



草酸青霉的植物多糖降解酶基因表达调控的研究进展

宁远妮, 张婷, 李文通, 赵帅*, 冯家勋*

广西大学生命科学与技术学院, 广西微生物与酶工程技术研究中心, 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广西 南宁 530004

宁远妮, 张婷, 李文通, 赵帅, 冯家勋. 草酸青霉的植物多糖降解酶基因表达调控的研究进展. 微生物学报, 2022, 62(11): 4213–4233.

Ning Yuanni, Zhang Ting, Li Wentong, Zhao Shuai, Feng Jiaxun. Gene expression and regulation of plant-polysaccharide-degrading enzymes in *Penicillium oxalicum*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(11): 4213–4233.

摘要: 植物生物质是地球上最丰富的可再生资源, 对其生物炼制可生产高附加值的生物基产品。生物炼制需要使用植物多糖降解酶(plant-polysaccharide-degrading enzymes, PPDEs), 如纤维素酶、木聚糖酶和生淀粉酶。丝状真菌草酸青霉(*Penicillium oxalicum*)能分泌完整的具有高活力的植物多糖降解酶, 但其产量低限制了大规模生产及应用。草酸青霉中植物多糖降解酶的生物合成受到多种调控因子包括转录因子的严格调控。本文主要介绍在以植物生物质甘蔗渣和木薯生淀粉为原料的生物炼制中, 涉及的一些关键微生物方面的问题, 如从高产植物多糖降解酶的真菌菌株的筛选、育种, 到草酸青霉植物多糖降解酶合成及其基因表达的调控基因的鉴定, 以及酶产量提高的工程菌株的构建等, 为丝状真菌资源的开发与利用提供理论指导。

关键词: 草酸青霉; 调控基因; 纤维素酶; 木聚糖酶; 生淀粉酶; 基因工程菌

基金项目: 国家自然科学基金区域创新发展联合基金重点项目(U21A20178)

Supported by the Joint Fund for Regional Innovation and Development of National Natural Science Foundation of China (U21A20178)

*Corresponding authors. FENG Jiaxun, Tel: +86-771-3231231, Fax: +86-771-3236855, E-mail: jiaxunfeng@sohu.com; ZHAO Shuai, shuaizhao0227@gxu.edu.cn

Received: 4 May 2022; Revised: 19 August 2022; Published online: 29 August 2022

Gene expression and regulation of plant-polysaccharide-degrading enzymes in *Penicillium oxalicum*

NING Yuanni, ZHANG Ting, LI Wentong, ZHAO Shuai*, FENG Jiaxun*

State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-Bioresources, Guangxi Research Center for Microbial and Enzyme Engineering Technology, College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, Guangxi, China

Abstract: Plant biomass is the most abundant renewable bioresource on earth. Many high-value added bio-based products can be produced by biomass biorefinery which needs to use plant-polysaccharide-degrading enzymes (PPDEs), such as cellulase, xylanase and raw-starch-degrading enzymes. Filamentous fungus *Penicillium oxalicum* can secrete complete PPDEs with high activity, but low yields of PPDEs limit their large-scale production and application. The biosynthesis of PPDEs in *P. oxalicum* is strictly regulated by many regulators such as transcription factors. In this review, in the biorefinery of sugarcane bagasse and raw cassava starch as feedstocks, some aspects concerning microorganisms were introduced, including the screening and breeding of fungal strains with high production of PPDEs, identification of regulatory genes regulating the biosynthesis of PPDEs and their gene expression in *P. oxalicum*, and construction of the engineered *P. oxalicum* strains with improved PPDE production, which would provide theoretical guidance for the exploration and utilization of fungal resources.

Keywords: *Penicillium oxalicum*; regulatory gene; cellulase; xylanase; raw-starch-degrading enzyme; genetically engineered strain

植物生物质富含植物多糖如纤维素、半纤维素和淀粉，是生物炼制生产生物基产品的良好原料^[1]。我国每年生产大量的富含淀粉的玉米、木薯和高粱等^[2]，以及富含纤维素和半纤维素的农业废弃物如甘蔗渣、稻秆、玉米秸秆等植物生物质^[3-4]。在“碳达峰”和“碳中和”背景下，对植物生物质进行生物炼制生产高附加值产品显得非常重要。在生物炼制过程中，关键步骤是对植物多糖的酶解、糖化。其中，所用的植物多糖降解酶的成本约占总生产成本的25%–30%^[5]。

植物多糖降解酶主要包括纤维素酶、木聚糖酶和淀粉酶。纤维素酶和木聚糖酶可在温和条件下将纤维素和木聚糖水解为单糖或寡糖，如葡萄糖、木糖或低聚木糖(图 1A、1B)^[6]。淀

粉酶是将淀粉水解为葡萄糖的一类酶，主要分为 α -淀粉酶、 β -淀粉酶和葡萄糖淀粉酶(图 1C)^[7]。传统的淀粉糖化工艺是先将生淀粉高温糊化，再加入耐高温的 α -淀粉酶进行液化，降温后加入糖化酶，酶解产生葡萄糖^[3]。生淀粉酶(raw-starch-degrading enzyme, RSDE)尤其生淀粉糖化酶(raw-starch-degrading glucoamylase, RSDG)，能在糊化温度以下直接将生淀粉酶解成葡萄糖。与一般淀粉酶相比，生淀粉酶最明显的不同是具有淀粉结合结构域(starch-binding domain)^[8]。淀粉结合结构域使生淀粉酶直接结合在生淀粉颗粒表面，促进酶的催化功能域对淀粉的水解。值得注意的是，裂解性多糖单加氧酶(lytic polysaccharide monoxygenase)辅助活性家族 13 (auxiliary activity family 13, AA13)

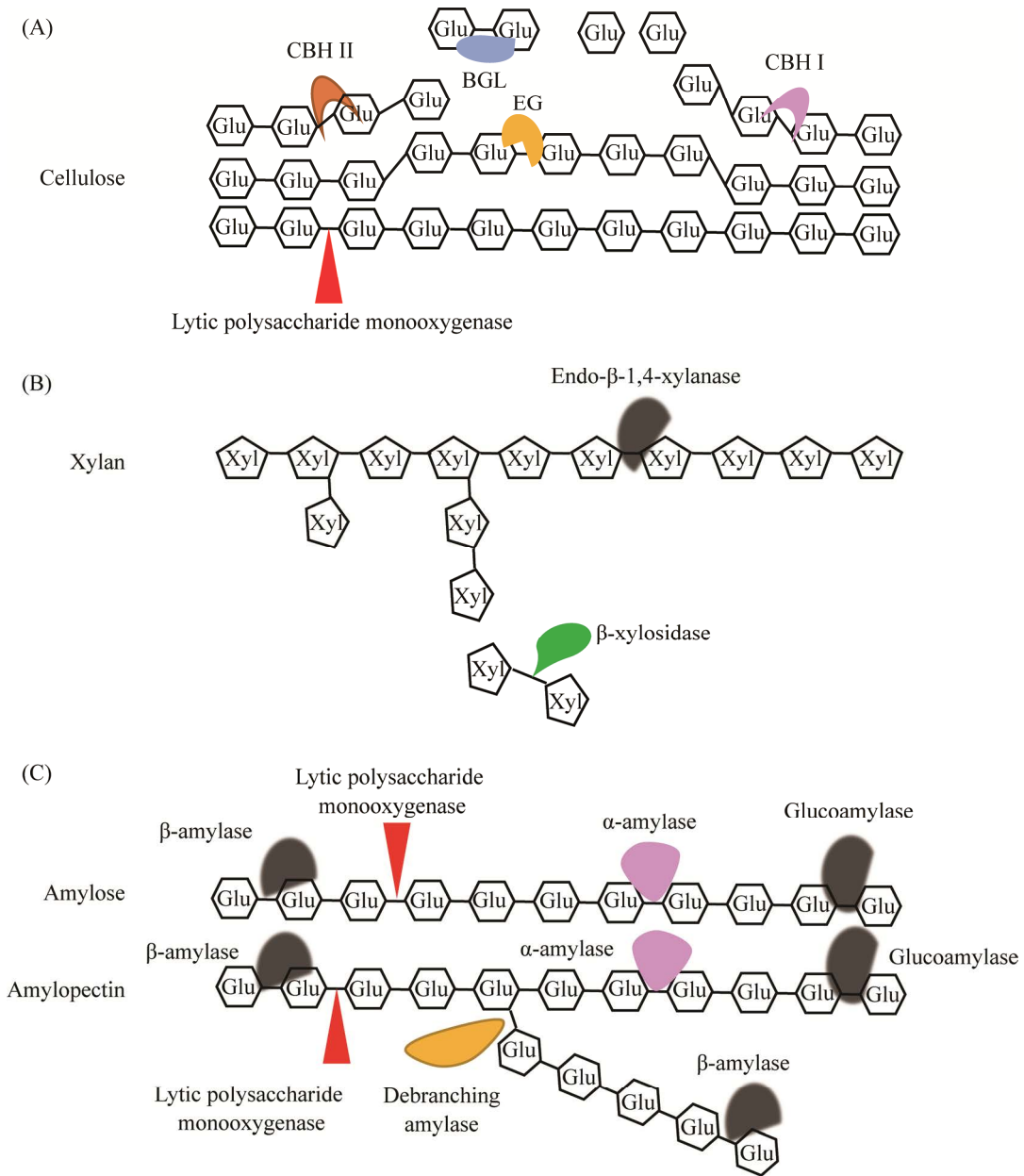


图 1 植物多糖纤维素(A)、木聚糖(B)和淀粉(C)的酶解示意图^[3,6-7,9]

Figure 1 Enzymatic degradation of plant polysaccharides including cellulose (A), xylan (B) and starch (C)^[3,6-7,9].

也可以通过氧化裂解糖苷键，促进对生淀粉颗粒的降解^[9-10]。总之，与传统工艺相比，生淀粉酶的使用可节约能源，简化步骤，具有很好的应用前景^[11]。

丝状真菌因高产植物多糖降解酶备受关

注，并被广泛研究。目前，一些菌种已用于商业生产纤维素酶，例如，国外主要用里氏木霉 (*Trichoderma reesei*)和国内主要用草酸青霉 (*Penicillium oxalicum*)。然而，里氏木霉的胞外β-葡萄糖苷酶产量非常低，需要额外添加大量

β -葡萄糖苷酶, 提高其水解能力。相比之下, 草酸青霉能产完全的、酶活力高的纤维素降解酶系, 有希望成为里氏木霉的替代菌种^[12]。但是, 迄今所报道的真菌植物多糖降解酶的产量, 还不能很好满足植物生物质工业生物炼制的需求^[13]。

真菌的植物多糖降解酶基因的表达在转录水平上受到调控网络的精准动态调控。调控网络主要由转录因子(transcription factor, TF)、信号蛋白和一系列信号分子等组成, 且与诱导碳源、培养时间等息息相关。明确植物多糖降解酶生物合成及其编码基因表达的调控机理, 获取适合的操作元件, 是通过合成生物学技术, 改造真菌菌株以提高酶产量的前提^[14]。

本文综述了针对以甘蔗渣和木薯生淀粉为水解底物, 挖掘和鉴定新的产植物多糖降解酶的真菌资源, 植物多糖降解酶合成及其编码基因的表达调控机理, 以及高产酶工程菌的构建等的研究进展, 为丝状真菌资源的开发与利用提供理论指导。

1 提高真菌的植物多糖降解酶产量的策略

1.1 天然高产植物多糖降解酶真菌的筛选

通过高通量筛选方法, 从自然界中筛选高产植物多糖降解酶的真菌菌株是最简单的途径。例如, Zhang 等用含有结晶纤维素(avicel)的平板进行高通量筛选, 从我国亚热带和热带森林土壤中, 分离得到 305 株真菌菌株。其中 31 株的结晶纤维素酶(avicelase)产量大于 0.2 U/mL, 包括 18 株木霉和 13 株青霉, 其中, 拟康宁木霉(*Trichoderma koningiopsis*)菌株 FCD3-1 分泌高活力的 β -葡萄糖苷酶; 草酸青霉菌株 HP7-1 (表 1)产生能高效水解蒸汽爆破预处理甘蔗渣的完整纤维素酶系^[15]。

继而, 以纤维素酶水解预处理甘蔗渣后剩余残渣为底物制备高通量筛选平板, Jing 等从 69 份广西森林土壤样品中, 分离得到 373 株真菌, 其中 12 株草酸青霉菌株的滤纸酶(filter paper cellulase, FPase)产量超过 0.5 U/mL。其中, 菌株 Z1-3 (表 1)在麦麸加 avicel 诱导下, 滤纸酶产量达到 2.74 U/mL。用菌株 Z1-3 的粗酶液水解预处理甘蔗渣 96 h 时, 纤维素的转化率达到 92.5%^[16]。

最近, Li 等从西藏高原地区分离得到 88 株真菌菌株, 包括 16 株青霉、木霉、曲霉和篮状菌。其中哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)菌株 LZ117 滤纸酶产量最高, 为 0.65 U/mL^[17]。

针对木薯生淀粉的糖化, Lin 等从广西十万大山森林土壤中分离、筛选得到一株草酸青霉菌株 GXU20, 其木薯生淀粉酶产量为 20 U/mL (表 1)。草酸青霉菌株 HP7-1 的木薯生淀粉酶产量是 GXU20 的 2.5 倍, 为 55.1 U/mL^[18]。

以上研究表明, 自然界中存在的降解植物多糖尤其是甘蔗渣中纤维素和木薯生淀粉能力较强的真菌主要为青霉和木霉。值得注意的是, 在针对不同底物的几种筛选策略中, 都能筛选到草酸青霉菌株。

1.2 物理化学诱变育种

物理化学诱变育种主要是通过各种物理射线、化学诱变剂或者联合对微生物菌种进行诱发突变, 使其遗传物质发生改变, 从而筛选有利于人类生产的突变株, 该突变是随机的、不定向的。常用的物理射线包括紫外线、X 射线、 γ 射线和常温常压等离子等; 化学诱变剂包括 5-溴尿嘧啶、甲基磺酸乙酯、亚硝基胍和吡啶类等。目前, 利用物理化学诱变育种, 提高真菌植物多糖降解酶的报道很多(表 1), 且效果显著。例如, 以草酸青霉菌株 HP7-1 为出发菌株, 经过 3 轮 γ 射线以及 2 轮甲基磺酸乙

表 1 天然筛选和人工育种获得的产植物多糖降解酶的草酸青霉菌株资源列表

Table 1 List of *P. oxalicum* strains producing plant-polysaccharide-degrading enzymes obtained through screening from nature and artificial breeding

Strains of <i>P. oxalicum</i>	Parental strain	Characteristics or way of obtaining	Inducing carbon source	Yield of enzyme	References
HP7-1	Wild-type	Isolated from Guangxi forestry soil	Wheat bran and avicel	FPase 1.79 U/mL	[15]
Z1-3	Wild-type	Isolated from Guangxi forestry soil	Wheat bran and avicel	FPase 2.74 U/mL	[16]
GXU20	Wild-type	Isolated from Guangxi forestry soil	Raw-starch	RSDE 20 U/mL	[18]
114-2	Wild-type	Isolated from soil in Jining, Shandong	Cellulose and wheat bran	FPase ~0.5 U/mL	[20]
EU2106	Strain HP7-1	γ -irradiation and ethyl methanesulfonate/ultraviolet light mutagenesis	Pretreated sugarcane bagasse	FPase 2.78 U/mL	[19]
JU-A10-T	Strain 114-2	Multiple rounds of random mutagenesis and genome shuffling	Cellulose and wheat bran	FPase ~4.5 U/mL	[20]
$\Delta PoxKu70$	Strain HP7-1	Deletion of gene <i>PoxKu70</i> in strain HP7-1	Avicel	Basically the same as that of the wild-type strain HP7-1	[19]
OX <i>PoxGA15A</i>	$\Delta PoxKu70$	The gene <i>PoxGA15A</i> was overexpressed in $\Delta PoxKu70$ using the strong promoter $P_{PoxEgCel5B}$ and the strong signal peptide p <i>PoxGA15A</i>	Raw-starch	RSDE 241.6 U/mL	[21]
A2-13	OX <i>PoxGA15A</i>	ARTP/EMS-combined multiple mutagenesis	Raw-starch	RSDE production increased 89.1% compared with that of the starting strain	[22]
$\Delta PoxAtf1\Delta PoxCxrC$	$\Delta PoxKu70$	Deletion of genes <i>PoxAtf1</i> and <i>PoxCxrC</i> in strain $\Delta PoxKu70$	Wheat bran plus rice straw	FPase production increased 2.4–29.1 times, xylanase production increased 78.9%–130.8%	[23]
$\Delta PoxCxrC::eEF1A$	$\Delta PoxKu70$	Simultaneous deletion of gene <i>PoxCxrC</i> and overexpression of gene <i>eEF1A</i> in strain $\Delta PoxKu70$	Avicel	Cellulase production increased 14.7%–127.7%, xylanase production increased 31.7%–217.8%, RSDE production increased 55.4%–314.6%	[24]
RE-10	Strain 114-2	Simultaneous deletion of genes <i>bgl2</i> and <i>creA</i> , and overexpression of gene <i>clrB</i> in strain 114-2	Wheat bran and avicel	Cellulase production increased 10–27 times, xylanase production increased 5 times	[25]
11-13	Strain RE-10	Overexpression of gene <i>bgl4</i> in strain RE-10	Corn cob, wheat bran, soy flour and cellulose	pNPGase production increased 65 times	[26]

酯和紫外线联合诱变, 获得了高产纤维素酶和木聚糖酶突变株 EU2106。在预处理甘蔗渣诱导下, 其滤纸酶产量达到 2.78 U/mL, 相比出发菌株提高了 55%^[19]。基因组重测序分析发现, 和野生型菌株 HP7-1 相比, 突变株 EU2106 有 274 个单核苷酸变异和 12 个插入/缺失突变。比较转录组分析发现, 和 HP7-1 相比, 突变株 EU2106 在含有麦麸加微晶纤维素的液体培养条件下, 有 347 个差异表达基因, 其中关键纤维素酶基因 *POX02490/cbh1-2*、*POX05571/egl*、*POX05570/Cel45A* 等转录水平显著上调。比较分泌组分析发现, 和 HP7-1 相比, 突变株 EU2106 分泌组中有 240 种蛋白质的分泌量发生变化, 其中, 3 个纤维二糖水解酶、8 个内切葡聚糖酶、2 个 β -葡萄糖苷酶和 5 个木聚糖酶的分泌量显著增加^[19]。

用草酸青霉突变株 EU2106 产的纤维素酶水解 NaOH 和 H₂O₂ 联合预处理的甘蔗渣纤维素, 酶用量为 30 FPU/g、底物浓度为 40 g/L, 50 °C 水解 96 h, 水解率达到 98.69%^[27], 表明草酸青霉分泌的纤维素酶系中各种酶组分的活力高、配比合理, 协同高效, 可以直接应用到甘蔗渣生物炼制中。唯一需要改进的是提高草酸青霉的纤维素酶产量。因此, 学术界认为木质纤维素生物炼制所用真菌纤维素酶的研究方向之一是提高真菌的纤维素酶产量。

以草酸青霉工程菌株 OXPoxGA15A (表 1) 为出发菌株^[21], Gu 等^[22]通过 4 轮甲基磺酸乙酯诱变和 2 轮常压常温等离子体诱变, 获得 1 株高产木薯生淀粉酶的突变株 A2-13 (表 1)。在可溶性淀粉为碳源诱导条件下, 以天然生木薯粉为底物, 突变株 A2-13 木薯生淀粉酶产量为 191.0 U/mL, 相比出发菌株, 提高了 89.1%。将突变株 A2-13 产生的生淀粉酶与商业 α -淀粉酶共用, 在 40 °C 下能高效水解生玉米粉和生

木薯粉。基因组重测序分析发现, 和出发菌株相比, 突变株 A2-13 有 230 个单核苷酸变异和 131 个插入/缺失突变。荧光定量 PCR 分析发现, 突变株 A2-13 中生淀粉糖化酶基因 *PoxGA15A* 表达量显著上调。

PoxGA15A 包含一个糖苷水解酶家族 15 催化功能域、一个碳水化合物结合模块家族 20 的淀粉结合结构域, 与草酸青霉菌株 114-2 中糖化酶 Amy15A (EPS34453.1) 和里氏木霉糖化酶 HjGA (2VN7)^[28]的一致性分别为 99.0% 和 56.9%。以糖化酶 HjGA 为模板, 通过蛋白质结构建模发现 *PoxGA15A* 的催化功能域主要形成桶状 α/β 结构; 淀粉结合结构域主要形成 β -sandwich 折叠结构^[8]。

以草酸青霉菌株 114-2 为出发菌株, 通过多轮诱变包括紫外线、亚硝基胍、基因组重排等, 获得突变株 JU-A10-T, 其滤纸酶产量是出发菌株的近 9 倍^[20]。虽然物理化学诱变育种可以有效提高真菌植物多糖降解酶产量, 但是突变株的遗传稳定性不够, 需要不断诱变以稳定其酶产量。

1.3 分子育种

真菌中植物多糖降解酶基因的表达受到复杂调控网络的调控, 可以根据调控网络靶点设计分子靶标, 进行真菌分子育种提高酶产量。针对甘蔗渣和木薯生淀粉的酶解, 目前已构建了 3 个草酸青霉工程菌(表 1)。例如, 通过 FLP/FRT 位点特异性重组系统, 在草酸青霉菌株 $\Delta PoxKu70$ 中同时敲除 2 个转录阻遏基因 *PoxAtfI*^[29] 和 *PoxCxrC*^[30], 获得双基因缺失突变体 $\Delta PoxAtfI \Delta PoxCxrC$, 在麦麸加稻杆为碳源的固体培养中, 与出发菌株 $\Delta PoxKu70$ 相比, 该突变体的纤维素酶和木聚糖酶产量分别显著增加 2.4–29.1 倍和 78.9%–130.8%, 其粗酶液水解碱预处理的甘蔗渣, 水解率提高 10.6%–13.5%^[23]。

以草酸青霉菌株 $\Delta PoxKu70$ 为出发菌株, 敲除转录阻遏基因 *PoxCxrC*, 突变株 $\Delta PoxCxrC$ 纤维素酶、木聚糖酶和生淀粉酶产量显著上升 10.6%–119.6%; 过量表达翻译延伸因子基因 *eEF1A*, 导致纤维素酶、木聚糖酶和生淀粉酶产量分别提高 31.03%–58.64%、30.49%–40.61% 和 10.56%–104.48%。同时敲除 *PoxCxrC* 和过量表达翻译延伸因子基因 *eEF1A*, 获得基因工程菌株 $\Delta PoxCxrC::eEF1A$, 在分别含有 avicel 和可溶性玉米淀粉为唯一碳源的培养基培养条件下, 纤维素酶、木聚糖酶和生淀粉酶产量显著增加 14.7%–314.6%。用工程菌 $\Delta PoxCxrC::eEF1A$ 所产生淀粉酶水解生木薯粉(浓度为 150.0 g/L) 96 h 时, 葡萄糖产率提高 9.3%–15.5%, 水解液中葡萄糖含量达到 101.0 g/L, 淀粉转化率为 89.1%^[24]。

值得关注的是, 当同时过量表达 *PoxCxrC* 和 *eEF1A* 时, 所得双基因过量表达菌株的纤维素酶和木聚糖酶产量与单基因过表达菌株 $\Delta PoxKu70::PoxCxrC$ 的无显著差别。过表达菌株 $\Delta PoxKu70::PoxCxrC$ 中, 关键的纤维素酶和木聚糖酶基因的表达受到严重抑制。当继续增加翻译延伸因子 *eEF1A* 时, 也不能增加纤维素酶和木聚糖酶的产量, 表明高水平的 mRNA 是高产酶的前提, 只有 mRNA 和 *eEF1A* 同时增多, 才能使酶产量更高。因此, 在分子育种过程中, 需要同时考虑转录和翻译的协调一致^[24]。

另外, 通过比较转录组学分析, 筛选得到 5 个最优候选草酸青霉诱导型启动子, 分别将该 5 个启动子和绿色荧光蛋白基因重组, 筛选到 pPoxEgCel5B-gfp 菌丝显示出最强的绿色荧光强度, 在接种后第 7 天达到 17 798.3。通过比较分泌组学分析, 筛选得到 3 个最优候选草酸青霉信号肽, 使用启动子 pPoxEgCel5B 分别

将该 3 个信号肽的编码序列和绿色荧光蛋白基因重组, 筛选到 spPoxGA15A-gfp 菌丝显示出最强的绿色荧光强度, 在接种后第 7 天达到 25 109.3。将筛选得到的草酸青霉中强启动子 pPoxEgCel5B 和强信号肽 spPoxGA15A, 用于过表达生淀粉糖化酶基因 *PoxGA15A*, 获得工程菌 OXPoxGA15A (表 1)。以预处理的木薯生淀粉为底物, 工程菌 OXPoxGA15A 的生淀粉酶产量达到 241.6 U/mL, 相比出发菌株 $\Delta PoxKu70$ 的提升 3.4 倍。同时, 菌株 OXPoxGA15A 的粗酶液对玉米、马铃薯和其他未蒸煮的生淀粉表现出高活性, 与文献报道的数据相比, 菌株 OXPoxGA15A 产生的这些酶活性接近或高于其他微生物菌株对相同底物的酶活性^[21–22]。

以草酸青霉菌株 114-2 为出发菌株, 通过敲除和过表达多个调控基因, 获得了一系列高产纤维素酶和木聚糖酶的突变株, 例如, 敲除转录阻遏基因 *cre1* 和 *bgl2*, 组成型过量表达转录激活基因 *clrB*, 获得的工程菌 RE-10 的滤纸酶和木聚糖酶产量分别比野生型提高 27 倍和 5 倍^[25]。继而, 在 RE-10 中过量表达 *bgl4*, 获得突变株 I1-13, 其 β -葡萄糖苷酶产量是出发菌株 66 倍, 达到 150 U/mL^[26]。

通过分子育种所获得的基因工程菌的遗传稳定性好, 然而, 目前工程菌的酶产量仍不高。最大的限制因素是对草酸青霉中植物多糖降解酶生物合成的调控机理所知甚少, 可操作的靶标元件不足等。

2 影响真菌的植物多糖降解酶基因表达的因素

2.1 外部因素

研究表明, 真菌中植物多糖降解酶基因的表达受到多种因素的影响, 主要分为外部因素

和内在因素。外部因素主要指真菌生长所处的环境因子,如碳源诱导物(图 2)。当环境中存在微生物生长可直接利用的单糖如葡萄糖时,则不会消耗自身能量合成植物多糖降解酶;当环境中不存在可直接利用的单糖时,需要分泌植物多糖降解酶来降解各种碳源,转化为可利用的单糖以维持生命^[31]。不同的碳源诱导条件下,植物多糖降解酶基因的表达水平具有显著差异。例如, Li 等通过分析比较 23 种碳源对草酸青霉菌株 $\Delta PoxKu70$ 纤维素酶产量的影响,发

现甲基纤维素诱导的滤纸酶产量最高,其次是 α -纤维素。通过分析比较菌株 $\Delta PoxKu70$ 在 5 种不同碳源(微晶纤维素、甲基纤维素、2-羟乙基纤维素、麦麸、葡萄糖)存在条件下的转录组,发现关键纤维素酶和木聚糖酶基因的表达量发生了不同程度的变化,如 $POX05587/Cel7A-2$ (*cbh1*)、 $POX05570/Cel45A$ 、 $POX06147/Cel5A$ 、 $POX07535/Cell12A$ 、 $POX06835/Bgl1$ 、 $POX00063/Xyn10A$ 和 $POX06783/Xyn11A$,它们中大多数转录水平都上升^[32]。Yan 等比较分析草酸青霉菌

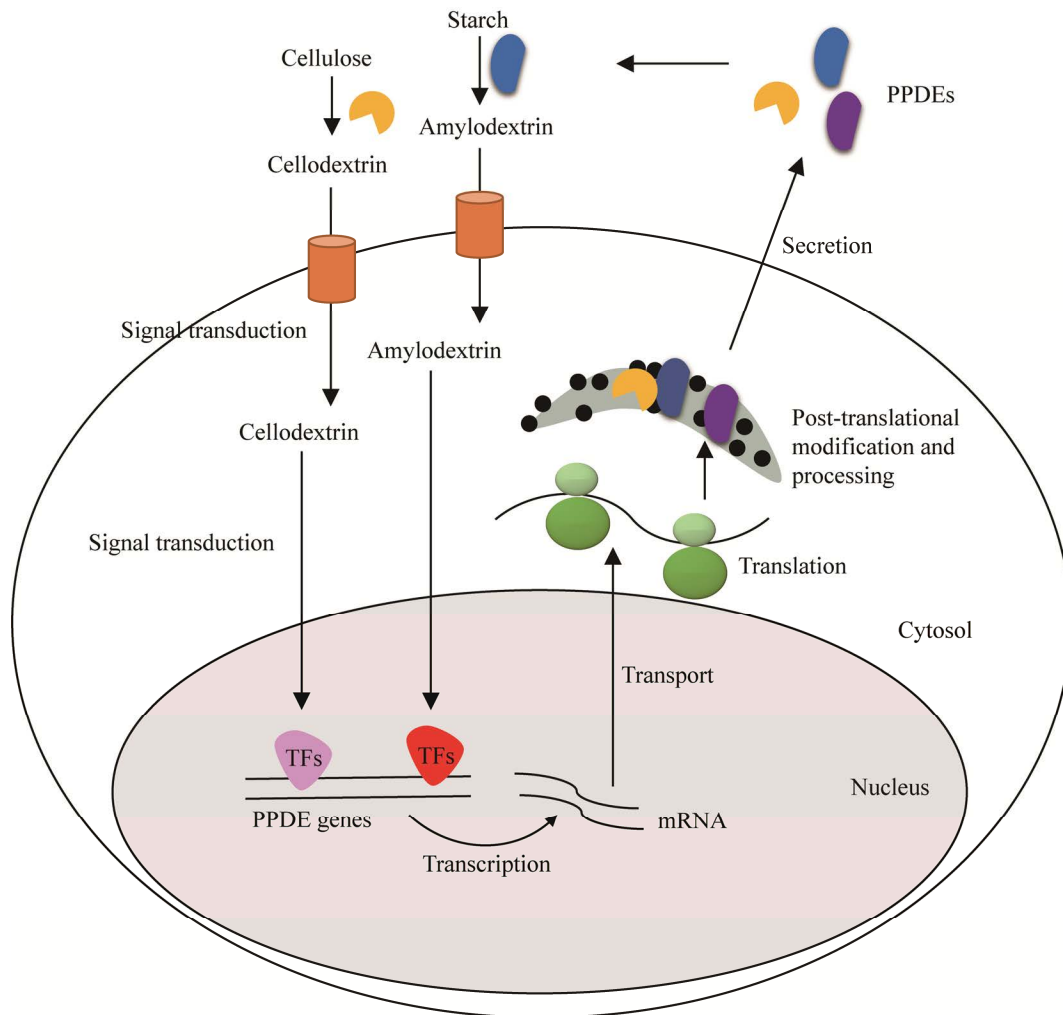


图 2 推测的丝状真菌中植物多糖降解酶(PPDEs)的生物合成示意图^[13-14]

Figure 2 Schematic diagram indicating biosynthesis of plant-polysaccharide-degrading enzymes (PPDEs) in filamentous fungi^[13-14].

株 HP7-1 分别在葡萄糖、麦麸, 以及麦麸加 avicel 培养条件下的转录组, 发现 108 个共转录基因, 其中 37 个基因包括 11 个纤维素酶基因和 2 个半纤维素酶基因的转录水平在葡萄糖培养条件下低转录表达, 在麦麸培养条件下中度转录表达, 在麦麸加 avicel 培养条件下高转录表达, 原因是葡萄糖抑制了草酸青霉中纤维素酶基因的转录, 而麦麸、avicel 诱导了其转录^[33]。

另外, 不同的培养方式也会影响草酸青霉植物多糖降解酶基因的表达水平。Zhao 等通过比较分析草酸青霉菌株 HP7-1 在含有麦麸加稻秆的固体培养基和液体培养基中培养 24 h 的转录组, 相比液体培养, 固体培养中关键纤维素酶和木聚糖酶基因的转录水平显著升高, 但是与柠檬酸循环和翻译有关基因的转录水平显著下降, 表明草酸青霉在固体培养时, 遇到更强的饥饿胁迫, 需要降低自身能耗, 集中力量产生、分泌纤维素酶, 降解胞外纤维素产生葡萄糖, 维持自身生存^[34]。

此外, 微生物生长环境的 pH 值影响真菌的各种生物学过程, 真菌有一个复杂而保守的 Pal-pH 途径系统。PacC 是 Pal-pH 通路中的主要转录因子, 调节各种生物过程来适应环境 pH 的变化^[35]。

光信号会控制真菌中重要的生理和形态反应, 真菌可以使用多达 11 个光感受器和信号级联来感知近紫外光、蓝光、绿光、红光和远红光, 从而控制大部分基因组适应环境。蓝光光感受器直接作为细胞核中的转录调节剂起作用, 而红光感应和远红光感应光敏色素诱导信号通路将信号从细胞质转导到细胞核。绿光可以被称为视蛋白的视网膜结合蛋白感知^[36]。

培养时间对真菌植物多糖降解酶基因表达及酶产量产生影响, 将里氏木霉菌丝接种到甘

蔗渣底物中, 培养物上清中的糖含量随着培养时间的增加而增加^[37]。

2.2 内在因素

内在因素主要是真菌体内信号转导通路及相关调控因子等(图 2)。在丝状真菌中, 碳分解代谢物阻遏(carbon catabolite repression, CCR)是通过抑制优先利用碳源如葡萄糖之外的碳源分解所需酶的生物合成, 从而达到对优选碳源的优先利用, 主要由蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA)和保守转录因子 CreA/Cre1 介导^[38]。葡萄糖被 G-蛋白偶联受体(G-protein-coupled receptor, GPCR)识别, 激活 G 蛋白复合体, 继而激活腺苷环化酶, 增加细胞体内第二信使环腺苷酸(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)水平。cAMP 结合 PKA 调节亚基 PKA-R, 激活 PKA 活性, 磷酸化下游底物, 包括 CreA/Cre1, 继而激活 CCR^[39]。在葡萄糖存在时, 真菌如里氏木霉和粗糙脉孢菌中缺失 *pka*, 导致纤维素酶产量增加。最近, 研究发现构巢曲霉突变株 Δpka 中, 将 CreA 第 319 位氨基酸即丝氨酸突变为丙氨酸, 使 CreA 不被磷酸化, 结果发现去磷酸化的 CreA 延迟进入细胞核。值得注意的是, 野生型和 CreA^{S319A} 菌株的纤维素酶产量无显著差异。S319 是激酶 Stk22 的磷酸化位点, 是 PKA 的间接磷酸化位点^[40]。里氏木霉 Cre1 中 S241 磷酸化修饰影响 DNA 结合和 CCR 的发生, 进而影响纤维素酶产量; 构巢曲霉 CreA 中 S262、S268 和 T308 的磷酸化影响 CreA 蛋白的积累、亚细胞定位、DNA 结合能力和酶活力等^[38]。其中, S262 和 S268 推测被酪蛋白激酶 CkiA 磷酸化位点, 而 T308 是糖原合酶激酶 GskA 的磷酸化位点^[39]。另外, CreA 的泛素化^[41]对自身的降解也很重要。

CreA/Cre1 可通过直接结合或与特异转录因子竞争结合靶标功能基因的启动子区, 直接

调控参与碳代谢基因的转录水平,也可通过调控特异调控基因的表达,间接控制参与碳代谢的基因表达水平^[42]。例如,里氏木霉 CreA 直接结合到关键纤维素酶和木聚糖酶基因如 *cbh1*、*egl*、*xlnA*、*xlnB* 和 *xlnD* 等启动子区,也可结合到关键调控基因 *xyr1* 启动子区等,直接和间接地控制纤维素酶和木聚糖酶的产生^[43]。

值得注意的是,金属离子如 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 在 cAMP 信号传导通路调控纤维素酶基因表达过程中,也发挥着重要作用^[44-47]。

丝状真菌 G 蛋白复合体由 3 个亚基 $G\alpha$ 、 $G\beta$ 和 $G\gamma$ 组成,参与糖、氨基酸、纤维素、细胞壁成分、性信息素、磷脂、钙离子和其他配体的信号传导,影响微生物初级代谢物和次级代谢物的生物合成^[48-49]。其中,里氏木霉中, GNA1 和 GNA3 都是 $G\alpha$ 亚基,缺失 GNA1 和 GNA3,导致纤维素酶基因表达的丧失,此过程依赖光和纤维素的诱导^[50]。草酸青霉中缺失 $G\alpha$ 亚基 PGA3,增加纤维二糖水解酶基因 *cbh1* 的转录水平,但是不提高纤维二糖水解酶产量,可能是因为蛋白质合成和分泌过程在 $\Delta pga3$ 中受到抑制^[51]。

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)是真菌信号传导的关键组分,参与对各种压力的反应和发育过程,MAPK 通过在转录水平以及转录后水平,精确调节细胞的生理过程^[52],同时 MAPK 通路受到 MAPK 磷酸酶(MAPK phosphatase, MKP)的调节^[53]。Tmk1、Tmk2 和 Tmk3 都是 MAPK。里氏木霉中,*tmk1* 和 *tmk2* 的缺失导致关键纤维素酶和木聚糖酶基因的表达显著降低^[54]。Tmk3 参与高渗透压抗性、维持细胞壁完整性和纤维素酶的合成^[55]。

真菌基因表达在时间、空间和数量上受到顺式作用元件以及反式作用因子共同协调作

用,顺式作用元件主要指染色体上的 DNA 序列,包括启动子、增强子和沉默子;反式作用因子主要指各种能结合在顺式作用元件上的蛋白质分子^[56]。植物多糖降解酶基因表达受到反式作用因子调控。例如,已经报道的调控纤维素酶和木聚糖酶基因表达的转录因子,主要包括里氏木霉中 Xyr1^[57]、Ace1^[58]、Ace2^[59]、Ace3^[60]、Ace4^[61];粗糙脉孢菌和曲霉中 CLR-1/ClrA^[62]、CLR-2/ClrB/ManR^[63];粗糙脉孢菌中 CLR-3^[63]、CLR-4^[64]、XLR-1^[65-66]、VIB1^[67]、McmA^[68-69]。在调控淀粉酶基因表达的转录因子中,主要包括曲霉中 AmyR 和 MalR^[70]、MalP 和 MalT^[71],禾谷镰刀菌中 ART1^[72]、里氏木霉中 COL-26 同源物 BglR^[73]、粗糙脉孢菌 COL-26^[73]和黑曲霉中转录因子 PrtT^[74]。这些调控因子在转录水平单独或者协调控制植物多糖降解酶基因的表达。此外,植物多糖降解酶基因启动子区的染色质状态^[75]以及组蛋白修饰如乙酰化^[76]、甲基化^[77]和泛素化^[78]也会影响植物多糖降解酶基因的表达。

3 草酸青霉植物多糖降解酶基因表达的调控因子的鉴定

同其他丝状真菌一样,草酸青霉植物多糖降解酶基因的表达也受外界碳源诱导,且同时受内在转录因子或相关蛋白的调控(图 2)。山东大学曲音波团队以草酸青霉菌株 114-2 为出发菌株,构建了全基因组 470 个转录因子编码基因的突变株,通过高通量平板筛选,发现其中 20 个转录因子在纤维素酶合成中发挥作用,并进一步鉴定了其中 4 个关键转录因子 ClrB、CreA、XlnR 和 AmyR。其中,ClrB 正向调控纤维素酶的产生,CreA 和 AmyR 负向调控纤维素酶基因的表达。相比里氏木霉的 Xyr1,草酸青

霉菌同源蛋白 XlnR 主要调控木聚糖酶的合成,对纤维素酶的产生影响较小^[79]。最近报道,类同源结构域(homeodomain-like)转录因子 PoHtf1 与关键转录因子 CreA、AmyR、ClrB 和 XlnR 协同调控关键纤维素酶基因的表达^[80]。另外,草酸青霉 bZIP 转录因子 ClrC 正向调控多种应激反应、分生孢子的产生,以及纤维素酶基因的表达^[81]。草酸青霉 C2H2 型转录因子 PoF1bC 激活其无性发育,对纤维素酶基因表达也至关重要^[82]。

广西大学本研究团队通过对草酸青霉菌株 HP7-1 和高产酶突变株 EU2106 在含有不同碳源的固体培养基和液体培养基的培养条件下的转录组进行比较分析,筛选获得近 150 个调控植物多糖降解酶生物合成的候选转录因子基因。为了鉴定这些候选转录因子基因的功能,建立了草酸青霉高效遗传操作平台。

通过 Illumina 二代测序技术,获得了草酸青霉菌株 HP7-1 的基因组序列(基因组登录号: JRV000000000)^[19],注释出 9 834 个蛋白编码基因,包括 477 个编码碳水化合物活性酶(carbohydrate-active enzyme, CAZyme)基因以及 484 个推测转录因子编码基因。进一步利用第三代单分子实时测序技术(single-molecule

real-time sequencing),获得了染色体水平的基因组序列,包括 8 条染色体的序列,注释出 9 728 个蛋白编码基因,包括 712 个 CAZyme 基因以及 496 个 TF 编码基因。用高通量基因组捕获技术(high-through chromosome conformation capture, Hi-C)建立了菌株 HP7-1 的 3D 基因组(JRV000000000)^[83]。通过同源重组技术,敲除菌株 HP7-1 中参与非同源末端连接途径的基因 *PoxKu70*^[19],获得了具有高效基因敲除效率的突变菌株 $\Delta PoxKu70$ (表 1)。为了克服抗生素抗性标记物的有限可用性,在菌株 $\Delta PoxKu70$ 中,构建了 FLP/FRT 位点特异性重组系统^[23]。

利用以上构建的遗传操作平台,构建候选调控基因的缺失突变体,并测定其植物多糖降解酶产量,发现了 18 个调控植物多糖降解酶生物合成的新转录因子(表 2)。这些转录因子中,9 个含有锌指结构(7 个 Zn2Cys6; 1 个 C2H2 和 1 个 GATA)、2 个含有 bZIP 结构、2 个含有 Myb 结构、其余 5 个分别含有着丝粒蛋白 B (centromere protein B)、叉头框(forkhead)、螺旋-转角-螺旋(helix-turn-helix)、高迁移率族蛋白(high mobility group box)和类同源结构域。通过序列比对分析发现,该 18 个新转录因子不包括在曲音波团队所发现的转录因子列表中。根据

表 2 鉴定的草酸青霉 HP7-1 中调控植物多糖降解酶基因表达的蛋白质

Table 2 List of identified regulatory proteins regulating the expression of plant-polysaccharide-degrading enzyme genes in *P. oxalicum* HP7-1

Protein name	Gene ID	Conserved domains	Mode of regulation	Inducing carbon source	References
POX01118	<i>POX01118</i>	Zn2Cys6-type zinc finger	Positive regulation of cellulase and xylanase production	Avicel	[32]
PoxCxrA	<i>POX01167</i>	Zn2Cys6-type zinc finger; Fungal_Trans	Positive regulation of cellulase and xylanase production	Avicel	[33,84]
PoxCxrC	<i>POX01387</i>	Zn2Cys6-type zinc finger; Fungal_Trans	Negative regulation of cellulase and xylanase production, negative regulation of RSDE production	Avicel, wheat bran and avicel, wheat bran plus rice straw, soluble corn starch	[30]

(待续)

(续表 2)

POX01474	<i>POX01474</i>	Zn2Cys6-type zinc finger; Fungal_Trans	Positive regulation of cellulase and xylanase production	Avicel	[32]
POX01678	<i>POX01678</i>	SANT	Negative regulation of cellulase and xylanase production	Avicel	[32]
POX01907	<i>POX01907</i>	SANT/Myb	Positive regulation of RSDE production	Soluble corn starch	[85]
PoxClrB	<i>POX01960</i>	Zn2Cys6-type zinc finger; Fungal_Trans	Positive regulation of cellulase and xylanase production	Avicel	[19]
POX02484	<i>POX02484</i>	Zn2Cys6-type zinc finger; Fungal_Trans	Positive regulation of cellulase and xylanase production	Avicel	[19]
PoxAtf1	<i>POX03016</i>	Aft1_OSA; Aft1_HRA; Aft1_HRR Basic leucine zipper	Negative regulation of cellulase and xylanase production in solid state cultivation	Wheat bran plus rice straw	[29]
POX03446	<i>POX03446</i>	Zn2Cys6-type zinc finger; Fungal_Trans	Positive regulation of RSDE production	Soluble corn starch	[85]
PoxCxrB	<i>POX04420</i>	C2H2-type zinc finger	Positive regulation of cellulase and xylanase production	Avicel	[33]
POX06509	<i>POX06509</i>	Basic leucine zipper domain	Positive regulation of RSDE production	Soluble corn starch	[85]
PoxCbh	<i>POX06865</i>	CENPB-type HTH domain	Positive regulation of cellulase and xylanase production	Avicel	[86]
POX07078	<i>POX07078</i>	PHD	Positive regulation of RSDE production	Soluble corn starch	[85]
PoxMBF1	<i>POX08292</i>	MBF1	Negative regulation of cellulase and xylanase production in solid and liquid culture	Wheat bran plus rice straw	[34]
PoxNsdD	<i>POX08415</i>	GATA-type zinc finger	Positive regulation of cellulase and xylanase production, negative regulation of RSDE production	Avicel, soluble corn starch	[33,87]
POX08522	<i>POX08522</i>	Forkhead box	Positive regulation of cellulase and xylanase production	Avicel	[19]
POX09752	<i>POX09752</i>	Zn2Cys6-type zinc finger; Fungal_Trans	Positive regulation of RSDE production	Soluble corn starch	[85]
PoxMK1	<i>POX00158</i>	Serine/threonine protein kinase catalytic (S_tkc)	Positive regulation of cellulose, xylanase and RSDE production	Avicel, wheat bran plus rice straw, soluble corn starch	[88]
PoxHmbB	<i>POX04772</i>	HMG-box	Positive regulation of cellulase and xylanase production, negative regulation of RSDE production	Avicel, soluble corn starch	[89]
eEF1A	<i>POX06702</i>	Translational elongation factor	Positive regulation of cellulose, xylanase and RSDE production	Avicel, soluble corn starch	[24]
GNG-1	<i>POX07071</i>	G protein γ subunit domain (GGL)	Positive regulation of cellulose, xylanase and RSDE production	Avicel, soluble corn starch	[90]

缺失突变体的滤纸酶产量或生淀粉酶产量的变化程度,从18个中选择其中9个转录因子进行了深入研究。

转录因子 PoxCxrA (cellulolytic and xylanolytic regulator A in *P. oxalicum*; POX01167)全长 733 个氨基酸,包括 1 个类 Gal4 锌指结构 DNA 结合功能域和 1 个真菌特有的转录因子结构域 (fungal_TF_MHR)。在 avicel 诱导条件下,相比出发菌株 $\Delta PoxKu70$, 突变体 $\Delta PoxCxrA$ 纤维素酶和木聚糖酶产量显著下调 68.5%–99.0%。差异转录组和荧光定量 PCR 分析发现, *PoxCxrA* 动态调控关键纤维素酶和木聚糖酶基因如 *cbh1*、*egl*、*eg2*、*bgl1* 和 *xyn11A* 等, 纤维糊精转运蛋白基因 *cdtC* 和 *cdtD*, 以及调控基因如 *PoxClrB*、*PoxCxrB*、*PoxCxrC*、*PoxNsdD*、*PoxCbh* 等的表达^[33]。同时, *PoxCxrA* 的转录水平也受到调控基因 *PoxClrB*、*PoxCxrB* 和 *PoxNsdD* 的动态调控。*PoxCxrA* 可直接结合到上述基因的启动子区, 其中在 *cbh1* 和 *PoxClrB* 启动子区结合的核心 DNA 序列分别为 5'-ATCAGATCCTCAAAGA-3'和 5'-GCTGAGT CCTT-3'。*PoxCxrA* 中最短的 DNA 结合域为 *PoxCxrA*₁₇₋₅₈, 其中保守氨基酸 R18、R19、Q27、K30、K32 和 P38 为关键氨基酸。有意思的是, *PoxCxrA* 还能结合自己的启动子区进行自我调控^[84]。另外, *PoxCxrA* 的调控功能依赖于碳源, 如在 avicel 诱导条件下, 草酸青霉产纤维素酶和木聚糖酶依赖 *PoxCxrA* 的调控, 但是在麦麸存在的情况下, 检测不到 *PoxCxrA* 的调控功能, 推测可能是麦麸中葡萄糖抑制了 *PoxCxrA* 的表达。

以 *PoxCxrA* 为核心, 进一步研究了与其在转录水平具有调控关系的转录因子。其中, 转录因子 *PoxCxrB* (cellulolytic and xylanolytic regulator B in *P. oxalicum*; POX04420)含有 302 个

氨基酸, 包含 2 个 C2H2 锌指结构 DNA 结合功能域。*PoxCxrB* 的缺失, 导致草酸青霉关键纤维素酶、木聚糖酶和淀粉酶基因的转录水平显著下降, 从而引起酶产量的下降。*PoxCxrB* 也可以直接结合关键酶基因的启动子区。在 avicel 诱导条件下, *PoxCxrB* 不同程度地调控 *PoxCxrA*、*PoxClrB* 和 *PoxNsdD* 的表达^[33]。

PoxCxrA 直接动态调控 *PoxCxrC* 的表达。转录因子 *PoxCxrC* (cellulolytic and xylanolytic regulator C in *P. oxalicum*; POX01387)全长 924 个氨基酸, 包含 1 个类 Gal4 锌指结构 DNA 结合功能域和 1 个真菌特有的转录因子结构域。与出发菌株草酸青霉菌株 $\Delta PoxKu70$ 相比, 在含有不同碳源如 avicel、麦麸加稻秆、麦麸加 avicel、羧甲基纤维素、可溶性淀粉等培养基中培养, 突变株 $\Delta PoxCxrC$ 的纤维素酶、木聚糖酶和生淀粉酶产量显著上升 10.6%–119.6%。*PoxCxrC* 直接结合关键纤维素酶、木聚糖酶和生淀粉酶基因的启动子区, 从而调控酶基因的表达。*PoxCxrC* 结合在 *cbh1* 和 *egl* 启动子区的寡核苷酸序列分别为 5'-TGGGTTG-3' (-519 到-513)与 5'-TCCGTC3' (-660 到-655)。*PoxCxrC* 还调控已知调控基因 *PoxCxrB*、*PoxCreA*、*POX02484*、*PoxNsdD* 和 *PoxAmyR* 的表达。进一步研究发现, *PoxCxrC* 的 N 端 12–288 氨基酸 (*PoxCxrC*₁₂₋₂₈₈)以及包含的保守寡肽 LPSVRSLLTP (65–74)是维持 *PoxCxrC* 正常功能所必需的。*PoxCxrC* 的 N 端和 C 端区域, 以及 *PoxCxrC* 的磷酸化修饰, 都会影响 *PoxCxrC* 形成同源聚体^[30]。

进一步通过串联亲和纯化-质谱和 GST-pulldown 分析发现, *PoxCxrC* 与翻译延伸因子 eEF1A 相互作用。在草酸青霉菌株 $\Delta PoxKu70$, 过量表达 *eEF1A* 导致纤维素酶、木聚糖酶和生淀粉酶产量分别提高 31.03%–58.64%、

30.49%–40.61% 和 10.56%–104.48% , 表明 eEF1A 促进草酸青霉纤维素酶、木聚糖酶和生淀粉酶的产生^[24]。

转录因子 PoxNsdD (POX08415) 含 494 个氨基酸, 包含 1 个 GATA 锌指结构 DNA 结合域。PoxNsdD 与曲霉中产孢调控因子 NsdD 的一致性为 57%–64%。草酸青霉基因 *PoxNsdD* 的缺失, 导致其纤维素酶、木聚糖酶和生淀粉酶产量显著下降, 主要归因于 *PoxNsdD* 对关键酶基因如 *cbh1*、*egl1*、*egl2*、*bgl1*、*xyn11A*、*PoxGA15A* 和 *amy13A* 的动态直接调控^[33]。*PoxNsdD* 也参与草酸青霉分生孢子发育和色素的生物合成。值得关注的是, 在草酸青霉营养生长和产孢时期, *PoxNsdD* 正向调控植物多糖降解酶基因的表达, 但是在营养生长阶段, 抑制产孢相关基因的表达。在 avicel 诱导条件下, PoxNsdD 不同程度地调控 PoxCxrA 的表达^[87]。

转录因子 PoxCbh (POX06865) 全长 544 个氨基酸, 包含 1 个 CENPB-type HTH 结构域和 1 个 HTH_Psq 结构域, 与裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 中 CENP-B 同系物 Cbh 和人类 CENP 蛋白的一致性分别为 21% 和 23%。Li 等在草酸青霉菌株 $\Delta PoxKu70$ 中敲除 *PoxCbh* 基因, 在微晶纤维素为唯一碳源诱导条件下, 与出发菌株 $\Delta PoxKu70$ 相比, 突变株 $\Delta PoxCbh$ 的纤维素酶和木聚糖酶产量降低 28.4%–59.8%。PoxCbh 直接结合关键纤维素酶和木聚糖酶基因如 *cbh1*、*egl2* 和 *xyn11A* 等的启动子区, 从而调控其表达。进一步发现 PoxCbh 结合 *cbh1* 启动子区-249 到-228 位置。值得关注的是, PoxCbh 在 avicel 液体诱导条件下具有调控功能, 但在麦麸加稻秆固体培养条件下, 不影响酶的产生^[86]。

转录因子 PoxAtf1 (POX03016) 和 PoxMBF1 (POX08292) 是通过研究草酸青霉在固体培养条

件下转录组差异分析以及遗传学分析时鉴定的。PoxAtf1 全长 464 个氨基酸, 包含 1 个 Aft1 渗透压应激 (Aft1 osmotic stress response)、1 个 Aft1_HRA、1 个 Aft1_HRR 和 1 个 bZIP 结构域, 与裂殖酵母 Atf1 一致性为 44%。在草酸青霉出发菌株 $\Delta PoxKu70$ 中敲除 *PoxAtf1* 发现, 突变株 $\Delta PoxAtf1$ 在麦麸加稻秆诱导条件下的纤维素酶和木聚糖酶产量升高 46.1%–183.2%。*PoxAtf1* 在固体发酵条件下调控关键纤维素酶和木聚糖酶基因如 *cbh1*、*egl2*、*egl3*、*xyn11A* 的表达。体外凝胶迁移分析发现, PoxAtf1 也能结合这些关键酶基因的启动子区^[29]。同时缺失 *PoxAtf1* 和 *PoxCxrC*, 或 *PoxMBF1* 和 *PoxCxrC*, 分别获得双基因突变株 $\Delta PoxAtf1\Delta PoxMBF1$ 和 $\Delta PoxAtf1\Delta PoxCxrC$, 测定其纤维素酶和木聚糖酶产量, 发现 *PoxAtf1* 和 *PoxCxrC* 具有叠加效应; 而 *PoxMBF1* 和 *PoxCxrC* 无叠加效应。双基因突变株 $\Delta PoxAtf1\Delta PoxMBF1$ 与单基因突变体 $\Delta PoxAtf1$ 和 $\Delta PoxMBF1$ 的基因转录谱发生明显改变^[23]。

PoxMBF1 全长 154 个氨基酸, 包含 1 个螺旋-转角-螺旋 DNA 结合结构域和 1 个 MBF1 结构域, 与酿酒酵母 Mbf1p 一致性为 51%。在出发菌株 $\Delta PoxKu70$ 中敲除 *PoxMBF1* 基因, 发现突变体 $\Delta PoxMBF1$ 在含有麦麸加稻秆的固体和液体诱导条件下纤维素酶和木聚糖酶的产量增加 20.0%–131.4%。PoxMBF1 在固体和液体培养条件下调控关键纤维素酶和木聚糖酶基因的表达, 也参与菌株对环境的胁迫响应^[34]。

通过比较分析草酸青霉菌株 HP7-1 分别在葡萄糖和淀粉作为唯一碳源培养条件下的转录组, 筛选出 23 个调控生淀粉糖化酶基因表达的候选调控基因。其中, *POX01907* 的缺失突变体的生淀粉酶产量下降幅度最大, 达到 83.4%。*POX01907* 全长 1 794 个氨基酸, 包含 2 个 SANT

结构域。POX01907 调控关键淀粉酶基因如 *PoxGA15A*、*amy13A* 的表达，并结合其启动子区。然而，POX01907 不影响纤维素酶和木聚糖酶的产生^[85]。

另外，Xiong 等在草酸青霉 $\Delta PoxKu70$ 中敲除一个 HMG-box 蛋白编码基因 *PoxHmbB*，与出发菌株 $\Delta PoxKu70$ 相比，在 *avicel* 诱导条件下，突变株 $\Delta PoxHmbB$ 纤维素酶产量降低 34.7%–86.5%，木聚糖酶产量降低 60.3%；而在可溶性玉米淀粉诱导条件下，淀粉酶产量提升 1 倍，此外，*PoxHmbB* 还影响了草酸青霉菌株的分生孢子发育和菌丝体生长^[89]。

除了上面介绍的转录因子，最近还发现其他相关蛋白影响草酸青霉植物多糖降解酶的产生

(表2)。例如，Pang 等发现 G 蛋白 γ 亚基 GNG-1 (POX07071)正向调控草酸青霉纤维素酶、木聚糖酶和生淀粉酶产量。进一步研究表明 GNG-1 可能通过介导基因 *PoxCxrB* 的表达，继而调控纤维素酶、木聚糖酶和生淀粉糖化酶基因的表达^[90]。

Ma 等发现 MAPK PoxMK1(POX00158)正向调控草酸青霉纤维素酶、木聚糖酶和生淀粉酶的生物合成。PoxMK1 不但介导关键纤维素酶、木聚糖酶和生淀粉酶基因的表达，还调控关键调控基因如 *PoxClrB* 和 *PoxCxrB* 的转录水平^[88]。

以上研究表明，草酸青霉植物多糖降解酶的生物合成受到多个转录因子和相关蛋白的动态调控，且呈现出多样性、特异性和复杂性(图 3)，总结如下。

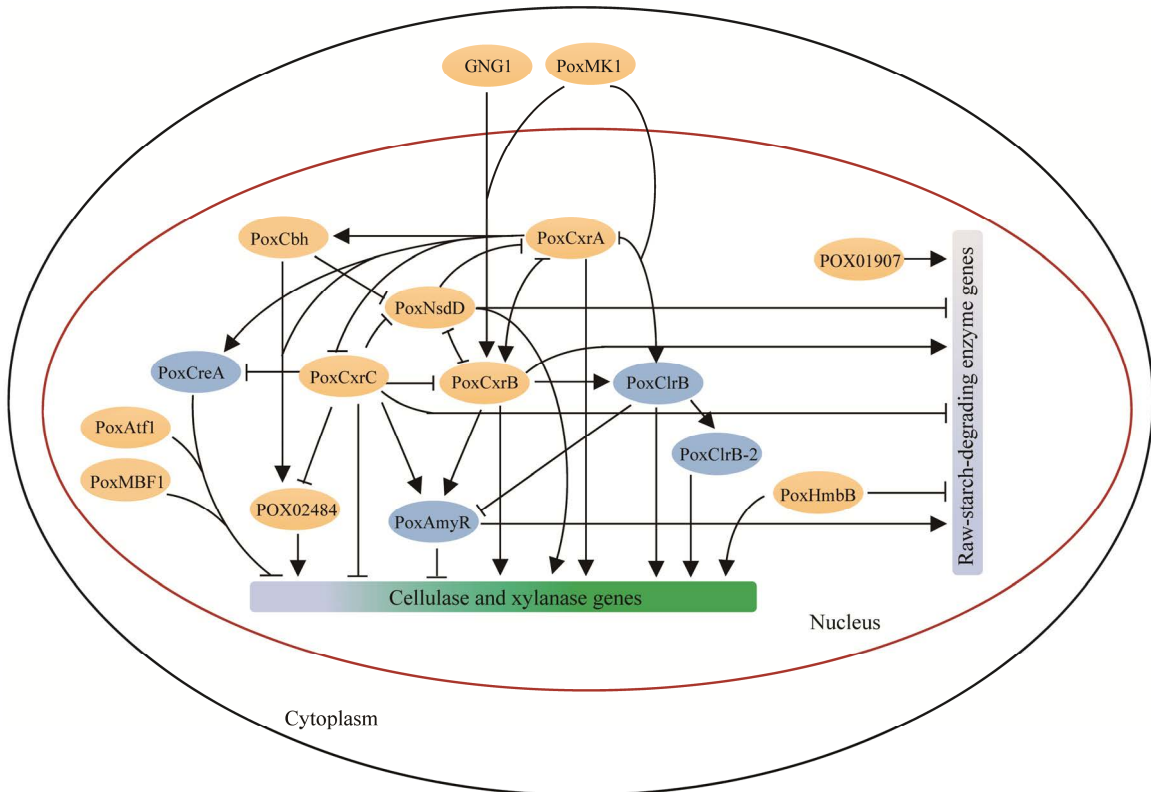


图 3 草酸青霉中植物多糖降解酶基因表达调控蛋白的调控网络

Figure 3 Regulatory network of regulatory proteins for regulating the expression of genes encoding plant-biomass-degrading enzymes in *P. oxalicum*. The regulation depends on the induction of extracellular carbon sources and induction duration.

(1) 不同种类植物多糖降解酶合成的共调控和特异性调控：如 *PoxCxrC* 负向调控纤维素酶、木聚糖酶和生淀粉酶的产量；*POX01907* 特异性正向调控生淀粉酶的产量，*PoxHMB1* 正向调控纤维素酶和木聚糖酶的产量，而负向调控生淀粉酶的产量。

(2) 不同培养方式的共调控和特异性调控：例如 *PoxMBF1* 既调控液体培养条件又调控固体培养条件下的草酸青霉纤维素酶和木聚糖酶基因的表达；*PoxCbh* 特异性调控液体培养条件下纤维素酶和木聚糖酶基因的表达。

(3) 外部碳源诱导的依赖性：如 *PoxCxrA* 在 *avicel* 诱导条件下具有调控作用，相反，在麦麸加 *avicel* 条件下无调控功能；*PoxCxrC* 在多种碳源如 *avicel*、羧甲基纤维素、麦麸加 *avicel*、麦麸加稻秆等诱导下都具有调控功能。

(4) 多转录因子相互促进、相互抑制共存：如诱导前期，*PoxCxrA* 促进 *PoxClrB* 基因的表达，但是在诱导后期，*PoxCxrA* 的表达受到 *PoxClrB* 的反馈抑制。

(5) 转录因子和蛋白相互作用：如 *PoxCxrC* 和 *eEF1A* 相互作用调控草酸青霉纤维素酶、木聚糖酶和生淀粉酶的合成。

4 结语与展望

植物多糖降解酶的开发与应用将有助于推动绿色生物制造的大规模生产与应用。目前，真菌植物多糖降解酶的产量低，致使生产成本居高不下。不同的植物多糖需要特异的植物多糖降解酶水解。本文针对以甘蔗渣和木薯生淀粉为生物炼制的原料，主要通过天然菌株的高通量筛选、物理化学诱变育种和分子育种 3 种途径，筛选和获得了一系列高产植物多糖降解酶的草酸青霉菌株，鉴定了调控草酸青霉植物多糖降解酶生物合成的 22 个新调控因子。

尽管目前在草酸青霉植物多糖降解酶合成机理、开发与利用方面都取得了一定的研究进展，但与实现其工业上大规模应用的目标还有一定的距离。因此，对未来研究工作，建议加强以下方面的研究。

(1) 目前能够用于合成生物学改造真菌菌株的有效靶标仍然十分有限，需要继续筛选和鉴定调控草酸青霉植物多糖降解酶合成的关键调控因子，包括转录因子和其他元件。

(2) 目前大部分工作只停留在酶产量和酶基因表达水平变化的层面上，需要深入解析关键转录因子或相关蛋白的分子调控机理，如转录过程、mRNA 稳定性及核质运输、蛋白互作等方面。

(3) 研究多转录因子及蛋白的互作机制，根据互作机制理性设计通过人工重塑调控网络提高酶产量的策略，并构建、获得酶产量提高的工程菌。

(4) 研究草酸青霉中碳流调控与植物多糖降解酶合成的关系。通过精细调控碳流量，如平衡细胞生长与酶合成碳流，降低胞内代谢干扰等，达到酶产量提高的目的。例如，可以从草酸青霉中草酸合成途径入手。截留草酸合成所用的碳流量，使其应用在植物多糖降解酶合成方面，从而提高酶产量。

参考文献

- [1] Ning P, Yang GF, Hu LH, Sun JX, Shi LN, Zhou YH, Wang ZB, Yang JM. Recent advances in the valorization of plant biomass. *Biotechnology for Biofuels*, 2021, 14(1): 102.
- [2] Waterschoot J, Gomand SV, Fierens E, Delcour JA. Production, structure, physicochemical and functional properties of maize, cassava, wheat, potato and rice starches. *Starch-Stärke*, 2015, 67(1/2): 14–29.
- [3] Liu YJ, Li B, Feng YG, Cui Q. Consolidated bio-saccharification: leading lignocellulose bioconversion into the real world. *Biotechnology Advances*, 2020, 40: 107535.

- [4] 曹升, 陈江枫, 黄富宇, 严华兵, 韦朝念, 李富山, 陆柳英, 覃夏燕, 陈会鲜, 李恒锐. 广西木薯产业现状分析及其发展建议. 南方农业学报, 2021, 52(6): 1468–1476.
Cao S, Chen JF, Huang FY, Yan HB, Wei CN, Li FS, Lu LY, Qin XY, Chen HX, Li HR. Development status and countermeasures of cassava industry in Guangxi. *Journal of Southern Agriculture*, 2021, 52(6): 1468–1476. (in Chinese)
- [5] Baral P, Kumar V, Agrawal D. Emerging trends in high-solids enzymatic saccharification of lignocellulosic feedstocks for developing an efficient and industrially deployable sugar platform. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2022, 42(6): 873–891.
- [6] Wang BT, Hu S, Yu XY, Jin L, Zhu YJ, Jin FJ. Studies of cellulose and starch utilization and the regulatory mechanisms of related enzymes in fungi. *Polymers*, 2020, 12(3): 530.
- [7] Gopinath SCB, Anbu P, Arshad MKM, Lakshmipriya T, Voon CH, Hashim U, Chinni SV. Biotechnological processes in microbial amylase production. *BioMed Research International*, 2017, 2017: 1272193.
- [8] Xu QS, Yan YS, Feng JX. Efficient hydrolysis of raw starch and ethanol fermentation: a novel raw starch-digesting glucoamylase from *Penicillium oxalicum*. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9: 216.
- [9] Vu VV, Hangasky JA, Detomasi TC, Henry SJW, Ngo ST, Span EA, Marletta MA. Substrate selectivity in starch polysaccharide monooxygenases. *Journal of Biological Chemistry*, 2019, 294(32): 12157–12166.
- [10] Haddad Momeni M, Leth ML, Sternberg C, Schoof E, Nielsen MW, Holck J, Workman CT, Hoof JB, Abou Hachem M. Loss of AA13 LPMOs impairs degradation of resistant starch and reduces the growth of *Aspergillus nidulans*. *Biotechnology for Biofuels*, 2020, 13: 135.
- [11] Görgens JF, Bressler DC, Van Rensburg E. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for direct conversion of raw, uncooked or granular starch to ethanol. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2015, 35(3): 369–391.
- [12] Li ZH, Liu GD, Qu YB. Improvement of cellulolytic enzyme production and performance by rational designing expression regulatory network and enzyme system composition. *Bioresource Technology*, 2017, 245: 1718–1726.
- [13] Sukumaran RK, Christopher M, Kooloth-Valappil P, Sreeja-Raju A, Mathew RM, Sankar M, Puthiyamadam A, Adarsh VP, Aswathi A, Rebinro V, Abraham A, Pandey A. Addressing challenges in production of cellulases for biomass hydrolysis: targeted interventions into the genetics of cellulase producing fungi. *Bioresource Technology*, 2021, 329: 124746.
- [14] Liu GD, Qu YB. Engineering of filamentous fungi for efficient conversion of lignocellulose: tools, recent advances and prospects. *Biotechnology Advances*, 2019, 37(4): 519–529.
- [15] Zhang Z, Liu JL, Lan JY, Duan CJ, Ma QS, Feng JX. Predominance of *Trichoderma* and *Penicillium* in cellulolytic aerobic filamentous fungi from subtropical and tropical forests in China, and their use in finding highly efficient β -glucosidase. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, 7: 107.
- [16] Jing L, Zhao S, Xue JL, Zhang Z, Yang Q, Xian L, Feng JX. Isolation and characterization of a novel *Penicillium oxalicum* strain Z1-3 with enhanced cellobiohydrolase production using cellulase-hydrolyzed sugarcane bagasse as carbon source. *Industrial Crops and Products*, 2015, 77: 666–675.
- [17] Li JX, Zhang F, Jiang DD, Li J, Wang FL, Zhang Z, Wang W, Zhao XQ. Diversity of cellulase-producing filamentous fungi from Tibet and transcriptomic analysis of a superior cellulase producer *Trichoderma harzianum* LZ117. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1617.
- [18] Lin HJ, Xian L, Zhang QJ, Luo XM, Xu QS, Yang Q, Duan CJ, Liu JL, Tang JL, Feng JX. Production of raw cassava starch-degrading enzyme by *Penicillium* and its use in conversion of raw cassava flour to ethanol. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2011, 38(6): 733–742.
- [19] Zhao S, Yan YS, He QP, Yang L, Yin X, Li CX, Mao LC, Liao LS, Huang JQ, Xie SB, Nong QD, Zhang Z, Jing L, Xiong YR, Duan CJ, Liu JL, Feng JX. Comparative genomic, transcriptomic and secretomic profiling of *Penicillium oxalicum* HP7-1 and its cellulase and xylanase hyper-producing mutant EU2106, and identification of two novel regulatory genes of cellulase and xylanase gene expression. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9: 203.
- [20] Liu GD, Zhang L, Qin YQ, Zou G, Li ZH, Yan X, Wei XM, Chen M, Chen L, Zheng K, Zhang J, Ma L, Li J, Liu R, Xu H, Bao XM, Fang X, Wang LS, Zhong YH, Liu WF, Zheng HJ, Wang SY, Wang CS, Xun LY, Zhao GP, Wang TH, Zhou ZH, Qu YB. Long-term strain improvements accumulate mutations in regulatory elements responsible for hyper-production of cellulolytic enzymes. *Scientific Reports*, 2013, 3: 1569.
- [21] Wang L, Zhao S, Chen XX, Deng QP, Li CX, Feng JX. Secretory overproduction of a raw starch-degrading glucoamylase in *Penicillium oxalicum* using strong

- promoter and signal peptide. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(21): 9291–9301.
- [22] Gu LS, Tan MZ, Li SH, Zhang T, Zhang QQ, Li CX, Luo XM, Feng JX, Zhao S. ARTP/EMS-combined multiple mutagenesis efficiently improved production of raw starch-degrading enzymes in *Penicillium oxalicum* and characterization of the enzyme-hyperproducing mutant. *Biotechnology for Biofuels*, 2020, 13(1): 187.
- [23] Lin YY, Zhao S, Lin X, Zhang T, Li CX, Luo XM, Feng JX. Improvement of cellulase and xylanase production in *Penicillium oxalicum* under solid-state fermentation by flippase recombination enzyme/recognition target-mediated genetic engineering of transcription repressors. *Bioresource Technology*, 2021, 337: 125366.
- [24] Zhao S, Mai RM, Zhang T, Feng XZ, Li WT, Wang WX, Luo XM, Feng JX. Simultaneous manipulation of transcriptional regulator CxrC and translational elongation factor eEF1A enhances the production of plant-biomass-degrading enzymes of *Penicillium oxalicum*. *Bioresource Technology*, 2022, 351: 127058.
- [25] Yao GS, Wu RM, Kan QB, Gao LW, Liu M, Yang P, Du J, Li ZH, Qu YB. Production of a high-efficiency cellulase complex via β -glucosidase engineering in *Penicillium oxalicum*. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9: 78.
- [26] Yao GS, Li ZH, Gao LW, Wu RM, Kan QB, Liu GD, Qu YB. Redesigning the regulatory pathway to enhance cellulase production in *Penicillium oxalicum*. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, 8: 71.
- [27] Xue JL, Zhao S, Liang RM, Yin X, Jiang SX, Su LH, Yang Q, Duan CJ, Liu JL, Feng JX. A biotechnological process efficiently co-produces two high value-added products, glucose and xylooligosaccharides, from sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, 2016, 204: 130–138.
- [28] Bott R, Saldajeno M, Cuevas W, Ward D, Scheffers M, Ahle W, Karkehabadi S, Sandgren M, Hansson H. Three-dimensional structure of an intact glycoside hydrolase family 15 glucoamylase from *Hypocrea jecorina*. *Biochemistry*, 2008, 47(21): 5746–5754.
- [29] Zhao S, Liao XZ, Wang JX, Ning YN, Li CX, Liao LS, Liu Q, Jiang Q, Gu LS, Fu LH, Yan YS, Xiong YR, He QP, Su LH, Duan CJ, Luo XM, Feng JX. Transcription factor AtfI regulates expression of cellulase and xylanase genes during solid-state fermentation of ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(24): e01226-19.
- [30] Zhang T, Mai RM, Fang QQ, Ou JF, Mo LX, Tian D, Li CX, Gu LS, Luo XM, Feng JX, Zhao S. Regulatory function of the novel transcription factor CxrC in *Penicillium oxalicum*. *Molecular Microbiology*, 2021, 116(6): 1512–1532.
- [31] Zhang T, Liao LS, Li CX, Liao GY, Lin X, Luo XM, Zhao S, Feng JX. Identification of a novel transcription factor TP05746 involved in regulating the production of plant-biomass-degrading enzymes in *Talaromyces pinophilus*. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2875.
- [32] Li CX, Zhao S, Luo XM, Feng JX. Weighted gene co-expression network analysis identifies critical genes for the production of cellulase and xylanase in *Penicillium oxalicum*. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 520.
- [33] Yan YS, Zhao S, Liao LS, He QP, Xiong YR, Wang L, Li CX, Feng JX. Transcriptomic profiling and genetic analyses reveal novel key regulators of cellulase and xylanase gene expression in *Penicillium oxalicum*. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10: 279.
- [34] Zhao S, Liu Q, Wang JX, Liao XZ, Guo H, Li CX, Zhang FF, Liao LS, Luo XM, Feng JX. Differential transcriptomic profiling of filamentous fungus during solid-state and submerged fermentation and identification of an essential regulatory gene *PoxMBF1* that directly regulated cellulase and xylanase gene expression. *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 12: 103.
- [35] Li BQ, Chen Y, Tian SP. Function of pH-dependent transcription factor PacC in regulating development, pathogenicity, and mycotoxin biosynthesis of phytopathogenic fungi. *The FEBS Journal*, 2022, 289(7): 1723–1730.
- [36] Yu ZZ, Fischer R. Light sensing and responses in fungi. *Nature Reviews Microbiology*, 2019, 17(1): 25–36.
- [37] Borin GP, Sanchez CC, De Souza AP, De Santana ES, De Souza AT, Paes Leme AF, Squina FM, Buckridge M, Goldman GH, Oliveira JV. Comparative secretome analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* during growth on sugarcane biomass. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0129275.
- [38] De Assis LJ, Silva LP, Bayram O, Dowling P, Kniemeyer O, Krüger T, Brakhage AA, Chen YY, Dong LG, Tan K, Wong KH, Ries LNA, Goldman GH. Carbon catabolite repression in filamentous fungi is regulated by phosphorylation of the transcription factor CreA. *mBio*, 2021, 12(1): e03146-20.
- [39] Adnan M, Zheng WH, Islam W, Arif M, Abubakar YS, Wang ZH, Lu GD. Carbon catabolite repression in filamentous fungi. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 19(1): 48.
- [40] Ribeiro LFC, Chelius C, Boppidi KR, Naik NS,

- Hossain S, Ramsey JJJ, Kumar J, Ribeiro LF, Ostermeier M, Tran B, Ah Goo Y, De Assis LJ, Ulas M, Bayram O, Goldman GH, Lincoln S, Srivastava R, Harris SD, Marten MR. Comprehensive analysis of *Aspergillus nidulans* PKA phosphorylome identifies a novel mode of CreA regulation. *mBio*, 2019, 10(2): e02825-18.
- [41] Ries LNA, Beattie SR, Espeso EA, Cramer RA, Goldman GH. Diverse regulation of the CreA carbon catabolite repressor in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 2016, 203(1): 335–352.
- [42] Chen YY, Dong LG, Alam MA, Pardeshi L, Miao ZQ, Wang F, Tan K, Hynes MJ, Kelly JM, Wong KH. Carbon catabolite repression governs diverse physiological processes and development in *Aspergillus nidulans*. *mBio*, 2022, 13(1): e0373421.
- [43] Han LJ, Liu KM, Ma W, Jiang Y, Hou SL, Tan YS, Yuan QQ, Niu KL, Fang X. Redesigning transcription factor Cre1 for alleviating carbon catabolite repression in *Trichoderma reesei*. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2020, 5(3): 230–235.
- [44] Nogueira KMV, Costa MDN, De Paula RG, Mendonça-Natividade FC, Ricci-Azevedo R, Silva RN. Evidence of cAMP involvement in cellobiohydrolase expression and secretion by *Trichoderma reesei* in presence of the inducer sophorose. *BMC Microbiology*, 2015, 15: 195.
- [45] Chen YM, Fan XJ, Zhao XQ, Shen YL, Xu XY, Wei LJ, Wang W, Wei DZ. cAMP activates calcium signalling via phospholipase C to regulate cellulase production in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Biotechnology for Biofuels*, 2021, 14(1): 62.
- [46] Chen YM, Shen YL, Wang W, Wei DZ. Mn²⁺ modulates the expression of cellulase genes in *Trichoderma reesei* Rut-C30 via calcium signaling. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11: 54.
- [47] Chen L, Zou G, Wang JZ, Wang J, Liu R, Jiang YP, Zhao GP, Zhou ZH. Characterization of the Ca(2+)-responsive signaling pathway in regulating the expression and secretion of cellulases in *Trichoderma reesei* Rut-C30. *Molecular Microbiology*, 2016, 100(3): 560–575.
- [48] Martín JF, Van Den Berg MA, Van Themaat EVL, Liras P. Sensing and transduction of nutritional and chemical signals in filamentous fungi: impact on cell development and secondary metabolites biosynthesis. *Biotechnology Advances*, 2019, 37(6): 107392.
- [49] Tuteja N. Signaling through G protein coupled receptors. *Plant Signaling & Behavior*, 2009, 4(10): 942–947.
- [50] Schmoll M. Regulation of plant cell wall degradation by light in *Trichoderma*. *Fungal Biology and Biotechnology*, 2018, 5: 10.
- [51] Hu YB, Liu GD, Li ZH, Qin YQ, Qu YB, Song X. G protein-cAMP signaling pathway mediated by PGA3 plays different roles in regulating the expressions of amylases and cellulases in *Penicillium decumbens*. *Fungal Genetics and Biology*, 2013, 58/59: 62–70.
- [52] González-Rubio G, Fernández-Acero T, Martín H, Molina M. Mitogen-activated protein kinase phosphatases (MKPs) in fungal signaling: conservation, function, and regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(7): 1709.
- [53] Caunt CJ, Keyse SM. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs). *The FEBS Journal*, 2013, 280(2): 489–504.
- [54] De Paula RG, Antoniêto ACC, Carraro CB, Lopes DCB, Persinoti GF, Peres NTA, Martinez-Rossi NM, Silva-Rocha R, Silva RN. The duality of the MAPK signaling pathway in the control of metabolic processes and cellulase production in *Trichoderma reesei*. *Scientific Reports*, 2018, 8: 14931.
- [55] 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.
- [56] Agelopoulos M, Foutadakis S, Thanos D. The causes and consequences of spatial organization of the genome in regulation of gene expression. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 682397.
- [57] Lichius A, Bidard F, Buchholz F, Le Crom S, Martin J, Schackwitz W, Austerlitz T, Grigoriev IV, Baker SE, Margeot A, Seiboth B, Kubicek CP. Genome sequencing of the *Trichoderma reesei* QM9136 mutant identifies a truncation of the transcriptional regulator XYR1 as the cause for its cellulase-negative phenotype. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 326.
- [58] Ling M, Qin YL, Li N, Liang ZQ. Binding of two transcriptional factors, Xyr1 and ACE1, in the promoter region of cellulase *cbh1* gene. *Biotechnology Letters*, 2009, 31(2): 227–231.
- [59] Li YY, Xue Y, Liu J, Gan LH, Long MN. Effects of the transcription factor Ace2 from *Trichoderma reesei* on cellulase and hemicellulase expression in *Trichoderma orientalis* EU7-22. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2021, 193(7): 2098–2109.
- [60] Zhang JJ, Chen YM, Wu C, Liu P, Wang W, Wei DZ. The transcription factor ACE3 controls cellulase

- activities and lactose metabolism via two additional regulators in the fungus *Trichoderma reesei*. *Journal of Biological Chemistry*, 2019, 294(48): 18435–18450.
- [61] Chen YM, Lin AB, Liu P, Fan XJ, Wu C, Li N, Wei LJ, Wang W, Wei DZ. *Trichoderma reesei* ACE4, a novel transcriptional activator involved in the regulation of cellulase genes during growth on cellulose. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87(15): e0059321.
- [62] Coradetti ST, Xiong Y, Glass NL. Analysis of a conserved cellulase transcriptional regulator reveals inducer-independent production of cellulolytic enzymes in *Neurospora crassa*. *Microbiology Open*, 2013, 2(4): 595–609.
- [63] Huberman LB, Coradetti ST, Glass NL. Network of nutrient-sensing pathways and a conserved kinase cascade integrate osmolarity and carbon sensing in *Neurospora crassa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(41): E8665–E8674.
- [64] Liu Q, Li JG, Gao RR, Li JY, Ma GL, Tian CG. CLR-4, a novel conserved transcription factor for cellulase gene expression in ascomycete fungi. *Molecular Microbiology*, 2019, 111(2): 373–394.
- [65] Sun JP, Tian CG, Diamond S, Glass NL. Deciphering transcriptional regulatory mechanisms associated with hemicellulose degradation in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*, 2012, 11(4): 482–493.
- [66] Xia CQ, Li ZH, Xu YN, Yang P, Gao LW, Yan Q, Li SY, Wang YN, Qu YB, Song X. Introduction of heterologous transcription factors and their target genes into *Penicillium oxalicum* leads to increased lignocellulolytic enzyme production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(6): 2675–2687.
- [67] Wu VW, Thieme N, Huberman LB, Dietschmann A, Kowbel DJ, Lee JN, Calhoun S, Singan VR, Lipzen A, Xiong Y, Monti R, Blow MJ, O'Malley RC, Grigoriev IV, Benz JP, Glass NL. The regulatory and transcriptional landscape associated with carbon utilization in a filamentous fungus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(11): 6003–6013.
- [68] Tani SJ, Kawaguchi T, Kobayashi T. Complex regulation of hydrolytic enzyme genes for cellulosic biomass degradation in filamentous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(11): 4829–4837.
- [69] Kunitake E, Kobayashi T. Conservation and diversity of the regulators of cellulolytic enzyme genes in *Ascomycete* fungi. *Current Genetics*, 2017, 63(6): 951–958.
- [70] Suzuki K, Tanaka M, Konno Y, Ichikawa T, Ichinose S, Hasegawa-Shiro S, Shintani T, Gomi K. Distinct mechanism of activation of two transcription factors, AmyR and MalR, involved in amylolytic enzyme production in *Aspergillus oryzae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(4): 1805–1815.
- [71] Hasegawa S, Takizawa M, Suyama H, Shintani T, Gomi K. Characterization and expression analysis of a maltose-utilizing (MAL) cluster in *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genetics and Biology*, 2010, 47(1): 1–9.
- [72] Oh M, Son H, Choi GJ, Lee CH, Kim JC, Kim H, Lee YW. Transcription factor ART1 mediates starch hydrolysis and mycotoxin production in *Fusarium graminearum* and *F. verticillioides*. *Molecular Plant Pathology*, 2016, 17(5): 755–768.
- [73] Xiong Y, Wu VW, Lubbe A, Qin LN, Deng SW, Kennedy M, Bauer D, Singan VR, Barry K, Northen TR, Grigoriev IV, Glass NL. A fungal transcription factor essential for starch degradation affects integration of carbon and nitrogen metabolism. *PLoS Genetics*, 2017, 13(5): e1006737.
- [74] Chen L, Zou G, Zhang L, De Vries RP, Yan X, Zhang J, Liu R, Wang CS, Qu YB, Zhou ZH. The distinctive regulatory roles of PrtT in the cell metabolism of *Penicillium oxalicum*. *Fungal Genetics and Biology*, 2014, 63: 42–54.
- [75] Mello-de-Sousa TM, Rassinger A, Derntl C, Poças-Fonseca MJ, Mach RL, Mach-Aigner AR. The relation between promoter chromatin status, Xyr1 and cellulase ex-pression in *Trichoderma reesei*. *Current Genomics*, 2016, 17(2): 145–152.
- [76] Xin Q, Gong YJ, Lv XX, Chen GJ, Liu WF. *Trichoderma reesei* histone acetyltransferase Gcn5 regulates fungal growth, conidiation, and cellulase gene expression. *Current Microbiology*, 2013, 67(5): 580–589.
- [77] Li YN, Hu YY, Zhu Z, Zhao KL, Liu GD, Wang LS, Qu YB, Zhao J, Qin YQ. Normal transcription of cellulolytic enzyme genes relies on the balance between the methylation of H3K36 and H3K4 in *Penicillium oxalicum*. *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 12: 198.
- [78] Alam MA, Kamlangdee N, Kelly JM. The CreB deubiquitinating enzyme does not directly target the CreA repressor protein in *Aspergillus nidulans*. *Current Genetics*, 2016: 2016 Sep 2.
- [79] Li ZH, Yao GS, Wu RM, Gao LW, Kan QB, Liu M,

- Yang P, Liu GD, Qin YQ, Song X, Zhong YH, Fang X, Qu YB. Synergistic and dose-controlled regulation of cellulase gene expression in *Penicillium oxalicum*. *PLoS Genetics*, 2015, 11(9): e1005509.
- [80] Guo H, Xu G, Wu RM, Li ZG, Yan MD, Jia ZL, Li ZH, Chen M, Bao XM, Qu YB. A homeodomain-containing transcriptional factor Po Htf1 regulated the development and cellulase expression in *Penicillium oxalicum*. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 671089.
- [81] Lei YF, Liu GD, Yao GS, Li ZH, Qin YQ, Qu YB. A novel bZIP transcription factor CtrC positively regulates multiple stress responses, conidiation and cellulase expression in *Penicillium oxalicum*. *Research in Microbiology*, 2016, 167(5): 424–435.
- [82] Yao GS, Li ZH, Wu RM, Qin YQ, Liu GD, Qu YB. *Penicillium oxalicum* PoFlbC regulates fungal asexual development and is important for cellulase gene expression. *Fungal Genetics and Biology*, 2016, 86: 91–102.
- [83] Li CX, Liu L, Zhang T, Luo XM, Feng JX, Zhao S. Three-dimensional genome map of the filamentous fungus *Penicillium oxalicum*. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(3): e0212121.
- [84] Liao LS, Li CX, Zhang FF, Yan YS, Luo XM, Zhao S, Feng JX. How an essential Zn2Cys6 transcription factor PoxCxrA regulates cellulase gene expression in *Ascomycete* fungi? *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 12: 105.
- [85] Zhang MY, Zhao S, Ning YN, Fu LH, Li CX, Wang Q, You R, Wang CY, Xu HN, Luo XM, Feng JX. Identification of an essential regulator controlling the production of raw-starch-digesting glucoamylase in *Penicillium oxalicum*. *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 12: 7.
- [86] Li CX, Liao LS, Wan XD, Zhang FF, Zhang T, Luo XM, Zhao S, Feng JX. PoxCbh, a novel CENPB-type HTH domain protein, regulates cellulase and xylanase gene expression in *Penicillium oxalicum*. *Molecular Microbiology*, 2021, 116(1): 140–153.
- [87] He QP, Zhao S, Wang JX, Li CX, Yan YS, Wang L, Liao LS, Feng JX. Transcription factor NsdD regulates the expression of genes involved in plant biomass-degrading enzymes, conidiation, and pigment biosynthesis in *Penicillium oxalicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(18): e01039-18.
- [88] Ma B, Ning YN, Li CX, Tian D, Guo H, Pang XM, Luo XM, Zhao S, Feng JX. A mitogen-activated protein kinase PoxMK1 mediates regulation of the production of plant-biomass-degrading enzymes, vegetative growth, and pigment biosynthesis in *Penicillium oxalicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(2): 661–678.
- [89] Xiong YR, Zhao S, Fu LH, Liao XZ, Li CX, Yan YS, Liao LS, Feng JX. Characterization of novel roles of a HMG-box protein PoxHmbB in biomass-degrading enzyme production by *Penicillium oxalicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(8): 3739–3753.
- [90] Pang XM, Tian D, Zhang T, Liao LS, Li CX, Luo XM, Feng JX, Zhao S. G protein γ subunit modulates expression of plant-biomass-degrading enzyme genes and mycelial-development-related genes in *Penicillium oxalicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(11): 4675–4691.

冯家勋, 博士, 广西大学生命科学与技术学院教授, 博士生导师。研究方向为产植物多糖降解酶的真菌功能基因组学及酶基因的表达调控。入选教育部新世纪优秀人才、广西首批“八桂学者”, 第六届中国青年科技奖获得者。主持和完成“863 计划”课题、国家自然科学基金课题等 12 项, 在 *Genome Research*、*Molecular Microbiology*、*Applied and Environmental Microbiology*、*Bioresource Technology* 等期刊上发表 SCI 论文 100 篇, 获授权中国发明专利 20 件。



赵帅, 博士, 广西大学生命科学与技术学院副教授, 博士生导师。研究方向为产植物多糖降解酶的真菌功能基因组学及酶基因的表达调控。主持和完成国家自然科学基金课题等 3 项, 发表 SCI 论文 40 篇。

