

产二氢嘧啶酶的菌种筛选和发酵条件的研究

孙万儒

(中国科学院微生物研究所, 北京)

从 19 个属共 275 株细菌中筛选出 8 株具有能不对称水解 5-苯基海因产生 N-氨甲酰基苯甘氨酸能力的菌株。经复筛和对它们的反应产物的元素组成、旋光性、红外光谱和核磁共振图谱的分析, 发现恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) 73104 具有较高的二氢嘧啶酶活力。

此菌产酶的发酵条件的研究表明, 柠檬酸和葡萄糖对产酶有明显的抑制作用, 甘油和乳酸对产酶有促进作用, 酵母膏对产酶起十分重要作用。5-甲基海因、5-苯基海因、海因、脲嘧啶、腺嘌呤和乳酸均是二氢嘧啶酶的有效诱导物, Cu^{++} 对产酶有明显抑制作用, 其它所试金属离子对产酶无明显作用。此菌产酶最适培养基组成为 (%): 乳酸 1.0, 酵母膏 2.0, NaCl 0.3, Na_2HPO_4 0.2, 5-甲基海因 0.2。最适初始 pH 为 5.5, 28℃ 培养 13.5 小时后每毫升发酵液酶活力为 2.5 单位。

虽然很早以前在许多动、植物中发现能水解海因产生海因酸的酶^[1,2]。Wallach 和 Grisolia 认为从小牛肝得到的二氢嘧啶酶 (Dihydropyrimidinase E C 3.5.2.2) 和水解海因的酶是一致的^[3]。Dudley 等^[4]证明它还可以水解 5-苯基海因产生 N-氨甲酰基-D-苯甘氨酸。因此二氢嘧啶酶又称为海因酶 (hydantoinase)。Tsugawa 等^[5]和 Sano 等^[6]在微生物中发现能不对称水解海因-5-丙酸和 5-吡啶甲基海因产生相应的 N-氨甲酰基-L-氨基酸的二氢嘧啶酶。Yamada 等^[7]和 Snamprogetti 等^[8]在微生物中发现了能将 5-甲硫乙基和 5-苯基海因水解为相应的 N-氨甲酰基-D-氨基酸的二氢嘧啶酶。近年来开展了利用二氢嘧啶酶生产光学活性氨基酸的研究工作。本文报道将 5-苯基海因不对称水解产生 N-氨甲酰基-D-苯甘氨酸的二氢嘧啶酶的菌种筛选和发酵条件的研究。

材料和方法

(一) 材料

1. 菌种: 供筛选的菌种有 275 株, 包括 19 个属, 56 个种。除由本所细菌组周慧玲同志提供 112 株外, 其余均由本所菌种保藏组供给。

2. 斜面培养基: 牛肉汁琼脂培养基。

3. 筛选培养基组成 (%): 牛肉膏 1、酵母膏 1、NaCl 0.3、葡萄糖 0.5 和 5-苯基海因 0.1。用 4N NaOH 调 pH 7.2, 250ml 三角瓶装 50ml 培养基; 8 磅灭菌 30 分钟备用。

4. 试剂: D-和 L-苯甘氨酸为太原制药厂和天津河北制药厂赠送; N-氨甲酰基苯甘氨酸按 Stark 和 Smyth 方法制备^[9]; 各种海因衍生物按 Suzuki 等方法^[10]或 Henze 和 Speer 法^[11]制备。其它试剂为市售商品。

(二) 方法

1. 培养方法: 将菌种接在肉汁斜面培养基上, 于 28℃ 培养 20 小时。每支斜面加入 15ml 无菌水, 制成种子菌悬液。每支摇瓶接入 1.0ml 的种子菌悬液, 于 28℃, 170rpm 的旋转摇床上培养 16 小时。

本文于 1981 年 4 月 1 日收到。

周慧玲、陈嘉懿和马廷生同志提供筛选菌种; 周慧玲同志对未定名菌种作了鉴定; 马德江同志为分离产物进行冷冻干燥; 乐华爱、王祯祥同志对本工作提供宝贵意见, 在此一并致谢。

2. 菌体收集: 取 5.0ml 发酵液于 4000rpm 离心 20 分, 倾出上清液, 加入 2.5ml 生理盐水制成菌悬液, 待测定。

3. 酶活力测定: 采用改进的 Cecere 法^[12]: 称取 352mg 的 5-苯基海因, 溶解在 90ml pH8.5, 0.05M 的磷酸缓冲液中, 取 1.8ml 上述底物溶液于试管中, 30℃ 保温, 加入上述制备的菌悬液 0.2ml, 于同一温度下保温反应 30 分钟, 取出立即加入 2.0ml 用 6N 盐酸配制的 5% 对-二甲氨基苯甲醛溶液, 于 4000rpm 离心 30 分钟, 小心倾出上清液, 用光径 0.5cm 比色杯在波长 438nm 下比色, 以零时的酶反应样品作空白, 测定光密度, 以光密度或下式计算酶活力。

酶活力 (u/ml) = $\frac{A_{438} \times K}{0.2 \times 30 \times 2}$

K (消光系数) = 29.5

4. 生物量测定: 取 0.2ml 上述菌悬液, 加入 3.8ml 生理盐水, 于 600nm 下, 用光径 0.5cm 的杯比色, 以生理盐水为空白, 测定光密度。

5. 酶反应产物的分离: 将筛选得到的有一定二氢嘧啶酶活力的菌株, 按上述培养方法培养, 收集 20 个摇瓶的菌体细胞。将 2.5g 的 5-苯基海因悬浮于 500ml 的 pH8.5, 0.05M 的磷酸缓冲液中, 加入菌体, 将反应混合物分装在 5 个 250ml 三角瓶中, 于 30℃ 水浴中振荡反应 26 小时, 每隔 4 小时用 4N NaOH 溶液调反应混合物 pH, 保持在 8.5 左右。反应完毕, 用 6N HCl 调 pH 到 3.0, 离心, 将上清液冷冻干燥, 得白色粉末。用乙醇提取, 直到抽提液对对-二甲氨基苯甲醛盐酸溶液无黄色反应为止, 合并抽提液, 于硅胶柱上分离, 收集洗脱液, 真空浓缩, 结晶, 过滤得无色晶体。再用丙酮及乙醇和水混合物进行重结晶。

结 果

(一) 初筛

筛选的重点放在细菌, 特别是假单胞菌上。结果如表 1。

从表 1 可看出, 在所筛选的 19 个属 275 株细菌中, 绝大多数都有少量的二氢嘧啶酶活力, 但酶活力较高的菌株都是假单胞菌。

表 1 初 筛 结 果

Table 1 Result of preliminary screening

菌种名称 Name of bacteria	种 数 Number of species	株 数 Number of strain	具有酶活力的菌株数 Number of active strain		
			+	++	+++
气杆菌 <i>Aerobacter</i> sp.	2	5	5		
无色杆菌 <i>Achromobacter</i> sp.	2	6	6		
嗜水气杆菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	1	1	1		
放射土壤杆菌 <i>Agrobacterium radiobacter</i>	1	1	1		
类产碱杆菌 <i>Alcaligenes faecalis</i>	1	5	5		
节杆菌 <i>Arthrobacter</i> sp.		3	3		
芽孢杆菌 <i>Bacillus</i> sp.	15	57	57		
短杆菌 <i>Brevibacterium</i> sp.	3	23	23		
产黄色纤维杆菌 <i>Cellulomonas flavigena</i>	1	1	1		
梭 菌 <i>Clostridium</i> sp.	2	4	4		
棒状杆菌 <i>Corynebacterium</i> sp.	4	10	10		
乳杆菌 <i>Lactobacillus</i> sp.	3	4	4		
小球菌 <i>Micrococcus</i> sp.	3	3	3		
偶然分枝杆菌 <i>Mycobacterium fortuitum</i>	1	1	1		
啤酒片球菌 <i>Pediococcus cerevisiae</i>	1	1	1		

续表 1

菌种名称 Name of bacteria	种 数 Number of species	株 数 Number of strain	具有酶活力的 菌株数 Number of active strain		
			+	++	+++
普通变形杆菌 <i>Proteus vulgaris</i>	1	2	2		
假单胞菌 <i>Pseudomonas</i> sp.		138	110	21	3
八叠球菌 <i>Sarcina</i> sp.	4	7	7		
沙雷氏杆菌 <i>Serratia</i> sp.	2	3	3		

酶活力等级按材料与方法所述条件下的吸光度值计。

The grades of enzyme activity of cells were calculated according to A_{438} which was measured under conditions as in materials and methods
 ++: 0—0.050; +++: 0.050—0.100; ++++: 0.100 以上。

表2 复筛结果

Table 2 Result of second screening

菌 种 名 称 Name of bacteria	菌体活力 Enzyme activity of cells A_{438}	上清液酶活力 Enzyme activity of super- natant A_{438}
荧光假单胞杆菌 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	0.065	0
恶臭假单胞菌 <i>Pseudomonas putida</i> 73307	0.087	0
恶臭假单胞菌 <i>Pseudomonas putida</i> 7352-2	0.086	0
恶臭假单胞菌 <i>Pseudomonas putida</i> 73627	0.067	0
恶臭假单胞菌 <i>Pseudomonas putida</i> 7321-1	0.165	0
恶臭假单胞菌 <i>Pseudomonas putida</i> 73104	0.176	0
恶臭假单胞菌 <i>Pseudomonas putida</i> 73101	0.155	0
恶臭假单胞菌 <i>Pseudomonas putida</i> 7337-1	0.108	0

(二) 复筛

1. 酶活力比较: 将初筛中产酶活力在

A_{438} 为 0.100 左右的菌株进行反复比较, 其结果列于表 2。

表 2 结果说明二氢嘧啶酶活力较高的菌种集中于恶臭假单胞菌中, 其中以 73104 菌酶活力最高。也说明它们产的二氢嘧啶酶均为胞内酶。

2. 酶反应产物的分离和鉴定: 将复筛中酶活力在 A_{438} 为 0.100 以上菌株按材料与方法所述条件培养并进行酶反应, 分离反应产物, 测定产物的熔点, 旋光度和元素组成。表 3 表明菌株 73104, 73101、7337-1 的反应产物与标准的 N-氨甲酰基-D-苯甘氨酸的数值相近。

另外, 将 73104 菌株反应产物和标准的 N-氨甲酰基-D-苯甘氨酸的红外光谱和核磁共振图谱比较 (如图 1、2), 证明反应产物为 N-氨甲酰基-D-苯甘氨酸。因此说明此菌产生的是能水解 5-苯海因产生 N-氨甲酰基-D-苯丙氨酸的二氢嘧啶酶。

(三) 碳源对产酶的影响

以下实验均用恶臭假单胞菌 73104 菌种。

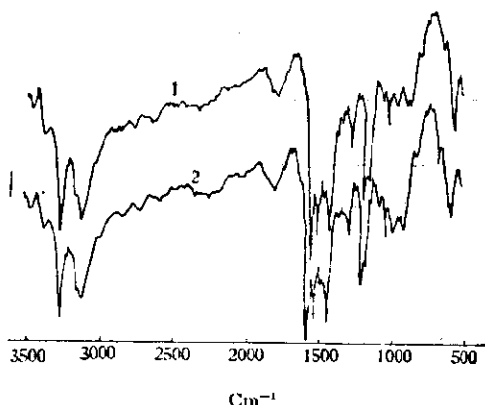


图1 恶臭假单胞菌 73104 反应产物与标准的 N-氨甲酰基-D-苯甘氨酸的红外光谱。

Fig.1 IR of reaction product of *Pseudomonas putida* 73104 and standard sample N-carbamyl-D-phenylglycine.

1. 标准样品 Standard
2. 反应产物 Reaction product

表3 酶反应产物的分析结果

Table 3 Analytic result of product of enzyme reaction

菌种号 Number of strain	产物重 Weight of product (g)	熔点 MP (°C)	旋光度 Optical activity $[\alpha]_D^{20}$	光学纯度 Optical purity	元素分析 Element analysis (%)		
				(%)	(C)	(H)	(N)
标准样品 Standard		184—184.5	—137.2		55.66	5.19	14.43
7337-1	0.55	183—184.5	—136.0	99.13	55.64	5.26	14.33
7321-1	0.70	185.5—186.5	—135.5	98.76	55.55	4.98	14.02
73101	0.70	185—186.5	—137.4	100.4	55.65	5.21	14.45
73104	0.90	185—186	—137.0	99.85	55.63	5.28	14.41

标准样品的元素分析数据是按理论计数

Element analysis of standard sample was calculated according to theory.

表4 各种碳源对菌生长和产酶的影响

Table 4 Effect of various carbon sources on cell growth and enzyme production

碳源 Carbon source	生物量 Biomass (A_{600})	酶活力 Enzyme activity (u/ml)
葡萄糖 Glucose	0.371	0.594
蔗糖 Sucrose	0.267	0.702
乳糖 Lactose	0.268	0.712
山梨糖 Sorbitose	0.266	0.640
麦芽糖 Maltose	0.293	0.732
甘油 Glycerol	0.390	0.924
可溶性淀粉 Soluble starch	0.283	0.728
葡萄糖酸 Gluconic acid	0.361	0.880
苹果酸 Malic acid	0.371	0.786
柠檬酸 Citric acid	0.388	0.560
醋酸 Acetic acid	0.334	0.870
乳酸 Lactic acid	0.362	1.160
无 No	0.304	0.796

以 1.0% 酵母膏, 0.3% NaCl, 0.1% 5-苯基海因为基础培养基, 另外加入 0.5% 的各种不同碳源进行实验, 结果如表4。有机酸、葡萄糖和甘油作为碳源对菌生长有利, 而其他糖对菌生长有轻微抑制作用; 乳酸、甘油、葡萄糖酸及醋酸对产酶有利, 柠檬酸和葡萄糖对产酶有明显抑制作用, 而其他糖类对产酶也有轻微的抑制作用。

(四) 氮源对产酶的影响

分别以乳酸、甘油为碳源的培养基内添加各种含氮的有机和无机化合物进行试验, 结果如表5。

由表5可知, 在两种培养基上, 恶臭假单胞菌 73104 可能由于缺乏生长因子, 在无机含氮化合物作氮源时均不生长, 在以氨基酸为氮源的培养基上生长很差, 各种有机含氮化合物虽均有利于生长, 但除酵母膏对产酶有明显促进作用外, 其它对产酶均无明显作用。

(五) 乳酸和酵母膏的最适用量

1. 乳酸的最适用量: 在筛选碳源时使用的培养基内加入不同量的乳酸, 结果如图3, 使用 1.0% 乳酸时, 产酶最高, 乳酸用量对菌生长无明显作用。

2. 酵母膏的最适用量: 在含有 1.0% 乳酸, 0.3% NaCl、0.1% 5-苯基海因的基

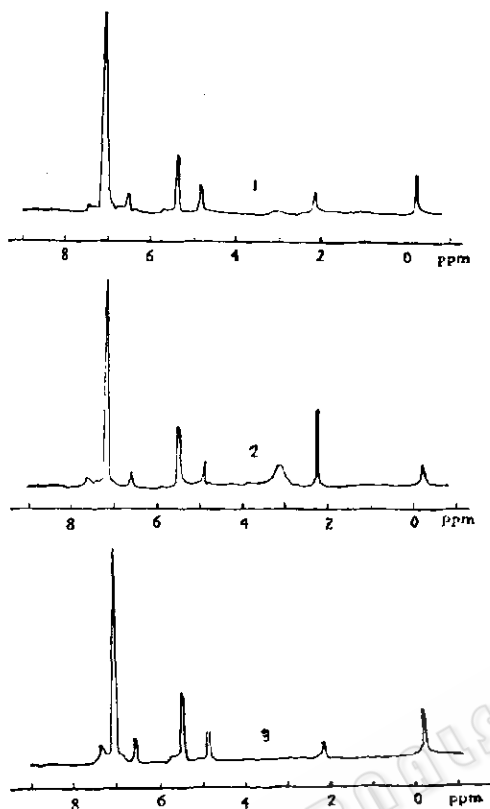


图2 恶臭假单胞菌 73104 的酶反应产物和标准样品的核磁共振图谱

Fig. 2 ^1H -NMR spectrum of reaction product of *Pseudomonas putida* 73104 and standard N-carbamyl-D- and L-phenylglycine

Solvent: dimethylsulfoxide

1. N-氨基酰基-D-苯甘氨酸 N-carbamyl-D-phenylglycine
2. N-氨基酰基-L-苯甘氨酸 N-carbamyl-L-phenylglycine
3. 产物 Product

础培养基上加入不同量的酵母膏进行试验,结果如图4。菌体生长和产酶与酵母膏用量有密切关系,产酶随酵母膏用量增加而明显增加,用2.0—3.0%的酵母膏可获得较高的酶活力,从实际应用考虑以2.0%为宜。

(六) 诱导物的影响

1. 诱导物的选择: 在含有1.0%乳酸、

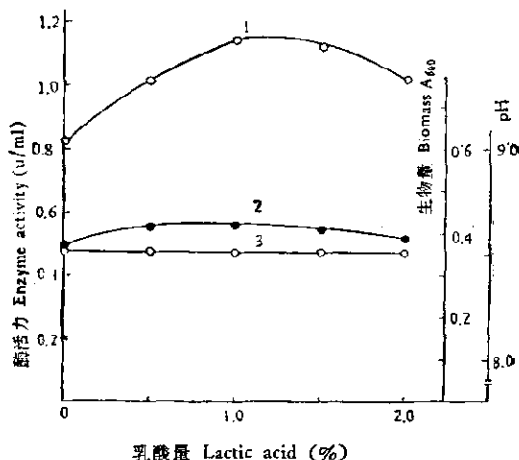


图3 乳酸用量对产酶的影响

Fig. 3 Effect of lactic acid on enzyme production

1.酶活力 Enzyme activity 2.生物量 Biomass 3. pH

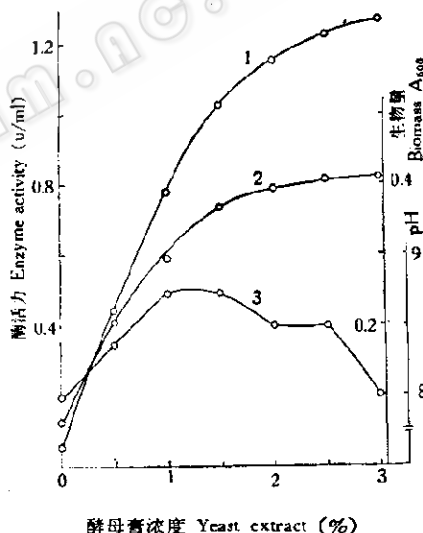


图4 酵母膏用量与产酶的关系

Fig. 4 Effect of yeast extract on enzyme formation

1.酶活力 Enzyme activity 2.生物量 Biomass 3. pH

2.0% 酵母膏和 0.3% NaCl 的培养基内加入表6所列的各种化合物进行试验,结果说明海因及5-位取代有简单侧链如甲基、苯基的海因,尿嘧啶、腺嘌呤和乳酸对产酶有诱导作用,其中以5-甲基海因、尿嘧啶和5-苯基海因的诱导效果最佳。而5-

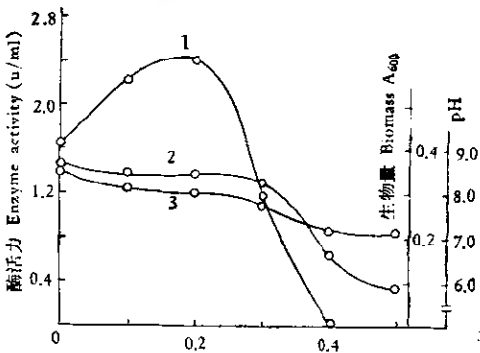
表 5 各种含氮化合物对产酶的影响

Table 5 Effect of various nitrogenous compounds on cells growth and enzyme production

含氮化合物 Nitrogenous compounds	用量 Concn. (%)	乳酸培养基 Lactic acid medium		甘油培养基 glycerol medium	
		生物量 Biomass (A ₅₀₀)	酶活力 Enzyme activity (u/ml)	生物量 Biomass (A ₅₀₀)	酶活力 Enzyme activity (u/ml)
无 No	0	0	0	0	0
豚豚 Proteose	1.0	0.180	0	0.188	0
鱼陈 Fish peptone	1.0	0.276	0	0.302	0.374
蛋白陈(蛋粉) Peptone (Egg powder)	1.0	0.190	0	0.204	0
牛肉膏 Beef extract	1.0	0.218	0.118	0.169	0
酵母膏 Yeast extract	1.0	0.334	1.646	0.404	1.214
蛋白陈(鱼粉) Peptone (Fish meal)	1.0	0.240	0.138	0.247	0.142
聚陈 Polypepton	1.0	0.099	0	0.137	0
玉米浆 Corn-steep liquor	1.0	0.177	0	0.204	0.212
DL-蛋氨酸 DL-methionine	0.5	0	0	0.056	0
L-天冬氨酸 L-aspartic acid	0.5	0	0	0.122	0
L-谷氨酸 L-glutamic acid	0.5	0.062	0	0.095	0
DL-苯基海因 DL-phenylhydantoin	0.5	0	0	0.059	0
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.2	0	0	0.048	0
NaNO ₂	0.2	0	0	0.063	0
(NH ₄) ₂ HP0 ₄	0.2	0	0	0.119	0
NH ₄ NO ₃	0.2	0	0	0.085	0
NaNO ₃	0.2	0	0	0.084	0
脲素 Urea	0.2	0.105	0	0.097	0

两种培养基分别含有 1.0% 的乳浆或甘油,并均含 0.3% NaCl, 0.1% 5-苯海因

Both media contain 1.0% lactic acid or glycerol respectively, and both with 0.3% NaCl and 0.1% 5-phenylhydantoin

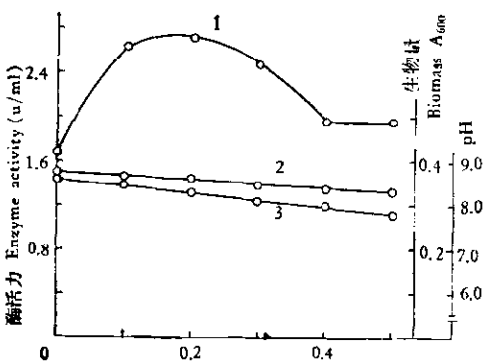


5-苯基海因浓度 5-phenylhydantoin (%)

图 5 5-苯基海因用量与产酶的关系

Fig. 5 Effect of 5-phenylhydantoin on enzyme formation

1.酶活力 Enzyme activity 2.生物量 Biomass 3.pH



5-甲基海因浓度 5-methylhydantoin (%)

图 6 5-甲基海因用量与产酶的关系

Fig. 6 Effect of 5-methylhydantoin on enzyme formation

1.酶活力 Enzyme activity 2.生物量 Biomass 3.pH

表 6 各种化合物对产酶的影响

Table 6 Effect of various compounds on enzyme formation

化 合 物 Compounds	生物量 Biomass (A ₆₀₀)	酶活力 Enzyme activity (u/ml)
无 No	0.396	1.116
尿嘧啶 Uracil	0.398	1.638
巴 比 妥 Barbitone	0.346	1.062
巴比妥酸 Barbituric acid	0.380	1.214
乳清酸 Orotic acid	0.410	1.430
双阿脲 Alloxatin	0.385	0.846
尿囊素 Allantoin	0.394	1.066
腺嘌呤 Adenine	0.322	1.524
6-氨基嘧啶 6-aminopyrimidine	0.350	1.028
海 因 hydantoin	0.363	1.494
5-甲基海因 5-methylhydantoin	0.373	1.642
5-甲硫乙基海因 5-methylthioethyl hydantoin	0.351	1.056
海因-5-乙酸 Hydantoin-5-propionic acid	0.369	1.056
海因-5-丙酸 Hydantoin-5-propionic acid	0.389	1.086
5-羟甲基海因 5-hydroxymethyl hydantoin	0.061	0
5-异丁基海因 5-isobutylhydantoin	0.330	1.012
5-咪唑甲基海因 5-imidazolylmethyl-hydantoin	0.404	1.136
5-吲哚甲基海因 5-indolylhydantoin	0.351	0.930
5-苯基海因 5-phenylhydantoin	0.364	1.638
5-氨基海因 5-aminopropylhydantoin	0.398	1.166
N-羧甲酰基苯甘氨酸 N-carbamylphenyl-glycine	0.404	1.166
N-羧甲酰基蛋氨酸 N-carbamylmethionine	0.403	1.224
N-羧甲酰基丙氨酸 N-carbamylalanine	0.388	0.944
苯甘氨酸 Phenylglycine	0.388	0.944

羟甲基海因对菌体生长有强烈的抑制作用。

2. 诱导物的最适用量: 在上述基础培养基中分别加不同量的 5-甲基海因和 5-苯基海因进行菌体培养, 其酶活力和生物量与诱导物用量的关系如图 5 和图 6

结果表明作为诱导物的两种海因的最适用量为 0.2%。超过此量时, 酶活力和生物量均下降, 但高浓度下 5-苯基海因对产酶和菌体生长的抑制作用比 5-甲基海因强烈。

(七) 金属离子对产酶的影响

在含有 2.0% 酵母膏、1.0% 乳酸、0.3% NaCl、0.1% 5-甲基海因的培养基内分别加入各种不同金属离子, 试验对产酶和菌体细胞生长的影响, 结果如表 7。

表 7 各种金属离子对产酶的影响

Table 7 Effect of various metal ions on formation enzyme

金 属 盐 Metallic salt	浓度 Concn. (μg/ml)	生物量 Biomass A ₄₃₈	酶活力 Enzyme activity (u/ml)
无 No	0	0.351	2.164
MgSO ₄ ·7H ₂ O	500	0.350	2.164
MnSO ₄ ·4H ₂ O	100	0.352	1.844
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	100	0.346	2.188
CaCl ₂ ·2H ₂ O	200	0.350	1.678
CoSO ₄ ·7H ₂ O	100	0.335	1.180
NiCl ₂ ·6H ₂ O	100	0.352	2.016
FeCl ₃ ·6H ₂ O	100	0.352	1.892
FeSO ₄ ·7H ₂ O	100	0.371	2.144
CuCl ₂ ·2H ₂ O	100	0.332	0.646

结果表明所试金属离子在使用的浓度下对菌体生长无明显影响; Mg²⁺、Zn²⁺、Ni²⁺、Fe²⁺、Mn²⁺、Ca²⁺ 和 Fe³⁺ 等对产酶无明显影响, Co²⁺ 对产酶有一定抑制作用, 而 Cu²⁺ 有显著的抑制作用。

(八) 培养基的起始 pH 对产酶的影响

将培养基的 pH 用 4N NaOH 或 8N HCl 调到图 7 所示的 pH 值, 灭菌后接种、培养、测定生物量和酶活力, 结果如图 7。培

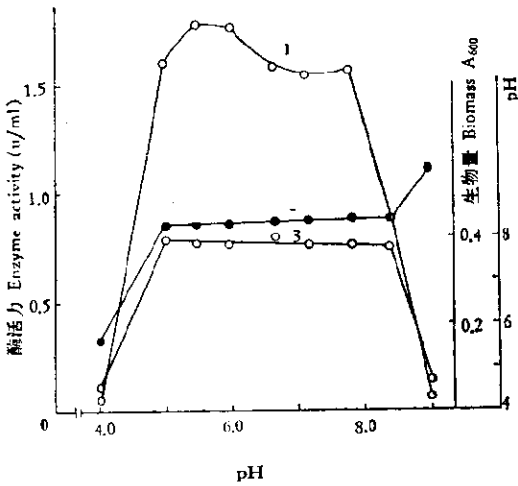
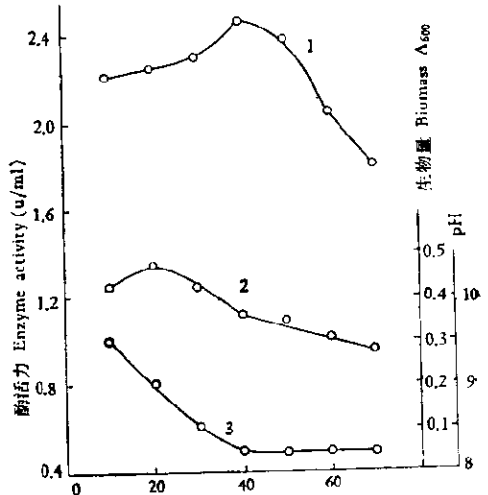


图7 培养基的起始 pH 对产酶的影响

Fig. 7 Effect of initial pH on enzyme formation

2. 酶活力 Enzyme activity 2. 生物量 Biomass 3. pH



培养基装量 Volume of medium (ml)

图9 培养基装量对产酶的影响

Fig. 9 Effect of medium volume on enzyme formation

1. 酶活力 Enzyme activity 2. 生物量 Biomass 3. pH

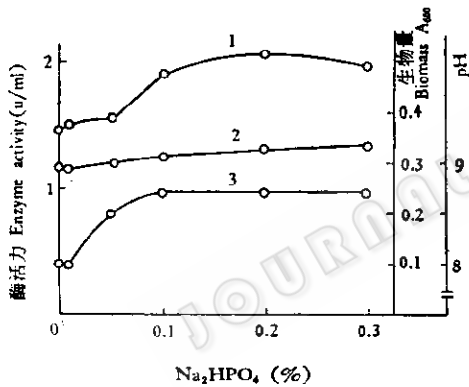
图8 Na_2HPO_4 对产酶的影响

Fig. 8 Effect of disodium hydrogen phosphate on enzyme formation

1. 酶活力 Enzyme activity 2. 生物量 Biomass 3. pH

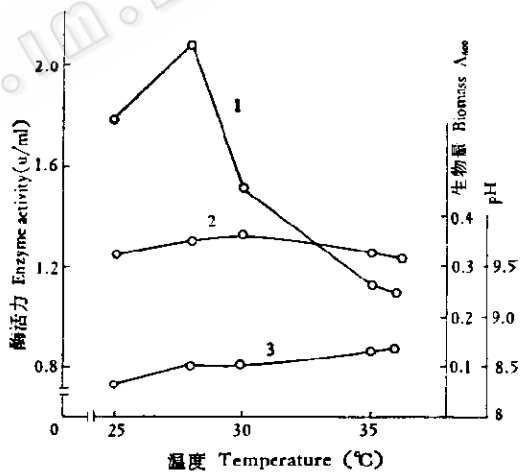


图10 培养温度对产酶的影响

Fig. 10 Effect of temperature on enzyme formation

1. 酶活力 Enzyme activity 2. 生物量 Biomass 3. pH

培养基的最适起始 pH 为 5.5, 在 pH 5.0—7.8 范围内, 对产酶和菌体生长影响不大, 而在此范围外, 菌体基本不生长。

(九) 磷酸盐对产酶的影响

在培养基中加入不同量的 Na_2HPO_4 , 对产酶的影响如图 8。说明 Na_2HPO_4 虽对菌种生长影响不大, 但可提高酶产量, 最适用量为 0.2%。

(十) 培养基装量对产酶的影响

在 250ml 三角瓶中装入不同量的培养基进行菌体培养, 结果如图 9。在 250ml 三角瓶中最适培养基装量为 40ml, 低于此值时对产酶影响较小, 而高于 40ml 值时, 随装量增加酶活力降低。

(十一) 温度对产酶的影响

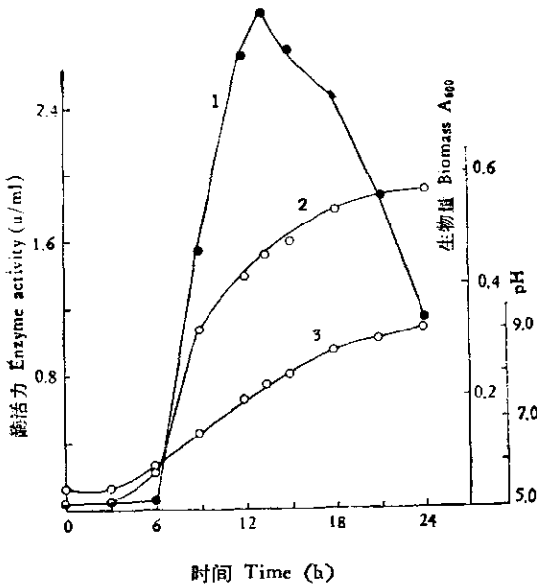


图 11 培养时间与产酶的关系

Fig. 11 Time course of enzyme formation

1. 酶活力 Enzyme activity 2. 生物量 Biomass 3. pH

按上述确定的最适条件制备培养基, 接种后分别在图 10 所列温度下, 于 200—210rpm 旋转摇床上培养测定酶活力, 产酶的最适培养温度为 28℃

(十二) 培养时间与产酶的关系

在上述确定的最适培养基 (2.0% 酵母膏, 1.0% 乳酸, 0.3% NaCl, 0.2% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.2% 5-甲基海因) 和 pH 下进行培养, 定时取样测发酵液酶活力和生物量, 结果如图 11。73104 菌在对数后期产酶达到高峰, 最适的培养时间为 13.5 小时, 再增加培养时间酶活力急剧下降。

讨 论

Yamada 等^[7]研究二氢嘧啶酶在微生物中分布时发现沟槽假单胞菌产的是 D-二氢嘧啶酶, Snamprogetti 等^[8]也是从假单胞菌属中得到了 D-二氢嘧啶酶, 但未报道种名。我们得到的具有 D-二氢嘧啶酶活力

的菌种基本都是恶臭假单胞菌。可见假单胞菌产的二氢嘧啶酶主要是 D-型的。

酵母膏对恶臭假单胞菌 73104 产酶是必要的, 并且产酶随酵母膏用量增加而增加, 不同批号的酵母膏对产酶也有较大影响。而 Yamada 等^[7]在研究沟槽假单胞菌产二氢嘧啶酶条件时发现, 酵母膏对产酶无影响, 只是对菌体细胞生长有好处。

另外, 恶臭假单胞菌 73104 在酵母膏培养基上加入诱导物时产酶只比不加的提高 50%, 而沟槽假单胞菌在肉汁培养基上加入诱导物后产酶可提高一倍, 这说明两个菌产酶条件不同; 也说明在酵母膏中可能含有恶臭假单胞菌产二氢嘧啶酶所必需的物质或诱导物。

从诱导物筛选结果可以看出, 核酸代谢的中间物: 乳清酸、尿嘧啶和腺嘌呤对产酶有一定诱导作用, 可间接表明二氢嘧啶酶在核酸代谢过程中有一定作用。

生长曲线表明产酶在对数生长后期达到高峰, 一进入停滞期, 细胞的酶活力急剧下降。这表明二氢嘧啶酶出现在细胞代谢和生长最旺盛时期, 与细胞生长, 增殖有关系。

参 考 文 献

- [1] Bernheim, F. and M. C. C. Bernheim: *J. Biol. Chem.*, **163**: 683, 1946.
- [2] Eadie, G. S. et al.: *J. Biol. Chem.*, **181**: 449, 1949.
- [3] Wallach, D. P. and S. Grisolia: *J. Biol. Chem.*, **226**: 272, 1957.
- [4] Dudley, K. H. et al.: *Drug. Metab. Dispos.*, **2**: 103, 1957.
- [5] Tsugawa, R. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **30**: 27, 1975.
- [6] Sano, K. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **41**: 819, 1977.
- [7] Yamada, H. et al.: *J. Ferment. Technol.*, **56**: 484, 1978.
- [8] Snamprogetti, S. p. A. et al.: *Ger. Offen.* 26 31048, 1977.
- [9] Stark, G. R. and D. G. Smyth: *J. Biol.*

- Chem.*, **238**: 214, 1963.
- [10] Suzuki, T. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **37**: 411, 1973.
- [11] Henze, H. R. and R. J. Speer: *J. Am. Chem. Soc.*, **64**: 522, 1942.
- [12] Ceccere, F. et al.: *FEBS Letters*, **57**: 192, 1975.

SCREENING OF STRAINS PRODUCING DIHYDROPYRIMIDINASE AND FERMENTATION CONDITIONS

Sun Wanru

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

Eight strains of *Pseudomonas* having dihydropyrimidinase activity which asymmetrically hydrolyses DL-5-phenylhydantoin into N-carbamyl-D-phenylglycine were selected from 275 bacterial strains belonging to 19 genera.

Their products from DL-5-phenylhydantoin were compared with the standard N-carbamyl-D-phenylglycine in melting point, optical rotation, infrared and H-NMR spectrum. *Pseudomonas putida* 73104 was found to have the highest activity of dihydropyrimidinase which produce N-carbamyl-D-phenylglycine.

Optimal conditions for the growth and dihydropyrimidinase formation of *Pseudomonas putida* 73104 were defined. The results suggested that enzyme activity increases

with the increase of the amount of yeast extract (0—0.3%) which is an essential factor for enzyme formation. Enzyme formation was enhanced by glycerol and lactic acid and was markedly inhibited by citric acid, glucose and Cu^{2+} ion. 5-Methylhydantoin, 5-phenylhydantoin, hydantoin, uracil, adenine and orotic acid were found to be effective inducers for enzyme formation.

Suitable medium consists of 2.0% yeast extract, 1.0% lactic acid, 0.3% NaCl, 0.2% Na_2HPO_4 and 0.2% 5-methylhydantoin. When the organism was grown in 250 ml flask containing 40 ml of the above medium on the rotory shaker (170 rpm) at 28°C for 13.5 hours, about 2.5 units/ml of dihydropyrimidinase was obtained.