

不同诱变方法对 TL-15028 菌株产泰乐菌素相关性能的影响

李春玲,丁亚莲,谢文静,牛 春,张 萍*

(宁夏泰瑞制药股份有限公司,银川,750101)

[收稿日期]2016-07-28 [文献标识码]A [文章编号]1002-1280 (2016) 12-0000-00 [中图分类号]S852.6

[摘 要] 为了选育出泰乐菌素高产菌株,以弗氏链霉菌 (*Streptomyces fradiae*) TL-15028 菌株作为出发菌株,利用化学诱变、物理诱变以及复合诱变的方法对菌株进行诱变处理,比较不同诱变方法的诱变效果,通过诱变筛选出 1 株遗传稳定性好、且具有泰乐菌素和豆油抗性的菌株 TLEU-1503,其发酵效价比出发菌株提高了 36.5%,达到 14124 $\mu\text{g/mL}$,对泰乐菌素高效生产、品质提升具有重要意义。

[关键词] 泰乐菌素;高产菌株;复合诱变;选育

The Effect of Different Induction Mutation Method on Production Performance for Tylosin in TL-15028 Strain

Li Chunling, Ding Yalian, Xie Wenjing, Niu Chun, Zhang Ping*

(Ningxia Tairui pharmaceutical Company Limited, Yinchuan 750101)

Abstract: In order to screening of high yield strain for tylosin, TL-15028 strain was selected as original strain. The original strain was mutation treated with chemical mutation, physical mutation and compound mutation, respectively. The mutagenic effect of the three methods were compared. The TLEU-1503 strain, which with high inheritance stability and resistance to tylosin and soybean oil, was screened. The potency of TLEU-1503 strain, which was 14124 $\mu\text{g/mL}$, had improved 36.5% than original strain. The result had great significance for efficient production and quality improvement of tylosin.

Key words: tylosin; high yield strain; compound mutation; screening

泰乐菌素(Tylosin)是一种 16 元大环内酯类禽畜专用抗生素,主要由弗氏链霉菌(*Streptomyces fradiae*)产生,可有效抑制革兰氏阳性菌、某些革兰氏阴性球菌、支原体、分枝杆菌、螺旋体及原虫等微生物的生长,对猪流行性肺炎、鸡败血症等多种常见

疾病有着独特的疗效^[1-3]。同时,泰乐菌素还可以促进禽畜生长,提高饲料利用率,缩短饲养周期,提高经济效益^[4]。泰乐菌素高效、低残留、不易产生耐药性,被广泛用作兽药和饲料添加剂,也是国家规划重点发展的兽药产品^[5-7]。但是,目前国内泰

作者简介:李春玲,主要从事微生物发酵菌种选育研究。

通讯作者:张 萍。E-mail:lichuling_@163.com

乐菌素基础与应用研究方面较弱,特别是生产菌种的效价远不及国外水平,严重阻碍了泰乐菌素产量和品质的提升。开展泰乐菌素高产菌株的选育是提高泰乐菌素产量的关键、也是优化产品竞争力的当务之急。鉴于此,本研究利用化学诱变、物理诱变及两者结合的方法对菌株进行诱变处理,定向选育出具有泰乐菌素、豆油抗性的高产稳定性菌株,为进一步提高泰乐菌素的产量和品质奠定一定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

出发菌为弗氏链霉菌(*Streptomyces fradiae*) TL-15028 菌株,由宁夏泰瑞制药有限公司技术中心保存。所用试剂均为国产分析纯,恒温大幅振荡摇床(HQL150C,武汉科学仪器厂)、恒温培养箱(LHP160,江苏杰瑞尔电器有限公司)、分光光度计(BECKMANDU-600)、高效液相色谱系统(Waters)。

1.2 方法

1.2.1 诱变前准备

1.2.1.1 培养基配制

试管斜面与平皿培养基:含玉米淀粉, NH_4NO_3 , K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 琼脂。种子摇瓶培养基:含豆饼粉,精油,酵母粉,玉米浆,重质 CaCO_3 。发酵摇瓶培养基:含鱼粉,玉米淀粉,精油,甜菜碱盐酸盐, K_2HPO_4 , $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 轻质 CaCO_3 , KCl , NaCl 。PH 调至 7.2, 121℃ 灭菌 15 min, 备用。

1.2.1.2 培养条件

在黑暗、温度 29℃、相对湿度 40% 条件下培养,试管斜面培养 9 d,平皿培养 18 d,种子摇瓶转速 220 rpm、培养 48 h,发酵摇瓶转速 220 rpm、培养 6 d。

1.2.1.3 菌种复壮

取保藏的斜面试管,倒入 6 mL 无菌生理盐水,用接种环刮取培养物表面的孢子,使其悬浮,再用脱脂棉过滤,将滤液倒入离心管中,5000 r/min 离

心 2 min,弃上清液,然后加入 5 mL 生理盐水,用移液器反复吸打沉淀物,倒入三角锥形瓶(型号为 100 mL,瓶中装有 15 粒玻璃珠)中,再用 5 mL 生理盐水冲洗离心管 2 次,一并倒入锥形瓶,29℃, 220 r/min 震荡 15 min,过滤得到孢子悬浮液。将孢子悬浮液用稀释至 1×10^{-4} ,每个平板加入 200 μL 孢子悬浮液,涂布均匀,培养后挑取单菌落,先进行抑菌圈初筛,然后摇瓶复筛。

1.2.2 诱变方法

1.2.2.1 紫外(UV)诱变处理

参照张明明等^[8]的方法,并做了一定改进。诱变处理时间分别为 0 s(对照)、15 s、30 s、60 s、90 s。诱变结束后,在黑暗中放置 1 h,吸取孢子悬浮液,梯度稀释,涂布平板,在 29℃ 培养箱中倒置培养 18 d。

1.2.2.2 甲基磺酸乙酯(EMS)诱变处理 参照徐红梅等^[9]的方法,并做了一定改进。诱变处理时间分别为 1 h、2 h、3 h、4 h、5 h,吸取诱变后的孢子悬浮液梯度稀释,涂布平板,于 29℃ 培养箱倒置培养 18 d。

1.2.2.3 $\text{LiCl} + \text{UV}$ 复合诱变处理 吸取 5 mL 孢子悬浮液置于 50 mL 三角瓶内,加入 1% 的 LiCl ,放置在摇床间振荡 4 h,然后经 UV 诱变处理 60 s,梯度稀释,涂布平板,于 29℃ 培养箱倒置培养 18 d。

1.2.2.4 $\text{EMS} + \text{UV}$ 复合诱变处理 吸取 5 mL 孢子悬浮液于 50 mL 三角瓶中,加入 15 μL EMS,放置于 29℃, 220 r/min 摇床间震荡 4 h,然后经 UV 诱变处理 60 s,梯度稀释,涂布平板,于 29℃ 培养箱倒置培养 18 d。

1.2.3 性能检测

1.2.3.1 泰乐菌素效价测定 参照 Choi 等^[10]的方法,并做了一定改进。采用 HPLC 法,色谱柱为 ODS 柱,流动相为 0.85 mol/L 氯化钠、40% 乙腈溶液,用 1 mol/L 的盐酸调 pH 至 2.5,流速为 1 mL/min,检测波长为 290 nm;待测效价 = (标准品的单位 $\times$ 待测样品的峰面积 $\times$ 待测样品的稀释倍数) / 标准品的峰面积。

1.2.3.2 致死率和正突变率 每个处理 30 皿,重

复3次,以未做诱变处理的孢子悬浮液作为对照,致死率=(对照处理平板菌落-诱变处理平板菌落)/对照处理平板菌落×100%。正突变率=诱变处理后效价高于对照5%的菌株数/诱变处理后菌株总数×100%。

1.2.3.3 菌株遗传稳定性测定 将高产菌株进行斜面保存,并连续传代3次,采用摇瓶发酵法测定每一代菌株泰乐菌素效价,分析遗传稳定性。

1.2.3.4 菌株泰乐菌素抗性的检测 孢子悬液稀释后涂布于含有15000 μg/mL泰乐菌素的平板上,于29℃培养箱倒置培养18 d,检测菌株的泰乐菌素抗性。

1.2.3.5 菌株豆油抗性的检测 将孢子悬液稀释后涂布于含有4%豆油的平板上,以不含豆油的平板为对照,于29℃培养箱倒置培养18 d,检测菌株的豆油抗性。发酵液中豆油残量的测定具体参照徐红梅^[9]的方法进行。

2 结果与分析

2.1 不同诱变方法诱变影响的比较 原始菌株复壮培养后,选取编号TL-15028的菌株为原始出发菌株,分别采用UV、EMS、LiCl+UV、EMS+UV诱

变方法进行诱变处理。结果发现,采用UV诱变,随着处理时间增加,菌体致死率、正突变率显著升高,90 s的致死率最高,达到89.1%;60 s的致死率为68.3%,正突变率与90 s无显著差异,且效价最高(见表1)。采用UV处理60 s,利用琼脂柱法进行初筛,得到11株正突变株,通过发酵摇瓶法复筛后,得到2株编号为TLU-1501、TLU-1502的菌株,其效价分别为12854、12973 μg/mL。

采用EMS诱变,随着处理时间增加,菌体致死率、正突变率显著升高,5 h的致死率最高,达到93.7%;4 h的致死率为66.1%,正突变率与5 h无显著差异,且效价最高(见表1)。采用EMS处理4 h,得到1株编号为TLE-1501的优良菌株,其发酵效价为12767 μg/mL。

采用LiCl+UV复合诱变,得到23株正突变株,复筛后获得2株编号为TLLU-1501、TLLU-1502的优良菌株,其发酵效价分别为13162 L、12236 μg/mL。采用EMS+UV复合诱变,得到34株正突变株,复筛后获得3株编号为TLEU-1501、TLEU-1502、TLEU-1503的优良菌株,其发酵效价分别为13427、13873、14124 μg/mL。

表1 不同诱变方法诱变影响的比较

诱变方法	处理时间	致死率(%)	正突变率(%)	最高效价(μg/mL)
对照	--	--	--	10347
	15 s	17.4 ^d	24.3 ^c	11046
	30 s	35.3 ^c	34.7 ^b	10953
	60 s	68.3 ^b	47.4 ^a	12973
	90 s	89.1 ^a	47.6 ^a	10933
	1 h	11.6 ^e	13.3 ^d	12077
UV	2 h	19.3 ^d	17.5 ^c	11473
	3 h	28.3 ^c	28.1 ^b	12162
	4 h	66.1 ^b	46.9 ^a	12767
	5 h	93.7 ^a	47.1 ^a	11891
EMS				
LiCl+UV	(LiCl 4 h)+(UV 60 s)	79.3	50.2	13162
EMS+UV	(EMS 4 h)+(UV 60 s)	72.7	56.7	14124

注:同一诱变方法中同列数据上标字母表示差异显著(P<0.05)。

2.2 不同诱变方法所选优良菌株遗传稳定性检测 对不同诱变方法获得优良菌种进行进一步复筛,

测定其遗传稳定性,结果发现,菌株TLU-1502、TLLU-1502、TLEU-1503遗传稳定性好(见表2)。

表2 优良菌种遗传稳定性分析

菌种种类	代数及效价(μg/mL)		
	第一代	第二代	第三代
TLU-1501	12854	11541	10954
TLU-1502	12973	12672	12732
TLE-1501	12767	11495	9816
TLLU-1501	13162	11242	9151
TLLU-1502	12236	11966	12153
TLEU-1501	13427	11114	9836
TLEU-1502	13873	10735	8964
TLEU-1503	14124	13973	14104

2.3 优良菌株泰乐菌素抗性检测 将菌株 TLU-1502、TLLU-1502、TLEU-1503 的菌株孢子悬液稀释为 1×10^{-4} , 然后分别涂布于含有 15000 μg/mL 泰乐菌素的培养基平板上, 培养后, 观察菌落的生长情况, 结果发现, TLU-1502 和 TLEU-1503 菌株的生长情况好, 而 TLLU-1502 生长情况一般(见表3)。结果表明, TLLU-1502、TLEU-1503 具有较好的泰乐菌素抗性。

表3 泰乐菌素对菌株生长的影响

菌株种类	菌落生长情况
TLU-1502	++
TLLU-1502	+++
TLEU-1503	+++

注: +++表示菌落生长好, ++表示菌落生长一般。

2.4 优良菌株豆油抗性检测 将菌株 TLU-1502、TLLU-1502、TLEU-1503 的菌株孢子悬液稀释为 1×10^{-4} , 然后分别涂布于含有 4.0% 豆油的平板上, 以不含豆油的平板为对照。培养后, 观察菌落的生长情况, 结果发现, 含豆油的培养基上三株菌种的菌落比不含豆油的培养基上的菌落明显大, 且未见孢子(见表4)。结果表明, 这3个菌株均具有较好的豆油抗性。

表4 豆油对菌株生长的影响

菌株种类	培养基种类及菌落生长情况	
	含豆油的培养基	不含豆油的培养基
TLU-1502	菌落饱满无孢子	菌落饱满, 白色孢子
TLLU-1502	菌落饱满无孢子	菌落饱满, 白色孢子
TLEU-1503	菌落饱满无孢子	菌落饱满, 白色孢子

2.5 优良菌株发酵组分的分析 将菌株选育出的优良菌株 TLLU-1502、TLEU-1503 以及原始菌株 TL-15028 进行摇瓶发酵(培养液中豆油含量 40 g/L), 发酵后, 分别测定它们生产泰乐菌素 4 种主要组分的效价以及发酵液中的残油量, 结果发现, TLEU-1503 菌种生产的泰乐菌素中 A 组分明显高于对照, 而 C 组分低于对照(见表5)。TLEU-1503 发酵液中的残油量最低, 说明 TLEU-1503 对豆油的利用效率最高(见表6)。

表5 发酵液中泰乐菌素组分的比较

菌株种类	泰乐菌素组分种类及效价(μg/mL)			
	A 组分	B 组分	C 组分	D 组分
TL-15028	6142	178	3476	457
TLLU-1502	7753	491	3424	585
TLEU-1503	9344	869	2957	954

表6 发酵液中残油量的比较

菌株种类	残油量(g/L)
原始菌株	6.83
TLU-1502	5.14
TLEU-1503	4.02

3 讨论

采用 UV 和 EMS 单一诱变, 处理时间是关键, 时间过短(处理时间 30 s), 诱变的正突变率较低, 时间过长(处理时间 90 s), 致死率过高, 均不利于后期的筛选。因此, 在综合考虑致死率、正突变率、突变菌株效价的前提下, 以 60 s 作为 UV 适宜的诱变处理时间。同样, 在 EMS 诱变处理时, 也是综合考虑上述指标后, 以 4 h 作为适宜的诱变处理时间。UV 诱变的机理是使菌体内同链 DNA 形成胸腺嘧啶二聚体, 阻止碱基正常配对, 进而引起突变, 但 UV 突变易产生光修复。EMS 是一种化学诱变剂, 可使菌体内 DNA 的鸟嘌呤烷基化, 导致碱基错配, 进而引起突变。采用 UV 和 EMS 单一诱变, 对弗氏链霉菌诱变效果可能有限, 往往不及复合诱变^[2]。相比单一诱变而言, 复合诱变产生的突变更多, 正突变率更高, 其对应的表型可能更丰富, 更容易选育出符合预期的优良菌株。本文所采用的 LiCl + UV、EMS + UV 两种复合诱变方法, 其诱变效果较单一诱变更佳, 其中, EMS + UV 诱变效果最佳, 这与徐红梅等^[9]的结论一致。同时, 本文对诱

变得到优良菌株进行了泰乐菌素抗性、豆油抗性的定向筛选,使其更符合实际生产的要求。

相对出发菌株而言,TLEU-1503 的发酵组分中泰乐菌素 A 含量明显提升,C 含量有较大幅度的下降,有利于泰乐菌素品质的提升,这与甘士喜等的研究结论相符^[11]。同时,TLEU-1503 还具有较好的泰乐菌素抗性和豆油抗性,这样既可以避免发酵生产过程中不断积累的泰乐菌素的反馈抑制作用;还可以充分利用发酵液中的豆油,有助于提高生产效率。TLEU-1503 发酵组分中泰乐菌素 A 含量明显提升,C 含量大幅下降,这一现象可能是由两方面的因素造成的,首先可能是由于 TLEU-1503 生产泰乐菌素的效率增加了,其次可能是由于催化组分 C 向组分 A 转化的大菌素 C 甲基转移酶活性提高了^[9,11]。弗氏链霉菌发酵生产过程中常以豆油作为碳源,豆油在被利用时,菌体必须具备较高活性的脂肪酶,TLEU-1503 具有较高的豆油利用效率,这表明其菌体的脂肪酶活性较高^[12]。有关 TLEU-1503 菌株大菌素 C 甲基转移酶活性和脂肪酶活性变化研究还有待于进一步深入。

参考文献:

[1] Bate N, Butler AR, Smith IP, et al. The mycarose-biosynthetic

Genes of *Streptomyces fradiae* producer of tylosin[J]. Microbiology, 2000, 146(1): 139-146.

[2] 黄蔚,徐春燕,牛春,等.泰乐菌素高产菌株选育研究进展[J].生物技术通报,2013,11:34-38.

[3] 闵勇,刘晓艳,杨自文,等.泰乐菌素及其衍生物研究进展[J].知识经济,2010,1:127-128.

[4] 周锐,魏宏.兽用抗生素泰乐菌素优点[J].中国动物保健,2011,13(5):32-32.

[5] 朱振杰.高效、低毒、无残留的动物专用抗生素—泰乐菌素及其应用[J].河北畜牧兽医,2001,17(9):33-33.

[6] 孙加楼.畜禽抗菌促生长—泰乐菌素[J].饲料博览,1999,11(11):34.

[7] 葛蔚,张莉,董越春.泰乐菌素的药用性能及促生长作用[J].兽药与饲料添加剂,2000,5(4):14-15.

[8] 张明明,万丹,徐玉崇,等.泰乐菌素高产菌株的筛选[J].广州化工,2015,43(12):87-89. [9] 徐红梅,郑黎,薛娟,等.泰乐菌素高产菌株的推理选育[J].畜牧与兽医,2014,46(6):12-15.

[10] Choi DB, Tamura S, Park YS, et al. Efficient tylosin producing from streptomyls fradiade using rapeseed oil[J]. Journal of Ferment Broeng, 1996, 82(2):183-186.

[11] 甘士喜,廖锦秀,张立红,等.泰乐菌素组份转化机制的研究[J].中国兽药杂志,2000,34(3):22-24.

[12] 戚薇,王建玲,贾士儒,等.碳源对泰乐菌素产量的影响[J].药物生物技术,1999,6(1):41-44.

(编辑:陈希)