

代谢促进剂对赤霉素发酵的影响及其补料发酵工艺研究

林璐¹, 彭辉¹, 聂志奎²

(1. 南京工业大学生物与制药工程学院, 江苏南京 211816; 2. 江西新瑞丰生化股份有限公司, 江西新干 331300)

摘要 针对藤仓赤霉菌的生长及其合成赤霉素 GA₃ 的代谢特征, 添加不同的表面活性剂和维生素, 考察其对藤仓赤霉菌的生长和赤霉素合成的影响, 获得最适的表面活性剂和维生素添加种类, 发现吐温-80、维生素 B₆、维生素 B₁₂、生物素有利于 GA₃ 的合成, 并对其添加量进行了优化。进一步建立了一种残糖反馈补料发酵工艺, 发现葡萄糖浓度对 GA₃ 的合成影响较大, 发酵过程中控制残留葡萄糖浓度为 30~40 g/L 时最有利于 GA₃ 的合成。在此操作条件下, 控制初糖浓度为 40 g/L, 进行了补料发酵, 最终 GA₃ 的发酵产量达到了 575.13 mg/L, 与分批发酵相比提高了 13.86%。

关键词 藤仓赤霉菌; 赤霉素; 发酵; 表面活性剂; 维生素; 补料工艺

中图分类号 Q393.97 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2022)23-0160-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2022.23.041



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Effects of Metabolism Promoter on Gibberellin Fermentation and Its Fed-batch Fermentation

LIN Lu¹, PENG Hui¹, NIE Zhi-kui² (1. College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing, Jiangsu 211816; 2. Jiangxi New Reyphon Biochemical Co., Ltd., Xingan, Jiangxi 331300)

Abstract According to the growth of *Fusarium fujikuroi* and its metabolic characteristics for gibberellin GA₃ biosynthesis, different surfactants and vitamins were added to investigate their effects on the growth of *Fusarium fujikuroi* and synthesis of gibberellin, and the optimum types of surfactants and vitamins were obtained. It was found that Tween-80, vitamin B₆, vitamin B₁₂ and biotin were beneficial to the synthesis of GA₃, and their addition amounts were optimized. Further, a residual glucose feedback fed-batch fermentation process was established, and it was found that the glucose concentration had a great effect on GA₃ biosynthesis, and the control of the residual glucose concentration to 30~40 g/L during the fermentation process was most beneficial to the synthesis of GA₃. Under this operating conditions, the initial sugar concentration was controlled at 40 g/L, and the fed-batch fermentation was performed, the final fermentation yield of GA₃ reached 575.13 mg/L, which increased by 13.86% compared with the batch fermentation.

Key words *Fusarium fujikuroi*; Gibberellin; Fermentation; Surfactant; Vitamins; Fed-batch process

赤霉素作为植物五大激素之一, 是一种天然植物生长调节剂, 对植物生长具有多种生理作用, 如调控植物的茎干延长、种子发芽、打破种子休眠、诱导开花等。目前赤霉素已经广泛应用于农业、林业和酿造业等, 具有很大的经济效益和市场前景^[1-4]。工业上, 赤霉素的合成主要通过藤仓赤霉菌深层液体发酵获得。然而, 高生产成本严重制约着赤霉素的广泛应用, 解决措施除了提高发酵菌种的性能外, 从发酵过程的精确控制等方面提高其生物合成效率亦是一种有效的方法。

在发酵过程中, 通过外源添加微量的代谢促进剂(表面活性剂、维生素等)能够显著提高发酵过程的产物产量, 该方法已被证明具有经济、简单、高效等优势, 广泛应用于发酵工业。表面活性剂是一类加入少量即能使其溶液体系的界面状态发生明显变化的物质, 据文献报道, 添加少量的表面活性剂能够提高发酵液中的溶氧水平, 促进发酵丝状真菌的生长和产物合成, 而且由于表面活性剂的特殊结构, 能够降低液体表面张力, 从而提高细胞膜的通透性, 促进细胞胞外代谢物的分泌^[5-6]。维生素是一类微生物生长所必需的微量有机物质, 能够调控微生物的物质代谢。例如维生素 B₆ 能促进乙酰辅酶 A 的合成, 而乙酰辅酶 A 是包括赤霉素在内的

萜类化合物合成前体; 维生素 B₁₂ 是以辅酶形式存在, 可以增加叶酸的利用率, 促进碳水化合物、脂肪和蛋白质的代谢; 生物素为羧化酶如丙酮酸羧化酶的辅酶, 可以促进胞内三羧酸(TCA)循环。因此维生素的添加也将改变微生物细胞内的代谢。该研究针对藤仓赤霉菌的生长和利用其合成赤霉素过程均为需氧过程, 且赤霉素为典型的胞外代谢产物这一特征, 研究添加不同种类的表面活性剂和维生素对藤仓赤霉菌生长和赤霉素合成的影响, 以期进一步提高藤仓赤霉菌合成赤霉素的效率; 在此基础上, 针对高浓度初始葡萄糖浓度易产生底物抑制及葡萄糖效应, 建立了一种残糖反馈的藤仓赤霉菌发酵产赤霉素的补料发酵工艺, 以使在实验室建立的发酵工艺更加适合于工业应用。

1 材料与方法

1.1 菌种 藤仓赤霉菌(*Fusarium fujikuroi*) 3-6-1, 南京工业大学合成生物制造工程实验室前期由 *Fusarium fujikuroi* CICC 2444 经过 ARTP 诱变获得, 该菌主要积累赤霉素 GA₃。

1.2 培养基 PDA 斜面培养基: 马铃薯块 200 g/L、葡萄糖 20 g/L、琼脂 15 g/L, pH 自然, 灭菌条件 121 °C、30 min。种子培养基: 葡萄糖 30 g/L、酵母膏 5.5 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.2 g/L、KH₂PO₄ 1.5 g/L、NaMoO₄·2H₂O 0.05 g/L、微量元素溶液 1 mL, pH 自然, 灭菌条件 121 °C 30 min。摇瓶发酵培养基: 葡萄糖 60 g/L、酵母膏 5.5 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.2 g/L、KH₂PO₄ 1.5 g/L、NaMoO₄·2H₂O 0.05 g/L、微量元素溶液 1 mL, pH 自然, 灭菌条件 121 °C、30 min。发酵罐发酵培养基: 葡萄糖 80 g/L、酵母膏 5.5 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.2 g/L、

基金项目 江苏省重点研发项目(BE2020782); 江西省重点研发项目(20181BBF60029); 江西省首批培养类科技创新高端人才(青年)项目(jxsq2019201089)。

作者简介 林璐(1983—), 女, 江苏扬州人, 实验师, 硕士, 从事微生物发酵工程研究。

收稿日期 2022-06-14

KH_2PO_4 1.5 g/L、 $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g/L、微量元素溶液 1 mL, pH 自然, 灭菌条件 121 °C、30 min。微量元素溶液: H_3BO_3 300 mg/L、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 100 mg/L、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 100 mg/L、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 200 mg/L、 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 500 mg/L。

1.3 培养方法

1.3.1 PDA 斜面培养。在超净台中吸取甘油管中的藤仓赤霉菌液 200 μL 接种到 PDA 斜面培养基中, 在恒温培养箱中 28 °C 培养 2~3 d, 直至菌丝长满整个斜面。

1.3.2 种子培养。将“1.3.1”培养好的菌种斜面用无菌水冲洗菌丝体, 接种于种子培养基, 于 28 °C、200 r/min 条件下培养 36 h。

1.3.3 摇瓶发酵培养。挑取生长良好的种子培养液接种于摇瓶发酵培养基中, 初始 pH 为 4.0, 接种量为 5%, 于 28 °C、200 r/min 条件下培养 10 d。

1.3.4 发酵罐发酵培养。采用 NBS 7.5 L 发酵罐进行培养, 挑取生长良好的种子培养液接种于发酵罐发酵培养基中, 初始 pH 为 4.0, 接种量为 5%, 于 28 °C、200 r/min 条件下培养 10 d。补料发酵时, 添加 500 g/L 葡萄糖溶液。

1.4 分析方法

1.4.1 菌体生物量测定。采用干重法, 取一定量的菌液经过真空抽滤, 并用去离子水洗涤 2 次, 得到的菌丝体经过 60 °C 恒温烘干至恒重。

1.4.2 葡萄糖含量测定。取一定量的发酵液, 离心后取上清 100 μL 定容至 10 mL, 用 SBA-40C 生物传感器检测。

1.4.3 赤霉素 GA_3 产量测定。采用高效液相色谱法, 方法如下: 样品预处理, 将发酵结束后的发酵液经过 12 000 r/min 离心 5 min 取得上清液, 上清液通过 0.22 μm 水系膜过滤后, 装入液相进样瓶中, 进行液相分析。色谱条件: DionexU3000 型高效液相色谱仪, Venusil MP C_{18} 柱 (Ageia Technologies, 填料粒径 5 μm), 流动相为甲醇+水+磷酸 (体积比为 68.00:32.00:0.05), 流速 0.8 mL/min, 检测波长 210 nm, 进样量 10 μL 。

2 结果与分析

2.1 表面活性剂对赤霉素合成的影响

2.1.1 添加表面活性剂的筛选。选择十二烷基磺酸钠 (SDS)、甜菜碱、吐温-80、聚乙二醇、司班-80、硬脂酸 6 种不同的表面活性剂, 在发酵初始时, 均以 2% (v/v) 的添加量加入发酵培养基中^[7], 结果如表 1 所示。

表 1 添加不同表面活性剂的发酵结果

Table 1 Fermentation results of adding different surfactants

表面活性剂 Surfactant	GA_3 产量 GA_3 yield mg/L	生物量 Biomass g/L
十二烷基磺酸钠 SDS	483.98	17.74
甜菜碱 Betaine	463.62	18.84
吐温-80 Tween-80	496.78	18.44
聚乙二醇 Polyethylene glycol	426.12	16.73
司班-80 Sban-80	443.04	17.62
硬脂酸 Stearic acid	469.12	18.05
对照 Control	463.85	17.43

分析表 1 结果可知, 添加 6 种不同表面活性剂的试验组与对照组相比, 生物量无明显的变化, 说明该表面活性剂对藤仓赤霉菌生长没有毒副作用。其中添加 SDS、吐温-80、硬脂酸均对 GA_3 产量有促进作用, 其他添加组 GA_3 产量则有一定量的下降。添加吐温-80 的 GA_3 产量最高, 达 496.78 mg/L, 与对照组相比提高了 7.10%。所以下一步将探究吐温-80 的添加量对 GA_3 合成的影响。

2.1.2 吐温-80 添加量对赤霉素合成的影响。在发酵初始时, 在发酵培养基中添加体积比分别为 0.1%、0.5%、1.0%、2.0%、5.0% 的吐温-80, 发酵结束后, 测定生物量与 GA_3 产量, 结果如图 1 所示。由图 1 可知, 与对照相比, 随着吐温-80 的浓度增加, 生物量与 GA_3 产量均有一定程度的提高。但当吐温-80 的浓度提高至 5.0% 时, 生物量与 GA_3 产量出现大幅下降, 说明吐温-80 浓度过高对细胞生长具有毒害作用。当吐温-80 浓度为 1.0% 时, GA_3 产量最高, 达 498.53 mg/L, 与对照相比提高了 7.87%。因此确定吐温-80 的最佳添加量为 1.0%。

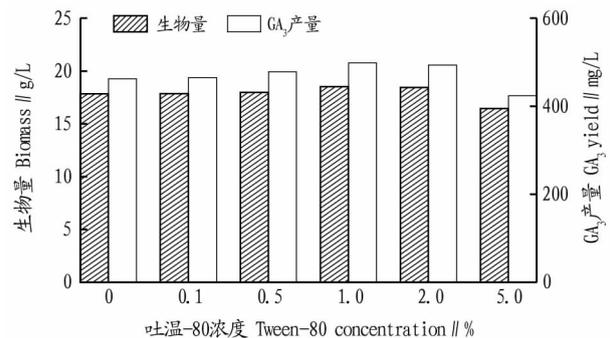


图 1 添加不同浓度吐温-80 对赤霉素合成的影响

Fig.1 Effect of adding different concentrations of Tween-80 on GA_3 synthesis

2.2 维生素对赤霉素合成的影响

2.2.1 添加维生素种类的筛选。选择维生素 B_1 、维生素 B_6 、维生素 B_{12} 、生物素、维生素 C 5 种维生素, 在发酵初始时, 均以 0.2 mg/L 的添加量加入发酵培养基中, 结果如表 2 所示。由表 2 可知, 添加 5 种不同维生素的试验组与对照组相比, 生物量均有不同程度的提高, 说明维生素能够促进藤仓赤霉菌的生长。其中添加生物素时生物量最高, 达 24.16 g/L。另外添加维生素 B_6 、维生素 B_{12} 、生物素均对 GA_3 产量有促进作用, 而维生素 B_1 和维生素 C 则对 GA_3 合成具有抑制作用, 产量均出现降低。下一步拟探究维生素 B_6 、维生素 B_{12} 、生物素的添加量对 GA_3 合成的影响。

表 2 添加不同维生素的发酵结果

Table 2 Fermentation results of adding different vitamins

维生素 Vitamin	GA_3 产量 GA_3 yield//mg/L	生物量 Biomass//g/L
维生素 B_1 Vitamin B_1	378.42	21.63
维生素 B_6 Vitamin B_6	546.12	21.46
维生素 B_{12} Vitamin B_{12}	573.11	18.44
生物素 Biotin	513.56	24.16
维生素 C Vitamin C	412.72	18.12
对照 Control	465.12	17.74

2.2.2 维生素 B₆ 添加量对赤霉素合成的影响。在发酵开始时,在发酵培养基中添加维生素 B₆,使其终浓度分别为 0.05、0.10、0.20、0.30、0.50 mg/L,对照为不添加任何物质。在发酵结束后测定生物量与 GA₃ 产量,结果如图 2 所示。由图 2 可知,与对照相比,添加维生素 B₆ 时,生物量均有不同程度的提高,说明维生素 B₆ 可以促进菌体生长。当维生素 B₆ 添加量为 0.20 mg/L 时,生物量最高,达 21.55 g/L,与对照相比提高了 20.86%。而随着维生素 B₆ 添加量的增加,GA₃ 产量呈现先上升后下降的趋势。在维生素 B₆ 添加量为 0.10 mg/L 时,GA₃ 产量最高,达 553.31 mg/L,与对照相比提高了 19.40%。由于维生素 B₆ 不仅参与生物体内的转氨基反应,还参与辅酶 A 的合成,所以维生素 B₆ 促进 GA₃ 合成的原因可能是其促进合成大量 GA₃ 前体物质辅酶 A,从而提高 GA₃ 产量。

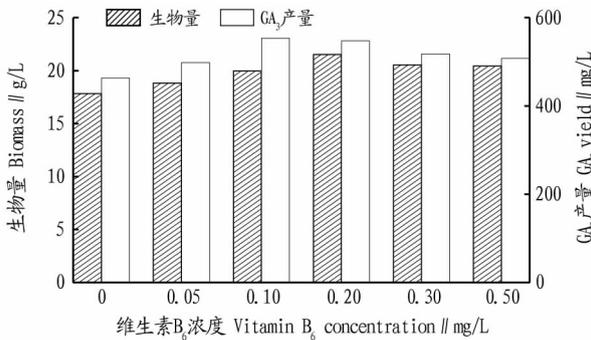


图 2 添加不同浓度维生素 B₆ 对赤霉素合成的影响

Fig.2 Effect of adding different concentrations of vitamin B₆ on GA₃ synthesis

2.2.3 维生素 B₁₂ 添加量对赤霉素合成的影响。发酵开始时,在发酵培养基中添加维生素 B₁₂,使其终浓度为 0.05、0.10、0.20、0.30、0.50 mg/L,对照为不添加任何物质。在发酵结束后测定生物量与 GA₃ 产量,结果如图 3 所示。由图 3 可知,与对照相比,添加维生素 B₁₂ 时,生物量的变化不明显,说明维生素 B₁₂ 对菌体生长影响较小。而维生素 B₁₂ 的添加显著提高了 GA₃ 产量,在维生素 B₁₂ 添加量为 0.10 mg/L 时,GA₃ 产量最高,达 572.17 mg/L,与对照相比提高了 24.34%。当维生素 B₁₂ 的添加量超过 0.10 mg/L 时,GA₃ 产量不再提高反而有下降趋势,所以 0.10 mg/L 是维生素 B₁₂ 的最佳添加量。维生素 B₁₂ 促进 GA₃ 合成的原因可能是其作为辅酶提高了 GA₃ 合成过程中某些关键酶的活性,如维生素 B₁₂ 可以提高脱氢酶的活性^[7]。

2.2.4 生物素添加量对赤霉素合成的影响。发酵开始时,在发酵培养基中添加生物素,使其终浓度为 0.05、0.10、0.20、0.30、0.50 mg/L,对照为不添加任何物质。在发酵结束后测定生物量与 GA₃ 产量,结果如图 4 所示。由图 4 可知,与对照相比,添加生物素时,生物量明显提高,说明生物素有益于菌体生长。当生物素添加量为 0.20 mg/L 时,生物量最高,达 24.65 g/L,与对照相比提高了 38.25%。该结论与王宝贝等^[8]的研究结果一致。同时生物素的添加也提高了 GA₃ 产量,在生物素添加量为 0.50 mg/L 时,GA₃ 产量最高,达

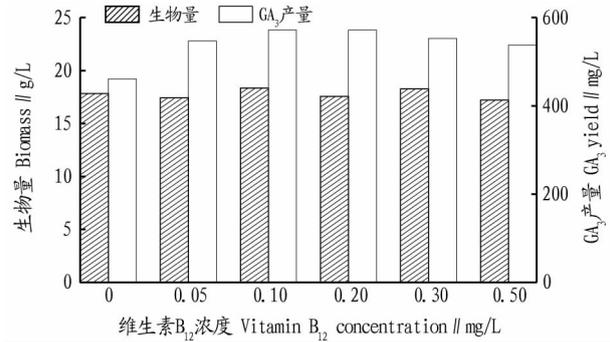


图 3 添加不同浓度维生素 B₁₂ 对赤霉素合成的影响

Fig.3 Effect of adding different concentrations of vitamin B₁₂ on GA₃ synthesis

519.37 mg/L,与对照相比提高了 12.24%。GA₃ 产量提高主要原因可能是生物素作为细胞内多种酶的辅酶,提高细胞整体代谢水平,从而提高了 GA₃ 的合成,另外可能是随着生物量的显著提高,GA₃ 产量也随之提高。

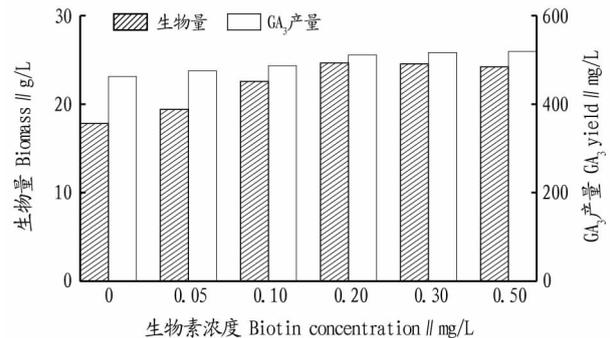


图 4 添加不同浓度生物素对赤霉素合成的影响

Fig.4 Effect of adding different concentrations of biotin on GA₃ synthesis

2.3 残糖反馈补料发酵工艺的建立 葡萄糖作为主要的发酵碳源,是细胞生长和能量的主要物质来源,同时也是藤仓赤霉菌合成 GA₃ 的底物。因此,葡萄糖的浓度和供应速率均会影响细胞的生长代谢和产物合成代谢,所以发酵过程中葡萄糖的浓度应保持在较低水平^[9-10]。葡萄糖补料发酵工艺可以克服该问题,可以同时利于细胞生长和产物合成。为此,建立了不同初始葡萄糖浓度的残糖反馈补料发酵工艺,将发酵液中的葡萄糖浓度控制在 10~20、30~40 g/L 低浓度水平,考察其对 GA₃ 发酵的影响。

2.3.1 初始葡萄糖 90 g/L 的分批发酵。在“2.1”和“2.2”的发酵考察过程中,均是以葡萄糖初始浓度为 90 g/L,在 7.5 L 发酵罐中进行分批发酵的,发酵生长曲线如图 5 所示。由图 5 可知,在 0~24 h 时菌体生物量在营养充足的条件下快速积累达到 15.63 g/L,之后生物量继续缓慢上升直至稳定期。这说明藤仓赤霉菌适应期极短,对环境的适应能力较强,高浓度的葡萄糖并没有抑制藤仓赤霉菌的生长。从葡萄糖消耗曲线来看,葡萄糖前期消耗较快主要用于菌体的生长,后期主要用于维持菌体生长和产物合成。从 GA₃ 合成曲线来看,在 0~72 h,氮源充足,GA₃ 合成速度较慢;在 72~168 h,氮源耗尽,葡萄糖浓度在 20~50 g/L,GA₃ 处于快速合成阶段;在

168~240 h, 菌体处于稳定期, 葡萄糖逐渐耗尽, GA_3 的合成几乎停滞。

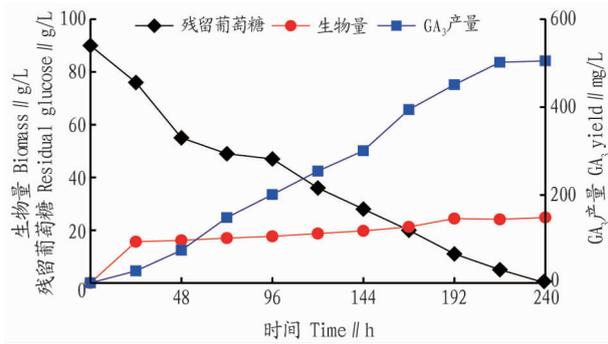


图5 藤仓赤霉菌分批发酵过程

Fig.5 Batch fermentation process of *Fusarium fujikuroi*

2.3.2 初糖 40 g/L 残糖控制在 30~40 g/L 的发酵。在初始葡萄糖浓度为 40 g/L 的发酵过程中, 当葡萄糖浓度低于 30 g/L 时, 添加葡萄糖以控制葡萄糖的浓度在 30~40 g/L, 发酵生长曲线如图 6 所示。由图 6 可知, 生物量的积累曲线与分批发酵相比几乎保持一致, 说明葡萄糖浓度为 30~40 g/L 时对菌体的生长影响较小。从 GA_3 合成曲线来看, GA_3 的积累曲线趋势与分批发酵一致, 均分为 3 个不同的阶段, 但是 GA_3 的合成速率高于分批发酵, GA_3 的最终产量为 575.13 mg/L, 与分批发酵相比提高了 13.86%。从该结果可以说明 GA_3 的合成速率与葡萄糖浓度相关, 过高或者过低均不利于 GA_3 的合成。

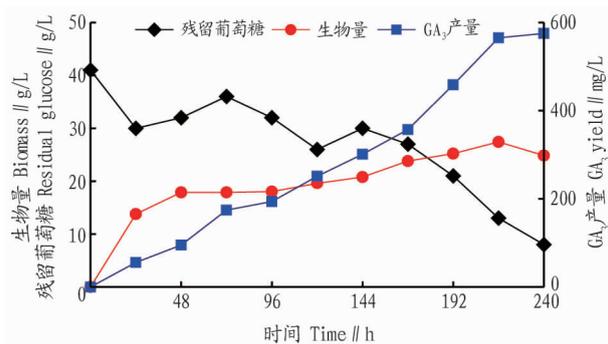


图6 初糖 40 g/L 残糖控制在 30~40 g/L 的发酵过程

Fig.6 Fermentation process with initial glucose concentration at 40 g/L with residual glucose controlled at 30~40 g/L

2.3.3 初糖 30 g/L 残糖控制在 10~20 g/L 的发酵。在初始葡萄糖浓度为 30 g/L 的发酵过程中, 当葡萄糖浓度低于 20 g/L 时, 添加葡萄糖以控制葡萄糖的浓度在 10~20 g/L, 发酵生长曲线如图 7 所示。由图 7 可知, 生物量的积累曲线与分批发酵相比几乎一致, 进一步证实葡萄糖浓度对菌体生长影响较小。从 GA_3 合成曲线来看, GA_3 的积累曲线趋势与分批发酵一致, 但是 GA_3 的合成速率低于分批发酵, GA_3 的最终产量为 394.44 mg/L, 与分批发酵相比降低了 21.98%。该结果也进一步可以说明 GA_3 的合成速率与葡萄糖浓度相关, 当浓度处于 10~20 g/L 不利于 GA_3 的合成。原因可能是当

葡萄糖浓度较低时, 藤仓赤霉菌偏向合成其他副产物, 如油脂、比卡菌素等。

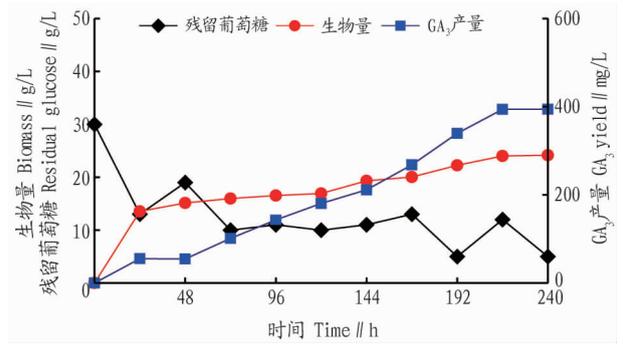


图7 初糖 30 g/L 残糖控制在 10~20 g/L 的发酵过程

Fig.7 Fermentation process with initial glucose concentration at 30 g/L with residual glucose controlled at 10~20 g/L

3 结论

针对藤仓赤霉菌的生长及其合成赤霉素 GA_3 的代谢特征, 添加不同的表面活性剂和维生素, 考察其对藤仓赤霉菌的生长和赤霉素合成的影响, 获得了最适的表面活性剂和维生素添加种类, 发现吐温-80、维生素 B_6 、维生素 B_{12} 、生物素有利于 GA_3 的合成, 并对其添加量进行了优化。由于优化后的培养基中葡萄糖浓度过高, 不利于菌体的快速生长和产物的快速合成, 建立了一种残糖反馈补料发酵工艺, 发现葡萄糖浓度对菌体生长影响不大, 但对 GA_3 的合成影响较大, 发酵过程中控制残留葡萄糖浓度为 30~40 g/L 时最有利于 GA_3 的合成。因此, 在此操作条件下, 控制初糖浓度为 40 g/L 进行了补料发酵, 最终 GA_3 的发酵产量达 575.13 mg/L, 与分批发酵相比提高了 13.86%。

参考文献

- [1] 彭辉, 施天穹, 聂志奎, 等. 微生物发酵产赤霉素的研究进展[J]. 化工进展, 2016, 35(11): 3611-3618.
- [2] 阙好新, 聂志奎. 赤霉素在葡萄酒生产中的应用研究[J]. 现代农业研究, 2021, 27(11): 46-47.
- [3] SHI T Q, PENG H, ZENG S Y, et al. Microbial production of plant hormones: Opportunities and challenges[J]. Bioengineered, 2017, 8(2): 124-128.
- [4] SHI T Q, GAO J, WANG W J, et al. CRISPR/Cas9-based genome editing in the filamentous fungus *Fusarium fujikuroi* and its application in strain engineering for gibberellic acid production[J]. ACS synthetic biology, 2019, 8(2): 445-454.
- [5] 朱艳, 袁其朋, 王航. 添加氧载体及表面活性剂对番茄红素发酵的影响[J]. 微生物学通报, 2006, 33(1): 90-93.
- [6] FUKUDA H, MORIKAWA H. Enhancement of γ -linolenic acid production by *Mucor ambigua* with nonionic surfactants[J]. Applied microbiology and biotechnology, 1987, 27(1): 15-20.
- [7] FRENKEL E P, KITCHENS R L, JOHNSTON J M. The effect of vitamin B12 deprivation on the enzymes of fatty acid synthesis[J]. Journal of biological chemistry, 1973, 248(21): 7540-7546.
- [8] 王宝贝, 凌雪萍, 郑宗宇, 等. 维生素对红法夫酵母产虾青素的影响[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2011, 50(1): 111-116.
- [9] JI X J, ZHANG A H, NIE Z K, et al. Efficient arachidonic acid-rich oil production by *Mortierella alpina* through a repeated fed-batch fermentation strategy[J]. Bioresource technology, 2014, 170: 356-360.
- [10] 聂志奎, 纪晓俊, 商静生, 等. 高山被孢霉发酵产花生四烯酸油脂的补料工艺[J]. 生物加工过程, 2015, 13(4): 1-6, 22.