度较快，在培养 24 h 已达最大值，为 31.97 g/L；当米曲霉以吐温 80 作为额外碳源时菌体积累较慢，在 96 h 时达到最大值，为 11.15 g/L。发酵液中蛋白总量在以葡萄糖作为额外碳源时比以吐温 80 时低。以吐温 80 作为额外碳源时，胞链结蛋白在 72 h 达到最大值的 5.65 mg/g，当以葡萄糖作为额外碳源时，米曲霉胞链结蛋白含量在 48 h 达到最大值，为 1.71 mg/g。利用 SDS-PAGE 检测 192 h 内胞连接蛋白质的表达与发酵液中的蛋白质的含量变化与利用 lowry 法测定的蛋白质含量具有一致的变化趋势：在米曲霉的快速生长期和稳定期时胞链结蛋白种类增加，在衰退期胞链结蛋白种类减少。

关键词：米曲霉；蛋白质表达；SDS-PAGE 图谱；胞链接；发酵
文章篇号：1673-9078(2013)8-1832-1836

Expression Changes of Proteins in Fermentation Broth of *Aspergillus oryzae*

FENG Guang-li, LIU Hong-wei, XU Xi-lin, LI Xiao-feng
(School of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: In this paper, biomass accumulation, dynamic expression of proteins in fermentation broth of *Aspergillus oryzae* were studied when glucose or tween 80 were used as additional carbon sources. When glucose was used as additional carbon source, biomass accumulation of *A.oryzae* was faster than tween 80 and reached the maximum of 31.97 g/L at 24 h, but accumulation of *A.ryzae* was slow when tween 80 was used, which reached the maximum of 11.15 g/L at 96 h. Total proteins in fermentation broth was higher with glucose as additional carbon source. Cell-bound proteins reached the maximum value of 5.65 mg/g at 72 h with tween 80 as additional carbon source, while cell-bound proteins reached the maximum of 1.71 mg/g at 48 h with glucose as additional carbon source. Expression of cell-bound proteins detected by SDS-PAGE within 192 h showed that cell-bound proteins increassed at the rapid growth and stationary phages, and reduced at the recession phage.which was in consistent with protein contents measured by the Lowry method.

Key words: *A.oryzae*; protein expression; SDS-PAGE patterns; cell-bound; fermentation

全细胞催化是生物催化的一种，它是指以微生物细胞作为催化剂，催化某种底物转化成特定产物的过程，起实质催化作用的是生物细胞中的酶。全细胞催化可以利用微生物细胞内的辅因子和其它酶与主反应耦合，提高了生物催化效率，降低了生物催化剂的成本。相比于纯酶催化，全细胞催化剂的制备避免了多步酶提取及纯化工艺，其只需通过微生物细胞培养的方式即可获得，方法简单[1]。

脂肪酶是重要的全细胞催化酶类，其在细胞外[2~4]、细胞壁[5]、细胞膜[5~6]、细胞质中[7]以及周质空间[7~8]中都有分布。细胞壁、细胞膜和周质空间中存在的脂肪酶被作为胞链结酶进行研究[5~11]。近些年关于胞链结酶研究越来越受到人们的关注，从 1990 年到2000 年，有关细胞链结脂肪酶（cell-bound lipase）的研究论文有 844 篇，从 2000~2012 年，相关的论文达 1569 篇。胞链结脂肪酶比纯酶在有机相催化体系中具有稳定好、催化效率高、廉价和易于操作的优点。研究表明米曲霉细胞具有催化核苷类物质合成的作用[12]，在以 tween80 作为额外碳源时大量产生胞连接和细胞质脂肪酶，分子量分别为 27 kDa 与 36 kDa[13]，本文主要利用葡萄糖和吐温 80 作为额外碳源对米曲霉生物量积累，胞链接蛋白以及发酵液蛋白随培养时间的变

收稿日期：2013-04-21
基金项目：国家自然科学基金资助项目（20906031、31270636）；广东省教育厅科技创新项目（2012KJCX0006）；新世纪优秀人才支持项目（NCET-12-0192）
作者简介：冯广莉（1988-），女，硕士研究生，现从事全细胞催化方面的研究
通讯作者：李晓凤（1977-），女，博士，副研究员，现研究方向为全细胞催化及食品安全检测

化情况进行研究，并且分析胞连接蛋白、发酵液蛋白与生物量累积之间的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 化学试剂

丙酮，广东化学试剂工程技术研究开发中心，分析纯；正己烷，江苏强盛化工有限公司，分析纯；Tricine，翔博生物公司；Tris-HCl，上海缘聚生物技术有限公司。酚试剂、盐酸、氯化镁、硫酸铵、磷酸氢二钾、乙酸、吐温 80、三氯乙酸、溴酚蓝、β-巯基乙醇、丙烯酰胺、TEMED 均为市售分析纯。

1.1.2 主要仪器设备

电泳仪，DYY-6C，北京六一仪器厂；全温摇瓶柜：HYG-A 太仓市实验设备厂；手提式压力蒸汽消毒器 YX-280 B：广州永程实验仪器有限公司；光学显微镜：上海，xsp-3 CA 1；低温水浴培养箱：LSHZ-300 太仓市试验设备厂；紫外分光光度计：Spectumlab 752 s 紫外可见光分光光度计。

1.2 菌种及培养基

米曲霉 3.5232，购自中国科学院微生物研究所，本实验室保藏。PDA 培养基作为菌种保藏与产孢培养基：马铃薯 200 g、葡萄糖、琼脂 15~20 g、蒸馏水 1000 mL、自然 pH。液体发酵培养基：0.5% $(NH_4)_2SO_4$、0.5%葡萄糖/吐温 80（额外碳源）、0.1% 酵母浸膏、0.1% K_2HPO_4、0.02% $MgSO_4·7H_2O$，分装到 500 mL 三角瓶中。

1.3 生物量测定

分别以葡萄糖和吐温 80 作为额外碳源的液体发酵培养基培养米曲霉。生物量测定的取样时间分别为 12 h、24 h、48 h、72 h、96 h、144 h、192 h。将真空抽滤后获得米曲霉湿菌体作为生物量的计算对象，单位为 g/L。

1.4 细胞组分的制备[14]

从不同培养基中获得的米曲霉菌丝，其中葡萄糖（浓度为 0.5%）作为碳源培养两瓶，吐温 80（浓度为 0.5%）作为碳源培养 3 瓶。真空抽滤获得米曲霉菌丝体后，加入蒸馏水重新分散菌体，再次真空抽滤获得菌体，重复清洗三次，同样方式利用 pH 7.5 的 Tris-HCl 缓冲溶液清洗两次。加入含 5 mmol/L 巯基乙醇的 pH 7.5 的磷酸缓冲液 35~45 mL 用以分散米曲霉菌丝体。提取胞链接组分时，在菌体悬液中加入 2.5% 的 Triton X-100 试剂，在 30 ℃，180 r/min 条件下分别震荡 20 h。抽滤后分别获得菌体和上清液，上清液作为胞链接蛋白组分。收集 300 mL 发酵液在 70 ℃下旋转蒸发浓缩至 30 mL，12,000 g 离心 10 min 后作为发酵液蛋白。利用三氯乙酸进行蛋白沉淀获得胞链接组分蛋白，利用 SDS-PAGE（分离胶 12.5%，浓缩胶 5%）分析胞连接和发酵液蛋白质表达种类与水平的变化。利用 Glyko Bandscan（version 5.0）分析 SDS-PAGE 图谱。

1.5 蛋白含量的测定

发酵液与胞连接蛋白含量的测定按照 lowry 法进行[15~16]。

1.6 数据分析

生物量的测定、胞连接及发酵液中蛋白质含量的测定中设置都三个平行实验，利用 SPSS 软件进行数据分析和绘图，所有图中误差棒采用 LSD 值。

2 结果与讨论

2.1 不同额外碳源时米曲霉的生长曲线研究

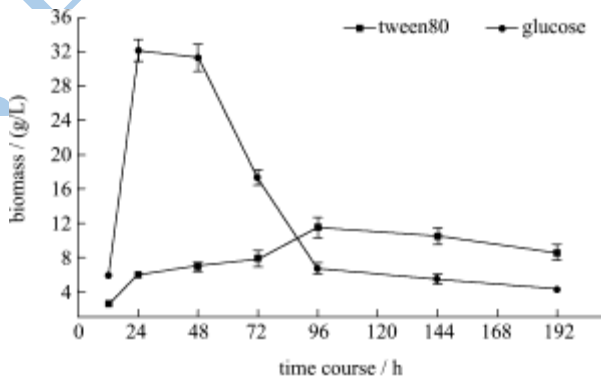


图 1 以葡萄糖和吐温 80 分别作为额外碳源时米曲霉的生长曲线

Fig.1 Growth curves of *A.oryzae* with glucose or tween 80 as additional carbon source

前期研究发现米曲霉在吐温80存在时可诱导产生脂肪酶，其在细胞壁（27 kDa）、细胞膜（27 kDa）以及细胞质（27 kDa与36 kDa）中均有存在[13]。米曲霉在分别以葡萄糖和吐温80作为额外碳源时的生长曲线如图1所示。当以葡萄糖作为额外碳源时，米曲霉生物量积累快，在24 h就达到了最大值，为31.97 g/L，在48 h菌体总量开始减少，而后从48 h到96 h菌体总量迅速减少，在192 h菌体总量达到最小值为5.10 g/L。相比之下米曲霉在以吐温80作为额外碳源时米曲霉的菌体总量

积累慢，在96 h时达到最大值的为15 g/L，在96 h至192 h之间菌体总量开始减少。

在米曲霉的培养过程中也可以发现：无论是以葡萄糖还是吐温 80 作为额外碳源，米曲霉生物量都随时间的延长而逐渐降低，在培养两周后只有很少的菌丝体存在于发酵液中。这应与米曲霉的自溶解作用有关，发酵液中较高的蛋白酶在米曲霉衰退期保持较高活性[17]也可能是导致米曲霉菌丝自溶的关键因素之一。

2.2 不同额外碳源时米曲霉发酵液中蛋白质表达量研究

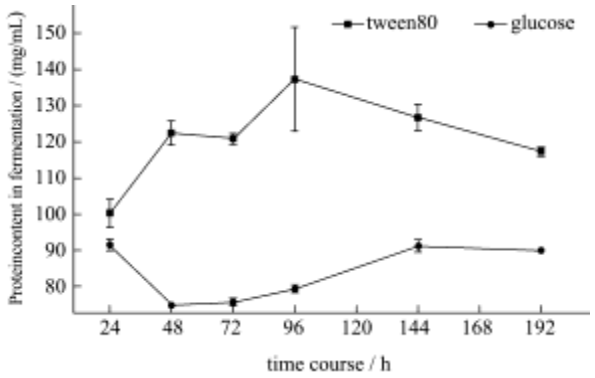


图 2 米曲霉在以不同碳源作为培养基时发酵液中蛋白总量随时间的变化

Fig.2 Changes of protein concentrations in fermentation broth of *A.oryzae* following the culture time

为了解米曲霉对培养基中营养物质的吸收以及向培养基中分泌的蛋白随时间的变化情况，采用 Lowry 法对培养基中的蛋白质总量随时间的变化进行了测定，如图 2 所示。在以葡萄糖作为额外碳源时，米曲霉发酵液中蛋白总量较低。在 24 h 至 48 h 之间，蛋白含量降低，这可由米曲霉的快速生长而消耗培养基中的蛋白来解释。在 48 h 至 192 h 米曲霉发酵液中的蛋白含量逐渐增加，分析原因应该与米曲霉向发酵液中分泌蛋白和米曲霉自溶解有直接关系。与前期研究结果一致[13]，相比于葡萄糖作为额外碳源的情况，以吐温 80 作为额外碳源时米曲霉发酵液中有更多的蛋白质分泌到发酵液中。在 24~48 h 之间，发酵液中蛋白含量增加，而在 48~72 h 之间蛋白总量略有减少，在 72 h~96 h 蛋白含量继续增加。在 96~120 h，蛋白含量逐渐降低。

2.3 不同额外碳源时米曲霉胞链接蛋白质的表达量研究

为了解米曲霉在葡萄糖与吐温 80 作为额外碳源时米曲霉胞链结蛋白含量的变化情况，对米曲霉在 192 h 内胞链结蛋白含量进行了测定，如图 3 所示。在以葡糖糖作为额外碳源时，培养 72 h，胞链结蛋白达到最大值为 5.65 mg/g，在 72 h 至 144 h 之间，胞链结蛋白含量逐渐降低，在 144 h 达到最小值为 2.72 mg/g；当以葡萄糖作为额外碳源时，米曲霉胞链结蛋白含量在 48 h 达到最大值为 1.71 mg/g.

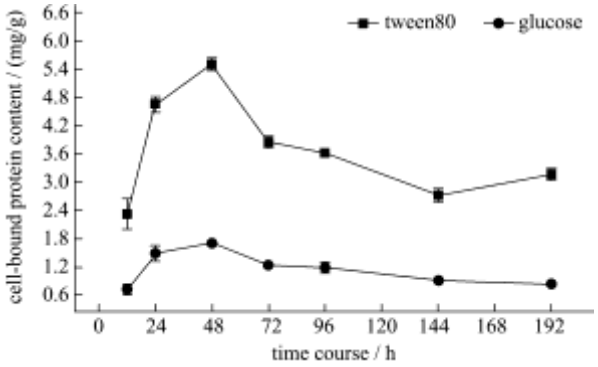


图 3 米曲霉胞链接蛋白随培养时间的变化情况

Fig.3 Changes of expression of cell-bound proteins following the culture time

2.4 培养时间对米曲霉胞链接蛋白质的表达量影响的SDS-page分析

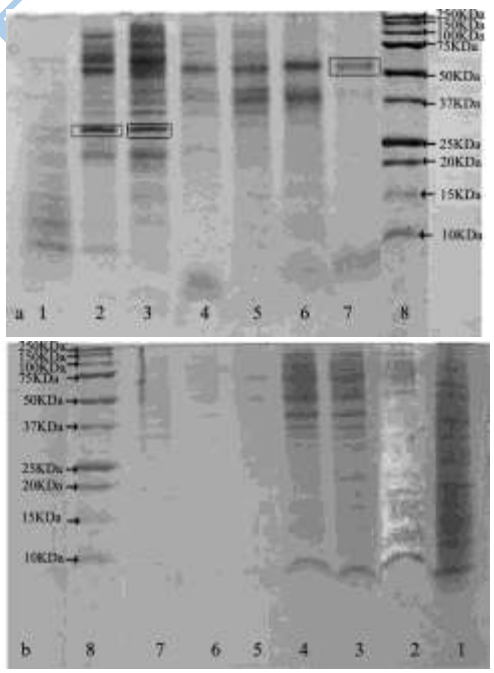


图 4 培养时间对胞链接蛋白表达的影响

Fig.4 Effects of culture time on expressions of cell-bound proteins

条带 No	1	2	3	4	5	6	7
图 a	12	12	14	7	7	3	1
图 b	19	16	14	13	4	3	5

注：图中是米曲霉分别以 0.5%吐温 80 或 0.5%葡萄糖作为额外碳源培养时胞链接蛋白质电泳图谱。a 图 0.5% tween 80 的胞链接蛋白，泳道 1：12 h，泳道 2：24 h，泳道 3：48 h，泳道 4：72 h，泳道 5：96 h，泳道 6：144 h，泳道 7：192 h，泳道 8：Marker: 从上至下依次为 250 kDa、150 kDa、100 kDa、75 kDa、50 kDa、37 kDa、25 kDa、20 kDa、15 kDa、10 kDa；b 图为葡萄糖作为额外碳源时米曲霉胞链结蛋白随时间的变化情况，泳道 1：12 h，泳道 2：24 h，泳道 3：48 h，泳道 4：72 h，泳道 5：96 h，泳道 6：144 h，泳道 7：192 h，泳道 8：Marker。

利用 SDS-PAGE 的方法研究了胞链接蛋白随培养时间的变化情况，如图 4 所示。以吐温 80 作为额外碳源对米曲霉进行培养时，随着培养时间的延长，米曲霉胞链接蛋白表达种类逐渐减少，在培养至 7 d时只能够在 50~60 kDa 附近发现一条蛋白质条带。相比之下，在以葡萄糖作为额外碳源培养米曲霉时，胞链接蛋白的种类也逐渐减少。在培养至 7 d时，蛋白质条带只有 5 条。王栋等利用吐温 80 提取胞膜蛋白时发现利用三油酸甘油酯诱导华根霉可以显著提高膜蛋白含量，从 0.915 g/mL 提高至 2.16 g/mL[18]。在吐温 80 作为诱导剂时，在 25~37 kDa 与 20~25 kDa 有两条表达量在 24~48 h 之间表达量较高，而在 48 h 后几乎不表达。这与米曲霉在 72 h 胞连接蛋白降低的 lowry 法测定结果相一致。在 192 h 只有一种蛋白能够很明显的被检测出来，其可能是导致其它蛋白水解的酶，其分子量在 50~60 kDa 之间。

2.5 培养时间对米曲霉胞产胞外蛋白质影响的 SDS-page分析

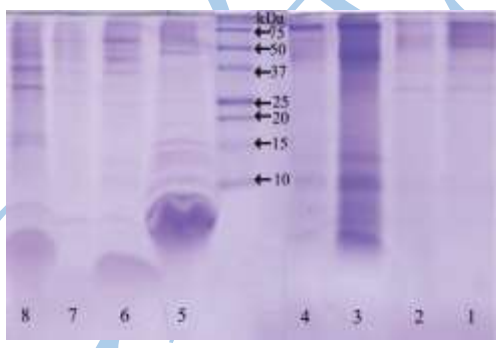


图 5 培养时间对发酵液中蛋白含量的影响

Fig.5 The changes of protein concentrations in fermentation broth following the time course

条带 No	1	2	3	4	5	6	7	8
条带数	5	5	9	5	12	7	7	11

注：图中是米曲霉分别以 0.5%葡萄糖和 0.5%吐温 80 作为额外碳源培养时发酵液蛋白电泳图谱。泳道 1：葡萄糖 12 h，泳道 2：葡萄糖 24 h，泳道 3：葡萄糖 48h，泳道 4：葡萄糖 144 h，泳道 5：吐温 12 h，泳道 6：吐温 24 h，泳道 7：吐温 48h，泳道 7：吐温 144 h。

根据发酵液电泳图谱（图 5），可知相比于胞链接蛋白，发酵液中的蛋白质种类从 12 h 至 144 h 都相对较低。从电泳条带上观察到的蛋白质含量与发酵液利用 Lowry 法测得的蛋白质含量变化情况大体一致。发酵液中蛋白质的种类没有胞连接的种类多。

3 结论

本研究首次分析了添加不同种类的额外碳源对所培养的米曲霉生物量、胞链接蛋白以及发酵液蛋白的影响。研究确定以葡萄糖作为额外碳源时，米曲霉生物量积累速度较快，在培养 24 h 已达最大值，为 31.97 g/L；当米曲霉以吐温 80 作为额外碳源时菌体积累较慢，在 96 h 时达到最大值，为 11.15 g/L。发酵液中蛋白总量在以葡萄糖作为额外碳源时比以吐温 80 时低。以吐温 80 作为额外碳源时，胞链结蛋白在 72 h 达到最大值的 5.65 mg/g，当以葡萄糖作为额外碳源时，米曲霉胞链结蛋白含量在 48 h 达到最大值，为 1.71 mg/g。利用 SDS-PAGE 检测 192 h 内蛋白质的表达与 lowry 法测定的蛋白质含量具有一致的变化趋势：在米曲霉的快速生长期和稳定期时胞链结蛋白种类增加，在衰退期胞链结蛋白种类减少。全细胞蛋白动态变化信息对全细胞催化剂的研究具有重要意义。

参考文献

[1] Kafarski P, Lejczak B. Application of bacteria and fungi as biocatalysts for the preparation of optically active hydroxyphosphonates [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2004, 29: 99-104

[2] Deive FJ, Carvalho E, Pastrana L, et al. Strategies for improving extracellular lipolytic enzyme production by *Thermus thermophilus* HB27 [J]. Bioresource Technology, 2009, 100(14): 3630-3637

[3] Hiol A, Jonzo MD, Rugani N, et al. Purification and characterization of an extracellular lipase from a *thermophilic Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2000, 26(5-6): 421-430

[4] Salah RB, Mosbah H, Fendri A, et al. Biochemical and molecular characterization of a lipase produced by *Rhizopus oryzae* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2006, 260(2): 241-248

[5] Hama S, Tamalampudi S, Fukumizu T, et al. Lipase Localization in *Rhizopus oryzae* Cells Immobilized within Biomass Support Particles for Use as Whole-Cell

Biocatalysts in Biodiesel-Fuel Production [J]. Journal of bioscience and bioengineering, 2006, 101(4): 328-333

[6] Razak CNA, Musani R, Basri M, et al. Characterization of Membrane-Bound Lipase from a *Thermophilic Rhizopus oryzae* Isolated from Palm Oil Mill Effluent [J]. JAOCS, 1999, 76(2): 171-174

[7] Nakashima T, Fukuda H, Kyotani S, et al. Culture conditions for intracellular lipase production by *Rhizopus chinensis* and its immobilization within biomass support particles [J]. Journal of fermentation technology, 1988, 66(4):441-448

[8] Long K, Ghazali HM, Ariff A, et al. Mycelium-bound lipase from a locally isolated strain of *Aspergillus flavus* link: pattern and factors involved in its production [J]. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 1996, 67(2):157-163

[9] Pereira-Meirelles FV, Rocha-Leao MHM, Sant' Anna GL. Lipase location in *Yarrowia lipolytica* cells [J]. Biotechnology Letters, 2000, 22(1): 71-75

[10] Abbadi N, Druet D, Comeau LC. Immunocytochemical identification and localization of lipase in cells of the mycelium of *Penicillium cyclopium* variety [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1995, 42(6): 923-930

[11] Nakashima T, Fukudo H, Kyotani S, et al. Culture Conditions for Membrane-Bound Lipase Production by *Rhizopus chinensis* and Its Immobilization within Biomass Support Particles [J]. Journal of Fermentation Technology, 1988, 66(4): 441-448

[12] Li XF, Zhu Z, Zhao GL, et al. Novel biocatalytic approach to acetylation of 1-β-D-arabinofuranosylcytosine by *Aspergillus oryzae* whole cell in organic solvents [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 93(1): 143-150

[13] 刘洪伟,许喜林,李晓凤.Tween 80 诱导下米曲霉 3.5232 产胞内脂肪酶的研究[J].现代食品科技,2012,28(8):911-914
Hongwei Liu, Xilin Xu, Xiaofeng Li. Purification of Lipases from Aspergillus oryzae 3.5232 Induced by Tween 80 [J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 93(1): 143-150

[14] Hama S, Tamalampudi S, Fukumizu T, et al. Lipase Localization in *Rhizopus oryzae* Cells Immobilized within Biomass Support Particles for Use as Whole-Cell Biocatalysts in Biodiesel-Fuel Production [J]. Journal of bioscience and bioengineering, 2006, 101(4): 328-333

[15] Wang, CS, Smith, RL. Lowry determination of protein in the presence of Triton X-100 [J]. Analytical Biochemistry, 1975, 63: 414-417

[16] Lowry OH, Rosebrough NJ, Lewis Farr, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent [J]. The journal of biological chemistry, 1951: 265-275

[17] 刘洪伟.具有催化核苷酰化反应活性的微生物脂肪酶定位及鉴定的研究[D].广州:华南理工大学,2012
LIU Hongwei. Study on localization and identification of microbial lipases with catalytic activity in regioselective acylation of nucleosides in cells [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2012