

用底物类似物抗性法选育海因酶高产菌种*

江 宁 任永娥 强亚静 卢大军 孙万儒

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 以底物类似物抗性作为选择性标记来筛选高产海因酶的突变菌种。假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) J43 通过紫外光、亚硝基胍、亚硝基胍加 5-氟尿嘧啶三次诱变处理后, 测定了 161 株有 5-氟尿嘧啶抗性的突变株的产海因酶活力, 得到的突变株 M39 产海因酶活力比出发株提高了 13.7 倍。此法对选育其他酶或其催化产物的高产菌种可能也有意义。

关键词 海因酶, 底物类似物, 育种

海因酶 (hydantoinase, E. C. 3.5.2.2) 是一种使海因及其 5' 取代衍生物开环生成 N-氨甲酰基 α -氨基酸的酶, 在合成光学活性氨基酸中有现实意义^[1]。以苯海因或对-羟基苯海因为底物, 可用酶法生产 D-苯甘氨酸或 D-对-羟基苯甘氨酸, 这是半合成 β -内酰胺类抗生素的重要原料。目前已从假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.)、土壤杆菌 (*Agrobacterium* sp.)、梭菌 (*Clostridium* sp.)、消化球菌 (*Peptococcus* sp.)、节杆菌 (*Arthrobacter* sp.)、赛氏杆菌 (*Serratia* sp.)、棒杆菌 (*Corynebacterium* sp.) 和芽胞杆菌 (*Bacillus* sp.) 等微生物中分离到产 D-海因酶的菌株^[2-6]。但野生型菌株的产酶活力都不太高。

产海因酶菌株的选育, 目前国际上普遍采用以底物为唯一氮源(或碳源)以及对二甲氨基甲醛 (PDAB) 显色的方法^[8-10]。但是用唯一氮(碳)源只能区别产酶与不产酶, 很难区别高产与低产。用 PDAB 显色在平板上直接筛选往往由于微生物本身产黄色物质而带来干扰。本文报道通过诱变剂处理后, 用底物类似物抗性的方法高效地选育海因酶的高产菌种。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 假单胞菌 J43, 从土壤中分离得到, 产海因酶活力 0.275U/ml, 保存于牛肉汁斜面。

1.1.2 培养基: (1) 发酵培养基(%): 牛肉膏 1.0, 酵母膏 1.0, 葡萄糖 0.5, NaCl 0.3, 苯海因 0.1, 用 NaOH 调 pH 至 7.0。(2) 平板培养基: 发酵培养基加 1.2% 琼脂。(3) 选择培养基: 平板培养基加适量 5-氟尿嘧啶 (5-FU)。

1.1.3 试剂: 均为国产分析纯或化学纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 海因酶活力的测定: 细胞接种在装有 30ml 发酵培养基的 250ml 三角瓶中, 30℃ 振荡培养 15h 后, 用 PDAB 法测定酶活力^[1], 酶的活力单位定义为在测定条件下每分钟

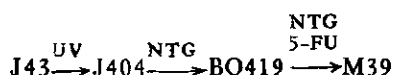
本文于 1994 年 7 月 7 日收到。

*“八·五”攻关课题部分内容。

产生 1 μ mol 氨甲酰基苯甘氨酸所需的酶量。

1.2.2 菌株的诱变: 参照文献[11]方法进行。(1)紫外光(UV)诱变: 用美国 Ultraviolet Products Inc. 产 60W 紫外灯, 波长 254nm, 距离 10cm, 照射 30s, 选择培养基加 50 μ g/ml 5-FU。(2)亚硝基胍(NTG)诱变: 用 1.0mg/ml 诱变剂, 30 $^{\circ}$ C 处理 30min, 选择培养基加 100 μ g/ml 5-FU。(3) NTG 和 5-FU 复合诱变: 用 1.0mg/ml NTG 加 100 μ g/ml 5-FU, 30 $^{\circ}$ C 处理 30min, 选择培养基加 200 μ g/ml 5-FU。

诱变谱系为:



1.2.3 高产海因酶菌株的筛选: 挑取在选择培养基上长出的菌落, 转接在牛肉汁斜面上于 30 $^{\circ}$ C 培养过夜, 再从斜面接种到发酵培养基, 30 $^{\circ}$ C 振荡培养 15h 后测定海因酶活力, 挑选高产菌株。

2 实验结果

经紫外光诱变后, 测定在选择培养基平板上长出的 11 个菌落, 结果如表 1。

表 1 紫外光诱变结果

Table 1 Results of ultraviolet mutagenesis

相对海因酶活力*(%) Relative activity	<100	100~150	150~200	>200
菌株数 No. of strains	0	1	2	8
占测定总菌株的百分数(%) Percent of total determined strains	0	9.1	18.2	72.7

* 出发菌株 J 43 为 100, 海因酶活力 0.275U/ml。

Original strain J43 as 100, activity of hydantoinase was 0.275U/ml.

虽然在选择培养基上长出的突变株数量很少, 但从表 1 可以看出, 用 5-FU 抗性进行筛选, 长出的菌落其酶活都有所提高, 并且大部分提高了一倍以上。选择其中一株 J404, 传代后海因酶活力为 0.714U/ml, 用它作为 NTG 诱变的出发株。NTG 诱变的结果如表 2。

表 2 NTG 的诱变结果

Table 2 Results of NTG mutagenesis

相对海因酶活力*(%) Relative activity	<100	100 ~200	200 ~300	300 ~400	400 ~500	>500
菌株数 No. of strains	8	19	15	14	4	0
占测定总菌株的百分数(%) Percent of total determined strains	13.3	31.7	25.0	23.3	6.7	0

* 出发菌株 J404 为 100, 海因酶活力 0.714U/ml。

Original strain J404 as 100, activity of hydantoinase was 0.714U/ml.

从表 2 可以看出,在 100 μ g/ml 5-FU 的选择培养基上生长的菌落,其海因酶活力大多数(86.7%)又有所提高,并且有一大半提高了一倍以上。在此基础上挑选一株 BO409,传代后的海因酶活力为 1.34U/ml,作为 NTG 和 5-FU 复合诱变的出发株。经诱变后,在选择培养基和不含 5-FU 的普通平板培养基上生长的结果如表 3。

表 3 NTG 和 5-FU 复合诱变的结果

Table 3 Results of NTG and 5-FU mutagenesis

相对海因酶活力*(%) Relative activity		<100	100 ~200	200 ~300	300 ~400	>400
生长在培养基平板上	菌株数 No. of strains	49	25	13	3	0
Grown on selective medium plates	占测定总菌株的百分数(%) Percent of total determined strains	54.4	27.8	14.4	3.3	0
生长在非选择性培养基平板上	菌株数 No. of strains	36	1	0	0	0
Grown on non-selective medium plates	占测定总菌株的百分数(%) Percent of total determined strains	97.3	2.7	0	0	0

* 出发菌株 BO409 为 100,海因酶活力为 1.34U/ml。
Original strain BO409 as 100, activity of hydantoinase was 1.34U/ml.

表 3 结果说明,由于出发株已有相当高的海因酶活力,对 5-FU 的抗性已达到 100 μ g/ml,因此尽管将选择培养基的 5-FU 浓度提高到 200 μ g/ml,筛选效率仍不如前两次诱变为高,但还是得到了近一半的正变菌株,少数菌株酶活力提高的幅度也较大,其中一株 M39 产酶活力达 4.322U/ml。而在没有选择压力的条件下,得到的突变株绝大多数是负变株。这说明利用底物类似物抗性进行筛选,可大幅度提高筛选效率。

3 讨论

尽管已有不少关于基因工程菌用于工业生产的成功报道,但经典的诱变育种仍是当前最重要的遗传育种手段,特别是对遗传背景不很清楚的对象,诱变育种更是必不可少。但是诱变育种存在着很大的盲目性和随机性,诱变后在产生少数正变株的同时,大量的负变株会给筛选工作带来很大的困扰,一般需要从数以千计的突变株中才可能选出比较满意的菌株,因此需要投入较多的人力、物力和时间,这是诱变育种存在的主要问题。如何提高诱变育种的效率,尽可能克服其盲目性和随机性,是一个十分重要而有意义的课题。

在选育某一特定酶或由它催化的代谢物的菌种时,如果酶对底物的专一性不强,它一般也能与底物的结构类似物作用。当一种能使微生物致死或抑制其生长的底物类似物存在时,不产或低产酶的菌株就被杀死或抑制生长,只有那些能产生大量酶从而将底物类似物作用掉的菌株才能生长,这样就可以大量淘汰经过诱变处理后产量低的菌株,提高了诱变育种的效率。海因酶又称二氢嘧啶酶(dihydropyrimidinase),本实验用底物尿嘧啶的类似物 5-FU 作选择试剂,5-FU 能引起碱基的参入错误与 DNA 复制错误而使细胞致死。

已知一条代谢途径,用代谢终产物结构类似物抗性的方法来选育高产突变株常常是

一种行之有效的方法。但是此法在应用上有一定局限。首先必须对代谢途径有所了解, 并且有时如果选出的突变株产生抗性的原因不是由于变构酶成为不能识别代谢终产物而是其他原因, 则得到的抗性突变株就不一定是期望的高产株^[12]。本文提出的底物类似物抗性法不存在这个问题, 也可以不必了解所涉及的代谢途径, 因此在一定条件下比终产物类似物抗性法更显有效。本实验用较少的工作量, 三次诱变仅测定了 161 株菌就使酶活力提高 13.7 倍, 从而证明了用底物类似物抗性的方法选育高产酶或其产物的菌种, 可能具有重要的普遍意义。

参 考 文 献

- [1] Syltsk C, L  ufer A, M  ller R *et al.* Production of Optically Pure D- and L-  -Amino Acids by Bioconversion of D, L-5-Monosubstituted Hydantoin Derivatives. In: Fiechter A ed. *Advances in Biochem Engin/Biotechnol.* Berlin Herdelberg. 1990. 41: 29~75.
- [2] 孙万儒. 微生物学报, 1983, 23(2): 133~142.
- [3] Yokozeki K, Kubota K. *Agric Biol Chem*, 1987, 51(3): 721~728.
- [4] Serge R, Chinski N, Ohleyer E. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1990, 33(4): 382~388.
- [5] Morin A, Touzel J P, Lafond A *et al.* *Appl Microbiol Biotechnol*, 1991, 35(4): 536~540.
- [6] M  ller A, Syltsk C, Schulze M *et al.* *Enzyme Microb Technol*, 1988, 10: 618~625.
- [7] Morin A, Lablanc D, Paleczek A *et al.* *J Biotechnol*, 1990, 16: 37~48.
- [8] Morin A, Hummel W, Kula M R. *Biotechnol Letters*. 1986, 8(8): 573~576.
- [9] Gross C, Syltsk C, Wagner F. *Biotechnol Tech*, 1987, 1(2): 85~90.
- [10] Morin A, Hummel W, Kula M R. *J Gen Microbiol*, 1987, 133(5): 1201~1207.
- [11] 《微生物诱变育种》编写组. 微生物诱变育种. 北京: 科学出版社, 1973.
- [12] Ball C. Genetics in the Development of the Penicillin Process. In: Hutler R *et al* ed. *Antibiotics and Other Secondary Metabolites Biosynthesis and Production*. London: Academic Press, 1978. 163~176.

BREEDING OF HYDANTOINASE OVERPRODUCTION STRAINS BY RESISTANCE OF SUBSTRATE ANALOGUE

Jiang Ning Ren Yonge Qiang Yajing Lu Dajun Sun Wanru

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract Hydantoinase overproduction strains were bred by use of substrate analogue resistant mutation. *Pseudomonas* sp. J43 was treated by UV, NTG and NTG plus 5-FU sequencely. Mutant M39 which produced hydantoinase 13.7 folds higher than that of original strain was obtained from 161 strains of mutants with 5-FU resistance by determination of hydantoinase activity. The method should be applied to screen overproduction strains of other enzymes or their products.

Key words Hydantoinase, Substrate Analogue, Breeding