



木质纤维素降解酶生产菌株的遗传改造及应用

蒋艺¹, 苏宁¹, 方翎^{1,2*}

¹ 山东大学微生物技术国家重点实验室, 山东 济南 250100

² 山东大学国家糖工程技术研究中心, 山东 济南 250100

摘要: 通过纤维素酶将木质纤维素向生物新能源的转化对经济社会的可持续发展具有重要意义, 被用于纤维素酶制剂工业化生产的微生物大多属于丝状真菌, 但丝状真菌的遗传操作困难, 且纤维素酶诱导机制尚未阐明, 严重制约了纤维素酶高产菌株选育与应用。本文综述了近年来纤维素酶高产菌株遗传操作方法的进展, 重点论述了丝状真菌合成纤维素酶过程中的信号感应、信号传导、转录调控的研究, 通过理性改造以提高纤维素酶生产菌株的产酶能力, 并且总结展望了丝状真菌在工业生产中的应用。

关键词: 丝状真菌, 纤维素酶, 遗传改造, 糖转运蛋白, 异源表达

化石燃料的使用是温室气体增加的主要原因之一, 加之其不可再生导致的能源危机直接威胁着人类生活及社会稳定。因此, 清洁、可再生的生物能源研究和开发成为经济社会可持续发展亟待解决的问题。生物质是地球上唯一可大规模再生的有机资源, 尤其是农业废弃物如玉米芯、玉米秸秆、小麦秸秆、水稻秸秆等木质纤维素, 由于其产量大、可再生、仍未充分利用等特点可作为二代燃料乙醇和丁醇的生产原料^[1]。如此, 不仅可以有效缓解温室效应及环境污染, 并且可以减少化石燃料消耗。

在液体生物燃料生产过程中, 最重要的步骤

是木质纤维素转化为可发酵糖。其中由于纤维素酶具有高效、环境友好的特点被广泛采用^[2]。纤维素酶是指能水解纤维素 β -1,4 葡萄糖苷键, 使纤维素变成葡萄糖的一组酶的总称, 它不是单一的酶, 而是起协同作用的多组分酶系, 主要包括 3 种: 外切 β -1,4 葡聚糖苷酶(exo β -1,4-glucanases, CBH)、内切 β -1,4 葡聚糖苷酶(endo β -1,4-glucanases, EG) 和 β -1,4 葡萄糖苷酶(β -1,4-glucosidases, BG)。在这三类酶的协同作用下, 能将具有生物质抗降解屏障特性的天然纤维素大分子降解为简单的葡萄糖分子^[3]。纤维素酶对纤维素降解机理当前并不明确。但普遍认为, 结晶纤维素的彻底降解至少需

基金项目: 山东省科技重大专项(新兴产业)项目(2015ZDXX0403A01); 高等学校学科创新引智计划(B16030); 山东大学基本科研业务费专项(2016JC031); 国家自然科学基金(31570040)

*通信作者。Tel: +86-531-88364004; Fax: +86-531-88364363; E-mail: fangxu@sdu.edu.cn

收稿日期: 2017-03-31; 修回日期: 2017-05-08; 网络出版日期: 2017-05-25

要这 3 组纤维素酶的协同作用：首先，内切葡聚糖酶主要作用于纤维素的非结晶区，随机水解纤维素链中的糖苷键，把纤维素长链切断，转化成为大量不同聚合度的纤维素短链，使得纤维素分子的聚合度降低，可供外切酶作用的纤维素链末端数增加；进而，外切酶(纤维二糖水解酶)可以水解纤维素结晶区，从纤维素链的还原端(CBH I)或非还原端(CBH II)开始持续水解，释放纤维二糖； β -葡萄糖苷酶则主要水解纤维二糖和可溶性纤维寡糖，最终将纤维素转化为可利用的葡萄糖^[4]，图 1 为纤维素酶系催化降解纤维素示意图^[5]。除应用于生物能源外，纤维素酶还广泛用于食品、饲料、医药、纺织、洗涤剂和造纸等众多的工业领域。

自然界中，能高效分解和利用纤维素的微生物很多，并且在植物、动物体内也发现了纤维素酶内源基因。但相对于细菌及其他动植物而言，丝状真菌产生纤维素酶活力最高且包含各种降解

酶(表 1)^[6-7]。而已经被应用在工业生产中的最具有代表性的丝状真菌菌种主要有木霉属(*Trichoderma* spp.)、曲霉属(*Aspergillus* spp.)、青霉属(*Penicillium* spp.)、根霉属(*Rhizopus* sp.)及漆斑霉属(*Myrothecium* sp.)等。据统计，全世界纤维素乙醇生产中的纤维素酶有 80%来自里氏木霉。虽然里氏木霉(*Trichoderma reesei*)基因组中仅包含 200 多种负责编码糖苷水解酶的基因，远少于其他丝状真菌，但其外分泌纤维素酶的能力较其他丝状真菌最高^[8]。里氏木霉已经成为世界上研究和应用最广泛的产纤维素酶生产菌种。目前，工业用里氏木霉菌株普遍都能生产超过至少 20 g/L 蛋白^[9]，并且另有报道称外分泌蛋白达到了 100 g/L 以上^[10]，大量结果表明里氏木霉分泌纤维素酶的提升空间潜力巨大。为了提高纤维素酶的产量，利用现有的丝状真菌遗传操作手段，对里氏木霉进行定向的分子改造，成为本文阐述的重点，并且对丝状真菌工业技术中的应用进行了介绍。

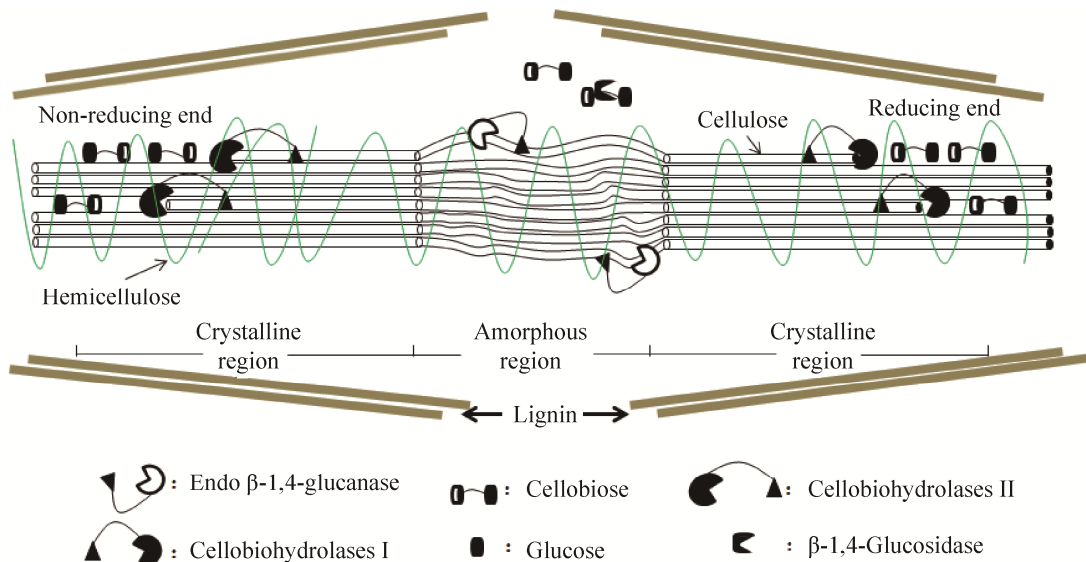


图 1. 纤维素酶系催化纤维素降解示意图

Figure 1. Schematic representation of the enzymatic hydrolysis of cellulose catalyzed by a fungal cellulase system.

表 1. 丝状真菌中主要的木质纤维素降解酶系^[6-7]
Table 1. Lignocellulosic degradation enzyme system from fungi^[6-7]

Stains	β-1,4-endoglucanase		β-1,4-glucosidase		Cellobiohydrolase		Xylanases		β-1,4-xylosidase		Total	
	GH6	GH7	GH12	GH45	GH1	GH3	GH6	GH7	GH10	GH11		GH3
<i>Trichoderma reesei</i> QM6a			13		15		3		5		15	51
<i>Aspergillus niger</i> CBS513.88			15		20		4		5		28	72
<i>Neurospora crassa</i> OR74A			14		10		8		6		16	54
<i>Rhizopus oryzae</i> 99-880			12		6		0		0		8	26
<i>Aspergillus nidulans</i> A4			20		22		5		5		37	89
<i>Aspergillus oryzae</i> RIB4			20		21		4		8		38	91
<i>Penicillium chrysogenum</i> Wisconsin 54-1255			18		20		3		4		31	76
<i>Fusarium graminearum</i> PH-1			20		24		3		8		38	93

1 丝状真菌的遗传改造技术

目前,完成全基因组测序的真菌超过 100 种以上,并且基因功能注释相对完善(<http://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/index.jsf>)。通过大规模功能基因比对以及不同碳源转录组学分析,研究人员可以获得许多菌种的遗传学信息。这些信息提供了产酶丝状真菌遗传工程改造的可能性。

将外源基因高效导入宿主细胞是丝状真菌遗传工程改造中必要的环节,然而丝状真菌的细胞壁成为转化过程的阻碍。近年来,多种转化方法已经发展起来并且适用于多数丝状真菌。现有的转化方法有 CaCl_2/PEG 原生质体法^[11]、电穿孔法^[12]、基因枪法^[13]以及农杆菌介导(ATMT)法^[14]等。但是电穿孔方法对细胞可造成高度损伤,死亡率可达到 50%以上。基因枪法设备要求成本高,并且各种影响因素需要优化。基于此,目前大多数实验室最常用的丝状真菌转化方法是 CaCl_2/PEG 原生质体法和根瘤农杆菌介导法。

CaCl_2/PEG 原生质体法 (protoplast-mediated

transformation, PMT)最早应用于酵母转化中^[15],后经方法改良应用于构巢曲霉^[16]及里氏木霉^[17]等。其既可用于外源基因随机插入,亦可利用丝状真菌自身同源重组基因修复模式进行基因定点整合操作^[18],操作方法简单、耗时少、效率高而被广泛应用。然而由于原生质体再生效率的因素,因此需制备大量原生质体以保证后续转化子的筛选效率。

根瘤农杆菌介导法(agrobacterium tumefaciens-mediated transformation, ATMT)是后续发展起来的一种常用的丝状真菌转化法。此方法需要借助革兰氏阴性根瘤农杆菌 *A. tumefaciens* 和 Ti 质粒实现介导转化。农杆菌具有天然转化的特性,可以侵染大多数双子叶植物和部分裸子叶及单子叶植物,将 T-DNA 序列转进植物细胞并整合到基因组中,使植物形成冠瘿病而被发现^[19]。1998 年, de Groot 等首次用 ATMT 法将外源 T-DNA 以单拷贝形式随机插入到泡盛曲霉(*Aspergillus awamori*)基因组中,并且效率是传统 CaCl_2/PEG 原生质体法的 600 倍^[20]。随后该方法相继应用于黑曲霉^[21]、

烟曲霉^[22]、指状青霉^[23]、嗜热毁丝菌^[24]及里氏木霉^[25]等等。Wang 等报道不同菌种中农杆菌法转化外源基因效率会有所不同^[26]。相对于其他几种转化方法, ATMT 法有以下优势: (1) 转化受体孢子培养简便, 不需要制备原生质体。(2) 50%–80%转化子中插入的外源基因大多是单拷贝形式, 且较 CaCl₂/PEG 原生质体法获得假阳性转化子少^[27]。(3) 转化效率高, 遗传稳定, 且 Ti 载体可以插入大片段 DNA 序列。但是 ATMT 法也有转化耗时长的缺点。总体来说 ATMT 方法更适合大片段 DNA 插入, 既可以利用宿主菌自身同源重组修复模式进行同源打靶, 也可以随机插入到宿主基因组 DNA 上。基于 ATMT 法的诸多优势, 该技术被广泛应用于丝状真菌遗传操作中。

在对丝状真菌进行遗传操作过程中, 筛选标记可分为三类: 以尿嘧啶营养缺陷型标记基因 *pyr4* 为代表的营养缺陷型选择标记, 以乙酰胺酶基因 *amds* 为代表的营养基因和以潮霉素 B、博来霉素、腐草霉素等为代表的抗药性筛选标记。虽然前两类在里氏木霉遗传改造中被广泛应用, 但是其异核体较多, 且假阳性率较高, 不易分纯, 给操作带来极大的负担。里氏木霉中最常用的抗性筛选标记是潮霉素磷酸转移酶基因(*hph*), 它可以使抗生素潮霉素 B 失效而筛选到正确转化子^[28]。然而在对同一菌株进行多次遗传操作时, 出现了筛选标记无法满足使用的情况, 且对于某种特定的丝状真菌可使用的抗性基因十分有限。

另外, Cre/loxP 重组系统也可以有效实现筛选标签重复利用, 进行多基因操作。Sternberg 和 Hamilton 等在 1981 年发现了大肠杆菌 P1 噬菌体中的 Cre/loxP 重组酶系统, 他们发现 P1 噬菌体含有多拷贝的 *loxP*[locus of crossing over(x), P1], 位点在基因组冗余序列末端, 在 *cre* 基因编码的环化

重组蛋白 Cre (Cyclization recombination protein) 作用下使 *LoxP* 位点间的基因序列被删除或重组^[29]。该系统最先应用于真菌模式生物酿酒酵母中进行回收筛选标记^[30]。德国科学家利用此方法在酵母菌中连续敲除了 20 多个与己糖转运相关的基因^[31]。该系统也在丝状真菌中广泛应用。西班牙科学家用木聚糖酶启动子诱导启动 *cre* 基因, 在构巢曲霉中用尿嘧啶标记敲除了 2 个基因, 实现了标签重复利用^[32]。维也纳 Aigner 课题组用木聚糖酶启动子诱导启动 *cre* 重组酶基因, 在里氏木霉中也实现了多基因操作的抗性标签重复使用。并且由于 *cre* 重组酶基因定点整合到 *pyr4* 基因位点可能会造成里氏木霉遗传不稳定性, 因此, 文章中同时也提到可以通过同源重组方式在完成多基因敲除后把 *cre* 重组酶基因剪切^[33]。因此, 山东大学方翎团队对此方法进行了改进, 利用 Tet-on 系统, 在多西环素存在的情况下调控 Cre 重组酶表达, 在草酸青霉中实现了多基因操作中吡啶硫胺素抗性标签的重复利用, 成功地构建了改良型的 Cre-loxP 系统^[34]。

近年来, CRISPR/Cas9 基因编辑技术的发展也有着很大发展潜力。其工作原理是 crRNA 和 tracrRNA 结合形成的复合物引导核酸酶 Cas9 在与 crRNA 配对的基因靶点上进行剪切。当前通过基因工程手段对 crRNA 和 tracrRNA 进行改造, 将其连接在一起得到 sgRNA (single guide RNA)。而融合的 RNA 具有与野生型 RNA 类似的活力。通过将表达 sgRNA 的元件与表达 Cas9 的元件相连接, 得到可以同时表达两者的质粒, 将其转染细胞, 便能够对目的基因进行操作^[35]。该技术手段已经广泛应用到植物^[36]、动物^[37]、微生物^[38]中, 由于丝状真菌体内不能包含游离质粒并且操作较其他微生物困难, 在丝状真菌中应用的报道还比

较少。中国科学院天津工业生物技术研究所田朝光课题组利用菌株体内 RNA 聚合酶 U6 启动子, 在菌体内进行 RNA 转录, 借助 CRISPR/Cas9 技术, 同时敲除了嗜热毁丝菌中 4 个基因, 提高其产纤维素酶能力^[39]。中国科学院上海生命科学研究院周志华课题组首次通过对 Cas9 基因的密码子优化成功地在里氏木霉菌株中进行了表达, 结合 RNA 的体外转录, 完成对里氏木霉基因的定点切割, 然后仅需 200 bp 的同源臂即可完成有效的基因敲除^[40]。这为里氏木霉多基因操作奠定了基础。

2 丝状真菌合成纤维素酶中信号感应及传导、转录调控的研究及改造

研究发现, 纤维素水解过程中产生的可溶寡糖是自然条件下诱导里氏木霉合成纤维素酶的主要因素^[41], 但除此之外, 陆续发现乳糖、槐糖、龙胆二糖等寡糖均有诱导效果。因此, 通过研究里氏木霉对寡糖吸收, 从而调控纤维素酶合成成为提高里氏木霉产酶的一种手段。细胞若要利用这些混合糖, 首先必须拥有丰富的糖转运蛋白库以吸收这些膜不透性碳源^[42], 其次它是如何将胞外诱导信号传至胞内并产生诱导作用, 引起了研究者的关注。图 2 显示了寡糖通过转运蛋白诱导纤维素酶合成机制^[43-44]。1993 年, Kubicek 等报道了在里氏木霉胞内检测到有同位素标记的纤维二糖, 证明里氏木霉细胞膜表面确实存在吸收纤维二糖的转运蛋白, 这是最早关于里氏木霉转运蛋白的报道, 当时命名为纤维二糖透过酶 (cellobiose permease)。同时通过竞争实验, 发现其他二糖均可与纤维二糖发生转运竞争, 这说明此糖转运蛋白也有转运其他纤维寡糖的能力, 但识别单糖、纤维三糖或纤维四糖的能力较差^[45]。直

到 2009 年, 美国科学家以粗糙脉孢菌为模式菌, 分别以芒草或微晶纤维素为碳源做了系统转录组及分泌组的分析, 糖转运蛋白的研究再次出现。在以微晶纤维素为碳源条件下表达量显著提高的基因中, 发现了 10 个 MFS 家族 (major facilitator superfamily) 转运蛋白 (分别为: NCU00801, NCU00988, NCU01231, NCU04963, NCU05519, NCU05853, NCU05897, NCU06138, NCU08114, NCU10021) 可能与纤维素酶产生有关。从此研究糖转运蛋白与纤维素酶的诱导成了热点^[46]。2013 年, Kubicek 等从乳糖为碳源转录组数据中选出 14 个转运蛋白。发现在里氏木霉中敲除转运蛋白 *Trire2:3405* 后, 菌株不能利用乳糖, 且在乳糖培养条件下也不能诱导纤维素酶基因的表达。*Trire2:3405* 被命名为乳糖渗透酶 (lactose permease)^[47]。而在另一种里氏木霉 PC-3-7 中敲除 *Trire2:77517* 或 *Trire2:79202* 后, 阻碍了乳糖的利用及纤维素酶基因的表达^[48], 说明了转运蛋白在诱导纤维素酶合成的过程中具有重要性。山东大学刘巍峰团队通过酵母转运实验证明里氏木霉 *Stp1* (*Trire2:47710*) 具有葡萄糖转运能力。随后在里氏木霉中敲除 *Stp1*, 发现在以微晶纤维素为碳源的培养条件下, $\Delta stp1$ 突变株的纤维素酶表达水平及其胞外酶活力均提高^[49]。实验证明通过敲除里氏木霉葡萄糖转运蛋白, 减少葡萄糖对纤维素酶基因表达的抑制, 进而可以提高纤维素酶合成。除此之外, 还可以对很多遗传靶点进行挖掘, 比如在诱导纤维素酶产生过程中碳源信号传递下游的 G 蛋白、cAMP 和 MAPK 信号途径等。山东大学方诩团队研究发现, 在碳源的传递过程中, MAPK 信号途径参与到了纤维素酶基因的合成过程中, 并且对里氏木霉中的 3 个 MAPKs 蛋白均进行了研究, 发现 *TMK2* 和 *TMK3* 均参与了细胞壁

完整性的维持, Tmk3 还参与高渗透压抵抗^[50], Tmk2 也参与孢子形成, 但是抑制了纤维素酶基因的表达^[51], 而 Tmk1 参与纤维素酶形成的调控^[52]。因此使我们全面地了解了 MAPKs 在里氏木霉纤维素酶形成中的作用, 更有助于下一步对此信号途径进行改造, 从而提高纤维素酶的合成。

里氏木霉中纤维素酶基因的表达受转录因子调控, 这些转录因子响应来自外界的碳源诱导物传递的信号, 从而对纤维素酶产生激活或者抑制的效应。已经报道的至少存在 4 个正向转录因子 Xyr1^[53]、Ace2^[54]、Ace3^[55]、Hap2/3/5^[56]以及 2 个负调控转录因子 Cre1^[57]和 Ace1^[58]均参与纤维素酶调控。现已发现 4 个激活转录因子结合域为 Zn(II)₂Cys₆ 型锌指蛋白结构, 而 2 个抑制转录因子结合域为 Cys₂His₂ 型锌指结构。这些锌指结构通过结合到纤维素酶基因启动子上对其转录基因进行调节, 如表 2。通过增加里氏木霉中激活转录因子或者降低抑制转录因子表达水平是提高里氏木霉纤维素酶产量的一种有效手段。深圳大学

刘刚课题组通过在里氏木霉 RUT-C30 中过表达 Xyr1 抑制 AceI 转录因子的表达, 使突变株产纤维素酶能力提高了 114 %。然而后续研究发现, 过量的 Xyr1 蛋白达到一定量后就会被迅速降解, 减弱了纤维素酶基因的表达^[59]。因此, 通过过表达转录激活因子(如: Xyr1、Ace II)来大幅度提高纤维素酶表达的方法潜力有限。而通过削弱丝状真菌碳代谢阻遏效应(CCR 效应)来提高纤维素酶表达的方法被科学家们期待且进行了大量的研究。芬兰 VTT 研究人员发现突变了纤维素酶 *cbhI* 启动区域的 CreI 转录因子结合位点后, 解除了葡萄糖对 CBHI 的抑制作用, 同时不影响槐糖对纤维素酶的诱导作用^[60]。Zhang 等在里氏木霉中导入人工锌指文库, 筛选出了酶活提高的突变株^[61]。另外, 山东大学方翎团队采用两个转录抑制因子 Cre1 和 Ace1 的结合结构域与 Xyr1、AceII、AceIII 和 Clr2 转录激活因子的效应域构建人工激活元件的方法来解除 Cre1 介导的碳代谢阻遏, 提高纤维素酶活, 取得了良好效果^[62](部分数据待发表)。

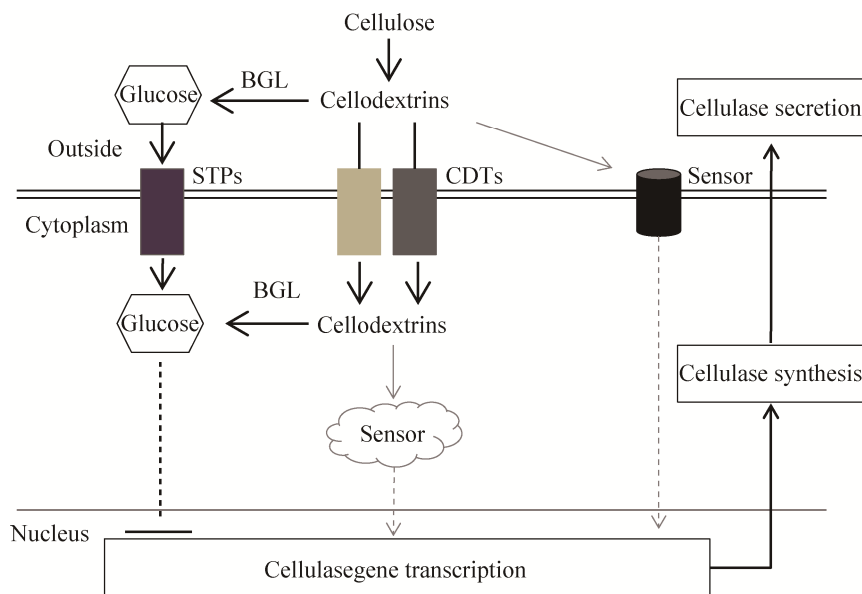


图 2. 寡糖通过转运蛋白诱导纤维素酶合成机制^[43-44]

Figure 2. Functional modules in cellobiose-induced cellulase production in fungi by cellobiose-transporters.^[43-44]

表 2. 里氏木霉中转录因子在纤维素酶基因结合位点
Table 2. The binding sites of the transcription factors responsible for cellulase expression in *Trichoderma reesei*

Transcription factor	Binding site (5'→3')
Cre1	SYGGRG
ACEI	AGGCA
ACEII	GGCTAATAA
Hap2	CCAAT
Xyr1	GGCTAA

3 木质纤维素降解酶系的分子水平改造及协同降解的研究

纤维素酶在降解木质纤维素的过程中, 会非特异性吸附到木质素上, 造成部分纤维素酶失活, 从而严重影响到纤维素酶的酶解效率。为了提高对木质纤维素的转化效率且减少纤维素酶的用量, 文献报道可以采用有机溶剂或者碱法等方法去除原料中的木质素^[63-64]。另一方面, 研究证明表面活性剂和非酶蛋白的添加也可以有效提高酶水解效率^[65], 但这种方法在工业应用时存在着废液处理以及成本的问题, 制约了在工业领域的应用。因此, 通过使用蛋白质工程的方法对纤维素酶进行改造, 从而有效提高木质纤维素酶解效率成为科学家研究的方向。然而, 此领域的研究先前报道较少。近年来, 欧美的科学家以里氏木霉 Cel7A(TrCel7A)的 CBM 为模板, 利用点饱和突变技术试图制备出蛋白突变体, 减少木质素的非产出性吸附。2013 年, 芬兰 VTT 的科学家们试图通过改变 CBM 平滑面上 2 个芳香族氨基酸 Y31 和 Y32 的疏水性, 来改变木质素的非产出性吸附^[66]。美国 UC Berkeley 的科学家们在美国 Energy Biosciences Institute 的资助下, 2015 年发现 TrCel7A CBM 的 Q2、H4、V18 和 P30 有可能是

改造的靶点^[67], 2016 年通过三突变体(V27E、P30D 和 Linker)突变减少了木质素的非产出性吸附^[68]。同时, 山东大学方翎团队在里氏木霉 CBHI 的 CBM 区选择了不同的氨基酸位点进行点突变, 增加 CBM 表面的负电荷, 结果发现 CBM 表面电荷的改变对微晶纤维素的降解活性产生了明显的改善(数据待发表)。

在 20 世纪 80 年代, 研究人员发现, 在使用里氏木霉菌株降解木质纤维素时, 随着水解进行, 酶反应由于残留物的耐受性增加、产物抑制和酶失活而减慢。这些问题通过使用预处理的方法来增加无定形纤维素的量, 并且加入了 β -葡萄糖苷酶以减少纤维二糖的抑制问题^[69]。同时, 山东大学方翎团队在里氏木霉中异源表达了来自于黑曲霉的 β -葡萄糖苷酶, 发现比酶活有了大幅度的提高, 降低了生产成本^[70]。因此大家试图寻找与纤维素酶协同作用的蛋白, 以期实现纤维素酶更高效率的降解。科学家们在大量研究各种酶类如何催化糖苷键的水解的同时, 还发现一些非纤维素酶的蛋白也可以协同降解木质纤维素。2002 年, Saloheimo 等在里氏木霉中发现了一种含有植物 Expansin 类似序列的新蛋白, 活性检测表明, 该蛋白可以破坏棉花纤维结构, 但不产生还原糖, 命名该蛋白为膨胀因子(Swollenin)。实验证明 Swollenin 可在葡萄糖、山梨糖和甘油为碳源的情况下表达, 但分泌量比纤维素酶低很多^[71]。这表明 Swollenin 蛋白可能协助纤维素酶对纤维素进行降解。2008 年, 里氏木霉基因组公布以后发现, 在里氏木霉中还有另外 3 个类 expansin 基因, 分别命名为 *eel1*、*eel2*、*eel3*。不像 Swollenin, 它们没有真菌典型的 CBD 结构域, 也没有 Expansin C 末端的 CBD 结构域, 但是它们的全蛋白与

Expansin 的序列一致性达到 25%–30%，比与 Swollenin 的一致性(20%–22%)还要高。但是，这几个蛋白功能目前仍不清楚^[72]。2003 年，Foreman 等发现有 2 个蛋白可以伴随着纤维素酶一起被诱导，并且协助纤维素酶对木质纤维素进行有效降解。这 2 个蛋白分别被命名为 CIP1 和 CIP2^[73]。最近发现 CIP1 与裂解酶在结构上有相似性，CIP2 属于 CE15 家族的葡萄糖醛酸酯酶。2009 年曾薇通过添加阿魏酸酯酶，与纤维素酶协同作用提高了对天然木质纤维素的水解效率^[74]。与纤维素酶通过协同作用提高纤维素酶降解能力的最具有里程碑意义的是多糖单加氧酶家族(LPMOs)的发现，其中最具代表性的是 AA9(之前称 GH61)。当它们与纤维素的结晶部分相互作用时，通过存在于其活性中心的铜离子的还原(这种还原可能是通过由纤维二糖脱氢酶 CDH 或小的还原分子比如抗坏血酸来形成的)，AA9 则会吸收来自底物中 C1、C4 或 C6 中的氢原子并在连续电子重排后同时加入氧气。所得的醛糖酸会导致糖苷键的不稳定，有利于纤维素酶的作用^[75–76]。基于序列相似性，AA9 可以分为三种类型：I 型、II 型和 III 型，每种类型的 AA9 可以识别纤维素的不同部位对其进行氧化。具体来说，I 型和 II 型主要是对 C1 (还原端)和 C4 (非还原末端)氧化，分别产生醛糖醛酸和 4-酮基葡萄糖醛酸形式的氧化低聚糖。III 型则是催化 C1 和 C4 氧化，产生醛糖醛酸和 4-酮糖醛糖形式的纤维寡糖^[77–79]。诺维信公司 2010 年报道，嗜热子囊菌来源的 GH61A 在里氏木霉中异源表达，水解相同纤维素物料，复合酶用量降到原纤维素酶用量的一半以上^[80]。山东大学方诩团队在里氏木霉表达了不同微生物来源的 AA9，以微晶纤维素为底物进行水解评价，发现氨基酸序列不

同的 AA9 与里氏木霉纤维素酶协同效果差异性较大(数据待发表)。这些来源于自身或者外源的非酶类辅助蛋白如上述膨胀因子、AA9 等能与纤维素基质发生反应，导致结晶区纤维素链自身膨胀、滑动或延伸，增加了纤维素酶对纤维素晶体区的可及性。因此，通过一些外源蛋白的添加，有助于协同纤维素酶发挥作用，降低酶用量，减少二代液体燃料生产成本。

4 丝状真菌在工业技术中的应用

众所周知，木质纤维素生物降解过程中，丝状真菌占据着不可忽略的地位。其中，一方面最为大家所熟知的是利用丝状真菌通过生物转化生产纤维素乙醇，从而将自然界丰富的农业废弃物转化为乙醇。另一方面，丝状真菌作为代谢物和酶的来源已有几个世纪的历史。约二十年来，基因操作技术的发展使我们能够更好地利用这些生物来表达不管是内源还是外源基因^[81]，因此，丝状真菌可作为工业技术中的底盘生物，用来生产高附加值的化学品^[82]。研究报道，丝状真菌可以用来生产高价值蛋白人细胞因子白细胞介素 6(IL-6)，在构巢曲霉中进行的初步实验表明，人类基因在曲霉菌中的表达是有可能的，但是活性 IL-6 的产量是很小的(微克水平)，但是通过使用基因融合的方法使活性 IL-6 的产量提高了 200 倍，但是活性仍然很低，约为 5 mg/L^[83]。导致这种低产量的原因，一部分就是由于丝状真菌分泌的大量蛋白中存在大量的内源蛋白酶，因此使得表达的外源蛋白一部分被降解。为了解决这个问题，又有研究者构建了蛋白酶缺失菌株用来进行外源蛋白的表达，在蛋白酶缺失的黑曲霉中异源表达 IL-6，发现活性提高 5–15 倍^[80]。在里氏木霉中，

由于其出色的蛋白分泌能力、高等动物类似的蛋白修饰系统和高甘露糖型 *N* 糖基化系统, 不论是学术界还是工业界均试图将其用来生产附加值高的异源蛋白^[41]。牛凝乳酶是最先在里氏木霉中成功表达的异源蛋白。该实验证实了在里氏木霉中进行外源蛋白异源表达的可行性, 但产量仅有 20–80 mg/L。后续通过将牛凝乳酶基因融合在纤维素外切酶 CBHI 后, 发酵产量提高到了每升几百毫克。Gao 等以里氏木霉为宿主异源表达来自 *Melanocarpus albomyces* 的漆酶, 摇瓶产量达到 230 mg/L^[42]。解决当前表达水平低的一个策略就是, 采用基因融合的方法来避免产物低水平表达, 因为这种方法可以提高 mRNA 的稳定性及正确转运到内质网并且进入分泌途径。除此之外, 以里氏木霉菌株为宿主, 不同研究者进行了多种工业产品的生产, 比如乙烯^[84]、*N*-乙酰神经氨酸^[85]、木糖

醇^[86]、赤藓糖醇^[87]等, 如表 3 所示。因此, 丝状真菌不仅可以作为纤维素酶的生产菌株, 还可以作为工业生产的底盘微生物, 实现其更大的工业价值。

5 展望

木质纤维素资源的综合利用可促进我国经济的可持续发展, 纤维素酶作为生物催化剂, 是该技术的核心。通过遗传操作手段改良现有工业木质纤维素降解酶菌种, 提高其产纤维素酶能力, 是降低该工艺成本的关键。可以预见, 随着遗传操作手段的不断创新, 丝状真菌合成纤维素酶调控机制会越来越清晰, 进而更有利于理性设计提高其产酶能力。同时, 丝状真菌在工业技术中的应用已不仅局限于纤维素酶的生产, 也可以作为生物制造的底盘微生物, 给人们带来丰富的高附加值的产品。

表 3. 丝状真菌中异源表达蛋白的生产

Table 3. The production of heterologous proteins in filamentous fungi

Strains	Heterologous protein	Culture conditions	Production level/(g/L)	References
<i>Trichoderma reesei</i>	Calf chymosin	Fermenter (10 L)	0.040	[88]
	Glucoamylase P	Shake flask (50 mL)	0.500	[89]
	Endochitinase	Shake flask (500 mL)	0.130	[90]
	Laccase	Fermenter (20 L)	0.230	[91]
	XynVI	Shake flask (50 mL)	0.172	[92]
	Cinnamoyl esterase EstA	Shake flask (50 mL)	0.033	[93]
	Xylanase II	Shake flask (50 mL)	0.500	[94]
<i>Aspergillus nidulans</i>	IL-6	Shake flask	0.100	[83]
<i>Aspergillus niger</i> (protease deficient)	IL-6	Shake flask	0.150	[95]
<i>Aspergillus oryzae</i>	Manganese peroxidase	Shake flask	0.005	[96]
<i>Trichoderma reesei</i>	Xylitol	Shake flask	13.200	[85]
<i>Trichoderma reesei</i>	Erythritol	Shake flask	0.005	[86]

参考文献

- [1] Wang MY, Li ZH, Fang X, Wang LS, Qu YB. Cellulolytic enzyme production and enzymatic hydrolysis for second-generation bioethanol production//Bai FW, Liu CG, Huang H, Tsao GT. *Biotechnology in China III: Biofuels and Bioenergy*. Berlin Heidelberg: Springer, 2012: 1–24.
- [2] Garvey M, Klose H, Fischer R, Lambertz C, Commandeur U. Cellulases for biomass degradation: comparing recombinant cellulase expression platforms. *Trends in Biotechnology*, 2013, 31(10): 581–593.
- [3] Gu FY, Chen CY, Shi JJ, Qian SJ. Advances in cellulase and its development tendency. *Journal of Microbiology*, 2008, 28(1): 83–87. (in Chinese)
顾方媛, 陈朝银, 石家骥, 钱世钧. 纤维素酶的研究进展与发展趋势. *微生物学杂志*, 2008, 28(1): 83–87.
- [4] Sánchez C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, 2009, 27(2): 185–194.
- [5] Gusakov AV. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. *Trends in Biotechnology*, 2011, 29(9): 419–425.
- [6] van den Brink J, de Vries RP. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 91(6): 1477–1492.
- [7] Wong DWS. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2009, 157(2): 174–209.
- [8] Martinez D, Berka RM, Henrissat B, Saloheimo, M, Arvas M, Baker SE, Chapman J, Chertkov O, Coutinho PM, Cullen D, Danchin EGJ, Grigoriev IV, Harris P, Jackson M, Kubicek CP, Han CS, Ho I, Larrondo LF, de Leon AL, Magnuson JK, Merino S, Misra M, Nelson B, Putnam N, Robbertse B, Salamov AA, Schmoll M, Terry A, Thayer N, Westerholm-Parvinen A, Schoch CL, Yao J, Barabote R, Nelson MA, Detter C, Bruce D, Kuske CR, Xie G, Richardson P, Rokhsar DS, Lucas SM, Rubin EM, Dunn-Coleman N, Ward M, Brettin TS. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nature Biotechnology*, 2008, 26(5): 553–560.
- [9] Peterson R, Nevalainen H. *Trichoderma reesei* RUT-C30 — thirty years of strain improvement. *Microbiology*, 2012, 158(1): 58–68.
- [10] Cherry JR, Fidantsef AL. Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Current Opinion in Biotechnology*, 2003, 14(4): 438–443.
- [11] Fitzgerald AM, Mudge AM, Gleave AP, Plummer KM. *Agrobacterium* and PEG-mediated transformation of the phytopathogen *Venturia inaequalis*. *Mycological Research*, 2003, 107(7): 803–810.
- [12] Ozeki K, Kyoya F, Hizume K, Kanda A, Hamachi M, Nunokawa Y. Transformation of intact *Aspergillus niger* by electroporation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1994, 58(12): 2224–2227.
- [13] Davidson RC, Cruz MC, Sia RAL, Allen B, Alspaugh JA, Heitman J. Gene disruption by biolistic transformation in serotype D strains of *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genetics and Biology*, 2000, 29(1): 38–48.
- [14] Michielse CB, Hooykaas PJJ, van den Hondel CAMJJ, Ram AFJ. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Current Genetics*, 2005, 48(1): 1–17.
- [15] Hinnen A, Hicks JB, Fink GR. Transformation of yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1978, 75(4): 1929–1933.
- [16] Ballance DJ, Buxton FP, Turner G. Transformation of *Aspergillus nidulans* by the orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene of *Neurospora crassa*. *Biochemical and Biophysical research Communications*, 1983, 112(1): 284–289.
- [17] Gruber F, Visser J, Kubicek CP, Graaff LH. The development of a heterologous transformation system for the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei* based on a *pyrG*-negative mutant strain. *Current Genetics*, 1990, 18(1): 71–76.
- [18] Wang FZ, Liu KM, Han LJ, Jiang BJ, Wang MY, Fang X. Function of a p24 heterodimer in morphogenesis and protein transport in *Penicillium oxalicum*. *Scientific Reports*, 2015, 5: 11875.
- [19] Lazo GR, Stein PA, Ludwig RA. A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Nature Biotechnology*, 1991, 9(10): 963–967.
- [20] de Groot MJA, Bundock P, Hooykaas PJJ, Beijersbergen AGM. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nature Biotechnology*, 1998, 16(9): 839–842.
- [21] Sugui JA, Chang YC, Kwon-Chung KJ. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Aspergillus fumigatus*: an efficient tool for insertional mutagenesis and targeted gene disruption. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(4): 1798–1802.
- [22] Qiao JJ, Liu W, Ma Y, Wan Z, Li RY. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of uracil auxotroph *Aspergillus fumigatus* is an efficient method for target gene knockout. *Journal of Peking University (Health Sciences)*, 2008, 40(3): 330–333. (in Chinese)
乔建军, 刘伟, 马彦, 万喆, 李若瑜. 根癌农杆菌介导的尿嘧啶缺陷烟曲霉转化是基因敲除的有效方法. *北京大学学报(医学版)*, 2008, 40(3): 330–333.
- [23] Wang JY, Li HY. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of the phytopathogenic fungus *Penicillium digitatum*. *Journal of Zhejiang University Science B*, 2008, 9(10): 823–828.
- [24] Xu J, Li JE, Lin LC, Liu Q, Sun WL, Huang BQ, Tian CG. Development of genetic tools for *Myceliophthora thermophila*. *BMC Biotechnology*, 2015, 15: 35.
- [25] Ma L, Zhang J, Zou G, Wang CS, Zhou ZH. Improvement of cellulase activity in *Trichoderma reesei* by heterologous expression of a beta-glucosidase gene from *Penicillium*

- decumbens*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2011, 49(4): 366–371.
- [26] Wang DY, He D, Li GQ, Gao S, Lü HY, Shan QS, Wang L. An efficient tool for random insertional mutagenesis: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the filamentous fungus *Aspergillus terreus*. *Journal of Microbiological Methods*, 2014, 98: 114–118.
- [27] Mullins ED, Chen X, Romaine P, Raina R, Geiser DM, Kang S. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: An efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. *Phytopathology*, 2001, 91(2): 173–180.
- [28] Penttilä M, Nevalainen H, Rättö M, Salminen, E, Knowles J. A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Gene*, 1987, 61(2): 155–164.
- [29] Sternberg N, Hamilton D. Bacteriophage P1 site-specific recombination: I. Recombination between *loxP* sites. *Journal of Molecular Biology*, 1981, 150(4): 467–486.
- [30] Sauer B. Functional expression of the cre-*lox* site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 1987, 7(6): 2087–2096.
- [31] Wieczorke R, Krampe S, Weierstall T, Freidel K, Hollenberg CP, Boles E. Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 1999, 464(3): 123–128.
- [32] Forment JV, Ramón D, MacCabe AP. Consecutive gene deletions in *Aspergillus nidulans*: application of the Cre/*loxP* system. *Current Genetics*, 2006, 50(3): 217–224.
- [33] Steiger MG, Vitikainen M, Uskonen P, Brunner K, Adam G, Pakula T, Penttilä M, Saloheimo M, Mach RL, Mach-Aigner AR. Transformation system for *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) that favors homologous integration and employs reusable bidirectionally selectable markers. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(1): 114–121.
- [34] Jiang BJ, Zhang RQ, Feng D, Wang FZ, Liu KM, Jiang Y, Niu KL, Yuan QQ, Wang MY, Wang HL, Zhang YM, Fang X. A tet-on and Cre-*loxP* based genetic engineering system for convenient recycling of selection markers in *Penicillium oxalicum*. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 485.
- [35] Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 2014, 157(6): 1262–1278.
- [36] Zhang H, Zhang JS, Wei PL, Zhang BT, Gou F, Feng ZY, Mao YF, Yang L, Zhang H, Xu NF, Zhu JK. The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. *Plant Biotechnology Journal*, 2014, 12(6): 797–807.
- [37] Wu YX, Liang D, Wang YH, Bai MZ, Tang W, Bao SM, Yan ZQ, Li DS, Li JS. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(6): 659–662.
- [38] DiCarlo JE, Norville JE, Mali P, Rios X, Aach J, Church GM. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(7): 4336–4343.
- [39] Liu Q, Gao RR, Li JE, Lin LC, Zhao JQ, Sun WL, Tian CG. Development of a genome-editing CRISPR/Cas9 system in thermophilic fungal *Myceliophthora* species and its application to hyper-cellulase production strain engineering. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10: 1.
- [40] Liu R, Chen L, Jiang YP, Zhou ZH, Zou G. Efficient genome editing in filamentous fungus *Trichoderma reesei* using the CRISPR/Cas9 system. *Cell Discovery*, 2015, 1: 15007.
- [41] Kubicek CP, Messner R, Gruber F, Mach RL, Kubicek-Pranz EM. The *Trichoderma* cellulase regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus. *Enzyme and Microbial Technology*, 1993, 15(2): 90–99.
- [42] Gao JF, Wang B, Han XY, Tian CG. Genome-wide screening of predicted sugar transporters in *Neurospora crassa* and the application in hexose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2017, 33(1): 79–89. (in Chinese)
高婧芳, 王邦, 韩晓云, 田朝光. 全基因组水平扫描鉴定粗糙脉孢菌糖转运蛋白及其在酿酒酵母已糖发酵中的评价. *生物工程学报*, 2017, 33(1): 79–89.
- [43] Li J, Liu GD, Chen M, Li ZH, Qin YQ, Qu YB. Cellodextrin transporters play important roles in cellulase induction in the cellulolytic fungus *Penicillium oxalicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(24): 10479–10488.
- [44] Liu GD, Qin YQ, Li ZH, Qu YB. Development of highly efficient, low-cost lignocellulolytic enzyme systems in the post-genomic era. *Biotechnology Advances*, 2013, 31(6): 962–975.
- [45] Kubicek CP, Messner R, Gruber F, Mandels M, Kubicek-Pranz EM. Triggering of cellulase biosynthesis by cellulose in *Trichoderma reesei*. Involvement of a constitutive, sophorose-inducible, glucose-inhibited β -diglucoside permease. *The Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268(26): 19364–19368.
- [46] Tian CG, Beeson WT, Iavarone AT, Sun JP, Marletta MA, Cate JHD, Glass NL. Systems analysis of plant cell wall degradation by the model filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(52): 22157–22162.
- [47] Ivanova C, Bååth JA, Seiboth B, Kubicek CP. Systems analysis of lactose metabolism in *Trichoderma reesei* identifies a lactose permease that is essential for cellulase induction. *PLoS One*, 2013, 8(5): e62631.
- [48] de Oliveira Porciuncula J, Furukawa T, Shida Y, Mori K, Kuhara S, Morikawa Y, Ogasawara W. Identification of major facilitator transporters involved in cellulase production during lactose culture of *Trichoderma reesei* PC-3-7. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2013, 77(5): 1014–1022.
- [49] Zhang WX, Kou YB, Xu JT, Cao YL, Zhao GL, Shao J, Wang H, Wang ZX, Bao XM, Chen GJ, Liu WF. Two major facilitator superfamily sugar transporters from *Trichoderma reesei* and their roles in induction of cellulase biosynthesis.

- Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(46): 32861–32872.
- [50] Wang MY, Zhao QS, Yang JH, Jiang BJ, Wang FZ, Liu KM, Fang X. A mitogen-activated protein kinase tmk3 participates in high osmolarity resistance, cell wall integrity maintenance and cellulase production regulation in *Trichoderma reesei*. *PLoS One*, 2013, 8(8): e72189.
- [51] Wang MY, Dong YM, Zhao QS, Wang FZ, Liu KM, Jiang BJ, Fang X. Identification of the role of a MAP kinase Tmk2 in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *Scientific Reports*, 2014, 4: 6732.
- [52] Wang MY, Zhang ML, Li L, Dong YM, Jiang Y, Liu KM, Zhang RQ, Jiang BJ, Niu KL, Fang X. Role of *Trichoderma reesei* mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in cellulase formation. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10(1): 99.
- [53] Mach-Aigner AR, Pucher ME, Steiger MG, Bauer GE, Preis SJ, Mach RL. Transcriptional regulation of *xyr1*, encoding the main regulator of the xylanolytic and cellulolytic enzyme system in *Hypocrea jecorina*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(21): 6554–6562.
- [54] Aro N, Saloheimo A, Ilmén M, Penttilä M. ACEII, a novel transcriptional activator involved in regulation of cellulase and xylanase genes of *Trichoderma reesei*. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(26): 24309–24314.
- [55] Häkkinen M, Valkonen MJ, Westerholm-Parvinen A, Aro N, Arvas M, Vitikainen M, Penttilä M, Saloheimo M, Pakula TM. Screening of candidate regulators for cellulase and hemicellulase production in *Trichoderma reesei* and identification of a factor essential for cellulase production. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, 7(1): 14.
- [56] Zeilinger S, Ebner A, Marosits T, Mach R, Kubicek CP. The *Hypocrea jecorina* HAP 2/3/5 protein complex binds to the inverted CCAAT-box (ATTGG) within the *cbh2* (cellobiohydrolase II-gene) activating element. *Molecular Genetics and Genomics*, 2001, 266(1): 56–63.
- [57] Ilmén M, Thrane C, Penttilä M. The glucose repressor gene *cre1* of *Trichoderma*: isolation and expression of a full-length and a truncated mutant form. *Molecular and General Genetics MGG*, 1996, 251(4): 451–460.
- [58] Saloheimo A, Aro N, Ilmén M, Penttilä M. Isolation of the *ace1* gene encoding a Cys₂-His₂ transcription factor involved in regulation of activity of the cellulase promoter *cbh1* of *Trichoderma reesei*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(8): 5817–5825.
- [59] Wang SW, Liu G, Wang J, Yu JT, Huang BQ, Xing M. Enhancing cellulase production in *Trichoderma reesei* RUT C30 through combined manipulation of activating and repressing genes. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2013, 40(6): 633–641.
- [60] Ilmén M, Onnela ML, Klemsdal S, Keränen S, Penttilä M. Functional analysis of the cellobiohydrolase I promoter of the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Molecular and General Genetics MGG*, 1998, 257(3): 386.
- [61] Zhang F, Bai FW, Zhao XQ. Enhanced cellulase production from *Trichoderma reesei* Rut-C30 by engineering with an artificial zinc finger protein library. *Biotechnology Journal*, 2016, 11(10): 1282–1290.
- [62] 方翎, 王方忠, 梁亚, 王明钰. 纤维素酶和半纤维素酶激活因子及其表达基因与应用. 中国: CN103436542A, 2013–12–11.
- [63] Wang ZL, Xu JH, Feng H, Qi HS. Fractal kinetic analysis of polymers/nonionic surfactants to eliminate lignin inhibition in enzymatic saccharification of cellulose. *Bioresource Technology*, 2011, 102(3): 2890–2896.
- [64] Chen HZ, Liu LY. Unpolluted fractionation of wheat straw by steam explosion and ethanol extraction. *Bioresource Technology*, 2007, 98(3): 666–676.
- [65] Seo DJ, Fujita H, Sakoda A. Effects of a non-ionic surfactant, Tween 20, on adsorption/desorption of saccharification enzymes onto/from lignocelluloses and saccharification rate. *Adsorption*, 2011, 17(5): 813–822.
- [66] Rahikainen JL, Evans JD, Mikander S, Kalliola A, Puranen T, Tamminen T, Marjamaa K, Kruus K. Cellulase–lignin interactions—the role of carbohydrate-binding module and pH in non-productive binding. *Enzyme and Microbial Technology*, 2013, 53(5): 315–321.
- [67] Strobel KL, Pfeiffer KA, Blanch HW, Clark DS. Structural insights into the affinity of Cel7A carbohydrate-binding module for lignin. *The Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(37): 22818–22826.
- [68] Strobel KL, Pfeiffer KA, Blanch HW, Clark DS. Engineering Cel7A carbohydrate binding module and linker for reduced lignin inhibition. *Biotechnology and Bioengineering*, 2016, 113(6): 1369–1374.
- [69] Ryu DDY, Mandels M. Cellulases: Biosynthesis and applications. *Enzyme and Microbial Technology*, 1980, 2(2): 91–102.
- [70] Wang FZ, Jiang Y, Guo W, Niu KL, Zhang RQ, Hou SL, Wang MY, Yi Y, Zhu CX, Jia CJ, Fang X. An environmentally friendly and productive process for bioethanol production from potato waste. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9(1): 50.
- [71] Saloheimo M, Paloheimo M, Hakola S, Pere J, Swanson B, Nyysönen E, Bhatia A, Ward M, Penttilä M. Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. *European Journal of Biochemistry*, 2002, 269(17): 4202–4211.
- [72] Verbeke J, Coutinho P, Mathis H, Quenot A, Record E, Asther M, Heiss-Blanquet S. Transcriptional profiling of cellulase and expansin-related genes in a hypercellulolytic *Trichoderma reesei*. *Biotechnology Letters*, 2009, 31(9): 1399–1405.
- [73] Foreman PK, Brown D, Dankmeyer L, Dean R, Diener S, Dunn-Coleman NS, Goedegebuur F, Houfek TD, England GJ, Kelley AS, Meerman HJ, Mitchell T, Mitchinson C, Olivares HA, Teunissen PJM, Yao J, Ward M. Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Journal of Biological Chemistry*,

- 2003, 278(34): 31988–31997.
- [74] Zeng W, Chen HZ. Synergistic effect of feruloyl esterase and cellulase in hydrolyzation of steam-exploded rice straw. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2009, 25(1): 49–54. (in Chinese)
曾薇, 陈洪章. 阿魏酸酯酶和纤维素酶在水解汽爆稻草中的协同作用. *生物工程学报*, 2009, 25(1): 49–54.
- [75] Phillips CM, Beeson WT, Cate JH, Marletta MA. Cellobiose dehydrogenase and a copper-dependent polysaccharide monooxygenase potentiate cellulose degradation by *Neurospora crassa*. *ACS Chemical Biology*, 2011, 6(12): 1399–1406.
- [76] Kim S, Ståhlberg J, Sandgren M, Paton RS, Beckham GT. Quantum mechanical calculations suggest that lytic polysaccharide monooxygenases use a copper-oxyl, oxygen-rebound mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(1): 149–154.
- [77] Beeson WT, Phillips CM, Cate JHD, Marletta MA. Oxidative cleavage of cellulose by fungal copper-dependent polysaccharide monooxygenases. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(2): 890–892.
- [78] Vu VV, Beeson WT, Phillips CM, Cate JHD, Marletta MA. Determinants of regioselective hydroxylation in the fungal polysaccharide monooxygenases. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136(2): 562–565.
- [79] Morgenstern I, Powlowski J, Tsang A. Fungal cellulose degradation by oxidative enzymes: from dysfunctional GH61 family to powerful lytic polysaccharide monooxygenase family. *Briefings in Functional Genomics*, 2014, 13(6): 471–481.
- [80] Harris PV, Welner D, McFarland KC, Re E, Navarro Poulsen JC, Brown K, Salbo R, Ding HS, Vlasenko E, Merino S, Xu F, Cherry J, Larsen S, Lo Leggio L. Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: structure and function of a large, enigmatic family. *Biochemistry*, 2010, 49(15): 3305–3316.
- [81] Punt PJ, van Biezen N, Conesa A, Albers A, Mangnus J, van den Hondel C. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends in Biotechnology*, 2002, 20(5): 200–206.
- [82] Bischof RH, Ramoni J, Seiboth B. Cellulases and beyond: the first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei*. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15(1): 106.
- [83] Contreras R, Carrez D, Kinghorn JR, van den Hondel CAMJJ, Fiers W. Efficient KEX2-like processing of a glucoamylase-interleukin-6 fusion protein by *Aspergillus nidulans* and secretion of mature interleukin-6. *Nature Biotechnology*, 1991, 9(4): 378–381.
- [84] Chen X, Liang Y, Hua J, Tao L, Qin WS, Chen SF. Overexpression of bacterial ethylene-forming enzyme gene in *Trichoderma reesei* enhanced the production of ethylene. *International Journal of Biological Sciences*, 2010, 6(1): 96–106.
- [85] Steiger MG, Mach-Aigner AR, Gorsche R, Rosenberg EE, Mihovilovic MD, Mach RL. Synthesis of an antiviral drug precursor from chitin using a saprophyte as a whole-cell catalyst. *Microbial Cell Factories*, 2011, 10(1): 102.
- [86] Dashtban M, Kepka G, Seiboth B, Qin WS. Xylitol production by genetically engineered *Trichoderma reesei* strains using barley straw as feedstock. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2013, 169(2): 554–569.
- [87] Jovanović B, Mach RL, Mach-Aigner AR. Erythritol production on wheat straw using *Trichoderma reesei*. *AMB Express*, 2014, 4(1): 34.
- [88] Harkki A, Uusitalo J, Bailey M, Penttilä M, Knowles JKC. A novel fungal expression system: Secretion of active calf chymosin from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Nature Biotechnology*, 1989, 7(6): 596–603.
- [89] Joutsjoki VV, Torkkeli TK, Nevalainen KMH. Transformation of *Trichoderma reesei* with the *Hormoconis resiniae* glucoamylase P (*gamP*) gene: production of a heterologous glucoamylase by *Trichoderma reesei*. *Current Genetics*, 1993, 24(3): 223–228.
- [90] Margolles-Clark E, Hayes CK, Harman GE, Penttilä M. Improved production of *Trichoderma harzianum* endochitinase by expression in *Trichoderma reesei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(6): 2145–2151.
- [91] Kiiskinen LL, Kruus K, Bailey M, Ylösmäki E, Siika-Aho M, Saloheimo M. Expression of *Melanocarpus albomyces* laccase in *Trichoderma reesei* and characterization of the purified enzyme. *Microbiology*, 2004, 150(9): 3065–3074.
- [92] Salles BC, Te’O VSJ, Gibbs MD, Bergquist PL, Filho EXF, Ximenes EA, Nevalainen KMH. Identification of two novel xylanase-encoding genes (*xyn5* and *xyn6*) from *Acrophialophora nainiana* and heterologous expression of *xyn6* in *Trichoderma reesei*. *Biotechnology Letters*, 2007, 29(8): 1195–1201.
- [93] Poidevin L, Levasseur A, Paës G, Navarro D, Heiss-Blanquet S, Asther M, Record E. Heterologous production of the *Piromyces equi* cinnamoyl esterase in *Trichoderma reesei* for biotechnological applications. *Letters in Applied Microbiology*, 2009, 49(6): 673–678.
- [94] De Faria FP, Te’O VSJ, Bergquist PL, Azevedo MO, Nevalainen KMH. Expression and processing of a major xylanase (XYN2) from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea* in *Trichoderma reesei*. *Letters in Applied Microbiology*, 2002, 34(2): 119–123.
- [95] Broekhuijsen MP, Mattern IE, Contreras R, Kinghorn JR, van den Hondel CAMJJ. Secretion of heterologous proteins by *Aspergillus niger*: production of active human interleukin-6 in a protease-deficient mutant by KEX2-like processing of a glucoamylase-hIL6 fusion protein. *Journal of Biotechnology*, 1993, 31(2): 135–145.
- [96] Stewart P, Whitwam RE, Kersten PJ, Cullen D, Tien M. Efficient expression of a *Phanerochaete chrysosporium* manganese peroxidase gene in *Aspergillus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(3): 860–864.

Genetic modification and application of lignocellulose degrading fungus

Yi Jiang¹, Ning Su¹, Xu Fang^{1,2*}

¹ State Key Laboratory of Microbial Technology, School of Life Sciences, Shandong University, Jinan 250100, Shandong Province, China

² National Glycoengineering Research Center, Shandong University, Jinan 250100, Shandong Province, China

Abstract: Conversion from lignocellulose to biofuel with enzyme hydrolysis will be beneficial for sustainable development. Most microorganisms used in the industrial production of cellulase are filamentous fungi. However, isolation of cellulase hyper producing strain is limited by the lack of proven technology on genetic modification of filamentous fungi and the mechanism of cellulase synthesis. In this paper, recent progress in the genetic modification of cellulase hyper producing strains are summarized. Specially, we discussed the influences of signal induction, signal transduction and transcriptional regulation on cellulase synthesis in filamentous fungi. Finally, the industrial application of filamentous fungi was also introduced.

Keywords: filamentous fungi, cellulase, genetic modification, sugar transporter, heterologous expression

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Shandong Scientific and Technology Project (2015ZDXX0403A01), by the Higher Education Discipline Innovation Introduction Program (B16030), by the Shandong University Basic Research Business Fee Special (2016JC031) and by the National Natural Science Foundation of China (31570040)

*Corresponding author. Tel: +86-531-88364004; Fax: +86-531-88364363; E-mail: fangxu@sdu.edu.cn

Received: 31 March 2017; Revised: 8 May 2017; Published online: 25 May 2017