

网络优先数字出版时间:2015-05-25

网络优先数字出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/45.1075.N.20150525.1700.011.html>

瑞氏木霉纤维素酶研究进展*

Research Progress on Cellulase from *Trichoderma reesei*

陈小玲,龙思宇,陈 英,张穗生,陈 东**

CHEN Xiao-ling, LONG Si-yu, CHEN Ying, ZHANG Sui-sheng, CHEN Dong

(广西科学院,非粮生物质酶解国家重点实验室,国家非粮生物质能源工程技术研究中心,广西生物质产业化工程院,广西生物炼制重点实验室,广西南宁 530007)

(Guangxi Academy of Sciences, State Key Laboratory of Non-food Biomass and Enzyme Technology, National Engineering Research Center for Non-food Biorefinery, Guangxi Biomass Industrialization Engineering Institute, Guangxi Key Laboratory of Biorefinery, Nanning, Guangxi, 530007, China)

摘要:瑞氏木霉(*Trichoderma reesei*)产生的纤维素酶系全、能分泌到细胞外,是研究得最清楚的产纤维素酶的模式菌株,但是其产生的纤维素酶还不能满足工业化转化纤维素的需要。本文从纤维素酶种类与调控、提高纤维素酶活的方法、标记基因的选择等方面概述瑞氏木霉纤维素酶,分析瑞氏木霉纤维素酶研究面临的问题及对策,指出提高 β -葡萄糖苷酶的产量和酶活是未来研究工作的重点之一。

关键词:纤维素酶 瑞氏木霉 酶活 改造 标记基因

中图分类号:Q933 文献标识码:A 文章编号:1002-7378(2015)02-0113-08

Abstract: *Trichoderma reesei* are well known for efficient production of cellulases and enormous protein secretory capacity, but its cellulases can not meet the requirement of industrialization. Cellulolytic enzyme systems from *T. reesei* contain exoglucanases, endoglucanases and β -glucosidase, which are regulated by carbon source and controlling genes. Various methods have been used to increase the production and activity of cellulases, including mutagenesis and genetic engineering technology. Various marker genes have been used in *T. reesei*, including auxotroph and drug resistance marker. Cellulosic bioconversion requires the synergistic action of the three enzymatic components, among which β -glucosidases is the speed limiting component.

Key words: cellulose, *Trichoderma reesei*, enzyme activity, modification, marker gene

0 引言

纤维素是植物中含量最丰富的组分,占植物干重的35%~50%^[1]。在石油资源日趋枯竭的严峻形势下,利用纤维素生产燃料乙醇已成为解决能源危机的有效途径之一^[2],是世界各国能源战略的重点^[3~5]。但是将纤维素水解为可发酵糖的成本很高,这成为商业化生产纤维素乙醇的主要障碍^[6]。

收稿日期:2014-04-10

作者简介:陈小玲(1982-),女,工程师,主要从事微生物学研究。

* 广西自然科学基金项目(2014GXNSFAA118103)资助。

** 通讯作者:陈 东(1962-),男,研究员,主要从事微生物技术与生物质能源研究。

纤维素的高效、低成本、规模化降解,是利用纤维素商业化生产燃料乙醇的关键。用物理化学法降解纤维素存在诸多难题,如设备昂贵、反应条件剧烈、后期处理困难、环境污染严重等。用酶法降解纤维素所需的反应条件比较温和,是水解纤维素的首选方法。纤维素酶的生产菌株种类繁多,其中瑞氏木霉(*Trichoderma reesei*)产生的纤维素酶系全、产量高,并能分泌到细胞外。瑞氏木霉是研究得最清楚的产纤维素酶的模式菌株,也是一种重要的工业菌株,但是其产生的纤维素酶还不能满足工业化转化纤维素的需要。因此有必要解析瑞氏木霉纤维素酶的研究进展,为设计相关策略以提高瑞氏木霉纤维素酶的产量和酶活提供参考。

1 瑞氏木霉纤维素酶

纤维素酶是一类能够降解纤维素生成葡萄糖的酶的总称,完整的纤维素酶系由内切葡聚糖酶(EG)、外切葡聚糖酶(CBH)及 β -葡萄糖苷酶(BG)组成,它们可以相互协同催化水解纤维素生成葡萄糖。其中:内切葡聚糖酶在纤维素长链内部随机切割,能迅速降低纤维素结构的完整性,同时又能水解产生一定量的纤维二糖和葡萄糖,是纤维素酶系的重要组成部分^[7,8],能水解纤维素衍生物和部分降解纤维素,但不能单独作用于结晶纤维素;外切葡聚糖酶从纤维素线性分子的末端水解糖苷键,每次切下1个纤维二糖分子,因此外切葡聚糖酶也称为纤维二糖水解酶^[9],其单独作用于天然结晶纤维素时酶活力较低,但能与内切葡聚糖酶共同作用彻底水解结晶纤维素^[10]; β -葡萄糖苷酶将纤维二糖最终水解为葡萄糖分子,对纤维二糖和纤维三糖的水解很快,其速度随葡萄糖聚合度的增加而下降,该酶的专一性较差,可以作用于所有的葡萄糖 β -二聚物,包括水杨苷、对硝基苯葡萄糖苷等葡萄糖的芳香基衍生物^[11]。

1.1 瑞氏木霉纤维素酶种类及调控

1.1.1 瑞氏木霉纤维素酶种类

瑞氏木霉的基因组已经完成测序,其大小为33.9 Mb,含有9129个基因^[6]。瑞氏木霉产生的内切葡聚糖酶和外切葡聚糖酶共有10种,其中:CBH1、CBH2、EG1、EG3和EG5各1种,EG2 2种,EG4 3种。在糖苷水解酶类(glycoside hydrolases, GHs)家族中,CBH1和EG1属于糖苷水解酶第7家族(GH7),CBH2属于GH6,EG2属于GH5,EG3属于GH12^[6]。瑞氏木霉产生的 β -葡萄糖苷酶

有7种,即Bgl2(Cel1a)、Cel1b、Bgl1(Cel3a)、Cel3b、Cel3c、Cel3d、Cel3e,其中,Bgl2(Cel1a)和Cel1b属于GH1,另外5种 β -葡萄糖苷酶属于GH3^[12]。Bgl1(Cel3a)能分泌到细胞外,在瑞氏木霉体内的功能涉及到诱导物的形成,可以高效诱导纤维素酶基因表达;Cel1a和Cel1b是胞内 β -葡萄糖苷酶,它们在菌株体外有转糖基作用,涉及到不溶性纤维素对纤维素酶基因的快速诱导^[13]。

1.1.2 瑞氏木霉纤维素酶基因表达的调控

瑞氏木霉的纤维素酶基因表达受各种碳源调节:纤维素、槐糖、乳糖诱导纤维素酶基因表达,纤维二糖、葡萄糖抑制纤维素酶基因表达。值得关注的是槐糖,它不仅强烈诱导 $cbh1$ 和 $cbh2$ 表达,还可以诱导 $egl1$ 、 $egl2$ 及 $egl5$ 表达;当培养基中存在甘油或山梨醇时,槐糖仍可以诱导纤维素酶基因表达,但如果培养基中含有高浓度葡萄糖时,则槐糖对纤维素酶基因没有诱导作用^[14,15]。

纤维素酶基因的表达还受调控基因调节,如碳源阻遏相关基因 $cre1$ ^[16],下调基因 $acel$ ^[17],上调基因 $ace2$ ^[18]及编码正调节蛋白的 $xyr1$ 基因^[19]等等。瑞氏木霉碳源阻遏相关基因 $cre1$ 与斜卧青霉(*Penicillium decumbens*) $creA$ 基因功能类似, $cre1$ 突变会引起瑞氏木霉生长形态改变并提高瑞氏木霉纤维素酶的活力^[20,21]。瑞氏木霉的另一个碳源阻遏相关基因是 $cre2$,与构巢曲霉菌(*Aspergillus nidulans*) $creB$ 基因同源,它不仅与碳源阻遏相关,还与纤维素酶基因的表达相关,敲除该基因可以提高纤维素酶活力^[22]。

另外,纤维素酶基因的表达还受启动子和转录因子的调控。启动子是基因的组成部分,它通过与转录因子的结合来控制基因表达的起始和基因表达的程度。真核生物启动子中最普遍存在的序列之一是CCAAT盒,瑞氏木霉的CCAAT盒位于 $cbh1$ 基因启动子约-700的位置^[23],它与转录激活因子ACE II的结合位点位于启动子-620~-820的区域。ACE II在 $cbh1$ 基因启动子的结合位点是GGCTAATAA,它能诱导瑞氏木霉纤维素酶基因 $cbh1$ 、 $cbh2$ 、 $egl1$ 、 $egl2$ 及木聚糖酶基因 $xyn2$ 的表达^[18]。在 $cbh1$ 启动子-677~-742区域上存在3个碳源代谢阻遏蛋白CRE1结合位点^[24,25],CRE1的存在能使 $cbh1$ 启动子的强度下降。删除 $cbh1$ 启动子-677~-742区域可以消除碳源阻遏作用,提高外源基因的表达。

1.2 提高瑞氏木霉纤维素酶活的方法

为改善瑞氏木霉纤维素酶的性能(如提高纤维素酶活力和产量),研究人员尝试了诸如诱变、分子改造及优化培养基成分等不同方法,并取得了一定的研究成果。其中,最常用的方法是分子改造,包括使用强启动子表达纤维素酶基因、定点突变和随机突变等。

1.2.1 诱变

诱变是比较传统的实验方法,分为物理诱变和化学诱变。为获得理想的突变菌株,多使用化学诱变法。化学诱变法是使用化学诱变剂对样品进行诱变处理,如用亚硝基胍(NTG)、乙基甲磺酸(EMS)、亚硝酸(HNO_2)等来处理瑞氏木霉的孢子^[26]。Toyama等^[27]发现用秋水仙碱和苯菌灵处理瑞氏木霉,可以使其产生高频率的遗传重组。

1.2.2 使用强启动子

在强启动子控制下表达纤维素酶相关基因,可以提高纤维素酶活或产量。这些强启动子包括 *cbh1* 启动子和 *pdc* 启动子。*cbh1* 启动子被认为是瑞氏木霉中最强的启动子。在对瑞氏木霉的遗传改造中,常利用 *cbh1* 的启动子和终止子序列构建载体,并利用 *cbh1* 的前导肽序列引导重组蛋白进行分泌性表达。Fang等^[28]用 *cbh1* 启动子过表达 *cbh2* 基因,通过农杆菌(*Agrobacterium*)将含 *cbh2* 基因的强表达盒转入瑞氏木霉,使菌株的滤纸酶活和纤维二糖水解酶活分别提高4倍和5倍。*pdc* 启动子被认为是瑞氏木霉的强组成型启动子。Wang等^[19]在瑞氏木霉 *pdc* 启动子的控制下表达 *xyl1* 基因,可以明显提高瑞氏木霉 RUT C-30 的纤维素酶活性。

1.2.3 定点突变和随机突变

定点突变是指通过聚合酶链式反应(PCR)向目的DNA片段中引入所需变化,包括碱基的添加、删除、点突变等。定点突变能迅速、高效地提高瑞氏木霉的纤维素酶的性能。使用该方法时,必须先了解某些DNA片段或碱基对瑞氏木霉纤维素酶的影响,然后有针对性地改造目的基因。例如,Zou等^[29]推测瑞氏木霉碳源代谢阻遏蛋白 CRE1 结合到 *cbh1* 启动子的某些位点,会削弱 *cbh1* 启动子的强度,因此他们将 CRE1 在 *cbh1* 启动子上的3个结合位点替换为转录激活因子 ACE II 的结合位点,从而提高外源基因的表达量。

随机突变是人为地对纤维素酶相关基因进行随机突变,在人工控制条件的特殊环境下筛选获得纤

维素酶特性提高的菌株。该方法主要有易错 PCR 技术、DNA 改组(DNA shuffling)技术等。在未知哪些DNA片段或碱基会对瑞氏木霉纤维素酶产生影响的情况下,可以用随机突变的方法来加快瑞氏木霉的进化。例如,对 EG III 进行随机突变和定突变,可以提高瑞氏木霉酶活^[30]或改变其最适 pH 值^[31]。此外还可以利用根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)的Ti质粒实现瑞氏木霉染色体的随机突变。Zhong等^[32]利用根癌农杆菌 AGL-1 介导的瑞氏木霉遗传化方法实现随机插入诱变:在乙酰丁香酮诱导下,构建到根癌农杆菌Ti质粒上的潮霉素B磷酸转移酶基因 *hph* 被随机整合到瑞氏木霉染色体上,使瑞氏木霉对潮霉素B产生抗性。

传统的DNA改组是用DNase I消化基因后,先进行无引物PCR,然后再进行有引物PCR,最后将有引物PCR的产物转化宿主菌,进行多次选择和重组,直到最终得到性状明显改良的理想突变体为止。此外,还可以用类似DNA改组的方法使瑞氏木霉染色体产生随机突变。类似DNA改组的方法,是用DNase I消化基因后,先用T4 DNA连接酶随机连接DNase I消化产生的小片段,然后以连接产物作为模板进行无引物PCR,最后将无引物PCR的产物直接转化宿主菌。陈小玲等用类似DNA改组的方法分别改造 *cbh1*^[33]、*egl1*^[34]和 *cre1*^[21]基因,均使瑞氏木霉的纤维素滤纸酶活提高,另外 *cre1* 基因的改造还使瑞氏木霉的表型发生改变。这些研究^[21,34,35]用类似DNA改组的方法经过1次筛选即可获得表型变化、酶活提高的突变菌株。但是仅进行1次改造,纤维素酶活力提高的程度依然有限,为获得更高的酶活和产量,还需对突变菌株进行新一轮的改造。

1.2.4 优化培养基成分

培养基成分对菌体的代谢有较大影响,通过优化培养条件,可以提高瑞氏木霉纤维素酶活力。Yan等^[35]用紫外线和NTG处理瑞氏木霉菌株 RUTC-30 后获得高产纤维素酶的瑞氏木霉菌株 YC-108,并进一步对菌株 YC-108 的培养条件进行优化。用优化的培养基组分(麸皮 24.63 g/L,微晶纤维素粉末 30.78 g/L,大豆饼粉末 19.16 g/L)培养该菌株,使其滤纸酶活(Filter paper activity, FPA)达到 15.82 IU/mL(比普通培养基培养的高出5倍),羧甲基纤维素酶活力(CMCase)从 83.02 IU/mL 增加到 628.05 IU/mL。

1.2.5 提高同源重组效率

在使用基于同源重组的方法改造瑞氏木霉纤维素酶基因时,提高同源重组效率很关键。例如,在使用定点突变或随机突变的方法改造纤维素酶基因时,提高重组效率可以使基因改造的成功率大大提高。真核生物有两个主要的重组方式——同源重组和非同源末端连接(NHEJ),这两个重组方式的区别在于双链DNA断点的修复是否依赖于同源DNA序列。除酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)外,真核生物更偏好于非同源末端连接修复。KU70和KU80是丝状真菌非同源末端连接途径的必需组件,敲除*ku70*和*ku80*基因可以提高丝状真菌的同源重组率。丝状真菌链孢霉属(*Neurospora*)的*mus-51*和*mus-52*基因分别与人的*ku70*和*ku80*同源。链孢霉属非同源整合需要非同源末端连接蛋白MUS-52和MUS-53(人Lig4同系物),而同源整合需要同源重组蛋白MEI-3和MUS-25^[36],敲除链孢霉属*mus-51*、*mus-52*基因,可以限制非同源末端连接,使100%的转化子都在同源位点发生整合,而野生型菌株的转化子只有10%~30%的转化子在同源位点整合^[37]。类似地,在瑞氏木霉的有性型——红褐肉座菌(*Hypocrea jecorina*)中,与人*ku70*基因同源的*tku70*基因也是非同源末端连接所必需的,该基因还与DNA的异位整合相关。Guangtao等^[38]用含潮霉素B磷酸转移酶基因的表达盒敲除红褐肉座菌*tku70*基因后,在*tku70*基因缺失菌株($\Delta tku70$ 菌株)中再敲除短链脱氢酶基因*tre54086*和真菌特异转录因子*tre47479*,考察*tku70*基因缺失对靶向效率的影响。结果发现,当同源性侧翼区(同源臂)为1 kb时, $\Delta tku70$ 菌株的*tre54086*和*tre47479*的同源重组效率都大于95%;当同源性侧翼区域为500 bp时, $\Delta tku70$ 菌株的同源重组效率为70%(*tre54086*)和63%(*tre47479*);而当同源性侧翼区为1 kb时,没有敲除*tku70*基因的同源重组效率只有10%(*tre54086*)和7%(*tre47479*)。另有研究发现,与*mus-51*或*mus-52*基因突变菌相比,即使在同源片段(同源臂)很短的情况在下,链孢霉属*mus-53*突变菌的基因打靶效率也达到100%,表明*mus-53*突变菌的基因打靶效率比*mus-51*和*mus-52*突变菌的更高^[36]。基于此,Steiger等^[39]敲除瑞氏木霉无性菌基因*mus-53*(与人Lig4同源),使其发生非同源末端连接缺陷,然后利用Cre-LoxP重组酶系统建立一个高效的基因打靶系统,该系统可以重复使

用潮霉素B和氟乙酰胺作为双向选择标记。

1.3 瑞氏木霉筛选标记

在进行遗传转化时,一般先将外源基因或改造的基因连到载体上,然后将载体转化瑞氏木霉菌株,在构建这类载体时一般以来源于细菌的质粒作为骨架。质粒载体需要有稳定、便于检测的标记基因,以方便筛选瑞氏木霉转化子。如果使用的标记基因来自于原核生物,则需要在标记基因前加一个真菌的启动子,如构巢曲霉的*gpd*启动子。用于转化瑞氏木霉的标记基因主要为营养缺陷型标记基因和抗药性标记基因。

1.3.1 营养缺陷型标记基因

营养缺陷型菌株是指只能在完全培养基或补充相应生长因子的基本培养基中才能正常生长的变异菌株。通过转入营养缺陷标记基因(与营养缺陷型菌株基因互补),可以使营养缺陷型菌株恢复野生型生长。瑞氏木霉中常用的营养缺陷标记基因有来源于构巢曲霉的鸟氨酸氨基甲酰转移酶基因*argB*^[40]、色氨酸生物合成酶基因*trpC*以及来源于粗糙链孢霉(*Neurospora crassa*)的乳清酸核苷-5'-磷酸脱羧酶基因*pyr4*^[41]。另外,尿嘧啶合成基因、编码NADP特异性谷氨酸脱氢酶的基因及与*trpC*基因类似的色氨酸生物合成酶基因*trp1*等也是丝状真菌中常用的营养缺陷标记基因。一般在其它丝状真菌中可以用的标记基因,在瑞氏木霉中也可以使用。

一般通过诱变的方法获得营养缺陷型突变菌株。例如,Penttilä等^[40]利用紫外线诱变瑞氏木霉的分生孢子,并筛选获得需要尿嘧啶(uracil)、色氨酸(tryptophane)或精氨酸(arginine)的营养缺陷型突变株。Gruber等^[41]通过紫外线和 γ 射线诱变瑞氏木霉分生孢子,分别获得5株和1株尿苷(uridine)营养缺陷型突变菌株,这两种诱变方法的存活率分别为65%和2%,突变菌株的回复率小于 10^{-8} ,在选择性培养基上传代若干代后突变子的稳定性没有下降。

1.3.2 抗药性标记

药物抗性标记不要求受体菌是营养缺陷型,应用较为方便。抗药性标记基因的转入可以使受体细胞在一定浓度的药物下生长,表现出药物抗性。在其它丝状真菌中能使用的抗药性标记基因在瑞氏木霉中绝大多数都可以使用。在瑞氏木霉中使用得最多的抗药性标记基因是来源于大肠杆菌(*Escherichia coli*)的潮霉素抗性基因*hph*,它在瑞

氏木霉中的应用非常稳定^[42]。其它抗药性标记基因,如来源于红褐肉座菌的 *pyr4* 基因、来源于印度斯坦链异壁菌 (*Streptoalloteichus hindustanus*) 的博来霉素抗性基因 *sh ble*^[43]、来源于米曲霉菌 (*Aspergillus oryzae*) 的吡啶硫胺抗性基因 *ptrA*^[44] 等在瑞氏木霉中也能很好地发挥抗性效果。

1.3.3 其它筛选标记

其它筛选标记还有碳源、氮源及硫源利用基因,绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 基因等。碳源、氮源及硫源利用基因可以使菌株能够在特定底物上生长。例如,来源于构巢曲霉菌的乙酰胺酶基因 *amdS*, 可以使瑞氏木霉菌株能在以乙酰胺为唯一氮源的培养基上生长。绿色荧光蛋白作为标记基因,可以使原来不可见或不可定位的部分(如细胞或细胞器等)变成可见或可定位的。绿色荧光蛋白基因已被应用于瑞氏木霉转化子的筛选鉴定中。2007年赵雪娜^[45]将含有绿色荧光蛋白 *gfp* 基因和 *bgl1* 基因的质粒转入瑞氏木霉,但是在阳性转化子中未检测到绿色荧光。赵雪娜认为可能是由于与 β -葡萄糖苷酶融合的 GFP 不能形成正确的结构,因此不能发出荧光;或者是由于其所发出的荧光较弱而被菌体自发荧光掩盖,因此难以检测。但是, Zhong 等^[46]于 2011 年发现, *gfp* 基因在农杆菌介导的瑞氏木霉转化中可以发挥良好的作用, Zou 等^[29]在 2012 年也成功将 *gfp* 基因作为标记基因应用于瑞氏木霉中。绿色荧光蛋白在瑞氏木霉遗传转化中的成功应用,使研究人员可以对瑞氏木霉进行更深入的科学研究。

2 存在的问题及对策

2.1 纤维素酶系中各组分不均衡

纤维素水解效率主要取决于纤维素酶系中各组分的比例和性质,但是野生菌株的纤维素酶系多是不完全的。瑞氏木霉产生的纤维素酶虽然齐全,但是各组分的产量、酶活不均衡。葡聚糖外切酶和葡聚糖内切酶活力高,而 β -葡萄糖苷酶产量少且酶活低,所以在水解纤维素的过程中会造成纤维二糖大量积累,抑制葡聚糖外切酶和葡聚糖内切酶的活力^[47]。这是纤维素水解的瓶颈问题,亟待研究解决。可以采用以下方法:(1)使用其他启动子在瑞氏木霉中表达 β -葡萄糖苷酶基因。研究表明,用 *eg3* 和 *xyn3* 的启动子表达 *bgl1* 基因,构建重组菌,由基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF)

检测显示重组菌过量表达 β -葡萄糖苷酶,使瑞氏木霉 β -葡萄糖苷酶活性分别提高 4.0 倍和 7.5 倍^[48]。基于此我们推测使用更强的启动子,如 *cbh1* 启动子或 *pdC* 强启动子可能使 β -葡萄糖苷酶产量更高;(2)将高酶活的 β -葡萄糖苷酶基因构建到瑞氏木霉中表达,如在瑞氏木霉中表达黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 的 β -葡萄糖苷酶基因;(3)将瑞氏木霉的葡聚糖外切酶、葡聚糖内切酶基因及黑曲霉的 β -葡萄糖苷酶基因转到酿酒酵母中共表达,构建能直接利用纤维素的酵母菌株,研究重组菌株混合发酵时对纤维素底物的利用情况。

2.2 外源表达的纤维素酶活性低

纤维素酶基因在大肠杆菌中可以高水平表达。然而在大肠杆菌中表达纤维素酶基因存在两个主要问题,一是纤维素酶在细菌胞内表达,不分泌到胞外,增加提取、纯化的难度;二是瑞氏木霉的纤维素酶是经过糖基化的,这使其在大肠杆菌中的表达更趋复杂。因此很多研究尝试用同属于真核生物的酵母来表达外源纤维素酶基因。不过,虽然酵母在合适信号肽的引导下可以将其表达的外源纤维素酶分泌到胞外,也可以对表达的外源纤维素酶进行糖基化修饰,但是酵母有可能对表达的外源纤维素酶进行过度糖基化修饰,从而影响纤维素酶的性能,如酶活、稳定性等。Wei 等^[49]对土曲霉 (*Aspergillus terreus*) β -葡萄糖苷酶的 4 个 N-联糖基化保守位点 (N224, N295, N363 及 N429) 分别进行定点突变,并在瑞氏木霉和毕赤氏酵母 (*Pichia pastoris*) 中表达突变的 β -葡萄糖苷酶,发现 4 个定点突变的毕赤氏酵母重组菌均产生过糖基化,而瑞氏木霉只有 N224 位点突变的重组菌产生过糖基化,这表明瑞氏木霉更适于表达外源 β -葡萄糖苷酶。为实现纤维素酶的分泌性表达、避免过度糖基化的问题,可以在瑞氏木霉中表达外源纤维素酶基因。

2.3 酶活力提高方法的局限

2.3.1 培养基优化方法

通过优化菌株的培养基可以在一定程度上提高纤维素酶酶活。但是,不同生产批次的培养基组分很难保持完全一样,菌株的纤维素酶活可能会有不明原因的升高或降低。而且,由于菌株之间的差异,不同菌株的最优化培养基也不完全相同。优化培养条件不能从本质上提高菌株生产高活力纤维素酶的能力,但用该方法可以最大限度地发挥菌株的潜力,所以一般是用诱变或分子改造的方法获得纤维素酶活力、产量提高的菌株,然后再对该菌株的培养条件

进行优化。

2.3.2 诱变方法

传统的改造方法是诱变的方法。但是,用化学诱变剂比较危险,会污染实验用品并产生沾有诱变剂的废弃物,需要对它们进行后期处理。相比之下,物理诱变是比较安全的诱变方法,用物理诱变的方法也可以取得满意的效果。例如,文献[41]用紫外线或其它射线处理瑞氏木霉的孢子,可以筛选到突变菌株。诱变存在的问题是突变的频率较低、突变的方向和性质难以控制,可以用定点突变、使用强启动子、或多拷贝表达基因的方法来解决这些问题。

2.3.3 营养缺陷型标记

营养缺陷型标记基因的应用有一定的局限:(1)需要获得相应的营养缺陷型突变菌株作为受体;(2)某种营养缺陷型的菌株一般只能使用1种营养缺陷型标记,如 *argB*-营养缺陷型的瑞氏木霉菌株只能使用以 *argB* 为标记的转化系统。可以使用抗药性标记基因或绿色荧光蛋白基因。

3 展望

对瑞氏木霉纤维素酶的研究已经持续开展了几十年。丝状真菌遗传转化系统的建立及完善,对瑞氏木霉纤维素酶的研究有很大的促进作用。被成功应用于瑞氏木霉遗传转化的标记基因越来越多,新标记基因的成功应用,有助于瑞氏木霉突变菌株的高通量筛选,例如董志扬等^[50]借助荧光标记基因和流式细胞仪可以实现高通量筛选。

纤维素的降解过程十分复杂,需要各种纤维素酶的协同作用。瑞氏木霉产生的 CBH I 已经达到其胞外分泌性蛋白总量的一半,所以如何提高其它纤维素酶的产量和酶活是研究的重点。瑞氏木霉产生的纤维素酶组份中,产量最少、酶活最低的是 β -葡萄糖苷酶,如何提高 β -葡萄糖苷酶的产量和酶活应该是研究工作的重中之重。经过漫长的进化,瑞氏木霉形成了一套复杂的调控系统,仅对某个基因进行改造还不能达到期望的目标,还有更多科学问题有待于深入研究。为实现纤维素酶大规模的生产和应用,改造瑞氏木霉纤维素酶,在瑞氏木霉中表达外源基因以及在酵母中表达瑞氏木霉或其他外源纤维素酶基因尚需要长时间的研究。随着微生物学和分子生物学技术的不断发展,新的研究方法和技术,如代谢工程和基因组学方法等对人们理解纤维素分解机制方面有巨大的促进,新技术的应用将使研究人员对瑞氏木霉纤维素酶的研究事半功倍。

参考文献:

- [1] Lynd L, Weimer P J, Van Zyl W H, et al. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2002, 66(3): 506-577.
- [2] 熊和平, 孙进昌. 木质纤维素生产燃料乙醇是解决能源危机的有效途径[J]. *中国农业信息*, 2007, 7: 24-29. Xiong H P, Sun J C. The production of fuel ethanol from wood cellulose is the effective way to solve the energy crisis[J]. *China Agricultural Information*, 2007, 7: 24-29.
- [3] Zaldivar J, Nielsen J, Olsson L. Fuel ethanol production from lignocellulose: A challenge for metabolic engineering and process integration[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 56(1-2): 17-34.
- [4] Lin Y, Tanaka S. Ethanol fermentation from biomass resources: Current state and prospects[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 69(6): 627-642.
- [5] Percival Zhang Y H, Himmel M E, Mielenz J R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies [J]. *Biotechnology Advances*, 2006, 24(5): 452-481.
- [6] Martinez D, Berka R M, Henrissat B, et al. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*) [J]. *Nature Biotechnology*, 2008, 26(5): 553-560.
- [7] Peiji G, Yinbo Q, Zunong W. Effects of endoglucanase from *Trichoderma viride* A10 in cellulose hydrolysis [J]. *Progress in Natural Science*, 1992, 2(5): 449.
- [8] Wang H, Jones R W. Cloning, characterization and functional expression of an endoglucanase-encoding gene from the phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* [J]. *Gene*, 1995, 158(1): 125-128.
- [9] Stahlberg J, Johansson G, Pettersson G. A binding-site-deficient, catalytically active, core protein of endoglucanase III from the culture filtrate of *Trichoderma reesei* [J]. *European journal of biochemistry / FEBS*, 1988, 173(1): 179-183.
- [10] Vincken J P, Beldman G, Voragen A. The effect of xyloglucans on the degradation of cell - wall - embedded cellulose by the combined action of cellobiohydrolase and endoglucanases from *Trichoderma Viride* [J]. *Plant Physios*, 1994, 104(1): 99-107.
- [11] 王廷璞, 曹丽娜, 雷新有. 利用微生物发酵生物质生产酒精工艺[J]. *甘肃科技*, 2006, 22(10): 42-45. Wang T P, Cao L N, Lei X Y. Fermentation of biomass ethanol production process with microorganisms

- [J]. Gansu Science and Technology, 2006, 22(10): 42-45.
- [12] 周庆新. 木霉纤维素膨胀因子 Swollenin 与 β -葡萄糖苷酶的功能研究[D]. 济南: 山东大学, 2011.
Zhou Q X. Functional Analysis of Cellulose Degradation Factor Swollenin and β -Glucosidase in *Trichoderma reesei* [D]. Jinan: Shandong University, 2011.
- [13] Zhou Q, Xu J, Kou Y, et al. Differential involvement of β -glucosidases from *Hypocrea jecorina* in rapid induction of cellulase genes by cellulose and cellobiose [J]. Eukaryotic Cell, 2012, 11(11): 1371-1381.
- [14] Ilmén M, Saloheimo A, Onnela M L, et al. Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* [J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63(4): 1298-1306.
- [15] Mach R L, Zeilinger S. Regulation of gene expression in industrial fungi: *Trichoderma* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2003, 60(5): 515-522.
- [16] Strauss J, Mach R L, Zeilinger S, et al. Cre1, the carbon catabolite repressor protein from *Trichoderma reesei* [J]. FEBS Letters, 1995, 376(1-2): 103-107.
- [17] Saloheimo A, Aro N, Ilmén M, et al. Isolation of the *acel* gene encoding a Cys(2)-His(2) transcription factor involved in regulation of activity of the cellulase promoter *cbhl* of *Trichoderma reesei* [J]. J Biol Chem, 2000, 275(8): 5817-5825.
- [18] Aro N, Saloheimo A, Ilmén M, et al. ACE II, a novel transcriptional activator involved in regulation of cellulase and xylanase genes of *Trichoderma reesei* [J]. J Biol Chem, 2001, 276(26): 24309-24314.
- [19] Wang S W, Liu G, Wang J, et al. Enhancing cellulase production in *Trichoderma reesei* RUT C30 through combined manipulation of activating and repressing genes[J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2013, 40(6): 633-641.
- [20] Nakari-set L T, Paloheimo M, Kallio J, et al. Genetic modification of carbon catabolite repression in *Trichoderma reesei* for improved protein production [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(14): 4853-4860.
- [21] 陈小玲, 陈东, 张穗生, 等. 瑞氏木霉碳源阻遏相关基因 *Cre1* 的分子改造[J]. 基因组学与应用生物学, 2014, 33(2): 288-292.
Chen X L, Chen D, Zhang S S, et al. Molecular modification of *Cre1* gene mediating carbon catabolite repression in *Trichoderma reesei* [J]. Genomics and Applied Biology, 2014, 33(2): 288-292.
- [22] Denton J A, Kelly J M. Disruption of *Trichoderma reesei cre2*, encoding an ubiquitin C-terminal hydrolase, results in increased cellulase activity[J]. BMC Biotechnology, 2011, doi: 10.1186/1472-6750-11-103.
- [23] Liu T, Wang T, Li X, et al. Improved heterologous gene expression in *Trichoderma reesei* by cellobiohydrolase I gene (*cbhl*) promoter optimization[J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2008, 40(2): 158-165.
- [24] Takashima S, Iikura H, Nakamura A, et al. Analysis of *Cre1* binding sites in the *Trichoderma reesei cbhl* upstream region[J]. FEMS Microbiol Lett, 1996, 145(3): 361-366.
- [25] Ilmén M, Onnela M L, Klemsdal S, et al. Functional analysis of the cellobiohydrolase I promoter of the filamentous fungus *Trichoderma reesei* [J]. Mol Gen Genet, 1996, 253(3): 303-314.
- [26] Durand H, Clanet M, Tiraby G. Genetic improvement of *Trichoderma reesei* for large scale cellulase production[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1988, 10(6): 341-346.
- [27] Toyama H, Yano M, Gisushi A, et al. Active nuclear shuffling system using a swollen conidium of *Trichoderma reesei* [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2003, 108(1-3): 821-824.
- [28] Fang H, Xia L. High activity cellulase production by recombinant *Trichoderma reesei* ZU-02 with the enhanced cellobiohydrolase production[J]. Bioresource Technology, 2013, 144: 693-697.
- [29] Zou G, Shi S, Jiang Y, et al. Construction of a cellulase hyper-expression system in *Trichoderma reesei* by promoter and enzyme engineering [J]. Microb Cell Fact, 2012, doi: 10.1186/475-2859-11-21.
- [30] Xiao Z Z, Wang P, Qu Y B, et al. Cold adaptation of a mesophilic cellulase, EG III from *Trichoderma reesei*, by directed evolution[J]. Science in China, 2002, 45(4): 337-343.
- [31] Wang T, Liu X, Yu Q, et al. Directed evolution for engineering pH profile of endoglucanase III from *Trichoderma reesei* [J]. Biomolecular Engineering, 2005, 22(1-3): 89-94.
- [32] Zhong Y H, Wang X L, Wang T H, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation (AMT) of *Trichoderma reesei* as an efficient tool for random insertional mutagenesis[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 73(6): 1348-1354.
- [33] 陈小玲, 张穗生, 黄俊, 等. 里氏木霉纤维二糖水解酶基因 *cbhl* 的分子改造[J]. 南方农业学报, 2014, 45

- (10);1739-1743.
- Chen X L,Zhang S S,Huang J,et al. Molecular modification of cellobiohydrolase gene *cbhl* from *Trichoderma reesei* [J]. Journal of Southern Agriculture,2014,45(10):1739-1743.
- [34] 陈小玲,陈东,芦志龙,瑞氏木霉内切- β -1,4 葡聚糖酶基因 *EgII* 的分子改造[J]. 广西科学,2011,18(3):264-268.
- Chen X L,Chen D,Lu Z L. Molecular modification of endo- β -1,4-glucanase gene *EgII* from *Trichoderma reesei* [J]. Guangxi Sciences,2011,18(3):264-268.
- [35] Yan Z L,Cao X H,Liu Q D,et al. A shortcut to the optimization of cellulase production using the mutant *Trichoderma reesei* YC-108[J]. Indian J Microbiol,2012,52(4):670-675.
- [36] Ishibashi K, Suzuki K, Ando Y, et al. Nonhomologous chromosomal integration of foreign DNA is completely dependent on MUS-53 (human Lig4 homolog) in *Neurospora* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences,2006,103(40):14871-14876.
- [37] Ninomiya Y,Suzuki K,Ishii C,et al. Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2004,101(33):12248-12253.
- [38] Guangtao Z, Hartl L, Schuster A,et al. Gene targeting in a nonhomologous end joining deficient *Hypocrea jecorina* [J]. Journal of Biotechnology,2009,139(2):146-151.
- [39] Steiger M G,Vitikainen M,Uskonen P,et al. Transformation system for *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) that favors homologous integration and employs reusable bidirectionally selectable markers[J]. Applied and Environmental Microbiology,2011,77(1):114-121.
- [40] Penttilä M,Nevalainen H,Rättö M,et al. A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei* [J]. Gene,1987,61(2):155-164.
- [41] Gruber F,Visser J,Kubicek C,et al. The development of a heterologous transformation system for the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei* based on a pyrG-negative mutant strain[J]. Current genetics,1990,18(1):71-76.
- [42] Mach R L,Schindler M,Kubicek C P. Transformation of *Trichoderma reesei* based on hygromycin B resistance using homologous expression signals[J]. Current genetics,1994,25(6):567-570.
- [43] Hartl L,Seiboth B. Sequential gene deletions in *Hypocrea jecorina* using a single blaster cassette [J]. Current genetics,2005,48(3):204-211.
- [44] Kubodera T,Yamashita N,Nishimura A. Transformation of *Aspergillus* sp. and *Trichoderma reesei* using the pyrithiamine resistance gene (*ptrA*) of *Aspergillus oryzae* [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry,2002,66(2):404-406.
- [45] 赵雪娜. β -葡萄糖苷酶基因过量表达提高 *Trichoderma reesei* 纤维素降解活性[D]. 济南:山东大学,2007.
- Zhao X N. Over-expression of β -Glucosidase to Improve Cellulolytic Activity of *Trichoderma Reesei* [D]. Jinan:Shandong University,2007.
- [46] Zhong Y,Yu H,Wang X,et al. Towards a novel efficient T-DNA-based mutagenesis and screening system using green fluorescent protein as a vital reporter in the industrially important fungus *Trichoderma reesei* [J]. Molecular Biology Reports,2011,38(6):4145-4151.
- [47] Shewale J G. Beta-glucosidase:Its role in cellulase synthesis and hydrolysis of cellulose[J]. Int J Biochem,1982,14(6):435-443.
- [48] Rahman Z,Shida Y,Furukawa T,et al. Application of *Trichoderma reesei* cellulase and xylanase promoters through homologous recombination for enhanced production of extracellular beta-glucosidase I [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry,2009,73(5):1083-1089.
- [49] Wei W,Chen L,Zou G,et al. N-glycosylation affects the proper folding,enzymatic characteristics and production of a fungal β -glucosidase[J]. Biotechnol Bioeng,2013,110(12):3075-3084.
- [50] 董志扬,秦丽娜. 高通量筛选高效表达外源蛋白的重组里氏木霉的方法;中国,CN102876706 A[P]. 2013-01-16.
- Dong Z Y, Qin L N. Methods for high-throughput screening of recombinant *Trichoderma reesei* with efficient expression of exogenous protein; Chinese, CN102876706 A[P]. 2013-01-16.

(责任编辑:米慧芝)