

一株乳酸菌细胞壁上的凝集淀粉因子

I. 电 子 显 微 镜 观 察

徐 浩 陈晓冬 李 悦

(中国科学院微生物研究所, 北京)

刘美莲 刘仲岑

(北京市粉丝厂)

由粉丝厂的酸浆中分离到一株有强大的凝集淀粉能力的纯培养菌, 初步定名为乳酸链球菌(*Streptococcus lactis*)。用扫描电镜直接观察证明凝集淀粉因子位于细胞壁的外侧。同样可以用离体细胞壁观察到淀粉凝集活性。用胰凝乳蛋白酶处理细胞可使凝集淀粉能力丧失, 证明这种凝集因子是位于壁上的一种功能蛋白。用溶菌酶处理菌体, 用 90,000 倍相对离心力所得的上清液也有凝集淀粉活性, 从而证明这种蛋白能溶于水中, 它很可能是一种外源凝集素类物质。

细菌细胞壁的构造, 除了主要的碳骨架外, 壁上还附有一些具有某些生物学功能的蛋白。它们为量虽小, 但极其重要。这一点虽然早已为人所共知, 但由于研究方法上的限制, 匀浆制取细胞壁时不易除去污染的细胞质蛋白, 因此不论在证明其存在方面, 或对它的性质的研究方面, 都存在着很大困难。为此我们选择适宜的研究对象, 用直接观察的方法予以定位后再进行因子的定性研究。

我国传统上就利用一种含有复杂的细菌区系的酸浆去凝集豆粕(一种豆类种子加水磨碎的产品)中的淀粉。这种工艺已经沿用了数百年, 用这种方法生产的淀粉制成的粉丝, 是一种重要的副食品。关于酸浆引起淀粉凝集已有人报道过^[1]。本文证明凝集淀粉因子是位于乳酸链球菌细胞壁上的一种功能蛋白。

材料与方法

1. 菌种的分离鉴定

通常工厂中使用的酸浆是在一定环境中, 经天然发酵形成的。酸浆中的微生物区系较复杂, 微生物学研究的第一步应当是分离纯系的淀粉凝集菌, 所用培养基成份如下:

(1) 固体培养基(克%)		(2) 液体培养基(克%)	
葡萄糖	1	葡萄糖	1
碳酸钙	1	酵母提取物	0.5
酵母提取物	0.5	用0.2 M(pH 6.6)的	
琼脂	1.8	磷酸缓冲液配制。	
pH	7.0		

平皿划线四次分出纯菌。在分出的 48 株菌

本文于 1979 年 6 月 12 日收到。

① 本工作是在本所技术室电镜组和离心机组合作下完成的, 参加的人员有顾跃文、初昭峰、刘如臻、王永力。

② 生物物理所电镜组给予本工作以全面合作, 本所徐绍华同志协助进行部分切片工作, 特此致谢。

中,选择有较强的凝集淀粉活性、并在 30℃ 左右生长较好的第 21 号菌作为本工作的研究材料。

2. 底物的选择

由于工厂在生产淀粉中,测试用的底物豆粕含蛋白等杂质较多,不便于测定观察,因此我们改用纯品淀粉,作为底物。

(1) 马铃薯淀粉 (*Amylum Solani*) (E. Merck)。

(2) 可溶性淀粉,分析纯 (浙江菱湖淀粉厂)。

3. 淀粉凝集因子的确定

确定淀粉凝集因子在细菌细胞上的部位,采用扫描电镜直接观察。所用电镜型号是 DX-3A 型(科学仪器厂 1978 年产品),溅喷金膜。另外我们做了起凝集作用的菌体以及经胰凝乳蛋白酶和溶菌酶处理过的菌体的超薄切片^[2]。切片简单流程如下:首先取生长在平皿上洗涤过的菌体或酶处理过的菌体进行双重固定。

(1) 在冰浴中,将菌体放在下列固定液中固定:

戊二醛 3.6% 10 毫升

甲胍酸钠 (Sodium cacodylate) 缓冲液

0.2 M, pH 7.3 10 毫升

钨红 (Ruthenium red) 水溶液 (1,500ppm) 5 毫升固定 1 小时后,用冷的 0.15 M 的甲胍酸钠洗三次,共半小时左右。

(2) 在室温中用下列固定液固定 3 小时:

钨酸水溶液 (4%) 2 毫升

甲胍酸钠缓冲液 [同 (1)] 2 毫升

钨红水溶液 [同 (1)] 2 毫升

固定后的材料用乙醇脱水,然后转入 Araldite M (CY212),加硬化剂 (Hardener HY 956),以 10:1 浓度包埋,在 75℃ 中保温,3—4 天后硬化,在 LKB 8,800 III 型切片机上切片,用 H_u-11A 电镜观察。所得切片用醋酸双氧铀及柠檬酸铅双重染色。钨红是对细胞壁的特异性电子染料,固定液中含有钨红便于对细胞壁进行观察。

实验结果

由绿豆酸浆中分离得到的 21 号菌株,在平皿培养基上生长菌落小,培养 2—3 天

后有较强的碳酸钙溶解圈,18—22 小时的斜面培养物革兰氏染色阳性,球菌成链(图版 I-1),接触酶阴性;在 pH 7.0 的液体培养基^[3]中培养 16—18 小时 pH 值降到 4.0—4.5。发酵液用新华滤纸层析,展开液用正丁醇、冰醋酸、水(比例 4:1:2),显色剂用 0.05% 的溴酚蓝,证明产乳酸。依据 Bergey 手册第八版^[3],可以初步定为乳酸链球菌 (*Streptococcus lactis*),这个菌能够有效地凝集可溶性淀粉 (1% 水溶液) 中的淀粉颗粒。

为了解菌体如何凝集淀粉,将活菌体加入到可溶性淀粉溶液中,于水封片条件下,用相差显微镜进行活体观察。由于光学显微镜分辨率的限制,虽可看到凝集的淀粉团块周围环绕着细菌群体,但不能详细地分辨细菌和淀粉粒之间的结合关系(图版 I-2)。

当改用扫描电镜进行观察时,可以清晰地看到菌体细胞像绳索或链条状使淀粉颗粒凝集在一处(图版 I-3、4),从而使得变大的团块迅速下沉。在重力效果方面约相当于 1,000 倍的重力场的加速效应。由图版 I-3、4 中可以看到,由于细菌是以细胞壁外侧紧贴着淀粉粒,同时由于其结合的专一性,因此可以判断这种结合因子是位于细胞壁上的化学物质,它不会是其它类别的超距作用的物理力。

为了判断细胞壁上是否有识别并能凝集淀粉的因子存在,我们制取了离体的细胞壁。将 40 毫升浓度约为 30 毫克/毫升的 21 号菌,在冰浴中超声处理 15 分钟,破碎仪器用 CFS-250-5 超声波发生器(无锡无线电设备厂)^[4]。破碎处理后先用 6,000 转/

1) 培养基成份: (克%)

葡萄糖 1

酵母提取物 0.5

2) 探头由本所技术室刘如臻同志改装。

分离心两次以除去未破碎的细胞。上清液在 4℃ 中, 22,000 g 离心 30 分钟, 沉淀是由细胞壁组成的半透明胶状物^[4]。将此沉淀物悬浮于 8—10 毫升的 0.1 M 的 pH 6.6 的磷酸缓冲液中。当 50 微升的这种悬液加到 0.5 毫升(1%) 淀粉悬浮液中时, 可看到明显的凝集效应。扫描电子显微镜图像显示离体的壁的碎块同样也起着粘和淀粉的作用(图版 I-5、6)。

为了把细胞壁上的凝集因子取下, 将在液体培养基中培养的细菌在 6℃ 的冰箱中先放五天左右, 然后加溶菌酶及 Triton X-100 处理。处理液中菌体终浓度为 15 毫克/毫升, 溶菌酶 500 微克/毫升, Triton X-100 是 1.2%, 处理前光密度 660 毫微米为 1.3—1.5。37℃ 处理 2—5 小时, 光密度降到 0.5。90,000 g 离心 60 分钟。这种上清液 50—500 微升加到 1—1.5 毫升的淀粉悬液中, 有淀粉凝集活性。上清液的冷冻干粉室温保存可保持活性两周左右。扫描电镜图象见图版 II-7 和图版 II-8。

菌体的细胞壁上的淀粉凝集物质从它的辨识能力和特异性结合上看, 推论是蛋白质。为了证实这一推论我们用胰凝乳蛋白酶(chymotrypsin, 国产)处理 21 号菌体细胞¹⁾, 随着处理时间的加长, 凝集能力逐渐下降, 2 小时时完全丧失凝集能力, 从而看到凝集淀粉的因子就是该酶的作用底物。用胰蛋白酶(Difco)在 pH 8.2, 同前条件处理, 得到同样的结果。我们用电镜观察了经酶处理后的细胞超薄切片。由于细胞群体中不同的细胞对这种酶的敏感程度不同, 各个细胞个体之间形态上有很大的差别, 因此被酶处理后, 各个时间的取样中都有各种形态的细胞, 只是数量比例上有所不同。丧失凝集活性的细胞群体中, 有一部分细胞膨大变形, 但从形态上看仍有完整的壁, 钉红着色部位仍然存在, 说明

受胰凝乳蛋白酶作用的部分是钉红不着色的部位(图版 II-9)。用溶菌酶处理菌体细胞(处理条件同前, 但不加 Triton X-100), 菌体即使形态上已破坏, 钉红着色部位丧失, 但仍保持凝集活性(图版 II-10)。作为对照用的正常细胞(特别是细胞壁)的形态见图版 II-11。

结论和讨论

1. 由上述的扫描电镜及细胞的超薄切片透射电镜观察说明凝集淀粉的活性物质确实存在于细胞壁上, 并且位于壁的外侧。

2. 由用胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶和溶菌酶处理的细胞, 再测定其凝集淀粉活力, 表明凝集因子是附在壁上的一种具有辨识和特异结合能力的功能蛋白。

3. 离体细胞壁的碎片有凝集淀粉能力。经溶菌酶处理后的不含细胞碎片的上清液也有凝集淀粉的能力。说明凝集因子是一种水溶性的蛋白质。

4. 本文结果表明, 既然造成菌体附着于淀粉之上的不是简单的糖包被(glycocalyx)^[5], 因此不论它是糖蛋白或简单蛋白, 都应属于接近于外源凝集素类的物质(lectin like substance)^[6,7], 对这点今后还需做进一步的研究。

关于利用酸浆制造粉条(即粉丝), 我国最早开始研究的是黄海化学工业社区嘉炜和吴冰颜二人。

在我们工作中承方心芳教授借阅区、吴二先生的研究报告(黄海化学工业研究社研究报告, 第 15 号, 1935 年), 并介绍他当时目覩的研究概况。我们深刻体会到研究的连续性与继承性, 我们今天的工作正是在前人工作的基础的继续。

1) 处理条件是 5 毫升菌悬液(约 30 毫克/毫升), 加 5 毫升浓度为 1 毫克/毫升的胰凝乳蛋白酶, 调 pH 至 8.0, 37℃ 水浴保温 2 小时。

参 考 文 献

- [1] 北京市粉丝厂和北京大学生物系酸浆研究小组:
北京大学学报(自然科学版), 57—66, 1974。
- [2] Pate, J. L. and E. J. Ordal: *J. Cell Biol.*,
35: 37—51, 1967.
- [3] Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed., pp. 490—496, 1974.
- [4] 中国科学院微生物研究所微生物细胞学研究组:

微生物学报, 17: 57—61, 1977。

- [5] Costerton, W., G. G. Geerey and K. J. Cheng: *Sci. Amer.*, 238: 86—95, 1978.
- [6] Sharon, N. and H. Lis: *Science*, 177: 949—959, 1972.
- [7] Gold, E. R. and P. Balding: Receptor-Specific Protein, Plant and Animal Lectins, *Excerpta Medica*, Amsterdam, 1975, Chap. 3., pp. 77—115.

A STARCH-AGGLUTINATING FACTOR ON THE CELL WALL OF *STREPTOCOCCUS LACTIS* STRAIN

I. ELECTRON MICROSCOPIC OBSERVATION

Xu Hao Chen Xiao-dong Li Yue

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Liu Mei-lian Liu Zong-chen

(Beijing Vermicelli Mill)

In China, a sour liquor (suangjiang) containing a complex microbial flora was traditionally used for starch agglutination and precipitation in starch factory. The starch-agglutinating potency is due to the action of certain bacteria strains in this liquor. An effective strain of *Streptococcus lactis* was isolated in pure culture by the authors in the present work. The contact interfaces of the starch granules and bacteria were observed under SEM. The micrograph shows that the bacteria connect to the starch granules just like a chain or string holding them together. The outer side of the bacteria cell wall

attached to the starch surface firmly. From the specificity and direct evidence of SEM micrographs it can be ascertained that the agglutination capacity is biochemical in nature. It suggests that there is a chemical factor on the bacterial cell wall. This factor is a kind of protein as proved by chymotrypsin treatment. As a functional protein it can be obtained from the purified cell wall, or even can be obtained in the ultracentrifugal supernatant after lysozyme treatment. This active protein seems to be a lectin-like substance.