

氮和碳对北京棒状杆菌谷酰胺合成酶的调节作用

孟广震 郝凤兮 钱世钧

(中国科学院微生物研究所, 北京)

不同氮源对北京棒状杆菌谷酰胺合成酶 (GS) 形成的影响显著不同。高浓度的 NH_4^+ 对 GS 的合成有阻遏作用, 而谷氨酸或低浓度的 NH_4^+ 对 GS 的合成有解阻遏作用。葡萄糖能促进 GS 的合成, 但阻遏谷氨酸脱氢酶 (GDH) 的合成。

关键词 北京棒状杆菌; 谷酰胺合成酶; 酶的调节

谷氨酰胺合成酶 (GS) 在许多生物氮代谢的调控中占有重要地位^[1]。对大肠杆菌的 GS 研究较充分, Brown 等^[2]曾证实该酶具有多种不同的调节形式。不同生物来源之 GS 的调节方式彼此各异^[3], 但关于氨基酸生产菌株的 GS 研究报告甚少。已知北京棒状杆菌 (*Corynebacterium pekinense* AS 1.299) 在分类上属于新种, 已应用于氨基酸生产^[4], 本文报告该菌 GS 在细胞水平上的调节规律。

材料和方法

(一) 菌种

北京棒状杆菌 AS 1.299, 由本所五室馈赠。在普通牛肉汁-琼脂斜面上于 30℃ 培养 24 小时。

(二) 摇瓶培养基

主要采用以下两种基础培养基:

A 培养基: 葡萄糖 1%, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.065%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.062%, 酵母汁 0.03%, 谷氨酸钠 60mM, pH 7.0。

B 培养基: 葡萄糖 6%, 谷氨酸钠 4%, K_2HPO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.002%, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.002%, 生物素 0.1μg/100ml, pH 7.0。

(三) 细胞破碎及无细胞提取液的制备

将一份湿细胞悬于六份 0.05M 咪唑-HCl 缓冲液中, 用 MSE 超声破碎器 (20KC) 于冰浴中处理 3 分钟, 然后于 12000 × g 离心 10 分钟, 上清

部分即无细胞提取液。

(四) 通透化细胞制备方法^[5]

取 25ml 培养物, 离心得湿细胞, 悬浮于 4ml 0.01M 咪唑-HCl 缓冲液 (pH 7.0) 中, 加 0.4ml 甲苯及 0.4 ml (1mg/ml) 的十六烷基三甲基溴铵 (CTAB), 于 30℃ 振荡 10 分钟, 离心后再悬于 4ml 同种缓冲液中。

(五) 谷酰胺合成酶 (GS) 活力的测定方法

以谷氨酰胺和羟胺为底物, 按 Woolfolk 等^[6]方法测定。反应混合物总体积为 2ml, 内含 0.06M 羟胺, 0.02M 砷酸钠, 0.03M L-谷氨酰胺, $4 \times 10^{-4}\text{M}$ MnCl_2 , $4 \times 10^{-4}\text{M}$ ADP 以及适当的酶量, 均溶于 0.05M 咪唑-HCl 缓冲液。反应物在 37℃ 作用 15 分钟, 加入 0.5ml 显色液 (内含等体积的 6N HCl 24% 三氯乙酸及 10% $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 的 0.02N 盐酸溶液) 终止反应, 在 540nm 波长处比色测定形成的 γ-谷氨酰肼酮酸。在上述条件下, 1 分钟催化形成 1μmol γ-谷氨酰肼酮酸所需要的酶量定义为一个酶活力单位。

(六) 谷氨酸脱氢酶 (GDH) 活力测定方法

用追踪 NADPH 在 340nm 的光吸收的改变进行测定^[7]。在终体积为 3ml 的反应混合物中含 5mM α-酮戊二酸, 0.25mM NADPH, 40mM NH_4Cl 和适当的酶量, 均溶于 0.05M Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5) 中。在上述条件下 1 分钟催化氧化 1 nmol NADPH 的酶量定义为一个酶活力单位。

本文于 1985 年 6 月 14 日收到。

(七) 蛋白质测定方法

无细胞提取液的蛋白质直接用 Lowry^[7] 方法测定。菌体蛋白质需预处理^[8]: 离心收集菌体, 用少量蒸馏水洗涤, 加 2ml 5% 的三氯乙酸, 离心后将菌体溶于 1M NaOH 中。

结 果

(一) 不同氮源对 GS 合成的调节作用

用

用不同的氮源补充或取代 A 培养基的

谷氨酸钠, 接种后于 30℃ 振荡培养 24 小时后测定细胞生长、菌体蛋白质及通透细胞 GS 活力, 结果如表 1 所示。加入规定量的 NH_4Cl 或尿素均阻遏 GS 的形成, 引起比活力的明显下降。

(二) 氮源浓度对 GS 合成的影响

改变 A 培养基中谷氨酸的浓度, 培养后测定细胞生长及比活力。结果如表 2 所示, 谷氨酸浓度在 50mM 以下时, 生长和比活力均无明显差别; 60mM 时, 细胞生

表 1 不同氮源对 GS 活力的影响

Table 1 GS activity in *Corynebacterium pekinense* AS 1,299 grown on various nitrogen sources

氮 源 Nitrogen source	生 长 Growth (A_{620nm})	GS 活 力 GS activity (U/ml)	蛋 白 质 Protein (mg/ml)	比 活 力 Specific activity (U/mg protein)
Sodium glutamate (60mM)	0.35	100	14	7.14
Sodium glutamate (60mM)+ NH_4Cl (20mM)	0.41	13	19	0.68
Urea (30mM)	0.46	15	13	1.10
NH_4Cl (60mM)	0.27	1	5	0.20

表 2 培养基中谷氨酸浓度对 GS 活力的影响

Table 2 Effect of concentration of glutamate in culture medium on GS activity

谷氨酸浓度 Concentration of glutamate (mM)	生 长 Growth (A_{620nm})	相对活力 Relative specific activity (%)
10	0.42	100
20	0.35	114
40	0.405	100
50	0.427	93
60	0.727	242

长和比活力均明显增加。

在完全 A 培养基中补加不同浓度 NH_4Cl 或尿素, 对 GS 活力的影响如表 3 和表 4 所示, 低浓度无机氮 (1mM 铵或尿素) 能促进 GS 的合成, 但高浓度的无机氮使 GS 的合成受到明显的阻遏。

表 3 培养基中 NH_4Cl 浓度对 GS 活力的影响

Table 3 Effect of concentration of NH_4Cl in culture medium on GS activity

NH_4Cl 浓度 Concentration of NH_4Cl (mM)	生 长 Growth (A_{620nm})	相对活力 Relative specific activity (%)
0	0.16	100
1	0.42	193
2	0.46	141
5	0.44	90
10	0.21	7
20	0.21	6.5
40	0.17	6.5

(三) 碳源对 GS 和 GDH 合成的调节作用

实验用洗涤菌体进行。先在 B 培养基

表 4 培养基中尿素浓度对 GS 活力的影响
Table 4 Effect of concentration of urea in culture medium on GS activity

尿素浓度 Concentration of urea (mM)	生 长 Growth (A _{620nm})	相对活力 Relative activity (%)
0	0.2	100
0.5	0.25	128
1	0.26	155
2.5	0.32	139
5	0.18	80
10	0.23	23
20	0.62	9
30	0.66	8

中于 30℃ 培养 16 小时后,离心收集菌体,然后用无菌水洗涤两次,将该菌体先转到缺葡萄糖的 B 培养基中培养 4 小时,然后补加葡萄糖到 6%,继续培养 6 小时,每隔 2 小时取样制备无细胞提取液,测定蛋白质、GS 及 GDH 活力,结果如图 1 所示。在剥夺葡萄糖的条件下,以谷氨酸为唯一的碳/氮源,生长缓慢,GS 和 GDH 活力不同程度下降。葡萄糖补回培养基后,生

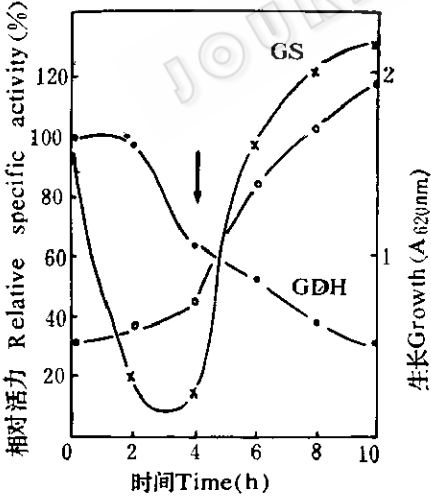


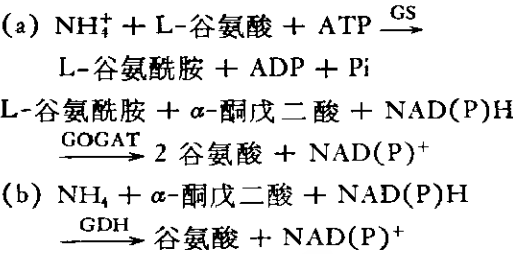
图 1 培养基中碳源对 GS 和 GDH 活力的影响
(箭头示补加葡萄糖)

Fig. 1 Effect of carbon source in culture medium on GS and GDH activity (The arrow indicates the addition of glucose)
○—○ Growth

长恢复,GS 活力迅速上升,而 GDH 继续下降。

讨 论

通常认为微生物对氮的同化有两种不同的途径^[9]: (a) GS/GOGAT 途径; (b) GDH 途径(见下式)。



因此,GS 和 GDH 的细胞水平常能代表上述两个互相对立又互相补充的氮的同化路线。如大肠杆菌在以谷氨酸为氮源时对 GS 有解阻遏作用,而对 GDH 却有明显的阻遏作用^[6]。本文报告在剥夺葡萄糖的培养基中培养后;再将葡萄糖补回培养基,GDH 和 GS 活力水平也呈相反的消长关系。

本文结果说明:高浓度氮对北京棒杆菌的 GS 有明显的阻遏作用,而谷氨酸有解阻遏作用。Halpern 等^[10]认为与氮相比谷氨酸的通透能力较差,是比较差的氮源。当培养基中含有高浓度的氮时,微生物便有效地利用这种氮源,而“无须”先经 GS 催化合成谷氨酰胺。

Miller 等^[12]报告 GS 比 GDH 对氮有较高的亲和力,因此在低浓度氮的培养条件下,GS 是比较有效的氮的同化途径,但需消耗一分子 ATP 能量。相反,GDH 对氮的亲和力较低,在高浓度氮的培养基中,GDH 是比较有效的同化氮的途径,而且耗能少。在以生产单细胞蛋白为目的的研究中,Windass 等^[12]成功地把大肠杆菌的 GDH 基因克隆到 *Methylophilus methylotrophus* 的质粒上,从而实现消耗较少的甲

醇,合成更多细胞蛋白的目标。

本文在细胞水平上初步揭示了 GS 活力调节的某些规律,关于 GS 活力调节的本质及在调节过程中 GS 的酶分子行为正在研究中。

参 考 文 献

- [1] Tyler, B.: *Annu. Rev. Biochem.*, 47: 1127—1162, 1978.
- [2] Brown, M. S. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 68: 2949, 1975.
- [3] Deuel, T. F. and S. Prusiner: *J. Biol. Chem.*, 247: 257—264, 1974.
- [4] 陈琦等: *微生物学报*, 13(1): 1—6, 1973.

- [5] Khanna, S. and D. T. D. Nicholas: *Arch. Microbiol.*, 134: 98—103, 1983.
- [6] Woolfolk, C. A. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 116: 177—192, 1966.
- [7] Lowry, P. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 193: 265, 1951.
- [8] Mora, Y., et al.: *J. General Microbiol.*, 118: 455—463, 1980.
- [9] Donald, R. G. K. and R. A. Ludwig: *J. Bacteriology*, 158(3): 1144—1151, 1984.
- [10] Ha'pern, Y. S. and H. E. Umbarger: *J. Gen. Microbiol.*, 20: 175—183, 1961.
- [11] Miller, R. E. and E. R. Stadtman: *J. Biol. Chem.*, 247: 7407—7419, 1972.
- [12] Windass, J. D. et al.: *Nature*, 287(5781): 396—401, 1980.

REGULATION OF *CORYNEBACTERIUM PEKINENSE* GLUTAMINE SYNTHETASE BY THE CARBON AND NITROGEN SOURCE

Meng Guangzhen Hao Fengxi Qian Shijun

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

The effect of the carbon and nitrogen source on the regulation of glutamine synthetase (GS) has been studied. The level of GS in *Corynebacterium pekinense* AS 1.299 varied in response to the nature and concentration of the nitrogen source in culture medium. Specific activity of GS was much higher in glutamate-grown cells than in ammonium or urea-grown cells. We suggest that the GS formation is strongly repressed by ammonium with high concentration and depressed by glutamate. In

addition, the activity of GS and glutamate dehydrogenase (GDH) decreased when the cells was deprived of carbon source. Some of GS was resynthesized with restoration of carbon source. In contrast, further decrease in GDH activity occurred in the same conditions.

Key words

Corynebacterium pekinense; Glutamine synthetase; Enzyme regulation