

恶臭假单胞菌完整细胞的二氢嘧啶酶的性质

孙 万 儒

(中国科学院微生物研究所, 北京)

由恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) 73104 产的二氢嘧啶酶对 5-苯基海因特异性较高, 但也可以水解 5-甲硫乙基海因和 5-甲基海因; 不能水解 5-取代基上具有正、负电荷的海因衍生物。酶作用的最适 pH 因底物不同而有差异, 但最适反应温度却相同。Ag⁺、Cu²⁺ 和 Zn²⁺ 及金属离子螯合剂对酶活力有强烈抑制作用。将细胞用 EDTA 处理后约有 70% 酶活力损失, 再加入金属离子, 只有 Fe²⁺ 能将酶活力恢复到原来活力的 90% 以上, 其它金属离子无此作用, 证明 Fe²⁺ 是酶反应所必需的。静息细胞和新鲜细胞在弱酸或弱碱条件下, 于 40℃ 以下保温均可使细胞酶活力提高 2—3 倍, 且保温的菌悬液的离心上清液几乎无酶活力; 而无细胞提取液保温后无酶活力提高现象, 说明在上述条件下, 保温可改善细胞膜对底物的通透性, 提高酶作用效率。氧能抑制酶反应, 主要是因为氧与底物形成可逆结合复合物所致。游离细胞的二氢嘧啶酶对 5-苯基海因、5-甲硫乙基海因和 5-甲基海因的 K_m 值分别为 1.61×10^{-2} 、 2.08×10^{-2} 和 $1.61 \times 10^{-1} M$ 。

现在知道, 来自不同微生物的二氢嘧啶酶对底物有很强的特异性, 有的可水解 L-海因产生相应的 N-氨甲酰基-L-氨基酸^[1,2], 有的可水解 D-海因产生相应的 N-氨甲酰基-D-氨基酸^[3]。在用一种酶进行水解过程中, 另一种构型的海因衍生物自发消旋, 最终将全部海因衍生物转化成单一光学活性 N-氨甲酰基氨基酸。因此, 在生产光学活性氨基酸上, 它比氨基酸酰化酶更方便。

本文报道恶臭假单胞菌游离细胞的二氢嘧啶酶的性质。

材料与方法

(一) 材料

1. 菌种: 恶臭假单胞菌 73104 为本实验室筛选^[4]。

2. 试剂: 各种 5-取代海因按 Suzuki 等方法^[5]或 Henze 和 Speer 方法^[6]合成。其它试剂为市售商品。

(二) 方法

1. 菌体的培养和收集: 将恶臭假单胞菌 73104 接入肉汁斜面, 于 28℃ 下培养 20 小时, 每支斜面加入 15ml 无菌水, 制成种子菌悬液。摇瓶培养基成分(%)为: 酵母膏 2.0, 乳酸 1.0, NaCl 0.3, 5-甲基海因 0.2 和 Na₂HPO₄ 0.2, pH5.5。250ml 三角瓶装 40ml 培养基。灭菌后加入 1.0ml 种子菌悬液, 于 28℃ 下, 170rpm 的旋转摇床上培养 14 小时。将发酵液于 4000rpm 下离心 40 分钟, 倾出上清液, 加入生理盐水洗涤离心, 再用生理盐水将菌体细胞制成悬液, 冰箱保存备用。

2. 酶活力测定: 按已报道方法^[4]。

结 果

(一) 底物特异性

分别以不同氨基酸制备的海因衍生物为底物, 测定酶活力, 结果如表 1。说明酶作用的最适底物是 5-苯基海因, 其次是 5-甲硫乙基海因, 5-异丁基海因和 5-甲基海

本文于 1981 年 7 月 17 日收到。

张树政先生对本工作提出许多指导意见, 在此深表谢意。

表 1 酶对各种海因衍生物的活力

Table 1 Substrate specificity of enzyme acting on various derivatives of hydantoin

海因衍生物 Derivative of hydantoin		相对酶活力(%) Relative enzyme activity
5-甲基海因	5-methylhydantoin	38.63
5-甲硫乙基海因	5-methylthioethylhydantoin	46.38
5-苯基海因	5-phenylhydantoin	100
5-苯甲基海因	5-benzylhydantoin	8.50
5-(对-羟基苯基)海因	5-(p-hydroxyphenyl) hydantoin	15.00
5-羟甲基海因	5-hydroxymethylhydantoin	0.63
5-(1-甲基丙基)海因	5-(1-methylpropyl) hydantoin	5.13
5-异丁基海因	5-isobutylhydantoin	34.25
5-海因乙酸	hydantoin-5-acetic acid	6.25
5-海因丙酸	hydantoin-5-propionic acid	4.25
5-(4-氨基丁基)海因	5-(4-aminobutyl) hydantoin	4.13
5-(3-胍基丙基)海因	5-(3-guanidinopropyl) hydantoin	7.00
5-咪唑甲基海因	5-imidazolidylhydantoin	8.00
5-(3-吲哚甲基)海因	5-(3-indolylmethyl) hydantoin	11.00

因;对 5-位取代基上有正、负电荷的海因衍生物的活力低;但对 5-苯甲基海因和 5-(1-甲基丙基)海因的活力也很低。

(二) 酶作用的最适 pH

以 5-苯基海因、5-甲硫乙基海因和 5-甲基海因为底物,在不同 pH 下测定酶活力,结果如图 1。对 5-苯基海因的最适 pH 为 8.2,且最适 pH 范围较窄;对 5-甲硫乙基海因的最适 pH 为 8.7 左右,范围略宽;对 5-甲基海因的最适 pH 为 9.0。

(三) 酶反应的最适温度

于不同温度下,用上述三种底物测定酶活力,结果(图 2)说明,酶作用三种底物的最适温度相同,均为 45℃ 左右。

(四) 金属离子和螯合剂对酶活力的影响

1. 在方法部分所述条件(后称标准反应条件)下进行酶反应时,分别加入 1 ×

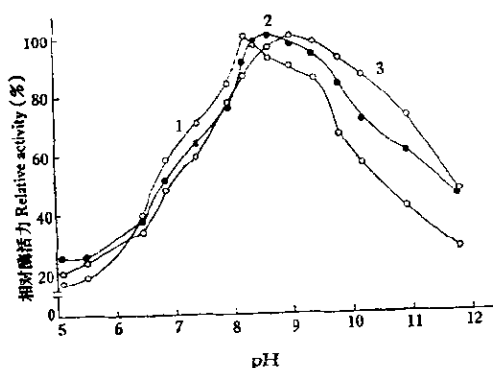


图 1 酶作用于不同底物时酶活力与 pH 的关系

Fig. 1 Effect of pH on enzyme activity toward various substrates

1. 5-苯基海因 5-phenylhydantoin,
pH 5.00—8.00, 0.05M 磷酸缓冲液
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{--NaH}_2\text{PO}_4$
2. 5-甲硫乙基海因 5-methylthioethylhydantoin
pH 8.20—9.00, 0.05M 硼酸缓冲液
 $\text{H}_3\text{BO}_3\text{--Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$
3. 5-甲基海因 5-methylhydantoin
pH 9.40—12.0, 0.05M 硼砂缓冲液
 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{--NaOH}$

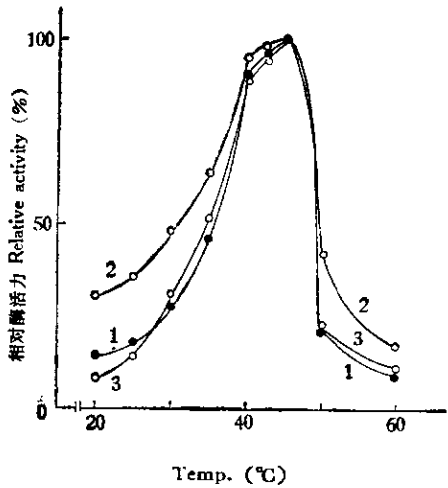


图2 酶作用不同底物时反应温度对酶活力的影响

Fig. 2 Effect of temperature on enzyme activity toward various substrates

图例同图1 Legend as in Fig. 1

10⁻²M 的各种金属离子或螯合剂,测定酶活力,结果列于表2。

结果说明在所试各种金属离子中 Ag⁺、Cu²⁺ 和 Zn²⁺ 对酶活力有强烈的抑制作用,其它金属离子无明显的抑制和激活作用。金属离子螯合剂 EDTA、邻二氮杂菲和 8-羟基喹啉对酶活力有强烈抑制作用。

2. 将游离细胞用 1×10⁻²M 的 EDTA 溶液处理 0.5 小时,然后离心除去 EDTA 溶液,用无盐水洗涤细胞五次,在有 1×10⁻²M 的各种金属离子存在下测定酶活力,表 2 第二栏结果表明所试金属离子中只有 Fe²⁺ 对酶活力恢复有作用,说明此酶需要 Fe²⁺,而 Fe³⁺ 和其它离子对酶活力无恢复作用。

(五) pH 和温度对游离细胞酶活力的影响

1. pH 的影响

(1) 将在冰箱中保存的细胞悬浮液离

表2 金属离子和螯合剂对酶活力的影响

Table 2 Effect of metal ions and chelating agents on enzyme activity

金属离子 Metal ion	相对活力(%) Relative activity	
	原细胞 Native cells	EDTA 处理细胞 EDTA treated cells
对照 Control	100	21.67
NH ₄ ⁺	98.38	33.75
K ⁺	99.63	27.30
Mn ²⁺	90.40	20.78
Mg ²⁺	96.26	36.77
Zn ²⁺	32.50	38.90
Ca ²⁺	90.29	28.06
Co ²⁺	86.55	41.74
Ni ²⁺	72.85	38.81
Fe ²⁺	98.75	92.18
Fe ³⁺	93.77	36.06
Cu ²⁺	18.31	10.48
Ag ⁺	9.46	9.59
Hg ²⁺	86.30	32.15
Al ³⁺	87.80	30.37
EDTA	28.08	
邻二氮杂菲 o-phenanthroline	31.08	
8-羟基喹啉 8-hydroxyquinoline	15.99	

心, 除去上清液后的细胞与新鲜细胞分别悬浮在不同 pH 的缓冲液中, 于 37℃ 保温 2 小时, 然后测定酶活力, 以未处理细胞酶活力为 100%, 结果如图 3。发现新鲜细胞和静息细胞在 pH4.8 和 pH8.0—9.0 范围内保温时, 酶活力均会增加, 而且新鲜细胞的酶活力要比静息细胞酶活力增加的更显著。

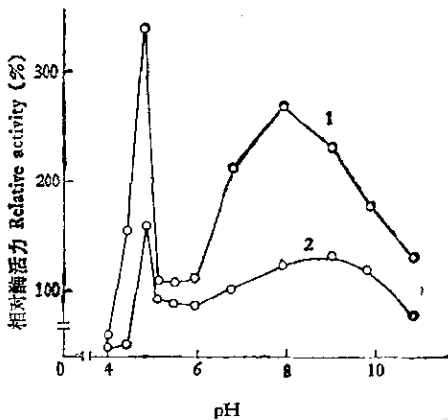


图 3 细胞在不同 pH 下保温时酶活力的变化

Fig. 3 The change of enzyme activity in the cells incubated at different pH

1. 新鲜细胞 Fresh cells
2. 静息细胞 Resting cells

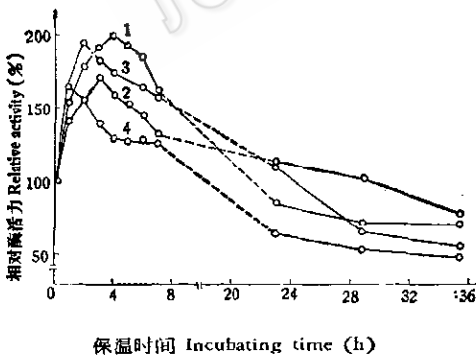


图 4 静息细胞在不同 pH 下保温时酶活力变化与保温时间的关系

Fig. 4 The change of enzyme activity in resting cells during incubation at: 1. pH 5.10; 2. pH 5.90; 3. pH 6.80; 4. pH 7.98

(2) 将静息细胞于 pH5.1、5.90、6.85 和 7.98 的缓冲液中 37℃ 保温, 定时取样,

测定酶活力, 结果如图 4。表明静息细胞在不同 pH 下保温, 酶活力均有增加, 但随 pH 不同, 酶活力的峰值和出现时间也不同。

(3) 新鲜细胞于 pH4.8、5.5、8.0 和 9.83 的缓冲液中, 37℃ 下保温, 定时取样测定酶活力。结果如图 5 所示, 酶活力均有增加, 但达到峰值时间不同。在 pH4.8 和 8.0 下保温 1—2 小时, 可达最大值, 在 pH5.5 时要更长时间; 但在 pH9.83 下保温时, 酶活力增加很少。长时间保温时, 在 pH4.8—8.0 范围内稳定性基本相似。

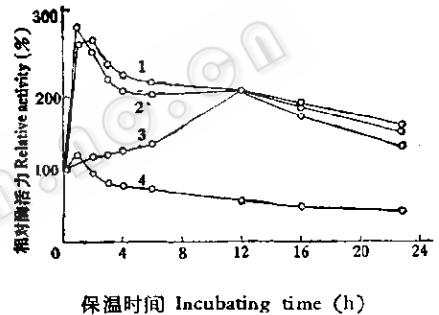


图 5 新鲜细胞在不同 pH 下保温时酶活力变化与保温时间的关系

Fig. 5 The change of enzyme activity in fresh cells during incubation at: 1. pH 4.80; 2. pH 8.0; 3. pH 5.5; 4. pH 9.8

2. 温度对细胞酶活力的影响

(1) 将细胞悬浮于 pH4.8、5.5 和 8.0 的缓冲液中, 于不同温度下保温 1 小时, 然后测定酶活力, 结果如图 6。表示在所试三种 pH 下, 温度对酶活力变化的影响不同。在 40℃ 以下, 短时间保温酶活力有增加。若超过 45℃, 酶活力损失很快。

(2) 将细胞悬浮于 pH8.0 的缓冲液中, 分别在 30、40 和 45℃ 下保温, 定时取样测定酶活力, 结果如图 7。说明细胞在 pH8.0 缓冲液中于 40℃ 保温 2 小时, 酶活力提高, 并达到高峰, 比原细胞酶活力增加 2 倍多, 而在 30℃ 下保温, 需 6 小时达到

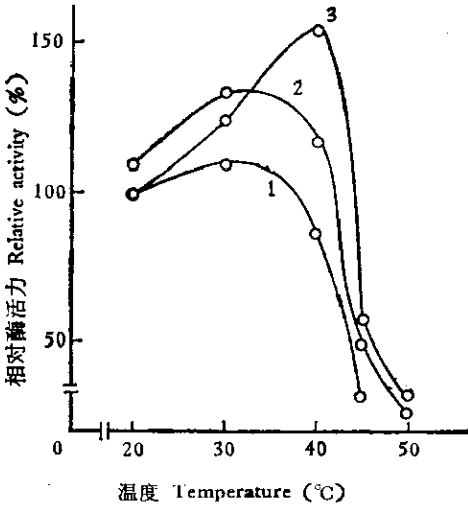


图 6 酶在不同 pH 和温度下保温时酶活力的变化
Fig. 6 The change of enzyme activity in the cells incubated at different pH and temperatures
1. pH 5.5; 2. pH 8.0; 3. pH 4.5

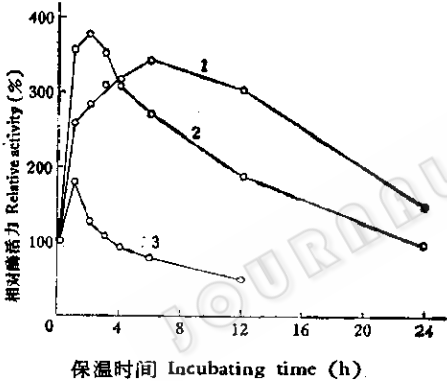


图 7 细胞在 pH8.0 不同温度下保温时酶活力变化
Fig. 7 The change of enzyme activity of the cells incubated at pH 8.0 and different temperatures
1. 30°C; 2. 40°C; 3. 45°C

表 3 细胞保温时缓冲液种类对酶活力的影响

Table 3 Effect of different buffers on enzyme activity of the cells

缓冲液 Buffer		细胞悬浮液酶活力 Activity of cell suspension	离心上清液酶活力 Activity of supernatant
生理盐水	Normal saline	2.55	0.08
巴比妥酸缓冲液	Barbituric acid	2.25	0.08
Tris 缓冲液	Tris	1.24	0.04
磷酸缓冲液	Phosphate	1.74	0.04
磷酸-柠檬酸缓冲液	Phosphate-citrate	1.77	0.03
硼酸缓冲液	Tetraborate	1.19	0.06
原细胞	Native cells	0.98	

最大值。

3. 细胞保温时不同缓冲液对酶活力的影响

将细胞悬浮于生理盐水和 pH8.0 0.02 M 的不同缓冲液中,于 40°C 保温 2 小时,测定酶活力。另一部分离心,取上清液测定酶活力,结果如表 3。说明细胞在生理盐水中保温时酶活力增加得最多,并且保温过程几乎没有酶从细胞中释放到溶液中。

4. pH 对无细胞提取液的酶活力的影响

(1) 将细胞超声破碎,离心,分别测定每一部分的酶活力,结果列于表 4。超声破碎不论是否完全,均可使酶活力大大提高,上清液酶活力比原细胞酶活力增加 2—3 倍;而破碎和未破碎的细胞沉淀物酶活力也比原细胞高。

(2) 无细胞提取液加到不同 pH 缓冲液中,于 40°C 下保温 2.0 小时,测定酶活力,以未保温的无细胞提取液酶活力为 100% 作图,如图 8。结果表明无细胞提取液在所试 pH 下无明显的酶活力增加现象。

(六) 氧对酶活力的影响

按表 5 所列内容进行处理,发现氧能强烈地抑制酶反应。这种作用主要是由于氧与底物的可逆结合,而不是和酶结合,从

表 4 细胞破碎过程中酶活力变化
Table 4 Distribution of enzyme activity in different fractions after cell disruption

材料 Fraction	酶活力 (u/ml) Activity	相对活力(%) Relative activity
原细胞 Nactive cells	0.53	100
细胞破碎物 Disrupted cell suspension	2.325	438
离心上清液 Supernatant	2.025	382
离心沉淀 Cell debris	0.820	155

表 5 氧对酶反应的影响
Table 5 Effect of oxygen on enzyme activity

处理方法 Method	酶活力 (u/ml) Activity	相对活力(%) Relative activity
对照 Control	2.77	100
酶反应时通氧 Reaction mixture + O ₂	0.56	20.2
底物预先通氧 Substrate solution + O ₂	0.59	21.2
细胞悬液预先通氧 Cell suspension + O ₂	2.46	88.7
底物通氧后真空排氧 Substrate solution + O ₂ then vacuum expelled	2.29	82.3
底物通氧后室温放置 4 小时 Substrate solution + O ₂ leaving at room temp.	2.06	74.3

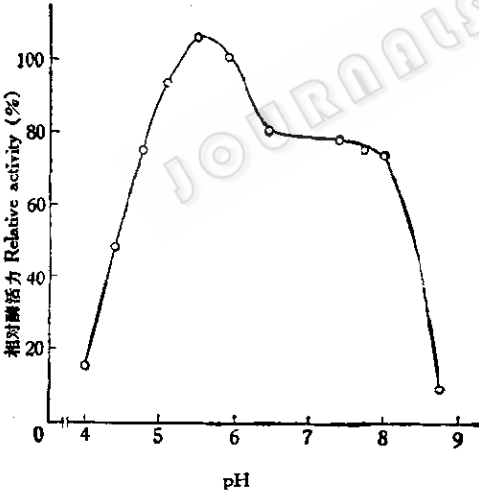


图 8 无细胞提取液在不同 pH 下保温时酶活力变化
Fig. 8 The change of enzyme activity of cell-free extract incubated at various pH

而妨碍了酶对底物的作用。

(七) K_m 和 V_{max} 值的测定

分别以 5-苯基海因、5-甲硫乙基海因和 5-甲基海因为底物，按 Lineweaver-Buck

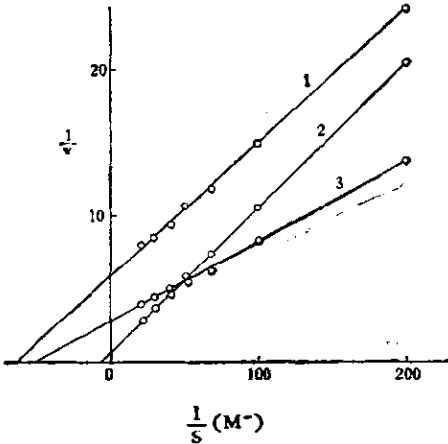


图 9 游离细胞的酶对不同底物的 Lineweaver-Buck 图
Fig. 9 Lineweaver-Buck plots for different substrates estimated with dihydropyrimidinase producing intact cells

- 1. 5-苯基海因 5-phenylhydantoin
- 2. 5-甲基海因 methylhydantoin
- 3. 5-甲硫乙基海因 5-methylthioethylhydantoin

做图法求 K_m 和 V_{max} ，结果如图 9 和表 6。

表6 酶对不同底物的 K_m 和 V_{max}
Table 6 K_m and V_{max} of enzyme for different substrates

底 物	$K_m(M)$	$V_{max}(Mmin^{-1})$
5-苯基海因 5-phenylhydantoin	1.61×10^{-2}	1.72×10^{-4}
5-甲硫乙基海因 5-methylthioethylhydantoin	2.08×10^{-2}	3.12×10^{-4}
5-甲基海因 5-methylhydantoin	1.61×10^{-1}	1.67×10^{-2}

讨 论

Pseudomonas putida 73104 产的二氢嘧啶酶是胞内酶。研究游离细胞内酶的性质对实际应用和了解酶在细胞内的状况及细胞本身有一定意义。

Takahashi 等^[6]在研究 *Pseudomonas striata* 的结晶二氢嘧啶酶性质时发现二价金属离子螯合剂对酶有抑制作用,推测铁和钴离子会参与酶反应。我们试验表明只有 Fe^{2+} 对酶的活力是重要的,而 Co^{2+} 对酶活力无作用。

如果只研究纯酶性质,难于发现细胞本身性质对酶活力和性质的影响。本试验表明,游离细胞在弱酸或弱碱性条件下,在一定温度下保温,能使细胞的酶活力明显提高。这种现象不像是酶本身的变化引起的,主要是在这一条件下细胞膜性质发生变化,大大改善了底物的通透性,而不是酶从细胞内释放出来所致。这种情况表明,对许多胞内酶来说,要提高胞内酶的利用率,改善细胞膜的通透性是很重要的。当

然,目前对酶活力提高的本质并不十分了解,有待进一步探讨。

氧能和底物 5-苯基海因可逆结合而影响酶作用这一有趣现象值得进一步研究。搞清底物与氧的结合方式对研究酶的作用方式会有重要意义,而且对实际应用也是重要的。

实验证明 *Pseudomonas putida* 73104 产的二氢嘧啶酶对 5-苯基海因的特异性很高,而对 5-甲硫乙基海因的特异性较低,这与 *Pseudomonas striata* 的二氢嘧啶酶有所不同。

参 考 文 献

- [1] Sano, K. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 41 (5): 819—825, 1977.
- [2] Tsugawa, R. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 30: 27, 1966.
- [3] Takahashi, S. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 57: 328, 1979.
- [4] 孙万儒: 微生物学报, 23(2): 133—142, 1983.
- [5] Suzuki, T. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 37 (2): 411—414, 1973.
- [6] Henze, H. R. and R. J. Speer: *J. Am. Chem. Soc.*, 64: 522, 1942.

PROPERTIES OF DIHYDROPYRIMIDINASE IN INTACT CELLS OF *PSEUDOMONAS PUTIDA*

Sun Wanru

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

Dihydropyrimidinase in intact cells of *Pseudomonas putida* 73104 has high specificity for 5-phenylhydantoin, it can also hydrolyze 5-methylhydantoin and 5-methylthioethylhydantoin, but can not hydrolyze the derivatives of hydantoin with positively and negatively charged groups at the 5 position of the hydantoin ring.

The optimum pH of enzyme reactions is different for different substrates, but the optimum temperature is the same for different substrates.

Enzyme activity is strongly inhibited by Ag^{+1} , Cu^{2+} , Zn^{2+} and chelating agents of metal ions ($1 \times 10^{-2} M$). Enzyme activity decreased about 70% when the cells were treated with EDTA ($1 \times 10^{-2} M$). Above 90% of initial activity was recovered when Fe^{2+} was added into the reaction mixture, but other metal ions had no such effect.

This shows that Fe^{2+} is an indispensable ion for dihydropyrimidinase activity in the cells.

Enzyme activity of intact and resting cells were increased about 2—3 times when they were incubated under weak acid or basic conditions at 40°C , and the supernatant of the incubated cells have hardly any enzyme activity. The activity of cell-free extract haven't changed under the same conditions. It seems that permeability of the cells is enhanced under the above mentioned conditions.

Enzyme reaction is strongly inhibited by oxygen which may probably combine reversibly with substrate. K_m values of enzyme for 5-phenylhydantoin, 5-methylthioethylhydantoin and 5-methylhydantoin are 1.61×10^{-2} , 2.08×10^{-2} and $1.61 \times 10^{-1} M$ respectively.