

赤霉素 A₉ 检定方法的建立和发酵的初步研究

颜方贵 夏书华 刘新泉 李季伦

(中国农业大学 生物学院 北京 100094)

摘要 通过对 50 株野生型藤仓赤霉菌的筛选, 获得一株 GA₉ 组分较高而 GA₃、GA₄₊₇ 组分较低的菌株农大 201 (ND-201), 然后通过多次紫外诱变, 使其产量从原来的 34 μg/ml 提高到 260 μg/ml。当发酵条件采用变温培养 (培养 72h 后由 28℃ 转到 34℃)、调节 pH 值 (72h 后 pH 由 4.5 调到 6.2), 产量可达 300 μg/ml。在培养基按最佳组分配制后, GA₉ 的产量可达 350 μg/ml。发酵产物经提取、层析并经气相色谱-质谱联机 (GC-MS) 鉴定确证为 GA₉。硅胶 G 薄层层析和荧光光度法可简便地对 GA₉ 进行定量测定。HPLC 法可测得 GA₉ 组分的比例含量。

关键词 藤仓赤霉菌, GA₉, 发酵, 鉴定

赤霉素 A₉ (GA₉) 是继 GA₃、GA₄、GA₇ 之后最受重视的赤霉素类物质之一^[1], 它对植物的生理活性具有一些独特的作用。例如五蕊柳在限制日照时, 枝条的伸长受阻, 喷射 GA₉ 可以得到恢复和促进^[2]; 使用 GA₄₊₇ 在诱导加拿大黑松雄花形成时, GA₉ 具有很强的增效作用^[3]; GA₉ 能显著刺激大白菜和苹果后熟期的胚轴的伸长^[4,5]; 能提高西红柿开花率 21.2%~28.4%^[6]等, 这是目前所知的少数资料。许多植物体内的 GA₉ 由 3-β-羟化酶所催化, 可转化为 GA₄ 而起作用^[7]。至于微生物的合成途径, 过去一直认为 GA₉ 来自 GA₁₂ 醛, GA₄ 来自 GA₁₄ 醛, 两者之间没有转化关系, 而 Takeshi 等人^[8] 用 ¹⁷H₂GA₉ 喂给 *Phaeosporia* L487 菌株, 发现产物中有带 ²H₂ 的 GA₄ 和 GA₁, 并且得到 GA₄ 的数量和 GA₉ 有线性关系。

GA₉ 的产生菌主要有: *Gibberella fujikuroi*、*Sphaceloma manihoticola*^[9] 和 *Phaeosporia*^[10], 后两者的 GA₉ 产量都很低。Cross^[11] 和 Borrow^[12] 等人认为: 变温培养、改变营养条件对提高 GA₉ 的产量有利。培养基中加入一定量的乙醛也可提高赤霉素的产量^[13]。我组从筛选野生菌开始, 经过多次紫外诱变并配以营养和外界环境的调整, GA₉ 产量由 34 μg/ml 提高到 350 μg/ml, 经各种方法检测, 产物 GA₉ 得到确证。

1 材料

1.1 供试菌株

农大 201 号, 系从 50 株野生型藤仓赤霉菌中筛选获得, 该菌株产 GA₉ 量较高, GA₃、GA₄₊₇ 的产量都很低。

本文于 1996 年 2 月 28 日收到。

1.2 培养基

1.2.1 菌种斜面及平板分离培养基: PDA。

1.2.2 产孢培养基: KNO₃ 0.3g, KH₂PO₄ 0.1g, MgSO₄ 0.05g, 自来水 100 ml。

1.2.3 种子培养基: 葡萄糖 0.3g, 蒸馏水 100ml。豆饼粉 1.5g, 淀粉 1.0g, 葡萄糖 1.0g, KH₂PO₄ 0.1g, (NH₄)₂SO₄ 0.05g, MgSO₄ 0.1g, 自来水 100ml。

1.2.4 发酵培养基(%): 豆饼粉 0.9, 淀粉 7.0, 葡萄糖 1.0, KH₂PO₄ 0.15, MgSO₄ 0.08, α-淀粉酶 0.003, pH 5~5.5

1.3 诱变剂

15W 紫外灯, 波长为 2537Å, 照射距离 30cm。

2 方法和结果

2.1 GA₉ 的定性检测方法

2.1.1 硅胶 G 薄层层析法(TLC)的定性检测: TLC 法展层剂的选择是根据 GA₉ 的极性^[14], 参考 Rachev^[15, 16]等人的报道, 设计 5 种展层剂, 展析结果见表 1:

表 1 GA₉ 在不同展层剂中的 R_f 值

Table 1 R_f values of GA₉ in different solvent

Solvent systems	1	2	3	4	5
GA ₃	0.35	0.123	0.05	0.55	-
GA ₄₊₇	0.45	0.12	0.2	-	-
GA ₉	0.6	0.3	0.45	-	-
Others GA	-	0.6	0.6	0.6	-

1. Chloroform: acetic ester: methyl alcohol: acetic acid = 20:20:2:0.2, 2. Cyclohexane: acetic ester: glacial = 15:5:0.1, 3. Phene: acetic ester: methyl alcohol = 2:3:2, 4. Chloroform: acetic ester: methyl alcohol = 66.7:33.3:0.5, 5. Phene: acetone: methy alcohol = 4:41

从表 1 可以看出, 展层剂 3 的效果最佳, GA₃、GA₄₊₇、GA₉ 和其它 GA 的 R_f 值间隔较大, 且 GA₉ 处于中间位置。GA₉ 的 TLC 定性法: 取一定量的样品, 点于硅胶 G 板上, 用展层剂 3 层析后, 喷显色剂(5% 浓 H₂SO₄ + 95% 的乙醇), 120℃ 加热 2min, 于紫外灯下观察, GA₉ 的 R_f 值为 0.45, 呈紫色荧光。

2.1.2 GA₉ 的鉴定: 采用国际通用的气相色谱—质谱(GC-MS)检测的方法。发酵液经提取, 硅胶柱分离, 得到 GA₉ 粗品, 经 GC-MS 鉴定, 并与标准图谱比较, 确证为 GA₉ 无疑。

2.1.3 GA₉ 的生物活性检测: 采用 α-淀粉酶诱导生成法^[10]: 将大麦种子消毒、横切、去除含胚的一半, 放入 7 支无菌试管中, 分别加入 1~7μg/ml 浓度的 GA₉, 培养 48h(33℃), 然后用索莫奇方法测定培养液中还原糖浓度, 试验结果表明, 在一定范围内诱导生成的 α-淀粉酶与 GA₉ 浓度量成正比。

2.2 GA₉ 的 TLC 定量测定法

2.2.1 GA₉ 的光谱性质: 用荧光分光光度计对 GA₉ 样品进行扫描, 得到 GA₉ 的激发光谱和发射光谱(见图 3), 它们的波长分别为 370nm 和 450nm。

2.2.2 GA₉ 的比例含量粗算: 采用 SY5000 高压液相色谱(HPLC)仪, C-18 色谱柱, 流

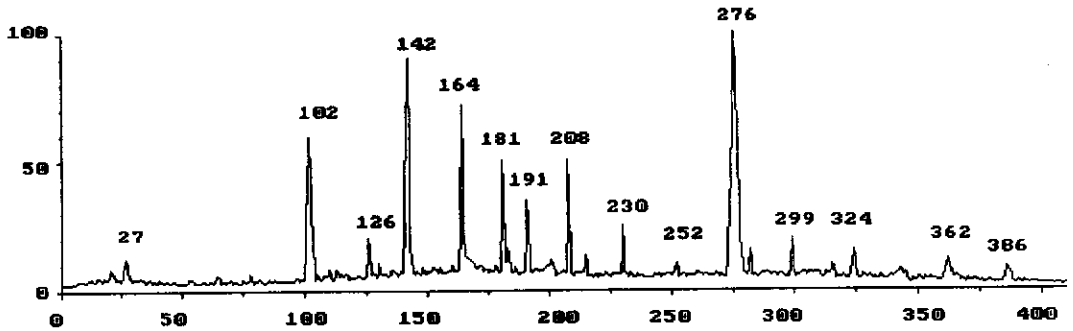
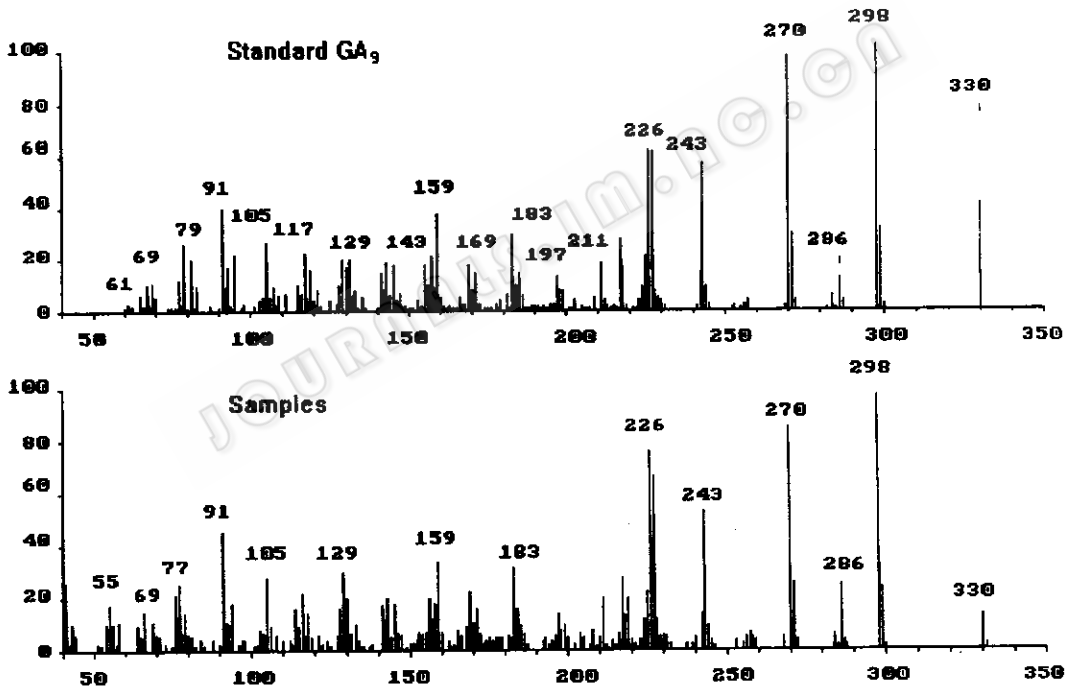


图1 样品的总离子流图

Fig. 1 The pattern of total ion fluid in the samples

图2 标准 GA_9 和样品的棒针质谱图比较Fig. 2 The comparison of bar mass-spectrogram in standard GA_9 and samples

动相为甲醇:水=40:60和60:40,流速1.2ml/min和1.5ml/min。图5为发酵抽取液的HPLC图,从标准的 GA_9 的RT值可以找出试样中的 GA_9 峰的位置和比例,从而为定量试样提供依据。

2.2.3 GA_9 的标准曲线制作和样品测定:配制 GA_9 0~500 μ g/ml的系列浓度,各取50 μ l加入试管中,并加入85%的浓硫酸,混匀反应5h,以420nm截止

型滤光片,以 360 μm 截止型滤光片为激发滤光片,在 930 荧光光度计上测出各浓度的荧光值,以测定的荧光值对 GA₉ 的浓度做标准曲线。标准曲线见图 4。

发酵液测定时,取 50 μl 发酵液,经 TLC 板层析,刮下 GA₉ 区带。然后按制作标准曲线方法进行荧光比色,根据荧光值从标准曲线上查得相应的浓度。

2.3 GA₉ 的菌种选育

以藤仓赤霉菌 DN-201 为出发菌株,接种产孢培养基,28 $^{\circ}\text{C}$ 摇瓶培养 72h,孢子悬液经过滤、离心、洗涤得 10⁷

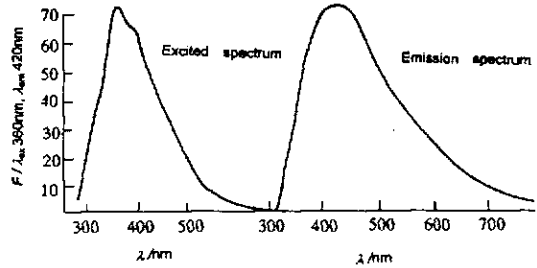


图 3 GA₉ 的激发光谱和发射光谱

Fig.3 The excited and emission spectrum of GA₉
 λ_{ex} 370nm, λ_{em} 420nm

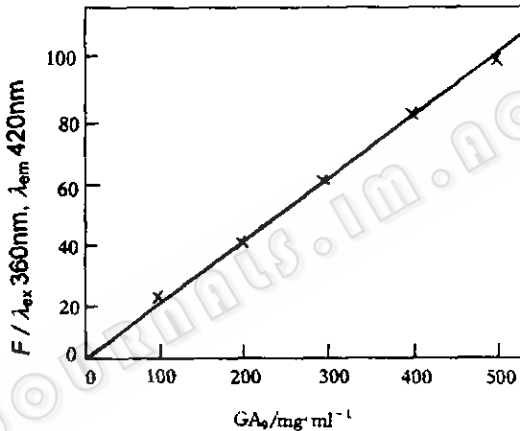


图 4 GA₉ 标准曲线(0~500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

Fig.4 The standard curve of GA₉(0~500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

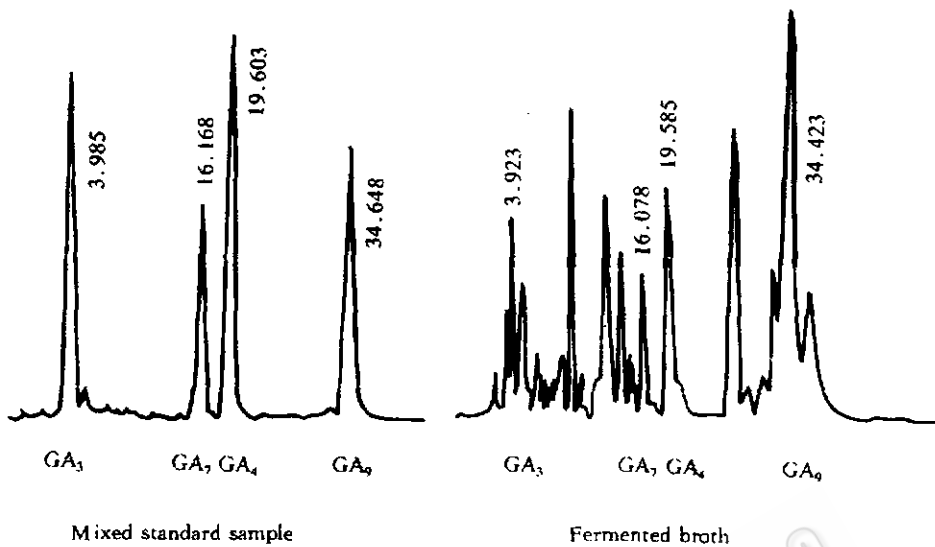
个/ml 的孢子悬液,然后进行紫外诱变,剂量选择为 1~6min,孢子存活率和初筛结果见表 2。

表 2 ND-201 菌株经 UV 诱变结果

Table 2 The mutation results of strain ND-201 by UV

Dosage/min	1	2	3	4	5	6
Surviving rate/%	5.3×10^{-1}	1.7×10^{-1}	6.7×10^{-2}	8.5×10^{-3}	1.6×10^{-3}	2.4×10^{-4}
Strain number	43	68	253	35	29	13
Positive mutation rate/%	5.1	11.3	29.4	14.6	7.5	1.6
Negative mutation rate/%	31.4	16.7	13.8	17.6	33.3	32

表 2 初步显示:剂量在 3min 时正突变率为 29.4%,效果最好。于是以后的几次 UV 诱变剂量均集中在 3min,使 GA₉ 的产量从原来的 34 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 增至 260 $\mu\text{g}/\text{ml}$,产量提高 5.02 倍。同时发现发酵液的颜色由原来的紫色变成灰白色,产色素能力显著下降。

图5 GA_9 样品的 HPLC 图Fig. 5 The HPLC graph for the samples of GA_9

2.4 发酵条件的选择

2.4.1 温度和 pH 的影响: 选择 28℃、32℃、34℃ 3 种温度和 2 个变温处理, 即: 72h 后由 28℃ 转 32℃ 和 28℃ 转 34℃。pH 值设 2 个处理, 即加入 $CaCO_3$ 调整 pH 和不调整 pH。摇瓶发酵 240h, 结果见表 3。

表 3 温度和 pH 对 GA_9 产量的影响Table 3 Effect of temperature and pH value on GA_9 production

Temperature/℃	28		32		34		28→32		28→34	
pH Adjustment	√	×	√	×	√	×	√	×	√	×
GA_9 Production/ $\mu g \cdot ml^{-1}$	130	67	180	115	225	143	260	179	300	96
Hyphe micro-mass	×	×	×	×	√	×	×	×	√	×

从表 3 中可以看出: 采用 28℃ 发酵 72h 后转入 34℃ 的变温培养, 同时调整 pH 值由 72h 后的 4.5 调至 6.2, 发酵 240h, GA_9 的产量最高, 菌丝的成球情况亦较好。

2.4.2 营养条件的选择: 选择 7 个因子、3 个水平的正交试验, 环境因子按 (2.4.1.) 得出的最佳条件, 即发酵 72h 后加入 $CaCO_3$ 调整 pH, 温度由 28℃ 升至 34℃。发酵结束按生物统计得到最佳营养条件 (即淀粉 10%、葡萄糖 1%、豆饼粉 1%、硫酸铵 0.1%、磷酸二氢钾 0.05%、硫酸镁 0.15%、甲醛 0.5%), 摇瓶发酵 240h, GA_9 的产量可达 350 $\mu g/ml$ 。

参考文献

- [1] Vrozier A, Kuo C C, Durley R C *et al.* *Canadia J Bot.* 1970, 48:867-877.
- [2] Takahashi, *Plant and Physiology*, 1991, 32(2):239-245.
- [3] 颜方贵, 秦杰, 李季伦等. *微生物学通报*, 1994, 21(3):163-167.
- [4] Hall, *Information Report, Newfoundland and Forestry Center Canada*, 1986, No. N-X, 252.

- [5]Junttila, Jensen, Pearce, Pharis, *Physiologia-Plantarum*, 1992, **84**(1):113-120
- [6]Halínska, Sínska, Lewak, *Physiologia-Plantarum*, 1987, **69**(3):531~534.
- [7]Fukuri, *Agri Biol Chem*, 1972, **36**:1003~10012.
- [8]Takeshi S, Hiroshi K, *Biotech Biochem*, 1994, **58**(2):438~439.
- [9]Rademacher w, Graebe J, *Bioch Biophy Res Com*, 1979, **91**(1):35~40.
- [10]Takeshi S, Katsuhiko S, *Agri Biol Chem*, 1989, **53**(1):303~304.
- [11]Cross B E, Gatt H B, Hanson J R, *Tetrahedron Letters*, 1962, **18**:451~459.
- [12]Borrow, *Canadian Journal of Microbio*, 1963, **10**:407~443.
- [13]Bateson J H, Cross B E, JCS Perkin I, 1974, 1131~1136.
- [14]Dwrtley R C, Pharis R P, *Phytochemistry*, 1972, **11**, 317~326.
- [15]Rachev R C, Rouseva R P, Bojkova S V *et al*, *J Natural Products*, 1993, **56**(7):1168~1170.
- [16]Rachev R C, Rouseva R P, Bojkiva S V, *J Natural Products*, 1993, **56**(6):1091~1095.

The Establishment of Identification Methods for Gibberellin A₉ and Preliminary Study on the Fermentation

Yan Fanggui Xia Shuhua Liu Xinquan Li Jilun
(China Agricultural University, Biology Institute, Beijing 100094)

Abstract Selected from 50 strains of *Gibberella fujikuroi*, a strain producing high-proportional GA₉(ND-201) was obtained. After ND-201 was treated 4 times by UV, a mutant with high production was gotten, and the yield of GA₉ increased 7 times, from original 34 μg/ml to 260 μg/ml. Moreover, the condition of fermentation were modified: the temperature was verified from 28°C to 34°C after 72 hours shake flask culture and the pH value was adjusted from 4.5 to 6.2. Using this way, the production of GA₉ was obviously increased. After 7-factors, 3-levels, orthogonal experiments, the yield of GA₉ in shake flask was achieved 350μg/ml, after 240 hours culture in the optimum condctions. Extracting the broth and purifying it, the products of fermentation was identified as GA₉ by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). By measuring the biggest Ultra-absorbtion wavelenth the method in assay the concentration of GA₉ in broth was simplified by combination of TLC and spectroflorimetry. In analysis the proportion of Gas in broth, HPLC was applied.

Key words *Gibberella fujikuroi*, GA₉, fermentation, identification