

生物学译文选

第 21 集

河北省科学院生物研究所资料室

84·10

生物科学导论

· 2 ·

中国科学院植物研究所

· 3 ·

卷 首 语

这一期我们选载了“乳酸链球菌肽”，“在水盐胁迫条件下，植物脯氨酸的代谢及其生理作用”和“科罗拉多州大学禾谷类作物的组织培养”三篇译文。对于从事工业微生物，植物生理和作物组织培养的科学工作者可能会有些用处。为了办好本刊物，我们衷心希望生物学科方面的同志们对我们的工作多提宝贵意见和道议，更希望能推荐一些有翻译价值的原文或提供译文，以使我们这个译文选能越办越好，为大家提供更多有价值的参考资料。

乳酸链球菌肽 (Nisin)

A. Hurst

1. 引言

乳酸链球菌肽已认识了四十多年，继续对食品微生物学家以兴趣。乳酸链球菌肽是一个多肽，结合着酸和过氧化物，是由乳酸链球菌产生的生物抑制剂。这些微生物属于血清组N，这个名字是由 Matlick & Hirsch (1947) 从抑制真菌的字母N创造的。已发表了一些综述，有的着重在应用方面，另一些则是基础微生物学和化学 (Berridge 1953, Hawley 1957, 1962; Marti 1966, Jarvis & Morissetti 1969, Hurst 1972, 1978, Lipinska 1977)。本文打算包括所有这些方面的全面论述，但是由于历史较长和参考书分散，无法做到包括所有文献。因此有些著作可能全部或部分遗漏，但是并没有蔑视人的意思。

乳酸链球菌肽的化学和生物合成提供了有趣的和艰难的挑战。

已假定有一个原乳酸链球菌肽 (Provisin) 但并未分离到，有一个可能是原乳酸链球菌肽的片段从非产生乳酸链球菌肽的链球菌中分离到，转成乳酸链球菌肽的酶也已发现，但至今并未提纯和研究。对产菌细胞的乳酸链球菌肽的功能也提出了有趣的问题。

在芽孢杆菌多肽类抗生素的情况，微生物的生长史中的功能很容易假设由于在芽孢形成中出现明显的分化。在格兰氏阳性的球菌中，该过程并不如此明显，但可能进行一个更隐蔽的细胞分化。一个可以思考的问题是乳酸链球菌肽和其他抗生素，正像多肽没有作为抗生素认识一样 (Hurst 1967)，可能在这个老化或分化过程中起作用。枯草杆菌产生的枯草菌素和乳酸链球菌产生的乳酸链球菌肽是极不平常但是非常相象的物质 (Gross et al 1969)。奇怪的是这些不同的微生物能产生如此相似的物质。

由乳酸链球菌一般都能产生乳酸链球菌肽类似的物质 (Oxford 1944, Hurst 1967)。确实，乳酸链球菌肽类似物质可以广泛分佈在整个链球菌界中，举例来说，一个抗生素类似物质，链球菌素 A-F 22, Tagg 和 Wannamaker (1978) 有所报道。该物质既是抗生素又是细菌素，很清楚是由该属的致病成员化脓链球菌所形成的。由格蘭氏阳性菌产生的细菌素已有论述 (Tagg et al 1976)。

在抗生素中，乳酸链球菌肽有独特的功能用作食品保藏剂。对此有几个原因：它没有用在医药和动物饲料，但口服无毒性。由于它是一个多肽，因而在食品中的任何残基都能被消化。尽管有这些因素，但乳酸链球菌肽对食品保藏剂的应用还是缓慢的，可能仍处在它的幼年期。Lipinska (1977) 发展了乳酸链球

菌肽产生菌的一个有趣用途，在乳酪制造中代替硝酸盐使用。直到1979年12月，它的使用在北美没有得到准许。在1966，美国食品和药物管理局（FDA）制止在罐头食品内使用乳酸链球菌肽，可能由于它缺乏一些必要的资料的原因，看来现在仍然是这个情况。正如在这个综述内其他地方所指出的，在交叉抗药性上资料是不充分的，以及其他的试验，如致变性的试验至今未做。而且，最近发展了对家畜饲料抗生素有危险的很大认识（Anonymous 1972）。但把称为抗生素的每样东西混为一谈是极大的错误。乳酸链球菌肽证明和用于医药和兽医的抗生素十分不同，它也不用于促进生长的目的。食品保藏领域的进展，将大大受到阻碍，只要被人们的混乱思想保持着被称为抗生素的所有物质必须排除在食品之外，应该更好的称乳酸链球菌肽是一个生物食品保藏剂，把它归入与乳酸，醋酸和过氧化氢，乳酸链球菌的其他抗菌产物为一类。

乳酸链球菌肽有食品保藏的优良，它在工艺和基础研究上有很多长处。在发达国家它可以用作热加工的附加剂。已有一些证明当乳酸链球菌肽存在时，芽孢变成“受伤”和更加热敏，加热残存的芽孢变得更加对乳酸链球菌肽敏感。在加热后残存的乳酸链球菌肽提供了防止这些芽孢的发育。产品这样的处理能够达到“商业灭菌”（任何存在的活芽孢无法生长和发育），比现在所需的热处理要少。从该产品，消费者所得的好处是，由于稍加热，

将改善营养价值、风味、质地和外观，对加工者来说，节能是重要的考虑。当局对食品添加剂应用的严格管理考虑到这些物质可能用于掩蔽污秽的制造业。可是，这种滥用对乳酸链球菌肽来说是不可能的，由于它的很窄的抗菌谱，乳酸链球菌肽的效果，关系到所带的细菌，已证明质量极差的出发材料用它是无效的 (Gibbs + Hurst 1964)。

发展中国家常常需要进口干奶产品来补充低蛋白的饮食。可是，这些国家的水供应常常是不安全的，干奶产品用污染的水调制将是更糟糕。在这样的环境里，感觉到更需建立一个调制厂，在厂里，产品应该在分配前进行热处理。乳酸链球菌肽加入到奶粉能使用伴随物而不需加热而获得营养价值。乳酸链球菌肽在产品内也能在没有冷藏设备的地区延长货架寿命。在中东一些国家已用上述的方法。

II、生 物 学

A、培养，菌株和培养基

该“抑制性链球菌”发现后不久就知道是属于乳酸链球菌属。Oxford (1944) 所用微生物看来好像是乳脂链球菌 *Streptococcus Cremoris*。1951年 Hirsh 和 Grimsted 开始做详细的分类试验。他们用血清学和生理学试验研究了 21 个产乳酸链球菌肽的菌株，都是乳酸链球菌 *S. lactis*。它们

唯一明显的特征结果是 21 个菌株的 20 个发酵蔗渣，这些种的性质通常被认为是可变的 (Deibel + Seeley 1974)，如果有任何联系的话，在蔗渣发酵和乳酸链球菌肽合成之间，并没有追究到底。Baribo + Foster (1951) 发现不论 *S. lactis* 和 *S. cremoris* 都能产生抗生素。

在牛奶或在这些需要复杂营养的微生物能够生长的通常复合有机培养基内（培养需要保温在 $20-30^{\circ}\text{C}$ 无通气）就能形成乳酸链球菌肽。Hirsch (1951) 发现在复合葡萄糖牛肉膏培养基，乳酸链球菌肽的通常产率为 80 国际单位/毫升 (IU/ml)。

酸度是生长停止的原因，因此周期性的中和几乎可使产量加倍。当葡萄糖变得不足时，结合着周期性酸的中和，增加培养基内葡萄糖从 1 至 2.5%，可增加产量从 160 到 460 IU/ml 。当泛酸变得不足时，通过补加，产量则可达 620 IU/ml 。用一个三组分的缓冲系统来代替周期性中和则进一步增加产量到约 1700 IU/ml 。该培养基的最大缓冲能力在 $\text{pH } 5.9-6.1$ ，这看来似乎是乳酸链球菌肽合成的最佳条件。增加乳酸链球菌肽合成常常与增加细胞量密切相关 (Hirsch 1951)。

Egorov et al (1971) 确证了最高乳酸链球菌肽合成与最大生物量形成相关联。他们使得培养基各种成分如玉米浆，酵母自溶物，水解酪蛋白，葡萄糖、磷酸盐、和无板盐类的浓度最佳化，得到最高产量约 2000 IU/ml 。随后他们又报告胸腺

嘧啶，腺嘌呤和次黄嘌呤刺激乳酸链球菌肽合成 (Egorov et al. 1976)。可是他们自己的结果，并不表明比在1971年他们所报告的产品产量有所提高。Hirsch (1951) 发现嘌呤类和嘧啶类碱基并无作用。

Kozak & Dobrzański (1977) 报告了一个最低的合成培养基。生长的最低要求也是乳酸链球菌肽合成的最低要求。在此培养基比复合培养基，乳酸链球菌肽的产生约低3—4倍。该培养基由9种氨基酸，4种B族维生素，葡萄糖和无机盐类。他们确证嘌呤类和嘧啶类对乳酸链球菌肽合成无作用。可是，在最低培养基上外加4种氨基酸（丝氨酸，脯氨酸，半胱氨酸和胱氨酸）增加乳酸链球菌肽的合成，其水平可与在复合培养基上相比。遗憾的是 Kozak & Dobrzański (1977) 发表的结果是用 10^6 OD 或 10^6 形成菌落的单位 (CFU) 的比，因此，和其他发表的结果作直接的比较是不可能的。

对乳酸链球菌肽生产的菌株选育已由 Matlack & Hirsch (1947) 提到。他们观察到很大的株间变異从反变得适于发酵培养的，在牛奶中抑制性活力下降。在发酵中，乳酸链球菌肽生产看来好像至少能稳定二年。

Cheeseman & Berridge (1957) 报道了从一个已经冷冻干燥10年的培养物中的菌株选育。从该培养物反复接种，乳酸链球菌肽的产量下降，表明该菌株已变成对乳酸链球菌肽敏感。

Cheeseman & Berridge (1957) 用一个10% 接种物到加入 500 IU/ml 乳酸链球菌肽的培养基内经一夜保温后，再接种到含 2000 IU/ml 的琼脂培养基上选育出一个耐药型。挑取菌落可产生 700 IU/ml，而原来的培养基只能形成 250 IU/ml。

Hirsch (1951) 也已讨论了一系列的转接数的变异影响和其他早期的菌种选育实验。

Lipinska (1977) 总结了涉及应用到产乳酸链球菌肽的链球菌生长在工业废料上的实验。这些废料包括奶品和生产胰岛素的胰酶水解废料。没有提到达到的确切产量。表明用现有的菌株，可以达到最高约 2000 IU/ml。Goudkov et al (1973) 比较了英国、波兰、和苏联廠商的乳酸链球菌肽制品的稳定性，他发现英国制品比其他两个，多少更为稳定。

B. 乳酸链球菌肽合成的遗传控制

Lipinska (1977) 报告了用辐射处理后的菌株能增加乳酸链球菌肽的产量。Kalra et al (1973) 报告分离了一个菌株能形成母株的乳酸链球菌肽量的加倍。他们用紫外光照射，分离 1—0.1% 存活的菌落。他们引用了其他人的早期著作，在这些著作中，同样的处理能形成乳酸链球菌肽合成增加 10 倍。看来需要做更多的这类实验。

已知 *S. lactis* 的质粒 DNA，在菌株的检查中 (Larsen

4 McKay, 1978) 报告有4—6个不同大小。Kozak et al (1973) 报告初步实验认为乳酸链球菌肽合成可能是由质粒控制。他们检查了12个 *S. lactis* 未处理菌株，挑了8081个菌落，其中3个是 Nis^- (0.004%)。在用二氨基吡啶处理后，11,337个菌落分离和测定，其中200个是 Nis^- (2%)，在用溴化乙锭处理后，分离6392个菌落，29个是 Nis^- (0.5%)。这个 Nis^- 培养物的增加主要因为是一个菌株，由于二氨基吡啶和溴化乙锭处理传统的认为是从质粒来“治疗”细菌，有一些证明乳酸链球菌肽的合成是由质粒控制的。

一个菌株很容易对质粒消除发生反应，也包含有更多自发形成 Nis^- 克隆 (4248 的 35 个被测得)。这性质是稳定的，通过发酵液 120 个培养物 10 次没有形成任何 Nis^+ 培养物。

质粒消除的培养物的质粒控制性质通过诱变的方法，不能重新获得该性质。Kozak et al (1974) 检查了用亚硝基胍处理后的二个质粒消除培养物。他们检查 30,730 个菌落从一个培养物和 20115 个菌落从另一个培养物，没有发见 Nis^+ 菌落。这个发见支持了乳酸链球菌肽是质粒调节的概念。已报告了进一步的实验，在此实验中打算用 $CsCl$ 梯度离心来给质粒 DNA 定性 (Fuchs et al 1975)。可是没有报告结论性的结果，在 8 个产乳酸链球菌肽的 *S. lactis* 中，二个没有发见共价闭环 (ccc) DNA，二个已经消除乳酸链球菌肽的菌株进一

步试验，和母株相比，只有一个已失去 CCC DNA 而另外一个则否。

C、乳酸链球菌肽对产生菌的功能

1、作为一个次级代谢物

可能乳酸链球菌肽对产生菌没有作用。在批号培养中，当超过一半以上的细胞芽已经合成时它开始形成 (Hurst 1966)。在那时，可能细胞反映了有限，但必需的营养物的耗竭。

Woodruff (1966) 认为代替全部“断路”，细胞得到合成抗生素作为一种转变，这代表了充分应用形成的酶系统和可用的底物的一种方法。因之，抗生素合成可以认为一种选择对细胞控制机制的破坏和一种当等待一个有限代谢物的新来源时维持全部功能性机回的方法。可是，这个观点似乎不适合乳酸链球菌肽的合成，这是一个需能的过程，能特别朝向生长末期受到限制。此外，酶转化后乳酸链球菌肽为乳酸链球菌肽并不存在于所有的时间相反，它看来似乎仅仅在朝着生长末期的一段时间内生成 (Hurst + Paterson 1971)。

2、作为一个优势因子

乳酸链球菌肽功能的第二个现象是当产生菌在和其他乳酸链球菌竞争时，它保证了优势。这个争辩涉及到 *S. lactis* 和 *S. cremoris* 之间的争论。这些微生物的自然生境仍然是多变的 (Sandine et al 1972)，但是已知它们是天然发酵原

乳的微生物。通过 Hirsch (1952) 争论更进一步，可概括如下：“筒装牛乳”或“在容器内牛乳”是一种较新的底物，但在豕养产乳动物时就有了。二个种在新的底物上会聚，为优势而斗争，所以，它们产生抗生素来针对彼此。

这样，*S. lactis* 产生乳酸链球菌肽，而 *S. cremoris* 则是对此更为敏感的微生物。同样，*S. cremoris* 产生双球菌素，而对此更为敏感的是 *S. lactis* (Hirsch & Grinstead 1951)。而且有利于此争论的是乳酸发酵的事实——在牛乳底物中生长的基本要求——与其说是染色体控制，不如说是质粒控制 (Larsen & McKay 1978)。

在工业实践中，乳酸菌菌株常常用混合型。这些菌株能够通过噬菌体打印来区别。在几次转移后，菌株中一个变成优势，自从 Hoyle & Nichols (1948) 的著作，已经接受了产生抗生素作为菌株优势的重要原因之一。虽然，对优势的其他原因已有所提及，但留给我们的还是问题 (Reddy et al 1971)。

3. 作为细胞生长调节剂

看到乳酸链球菌肽功能的第三方面是产生菌的生长史中有调节作用。乳酸链球菌肽的生物合成在批号培养开始于菌体已经形成约 50% 以后 (图 1) (Hurst 1966)。假如乳酸链球菌肽在它开始合成以前加入培养基，它将抑制和溶解产生菌 (Hurst & Kruse 1972)。假如乳酸链球菌肽在接种前加入培养基，

生长稍有延缓，但从后该菌生长与对照同样的速率和达到同样的菌体量（图2）。这些结果认为产生菌的生长与乳酸链球菌肽的失活同时开始。为了试验其可能性，培养控制在 $\text{pH} 6.8$ 生长到稳定阶段（Hurst 1968）。在此 pH ，乳酸链球菌肽保持和细胞结合，其浓度增加从0（在接种期）到1.3%的干重（在稳定期）。在此时，用1%细胞作为接种物开始新的发酵。细胞重新分离，乳酸链球菌肽只有这些细胞干重的0.13%（图3）。

破坏乳酸链球菌肽的酶未能证明，认为钙吸收结合而使乳酸链球菌肽消失（Hurst & Lazarus 1968）。由于钙的吸收能预料到细胞混悬液的光学性质的改变，其影响已作了研究。

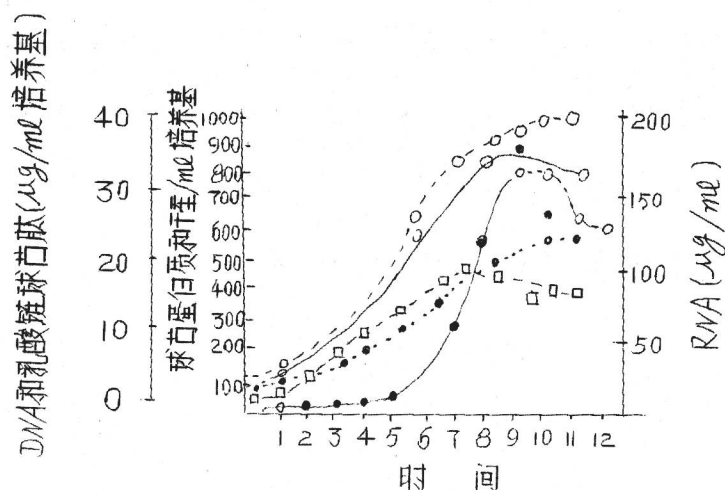


图1 乳酸链球菌生长在批量培养时生物合成的活性
干重(○- -) DNA(○—) 乳酸链球菌肽(●—)
蛋白质(●- - -) RNA(□- - -) 自Hurst 1966.

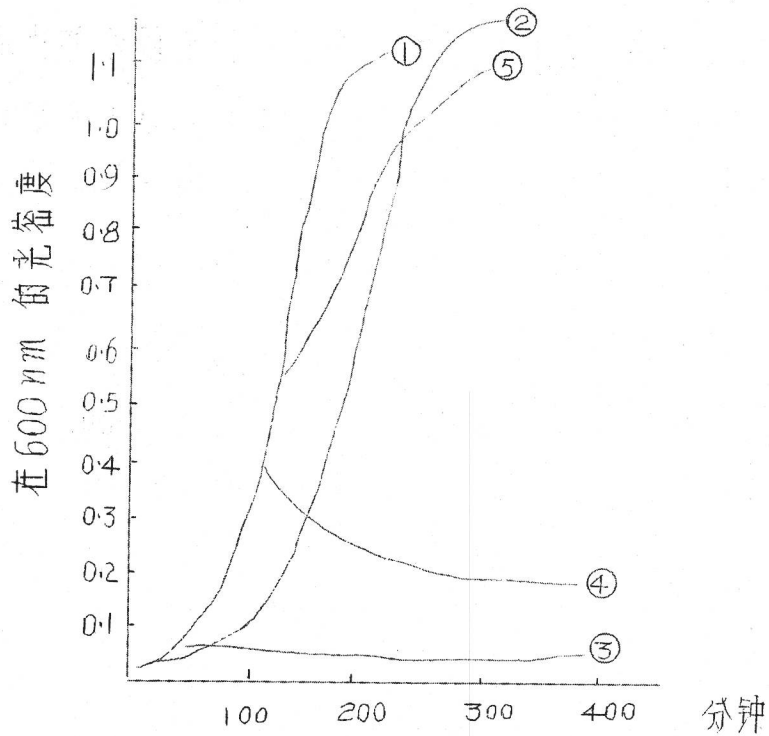


图2 一个产乳酸链球菌肽的乳酸链球菌过夜生长在一个复合有机培养基再接种在相同培养基,第一管未加乳酸链球菌肽,第2-5管加乳酸链球菌肽(-500 IU/ml)第二管在接种前加,第三管在培养30分钟后,第4管在培养105分钟后,第5管在120分钟乳酸链球菌肽开始合成后,自 Hurst & Kruse 1972

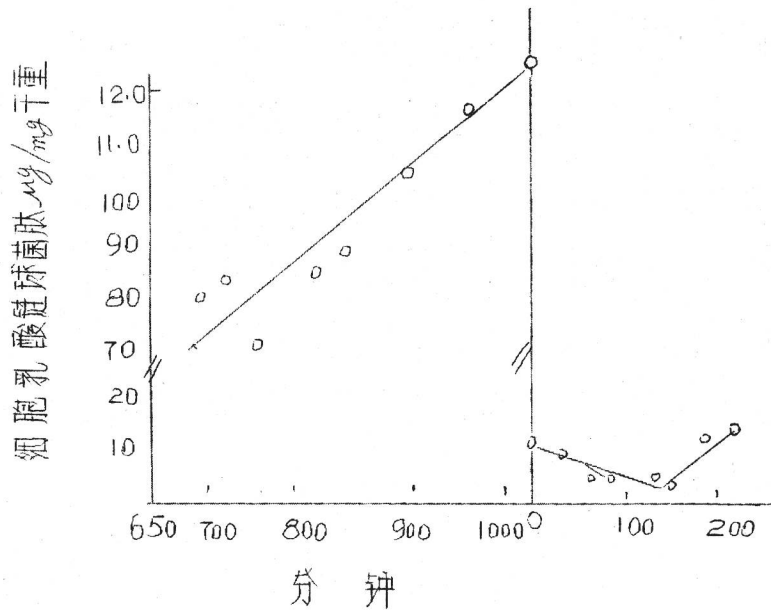


图3. 通过产生菌，乳酸链球菌肽明显破坏
 乳酸链球菌在批号发酵在 pH 6.8 表示
 的时间生长
 在 0 时培养将再接种到新鲜的相同组
 成的培养基 自 Hurst 1968 .

(Hurst 1969)。在转接培养时，细胞混悬液的光密度下降。这反应需盐（如钙）和葡萄糖和依靠温度。用 p -汞苯甲酸盐和碘乙酸盐能致中毒 (Hurst & Kruse 1970)。电子显微镜观察稳定期细胞混悬在钨酸铵内表明壁、膜，壁至膜的吸着，隔膜，和间体的清楚结构。可是，转接后四分钟，钨酸铵不再揭示任何结构，细胞内部染成黑色固体，可能，在短时间内，细胞

变成对染料的可渗透性 (Hurst + Stubbs 1969)。

在转接培养上发生的事件可概括如下：发生光学反应，表明了细胞形状的变化。这些细胞变得对钼酸铵的可渗透性，结合 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 和丧失可生物鉴定的乳酸链球菌肽。去掉葡萄糖或加入碘乙酸盐，停止其光学反应和 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 的吸收，乳酸链球菌肽并未失活。该作用认为乳酸链球菌肽的失活是由细胞的结构上变化造成的 (Hurst + Kruse 1970)。

S. lactis 野生菌株的很小的探测表明虽然它们大多数能产乳酸链球菌肽 (40 个中的 35 个)，但少数却不能 (40 个中的 5 个)。因此，很难表明假如有一些菌株不能产生它，乳酸链球菌肽如何能有调节功能 (Hurst 1967)。可是，这些菌株都能产生一个基本的多肽而无抑制性质，但和乳酸链球菌肽如此相似，以至用 *Sephadex* 色谱也不能与乳酸链球菌肽分开，在聚丙烯酰胺凝胶电泳内其表现和乳酸链球菌肽一样。

进一步发见在批量培养中，乳酸链球菌肽积累一直从生长到后期。细胞结合乳酸链球菌肽的量也与其延滞期的长短密切相关 (Hurst + Dring 1968)。总之，推理证明乳酸链球菌肽和其他硷性多肽 (它们大多未知由于它们非抗生素) 可能在批量培养内有与生长开始到结束有关的功能。已经对短杆菌肽证明有调节功能涉及到产生菌的芽胞化 (Mukherjee + Paulus 1977)。