

赤霉烯酮的微生物还原

吴莲芬 王秋敏 王淑菊 周凤仪

(中国科学院上海有机化学研究所, 上海 200032)

用 *Rhodosporula* sp. *Saccharomyces* sp. *Arthrobacter* sp. 和 *Candida* sp. 四属 20 株菌对由 *Fusarium graminearum* 产生的类雌激素——赤霉烯酮 (Zearalenone) 的还原转化进行了研究。实验结果证明, *Rhodosporula* sp. 和 *Arthrobacter* sp. 的还原产物主要是 α -赤霉烯醇 (α -Zearalenol, 经 HPLC 鉴定含量分别为 96% 和 84%)。 *Saccharomyces* sp. 和 *Candida* sp. 的主要还原产物是 β -赤霉烯醇 (β -Zearalenol, 经 HPLC 鉴定含量分别为 91% 和 92%)。产物均经 HPLC、 ^{13}C -NMR 和 MS 鉴定确证。

关键词 赤霉烯酮; 赤霉烯醇

赤霉烯酮是从赤霉属菌菌丝中分离得到的具有显著生理活性的一类 β -二羟基苯酸酯 (β -resorcylates) 的天然产物, 它使家畜出现子宫和乳腺肥大、脱肛等症状, 这是一种雌激素 (estrogenic) 中毒现象。而其还原产物——赤霉烯醇具有比赤霉烯

酮更强的雌激素活性, 但其另一还原产物——赤霉醇则具有比赤霉烯酮的雌激素活性差, 而具有明显的促蛋白合成 (Anabolic) 的活性, 尤其是 α -赤霉醇, 已是国外商品化的动物生长促进剂, 而赤霉烯醇进一步氢化, 则能方便地得到赤霉醇。赤霉

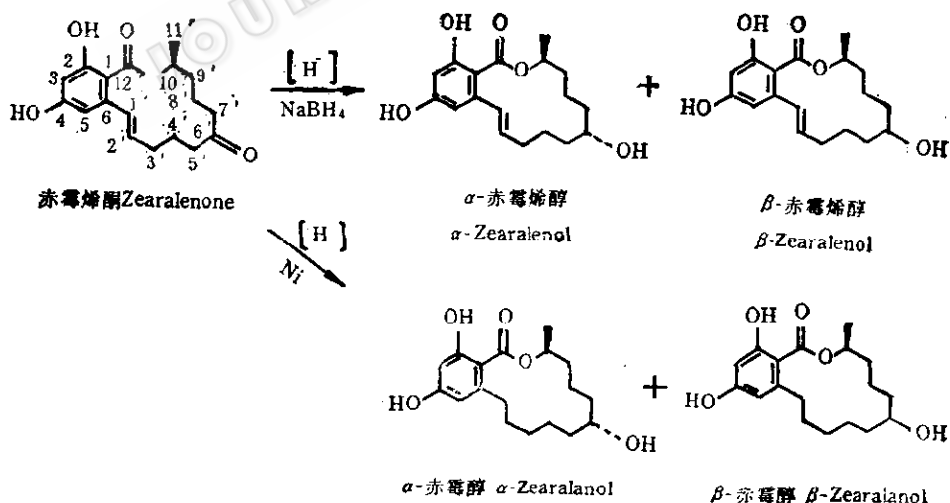


图 1 赤霉烯酮及其还原产物的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of zearalenone and its reductive products

本文于 1990 年 8 月 8 日收到。

试验用赤霉烯酮由北京农业大学生物学院李季伦教授实验室提供, 陈文英同志参加过部分工作, 在此一并致谢。

烯酮是一大环内酯化合物,它经化学催化还原时,其6'-C上引进了新的不对称碳原子,因而产生二个非对映异构体—— α 、 β -赤霉烯醇^[1]或 α 、 β -赤霉醇^[2](见图1),反应几乎无选择性。

而一些微生物能专一性还原赤霉烯酮,从而生成二个非对映异构体中的一个^[3-5],反应具有高度的选择性。我们对还原赤霉烯酮的微生物进行了筛选,并就还原的最适条件进行了研究,还运用休止细胞对赤霉烯酮的还原进行了探讨,寻求高选择性还原赤霉烯酮的方法,以期替代化学还原方法。

材料与方 法

(一) 菌种和培养基

1. 菌种: 筛选得到,经鉴定分属下述四类: *Rhodotorula* sp.、*Saccharomyces* sp.、*Arthrobacter* sp. 和 *Candida* sp.

2. 培养基: (1)斜面培养基(g/L): 葡萄糖 30, 玉米浆 20, KH_2PO_4 1, NaNO_3 2, K_2HPO_4 2, MgSO_4 0.5, FeSO_4 0.2, 琼脂 20, 蒸馏水定容, pH6.4。 (2)液体培养基(g/L): 1[#], 同斜面培养基,不加琼脂, pH 6.7; 2[#], 同 1[#]培养基,另加酵母膏10; 3[#], 葡萄糖 55、蛋白胨 20、酵母膏 2。

(二) 菌体培养及赤霉烯酮的转化培养

1. 前培养: 10ml 1[#]培养基装于 500ml 三角瓶中,接一白金耳菌量,往复摇床, 28℃振荡培养 2 天。

2. 转化培养: 250ml 三角瓶中装 50ml 培养基(1[#]、2[#]、3[#]),加入前培养液 2ml,往复摇床, 28℃振荡 24 小时后,加赤霉烯酮溶液(2mg/ml 乙醇,以 50—100 μg /ml 培养基浓度投料,于 28℃培养 72 小时,其间通气程度可通过振荡、静止、密闭振荡等调节。

3. 休止细胞转化培养: 将菌体离心(3500 r/min, 20min),再用 0.2mmol/l 磷酸缓冲液洗两次。将细胞置于一定溶液(生理盐水、缓冲液等)中,加入赤霉烯酮溶液,其余条件同转化培养。

(三) 产物提取、纯化及鉴定

转化后,用乙酸乙酯提取 3 次(50ml/次),合并乙酸乙酯提取液,用无水硫酸钠干燥过夜,浓缩至干。用硅胶薄层层析板制备分离,展开剂为氯仿-甲醇(97:3, v/v),产物用甲醇-水重结晶。

转化情况由液相色谱分析, Waters 246 型液相色谱仪配 UV441 型检测器。柱: Radial Pak C_{18} ; 移动相: 甲醇-水(65:35, v/v); 流量: 1ml/min, 检测器: UV214、229 或 254nm。

MS 仪: Finnigan 4021; ^{13}C -NMR 仪: FX-90Q。

结 果 和 讨 论

(一) 还原赤霉烯酮菌种的筛选

对 20 株菌株进行培养与赤霉烯酮转化,用 1[#]培养基振荡或静止培养转化。结果表明一些菌株能选择性较好地还原赤霉烯酮,其中立体选择性较高的有: *Rhodotorula* sp., *Arthrobacter* sp.、*Saccharomyces* sp. 和 *Candida* sp. (见表1)。*Rhodotorula* sp. 及 *Arthrobacter* sp. 的产物主要为 α -赤霉烯醇,而 *Saccharomyces* sp. 及 *Candida* sp. 的产物主要为 β -赤霉烯醇。我们选择了 *Rhodotorula* sp. 和 *Saccharomyces* sp. 来进行赤霉烯酮还原条件的研究。

(二) 转化产物的确认

1. HPLC 分析: 几个化合物在 C_{18} 反相柱上能很好地分离,其滞留时间分别为: β -赤霉醇 4.95'; β -赤霉烯醇 5.8'; α -赤霉醇 7.4'; α -赤霉烯醇 8.3';

表 1 一些微生物对赤霉烯酮的还原
Table 1 Microbial reduction of zearalenone

菌 种 Strains	α, β 异构体的相对含量 Content (%)	
	α -赤霉烯醇 α -Zearalenol	β -赤霉烯醇 β -Zearalenol
<i>Rhodotorula</i> sp.	96	4
<i>Arthrobacter</i> sp.	84	16
<i>Saccharomyces</i> sp.	9	91
<i>Candida</i> sp.	8	92

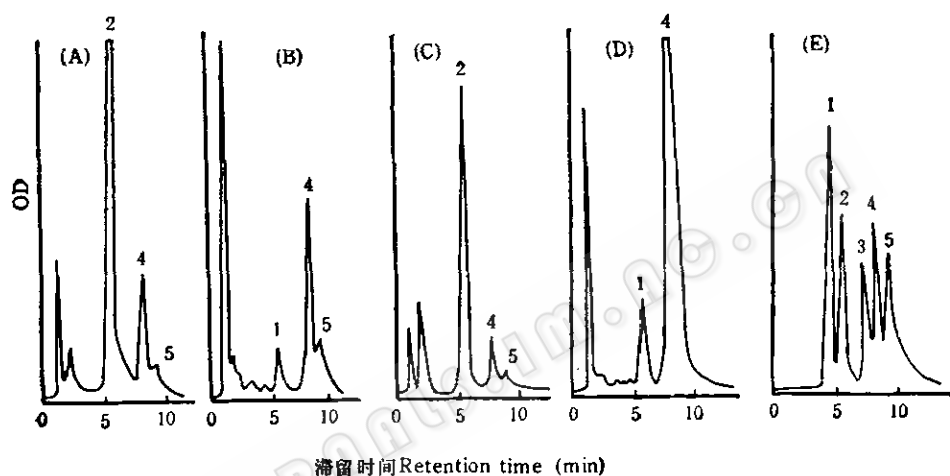


图 2 各种菌株转化产物的 HPLC

Fig. 2 HPLC of the mixture produced by different strains

1. β -赤霉醇 β -Zearalenol; 2. β -赤霉烯醇 β -Zearalenol; 3. α -赤霉醇 α -Zearalenol;
4. α -赤霉烯醇 α -Zearalenol; 5. 赤霉烯酮 Zearalenone
A. *Saccharomyces* sp.; B. *Arthrobacter* sp.; C. *Candida* sp.; D. *Rhodotorula* sp.;
E. 标准样品 Standard samples

赤霉烯酮 9.9'。

由微生物转化的产物经鉴定, 滞留时间分别与 α 、 β -赤霉烯醇相同, 如图 2 所示。

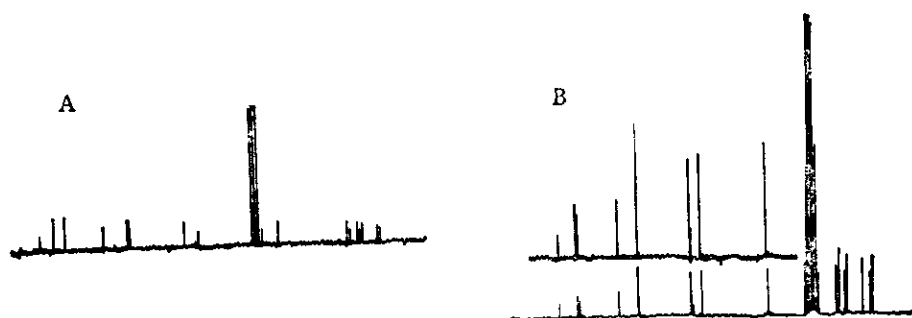
2. ^{13}C -NMR 分析: 转化产物由 ^{13}C -NMR (图 3) 表明: 赤霉烯酮的化学位移 $\delta 215$ (C-6') 消失, $\delta 132$ (C-2') 和 $\delta 135$ (C-1') 依然存在, 其它化学位移 (δ 值) 分别与文献值^[3]报道的 α 、 β -赤霉烯醇的数值相一致。

3. MS 分析: 质谱分析如图 4。转化产物的分子、离子质荷比 (m/e) 为 320,

证明在赤霉烯酮分子中, 只加上了二个氢原子。

(三) 培养基对转化率的影响

将 *Rhodotorula* sp. 和 *Saccharomyces* sp. 的前培养液接于不同的培养基 1[#]、2[#]、3[#], 振荡培养。投入赤霉烯酮量为每毫升培养基加入 200 μg , 72 小时后提取, HPLC 分析, 各转化情况如表 2 所示。对 *Rhodotorula* sp. 及 *Saccharomyces* sp., 培养基 3[#] 的转化率都较 1[#]、2[#] 为好。因而, 在以后的试验中, 我们选择培养基 3[#] 作为转化培养基。

图3 转化产物的 ^{13}C -NMR 图谱Fig. 3 ^{13}C -NMR of the reductive products

- A. *Rhodotorula* sp. 转化产物 The reductive product of *Rhodotorula* sp.;
 B. *Saccharomyces* sp. 转化产物 The reductive product of *Saccharomyces* sp.

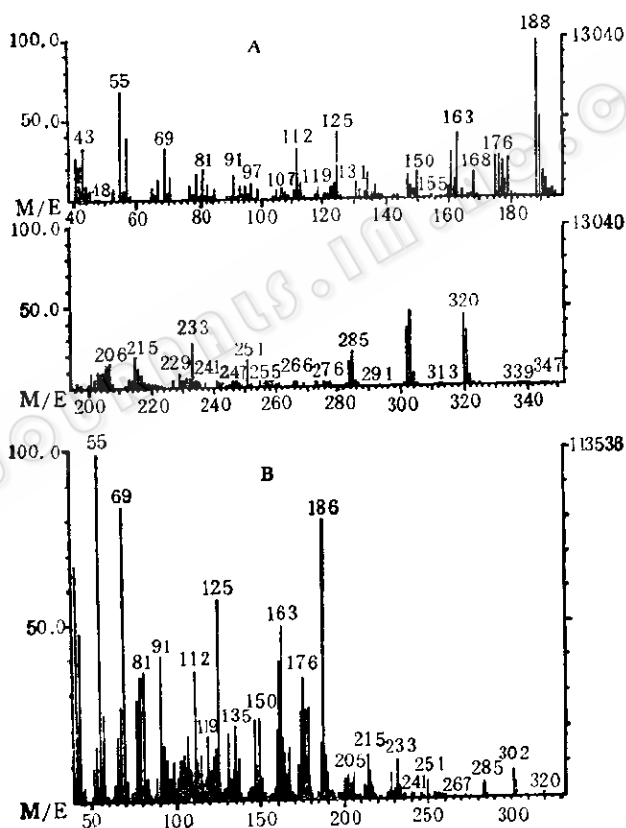


图4 转化产物的质谱图

Fig. 4 MS of the reductive products

- A. *Rhodotorula* sp. 的转化产物 The reductive product of *Rhodotorula* sp.;
 B. *Saccharomyces* sp. 的转化产物 The reductive product of *Saccharomyces* sp.

(四) 通气程度对转化率的影响
 一般微生物转化中, 通气情况对转化

率的影响较大。我们通过静止、振荡的方法来使转化时的通气程度有所不同, 并采

表 2 不同培养基对转化率的影响

Table 2 Effect of culture medium

菌株 Strains	转化率 Yield(%)	培养基 Culture medium		
		1#	2#	3#
<i>Rhodotorula</i> sp.	48	59	67	
<i>Saccharomyces</i> sp.	52	73	85	

取了密封振荡(见表 3)。结果表明这二株菌种转化过程中对通气要求不同,通气程度高对 *Saccharomyces* sp. 的转化极为有利,其转化率为 85%,而静止条件下转化率仅 32%,密封振荡条件下转化率为 21%。而通气程度高对 *Rhodotorula* sp. 的转化并不有利,静止条件下转化率(76%)均高于振荡(67%)及密封振荡(45%)。

表 3 通气情况对转化率的影响

Table 3 Effect of ventilation

通气情况 Ventilation	转化率 Conversion (%)	
	<i>Rhodotorula</i> sp.	<i>Saccharomyces</i> sp.
静止 Standing	76	32
振荡 Shaking (Open)	67	85
密封振荡 Shaking (Closed)	45	21

(五) 转化时间对转化率的影响

将 *Rhodotorula* sp. 前培养液接于 3# 培养基,培养后投入赤霉烯酮,投入量为每毫升培养基 50 μ g,不同时间取样,测定其转化率。由图 5 可见,转化时间在 48—72 小时为宜,且初始 pH(6.7 或 8.5)对转化率基本上无影响。

(六) 不同投料量对转化率的影响

为了提高转化效率,尽可能提高单位投料量的转化率,我们进行了不同投料量对转化率的影响的研究。转化条件为静止

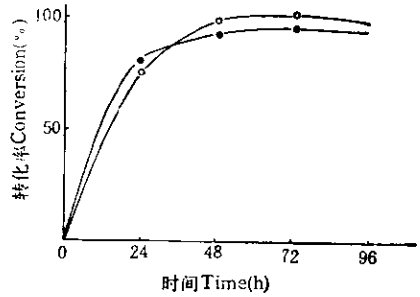


图 5 *Rhodotorula* sp. 还原赤霉烯酮时间进程

Fig. 5 Effect of time

—○— pH8.5; —●— pH6.7

培养, 3# 培养基, 菌体为 *Rhodotorula* sp., 转化 48 小时后,测定其转化率(见图 6)。可见,虽然投料量增加,相应的转化率有所下降,但投料浓度在 10—20% 时,48 小时的转化率均在 90% 以上,而当投料浓度在 25% 时,也只降至 85%,故在该条件下,投料浓度可为 20—25%。

(七) 休止细胞还原赤霉烯酮

将休止细胞置于不同溶液中,赤霉烯酮投料量为每毫升培养基 100 μ g,转化时间为 72 小时,各转化率见表 4。各溶液对休止细胞转化率影响不大,因而选用自来水作为休止细胞转化的溶液是较为简单而廉价的。溶液以中性为好。

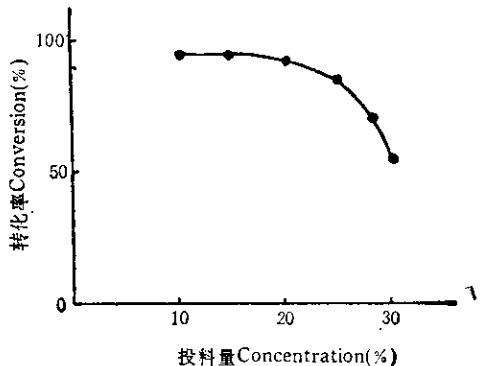


图 6 投料量与转化率的关系

Fig. 6 Effect of concentration of zearalenone

表 4 不同溶液对休止细胞转化率的影响

Table 4 Effect of conversion in various solutions by resting cell

不同溶液 Solution	生理盐水 Normal saline water	水 Water	葡萄糖 Glucose	磷酸缓冲液 Phosphate buffer 0.2 mol/L
转化率 Conversion (%)	95	94	92	82

* 各种溶液 pH = 8

参 考 文 献

- [1] Hadge, E. B. et al.: U. S. Patent, 3, 239, 348, 1966.
- [2] Hadge, E. B. et al.: U. S. Patent, 3, 239, 345, 1966.
- [3] 松浦・康、芳沢宅実; 食卫誌, 26: 24—28, 1985.
- [4] Mc-mullon, J. R.: U. S. Patent, 4, 004,978, 1977.
- [5] El-Sharkawy, S. et al.: J. Org. Chem., 53: 515—519, 1988.

BIOTRANSFORMATION OF ZEARALENONE

Wu Lianfen Wang Qiumin Wang Shuju Zhou Fengyi

(Shanghai Institute of Organic Chemistry, Academia Sinica, Shanghai 200032)

The conversion of Zearalenone by some strains of microorganisms was investigated. When the selective strains of *Rhodotorula* sp., *Arthrobacter* sp., *Saccharomyces* sp., and *Candida* sp. were incubated by shaking or standing at 28°C for 72 h with an alcoholic solution of Zearalenone as the substrate at a concentration of 2—10 mg/ml ethanol (50—100 µg/ml medium), it was readily converted to give Zearalenols, consisting either mainly

of the α -isomer (e.g. 96% in case of *Rhodotorula* sp. and 84% in case of *Arthrobacter* sp. as determined by HPLC) or β -isomer (e. g. 91% and 92% in *Saccharomyces* sp. and *Candida* sp., respectively). The structure of the product was confirmed by ^{13}C -NMR, MS and HPLC.

Key words

Zearalenone; Zearalenol