

## 研究报告

## 华根霉固态与液态培养产胞外蛋白的比较蛋白质组学分析

蔡君 王栋\* 徐岩

(工业生物技术教育部重点实验室 食品安全与营养协同创新中心 江南大学生物工程学院

酿造微生物及应用酶学研究室 江苏 无锡 214122)

**摘要:**【目的】考察固态和液态两种培养方式对丝状真菌华根霉(*Rhizopus chinensis*) CCTCC M201021 产胞外蛋白的影响,以加深对微生物固、液态培养特异性产酶的认识。【方法】利用成分相同的培养基对华根霉分别进行平板固态培养和液态培养,提取华根霉所产胞外蛋白,采用二维凝胶电泳(2-DE)结合质谱分析,分离鉴定差异蛋白。【结果】固态培养下华根霉所产胞外蛋白的蛋白酶活性是液态培养的 9.2 倍。胞外蛋白质组数据分析表明,华根霉固态和液态培养所产胞外蛋白存在显著差异,其中约 70%是固态和液态培养下各自产生的特有蛋白。质谱鉴定进一步表明,固、液态培养对华根霉产胞外蛋白的种类和表达量都有显著影响,其中水解酶类所占比例较大,主要是与蛋白质降解相关的蛋白。【结论】固态和液态不同培养方式影响了华根霉产胞外蛋白的组成,有些基因只在特定培养方式下表达。固态培养下华根霉产胞外蛋白酶种类相对更多以及大部分蛋白酶的上调表达,可能是固态培养下胞外蛋白酶活性很高的原因。研究结果提示需要注意固液态不同培养方式下丝状真菌胞外酶的筛选和生产可能存在的 inconsistency。

**关键词:** 华根霉, 胞外蛋白质组, 二维电泳(2-DE), 固液态培养

## Comparison of extracellular proteome from *Rhizopus chinensis* in solid-state and submerged cultures

CAI Jun WANG Dong\* XU Yan

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education; Synergetic Innovation Center for Food Safety and Nutrition; Center for Brewing Science and Enzyme Technology, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

**Abstract:** [Objective] We studied the influence of solid-state and submerged cultures on the extracellular proteome of filamentous fungus *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021, to understand the specificity of enzyme production by filamentous fungi in different cultures. [Methods] Using

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 31271920); National Key R&D Program (No. 2016YFD0400503); Top-notch Academic Programs Project of Jiangsu Higher Education Institutions (No. PPZY2015A056)

**\*Corresponding author:** Tel: 86-510-85197082; E-mail: dwang@jiangnan.edu.cn

**Received:** February 28, 2016; **Accepted:** April 14, 2016; **Published online** (www.cnki.net): May 10, 2016

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(No. 31271920); 国家重点研发计划项目(No. 2016YFD0400503); 江苏省高校品牌特色专业建设工程(No. PPZY2015A056)

**\*通讯作者:** Tel: 86-510-85197082; E-mail: dwang@jiangnan.edu.cn

**收稿日期:** 2016-02-28; **接受日期:** 2016-04-14; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2016-05-10

same media, we carried out solid-state agar-plate culture and submerged culture of *R. chinensis*. Two-dimensional electrophoresis (2-DE) and MALDI-TOF/TOF-MS were used to analyze the extracted extracellular proteins, and the differential proteins were identified. **[Results]** Protease activity of extracellular protein from the solid-state culture was much higher (9.2-fold) than that from submerged culture. The 2-DE gel maps indicate the differences in the extracellular proteomes between solid-state and submerged cultures, and most proteins (about 70%) were special from solid-state or submerged culture. After identification, the variety and expression level of extracellular proteins from the two different cultures were significantly different. Among these differential proteins, hydrolases were the majority, most of which were related with protein degradation. **[Conclusion]** Different cultures influenced the composition of extracellular proteome by *R. chinensis*, and some proteins were only expressed in a specific culture. Relatively more variety and higher expression level of some proteases under solid-state culture could be the reason, which resulted in the much higher protease activity of extracellular protein. These results suggested the possible inconsistencies of extracellular enzymes produced by filamentous fungi between the strain screening and submerged fermentation in industry production, when solid-state culture and submerged culture were used.

**Keywords:** *Rhizopus chinensis*, Extracellular proteome, Two-dimensional electrophoresis (2-DE), Solid-state and submerged culture

丝状真菌是一类重要的工业微生物,除了用于传统发酵食品和饮料工业,由于其强大和多样化的代谢能力使其在医药、食品、化工和能源等众多领域有着广泛的应用<sup>[1-4]</sup>。现代发酵工业对丝状真菌已广泛采用液态培养进行工业生产;而在自然状态下丝状真菌通常在固态基质上生长,人们利用丝状真菌固态发酵来获得相应产品也有悠久的历史。在工业微生物的筛选过程中,也经常利用平板固态培养进行目的菌株的筛选。许多研究表明,丝状真菌固态发酵可以得到较高的产酶水平<sup>[5-6]</sup>。近年来的研究发现,丝状真菌固态发酵和液态发酵所产酶类及其产酶机制也存在差异。Asther等<sup>[7]</sup>研究发现在固态和液态培养条件下黑曲霉(*Aspergillus niger*) I-1472对于不同甲酯底物产生的酯酶酶谱明显不同。Te Biesebeke等<sup>[8]</sup>将米曲霉(*A. oryzae*)固态和液态发酵提取物中的蛋白条带进行N-端测序分析,发现液态发酵主要高产 $\alpha$ -淀粉酶、阿拉伯糖苷酶和木聚糖酶;而在固态发酵中除了分泌 $\alpha$ -淀粉酶和几丁质酶外,还能够生成其他蛋白。Oda等也发现固态培养米曲霉会分泌更多种类的淀粉水解酶<sup>[9]</sup>。虽然固、液态培养基成分的差异可能会影响不同胞外蛋白的表达和分泌,但固、液态培养

方式的不同也可能会影响丝状真菌的代谢及酶的合成。由于丝状真菌生理生化以及代谢特性的复杂性,目前对其酶和代谢产物合成调控机制的认识尚不清晰。随着后基因组学的发展,包括基因组学、转录组学和蛋白质组学等在内的组学方法为在分子水平上研究丝状真菌提供了有力手段。目前关于固、液态培养研究较多的丝状真菌是米曲霉,相关研究多集中在部分基因的转录调控方面<sup>[6-10]</sup>,针对丝状真菌固液态培养的胞外蛋白质组学研究还不多见。

华根霉(*Rhizopus chinensis*) CCTCC M201021是从我国传统固态酿造白酒大曲中筛选得到的一株丝状真菌,其液态发酵生产的酶蛋白在食品、生物香料、表面活性剂等领域具有良好的工业应用价值<sup>[11-13]</sup>。该菌株的全基因组序列近来已被测序完成<sup>[14]</sup>,并已在美国 Joint Genome Institute (JGI)的 MycoCosm 真菌基因组数据库发布(<http://genome.jgi.doe.gov/Rhich1/Rhich1.home.html>)。本研究利用主要成分相同的固态和液态培养基对华根霉进行培养,基于二维凝胶电泳(2-DE)技术对华根霉在两种培养条件下的胞外蛋白进行分析,考察不同培养方式对华根霉产胞外蛋白的影响及其

产胞外酶特性, 加深对微生物固液态培养特异性产酶的认识, 为微生物特定筛选方法和培养方式的选择提供一定的依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和试剂

**1.1.1 菌株:** 华根霉 (*R. chinensis*) CCTCC M201021 由江南大学酿造微生物学及应用酶学研究室筛选保藏。

**1.1.2 培养基:** 马铃薯-葡萄糖琼脂斜面培养基(g/L): 马铃薯 200.0, 葡萄糖 20.0, 琼脂 2.0, pH 自然。固态培养基(20 mL/平板) (g/L): 鱼粉蛋白胨 40.0, 麦芽糖 10.0,  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  2.0,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5, 橄榄油 22.5, 琼脂 2.0, pH 自然。液态培养基(20 mL/瓶) (g/L): 鱼粉蛋白胨 40.0, 麦芽糖 10.0,  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  2.0,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5, 橄榄油 22.5, pH 自然。

**1.1.3 主要试剂:** IPG 预制胶条(pH 3.0–10.0, 18 cm, 线性), IPG Buffer (pH 3.0–10.0), 矿物油, 3-[(3-胆固醇氨基丙基)二甲氨基]-1-丙磺酸(CHAPS), 二硫苏糖醇(DTT), 碘乙酰胺(IAA)和 2D Clean-up Kit 试剂盒均购自瑞典 GE 公司; Tris-HCl (1.5 mol/L, pH 8.8)和低熔点琼脂糖购自美国 Bio-Rad 公司;  $N,N,N',N'$ -四甲基乙二胺(TEMED)、碳酸氢铵( $NH_4HCO_3$ )、胰蛋白酶和乙腈(ACN)均购自美国 Sigma 公司; 1%溴酚蓝储液、非干扰型蛋白浓度测定试剂盒、蛋白酶抑制剂、丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺溶液(37.5:1, 40%)和考马斯亮蓝 G-250 均购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 其它试剂均为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司。

**1.1.4 主要仪器:** 酶标仪购自美国 Thermo Fisher 公司; Ettan<sup>TM</sup> IPGphor3 等电聚焦仪、Ettan<sup>TM</sup> DALTSix 垂直电泳系统和 ImageScannerIII 扫描仪均购自瑞典 GE 公司; 贝克曼 Avanti J-E 离心机购自美国 Beckman Coulter 公司; 立式冷冻离心机(3K15)购自美国 Sigma 公司; 冷冻干燥机和真空离心浓缩仪购自美国 LABCONCO 公司; 激光解析电

离串联飞行时间质谱(MALDI-TOF/TOF-MS)及相关软件购自德国 Bruker Daltonics 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 培养方法及条件:** 参照 Teng 等<sup>[15]</sup>报道的方法进行以下操作。孢子培养及孢子悬浮液制备: 将保藏的华根霉菌株划线到马铃薯-葡萄糖琼脂斜面培养基后于 30 °C 培养 72 h。向斜面培养基中加入适量无菌生理盐水, 用接种环收集菌体并将其转移到含有玻璃珠的锥形瓶中, 不断摇晃使孢子分散。将含有华根霉孢子的生理盐水通过两层擦镜纸以滤去菌丝制成孢子悬浮液备用。液态培养条件: 20 mL 液态培养基于 150 mL 三角瓶中, 旋转式摇床 200 r/min、30 °C 培养 72 h, 菌体生长基本达到稳定期。为控制培养基组成, 固态培养采用平板培养方法: 20 mL 固态培养基平板在 30 °C 恒温培养箱中培养 72 h。接种量: 固态培养为每毫升  $10^8$  个孢子, 液态培养为每毫升  $10^9$  个孢子。

**1.2.2 样品的制备:** 参照 Oda 等<sup>[9]</sup>的操作方法略有改变, 主要步骤包括: 液态培养结束后, 发酵液经 12 000 r/min 离心 30 min, 收集上清液经 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤后作为胞外蛋白样品。分离得到的菌体冻干 48 h 后称重得到液态培养生物量。固态培养结束后, 从平板上刮下菌体, 收集后冻干 48 h, 称重得到固态培养生物量。除去菌体的培养基碾碎后加入 50 mmol/L、pH 5.0 的醋酸缓冲液(50 mL/平板), 放置于 4 °C 浸提蛋白 8–10 h, 12 000 r/min 离心 30 min 后收集上清液, 经 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤后作为胞外蛋白样品。

**1.2.3 胞外蛋白提取及二维电泳样品的制备:** 依据 2D Clean-up Kit 试剂盒使用说明处理液态培养发酵液和固态培养浸提液以制备二维电泳蛋白样品。将上述制得的蛋白样品与电泳上样水化液[7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 4% CHAPS (质量体积比), 65 mmol/L DTT, 0.2% IPG Buffer (体积比)和 0.1% 的 1%溴酚蓝储液(体积比)]充分混合至蛋白样品完全溶解, 用非干扰型蛋白浓度测定试剂盒对水化液中蛋白质浓度进行定量。

**1.2.4 二维凝胶电泳(2-DE):** 参照 Zhang 等<sup>[16]</sup>的文献以及 GE 公司《二维电泳原理和方法》中的相关步骤采用 pH 3.0–10.0, 18 cm 线性胶条进行二维电泳。IPG 胶条于 20 °C 水化过夜后进行等电聚焦。最终确定的蛋白上样量为 400 µg, 上样体积为 350 µL。在 Ettan<sup>TM</sup> IPGphor3 等电聚焦仪中, 按照以下程序完成等点聚焦: 250 V, 2.5 h; 500 V, 1.5 h; 1 000 V, 1.5 h; 2 000 V, 2 h; 4 000 V, 2 h; 8 000 V, 2.5 h; 8 000 V 维持 7.5 h; 500 V 维持。将等电聚焦完的 IPG 胶条在平衡液 I [6 mol/L 尿素, 2% SDS, 0.375 mol/L Tris-HCl (1.5 mol/L, pH 8.8), 20% 甘油, 20 g/L DTT] 和平衡液 II [6 mol/L 尿素, 2% SDS, 0.375 mol/L Tris-HCl (1.5 mol/L, pH 8.8), 20% 甘油, 25 g/L IAA] 中分别平衡 15 min。将 IPG 胶条转移到 12% SDS-PAGE 凝胶上, 在 Ettan<sup>TM</sup> DALTSix 垂直电泳系统中进行 SDS-PAGE 电泳。电泳条件为: 2 W/胶, 1.5 h; 14 W/胶直至溴酚蓝染料到达凝胶底部。电泳完成后采用考马斯亮蓝 G-250 染色法<sup>[17]</sup>进行凝胶染色, 脱色后使用 ImageScanner 获得凝胶图像并采用 PD-Quest 8.0.1 软件进行图像分析。经软件检测后在平行的 3 张胶图上均发现的点继续进行后续操作。

**1.2.5 蛋白质酶解及分析:** 二维电泳图谱中的蛋白点参照 Jin 等<sup>[18]</sup>的方法进行分析。样品经胰酶酶解, 并用 MALDI-TOF/TOF-MS 进行质谱鉴定。一级质谱方法采用正离子反射模式采集质谱数据, 质谱扫描的质荷比范围为 700–3 500, 激光发射次数为 500。选取一级质谱中信号较强的母离子进行二级质谱分析, 采用 LIFT 的方法, 激光发射次数为 2 000, 从而得到样品的肽质量指纹图谱。利用 FlexAnalysis 软件对得到的图谱进行分析。将 MALDI-TOF/TOF-MS 上获得的数据采用 BioTool 软件结合 JGI 上的华根霉基因组数据库 (<http://genome.jgi.doe.gov/Rhich1/Rhich1.home.html>) 进行基因注释和功能检索。

**1.2.6 蛋白样品酶活力的测定:** 参考 Cupp-Enyard<sup>[19]</sup>的文献采用酪蛋白作为底物来测定样品中蛋白酶的活性。

## 2 结果与讨论

### 2.1 华根霉固态和液态培养结果

利用成分相同的培养基, 华根霉经平板固态培养和液态培养后进行胞外蛋白及蛋白酶活性分析, 结果如表 1 所示。液态培养有利于华根霉菌体的增长, 其生物量约为固态培养的 1.4 倍。虽然固态培养所得生物量较低, 但是与许多报道类似<sup>[5-6]</sup>, 固态培养所产胞外蛋白酶活性远高于液态培养, 为液态培养的 9.2 倍。由于培养基成分相同, 固态和液态培养方式的不同应该是造成华根霉胞外酶活性差异的主要原因, 结合蛋白浓度的差异, 这种酶活性的差异很可能主要不是由酶表达量的差异, 而是由酶的种类或者胞外蛋白的组成差异引起的。

### 2.2 华根霉固态和液态培养胞外蛋白质组的二维电泳图谱分析

为考察胞外蛋白的组成差异, 采用二维电泳方法对华根霉不同培养方式的胞外蛋白进行分析。经二维电泳分离, 华根霉固态和液态培养分别得到的 3 个胞外蛋白重复样品得到了非常相似的二维电泳图谱, 蛋白斑点的匹配度分别为 89.4% 和 90.5%, 表明该二维电泳分析具有良好的重复性。典型的 2D 电泳图谱如图 1 所示。比较两个图谱可以直观地发现, 两者间存在着显著的蛋白点差异。进一步对图谱进行软件分析, 分别在固态培养和液态培养的胞外蛋白 2D 电泳图谱上检测到 57 个和 69 个蛋白点(两组胶图中分别重复出现 3 次), 其中

表 1 华根霉固态和液态培养结果比较  
Table 1 Comparison of solid-state and submerged cultures of *R. chinensis*

培养方式 Culture	生物量 Biomass (g/L)	胞外蛋白浓度 Protein concentration (g/L)	胞外蛋白酶活性 Protease activity (U/mL)
固态培养 Solid-state culture	24.00±0.48	0.32±0.04	187.23±4.78
液态培养 Submerged culture	33.50±0.64	0.90±0.07	20.28±0.42

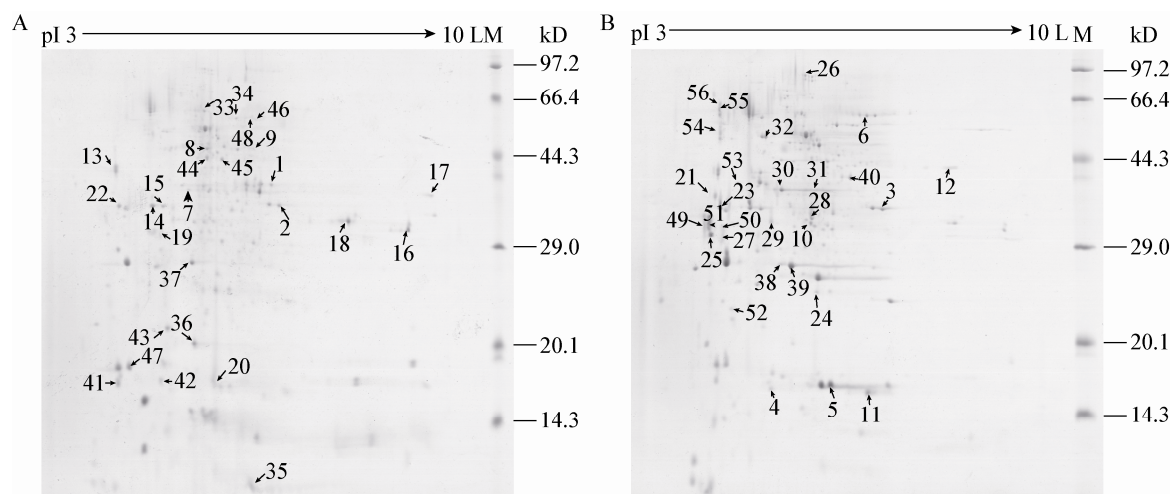


图1 华根霉固态培养(A)和液态培养(B)胞外蛋白二维凝胶电泳图谱

Figure 1 2-DE gel map of extracellular proteins from solid-state (A) and submerged (B) cultures of *R. chinensis*

固态和液态培养的独有蛋白点分别为 39 个和 51 个,共有蛋白点有 18 个(蛋白点数量分布如图 2 所示)。将两组胶图中表达量差异 $\geq 2$  倍且  $P < 0.05$  的蛋白点认为是固态培养和液态培养的胞外差异蛋白点,则共有蛋白点中有 12 个差异蛋白点。由此可见,不同培养方式下,华根霉所产的胞外蛋白差异显著,其中独有蛋白两者分别占了各自蛋白点的 68%和 74%;即使是共有蛋白,其中大部分蛋白(约 67%)的表达量也存在显著差异。这一结果初步表明,固态培养和液态培养对于华根霉产胞外蛋白有着直接的影响,胞外蛋白的组成存在显著差异。

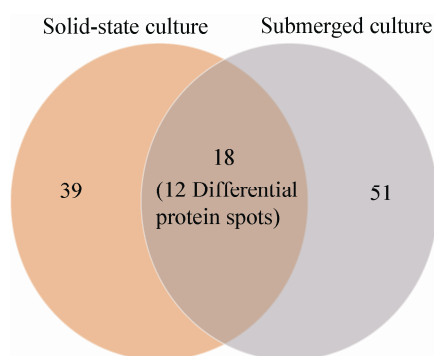


图2 华根霉固态和液态培养二维电泳胞外蛋白点分布

Figure 2 Number distribution of unique and shared protein spots of the extracellular proteomes from solid-state and submerged cultures of *R. chinensis*

### 2.3 胞外差异蛋白的鉴定及分类

将检测到的独有和差异蛋白点经 MALDI-TOF/TOF-MS 鉴定并根据华根霉基因组数据库进行胞外蛋白的功能注释,除去许多假定蛋白及功能未知蛋白,最终鉴定得到功能的胞外蛋白共 56 个蛋白点,其中大部分仍是独有蛋白。固态培养独有的蛋白点为 18 个,液态培养独有蛋白点 29 个,两者共有的差异蛋白点 9 个。这些共有的差异蛋白中,大部分为固态培养显著上调表达的蛋白。表 2 为这 56 个蛋白点的注释,其中水解酶按照水解类型进行了进一步区分。这些蛋白的功能分类如图 3 所示,其各自在二维电泳图谱中的位置已在图 1 中标出。

经鉴定的蛋白点功能种类较多,比较华根霉固态和液态培养得到的胞外蛋白功能和种类,可以发现存在较明显的差异(表 2、图 3)。不仅不同培养方式产生的许多独有蛋白功能和种类不同,功能类似的蛋白在不同培养方式下也多是由不同基因表达。按照酶学分类数量最多的是水解酶类(图 3),约占其中的 38% (21 个蛋白点),这与胞外蛋白主要参与营养物质的获取相关。以水解酶为例,有些蛋白仅液态培养得到(如酯键水解酶),有些仅固态培养产生(如几丁质酶);对功能相同的酶(如天冬氨酸蛋白酶),固液态培养也是由不同基因编码

表 2 鉴定蛋白点的功能注释  
Table 2 Functional annotation of identified protein spots

编号 Spot No.	基因 Gene	理论分子量/等电点 Theoretical mass (kD)/pI	实际分子量/等电点 Experimental mass (kD)/pI	蛋白描述 Protein description	比率 <sup>a</sup> Ratio	得分 <sup>b</sup> Score
<b>Oxidoreductases</b>						
1	A11658	34.92/6.33	40.48/6.62	NAD-dependent malate dehydrogenase	S	94
2			37.03/6.74		0.46	154
3	A09161	35.64/8.52	37.10/7.02	NAD-dependent malate dehydrogenase	L	196
4	A00642	35.32/5.63	17.03/5.29	Thioredoxin reductase	L	319
5	A01185	15.78/5.74	17.37/6.08	Cu <sup>2+</sup> /Zn <sup>2+</sup> superoxide dismutase (SOD1)	L	101
6	A07336	60.83/6.55	59.03/6.77	Delta(1)-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	L	59
<b>Transferases</b>						
7	A04609	35.73/5.39	33.97/4.98	Transaldolase	S	98
8	A00208	44.58/5.89	49.10/5.65	3-Phosphoglycerate kinase	S	118
9	A02640	47.02/5.89	50.07/6.35	Ornithine aminotransferase	S	120
10	A14029	32.99/5.56	34.33/5.89	Spermidine synthase	L	110
11	A08898	13.22/7.73	16.69/6.77	Nucleoside diphosphate kinase	L	241
12	A09643	47.21/8.73	43.94/8.11	Aspartate aminotransferase	L	40
<b>Hydrolases</b>						
<b>Acting on peptide bonds</b>						
13	A13528	102.00/5.06	42.77/4.32	Aspartyl protease	S	261
14	A04813	40.46/7.50	36.65/4.86	Aspartic proteinase	S	812
15			33.65/4.86		3.90	304
16	A05899	62.94/9.70	32.83/8.65	Subtilisin-related protease	5.99	106
17	A04838	62.82/9.65	28.56/8.95	Subtilisin-related protease	S	131
18			33.97/7.77		18.18	197
19	A01284	58.28/5.12	33.97/4.98	Serine carboxypeptidases	S	189
20	A00335	58.19/5.06	17.11/5.80	Serine carboxypeptidases	S	30
21	A09980	41.43/5.36	39.16/4.40	Aspartyl protease	L	715
22			37.03/4.35		0.49	997
23	A11411	41.33/5.94	38.98/4.45	Aspartyl protease	L	138
24	A05635	48.06/6.99	25.90/6.02	Aspartyl protease	L	32
25	A07771	99.82/5.76	32.20/4.32	Puromycin-sensitive aminopeptidase	L	549
26	A08721	77.36/5.48	98.02/5.80	Dipeptidyl aminopeptidase	L	66
<b>Acting on ester bonds</b>						
27	A16284	63.84/9.48	32.55/4.51	Hormone-sensitive lipase	L	58
28	A07081	34.28/5.72	35.40/5.92	Alkaline phosphatase	L	303
29	A02285	27.11/5.30	34.69/5.29	Ribonuclease	L	53
<b>Acting on acid anhydrides</b>						
30	A08632	32.18/5.24	40.71/5.47	Inorganic pyrophosphatase	L	361
31			40.38/6.11		L	280
32	A00873	12.65/8.23	55.68/4.20	F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> -type ATP synthase, beta subunit	L	136
<b>Glycosylases</b>						
33	A13812	54.87/5.38	66.38/5.62	Chitinase	S	117

(待续)

							(续表)
<b>Isomerases</b>							
34	A16561	62.44/5.84	62.56/60.8	Glucose-6-phosphate isomerase	S	71	
35	A05913	53.06/6.11	8.48/6.38	Fructose-2,6-biphosphatase	S	36	
36	A09038	27.50/5.42	19.92/5.50	Triosephosphate isomerase	4.43	68	
37			27.89/5.44		2.21	311	
38			28.61/5.47		L	247	
39			28.42/5.59		L	423	
<b>Ligases</b>							
40	A08526	81.19/6.65	42.52/6.51	E3 ubiquitin protein ligase	L	35	
<b>Other proteins</b>							
41	A13941	16.00/4.97	17.64/4.38	Actin depolymerizing factor	S	50	
42			17.11/5.02		S	277	
43	A17336	20.34/5.19	21.44/5.11	Uncharacterized conserved protein, contains ML domain	S	166	
44	A12616	70.49/5.17	45.26/5.65	Molecular chaperones HSP70/HSC70, HSP70	S	154	
45			45.26/5.89	superfamily	S	231	
46	A00900	143.43/6.08	66.56/6.38	Mismatch repair ATPase MSH2	S	182	
47	A11841	29.88/4.48	18.17/4.56	Mitochondrial matrix glycoprotein	3.28	187	
48	A10237	158.01/5.94	59.03/6.56	Mismatch repair ATPase MSH2	4.13	119	
49	A08191	19.04/4.26	35.76/4.26	Stromal cell-derived factor 2, contains MIR domains	L	249	
50			33.98/4.49		L	60	
51	A16562	19.01/4.28	35.75/4.30	Stromal cell-derived factor 2, contains MIR domains	L	186	
52	A04379	18.58/4.57	24.35/4.71	Uncharacterized conserved protein	L	320	
53	A16773	292.32/5.56	41.45/4.77	Beta-spectrin	L	34	
54	A11922	47.10/4.43	55.68/4.46	Calreticulin	L	38	
55			65.06/4.46		L	229	
56			66.42/4.46		L	93	

注：<sup>a</sup>：比率为二维电泳图谱中固态培养与液态培养蛋白丰度之比，其中 S 和 L 分别表示为固态培养和液态培养的独有蛋白点；<sup>b</sup>：得分为 MALDI-TOF/TOF-MS 鉴定得分。

Note: <sup>a</sup>: Ratio means the ratio of protein abundances between the samples from the solid-state culture and submerged culture; S or L indicate the proteins only expressed in solid-state culture or submerged culture, respectively. <sup>b</sup>: Score is the score of identification by MALDI-TOF/TOF-MS.

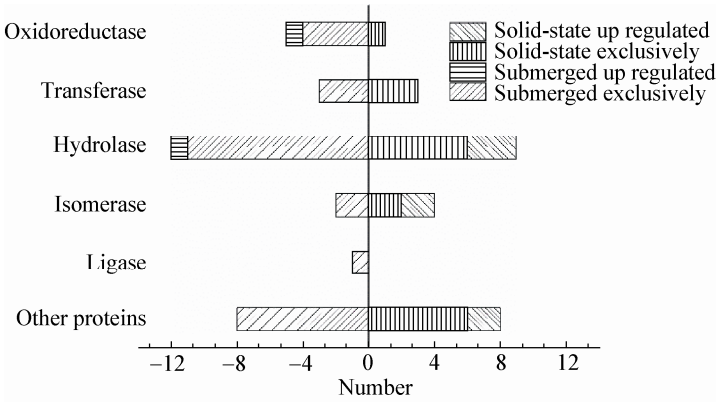


图 3 固液态培养差异蛋白点的功能分类

Figure 3 The functional classification of identified differential protein spots from solid-state and submerged cultures



的同工酶或者表达量差异显著。丝状真菌分泌胞外蛋白经常受到底物基质的影响<sup>[20-21]</sup>, 本研究中固液态培养基组成相同, 华根霉产胞外蛋白组成的差异并非是培养基组成的影响。这些结果说明, 即便对于相同成分的培养基, 不同培养方式下华根霉也会产生功能和种类明显不同的胞外蛋白, 可能是微生物针对不同外部环境产生不同响应, 进而调节相应基因的表达和分泌。这种调节可能是多方面的。有研究报道米曲霉固液态不同培养方式在转录水平调节了不同基因的表达<sup>[6]</sup>。而本研究中还发现存在同一基因的不同蛋白产物(如表 2 中同一基因对应多个蛋白点), 固液态培养方式可能对胞外蛋白的翻译及翻译后修饰也存在调节。由于丝状真菌的复杂性, 关于丝状真菌对于固液态环境的响应机制目前尚不清楚, 许多胞外蛋白的功能也不很明确, 固液态培养在传质、混合等培养特性方面的差异也较为复杂, 不同培养方式对胞外蛋白的调节还需要进一步研究。

在鉴定的水解酶中, 与蛋白质降解相关的蛋白点占了很高的比率(67%), 这可能与培养基中含有较多氮源有关。针对这些蛋白降解酶进行分析可以发现(表 2), 两种培养方式产生的蛋白酶种类存在差异。除了内切蛋白酶外, 固态培养还主要产生羧肽酶, 而液态培养则产生氨肽酶, 而这一现象未曾在其它丝状真菌中有过报道。固态培养产生的蛋白酶种类相对更多, 大部分共有蛋白酶表达得到了上调, 个别蛋白酶上调表达很大, 如 Subtilisin 蛋白酶(蛋白点 18)固态培养较液态培养上调表达了 18 倍。表 1 中华根霉固态培养胞外蛋白酶活性远高于液态培养的结果可以由此得到解释。我们可以推测, 丝状真菌在固态培养条件下可以得到较高的产酶水平可能与其分泌更为多样的同工酶以及部分酶表达量更高有关。

### 3 结论

本研究采用二维凝胶电泳结合 MALDI-TOF/TOF-MS 的蛋白质组学方法比较了华根霉在固态和

液态培养下产胞外蛋白的情况。二维凝胶电泳图谱显示两者胞外蛋白存在明显不同, 其中大部分为各自的独有蛋白, 部分共有蛋白表达量也有显著差异。质谱鉴定进一步表明, 华根霉产胞外蛋白的组成和功能受到固液态不同培养方式的显著影响, 蛋白表达的种类和表达量都有明显的变化, 有些蛋白仅在特定培养方式下表达。这可能是华根霉针对不同外部环境产生不同的响应, 调节相应基因表达的结果。在胞外差异蛋白中水解酶类所占比例较大, 其中很大一部分与蛋白质降解相关。固态培养下华根霉产蛋白酶的种类相对更多以及大部分共有蛋白酶的上调表达, 可能是固态培养所产胞外蛋白酶的活性远高于液态培养的原因。

本研究结果表明, 采用固、液态不同培养方式, 丝状真菌产胞外蛋白可能存在显著差异。由于平板固态培养是常用的微生物筛选方法, 而液态发酵则是现代发酵工业广泛采用的生产方法, 因此对于工业微生物的筛选及培养可能需要引起注意: 在菌种筛选时, 不能采用单一的筛选方式; 而在工业发酵中, 为生产得到特定酶蛋白产物, 也应选择相应的培养方式。

### 参 考 文 献

- [1] Gibbs PA, Seviour RJ, Schmid F. Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2000, 20(1): 17-48
- [2] Dufossé L, Fouillaud M, Caro Y, et al. Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2014, 26: 56-61
- [3] Hevekerl A, Kuenz A, Vorlop KD. Filamentous fungi in microtiter plates-an easy way to optimize itaconic acid production with *Aspergillus terreus*[J]. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2014, 98(16): 6983-6989
- [4] Pérez-Rodríguez N, Oliveira F, Pérez-Bibbins B, et al. Optimization of xylanase production by filamentous fungi in solid-state fermentation and scale-up to horizontal tube bioreactor[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2014, 173(3): 803-825
- [5] Abe K, Gomi K, Hasegawa F, et al. Impact of *Aspergillus oryzae* genomics on industrial production of metabolites[J]. *Mycopathologia*, 2006, 162(3): 143-153
- [6] Imanaka H, Tanaka S, Feng B, et al. Cultivation characteristics and gene expression profiles of *Aspergillus oryzae* by membrane-surface liquid culture, shaking-flask culture, and agar-plate culture[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2010, 109(3): 267-273



- [7] Asther M, Haon M, Roussos S, et al. Feruloyl esterase from *Aspergillus niger*: a comparison of the production in solid state and submerged fermentation[J]. Process Biochemistry, 2002, 38(5): 685-691
- [8] Te Biesebeke R, Boussier A, van Biezen N, et al. Identification of secreted proteins of *Aspergillus oryzae* associated with growth on solid cereal substrates[J]. Journal of Biotechnology, 2006, 121(4): 482-485
- [9] Oda K, Kakizono D, Yamada O, et al. Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under submerged and solid-state culture conditions[J]. Applied Environmental Microbiology, 2006, 72(5): 3448-3457
- [10] Te Biesebeke R, van Biezen N, De Vos WM, et al. Different control mechanisms regulate glucoamylase and protease gene transcription in *Aspergillus oryzae* in solid-state and submerged fermentation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 67(1): 75-82
- [11] Ghanem A, Aboul-Enein HY. Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents[J]. Tetrahedron: Asymmetry, 2004, 15(21): 3331-3351
- [12] Xu Y, Wang D, Mu XQ, et al. Efficient esterification of sorbitan oleate by lipase in a solvent-free system[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2003, 80(7): 647-651
- [13] Shan TY, Wang D, Xu YH, et al. Kinetic resolution of 2-octanol by esterification with mycelium-bound lipase from *Rhizopus chinensis*[J]. Chinese Journal of Catalysis, 2008, 29(4): 403-408 (in Chinese)
- 单天宇, 王栋, 徐岩华, 等. 根霉菌丝体结合脂肪酶催化酯合成动力学拆分 2-辛醇[J]. 催化学报, 2008, 29(4): 403-408
- [14] Wang D, Wu R, Xu Y, et al. Draft genome sequence of *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021, used for brewing traditional Chinese alcoholic beverages[J]. Genome Announcements, 2013, 1(2): e00195-12
- [15] Teng Y, Xu Y, Wang D. Changes in morphology of *Rhizopus chinensis* in submerged fermentation and their effect on production of mycelium-bound lipase[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2009, 32(3): 397-405
- [16] Zhang B, Guan ZB, Cao Y, et al. Secretome of *Aspergillus oryzae* in Shaoxing rice wine koji[J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 155(3): 113-119
- [17] Candiano G, Bruschi M, Musante L, et al. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis[J]. Electrophoresis, 2004, 25(9): 1327-1333
- [18] Jin Z, Mu YW, Sun JY, et al. Proteome analysis of metabolic proteins (pI 4-7) in Barley (*Hordeum vulgare*) malts and initial application in malt quality discrimination[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(2): 402-409
- [19] Cupp-Enyard C. Sigma's non-specific protease activity assay-casein as a substrate[J]. Journal of Visualized Experiments, 2008(19): 899
- [20] Lu X, Sun JB, Nimtz M, et al. The intra- and extracellular proteome of *Aspergillus niger* growing on defined medium with xylose or maltose as carbon substrate[J]. Microbial Cell Factories, 2010, 9: 23
- [21] Jun H, Kieselbach T, Jönsson LJ. Enzyme production by filamentous fungi: analysis of the secretome of *Trichoderma reesei* grown on unconventional carbon source[J]. Microbial Cell Factories, 2011, 10: 68