

研究报告

产黄青霉菌响应苯氧乙酸的 Ca^{2+} 信号转导机制

完莉萍¹ 程景胜^{1*} 李小兵² 元英进¹

(1. 天津大学(北洋园校区)化工学院制药工程系 天津 300350)

(2. 石家庄学院生物工程系 河北 石家庄 050035)

摘要:【目的】研究青霉素 V 生产过程中— Ca^{2+} 信号转导途径参与产黄青霉菌对外源侧链前体苯氧乙酸的应答机制。【方法】考察 4 种不同机制的 Ca^{2+} 信号干扰剂[利心平、乙二醇双(2-氨基乙基醚)四乙酸、苏拉明和硫酸新霉素]对青霉素 V 产量和产黄青霉菌生物量的影响。运用 Fluo-3/AM 荧光染料对细胞进行染色,通过荧光显微镜成像和酶标仪定量检测两种方法监测胞内 Ca^{2+} 浓度的变化。【结果】苯氧乙酸添加后胞内 Ca^{2+} 相对含量高于对照组 49.86%,而 1 mmol/L 磷酸酯酶 C 底物抑制剂硫酸新霉素的添加使得胞内 Ca^{2+} 相对含量降低了 53.31%,同时青霉素 V 产量降低 78.71%,表明产黄青霉菌可通过肌醇 1,4,5-三磷酸信号途径调节胞内 Ca^{2+} 浓度来响应苯氧乙酸的胁迫。【结论】首次探究了 Ca^{2+} 信号转导途径在产黄青霉菌对苯氧乙酸应答中的作用,为丝状真菌中 $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ - Ca^{2+} 信号转导途径的研究提供理论依据。

关键词: Ca^{2+} 信号转导, 苯氧乙酸, 青霉素, 产黄青霉菌

Calcium-associated signals responses of *Penicillium chrysogenum* to phenoxyacetic acid

WAN Li-Ping¹ CHENG Jing-Sheng^{1*} LI Xiao-Bing² YUAN Ying-Jin¹

(1. Department of Pharmaceutical Engineering, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University (Peiyang Park Campus), Tianjin 300350, China)

(2. Department of Biological Engineering, Shijiazhuang University, Shijiazhuang, Hebei 050035, China)

Abstract: [Objective] We studied calcium-associated signal responses of *Penicillium chrysogenum* to phenoxyacetic acid. [Methods] The effects of different types of Ca^{2+} interference agents (Nifedipine, EGTA, Suramin and Neomycin sulfate) for penicillin V production were studied. Intracellular Ca^{2+} concentration was measured by Olympus System microscope and SpectraMax M2 Fluorescence Microplate Reader. [Results] Levels of intracellular Ca^{2+} in *P. chrysogenum* significantly increased (49.86% higher than the control) at 25 h after treatment with phenoxyacetic acid (POA), whereas

Foundation item: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2014CB745100); National Natural Science Foundation of China (No. 21176183, 21576201)

*Corresponding author: Tel: 86-22-85356520; E-mail: jscheng@tju.edu.cn

Received: July 11, 2016; Accepted: October 27, 2016; Published online (www.cnki.net): November 09, 2016

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目(973 计划) (No. 2014CB745100); 国家自然科学基金项目(No. 21176183, 21576201)

*通讯作者: Tel: 86-22-85356520; E-mail: jscheng@tju.edu.cn

收稿日期: 2016-07-11; 接受日期: 2016-10-27; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-11-09

significantly reduced (53.31% lower than the control) after treatment with neomycin sulfate as an intracellular calcium inhibitor. Results indicate that cells regulated intracellular calcium level through Ins(1,4,5) P_3 signaling pathways to response POA stress. **[Conclusion]** Understanding the effect of Ca^{2+} signal transduction pathway how *P. chrysogenum* responses to POA stress provides guidance for industrial penicillin production.

Keywords: Ca^{2+} signal transduction, Phenoxyacetic acid, Penicillin, *Penicillium chrysogenum*

青霉素具有抗菌作用强、疗效好、毒副作用低等优点,是临床抗感染的首选药物之一^[1-2],已成为年产量超过 6 万 t 的单项产品^[3],年销售额达 15 亿美元,占总抗生素市场份额的 65%^[4]。在工业青霉素生产过程中,通常需向培养基中添加一定浓度的外源侧链前体苯乙酸或苯氧乙酸,否则发酵液中将积累大量的 6-氨基青霉烷酸和少量不同种类的青霉素衍生物^[5]。然而苯乙酸和苯氧乙酸都是弱酸,对细胞有一定的毒害作用,主要包括对菌体生长、青霉素生物合成及弱酸解偶联等关键酶的特异性抑制作用^[6-7],因此一直是工业青霉素生产的瓶颈。

Ca^{2+} 是真核生物中普遍存在的胞内第二信使,能够将很多胞外化学或物理刺激通过不同的信号途径转换成胞内应答反应,而这些信号转导途径最典型的特征是胞内游离型 Ca^{2+} 水平瞬时升高^[8]。在真核细胞中,胞质 Ca^{2+} 的静息(低)水平主要通过控制 Ca^{2+} 泵和转运子的活性维持。而激素、环境因子等外部信号则能引起胞内 Ca^{2+} 水平瞬间增大, Ca^{2+} 作为第二信使能激活许多下游信号分子,如蛋白激酶 C 和钙调蛋白结合型激酶等^[9]。在许多真核生物中,已证实 Ca^{2+} 介导的信号转导途径参与外界刺激,如渗透压、热击、机械刺激、氧化应激和电刺激等的应答^[10]。目前,丝状真菌中的分子生物学等研究表明, Ca^{2+} 参与真菌的基本生理过程^[11]和特异性发育包括孢子形成、菌丝分枝^[12]、孢子再生^[13]、菌丝方向^[14]等,然而 Ca^{2+} 在丝状真菌中介导的信号转导途径目前还不是很清楚。

此外,外源前体苯氧乙酸对产黄青霉菌(*Penicillium chrysogenum*)影响的多效性还不是很清楚,目前大多研究都只专注于其在产黄青霉菌中的

转运方式。本研究首次探查了 Ca^{2+} 信号转导途径在产黄青霉菌对苯氧乙酸应答反应中的作用,从而为工业化青霉素生产提供指导作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: *Penicillium chrysogenum* (CGMCC 3.5129), 购买于中国普通微生物菌种保藏管理中心; *Micrococcus luteus* (CGMCC 1.1848), 天津大学乔建军教授馈赠。

1.1.2 主要试剂和仪器: 玉米浆, 华北制药股份有限公司; 蔗糖, 广西凤塘生化股份有限公司; 乳糖, 天津奥淇医科玻璃仪器化学试剂有限公司; $FeCl_3$, 天津福晨化学试剂厂; 酵母粉、蛋白胨, 英国 OXOID 公司; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 、 $NaCl$, 天津市北方化学试剂玻璃仪器采购中心; $CaCO_3$ 、 $NaNO_3$ 、 KH_2PO_4 、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 天津风船化学试剂科技有限公司; $(NH_4)_2SO_4$, 天津市恒兴化学试剂制造有限公司; 玉米油, 中粮集团营销有限公司; 利心平, 北京百灵威科技有限公司; 乙二醇双(2-氨基乙基醚)四乙酸(EGTA), 北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; 苏拉明, 美国 ACROS 公司; 硫酸新霉素, 梯希爱(上海)化成工业发展有限公司; 苯氧乙酸, 上海江莱生物科技有限公司。Olympus CX41 荧光显微镜、CX-DMB-2 滤光片, 日本 Olympus 公司; 荧光微孔读数板 SpectraMaxM2, 美国 Molecular Devices 公司; HNY-2102C 型回旋式摇床, 天津欧诺仪器股份有限公司; DH6000B II 型电热恒温培养箱, 天津市泰斯特仪器有限公司。

1.1.3 培养基: LB 培养基和固体 LYP 培养基参考文献[15]配制; 种子培养基(g/L): 玉米浆 20.00, 蔗糖 20.00, 酵母粉 5.00, $CaCO_3$ 5.00, $NaNO_3$ 3.00,

NaCl 0.50, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.50, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, pH 5.8; 发酵培养基(g/L): 玉米浆 30.00, 乳糖 35.00, CaCO_3 10.00, KH_2PO_4 1.00, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5.00, 玉米油(6 mL/L), pH 6.0。

1.2 方法

1.2.1 培养条件: (1) 固体平板培养^[15]: 取加热融化的固体 LYP 培养基约 15 mL, 倒入培养皿中静置待其凝固后, 取保存于 -80°C 的 *P. chrysogenum* CGMCC 3.5129 甘油菌悬液 0.2 mL 加入到固体培养基上并用涂布棒涂布均匀, 于 28°C 下恒温培养箱中倒置培养 5 d, 封口倒置保存于 4°C 备用。

(2) 摇瓶种子培养^[15]: 铲取固体平板上约 0.5 cm^2 的新鲜孢子接种到装有 40 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中, 26°C 、200 r/min 培养 24 h 后得到种子培养液。

(3) 摇瓶发酵培养: 取种子发酵液 10 mL 接种于装有 90 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中, 26°C 、200 r/min 培养 144 h, 每 24 h 取样检测。每组实验 3 次平行。

1.2.2 菌体生物量的测定: 每隔 24 h 取 10 mL 发酵液 5 000 r/min 离心 10 min, 丢弃上清收集菌体, 用 0.1 mol/L HCl 洗涤后, 离心除去发酵液中未溶解的碳酸钙和玉米浆, PBS 洗涤 3 次除去发酵液, 再用已烘干至恒重且称重的滤纸抽滤, 并将滤纸与菌体一同置于 85°C 烘箱中干燥 24 h 至恒重, 称重后减去滤纸干重即为菌体干重(Dry cell weight, DCW)。收集离心后的剩余发酵液, 保存于 -80°C 用于效价检测。

1.2.3 青霉素产量测定: 准确称取青霉素 V 标准品 0.005 g 于 100 mL Milli Q 水中, 溶解并涡旋混匀后, 进行梯度稀释, 即获得浓度为 50、25、10、5、1 mg/L 青霉素 V 标准品。取 10 μL 点样, 测量抑菌圈直径, 每组实验 3 组平行。分别以抑菌圈面积为 X 轴, 以青霉素 V 标准品浓度为 Y 轴, 绘制标准曲线。取保存于 -80°C 的藤黄微球菌甘油种子液接种到液体 50 mL LB 液体培养基中, 37°C 、220 r/min 摇床培养, 待其 OD_{600} 约为 2 时用于效价检测。将固体

LB 培养基融化, 取一定体积的 LB 固体培养基及对应体积的菌悬液, 使其终 OD_{600} 为 0.1, 总体积为 15 mL/每培养皿, 静置待其凝固。取不同时间点保存于 -80°C 的发酵液上清 10 μL 点样, 放入 37°C 培养箱中待发酵液完全被吸收后倒置培养, 18–24 h 后量抑菌圈直径, 取平均值^[16]。

1.2.4 胞内 Ca^{2+} 浓度测定: 取发酵液 0.5 mL, 离心去上清, 加入 1 mL PBS (pH 7.8) 洗涤 3 次, 再用 0.5 mL 重悬; 加入 0.5 μL Fluo-3/AM (5 mmol/L) 使其终浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$, 37°C 、120 r/min 在黑暗中孵育 1 h; 用 PBS (pH 7.8) 洗涤 2 次后重悬; 制片, 用 CX-DMB-2 滤光片的荧光显微镜下拍照观察其荧光强度; 同时取 200 μL 悬浮液, 设置激发光为 488 nm, 发射光为 530 nm, 用酶标仪 SpectraMax M2 检测其相对荧光强度^[17]。

2 结果与分析

2.1 不同浓度利心平、EGTA、苏拉明和硫酸新霉素对青霉素 V 生产的影响

探究外源前体苯氧乙酸存在时, 干扰 Ca^{2+} 信号转导途径对产黄青霉菌生产青霉素的影响。通过在前体添加前 1 h 分别向培养基中添加 Ca^{2+} 通道抑制剂利心平、 Ca^{2+} 螯合剂 EGTA、G 蛋白偶联抑制剂苏拉明和磷酸酯酶 C 底物抑制剂硫酸新霉素(并添加相同体积的无菌水作为对照试验), 探究这 4 种 Ca^{2+} 信号干扰剂对青霉素 V 产量的影响。为上述 4 种 Ca^{2+} 信号干扰剂对效价检测的指示菌(藤黄微球菌)的影响, 进行了空白实验, 即在其他条件一致的情况下, 不接种产黄青霉菌培养 24 h 后, 用杯碟法检测相应浓度利心平、EGTA、苏拉明和硫酸新霉素对藤黄微球菌生长的影响, 实验证明利心平、EGTA 和苏拉明对藤黄微球菌生长均无显著影响, 但是不同浓度硫酸新霉素对藤黄微球菌的生长有抑制作用, 见图 1, 因此后续实验结果分析中已减去对应浓度硫酸新霉素的抑菌圈面积。

利心平的终浓度梯度为 50、100、200 和 300 $\mu\text{mol/L}$, EGTA 的终浓度梯度为 1、5 和 10 mmol/L, 苏拉明的终浓度梯度为 10、50、100

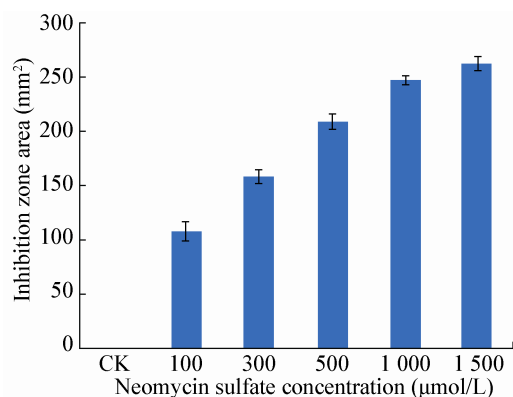


图1 不同浓度硫酸新霉素对藤黄微球菌生长的影响
Figure 1 Effect of different concentrations of neomycin sulfate on the growth of *Micrococcus luteus*

和 300 μmol/L, 硫酸新霉素的终浓度梯度设置为 100、300、500 和 1 000 μmol/L, 实验结果见图 2, 从图 2A、B 和 C 中可以看出, 与对照组相比, 不同浓度的利心平、EGTA 和苏拉明对整个发酵过程中青霉素 V 产量无显著影响, 从图 2D 中可以看出, 随着硫酸新霉素添加浓度的增大, 青霉素 V 产量逐渐降低, 当硫酸新霉素终浓度为 100、300、500 和 1 000 μmol/L 时青霉素 V 产量分别降低了 27.66%、40.02%、63.97%和 78.71%, 由此可见 4 种 Ca^{2+} 干扰剂中硫酸新霉素的添加极大地抑制了青霉素 V 的生物合成, 其它 3 种均无显著影响。

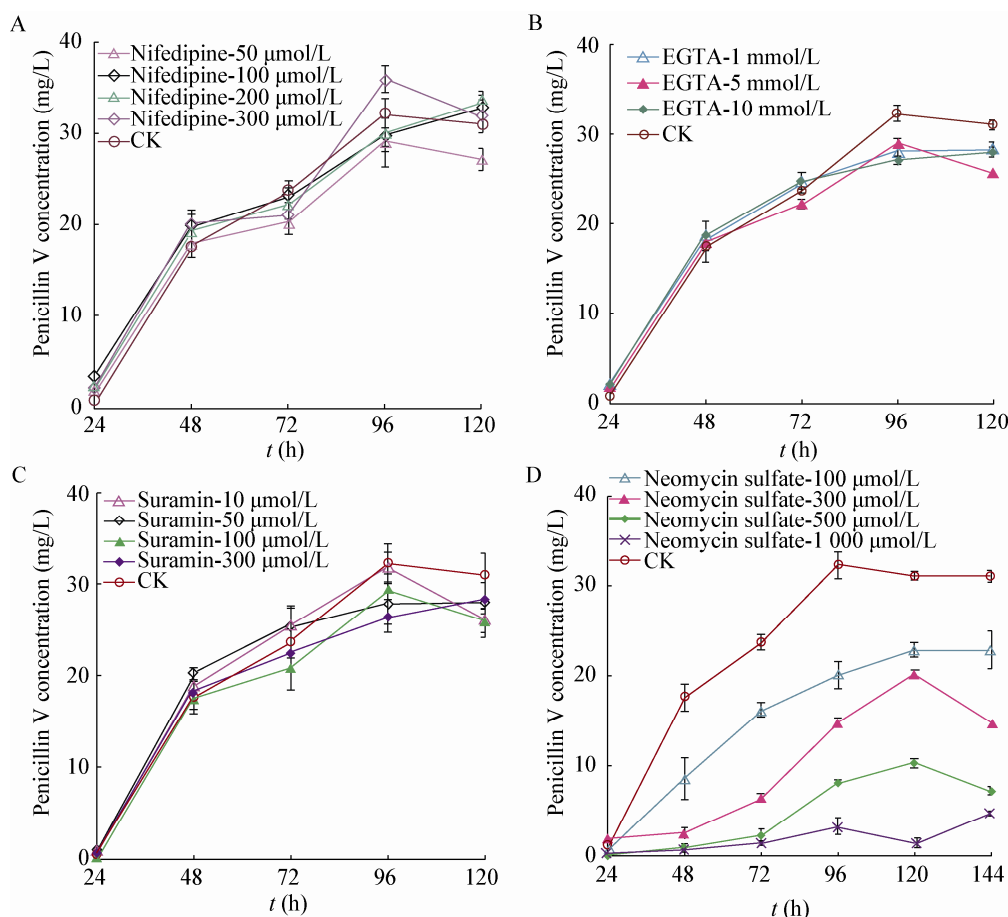


图2 不同 Ca^{2+} 信号干扰剂对青霉素 V 产量的影响

Figure 2 Effects of different type of Ca^{2+} interference agents on the penicillin V production

注: A: 不同浓度利心平对青霉素 V 产量的影响; B: 不同浓度 EGTA 对青霉素 V 产量的影响; C: 不同浓度苏拉明对青霉素 V 产量的影响; D: 不同浓度硫酸新霉素对青霉素 V 产量的影响。

Note: A: Effect of different concentrations nifedipine on the penicillin V production; B: Effect of different concentrations EGTA on the penicillin V production; C: Effect of different concentrations suramin on the penicillin V production; D: Effect of different concentrations neomycin sulfate on the penicillin V production.

2.2 在苯氧乙酸存在时硫酸新霉素不同添加时间对产黄青霉菌生长和青霉素 V 产量的影响

为进一步探究硫酸新霉素对青霉素 V 生产的影响, 比较了硫酸新霉素不同添加时间对产黄青霉菌生长和青霉素产量的影响, 分别为苯氧乙酸添加前 30、60 和 90 min, 实验结果如图 3 所示。从图 3A 可以看出, 硫酸新霉素的添加对产黄青霉菌的菌体生长有不利影响, 但不显著; 同时从图 3B 和 3C 中可以看出, 在整个发酵过程中, 加入硫酸新霉素后的所有实验组中青霉素 V 均没有明显积累, 说明硫酸新霉素的加入对产黄青霉菌生长影响不显著, 但对青霉素 V 生产影响极为显著, 并且硫酸新霉素的添加时间对青霉素 V 生产没有显著差异。

2.3 硫酸新霉素对产黄青霉菌胞内 Ca^{2+} 浓度的影响

硫酸新霉素可抑制肌醇 1,4,5-三磷酸信号途径中的关键酶—磷酸酯酶 C 的活性, 进而干扰胞内 Ca^{2+} 的动态平衡。用荧光染料 Fluo-3/AM 对细胞进行处理, 荧光强度可直接反映胞内 Ca^{2+} 水平。图 4 为发酵 25 h 时实验组和对照组的荧光图片, 从图

4 中可以看出, 只添加苯氧乙酸的实验组中, 荧光强度明显比对照组强, 但是硫酸新霉素的加入使得荧光强度减弱。图 5 中显示的是胞内 Ca^{2+} 相对含量, 从图 5 中可以看出, 加入苯氧乙酸后胞内 Ca^{2+} 相对含量高于对照组 49.86%, 而加入硫酸新霉素后胞内 Ca^{2+} 相对含量降低了 53.31%。这与荧光图片结果一致, 表明苯氧乙酸的加入使得发酵 25 h 时胞内 Ca^{2+} 水平升高, 然而硫酸新霉素的加入使得胞内 Ca^{2+} 水平显著降低。因此可以得出结论, Ca^{2+} 信号转导途径参与了产黄青霉菌细胞对苯氧乙酸胁迫的防御反应。

3 结论与讨论

在工业青霉素生产过程中, 通常需要向培养基中外源添加一定浓度的侧链前体苯乙酸或苯氧乙酸, 否则发酵液中将积累大量的 6-氨基青霉烷酸和少量不同种青霉素^[5]。然而苯乙酸和苯氧乙酸都是弱酸, 对细胞有一定的毒害作用, 一直是工业青霉素生产的瓶颈。 Ca^{2+} 作为胞内第二信使, 介导的信号转导途径调节真核生物体内许多基本的生理过程, 并参与外界刺激响应。

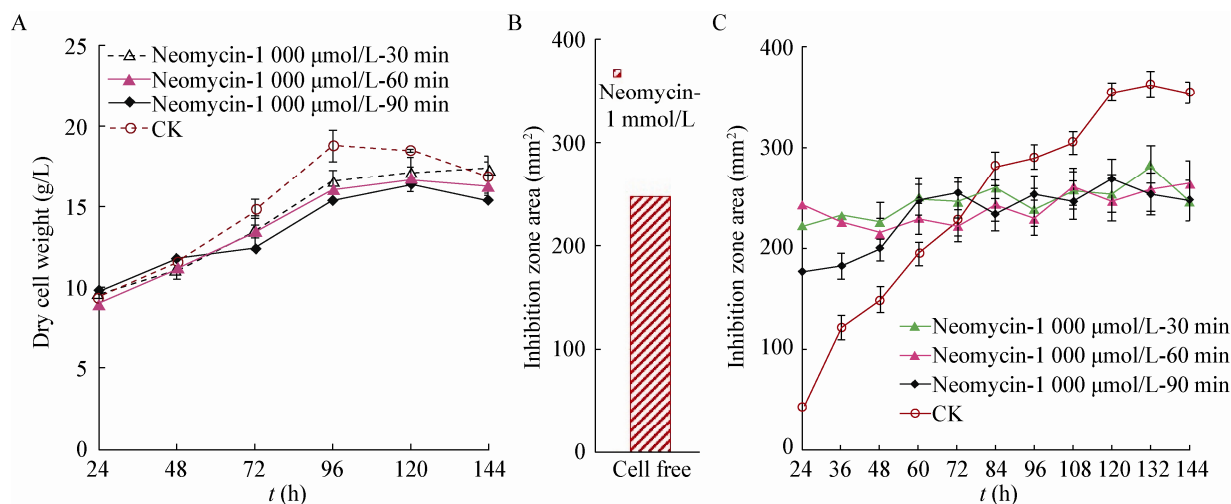


图 3 硫酸新霉素不同添加时间对产黄青霉菌生长和青霉素 V 产量的影响

Figure 3 Effects of different feeding time of neomycin sulfate on dry cell weight of *Penicillium chrysogenum* and the penicillin V production

注: A: 硫酸新霉素不同添加时间对产黄青霉菌生长的影响; B: 1 mmol/L 硫酸新霉素对藤黄微球菌生长的影响; C: 硫酸新霉素不同添加时间对青霉素 V 生产的影响。

Note: A: Effects of different feeding time of neomycin sulfate on dry cell weight of *Penicillium chrysogenum*; B: Effects of 1 mmol/L neomycin sulfate on the growth of *Micrococcus luteus*; C: Effect of different feeding time of neomycin sulfate on the penicillin V production.

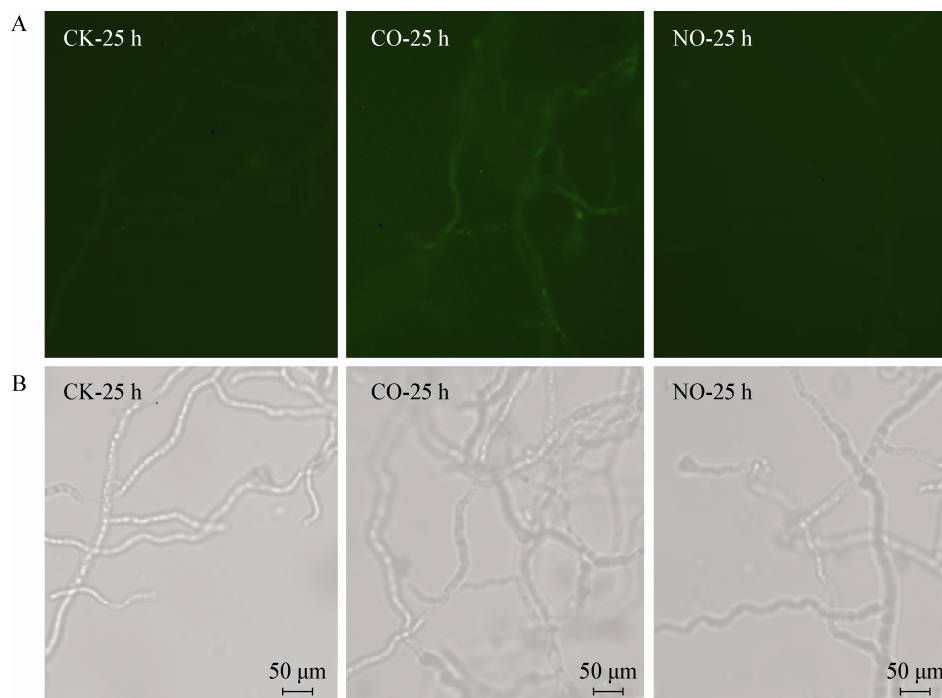


图 4 发酵 25 h 细胞的 Fluo-3/AM 荧光染色图片

Figure 4 The fluorescent dye-loaded cell images by fluorescence microscope at 25 h of fermentation

注：A：荧光图片；B：相同视野下的显微镜图片。CK 代表对照，只添加相同体积的无菌水；CO：CK-POA，代表只添加苯氧乙酸；NO：Neomycin sulfate-POA，代表添加硫酸新霉素和苯氧乙酸。

Note: A: Fluorescence image; B: Microscope images under the same vision with corresponding A. CK: Control group; CO: Adding POA; NO: Treated with POA and neomycin sulfate.

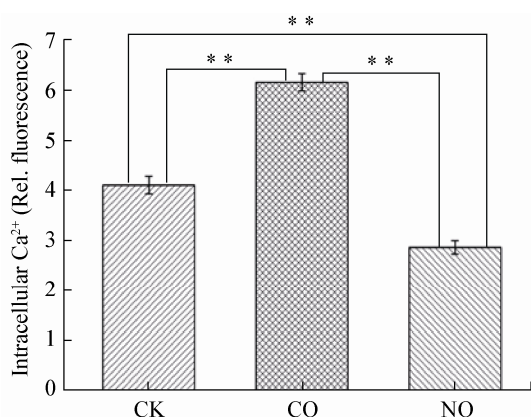


图 5 发酵 25 h 时不同实验组胞内 Ca^{2+} 相对荧光强度

Figure 5 The relative fluorescence intensity of intracellular Ca^{2+} at 25 h of fermentation

注：CK 代表对照，只添加相同体积的无菌水；CO：CK-POA，代表只添加 POA；NO：Neomycin sulfate-POA，代表添加硫酸新霉素和 POA；**： $P < 0.01$ 。

Note: CK: Control group; CO: Adding POA; NO: Treated with POA and neomycin sulfate; **: $P < 0.01$.

为探究产黄青霉菌对苯氧乙酸的响应机制，考察 4 种不同机制的 Ca^{2+} 信号干扰剂对青霉素产量的影响，包括钙离子通道抑制剂利心平、钙离子螯合剂 EGTA、G 蛋白偶联抑制剂苏拉明和磷酸酯酶 C 底物抑制剂硫酸新霉素，发现不同浓度的利心平、EGTA 和苏拉明对整个发酵过程中青霉素 V 产量无显著影响，而硫酸新霉素的添加极大地抑制了青霉素 V 的生物合成，且随着硫酸新霉素添加浓度的增大，青霉素 V 产量逐渐降低，呈线性负相关。进一步研究表明磷酸酯酶 C 底物抑制剂硫酸新霉素的添加对菌体影响不显著，且不同时间添加对青霉素产量的影响与添加时间和菌体量无关。

硫酸新霉素可抑制肌醇 1,4,5-三磷酸信号途径中的关键酶磷酸酯酶 C 的活性，进而干扰胞内 Ca^{2+} 的动态平衡，肌醇 1,4,5-三磷酸信号途径如图 6 所示^[18]。肌醇 1,4,5-三磷酸主要是通过刺激液泡或

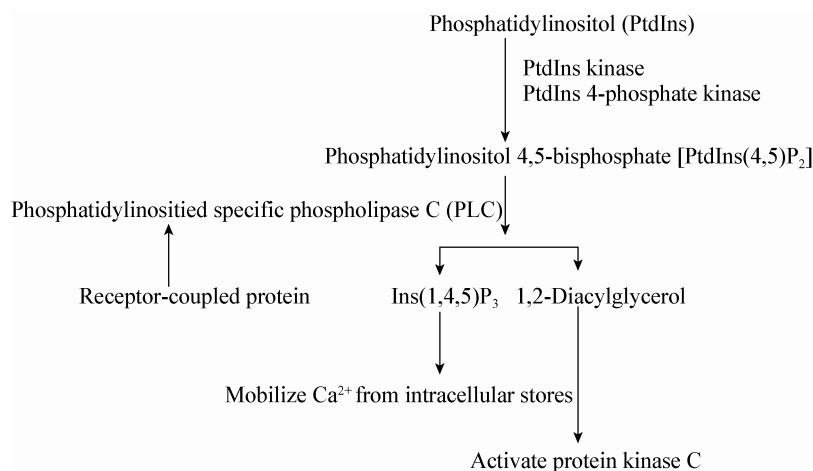


图 6 肌醇 1,4,5-三磷酸信号途径
Figure 6 Ins(1,4,5)P₃ signaling pathways

其他细胞器中 Ca^{2+} 的释放进而维持胞内 Ca^{2+} 的动态平衡, 此过程已被证实包含于细胞器内膜系统肌醇 1,4,5-三磷酸-门控型钙离子通道^[19]。而硫酸新霉素能够抑制磷酸酯酶 C 活性^[20]及磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸的合成^[21], 进而干扰肌醇 1,4,5-三磷酸的代谢和细胞溶质中 Ca^{2+} 的分布^[22], 阻碍了肌醇 1,4,5-三磷酸转移并放大胞外信号。当产黄青霉菌受到外源苯氧乙酸刺激时, 由于硫酸新霉素的加入, 细胞不能够迅速合成磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸和(或)肌醇 1,4,5-三磷酸应对外加非生物压力, 进而对菌体生长和青霉素 V 合成产生不利影响。

胞液中自由 Ca^{2+} 脉冲是细胞防御应答机制中最重要的事件之一, 通过对胞内 Ca^{2+} 水平检测, 证明外源前体苯氧乙酸胁迫下胞内 Ca^{2+} 浓度显著高于对照组, 而硫酸新霉素的添加削弱肌醇 1,4,5-三磷酸信号途径后, 胞内 Ca^{2+} 水平显著降低, 甚至低于对照组水平, 同时又造成青霉素产量下降。因此表明产黄青霉菌通过肌醇 1,4,5-三磷酸信号途径调节胞内 Ca^{2+} 浓度来响应苯氧乙酸的胁迫, 肌醇 1,4,5-三磷酸信号途径与 Ca^{2+} 信号的结合, 扩展了肌醇 1,4,5-三磷酸信号转导途径对细胞胁迫过程的影响。

在工业青霉素生产过程中, 通常需添加较高浓度的碳酸钙来中和发酵过程中产生的有机酸, 维持发酵液 pH 稳定^[23]。因此本研究具有一定的实际意

义, 为阐明产黄青霉菌对苯氧乙酸的响应机制提供一定的实验依据, 并为丝状真菌中 Ins(1,4,5)P₃- Ca^{2+} 信号转导途径的研究提供理论依据。

参考文献

- [1] Peng Q, Yuan YH, Gao MY, et al. Genomic characteristics and comparative genomics analysis of *Penicillium chrysogenum* KF-25[J]. BMC Genomics, 2014, 15: 144
- [2] Hamed RB, Gomez-Castellanos JR, Henry L, et al. The enzymes of β -lactam biosynthesis[J]. Natural Product Reports, 2013, 30(1): 21-107
- [3] Kurzątkowski W, Staniszevska M, Bondaryk M, et al. Penicillin G production by industrial strains of *Penicillium chrysogenum*[J]. Postępy Mikrobiologii, 2014, 53(4): 366-370
- [4] Srirangan K, Orr V, Akawi L, et al. Biotechnological advances on penicillin G acylase: pharmaceutical implications, unique expression mechanism and production strategies[J]. Biotechnology Advances, 2013, 31(8): 1319-1332
- [5] Batchelor FR, Doyle FP, Nayler JHC, et al. Synthesis of penicillin: 6-aminopenicillanic acid in penicillin fermentations[J]. Nature, 1959, 183(4656): 257-258
- [6] Henriksen CM, Nielsen J, Villadsen J. Modelling of the protonophoric uncoupling by phenoxyacetic acid of the plasma membrane potential of *Penicillium chrysogenum*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1998, 60(6): 761-767
- [7] Hillenga DJ, Versantvoort H, van der Molen S, et al. *Penicillium chrysogenum* takes up the penicillin G precursor phenylacetic acid by passive diffusion[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(7): 2589-2595
- [8] Liu YY, Guo SX. Involvement of Ca^{2+} channel signalling in sclerotial formation of *Polyporus umbellatus*[J]. Mycopathologia, 2010, 169(2): 139-150
- [9] Gehring CA, Irving HR, Parish RW. Effects of auxin and abscisic acid on cytosolic calcium and pH in plant cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990, 87(24): 9645-9649
- [10] Binder U, Chu ML, Read ND, et al. The antifungal activity of the *Penicillium chrysogenum* protein PAF disrupts calcium homeostasis in *Neurospora crassa*[J]. Eukaryotic Cell, 2010, 9(9): 1374-1382
- [11] Greene V, Cao H, Schanne FAX, et al. Oxidative stress-induced

- calcium signalling in *Aspergillus nidulans*[J]. Cellular Signalling, 2002, 14(5): 437-443
- [12] Steinbach WJ, Cramer RA Jr, Perfect BZ, et al. Calcineurin controls growth, morphology, and pathogenicity in *Aspergillus fumigatus*[J]. Eukaryotic Cell, 2006, 5(7): 1091-1103
- [13] Nelson G, Kozlova-Zwinderman O, Collis AJ, et al. Calcium measurement in living filamentous fungi expressing codon-optimized aequorin[J]. Molecular Microbiology, 2004, 52(5): 1437-1450
- [14] Brand A, Shanks S, Duncan VMS, et al. Hyphal orientation of *Candida albicans* is regulated by a calcium-dependent mechanism[J]. Current Biology, 2007, 17(4): 347-352
- [15] Yang J, Xu XX, Liu G. Amplification of an MFS transporter encoding gene *penT* significantly stimulates penicillin production and enhances the sensitivity of *Penicillium chrysogenum* to phenylacetic acid[J]. Journal of Genetics and Genomics, 2012, 39(11): 593-602
- [16] Martín J, García-Estrada C, Rumbero Á, et al. Characterization of an autoinducer of penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(16): 5688-5696
- [17] Zhang HY, Wang WX, Yin H, et al. Oligochitosan induces programmed cell death in tobacco suspension cells[J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 87(3): 2270-2278
- [18] Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signalling[J]. Nature, 1993, 361(6410): 315-325
- [19] Martinec J, Feltl T, Scanlon CH, et al. Subcellular localization of a high affinity binding site for D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate from *Chenopodium rubrum*[J]. Plant Physiology, 2000, 124(1): 475-483
- [20] Schacht J. Inhibition by neomycin of polyphosphoinositide turnover in subcellular fractions of guinea-pig cerebral cortex *in vitro*[J]. Journal of Neurochemistry, 1976, 27(5): 1119-1124
- [21] Gabev E, Kasianowicz J, Abbott T, et al. Binding of neomycin to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂)[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1989, 979(1): 105-112
- [22] Tsai HC, Chung KR. Calcineurin phosphatase and phospholipase C are required for developmental and pathological functions in the citrus fungal pathogen *Alternaria alternata*[J]. Microbiology, 2014, 160(7): 1453-1465
- [23] El-Marsafy M, Abdel-Akher M, El-Saied H. Effect of media composition on the penicillin production[J]. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Zweite Naturwissenschaftliche Abteilung: Allgemeine, Landwirtschaftliche und Technische Mikrobiologie, 1997, 132(2): 117-122