

L-异白氨酸发酵的研究

IV. L-异白氨酸生物合成调节机制的初步研究

唐任天 郭永复 陈琦

(中国科学院微生物研究所, 北京)

钝齿棒状杆菌新种 AS 1.542, 及其诱变株 AS 1.998 均含有 TDase、AHAase 及 TAase 活性。试验了二价离子及 pH 对酶活性的影响。测定了 TDase 及 AHAase 受末端氨基酸反馈抑制的程度, 及表观米氏常数。

结果表明, TDase 及 AHAase 均有两个酶反应最适 pH。Leu、iLeu、Val 及 KB 对酶活性均有负反馈抑制作用。AS 1.998 的 TDase 受 iLeu、Val 的负反馈抑制作用减少; 其 AHAase 总活性明显增加。

由此认为诱变株 AS 1.998 受到的末端氨基酸反馈控制作用被部份解除, 从而导致该菌积累 iLeu。

谷氨酸生产菌 AS 1.542 是钝齿棒状杆菌新种。以它为出发菌诱变获得 iLeu 产生菌 AS 1.998。但是这些菌的氨基酸生物合成调节机制还未经研究。本文对 AS 1.542 及 AS 1.998 菌, 进行了 iLeu 生物合成调控机制的初步探讨。

材料与方 法

(一) 菌株: 钝齿棒状杆菌 (*Corynebacterium crenatum* nov. sp) AS 1.542^[1], 及由此菌诱变获得的抗 α -氨基- β -戊酸的 iLeu 生产菌 AS 1.998^[2-3]。

(二) 种子培养基组成(%): 葡萄糖 1.0, 脲 0.2, 硫酸铵 0.3, 玉米浆 0.2, 豆饼水解液 0.1 (以豆饼干重计算), pH 7.2。5 升三角瓶装量 1 升。接种后旋转摇床培养 14 小时。

(三) 无细胞酶抽提物的制备: 离心收获细胞并以 0.2% 氯化钾溶液洗净后, 悬浮于 10% 甘油溶液中, 冰盐浴中以超声波细胞破碎器处理。加入硫酸链霉素。离心清液加入硫酸铵。为制备 TDase, 硫酸铵饱和度为 30—40%; 对 AHAase 则为 38—45%。将沉淀溶于 10% 甘油中, 流经葡聚糖 G-25 柱, 收集活性部份。

(四) TDase 活性测定: 参考 Masahiko Kisumi 等方法^[4]。反应液终浓度为(毫克分子浓度): Thr 20, 磷酸吡哆醛 0.02, Tris-顺丁烯二酸-NaOH 缓冲液 100 (pH 9), 无细胞酶抽提物适量, 终体积 2.5 毫升。37°C 反应, 保温时间一般为 30 分钟。加入 50% 三氯醋酸 0.1 毫升中止反应。生成的 KB 按藤井畅三的方法测定^[5]。取离心清液 2 毫升, 加入 0.5 毫升 0.1% 的 2, 4-二硝基苯胍的 2N 盐酸溶液, 37°C 保温 5 分钟, 冷却后加入 0.5 毫升 8N NaOH。测定 480 毫微米光密度值, 按标准曲线折算成 KB 毫克分子数。在测定条件下 1 毫克分子 KB/30 分·毫克蛋白为 1 酶活单位。

(五) AHAase 活性测定: 参考 M. B. Coukell 等法^[6], 反应液终浓度(毫克分子浓度): 丙酮酸钠

本文于 1980 年 4 月 7 日收到。

本文采用以下缩写:

Ala, L-丙氨酸;	Lys, L-赖氨酸;
Val, L-缬氨酸;	Asp, L-天门冬氨酸;
Leu, L-白氨酸;	AHA, α -乙酰羟酸;
DThr, D-苏氨酸;	Met, L-蛋氨酸;
TDase, L-苏氨酸脱氨酶;	HSer, L-同型丝氨酸;
Py, 丙酮酸;	AHAase, α -乙酰羟酸合成酶;
iLeu, L-异白氨酸;	Ser, L-丝氨酸;
TAase, 转氨酶;	KB, α -酮丁酸;
Thr, L-苏氨酸。	

40, 焦磷酸硫铵素 0.2, MgCl₂ 10, 黄素腺嘌呤二核苷酸 0.05, Na-磷酸缓冲液 100 (pH 8), 无细胞酶提取物适量, 终体积 2.5 毫升。37℃ 保温后加入 50% 三氯醋酸 0.1 毫升。按 W. W. Westerfield^[7] 及 A. N. Radhakrishnan^[8] 等法测定生成的 AHA。取加三氯醋酸后的离心清液 2 毫升, 60℃ 保温 15 分钟, 冷却后加入 0.5 毫升肌酸 (0.5% 溶液), 及 0.5 毫升 α -萘酚 (5.0% 的 2.5N NaOH 溶液)。37℃ 保温 15 分钟, 测定 530 毫微米光密度值。1 毫克分子 AHA/30 分·毫克蛋白为 1 酶活单位。

(六) 蛋白质浓度测定: 以牛血清白蛋白水溶液作标准, 按 260 Å、280 Å 双波长经验公式计算。

结果与讨论

(一) 各种氨基酸对菌株生长的影响

AS 1.542 及 AS 1.998 菌体洗净后加到基础培养基琼脂平皿内, 在琼脂平皿表面分别加一定量的各种氨基酸, 培养后测定

抑菌圈半径。由表 1 可见, ILeu、Val、HSer、Thr、Asp 及 DThr 对 AS 1.542 的生长有不同程度的抑制; 而 ILeu、Val 及 HSer 对 AS 1.998 菌的抑制则有不同程度减弱。

(二) 各种氨基酸对 ILeu 产生的影响

根据以上结果, 估计某些氨基酸会影响 ILeu 的合成, 于是进行了摇管培养试验。表 2 说明, Thr、ILeu、HSer 及 Lys 依次对 AS 1.998 的生长有一定抑制作用。添加 Thr 或 HSer 对该菌积累 ILeu 有明显抑制; 而较低浓度的 Lys 和 ILeu 则不仅没有抑制, 似乎反而有刺激作用。

(三) TDase 及 AHAase 活性在两株菌间的比较

以湿细胞、丙酮干粉细胞制剂和无细胞酶提取物作为酶源, 比较了两株菌的 TDase 与 AHAase 活性。无细胞酶提取物的比活性的单位蛋白量所具有的活性计

表 1 氨基酸对菌株生长的影响

抑制圈半径 (毫微米)	氨基酸	菌株									
		Ala	Asp	HSer	Thr	DThr	ILeu	Val	Leu	Met	Lys
AS 1.542		0	2	2	8	4	6	2	0	0	0
AS 1.998		0	2	0	8	4	0	0	0	0	0

基础培养基组成(%): 葡萄糖 2.0, KH₂PO₄ 0.1, (NH₄)₂HPO₄ 0.2, MgSO₄·7H₂O 0.04, Fe²⁺、Mn²⁺ 2ppm, 生物素 10 微克/100 毫升, 硫胺素·HCl 100 微克/100 毫升, 琼脂 2.0。28℃ 培养 2 天。

表 2 氨基酸对 AS 1.998 菌产生 ILeu 的影响*

添加氨基酸	HSer			Thr			Lys			ILeu			对照
	0.33	0.65	1.00	0.33	0.65	1.00	0.33	0.65	1.00	0.33	0.65	1.00	
菌体生长(%)	84	51	28	4	5	5	93	47	19	60	32	32	100
ILeu 产量(%)	11	12	12	19	18	16	179	263	74	214	102	91	100

* 除添加氨基酸按表内所列外, 其余培养基组成(%): 葡萄糖 12.0, (NH₄)₂SO₄ 2.0, K₂HPO₄ 0.1, KH₂PO₄ 0.1, MgSO₄·7H₂O 0.04, Fe²⁺、Mn²⁺ 0.0002, 生物素 10 微克/升, 硫胺素·HCl 50 微克/升, CaCO₃ 2.0, pH 7.2。小试管装量 2.5 毫升。30℃ 摇床培养 1 天测定生长 (O. D.₆₁₀), 培养 3 天测定 ILeu 产量。以不加氨基酸者为对照。

算,而总活性以单位原细胞量所相应的活性计算;湿细胞或丙酮干粉细胞制剂则以单位重量湿细胞或制剂的活性计算。由表 3 可见,AS 1.998 的 TDase 比活性有所增加,而以湿细胞或丙酮干粉制剂进行的试验亦反映出相近的增加。似乎表明细胞膜

表 3 TDase、AHAase 活性在两株菌中的比较*

酶	菌株		
	AS1.542	AS1.998	
TDase	酶活性比(%)		
	湿细胞	100	112
	丙酮干粉制剂	100	130
	无细胞提取物(比活)	100	125
AHAase	无细胞提取物(总活)	100	117
	无细胞提取物(比活)	100	118
	无细胞提取物(总活)	100	249

* 在各项平行比较试验中,以 AS 1.542 的活性为 100 进行比较。

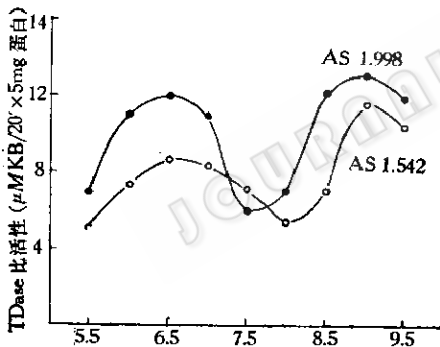


图 1 TDase 的最适 pH

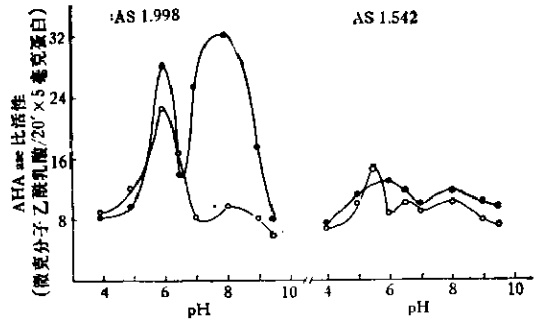


图 2 AHAase 的最适 pH 及预热效应
预热酶处理是在 40℃ 预热 30 分钟后于 0℃ 冷却
○—○ 未预热 ●—● 预热

对底物、产物的进出并无严重障碍。此外 AS 1.998 的 AHAase 总活性亦明显提高。

(四) TDase 的最适 pH

以下试验均用无细胞酶抽提物进行。由图 1 可见,AS 1.542 及 AS 1.998 的 TDase 均有二个最适 pH, 分别为 6.5 及 9.0。表明这些菌有可能存在同工酶。

(五) AHAase 的最适 pH

由图 2 可见,AS 1.542 在 pH 5.5 处活性较高,在 pH 8.0 及 pH 6.5 处有两个小峰;而 AS 1.998 最适 pH 为 6.0 及 8.0。有趣的是,经热预处理而又冷却之后,AS 1.998 的碱性 AHAase 活性有明显增加。此现象似未见报道。

(六) 二价离子对 AHAase 活性的影响

从表 4 可以看出,金属离子 Co^{2+} 、

表 4 二价离子对 AHAase 活性的影响*

菌株	酶活性比 (%)	离子							
		Mg^{2+}	Co^{2+}	Zn^{2+}	Ni^{2+}	Mo^{2+}	Fe^{2+}	Mn^{2+}	CrO_4^{2-}
AS 1.542	4	100	130	131	120	134	115	128	50
	40	119	122	114	114	92	125	155	25
AS 1.998	4	100	113	111	105	117	96	115	61
	40	111	118	98	105	94	110	127	40

* 以加入 4 ppm $MgSO_4$ 者为对照计算。

表 5 氨基酸对 TDase、AHAase 的反馈抑制

酶	抑制率 (%) 菌株	添加氨基酸						
		Leu	ILeu	Val	Leu ILeu	Leu Val	ILeu Val	Leu ILeu Val
TDase	AS 1.542	32	44	40	51	43	52	53
	AS 1.998	31	22	12	35	24	23	42
AHAase	AS 1.542	14	31	53	31	56	61	65
	AS 1.998	11	24	46	28	49	51	54

注: 添加氨基酸各为 1 毫克分子浓度。以未添加氨基酸者为对照进行计算。

Zn²⁺、Ni²⁺、Mo²⁺、Mn²⁺ 对 AS 1.542 的 AHAase 的激活作用似比 Mg²⁺ 强, 但对 AS 1.998 则作用不明显。另外阴离子 CrO₄²⁻ 对两株菌均有强烈抑制作用。

(七) 氨基酸对 TDase、AHAase 的反馈抑制

在以 Thr 或 Py 为底物的反应体系中, 分别加入等量各种代谢末端氨基酸, 然后测定 TDase 或 AHAase 的酶活性。结果表明, Leu、ILeu、Val 及它们的相互组合均对酶活性有负反馈抑制作用, 但不呈现协同反馈抑制作用。

(八) AHAase 的表现米氏常数

为了解 Py 及各末端氨基酸与 AHAase 结合的情况, 以 Py 为底物, 按“1/V—1/S”作图, 分别求出在 Leu、ILeu、Val 或 KB 存在与否时的表现米氏常数如图 3 及表 6 所示。

表 6 AHAase 的反应表现米氏常数*

菌株	表现米氏常数 (毫克分子)				
	K _m	K _{Leu}	K _{ILeu}	K _{Val}	K _{KB}
AS 1.542	7.57	10.50	12.60	18.03	10.73
AS 1.998	8.00	9.10	15.38	21.50	11.84

* K_{Leu}、K_{ILeu}、K_{Val} 及 K_{KB} 分别表示添加 1 毫克分子浓度的 Leu、ILeu、Val 或 KB 情况下测得的表现米氏常数。以不添加者作 K_m。

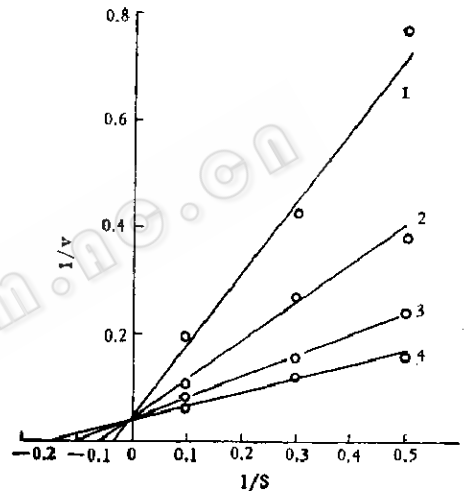


图 3 抑制剂存在下改变底物浓度对 AHAase 反应初速度的影响

v 为初速度(微克分子浓度乙酰乳酸/10 分钟 × 5 毫克蛋白)。1, 2, 3, 4 依次为添加 1 毫克分子浓度的 Val、ILeu、Leu 及不添加的对照试验组

综合上述结果, 可能由于获得了抗 α -氨基 β -羟基戊酸的特性, AS 1.998 的 TDase 比活性增加, 受到 ILeu 及 Val 及它们的组合的负反馈抑制作用减少; AHAase 总活性明显增加, 表明对酶本身生成的反馈阻遏作用可能得到部份解除。K_{ILeu} 与 K_{Val} 值增大, 反映 ILeu 与 Val 对 AHAase 的竞争能力减少。由于 TDase 活性增加、抑制减少, Thr 便可能迅速转变成 KB, Thr 胞内浓度减少, 它对菌体生长及

- [15] Komatsubara et al.: *Amino Acid and Nucleic Acid*, 34: 71—74, 1976.
- [16] Masahiko Kisumi et al.: *J. Biochem.*, 82: 95—103, 1977.
- [17] Hidehiko Kumagai et al.: *Agri. Biol. Chem.*, 42: 613—621, 1978.
- [18] Umbarger, H. E.: *Ann. Rev. Biochem.*, 47: 533—606, 1978.
- [19] 唐任天等: 微生物学报, 15(3): 205—211, 1975。
- [20] 唐任天等: 第四届国际食品科学技术会议论文集编(摘要), 6b-02 (东京), 1978。
- [21] 唐任天等: 微生物学通报, 5(2): 11—13, 1978。

STUDIES ON THE FERMENTATION OF L-ISOLEUCINE

IV. STUDIES ON THE REGULATION OF L-ISOLEUCINE BIOSYNTHESIS

Tang Rentian Guo Yongfu Chen Qi

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Glutamic acid-producing bacterium AS 1.542 (*Corynebacterium crenatum*) and its isoleucine-producing mutant AS 1.998 resistant to α -amino- β -hydroxyvaleric acid, were used in these experiments.

L-threonine deaminase (TDase), acetohydroxy acid synthetase (AHAase) and transaminase were found in these strains.

AHAase activity was stimulated by Co^{2+} , Zn^{2+} , Mo^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} metal ions, and it was inhibited by CrO_4^{2-} ion.

The fact that each enzyme preparation of TDase or AHAase from both strains had two pH optima suggest that there may be two forms of TDase or

AHAase. It was found that the basic AHAase activity of AS 1.998 strain became higher after heat treatment.

TDase and AHAase activity in AS 1.998 were higher than that in AS 1.542. From kinetic analysis, it was found that the feedback inhibition of isoleucine, leucine or valine on AHAase were less in AS 1.998. These changes may lead to produce a large amount of isoleucine.

From the above results, the metabolic pathway and regulatory mechanism of isoleucine biosynthesis in AS 1.542 and AS 1.998 have been discussed preliminarily.