

## 乳酸链球菌凝集淀粉粒机理的进一步研究\*

曹宗巽 卢光莹 宋云\*\*

(北京大学生物系, 北京)

刘 美 莲

(北京粉丝厂, 北京)

本文进一步报道了在我国传统的“酸浆法”生产淀粉的过程中, 乳酸链球菌 (*Streptococcus lactis*) 菌体上的何种物质使淀粉粒凝集。实验表明, 能使蛋白质变性的各种物理因素及化学因素如加热、紫外线照射、超声波以及用苯酚、三氯乙酸、甲醛、来苏尔等, 都能使乳酸链球菌凝集淀粉粒的作用完全丧失; 用糜蛋白酶处理菌体后, 菌体凝集淀粉粒的作用也完全丧失, 而用被 Kunitz 抑制剂抑制了的糜蛋白酶或用纤维素酶、果胶酶、脂肪酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、溶菌酶处理菌体, 则仍然保留其凝集淀粉的能力。上述实验暗示, 对淀粉粒的凝集起作用的是菌体表面上的某种蛋白质类物质, 很可能是某种凝集素 (lectins)。

本文还报道了菌体、淀粉粒和阳离子三者之间量的关系, 它们之间量的正相关表明, 在凝集作用中, 三者可能是以某种方式结合在一起的。结合的性质还待进一步研究。

国外生产淀粉多用离心法, 而我国近千年来一直沿用“酸浆法”。关于“酸浆”沉淀淀粉的机理, 我们<sup>[1]</sup>曾将前人的工作<sup>[2,3]</sup>推进了一步。实验表明, 酸浆凝集淀粉粒, 不是由于其中的酸度或其它发酵产物, 而是由于微生物菌体的作用。其中起作用的菌经鉴定为乳酸链球菌的某一变种, 它能使豆粕中原来分散着的淀粉粒形成十几粒乃至几百粒凝集而成的大小不等的团块。实验还表明, 这种凝集作用只有在 pH 5.5—8.5 的范围内才能出现凝集现象, 而以 pH 6.0—6.2 为最适; 凝集的速度在一定范围内随着温度的升高而增加; 此外, 凝集现象的发生, 还必须有二价以上金属阳离子的参与 (但  $\text{Sr}^{2+}$  和  $\text{Ba}^{2+}$  不起作用,  $\text{Ca}^{2+}$  的作用也较差), 阳离子的价数越高, 凝集效应也越大。

本文还报道了菌体上的何种物质起作用, 以及在凝集过程中菌体、淀粉和金属阳

离子三者之间量的关系。

### 实验材料

本文各实验所用的豆粕和淀粉均为北京粉丝厂生产用的豆粕及新鲜的淀粉产品; 文中所指的淀粉悬液是将新鲜的淀粉产品经无离子水多次洗涤后再用无离子水配制而成。实验中所用菌体均为该厂生产用的“酸浆”原液或离心 (2,000g) 所得之菌体 (其中除起作用的乳酸链球菌外, 还有少量杂菌); 文中所指菌液是将离心所得之菌体用无离子水洗涤多次后, 用无离子水配制而成; 文中所指菌量即以酸浆原液或上述用无离子水配成的菌液的毫升数来表示。

判断菌体凝集淀粉粒能力的标准已在前文<sup>[1]</sup>中详述, 本文实验中主要以目测法观察当酸浆 (或菌液或菌体) 与豆粕 (或淀粉悬液) 混匀后, 有无淀

本文于 1979 年 5 月 24 日收到。

\* 本项研究工作是在 1974 年进行的。北京大学生物系甘忠如、于永满、贾云忠、顾孝诚, 北京粉丝厂张庆霞、刘仲岭参加了部分工作。

\*\* 现在中国科学院研究生院。

粉粒的凝集作用、作用快慢和淀粉沉淀量,常以 100 毫升豆粕中加入 3 毫升酸浆所产生的凝集现象作为标准,这种比例经多次试验证明是适当的。

## 实验方法和结果

### (一) 化学因素对菌体凝集淀粉粒作用的影响

1. 将由酸浆离心所得之菌体分别用水、乙醚、二甲苯、丙酮、各种浓度的及无水的乙醇、8 M 脲、29% 过氧化氢、冰冷的3% 三氯醋酸、90% 苯酚、20% 和40% 甲醛以及5% 和 20% 来苏尔处理十分钟,并离心除去这些化学试剂。然后将菌体加至豆粕中。试验发现各种浓度的三氯醋酸、苯酚、甲醛及来苏尔处理过的菌体完全丧失了其凝集淀粉粒的能力;其它试剂则无影响。

2. 将碘代乙酸和氯化汞分别加入菌液中,使其浓度分别为  $1 \times 10^{-4} M$  和  $1 \times 10^{-6} M$ 。在 28℃ 保温半小时后,将上述二种菌液分别加至豆粕中,可见其凝集淀粉的能力完全丧失。

### (二) 物理因素对菌体凝集淀粉粒作用的影响

将由酸浆离心所得之菌体分别进行下述处理,然后加至豆粕中,观察凝集淀粉粒的能力。

1. 煮沸五分钟,发现菌体凝集淀粉粒的能力完全丧失。

2. 在紫外线下照射二小时(20 W, 距离 30 厘米)后,菌体凝集淀粉粒的能力完全丧失。

3. 超声波处理: 将菌液置于冰盐浴中,用超声波在菌液内处理五分钟(CFS-25A × 超声波发生器, 8.6 KC, 250 W),温度上升至 15—30℃,停止处理。待冷至 10℃ 以下再处理五分钟,再冷却,再处理五分钟。冷却后比较超声波处理前和处理后

的菌液凝集淀粉粒的能力。结果见表 1。

表 1 超声波处理菌体对凝集作用的影响

菌 液	菌液最低需要量*(毫升)
未经超声波处理	2
经超声波处理	10

\* 菌液最低需要量表示能使 100 毫升豆粕中的淀粉凝集沉降所需要的菌液最低毫升数。菌液最低需要量越小,表示菌液凝集淀粉粒的能力越强。

由表 1 可见,在本实验条件下,经超声波处理后的菌液凝集淀粉粒的能力只保留了原有能力的 20%。

4. 用金钢砂研磨: 分别将菌体和淀粉粒在冰盐浴中研磨 4 小时,所用金钢砂为 500 目、300 目、200 目及 180 目的混合物,研磨后除去金钢砂。

将经过研磨的菌体加至豆粕中,其凝集淀粉粒的能力仍然正常。在显微镜下观察,可见菌体未破裂,但链球菌的“链”被打断了许多。

经过研磨的淀粉粒在显微镜下可观察到大多数已破碎,但将它配成淀粉乳,并加入菌体后,发现淀粉粒的碎片仍发生凝集现象。

### (三) 各种酶处理对菌体凝集淀粉粒作用的影响

将菌体和淀粉粒分别用各种酶进行处理。用柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液控制 pH, 反应液中酶浓度均为 1%,均在 30°—37℃ 下保温 4 小时,每 10 分钟摇动一次。蛋清溶菌酶和蜗牛酶作用条件为: 0.05 M、pH 6.5 磷酸缓冲液及 1 M 山梨醇,反应液酶浓度分别为 40γ/毫升和 10 毫克/毫升,34—37℃ 保温 1—3 小时。

分别将酶处理过的菌体加至正常的豆粕中及将正常的菌体加至酶处理过的淀粉悬液中,分别观察淀粉粒凝集的情况。并用各种相应的 pH 值的缓冲液处理菌体和

表 2 酶处理菌体和淀粉粒对凝集作用的影响

酶 类	pH	经处理的菌体对正常淀粉粒的凝集作用	正常菌体对经处理的淀粉粒的凝集作用
纤 维 素 酶	4.4	正 常	正 常
果 胶 酶	4.4	正 常	正 常
脂 肪 酶	8.0	正 常	正 常
蛋 清 溶 菌 酶	6.5	正 常	—
蛎 牛 酶	6.5	正 常	—
胰 蛋 白 酶	8.0	正 常	正 常
木 瓜 蛋 白 酶	5.4	正 常	正 常
胃 蛋 白 酶	3.0	正 常	正 常
糜 蛋 白 酶	7.8	作用完全丧失	正 常
被 Kunitz 抑制了的糜蛋白酶	7.8	正 常	正 常
缓 冲 液	3.0	正 常	正 常
缓 冲 液	4.4	正 常	正 常
缓 冲 液	5.4	正 常	正 常
缓 冲 液	8.0	正 常	正 常

淀粉粒作为对照。结果见表 2。

由表 2 可见,在所试各种酶中,只有糜蛋白酶处理菌体后,菌体凝集淀粉粒的能力完全丧失,而用被 Kunitz 抑制剂(又名碱性胰蛋白酶抑制剂,它也抑制糜蛋白酶)抑制了的糜蛋白酶(按每毫克酶加入 500 单位 Kunitz 抑制剂)处理菌体,则菌体凝集淀粉粒的作用完全正常。

#### (四) 菌量、淀粉量及离子量三者之间的关系

##### 1. 菌量与淀粉沉淀量的关系

取 100 毫升量筒数个,各加 100 毫升豆粕及不同体积的酸浆(在本试验中由于豆粕中已有足够的阳离子,因而没有外加阳离子),摇匀后静置。待淀粉粒凝集沉降后,用虹吸法除去全部液层和杂质层。然后加水将淀粉搅起,并在已称好重量的滤纸上过滤,烘干称重。所得结果见图 1。

##### 2. 菌量与阳离子需要量的关系

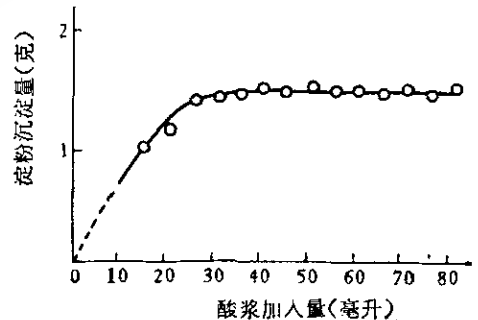


图 1 酸浆加入量与淀粉沉淀量的关系

本实验所用之菌液,是将酸浆离心所得之菌体用无离子水洗涤 7—8 次后加无离子水至原体积而制成的菌液;所用之淀粉是将新鲜淀粉用无离子水洗涤 10—15 次后加无离子水配制成的淀粉悬液(经过检验,仅将这种菌液和这种淀粉悬液混匀,由于无金属阳离子参与,不能发生凝集作用)。

研究了在淀粉量固定不变以及菌量足够的情况下,离子最低需要量与菌量的关

系。所试离子为  $0.025M$   $CoCl_2$ 。结果见表 3。

表 3 菌量与阳离子需要量的关系

淀粉悬液 (毫升)	菌液 (毫升)	无离子水 (毫升)	离子最低需要量* ( $0.025M$ $CoCl_2$ 的毫升数)
20	1	4	0.285
20	2	3	0.325
20	3	2	0.420
20	4	1	0.580
20	5	0	0.655

\* 离子最低需要量为在菌量足够的情况下,使一定量的淀粉完全凝集所需离子的最低量(毫升),不同种类的金属阳离子溶液的离子最低需要量是不同的。

### 3. 淀粉沉淀量与阳离子需要量的关系

实验所用菌液、淀粉悬液及阳离子溶液皆与上段所述相同。

研究了在菌量足够并固定不变的条件下,淀粉沉淀量与所需离子量的关系。结果见表 4。

表 4 淀粉沉淀量与离子需要量的关系

淀粉悬液 (毫升)	无离子水 (毫升)	菌液 (毫升)	离子最低需要量 ( $0.025M$ $CoCl_2$ 的毫升数)
5	15	3	0.205
10	10	3	0.255
15	5	3	0.305
20	0	3	0.400
25	-5*	3	0.540
30	-10*	3	0.605

\* 为了使总体积为 20 毫升,待淀粉沉淀后取出 5 毫升或 10 毫升水,然后再加入菌液。

## 讨 论

前文已指出,酸浆中能使淀粉粒凝集的主要因素是乳酸链球菌某一变种的菌体。但菌体上何种物质起作用?从本文对各种化学因素影响的研究中可以看到,三氯醋酸、苯酚、甲醛、来苏尔以及碘代乙酸、氯化汞能使菌体完全丧失凝集淀粉粒的能力,而这些化学试剂恰恰都是蛋白质的变

性剂、沉淀剂或酶的抑制剂。在物理因素中,煮沸、紫外光照射、超声波处理也都是能引起蛋白质变性的因素,因而也能使菌体完全丧失或部分丧失凝集淀粉粒的能力;而机械研磨虽然能部分地打断链球菌菌体的“链”,但不足以使蛋白质变性,因而菌体凝集淀粉粒的作用正常。此外,由酶的实验可清楚地看到,各种酶中只有蛋白酶,而且只有糜蛋白酶,由于它破坏了菌体上起作用的某种特殊的蛋白质类物质,因而使菌体完全丧失了凝集淀粉粒的能力。而当糜蛋白酶被 Kunitz 抑制剂抑制以后,由于其不再能作用于菌体上的这种特殊蛋白质,因此菌体凝集淀粉粒的能力仍然保存。根据上述实验结果,我们认为菌体上能使淀粉粒凝集的物质是某种蛋白质。

关于菌体、淀粉粒和金属阳离子三者之间的关系,从图 1 可以看到,如果加入的菌液不足,淀粉沉淀则不完全;淀粉沉淀量随着菌液的增加而增加,当菌液增加至一定量以后则淀粉沉淀量达到一恒定值,这是因为淀粉已沉淀完全。实验还表明,在淀粉量一定的情况下,离子需要量随菌量的增加而增加,在菌量足够的条件下,离子需要量又随淀粉量的增加而增加。由上述实验,可以得出结论:淀粉量、菌量以及金属阳离子量三者之间是正相关的。因此我们认为,在淀粉粒凝集的过程中,三者很可能是结合在一起的。至于它们结合的性质,尚待进一步研究。

近年来,人们广泛地研究了凝集素。许多迹象表明,文中所揭示的乳酸链球菌凝集淀粉粒的能力,可能是由于菌体表面的某种凝集素的作用。

## 参 考 文 献

- [1] 北京大学生物系,北京粉丝厂酸浆研究小组:北京大学学报(自然科学版),1974年第1期第57—66页。

[2] 区嘉炜、吴冰颜: 黄海化学工业研究社研究调查报告, 第1—39页, 1935年。

[3] 汪缉文: 《龙口粉丝》, 北京轻工业出版社出版, 1958年。

## FURTHER STUDIES ON THE MECHANISM OF THE AGGLUTINATING ACTION OF *STREPTOCOCCUS LACTIS* IN STARCH PRODUCTION

Cao Zong-xun\* Lu Guang-ying Song Yun

(Biology Department, Beijing University)

Liu Mei-lian

(Beijing Vermicelli Mill)

In a previous paper, we have shown that in the Chinese traditional "sour liquid" method of starch production, it is neither the acidity, nor any of the fermentation products, but the microorganism itself, that causes the precipitation of starch grains. The microorganism contained in the liquid agglutinates starch, thereby making the dispersed starch grains to aggregate into big masses. The agglutinating action between the microorganism and the starch grains requires certain conditions: an optimal pH, a proper temperature and the presence of certain cations. Monovalent cations and certain divalent cations such as  $\text{Sr}^{2+}$  and  $\text{Ba}^{2+}$  have no effect, while  $\text{Ca}^{2+}$  has a weak effect. Among the di- tri- and tetravalent cations tested, the agglutinating effect increases with the valency. The responsible microorganism has been isolated and characterized as a variety of *Streptococcus lactis*.

In the present paper, experiments were designed to study the effect of various physical and chemical factors, together with a series of enzyme preparations, on the agglutination between the bacteria and the starch grains. All treatments which are known to denature pro-

teins led to the loss of agglutinating ability of the bacteria. These included; heating, treatment with phenol, trichloroacetic acid, formaldehyde and lysol, ultraviolet radiation, ultrasonic waves, etc. Among the various enzymes tested, cellulase, pectinase, lipase, pepsin, trypsin, papain, lysozyme did not destroy the agglutinating ability of the bacteria, whereas chymotrypsin completely abolished it. Chymotrypsin which had been inhibited by kunitz inhibitor no longer destroyed the agglutinating action of the bacteria.

According to the above experiments, it is believed that some special proteins, perhaps lectins, on the bacterial surface are responsible for the agglutinating action between the bacteria and the starch grains.

In this paper, the quantitative relations among the bacteria, the starch grains and the cations were also studied. The positive quantitative relationship among them seems to suggest that in the agglutination reaction, these three are in some fashion bound together. The nature of the binding sites remains to be investigated.

\* i. e. Tsao Tsung-hsun