

L'EFFET INHIBITEUR SPECIFIQUE DANS LA PRODUCTION DE LA XYLOSE-ISOMERASE CHEZ *L. FERMENTUM*

Kei YAMANAKA

(Laboratoire de Microbiologie)

(Reçu le 6 Août, 1959)

On sait que la production (biosynthèse) de la pentose-isomérase chez certaines bactéries est essentiellement adaptative et aussi inductible. Il a été montré précédemment que cette enzyme chez bacille d'hétérolactique se produit dans toutes les diverses conditions des cultures et que sa formation est constitutive⁽¹⁾. Au contraire, sa production par bacille d'homolactique est adaptative, c'est-à-dire l'arabinose-isomérase se produit dans seule une culture qui contient arabinose à la source de carbon. L'activité de xylose-isomérase chez *L. fermentum* a été démontrée dans l'extrait de cette cellule cultivée sur xylose, mannose, arabinose ou fructose. Mais, en contre, cette activité n'est pas décelable dans autre cas⁽¹⁾.

Il est montré ici qu'en présence du glucose dans le milieu, la production de xylose-isomérase est nettement inhibée. L'enzyme est extrait à la cellule de *L. fermentum*, une bacille d'hétérolactique cultivée dans le médium synthétique contenant peptone 1%, extrait de la levure 1%, acetate de sodium 1%, SO₄Mg 0.02%, SO₄Mn 0.001%, ClNa 0.001%, et SO₄Fe 0.001% à 37°C pendant vingt heures.

Pour obtenir des extraits, les bactéries lavées deux fois par centrifugation, sont broyées avec de

Tableau I. Rapport de l'Activité de la Pentose-Isomérase

A. Xylose-isomérase

source de carbon organisme	glucose	fructose	mannose	galactose	xylose	arabinose
<i>L. fermentum</i>	0	20	100	2	100	71
<i>L. fermenti</i>	2	0	8	—	100	—
<i>Leuc. mesenteroides</i>	13	88	80	—	100	—
<i>L. brevis</i>	118	53	24	26	100	51
<i>L. pentoaceticus</i>	12	20	—	0	100	3
<i>L. lycopersici</i>	49	8	17	11	100	9
<i>L. gayonii</i>	32	21	—	7	100	6
<i>L. buchneri</i>	3	15	—	2	100	24
<i>L. mannitoposus</i>	11	10	—	27	100	17
<i>L. xylosus</i>	78	81	—	13	100	—

B. Arabinose-isomérase

<i>L. brevis</i>	56	30	44	48	43	100
<i>L. pentoaceticus</i>	123	127	—	24	82	100
<i>L. lycopersici</i>	160	160	99	46	41	100
<i>L. gayonii</i>	86	63	—	89	73	100
<i>L. buchneri</i>	—	66	—	29	74	100
<i>L. mannitoposus</i>	81	59	—	106	104	100
<i>Pc. lindneri</i>	166	75	98	75	—	100
<i>L. plantarum</i>	0	0	0	—	—	100
<i>L. arabinosus</i>	0	0	0	—	—	100
<i>L. cucumeris</i>	0	0	0	—	—	100
<i>L. sake</i>	0	0	0	—	—	100
<i>L. wortmannii</i>	0	0	0	—	—	100
<i>Sc. thermophilus</i>	0	0	0	—	—	100

l'alumine Le broyat replit dans de l'eau est centrifugé à la vitesse de 20,000g pendant trente minutes. L'activité de la xylose-isomérase est suivie par détermination du xylulose formé d'après l'incubation à 37° C en 10 minutes dans la solution de 3.0 ml contenant: 10 μM de Cl_2Mg , 50 μM de tampon de Tris à pH 7.4, 20 μM de xylose, 20 μM du fluor de sodium, et l'extrait d'enzyme. Xylulose est dosé par la méthode de cystéine-carbazole⁽²⁾, et la protéine d'extrait est exécutée par la méthode de LOWRY⁽³⁾. Activité spécifique de l'isomérase est exprimée à micromoles du cétopentose formé au milligramme de protéine du broyat dans cette condition. L'activité spécifique des arabinose- et xylose-isomérases est rapportée dans le tableau I.

Résultats obtenus dans ce tableau, s'expliquent si l'on admet:

a) que l'activité de l'arabinose-isomérase par pluparts des sources de bacille d'hétérolactique et par *Pc. lindneri* ne change pas par l'aliment carboné.

b) que cette activité chez bacille d'homolactique est démontrée dans seule la culture contenant l'arabinose.

c) ainsi que la xylose-isomérase par bacille d'hétérolactique et par *L. xylosus* se produit assez fortement dans la cellule obtenue à la culture contient xylose, glucose, fructose ou arabinose.

d) que *L. fermentum* produit la xylose-isomérase qui, en ressemblant à egards à l'enzyme d'autre souche de bacille d'hétérolactique, et qui en est nettement distincte outre le cas de xylose comme source de carbon.

On sait que dans la grande majorité de cas, l'inducteur est un substrat de l'enzyme, mais cette règle n'est pas absolue et il apparaît clairement aujourd'hui que la fonction d'inducteur est distincte de celle de substrat⁽⁴⁾. Chez *L. fermentum*, qui est capable de fermenter le xylose, glucose, et mannose, culture sur mannose, arabinose, xylose, ou fructose conduit la production accue de xylose-isomérase. Mais cette teneur est faible sur glucose, galactose, maltose, ou sucrose. Cette différence entre la production d'enzyme et source de glucide est très intéressante, car fructose ou arabinose qui sont actifs sur la production d'enzyme, ne sont pas fermenté par cette bactérie. La production d'enzyme, est augmentée dans la bactérie cultivée sur mannose, mais mannose n'est pas isomerisé directement par ce broyat lorsque il prolifèrent soit sur mannose. Tout ce que l'on sait sur la biosynthèse induite des enzymes montre que ce phénomène est étroitement lié au métabolisme de l'énergie et au métabolisme de synthèse. En fait, il n'a jamais été observé que chez des cellules disposant d'une source d'énergie utilisable et au moins potentiellement capables de s'accroître.

On classifie deux sortes des glucides par l'effet sur la production de xylose-isomérase chez *L. fermentum*, comme on admet suivant:

a) actif mannose, arabinose, xylose, fructose

b) inactif glucose, galactose, sucrose, maltose

La liaison entre xylulose formé et durée d'essais est illustrée dans la Fig. 1. Deux courbes sont obtenues sur l'activité d'isomérase cultivée sur xylose ou mannose. Xylulose est formé assez lentement par l'enzyme obtenue sur mannose, mais il est

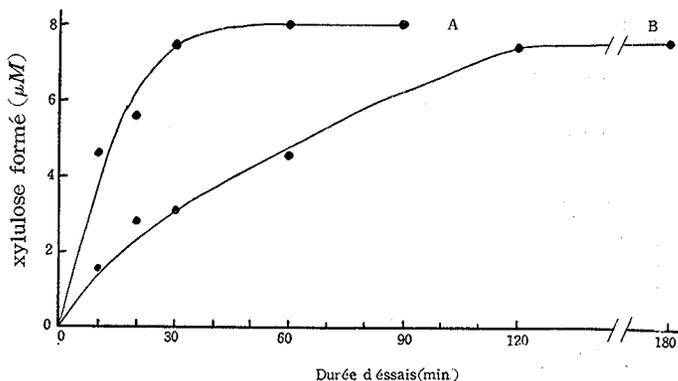


Fig. 1 Activité de la Xylose-Isomérase
A. cultivé sur xylose, protéine 1.10mg.
B. cultivé sur mannose, protéine 0.95mg.

accumulé en peu de temps par l'enzyme obtenue sur xylose. Aussi on montre dans la Fig. 2, que formation du xylulose est proportionnelle à la quantité d'enzyme. On emploie la mélange des deux glucides à la source carbonée (chacun 0.5 %), et la liaison entre l'effet des combinaisons des glucides et la production d'enzyme est prouvée. Comme on voit dans le tableau II, addition du glucose, fructose, ou arabinose avec xylose dans le milieu, elle n'inhibe rien la production d'enzyme. Elle ne varie guère cette production

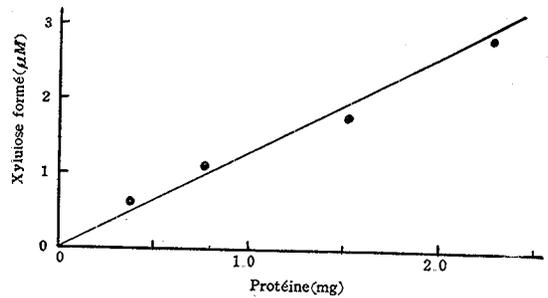


Fig. 2 Effet de la Quantité d'Enzyme (cultivé sur mannose)

Tableau II. Liaison entre l'Activité de la Xylose-Isomérase et Aliment Carboné du Milieu.

Aliment carboné	Durée d'essais, 10 min.			Durée d'essais, 30 min.	
	protéine (mg)	xylulose formé (μM)	activité spécifique	protéine (mg)	xylulose formé (μM)
xylose	0.55	2.27	4.12	1.10	3.14
// +mannose	0.78	2.64	3.40	1.94	4.29
// +arabinose	0.66	1.53	2.32	1.32	4.10
// +glucose	0.52	1.42	2.76	1.03	4.0
// +fructose	0.62	1.25	2.08	1.24	3.55
mannose	0.54	0.76	1.43	0.95	3.08
// +fructose	0.74	0.50	0.67	1.47	1.53
// +glucose	0.48	0.11	0.23	1.20	0.05
// +galactose	0.70	0.18	0.26	1.40	1.15
// +arabinose	0.57	0.58	1.03	0.95	2.14
fructose				0.81	0.64
// +glucose	0.70	0.05	0.07	1.75	0.06
arabinose				0.55	2.21
// +glucose	1.10	0	0	1.10	0
glucose	0.74	0	0	1.47	0.02

quand on emploie la mélange des fructose et mannose ou des arabinose et mannose comme l'aliment carboné. Mais, il en inhibe parfaitement cette production quand le glucose s'ajoute au lieu de xylose sur mannose, fructose ou arabinose. Non seulement culture sur glucose ne conduit rien la production de l'isomérase, l'addition du glucose inhibe cette production. Mais activité d'isomérase n'inhibe jamais par l'addition du glucose.

Le présent travail apporte des données sur la production (biosynthèse) de la xylose-isomérase. On peut de supposer sur ce sujet important que le glucose inhibe la biosynthèse d'isomérase au quelque part de métabolisme de la production induite. On montre que cette enzyme chez *L. fermentum* se peut de induire par xylose ou mannose⁽⁵⁾. A propos des ces résultats, il faut de considérer que mannose et aussi xylose sont les inducteurs. Xylose est un substrat de l'enzyme, mais mannose n'est pas un substrat de cette enzyme. Donc, on suppose que mannose est métabolisé, et un produit intermédiaire inconnu au mannose soit un inducteur réel et que glucose ou cet intermédiaire métabolisé inhibe cette production inductible.

Je tiens à témoigner ici ma reconnaissance à M. le Professeur H. KATAGIRI de la Faculté d'Agriculture de l'Université de Kyôto qui a attiré mon intérêt sur la question de la biosynthèse inductible de

la pentose-isomérase. Je remercie M. le Professeur K. KITAHARA de l'Institut de Microbiologie appliquée de l'Université de Tôkio, et M. le Professeur K. KATAKURA de la Faculté d'Agriculture de l'Université de Okayama, d'avoir bien voulu suivre ce travail ainsi que des suggestions qu'il m'a données.

- (1) YAMANAKA, K.: *Bull. Agr. Chem. Soc., Japan*, en imprimé. L., RANDALL, R. T.: *ibid.*, 193, 265 (1951).
 (2) DISCHE, Z., BORENFREUND, E.: *J. Biol. Chem.*, 192, 583 (1951). (4) MONOD, J., COHN, M.: *Adv. in Enzymol.*, 13, 67 (1952).
 (3) LOWRY, O. H., ROSENBOUGH, N. J., FORR, A. (5) YAMANAKA, K.: Non publier.

L. fermentum のキシロース・イソメラーゼ 生成における特異的阻害

山 中 啓

微生物におけるペントース・イソメラーゼはその基質ペントースにのみ適応的に生成されると報告されているが、その検討はほとんどなされていない。著者はすでにヘテロ乳酸菌類のペントース・イソメラーゼを見出し、その生成物の同定、酵素の比活性、平衡定数、ミハエリス（解離）定数等について報告した⁽¹⁾。さらにペントース・イソメラーゼ力と培地の糖との関係をヘテロ、ホモ両菌17株について検討した（第1表）。その結果、

- 1) ヘテロ菌および *Pc lindneri* のアラビノース・イソメラーゼは構成的に、ホモ菌のそれはアラビノースにのみ適応的に生成されること。
- 2) ヘテロ菌および *L. xylosus* のキシロース・イソメラーゼはキシロース培地で最も強く、グルコース、フラクトース、アラビノース培地にも見出されること。
- 3) とくに *L. fermentum* のキシロース・イソメラーゼはキシロース以外にマンノース、アラビノース、フラクトース培地で生成され、その他の糖では生成されないことを見出した。

多くの場合、酵素の誘導剤は基質であるが、誘導剤の機能 (function) と基質の機能とは別である⁽⁴⁾。今回は *L. fermentum* のキシロース・イソメラーゼの生成 (誘導) をしらべるために、培地の糖を二種 (各0.5%) 同時に与えてイソメラーゼの生成の変化をしらべたところ、グルコースの添加がとくにその生成を阻害することを知った。グルコースは本菌の生育炭素源として有効であるが、イソメラーゼの生成には無効である。またグルコースの添加はイソメラーゼの反応を全く阻害しない。本酵素はキシロース、マンノースで誘導され、グルコースでは誘導されないで (未発表)、グルコースの阻害効果は酵素の生合成の阻害であり、おそらくグルコースまたはグルコースの未知中間代謝物が生合成のさいの酵素蛋白合成に有効な誘導剤 (Inducer) にアナログのような形であるいはその他の作用によって誘導剤と抵抗して阻害するのではないかと考えている。このことは基質であるキシロースを炭素源としたものにグルコースを添加しても阻害されず、基質以外で生成に有効なマンノース、アラビノース、フラクトースにグルコースを添加したときに阻害が認められるのでこれらの真の誘導剤とグルコースとの関連によるものと推定できる。