

发 明 記 录

(机密文件)

总 号:
分类号:
档案号:

赤霉素的生物合成和应用

发 明 者: 北京农业大学

俞大紱、李季倫、王富順、罗国光、李玉湘、吳 亭等

发明完成日期: 1963年12月

审 查 单 位:

本发明技术內容的密級: 机 密

一、列为发明的理由

赤霉素是一种高效能的植物生长刺激素。它不仅是近代植物生理科学中一个重要的研究对象, 而且在某些作物上(如葡萄等)已成为一项重要的增产措施。

赤霉素是日本人发现的, 1938年薮田和柱木首先从为害水稻的一种病原真菌(以下称赤霉菌)的培养液中, 提煉出来了赤霉素的结晶。但在当时并未被人注意。1955年, 英国和美国同时试制成功。1958年在苏联, 1960年在捷克也进行了试制。目前, 日本、英国、美国和苏联都有生产, 并采取了技术保密的措施。

北京农业大学于1958年8月试制成功。其后在赤霉菌的选育, 赤霉素的生物合成, 应用和作用机制等方面进行了比较广泛的研究。建立了中间试验车间, 生产了少量赤霉素供应各地研究工作的需要。五年来, 此项研究获得了以下的成果:

1.选育出了优良的赤霉菌系。其赤霉素的产量和中国医学科学院抗菌素研究所1959年自国外引进的“苏白”菌种的赤霉素产量相等，有的菌系已超过了“苏白”菌种。

2.找出了适合赤霉素生物合成的发酵培养基。此培养基的特点是：成本低、原料易得，而且发酵周期短。用“苏白”菌种，在200公升发酵罐中以此培养基进行深层发酵，于125小时内，每公升发酵液中赤霉素的最高含量可达到1,640毫克（荧光定量分析）。这一产量已远超过了国内外已发表的最高纪录水平。

下面是和国内外有代表性的资料所进行的比较：

表1. 各国赤霉素单位产量的比较*

地 点	北京农业大学		上海农 药 厂	美国Cyanamid公司		英国专刊	日 本		捷 克
年分	1960	1963	1961	1959*		1957*	1953*		1961
每公升 中赤霉 素的含 量 mg/l.	1350	1640	800	880	650(罐) 780 (摇瓶)	544	37	8	400—500
所用培 养基的 主要成 分	蔗糖8% 麸皮3% 硫酸0.1%	蔗糖5% 麸皮5% 硫酸0.1%	蔗糖8% 棉子餅1.5% 硫酸0.1%	甘油20% 葡萄糖10% 乳糖20% 玉米浆25%	甘油30% 淀粉30% 玉米浆25%	葡萄糖20% 硫酸0.24%	未报 导	未报 导	蔗糖8% 花生并粉1% (NH ₄) ₂ HPO ₄ 0.4%
发酵 条件	200公升 发酵罐	200公升 发酵罐	300公升 发酵罐	250毫升 摇瓶	200公升 发酵罐 250毫升 摇瓶	30公升 发酵罐	静止 培养	250 公升 发酵 罐	摇瓶
发酵 时间	180小时	125小时	8 天	7 天	7 天	618小时	—	—	8—10天

*.此后未见发表数字 +.未见到苏联有关赤霉素单位产量数字的报导

3.阐明了赤霉菌的脂肪代谢与赤霉素生物合成之间的关系。在理论上以及在指导赤霉素生产的实践中具有一定意义。

4.简化了提炼方法，能比较容易地获得赤霉酸的纯结晶，收得率可达70%，经化学和生物方法鉴定与英国卜内门公司1958年的样品相同。但这一方法所用有机溶剂的量，成本高，尚有待改进。

5.五年的试验结果，已经肯定了赤霉素应用在十几种蔬菜和葡萄上的增产效果很显著，并研究出使用赤霉素的恰当时期和方法。应用赤霉素打破马铃薯块茎的休眠，进行二季栽培在北京地区已获得了初步成果，为解决马铃薯退化和当地留种问题提供了可能性。

6.研究了赤霉素刺激植物种苗萌发和生长的作用机制，阐明了赤霉素对某些酶系活性的

影响。

通过上述研究的结果，为我国赤霉素的生产和实际应用打下了比较巩固的基础。

二、研究发明的详细内容

1. 选育出了产生赤霉素的菌种

(1) 自我国八个省市的水稻恶苗病株中，分离出700多个菌株，初步筛选出14个产生赤霉素能力较强的菌系。但产生赤霉素的量不够稳定。

用其中一个菌系“124”，用紫外光连续照射生长菌落的方法，经12次照射后，选出了“30—10”突变系。其赤霉素的产量比原始的“124”菌系要高2倍多，而且稳定。
在合成培养基中比较了“124”，“30—10”，“苏白”三个菌系的赤霉素产量的结果，证明新选育出的变种的赤霉素产量较高。其结果如表2。

表2 “124”，“30—10”，和苏白三个菌系合成赤霉素能力的比较

赤霉素* r/ml 菌系 \ 时 间	3 天	5 天	7 天
“124”	33	198	192
“30—10”	211	456	369
“苏白”	202	437	359

* 荧光分析。

(2) 1963年又自北京西苑水稻恶苗病株分离一野生菌系。其赤霉素的产量不高，(平均250r/ml左右)且不稳定。经单孢分离，培养成为358个菌系。分析这些菌系的特性发现它们至少代表三种不同的类型。其中“P”型355菌系的赤霉素产量已超过从苏联引进的“苏白”菌种。

由以上研究说明，该野生型是异核体，至少含有三种不同遗传特性的核，容易发生分离，因此使得各种性状不稳定，经用单孢(孢子是单核的)分离的方法，分出同核体的菌系后便出现了上述三种不同类型的菌系，其菌落形态和产生赤霉素的能力均不相同，但性状比较稳定。其中P型菌系合成赤霉素的能力都强，而且又有孢子，这就为利用紫外光诱发出更高产的突变菌系提供了好材料。

2. 赤霉素的生物合成

(1) 发酵培养基和发酵条件。

1961年之前，曾先后筛选过大量的培养基，在此基础上设计了高产的麸皮糖发酵培养基(成分：麸皮3%，蔗糖8%， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%， KH_2PO_4 0.2%， MgCO_3 0.2%，硼酸0.005%， pH 4.5—5)，并研究了它的发酵条件。用“苏白”菌株，以此培养基，在200公升发酵罐中进行深层发酵，于180小时发酵液中赤霉素的含量可达1,350r/ml。其发酵条件：

200公升搪瓷发酵罐，直径比高1:1.5，内无挡板，桨式搅拌。投料 100 公升。罐压保持0.5公斤，罐温26—28℃，通气量0.5:1 (V/V)，搅拌速度220r.p.m。“苏白”菌种，种子培养基为洛林—塔姆合成培养基，种子年龄，旋转式摇床 (160r.p.m) 26℃培养 3 天，接种量 2 %，加0.1%花生油作为消沫剂，一次加入与培养基一同高压灭菌 (15磅，40分钟)。

发酵过程中，发酵液中残糖量，pH值和赤霉素的含量变化见图 1。

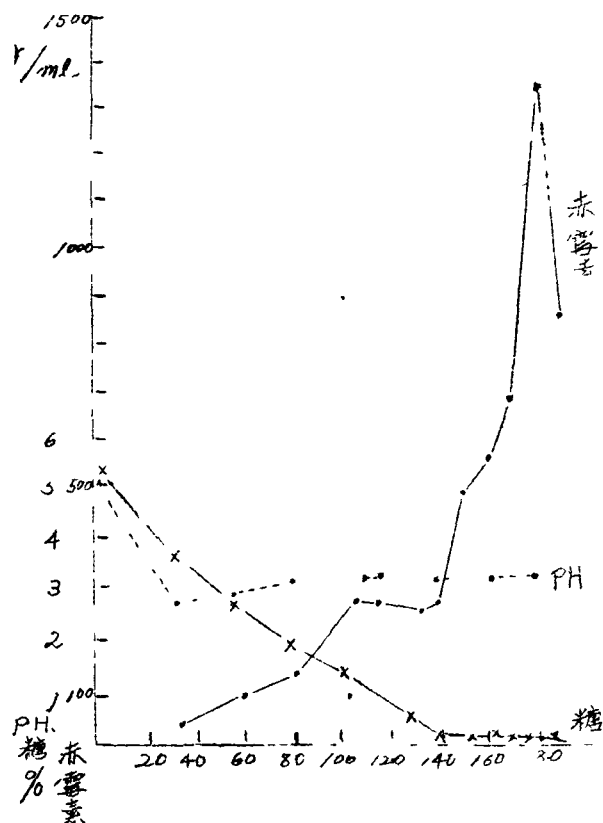


图1 糖8%，麸皮3%培养基发酵期间的生化变化(1960)。

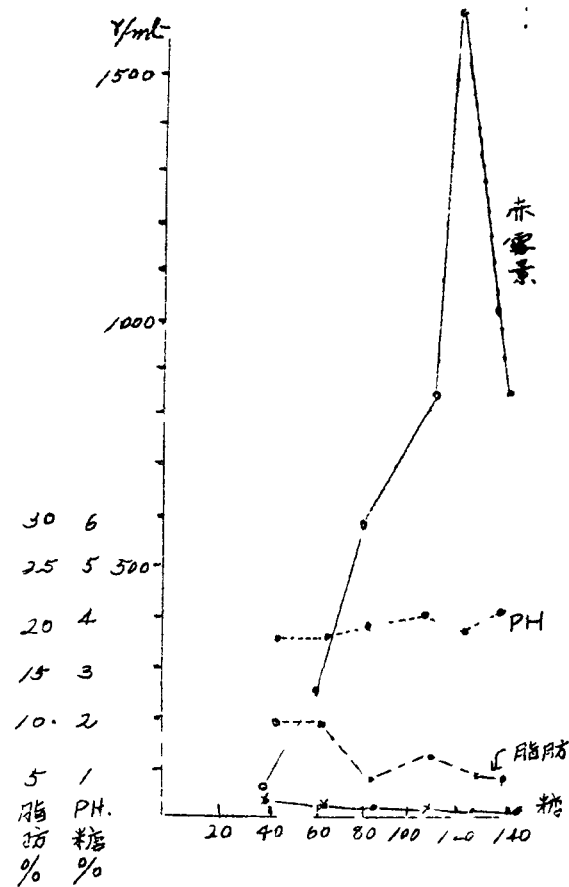
1961年后，在原设计的发酵培养基的基础上，改变糖与麸皮的用量（其他成份不变）组成了七种配方的培养基，经摇瓶对比试验，结果以糖5%—麸皮5%的配方更有利于赤霉素的生物合成。发酵8天时，赤霉素的含量可达1050r/ml，而原有培养基（糖8%—麸皮3%）中此时赤霉素的含量仅为694r/ml。

改进后的培养基，经200公升发酵罐进行中间生产试验，于125小时内，发酵液中赤霉素的最高含量可达1,640r/ml，而用原有的培养基在208小时发酵液中赤霉素的最高含量始达1,410r/ml。不但发酵周期缩短了三天的多，而且赤霉素的含量有所增加，同时糖的用量也减少了约40%达到了提高产量和降低成本的目的。

其发酵条件，除种子培养基由洛林—塔姆培养基改为麸皮（10%）浸液加5%蔗糖之

外，其他条件都和1960年试验相同。

用改进后的培养基（糖5%，麸皮5%）所进行深层发酵过程中的生化变化见图2，表4中Ⅱ。



表Ⅱ、糖5% 麸皮5% 培养基
发酵期间生化变化(1962)

(2) 赤霉菌的脂肪代谢与赤霉素生物合成之间的相互关系。

1960年，在以糖8%，麸皮3%的培养基进行深层发酵时，曾用Sudan Ⅲ染色的方法，观察到菌体内脂肪颗粒的积累和分解与发酵液中赤霉素含量的变化密切相关：在发酵前期（图Ⅰ中140小时之前）菌体内脂肪颗粒逐渐积累变大，此时赤霉素的含量上升缓慢。此后，脂肪又开始逐渐消失，而赤霉素的含量却迅速上升，此时发酵液中残糖量的变化已很小。当菌体变空时，赤霉素的含量又急剧下降（见图Ⅰ）。为了进一步验证菌体内脂肪代谢与赤霉素生物合成之间的这种关系，在1962年着重分析了在不同情况下，发酵过程中菌体内脂肪含量，发酵液中赤霉素含量，残糖量和pH值的变化，结果见表4，图2、图3和图4。

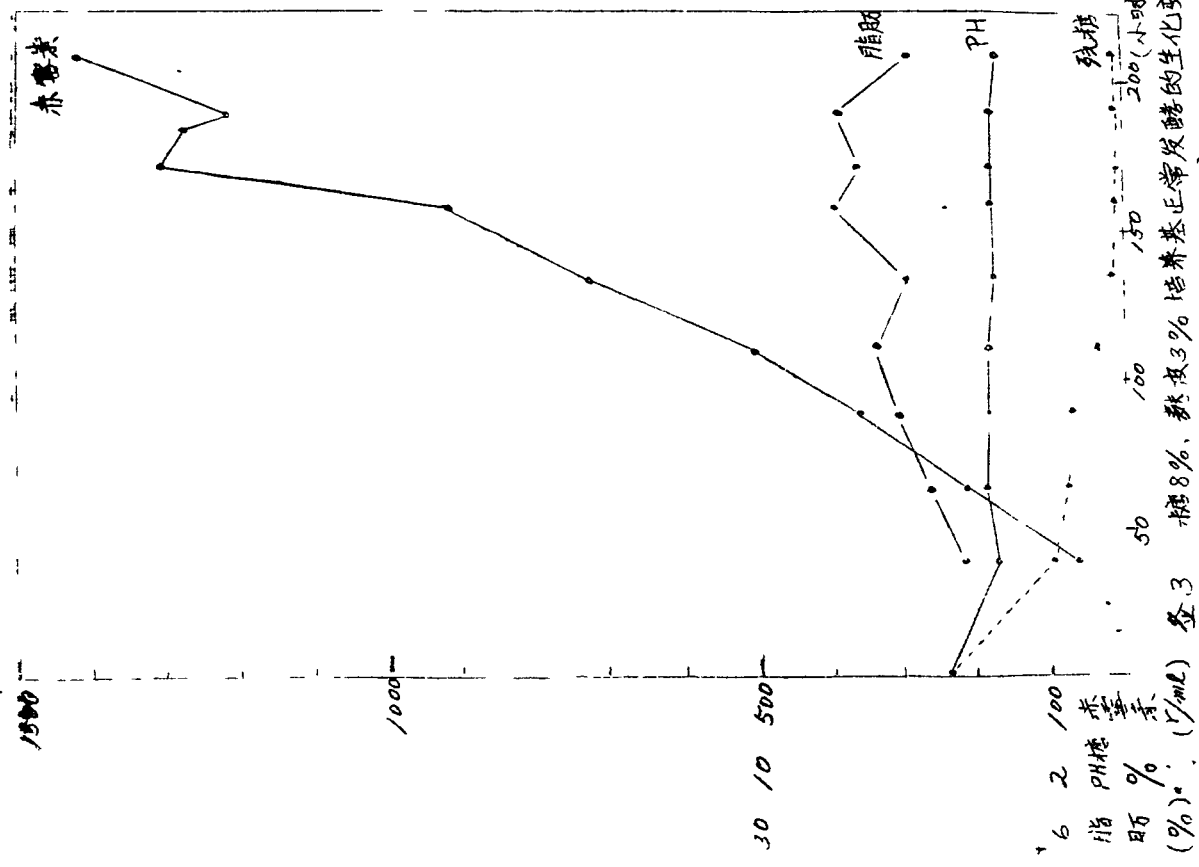


图3 糖8%、麸皮3%培养基正常发酵的生化变化。

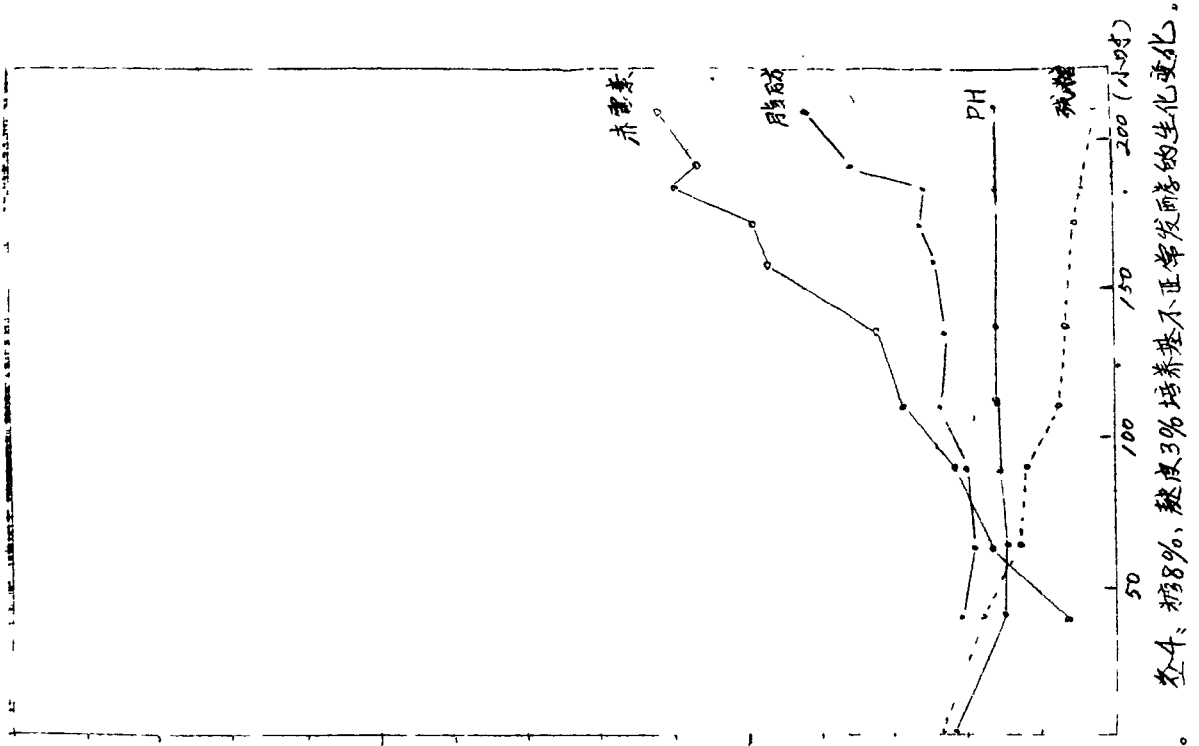


图4 糖8%、麸皮3%培养基不正常发酵的生化变化。

表4 不同情况下赤霉素发酵过程中的生化分析

发酵时间 (小时) 情况		40	64	88	112	125	136	160	173	184	191	208
项目												
干菌絲内 脂肪含量 %	I—1*	13.24	15.09	18.44	20.50	—	14.15	23.39	22.52	—	23.06	17.55
	I—2*	12.64	11.71	12.59	15.24	—	14.28	15.66	18.97	18.00	24.57	26.71
	II	9.79	9.71	4.08	5.64	4.97	4.84					
发酵液中 赤霉素含 量 r/ml	I—1	71	215	357	500	—	720	912	1300	1268	1206	1410
	I—2	60	160	216	280	—	320	470	490	600	570	620
	II	65	260	590	840	1640	840**					
残糖量 %	I—1	2.08	1.65	1.54	0.62	—	0.30	0.24	0.17	0.16	0.14	0.14
	II—2	3.63	2.93	2.31	1.56	—	1.38	1.10	1.03	0.81	0.74	0.51
	II	0.28	0.20	0.11	0.09	0.05	0.048					
PH	I—1	3.50	3.70	3.62	3.65	—	3.50	3.60	3.50	3.70	3.55	3.40
	II—2	3.10	2.90	3.00	3.00	—	3.20	3.20	3.20	3.10	3.10	3.15
	II	3.60	3.60	3.85	3.95	3.65	3.95					

* I—1 代表糖8%—麸皮3%，培养基(C/N=43:1)正常发酵情况。

I—2 代表同一培养基由于原始pH低而引起的不正常发酵的情况。

II 代表糖5%—麸皮5%培养基(C/N=23:1)正常发酵的情况。

** 此时菌体已自溶。

由表4中可以看出：(1)在I—2(图4)的整个发酵过程中pH均较低，菌体脂肪的合成与赤霉素的合成速度以及糖的利用率均缓慢，而且菌体内脂肪一直不分解，208小时时高达26.71%，但赤霉素含量却低，仅620r/ml。

(2)在I—1中(图3)，脂肪的合成量不如I—2的高，而糖的利用速度则较I—2为快。脂肪合成于160小时停止并开始分解，此时赤霉素的合成量更迅速增加，在160—173小时之间菌体内脂肪含量由23.39%下降到22.52%，发酵液中赤霉素含量由912r/ml增加到1300r/ml，而残糖量仅降低0.07%，208小时菌体脂肪含量下降为17.55%，发酵液中赤霉素含量上升为1410r/ml。

(3)在II中(图2)，菌体内脂肪的合成在40小时之前即停止，而且总含量也较低，40小时时为9.79%。此后随着脂肪的分解，赤霉素的生物合成速度迅速上升，于125小时即达高峰(1640r/ml)。136小时时菌体内已空，赤霉素产量急骤下降为840r/ml。

所以出现以上的现象，可能是在发酵过程中，当合成脂肪时，不利于赤霉素的合成；当脂肪分解时，菌体内源的脂肪转化为合成赤霉素的基质，因为此时发酵液中的残糖量已极少变化，不足供应合成大量赤霉素的需要。

为了证实以上的想法，用置换培养的方法，进行了赤霉菌静息菌丝（不生长的菌丝体）利用高级脂肪酸以合成赤霉素的试验。结果是表5，（三次试验每次三个重复的平均值）

表5 赤霉菌静息菌丝置换培养试验*

小时 赤霉素 μg/ml 基质	71	119	167	215	263
蒸馏水	0	0	0	0	140
葡萄糖8%— NH ₄ NO ₃ 0.2% 培养基	2	13.8	43.3	128	0
葡萄糖0.1M	8.4	22.5	39.4	57.4	76
油酸0.1M	13.6	43.2	69.9	97.3	101.6
棕榈酸0.1M	4	26.6	75.2	85	113.5
Tween 20**	2.2	8	10	23	30.2
Tween 60**	21	60.5	106.2	130.4	110
Tween 80**	18.2	43.8	87.1	100.6	86.4
T80 + 10 ⁻⁴ M DNP	15.1	40	81.2	92.3	85.7
T80 + 5 × 10 ⁻⁴ M DNP	2.5	4.5	4.5	4.5	4.5

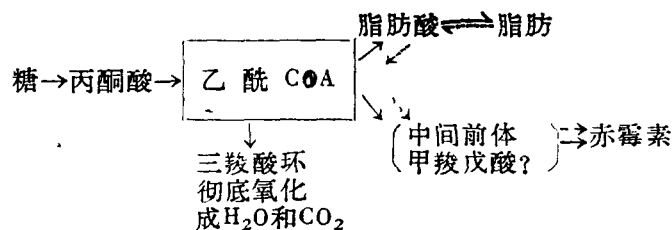
* 生长菌丝培养基的成分为：葡萄糖 2%，NH₄NO₃ 0.3%，KH₂PO₄ 0.2%，MgSO₄ 0.1%，微量元素溶液0.2%，于28℃，静置培养七天后，以无菌水洗滌菌膜，作为置换培养的静息菌丝，其中无内源赤霉素。

** Tween 20为月桂酸的可溶性衍生物；
Tween 60为硬脂酸的可溶性衍生物；
Tween 80为油酸的可溶性衍生物；

因不知其确切成分，三者的浓度都以油酸钾0.1M的浓度计算。

由表5中看出：赤霉菌的静息菌丝可以利用油酸，棕榈酸和脂肪酸的衍生物（Tween80和Tween60），对Tween20利用较差。在Tween80中加入氧化磷酸化解偶联试剂2,4-DNP，在5 × 10⁻⁴M的浓度下，可以完全抑制赤霉素的合成。说明脂肪酸分解不但为赤霉素的合成提供了前体物质，而且也供应了能量。

基于上述研究，提出以下的假设图解用以说明赤霉菌的糖代谢，脂肪代谢和赤霉素合成之间的相互关系：



糖降解到乙酰CoA后可有三条义路：一条进入三羧酸环，被彻底氧化成 CO_2 和 H_2O ，同时供应合成菌体的碳架和能量。第二条路是合成脂肪，第三条路是合成赤霉素。在菌体生长时首先是走第一条路。如果培养基的C/N比大（糖8%，麸皮3%培养基的C/N比的为43/1），多余的糖优先用于合成脂肪，赤霉素合成的量就低（图4）。如果培养基的C/N比小（糖5%，麸皮5%培养基的C/N比约为23/1），脂肪合成的量少，赤霉素的合成速度一开始就较快（图2）。当菌体内脂肪转向分解时又为赤霉素的合成提供了能量和中间前体物质，所以后期赤霉素的合成是架耗了菌体的内源脂肪。脂肪分解完之后，菌体变空。但此时菌体的呼吸作用并未停止，赤霉素可能作为呼吸基质被消耗，因而产量下降。如果这种推论是正确的话，那么在菌体要变空之前，采取减少通气量的措施，便有可能减慢赤霉素下降速度。

3. 赤霉素的应用效果：

5年来用我校自产的赤霉素在大田作物、蔬菜和果树等许多种作物上进行了试验研究，确实肯定有显著增产效果而又可能为生产上所利用者，主要有：葡萄，和几种蔬菜。利用赤霉素打破马铃薯的休眠以进行二季栽培在北京地区已初步获得成果。些外在不少的作物上，如甘薯、棉麻、芝麻等都出现有利的影响，值得进一步研究。

（1）在葡萄上的应用。

赤霉素对无核葡萄浆果的生长有显著的刺激作用。无核白葡萄于开花后一周内，用200ppm赤霉素水溶液浸渍幼穗一次，即可使浆果平均重量和果穗的平均重量比对照分别增加200%以上。增产效果显著，收益大，但成熟约晚一周。在我国新疆盛产无核白葡萄的吐鲁番地区试验的结果也获得了显著的增产效果，每亩地可增加纯收益80多元（已扣除赤霉素，人工等成本），甚受当地农民的欢迎。晒制的葡萄干个大、味略酸，但不太影响质量，适合出口。

赤霉素可使有核葡萄形成无子葡萄。这一措施在日本已大规模推广应用。根据北京农业大学的试验，花后一周内处理玫瑰香葡萄，可显著提高座果率，并生成70—80%的无核果粒。浆果成熟期可提前1—3周。处理后一般果粒体积略小，但平均穗重并不降低。

因为赤霉素在葡萄植株中不行传递，因此处理时要均匀，控制在开花后浆果生长初期时处理，效果最好。

（2）在蔬菜上的应用。

已肯定了赤霉素应用在莴笋、芹菜、菠菜、团叶生菜、花叶生菜、苋菜、茼蒿等十几种蔬菜的增产效果（自30—100%不等）。并研究出了处理的适合浓度和时间。在农村人民公社中示范推广，甚受欢迎。但由于用药量大，而目前赤霉素的成本尚高，限制了大面积的实际应用。

(3) 在马铃薯上的应用。

1960年在南郊农场和北京农大试验站，异地分别进行以赤霉素打破马铃薯休眠进行二季栽培的试验都获得了成功。退化症状轻，有希望解决马铃薯退化和当地留种的问题，但1962年在北京地区未能得到重复，而在大连地区获得了成功。关于这个问题还需要进一步摸清条件。

4. 赤霉素在植物萌发生长中对几种酶系统活性的影响

我们研究了在几种高等植物生长或萌发中赤霉素对转化酶及转氨酶所产生的影响。

赤霉素促进矮生四季豆的生长和水稻（稻源三百粒），小麦（农大183）种子，马铃薯（男爵）块茎和菊芋块根的萌发。也大大促进了转化酶的活性。如用每株20微立升，100PPM赤霉素溶液，滴在四季豆幼苗的生长点上，其转化酶活性比对照（蒸馏水）增加1.7倍；用100ppm赤霉素分别将水稻及小麦浸种二小时，萌发后五日测其转化酶活性比对照相应分别增加5.1倍及0.59倍；用1ppm赤霉素处理马铃薯块茎一小时萌发后其转化酶活性比对照增加1.5倍。与此同时四季豆植物的转氨酶也有不同程度的增加，谷丙转氨酶（GPT）增加1倍，谷草转氨酶（GPT）增加0.68倍。可是赤霉素（100ppm）对抽苔的大蒜，以及洋葱和大葱种子的萌发都不起作用，同时也不促进其相应的转化酶及转氨酶活性。

赤霉素可打破菊芋块根休眠。一般情况菊芋休眠期是3—5个月，经100ppm赤霉素浸24小时后，四天后即萌发，此时转化酶显著增加，如对照酶活性为零时，处理者为12.4单位，转氨酶亦有所增加，谷草（GOT）转氨酶的活性较显著，比对照增加0.5倍，而谷丙（GOT）转氨酶活性增加不显著。它完全不表现淀粉酶的活性。

赤霉素促进植物的生长发育，前人的工作多归之于淀粉酶活性的增加，由我们的实验看来，对某些植物如四季豆，水稻，小麦，马铃薯等来说，赤霉素对转化酶活性的增加也起着重要的作用。由于在菊芋块根中含有菊糖（多聚果糖苷），为转化酶水解，不为淀粉酶水解为已知的事实，因此我们认为赤霉素之所以促使菊芋块根的萌发，可能是由于赤霉素促使其转化酶活性的增加起着重要的作用。