

# 赤霉酸产生菌 UF456发酵条件的研究

孙建义 翁晓燕

(浙江农业大学饮料科学研究所 杭州 310029)

**摘 要** 筛选出赤霉酸产生菌 UF456的发酵培养基配方,研究了各种碳源、氮源、碳氮比和不同微量元素对赤霉酸发酵的影响。结果表明:最佳碳源为玉米淀粉,含量为12.5%;最佳氮源为黄豆饼粉和花生饼粉,含量分别为0.3%和1.2%;微量元素  $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  和  $\text{Zn}^{2+}$  对赤霉酸发酵具有促进作用,其中  $\text{Fe}^{2+}$  尤为重要,三种元素不同的组合对赤霉酸发酵的促进作用都具有累加效应。

**关键词** 赤霉酸, 发酵条件

赤霉酸 (Gibberellic Acid, 简称  $\text{GA}_3$ ) 是一种植物生长激素,广泛应用于农业各领域,如打破休眠,促进种子发芽,诱导植物开花,提高作物产量等;在大麦发芽过程中应用赤霉酸可以提高麦芽质量<sup>[1]</sup>。赤霉酸由赤霉菌产生,不同菌株,其发酵条件具有显著的差异<sup>[2,3]</sup>。本研究室筛选出高产菌株 UF456,为了提高赤霉酸的效价,筛选了 UF456 菌株的发酵培养基配方,研究了各种碳源、氮源、碳氮比和微量元素对赤霉酸发酵的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株

赤霉酸产生菌 UF456,由本研究室提供。

### 1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基: PDA 培养基。

1.2.2 种子培养基 (%): 葡萄糖1.5, 糊精1.0, 花生饼粉1.5,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.075,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1, 自然 pH。

1.2.3 发酵培养基 (%): 玉米淀粉10,  $\alpha$ -淀粉酶0.03, 花生饼粉1.2, 黄豆饼粉0.3,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.075, 自然 pH。

1.2.4 用于微量元素试验的培养基 (%): 葡萄糖10,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0.2,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.075, 微量元素  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  各为0.07, 自然 pH。

### 1.3 分析方法

1.3.1 pH: 用 pH S-2型酸度计(上海第二分析仪器厂产品)测定。

1.3.2 含糖量测定: 斐林滴定法。

1.3.3 含氮量测定: 凯氏定氮法。

1.3.4 赤霉酸定量测定: 发酵液过滤, 用蒸馏水将滤液进行适当稀释, 然后用分析纯无水乙醇稀释10倍。取1ml 稀释液加1ml 无水乙醇, 缓慢加入浓硫酸(硫酸:乙醇18:1)18ml, 振荡混匀, 28℃保温1小时, 进行荧光比色测定。

## 2 结果和讨论

### 2.1 发酵培养基的筛选

将 UF 456 PDA 斜面种子制备成菌悬液, 接入种子培养基中 (250ml 三角瓶装 30ml), 28℃230r/min 振荡培养30小时左右。按10%的接种量接入所筛选的发酵培养基(表1)中, 在28℃于230r/min 振荡培养168小时, 然后定量测定赤霉酸的含量。结果表明, 培养基 B 所产生的赤霉酸含量最高, 其次是培养基 C 和 D, 而培养基 A 较差。

表1 发酵培养基的组成及 UF456 产 GA<sub>3</sub> 的比较

Table 1 The composition of various medium formula and comparison of the yield of GA<sub>3</sub> produced by strain UF456

	培养基 Medium (%)			
	A	B	C	D
葡萄糖 Glucose	9.0		4.0	
糊精 Dextrin			1.0	5.0
饴糖 Starch syrup			5.0	6.0
玉米淀粉 Corn starch		10.0		1.0
α-淀粉酶 α-Amylase		0.03		
花生饼粉 Peanut meal		1.2	1.5	2.0
黄豆饼粉 Soybean cakemeal		0.3		
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.2			
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.10	0.10	0.20	0.25
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.075	0.075	0.075	0.100
微量元素 Microelements	0.07			
产量 Yield of GA <sub>3</sub> (mg/L)	813	1350	1300	1230

### 2.2 碳源对赤霉酸发酵的影响

采用无玉米淀粉的发酵培养基 B, 加入各种不同碳源进行赤霉酸发酵, 各种碳源的加入量相当于10%玉米淀粉中的含碳量, 其它条件同上。试验结果(表2)表明, 玉米淀粉和可溶性淀粉作为碳源时, 产量最高; 用糊精、葡萄糖、甘薯淀粉、蔗糖、甘蔗糖蜜作碳源时, 赤霉酸产量依次降低。蔗糖需经胞内蔗糖酶分解, 才能被菌丝利用, 因此其效果较直接利用的葡萄糖差。高浓度葡萄糖会使赤霉酸发酵产生反馈抑制效应<sup>[4,5]</sup>, 因此多糖类作为碳源效果较佳, 而甘薯淀粉比玉米淀粉支链多<sup>[6]</sup>, 在灭菌过程中糊化易使发酵液产生胶状变稠, 使发酵液的传氧效率降低, 从而影响菌体生长和赤霉酸发酵。至于甘蔗糖

蜜,因其含有5—12%的胶体物(由果胶质、蔗糖和黑色素组成)<sup>[6]</sup>,易吸附在菌丝体表面,阻碍其新陈代谢,抑制了赤霉酸发酵,因此甘蔗糖蜜作为碳源使用时,必须经过预处理将糖蜜中的胶体物质除去。

表2 碳源对赤霉酸发酵的影响  
Table 2 Effects of carbon sources on GA<sub>3</sub> fermentation

碳 源 Carbon sources	甘蔗糖蜜 Sugar cane molasses	蔗糖 Sucrose	甘薯淀粉 Sweet potato starch	葡萄糖 Glucose	糊精 Dextrin	可溶性淀粉 Soluble starch	玉米淀粉 Corn starch
产量 Yield of GA <sub>3</sub> (mg/L)	517	812	858	936	1118	1235	1260
pH	6. 67	3. 57	3. 67	3. 66	3. 53	3. 62	3. 53

2.3 不同氮源对赤霉酸发酵的影响

采用无花生饼粉和黄豆饼粉的发酵培养基B,然后加入各种氮源。氮源的加入量相当于1.2%花生饼粉和0.3%黄豆饼粉的总含氮量,其他条件同上。试验结果(表3)表明,用有机氮源(如黄豆饼粉、花生饼粉)要比无机氮源进行赤霉酸发酵效果好,主要是在天然的有机氮源中含有丰富的营养物质,如含有铁、铜、锌等其它微量元素和合成赤霉酸的前体物质<sup>[2,3]</sup>。无机氮源中的硝酸铵较硫酸铵和氯化铵效果佳,是由于SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>和Cl<sup>-</sup>不能被菌丝利用,使发酵液pH值过低,影响了赤霉菌的生理代谢,而NO<sub>3</sub><sup>-</sup>能被菌丝利用,使发酵液的pH不致偏低,有利于赤霉菌的新陈代谢,NH<sub>4</sub><sup>+</sup>优先于NO<sub>3</sub><sup>-</sup>被利用<sup>[2]</sup>,因而赤霉酸产量较高。

表3 氮源对赤霉酸发酵的影响  
Table 3 Effects of nitrogen sources on GA<sub>3</sub> fermentation

氮 源 Nitrogen sources	NH <sub>4</sub> Cl	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	尿 素 Urea	花生饼粉 Peanut meal	黄豆饼粉 Soybean cake meal	黄豆饼粉和花生饼粉 Peanut meal & Soybean cake meal
产量 Yield of GA <sub>3</sub> (mg/L)	380	400	1100	1260	1300	1360	1350
pH	2. 40	2. 54	3. 83	4. 26	4. 19	4. 11	4. 14

2.4 碳氮比对赤霉酸发酵的影响

采用发酵培养基B,调整发酵培养基中玉米淀粉和甘薯淀粉的浓度,使发酵培养基的C/N比值为5个水平,其他条件同上。试验结果(图1)表明:无论是以玉米淀粉还是甘薯淀粉为碳源进行赤霉酸发酵,其最佳C/N比值都为50:1,即加入玉米淀粉为12.5%,甘薯淀粉为14.5%。

在生产上,控制培养基中碳氮比例是促进以生长为主阶段向以发酵为主阶段转化的

首要条件，所以选择培养基时，必须保证在前期有利于菌体迅速大量繁殖所需要的易于利用的营养物质，并且还应该供足在转入生物合成阶段时，利用较慢的必需营养物质。

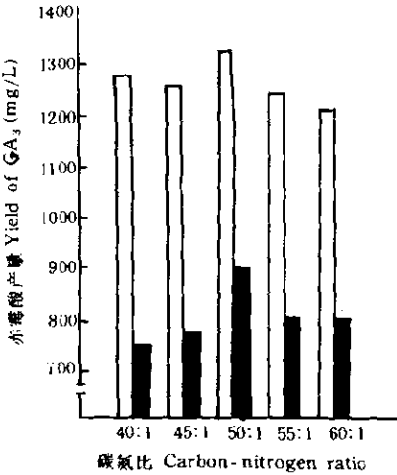


图1 不同碳氮比对 GA<sub>3</sub>发酵的影响

Fig. 1 Effects of Carbon-Nitrogen ratios on GA<sub>3</sub> fermentation  
□ 玉米淀粉 Corn starch;  
■ 甘薯淀粉 Sweet potato starch.

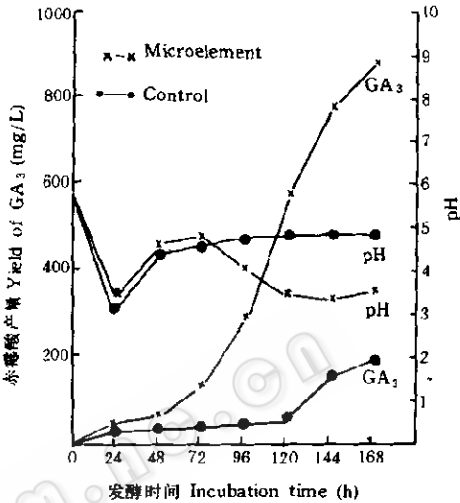


图2 微量元素对 GA<sub>3</sub>发酵的影响

Fig. 2 Effect of microelements on the course of GA<sub>3</sub> fermentation

2.5 微量元素对赤霉酸发酵的影响

2.5.1 某些金属元素对赤霉酸发酵的影响：比较了 Fe<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>和 Zn<sup>2+</sup>三元素以及它们之间不同组合对赤霉酸发酵的影响。经种子培养基培养的种子用无菌重蒸馏水充分洗涤，然后接种到用于微量元素试验的培养基中，其它条件不变。结果(表4)表明，三种元素对细

表4 微量元素对赤霉酸发酵的影响

Table 4 Effects of microelements on GA<sub>3</sub> fermentation

	微量元素 Microelements							
	对照 Control	Zn <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup>	Fe <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup> Zn <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup> Fe <sup>2+</sup>	Fe <sup>2+</sup> Cu <sup>2+</sup>	Fe <sup>2+</sup> Cu <sup>2+</sup> Zn <sup>2+</sup>
发酵液色泽 Color of medium	白色 White							
		+	+	+	++	++	+++	++++
颜色 Brown								
产量 Yield of GA <sub>3</sub> (mg/L)	101	230	290	550	580	610	690	950

“+”表示褐色程度 The color degree of medium marked with different “+”.

胞色素形成都具有促进作用；促进赤霉酸发酵的作用顺序为  $\text{Fe}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$ 。从不同元素之间相互作用的试验结果可知，三种元素之间都具有不同程度的累加效应，提高赤霉酸产量和促进胞色素形成的顺序为  $\text{Fe}^{2+} + \text{Cu}^{2+} + \text{Zn}^{2+} > \text{Fe}^{2+} + \text{Cu}^{2+} > \text{Fe}^{2+} + \text{Zn}^{2+} > \text{Cu}^{2+} + \text{Zn}^{2+}$ 。从中也可看出，含有  $\text{Fe}^{2+}$  的组合都具有较高的赤霉酸产量和较多的胞色素形成，因而  $\text{Fe}^{2+}$  在研究赤霉酸发酵机理和提高赤霉酸产量方面都具有重要意义。

**2.5.2 微量元素对赤霉酸发酵过程的影响：**用不具任何微量元素的发酵培养基为对照，研究了同时含  $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  和  $\text{Zn}^{2+}$  三元素的发酵培养基中的赤霉酸发酵过程，其他条件同上。试验结果（图2）表明：在含微量元素的发酵培养基中，发酵72小时后，发酵液 pH 显著下降，并在120小时后 pH 维持在3—4之间。与此同时，赤霉酸产量也随发酵时间延长而大量产生，而对照 pH 值一直维持在4—5之间，赤霉酸含量也很低。

### 参 考 文 献

- [1] Martin C G. The Biochemistry and physiology of Gibberellins. New York: Praeger Publishers, 1983, 2: 395—444.
- [2] Jefferys E G. *Adv Appl Microbiol*, 1970, 13: 283—316.
- [3] 孙建义, 等. 应用微生物, 1989, 5: 5—8.
- [4] Abbott Laboratories, Brit. Pat. No. 919, 186, 1963.
- [5] Imperial Chemical Industries Ltd., Brit. Pat. No. 838, 032., No. 838, 033., No. 839, 652, 1960.
- [6] 申家恒编著. 味精生产基本知识, 哈尔滨: 黑龙江省发酵工业科技情报站, 1983. 10.

## STUDIES ON FERMENTATIVE CONDITIONS OF GIBBERELIC ACID PRODUCED BY STRAIN UF456

Sun Jianyi Weng Xiaoyan

(Institute of Feed Science, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029)

**Abstract** Experiments were carried out on gibberellic acid fermentation conditions with its optimum medium formula. In gibberellic acid fermentation medium, the optimum carbon source was corn starch, and its optimum content was 12.5 percent; the optimum nitrogen sources were peanut meal and soybean cakemeal, their optimum contents were 1.2 and 0.3 percent, respectively; the optimum carbon-nitrogen ratio was 50:1. The microelements of Fe, Cu and Zn could increase yield of gibberellic acid, and that Fe, as a single microelement, was more effective than others, and that they had accumulative effects on the gibberellic acid fermentation. Meanwhile, the effect of three microelements on the course of gibberellic acid fermentation was discussed.

**Key words** Gibberellic acid, Fermentation conditions