

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.01067

后基因组时代的丝状真菌基因组学与代谢工程

陈献忠^{1,2}, 沈微^{1,2}, 樊游^{1,2}, 王正祥^{1,2}

1. 江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122;
2. 江南大学生物工程学院生物资源与生物能源研究中心, 无锡 214122

摘要: 丝状真菌不仅是传统发酵工业中抗生素、酶制剂和有机酸的主要生产者, 而且也是代谢工程育种中异源蛋白表达的重要细胞工厂。丝状真菌的遗传修饰和代谢工程研究是现代工业生物技术领域最具活力的研究方向之一。特别是与细菌和酵母相比, 丝状真菌在细胞生长、营养需求、环境适应性、翻译后修饰、蛋白分泌能力和生物安全性等方面具有显著的优势。文章综述了丝状真菌作为异源蛋白表达系统在基因组学技术研究和代谢工程研究方面的最新进展。作者在分析丝状真菌基因组结构、特点的基础上, 阐述了比较基因组学、蛋白质组学、转录组学和代谢组学等对丝状真菌的代谢途径重构、新型蛋白挖掘和代谢工程育种中的作用和意义。另一方面, 作者分析了丝状真菌在表达外源蛋白时遇到的瓶颈问题, 总结了丝状真菌代谢工程育种中的常用策略包括异源基因的融合表达、反义核酸技术、蛋白分泌途径改造、密码子优化和蛋白酶缺陷宿主的选育等技术和手段。最后, 对该领域的发展趋势进行了展望。

关键词: 丝状真菌; 基因组学; 代谢工程; 异源蛋白; 细胞工厂

Genomics and metabolic engineering of filamentous fungi in the post-genomics era

CHEN Xian-Zhong^{1,2}, SHEN Wei^{1,2}, FAN You^{1,2}, WANG Zheng-Xiang^{1,2}

1. Key Lab of Industrial Biotechnology, Education Ministry, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;
2. Research Center of Bioresource and Bioenergy, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract: Filamentous fungi are used in a variety of industrial processes including the production of primary metabolites (e.g., organic acid, vitamins, and extracellular enzymes) and secondary metabolites (e.g., antibiotics, alkaloids, and gibberellins). Moreover, filamentous fungi have become preferred cell factories for production of foreign (heterologous) proteins in biotechnology in recent years. Compared to bacterial and yeast hosts, filamentous fungi showed predominant features such as the ability of growing on rather simple and inexpensive substrates, producing and secreting exceptionally large amounts of proteins, post-translational modifications, and GRAS (generally regarded as safe) approval. Therefore, the exploration of filamentous fungi has been attractive recently. This review summarizes the recent development in genomics, comparative genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics of filamentous fungi, and describes their applications and functions in reconstruction of metabolic network, discovery of novel proteins and genes, investigation of cell physiological and biochemical reactions, and strain breeding. This review also analyzes the bottlenecks of heterologous protein

收稿日期: 2011-04-19; 修回日期: 2011-05-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 21006039)和国际科技合作重点项目(编号: 2009DFA31300)资助

作者简介: 陈献忠, 博士, 副教授, 研究方向: 工业微生物与代谢工程。E-mail: cxzcool2000@yahoo.com.cn

网络出版时间: 2011-8-22 10:05:01

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20110822.1005.005.html>

expression in filamentous fungi. Furthermore, special emphasis is given on the strategies for improving the protein production, including fusion expression of heterologous proteins, RNAi technology, manipulations of secretion pathways, codon optimization of foreign genes, and screening of protease mutants. Lastly, this review proposes the future direction of metabolic engineering of filamentous fungi.

Keywords: filamentous fungi; genomics; metabolic engineering; heterologous proteins; cell factory

以木霉、曲霉、毛霉和根霉为主的丝状真菌是一类常见的真核微生物,在工业、农业、医药以及基础生物学研究中具有重要作用。例如,重要的抗生素产生菌—产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*)和顶头孢霉(*Cephalosporium acremonium*)分别能产生青霉素和头孢菌素,用于疾病的治疗,而有些丝状真菌又能产生对人体有害的物质,如黄曲霉毒素产生菌黄曲霉;一些工业丝状真菌如黑曲霉(*Aspergillus niger*)和米曲霉(*Aspergillus oryzae*)被广泛用于生产酶类(如蛋白酶和淀粉酶)和有机酸(如柠檬酸等);丝状真菌又是重要农作物的致病菌,并能导致粮食等贮藏过程中的腐败变质,同时又有一些丝状真菌(如白僵菌、绿僵菌、哈氏木霉等)可用于作物病虫害的生物防治;丝状真菌中的构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)和粗糙脉胞菌(*Neurospora crassa*)由于其相对简单性而被作为“模式”菌株用于真核生物的一些基础生物学特性研究,其中 1979 年首次将重组 DNA 技术应用于粗糙脉胞菌研究对丝状真菌产物形成分子基础研究和丝状真菌代谢工程育种具有里程碑意义。

近年来,随着微生物分子生物学和遗传工程的飞速发展,越来越多的丝状真菌基因组如黑曲霉、米曲霉和里氏木霉(*Trichoderma reesei*)被解析和公布,丝状真菌作为细胞工厂生产异源蛋白受到更为广泛的关注,并取得了较为突出的成果^[1,2]。但是与酵母研究相比,丝状真菌在研究的深度、广度以研究规模上还具有明显的差距。本文就丝状真菌遗传表达系统在基因组学、转录组学、蛋白质组学和分泌组学研究的新理论、新技术和新方法予以综述,对丝状真菌代谢工程研究存在的瓶颈问题和提高丝状真菌作为细胞工厂生产异源蛋白的策略进行了归纳,并对该领域的未来发展方向予以展望。

1 丝状真菌作为细胞工厂生产外源蛋白的优势

与细菌和酵母相比,丝状真菌作为宿主表达外源基因具有显著的优势。首先,丝状真菌具有完善的蛋白分泌途径,能够将酶或其他多肽高效的输送到胞外,这种分泌能力是酵母和细菌所不具备的。由于有些重组蛋白的胞内积累可能对细胞产生毒性作用,因此分泌表达不仅可以减少或避免其对细胞的损伤,还有利于重组蛋白的分离和纯化。文献报道,传统诱变后的里氏木霉经发酵工艺优化后,其自身纤维素酶分泌水平可达到 40 g/L,甚至更高^[3],而黑曲霉的糖化酶分泌水平也能达到 25 g/L^[4]。其次,丝状真菌具有真核生物典型的转录后修饰和翻译后加工能力,如内含子剪接、糖基化修饰、蛋白酶切割和二硫键的形成等,这些生物分子修饰均是真核基因表达具有生理功能蛋白所必需的步骤^[5]。另外,在生物安全性方面,不少丝状真菌如黑曲霉、米曲霉和里氏木霉等用于食品及食品加工业已有较长的历史,已被美国FDA(Food and Drug Administration)认定为GRAS (generally regarded as safe)范围的微生物,故在食品医药安全问题层出不穷的今天更值得信赖。在发酵培养方面,尽管丝状真菌要比原核表达系统的工艺复杂,但与高等真核生物表达系统相比,丝状真菌培养更为简便、成本低廉,细胞生长迅速,适宜于工业放大。表 1 总结了在丝状真菌中表达重组蛋白种类,其中大部分重组酶是应用于安全性要求较高的食品工业加工中。

2 丝状真菌基因组学研究

2.1 丝状真菌基因组学研究

在真菌基因组学研究中,1997 年完成的模式生物酿酒酵母菌基因组测序揭开了真菌基因组学研究

表 1 常见丝状真菌异源蛋白表达系统及表达产物

蛋白质/酶	表达宿主	基因来源
Aminopeptidase	<i>Trichoderma reesei</i>	<i>Aspergillus</i> sp.
Arabinofuranosidase	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus</i> sp.
Catalase	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus</i> sp.
Cellulase	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Humicola</i> sp.
Galactosidase (alpha)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Guar plant
Glucanase (beta)	<i>Trichoderma reesei</i>	<i>Trichoderma</i> sp.
Glucoamylase	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus</i> sp.
Glucose oxidase	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus</i> sp.
Laccase	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Myceliophthora</i> sp.
Lactase or Galactosidase (beta)	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Aspergillus</i> sp.
Lipase	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Candida</i> sp
Mannanase (endo-1, 4-beta)	<i>Trichoderma reesei</i>	<i>Trichoderma</i> sp.
Pectin lyase	<i>Aspergillus niger</i> var. <i>awamori</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Phytase	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Peniophora</i> sp.
Protease	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Rhizomucor</i> sp.
Pullulanase	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	<i>Hormoconis</i> sp.
Xylanase	<i>Aspergillus niger</i> var. <i>awamori</i>	<i>Aspergillus</i> sp
Chymosin	<i>Aspergillus niger</i> var. <i>awamori</i>	Calf

的序幕,通过这种最简单的真核生物基因组学研究获得的新技术和新方法应用于遗传背景更复杂的丝状真菌的基因组学研究中。截止目前为止,在NCBI的公共数据库中已经对 1 099 种真核生物全基因组开展了研究计划(40 种已完成,401 种正在组装,658 种正在开展),其中包括 300 个真菌基因组计划。尽管丝状真菌的遗传背景复杂,基因组规模也相对较大,但经过科学家的努力,越来越多的丝状真菌基因组序列被公布。另一方面,考虑到基因组测序和拼接过程产生的误差,一些重要的真菌基因组已进行了更为精确的重新测序、拼接和注释。粗糙脉胞菌和黑曲霉两个重要模式生物的基因组于 2001 年完成序列测定,并且于 2007 年绘制了更为精确和详细的黑曲霉基因组图谱^[6]。Clutterbuck等^[7]于 1997 年就完成了*A. nidulans*的完整物理图谱绘制,并于 2001 年完成了全基因组测序工作^[8]。2005 年Broad研究所的Galagan课题组^[9]公布了序列更精确和注释更详细的该基因组序列信息。*A. oryzae*和*A. fumigatus*的全基因组序列也于 2005 年完成测序和注释^[10,11]。*A. clavatus*、*A. flavus*、*A. parasiticus*和 *A. terreus*等丝状真菌基因组序列也相继完成测序和/或注释^[12]。表 2 列出了已经完成的一些重要丝状真菌

基因组测序、注释的相关信息,从中可以看出丝状真菌基因组学研究的主要对象是一些在工业应用和新药开发中具有前景和潜力的菌株。

2.2 丝状真菌比较基因组学及其应用

比较基因组学(Comparative genomics)是基于一些模式微生物(如大肠杆菌、枯草芽胞杆菌和酿酒酵母等)的功能基因组学研究的不断深入发展,在对未知生物的基因组图谱和测序基础上,与已知基因和基因组结构进行比较,通过序列同源比对和计算机分析从而了解基因的功能、表达机理和物种进化的学科。随着可知基因组数量的不断增加,比较基因组学也可应用于基因鉴别及基因表达的调控元件或同线性区域的研究。另一方面,比较基因组学能够帮助鉴定亲缘关系较近的物种之间的区别,包括致病性、次级代谢模式或其他特性^[12]。如能够分解利用木质纤维素的里氏木霉的基因组自从 2008 年被解析后,不少学者认为该菌株基因组的解析不仅为纤维素燃料乙醇研究提供了重要的遗传信息,而且使得里氏木霉能够通过代谢途径的理性设计和构建最终成为单糖生产的重要细胞工厂^[13]。基于海量信息和比较基因组学的“基因组采矿”技术(Genome mining)能

表 2 已经完成的主要丝状真菌基因组信息

丝状真菌	菌株	状态	应用领域	网址 URL
<i>Aspergillus clavatus</i>	NRRL 1	Annotated	Medical	http://www.tigr.org/tdb/e2k1/acla1/
<i>A. flavus</i>	NRRL 3357	Annotated	Medical	http://www.Aspergillusflavus.org/genomics/
<i>A. fumigatus</i>	Af293	Annotated	Medical	http://www.tigr.org/tdb/e2k1/afu1/intro.shtml
<i>A. nidulans</i>	FGSC A4	Annotated	Model organism	http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/Aspergillus_nidulans/Home.html
<i>A. niger</i>	ATCC 1015	Annotated	Industrial	http://genome.jgi-psf.org/Aspni1/Aspni1.home.html
<i>A. niger</i>	CBS 513.88	Annotated	Industrial	http://www.dsm.com/en_US/html/dfs/genomics_aniger.htm
<i>A. oryzae</i>	RIB40	Annotated	Industrial	http://www.bio.nite.go.jp/dogan/MicroTop?GENOME_ID=ao
<i>A. terreus</i>	NIH 2624	Annotated	Medical	http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/Aspergillus_terreus/Home.html
<i>Coprinus cinereus</i>	7#130	Annotated	Model organism	http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/Coprinus_cinereus/Home.html
<i>Fusarium oxysporum</i>	FGSC 4286	Annotated	Plant pathogen	http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/fusarium_group/MultiHome.html
<i>Laccaria bicolor</i>	S238N-H82	Annotated	Symbiotic	http://genome.jgi-psf.org/Lacbi1/Lacbi1.home.html
<i>Magnaporthe grisea</i>	70-15	Annotated	Plant pathogen	http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/magnaporthe_grisea/Home.html
<i>Neosartorya fischeri</i>	NRRL 181	Annotated	Medical	http://www.tigr.org/tdb/e2k1/nfa1/
<i>Neurospora crassa</i>	OR74A	Annotated	Model organism	http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/Neurospora/Home.html
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	RP-78	Draft assembly	Industrial	http://genome.jgi-psf.org/whiterot1/whiterot1.home.html
<i>Trichoderma reesei</i>	QM6a	Annotated	Industrial	http://genome.jgi-psf.org/Trire2/Trire2.home.html

够挖掘和鉴别一些真菌基因组中未知蛋白功能, 该技术对于筛选和有工业应用价值的蛋白/酶是十分有效的工具。在丝状真菌中, 代谢相关基因一般是以基因簇 (Genes clusters) 的形式分布的 (在 *Aspergillus* 细胞中至少发现了 30~40 个基因簇存在), 这些基因簇一般与聚酮体或非核糖体多肽的合成相关, 因此在新药挖掘和新工业酶制剂的开发中具有重要意义^[14]。如从黑曲霉基因组数据库中, 利用“基因组采矿”技术鉴定出了超过 200 种的蛋白酶, 其中两种新型的脯氨酸特异性内切蛋白酶已经应用于工业生产中, 一种是应用于啤酒品质的提高^[15], 另一种应用运动饮料的生产^[16]。

另一方面, Pel 等^[6]对黑曲霉基因组数据进行了精确的比对分析并结合代谢网络的重构鉴定出了许多与 DNA 复制、物质转运和胞内/胞外酶生产相关的蛋白, 这为黑曲霉发酵产柠檬酸的育种策略提供了新的研究角度。通过比较基因组学技术分析 *A. Oryzae* 的基因组发现, 该基因组中存在着丰富的与细胞降解和初级代谢与次级代谢相关的基因, 并且发现有 134 种肽酶存在, 其中仅有 18 种是功能明确的^[17]。比较基因组学的应用也提高了 *A. nidulans* 基因组的功能注释和代谢途径的模拟分析^[18]。基于基因组规模的代谢网络重构是比较基因组学的进一步

发展和应用, 它是通过尽量发掘、综合基因组中蕴藏的相关重要信息, 如基因簇、调节位点共享等, 以准确预测基因的功能, 有效解决缺失基因问题 (Missing genes, 即代谢元件应该存在却还没有找到对应基因); 在此基础上, 设计实验以验证基因功能预测的正确性, 最终实现细胞代谢网络的重构。不少研究表明, 使用这种方法, 能够显著提高基因功能注释和代谢网络重构的质量, 并且发现新的功能基因^[19, 20]、甚至新的代谢途径^[21~23]。更重要的是, 在菌种改良中利用这种方法重构的代谢工程菌能够显著提高目标产物产量^[24]。

3 后基因组时代的丝状真菌“OMICS”—组学研究

所谓“后基因组时代”, 其特征就是随着大规模基因组测序的完成, 涌现的一些新技术和方法对海量数据进行挖掘和利用。生命科学中新的组学“OMICS”技术的发展为进一步揭示和应用丝状真菌基因组信息及代谢途径分析提供了快速高效的工具, 这些组学技术主要包括转录组学、蛋白质组学、代谢组学、反应组学和表达组学等。应用这些技术可以对目标产物或代谢流进行理性设计和构建。这些组学是利用高通量研究方法在细胞内不同层面上进

行研究探索。它们不仅相互制约,而且相互影响,通过组学研究可以获得细胞生物学代谢的系统信息。例如,针对某一靶基因的敲除,我们可以考察在转录组水平对宿主细胞基因表达产生的全局性影响,也可以在转录组水平鉴别遗传修饰的新目标;在蛋白质组水平可以研究大量蛋白质的分泌机制,也可以考察蛋白质的翻译后修饰和蛋白质之间的相互作用;代谢物组研究可以鉴别新的有用的代谢产物,了解代谢流的流向和代谢途径等,最终为代谢工程提供有价值的信息。

3.1 丝状真菌转录组学及其应用

转录组学(Transcriptomics)是以RNA分子为基础的实验技术,按照其原理可分为两类:对于DNA序列已知的,有寡核苷酸阵列、cDNA微阵列和EST分析等;未知序列信息的分析技术,包括基因表达系列分析(SAGE)、差异消减杂交(SSH)等。Breakspear等^[25]报道了第一个丝状真菌的微阵列分析技术,同时研究者也认为该技术需要利用更多的担子菌类细胞作进一步验证。Abe等^[26]利用DNA微阵列技术对*A. oryzae*基因组进行了比较转录组分析,结果表明利用该技术能够鉴别一些新的代谢产物,在工业上可以应用于新蛋白的开发。Anderson等^[27]制备了一个基因芯片分别对*A. nidulans*、*A. niger*和*A. oryzae* 3种丝状真菌进行相对转录组分析,他们利用这种交叉分析方法鉴定出了存在于*Aspergillus* spp的23个保守基因和365个差异表达基因,其中23个保守基因中多数是编码糖转运蛋白和酶。利用这种转录组水平的交叉分析方法不仅能够鉴定一些新的蛋白,也能鉴定新的菌株。Chamberg等^[28]根据*T. reesei*的表达序列标签(Expression sequence tag, EST)采用微阵技术分析了*T. reesei*在好氧条件下降解纤维素的分子机制,阐明了兼性厌氧的酿酒酵母*S. cerevisiae*与好氧生长的丝状真菌*T. reesei*在有氧条件下生长细胞代谢的生化差异:即*T. reesei*编码三羧酸循环酶和电子传递链蛋白的基因是以有利于丙酮酸经三羧酸循环氧化的方式进行程序性表达的,而不是倾向于经发酵还原为乙醇的方式进行的。该研究还指出,葡萄糖控制的调节机制很可能是进化压力的目标,引导代谢物流分配的主要方式是呼吸代谢而不是发酵。这一发现对于开展以纤维素为原料的代谢工程手段生产燃料酒精具有重要的启迪意义。

3.2 丝状真菌蛋白质组学及其应用

与依赖于微阵列技术的转录组学方法相比,蛋白质组学(Proteomics)研究更多的依靠分析技术的发展,常见的蛋白质组学研究方法包括同位素标记、亲和标记、二维聚丙烯酰胺凝胶电泳(2-D PAGE)、质谱技术(MS)、肽序列标签、蛋白质微阵列、核磁共振技术(NMR)以及其他研究蛋白质相互作用的方法如酵母双杂交系统等。Kim等^[29]总结了应用于*Aspergillus*蛋白质组学研究中的各种方法和技术,通过各种蛋白质组学技术,共鉴定出了28个细胞表面蛋白,102个与分泌相关的蛋白以及139个胞内蛋白,同时也构建了代谢途径中关键基因的蛋白质组图谱。蛋白质组学技术不仅可以用于真菌致病机理的研究,也用于丝状真菌的代谢网络调节研究。Kniemeyer等^[30]利用2-D凝胶电泳技术比较了烟曲霉在不同碳源培养条件下,胞内蛋白质表达情况,揭示了其碳代谢的抑制因素。Carberry研究组^[31]和Martin等^[32]等利用蛋白质组学技术分别鉴定出了烟曲霉细胞中的丙氨酸转氨酶、乌头酸水合酶和鸟嘌呤核苷酸结合蛋白亚单位等,这些蛋白都是糖类、脂类和蛋白质代谢过程中的关键酶,功能涉及细胞代谢、蛋白质的合成与转运等。这些蛋白质图谱、数据为研究烟曲霉的致病机理和生化代谢途径提供了丰富的信息。产紫青霉(*Penicillium purpurogenum*)是能够降解半纤维素和木质素的模式菌株,Gonzalez-Vogel等^[33]利用蛋白质组学技术在非变性条件下鉴定和分析了该菌株的纤维素降解酶系的相关蛋白,结果发现该酶复合物是由 β -半乳糖苷酶、脂酶和木聚糖酶等组成一类高分子蛋白复合物,作者通过免疫共沉淀技术分析了其中一个酶复合物各组分之间的相互作用,这为更深入的理解木质纤维素降解机制提供了理论依据。目前,丝状真菌蛋白质组研究的热点逐渐转向亚细胞(如细胞壁、质膜、细胞器、细胞质和细胞核)的蛋白质。

3.3 丝状真菌代谢组学及其应用

代谢组学(Metabolomics)是应用高通量检测方法对生物体内所有代谢物进行定量分析,并寻找代谢物与生理/病理变化的相对关系的研究方式,是系统生物学的组成部分。以*Aspergillus*和*Penicillium*为例,真菌细胞的次级代谢产物据估计达到10 000

种之多,但目前已知的代谢产物不足 10%^[34]。由于 *S. cerevisiae* 的代谢组学研究开展较早,数据丰富,方法成熟,可以通过代谢特征的比较研究开展一些更为复杂的丝状真菌的代谢组学研究。与转录组学和蛋白质组学相比,通过代谢产物的分析能够更敏锐的分析环境扰动/胁迫对细胞的影响,因为有些情况下环境改变并不影响细胞转录水平或蛋白质水平的变化,却可以通过代谢产物表现出来。代谢组学研究的关键是能够高效快捷的分析、鉴定胞内代谢产物,据报道毛细管-质谱技术能够同时分析 1000 种以上的物质,在代谢组学研究中发挥着重要作用^[35]。*A. nidulans* 是研究丝状真菌细胞生物学和基因表达调控的一种重要模式菌株, Kouskoumvekaki 等开展了重组 *Aspergilli* 代谢组学研究,他们检测分析了 450 种重组菌代谢物,发现其中 7 种代谢物可以作为生物标记用于菌株的基因型鉴定^[36]。由此可见,代谢物特征不仅可以作为丝状真菌的分类工具还能够用于代谢工程中的目标产物分析。

4 丝状真菌代谢工程研究

4.1 丝状真菌代谢工程研究的瓶颈问题

在丝状真菌基因组学、转录组学、蛋白质组学和代谢组学等发展的基础上,以菌种改良为目的的

丝状真菌代谢工程研究发展迅速,丝状真菌作为细胞工厂生产异源蛋白和其他生物化学品也显示了良好的应用前景。随着多种丝状真菌遗传转化体系的建立,研究者通过各种遗传手段如强启动子控制、提高基因拷贝数、融合蛋白表达、分泌系统改造和蛋白酶基因敲除等技术提高异源重组蛋白表达水平,为丝状真菌高效表达和分泌异源蛋白奠定了基础^[37]。典型的丝状真菌细胞工厂生产异源蛋白模式如图 1 所示。

目前丝状真菌表达系统也存在着一些瓶颈问题:(1)由于丝状真菌存在多核现象,在导入外源基因时会由于重组问题产生异核转化子现象,从而导致重组菌的表达水平下降;(2)由于丝状真菌细胞的限制修饰系统和复杂的蛋白酶系,使得外源基因的表达产物难以积累和分泌,导致目标产物的产量较低;(3)丝状真菌的基因表达调控极为复杂,存在多种转录因子的参与,很难通过单一的遗传修饰手段(如提高基因拷贝数、使用强启动子策略等)提高外源基因表达水平;(4)即在表达一些来源于细菌、哺乳动物或植物的基因时,蛋白表达水平多在 mg/L 数量级,远低于同源基因的表达和分泌水平^[38]。对于个别产蛋白能力相对较高的菌株而言,通过传统的随机诱变和筛选技术能够进一步提高蛋白合成能力从而可

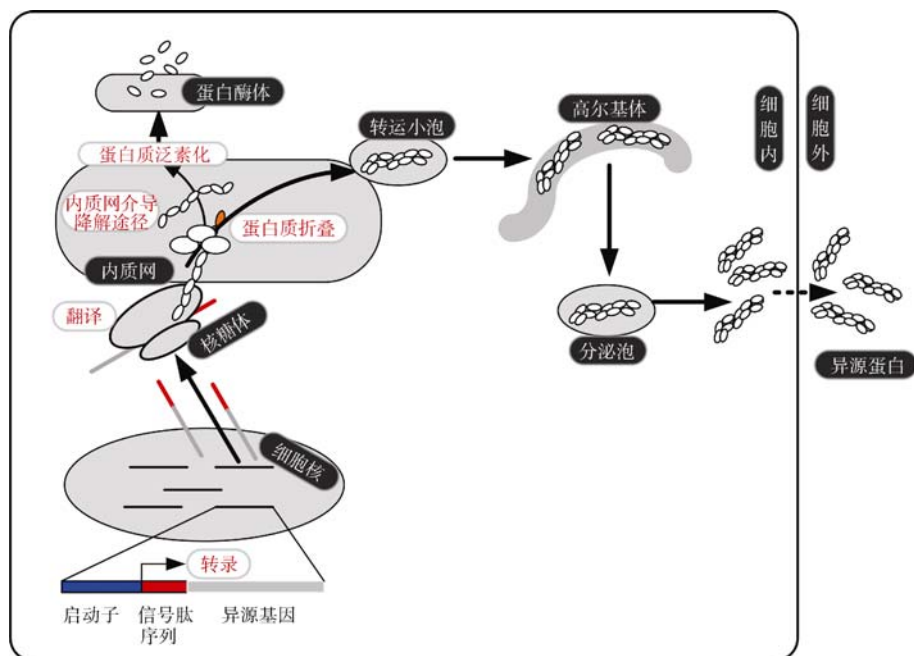


图 1 丝状真菌异源蛋白表达和分泌途径

以规模放大,但这种菌种改良策略受到了许多方面的限制。

4.2 提高丝状真菌异源蛋白表达策略

4.2.1 异源蛋白融合表达

丝状真菌在表达一些自身蛋白时,能够高效的分泌到胞外,但是在表达异源基因时细胞的分泌能力显著下降。选择宿主自身高分分泌表达的蛋白作为载体,将外源基因通过分子操作插入到该载体下游,构建融合表达系统是提高外源基因分泌水平的有效策略之一。融合表达能够在一定程度提高外源蛋白的稳定性,增加分泌效率和免受蛋白酶降解等,但具体的机制仍有待深入研究。基因融合表达已经用于不同的丝状真菌宿主中。最典型的例子就是将牛凝乳酶基因与黑曲霉葡萄糖淀粉酶基因融合表达能够显著提高凝乳酶蛋白的分泌水平,这也是第一个在丝状真菌中融合表达异源基因提高分泌水平的成功例子^[39]。由于黑曲霉葡萄糖淀粉酶是一个多结构域的蛋白,在随后的研究中常将该蛋白的催化区域分离后作为载体蛋白用于异源蛋白融合表达。另外里氏木霉的纤维二糖水解酶(CBH1)因具有高效的分泌水平也被常用于融合表达的载体蛋白。然而这种融合表达策略并不是对所有丝状真菌和/或所有异源蛋白表达都有效。Conesa等^[40]研究发现在黑曲霉中融合表达真菌来源的过氧化物酶并不能提高蛋白的分泌效率。

4.2.2 密码子优化

根据宿主的密码子偏爱性优化异源基因的密码子能够提高蛋白表达效率,这在一些原核生物和真核生物中均有报道,细菌中的研究结果认为密码子优化提高了翻译效率从而提高了蛋白表达水平^[41]。近年来,一些学者分别报道了在*A. awamori*、*A. niger*、*N. crassa*和*T. reesei*等丝状真菌宿主中表达经密码子优化后的异源基因能够提高蛋白分泌表达水平^[42-45]。进一步的研究发现密码子优化能够提高异源基因在真菌中的转录活性即mRNA水平^[44-46]。2008年,Tokuoka等^[46]将密码子优化后的粉尘螨(*Dermatophagoides farina*)的过敏素蛋白Derf7基因在米曲霉宿主中表达,结果表明无论是融合表达还是非融合表达,密码子优化能够显著提高Derf7基

因的mRNA水平和蛋白表达水平。进一步的研究发现,野生型基因的转录产物mRNA不含终止密码子,从而导致转录产物中poly(A)的降解,这也是外源基因表达水平较低的主要原因^[47]。因此,密码子优化也是提高外源基因在丝状真菌高效转录和表达的途径之一。另外,将丝状真菌启动子插入到报告基因上游导入宿主细胞也是研究一些蛋白分泌和表达机理的有效手段。绿色荧光蛋白(GFP)在研究丝状真菌蛋白分泌机理中发挥了重要作用。黑曲霉(*Aspergillus niger*)用于生产异源蛋白质时产量普遍低于产生同源蛋白质的菌株。2005年,Talabardon等^[47]将载有gfp基因的pgpdAGLAGFP质粒转化黑曲霉,使得重组菌能够表达GLA-GFP(葡糖糖淀粉酶—绿色荧光蛋白)融合蛋白。作者通过3种不同的培养方式(游离细胞培养、旋转纤维床和静态纤维床)获得表达GFP蛋白的重组黑曲霉不同菌丝形态,结果表明,融合荧光蛋白的表达量与真菌细胞的菌丝形态密切相关。

4.2.3 提高细胞的蛋白分泌能力

丝状真菌对异源基因转录后的加工效率远低于同源基因的加工效率,这也是导致丝状真菌异源基因表达时效率较低的原因之一。尽管有证据表明丝状真菌蛋白的分泌机制与其他的真核细胞类似,即分泌蛋白集中在菌丝顶端,但却少有阐述。通过将gfp基因整合到黑曲霉葡萄糖淀粉酶的启动子区域,使得绿色荧光蛋白与葡萄糖淀粉酶融合,第一次可以在单菌丝水平观察到黑曲霉体内葡萄糖淀粉酶的分泌情况^[48]。利用基因工程技术和传统诱变技术相结合,构建和筛选高分泌能力的突变株也是提高丝状真菌外源基因表达能力的一种途径。Xavier等^[49]利用DNA分子的同源双交换重组原理敲除了黑曲霉的葡萄糖淀粉酶和酸性淀粉酶基因,突变株在淀粉培养基上的生长能力显著受损,但将葡萄糖淀粉酶基因的催化域部分导入该突变株后生长能力又恢复到敲除前水平。在此基础上将来源于白腐菌的漆酶基因与黑曲霉的葡萄糖淀粉酶基因的催化域部分相连后导入突变株受体细胞,转化子经紫外线诱变后涂布淀粉培养基,筛选生长速度快的突变体,研究结果发现突变体的生长速度与其漆酶基因的表达式呈正相关。该研究结果为提高丝状真菌的异源基

因表达水平提供了一种可借鉴的思路。

最新的研究发现,丝状真菌的液泡蛋白排序基因参与异源蛋白的分泌。Jaewoo等^[50]从米曲霉中克隆了液泡蛋白排序受体的编码基因*AoVps10*,将该基因与*gfp*基因融合表达亚细胞定位表明该受体蛋白定位于胞内的高尔基体上,该基因的缺失能够导致细胞液泡羧肽酶*AoCpyA*的错误排列和胞外的过量分泌。为进一步研究该基因的缺失对异源蛋白表达和分泌的影响,作者将牛凝乳酶基因转化 $\Delta Aovps10$ 突变株,结果发现突变株的异源蛋白表达能力提高了2.2~3.0倍左右。这对于研究丝状真菌在表达异源基因时的转录后修饰以及提高外源蛋白的表达和分泌具有参考意义。

4.2.4 反义核酸技术

由于丝状真菌遗传背景和基因表达调控机制复杂,代谢工程技术的经典手段—单一的基因敲除和/或过量表达有时难以达到预期效果,反义RNA技术为丝状真菌的基因表达抑制调控提供了另一种有效的研究手段。反义RNA技术是人工合成一段与靶RNA特定区域碱基互补的RNA序列,将其导入受体细胞内转录成反义RNA通过互补配对以形成基因沉默作用,抑制基因的表达。不同的反义RNA其功能和作用方式不尽相同,其作用机理人们通常认为可能是反义RNA与靶RNA通过形成的杂交结构在复制、转录、翻译等过程起负调控作用。在真核生物中,反义RNA可以存在细胞质中,也有存在细胞核内,在复制、转录、转录后加工及转运、翻译等水平上起作用。反义RNA在真核生物中的主要功能:

作用于mRNA末端,影响5'端和3'端的正常修饰;

作用于外显子和内含子的连接区,阻止前体mRNA的剪接; 作用于polyA形成位点,阻止mRNA的成熟及其向胞浆中的转运。与传统基因敲除技术相比,反义RNA技术可以在保证细胞正常生长和代谢条件,避免细胞致死突变的前提下,完成特定靶基因的沉默;同时,可以通过诱导表达,选择特定时间抑制基因的表达。反义RNA技术在丝状真菌的代谢产物积累和基因调控机理研究方面均有报道。2006年,Herrmann等^[51]采用反义RNA技术研究了*A. nidulans*的蛋白激酶C(*pkcA*)基因沉默现象,结果发现合成 β -内酰胺类抗生素—青霉素的关键酶

*aatA*的阻遏蛋白AnBH1在细胞中的分布由细胞核改变至细胞质中,从而削弱了对其抑制作用。谢林等^[52]构建了米曲霉*Aspergillus oryzae* SAICAR合成酶基因反义表达载体,将其导入受体细胞抑制SAICAR合成酶的表达,从而使得中间代谢产物红色色素CAIR的积累明显上升。2005年,Wang等^[53]利用反义RNA技术对丝状真菌*T. reesei*的木糖代谢途径进行改造,通过抑制木糖醇脱氢酶(*XDH*)的表达,使中间代谢产物木糖醇的积累量明显高于原始菌株。由此可见,反义RNA技术能够在丝状真菌的基因表达调控和分子育种研究中发挥着积极的作用。

4.2.5 利用蛋白酶缺失菌株作为宿主

由于胞外蛋白酶对异源蛋白的降解作用,丝状真菌丰富的蛋白酶系被认为是限制异源蛋白高效分泌和表达的主要因素之一。因此,筛选或构建蛋白酶缺失突变株作为宿主是提高蛋白表达效率的重要手段之一。黑曲霉是研究较为深入的第一个用于外源基因表达的丝状真菌。针对该菌株通过遗传改良获得了一些蛋白酶缺失突变株,利用突变株表达异源基因时蛋白产量得到明显的提高。但是突变株中残存的蛋白酶活性也能严重削弱一些外源蛋白的合成。Van den Hombergh等^[54]构建了一株蛋白酶基因*pepA*、*pepB*和*pepE*缺失的*A. niger*突变株,结果发现尽管突变株的胞外蛋白酶活力与野生型菌株相比有所降低,但还维持相对较高的水平。利用比较基因组学技术进一步研究发现,*A. niger*中存在更多的蛋白酶基因包括*pepAa*、*pepAb*、*pepAc*和*pepAd*。将漆酶基因分别在*pepAa*、*pepAb*和*pepAd*突变株中进行表达,结果发现漆酶的表达水平与对照相比分别提高了21%、42%和30%^[55]。刘丽等^[56]采用传统的紫外诱变技术获得了一株酸性蛋白酶活力缺陷的黑曲霉突变株,将细菌血红蛋白基因*vhb*作为报告基因导入该突变株中在转录和分泌水平上研究了蛋白酶缺失对异源基因表达的影响,结果表明蛋白酶的缺失显著提高了外源蛋白的分泌表达水平,与出发菌株相比突变株的表达水平提高了5倍。本实验室课题组构建了多拷贝表达糖化酶基因*glaA*的重组载体导入蛋白酶缺陷的黑曲霉宿主中,通过荧光实时定量RT-qPCR技术检测*glaA*的拷贝数与糖化酶产量的关系,结果表明在染色体上整合2~3个拷贝的糖化酶

基因有助于提高糖化酶活力^[57]。唐国敏课题组^[58]针对黑曲霉的外源基因表达开展了研究, 他们发现黑曲霉酸性蛋白酶基因 $pep-B$ 和 $pep-D$ 的敲除能够提高外源漆酶基因的分泌表达。日本学者Yoon等^[59]在*A. Oryzae*的 $tppA$ 、 $pepE$ 、 $nptB$ 、 $dppIV$ 和 $dppV$ 等 5 个蛋白酶缺失的基础上, 进一步敲除了另外 5 个蛋白酶基因 $alpA$ 、 $pepA$ 、 $AoepAa$ 、 $AoepAd$ 和 cpI , 以 10 蛋白酶基因缺失突变株作为宿主异源表达人溶菌酶(HLY)和牛凝乳酶(CHY)基因, 与 5 基因缺失的突变株相比表达水平分别提高了 30%和 35%。由此可见, 通过筛选蛋白酶缺失突变株也是提高异源蛋白表达水平的有效策略之一。

除了上述外, 优化遗传转化技术^[60, 61]、高效的多基因连续删除技术^[62]、构建精确调控的表达系统^[63]、糖基化修饰途径的改造、多拷贝串联表达、选择强启动子和应用高效分泌信号肽等均是常用的提高异源蛋白在丝状真菌中表达水平的策略。如Pachlinger等^[63]发现将人雌激素受体导入烟曲霉或黑曲霉后, 转化子对雌激素化合物变得十分敏感, 他们利用人雌激素受体-雌激素应答原件(hER α -ERE)构建了烟曲霉的异源蛋白表达系统, 研究发现该表达系统中报告基因的表达水平能够受到诱导物(雌激素化合物)的精确调控, 即在一定范围内异源蛋白表达水平与诱导剂浓度呈典型的线性关系, 该表达系统的另一个优点是异源基因的表达与碳源、氮源的利用无关, 即不会受到代谢阻遏影响。

5 结语与展望

丝状真菌作为细胞工厂在异源蛋白表达中发挥着越来越重要的作用, 为工业酶制剂生产和重组药物开发提供了广阔的创新空间。随着真菌后基因组时代的来临, 各种组学技术的发展使得在不同水平和尺度上系统分析细胞的反应和调控机理, 包括 DNA 水平、RNA 水平、蛋白质和代谢物水平等。多尺度数据的整合分析, 有助于理解和掌握复杂的丝状真菌代谢调控机制, 为丝状真菌代谢工程研究提供了更为广阔的前景。未来丝状真菌异源蛋白表达的发展趋势将是在整合丝状真菌各组学研究的基础上, 挖掘新的蛋白/酶、新的代谢途径/网络, 传统的基因工程技术结合最新的代谢工程技术, 最终获得更为优良的生产菌种。本文仅总结和分析了丝状真

菌基因组学技术及相关组学技术的发展, 分析了丝状真菌代谢工程研究的新思路和新方法。

尽管丝状真菌后基因组时代已经开启, 但是应该看到, 由于丝状真菌在代谢调控和遗传背景上的复杂性, 许多问题或瓶颈还亟待科学工作者去攻克, 这可能需要很长的时间完成。国内学者关于丝状真菌研究多集中在菌种筛选、代谢产物分析等, 也有部分综述报道, 但整体而言, 丝状真菌表达外源基因研究与国外有显著的差距。为了不使在丝状真菌生物技术领域受制于人, 我们应该在该领域投入更多的精力, 既要跟踪前沿, 开拓自己的特色领域, 更要脚踏实地, 步步为营, 争取在真菌生物技术的国际舞台上有一席之地。

参考文献(References):

- [1] Adrio JL, Demain AL. Fungal biotechnology. *Int Microbiol*, 2003, 6(3): 191–199. DOI
- [2] Fleißner A, Dersch P. Expression and export: recombinant protein production systems for *Aspergillus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 87(4): 1255–1270. DOI
- [3] Cherry JR, Fidantsef AL. Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Curr Opin Biotechnol*, 2003, 14(4): 438–443. DOI
- [4] Ward OP, Qin WM, Hanjoon J, Ye J, Singh A. Physiology and biotechnology of *Aspergillus*. *Adv Appl Microbiol*, 2006, 58(1): 1–75. DOI
- [5] Karnaukhova E, Ophir Y, Trinh L, Dalal N, Punt PJ, Golding B, Shiloach J. Expression of human $\alpha 1$ -proteinase inhibitor in *Aspergillus niger*. *Microb Cell Fact*, 2007, 6: 34. DOI
- [6] Pel HJ, de Winde JH, Archer DB, Dyer PS, Hofmann G, Schaap PJ, Turner G, de Vries RP, Albang R, Albermann K, Andersen MR, Bendtsen JD, Benen JA, van den Berg M, Breestraat S, Caddick MX, Contreras R, Cornell M, Coutinho PM, Danchin EG, Debets AJ, Dekker P, van Dijk PW, van Dijk A, Dijkhuizen L, Driessen AJ, d'Enfert C, Geysens S, Goosen C, Groot GS, de Groot PW, Guillemette T, Henrissat B, Herweijer M, van den Hombergh JP, van den Hondel CA, van der Heijden RT, van der Kaaij RM, Klis FM, Kools HJ, Kubicek CP, van Kuyk PA, Lauber J, Lu X, van der Maarel MJ, Meulenberg R, Menke H, Mortimer MA, Nielsen J, Oliver SG, Olsthoorn M, Pal K, van Peij NN, Ram AF, Rinas U, Roubos JA, Sagt CM, Schmoll M, Sun J, Ussery D, Varga J, Vervecken W, van de Vondervoort PJ, Wedler H, Wösten HA, Zeng AP, van Ooyen AJ, Visser J, Stam H. Genome

- sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(2): 221–231. [DOI](#)
- [7] Clutterbuck AJ. The validity of the *Aspergillus nidulans* linkage map. *Fungal Genet Biol*, 1997, 21(3): 267–277. [DOI](#)
- [8] Monsanto. 2001, Microbial Sequence Database, <http://microbial.cereon.com>. [DOI](#)
- [9] Galagan JE, Calvo SE, Cuomo C, Ma LJ, Wortman JR, Batzoglou S, Lee SI, Bastürkmen M, Spevak CC, Clutterbuck J, Kapitonov V, Jurka J, Scaccocchio C, Farman M, Butler J, Purcell S, Harris S, Braus GH, Draht O, Busch S, D'Enfert C, Bouchier C, Goldman GH, Bell-Pedersen D, Griffiths-Jones S, Doonan JH, Yu J, Vienken K, Pain A, Freitag M, Selker EU, Archer DB, Penalva MÁ, Oakley BR, Momany M, Tanaka T, Kumagai T, Asai K, Machida M, Nierman WC, Denning DW, Caddick M, Hynes M, Paoletti M, Fischer R, Miller B, Dyer P, Sachs MS, Osmani SA, Birren BW. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature*, 2005, 438(7071): 1105–1115. [DOI](#)
- [10] Machida M, Asai K, Sano M, Tanaka T, Kumagai T, Terai G, Kusumoto KI, Arima T, Akita O, Kashiwagi Y, Abe K, Gomi K, Horiuchi H, Kitamoto K, Kobayashi T, Takeuchi M, Denning DW, Galagan JE, Nierman WC, Yu JY, Archer DB, Bennett JW, Bhatnagar D, Cleveland TE, Fedorova ND, Gotoh O, Horikawa H, Hosoyama A, Ichinomiya M, Igarashi R, Iwashita K, Juvvadi PR, Kato M, Kato Y, Kin T, Kokubun A, Maeda H, Maeyama N, Maruyama JI, Nagasaki H, Nakajima T, Oda K, Okada K, Paulsen I, Sakamoto K, Sawano T, Takahashi M, Takase K, Terabayashi Y, Wortman JR, Yamada O, Yamagata Y, Anazawa H, Hata Y, Koide Y, Komori T, Koyama Y, Minetoki T, Suharnan S, Tanaka A, Isono K, Kuhara S, Ogasawara N, Kikuchi H. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*, 2005, 438(7071): 1157–1161. [DOI](#)
- [11] Nierman WC, Pain A, Anderson MJ, Wortman JR, Kim HS, Arroyo J, Berriman M, Abe K, Archer DB, Bermejo C, Bennett J, Bowyer P, Chen D, Collins M, Coulsen R, Davies R, Dyer PS, Farman M, Fedorova N, Feldblyum TV, Fischer R, Fosker N, Fraser A, García JL, García MJ, Goble A, Goldman GH, Gomi K, Griffith-Jones S, Gwilliam R, Haas B, Haas H, Harris D, Horiuchi H, Huang JQ, Humphray S, Jiménez J, Keller N, Khouri H, Kitamoto K, Kobayashi T, Konzack S, Kulkarni R, Kumagai T, Lafon A, Latgé JP, Li WX, Lord A, Lu C, Majoros WH, May GS, Miller BL, Mohamoud Y, Molina M, Monod M, Mouyna I, Mulligan S, Murphy L, O'Neil S, Paulsen I, Peñalva MA, Pertea M, Price C, Pritchard BL, Quail MA, Rabinowitsch E, Rawlins N, Rajandream MA, Reichard U, Renauld H, Robson GD, Rodriguez de Córdoba S, Rodriguez-Peña JM, Ronning CM, Rutter S, Salzberg SL, Sanchez M, Sánchez-Ferrero JC, Saunders D, Seeger K, Squares R, Squares S, Takeuchi M, Tekai F, Turner G, Vazquez de Aldana CR, Weidman J, White O, Woodward J, Yu JH, Fraser C, Galagan JE, Asai K, Machida M, Hall N, Barrell B, Denning DW. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature*, 2005, 438(7071): 1151–1156. [DOI](#)
- [12] Jones MG. The first filamentous fungal genome sequences: *Aspergillus* leads the way for essential everyday resources or dusty museum specimens? *Microbiology*, 2007, 153(1): 1–6. [DOI](#)
- [13] Martinez D, Berka RM, Henrissat B, Saloheimo M, Arvas M, Baker SE, Chapman J, Chertkov O, Coutinho PM, Cullen D, Danchin EG, 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, Robertse 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*). *Nat Biotechnol*, 2008, 26(5): 553–560. [DOI](#)
- [14] Brakhage AA, Schroeckh V. Fungal secondary metabolites-strategies to activate silent gene clusters. *Fungal Genet Biol*, 2010, 48(1): 15–22. [DOI](#)
- [15] Lopez M, Edens L. Effective prevention of chill-haze in beer using an acid proline-specific endoprotease from *Aspergillus niger*. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(20): 7944–7949. [DOI](#)
- [16] Edens L, Dekker P, van der Hoeven R, Deen F, de Roos A, Floris R. Extracellular prolyl endoprotease from *Aspergillus niger* and its use in the debittering of protein hydrolysates. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(20): 7950–7957. [DOI](#)
- [17] Kobayashi T, Abe K, Asai K, Gomi K, Juvvadi PR, Kato M, Kitamoto K, Takeuchi M, Machida M. Genomics of *Aspergillus oryzae*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2007, 71(3): 646–670. [DOI](#)
- [18] David H, Özçelik IS, Hofmann G, Nielsen J. Analysis of *Aspergillus nidulans* metabolism at the genome-scale. *BMC Genomics*, 2008, 9: 163. [DOI](#)
- [19] Pinchuk GE, Rodionov DA, Yang C, Li XQ, Osterman AL, Dervyn E, Geydebrekht OV, Reed SB, Romine MF, Collart

- FR, Scott JH, Fredrickson JK, Beliaev AS. Genomic reconstruction of *Shewanella oneidensis* MR-1 metabolism reveals a previously uncharacterized machinery for lactate utilization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(8): 2874–2879. [DOI](#)
- [20] Yang C, Rodionov DA, Rodionova IA, Li XQ, Osterman AL. Glycerate 2-kinase of *Thermotoga maritima* and genomic reconstruction of related metabolic pathways. *J Bacteriol*, 2008, 190(5): 1773–1782. [DOI](#)
- [21] Rodionov DA, Kurnasov OV, Stec B, Wang Y, Roberts MF, Osterman AL. Genomic identification and *in vitro* reconstitution of a complete biosynthetic pathway for the osmolyte di-myo-inositol-phosphate. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(11): 4279–4284. [DOI](#)
- [22] Sorci L, Martynowski D, Rodionov DA, Eyobo Y, Zogaj X, Klose KE, Nikolaev EV, Magni G, Zhang H, Osterman AL. Nicotinamide mononucleotide synthetase is the key enzyme for an alternative route of NAD biosynthesis in *Francisella tularensis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(9): 3083–3088. [DOI](#)
- [23] Piskur J, Schnackerz KD, Andersen G, Björnberg O. Comparative genomics reveals novel biochemical pathways. *Trends Genet*, 2007, 23(8): 369–372. [DOI](#)
- [24] Adrio JL, Demain AL. Genetic improvement of processes yielding microbial products. *FEMS Microbiol Rev*, 2006, 30(2): 187–214. [DOI](#)
- [25] Breakspear A, Momany M. The first fifty microarray studies in filamentous fungi. *Microbiology*, 2007, 153(1): 7–15. [DOI](#)
- [26] Abe K, Gomi K, Hasegawa F, Machida M. Impact of *Aspergillus oryzae* genomics on industrial production of metabolites. *Mycopathologia*, 2006, 162(3): 143–153. [DOI](#)
- [27] Andersen MR, Nielsen ML, Nielsen J. Metabolic model integration of the bibliome, genome, metabolome and reactome of *Aspergillus niger*. *Mol Syst Biol*, 2008, 4: 178. [DOI](#)
- [28] Chambergó FS, Bonaccorsi ED, Ferreira AJS, Ramos ASP, Ferreira Júnior JR, Abrahão-Neto J, Farah JP, El-Dorri H. Elucidation of the metabolic fate of glucose in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* using expressed sequence tag (EST) analysis and cDNA microarrays. *J Biol Chem*, 2002, 277(16): 13983–13988. [DOI](#)
- [29] Kim Y, Nandakumar MP, Marten MR. The state of proteome profiling in the fungal genus *Aspergillus*. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 2008, 7(2): 87–94. [DOI](#)
- [30] Kniemeyer O, Lessing F, Scheibner O, Hertweck C, Brakhage AA. Optimisation of a 2-D gel electrophoresis protocol for the human-pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Curr Genet*, 2006, 49(3): 178–189. [DOI](#)
- [31] Carberry S, Neville CM, Kavanagh KA, Doyle S. Analysis of major intracellular proteins of *Aspergillus fumigatus* by MALDI mass spectrometry: Identification and characterisation of an elongation factor 1B protein with glutathione transferase activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 341(4): 1096–1104. [DOI](#)
- [32] Vödisch M, Albrecht D, Lessing F, Schmidt AD, Winkler R, Guthke R, Brakhage AA, Kniemeyer O. Two-dimensional proteome reference maps for the human pathogenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Proteomics*, 2009, 9(5): 1407–1415. [DOI](#)
- [33] Gonzalez-Vogel A, Eyzaguirre J, Oleas G, Callegari E, Navarrete M. Proteomic analysis in non-denaturing condition of the secretome reveals the presence of multienzyme complexes in *Penicillium purpurogenum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 89(1): 145–155. [DOI](#)
- [34] Smedsgaard J, Nielsen J. Metabolite profiling of fungi and yeast: from phenotype to metabolome by MS and informatics. *J Exp Bot*, 2005, 56(410): 273–286. [DOI](#)
- [35] Soga T. Capillary electrophoresis-mass spectrometry for metabolomics. *Methods Mol Biol*, 2007, 358: 129–137. [DOI](#)
- [36] Kouskoumvekaki I, Yang ZY, Jónsdóttir SÓ, Olsson L, Panagiotou G. Identification of biomarkers for genotyping *Aspergilli* using non-linear methods for clustering and classification. *BMC Bioinformatics*, 2008, 9: 59. [DOI](#)
- [37] 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 Biotechnol*, 2002, 20(5): 200–206. [DOI](#)
- [38] Gouka RJ, Punt PJ, van den Hondel CAMJJ. Efficient production of secreted proteins by *Aspergillus*: progress, limitations and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, 47(1): 1–11. [DOI](#)
- [39] Ward M, Wilson LJ, Kodama KH, Rey MW, Berka RM. Improved production of chymosin in *Aspergillus* by expression as a glucoamylase-chymosin fusion. *Biotechnology (NY)*, 1990, 8(5): 435–440. [DOI](#)
- [40] Conesa A, van den Hondel CAMJJ, Punt PJ. Studies on the production of fungal peroxidases in *Aspergillus niger*. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(7): 3016–3023. [DOI](#)
- [41] Gustafsson C, Govindarajan S, Minshull J. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol*, 2004, 22(7): 346–353. [DOI](#)
- [42] Nelson G, Kozlova-Zwinderman O, Collis AJ, Knight MR, Fincham JRS, Stanger CP, Renwick A, Hessing JGM, Punt PJ, van den Hondel CAMJJ, Read ND. Calcium measurement in living filamentous fungi expressing codon-optimized

- aequorin. *Mol Microbiol*, 2004, 52(5): 1437–1450. DOI
- [43] Koda, A, Bogaki T, Minetoki T, Hirotsune M. High expression of a synthetic gene encoding potato alpha-glucan phosphorylase in *Aspergillus niger*. *J Biosci Bioeng*, 2005, 100(5): 531–537. DOI
- [44] Gooch VD, Mehra A, Larrondo LF, Fox J, Touroutoutoudis M, Loros JJ, Dunlap JC. Fully codon-optimized luciferase uncovers novel temperature characteristics of the *Neurospora* clock. *Eukaryot Cell*, 2008, 7(1): 28–37. DOI
- [45] Te'o VSJ, Cziferszky AE, Bergquist PL, Nevallainen KMH. Codon optimization of xylanase gene *xynB* from the thermophilic bacterium *Dictyoglomus thermophilum* for expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *FEMS Microbiol Lett*, 2000, 190(1): 13–19. DOI
- [46] Tokuoka M, Tanaka M, Ono K, Takagi S, Shintani T, Gomi K. Codon optimization increases steady-state mRNA levels in *Aspergillus oryzae* heterologous gene expression. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74(21): 6538–6546. DOI
- [47] Talabardon M, Yang ST. Production of GFP and glucoamylase by recombinant *Aspergillus niger*: effects of fermentation conditions on fungal morphology and protein secretion. *Biotechnol Prog*, 2005, 21(5): 1389–1400. DOI
- [48] Vahid K, Brookman JL, Robson GD. A study of the protein secretory pathway of *Aspergillus niger* using a glucoamylase-GFP fusion protein. *Fungal Genet Biol*, 2001, 32(1): 55–65. DOI
- [49] Weenink XO, Punt PJ, van den Hondel CAMJJ, Ram AFJ. A new method for screening and isolation of hypersecretion mutants in *Aspergillus niger*. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 69(6): 711–717. DOI
- [50] Yoon J, Aishan T, Maruyama JI, Kitamoto K. Enhanced production and secretion of heterologous proteins by the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* via disruption of vacuolar protein sorting receptor gene *Aovps10*. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(17): 5718–5727. DOI
- [51] Herrmann M, Spröte P, Brakhage AA. Protein kinase C (PkcA) of *Aspergillus nidulans* is involved in penicillin production. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(4): 2957–2970. DOI
- [52] 谢林, 谢欣, 鞠桂芝. *Aspergillus oryzae* SAICAR合成酶基因的克隆及反义表达载体的构建. 中国生物制品学杂志, 2003, 16(5): 261–263. DOI
- [53] Wang TH, Zhong YH, Huang W, Liu T, You YW. Antisense inhibition of xylitol dehydrogenase gene, *xdh1* from *Trichoderma reesei*. *Lett Appl Microbiol*, 2005, 40(6): 424–429. DOI
- [54] van den Hombergh JPTW, Sollewijn Gelpke MD, van de Vondervoort PJJ, Buxton FP, Visser J. Disruption of three acid proteases in *Aspergillus niger*-effects on protease spectrum, intracellular proteolysis, and degradation of target proteins. *Eur J Biochem*, 1997, 247(2): 605–613. DOI
- [55] Wang Y, Xue W, Sims AH, Zhao C, Wang A, Tang G, Qin J, Wang H. Isolation of four pepsin-like protease genes from *Aspergillus niger* and analysis of the effect of disruptions on heterologous laccase expression. *Fungal Genet Biol*, 2008, 45(1): 17–27. DOI
- [56] 刘丽, 刘谨, 仇润祥, 朱兴国, 唐国敏. 丝状真菌分泌系统中受体菌的构建. 生物工程学报, 2002, 18(6): 667–670. DOI
- [57] 姚婷婷, 王衍敏, 顾建龙, 王正祥. 携多拷贝 *glaA* 的重组黑曲霉过量合成糖化酶的研究. 生物工程学报, 2006, 22(4): 567–571. DOI
- [58] 孙晶, 李景鹏, 王敖全, 唐国敏, 王华明. 黑曲霉 *pepB* 基因缺失菌株的构建及其功能分析. 微生物学报, 2004, 44(6): 766–770. DOI
- [59] Yoon J, Maruyama J, Kitamoto K. Disruption of ten protease genes in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* highly improves production of heterologous proteins. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 89(3): 747–759. DOI
- [60] 周礼红, 王正祥, 诸葛健. 红曲霉不同转化方法的比较. 遗传, 2006, 28(4): 479–485. DOI
- [61] 王教瑜, 杜新法, 柴荣耀, 孙国昌, 林福呈. 丝状真菌目标基因替换过程中的策略与方法. 遗传, 2007, 29(7): 898–904. DOI
- [62] Kopke K, Hoff B, Kück U. Application of the *Saccharomyces cerevisiae* FLP/FRT recombination system in filamentous fungi for marker recycling and construction of knockout strains devoid of heterologous genes. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(14): 4664–4674. DOI
- [63] Pachlinger R, Mitterbauer R, Adam G, Strauss J. Metabolically independent and accurately adjustable *Aspergillus* sp. expression system. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(2): 672–678. DOI