

藤仓赤霉菌赤霉素生物合成及代谢调控研究进展

王冰璇¹, 司文³, 吴焯飞³, 张心齐¹, 汪石莹¹, 吴酬飞², 林海萍¹, 尹良鸿¹

1 浙江农林大学 生物农药高效制备技术国家地方联合工程实验室, 浙江 临安 311300

2 湖州师范学院 生命科学学院, 浙江 湖州 313000

3 浙江钱江生物化学股份有限公司, 浙江 海宁 314400

王冰璇, 司文, 吴焯飞, 等. 藤仓赤霉菌赤霉素生物合成及代谢调控研究进展. 生物工程学报, 2020, 36(2): 189–200.

Wang BX, Si W, Wu YF, et al. Research progress in biosynthesis and metabolism regulation of gibberellins in *Gibberella fujikuroi*. Chin J Biotech, 2020, 36(2): 189–200.

摘要: 赤霉素是最重要的植物生长调节剂之一, 在农业生产中得到越来越广泛的应用, 具有广阔的市场前景, 但其工业化的高生产成本严重制约着它的广泛应用。近年来, 利用生物技术提升赤霉素产量日益成为研究热点。赤霉素生物合成是多种酶协同作用的过程, 阐明赤霉素的生物合成机制, 利用代谢工程策略调控代谢流量, 对提高赤霉素产量至关重要。文中综述了当前藤仓赤霉菌赤霉素生物合成途径、关键酶、环境因素、代谢流调控等方面的研究进展, 在代谢调控方面进行了展望, 以期为实现赤霉素稳产高产提供思路。

关键词: 藤仓赤霉菌, 赤霉素, 生物合成, 代谢调控, 关键酶

Research progress in biosynthesis and metabolism regulation of gibberellins in *Gibberella fujikuroi*

Bingxuan Wang¹, Wen Si³, Yefei Wu³, Xinqi Zhang¹, Shiyong Wang¹, Choufei Wu², Haiping Lin¹, and Lianghong Yin¹

1 Local and National Joint Engineering Laboratory of Biopesticide High-efficient Preparation, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an 311300, Zhejiang, China

2 College of Life Sciences, Huzhou Normal University, Huzhou 313000, Zhejiang, China

3 Zhejiang Qianjiang Biochemical Co., Ltd., Haining 314400, Zhejiang, China

Abstract: Gibberellin is one of the most important plant growth regulators, and widely used in agricultural production. However, the high cost of gibberellins production is restricting its efficient application. In recent years, biotechnological

Received: May 14, 2019; **Accepted:** July 25, 2019

Supported by: Sub-project of National Key Research and Development Program (No. 2017YFD0201302-04), Collaborative Innovation Center of Zhejiang Green Pesticide Open Fund Programs (No. LSNY201815).

Corresponding authors: Haiping Lin. Tel: +86-571-63732757; Fax: +86-571-63740809; E-mail: zjlxylhp@163.com

Lianghong Yin. Tel: +86-571-63732757; E-mail: ylh4@163.com

国家重点研发计划 (No. 2017YFD0201302-04), 浙江省绿色农药 2011 协同创新中心开放基金 (No. LSNY201815) 资助。

网络出版时间: 2019-08-06

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.q.20190805.1053.001.html>

innovations have improved the synthesis of gibberellin. Gibberellin biosynthesis requires various enzymes. Current research focuses on the biosynthetic mechanisms of gibberellin and the metabolic engineering techniques to improve the production of gibberellin. This paper reviews the current research on gibberellin biosynthesis pathway, the key and enzymes environmental factors involved, and the metabolic regulation of gibberellin in *Gibberella fujikuroi*, summarizes the application of metabolic regulation in gibberellin biosynthesis, to provide the basis for achieving stable gibberellins production.

Keywords: *Gibberella fujikuroi*, gibberellins, biosynthesis, metabolic regulation, key enzyme

赤霉素 (Gibberellins, GA) 是一种天然的植物生长调节剂, 与生长素、细胞分裂素、脱落酸、乙烯被称为植物五大激素^[1]。1934年, GA由日本学者从恶苗病菌的发酵滤液中得到, 并于1938年正式命名为GA。至今已发现不同结构的GA有136种, 总称赤霉素类 (GAs)^[2]。具有生物活性的GA主要有GA₁、GA₃、GA₄、GA₇等, 它们的化学结构如图1所示^[3-4]。

研究表明, GA对植物生长具有多种调控功能, 可促进茎的伸长、诱导植株开花、打破种子休眠、增强植物抗性等^[6-7], 因而在农业、林业、食品酿造等方面有着巨大的应用潜力。植物、细菌和真菌的代谢物中均有GA产生^[8-10], 但在微生物体内的生理作用尚未研究透彻。

目前GA可通过化学合成、植物提取和微生物发酵三种方式获得。因为前两种方式成本高、效率低, 而微生物发酵法周期短、效率高, 所以微生物发酵法被广泛应用于工业大规模生产^[5]。目前, 藤仓赤霉菌(*Gibberella fujikuroi* W.为有性态, 无性态为藤仓镰孢菌 *Fusarium fujikuroi*)是工业生产的主要菌种, 国内GA₃工业生产水平在1 200–2 000 mg/L, 国外深层液态发酵可达到3 900 mg/L^[11], GA₄国内产量大约在600–800 mg/L^[12], 但随着GA的应用越来越广泛, 其产量已远远不能满足市场需求, 因此探索提高GA产量的方法十分必要。GA的生物合成途径是一个多种酶参与的复杂过程, 因此对途径中关键酶及酶基因的研究是实现GA定向调控必不可少

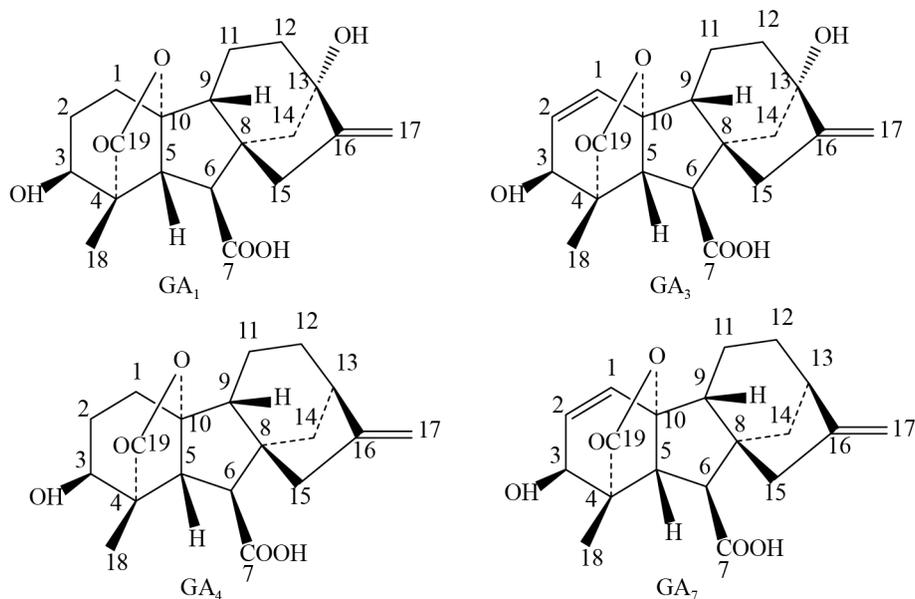


图1 GA₁、GA₃、GA₄、GA₇的化学立体结构^[5]

Fig. 1 The Chemical structural formula of GA₁, GA₃, GA₄ and GA₇^[5].

的, 再加上基因技术的不断发展, 利用基因工程菌生产 GA 已成为研究热点。本文就 *G. fujikuroi* 中 GA 的合成途径和相关酶及代谢调控研究进展进行综述, 以期为提高 GA 的产量提供思路。

1 GAs 生物合成途径

G. fujikuroi 中 GA 的生物合成途径^[13-14]已研

究得较为清楚 (图 2), 主要包括 3 个阶段: 牻牛儿牻牛儿焦磷酸 (Geranylgeranyl diphosphate, GGPP) 的合成、由 GGPP 合成 GA₁₂ 醛、GA₁₂ 醛转化为其他种类的 GA。

1.1 GGPP 的生物合成

该阶段是 *G. fujikuroi* 中 GA 合成的第一阶段, 其中 GGPP 是二萜类化合物的共同合成前体,

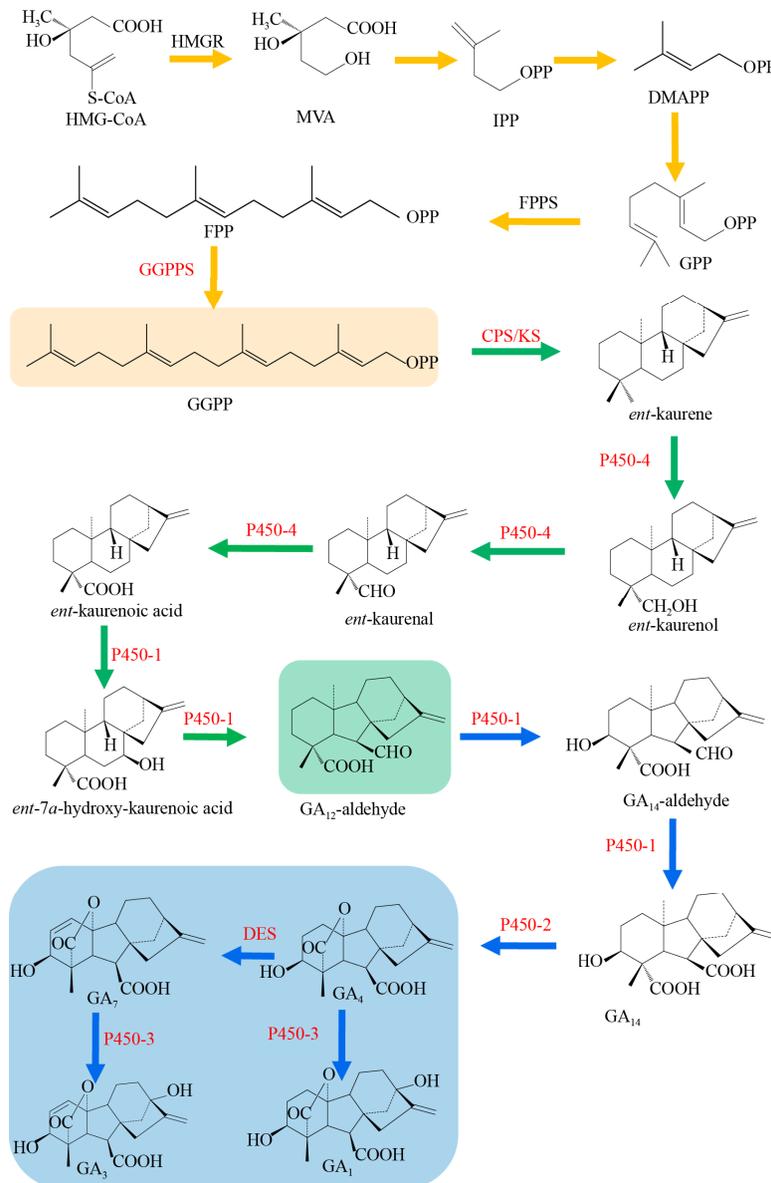


图 2 藤仓赤霉菌赤霉素的合成途径^[5,15]

Fig. 2 The gibberellin biosynthetic pathway in *G. fujikuroi*^[5,15]. The yellow arrow represents the synthesis of GGPP, the green arrow represents the synthesis of GA₁₂ aldehyde, and the blue arrow represents the synthesis of GAs. The Red-labeled enzymes are the enzymes encoded by the genes in the gene cluster mentioned below.

首先以内源乙酰-CoA^[4]为底物,在 3-羟基-3-甲基-戊二酰 CoA (3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A, HMG-CoA) 还原酶 (3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A reductase, HMGR) 的催化下生成 GA 的前体物质甲羟戊酸 (Mevalonic acid, MVA), 再生成异戊烯焦磷酸 (Isopentenyl pyrophosphate, IPP)、二甲基丙烯焦磷酸 (Dimethyl allyl pyrophosphate, DMAPP)、牻牛儿基焦磷酸 (Geranyl pyrophosphate, GPP)、法尼基焦磷酸 (Farnesyl pyrophosphate, FPP), IPP 与 FPP 相接, 形成 GGPP, 这是二萜的共同前体^[8]。

1.2 GA₁₂ 醛的生物合成

第二阶段 GA₁₂ 醛的合成过程中, GGPP 经过古巴焦磷酸合成酶 (Copalyl pyrophosphate synthase, CPS)、内根-贝壳杉烯合成酶 (*ent*-kaurenesynthase, KS) 的催化, 生成内根-贝壳杉烯。高度疏水的内根-贝壳杉烯在细胞色素 P450-4、P450-1 单氧酶的一系列催化下生成内根-贝壳杉烯酸、GA₁₂ 醛^[15]。

1.3 GAs 的生物合成

在该阶段 GA 可通过 P450 氧化酶同工酶的氧化, 生成一系列不同种类的 GA。首先 GA₁₂ 醛在 P450-1 酶的作用下, 经羟基化生成 GA₁₄ 醛, 之后转化为 GA₁₄^[16]。GA₁₄ 由 P450-2 酶催化转化为 GA₄^[17], GA₄ 既可以在 1,2-去饱和酶的作用下转化成 GA₇, 又可在 P450-3 酶的作用下转化为 GA₁。最后, GA₇ 在 P450-3 酶的作用下生成 GA₃。

2 调控 GAs 合成的关键酶

2.1 3-羟基-3-甲基-戊二酰 CoA 还原酶 (HMGR)

HMGR 是 GA 生物合成途径中第一个限速酶, 也是 GA 等萜类代谢过程中的关键调控位点, 催化 HMG-CoA 形成 MVA^[18]。Giordano 等^[19]研究 GA、胡萝卜素合成途径时发现, 洛伐他汀 (Lovastatin) 作为该酶的抑制剂, 只对 GA 的积累

有作用, 却不影响胡萝卜素的积累和菌丝生长, 说明有两种不同的合成路径在该菌株体内。通过分子杂交、PCR 扩增等表明合成基因是同一的, 但存在对 Lovastatin 的亚细胞结构障碍。有研究发现 HMGR 是由 *hmgr-1*、*hmgr-2*、*hmgr-3* 这 3 个基因组成的基因家族所编码, 且基因家族不同成员的表达量影响 MVA 途径中“碳流”的变化, 从而造成萜类产物的种类和产量不同^[20]。Albermann 等^[21]发现, *hmgr* 编码的 HMGR 由两部分组成, 分别为具有 8 个跨膜区域的疏水性 N 端结构域和亲水性 C 端结构域, 对 *hmgr* 的 C 端序列进行超表达, 结果显示 GA₃ 效价比亲本菌株增加 260%。MVA 途径存在于所有萜类化合物的合成过程中, 穗槐二稀同 GA 一样, 同属于萜类化合物, Keasling 等^[22]通过实验证明, HMGR 是穗槐二稀生成过程中的限速酶, 而且在酵母中过表达 tHMGR 后, 穗槐二烯产量大幅度提高, 说明通过增加 MVA 代谢流可以作为提高 GA 产量的一个新思路。

2.2 牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合酶 (GGPPS)

GGPPS 同 HMGR、FPP 合成酶 (FPPS) 共同参与调控 GGPP 的生成。Tudzynski 等^[23]敲除编码 GGPPS 基因 *ggs2* 后, 发现该菌株不再合成 GA。Albermann 等^[21]将 *ggs2* 超表达, GA 总产量增加近 135%, 说明 *ggs2* 编码的 GGPPS 参与了 GA 合成的关键步骤。对 *G. fujikuroi* 中 GA 合成途径中 HMGR、FPPS、GGPPS 等基因 *hmgr*、*fpps*、*ggs2* 超表达, 发现 *hmgr* 和 *fpps* 超表达后的菌株 GA 积累水平急剧降低, 可能是过多的前体物质引起了该途径的反馈抑制。

2.3 多功能合酶 (CPS/KS)

CPS/KS 作为 *G. fujikuroi* 中的一种多功能合酶, 同真菌中其他二萜环化酶一样, 主要以双功能环化酶的形式存在^[24]。在真菌中, 由 *cps/ks* 编码的 CPS/KS 双功能酶, 能够直接催化两步环化反应,

使 GGPP 向内根-贝壳杉烯转化。而 *cps/ks* 与 *ggs2* 紧密连锁, 共用一个 839 bp 的启动子, 这可能更好地促进 GGPP 合成^[25], 而且有研究表明, 将两者同时超表达, 总 GA 水平可提升 111 mg/(L·g)^[21]。

2.4 细胞色素 P450 酶系

细胞色素 P450 酶在植物、动物、细菌和真菌中广泛存在, 是自然界中含量最丰富、底物谱最广的催化酶系。Tudzynski 等^[23]通过 PCR 技术、差异基因筛选、限制酶介导的基因重组等方法发现在 *G. fujikuroi* 中, P450 酶与控制 GA 合成的另外两个基因 *cps/ks*、*des* 位于同一条染色体上, 组成了一个基因簇, 但转录方向并不一样, 该基因簇中, 除 *P450-3* 外, 其余均受氮源抑制, 如图 3 所示。Tudzynski 等^[26]敲除了 *des*、*P450-3*, 发现该敲除株只产生 GA_4 和 GA_7 。敲除 *des*, 则不再产生 GA_3 和 GA_7 , 而 GA_1 和 GA_4 则大幅增加。只敲除 *P450-3*, GA_4 和 GA_7 的产量提高, 但产物中不再有 GA_1 和 GA_3 。将 *des* 和 *P450-3* 同时敲除, 则该菌株只生成 GA_4 , 并且其产量比野生型高 7-8 倍。说明 *des* 编码 GA_4 去饱和酶, 催化 GA_4 向 GA_3 转化, *P450-3* 编码细胞色素 P450-3 单氧酶, 催化 GA_7 到 GA_3 和 GA_4 到 GA_1 的反应。*P450-4* 位于 *des* 右侧, 编码 P450-4 单氧酶, 该酶催化内根-贝壳杉烯生成内根-贝壳杉烯^[27]。*P450-1* 和 *P450-4* 是共享双向启动子的转录单元, P450-1 单氧酶主要催化内根-贝壳杉烯酸到 GA_{14} : 7 β -羟基化、氧化 C-6 位收缩 B 环、3 β -羟基化、氧化 C-7 位, 分别转化为内根-7 α -贝壳杉烯酸、 GA_{12} 醛、 GA_{14} 醛、 GA_{14} ^[8], 其中 3 β -羟基化是代谢调控或诱变筛选获

得高产 GA_{4+7} 的最主要途径^[28]。*P450-2* 位于 *P450-1* 的右侧, 编码 P450-2 单氧酶, 可催化 GA_{14} C-20 位氧化, 从而转化为 GA_4 。*P450-3* 是唯一不受高浓度氮源抑制的基因, 位于最下游, 编码细胞色素 P450-3 单氧酶, 催化 GA_7 到 GA_3 和 GA_4 到 GA_1 的反应^[27]。

2.5 谷氨酰胺合成酶 (GS)

谷氨酰胺合成酶 (Glutamine synthetase, GS) 是藤仓赤霉菌中合成谷氨酰胺的唯一酶, 还是参与氮代谢的关键酶。研究表明, 高浓度的谷氨酰胺能抑制所有氮源限制基因的表达, 当 GS 被移除后, 胞内谷氨酰胺处于较低水平, GA 合成基因则会大量表达, 导致 GA 大量合成^[29]。然而有研究表明, 当敲除 GS 的编码基因 *gln1* 后, GA 水平明显下降, 说明 *gln1* 涉及赤霉菌的代谢调控^[30]。

2.6 腺苷酸环化酶 (AC)

腺苷酸环化酶 (Adenyl cyclase, AC) 是参与调节细胞内多种生理功能的膜整合蛋白, 是调控真菌中环腺苷磷酸 (cAMP) 水平的关键酶^[31]。大量研究表明, 许多丝状真菌的发育、生长、抗逆等都受细胞跨膜信号 cAMP 转导途径的调控^[32]。Michielse 等^[33]与 García-Martínez 等^[34]证明, 在 *G. fujikuroi* 中, 当敲除编码腺苷酸环化酶基因后, GA 产量减少。Studt 等^[35]发现, AC 被异三聚体 G 蛋白 (Heterotrimeric G protein) α 亚基刺激, 合成 cAMP 后, 蛋白激酶 A (Pka) 被激活, 进而 Pka 通过对目的蛋白进行磷酸化修饰来改变蛋白活性, 调控 *G. fujikuroi* 代谢过程。

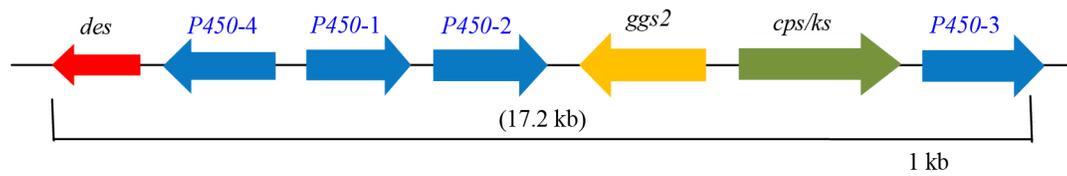


图 3 藤仓赤霉菌中赤霉素生物合成基因簇^[15]
Fig. 3 Gibberellin gene cluster in *G. fujikuroi*^[15].

3 调控 GAs 合成的环境因素

微生物培养基组分以及培养条件的变化均会引起 GA 合成代谢过程中关键酶及基因的变化,从而直接或间接调控着 GA 的合成代谢。

3.1 营养元素的调控

3.1.1 碳源

碳源作为微生物生长的物质基础,一方面为细胞生长提供必需的物质能量,另一方面也为代谢产物提供原料。葡萄糖、淀粉、蔗糖是目前最常用的碳源,过高的碳源浓度会因代谢抑制而限制 GA 的合成^[36]。González 等^[37]向培养基中添加淀粉和蔗糖的混合物能大幅提升 GA 产量。刘文芳等^[38]认为液化淀粉是 GA 发酵的最优碳源。甜菜渣、糖蜜、秸秆等也可为 GA 生产提供碳源。刘凤莉等^[39]在研究串珠镰孢菌 *Fusarium moniliforme* 固态发酵产 GA₃ 时发现,在培养基中添加酶解后的秸秆,产量能得到有效提高,达到 789.14 mg/kg。经研究发现,开始时高浓度的碳源会对 GA₃ 的合成产生抑制,但氮源耗尽时少量的碳源补充有利于细胞生长和 GA₃ 积累^[40]。可见碳源的种类及比例对赤霉素的产量有明显的影响,因此可通过合适的碳源配比来提升赤霉素生产水平。

植物油可作为迟效碳源,不仅为微生物生长发育提供能量,还能缓解中间代谢物的阻遏效应。植物油经过培养环境中脂肪酶的分解作用,形成脂肪酸和甘油,其中脂肪酸通过代谢途径中的 β -氧化,形成乙酰辅酶 A 参与合成。例如庄木坤等^[28]认为在培养过程中添加芝麻油、橄榄油、豆油能够提升 GA₃ 的效价。在抗生素的生产中,植物油也能提高产物效价,如 Park 等^[41]在头霉素 C 的研究过程中发现,8% (W/V) 的菜籽油与单一碳源淀粉相比,目的产物产量提高 2 倍。陈贵斌等^[42]发现以豆油为部分碳源进行头霉素 C 发酵,有利

于提高产素能力。将多种植物油加到红霉素发酵培养基中,可有效提升红霉素积累水平^[43]。

3.1.2 氮源

在 *G. fujikuroi* 的 GAs 合成途径中,高浓度的氮水平对 GAs 合成的影响尤为显著。Tudzynski 等^[13]克隆了 *areA-GF* 基因,该基因参与 *G. fujikuroi* 中氮代谢,而且缺失 *areA-GF* 基因的菌株只能利用谷氨酸盐和铵盐作为氮源,其 GA 产量较低。Mihlan 等^[29]证实 *areA-GF* 编码的蛋白质可以与 *cps/ks*、*des*、*P450-4*、*P450-2*、*P450-1*、*ggs2* 这 6 个基因的启动子结合。因此,*areA-GF* 的缺失将会造成这 6 个受氮调控基因的表达水平下降。敲除谷氨酰胺合成酶基因 *glnA-GF* 会造成 GAs 和比卡菌素产量急剧下降,说明 *glnA-GF* 有可能也参与 GAs 的生物合成氮代谢^[30]。Wong 等^[44]发现,在氮源充足时,*areA* 的活性受 *meaB* 与 *nmrA* 的影响。氮源不足的情况下,敲除 *meaB* 会造成 GA 生物合成途径中受氮调控基因的表达量急剧提升。敲除 *meaB* 和 *areA* 则导致 GA 合成基因不表达,合成比卡菌素合基因提高。因此,*meaB* 与 *areA* 相互作用,共同参与赤霉菌的氮代谢调控,且二者不可相互替代^[45]。

氮源种类也影响 GAs 的生物合成。常用的无机氮源有氯化铵、硝酸钾、硫酸铵,有机氮源有玉米浆粉、蛋白胨^[28]、豆粕粉、花生粉等^[46]。王卫等^[47]在培养基中加入不同种类的花生饼粉,结果表明,冷轧花生粉因含有大量蛋白大分子,而能够有效提升 GA₃ 产量。李明森等^[48]在研究 GA₃ 固体发酵时发现,向含有麸皮玉米面的培养基中分别添加硫酸铵、豆粕粉、花生饼粉、硝酸钾都使 GA₃ 效价降低,这可能是因为额外添加氮源造成营养物质消耗、菌体生长过快,限制了培养基的传热与溶氧,从而造成 GA₃ 效价降低。Lale 等^[49]研究表明,以小麦蛋白作为氮源,其 GA₃ 效价要比脱脂豆粕作为氮源产量要低,但 GA₄ 效

价却大幅提高。这说明氮源还可能对酶活性产生作用,从而导致 GA 种类和产量发生变化。

3.1.3 无机盐、氨基酸及其他物质

无机盐不仅为赤霉素积累的提供营养物质,为酶活性提供离子,还能控制氧化还原电位,平衡细胞渗透压。如储修云等^[50]通过在培养基中添加镁、硼、磷等提高了 GAs 的效价产量。氨基酸的种类及浓度影响 GA 的生产,缬氨酸能降低其产量,少量的酪氨酸、谷氨酸能提高 GA 生产水平。维生素 C 也会阻碍 GA₃ 的合成^[51]。在萜类的研究过程中发现,添加促进剂或诱导剂也能促进产物合成,如三孢布拉霉菌产番茄红素的发酵中,添加 β-紫罗酮、青霉素等物质后,番茄红素产量能高达 1.54 g/L^[52]。赤霉素也是萜类的一种,但目前赤霉素关于此方面研究较少,有待于深入探究。

3.2 培养条件

3.2.1 pH

培养基中不同的 pH 值会影响一些营养物质的电离程度,当菌体摄取这些营养物质时,会造成细胞内一些大分子如核酸、蛋白质等酸碱度变化,进而使它们的生物活性发生改变。微生物的生长和次级代谢产物与 pH 值有非常重要的关系。对于 GA₃ 的生产,pH 值大于 6.0,菌株主要产 GA₄ 和 GA₇,小于 3.5 主要产 GA₁^[14]。一方面可能是因为过高的 pH 导致 GA₄ 和 GA₇ 等中间代谢物分泌到胞外而不能再转运回胞内继续合成终产物 GA₃,另一方面可能是 pH 对 GAs 合成途径中的酶产生了影响^[10]。Bilkay 等^[53]指出 pH 为 5 时,黑曲霉发酵 GA₃ 产量达到 0.25 g/L;当 pH 为 3 和 7 时,GAs 的产量分别为 0.1 g/L 和 0.15 g/L。李明森等^[52]发现 pH 为 7 时固体培养 GA₃ 效价最高,为 9.832 g/kg。张文宣等^[54]在研究 GA₄₊₇ 大罐生产过程中,用流加补氨水替代碳酸钙进行 pH 调节,结果显示,调节 pH 值能明显提高 GA₄₊₇ 效价。由此可见,pH 会制约 GAs 的种类及含量,

因此在实践生产中,可通过调节发酵过程中的 pH 来指导生产。

3.2.2 温度

温度与微生物的生长存活密不可分,不同的温度可促进不同的酶活性,进而提升目的代谢物的积累速度。有研究指出,用串珠镰孢、*G. fujikuroi* 作为生产菌株生产 GA 适宜温度有 25 °C、27 °C、28 °C、29 °C、30 °C^[55-58]。Jefferys^[59]指出,29 °C 利于 *G. fujikuroi* 产 GA₃,高于 29 °C 效价降低,31-32 °C 时利于菌体生长。Meleigy 等^[60]认为,30 °C 利于串珠镰孢产 GA₃,高于 30 °C 效价降低,40 °C 抑制 GA₃ 积累。Escamilla 等^[11]研究证明,30 °C 有利于流化床培养固定化 *G. fujikuroi* 产 GA。王卫等^[46]发现对 GA₃ 发酵过程实施分阶段变温控制策略比恒温发酵产量提高了 11.14%。因此,在 GAs 生产过程中,可通过菌株的种类来探究适宜的温度,从而提高 GAs 产量。

3.2.3 溶氧

溶氧在微生物代谢中也发挥着巨大的作用,影响着细胞还原力 NADPH 和能量代谢。*G. fujikuroi* 生长和 GA 合成过程都要消耗氧气,因为此途径中有大量氧化反应,如脱氢酶、双加氧酶、P450 单氧酶所参与的反应都需要消耗氧气,所以足够的溶氧量必不可少^[13]。在 GAs 实际生产中,溶氧控制一般通过增大通气量、补水、降温、提高转速、添加表面活性剂、氧载体等方式解决。Borrow 等^[61]发现,在培养体系中通入少量二氧化碳能显著提升 GA₃ 产量,达到 0.62 g/L,而不添加二氧化碳 GA₃ 的产量仅 0.42 g/L。Machado 等^[62]在研究固体发酵时发现,在 72 h 之前提供低溶氧 (0.24 L/(h·kg)) 环境,之后提供高供氧 (0.72 L/(h·kg)) 环境,GA₃ 产量可达到最高。但是发酵过程中溶氧过高也会因菌体生长过快、副产物的大量生成等原因导致 GAs 产量降低。

过低溶氧量一方面会造成菌丝体内的代谢过

程发生变化,如厌氧呼吸会产生大量的乙酸、乙醇等,对细胞产生毒害;另一方面导致 pH 下降、菌丝体自溶、发酵终止、效价偏低。因此,在 GAs 的发酵过程中,充足的溶氧量至关重要。

4 调控 GAs 合成的代谢流

4.1 阻断分支途径关键酶基因调控

在 *G. fujikuroi* 的 GAs 合成过程中,可通过敲除分支途径关键酶基因,从而提高 GAs 产量,如 Wiemann 等^[63]将藤仓赤霉中编码磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶 (Phosphopantetheinyl transferase) 的 *ppt1* 基因敲除,造成聚酮化合物合酶 (PKSs) 和非核糖体缩氨酸合酶 (NRPSs) 活性丧失,从而导致与 PKSs 和 NRPSs 相关的下游代谢反应受到阻断,代谢流向 GAs 合成途径转移,使 GA 效价得到提升。目前,赤霉素在该方向的研究较少,可借鉴相关萜类化合物的研究作为参考。如番茄红素作为萜类化合物的一种,且在基因调控方面研究较为透彻,如 Miura 等^[64]将番茄红素合成基因 *crtE*、*crtB*、*crtI* 转入原本不产番茄红素的产蛋白假丝酵母 *Candida utilis* 后,该菌株开始产生番茄红素,通过切断其竞争途径麦角固醇的代谢通路,并使 HMGR 过表达,最终番茄红素产量提高 7 倍^[65]。

4.2 前体物质调控 GAs 合成

前体物是指加入到培养基中,能被微生物直接利用或参与目标产物的生成,通常有脂肪酸、柠檬酸、糖类、C₁ 化合物等一些初级代谢产物。

微生物在经过长期的进化演变,其代谢通常不产生多余的物质,调控点通常控制初级代谢分支首个酶的活性或合成,而添加前体物可以令次级代谢过程避开初级代谢对目标产物的调控。

但前体物的添加浓度不可过高,对菌有毒害作用,从而影响目标代谢物产量,过低则作用不显著。因此,前体物调控策略的研究对实现 GAs

高产稳产十分必要。Cihangir^[66]以 MVA 作为前体物加到浸没培养的黑曲霉 *Aspergillus niger* 中,探究 MVA 对该菌的生长和 GA₃ 产量的影响,发现添加少量 MVA 使 GA₃ 的产量提高近 50 mg/L。王卫等^[67]发现在培养基中添加草酰乙酸、维生素 B₂、葡萄糖酸钙能够大大提高 GA₃ 产量。目前,前体物质影响 GA 合成的相关研究较少,可通过其他萜类物质的相关研究,为提高 GAs 产量提供思路,如萜类化合物紫杉醇的培养过程中,添加前体物苯甲酸钠、乙酸钠、苯丙氨酸可有效促进紫杉醇的生成产量,产量最高可达 242.6 g/L^[68]。

5 总结与展望

近年来,随着生物化学、分子生物学等学科的不断发展,*G. fujikuroi* 产 GAs 的合成途径已逐渐清晰,合成途径中的大部分关键酶基因的功能也都研究得较为深入,但在代谢调控机制方面,前体物代谢调控方面研究不够深入,还有待于进一步探索。本课题组致力于 *G. fujikuroi* 中 GA₄ 的前体物代谢调控研究,发现前体物对 GA₄ 效价提高有显著影响。

目前 GA 的生产主要通过液态深层发酵来实现,但 GA 需求日益增长与工业生产的高成本形成了尖锐的矛盾。因此,一方面可利用代谢工程对 GA 合成途径进行分子改造,获得 GA 种类单一、稳产高产的工程菌株;另一方面可通过宏观代谢调控发酵工艺优化方式提高 GA 产量,具体体现在以下 3 个方面:1) 转移或构建新的细胞代谢流。通过对基因和基因簇的克隆、定点敲除、同源重组、定向诱变等方式构建新的细胞代谢流,提高 GA 积累水平。目前,用于 GA 生产的菌主要是 *G. fujikuroi* 和串珠镰刀菌。随着研究的不断深入,发现甲基营养型芽孢杆菌 *Bacillus methylotrophicus*^[69]、解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens*^[70]、草螺菌 *Herbaspirillum*

seropedicae^[71]等细菌也能产生 GA, 但目前能够应用于工业生产的细菌还未见报道。而且除 GA 外, 其他萜类化合物如 β -胡萝卜素、青蒿素等均在构建工程菌株展开了深入研究。因此, 可以借鉴其他萜类化合物的研究思路作为后续深入探究提升 GA 产量的新方向。2) 增加 GA 合成代谢流。一方面可以通过改造和调控微生物内源代谢途径, 提高限速酶的表达量。另一方面可以直接在发酵过程中添加前体物, 王卫等^[69]在培养基中添加 L-异亮氨酸、草酰乙酸、MVA 等合成前期的小分子物质, 较添加单一前体 MVA, GA₃ 产量提高了 11.6%。目前通过该方面进行调控 GA 产量的研究相对较少可进行深入探究。3) 发酵工艺优化。首先可以通过分析 *G. fujikuroi* 中 GA 代谢调控机制, 微观为思路, 宏观为导向, 对菌株最适生长条件进行优化; 其次创新开发新型的发酵方式, 满足 GA 的商业需求。

REFERENCES

- [1] Shen Q, Liu YY, Naqvi NI. Fungal effectors at the crossroads of phytohormone signaling. *Curr Opin Microbiol*, 2018, 46: 1–6.
- [2] Rodrigues C, de Souza Vandenberghe LP, Oliveira JD, et al. New perspectives of gibberellic acid production: a review. *Crit Rev Biotechnol*, 2012, 32(3): 263–273.
- [3] Hedden P, Thomas SG. Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochem J*, 2012, 444(1): 11–25.
- [4] Bömke C, Tudzynski B. Diversity, regulation, and evolution of the gibberellin biosynthetic pathway in fungi compared to plants and bacteria. *Phytochemistry*, 2009, 70(15/16): 1876–1893.
- [5] Peng H, Shi TQ, Nie ZK, et al. Fermentative production of gibberellins: a review. *Chem Ind Eng Progr*, 2016, 35(11): 3611–3618 (in Chinese).
彭辉, 施天穹, 聂志奎, 等. 微生物发酵产赤霉素的研究进展. *化工进展*, 2016, 35(11): 3611–3618.
- [6] Li QX, Zhang L, Wang Y, et al. The research progress of gibberellin on the regulation of flowering and floral organ development in plant. *Chin J Cell Biol*, 2019, 41(4): 746–758 (in Chinese).
- [7] Al-Aboudi A, Kana'An BM, Zarga MA, et al. Fungal biotransformation of diuretic and antihypertensive drug spironolactone with *Gibberella fujikuroi*, *Curvularia lunata*, *Fusarium lini*, and *Aspergillus alliaceus*. *Steroids*, 2017, 128: 15–22.
- [8] Kawaide H. Biochemical and molecular analyses of gibberellin biosynthesis in fungi. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2006, 70(3): 583–590.
- [9] Nett RS, Montanares M, Marcassa A, et al. Elucidation of gibberellin biosynthesis in bacteria reveals convergent evolution. *Nat Chem Biol*, 2017, 13(1): 69–74.
- [10] Nagel R, Peters RJ. Investigating the phylogenetic range of gibberellin biosynthesis in Bacteria. *Mol Plant Microbe Interact*, 2017, 30(4): 343–349.
- [11] Escamilla SEM, Dendooven L, Magaña IP, et al. Optimization of gibberellic acid production by immobilized *Gibberella fujikuroi* mycelium in fluidized bioreactors. *J Biotechnol*, 2000, 76(2/3): 147–155.
- [12] Zhang WX, Liu YX, Zhou JL, et al. The fermentation technology conditions of pilot plant for gibberellin A₄+A₇ in 5000 L tank. *Agrochemicals*, 2011, 50(11): 805–807 (in Chinese).
张文宣, 刘义雄, 周金龙, 等. 赤霉素 GA₄₊₇ 在 5000L 发酵罐中的中试发酵工艺. *农药*, 2011, 50(11): 805–807.
- [13] Tudzynski B. Biosynthesis of gibberellins in *Gibberella fujikuroi*: biomolecular aspects. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, 52(3): 298–310.
- [14] Tudzynski B. Gibberellin biosynthesis in fungi: genes, enzymes, evolution, and impact on biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 66(6): 597–611.
- [15] Salazar-Cerezo S, Martínez-Montiel N, García-Sánchez J, et al. Gibberellin biosynthesis and metabolism: A convergent route for plants, fungi and bacteria. *Microbiol Res*, 2018, 208: 85–98.
- [16] Rojas MC, Hedden P, Gaskin P, et al. The *p450-1* gene of *Gibberella fujikuroi* encodes a multifunctional enzyme in gibberellin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(10): 5838–5843.
- [17] Tudzynski B, Rojas MC, Gaskin P, et al. The gibberellin 20-oxidase of *Gibberella fujikuroi* is a

- multifunctional monooxygenase. *J Biol Chem*, 2005, 277(24): 21246–21253.
- [18] Zhang XW, Zhang D. Recent advances of secondary metabolites in genus *Fusarium*. *Plant Physiol J*, 2013, 49(3): 201–216 (in Chinese).
张晓伟, 张栋. 镰孢菌属真菌次生代谢产物的研究进展. *植物生理学报*, 2013, 49(3): 201–216.
- [19] Giordano W, Avalos J, Fernández-Martín R, et al. Lovastatin inhibits the production of gibberellins but not sterol or carotenoid biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. *Microbiology*, 1999, 145(10): 2997–3002.
- [20] Li L, Hu CH. Advance in fungal diterpene cyclase-A review. *Acta Microbiol Sin*, 2010, 50(11): 1438–1445 (in Chinese).
刘莉, 胡昌华. 真菌二萜环化酶的研究进展. *微生物学报*, 2010, 50(11): 1438–1445.
- [21] Albermann S, Linnemannstöns P, Tudzynski B. Strategies for strain improvement in *Fusarium fujikuroi*: overexpression and localization of key enzymes of the isoprenoid pathway and their impact on gibberellin biosynthesis. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(7): 2979–2995.
- [22] Keasling JD. Synthetic biology and the development of tools for metabolic engineering. *Metabol Eng*, 2012, 14(3): 189–195.
- [23] Tudzynski B, Hölter K. Gibberellin biosynthetic pathway in *Gibberella fujikuroi*: evidence for a gene cluster. *Fungal Genet Biol*, 1998, 25(3): 157–170.
- [24] Davis EM, Croteau R. Cyclization enzymes in the Biosynthesis of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes//Leeper FJ, Vederas JC, eds. *Biosynthesis*. Berlin: Springer, 2000, 209: 53–95.
- [25] Domenech CE, Giordano W, Avalos J, et al. Separate compartments for the production of sterols, carotenoids and gibberellins in *Gibberella fujikuroi*. *Eur J Biochem*, 1996, 239(3): 720–725.
- [26] Tudzynski B, Mihlan M, Rojas MC, et al. Characterization of the final two genes of the gibberellin biosynthesis gene cluster of *Gibberella fujikuroi*: *des* and *p450-3* encode GA₄ desaturase and the 13-hydroxylase, respectively. *J Biol Chem*, 2003, 278(31): 28635–28643.
- [27] Tudzynski B, Hedden P, Carrera E, et al. The *p450-4* gene of *Gibberella fujikuroi* encodes *ent*-kaurene oxidase in the gibberellin biosynthesis pathway. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(8): 3514–3522.
- [28] Zhuang MK, Wang JG, Ji ZX, et al. Effects of vegetable oils on ferment of gibberellin acid. *J Chin Cereals Oils Assoc*, 2008, 23(1): 77–80 (in Chinese).
庄木坤, 王继刚, 冀志霞, 等. 植物油对赤霉酸发酵的影响及其分析. *中国粮油学报*, 2008, 23(1): 77–80.
- [29] Mihlan M, Homann V, Liu TW, et al. *AreA* directly mediates nitrogen regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*, but its activity is not affected by *nmr*. *Mol Microbiol*, 2010, 47(4): 975–991.
- [30] Teichert S, Schönig B, Richter S, et al. Deletion of the *Gibberella fujikuroi* glutamine synthetase gene has significant impact on transcriptional control of primary and secondary metabolism. *Mol Microbiol*, 2004, 53(6): 1661–1675.
- [31] Shen K, Wang JJ, Tong YM, et al. Cloning and functional analysis of StAC gene in *Setosphaeria turcica*. *Sci Agric Sin*, 2013, 46(5): 881–888 (in Chinese).
申坤, 王晶晶, 佟亚萌, 等. 玉米大斑病菌腺苷酸环化酶基因的克隆与功能分析. *中国农业科学*, 2013, 46(5): 881–888.
- [32] Lengeler KB, Davidson RC, D'Souza C, et al. Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2000, 64(4): 746–785.
- [33] Michielse CB, Studt L, Janevska S, et al. The global regulator *FfSge1* is required for expression of secondary metabolite gene clusters but not for pathogenicity in *Fusarium fujikuroi*. *Environ Microbiol*, 2015, 17(8): 2690–2708.
- [34] García-Martínez J, Ádám AL, Avalos J. Adenylyl cyclase plays a regulatory role in development, stress resistance and secondary metabolism in *Fusarium fujikuroi*. *PLoS ONE*, 2012, 7(1): e28849.
- [35] Studt L, Humpf HU, Tudzynski B. Signaling governed by G proteins and cAMP is crucial for growth, secondary metabolism and sexual development in *Fusarium fujikuroi*. *PLoS ONE*, 2013, 8(2): e58185.
- [36] Wiemann P, Albermann S, Niehaus EM, et al. The Sfp-type 4'-phosphopantetheinyl transferase ppt1 of *Fusarium fujikuroi* controls development, secondary metabolism and pathogenicity. *PLoS ONE*, 2012, 7(5): e37519.

- [37] González PC, Delgado G, Antigua M, et al. Some Aspects of *Gibberella fujikuroi* Culture Concerning Gibberellic Acid Production//Galindo E, Ramírez OT, eds. *Advances in Bioprocess Engineering*. Dordrecht: Springer, 1994: 425–430.
- [38] Liu WF, Zhao XY, Tian YJ, et al. Fermentation conditions for gibberellin production by a *Gibberella fujikuroi* SFGi-1 strain. *China Brew*, 2010, 29(6): 117–120 (in Chinese).
刘文芳, 赵祥颖, 田延军, 等. 菌株 SFGi-1 产赤霉素发酵条件的研究. *中国酿造*, 2010, 29(6): 117–120.
- [39] Liu FL, Bai J, Li P, et al. Research on solid-state fermentation medium for gibberellin. *Guangdong Chem Ind*, 2018, 45(8): 38, 19 (in Chinese).
刘凤莉, 白净, 李攀, 等. 赤霉素固态发酵培养基的研究. *广东化工*, 2018, 45(8): 38, 19.
- [40] Liu WF. Study on the fermentation conditions of gibberellins produced by the strain SFGi-1[D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2010: 32–35 (in Chinese).
刘文芳. 菌株 SFGi-1 产赤霉素发酵条件的研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2010: 32–35.
- [41] Park YS, Momose I, Tsunoda K, et al. Enhancement of cephamycin C production using soybean oil as the sole carbon source. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1994, 40(6): 773–779.
- [42] Chen GB, Qi W, Guo B, et al. Study on the cephamycin C production using soybean oil as the part carbon source. *J Tianjin Inst Light Ind*, 1998, (2): 1–5 (in Chinese).
陈贵斌, 戚薇, 郭波, 等. 油为部分碳源发酵生产头孢霉素 C 的初步研究. *天津轻工业学院学报*, 1998, (2): 1–5.
- [43] Yang LF, Cao J, Zhang ZZ, et al. Effect of vegetable oils on the erythromycin fermentation. *Food Ferment Technol*, 2009, 45(4): 46–48 (in Chinese).
杨莲芳, 曹健, 张中州, 等. 不同种类植物油对红霉素发酵的影响. *食品与发酵科技*, 2009, 45(4): 46–48.
- [44] Wong KH, Hynes MJ, Todd RB, et al. Transcriptional control of *nmrA* by the bZIP transcription factor MeaB reveals a new level of nitrogen regulation in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol*, 2010, 66(2): 534–551.
- [45] Wagner D, Schmeinck A, Mos M, et al. The bZIP transcription factor MeaB mediates nitrogen metabolite repression at specific loci. *Eukaryot Cell*, 2010, 9(10): 1588–1601.
- [46] Wang W, Wu YH, Li JL, et al. Enhanced gibberellic acid production through the regulation of temperature in batch fermentation. *Chin J Appl Environ Biol*, 2017, 23(3): 432–436 (in Chinese).
王卫, 吴耀辉, 黎继烈, 等. 温度对赤霉素发酵的影响及优化策略. *应用与环境生物学报*, 2017, 23(3): 432–436.
- [47] Wang W. Screening high gibberellin acid producing strains from *Gibberella fujikuroi* and optimization on the fermentation conditions[D]. Changsha: Central South University of Forestry and Technology, 2015: 47–48 (in Chinese).
王卫. 高产赤霉素菌株选育及发酵工艺优化[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2015: 47–48.
- [48] Li MS, Han YL, Zhao XY, et al. Optimizing the gibberellin solid fermentation conditions of *Gibberella Fujikuroi* GLV-85. *Shandong Food Ferm*, 2012, (1): 3–8 (in Chinese).
李明森, 韩延雷, 赵祥颖, 等. 菌株 GLV-85 产赤霉素固体发酵条件的研究. *山东食品发酵*, 2012, (1): 3–8.
- [49] Lale G, Gadre R. Enhanced production of gibberellin A₄ (GA₄) by a mutant of *Gibberella fujikuroi* in wheat gluten medium. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2010, 37(3): 297–306.
- [50] Chu XY, Yin TS, Tang YH. Study on trace element additives in stimulating GA secretion and the rapid method for GA determination. *Guangdong Trace Elements Sci*, 1995, 2(6): 1–7 (in Chinese).
储修云, 印天寿, 唐玉华. 微量元素添加剂促进赤霉素分泌及赤霉素速测技术研究. *广东微量元素科学*, 1995, 2(6): 1–7.
- [51] Li MS. Study on fermentation and extraction process for GA₃[D]. Ji'nan: Shandong Polytechnic University, 2012: 8.
李明森. 赤霉素发酵及提取工艺的研究[D]. 济南: 山东轻工业学院, 2012: 8.
- [52] Xie SH, Yu XB, Gu QY. Enhancement of lycopene production by *blakeslea trispora* using carotenoid biosynthetic enzyme promoter. *Chin J Biopr Eng*, 2008, 6(2): 17–21 (in Chinese).
解书怀, 余晓斌, 顾秋亚. 代谢途径酶活促进剂对番茄红素发酵的影响. *生物加工过程*, 2008, 6(2): 17–21.

- [53] Bilkay IS, Karakoç Ş, Aksöz N. Indole-3-acetic acid and gibberellic acid production in *Aspergillus niger*. Turkish J Biol, 2010, 34(3): 313–318.
- [54] Zhang WX, Liu YX, Zhou SJ, et al. Study of replacing calcium carbonate with ammonium feeding in gibberellins A₄₊₇ fermentation. World Pesticid, 2011, 33(6): 48–51 (in Chinese).
张文宣, 刘义雄, 周圣骄, 等. 流加补氨水代替碳酸钙在赤霉素 GA₄₊₇生物发酵中的研究. 世界农药, 2011, 33(6): 48–51.
- [55] Kahlon SS, Malhotra S. Production of gibberellic acid by fungal mycelium immobilized in sodium alginate. Enzyme Microb Technol, 1986, 8(10): 613–616.
- [56] Bandelier S, Renaud R, Durand A. Production of gibberellic acid by fed-batch solid state fermentation in an aseptic pilot-scale reactor. Proc Biochem, 1997, 32(2): 141–145.
- [57] Uthandi S, Karthikeyan S, Sabarinathan KG. Gibberellic acid production by *Fusarium fujikuroi* SG2. Journal of Scientific and Industrial Research, 2010, 69: 211–214.
- [58] Berrios J, Pyle DL, Aroca G. Gibberellic acid extraction from aqueous solutions and fermentation broths by using emulsion liquid membranes. J Membr Sci, 2010, 348(1/2): 91–98.
- [59] Jefferys EG. The gibberellin fermentation. Adv Appl Microbiol, 1970, 13: 283–316.
- [60] Meleigy SA, Khalaf MA. Biosynthesis of gibberellic acid from milk permeate in repeated batch operation by a mutant *Fusarium moniliforme* cells immobilized on loofa sponge. Bioresour Technol, 2009, 100(1): 374–379.
- [61] Borrow A, Jefferys EG, Kessell RHJ, et al. The metabolism of *Gibberella Fujikuroi* in stirred culture. Can J Microbiol, 1961, 7(2): 227–276.
- [62] Machado CM, Oishi BO, Pandey A, et al. Kinetics of *Gibberella fujikuroi* growth and gibberellic acid production by solid-state fermentation in a packed-bed column bioreactor. Biotechnol Prog, 2010, 20(5): 1449–1453.
- [63] Wiemann P, Brown DW, Kleigrewe K, et al. FfVel1 and FfLae1, components of a velvet-like complex in *Fusarium fujikuroi*, affect differentiation, secondary metabolism and virulence. Mol Microbiol, 2010, 77(4): 972–994.
- [64] Miura Y, Kondo K, Shimada H, et al. Production of lycopene by the food yeast, *Candida utilis* that does not naturally synthesize carotenoid. Biotechnol Bioeng, 1998, 58(2/3): 306–308.
- [65] Shimada H, Kondo K, Fraser PD, et al. Increased carotenoid production by the food yeast *Candida utilis* through metabolic engineering of the isoprenoid pathway. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(7): 2676–2680.
- [66] Cihangir N. Stimulation of the gibberellic acid synthesis by *Aspergillus niger* in submerged culture using a precursor. World J Microbiol Biotechnol, 2002, 18(8): 727–729.
- [67] Wang W, Li JL, Shen JJ, et al. Selection of precursors for producing gibberellin acid by *Gibberella fujikuroi* and optimization of the fermentation process. Chin J Pharmaceut, 2016, 47(6): 692–695 (in Chinese).
王卫, 黎继烈, 沈珺珺, 等. 赤霉素发酵前体的筛选与发酵工艺优化. 中国医药工业杂志, 2016, 47(6): 692–695.
- [68] Dai WL, Cheng L, Tao WY. Application of response surface methodology in optimization of precursors for taxol production by *Fusarium mairei* K178. China Biotechnol, 2007, 27(11): 66–72 (in Chinese).
代文亮, 程龙, 陶文沂. 响应面法在紫杉醇产生菌发酵前体优化中的应用. 中国生物工程杂志, 2007, 27(11): 66–72.
- [69] Radhakrishnan R, Lee IJ. Gibberellins producing *Bacillus methylotrophicus* KE2 supports plant growth and enhances nutritional metabolites and food values of lettuce. Plant Physiol Biochem, 2016, 109: 181–189.
- [70] Shahzad R, Waqas M, Khan AL, et al. Seed-borne endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 produces gibberellins and regulates endogenous phytohormones of *Oryza sativa*. Plant Physiol Biochem, 2016, 106: 236–243.
- [71] Lee KE, Radhakrishnan R, Kang SM, et al. Enterococcus faecium LKE12 cell-free extract accelerates host plant growth via gibberellin and indole-3-acetic acid secretion. J Microbiol Biotechnol, 2015, 25(9): 1467–1475.

(本文责编 郝丽芳)