

根瘤菌 4012a 菌株产细胞分裂素发酵条件的研究*

贾小明 陈声明 闵航 钱泽澍

(浙江农业大学生物科学系 杭州 310029)

摘 要 用酶标免疫检测法研究了根瘤菌 4012a 菌株细胞分裂素发酵的适宜培养基和培养条件。结果表明, 其最佳培养基为(g/L): 葡萄糖 10.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.6, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.4, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.04, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1mg/L, 泛酸钙 100 $\mu\text{g/L}$, 腺嘌呤 200 mg/L。该菌株在 150 r/min 的旋转摇床上 27℃ 振荡培养 96h, 发酵液中细胞分裂素产量可达 908 $\mu\text{g/L}$, 生物活性(萝卜子叶扩大法)为 1 mg/L 激动素当量。

关键词 细胞分裂素, 根瘤菌, 发酵, 酶标免疫检测法(ELTSA)

分类号 Q939.97

细胞分裂素(Cytokinin, CTK)是一类植物激素, 它具有刺激细胞分裂, 促进侧芽发育, 维持蛋白质和核酸的合成, 延缓离体叶片衰老等作用。因此, CTK 在农业生产上应用广泛。目前, 商品细胞分裂素主要来源^[1]为化学合成, 存在产率低, 价格昂贵等问题, 生产仅为试剂级水平, 并且有些 CTK 种类我国目前尚不能合成, 依赖进口, 严重影响了人们在农业生产和生活上的需要。由于微生物具有生长速度快、生产周期短、培养条件易控制 and 不受季节限制等特点, 故用微生物合成、发酵生产 CTK 成为各国学者普遍关注的课题^[2,3]。本文报道用酶标免疫检测法研究根瘤菌 4012a 菌株产核糖核苷类 CTK 的发酵条件结果。

1 材料和方法

1.1 菌株、培养基和培养条件

1.1.1 菌株: 根瘤菌 4012a 菌株分离自蚕豆根瘤。

1.1.2 斜面培养基: 甘露醇酵母膏琼脂(YMA)。

1.1.3 基础培养基(g/L): 甘露醇 10, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.8, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.01, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2 mg, 蒸馏水 1.0 L, pH 6.8~7.0。115℃ 灭菌 30 min。

1.1.4 培养条件: 将在 YMA 斜面上 28℃ 培养 2 d 的根瘤菌 4012a 菌株用灭菌的生理盐水洗下, 制成菌悬液, 用灭菌的生理盐水调节菌体浓度在 A_{600} 处为 0.7。吸取 1ml 接入基础培养基中, 27℃ 150r/min 旋转式摇床上培养 4 d, 以改变基础培养基的成分及培养条件进行 CTK 发酵条件试验。

* 本研究得到浙江省教委和浙江农业大学科技基金资助。

收稿日期: 1996-10-21

1.2 材料

- 1.2.1 玉米素(Zeatin): 美国 Sigma 公司产品。
 1.2.2 生物素: 日本进口, 国内分装。
 1.2.3 Sep-pak C_{18} 柱: 美国 Waters 公司产品。
 1.2.4 ZRs ELISA 药盒: 南京农业大学植物激素研究室产品。
 1.2.5 酶联免疫检测仪: 华东电子管厂 DG-3022A 型。
 1.2.6 高速冷冻离心机: 美国 IEC B-20A 型。

1.3 分析方法

- 1.3.1 发酵液中 CTK 的分离提取: 发酵液用 6 mol/L HCl 调 pH 为 2~3, 40~50℃ 水浴酸化过夜, 8 000 r/min 离心 15 min, 上清液调 pH 至 8.5, 注入 C_{18} 柱用 80% 甲醇液洗脱。蒸去洗脱液中甲醇, 水相(含 CTK)用于酶联免疫测定(ELISA)。
 1.3.2 细胞分裂素的酶联免疫测定: 按 ZRs ELISA 药盒说明书进行。
 1.3.3 细胞分裂素的生物测定: 萝卜子叶扩大法^[4]。

2 结果和分析

2.1 碳氮源对 4012a 菌株产 CTK 的影响

以不同碳源(10g/L)和氮源(1g/L)替代基础培养基中的甘露醇和 $(NH_4)_2SO_4$, 进行

全交叉试验, 检查碳氮源对产 CTK 的影响。结果图 1 可见, 碳氮源是影响 CTK 产生的重要因素, 并且碳氮源搭配不同, 产量差异很大, 其中以葡萄糖为碳源、 $(NH_4)_2SO_4$ 为氮源时, CTK 产量最高。

2.2 不同无机盐对 4012a 菌株 CTK 发酵的影响

根瘤菌的生长需要各种矿质元素, 对矿质元素采用 $L_{16}(4^3)$ 正交表进行多因素正交试验, 结果见图 2。

从因素与 CTK 产量的正交试验直观图上可看出矿质元素的最佳水平

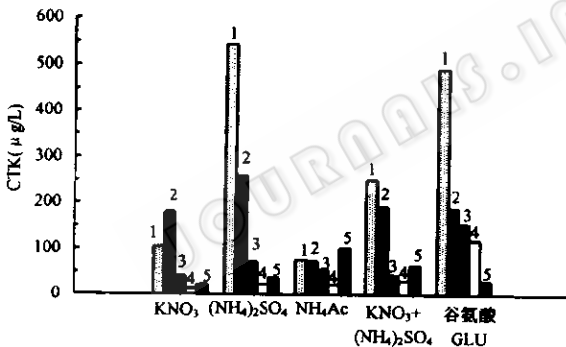


图1 碳氮源对4012a菌株产CTK的影响

1.葡萄糖; 2.甘露醇; 3.果糖; 4.蔗糖; 5.琥珀酸钠。

Fig. 1 Effects of different carbon and nitrogen sources on CTK produced by rhizobia strain 4012a

1. Glucose; 2. Mannose; 3. Fructose; 4. Sucrose; 5. Succinate.

佳水平分别应为(g/L): $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.6, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.4, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.04, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.1 mg/L。

2.3 维生素对 4012a 菌株产 CTK 的影响

在以硫酸铵为氮源、葡萄糖为碳源、矿质元素为最佳水平的培养基中分别添加 1~4 种不同的维生素, 每种维生素为 100μg/L 培养基, 测定维生素对产 CTK 的影响, 结果见表 1。

经统计分析可见, 添加单种或多种维生素对产 CTK 并无很大差异。而在添加单种维

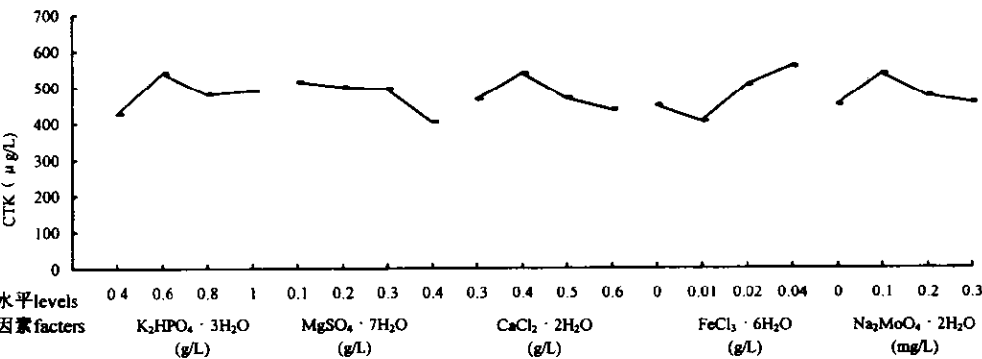


图2 5因素4水平[L₁₆(4⁵)]正交试验直观分析图

Fig. 2 The analytic diagrams of or thogonal design of experiment L₁₆(4⁵)

生素时,维生素种类之间的差异对产细胞分裂素的影响较大,其中添加泛酸钙、维生素 B₁能提高细胞分裂素的产量,而添加生物素和维生素 B₆反而会降低其产量。

2.4 前体物质对 4012a 菌株产 CTK 的影响

根据以上试验结果,在培养基中分别添加不同的前体物质,观察其对产 CTK 的影响。

表 2 可见,培养基中添加腺嘌呤明显提高 CTK 产量,腺嘌呤添加量从 50mg/ L 增至 200mg/ L, CTK 产量从 747μg / L 发酵液增至 903μg / L 发酵液。在无腺嘌呤的情况下添加天冬氨酸,CTK 产量变化不明显。当发酵液中存在腺嘌呤时,再添加天冬氨酸,CTK 产量下降。

2.5 不同装液量对 4012a 菌株产 CTK 的影响

250ml 三角瓶中分别装入不同体积发酵

表 1 不同维生素对 4012a 菌株产 CTK 的影响

Table 1 Effects of different vitamins on CTK produced by strain 4012a

No.	B ₁	B ₂	B ₆	生物素 Biotin	泛酸钙 Pantothenate	CTK (μg/L)
1			+			654
2		+				679
3	+					699
4				+		638
5					+	721
6			+	+		628
7	+			+		713
8		+		+		635
9				+	+	634
10			+		+	674
11	+		+			649
12		+			+	698
13	+				+	688
14		+	+			610
15	+	+				640
16	+	+	+			643
17	+		+		+	718
18		+	+	+		651
19			+	+	+	643
20		+	+		+	706
21	+		+	+		707

续表1

No.	B ₁	B ₂	B ₆	生物素 Biotin	泛酸钙 Pantothenate	CTK (μg/L)
22	+	+		+		687
23	+	+			+	716
24		+		+	+	663
25	+			+	+	655
26	+		+	+	+	646
27		+	+	+	+	652
28	+	+	+		+	708
29	+	+		+	+	645
30	+	+	+	+		692
ΣCTK (对“+”项试验求和)	10206	10025	9981	9889	10167	20092
“+”试验次数	15	15	15	15	15	30
CTK	680.4	668.3	665.4	659.3	677.8	669.2

注：“+”表示加入该种维生素。

27℃培养好的斜面菌种放在31℃恒温处理1d,然后27℃发酵,结果未测到CTK,这表明30℃是产CTK的阈值。

2.7 4012a 菌株 CTK 发酵周期

综合上述发酵条件试验的结果,CTK 发酵的最佳培养基配方为(g/L):葡萄糖 10.0, (NH₄)₂SO₄ 1.0, K₂HPO₄·3H₂O 0.6, MgSO₄·7H₂O 0.1, CaCl₂·2H₂O 0.4, FeCl₃·6H₂O 0.04, Na₂MoO₄·2H₂O 0.1 mg/L,泛酸钙 100 μg/L,腺嘌呤 200 mg/L。采用此培养基,在250 ml三角瓶内装50 ml培养液,27℃,150 r/min摇床进行CTK发酵。定时取样测定发酵液中CTK的含量。4012a菌株的发酵产CTK过程(图4)所示。24 h内细胞已开始生长,第72 h达到最大生长量,随后菌体生长量

下降。而CTK产量的增长比菌体生长量的增长滞后,24 h开始CTK不断增高,特别是72 h后产量迅速上升,96 h达最大值(908 μg/L)。

CTK是微生物的次生代谢产物,4012a菌株CTK发酵76h后细胞逐渐裂解自溶,细胞量开始下降,96hCTK产量下降。这与试验分析用的ZRs ELISA药盒有关。ZRs ELISA药盒可检测生物材料内CTK的ZR组(zeatin riboside group,简称ZRs),主要包括玉米素、

液,观察通气量对产CTK的影响,结果(图3)表明培养基的较适装量为50~75ml。

2.6 温度对4012a菌株产细胞分裂素的影响

从表3可见,温度对产CTK影响十分重要。根瘤菌4012a菌株产CTK的发酵温度为27℃,超过30℃则不能产生CTK。为进一步验证温度对4012a菌株产CTK的影响,将在

表2 添加前体物质对4012a菌株产CTK的影响
Table 2 Effects of precursor on CTK produced by strain 4012a

添加的前体物质 Precursor (mg/L)			CTK (μg/L)	添加的前体物质 Precursor (mg/L)			CTK (μg/L)
腺嘌呤 Adenine	天冬氨酸 Aspartic acid			腺嘌呤 Adenine	天冬氨酸 Aspartic acid		
50	0		747	0	200		736
100	0		830	200	50		794
200	0		903	200	100		670
0	50		728	200	200		587
0	100		731	0	0		716

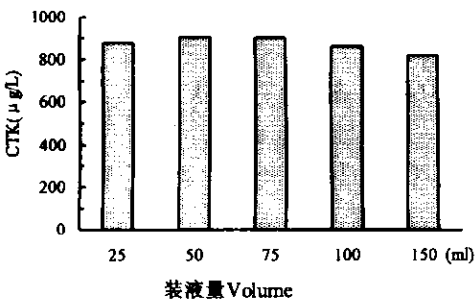


图3 不同装液量对4012a菌株产CTK的影响

Fig. 3 Effects of the various volume media in 250ml Elenmeyer flask on CTK produced by strain 4012a

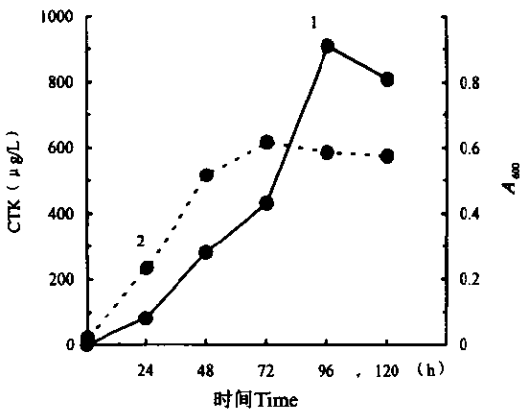


图4 4012a菌株CTK发酵的时间过程

1. CTK产量; 2.细胞量(A_{600}).

Fig. 4 The time course of CTK fermentation by strain 4012a

1.Yield of CTK; 2.Cell content (A_{600}).

玉米素核苷、9-葡萄糖基玉米素的总量,但不能检测其他种类的CTK。而生物体中的细胞分裂素是可以互相转化的。

2.8 4012a 菌株 CTK 的生物活性

对根瘤菌 4012a 菌株的发酵提取液进行萝卜子叶扩大法测定,其生物活性为 1 mg / LKE(kinetin equivalents)。

表3 温度对4012a菌株产CTK的影响

Table 3 Effect of temperature on CTK produced by Strain 4012a

菌种培养温度 Incubation temperature (±1℃)	发酵温度 Fermentation temperature (±2℃)	CTK产量 (μg/L)
27	24	892
27	27	905
27	32	0
27	35	0
32	27	0

3 讨论

在根瘤菌合成CTK的发酵条件中,营养是首要的,Phillips^[5]等在进行根瘤菌产CTK的研究中采用的是Valera^[6]的化学培养基。而该培养基是Valera用来进行植物组织培养的,基质内含有多种较适合植物细胞生长的微量元素和维生素,这显然不是根瘤菌产CTK的最佳基质。研究发现培养基中不同碳氮源组合对产CTK的影响较大,正确地组合碳氮源和调整矿质元素可提高CTK的产量。添加外源泛酸钙和B₁则促进CTK的合成。Norberg^[7]曾发现迈尔陶斯外担菌(*Exobasidium myrtilli*)只在含有腺嘌呤的培养基上产生CTK,而在天冬氨酸基质上不产CTK。Romanow^[8]等在根瘤土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)观察到同样情况。本实验观察到根瘤菌4012a菌株能在无腺嘌呤和天冬氨酸的化学合成培养基上产CTK。这表明4012a菌株能利用培养基中营养成分合成CTK,添加腺嘌呤显著提高CTK产量,这可能是该生物体合成CTK的途径与以上两种菌有所不同

同。

在产 CTK 发酵条件的诸多因素中,温度是极重要的。本研究观察到根瘤菌生长温度为 20~38℃,最适生长温度为 25~30℃,而 CTK 发酵的温度则为 27℃ 左右。超过 30℃,丧失 CTK 的合成能力。Regier 等^[9]报道根瘤土壤杆菌产 CTK 基因位于细胞体内的 T₁质粒上,而该质粒为温敏型,37℃ 以上即丢失。MacDonald 等^[2]报道萨氏假单胞菌 (*Pseudomonas savastanoi*) PB-213-2 菌株和 EW1006 菌株能分泌 CTK,但其质粒也易受温度影响而丢失。本试验观察到 4012a 菌株也有温敏现象,但是否属质粒调控,有待进一步探明。

参 考 文 献

- [1] 戎积圻,山四妹,马建国,生物化学与生物物理进展,1980,6:43~45.
- [2] MacDonald E M S, Powell C K, Regier D A *et al.* *Plant Physiol*, 1986, 82: 742~747.
- [3] 贾小明. 微生物学通报,1996, 23(4): 230~235.
- [4] 朱广廉,钟海文,张爱琴. 植物生理学实验. 北京: 北京大学出版社,1990.
- [5] Phillips D A, Torrey J G, *Physiol Plant*, 1970, 23: 1057~1063.
- [6] Valera C L, Alexander M. *J Bact*, 1965, 89: 1134~1139.
- [7] Norberg S O. *Symb Bot Ups*, 1968, 19: 1~117.
- [8] Romanow I, Chavignac M A, Pochon J. *Paris*, 1969, 117: 58~63.
- [9] Regier D A, Morris R O. *Biochem Biophys Res Commun*, 1982, 104: 1560~1566.

STUDIES ON FERMENTATION CONDITIONS OF CYTOKININ PRODUCED BY RHIZOBIA STRAIN 4012a

Jia Xiaoming Chen Shengming Min Hang Qian Zeshu

(Department of Biological Science, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029)

Abstract The conditions of cytokinin fermentation of the rhizobia strain 4012a were detected by the ELISA. The results indicated that the optimal medium for cytokinin production by strain 4012a was composed of glucose 10 g / L, (NH₄)₂SO₄ 1.0, K₂HPO₄ · 3H₂O 0.6, MgSO₄ · 7H₂O 0.1, CaCl₂ · 2H₂O 0.4, FeCl₃ · 6H₂O 0.04, Na₂MoO₄ · 2H₂O 0.1 mg / L, calcium pantothenate 100μg / L, adenine 200mg / L. When strain 4012a was grown in 250ml flask containing 50ml of the medium on the rotary shaker (150r/min) at 27℃ for 96h, the yield of CTK 908μg / L culture solution was obtained. It displayed bioactivity kinetin equivalents (KE) 1mg / L medium with the radish cotyledon expansion test.

Key words Cytokinin, Rhizobia, Fermentation, ELISA