

# 信号转导工程及基因工程 在悬浮培养灵芝细胞生产灵芝酸中的应用

岳同辉<sup>1</sup>,姜露熙<sup>1</sup>,李焕军<sup>1</sup>,李娜<sup>2</sup>,徐军伟<sup>1,\*</sup>

(1.昆明理工大学 生命科学与技术学院,云南昆明 650500;

2.昆明理工大学 理学院,云南昆明 650500)

**摘要:**灵芝酸是灵芝中的主要活性成分之一,现代药理和临床研究表明,灵芝酸具有毒杀肿瘤细胞、抑制癌细胞转移、抗 HIV-1 和 HIV-1 蛋白酶等功能。目前悬浮培养灵芝细胞法是大规模生产灵芝酸的重要策略,具有很好的应用潜力和前景。近些年,有大量的文献报道通过不同方式提高灵芝细胞中灵芝酸的含量,并取得了一定进展。文章主要从信号转导调控、诱导子策略和基因工程等方面综述了近年来悬浮培养生产灵芝酸的研究进展,并对以后通过调控代谢通路和合成生物学实现灵芝酸的高效生产进行了展望。

**关键词:**悬浮培养,生物合成,信号转导工程,诱导策略,基因工程

## Applications of signal transduction engineering and genetic engineering in production of ganoderic acid in submerged culture of *Ganoderma lucidum*

YUE Tong-hui<sup>1</sup>, JIANG Lu-xi<sup>1</sup>, LI Huan-jun<sup>1</sup>, LI Na<sup>2</sup>, XU Jun-wei<sup>1,\*</sup>

(1.Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China;

2.Faculty of Science, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

**Abstract:** Ganoderic acids (GAs) are important bioactive constituents produced by *Ganoderma* spp. Modern pharmacological and clinical studies have shown that GAs had extraordinarily pharmacological functions, such as anti-viral, anti-tumor, immuno-modulating effect, etc. Submerged fermentation of *G. lucidum* is a promising technology for efficient production of GAs. Recent publication about fermentation production of GAs in the last decade, especially the progresses toward signal transduction strategies, induction strategies and genetic engineering were summarized in this paper. Moreover, metabolic engineering and synthetic biology approaches for efficient production of GAs were also proposed in this paper.

**Key words:** Submerged culture; biosynthesis; signal transduction; induction strategies; genetic engineering

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2016)15-0370-05

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2016.15.064

灵芝是一种传统的中药材,在亚洲已有上千年的药用历史,随着近些年人们对中药认识度的提升,灵芝也越来越受到重视。灵芝酸是灵芝中的主要活性成分之一。目前,发现的灵芝酸单体有上百种,不同的单体具有不同的药理功能,如 GA-U、GA-V、GA-W、GA-X 和 GA-Y 能够在体外抑制肿瘤细胞<sup>[1]</sup>; GA-C1、GA- $\alpha$  和 GA-H 能够抑制 HIV-1 的蛋白酶活性<sup>[2]</sup>; GA-T 可抑制肺癌细胞的增殖、转移等,GA-S 刺激血小板聚集<sup>[3]</sup>; GA-Me 可有效地抑制肿瘤生长、肺癌细胞转移和肿瘤入侵等<sup>[4-5]</sup>。

由于灵芝酸具有以上重要的生理活性,目前它已成为国内外对灵芝研究的一个热点。悬浮培养是生产灵芝酸的重要策略,具有很好的应用潜力<sup>[6]</sup>。早期的研究主要通过加速灵芝细胞生长和优化培养条件使灵芝酸产率有一定程度的提高,但是仍不能满足市场的需要。灵芝酸的低生产率仍是制约其市场化应用的核心问题之一。灵芝基因组和转录组测序已经完成,为解析灵芝酸的生物合成途径、了解相关分子调控机制奠定了基础。近年来随着对灵芝酸生物合成途径及其调控机制研究的深入,信号转导工

收稿日期:2015-12-14

作者简介:岳同辉(1992-),男,硕士研究生,研究方向:高等真菌代谢工程,E-mail:tonghui\_yue@163.com。

\* 通讯作者:徐军伟(1979-),男,博士,副教授,研究方向:生物技术,应用微生物,微生物代谢工程,E-mail:xjw@163.com, jwxu@kmust.edu.cn。

基金项目:国家自然科学基金项目(31360495, 21566016)。

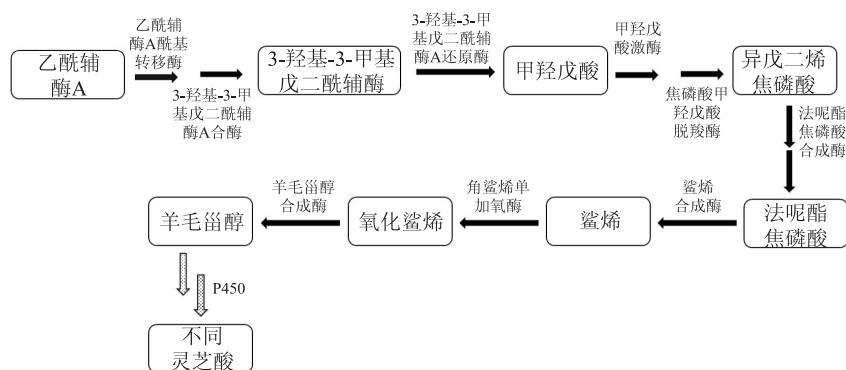


图1 灵芝酸的生物合成途径  
Fig.1 Ganoderic acid biosynthetic pathway

注:P450(细胞色素 P450 酶家族)。

程、诱导子策略和基因工程等一些新的方法开始应用于提高灵芝酸的生产。本文主要就近年来悬浮培养灵芝细胞生产灵芝酸的相关研究进展进行了综述,并对其进一步高效生产进行了展望。

### 1 灵芝酸的生物合成

灵芝酸作为一类四环三萜类化合物,是高度氧化的羊毛甾烷类衍生物。早期的同位素实验表明灵芝酸是由甲羟戊酸/类异戊二烯途径合成的(如图1)<sup>[7]</sup>,反应过程涉及法呢酯焦磷酸在鲨烯合酶的催化下合成鲨烯,后经鲨烯单加氧酶催化产生鲨烯2,3-氧化物,再经羊毛甾醇合成酶形成羊毛甾醇<sup>[8-11]</sup>。Shiao等<sup>[12]</sup>通过同位素标记实验证实了羊毛甾醇可以转化为灵芝酸。近年来,相关的研究表明细胞色素P450酶可能参与了羊毛甾醇的后修饰(骨架的氧化和羟化)形成灵芝酸的过程<sup>[13-14]</sup>。

Shi等<sup>[7]</sup>已经克隆了灵芝酸生物合成途径上游编码3-羟基-3-甲基戊二酰-CoA还原酶、法呢酯焦磷酸合成酶、鲨烯合成酶和羊毛甾醇合成酶的基因。但是至今,对于参与羊毛甾醇后修饰形成灵芝酸的相关P450酶和基因了解尚少。

### 2 信号转导工程及基因工程在悬浮培养灵芝细胞生产灵芝酸中的应用

悬浮培养是在液体培养基中不断搅动或摇动条件下培养细胞或细胞团,它具有快速、低消耗、易控制等优点,是高效生产灵芝酸的一种非常有潜力的

培养方式<sup>[15]</sup>。近些年在提高灵芝酸生产方面有大量的文献报道,早期的研究主要集中在优化培养条件,改变培养方式、培养策略等方面<sup>[16]</sup>。近几年信号转导调控、诱导子策略和基因工程等方法也开始应用到悬浮培养条件下提高灵芝酸产量的研究上。

#### 2.1 信号转导调控

近些年,通过信号转导调控提高次级代谢产物的生产方面受到广泛关注。2012年Xu等<sup>[17]</sup>发现钙调磷酸酶信号通路调节可以明显提高灵芝中三萜类化合物的生物合成,在液体静置培养基中添加Ca<sup>2+</sup>,可以使总灵芝酸的产率达到(86.45 ± 5.42) mg/g DW(细胞干重),单体灵芝酸的产量(GA-Mk, GA-T, GA-S和GA-Me)分别是不添加时的2.6, 4.5, 3.2、3.8倍,灵芝酸生物合成通路相关基因*hmgr*、*sqs*和*ls*以及灵芝酸合成调控相关基因*cam*(钙调蛋白基因)、*can*(钙调神经磷酸酶A亚基基因)以及*Crz1*(转录因子)的表达水平均有上调。后来Xu等<sup>[18]</sup>还发现,在培养基中添加Na<sup>+</sup>,可以分别使GA-Mk, GA-T, GA-S和GA-Me达到263.73 ± 9.06、237.62 ± 5.89、83.13 ± 2.76、100.16 ± 6.12 mg/L,分别是未添加组的3.65、4.30、2.74、3.18倍,并且证明了Na<sup>+</sup>的诱导作用是通过提高细胞质内Ca<sup>2+</sup>的浓度以利于灵芝酸的合成。进一步研究表明Mn<sup>2+</sup>添加也有同样的效果<sup>[19]</sup>。

真菌中许多次级代谢产物的合成受到细胞内氮源的调控<sup>[20-21]</sup>,调控通过细胞内锌指蛋白转录因子*AreA/NZT-2*的介导<sup>[20-22]</sup>。Zhao等<sup>[23]</sup>发现灵芝酸的

表1 不同氮源限制对灵芝酸合成的影响

Table 1 Effect of limitation of different nitrogen sources on GA biosynthesis

氮源	细胞干重 (g/L)	GA含量(μg/mg)			
		Mk	T	S	Me
60 mmol/L 硫酸铵	6.51	0.29	5.21	3.93	1.72
3 mmol/L 硫酸铵	7.12	1.13	17.34	16.81	2.35
60 mmol/L 天冬酰胺	9.61	0.66	1.63	2.90	0.88
3 mmol/L 天冬酰胺	8.06	1.76	11.67	27.46	5.34
60 mmol/L 甘氨酸	9.73	0.99	2.69	8.31	1.75
3 mmol/L 甘氨酸	8.45	0.68	4.74	9.45	1.89
60 mmol/L 谷氨酰胺	10.83	0.92	2.08	4.74	1.58
3 mmol/L 谷氨酰胺	8.88	1.26	7.31	19.25	3.52

合成受灵芝内氮源的影响,并发现在不同氮源(硫酸铵、谷氨酰胺、天冬酰胺和甘氨酸)限制条件下——每种氮源在 3 mmol/L(氮限制条件)下,均提高了灵芝酸产量(如表 1),尤其是硫酸铵、谷氨酰胺和天冬酰胺效果较明显;并进一步研究了效果最好的谷氨酰胺在不同浓度条件下对灵芝酸产量的影响,发现当谷氨酰胺浓度为 3 mmol/L 时,灵芝酸产量达到最大,GA-Mk、GA-T、GA-S 和 GA-Me 分别达到了  $2.16 \pm 0.19$ ,  $11.76 \pm 1.82$ ,  $31.09 \pm 2.67$ ,  $7.04 \pm 0.64$   $\mu\text{g}/\text{mg DW}$ ,分别是基本培养基中的 2.81, 5.84, 8.33, 5.12 倍,总灵芝酸是基本培养基的 4.19 倍,灵芝酸合成相关基因 *hmgr*、*fps*、*sqs*、*ls* 和 *areA* 的表达量分别上调了 37, 18, 4.5, 3.2, 13 倍。

Li 等<sup>[24]</sup>在  $\text{Ca}^{2+}$  添加和氮缺陷实验基础上,发现整合  $\text{Ca}^{2+}$  添加和氮缺陷策略,在培养基中添加 10 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  同时将氮源含量限制在 3 mmol/L 时,可使 GA-T 的含量达到了 1.87 mg/100 mg DW,分别是单独  $\text{Ca}^{2+}$  添加策略和氮缺陷策略的 2.1~4.2 倍。组合策略中中间代谢产物鲨烯的含量分别是  $\text{Ca}^{2+}$  添加和氮缺陷策略的 3.9、2.2 倍, HMGR 和 LS 基因的表达量分别提高到 3.3~7.5 倍和 1.3~2.3 倍。

阿司匹林在酵母细胞和动物细胞中可以诱导细胞的凋亡,但在高等真菌中凋亡信号对次级代谢产物合成的影响仍不清楚。You 等<sup>[25]</sup>研究了阿司匹林作为一种细胞凋亡诱导信号对灵芝细胞的影响,发现阿司匹林可通过诱导 ROS(活性氧)的产生介导灵芝细胞的凋亡,同时通过 Hog1(丝裂原活化蛋白激酶)磷酸化参与灵芝酸的合成,使 GA-24 和总灵芝酸的产量分别提高了 2.7 倍( $515.2 \mu\text{g}/100 \text{mg DW}$ )和 2.8 倍( $5385 \mu\text{g}/100 \text{mg DW}$ )。

以上研究表明,采用合适的信号转导调控策略可以提高灵芝酸的产量,同时灵芝酸生物合成途径的相关基因(*hmgr*、*fps*、*sqs* 和 *ls*)的表达量也有上调。但是相关调控的分子机制需要进一步深入研究。

## 2.2 诱导子策略

诱导子可以影响真菌的生长、孢子的形成、次级代谢的产生以及真菌的细胞形态。常用于真菌的诱导子主要有茉莉酸甲酯、水杨酸、苯巴比妥、乙酸、芦丁等<sup>[26,30]</sup>。

茉莉酸甲酯(MeJA)是与损伤相关的植物激素和信号分子,广泛地存在于植物体中,外源添加能够诱导植物防御相关基因的表达,并促使次级代谢产物的积累。它已应用到植物中诱导人参皂甙、紫杉醇和萜类次级代谢产物的生物合成。

灵芝酸合成途径中 FPS 基因的启动子序列上存在 MeJA 应答元件,可能调控了 FPS 基因的表达。任等<sup>[26]</sup>在灵芝悬浮培养基中添加 MeJA,研究了 MeJA 的添加浓度、添加时间和所用溶剂对灵芝酸产量的影响,发现 254  $\mu\text{mol}/\text{L}$  的 MeJA 溶于吐温 20 在培养第 6 d 添加到培养基中效果最好,使灵芝酸产率达到 4.52 mg/100 mg DW,提高了 45.3%,且灵芝酸生物合成通路相关基因 *fps*、*sqs*、*hmgr*、*mvd*(*mdd*) 和 *osc*(*se*) 等的表达水平平均比对照组要高。

苯巴比妥是一种典型的 P450 诱导剂,可增加几种植物细胞色素 P450 的酶活和相应基因的转录<sup>[27]</sup>。Liang 等<sup>[28]</sup>在灵芝培养基中添加苯巴比妥后提高了灵芝酸的产量,并通过研究苯巴比妥的不同添加剂量和添加时间对灵芝酸产量的影响,发现在悬浮培养转到静置培养后第 5 d 添加 100  $\mu\text{mol}/\text{L}$  苯巴比妥可使总灵芝酸产量达到  $(41.4 \pm 0.6) \text{mg}/\text{g DW}$ ,四种单体灵芝酸产量(GA-Mk, GA-T, GA-S 和 GA-Me)分别提高了 47%, 28%, 36%, 64%;同时,相关基因(*hmgr*、*sqs* 和 *ls*)的表达水平均有上调。

乙酸是一种安全而又经济的诱导剂,已用于降低血清胆固醇、诱导脂肪酸合成酶基因的表达、增加蛋白质乙酰化以及刺激动物、植物和真菌的生长。Ren 等<sup>[29]</sup>研究了在培养基中添加乙酸诱导灵芝酸的合成,并通过响应面法优化培养条件,结果表明乙酸的添加量在 5~8 mmol/L 时,总灵芝酸最高产率提高了 105% ( $5.5 \text{mg}/100 \text{mg DW}$ ),中间代谢产物羊毛甾醇和鲨烯的产率分别达到了 47、15.8  $\mu\text{g}/\text{g DW}$ ,分别提高了 2.5、1.8 倍;乙酸添加诱导了灵芝酸合成通路相关基因 *fps*、*ls*、*cyp51*(细胞色素 P450 家族基因之一)和 *hmgs* 转录水平的提高。

## 2.3 基因工程调控

基因工程已成为从微生物以及高等植物中大量生产生物医学及工业相关化合物的重要工具<sup>[30]</sup>。随着灵芝酸生物合成途径相关基因(*hmgr*、*fps*、*sqs* 和 *ls* 等)的克隆,通过基因工程手段增强灵芝酸的生物合成通路,已成为提高灵芝酸积累的一种有效策略。

在萜类的生物合成途径中, HMGR 是 MVA(甲羟戊酸)途径中一个关键酶(限速酶),它催化 HMG-CoA 生成甲羟戊酸,然后甲羟戊酸被用于合成各种萜类。不同物种的 HMGR 一般由三部分组成: N-端跨膜区域(调节区)、连接区和非常保守的催化区域。

应用基因工程策略的前提是首先获得稳定的遗传转化方法。Xu 等<sup>[31]</sup>将 *sdhB*(编码琥珀酸脱氢酶铁-硫蛋白亚基)基因进行定点突变,并且获得了 *cbx*(萎锈灵)抗性,建立了灵芝的同源基因转化系统,并利用该转化系统成功在灵芝中高表达了 HMGR 基因的催化区域,使总灵芝酸产率达到 29.4 mg/g DW,是野生型菌株的约 2 倍( $14.1 \text{mg}/\text{g DW}$ );使灵芝酸合成通路相关基因(*fps*、*sqs*、*ls*)分别提高了 6.8、6.8、9.1 倍。说明,通过高表达灵芝酸合成途径中的关键基因是提高灵芝酸的产量一种有效策略。

高表达 HMGR 基因的催化亚基虽然使总灵芝酸的产率提高了 2 倍,但是并没有影响四种主要单体灵芝酸(GA-Mk、GA-T、GA-S 和 GA-Me)的产率,由于不同的单体灵芝酸具有的生理活性不同,因此提高单体灵芝酸的产率具有重要意义。*sqs* 是催化从甲羟戊酸途径到三萜生物合成的第一个酶基因,Zhou 等<sup>[32]</sup>又通过在灵芝中高表达 *sqs*,使四种主要的单体灵芝酸(GA-Mk、GA-T、GA-S 和 GA-Me)的最大产率分别达到 16、40、43、53  $\mu\text{g}/100 \text{mg DW}$ ,是野生型菌株的 2.86、2.67、1.95、1.25 倍;并且工程菌株中鲨烯和羊毛甾醇含量分别是野生菌株的 1.55 倍和



1.68 倍, *sqs* 和 *ls* 的表达量分别上调了 15.6 倍和 1.93 倍。

除了对灵芝酸合成通路上相关基因进行高表达外,我们实验室在灵芝细胞中异源表达了透明颤菌血红蛋白基因。它是一种氧结合蛋白,可以在低氧条件下,将氧运输给末端呼吸氧化酶,有效提高细胞的呼吸作用<sup>[33]</sup>。悬浮培养灵芝细胞发酵后期,由于细胞密度较大,氧成为其主要限制条件之一,表达透明颤菌血红蛋白基因将有利于细胞的生长和代谢物的合成。我们的结果表明表达透明颤菌血红蛋白基因的菌株中四种主要的灵芝酸单体含量提高了 1.4~2.2 倍,总灵芝酸也提高了 50%<sup>[34]</sup>。

### 3 展望

虽然已经成功在灵芝中高表达了 HMGR 和 SQS 基因,并且提高了总灵芝酸及单体灵芝酸的产量,但灵芝酸合成通路中还有许多相关基因可以进行基因工程操作(高表达或者沉默),因此共表达多个合成途径结构基因,增强代谢流量,是进一步大幅提高灵芝酸产量的一个方向。

鉴定灵芝酸合成途径相关的 P450 基因对于深入解析灵芝酸的生物合成及代谢调控具有重要意义<sup>[35]</sup>。以后对相关 P450 基因进行基因工程操作,可以改变灵芝酸单体的多样性,提高特定灵芝酸单体的产量,方便高效地制备和回收灵芝酸单体。

采用合成生物学方法异源合成次级代谢产物也备受关注,很多重要的次级代谢产物已经实现了在大肠杆菌、酵母等细胞中异源生产,如利用酿酒酵母生产丁醇、大肠杆菌或者酵母细胞生产单萜等<sup>[36-37]</sup>。解析灵芝酸的合成途径,并实现其异源表达,是高效生产灵芝酸另一个很有潜力的方向。

### 参考文献

[1] Toth J O, Bang L U U, Beck J P, et al. Cytotoxic triterpenes from *Ganoderma lucidum* (polyporaceae): structures of ganoderic acids U - Z [J]. *Journal of Chemical Research*, 1983, 24 (12): 1081-1084.

[2] Min B S, Nakamura N. Triterpenes from the spores of *Ganoderma lucidum* and their inhibitory activity against HIV - 1 protease [J]. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1998, 46 (10): 1607-1612.

[3] Tang W, Liu J W, Zhao W M, et al. Ganoderic acid T from *Ganoderma lucidum* mycelia induces mitochondria mediated apoptosis in lung cancer cells [J]. *Life Sciences*, 2006, 80 (3): 205 - 211.

[4] Wang G, Zhao J, Liu J, et al. Enhancement of IL - 2 and IFN -  $\gamma$  expression and NK cells activity involved in the anti - tumor effect of ganoderic acid Me *in vivo* [J]. *International Immunopharmacology*, 2007, 7 (6): 864 - 870.

[5] Chen N H, Liu J W, Zhong J J. Ganoderic acid Me inhibits tumor invasion through down - regulating matrix metalloproteinases 2/9 gene expression [J]. *Journal of Pharmacological Sciences*, 2008, 108 (2): 212 - 216.

[6] Fang Q H, Zhong J J. Submerged fermentation of higher fungus

*Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites - ganoderic acid and polysaccharide [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2002, 10 (1): 61 - 65.

[7] Shi L, Ren A, Mu D, et al. Current progress in the study on biosynthesis and regulation of ganoderic acids [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 88 (6): 1243 - 1251.

[8] Hirotani M, Asaka I, Furuya T. Investigation of the biosynthesis of 3 $\alpha$  - hydroxytriterpenoids, ganoderic acids T and S, by application of a feeding experiment using [1, 2 - 13C2] acetate [J]. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 1990 (10): 2751 - 2754.

[9] Hirotani M, Furuya T. Changes of the triterpenoid patterns during formation of the fruit body in *Ganoderma lucidum* [J]. *Phytochemistry*, 1990, 29 (12): 3767 - 3771.

[10] Shiao M S. Natural products of the medicinal fungus *Ganoderma lucidum*: occurrence, biological activities, and pharmacological functions [J]. *The Chemical Record*, 2003, 3 (3): 172 - 180.

[11] Shiao MS, Lee LW. Polysaccharides and oxygenated triterpenes in the fungus *Ganoderma lucidum*: Genomic approaches to their biological functions and biosynthesis. 230th ACS National Meeting. Washington, DC, 2005, p 154.

[12] Shiao M S, Lin L J, Yeh S F, et al. Structures, biosynthesis and biological functions of oxygenated triterpenoids in *Ganoderma lucidum* [J]. *Phytochem Ecol*, 1989, 9: 235 - 243.

[13] Liu D, Gong J, Dai W, et al. The genome of *Ganoderma lucidum* provide insights into triterpene biosynthesis and wood degradation [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (5): e36146.

[14] Chen S, Xu J, Liu C, et al. Genome sequence of the model medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* [J]. *Nature Communications*, 2012, 3: 913.

[15] Zhong J J, Tang Y J. Submerged cultivation of medicinal mushrooms for production of valuable bioactive metabolites [J]. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2004, 87: 25 - 59.

[16] Xu J W, Zhao W, Zhong J J. Biotechnological production and application of ganoderic acids [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87 (2): 457 - 466.

[17] Xu Y N, Zhong J J. Impacts of calcium signal transduction on the fermentation production of antitumor ganoderic acids by medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* [J]. *Biotechnol Advances*, 2012, 30 (6): 1301 - 1308.

[18] Xu Y N, Xia X X, Zhong J J. Induced effect of Na<sup>+</sup> on ganoderic acid biosynthesis in static liquid culture of *Ganoderma lucidum* via calcineurin signal transduction [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2013, 110 (7): 1913 - 1923.

[19] Xu Y N, Xia X X, Zhong J J. Induction of ganoderic acid biosynthesis by Mn<sup>2+</sup> in static liquid cultivation of *Ganoderma lucidum* [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2014, 111 (11): 2358 - 2365.

[20] Mihlan M, Homann V, Liu T W D, et al. AREA directly mediates nitrogen regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*, but its activity is not affected by NMR [J].

Molecular Microbiology, 2003, 47(4):975-991.

[21] Marzluf G A. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1997, 61(1):17-32.

[22] Haas H, Marzluf G A. NRE, the major nitrogen regulatory protein of *Penicillium chrysogenum*, binds specifically to elements in the intergenic promoter regions of nitrate assimilation and penicillin biosynthetic gene clusters [J]. Current Genetics, 1995, 28(2):177-183.

[23] Zhao W, Xu J W, Zhong J J. Enhanced production of ganoderic acids in static liquid culture of *Ganoderma lucidum* under nitrogen-limiting conditions [J]. Bioresource Technology, 2011, 102(17):8185-8190.

[24] Li H J, Zhang D H, Han L L, et al. Further improvement in ganoderic acid production in static liquid culture of *Ganoderma lucidum* by integrating nitrogen limitation and calcium ion addition [J]. Bioprocess and biosystems engineering, 2016, 39(1):75-80.

[25] You B J, Lee M H, Tien N, et al. A novel approach to enhancing ganoderic acid production by *Ganoderma lucidum* using apoptosis induction [J]. PLoS One, 2013, 8(1):e53616.

[26] Ren A, Qin L, Shi L, et al. Methyl jasmonate induces ganoderic acid biosynthesis in the basidiomycetous fungus *Ganoderma lucidum* [J]. Bioresource Technology, 2010, 101(17):6785-6790.

[27] Contin A, Collu G, van der Heijden R, et al. The effects of phenobarbital and ketoconazole on the alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 1999, 37(2):139-144.

[28] Liang C X, Li Y B, Xu J W, et al. Enhanced biosynthetic gene expressions and production of ganoderic acids in static liquid culture of *Ganoderma lucidum* under phenobarbital induction [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 86(5):1367-1374.

(上接第369页)

Chemistry, 2012, 681:89-95.

[48] Hamedy P A, FitzGerald R J. Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review [J]. Journal of Functional Foods, 2012, 4(1):6-24.

[49] Kobayashi K, Maehata Y, Okada Y, et al. Medical-grade collagen peptide in injectables provides antioxidant protection [J]. Pharmaceutical Development and Technology, 2013, 20(2):219-226.

[50] Himaya S W A, Ryu B M, Ngo D H, et al. Peptide isolated from Japanese flounder skin gelatin protects against cellular oxidative damage [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(36):9112-9119.

[51] Samaranyaka A G P, Li-Chan E C Y. Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications [J]. Journal of Functional Foods, 2011, 3(4):229-254.

[52] Cao M, Jiang J, Du Y, et al. Mitochondria-targeted

[29] Ren A, Li X B, Miao Z G, et al. Transcript and metabolite alterations increase ganoderic acid content in *Ganoderma lucidum* using acetic acid as an inducer [J]. Biotechnology Letters, 2014, 36(12):2529-2536.

[30] Khan M T H, Ather A, Gambari R. The role of metabolic engineering for the production of secondary metabolites of plants [J]. Minerva Biotechnologica, 2005, 17(3):127.

[31] Xu J W, Xu Y N, Zhong J J. Enhancement of ganoderic acid accumulation by overexpression of an N-terminally truncated 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene in the basidiomycete *Ganoderma lucidum* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(22):7968-7976.

[32] Zhou J S, Ji S L, Ren M F, et al. Enhanced accumulation of individual ganoderic acids in a submerged culture of *Ganoderma lucidum* by the overexpression of squalene synthase gene [J]. Biochemical Engineering Journal, 2014, 90:178-183.

[33] Stark B C, Pagilla K R, Dikshit K L. Recent applications of *Vitreoscilla* hemoglobin technology in bioproduct synthesis and bioremediation [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(4):1627-1636.

[34] Li J H, He L Y, Zhuang D H, et al. Enhancement of ganoderic acid production by constitutively expressing *Vitreoscilla* hemoglobin gene in *Ganoderma lucidum* [J]. Journal of Biotechnology, 2016, 227:35-40.

[35] Xu J W, Zhong J J. Genetic engineering of *Ganoderma lucidum* for the efficient production of ganoderic acids [J]. Bioengineered, 2015, 6(6):357-360.

[36] Hong K K, Nielsen J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: a key cell factory platform for future biorefineries [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2012, 69(16):2671-2690.

[37] Fischer M J C, Meyer S, Claudel P, et al. Metabolic engineering of monoterpene synthesis in yeast [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2011, 108(8):1883-1892.

antioxidant attenuates high glucose-induced P38 MAPK pathway activation in human neuroblastoma cells [J]. Molecular Medicine Reports, 2012, 5(4):929-934.

[53] Mastroeni D, Khdour O M, Arce P M, et al. Novel Antioxidants Protect Mitochondria from the Effects of Oligomeric Amyloid Beta and Contribute to the Maintenance of Epigenome Function [J]. ACS Chemical Neuroscience, 2015, 6(4):588-598.

[54] Zhang T, Li Y, Miao M, et al. Purification and characterisation of a new antioxidant peptide from chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates [J]. Food Chemistry, 2011, 128(1):28-33.

[55] Sarmadi B H, Ismail A. Antioxidative peptides from food proteins: a review [J]. Peptides, 2010, 31(10):1949-1956.

[56] Yang M J, Lin W Y, Lu K H, et al. Evaluating antioxidative activities of amino acid substitutions on mastoparan-B [J]. Peptides, 2011, 32(10):2037-2043.