

• 农业生物技术 •

基于比较代谢组学解析藤仓赤霉菌 CGMCC 17793 高产 GA₄ 机制

林嘉浩¹, 殷凯楠¹, 韩欣欣¹, 张心齐¹, 尹良鸿¹, 吴酬飞², 丁娜娜^{1*}, 林海萍^{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

林嘉浩, 殷凯楠, 韩欣欣, 张心齐, 尹良鸿, 吴酬飞, 丁娜娜, 林海萍. 基于比较代谢组学解析藤仓赤霉菌 CGMCC 17793 高产 GA₄ 机制[J]. 生物工程学报, 2024, 40(10): 3548-3560.

LIN Jiahao, YIN Kainan, HAN Xinxin, ZHANG Xinqi, YIN Lianghong, WU Choufei, DING Nana, LIN Haiping. Comparative metabolomics reveals the mechanism for the high GA₄ production in *Gibberella fujikuroi* CGMCC 17793[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(10): 3548-3560.

摘要: 新型赤霉素(gibberellin) GA₄ 因其独特的优势而具有广阔的应用前景。为探究 GA₄ 生物合成调控机制, 本研究以藤仓赤霉菌(*Gibberella fujikuroi*) GA₄ 生产菌株 S (CGMCC 17793) 和野生菌株 Y (GenBank 登录号: NRRL 13620) 为研究对象, 利用液相色谱-质谱联用(liquid chromatograph-mass spectrometer, LC-MS)代谢组学技术, 结合主成分分析(principal component analysis, PCA)与偏最小二乘-显著性分析联合法(partial least squares-discrimination analysis, PLS-DA)等对两种菌株在同一发酵时间以及菌株 S 在不同发酵时间的差异代谢物进行筛选与鉴定, 并利用 KEGG 数据库和 MBROLE 2.0 分析相关代谢通路。结果表明, 与菌株 Y 相比, 菌株 S 在发酵 3、6、9 d 时, 显著上调和下调的代谢物分别为 107 种和 66 种、136 种和 47 种、94 种和 65 种。与生产菌株 S 发酵 3 d 时相比, 6、9 d 时显著上调和下调的代谢物分别为 29 种和 40 种、52 种和 67 种。菌株 S 与菌株 Y 同一发酵时间的差异代谢物主要富集在氨基酸代谢、三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA cycle)和萜类生物合成等通路。菌株 S 不同发酵时间的差异代谢物主要富集在氨基酸代谢与糖代谢等合成途径。通路注释与分析结果说明, 菌株 S 通过促进氨基酸与糖代谢、TCA 循环产生更多乙酰 CoA, 增强了甲羟戊酸途径, 从而使萜类化合物合成的前体物质异戊烯焦磷酸(isopentenyl pyrophosphate, IPP)含量增加, 最终提高了 GA₄ 产量。本研究探究了藤仓赤霉菌 GA₄ 代谢规律, 为调控藤仓赤霉菌提高 GA₄ 产量提供了理论基础。

关键词: 比较代谢组学; 藤仓赤霉菌; 赤霉素 GA₄; 代谢通路; 乙酰辅酶 A

资助项目: 浙江省基础公益研究计划(LGG22C140001); 浙江省“三农九方”科技协作计划(2024SNJF27)

This work was supported by the Zhejiang Basic Public Welfare Research Project (LGG22C140001) and the Zhejiang Province “San Nong Jiu Fang” Science and Technology Cooperation Plan (2024SNJF27).

*Corresponding authors. E-mail: DING Nana, 20220148@zafu.edu.cn; LIN Haiping, hplin@zafu.edu.cn

Received: 2023-12-12; Accepted: 2024-04-11; Published online: 2024-04-24

Comparative metabolomics reveals the mechanism for the high GA₄ production in *Gibberella fujikuroi* CGMCC 17793

LIN Jiahao¹, YIN Kainan¹, HAN Xinxin¹, ZHANG Xinqi¹, YIN Lianghong¹, WU Choufei², DING Nana^{1*}, LIN Haiping^{1*}

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 Science, Huzhou Normal University, Huzhou 313000, Zhejiang, China

Abstract: With unique advantages, gibberellin GA₄ has broad application prospects. To explore the regulatory mechanism for the biosynthesis of GA₄, we combined liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS)-based metabolomics with principal component analysis (principal component analysis, PCA) and partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) to screen and identify the differential metabolites between the GA₄-producing strains S (industrial high-yield strain CGMCC 17793) and wild-type strain Y (NRRL 13620) of *Gibberella fujikuroi* fermented for the same time and the differential metabolites of strain S fermented for different time periods. KEGG and MBROLE 2.0 were used to analyze the metabolic pathways involving the differential metabolites. The results showed that compared with strain Y, strain S significantly upregulated and downregulated 107 and 66, 136 and 47, and 94 and 65 metabolites on days 3, 6, and 9, respectively. Compared with that on day 3 of fermentation, strain S upregulated 29 metabolites and downregulated 40 metabolites on day 6 and upregulated 52 metabolites and downregulated 67 metabolites on day 9. The differential metabolites between strain S and strain Y after fermentation for the same time were mainly enriched in amino acid metabolism, tricarboxylic acid (TCA) cycle, and terpenoid biosynthesis. The differential metabolites of strain S after fermentation for different time periods were mainly enriched in amino acid and sugar metabolism pathways. Pathway annotation results indicated that strain S increased the production of acetyl-CoA by promoting amino acid and sugar metabolism and TCA cycle, thereby enhancing the mevalonic acid pathway and increasing the content of isopentenyl pyrophosphate (IPP), a precursor for the synthesis of terpenoids, which ultimately led to increased GA₄ production. This study explored the metabolic rules of *Gibberella fujikuroi* GA₄, providing a theoretical basis for regulating *Gibberella fujikuroi* to improve GA₄ production.

Keywords: comparative metabolomics; *Gibberella fujikuroi*; gibberellins GA₄; metabolic pathway; acetyl-CoA

赤霉素(gibberellins, GA)是一类天然植物生长调节剂,具有提高种子发芽率、促进植株生长、调节开花等重要生理功能^[1]。Rodrigues等^[2]报道了136种不同结构的赤霉素,按照发

现顺序依次命名为GA₁、GA₂……GA₁₃₆,统称赤霉素类(GA_s),其中生物活性较高的主要有GA₁、GA₂、GA₃、GA₄、GA₇等。目前国内外应用最广泛的是GA₃,但新型赤霉素GA₄因其

独特的优势而具有广阔的应用前景。与 GA₃ 相比, GA₄ 的优点主要表现在以下几个方面: 能打破植物休眠、促进胚轴生长, 但不影响抗倒伏性; 提高水果表皮角质层韧性, 防止果皮破裂; 促进植物开花, 提高坐果率, 对苹果大小年调节与褐锈病缓解十分有效^[3-5]。因此 GA₄ 在国内外市场上供不应求、价格较高, 企业迫切需要提高发酵产量、降低生产成本^[6]。

当前工业生产中普遍采用藤仓赤霉菌 (*Gibberella fujikuroi*) 液态发酵生产 GA₄, 已通过菌种选育、发酵条件优化等措施提高产量, 但增幅较为有限^[7]。随着研究不断深入, 赤霉素合成途径和其中的关键酶逐步揭晓^[8], 但目前代谢调控位点仍不清晰, 这已成为 GA₄ 进一步提升产量的限制因素。代谢组学通过现代检测技术对生物体代谢产物进行分析, 直观反映生理生化动态过程, 从而探究细胞内的生化途径^[9-12]。近年来, 基于液相色谱-质谱联用 (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS) 的代谢组学在疾病诊断、毒理评价、中医等方面已成为研究热点^[13-15]。因此代谢组学技术可从代谢产物的变化规律解析影响赤霉素生物合成的调控机制, 挖掘 GA₄ 合成途径中的关键中间产物及作用, 进而探究 GA₄ 高效合成机制。

本研究通过非靶向代谢组学, 比较藤仓赤霉菌 GA₄ 生产菌株 S 和野生菌株 Y 在同一发酵时间、菌株 S 在不同发酵时间的代谢产物差异, 分析影响 GA₄ 高效合成的主要代谢通路和关键代谢产物, 以期通过代谢调控提高 GA₄ 发酵产量提供依据。

1 材料与amp;方法

1.1 菌种

藤仓赤霉菌 (*Gibberella fujikuroi*): 生产菌株 S (CGMCC 17793) 由浙江钱江生物化学股份有

限公司提供, 为 GA₄ 高产菌株; 野生菌株 Y (GenBank 登录号: NRRL 13620) 购自美国农业研究菌株保藏中心。

1.2 试剂

黄豆粕粉、玉米浆粉、玉米蛋白粉由浙江钱江生物化学股份有限公司提供, 为工业级原料; 马铃薯购自菜市场; 其他试剂均购自浙江卡尔生物技术有限公司, 为分析纯。

斜面培养基马铃薯葡萄糖琼脂 (potato dextrose agar, PDA) (g/L): 马铃薯 200.0, 葡萄糖 20.0, 琼脂粉 20.0, 121 °C 蒸汽灭菌 20 min。

液体菌种培养基 (g/L): 蔗糖 30.0, 黄豆粕粉 12.0, NH₄Cl 3.0, NaNO₃ 3.0, KH₂PO₄ 1.5, MgSO₄·7H₂O 0.2, K₂SO₄ 0.2, pH 6.8, 121 °C 蒸汽灭菌 30 min。

发酵培养基 (g/L): 乳糖 140.0, 黄豆粕粉 10.0, 玉米浆粉 10.0, 玉米蛋白粉 5.0,

K₂SO₄ 2.0, ZnSO₄·7H₂O 0.005, MgSO₄·7H₂O 1.0, CoCl₂·6H₂O 0.005, 尿素 1.25, pH 7.0, 121 °C 蒸汽灭菌 30 min。

1.3 发酵培养

菌种活化: 将保存菌种转接到 PDA 平板上, 28 °C 恒温培养 7-8 d。

液体菌种培养: 用无菌打孔器在活化的菌种平板同一圆周打取直径 10 mm 的菌饼, 取 4 个投入装有 5 mL 无菌水与玻璃珠的试管中振荡 10 min, 按照 4% (体积分数) 的接种量接入装有 30 mL 种子培养基的 250 mL 摇瓶中, 33 °C、220 r/min 恒温振荡培养 48 h。

液态发酵: 按照 4% (体积分数) 的接种量将液体菌种接入装有 40 mL 发酵培养基的 250 mL 摇瓶中, 33 °C、220 r/min 恒温振荡培养, 根据实验需要定期取样。

1.4 样品制备

取培养 3、6、9 d 时生长正常的生产菌株 S

(分别标记为 S3d、S6d、S9d)和野生菌株 Y (分别标记为 Y3d、Y6d、Y9d)发酵样品, 4 °C、1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液。加入 3 mL 无菌水配制的 1×PBS 缓冲液悬浮菌丝沉淀, 200 r/min 离心 5 min, 无菌水清洗 2 次, 弃上清液。沉淀转移至耐-192 °C 低温的螺纹口冻存管中, 液氮速冻 1 h 后-80 °C 保存备用。每组设置 6 个重复。

1.5 液相色谱-质谱联用(LC-MS)方法

1.5.1 液相色谱方法

数据采集所用到的液相体系为 Thermo Scientific ultimate 3000 HPLC (ThermoFisher Scientific 公司)。所用色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C18 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm, Waters)。柱温设置为 35 °C, 流速为 400 μL/min。采用的流动相: A 相为水(0.1%甲酸); B 相为乙腈(0.1%甲酸)。流动相梯度设置参数:0.0–0.5 min 为 5% B; 0.5–7.0 min 为 5%–100% B; 7.0–8.0 min 为 100% B; 8.0–8.1 min 为 100%–5% B; 8.1–10.0 min 为 5% B。

1.5.2 质谱方法

采用高分辨率串联质谱仪 Q-Exactive (ThermoFisher Scientific 公司)检测从色谱柱中洗脱的代谢物。Q-Exactive 可在正离子和负离子模式下运行。以 70 000 的分辨率收集前体光谱(70–1 050 *m/z*)以达到 3e6 的 automatic gas control (AGC) 目标, 最大进样时间设置为 100 ms。在 data-dependent acquisition (DDA) 模式下设置了获取数据的前 3 个配置。以 17 500 的分辨率收集碎片光谱以达到 1e5 的 AGC 目标, 最大进样时间为 80 ms。为了评估整个采集过程中 LC-MS 的稳定性, 在每 10 个样本后采集质量控制样品。

1.6 数据处理

采用 Design expert 10.0、SPSS 19.0 软件进行数据处理分析^[16]。

1.7 差异代谢物筛选及鉴定

处理后的数据上传联川生物云平台 (<https://www.omicstudio.cn/index>)进行分析。采用偏最小二乘法分析 (partial least squares-discrimination analysis, PLS-DA) 模型区分菌株 S 与菌株 Y 同一发酵时间(S3d 与 Y3d、S6d 与 Y6d、S9d 与 Y9d)和菌株 S 不同发酵时间(S3d 与 S6d、S3d 与 S9d)各组间代谢轮廓的总体差异, 以变量权重值(variable importance in the projection, VIP>1)和 *t* 检验($P<0.05$)为标准筛选差异代谢物, 再通过 KEGG 数据库 (<https://www.kegg.jp/>)进行代谢通路注释, 获得差异代谢物参与的通路, 最后使用 MBROLE 2.0 (<http://csbg.cnb.csic.es/mbrole2/>)对通路进行富集分析, 使用联川云平台工具绘制通路富集分析图和主成分分析 (principal component analysis, PCA) 图。

2 结果与分析

2.1 菌株 S 和菌株 Y 生长与 GA₄ 合成差异

菌株 S 和菌株 Y 的生长曲线见图 1。在 0–10 d 的发酵阶段, 生长曲线可分为延滞期(0–1 d)、对数期(1–3 d)和稳定期(3–10 d)。菌株

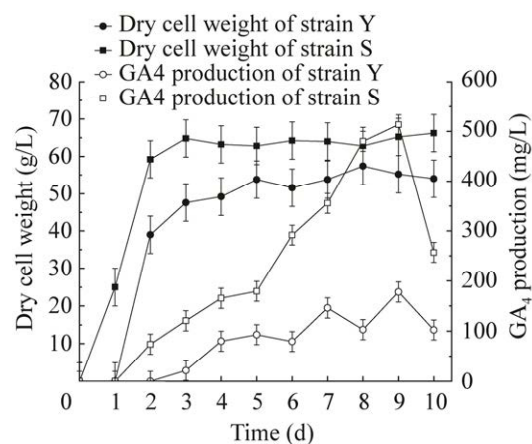


图 1 菌株 S 与菌株 Y 的生长曲线和 GA₄ 合成曲线

Figure 1 Growth and GA₄ synthesis curves of strain S vs. strain Y.

Y 有典型的延滞期, 而菌株 S 没有延滞期, 更适合工业生产。自发酵初始, 菌株 S 的生长速率就一直领先且显著大于菌株 Y, 最终生物量也显著高于菌株 Y。2 个菌株的 GA₄ 合成曲线见图 1。菌株 S 在发酵 1 d 后开始积累 GA₄, 菌株 Y 晚 1 d, 即 2 d 后开始积累。达到稳定期后, 2 个菌株菌丝干重均趋于平稳, 但单位菌丝干重的 GA₄ 产量呈持续上升趋势, 菌株 S 的上升幅度尤为显著。菌株 S 与菌株 Y 的 GA₄ 产量均于 9 d 时达到最大值, 分别为 513.0 mg/L 和 177.8 mg/L, 此时菌株 S 的 GA₄ 产量为菌株 Y 的 2.9 倍。可见藤仓赤霉菌的两个菌株在发酵稳定期 GA₄ 产量的提升并不是由于菌丝量增加引起的。

2.2 菌株 S 和菌株 Y 代谢组学差异

2.2.1 样品质量

通过 LC-MS 质谱检测菌株 S 与菌株 Y 发酵 3、6、9 d 的菌丝, 使用质量控制(quality control, QC)进行样本质控, PCA 得分情况见图 2。正红色 QC 样本检测结果较为密集地聚在一起, 说明 QC 重复性良好, 分析系统稳定, 所采集的样品数据可以进行差异分析。

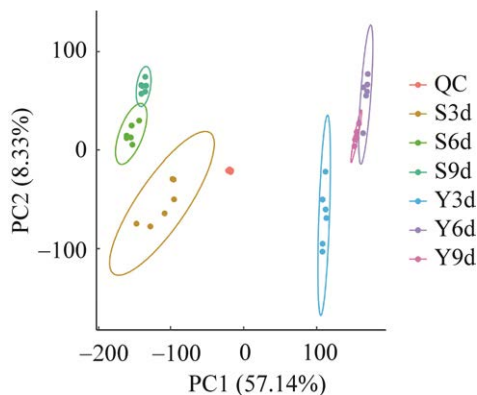


图 2 QC 样本 PCA 得分图

Figure 2 PCA score plot of QC samples. Different colors represent different samples. S3d-S9d indicate the composition distribution status of strain S at 3 d, 6 d, and 9 d during fermentation; Y3d-Y9d indicate the composition distribution status of strain Y at 3 d, 6 d, and 9 d during fermentation.

2.2.2 模型分析结果

对发酵所得菌丝中测得的代谢物进行 PCA 和 PLS-DA 建模分析。PCA 模型显示, 相比较的两组样品基本都处于 95% 置信区间内, 且数据点空间区分十分明显(图 3)。在 PLS-DA 模型中, 两组数据样本呈各自聚类且彼此离散, 结果与 PCA 相似(图 4)。模型分析表明菌株 S 与菌株 Y 同一发酵时间、菌株 S 不同发酵时间在代谢水平上存在显著差异。

2.3 差异代谢物

以 PLS-DA 模型的 VIP>1、P<0.05 为标准, 筛选出菌株 S 与菌株 Y 同一发酵时间和菌株 S 不同发酵时间的差异代谢物。

2.3.1 菌株 S 与菌株 Y 在同一发酵时间的差异代谢物

与菌株 Y 相比, 菌株 S 在发酵 3、6、9 d 时, 显著上调和下调的代谢物分别有 107 种和 66 种、136 种和 47 种、94 种和 65 种。由表 1 和图 5 可见, 主要差异代谢物集中在萜类物质(如内根-贝壳杉烯、赤霉素 GA₄、甲羟戊酸)、氨基酸(如 L-谷氨酸、L-赖氨酸、L-天冬氨酸)、TCA 途径产物(如柠檬酸、琥珀酸)等, 且菌株 S 主要差异代谢物含量显著高于菌株 Y。结合图 4 与图 5 分析可见, 差异代谢物中与 TCA 循环和氨基酸代谢相关的通路分别有 7 条与 8 条, 说明菌株 S 的 GA₄ 高效合成可能与 TCA 循环和氨基酸代谢有关, 菌株 S 可能是通过提高糖的利用率和氨基酸代谢效率产生更多关键中间代谢物乙酰 CoA, 从而促进萜类物质赤霉素的合成。

2.3.2 菌株 S 不同发酵时间的差异代谢物

与发酵 3 d 相比, 菌株 S 在发酵 6 d、9 d 时, 显著上调和下调的代谢物分别有 29 种和 40 种、52 种和 67 种。表 2 为菌株 S 不同发酵时间的主要差异显著代谢物, 可见主要集中于糖代谢与氨基酸代谢途径, 进一步验证了菌株 S 中 GA₄ 的合成与这两个代谢途径密切相关。

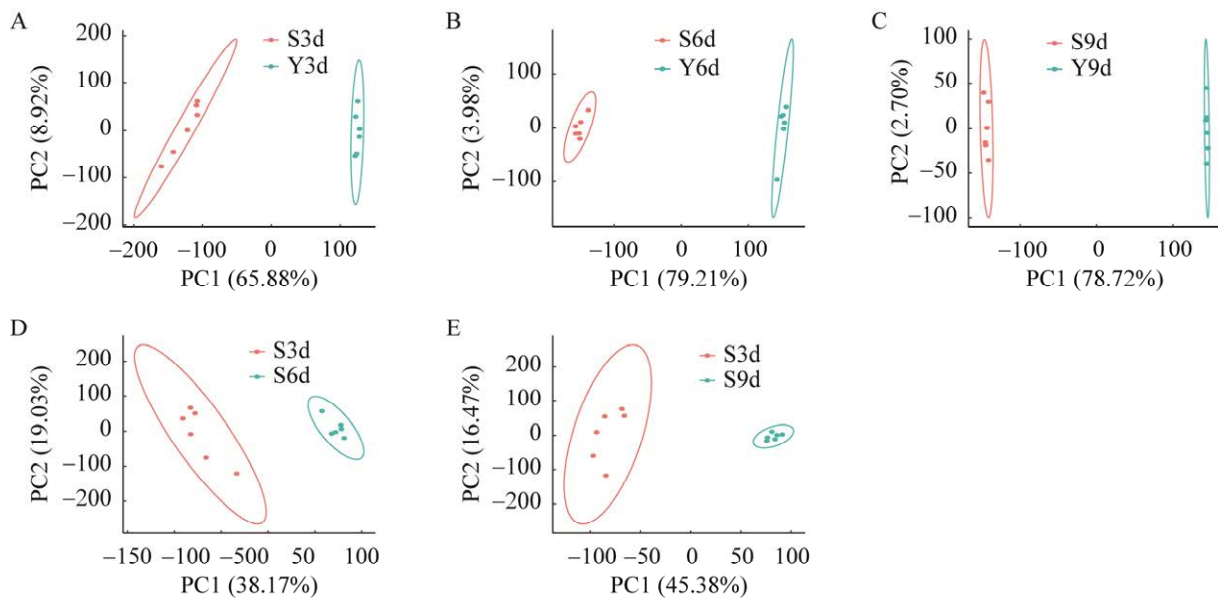


图 3 菌株 S、Y 同一发酵时间和菌株 S 不同发酵时间的 PCA 比较图

Figure 3 Comparison of PCA between strain S and strain Y with the same fermentation time, and strain S with different fermentation times. A–C: Comparison of PCA between strain S and strain Y at 3 d, 6 d, and 9 d during fermentation, red dots represent the strain S at 3 d, 6 d, and 9 d, while blue dots represent the strain Y at 3 d, 6 d, and 9 d. D–E: Comparison of PCA on strain S at 3 d and 6 d, as well as 3 d and 9 d during fermentation, red dots represent the strain S at 3 d, while blue dots represent the strain S at 6 d and 9 d.

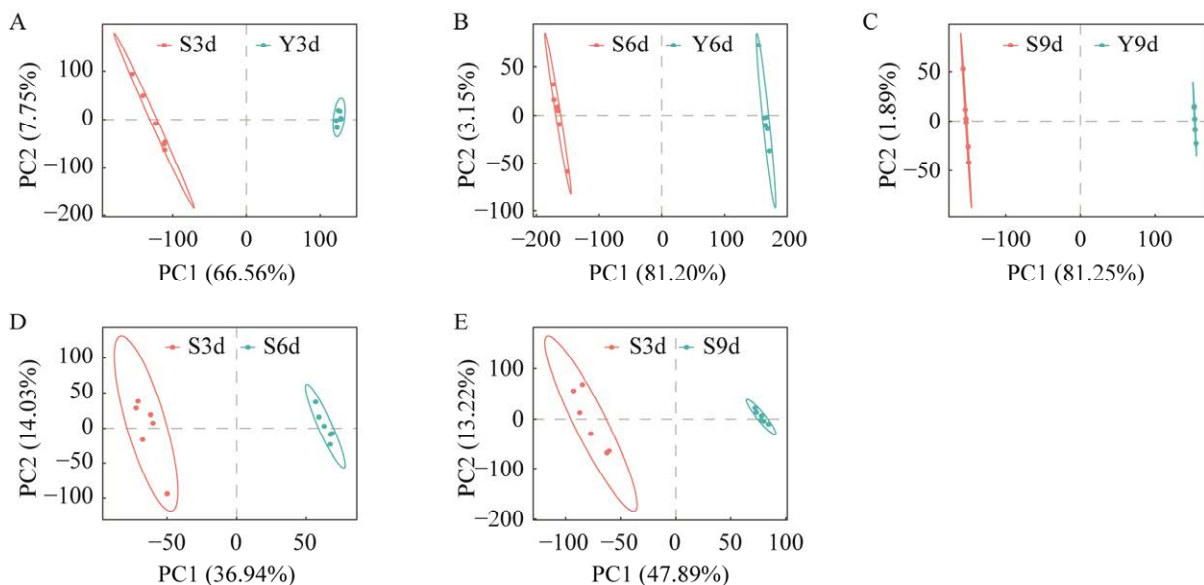


图 4 菌株 S、Y 同一发酵时间和菌株 S 不同发酵时间的 PLS-DA 比较图

Figure 4 Comparison of PLS-DA between strain S and strain Y with the same fermentation time, and strain S with the different fermentation times. A–C: Comparison of PLS-DA between strain S and strain Y at 3 d, 6 d, and 9 d during fermentation, red dots represent the strain S at 3 d, 6 d, and 9 d, while blue dots represent the strain Y at 3 d, 6 d, and 9 d. D–E: Comparison of PLS-DA on strain S at 3 d and 6 d, as well as 3 d and 9 d during fermentation, red dots represent the strain S at 3 d, while blue dots represent the strain S at 6 d and 9 d.

表 1 菌株 S 与菌株 Y 在同一发酵时间主要差异显著代谢物

Table 1 Main significant metabolites between strain S and strain Y at the same fermentation time

Metabolic type	Metabolite	Molecular formula	S3d vs. Y3d	S6d vs. Y6d	S9d vs. Y9d
Terpenoid synthesis	Geranylgeranyl diphosphate	$C_{20}H_{36}O_7P_2$	*	*	—
	Ent-kaurene	$C_{20}H_{32}$	*	*	—
	Gibberellins GA ₁₂ aldehyde	$C_{20}H_{28}O_3$	**	*	—
	Gibberellins GA ₁₄ aldehyde	$C_{20}H_{28}O_4$	*	*	*
	Gibberellins GA ₁₄	$C_{20}H_{28}O_5$	**	*	—
	Gibberellins GA ₁₂	$C_{20}H_{28}O_4$	*	*	*
	Gibberellins GA ₄	$C_{19}H_{24}O_5$	**	*	*
	Gibberellins GA ₁	$C_{19}H_{24}O_6$	**	*	—
	Gibberellins GA ₃	$C_{19}H_{22}O_6$	**	*	—
	Gibberellins GA ₇	$C_{19}H_{22}O_5$	**	*	—
	Terpene mycin	$C_{20}H_{28}O_6$	**	*	—
	Terpene tetraene	$C_{20}H_{32}$	*	*	—
	Mevalonic acid	$C_6H_{12}O_4$	*	*	—
	Methyl-hydroxy-pentanoic acid diphosphate	$C_6H_{14}O_{10}P_2$	*	*	—
	Amino acid metabolism	L-glutamic acid	$C_5H_9NO_4$	—	**
L-lysine		$C_6H_{14}N_2O_2$	—	*	*
Allysine		$C_6H_{11}NO_3$	*	*	*
L-tryptophan		$C_{11}H_{12}N_2O_2$	*	*	—
5-hydroxytryptamine		$C_{10}H_{12}N_2O$	*	—	—
N-acetyl-5-methoxytryptamine		$C_{13}H_{16}N_2O_2$	*	—	—
L-leucine		$C_6H_{13}NO_2$	*	*	*
Amyl phosphate		$C_5H_{11}O_4P$	*	*	*
L-phenylalanine		$C_9H_{11}NO_2$	*	*	*
L-alanine		$C_3H_7NO_2$	*	*	*
TCA pathway	L-aspartic acid	$C_4H_7NO_4$	*	*	*
	Succinic acid	$C_4H_6O_4$	*	**	*
	Citric acid	$C_6H_8O_7$	*	**	—
	Isocitric acid	$C_6H_8O_7$	*	**	—
	Fumaric acid	$C_4H_4O_4$	*	*	**
	α -ketoglutaric acid	C_20H_{32}	—	*	**
	Pentadiene	$C_{20}H_{36}O_7P_2$	*	*	—

VIP>1 marked as “*”; VIP>2 marked as “**”; No detected target product marked as “—”.

2.4 KEGG 代谢通路的富集

2.4.1 菌株 S 与菌株 Y 同一发酵时间差异代谢物 KEGG 通路

通过 KEGG 对 S3d 与 Y3d、S6d 与 Y6d、S9d 与 Y9d 差异代谢物进行分析, 分别富集到 114、126、114 条代谢通路, 其中显著富集 ($P<0.05$) 的分别有 39、50、39 条。对排名前 20 的通路进行分析, 发现其主要集中在萜类物质合成、氨基酸代谢与糖代谢这 3 类途径上,

各自覆盖差异代谢物最多的通路分别是二萜生物合成(diterpenoid biosynthesis)、色氨酸代谢(tryptophan metabolism)与柠檬酸循环(citrate cycle) (图 6A–6C), 表明这 3 个通路的富集显著性与差异代谢物数量均较大, 对 GA₄ 的代谢流研究具有重要意义。

2.4.2 菌株 S 不同发酵时间差异代谢物 KEGG 通路

通过 KEGG 对 S3d 与 S6d、S3d 与 S9d 差

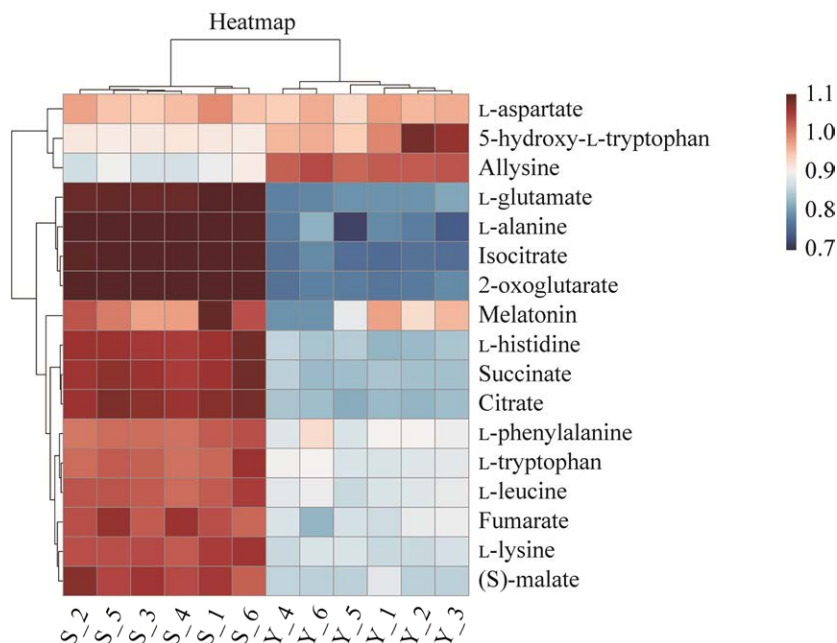


图 5 菌株 S 与菌株 Y 在同一发酵时间差异代谢物聚类热图

Figure 5 Clustering heat map of differential metabolites between strain S and strain Y at same fermentation time. S_1-S_6 and Y_1-Y_6 represents six parallel samples of strain S and strain Y, respectively.

表 2 菌株 S 不同发酵时间主要差异显著代谢物

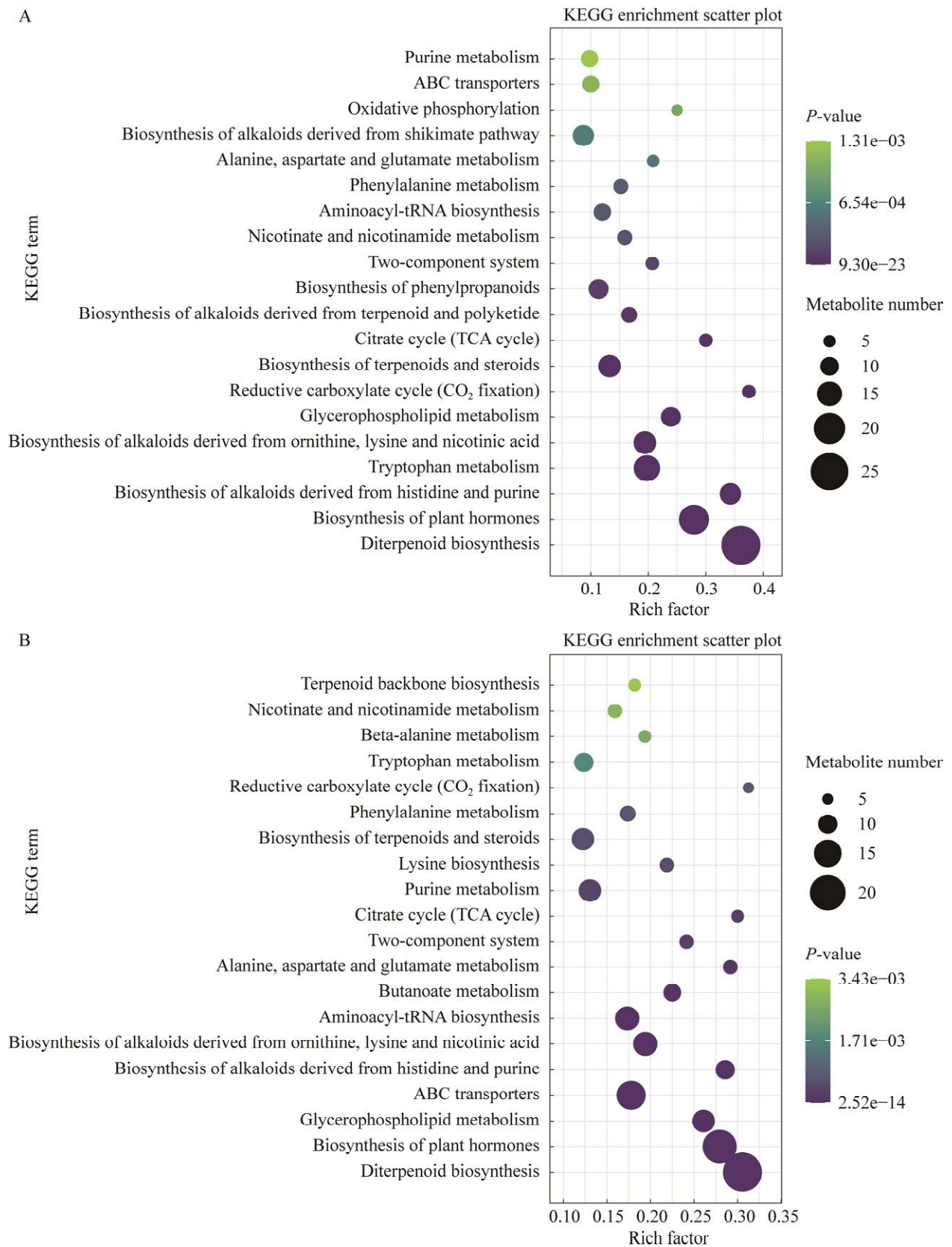
Table 2 Main significant metabolites of strain S with different fermentation times

Metabolic type	Metabolite	Molecular formula	S6d vs. S3d	S9d vs. S3d
Sugar metabolism	Hemolytic enzyme	$C_{12}H_{19}NO_7R_2$	*	**
	Hemolysin	$C_6H_{13}NO_7PR$	*	*
	Trehalose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	**	*
	Triglyceride	$C_6H_5O_6R_3$	**	**
	Cephalin	$C_7H_{12}NO_8PR_2$	**	**
	Phosphatidylcholines	$C_{10}H_{18}NO_8PR_2$	*	*
Amino acid metabolism	N-acetyl-L-phenylalanine	$C_{11}H_{13}NO_3$	*	**
	Xanthurenic acid	$C_{10}H_7NO_4$	**	**
	Indophenol	C_8H_7NO	**	**
	Formyl anthranilic acid	$C_8H_7NO_3$	**	**
	5-hydroxyindole-3-acetic acid	$C_{10}H_9NO_3$	**	**
	2-isopropylmalic acid	$C_7H_{12}O_5$	**	**
	Xanthurenic acid	$C_{10}H_7NO_4$	**	**
	Kynurenic acid	$C_{10}H_7NO_3$	**	**
	3-hydroxyanthranilic acid	$C_7H_7NO_3$	**	**
	Indole	C_8H_7N	**	**

VIP>1 marked as “*”; VIP>2 marked as “**”.

异代谢物进行分析, 分别富集到 64 条和 67 条代谢通路, 其中显著富集($P<0.05$)的分别有 5 条和 4 条。分析发现主要集中在氨基酸与糖代谢这两类途径上, 各自覆盖差异代谢物最多的通路

分别是色氨酸代谢(tryptophan metabolism)与甘油磷脂代谢(glycerophospholipid metabolism)(见图 6D、6E), 进一步说明氨基酸和糖类代谢在 GA₄ 代谢流中起着重要作用。



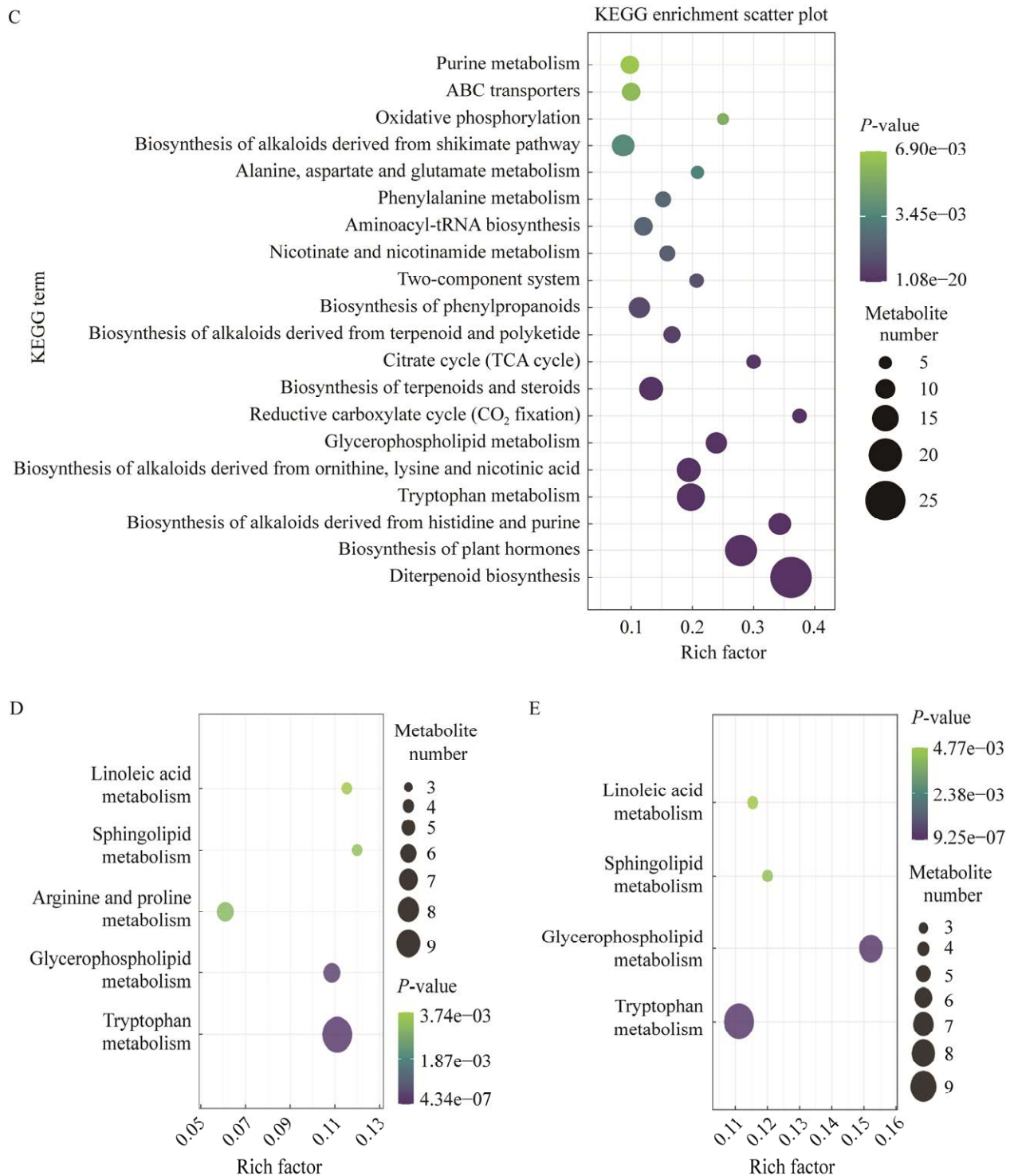


图 6 菌株 S、Y 同一发酵时间与菌株 S 不同发酵时间差异显著代谢物 KEGG 富集图

Figure 6 KEGG enrichment maps of significant difference metabolites between strain S and strain Y at the same fermentation time, and strain S with the different fermentation times. A–C: Terpenoid synthesis, amino acid and sugar metabolism pathways between strain S and strain Y at 3 d, 6 d and 9 d. D–E: Amino acid and sugar metabolism pathways of strain S at 3 d, 6 d and 9 d.

3 讨论

3.1 氨基酸代谢对 GA₄ 合成的影响

代谢组分析表明菌株 S 与菌株 Y 在同一发酵时间所得菌丝的氨基酸含量存在显著差异。如图 7 所示, 菌株 S 在发酵 3、6、9 d 时菌丝中谷氨酸、赖氨酸、色氨酸、亮氨酸、丙氨酸以及苯丙氨酸的含量均显著高于菌株 Y, 而天冬氨酸含量则显著低于菌株 Y。

氨基酸是细胞生物合成和代谢的主要产物, 通常作为前体物参与细胞构建, 还可以通过形成酶调节代谢^[17]。色氨酸在色氨酸酶的催化下可分解为丙酮酸和吲哚, 生成的丙酮酸进一步氧化脱羧得到乙酰 CoA, 从而参与萜类物质合成^[18]。同理, 亮氨酸、赖氨酸和苯丙氨酸等氨基酸也能通过特定反应生成乙酰 CoA。乙

酰 CoA 在生物体内参与很多重要的生化反应, 如三羧酸循环、氨基酸代谢等。同时, 作为甲羟戊酸途径的重要前体, 乙酰 CoA 直接影响萜类化合物的合成, 改变乙酰 CoA 浓度会对萜类物质产量造成显著影响, 因此可以通过调节甲羟戊酸途径促使乙酰 CoA 转向不同的代谢方向, 提高特定产物产量^[19]。在裂殖壶菌(*Schizochytrium* sp.) 中通过添加甲羟戊酸途径抑制剂强化乙酰 CoA 的供应, 二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)产量比对照组提高了 46.61%^[20]。Shiba 等^[21]通过异源表达啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) 中乙酰 CoA 合成酶基因 ACS, 提高了萜类物质青蒿素的产量。Chen 等^[22]过表达 ACS 与乙醇脱氢酶基因, 敲除了乙醛酸循环中柠檬酸合酶(citrate synthase, CIT2)和苹果酸合酶(malate synthase, MLS1)的基因, 以减少乙酰 CoA 的损

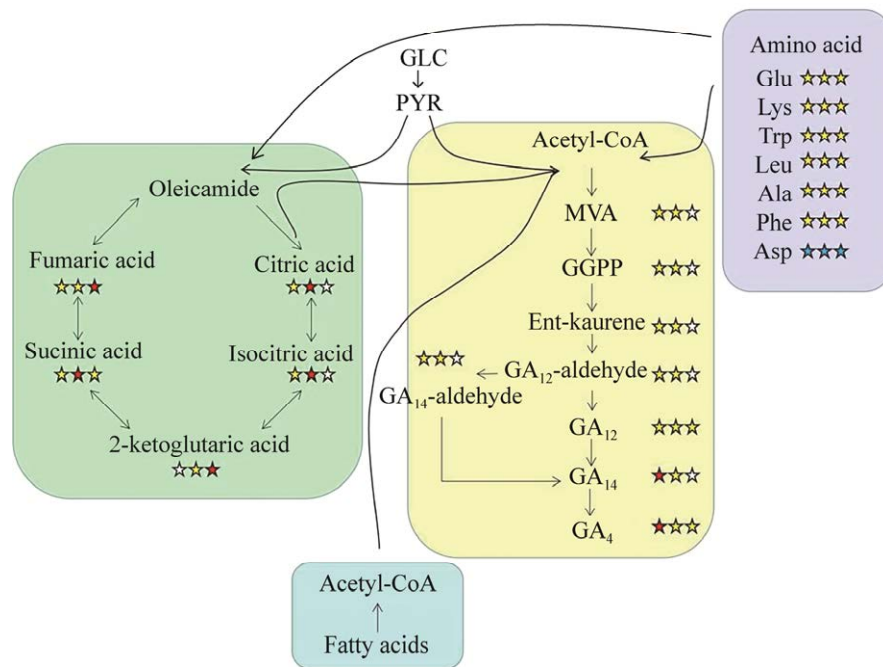


图 7 菌株 S 与菌株 Y 代谢网络中差异代谢产物丰度示意图

Figure 7 Schematic diagram of differential metabolite abundance in metabolic network of strain S and strain Y. The three pentagram icons from left to right represent 3 d, 6 d and 9 d in turn. Red, yellow, and blue respectively indicate that the metabolic product levels of strain S are significantly higher, significantly higher, and significantly lower than strain Y, while white indicates that the difference is not significant. GLC: Glucose; PYR: Pyruvic acid.

失, 结果 α -檀香烯的产量比对照提高了 4 倍。由以上报道可以推测菌株 S 通过氨基酸代谢的加强提供更多萜类物质合成的重要前体物质乙酰 CoA, 增强了甲羟戊酸途径, 从而使得萜类化合物前体物质异戊烯焦磷酸(IPP)含量增加, 最终提高了 GA₄ 产量。

3.2 TCA 循环对 GA₄ 合成的影响

在生物体内, TCA 循环不仅能为生物体提供能量, 还是糖类、脂类、氨基酸等代谢的中心枢纽。TCA 循环中间产物柠檬酸等可通过糖异生途径生成丙酮酸, 进而氧化脱羧生成乙酰 CoA, 参与萜类物质合成。同时柠檬酸也可以在裂解酶作用下直接生成乙酰 CoA, 为 GA₄ 等萜类物质的合成提供底物^[23]。氨基酸可通过转氨作用参与到 TCA 循环中, 如 L-谷氨酸可以脱氨生成 α -酮戊二酸, 同时得到 NADPH 和 ATP, 为丙酮酸脱羧氧化合成乙酰 CoA 提供能量, 增强 TCA 循环^[24]。伏贝贝^[25]通过过表达柠檬酸裂解酶(ATP-citrate lyase, ACL)且敲除异柠檬酸裂解酶(isocitrate lyase, ICL1)基因, 使香叶醇的产量和产率分别提高了 34%和 83%。本研究表明, 菌株 S 发酵所得菌丝中柠檬酸、延胡索酸等 TCA 循环中间产物含量显著高于菌株 Y, 结合以上文献说明菌株 S 糖代谢更旺盛, 对碳源的利用率更高, 可以通过 TCA 途径获得更多的乙酰 CoA, 从而提高 GA₄ 产量。

4 结论

本研究基于比较代谢组学分析了藤仓赤霉菌 GA₄ 合成的关键代谢物, 结果表明 GA₄ 高产菌株 S 与野生菌株 Y 同一发酵时间的差异代谢物主要富集在氨基酸代谢、TCA 循环和萜类生物合成等通路。菌株 S 不同发酵时间的差异代谢物主要富集在氨基酸代谢与糖代谢等合成通路。说明菌株 S 可能是通过促进氨基酸代谢与

TCA 循环等产生更多乙酰 CoA, 增强了甲羟戊酸途径, 从而使萜类化合物前体物质异戊烯焦磷酸(IPP)含量增加, 最终提高了 GA₄ 产量。

REFERENCES

- [1] 魏晓琼, 贾文飞, 马靖恒, 王颖, 李金英, 吴林. 植物生长调节剂对植株生长发育的影响概述[J]. 北方园艺, 2022(4): 118-125.
WEI XQ, JIA WF, MA JH, WANG Y, LI JY, WU L. Review on the effects of plant growth regulators on plant growth and development[J]. Northern Horticulture, 2022(4): 118-125 (in Chinese).
- [2] RODRIGUES C, de SOUZA VANDENBERGHE LP, de OLIVEIRA J, SOCCOL CR. New perspectives of gibberellic acid production: a review[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2012, 32(3): 263-273.
- [3] ATAY AN, KOYUNCU F. Manipulating regular bearing in 'golden delicious'/M9 apple trees using GA₄₊₇ and ethephon[J]. International Journal of Fruit Science, 2016, 16(1): 10-22.
- [4] PESTEANU A. Effect of application with gibberellin GA₄₊₇ on russetting of 'golden delicious' apples[J]. Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca Horticulture, 2015, 72(2): 38-44.
- [5] 庄木坤. 赤霉素高产菌株改造与发酵研究[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2007.
ZHUANG MK. Breeding of gibberellic acid overproducing strain and fermentation[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2007 (in Chinese).
- [6] WANG BX, YIN KN, WU CF, WANG L, YIN LH, LIN HP. Medium optimization for GA₄ production by *Gibberella fujikuroi* using response surface methodology[J]. Fermentation, 2022, 8(5): 230.
- [7] LALE G, GADRE R. Enhanced production of gibberellin A₄ (GA₄) by a mutant of *Gibberella fujikuroi* in wheat gluten medium[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2010, 37(3): 297-306.
- [8] KAWAIDE H. Biochemical and molecular analyses of gibberellin biosynthesis in fungi[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2006, 70(3): 583-590.
- [9] 孔宏伟, 戴伟东, 许国旺. 基于液相色谱-质谱联用的代谢组学研究中代谢物的结构鉴定进展[J]. 色谱, 2014, 32(10): 1052-1057.
KONG HW, DAI WD, XU GW. Advances of metabolite identification in liquid chromatography-mass spectrometry based metabolomics[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2014, 32(10): 1052-1057 (in Chinese).
- [10] KWON SW, KIM NE, JIN SH, SEO J, HAM TH, LEE

- J. Evaluation of the resistant to bakanae disease in Korean rice landraces (*Oryza sativa* L.)[J]. *Plant Breeding and Biotechnology*, 2021, 9(4): 355-359.
- [11] 俞邱豪, 张九凯, 叶兴乾, 陈颖. 基于代谢组学的食品真实属性鉴别研究进展[J]. *色谱*, 2016, 34(7): 657-664.
YU QH, ZHANG JK, YE XQ, CHEN Y. Progress on metabolomics for authenticity identification of food[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2016, 34(7): 657-664 (in Chinese).
- [12] 杨波, 杨强, 张爱华, 王喜军. 基于代谢组学技术的中医药研究进展[J]. *中国医药导报*, 2019, 16(24): 24-28.
YANG B, YANG Q, ZHANG AH, WANG XJ. Research progress of traditional Chinese medicine based on metabolomics technology[J]. *China Medical Herald*, 2019, 16(24): 24-28 (in Chinese).
- [13] LUO C, ZHANG XQ, HE YF, CHEN H, LIU MR, WANG HR, TANG LF, TU G, DING M. A pseudo-targeted metabolomics study based on serum bile acids profiling for the differential diagnosis of benign and malignant breast lesions[J]. *Steroids*, 2021, 175: 108914.
- [14] ZHANG CY, FLOR S, RUIZ P, DHAKAL R, HU X, TEESCH LM, LUDEWIG G, LEHMLER HJ. 3,3'-dichlorobiphenyl is metabolized to a complex mixture of oxidative metabolites, including novel methoxylated metabolites, by HepG2 cells[J]. *Environmental Science & Technology*, 2020, 54(19): 12345-12357.
- [15] YE XX, WANG XQ, WANG YF, SUN WT, CHEN Y, WANG D, LI ZH, LI ZF. A urine and serum metabolomics study of gastroesophageal reflux disease in TCM syndrome differentiation using UPLC-Q-TOF/MS[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2021, 206: 114369.
- [16] 皇甫诗男. 低温暗培养下笃斯越橘代谢重组研究及转录组分析[D]. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 2018.
HUANGFU SN. Study on metabolic recombination and transcriptome analysis of *V. uliginosum* L. under low temperature and dark culture[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [17] 王亮. 酿酒酵母高浓度乙醇连续发酵体系振荡行为[D]. 大连: 大连理工大学博士学位论文, 2014.
WANG L. Oscillatory behavior in very-high-gravity continuous ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*[D]. Dalian: Doctoral Dissertation of Dalian University of Technology, 2014 (in Chinese).
- [18] 韦平和, 彭加平. 色氨酸酶的催化功能及其在 L-色氨酸酶法合成中的应用[J]. *药物生物技术*, 2011, 18(2): 180-184.
WEI PH, PENG JP. Catalytic function of tryptophanase and its application in enzymatic synthesis of L-tryptophan[J]. *Pharmaceutical Biotechnology*, 2011, 18(2): 180-184 (in Chinese).
- [19] 李亮, 尚晓冬, 谭琦. 担子菌中甲羟戊酸途径影响萜类物质合成的研究[J]. *中国农业科技导报*, 2014, 16(3): 53-61.
LI L, SHANG XD, TAN Q. Studies of mevalonate pathway influence on biosynthesis of terpenoids in basidiomycota[J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2014, 16(3): 53-61 (in Chinese).
- [20] 魏萍, 任路静, 纪晓俊, 仝倩倩, 冯云, 黄和. 强化乙酰辅酶 A 供应对裂殖壶菌合成二十二碳六烯酸的影响[J]. *中国生物工程杂志*, 2011, 31(4): 87-91.
WEI P, REN LJ, JI XJ, TONG QQ, FENG Y, HUANG H. Effect of reinforcing acetyl-CoA supply in docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp.[J]. *China Biotechnology*, 2011, 31(4): 87-91 (in Chinese).
- [21] SHIBA Y, PARADISE EM, KIRBY J, RO DK, KEASLING JD. Engineering of the pyruvate dehydrogenase bypass in *Saccharomyces cerevisiae* for high-level production of isoprenoids[J]. *Metabolic Engineering*, 2007, 9(2): 160-168.
- [22] CHEN Y, DAVIET L, SCHALK M, SIEWERS V, NIELSEN J. Establishing a platform cell factory through engineering of yeast acetyl-CoA metabolism[J]. *Metabolic Engineering*, 2013, 15: 48-54.
- [23] 王美迟, 王贤纯. 物质代谢网络中葡萄糖有氧分解途径的主干道作用分析及课堂教学[J]. *高师理科学刊*, 2019, 39(1): 94-97, 110.
WANG MC, WANG XC. Analysis and classroom teaching of the main road role of glucose aerobic decomposition pathway in substance metabolic network[J]. *Journal of Science of Teachers' College and University*, 2019, 39(1): 94-97, 110 (in Chinese).
- [24] 王琪琳, 陈路. 三种酮酸与四大类物质代谢的关系[J]. *生命的化学*, 2019, 39(3): 616-622.
WANG QL, CHEN L. The relationship between three major ketoacids and four major types of substance metabolism[J]. *Chemistry of Life*, 2019, 39(3): 616-622 (in Chinese).
- [25] 伏贝贝. 改造酿酒酵母乙酰辅酶 A 合成途径及其在香叶醇生产中的应用[D]. 济南: 齐鲁工业大学硕士学位论文, 2018.
FU BB. Engineering acetyl-CoA synthetic pathway and its application in geraniol production in *Saccharomyces cerevisiae*[D]. Jinan: Master's Thesis of Qilu University of Technology, 2018 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)