

多胺调节病毒生长的生物学机理

朱 晓 波

(张家口医学院生化教研室)

病毒在感染细胞中可呈多种生长状态,每种生长状态是由共同的调节机理决定的。病毒感染的共性决定了病毒调节机理的相同性,其特殊性又决定了病毒在感染细胞中生长状态的多样性。对多胺的深入研究发现:病毒感染引起细胞内多胺水平的不同改变,这些改变和病毒生长状态的多样性密切相关。显然,这类对细胞调节发挥重要作用的物质,也可以调节病毒的生长。

(一) 多胺是调节病毒生长的必需因子

多胺对细胞中病毒的生长具有重要的调节作用。多胺合成特异抑制剂 DFMO (二氟甲基鸟氨酸) 及 MGBG (丙脒脒) 的应用促进了这方面的研究。在人羊膜细胞中加入 MGBG,可以抑制脊髓灰质炎病毒, ECHO 病毒及柯萨克 B₁ 病毒在细胞中的复制^[1]。

Hodgson^[2] 分析了牛痘病毒感染的 HeLa 细胞中鸟氨酸脱羧酶 (ODC) 活性,发现病毒感染细胞后立即诱导 ODC 合成,在感染后 5 小时 ODC 活性达最高峰。而且,此 ODC 由病毒携带的 ODC 基因编码。Lanzer^[3] 进一步指出,在感染 9 小时后多胺的合成及其浓度大幅度降低,但不被完全抑制。另外,在腺病毒 S 感染的 KB 细胞及非致癌病毒感染的瘤细胞和 Mengo 病毒感染的艾氏腹水癌细胞中,也观察到这种现象^[4]。

在牛痘病毒感染的 KB 培养细胞中,由介质中除去精氨酸(多胺合成的前体物)可以抑制传染性子代病毒粒子的产生^[5]。病毒的吸附、侵入、脱壳过程及病毒早期 mRNA 合成和病毒 DNA 合成均不受影响,但病毒晚期 mRNA 合成在缺乏精氨酸时受到抑制,病毒对精氨酸的需要可被鸟氨酸或多胺的加入所代替^[6]。此

外, Svec 和 Links 的研究指出,多胺也调节鼠乳腺肿瘤培养细胞中鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)的基因表达。这些研究均表明,多胺对病毒生长的调节与病毒基因的表达相关,并依赖于多胺的浓度改变。

(二) 多胺与病毒核酸

用去垢剂和尿素处理病毒,可获得裸露的病毒核酸。应用这种方法,1971 年 Gibson 在单纯疱疹病毒中发现精脒随病毒外壳除去,精脒则与 DNA 紧密结合。从而首次表明,多胺是动物病毒的组成成份。此外,对牛痘病毒^[7]、腺病毒 S、流感病毒、新城疫病毒^[1]的分析表明,多胺也是这些病毒的组成成份。看来,多胺作为动物病毒成份具有普遍性。

作为病毒结构成份,这类含氮阳离子脂肪族化合物通过中和磷酸基团负电荷,结合 50—80% 的病毒核酸。多胺所结合的部分编码蛋白,为病毒基因在寄主细胞内的快速表达提供了先决条件。因为适量多胺的结合,使病毒核酸处于最佳活性构象状态,以至于与病毒核酸结合的各种酶能以最大速度催化反应。韩玉眠^[8]用小牛胸腺 DNA 及 M₁₃ 噬菌体 DNA 的体外转录系统证实,多胺对天然 DNA 模板有明显的激活作用。

尚未结合多胺的 20—50% 病毒核酸负责病毒基因的调控,这部分核酸主要构成病毒的增强子及基因 TATA box 上游调节区。它们不仅具有各种特殊序列(如各种重复序列),而且也有生成 Z-DNA 的能力^[9]。Barbara^[8] 发现,SV40 和 MSV (莫氏肉瘤病毒)病毒基因组中的重复序列能广泛形成杆状或环状结构,

本文承康健副教授审校,特此致谢。

并确认 SV40 增强子能形成一对生物功能极为重要的二、三级结构。另外,已经表明:病毒增强子由一个或多个结合区组成。这些事实提示,负责病毒基因调控的核酸序列是以下列方式存在的:病毒增强子通过多种方式与病毒 DNA 上一个或数个基因的 TATA box 上游调节区中可互补序列结合,其中增强子的每一结合区可结合一个基因的 TATA box 上游调节区,呈特定的二、三级结构。病毒核酸的这种存在方式使这些基因处于抑制状态。多胺很可能通过某种途径将病毒基因的这种抑制状态转变为活性状态。

(三) TGase 是多胺发挥调节作用的关键

动物细胞中存在着 一类转谷氨酰胺酶 (Transglutaminase, 简称 TGase)。它催化一类调节蛋白中 γ -谷氨酰胺残基(可能也催化天冬酰胺残基)和多胺中一个或二个伯氨基间的转酰基反应,伴随调节蛋白的构象转变,形成稳定的蛋白-酰基多胺复合物^[9]。细胞分化时,该复合物种类和水平的变化,直接影响细胞的分化状态^[10]。多胺酰基化产物的多样性^[11]提示, TGase 有一系列同工酶存在。

就象继电器可以接受并综合从三、四个来源输入的信息,以阈值效应进行反应一样, TGase 可能也受数个细胞内信息的控制,并以阈值效应进行反应。TGase 同工酶的存在保证了它以阈值效应进行反应。在一定条件下,具某阈值水平的多胺可以激活某 TGase 催化形成相应的蛋白-酰基多胺复合物。TGase 除受多胺调节外,还受一些其它成份,如细胞内 Ca^{++} 、丁酸盐及某些蛋白激酶的调节^[9]。

(四) 蛋白-酰基多胺复合物可以调节病毒基因表达

多胺与调节蛋白形成的复合物具如下性质: 1. 蛋白-酰基多胺的形成,诱导调节蛋白构象转变,蛋白的这种变构反应方式,使控制系统有选择的自由,可以识别特异的调节部位。2. 作为多聚阳离子化合物,多胺与调节蛋白的共价结合,使调节蛋白具强碱性。这样,调节蛋白易取代与病毒 DNA 结合的蛋白,直接与 DNA

结合。3. 乙酰精脒与小牛胸腺 DNA 及 Poly(dG^{-3}mdC)·Poly(dG^{-5}mdC)的结合可以诱导其 B-DNA 转化为 Z-DNA^[12]。其它实验也表明: 乙酰多胺可以解开部分小牛胸腺的双链 DNA。这些事实提示:复合物中酰基多胺(乙酰或丙酰多胺)也有同样作用,可将基因调节部位的 B-DNA 转化为 Z-DNA。

蛋白-酰基多胺复合物的这些性质决定了它可以选择性地识别由病毒增强子和基因 TATA box 上游调节区形成的特异调节部位,调节病毒基因的表达。Thomas^[13]研究了由兔子子宫制备的孕酮受体,指出孕酮与 7S-10S 受体形成的复合物在体外对 DNA 几乎无亲合性,只有多胺促使该复合物转化为 5S 形式后,才具有结合 DNA 的能力。同时,多胺与受体复合物的结合,使 5S 复合物表面负电荷减少,碱性增强。还有研究表明,孕酮与其受体形成的复合物,通过与 MMTV 前病毒 DNA 中包括增强子在内的多个调节区域的互相作用,可以调节 MMTV 前病毒转录^[14]。

(五) 病毒基因的活化

病毒增强子和上游调节区形成的特异结构,决定了蛋白-酰基多胺复合物由某个方向分别与增强子和上游调节区逐渐结合,以实现增强子对病毒基因的启动及促进的双重作用(如图 1-1)。在增强子和上游调节区形成的多个基因的调节部位中,复合物仅识别相对应的一个基因调节部位。复合物与增强子的结合,解除了增强子对上游调节区的结合抑制,而与基因 TATA box 上游调节区的结合,通过复合物中酰基多胺与 DNA 的直接作用,导致上游调节区的 B-DNA 转化为 Z-DNA,在调节蛋白参与下,使 Z-DNA 双螺旋解链,进而引起相邻的 TATA box 解链,有关的酶和因子结合在 TATA box 序列的单链上,导致基因活化。

复合物结合 DNA 的数量与基因上游调节区解链的速度和程度、相邻 TATA box 解链速度及各种酶和因子结合 DNA 的速度成正相关性。这种相关性导致复合物结合 DNA 数量越多,病毒基因转录速度越快。如果一个增强子

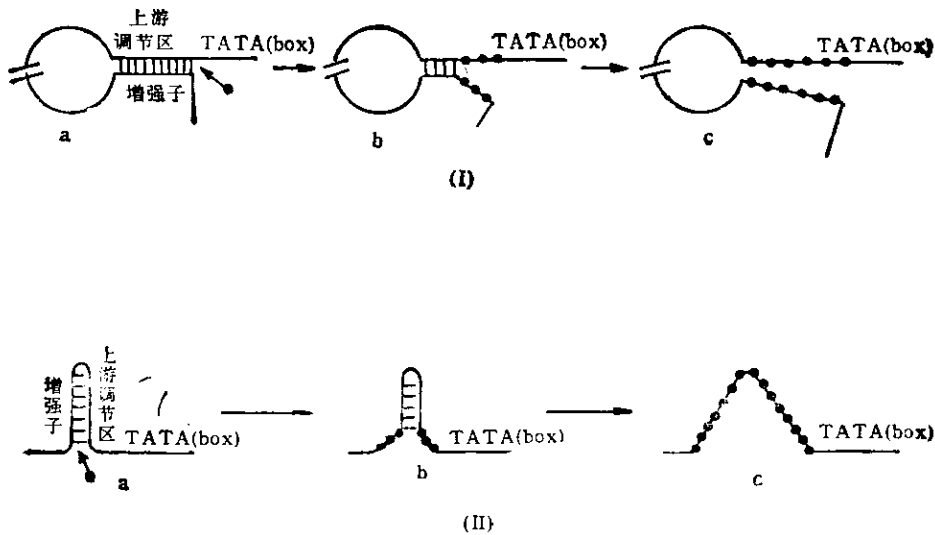


图1 调节复合物与基因调节部位的作用方式

I: 增强子与基因不相邻 II: 增强子与基因相邻。

(a) 调节复合物(●)尚未结合基因调节部位, 基因关闭。(b) 调节复合物部分结合调节部位, 基因缓慢转录。(c) 调节复合物全部结合调节部位, 基因快速转录。(b)、(c) 中调节复合物结合部位及 TATA (box) 处 DNA 均由两条解开的单链组成, 以便于有关的酶和因子结合在 TATA (box) 单链上活化基因。

与某基因相邻, 则由于它提高了基因上游解链程度而更加强烈地促进该基因转录(如图1-II)。

(六) 多胺水平改变和病毒生长状态

病毒可以通过多种途径改变感染细胞内的多胺水平。牛痘病毒自身携带 ODC 基因, SV40 不仅阻止转化的 SV3T3 细胞多胺外泌, 其早期产物也诱导细胞 ODC 合成^[15], 劳氏肉瘤病毒的 v-src 基因表达后, 观察到 DG (二酯酰甘油) 浓度大幅度升高^[16]。还有研究指出, DG 通过 DG/PKC (蛋白激酶 C) 系统可以提高多胺水平^[17]。其它病毒的作用途径不清。然而, 不论经由何种途径, 病毒都可以快速或缓慢地引起细胞内多胺水平改变, 但改变程度与寄主细胞和病毒种类相关。

比较非致癌病毒感染的瘤细胞和致癌病毒转化的正常细胞中多胺合成情况^[18], 可以发现, 1. 在感染早期, 两类病毒感染的细胞中, 多胺合成均迅速升高; 2. 在感染晚期出现分歧, 非转化感染细胞中多胺合成及其浓度迅速下降, 转化细胞中多胺仍维持高水平。

研究表明, 经 SV40 转化的 SV3T3 细胞中的 ODC 活性、精胺和精胍浓度较未经处理的

3T3 细胞分别高 20、15 和 3.3 倍^[19]。但经 DFMO 处理的 SV3T3 细胞, 由于多胺的耗竭, 它的生长速度却十分缓慢^[19]。有实验表明, 3T3 细胞中多胺水平的升高与 c-myc 的表达呈正相关性^[20]。

牛痘病毒在细胞中引起的多胺改变, 即感染早期多胺合成和浓度的升高及感染后期多胺的降低, 保证了病毒在细胞中完成正常的生长周期。对细胞内多胺代谢水平的影响, 如前体物精氨酸的缺乏及多胺合成抑制剂的应用, 可抑制病毒基因的表达, 使病毒以潜伏状态存在。如果在牛痘病毒感染的某些细胞, 多胺在整个感染期持续升高, 那么, 很可能这一升高不仅抑制病毒基因表达, 还可引起细胞转化。

人类免疫相关病毒 (HIV) 的活化及其致病机理与它引起的多胺改变密切相关。Pasquali 发现, 多胺合成的特异抑制剂 MAP 和 DFMO, 可以抑制由细胞有丝分裂原 PWM 和淋巴细胞活素 IL-2 诱导的外周血 T 细胞活化, 使细胞处于免疫抑制状态, 并指出这种抑制是由于抑制剂阻止了多胺的合成, 及其浓度的升高^[21]。Dinter 的实验指出, 佛波醇酯 TPA 刺

激 HIV 感染的非淋巴细胞时, HIV 基因表达及 HIV 开始复制, 同时, 与 HIV 增强子相互作用的细胞 DNA 结合蛋白活性也相应增加, 这一增加发生在细胞内蛋白合成停止的时期^[27]。由于 TPA 直接作用于 PKC, 并提高细胞内多胺水平, 看来, 多胺水平的升高与 HIV 基因的转录相关。

HIV 侵染 T₄ 细胞后, 其活化需细胞内高水平的多胺存在, 但 HIV 本身不引起多胺升高, 此时, HIV 以溶原状态存在。一旦细胞受到被 HBV、CMV、EB 病毒及慢性寄生虫等感染的刺激时, T₄ 细胞内多胺堆积达活化 HIV 的阈值水平, 导致 HIV 病毒基因活化及 HIV 增殖。在增殖后期, HIV 基因产物降低细胞内多胺, 以完成 HIV 的增殖, 并阻止感染细胞中多胺水平的再次升高, 以至于细胞的增殖及其免疫活性受到抑制。

除病毒引起的细胞多胺改变调节病毒自身的生长状态外, 一些其它因素如激素、生长因

子、神经介质、一些药物、病毒的重复感染和细胞生长周期的改变, 也可以改变细胞内多胺代谢, 因此, 它们也能够影响病毒的生长状态。

多胺水平改变对病毒基因和细胞基因的选择性调节过程见图 2。

(七) 多胺水平改变与抗病毒感染和肿瘤细胞逆转化

干扰素 (IFN) 不仅是抗病毒因子, 而且是具广泛生物活性的调节蛋白, 它可以诱导肿瘤细胞逆转化, 还可以诱导多胺依赖的蛋白激酶合成, 超过细胞生理水平的多胺可以激活这些蛋白激酶。被激活的蛋白激酶使 ODC 和 SAMDC (S-腺苷蛋氨酸脱羧酶) 磷酸化而失活^[24]。这样, IFN 可以维持细胞中生理多胺的恒定。因此, 在 IFN 存在的细胞中, IFN 可以阻止病毒引起的多胺升高, 抑制病毒基因活化。在肿瘤细胞中, IFN 不仅降低多胺以阻止 c-onc 的表达, 而且, 降至生理水平的多胺又重新活化被抑制的细胞基因, 导致肿瘤细胞逆转

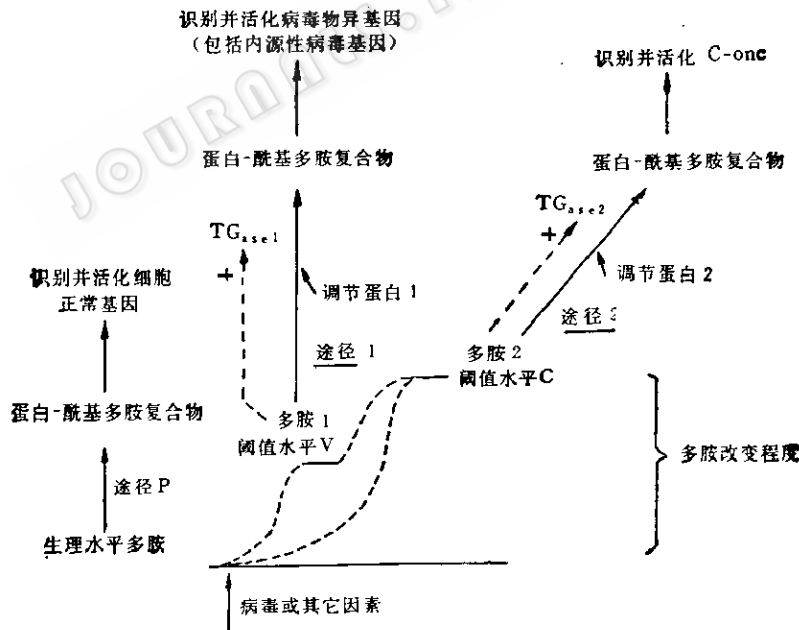


图 2 多胺水平改变对病毒基因和细胞基因的选择性调节机理

病毒等引起多胺升高, 途径 P 受阻, 细胞正常功能受抑制。若多胺升到阈值水平 V, 按途径 1, 经蛋白-酰基多胺活化病毒特异基因, 包括内源性病毒基因, 调节病毒生长状态, 若多胺改变到阈值水平 C, 则经途径 2 活化 c-onc。在某些情况下, 途径 1 也可通过升高多胺水平, 转化到途径 2, 引起细胞转化。多胺水平的降低, 可以抑制病毒基因及 c-onc 的表达, 达生理水平的多胺可重新按途径 P 打开被抑制的细胞基因, 多胺进一步降低达生理水平以下, 则抑制细胞的正常生理功能。

分化。

DFMO 是 ODC 的不可逆抑制剂,它降低细胞多胺合成的程度,与 DFMO 的剂量呈正相关性。DFMO 及多胺合成的其它抑制剂在不影响寄主细胞生长的情况下,可以抑制几乎所有病毒的生长。Schindler^[25]研究表明,DFMO 使多胺水平,特别是腐胺水平降到某阈值水平以下时,可以有效地诱导 EC 细胞分化。

虽然 IFN 和 DFMO 均通过改变细胞多胺水平以抗病毒生长,诱导肿瘤细胞逆转分化,但二者是以不同方式影响多胺代谢的。这一差异决定了它们在抗病毒、抗肿瘤生长方面的许多性质不同。

(八) 结论

病毒侵染引起宿主细胞多胺水平的改变。病毒又通过多胺的这一改变得以实现在宿主细胞内的自身调节。多胺对病毒的这种调节作用是一个复杂过程,涉及到病毒和细胞二者的协同作用,可以归纳几点:

1. 多胺在转录水平调节病毒基因的表达。基因调节蛋白的活化、病毒 DNA 构象转变和双螺旋解链及病毒基因的快速表达均需要多胺的参与。

2. 多胺在转录水平的调节,依赖其浓度水平的改变。通过 TGase 作用,将细胞内多胺水平与特定病毒基因的表达联系起来。因此,细胞内多胺水平的改变决定着病毒的生长状态。

3. 对细胞内多胺水平的调节依赖病毒和宿主细胞双方的协同作用。虽然病毒本身具改变细胞内多胺代谢能力,但离不开宿主细胞的存在。因此,细胞的生长状态及一些其它影响多胺代谢的因素,也影响细胞中病毒的生长周期。

4. 由于多胺在细胞生长、分化及增殖过程中的重要调节作用,多胺在调节病毒生长的同时,也影响细胞的正常调节过程。病毒引起的多胺大幅度升高可以诱发细胞转化,这是不同水平的多胺对病毒基因和细胞基因选择性作用的结果。

参 考 文 献

- Williamson JD et al.: *Med Microbio*, 4: 260—264, 1984.
- Hodgson J et al.: *Biochem Biophys Res Commun*, 63: 308—312, 1975.
- Lanzer W & J A Holowczak: *J. Virol*, 16: 1254—1264, 1975.
- Egberts E et al.: *J. Virol*, 22: 591—597, 1977.
- Obert G et al.: *Ann Virol (Inst Pasteur)*, 131: 15—24, 1980.
- 韩玉眠: 生物化学与生物物理进展, 4: 38—41, 1984.
- Andrew S: *New Scientist*, 101(1402): 42, 1984.
- Barbara L: *Nature* 295: 568, 1982.
- Bungay P J & M Griffin: *Biochem, Soci, Trans*, 13(2): 353—354, 1985.
- Yuspa S H et al.: *Can. Res*, 43: 5707—5712, 1985.
- Simone B et al.: *Biochem, Biophys, Acta*, 952(3): 325, 1988.
- Thomas T J et al.: *Biopolymers*, 24: 725—729, 1985.
- Thomas T et al.: *Can Res*, 48: 1217—1222, 1988.
- Betao M et al.: *J. Steroid, Biochem*, 27: 9—14, 1987.
- Bethell D R et al.: *Am. J. Physiol*, 243: C262—C269, 1982.
- Dmothy J Martin et al.: *The Journal of Cell Biology*, 108: 683—691, 1989.
- 李润生: 细胞生物学杂志, 10(4): 145—149, 1988.
- Giuseppe Scalabrino: *Adv. Can. Res*, 36: 18, 1982.
- Pegg A E: *Biochem. J*, 197: 315—320, 1981.
- Stimas Eva: *J. Cell Physiol*, 133(3): 590—594, 1987.
- Spasquali J L et al.: *Clin Exp Immunol*, 72: 141—144, 1988.
- Dinter Harald: *EMBO J*, 6(13): 4067—4071, 1987.
- Mitchell J L A et al.: *Adv. Polyamine, Res*, 1: 39, 1978.
- Sekar V et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 114(3): 950, 1983.
- Joel Schindler et al.: *J. Cell Physiol*, 122: 1—6, 1985.

糖。美国和欧洲一些国家早已商业化生产。我国目前已有批量生产。该产品具有一些卓越的物理化学性质,在石油开采、食品加工及其它工业中用途广泛^[1,2]。

研究表明,黄单胞胶是一种生物聚合物,由葡萄糖(Glc)、甘露糖(Man)和葡萄糖醛酸(GlcA)以2:2:1及不同量的丙酮酸和乙酸组成(图1)。分子的基本结构是五糖重复单位。在纤维素主链上,由 β -D-Man(1-4)- β -D-GlcA(1-2)- α -D-Man组成三糖侧链,以糖苷键交替连于葡萄糖单位的3-O-位上;乙酸以酯的形式连于侧链内部Man 6-O-位上,而丙酮酸与末端Man单位缩合成缩酮。黄单胞胶的分子量约 $5-50 \times 10^6$ 道尔顿^[3]。

尽管黄单胞胶的主要结构特征已得到证实,但许多研究表明,菌株和培养条件的变化能引起产物组分的某些改变,主要是胶分子中丙酮酸和乙酸水平的变化^[4]。经检测,一些商品黄单胞胶的丙酮酸化和乙酰化程度分别在0.32—0.44和0.34—0.90间变化^[5]。这些差异

的研究具有实际意义。本文仅就这方面的一些研究结果作一综述。

(一) 发酵条件对胶中丙酮酸含量的影响

当用*Xanthomonas*属的不同菌种生产黄单胞胶时,发现胶中丙酮酸化和乙酰化程度有很大变化,而碳水化合物变化不大,即D-Glc:D-Man:D-GlcA = 2:2:1,与公认的组成一致^[6]。Davidson研究了在不同营养限制下连续发酵的胶组分变化。发现把*X. campestris*培养于不同营养限制的恒化器中时,产物的碳水化合物组分基本一致,但乙酸水平有少量变化(3.1—5.2%),丙酮酸含量有较大差别(0.9—8.5%)(表1)。在P、Mg限制条件下,胶中出现低水平丙酮酸(0.9和1.1%)。这两种元素对生物合成中的磷酸烯醇式丙酮酸和丙酮酸化机制有直接影响^[5]。

Cadmus等^[6]在20升罐中用合成培养基证实了产生高和低丙酮酸胶(分别为4%和2%)的发酵条件。在不同制剂中发现不同量的丙酮酸缩酮影响胶溶液粘度。低氮[0.1% (NH_4)₂

表1 各种生长限制条件下连续培养生产黄单胞胶的产量和组分

	限制营养					
	Glc	N	S	K	P	Mg
细胞量(g/l)	1.1	1.6	1.8	1.7	2.9	1.5
聚合物量(g/l)	2.7	7.0	6.4	5.3	5.0	5.7
Man:Glc	1.10	1.08	1.09	1.13	1.18	1.20
GlcA(%)	21	21	18	23	17	16
乙酸(%)	4.9	3.1	—	4.5	—	5.2
丙酮酸(%)	5.8	6.6	8.5	5.5	0.9	1.1

HPO_4]和低通风量(0.25V/l/min)有利于低丙酮酸胶的产生;增加 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 至0.15%,加入 K_2HPO_4 ,并增加通风量至1.5 V/l/min,则有利于正常胶的产生。在既定试验条件下,出现的丙酮酸含量与胶质量之间的差别归因于菌株的特异性。在分批发酵过程中,两天后的产物含有4%丙酮酸,而一天的样品中仅含3%丙酮酸。由于在同一发酵的不同时间胶中丙酮酸含量各异,丙酮酸缩酮又不可能在胞外形成,因此,终产物是一个含有低丙酮酸和高丙酮酸

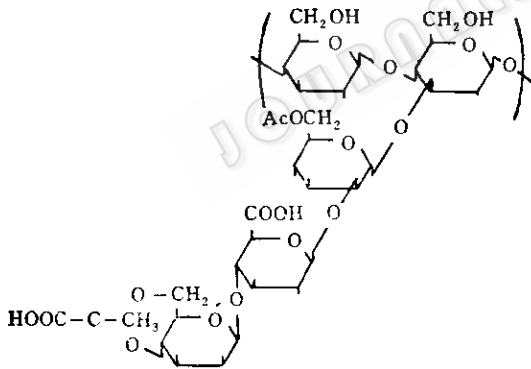


图1 黄单胞胶分子的重复单位

(-----示并非每个末端D-Man都带有丙酮酸)

可能与生产菌株、菌种保藏和其它发酵条件不同有关。曾发现一些保藏菌株的次代株在产量、粘度、丙酮酸和乙酸含量方面各不相同,从而导致产品溶液性质的差异^[6]。大量的研究表明,胶中丙酮酸含量不同是这些差异的主要原因。黄单胞胶的多数应用基于不寻常的流变学性质,因此对胶中丙酮酸含量与其溶液流变学

的混合物。另外，他们还确定了生产低丙酮酸胶 (LPxan) 和高丙酮酸胶 (HPxan) 的最适条件。产 LPxan 的培养基含有 2.5% Glc, 0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0.01% MgSO_4 , 自来水, pH7.2; HPxan 除加入 0.25% K_2HPO_4 和 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 增至 0.15% 外, 其它条件相同。试验证明, 几个次代菌株在以上两种培养基中所产胶的丙酮酸含量显著不同。

(二) 菌株变异对胶中丙酮酸含量的影响

在分批和连续发酵中均发现某些菌株的变异, 严重地影响着胶的产量和质量。变异主要是大菌落(L型)和小菌落(S型)的形成。L型产胶率高, 胶质好; S型产胶率低, 胶质差。经检测, 二者间的唯一差别是胶中丙酮酸含量不同。L型主产 HPxan, 平均含丙酮酸 4%; S型主产 LPxan, 含丙酮酸 2.5—3.0%。大菌落易变异为小菌落。不同菌株所产的胶中丙酮酸含量均不同, 约在 2.5—4.8% 之间(表 2)^[9]。后来发现, 菌株的变异性不仅仅是由菌落变型表现出来, 因为 L 型菌落亚株也可以高收率生产

表 2 B-1459 不同菌株的乙酸和丙酮酸含量

菌株类型	乙 酸 (g/100g)	丙 酮 酸 (g/100g)
PS-L	4.5	4.4
PS-S	3.7	2.5
PS-P*	4.7	4.7

* P-亲株(L)。

不合要求的 LPxan, 而且也分离到能高收率生产改性产物的 S 型菌落亚株。所以, 胶质量的最好标志是丙酮酸含量, 产生菌的菌落大小有一定影响, 但非主要因素^[10]。

在某些野生型 *X. campestris* (如 T646) 突变株的分批发酵中, 也发现侧链减少的胶^[11]。由无粘液型突变株 (T646NM2) 所产的微量胶中, 除丙酮酸含量减少外, 其它组分与野生型胶相似(表 3)。野生型与无粘液型突变株所产多糖的乙酸含量很低。

有利于生产优质胶的分批发酵工艺已确定, 并查出发酵遇到的问题多是由于菌种保藏

表 3 由野生型和无粘液型突变株产生的黄单胞胶组分(%)

菌 株	Glc	Man	GlcA	丙 酮 酸 (mmol/L/g)	乙 酸 (mmol/L/g)
T646	42	38	20	24	0.7
T646 NM2	40	38	22	1.9	0.8

注: T646:野生型, T646NM2:无粘液型突变株。

不当所致^[9]。例如, 利用 D-Glc 低的($<0.2\%$)琼脂斜面频繁传代(两周内不止一次), 即出现严重的菌株退化现象(表 4)。Kidby 等也报道^[12], 为避免菌种退化, 需要限制传代次数。在连续发酵中也遇到了这种退化。当周转 6.5—8.7 次时, 观察到 L 型菌落仍占绝对优势, 发酵仍能保持稳定状态。然后 S 型则变为优势, 稳态发酵不能保持, 导致产量和质量下降^[13]。因此, 应避免长期将菌株保存在琼脂斜面上, 一般不应超过三个月。适宜的保存方法是冻干法。

引人注意的是, 由同一公司生产的产品也可在化学组分方面不同。这就增加了生产均一产品的困难。因此, 充分注意菌株保藏至关重要。

表 4 菌株传代频率对菌落大小的影响

传代次数/14天	琼脂斜面	L:S(10个月)
1	TGY	47:1
2	TGY	10:1
6	TGY	1:3
1	YM	200:0
2	YM	120:1
6	YM	1:1

要。

许多应用都需要一种无不溶物或颜色的优质胶, 为此需有一株正常的生产菌株, 使用一种无色和无不溶物的培养基, 并控制发酵条件, 使之有助于优质胶的生产。规定优质胶的丙酮酸

含量为4%或更多;劣质胶的丙酮酸含量<3%;能生产优质胶的次代株视为正常菌株。因此,必须经常选育正常的菌株,方能优质稳产。当菌株和发酵条件改变时,应注意测定胶中的丙酮酸含量^[6]。

(三) 不同丙酮酸含量黄单胞胶的特点

黄单胞胶溶液的基本性质是独特而优越的,包括在低浓度下的高粘度和假塑性;屈服应力;当与半乳糖甘露聚糖混合时的协同增效作用;在极端 pH、温度及剪切力作用下的高度稳定性;以及随 pH 和离子强度变化的独特的粘度行为。这些性质是由其化学结构及其在溶液中出现的各种大分子形式引起的^[14]。

黄单胞胶的沉淀和再水合行为随丙酮酸含量而不同。在用乙醇沉淀过程中,HPxan 呈一种粘性纤维状沉淀缠绕于搅拌器上;LPxan 一般呈一种低粘性微粒物质沉淀,不缠搅拌器。LPxan 溶液经短暂加热(如 0.1—1.0%, 95℃, 3min),则随乙醇和 KCl 的变化产生与 HPxan 一样的沉淀行为。由于用钾盐形式分离,两种产物经冷冻干燥均呈白色纤维状。干燥的 HPxan 的特征是再水合时间长于 LPxan。HPxan 溶液没有 LPxan 溶液清亮,略呈乳白色。

Sandford 等指出^[7],胶中丙酮酸含量是其溶液性质的一个指标。丙酮酸含量 >4% 的 HPxan 都显示相似的溶液性质,并且与 LPxan 大不相同。各种胶的粘度/丙酮酸含量曲线均表明,粘度随丙酮酸含量的增加而相应提高。HPxan 粘度比 LPxan 高得多。这表明丙酮酸含量高于现在的正常胶者,可有更高的溶液粘度。如果每个末端甘露糖都带一个丙酮酸缩酮,则胶中丙酮酸含量将是 8.69%,几乎是现在 HPxan 的两倍。粘度对温度和盐的依赖性随浓度而决定的。高浓度时,HPxan 和 LPxan 的流变学性质相近;低浓度时则显著不同。

国内已有人证实^[15],在胶浓度相同的情况下,粘度随胶中丙酮酸含量增加而提高,LPxan 的溶液粘度大大低于 HPxan;胶中丙酮酸含量不同,溶液的增粘性显著不同,丙酮酸含量越

高,增粘性能越好(图 2);胶溶液的粘度随剪切速率的增加而迅速降低,但 HPxan 明显优于 LPxan (图 3)。

(四) 理论上的探讨

有人对 HPxan 和 LPxan 的分析与推理的胶组分作了比较(表 4)^[7]。发现二者的 Glc、Man 和 GlcA 的量基本一致,主要区别在于丙

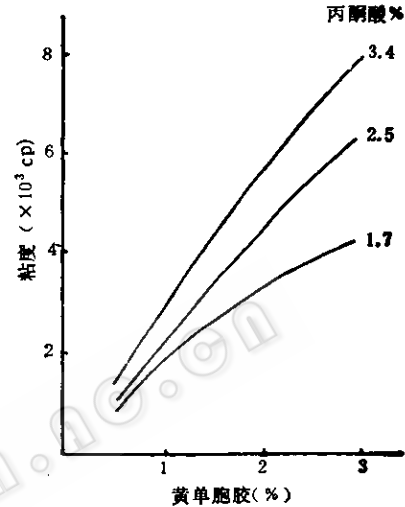


图2 黄单胞胶溶液的增粘性能比较

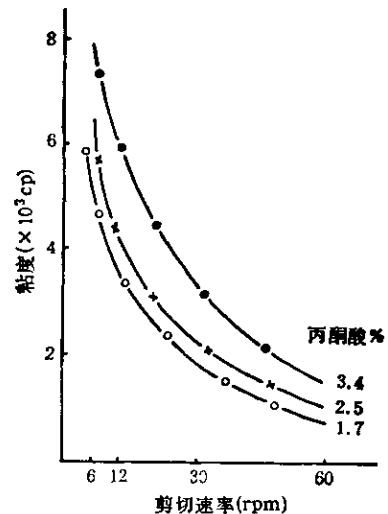


图3 1.0% 胶溶液的假塑性比较

酮酸和乙酸含量。HPxan 与每隔一个侧链末端有一丙酮酸的理論平均数相当,而 LPxan 则相当于每四个末端甘露糖有一个丙酮酸的理論数。有证据指出,丙酮酸基团在胶分子链中并非均匀分布,因为胶分子可以被分割成不同丙

表 5 实验和推理的胶组分比较

样 品	丙 酮 酸		乙 酸 g/100g	D-Glc g/100g	D-Man g/100g	D-GlcA g/100g
	类 型	g/100g				
A. 实验						
HPxan	高	4.4	4.5	37.0	43.4	19.5
LPxan	低	2.5	3.7	37.7	42.9	19.3
B. 理论						
1	最高	8.7	4.3	35.6	35.6	19.2
2	高	4.6	4.5	37.6	37.6	20.3
3	低	2.4	4.6	38.7	38.7	20.8
4	最低	0	4.8	39.8	39.8	21.5

注: 1. 每个侧链末端 D-Man 有一个丙酮酸。 2. 每隔一个侧链末端 D-Man 有一个丙酮酸。

3. 每四个侧链末端 D-Man 有一个丙酮酸。 4. 侧链末端 D-Man 无丙酮酸。

酮酸含量的片断。实际上, 在各个胶分子中, 丙酮酸可能群集。

加热 LPxan 发生粘度变化的原因尚不清楚。有解释说由于加热而形成一种新的物理结构或者发生了化学变化。例如, 通过缩酮重排、乙酸转移或酯化羧基的游离而引起的交联。但热处理前后的红外光谱一致。HPxan 的固有粘度不受加热的影响。

HPxan 的溶液粘度比 LPxan 高的原因是二者在溶液中的分子相互作用不同, 丙酮酸的羧基可影响电荷分布到大分子上。Bradshaw 等指出^[6], 胶中丙酮酸含量不直接影响溶液粘度, 因为天然黄单胞胶和用温和水解制备的无丙酮酸胶在 0.2—1.5% 浓度、 $10S^{-1}$ 剪切速率时粘度近似。但化学制备的无丙酮酸胶比由变异株产生的无丙酮酸胶粘度高。Smith 等认为^[5], 胶中丙酮酸基团在大分子交联中起某种作用。发现往提纯的胶液中加入 1.0% KCl, 粘度的变化只有当丙酮酸化程度 >0.31 时才发生。胶液中的大分子交联作用被丙酮酸甲基基团间非极性相互作用所促进。这些甲基位于螺旋结构的外围。另外, 胶液的微孔过滤进一步证实了丙酮酸对交联的作用。随着 NaCl 的增加, 通过滤膜 ($3\mu m$) 的流动阻力也增加。但各种来源的无丙酮酸胶液在所有 NaCl 浓度下均易通过此滤膜。尚无证据表明脱乙酰基胶液能提高滤过能力。因此, 乙酸可能不在大分子交联中起作用, 因其位置太靠近螺旋中心。

黄单胞胶中的丙酮酸含量是发酵条件和菌株的函数。有可能得到这样的胶, 即分子中的丙酮酸含量可从 0 到理论上的最高值 (8.69%)。这些不同产品在耐受海水“硬”盐、增粘效力和发酵液粘度等方面均有区别^[17]。因此, 可以通过发酵条件和菌株变异的选择来影响胶中丙酮酸含量。胶中丙酮酸的变化并没有改变聚合物总体结构, 但当胶浓度或离子强度、pH、温度等变化时影响胶液的流变学变化。这些影响与丙酮酸残基启动胶分子的聚集形式有关。聚集形式占优势的胶液显示较高的表观粘度、假塑性和屈服应力。因而控制胶中丙酮酸含量展示了一个调整多糖性质的有用途径。

参 考 文 献

1. Rogovin I S et al.: *J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng.*, 3: 51, 1961.
2. Jeanes A: *J. Polym. Sci. Polym. Symp.*, 45: 209—227, 1974.
3. Jaunsson P E et al.: *Carbohydr. Res.*, 45: 275, 1975.
4. Sutherland I W: *Adv. Microb. Physiol.*, 8: 143—208, 1972.
5. Smith I H et al.: *Int. J. Biol. Macromol.*, 3: 129—134, 1981.
6. Cadmus M C et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 20: 1003—1014, 1987.
7. Sanford P A et al.: in “Extracellular Microbiol Poly, saccharides”, ACS Symp. ser., 45: 192—210, 1977.
8. Davidson I W: *FEMS Microbiol. Lett.*, 3: 347—349, 1978.
9. Cadmus M E et al.: *Can. J. Microbiol.*, 22: 942—948, 1976.
10. Slodki M E et al.: *Adv. Appl. Microbiol.*, 23: 19—54,

(下转第 249 页)

(上接第 245 页)

1978.

11. Whitfield C et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 124: 388—392, 1981.
12. Kidby D et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 33: 840, 1977.
13. Silman R W & P Rogovin: *Biotachnol. Bioeng.*, 14: 23, 1972.

14. Margaritis A: in "Comprehensive Biotechnology", 3, 1005—1044, 1985.
15. 刘如林等: 微生物学杂志9,(4): 1—6, 1989.
16. Bradshaw I J et al.: *Carbohydr. Polym.*, 3: 23—38, 1983.
17. Wernau W C: *Dev. Ind. Microb.*, 26: 263—269, 1984.