

玉米赤霉烯酮生物合成条件的研究

王滨* 张麓 李季伦

提要:从自然界中分离得到的玉米赤霉菌 *G.zeae* BAU-_{z8} 菌株只具有在固体培养基中合成玉米赤霉烯酮的能力。经过亚硝基胍和紫外线对BAU-_{z8} 的诱变处理后,再经筛选和分离纯化,得到了具有在液体常温条件下生成玉米赤霉烯酮的突变株 D₄₋₂₁, 并对其生成玉米赤霉烯酮的条件进行了研究。试验表明:培养基的碳源、氮源种类;碳、氮、磷的浓度及C/N值;初始pH值、培养温度、通气量等因素都对玉米赤霉烯酮产量有很大影响。通过试验,确定了摇瓶发酵培养基成份的最佳组合以及最适的培养条件为:葡萄糖18%、尿素0.27%、K₂HPO₄ 0.05%、酵母膏0.10%、MgSO₄ 0.25%、KCl 0.025%、pH5.4—5.5(自然)、装量:120ml/500ml摇瓶、温度:21—24℃,经摇床震荡培养2周,产量可达2—2.2g/l。

玉米赤霉烯酮(Zearalenone)是玉米赤霉菌 [*Gibberella zeae*, 其无性世代为禾谷玫瑰镰刀菌 (*Fusarium roseum* 'graminearum')] 的一种代谢产物,此物质具有动物雌性激素作用,低剂量处理肉用牛、羊可显著地促进增重和提高饲料转化率而无任何可觉察的副作用。目前,世界上有20多个国家都在大规模地进行试验,美国商业溶剂公司已开始大量生产玉米赤霉醇(玉米赤霉烯酮的还原产物,其生物学效应约为烯酮的8倍)。作为肉用牛、羊的生长促进剂,商品名称为Ralgro^[1]。

我校自1973年开始进行玉米赤霉烯酮的研究^[2],从北京郊区分离出玉米赤霉菌 *G.zeae* BAU-_{z8} 菌株,此菌株经过用大米培养基常温培养2周;低温培养2周;再转常温培养2周后,每公斤培养物可产生约1.4克的玉米赤霉烯酮。但是,固体发酵生产玉米赤霉烯酮不仅生产周期长、色素生成多、提取纯化困难,而且还需经过低温阶段,不利于工业生产。因此,选育能在液体培养基中于常温下生产玉米赤霉烯酮的菌株,并研究其生物合成的条件,是实现玉米赤霉烯酮工业生产的前提。

材 料 与 方 法

菌种:

- (1) *G.zeae* BAU-_{z8} (北京农业大学微生物专业提供)
- (2) *G.zeae* D₄₋₂₁ (本研究所得突变株)

培养基: (%)

淀粉—谷氨酸—酵母膏培养基:可溶性淀粉 2 g, L—谷氨酸 1 g, 酵母膏 0.1 g,

* 现在北京轻工业学院工作。

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1.9 g, 柠檬酸钠 $\cdot 2H_2O$ 1.21 g, pH5.6, 灭菌: 10磅30分钟

(2) 蔡氏 (Czapek) 培养基 (菌种活化用)。

(3) 酵母膏蔡氏培养基 (诱变菌种用): 蔡氏培养基 + 1% 的酵母膏。

(4) 摇瓶发酵培养基 (菌种筛选用): 葡萄糖 ($C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$) 20 g, 尿素 0.4 g, 酵母膏 0.1 g, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.05 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.025 g, KCl 0.025 g, pH 自然, 灭菌: 10磅30分钟。

诱变处理与分离纯化:

(1) NTG诱变: 将BAU₋₂₈菌丝悬液于带玻璃珠的三角瓶中上摇床打碎菌丝, 取一定量的碎菌丝液于蔡氏培养液中于常温摇瓶培养12小时, 得到幼嫩的菌丝片段, 离心后菌体用0.2M、pH 6 的磷酸缓冲液悬浮, 菌悬液用0.5mg/ml、1.0mg/ml的NTG于25℃恒温处理, 于30'、60'、90'取样稀释后接种至平板培养, 挑取有形态差异的菌落转至斜面, 然后进行摇瓶培养试验。

(2) UV诱变: 经NTG诱变过的突变株点种在平板上培养2天, 用紫外灯(20W、30cm)照射20分钟, 培养2天后切取异常菌丝尖端转管并以石蜡油封藏。平板继续用此法处理。得到的诱变株进行摇瓶培养试验。

(3) 分离纯化: 从突变株斜面的两处不同部位挑取少量菌丝点种在平板上, 培养2天后切取菌丝尖端, 每个菌落切两份, 每支突变株分出4支分离株, 上摇床进行复筛。

培养条件:

(1) 培养温度: 常温21—24℃; 低温4—10℃。

(2) 摇瓶发酵: 菌株经活化培养1周, 加无菌水刮下菌丝制成悬液, 以5%的接种量接入发酵液中。除BAU₋₂₈与D₄₋₂₁液体摇瓶发酵特性对比试验和温度影响试验采用山东大学出产的摇瓶机(180转/分钟; 偏心距21mm); 摇瓶容积300ml, 装量60ml外, 其它试验均采用华北制药厂出产的摇床(100转/分钟, 偏心距25mm); 摇瓶容积500ml, 装量见结果项, 常温振荡培养2周。各种处理重复三次, 结果取其平均值。

玉米赤霉烯酮的提取与测定:

发酵液抽滤后, 用雷磁—25—型酸度计测pH值, 菌体用蒸馏水稍加洗涤抽滤后加乙酸乙酯进行浸提。发酵液大约为120ml, 调至pH 3, 用300ml乙酸乙酯分三次抽提。(玉米赤霉烯酮产量的4/5存在于菌丝体中。)合并乙酸乙酯提取液, 加无水硫酸钠脱水, 用旋转蒸发器减压浓缩。浓缩液用硅胶G薄层层析分离, 推动剂为石油醚(60—90℃)和乙酸乙酯(60:40V/V), 同时以标准品作为对照。玉米赤霉烯酮硅胶薄层层析的R_f值一般为0.5, 用波长254nm的紫外分析仪检测呈现亮蓝绿色荧光斑点。将荧光斑点刮下, 用无水乙醇溶洗3次, 离心去硅胶, 用751G分光光度计于274nm测吸收值。玉米赤霉烯酮在3—10μg间, 其光密度与含量成直线关系。

测糖: 采用蒽酮法。

以上所采用的试剂除无水硫酸钠为化学纯和提取玉米赤霉烯酮时用工业乙酸乙酯外, 其余均为分析纯。

结 果 与 分 析

一、BAU-₂₈菌株液体发酵特性:

试验采用Bacon^[3]的淀粉—谷氨酸—酵母膏培养基,以不同的培养条件来处理,考察BAU-₂₈是否能经液体培养生成玉米赤霉烯酮。结果(表1)表明:BAU-₂₈不具有液体发酵生成玉米赤霉烯酮的能力。

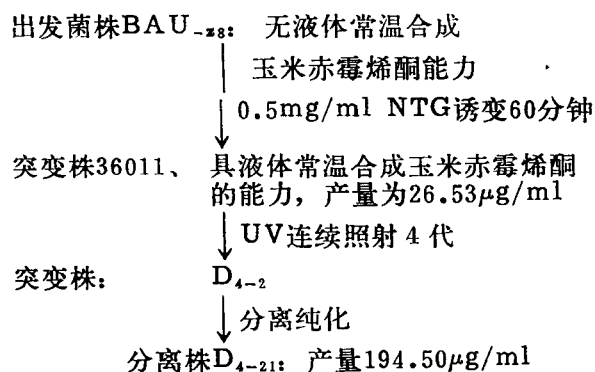
表1 BAU-₂₈液体发酵特性*

处理号	常温 摇床 天数	常温 静止 天数	低温 静止 天数	低温后转 常温摇床 天数	低温后转 常温静止 天数	装量 (ml)	玉米赤霉烯酮 ($\mu\text{g/ml}$)
1	3	11				25	0
2	3	11				30	0
3	3	11				40	0
4	3	7	10		7	25	0
5	7		7	7		25	0
6	14					25	0

* 常温: 24—25℃ 低温: 4—8℃

二、液体常温合成玉米赤霉烯酮菌株的诱变选育

由于BAU-₂₈菌株很难生成孢子,因此采用亚硝基胍处理BAU-₂₈菌丝片段,初步得到具有液体常温合成玉米赤霉烯酮能力的突变株36011号,但产量较低。再用紫外线对突变株36011号连续照射处理,得到D₄₋₂等几支突变株。经分离纯化后,除D₄₋₂菌株外,都出现有丧失液体常温合成玉米赤霉烯酮能力的分离株。而D₄₋₂经分离纯化得到的4支分离株,不仅都具有液体常温合成玉米赤霉烯酮的能力,而且产量基本相同并高于其他分离株,证明D₄₋₂为较纯的突变株,故选其产量最高的分离株D₄₋₂₁进行玉米赤霉烯酮生物合成条件的研究。D₄₋₂₁的诱变谱系如下:



突变株D₄₋₂₁与原始株BAU-₂₈液体常温摇瓶发酵特性比较结果见表2。另外, D₄₋₂₁菌株生成色素的能力比BAU-₂₈少得多,有利于玉米赤霉烯酮的提取和纯化。

表2 D₄₋₂₁与BAU₋₂₈液体摇瓶发酵特性比较

菌 株	测 定 项 目	常温摇床 ^a	经过低温摇床阶段 ^b	
			I	II
BAU ₋₂₈	pH值	3.50	3.90	3.30
	菌丝干重 (mg/ml)	27.51	28.87	32.00
	玉米赤霉烯酮 (μg/ml)	0	0	0
D ₄₋₂₁	pH值	3.50	3.80	3.45
	菌丝干重 (mg/ml)	20.01	22.70	27.11
	玉米赤霉烯酮 (μg/ml)	205.30	184.32	250.42

a. 常温二周 b. 常温5天低温5天, 转常温I为3天, II为5天。

玉米霉烯酮生物合成的条件

(一) 不同碳源的影响

试验所用的碳源物质, 除淀粉和Tween80按8%、乙酸钠按12.4%加入外, 其余均按20%葡萄糖的含碳量折算加入。各种糖类和乙酸钠均单独灭菌后加入到培养基中。结果(表3)表明: 只有葡萄糖是合成玉米赤霉烯酮的最适碳源。

表3 不同碳源对玉米赤霉烯酮产量的影响

碳 源 种 类	最终pH价	菌丝干重 (mg/ml)	玉米赤霉烯酮(μg/ml)
葡 萄 糖	3.58	22.32	212.41
果 糖	4.00	24.20	12.54
L-(+)-阿拉伯糖	6.30	23.24	0
蔗 糖	4.40	19.09	0
麦 芽 糖	5.20	45.34	8.50
乳糖+葡萄糖	6.20	21.69	62.30
淀 粉	9.10	21.68	0
Tween 80	9.00	5.290	0
乙 酸 钠	10.50	5.291	0

* 培养基其他成份均与摇床发酵培养基相同。

(二) 不同氮源的影响

由于尿素与培养基其它成份一起高压灭菌时会分解成氨挥发, 从而使培养基含氮量降低。因此对尿素采用冷法灭菌(细菌过滤器灭菌)再加入培养基中, 浓度为0.30%, 其他氮源物质均按此浓度的尿素含氮量折算加入。结果(表4)表明: 尿素和醋酸铵为最适氮源, 两者的产量基本相同。考虑到醋酸铵易吸水潮解, 不利于工业化生产, 故选用尿素, 并在以后的试验中, 尿素一律采用冷法灭菌。

值得注意的是, 当醋酸铵与培养基其它成份一起灭菌时, 表现有毒性, 菌株毫无生长。而当分开单独灭菌时, 却能较好地生长并合成较高产量的玉米赤霉烯酮。以硫酸铵为氮源,

成摇床停机数小时从而使通气量减低时，产量大大提高。通气量对产量的影响将在后面予以详细分析。

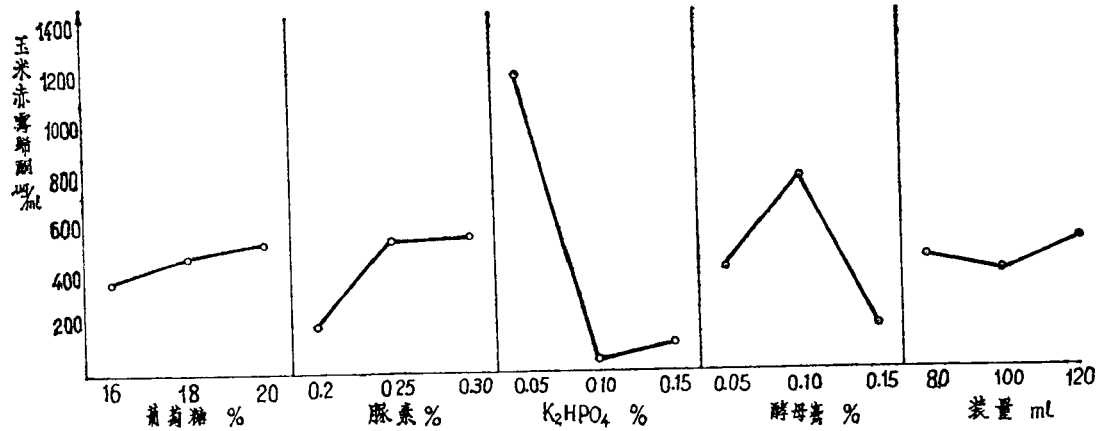
试验证明，玉米赤霉烯酮的合成不仅需要培养基中适合的C/N值，而且初始糖浓度必须有较高的水平。尽管存在有高糖的抑制效应，但同在最适C/N值时，低糖浓度例如将糖的浓度降低50%，则很难生成玉米赤霉烯酮。这一结果与美国商业溶剂公司的结果一致^[1]。

（四）培养基主要成份的最佳组合

以影响产量的5个主要因子、3个水平（表6），采用 $L_{18}(3)^7$ 正交表进行试验，结果见表7。根据结果作出产量与各因子关系图（图一）。从图中可看出各因素对产量都有很大影响，其中以磷酸盐最为明显，过量的磷酸盐强烈地抑制玉米赤霉烯酮的合成。通过综合分析，选出培养基的最佳组合为：葡萄糖18%，尿素0.27%， K_2HPO_4 0.05%，酵母膏0.1%，装量120ml/500ml摇瓶。

表6 正交试验的因素和水平

因 素 水 平	葡萄糖	尿 素	K_2HPO_4	酵母膏（%）	装量（ml）
1	16	0.20	0.05	0.05	80
2	18	0.25	0.10	0.10	100
3	20	0.30	0.15	0.15	120



图一 不同水平的葡萄糖、尿素、 K_2HPO_4 、酵母膏及装量与玉米赤霉烯酮产量的关系

（五）pH值的影响

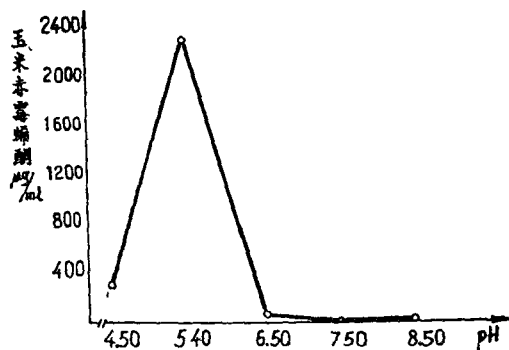
试验以无菌的HCl和NaOH溶液将灭菌后的培养基调至不同的pH值进行摇瓶发酵。结果（图二）表明以pH5.4（自然）为最适。因此培养基不必调pH。发酵后期，发酵液pH下降至3.5左右，曾试用在培养基中添加 $CaCO_3$ 来中和所生成的酸，结果完全抑制了玉米赤霉烯酮的合成。

（六）培养温度的影响

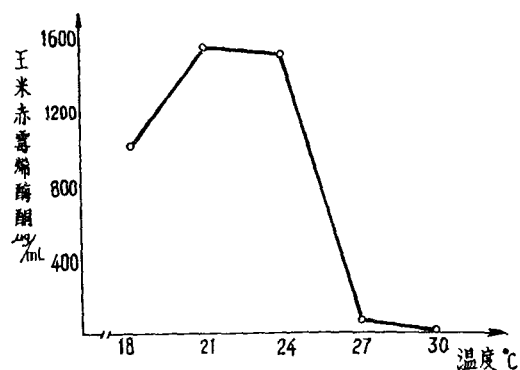
试验结果（图三）表明最适温度范围在21—24℃。低于或高于这一温度范围，都不利于玉米赤霉烯酮的合成。

表 7 正交试验结果*

因子 试验号	葡萄糖 (%)	尿 素 (%)	K_2HPO_4 (%)	酵 母 膏 (%)	装 量 (ml)	玉米赤霉烯酮 ($\mu\text{g/ml}$)
1	16	0.20	0.05	0.05	30	1170.88
2	16	0.25	0.10	0.10	100	100.00
3	16	0.30	0.15	0.15	120	83.30
4	18	0.20	0.10	0.15	120	0
5	18	0.25	0.15	0.05	80	171.88
6	18	0.30	0.05	0.10	100	2125.00
7	20	0.20	0.15	0.10	120	0
8	20	0.25	0.05	0.15	80	937.50
9	20	0.30	0.10	0.05	100	125.00
10	16	0.20	0.10	0.10	80	0
11	16	0.25	0.15	0.15	100	0
12	16	0.30	0.05	0.05	120	968.75
13	18	0.20	0.05	0.15	100	0
14	18	0.25	0.10	0.05	120	36.50
15	18	0.30	0.15	0.10	80	437.50
16	20	0.20	0.15	0.05	100	0
17	20	0.25	0.05	0.10	120	1980.40
18	20	0.30	0.10	0.15	80	0
K_1	2322.96	1170.9	7182.54	2473.02	2717.76	
K_2	2770.30	3226.2	261.48	4642.92	2350.02	
K_3	3042.90	3302.04	692.40	1020	3068.58	
$\bar{K}_1$	387.16	195.15	1197.09	412.17	452.96	
$\bar{K}_2$	461.80	537.70	43.58	773.82	391.67	
$\bar{K}_3$	507.15	550.34	115.40	170.00	511.43	
R	119.99	355.19	1153.51	603.82	119.76	

* K_1 、 K_2 、 K_3 分别为各因素的水平1、2、3的产量总和, $\bar{K}_1$ 、 $\bar{K}_2$ 、 $\bar{K}_3$ 分别为 K_1 、 K_2 、 K_3 的平均数。 $R = K_{\max} - K_{\min}$ 

图二 培养液初始pH值对玉米赤霉烯酮合成的影响



图三 培养温度对玉米赤霉烯酮合成的影响

(七) 累代培养的影响

原始株BAU-28在察氏培养上经过几次传代就会丧失合成玉米赤霉烯酮的能力^[2]，国外文献也有类似的报道^[3]。而突变株D₄₋₂₁在察氏培养基上连传5代后，摇瓶发酵结果(表8)表明：D₄₋₂₁合成玉米赤霉烯酮的性状稳定，连传5代，产量基本不受影响。

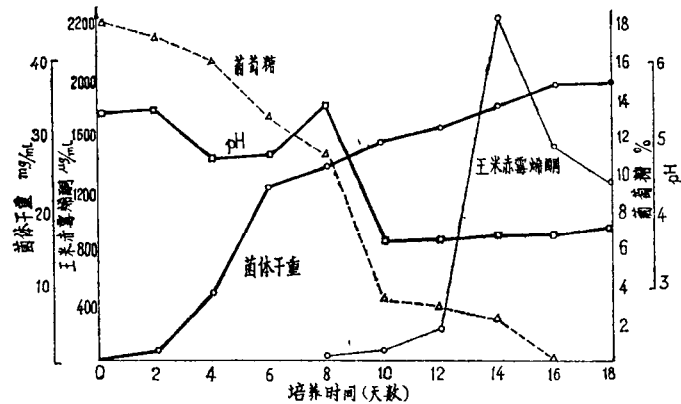
表8 累代培养对D₄₋₂₁菌株合成玉米赤霉烯酮的影响

培养代数	最终pH 值	菌体干重 (mg/ml)	玉米赤霉烯酮 (μ g/ml)
第1代	3.45	33.05	2153.20
第2代	3.40	32.89	2125.00
第3代	3.30	31.84	1952.50
第4代	3.30	30.85	2073.20
第5代	3.30	30.11	2102.50

培养基为正交试验选出的最佳组合培养基 装量:120ml

(八) 发酵全过程中的变化

从结果(图四)可看出，菌体生长和玉米赤霉烯酮的合成明显地分成两个生理阶段；菌



图四 玉米赤霉烯酮 D₄₋₂₁发酵过程中pH、糖耗、菌体干重、玉米赤霉烯酮产量变化的时间进程(装量120ml)

体从第8天开始合成玉米赤霉烯酮，但合成速率很低，从第12天至第14天合成速率猛增。通过观察菌丝体的形态变化，发现在发酵过程中，伴随着一个脂肪逐渐积累以后又分解的过程。菌丝体从第8天可观察到有脂肪球累积，以后逐渐增多，到第12天达到高峰，菌丝体内充满了成串的脂肪球，以后转向分解。而此时恰恰是玉米赤霉烯酮大量合成时期。

另外，通气量对玉米赤霉烯酮合成的影响很大。发酵前期通气量不宜过高，但由生长阶段向玉米赤霉烯酮合成阶段的转变时期，却要有足够的氧存在，否则将会完全抑制玉米赤霉烯酮的合成。例如在以100ml装量的摇瓶发酵中，如果摇床第10天停机数小时，摇瓶发酵的产量为0。从摇瓶装量上分析，120ml要比100ml的结果好得多，前者不仅耗糖快，而且菌体累积脂肪和生成玉米赤霉烯酮的时间也早，使发酵周期缩短，产量提高。而后者可能是由于通气量高、氧供应充足，在菌体细胞内产生巴斯德效应，降低了糖耗速度，使脂肪的累积和玉米赤霉烯酮的合成被推迟，引起发酵周期的延长及产量的下降。

讨 论

通过试验,初步观察到脂肪代谢可能与玉米赤霉烯酮的合成代谢有关。关于玉米赤霉烯酮生物合成的途径问题,Steele^[4]等曾发现〔1—¹⁴C〕乙酸和〔2—¹⁴C〕二乙基丙二酸很容易结合进入到玉米赤霉烯酮中,¹⁴CO₂也能结合进去但比较慢。他们认为玉米赤霉烯酮是经由多酮(Polyketide)途径从乙酸和丙二酰CoA衍生出来的。根据这一结果和我们所观察到的一些现象,可推测:合成玉米赤霉烯酮所用的菌体物质和脂肪酸合成所用的前体物质都是由乙酰CoA衍生而来,通过乙酰CoA将这两种代谢联系起来。在发酵过程中,乙酰CoA首先被用于合成脂肪酸。在后期,脂肪开始分解,为玉米赤霉烯酮的合成提供了大量的底物和能源,使产量急剧上升。如能证实这一推测,在今后的诱变育种工作中可通过以下两个方面,进行代谢调节控制:第一,选育出玉米赤霉烯酮生物合成脱阻抑的菌株,使玉米赤霉烯酮在发酵前期就开始合成。第二,选育玉米赤霉烯酮合成酶活力高而脂肪酸合成部分受阻的菌株,使乙酰CoA主要被用来合成玉米赤霉烯酮,而只有少量被用于合成脂肪酸。这样,就有可能选育出产量高,周期短的优良菌株。

参 考 文 献

1. Hidy, P. H., R.S. Baldwin, R.L. Greasham, C.L. Keith and J.R. McMullen 1977, Zearalenone and some derivatives: Production and biological activities *Adv. Microbial.* 22:59—82
2. 李季伦、朱彤霞、张箴、李宝仁、邓泽沛、李永生、孟繁静, 1980 玉米赤霉烯酮的研究, 北京农业大学学报第1期: 13—18
3. Bacon, C.W., J.D. Robbins, and J.K. Porter, 1977 Media for identification of *Gibberella Zeae* and production of F—2 (Zearalenone) *Appl. Environ. Microbial* 33:445—449
4. Steele, J.A., J.R. Lieberman, and C.J. Mirocha 1974, Biogenesis of Zearalenone (F-2) by *Fusarium roseum Graminearum*. *Can. J. Microbiol.* Vol.20:531—534

PRODUCTION OF ZEARALENONE BY *GIBBERELLA* ZEAE MUTANT D₄₋₂₁ IN LIQUID MEDIA

Wang Bin Zhang Chi Li Jilun

Department of Plant Protection and Microbiology,
Beijing Agricultural University

Abstract

A mutant of *Gibberella zeae* BAU₋₂₈ was obtained through the treatment with NTG and UV light. BAU₋₂₈ was isolated from corn grown in the suburb fields of Beijing by Li et al(2), which produced zearalenone only in solid media. The mutant D₄₋₂₁, however, can produce zearalenone in liquid media under room temperature.

The effects of the concentration of C.N.P. and C/N ratio, the initial pH value of the medium, the temperature and aeration on production of zearalenone were tested. It was found that the best yield of zearalenone produced by D₄₋₂₁ is 2-2.2g/l in a medium containing 18% glucose, 0.27% urea, 0.05% K₂HPO₄, 0.1% yeast extract, 0.025% MgSO₄ and 0.025% KCl. The manipulation is to fill a 500 ml volume flask with 120ml of the medium and shake it on a rotatory shaker at 21—24℃ for 2 weeks.

一种新的植物生长调节剂BA—984研制成功

我校农药研究室的科研人员最近研制成功一种新的植物生长调节剂, 目前正在进行药效测定。这种新的植物生长调节剂对水稻、果树和多种花卉具有抗倒伏、缩短节间生长等多种生长调节作用, 可望在我国农村、城市广泛推广。

(李增民)