

珍珠岩液体培养基制备镰刀菌素 C 的研究

李国玉 李铭新 马吉林

(中国医学科学院肿瘤医院, 北京 100021)

串珠镰刀菌可利用羟基脯氨酸、蔗糖、甘油和珍珠岩 (P) 等组成的 P 液体培养基合成镰刀菌素 C (Fc), 其最高量为 936mg/kg 有机物, 比在玉米渣培养基中形成的 Fc 量较高。用 P 液体培养基制备 Fc, 受蔗糖浓度、胺类和培养温度及培养时间等的影响。实验证明, 由 1g 羟基脯氨酸、40g 蔗糖和珍珠岩组成的 P 液体培养基, 在 28℃ 培养二周是形成 Fc 的理想条件。液体培养基中加入珍珠岩, Fc 的形成量增加 500 多倍。

关键词 珍珠岩液体培养基; 镰刀菌素 C

串珠镰刀菌是河南省林县玉米中的主要真菌^[1]。Wiebe 和 Bjeldanes 从玉米中分离出串珠镰刀菌, 接种于玉米, 并从该接种物中获得一种致突变物——Fc^[2]。随后, 本实验室也从接种于串珠镰刀菌的玉米渣中分离出 Fc^[3], 并证明 Fc 对细胞和细菌有明显的致突变作用^[4,5]。1983 年, Gelderblom 发现 Fc 受紫外线和温度(约 60℃, 30min) 影响, 而失去全部的紫外吸收和诱变性^[6]。过去, 在实验室条件下, 从霉变玉米渣中提取和纯化 Fc 的过程比较复杂^[3], 会影响 Fc 的生物学活性及紫外吸收。为寻找快速简便制备 Fc 的方法, 并为串珠镰刀菌生物合成同位素标记的 Fc 选择前体物, 作者用不同前体物组成培养基代替玉米渣。所选用的有机物, 既可作为合成 Fc 的原料, 又可进行同位素标记。

材料与方 法

(一) 试剂

羟基脯氨酸 Sigma grade; 30% 甲胺水溶液和吡咯为化学纯。其它试剂均为分析纯。

(二) 珍珠岩

购买于北京市朝阳区北花园珍珠岩公司。使用前反复水洗, 晾干后使用。

(三) 菌株

串珠镰刀菌株由本研究组分离和鉴定, 所用菌株保存在 4℃ 冰箱。

(四) 液体培养基组份(表 1)

(五) 珍珠岩液体培养基

由液体培养基加珍珠岩组成。

(六) 接种和培养

在 200ml 三口瓶中加 25ml 液体培养基和 5g 珍珠岩, 灭菌后, 接种串珠镰刀菌, 在 28℃ 培养二周。玉米渣培养基则按以前培养的方法, 在 28℃ 培养三周和 11℃ 继续培养一周。

(七) Fc 的提取和纯化

P 液体培养基(5g 珍珠岩加 25ml 液体培养基)的培养物用 100ml 醋酸乙酯提取两次, 用旋转蒸发器, 在减压下, 浓缩醋

本文于 1990 年 12 月 29 日收到。

中国医学科学院青年基金资助课题。

本研究得到了北京农业大学李季伦教授的帮助, 特此致谢。

表 1 液体培养基的组份

Table 1 Components of liquid culture media (g/L)

组份 Components	组别 Groups		
	I	II	III
K_2HPO_4	1.8	1.8	1.8
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1.2	1.2	1.2
NaCl	24	24	24
蔗糖 Sucrose	40	40	40*
甘油 Glycerin	5	5	5
羟基脯氨酸 Hydroxy proline	1*	0	0
甲胺 Methyl amine	0	1	0
吡咯 Pyrrole	0	0	1

* 液体培养基中蔗糖和羟基脯氨酸的理想浓度。

Optimal concentrations of sucrose and hydroxy proline in liquid culture media.

酸乙酯提取液至干,加 0.2ml 甲醇,重新溶解,待反相液相色谱 (HPLC) 分析。

玉米渣培养物(50g)用 100ml 氯仿:甲醇(9:1)提取两次,提取液用石油醚(2×50ml)脱色,脱色后的提取物,在减压下,用旋转蒸发器浓缩至 2—5ml,进行柱层析(柱层析硅胶,60—100 目),以氯仿:甲醇(9:1)作洗脱剂,收集浅黄色的洗脱液,蒸发氯仿:甲醇溶液,得 Fc 半纯品,进一步用薄层层析法 (TLC) 纯化,获得 Fc,待 HPLC 分析。

(八) 镰刀菌素 C 的分析

所有实验培养物提取,都经过 TLC 和 HPLC 分析。

TLC 层析,展开剂为氯仿:甲醇(9:1),标准 Fc 为阳性对照。

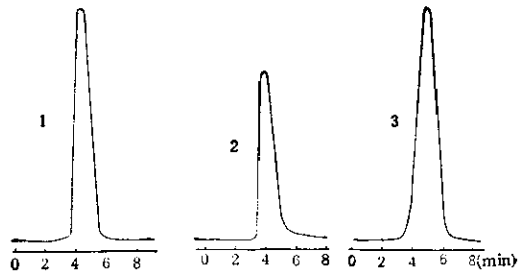


图 1 Fc 的 HPLC 色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of Fc

- 1.P 液体培养基;
- 2.玉米渣;
- 3.P 液体培养基和玉米渣并加标准 Fc。
- 1.In P-liquid culture medium;
- 2.In corn grit;
- 3.In P-liquid culture medium, corn grit and spiked with standard Fc.

反相液相色谱,紫外检测器,波长为 365nm,色谱柱—— $^{15}C_{25}cm \times 4mm$ (Waters Co.),流动相 100% 甲醇,流速:1.0ml/min。

(九) P 液体培养基组份及培养条件的选择

1. 在其它条件不变的情况下,在液体培养中分加 5、10、20、30、40g 蔗糖,进行培养,选择产生 Fc 的合适浓度。

2. 按照 1 的方法,在液体培养基中加 0、0.5、1、2g 羟基脯氨酸;另外,选用 1g 甲胺和 1g 吡咯代替羟基脯氨酸。

3. 选择不同的培养温度和时间,如:在 28℃ 分别培养一周、二周和三周;28℃ 培养三周和 11℃ 继续培养一周;19℃ 培养二周。

4. 取 5g 珍珠岩分别加在 20、25、30 和 50ml 液体培养基中和取 25ml 液体培养基(不加珍珠岩)的五组,在 28℃,培养二周。

结 果

串珠镰刀菌接种于 P 液体培养基,在

28℃培养二周, 从其培养物中获得一化合物, 该化合物与标准 Fc 的 TLC 色谱 R_f 值、荧光斑点和 HPLC 的保留时间一致 (图 1)。这表明串珠镰刀菌可以利用所选择有机物合成 Fc, Fc 的形成受培养温度、时间以及蔗糖和胺类的种类及浓度等的影响较大。

(一) 蔗糖浓度对 Fc 量的影响

在其它培养条件不变的情况下, 每升液体培养基中, 分别加入 5、10、20、30、40g 蔗糖。结果表明, 加入 40g 的蔗糖, 是形成 Fc 的理想浓度 (Fc 的形成量为 936 mg/kg 有机物)。

(二) 羟基脯氨酸的浓度和其它有机胺对 Fc 形成的影响

每升液体培养基中分别加入 0、0.5、1 和 2g 的羟基脯氨酸和用 1g 甲胺 (或 1g 吡咯) 代替羟基脯氨酸。表 2 结果表明, 在不加羟基脯氨酸的情况下, 串珠镰刀菌不产生 Fc, 选用 1g 羟基脯氨酸产生的 Fc 最高。

表 2 羟基脯氨酸浓度和其化有机胺对 Fc 形成的影响

Table 2 Effects of hydroxy proline concs. and other organic amines on production of Fc

有机胺浓度和种类 Concs. and kinds of org- anic amines	液体培养基 (g/L) Liquid culture media	Fc (mg/kg 有机物 org. matters)
	0	0
羟基脯氨酸 Hydroxy proline	0.5	70
	1	936
	2	700
甲胺 Methyl amine	1	630
吡咯 Pyrrole	1	700

(三) 不同培养温度和培养时间对形成 Fc 的影响

表 3 结果表明, 串珠镰刀菌在 28℃ 培

养 14 天, 产生的 Fc 量最高。在 28℃ 培养三周, 或在 11℃ 继续培养一周, Fc 的形成量降低, 在 19℃ 培养二周, 也可获得 Fc。

表 3 培养温度和时间对 Fc 形成的影响 (P 液体培养基)

Table 3 Effects of different temp./time on production of Fc (in perlite-liquid culture medium)

培养条件 Culture conditions	Fc (mg/kg 有 机物 org. mat- ters)
28℃ 1 周 (week)	315
28℃ 2 周 (weeks)	936
28℃ 3 周 (weeks), 11℃ 1 周 (week)	190
28℃ 3 周 (weeks)	285
19℃ 2 周 (weeks)	259.1

(四) 珍珠岩和不同体积的液体培养基组成 P 液体培养基对 Fc 形成量的影响

分别取 20、25、30 和 50ml 的液体培养基, 加 5g 珍珠岩, 组成 P 液体培养基和 25ml 液体培养基为五组, 实验结果以 25ml 液体培养基加 5g 珍珠岩的 P 液体培养基形成 Fc 量最高 (936mg/kg 有机物), 是不加珍珠岩培养的 500 倍 (表 4)。

表 4 珍珠岩与不同体积的液体培养基对 Fc 形成的影响

Table 4 Effects of perlite and different volume liquid culture media on production of Fc

珍珠岩 Perlite (g)	液体培养基 Liquid culture media (ml)	Fc (mg/kg 有机物 org. matters)
5	20	55.1
5	25	936
5	30	700
5	50	252.8
0	25	1.82

讨 论

过去以玉米渣为培养基制备镰刀菌素 C, 在培养过程中产生大量的色素和 Fc 的

同系物,经多步纯化才能获得 Fc^[3]。过多的纯化步骤,会降低 Fc 的生物学活性和紫外吸收。串珠镰刀菌利用珍珠岩液体培养基可合成较单一的Fc,纯化方法快速,简单, Fc 的最高量为 936mg/kg 有机物,比在玉米渣培养基中的产量(813mg)高。此外,本实验所选用羟基脯氨酸(吡咯或甲胺)等有机物均参与了 Fc 的合成,如果培养基中加同位素标记的羟基脯氨酸、吡咯或甲胺,可获得同位素标记的 Fc。

液体培养基中不同种类或不同浓度的有机胺可影响 Fc 的形成,实验中选择羟基脯氨酸(吡咯)。试设想真菌利用羟基脯氨酸(吡咯)为合成 Fc 提供 Fc 的吡咯烷环,甲胺为Fc的吡咯环基提供甲氨基,甘油和蔗糖提供碳水化合物。从本实验可推测 Fc 吡咯烷基的氮原子来源于羟基脯氨酸(吡咯或甲胺)。研究或标记 Fc 吡咯烷环基的目的是因为该吡咯烷环氧基与细菌的致突变作用和 DNA 结合有关^[6,7]。

实验中的珍珠岩是一种无机保温建筑材料,具有多孔,吸水性强,高温下理化性质稳定,原料来源容易,价格低廉等特点。本研究选用珍珠岩,使液体培养基吸附于珍珠岩表面,扩大真菌在培养基中的生长面积,Fc 的生成量为 936mg/kg 有机

物。在不含珍珠岩的液体培养基中,真菌仅生长在培养基的表面, Fc 的生成量为 1.85mg/kg 有机物,两种培养基的不同,对形成 Fc 有很大的影响。培养过程中珍珠岩不参与反应,使用过的珍珠岩,经水洗后,可重复使用。该方法可广泛使用于实验室和工业。

P 液体培养基与玉米渣培养基形成Fc的时间不同,该液体培养基在 28℃ 培养二周,形成 Fc 的量最高,利用玉米渣培养基则需在 28℃ 培养三周和 11℃ 继续培养一周。液体培养基中蔗糖对 Fc 的形成有关,过低的蔗糖不能提供足够量的碳氢氧元素,以 40g 蔗糖/L 培养液形成 Fc 的量较为理想。

参 考 文 献

- [1] 李治安等:癌症,5: 294—295,1986。
- [2] Weibe, L.A. and L. F. Bjldences: *J. Food Sci.*, 46: 1424—1427, 1981。
- [3] 蒋原宙等:中华肿瘤杂志,7 (增刊): 42—43, 1985。
- [4] 程书钧等:中华肿瘤杂志,6: 32—34,1985。
- [5] 罗煥造等:遗传与疾病,2: 213—215,1985。
- [6] Gelderblom, W.C.A. et al.: *Biochem. Pharmacol.*, 33: 1601—1603 1984。
- [7] Gelderblom, W.C.A. et al.: *Toxicol.*, 21: 467—473, 1983。

METHOD OF PRODUCING FUSARIN C IN PERLITE-LIQUID CULTURE MEDIUM

Li Guoyu Li Minxin Ma Jilin

(Cancer Institute, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021)

For researching the biosynthesis-labelled Fusarin C(Fc) by *Fusarium moniliforme*, a more quick and convenient method of Fusarin C production and purification were established, and a good liquid culture medium consisted of different kinds organic matters (hydroxy proline, sucrose and glycerin), inorganic salts and perlite replaced corn grit medium. The perlite-liquid culture medium inoculated with the strain of *F. moniliforme* yields 936mg Fc/kg organic matter with in 14 days of incubation at 28°C. As compared with the corn grit medium, the amount of Fc from perlite-liquid medium was more than that from corn grit medium (831mg Fc/kg corn grit). In all experiments both thin-layer chromatography and high-pressure liquid chromatography were used to confirm the presence of Fc. parameters which were important

for the optimal biosynthesis of Fc included hydroxy proline and sucrose concentrations, incubated time/temperature and amount of perlite. The 40g of sucrose/L liquid culture was optimal concentration for Fusarin C production. Of three contained N-matter tested, hydroxy proline was the best sources of N-atom for Fusarin C. Under the absence of hydroxy proline, the Fc wasn't synthesized in perlite-liquid culture medium by *F. moniliforme*. A culture time/temperature study of Fc production was done, and the optimal Fc amounts was synthesized after incubation for 14 days at 28°C on perlite-liquid culture medium.

Key words

Perlite-liquid culture medium; Fusarin C