

外源添加物对食药菌液体发酵影响的研究进展

韦朝阳¹, 贺 亮², 邵双双¹, 冯依力³, 李卫旗^{1,*}, 程俊文²

(1. 浙江大学生命科学院, 浙江 杭州 310058; 2. 浙江省林业科学研究院, 浙江省森林资源生物与化学利用重点实验室, 浙江 杭州 310023; 3. 浙江大学医学院附属邵逸夫医院, 浙江 杭州 310016)

摘 要: 食药菌发酵培养基中加入不同的添加物和合适的剂量, 可显著促进菌丝生物量的提高和次生代谢产物的合成, 文中综述外源添加物中药、生长因子、油脂类物质、信号分子对食药菌液体发酵的影响以及添加物对食药菌液体发酵代谢调控的机理, 为食药菌今后的研究与开发提供一定的理论基础。

关键词: 外源添加物; 食药菌; 液体发酵; 代谢调控

A Review on the Effects of Exogenous Additives on Submerged Fermentation of Edible and Medicinal Fungi

WEI Chaoyang¹, HE Liang², SHAO Shuangshuang¹, FENG Yili³, LI Weiqi^{1,*}, CHENG Junwen²

(1. College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Biological and Chemical Utilization of Forest Resources, Zhejiang Forestry Academy, Hangzhou 310023, China; 3. Sir Run Run Shaw Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310016, China)

Abstract: The biomass production of edible and medicinal fungi and the synthesis of secondary metabolites may be significantly promoted by adding the suitable concentration of additives to the fermentation substrate. This paper reviews the effects of some exogenous additives such as traditional Chinese medicines, growth factors, grease-like materials and signaling molecules on submerged fermentation of edible and medicinal fungi as well as the underlying mechanism of metabolism regulation, which will hopefully provide a theoretic foundation for further research and development of edible and medicinal fungi.

Key words: exogenous additives; edible and medicinal fungi; submerged fermentation; metabolism regulation

中图分类号: TS202.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2015) 07-0245-06

doi:10.7506/spkx1002-6630-201507045

我国真菌资源丰富, 至少有10万余种, 已经报道的食药菌约为1 000种, 实验已探明具有药效的真菌多达300余种, 目前我国大量入药应用的食药菌仅数十种^[1]。真菌中含有丰富的生物活性物质, 如真菌多糖、多肽、氨基酸、蛋白质、生物碱、萜类化合物、色素类化合物、甾醇, 还有核苷类物质、酚、酯类、微量元素和维生素等^[2-3]。据文献报道, 冬虫夏草、灵芝、茯苓、香菇等食药菌具有抗肿瘤活性、免疫调节、健胃保肝等功效, 除此之外还具有活血止痛、抗氧化、抗病毒、抗疲劳、祛痰镇咳等诸多活性作用^[4-5]。

近年来, 液体发酵技术关于提高食药菌发酵产物产量工艺的研究已经有了长足的进展, 为食药菌的生产带来了巨大的利润和便利, 具有广阔的应用前景, 目

前主要集中在培养基和培养条件的优化上, 如碳源、氮源、无机盐、温度、pH值、转速等^[6-7]。传统的发酵优化策略对于提高食药菌的生物量和代谢物的产量是行之有效的, 但除了此方法外, 是否还可以另辟蹊径呢? 如何进一步提高食药菌关键活性产物的产量仍是国内外相关研究者关注的热点。近几年, 研究发现一些外源添加物如中药薏苡仁、玉米油^[8-9]等的添加, 能较大幅度地提高食药菌代谢产物的产量, 或是产生新的代谢物^[10], 采用外源添加物对代谢产物的生物合成进行调控成为食药菌发酵调控的新策略和新手段。文中综述外源添加物中药、生长因子、油脂类物质、信号分子对食药菌液体发酵的影响及其代谢调控的机理, 为食药菌今后的研究与开发提供一定的理论基础。

收稿日期: 2014-04-22

基金项目: 国家林业局“948”项目(2008-4-64); 浙江省科技厅重大科技专项(2012C12004-4);

中央补助地方科技基础条件专项资金项目(20130611A); 浙江省科技厅院所专项(2012F30037);

杭州市农业科研攻关专项资金项目(20120232B48)

作者简介: 韦朝阳(1989—), 男, 硕士研究生, 主要从事食药菌发酵及其多糖研究。E-mail: weichaoyang2012@163.com

*通信作者: 李卫旗(1964—), 男, 副教授, 博士, 主要从事微生物发酵研究。E-mail: liweiqi2007@zju.edu.cn

1 中 药

食药用菌可以分泌庞杂的酶系对中药中的纤维素、淀粉、蛋白质、脂类等丰富的营养成分加以利用,促进真菌生长和产物合成,从而得到丰富的代谢产物。中药发酵技术研究发现,真菌在代谢过程中还有可能对中药中的萜类、黄酮类、生物碱、皂苷类等某些活性物质进行生物转化,消除中药毒副作用,甚至形成新的成分或是活性更高的物质^[11-13],明显增强发酵产物的生物活性和药理功能。目前,研究中所选用的中药主要是草本植物和药用昆虫^[14](如蜚螂等),研究过程中探讨了单味中药和复合(2味及2味以上)中药粉末、水提物、醇提物及不同剂量对食药用菌液体发酵的影响,筛选出对食药用菌生长和代谢产物合成具有促进作用的中药成分及最佳剂量,为食药用菌的研究开发提供科学依据。

李羿等^[15]将1 g/100 mL的薏苡仁、甘草、淡竹叶、桑叶、灵芝和枸杞子6味中药粉末分别加入茯苓发酵培养基中,对其进行摇瓶液体发酵培养,结果发现,6味中药粉末对茯苓菌丝体的生长和胞外多糖的合成均有促进作用,其中薏苡仁粉末最有利于菌体生长,枸杞粉末对胞外多糖的作用最为显著;进一步研究将6味中药粉末分别按质量比1:1的比例组成复合中药加入茯苓发酵培养基中培养,筛选出最优培养基为添加薏苡仁和枸杞子粉末复合中药的培养基,当添加量为0.75%时,其菌丝体生物量最高达14.29 g/L,添加量为2.0%时胞外多糖产量最高达9.81 g/L,但该实验没有排除中药本身所含蛋白质和多糖可能对真菌生物量和胞外多糖产量造成的干扰。采用中药醇提物可基本排除中药中多糖和蛋白质的直接作用,更能反映中药对真菌发酵影响的真实规律,侯晓梅等^[16]报道187.5 g/L生药量的薏苡仁水提物能促进灰树花菌丝体的生长,其生物量为对照组的1.24倍,对灰树花胞外多糖的影响最为显著,其产量为对照组的2.78倍。为了排除中药本身所含多糖和蛋白质的干扰,进一步研究了薏苡仁的醇提物对灰树花液体发酵的影响,结果发现薏苡仁醇提物能有效促进灰树花菌丝体的生长和胞外多糖的分泌,当其添加量为2.0 g/L时生物量是对照组的2.60倍,当其添加量为0.2 g/L时胞外多糖产量是对照组的1.33倍,表明中药薏苡仁对灰树花活性产物合成的促进作用并不是作为有效氮源或碳源而直接起作用的。其机理可能是中药的添加改变了食药用菌细胞壁的结构,使真菌细胞壁透性增加,从而有利于营养物质的摄取和胞内产物的分泌,或是中药能影响胞外产物的生物合成途径,使胞外产物大量合成^[17]。

不同中药对食药用菌生长和代谢产物形成的影响是不同的,不同添加量的中药对食药用菌发酵的影响也各有差异。黄芪粉、茶叶粉、穿心莲粉对茯苓菌体生长和

胞外多糖的合成均有显著促进作用;麦芽粉、三七粉和葛根粉能刺激茯苓分泌胞外多糖,但抑制菌体细胞的生长,而鹿衔草粉正好相反,可有效促进茯苓菌丝体的生长,但却抑制了茯苓胞外多糖的合成或分泌;枸杞粉、山楂粉、丹参粉、茜草粉、连翘粉则不利于茯苓真菌的液体发酵培养^[18]。赵艳等^[19]研究发现不同添加量的枸杞子醇提物对灵芝生物量和胞内三萜产量的影响表现为先增加后减少的趋势,表明枸杞醇提物中可能同时存在促进和抑制灵芝菌丝体生长和胞内三萜合成的功能因子,当枸杞醇提物的添加量>200 mg/L时,随着抑制因子的积累,其抑制作用强于促进作用,因而菌丝体的生长和胞内三萜合成均受到抑制,中药对食药用菌代谢产物合成的影响不是某些成分的直接作用,而是各种成分促进与抑制综合作用的结果。

食药用菌发酵过程中,中药也可能会对发酵产物的生物活性和药理功能产生影响。研究表明,添加陈皮水提物有助于提高冬虫夏草胞外多糖的抗补体活性及抗氧化活性,抗补体活性由48.2%~68.7%提高到了58.0%~80.8%,抗坏血酸当量抗氧化活性(ascorbic acid equivalent antioxidant capacity, AEAC)由142.8~219.5 mg/100 g提高到284.3~384.6 mg/100 g^[20]。在灵芝发酵培养基中添加药用昆虫蜚螂水提物可以较大幅度地提高灵芝发酵物抗小鼠肝癌的活性,使灵芝发酵物的抑癌率比对照组发酵物提高了37.49%^[21]。Lin Fangyi等^[22]也有类似的报道,枸杞水提物对云芝的液体深层发酵具有显著的促进作用,其胞外糖肽产量和生物量分别是对照组的2.72倍和1.56倍,同时其胞外糖肽的免疫调节活性也得到明显的提高。代谢产物活性的改变可能是培养基中添加中药后,刺激或抑制了蝉拟青霉活性物质的代谢量,或是蝉拟青霉在生长代谢过程中对某些中药成分进行了生物转化,产生了新的次生代谢产物,从而改变代谢产物的活性。

2 生长因子

生长因子是微生物生长所必需且需求量很少的有机化合物,主要为维生素、氨基酸和代谢产物的前体等,作为酶的辅基或辅酶参与新陈代谢或是作为代谢产物的中间枢纽,对真菌菌丝生长、代谢产物的合成与分泌具有促进作用。菌丝体生长过程中需要某些维生素类物质参与代谢,据文献报道,VB₁和VB₂对桑黄菌丝生长均有不同程度的促进作用,而且两者合用具有协同作用,在PD培养基中添加0.3 g/L VB₁和0.3 g/L VB₂进行发酵,有利于桑黄菌体增殖,提高多糖产量^[23]。

添加前体物质后,食药用菌可以不需要自身合成而直接利用前体合成次生代谢产物,产物的产量因前体的

加入而有一定的提高。王蕾等^[24]筛选出CM001号与10号作为高产虫草素的优良菌株,在液体培养基中加入不同的前体物及营养物质进行发酵培养,结果表明腺苷、腺嘌呤、丙氨酸、甘氨酸、*L*-天冬氨酸5种物质能大幅度提高两种菌株的虫草素产量,尤其腺嘌呤的效果最明显,虫草素总产量分别是空白对照组的5.57倍和7.09倍,而肌苷、鸟苷、半胱氨酸3种物质抑制了虫草素的合成。腺苷是虫草素的直接前体,腺嘌呤又是腺苷的前体,两者均能有效地提高虫草素产量,但腺嘌呤比腺苷更能迅速有效地被蛹虫草细胞吸收与利用,腺嘌呤更有利于虫草素的合成,因而对虫草素产量的提高更显著;丙氨酸、甘氨酸、*L*-天冬氨酸能提高虫草素产量的原因可能是氨基酸营养物能与前体腺嘌呤和腺苷通过产生有效的协同互补作用使虫草素产量得到大大的提高^[25]。

4-乙酰基安卓奎诺尔B (4-acetylantroquinonol B) 是牛樟芝的关键生物活性成分,Chiang等^[26]认为牛樟芝的某些挥发性化合物可能是它的前体,并从牛樟芝的挥发性化合物中筛选2,4,5-三甲氧基苯甲醛 (2,4,5-trimethoxybenzaldehyde, TMBA) 和橙花叔醇 (nerolidol) 作为发酵过程中的添加物,结果表明这两种化合物均能显著提高4-乙酰基安卓奎诺尔B的产量,但橙花叔醇在高质量浓度 (1 g/100 mL) 时会产生反馈抑制作用,抑制4-乙酰基安卓奎诺尔B的合成;对于HepG2癌细胞的抗癌活性而言,两种化合物均有利于增强4-乙酰基安卓奎诺尔B的抗癌活性,而且TMBA的作用较橙花叔醇更为显著,因而TMBA是4-乙酰基安卓奎诺尔B的最佳前体。文献报道,甾醇也可作为诱导因子增加猪苓甾体的积累,胆固醇、 β -谷甾醇和豆甾醇3种甾醇中,胆固醇最有利于猪苓甾体的积累,因其结构更接近于甾体合成过程中的中间产物,且水溶性较 β -谷甾醇和豆甾醇高,因而诱导效果最好,当其添加质量浓度为0.02 g/100 mL时,猪苓总甾体的净增量最高,达到53.224 mg^[27]。

3 油脂类物质

研究发现一些油脂类物质和表面活性剂在食药菌液体发酵生产中除了作为消泡剂^[28]外,还能对真菌的生长代谢产生影响,人们便开始尝试用它们作为诱导因子来促进食药菌特定活性成分的合成^[29-31]。近些年来人们主要关注脂肪酸、植物油等油脂类物质对食药菌液体发酵影响的研究,油脂物质能促进真菌生长代谢与油或脂肪酸改变真菌细胞膜结构和通透性或直接影响代谢途径中某些重要的酶活性有关。高兴喜等^[32]报道,油酸能显著促进灵芝菌丝体的生长、胞内多糖的合成及胞内外三萜的积累,硬脂酸有利于灵芝胞外多糖和胞内多糖的

产生,此外,亚油酸对灵芝胞内三萜具有较强的诱导效果。植物油能促进食药菌的生长代谢,是一种有效的调控方式,Yang Hailong等^[33]报道薏苡仁油对灵芝液体发酵具有显著的促进作用,添加量为2% (体积分数) 的薏苡仁油使灵芝生物量达10.71 g/L,三萜含量达92.94 mg/L,胞外多糖产量为0.33 g/L,胞内多糖产量为0.389 g/L,分别是对照组的3.34、2.76、2.2倍和2.23倍。Zhou Huabin等^[34]研究发现0.2% (体积分数) 的薏苡仁脂有助于灵芝菌丝生长和胞内多糖及胞外多糖的合成,在发酵过程中葡萄糖快速消耗,而薏苡仁脂的含量却变化不大,并且发酵液的pH值基本不变,表明薏苡仁脂并非作为碳源直接影响灵芝的生长代谢,而是作为一个促进因子起作用,而其对生物量和多糖产量的促进作用也不是通过改变发酵液的pH值,而且灵芝多糖生物合成途径中的一些重要酶的活性也受到薏苡仁脂的影响。

研究表明,表面活性剂如吐温-80能有效促进食药菌中活性代谢产物的合成,在牛樟芝液体发酵的第72小时添加0.1 g/100 mL的吐温-80, Antrodin C的产量明显高于对照组,由 (52.37 $\pm$ 1.02) mg/L提高到 (103.76 $\pm$ 0.92) mg/L,在吐温-80和大豆油的耦合发酵体系中, Antrodin C的最大产量是对照组的3.6倍^[35]。Zhang Bobo等^[36]报道在虎奶菇发酵的第5天向培养基中添加3.0 g/L吐温-80,使虎奶菇的生物量和胞外多糖产量相比对照组分别提高了51.3%和41.8%,有趣的是,吐温-80虽然未改变虎奶菇胞外多糖的化学结构和组成,但其多糖的分子质量却明显低于对照组,由 (4.30 $\pm$ 0.12) $\times 10^6$ D变为 (3.18 $\pm$ 0.09) $\times 10^6$ D。吐温-80影响食药菌新陈代谢的机制可能与菌丝体细胞膜的完整结构和跨膜运输活性有关^[37]。表面活性剂的分子结构具有两亲性,而真菌细胞膜结构也由一层两亲性的磷脂组成,因而表面活性剂可能局部嵌合到细胞膜中,从而加快了细胞从培养基中摄取营养的速率^[38]。

4 信号分子

信号分子如激素、真菌激发子、短肽、气体分子 (NO、CO) 以及Ca²⁺、Cu²⁺等可以通过激活特定代谢途径来提高代谢产物的产量,在调控食药菌的生长代谢中发挥着重要作用。

通过激素传递信息是最广泛的一种信号传导方式,陈安徽等^[39]发现细胞分裂素6-苄氨基嘌呤 (6-benzylaminopurine, 6-BA) 具有一定的提高蝉拟青霉最大生物量的作用,其中,中剂量6-BA显著缩短了蝉拟青霉的发酵周期,而且最大生物量也提高了28.96%。同时也改变了蝉拟青霉菌丝体中活性物质的代谢节奏,和对照组相比,低剂量6-BA使胞内多糖产量比对照

组提高了47.37%，相应发酵时间的虫草素产量提高了139.50%。魏原芝等^[40]报道不同的植物激素及同一植物激素的不同浓度对杏鲍菇生长代谢的影响程度各不相同，这可能由于其激活了杏鲍菇菌丝伸长生长有关的氨基酸、辅酶、蛋白质等代谢酶的合成，提高菌丝胞外酶活性，增强菌丝对营养物质的吸收与利用，从而影响细胞内的新陈代谢。Ren Ang等^[41]在灵芝发酵过程中通过添加茉莉酸甲酯（methyl jasmonate, MeJA）诱导灵芝酸的合成，于发酵第6天时加入254 $\mu\text{mol/L}$ 的MeJA，得到菌丝体中灵芝酸的产量为4.52 mg/100 mg，比对照组提高了45.3%，灵芝酸产量的显著提高与MeJA对其生物合成关键性酶基因表达均有不同程度的诱导作用有关。

真菌激发子（fungal elicitors）是来源于真菌的一种特定化学物质或信号，它们可以是真菌的多糖、多肽、发酵液、真菌分泌产物等，能激活特定次生代谢途径，刺激真菌细胞产生并且积累特定的生物活性成分。马晓宁等^[42]选取7种食药菌多糖作为激发子，其中来自蛹虫草菌株CM-JS菌丝体的多糖激发子CM-JS对蛹虫草多糖的生物合成有显著诱导作用，通过工艺优化得到CM-JS的最佳添加量为70.328 $\mu\text{g/mL}$ ，在蛹虫草发酵第2天加入激发子并激发3 d时间，能使蛹虫草干菌丝中的多糖含量提高54.16%，达到342.5 mg/g。据文献报道，源自梗孢菌（*Monilinia fructicola*）菌丝体中的一种多肽可诱导菜豆内果皮中菜豆素的形成和积累，进而董玉洁等^[43]从中华真地鳖中分离得到一种多肽，并研究其对北虫草虫草菌素产量的影响，结果发现添加地鳖多肽可显著提高北虫草虫草菌素的产量，在北虫草发酵的第3天添加4 mg地鳖多肽发酵至第7天，其虫草菌素产量最高达55.43 $\mu\text{g/mL}$ ，约为对照组虫草菌素产量的2倍。

一氧化氮（NO）是一种重要的活性氮，对诱导真菌次生代谢产物的合成与积累具有一定的作用^[44]。王松华等^[45]采用硝普钠（sodium nitroprusride, SNP）作为外源一氧化氮的供体，加入灵芝发酵培养基中进行发酵，发现0.5 mmol/L的SNP能显著促进灵芝菌体生长和胞外多糖及胞内多糖的合成，其产量分别为对照组的1.19、2.58倍和1.55倍，当SNP浓度 >4 mmol/L时，灵芝菌丝体生物量胞外多糖和胞内多糖的产量均呈现下降趋势，说明过高浓度的SNP抑制菌体的生长和灵芝多糖的产生。

金属元素在真菌的生长发育以及代谢中是不可或缺的，它们对真菌的细胞组成、酶的激活和新陈代谢具有重要作用，其中 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 等金属元素作为真菌代谢途径中重要的信号分子，可通过调控信号途径来提高食药菌代谢产物的产量。徐铁宁^[46]发现添加 Ca^{2+} 、 Na^{+} 和 Mn^{2+} 能够有效地提高灵芝酸产量，其中10 mmol/L Ca^{2+} 的影响最显著，总灵芝酸的产量达（1.58 $\pm$ 0.03）g/L，它们调控灵芝代谢的分子机制是 Ca^{2+} 、 Na^{+} 和 Mn^{2+} 能够

上调灵芝胞内 Ca^{2+} 水平，从而促发钙调磷脂酶信号，通过上调钙调磷脂酶信号基因和灵芝酸生物合成基因的转录水平来促进灵芝酸的合成。Fan Dandan等^[47]发现 FeSO_4 可作为蛹虫草中虫草素的有效诱导剂，其最佳添加条件为在发酵的第1天向蛹虫草培养基中加入1 g/L FeSO_4 进行发酵，虫草素最高产量达（596.59 $\pm$ 85.50）mg/L，较对照组提高了70%，研究发现， Fe^{2+} 对虫草素合成的促进作用主要是通过对嘌呤核苷类物质代谢途径中编码由IMP合成AMP关键酶的*purA*基因进行正调控实现的。

5 添加物对食药菌液体发酵代谢调控的机理

上述研究表明外源添加物能够有效调控食药真菌代谢物的生物合成，通过添加中药成分、重要前体物质、油脂类物质及信号分子，对食药菌代谢产物生物合成途径中关键酶的活性进行调节或诱导次级代谢途径中特定酶的基因表达进而激活特定次生代谢途径，或是改变细胞通透性，从而最大限度地积累目的产物。

食药菌的代谢调控主要是通过控制酶的作用来实现的，其调节类型主要有两种^[48]，一种是酶活性调节，提高代谢产物合成途径中重要酶的酶活力，或抑制一些与代谢产物生物合成无关的旁路代谢途径中关键酶的酶活力，将细胞的物质和能量导向目的产物生物合成途径，促进代谢产物的合成，是在酶化学水平发生的。贺宗毅等^[49]报道中药天麻的添加有助于灰树花胞外多糖产量的提高，同时对灰树花多糖合成代谢途径中的两个重要酶葡萄糖磷酸异构酶（glucose phosphate isomerase, PGI）和 α -葡萄糖磷酸变位酶（ α -phosphoglucomutase, α -PGM）的酶活力进行测定，其中PGI是糖酵解途径中的重要酶， α -PGM是与胞外多糖合成相关的重要酶。结果发现，对照组与天麻组的 α -PGM变位酶酶活力并无显著差异，而天麻组的PGI异构酶活力明显低于对照组，表明中药天麻中的天麻素或其复合成分对灰树花多糖合成代谢途径中PGI异构酶具有显著的抑制作用，即抑制了灰树花多糖的糖酵解途径，从而有利于葡萄糖-6-磷酸向灰树花多糖合成的途径迁移。Zhou Huabin等^[34]也有类似发现，薏苡仁脂能较大幅度地提高灵芝多糖的产量，进而研究了薏苡仁脂对灵芝多糖EMP途径中关键酶 α -PGM和PGI活性的影响，结果显示，在发酵的第4、6、8天，对照组PGI异构酶的活力分别为7.46、3.11、2.15 nmol/（min $\cdot$ mg pro），而添加薏苡仁脂后的PGI异构酶的活力分别为5.46、1.14、0.52 nmol/（min $\cdot$ mg pro），PGI异构酶的活性明显低于对照组； α -PGM变位酶酶活力明显高于对照组，在发酵第8天，添加薏苡仁脂的 α -PGM变位酶活力最高达到121.32 nmol/（min $\cdot$ mg pro）（对照组为1.47 nmol/（min $\cdot$ mg pro）），表明薏苡仁脂促进灵

芝多糖合成的机制是通过直接调节PGI异构酶和 α -PGM变位酶的活性来实现的。

酶调节的另一种类型是酶合成的调节,诱导食用菌代谢产物途径中特定酶的基因表达,调节酶分子的合成量,进而激活特定次生代谢途径,引起反应速率和次级代谢途径通量的改变,从而积累特定目的代谢产物,是在遗传学水平上发生的。Xu Yining等^[50]发现钙调磷脂酶信号转导对灵芝酸产量影响显著,添加10 mmol/L Ca^{2+} 进行灵芝液体发酵,总灵芝酸(ganoderic acid, GA)的产量(干质量)在发酵第4天时达到了 (62.55 ± 2.05) mg/g,是对照组的3.7倍。添加 Ca^{2+} 时,促发了钙调磷脂酶信号,该信号通过上调钙调磷脂酶信号途径基因 cam 、 cna 和 crz1 及灵芝酸生物合成基因 hmgr 、 sqs 和 ls 的转录水平来大幅度提高灵芝酸产量。Ren Ang等^[41]在灵芝发酵过程中通过添加茉莉酸甲酯MeJA诱导了灵芝酸的合成,并对其生物合成途径中关键性酶基因(hmgr 、 hmgs 、 mvd 、 fps 、 sqs 、 osc)的表达进行了研究,经条件优化得到在发酵第6天时加入最佳浓度为254 $\mu\text{mol/L}$ 的MeJA,灵芝酸的产量(以干质量计)达到最大值4.52 mg/100 mg,较对照组提高了45.3%,而且上述6个酶基因的转录水平均有不同程度的提高。Fan Dandan等^[47]对嘌呤核苷酸生物合成途径中3个重要基因 purA (编码腺苷酸琥珀酸合成酶)、 purH (编码IMP环化水解酶)、 guaB (编码IMP脱氢酶)转录水平的研究表明,添加 FeSO_4 后 purA 的转录水平显著上调,而 purH 和 guaB 的转录水平略有下调,表明 purA 是调控嘌呤核苷酸生物合成的基因,虫草素产量的提高可能归因于 purA 的转录水平的上调。因而 Fe^{2+} 对虫草素合成的促进作用主要是通过对嘌呤核苷类物质代谢途径中编码由IMP合成AMP关键酶的 purA 基因进行正调控实现的。

代谢产物在胞内合成并向胞外分泌,而代谢产物在胞内积累会对其自身合成有一定的反馈抑制作用,因而细胞壁、质膜对代谢产物的通透性,也是影响代谢产物分泌以及其胞外产量的重要因素之一。Zhang Bobo等^[51]提出了一个模型用以阐述刺激剂如表面活性剂吐温-80通过增大细胞膜的通透性来提胞外代谢产物产量的机制,即首先是吐温-80添加后,上调了脂肪酸合成酶的 α 亚基FasA的表达,进而促进长链脂肪酸的合成,增加脂肪酸含量,并掺入菌丝细胞膜中增加细胞膜活性;然后,不同表达量的通信蛋白如磷脂酶D1(下调)和假定蛋白PGUG_02954(上调)可能介导了菌丝细胞和细胞外刺激物(吐温-80)之间的信号转导;最后,ATP结合盒转运蛋白下调作为泵将胞外多糖挤压出细胞,导致胞外多糖产量显著提高。

6 结 语

食用菌中含有丰富而独特的营养物质,不仅口味鲜美而且兼具多种药理功能,因而备受人们喜爱。随着食用菌的药用价值和营养价值逐渐被认识,人们对它们的需求也逐年增加。为了满足不断扩大的市场需求,食用菌液体发酵技术备受国内外研究人员的关注。充分地应用现代生物学技术,不断提高食用菌液体发酵培养技术,深入研究食用菌液体发酵代谢产物的生物合成途径,探讨添加物对食用菌液体发酵代谢物生物合成的影响及其调控机制,筛选合适的添加物加入到发酵基质中,大力促进目标产物及新化合物的生物合成,提高食用菌有效活性成分的产量和药理活性,实现食用菌资源高值化的利用,无论在理论上还是实践上指导真菌发酵生产都具有重要的研究意义。随着食用菌代谢产物生物合成途径及调控机制研究的不断突破,通过一些关键合成酶基因的表达和相关代谢途径中重要酶活性的调控,将是今后食用菌液体发酵代谢调控研究的热点。

参考文献:

- [1] 黄年来. 中国最有开发前景的主要药用真菌[J]. 食用菌, 2005, 27(1): 3-4.
- [2] 贺亮, 马云文, 程俊文, 等. 药用真菌蝉拟青霉生物活性物质的研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2012, 31(1): 8-16.
- [3] WEI Zhenhua, DUAN Yingyi, QIAN Yongqing, et al. Screening of *Ganoderma* strains with high polysaccharides and ganoderic acid contents and optimization of the fermentation medium by statistical methods[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2014, 37(9): 1789-1797.
- [4] 孔怡, 武晓亮, 兰玉菲, 等. 药用真菌云芝的研究进展[J]. 农学学报, 2014, 4(2): 82-84.
- [5] 牛爽, 郝利民, 赵树欣, 等. 茯苓多糖的研究进展[J]. 食品科学, 2012, 33(13): 348-353.
- [6] WU Zhongwei, LU Junwen, WANG Xiaoping, et al. Optimization for production of exopolysaccharides with antitumor activity *in vitro* from *Paecilomyces hepiali*[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 99: 226-234.
- [7] TANG Jiapeng, LIU Yiting, ZHU Li. Optimization of fermentation conditions and purification of cordycepin from *Cordyceps militaris*[J]. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 2014, 44(1): 90-106.
- [8] 李羿, 李晨, 游元元, 等. 以薏苡仁为基质的茯苓发酵罐补料液体发酵[J]. 药物生物技术, 2011, 18(5): 407-410.
- [9] HUANG H C, CHEN C I, HUNG C N, et al. Experimental analysis of the oil addition effect on mycelia and polysaccharide productions in *Ganoderma lucidum* submerged culture[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2009, 32(2): 217-224.
- [10] 王玉红, 丁重阳, 徐鹏, 等. 中药黄芪对发酵生产灵芝多糖的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 24(2): 38-45.
- [11] 李国红, 沈月毛, 王启方, 等. 发酵三七中的皂苷成分研究[J]. 中草药, 2005, 36(4): 499-500.
- [12] 王身艳, 陈建伟, 张蔚学, 等. 双向发酵对白芍HPLC指纹图谱及芍药苷含量的影响[J]. 现代中药研究与实践, 2009, 23(2): 6-9.
- [13] 崔月花, 杨艳彬, 章克昌. 几种中药对灵芝发酵影响的研究[J]. 食用菌学报, 2008, 15(1): 55-61.

- [14] LIU Gaoqiang, XIAO Huaxi, WANG Xiaoling, et al. Stimulated production of triterpenoids of *Ganoderma lucidum* by an ether extract from the medicinal insect, *Catharsius molossus*, and identification of the key stimulating active components[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2011, 165(1): 87-97.
- [15] 李羿, 杨胜, 李晨, 等. 茯苓摇瓶液体发酵复合药性培养基及其化学成分研究[J]. 中草药, 2012, 43(8): 1519-1522.
- [16] 侯晓梅, 陈敏青, 张慧蕾, 等. 中药提取物对灰树花深层发酵的影响[J]. 食品科技, 2013, 38(9): 185-188.
- [17] 刘高强, 赵艳, 王晓玲, 等. 灵芝多糖的生物合成和发酵调控[J]. 菌物学报, 2011, 30(2): 198-205.
- [18] 崔培梧, 吴红娟, 谭朝阳, 等. 植物药-茯苓菌双向发酵代谢特征初探[J]. 湖南中医药大学学报, 2013, 33(7): 37-40.
- [19] 赵艳, 刘高强, 朱朝阳, 等. 不同植物药提取物对灵芝细胞生长和胞内三萜产物形成的影响[J]. 菌物学报, 2011, 30(2): 249-254.
- [20] CHOI J W, RA K S, KIM S Y, et al. Enhancement of anti-complementary and radical scavenging activities in the submerged culture of *Cordyceps sinensis* by addition of citrus peel[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(15): 6028-6034.
- [21] 刘高强, 丁重阳, 章克昌, 等. 药用昆虫蛭蟥对灵芝发酵和抗小鼠肝癌活性的影响[J]. 生物工程学报, 2009, 26(6): 880-886.
- [22] LIN Fangyi, LAI Y K, YU Haochen, et al. Effects of *Lycium barbarum* extract on production and immunomodulatory activity of the extracellular polysaccharopeptides from submerged fermentation culture of *Coriolus versicolor*[J]. Food Chemistry, 2008, 110(2): 446-453.
- [23] 丁兴红, 温成平, 丁志山, 等. 桑黄液体发酵生产多糖工艺研究[J]. 中草药, 2012, 43(5): 906-909.
- [24] 王蕾, 罗巍, 胡瑕, 等. 虫草素高产菌株的筛选及不同添加物对虫草素产量的影响研究[J]. 菌物学报, 2012, 31(3): 382-388.
- [25] 文庭池, 康冀川, 雷帮星, 等. 前体及营养物质提高蛹虫草虫草素产量的研究[J]. 食品科学, 2010, 31(5): 175-179.
- [26] CHIANG C C, HUANG T N, LIN Yuwei, et al. Enhancement of 4-acetylanthroquinone B production by supplementation of its precursor during submerged fermentation of *Antrodia cinnamomea*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(38): 9160-9165.
- [27] 钟慧敏, 王俊儒, 李同臣. 3种诱导因子对发酵法生产猪苓甾体的影响[J]. 西北林学院学报, 2011, 26(3): 132-135.
- [28] PARK J P, KIM S W, HWANG H J, et al. Stimulatory effect of plant oils and fatty acids on the exo-biopolymer production in *Cordyceps militaris*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 31(3): 250-255.
- [29] HSIEH C, WANG H L, CHEN C C, et al. Effect of plant oil and surfactant on the production of mycelial biomass and polysaccharides in submerged culture of *Grifola frondosa*[J]. Biochemical Engineering Journal, 2008, 38(2): 198-205.
- [30] CUI Jiandong, ZHANG Yanan. Evaluation of metal ions and surfactants effect on cell growth and exopolysaccharide production in two-stage submerged culture of *Cordyceps militaris*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2012, 168(6): 1394-1404.
- [31] 毕澎洋, 杨海龙, 闵伟红. 薏苡仁油和薏苡仁酯促进灵芝深层发酵的研究[J]. 食品工业科技, 2011, 32(12): 226-228.
- [32] 高兴喜, 姚强, 宫志远, 等. 不同脂肪酸对桑黄液体发酵的影响[J]. 食品科学, 2011, 32(7): 198-201.
- [33] YANG Hailong, MIN Weihong, BI Pengyang, et al. Stimulatory effects of *Coix lacryma-jobi* oil on the mycelial growth and metabolites biosynthesis by the submerged culture of *Ganoderma lucidum*[J]. Biochemical Engineering Journal, 2013, 76: 77-82.
- [34] ZHOU Huabin, BI Pengyang, WU Xiangting, et al. Improved polysaccharide production in submerged culture of *Ganoderma lucidum* by the addition of coixinolide[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 172(3): 1497-1505.
- [35] ZHANG Huan, XIA Yongjun, WANG Yuanlong, et al. Coupling use of surfactant and *in situ* extractant for enhanced production of Anrocin C by submerged fermentation of *Antrodia camphorata*[J]. Biochemical Engineering Journal, 2013, 79: 194-199.
- [36] ZHANG Bobo, CHEUNG P C K. Use of stimulatory agents to enhance the production of bioactive exopolysaccharide from *Pleurotus tuber-regium* by submerged fermentation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(4): 1210-1216.
- [37] ZHANG Bobo, CHEUNG P C K. A mechanistic study of the enhancing effect of Tween 80 on the mycelial growth and exopolysaccharide production by *Pleurotus tuber-regium*[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(17): 8323-8326.
- [38] CHEN Huabing, HUANG H C, CHEN C I, et al. The use of additives as the stimulator on mycelial biomass and exopolysaccharide productions in submerged culture of *Grifola umbellata*[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2010, 33(3): 401-406.
- [39] 陈安徽, 王卫东, 陈宏伟, 等. 激素对蝉拟青霉深层液体发酵生长代谢的调控作用[J]. 食品科学, 2010, 31(23): 317-321.
- [40] 魏原芝, 陈书进, 赵盼, 等. 植物激素对杏鲍菇菌丝生长及酶活性的影响[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(29): 14179-14180.
- [41] REN Ang, QIN Lei, SHI Liang, et al. Methyl jasmonate induces ganoderic acid biosynthesis in the basidiomycetous fungus *Ganoderma lucidum*[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(17): 6785-6790.
- [42] 马晓宁, 贾俊强, 滕国琴, 等. 真菌多糖激发子的筛选及对蛹虫草多糖激发条件的优化[J]. 蚕业科学, 2012, 38(4): 734-739.
- [43] 董玉洁, 朴美子. 地鳖多肽对北虫草虫草素产量的影响[J]. 中国食品学报, 2013, 13(6): 129-133.
- [44] ZHENG Weifa, LIU Yubing, PAN Shenyuan, et al. Involvements of S-nitrosylation and denitrosylation in the production of polyphenols by *Inonotus obliquus*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 90(5): 1763-1772.
- [45] 王松华, 张强, 李正鹏, 等. 一氧化氮对灵芝多糖产量的影响[J]. 安徽科技学院学报, 2013, 27(3): 25-28.
- [46] 徐铁宁. 钙调磷酸酶信号对灵芝菌丝体液体发酵生产抗癌次级代谢物灵芝酸的影响[D]. 上海: 上海交通大学, 2013.
- [47] FAN Dandan, WANG Wei, ZHONG Jianjiang. Enhancement of cordycepin production in submerged cultures of *Cordyceps militaris* by addition of ferrous sulfate[J]. Biochemical Engineering Journal, 2012, 60(15): 30-35.
- [48] 沈萍, 陈向东. 微生物学[M]. 2版. 北京: 高等教育出版社, 2006: 126.
- [49] 贺宗毅, 吴天祥, 徐晓宝. 中药天麻成分对灰树花胞外多糖合成及相关关键酶的影响[J]. 食品科学, 2013, 34(11): 199-202. doi: 10.7506/spkx1002-6630-201311043.
- [50] XU Yining, ZHONG Jianjiang. Impacts of calcium signal transduction on the fermentation production of antitumor ganoderic acids by medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*[J]. Biotechnology Advances, 2012, 30(6): 1301-1308.
- [51] ZHANG Bobo, CHEN Lei, CHEUNG P C K. Two-dimensional gel electrophoresis analysis of mycelial cells treated with Tween 80: differentially expressed protein related to enhanced metabolite production[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(42): 10585-10591.