

# 酪氨酸酚解酶高产菌株快速筛选模型的建立与应用

李华钟

李 静

(无锡轻工大学生物工程学院、无锡,214036) (青岛海洋大学精细化工研究所,青岛,266003)

**摘 要** 以甲酚红作指示剂,在加有酪氨酸的固态培养基上,根据甲酚红由黄变红所形成的变色圈的大小筛选酪氨酸酚解酶高产突变株是一种平板快速筛选方法。弗氏柠檬酸细菌 ATCC8090 菌株经紫外线和亚硝基胍诱变处理后,经该法筛选得到突变株 C37-30,该菌株产酪氨酸酚解酶达 125 U/g 干菌体,较出发菌株提高 232%。连续 5 代传代试验表明,突变株 C37-30 产酶稳定。

**关键词** 酪氨酸酚解酶 快速筛选方法 弗氏柠檬酸细菌 甲酚红 诱变

酪氨酸酚解酶(tyrosine phenol lyase, EC 4.1.99.2, TPL),也称  $\beta$ -酪氨酸酶,可以将邻苯二酚(catechol)、丙酮酸(pyruvate)和氨缩合形成左旋多巴(3,4-二羟基苯基丙氨酸,3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine; 简称 L-DOPA),是治疗帕金森氏综合症、肝昏迷、CO 中毒、精神病等方面的有效药物<sup>[7,8]</sup>,但价格昂贵。以丙酮酸、邻苯二酚和氨为底物,用微生物酶法合成 L-DOPA 具有成本低,纯度高,提取容易,品质优良等优点,日本味之素公司等已投入工业化生产。本研究首先建立了 TPL 高产菌株平板快速检出方法,然后运用该方法以弗氏柠檬酸细菌为出发菌,经紫外线和亚硝基胍诱变,筛选得到一株产酪氨酸酚解酶的高产菌株 C37-30,并对该菌株的产酶稳定性进行了验证。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌 种

弗氏柠檬酸细菌(*Citrobacter freundii*) ATCC 8090,来自美国模式菌种保藏中心。

### 1.2 培养基

培养基组成见表 1。

### 1.3 培养方法

种子培养从培养好的斜面上挑取一环菌体接入种子培养基中,打散菌体后 150

r/min, 30℃ 培养 20 h。

表 1 培养基组成/ $10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

	斜面培养基	种子培养基	筛选平板培养基	产酶培养基
L-Tyr	0.02	0.02	0.2	0.2
蛋白胨	1.0	0.5		
酵母膏	0.5	1.0	0.5	0.5
牛肉膏		0.5		
KCl	0.1	0.1		
NaCl	0.1	0.1		
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O		0.005	0.1	0.1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>			0.2	0.2
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O				0.002
盐酸吡哆醇			0.01	0.01
甲酚红			0.005	
琼脂	2.0		2.0	

注:上述培养基 pH6.7, 0.1 MPa 灭菌 15 min。

产酶细胞培养:种子培养好后以 10% 的接种量,接入产酶培养基中,150 r/min, 30℃ 摇瓶培养 24 h,以得到含酶菌体。

### 1.4 菌种的诱变处理

紫外诱变方法,见文献[9]。

亚硝基胍诱变方法,见文献[10]。

### 1.5 分析方法

菌体干重(DCW)的测定:取细胞培养液于 10 000 r/min 离心 5 min 后弃去上清液,打散菌体,加入等体积蒸馏水洗涤后再离心,弃去上清液,置于干燥箱中在 80℃ 下烘至恒重,冷却后称重,得菌体的干重。

TPL酶活力的测定:取产酶培养液2 mL,离心得菌体后,用100 mol/L, pH8.0的 $K_3PO_4$ 缓冲液洗涤细胞2次,加入2 mL的 $K_3PO_4$ 缓冲液振荡混匀,并用该缓冲液稀释20倍。取1 mL稀释菌液加入10 mL的比色管中,加入2 mL  $K_3PO_4$ 缓冲液,再加入1 mL反应底物(2.2648 g  $L$ -Tyr 和 0.2056 g 磷酸吡哆醇,用上述 $K_3PO_4$ 缓冲液溶解并定容至1000 mL,测定时稀释10倍使用),在30℃下反应30 min后,加入1 mL 0.5 mol/L的HCl终止酶反应。空白对照:1 mL稀释菌液于沸水中煮5 min灭酶活,加入上述试剂。通过测定由 $L$ -Tyr水解释放出的丙酮酸的量来定义酪氨酸酚解酶的酶活。

酶活单位定义:30℃, pH8.0的条件下,每分钟水解产生1  $\mu$ mol 丙酮酸所需要的酶的量为一个酶活单位(U)。

丙酮酸的测定,见文献[11]。

## 2 结果

### 2.1 TPL高产菌平板快速检法——甲酚红变色圈法的建立

实验中发现 *Citrobacter freundii* ATCC8090 在细胞培养基中培养到稳定期以后,培养基的pH值从原来灭菌后的6.9上升到9.0左右,日本Para等曾报道能够合成 $L$ -DOPA的菌种 *Erwinia herbicola* 培养一定时间后培养基的pH值也有所升高,可能是因为细胞以 $L$ -Tyr为诱导物合成TPL的同时, $L$ -Tyr被TPL水解,释放的 $NH_3$ 使得培养基pH上升<sup>[12]</sup>。为此,使用液体筛选培养基,以不加 $L$ -Tyr为对照,接种后于30℃, 150 r/min振荡培养30 h,测定培养液的pH值以及 $NH_4^+$ 的浓度,结果见表2。

表2 添加 $L$ -Tyr对培养液pH值以及 $NH_4^+$ 浓度的影响

	添加 $L$ -Tyr 浓度/%	灭菌后 pH值	培养后 pH值	$NH_4^+$ 增加量 $\mu$ mol/mL
对照组	0	6.9	8.2~8.3	—
试验组	0.2	6.9	9.0	9.8

从表2看出,对照组中即使不加 $L$ -Tyr,培养后pH也从6.9升至8.2~8.3,可能是细胞生长过程中分解利用营养物质的同时产生碱性物质。试验组中加入 $L$ -Tyr的浓度为11.0  $\mu$ mol/mL,被TPL酶水解后产生的最大 $[NH_4^+]$ 是11.0  $\mu$ mol/mL,实际测定值为9.8  $\mu$ mol/mL,可以认为试验组pH升高和 $[NH_4^+]$ 的增加是由于 $L$ -Tyr被水解所致。

为此,选择甲酚红为指示剂,其变色范围是pH7.0~8.8(橙黄色~紫红色)。将其加入含0.2%  $L$ -Tyr的筛选平板中,产TPL的菌落周围的 $L$ -Tyr被水解,会形成紫红色变色圈,变色圈的大小将能反映出细胞产TPL的能力。

### 2.2 紫外线和亚硝基胍诱变结果

#### 2.2.1 紫外线诱变结果

用15w的紫外灯,照射距离为30 cm,照射时间为20 s(致死率为88%)。经后培养后,涂布加有甲酚红的筛选平板,30℃培养24 h后,挑选变色圈与菌落直径之比较大的菌落200个,接到斜面保藏。初筛结果有76株菌的酶活比原种提高10%以上,计为正突变;有68株菌酶活比原种降低10%以上,计为负突变;56株菌酶活与原菌相差 $< \pm 10\%$ 。结果见图1。

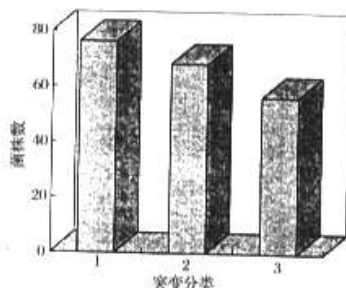


图1 紫外诱变的初筛结果

注:图中“突变分类”指:1—正突变(酶活比原种提高10%以上);2—负突变(酶活比原种降低10%以上);3—酶活与原种相差 $< 10\%$ (图2同)

由上述结果可以看出,正突变菌占38%,负突变菌占34%,因此可以认为甲基红筛选平板检出TPL高产菌是可行的。



# Construction and Application of the Rapid Screen Model for Tyrosine Phenol Lyase Producer

Li Huazhong

( Biotechnology School, Wuxi University of Light Industry, Wuxi, 214036)

Li Jing

(Fine Chemistry Institute, Ocean University of Qingdao, Qingdao, 266003)

**ABSTRACT** It is a rapid method for screening the tyrosine phenol lyase producer according to the size of the red color ring by using methyl phenol red as the indicator in the solid medium containing tyrosine. The mutant C37-30 which produces as much as 125 U/g *DCW* of tyrosine phenol lyase (232% higher than that of the original one) was obtained by using the rapid screen method after *Citrobacter freundii* ATCC8090 was mutagenized with UV and NTG. The continuous 5 generations test shows that the mutant C37-30 is stable in the tyrosine phenol lyase production.

**Key words** tyrosine phenol lyase, rapid screen method, *Citrobacter freundii*, methyl phenol red, mutagenesis