

研究报告

黑曲霉转录因子 ACE1 的功能分析及其对 β -葡萄糖苷酶表达合成的影响

王硕¹, 王昕¹, 叶伟¹, 吕育财¹, 马东旭^{1,2*}, 龚大春^{1*}

1 三峡大学 生物与制药学院, 湖北 宜昌 443002

2 三峡大学 水利与环境学院, 湖北 宜昌 443002

王硕, 王昕, 叶伟, 吕育财, 马东旭, 龚大春. 黑曲霉转录因子 ACE1 的功能分析及其对 β -葡萄糖苷酶表达合成的影响[J]. 微生物学通报, 2026, 53(1): 238-253.

WANG Shuo, WANG Xin, YE Wei, LÜ Yucan, MA Dongxu, GONG Dachun. Functions of the transcription factor ACE1 in *Aspergillus niger* and its effect on the expression and synthesis of β -glucosidase[J]. Microbiology China, 2026, 53(1): 238-253.

摘要:【背景】ACE1 转录因子广泛存在于产纤维素酶的丝状真菌中, 然而其在黑曲霉(*Aspergillus niger*)中的调控功能有待明确。【目的】在 *A. niger* 中敲除和过表达转录因子 ACE1, 探究其对 β -葡萄糖苷酶(β -glucosidase, BGL)表达、菌丝发育和色素合成的调控作用。【方法】以 *A. niger* An-1 为出发菌株, 利用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术, 获得敲除菌株 $\Delta ace1$ 、过表达菌株 *Oace1*。于不同诱导环境下, 检测各菌株中的 BGL 酶活变化、菌丝生长、产孢情况及黄色素合成差异。【结果】系统发育树分析发现, *A. niger* 与里氏木霉(*Trichoderma reesei*)、粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)中 ACE1 的同源性较低。经原生质体转化法将操作质粒和供体片段同时导入, 获得缺失突变菌株 $\Delta ace1$ 。以微晶纤维素、玉米芯粉为诱导物, 纤维二糖为检测底物时, 菌株 $\Delta ace1$ 的 BGL 酶活分别下降了 86.1%、54.9%; 以 *p*-硝基苯酚- α -D-吡喃葡萄糖苷为检测底物时, 菌株 $\Delta ace1$ 的 BGL 酶活分别下降了 23.7%、63.98%。组装过表达框 $P_{gpa-ace1-T_{gla}}$, 在 *kusA* 位点进行精准插入, 成功获得过表达菌株 *Oace1*。以微晶纤维素诱导时, 过表达菌株 *Oace1* 的 BGL 酶活是野生菌株 An-1 的 1.37–2.16 倍。在以甜菊糖苷和微晶纤维素为碳源的培养基上, 缺失菌株 $\Delta ace1$ 的菌丝延伸迟缓、分生孢子梗分化延迟, 而过表达菌株 *Oace1* 与菌株 An-1 的菌丝形态无差异。在以甜菊糖苷为碳源, 进行固、液体培养时, 敲除菌株 $\Delta ace1$ 生物合成黄色素的能力显著加强。【结论】转录因子 ACE1 正向调控 *A. niger* 的 BGL 表达和产孢能力, 负调控黄色素的合成, 增强 ACE1 表达水平能够有效

资助项目: 湖北省教育厅科学技术研究计划(Q20231201); 湖北省自然科学基金创新发展联合基金(2024AFD178)

This work was supported by the Science and Technology Research Program for Department of Education of Hubei Province (Q20231201) and the Natural Science Foundation of Hubei Province Joint Fund for Innovation and Development (2024AFD178).

*Corresponding authors. E-mail: MA Dongxu, madongxu@ctgu.edu.cn; GONG Dachun, gongdachun@sxdx613.wecom.work

Received: 2025-04-26; Accepted: 2025-06-11; Published online: 2025-07-10

提升 *A. niger* 产 BGL 能力, 本研究为优化 *A. niger* 的产酶性能提供新思路。

关键词: 黑曲霉; ACE1 转录因子; β -葡萄糖苷酶; 孢子分化; 黄色素

Functions of the transcription factor ACE1 in *Aspergillus niger* and its effect on the expression and synthesis of β -glucosidase

WANG Shuo¹, WANG Xin¹, YE Wei¹, LÜ Yucan¹, MA Dongxu^{1,2*}, GONG Dachun^{1*}

¹ College of Biological and Pharmaceutical Sciences, China Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei, China

² College of Hydraulic and Environmental Engineering, China Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei, China

Abstract: **[Background]** The transcription factor ACE1 is widely present in cellulase-producing filamentous fungi, while its regulatory function in *Aspergillus niger* remains unclear. **[Objective]** To investigate the regulatory effects of ACE1 on β -glucosidase (BGL) expression, mycelial development, and pigment biosynthesis by deleting and overexpressing ACE1 in *A. niger*. **[Methods]** The knockout strain $\Delta ace1$ and overexpression strain *Oace1* were constructed with the parent strain An-1 through CRISPR-Cas9 gene editing. The BGL activity, mycelial growth, sporulation, and yellow pigment were determined under various induction conditions. **[Results]** The phylogenetic analysis revealed low homology of *ace1* between *A. niger* and *Trichoderma reesei* or *Neurospora crassa*. The mutant $\Delta ace1$ was successfully constructed after introduction of the CRISPR-Cas9 plasmid and the donor fragment. When microcrystalline cellulose (MCC) and corncob powder were used as inducers, the BGL activity of $\Delta ace1$ with cellobiose as the substrate decreased by 86.1% and 54.9%, and that of $\Delta ace1$ with *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (pNPG) as the substrate decreased by 23.7% and 63.98%, respectively. The overexpression cassette $P_{gpd-ace1-T_{gla}}$ was precisely integrated into the *kusA* locus to construct *Oace1*. The BGL activity of *Oace1* was 1.37–2.16 times that of the wild strain An-1 with MCC as the inducer. On the medium with stevioside or MCC as the carbon source, $\Delta ace1$ showed delayed hyphal extension and conidiophore differentiation, while *Oace1* retained normal morphology. The yellow pigment biosynthesis ability of $\Delta ace1$ was significantly enhanced in the solid and liquid media containing stevioside. **[Conclusion]** The transcription factor ACE1 positively regulates BGL expression and sporulation, while it negatively regulates yellow pigment synthesis in *A. niger*. Strengthening the expression of ACE1 effectively improves BGL production. This study provides a new strategy for optimizing the enzyme production performance of *A. niger*.

Keywords: *Aspergillus niger*; transcription factor ACE1; β -glucosidase; sporulation; yellow pigment

纤维素酶主要包括内切葡聚糖酶(endo- β -1,4-glucanase, EG)、外切葡聚糖酶(exo- β -1,4-glucanase, CGH)和 β -葡萄糖苷酶(β -glucosidase, BGL)^[1],其作为重要酶制剂,广泛应用于食品、化工、造纸、农业、养殖业领域^[2]。在非粮生物质开发方面,纤维素酶将纤维素水解成糖,用于微生物发酵生产乙醇、丁醇、二元酸、长链脂肪酸等多种高值化学品,在新一代碳源秸秆糖的生物制造产业中具有重要的意义^[3-5]。脉孢菌属(*Neurospora*)、木霉菌属(*Trichoderma*)和曲霉属(*Aspergillus*)的丝状真菌被广泛用于纤维素酶的工业生产^[6-9],但限速酶 BGL 仍面临含量少、酶活低的困境^[10]。黑曲霉(*Aspergillus niger*)作为分泌 BGL 的优势菌株^[11],其在生物合成 BGL 过程中的限制有待于进一步被解除。

虽然 *A. niger* 具有完善的蛋白合成分泌系统^[12],但其纤维素酶基因的表达受控于严谨的转录调控网络^[13]。近些年来,在粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)、里氏木霉(*Trichoderma reesei*)、草酸青霉(*Penicillium oxalicum*)中,研究者们已鉴定出 40 多个调控因子参与了纤维素酶基因的表达^[10],然而,在 *A. niger* 中仅有 CREA、XLNR、CLRA、CLRB、AMYR 转录调控因子被证明参与了 BGL 的生物合成,潜在的关键调控因子仍需要进一步挖掘和鉴定^[14-17]。转录因子 ACE1 最初被发现于 *T. reesei* 中,属于锌指蛋白类别,具有 3 个 Cys(2)-His(2)结构单元,在外切葡聚糖酶基因 *cbh1* 的启动子区域存在 8 个 ACE1 的结合位点(5'-AGGCAA-3'和 5'-AGGCA-3')^[18]。*T. reesei* ALKO2221 的转录因子 ACE1 抑制了纤维素酶的生物合成,*ace1* 基因的缺失使纤维素酶的酶活提高了大约 2 倍^[19]。在 *P. oxalicum* 114-2 中,缺失 *ace1* 基因使滤纸酶活力提升了 1.8 倍^[20]。利用 RNAi 技术抑制嗜热毁丝霉(*Myceliophthora thermophila*) *ace1* 基因的表达,沉默菌株 A98 的纤维素酶活均有所提升,其中 BGL 酶活高出野生菌株 2.3 倍^[21]。

基于转录因子 ACE1 在纤维素酶表达过程中的重要作用,该转录因子成为调控改造的重要靶点。Zhu 等^[22]将 *T. reesei* Rut-C30 的负调控因子 ACE1 甲基化位点 R383 突变为谷氨酰胺,从而降低 ACE1 与 DNA 位点的结合,致使突变菌株的滤纸酶活提升了 85%。Sun 等^[23]将 *T. reesei* *cbh1* 启动子区域中的 ACE1 结合位点分别替换为正调控因子 Ace2 和 XYR1 的结合位点,得到工程化启动子 *cbh1pA* 和 *cbh1pX*,甘露聚糖酶的酶活力增加了 3.6-5.0 倍。Xia 等^[24]在 *T. reesei* ZU-02 中将 *bgl* 基因的表达框整合在基因位点,在敲除 *ace1* 基因的同时过表达 *bgl* 基因,使 BGL 酶活提升至 25.13 U/mL,高于出发菌株 167 倍。Fonseca 等^[25]在 *T. reesei* Br_TrR01 的 *ace1* 基因位点上整合了正调控因子 XYR1 表达框,在敲除 *ace1* 基因的同时过表达 XYR1,所构建工程菌株 Br_TrR02 的 BGL 酶活从 0.74 U/mg 提升至 4.6 U/mg。另外,*ace1* 基因的缺失会造成 *T. reesei* 与 *P. oxalicum* 在固体培养基上孢子发育和菌丝生长的延迟^[18-20]。然而,该转录因子在 *A. niger* 中的相关调控作用还未见报道。

鉴于转录因子 ACE1 在其他丝状真菌中的重要调控作用,本研究以自主筛选获得的 *A. niger* An-1 为研究对象,探索该转录因子对 *A. niger* 产酶性能、菌体发育和色素合成的调控作用,以期为高产 BGL 工程 *A. niger* 的调控改造提供有效靶点和理性策略。

1 材料与方法

1.1 样品

A. niger An-1, 实验室保存。大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α , 南京诺唯赞生物科技股份有限公司。pFC332 与 pUC19 质粒,湖南丰晖生物科技股份有限公司, pFC332-Cas9-sgRNA 质粒,本实验室保存。pUC-sgRNA,南京金唯智生物科技股份有限公司。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,序列见表 1。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Name	Primer sequence (5'→3')
Ace 5S-F	GAACATATACTGGGCCCGGAAGATCTGGTTGGAGATTCCAGACTCAG
Ace 5S-R	CTAGGGGGTCCCTCATCATCGACATACAACAGAAGGGATTC
Ace sg-F	CGATGATGAGGACCCCCTAGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
Ace sg-R	CGGAAACAGCTATGACCATGAAAAAAGCACCGACTCGG
pFC332-F	ACCCTGTGAGTCTTGATAGAC
pFC332-R	CCGTTTCGAGAGCATGATC
KUS5S-R	CAGGGTTTTATCATCACCATACATACAACAGAAGGGATTTCG
KUSsgRNA-F	ATGGTGATGATAAAACCCTGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
quAce-F	GGGACGCCACGTCG
quAce-R	GTAGTTTTAATAGCTCACCTTGCGC
qdAce-F	GCCAAGGTGAGCTATTAATAACTACGACTCCGGACCAGGTTAGTT
qdAce-R	AGTTGTTGTTGTTGCCGGT
bglAce-F	AGGTGAGCTATTAATAACTACCGATGAACTGCTAGACTGGTG
bglAce-R	GATTGCTCGTCTGTTGGGG
bglAce-F	GCCCCAACAGACGAGCAATCGACTCCGGACCAGGTTAGT
ouAce-F	CTCTAGAGGATCCCCGGGTACCAATAAGATCAGAGCTACAAACCAG
ouAce-R	ATTCTGAAGTCTGGGCCAAGTTC
ogpd-F	CTTGGCCAGACTTCAGAATCAAGTCACGTTGTCCATAATTG
ogpd-R	CGGGGGTTTTGAGACTTCATTGTTTAGATGTGTCTATGTGGC
oAce-F	CACATAGACACATCTAAACAATGAAGTCTCAAAACCCCG
oAce-R	CTAGAACGGTGGCATCTGCG
oter-F	CGCAGATGCCACCGTTCTAGACAATCAATCCATTTGCTATAGTTAAAG
oter-R	TAGCGATTGCGCAGCAAC
odAce-F	CGCAGATGCCACCGTTCTAGACAATCAATCCATTTGCTATAGTTAAAG
odAce-R	CGGCCAGTGAATTCGAGCTCGGCCTTCTTACCGGCATTTGAG
kusAyz-F	GTACGCAAATTTACCCATGAACTTG
kusAyz-R	CTGATCACGGGCTGTCAAC
bglyz-R	GCTCAGCCTTGAGCAGCTTGTTGAGAGTGTAGCTG
Aceyz-F	ATGAATACCATTTCGCAATCCAGACG
Aceyz-R	TACCTAGAACGGTGGCATCTGCG

1.2 主要试剂和仪器

限制性内切酶 *Bgl* II、*Kpn* I, New England Biolabs 公司; 质粒提取试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、2×Rapid *Taq* Master Mix、2×Phanta Max Master Mix (Dye Plus)、DL5000 DNA marker、DL15000 DNA marker、Ultra Gel Red (10 000×), 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 琼脂糖凝胶, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 50×TAE, 上海碧云天生物技术有限公司; 无缝

克隆试剂盒, 上海都友生物科技有限公司; 真菌基因组 DNA 提取试剂盒、潮霉素、蜗牛酶和溶菌酶, 北京索莱宝科技有限公司; 纤维素酶, 上海麦克林生化科技股份有限公司。光学显微镜, 宁波舜宇仪器有限公司。

1.3 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar, PDA) (g/L): 马铃薯 200.0、葡萄糖 20.0、琼脂 20.0, 在后续原生质体转化得到的转化子筛

选中添加 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素 B (hygromycin B, hyg B) 抗生素。

种子培养基(g/L): 羧甲基纤维素钠 15.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.6, KH_2PO_4 1.0, 酵母浸粉 1.0。

玉米芯发酵培养基(g/L): 玉米芯粉末(50目) 40.0, 酵母浸粉 10.0, KH_2PO_4 4.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.8, CaCl_2 0.5, 吐温-80 0.3 mL, 微量元素(MnSO_4 0.32%, ZnSO_4 0.28%, CoCl_2 0.4%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1%) 0.5 mL。

甜菊糖苷发酵培养基(g/L): 甜菊糖苷 15.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10.0, 尿素 2.5, KH_2PO_4 2.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0, 吐温-80 3 mL, 微量元素 0.1 mL, 固体培养基加入琼脂 20.0。

微晶纤维素发酵培养基(g/L): 微晶纤维素 20.0, CaCl_2 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.6, KH_2PO_4 5.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5, 固体培养基加入琼脂 20.0。

TC 缓冲液(g/L): CaCl_2 5.5, Tris 1.2, pH 5.8。

STC 缓冲液: D-山梨醇 242.3 g, TC 缓冲液定容至 1 L。

50% PEG 缓冲溶液: PEG-6000 5.0 g, TC 缓冲液定容到 10 mL。

CD 高渗琼脂培养基(g/L): 蔗糖 342.0, NaNO_3 3.0, KCl 2.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1.0, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, 琼脂 20.0。

1.4 黑曲霉 An-1 中 ACE1 的氨基酸序列分析

从 NCBI 网站下载 *A. niger* (XP_001397517.3)、*T. reesei* (XP_006962963.1)、米曲霉(*Aspergillus oryzae*) (XP_023089397.1)、构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*) (XP_660523.1)、烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*) (XP_754813.1)、棘孢曲霉(*Aspergillus aculeatus*) (XP_020055641.1)、粗糙脉孢菌(*N. crassa*) (XP_963927.3)、草酸青霉(*Penicillium oxalicum*) (XP_049965567.1) 的氨基酸序列, 使用 MEGA 11 软件绘制系统发育树, 分析含有 *ace1* 基因丝状真菌的遗传进化关系。

1.5 基因编辑靶位点的设计

使用 sgRNA 靶位点设计网站 CHOPCHOP (<http://chopchop.cbu.uib.no/>), 选取 *A. niger* 基因组的生物信息, 在输入 *ace1* 靶基因的核苷酸序列后得到靶位点序列列表, 综合考虑靶标位置、G+C 含量、二级结构、脱靶基因编辑效率, 选择高效编辑靶位点。

1.6 用于敲除 *ace1* 基因的靶向质粒和供体片段的构建

将设计好的靶位点加在 Ace 5S-F 和 Ace sg-R 引物(表 1)中, 用真菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 *A. niger* 基因组。以 *A. niger* 基因组为模板, 以 Ace 5S-F 和 Ace 5S-R 为引物扩增携带靶位点的 5S rRNA 启动子片段, 以 pUC-sgRNA 质粒为模板, 以 Ace sg-F/R 为引物扩增携带靶位点的 sgRNA, 其中 PCR 反应体系(50 μL): 2 \times Phanta Max Master Mix (Dye Plus) 25 μL , 上、下游引物(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)各 2 μL , DNA 模板(100 $\text{ng}/\mu\text{L}$) 1 μL , ddH₂O 20 μL 。PCR 反应条件: 95 $^\circ\text{C}$ 5 min; 95 $^\circ\text{C}$ 30 s, 60 $^\circ\text{C}$ 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 1 min, 30 个循环; 72 $^\circ\text{C}$ 5 min。对 PCR 产物进行纯化回收, 经融合 RCR, 使用引物 Ace 5S-F 和 Ace sg-R, 将 5S rRNA 和 sgRNA 片段组装为 5S rRNA-*ace1*-sgRNA-T6 表达框, 其中融合 PCR 反应体系(50 μL): 2 \times Phanta Max Master Mix (Dye Plus) 25 μL , 上、下游引物(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)各 2 μL , DNA 模板 100 ng (各片段摩尔比为 1:1), ddH₂O 20 μL 。

使用 *Bgl* II 酶切处理 pFC332 质粒, 经无缝克隆, 将 5S rRNA-*ace1*-sgRNA-T6 表达框整合至 pFC332 线性化载体。挑取多个转化子, 使用 pFC332-F/R 进行菌液 PCR 验证, 反应体系(10 μL): 2 \times Rapid Taq Master Mix 5 μL , 上、下游引物(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)各 1 μL , 菌液 1 μL , ddH₂O 2 μL 。PCR 反应条件: 95 $^\circ\text{C}$ 10 min; 95 $^\circ\text{C}$ 30 s, 60 $^\circ\text{C}$ 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 1 min, 30 个循环; 72 $^\circ\text{C}$ 5 min。经琼脂糖凝胶电泳, 将片段大小正确的 Cas9 与 sgRNA 共表达质粒 pFC332-Cas9-sgRNA, 送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

敲除供体 QAce1 片段的构建: 以 *A. niger* 基因组为模板, 以 quAce-F/R 和 qdAce-F/R 为引物, 扩增靶位点附近的 *ace1* 基因上、下游片段。经融合 PCR, 以 quAce-F 和 qdAce-R 为引物将上、下游片段融合为供体片段。敲除供体 QAce1-BGL 片段的构建: 以 *A. niger* 基因组为模板, 以 bglAce-F/R 和 bglAce-F/qdAce-R 为引物, 扩增 *bgl* 基因和下游同源臂, 经融合 PCR, 以 quAce-F 和 qdAce-R 为引物将上游片段、*bgl* 基因和下游片段融合为供体片段。以上 PCR 产物通过醋酸钠-乙醇沉淀法纯化回收。

1.7 用于过表达 *ace1* 基因的靶向质粒和供体片段的构建

将设计 *kusA* 基因的靶位点加在 KUS5S-R 和 KUSsgRNA-F 上, 以 *A. niger* 基因组为模板, 以 KUS5S-F/Ace 5S-R 为引物扩增携带靶位点的 5S rRNA 启动子片段, 以 pUC-sgRNA 质粒为模板, 以 KUSsgRNA-F/Ace sg-R 为引物扩增携带靶位点的 sgRNA。2 个片段经融合 PCR 扩增, 获得 5S rRNA-*kus*-sgRNA-T6 表达框。按照 pFC332-Cas9-sgRNA 的构建方法, 获得靶向质粒 pFC332-*kusA*-sgRNA, 送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

以 *A. niger* 基因组为模板, 以 ouAce-F/R、odAce-F/R、ogpd-F/R、oAce-F/R 和 oter-F/R 为引物, 分别扩增插入位点 *kusA* 的上、下游片段, P_{gpd} 启动子片段、*ace1* 基因片段与 T_{gla} 终止子片段。使用 *Kpn* I 酶切处理 pUC19 质粒, 以上片段经无缝克隆实现多个片段的组装, 得到过表达框 P_{gpd} -*ace1*- T_{gla} 。

1.8 基因编辑菌株的筛选和验证

本研究采用 PFG 介导的原生质体转化法, 实现靶向质粒与供体模板的转化。具体为: 取新鲜制备的 *A. niger* 孢子悬液, 均匀涂布在铺有玻璃纸的 PDA 培养基上, 于 28 °C 培养 16–18 h。将培养好的附有菌丝体的玻璃纸置于含有 10 mL 复合酶液(1%纤维素酶+0.5%蜗牛酶+0.25%溶菌酶)的无菌培养皿中酶解处理 2 h。6 000 r/min、

10 °C 离心 10 min, 收集原生质体, 使用 STC 缓冲液洗涤 2 次后进行悬浮, 得到用于转化的原生质体。

取 100 μ L 原生质体加入 3 μ g 靶向质粒与 3 μ g 供体片段, 混合均匀, 冰浴 20 min。加等体积的 50% PEG 缓冲溶液, 混合均匀后, 25 °C 孵育 20 min。加入 2 mL STC 缓冲液, 混合均匀, 置于 28 °C 静置孵育 4 h, 6 000 r/min、10 °C 离心 10 min, 收集菌体沉淀, 均匀涂布于含 300 μ g/mL 潮霉素的 CD 培养基上, 28 °C 培养 3–5 d。待转化子长出后, 转接于含 300 μ g/mL 潮霉素的 PDA 固体平板上, 28 °C 培养 2–3 d, 分离并筛选出抗性转化子。

采用菌丝 PCR 对 *A. niger* 转化子进行筛选和验证: 挑取适量菌丝于含有 45 μ L 2 mmol/L NaOH 溶液的离心管中, 混匀后 95 °C 加热 10 min, 待冷却后加入 5 μ L 2 mmol/L Tris-HCl 溶液, 裂解液 12 000 r/min 离心 10 min 后取上清作为模板。以 Aceyz-F/R 为引物检验菌株 $\Delta ace1$, 以 Ace1yz-F/bglyz-R 为引物检验菌株 $\Delta ace1$ -*bgl*, 以 kusAyz-F/R 为引物检验菌株 *Oace1*。将菌丝 PCR 验证正确的菌株进一步送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.9 黑曲霉 An-1 及其基因编辑菌株的菌落形态比较

将各菌株制成 10^7 的孢子悬液, 吸取 1 μ L 孢子悬液, 分别点接在 PDA 固体平板、甜菊糖苷固体平板、微晶纤维素固体平板上, 置于 28 °C 培养箱, 于 24、48、72 h 观察菌株形态并记录。制片时用接种针刮取少量菌丝样本, 置于洁净载玻片上, 滴加适量无菌蒸馏水, 轻柔覆盖盖玻片。将制备好的玻片置于光学显微镜载物台上, 使用 10 倍目镜配合 20 倍物镜(总放大倍数 200 \times)进行显微观察, 系统记录菌丝形态特征。

1.10 黑曲霉 An-1 及其基因编辑菌株的发酵培养及酶活、黄色素合成能力分析

取 10^7 个孢子接种量接种于种子培养基, 30 °C、200 r/min 振荡培养 24 h, 以 10% 的接种

量分别转接至玉米芯、甜菊糖苷、微晶纤维素发酵培养基, 30 °C、200 r/min 振荡培养, 在以甜菊糖苷为诱导物的发酵培养基中, 于第 2 天加入 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g。于第 3–7 天取适量发酵液, 12 000 r/min 离心 10 min 后取上清进行酶活测定, 并根据颜色变化初步判断基因编辑菌株与出发菌株 An-1 在合成黄色素能力上的差异。

1.11 酶活检测分析

以 *p*-硝基苯酚- β -D-吡喃葡萄糖苷 (*p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside, pNPG) 为底物测定 BGL 酶活: 取 15 μL 粗酶液加入 150 μL 5 mmol/L pNPG 底物溶液中, 70 °C 反应 10 min 后立即取 60 μL 加入 100 μL 1 mol/L 碳酸钠溶液中, 于 405 nm 测定吸光值。以每毫升酶液每分钟产生 1 μmol 的对硝基苯酚 (*p*-nitrophenyl, pNP) 所需要的酶量定义为一个酶活力单位 (U)。

以纤维二糖为底物测定 BGL 酶活: 取 100 μL

粗酶液加入 100 μL 10 mmol/L 纤维二糖底物溶液中混合, 最适温度 70 °C 反应 10 min 后, 冰水冷却终止反应。取 2.5 μL 反应液和 2.5 μL 校准品分别加入 250 μL 葡萄糖测定试剂中, 在 505 nm 处检测吸光值。以每毫升酶液每分钟产生 1 μmol 葡萄糖所需要的酶量定义为 1 个酶活力单位 (U)。

2 结果与分析

2.1 ACE1 的生物信息分析

Saloheimo 等^[18]通过酵母杂交体系在 *T. reesei* 中首次分离出调控纤维素酶表达的转录因子 ACE1。此后, 在不同丝状真菌中相继发现了 ACE1, 并揭示了其在纤维素酶合成中的表达调控功能。通过 MEGA 11 软件, 将 *A. niger* 的 ACE1 与 7 个不同来源的同系物进行比对分析, 所构建的系统发育树如图 1 所示。*A. niger* 和

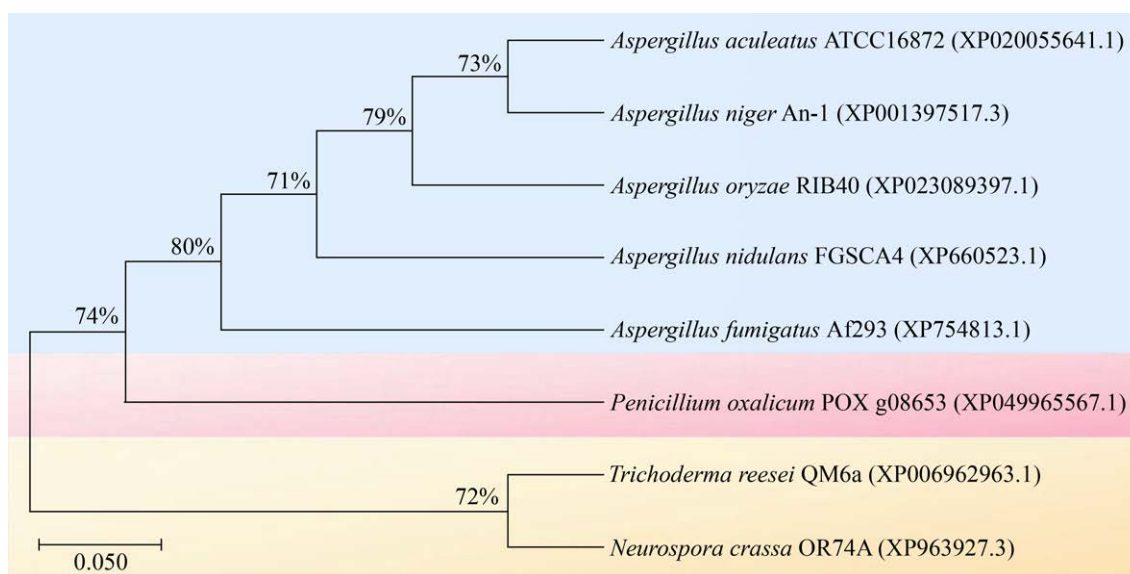


图 1 基于 ACE1 的氨基酸序列构建的系统发育树 图中括号内数值为各个丝状真菌 *ace1* 基因的 GenBank 登录号; 分支节点处的数字代表 bootstrap 值, 反映该节点在系统发育树中的可靠性, 该值 $\geq 70\%$ 即为可接受阈值; 比例尺表示遗传距离。

Figure 1 Phylogenetic tree constructed based on ACE1 amino acid sequence. Numbers in parentheses are GenBank accession numbers of *ace1* genes of the strains. The numbers at the branch nodes represent the bootstrap values, which reflect the reliability of the nodes in the evolutionary tree. The value $\geq 70\%$ is considered an acceptable threshold. The scale represents the genetic distance.

A. aculeatus ACE1 表现出较高保守性, *A. oryzae*、*A. nidulans* 与 *A. fumigatus* 的 ACE1 组成一个分支, 说明不同曲霉的 ACE1 具有一定差异性。*P. oxalicum* ACE1 为一个分支, 而 *T. reesei* 与 *N. crassa* 的 ACE1 组成另一个分支, 与曲霉的同源性较低, 可能会在调控作用方面表现较大差异。

2.2 *ace1* 基因靶向敲除载体与供体 DNA 的构建

采用 CRISPR-Cas9 系统进行 *ace1* 基因的精准敲除。首先, 经融合 PCR 将 20 bp 靶点序列引入 5S rRNA-*ace1*-sgRNA 表达框, 如图 2A、2B 所示, 该表达框的长度约为 570 bp; 随后, 采用无缝克隆的方式, 将 sgRNA 的表达框整合至 pFC332 表达载体中, 经菌液 PCR 与测序验证, 重组质粒构建成功(图 2C、2D)。

本研究设计了 2 种不同的敲除供体片段, 其中如图 2E 所示, *Qace1* 敲除供体仅造成了 *ace1* 基因编码序列的缺失。经融合 PCR 和测序验证, 成功获得 *Qace1* 敲除供体, 条带长度为 1.0 kb (图 2F)。考虑 *T. reesei*、*P. oxalicum* 等丝状真菌中 ACE1 转录因子负调控纤维素酶的合成, 而且在 *T. reesei* 中同时敲除 *ace1* 基因与过表达 *bgl* 基因能够促进 BGL 分泌, 因此, 在 *Qace1*-BGL 敲除供体中引入了 BGL 表达框如图 2G 所示, 经融合 PCR 和测序验证, 成功获得 *Qace1*-BGL 敲除供体, 条带长度 5.31 kb (图 2H)。

2.3 *ace1* 基因突变体的筛选与基因型鉴定

通过 PEG 介导的原生质体转化法, 将靶向质粒与敲除供体共同转化至 *A. niger* 菌株中, 随后将潮霉素抗性的 CD 高渗固体培养基上的转化子接种于抗性 PDA 平板上。待转化子长出后挑取菌丝, 利用碱裂解法破菌后, 对转化子进行 PCR 检测。采用 *Ace1yz*-F/R 引物进行菌丝 PCR, 未敲除成功的条带长度为 2.2 kb, 而 *Qace1* 供体导入所获菌株 $\Delta ace1$ 的条带长度仅为 1.1 kb (图 3A)。采用 *Ace1yz*-F/*bglyz*-R 引物

进行菌丝 PCR, 野生菌株未扩增出条带, 而 *Qace1*-BGL 供体导入所获 $\Delta ace1$ -*bgl* 菌株条带长度约为 3.2 kb (图 3B)。进一步经测序检验, 菌株 $\Delta ace1$ 和 $\Delta ace1$ -*bgl* 构建成功。

本研究使用强启动子 P_{gpd} 优化 *ace1* 基因的表达, 所构建的操作质粒靶向 *kusA* 位点, 供体片段由靶位点上游 500 bp 片段、 P_{gpd} -*ace1*- T_{gla} 的过表达框和靶位点下游 500 bp 片段组装而成。靶向质粒与过表达供体片段共同转入至 *A. niger* An-1, 经菌丝 PCR 验证, 编辑菌株的条带大小为 6.5 kb, P_{gpd} -*ace1*- T_{gla} 表达框插入到基因组上的 *kusA* 位点, 成功获得过表达菌株 *Oace1* (图 4)。

2.4 转录因子 ACE1 对黑曲霉生长发育与合成黄色素的调控作用

如图 5 所示, 在以葡萄糖为碳源的 PDA 平板上, 菌株 $\Delta ace1$ 展示出与野生菌株相同的生长速度, 菌落大小一致, 形成了致密的黑色孢子, 未呈现出生长发育差异。在以甜菊糖苷为碳源培养 72 h 时, 野生菌株 An-1 和过表达菌株 *Oace1* 的菌落直径较大, 分化出黑色孢子, 然而 *ace1* 基因的敲除使 *A. niger* 的菌丝延伸迟缓, 菌落直径较小, 孢子发育还未发育成熟。在以微晶纤维素为碳源培养 72 h 时, 各菌株的菌落直径无明显差异, 相较于野生菌株 An-1 和过表达菌株 *Oace1*, 敲除菌株的孢子相对稀疏。进一步通过光学显微镜观察发现, 野生菌株和菌株 *Oace1* 分生孢子梗顶端膨大, 形成典型的放射状球形顶囊, 成熟的孢子已发散, 而菌株 $\Delta ace1$ 分生孢子梗相对较小, 孢子还未发育成熟。

野生菌株 An-1 在以甜菊糖苷为碳源的固体平板背部呈淡黄色, 而菌株 $\Delta ace1$ 呈亮黄色。在以甜菊糖苷为碳源的摇瓶发酵中, 野生菌株 An-1 的发酵液澄清透亮, 然而, *ace1* 基因的敲除, 使发酵液呈现明显黄化现象。在以微晶纤维素和玉米芯为碳源发酵时, 发酵液上清并未显示出颜色差异(图 6)。以上结果说明, 在特定碳源下转录因子 ACE1 负调控黄色素的生物合成。

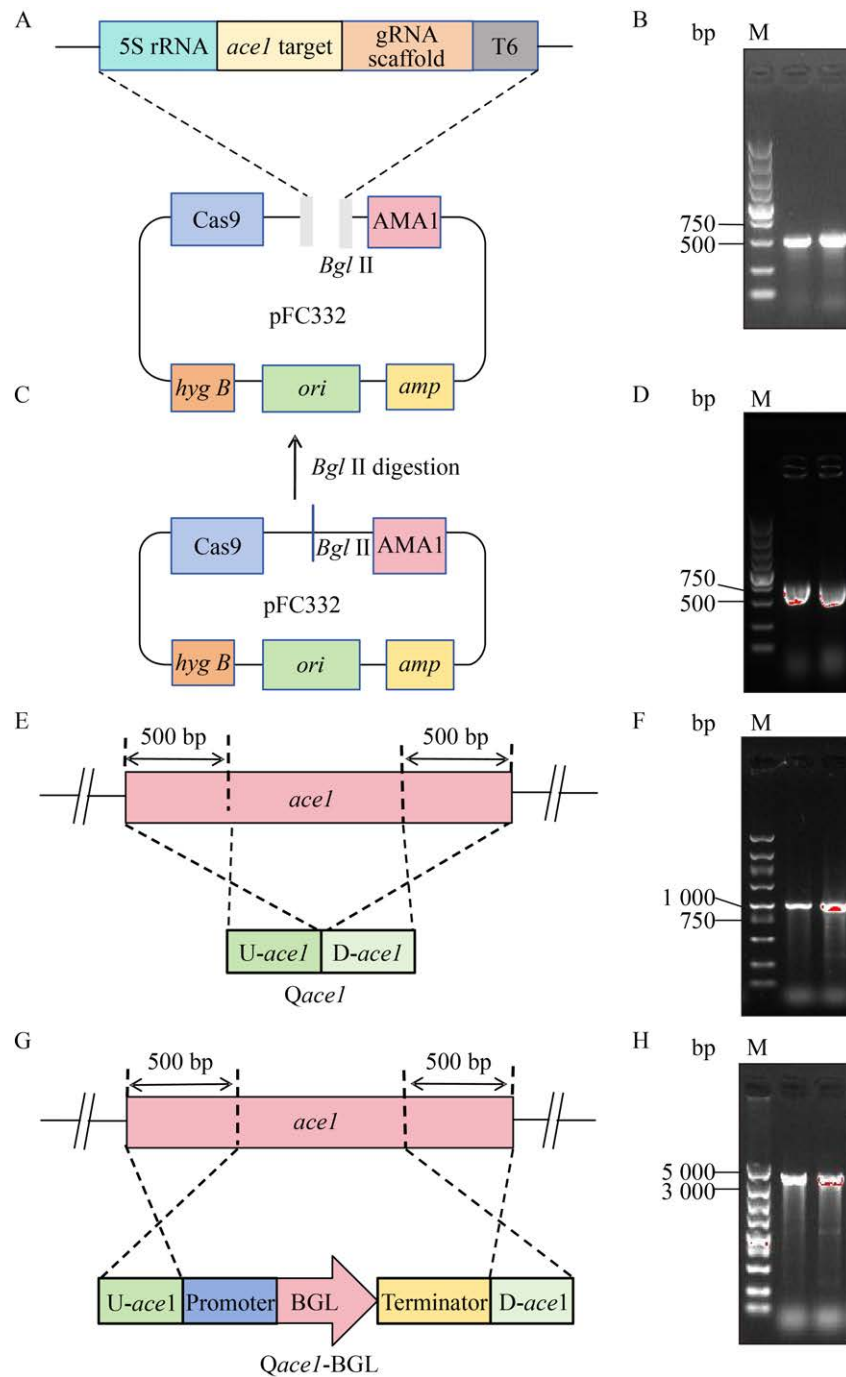


图2 用于敲除 *ace1* 基因的靶向质粒与供体片段的构建 A-B: 5S rRNA-*ace1*-sgRNA 表达框的构建与电泳检测; C-D: 敲除 *ace1* 基因靶向质粒的构建与电泳检测; E-F: *Qace1* 敲除供体片段的构建与电泳检测; G-H: *Qace1*-BGL 敲除供体片段的构建与电泳检测。

Figure 2 Construction of targeted plasmid and donor fragments for deleting *ace1* gene. A-B: Assembly and verification of the 5S rRNA-*ace1*-sgRNA expression cassette; C-D: Construction and verification of the targeted plasmid for deleting *ace1* gene; E-F: Assembly and verification of *Qace1* donor fragment for deleting *ace1* gene; G-H: Assembly and verification of *Qace1*-BGL donor fragment for deleting *ace1* gene. M: DL5000 DNA marker.

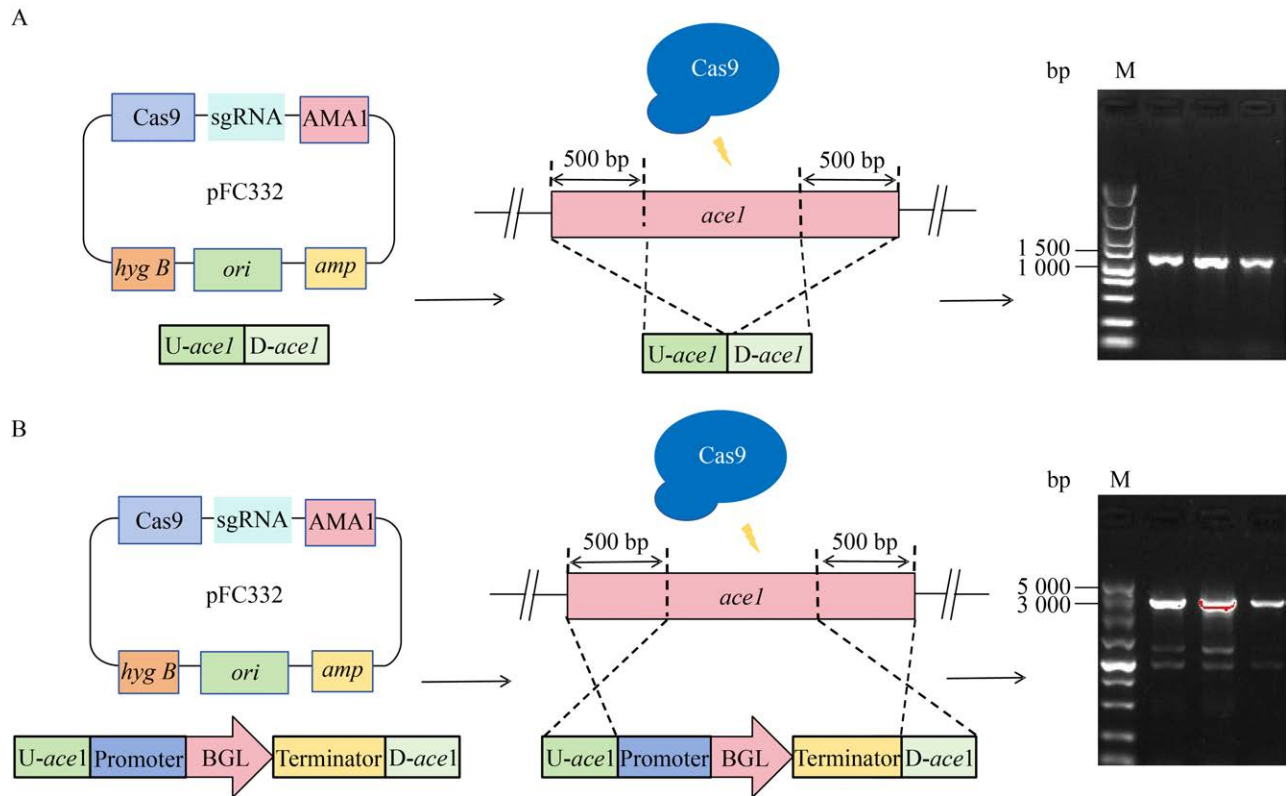


图 3 *ace1* 基因缺失菌株筛选和验证 A: *ace1* 基因的敲除; B: BGL 表达框在 *ace1* 位点的整合。

Figure 3 Screening and verification of the *ace1* knockout strains. A: Knockout of the *ace1* gene; B: Integration of the BGL expression cassette at the *ace1* locus. M: DL5000 DNA marker.

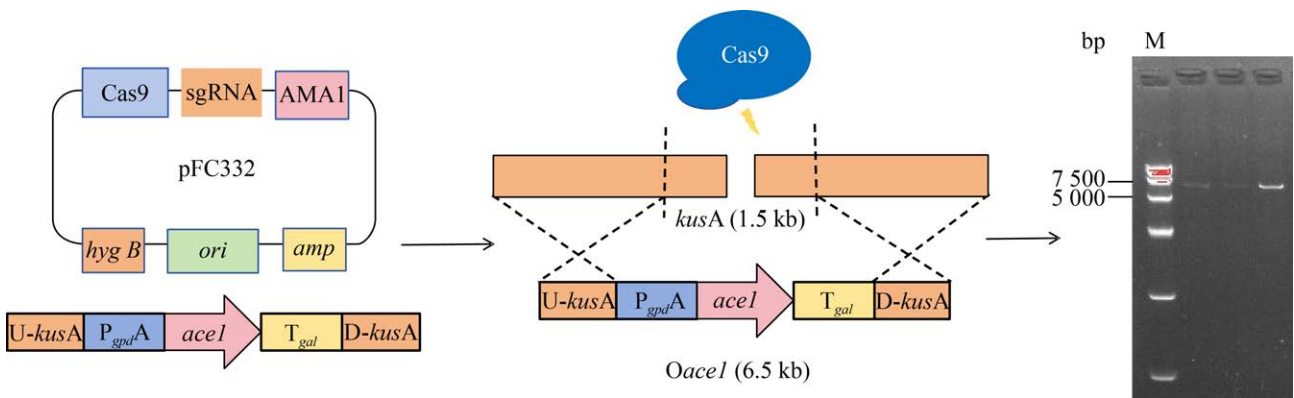


图 4 *ace1* 基因在 *kusA* 位点的过表达

Figure 4 Overexpression of the *ace1* gene at the *kusA* locus. M: DL5000 DNA marker.

2.5 *ace1* 基因缺失对黑曲霉产 BGL 的影响

在液体摇瓶发酵时,结果如图 7A 和 7B 所示,以微晶纤维素为诱导物时,野生菌株 An-1 以纤维

二糖和 pNPG 为底物的酶活分别为 2.038 U/mL 和 1.416 U/mL,相比之下,菌株 $\Delta ace1$ 的酶活分别为 0.283 U/mL 和 1.08 U/mL,减少了 86.1%和 23.7%,菌株 $\Delta ace1$ -*bgl*的酶活分别为 1.69 U/mL

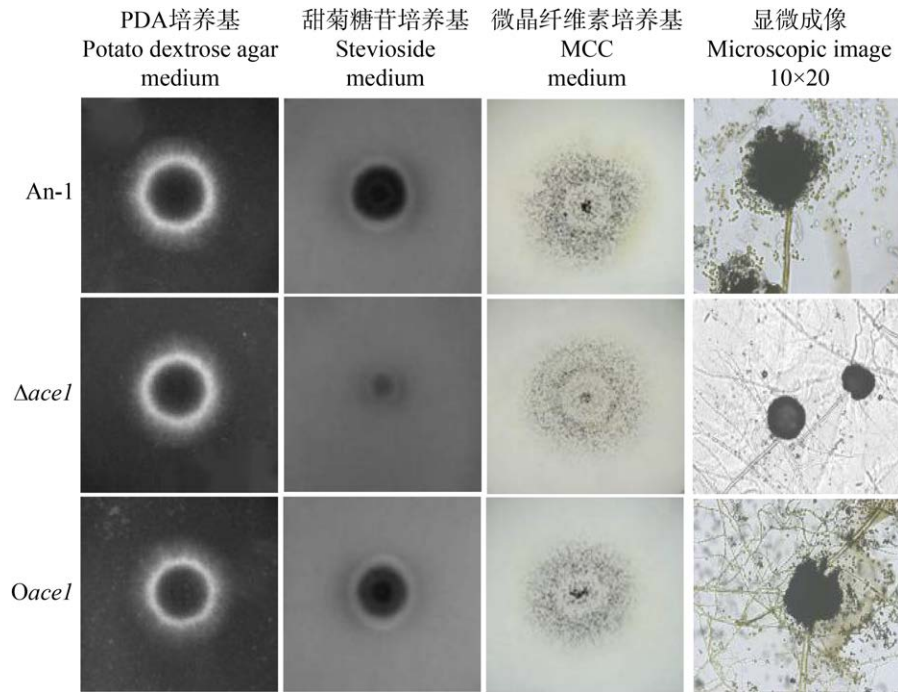


图5 转录因子 ACE1 在不同碳源下对黑曲霉生长发育的调控作用

Figure 5 Regulatory role of transcription factor ACE1 on the growth and development of *Aspergillus niger* under different carbon sources.



图6 转录因子 ACE1 对黑曲霉合成黄色素的调控作用

Figure 6 Regulatory role of transcription factor ACE1 in the biosynthesis of yellow pigment in *Aspergillus niger*.

和 1.31 U/mL, 减少了 17.1% 和 7.49%。以玉米芯为诱导物时, 分别利用纤维二糖和 pNPG 为底物测定不同菌株产 BGL 的能力, 野生菌株 An-1 的酶活分别为 14.76 U/mL 和 8.674 U/mL, 相比

之下, 菌株 $\Delta ace1$ 的酶活分别为 6.66 U/mL 和 3.124 U/mL, 减少了 54.9% 和 63.98%。菌株 $\Delta ace1-bgl$ 的酶活分别为 10.58 U/mL 和 5.11 U/mL, 减少了 28.31% 和 41.1% (图 7C、7D)。在以甜

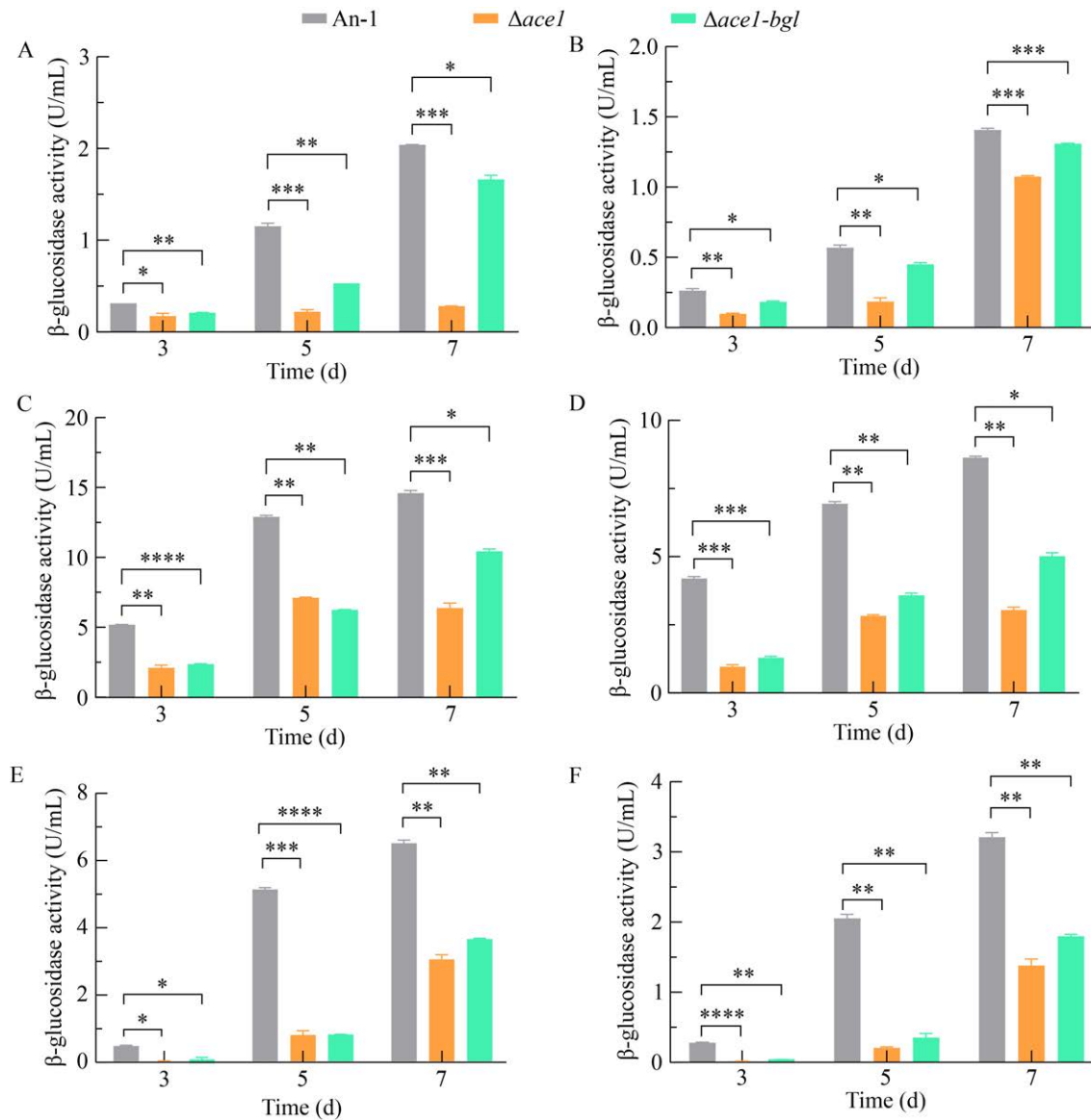


图 7 *ace1* 基因缺失对黑曲霉产 β -葡萄糖苷酶的影响 A-B: 以微晶纤维素为诱导物; C-D: 以玉米芯为诱导物; E-F: 以甜菊糖苷为碳源的摇瓶发酵; A、C 和 E 以纤维二糖为底物测定 BGL 酶活; B、D 和 F 以 pNPG 为底物测定 BGL 酶活。

Figure 7 Impact of *ace1* gene knockout on β -glucosidase (BGL) production in *Aspergillus niger*. A-B: Using microcrystalline cellulose as the inducer; C-D: Using corn cob as the inducer; E-F: Shake flask fermentation using stevioside as carbon source. A, C and E represent BGL activity determined by cellobiose as substrate; B, D, and F represent BGL enzyme activity assayed with pNPG as substrate. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$.

菊糖苷为碳源的摇瓶发酵中, 菌株 $\Delta ace1$ 以纤维二糖和 pNPG 为底物时, BGL 酶活下降了 55.3%和 55.7%, 如图 7E 和图 7F 所示。*A. niger* 在敲除 *ace1* 基因后, 酶活水平出现明显下降, 以上结果表明转录因子 ACE1 正调控 *A. niger* BGL 的合成, 这与 *M. thermophila*、*T. reesei*、*P. oxalicum* 中的负调控作用截然相反。

2.6 过表达 *ace1* 基因促进黑曲霉分泌 BGL

经发酵检测, 结果如图 8A、8B 所示, 以

微晶纤维素为诱导物时, *Oace1* 菌株以纤维二糖和 pNPG 为底物的酶活分别为 2.797 U/mL 和 3.057 U/mL, 是野生菌株 An-1 的 1.37–2.16 倍。以玉米芯为诱导物时, 分别利用纤维二糖和 pNPG 为底物测定不同菌株产 BGL 的能力, 第 5 天 *Oace1* 的 BGL 酶活为 15.67 U/mL 和 7.815 U/mL, 略高于野生菌株 An-1, 第 7 天两者酶活无明显差异(图 8C、8D)。以上结果表明, 优化转录因子 ACE1 的表达量是促进 *A. niger* 产 BGL 的有效方法。

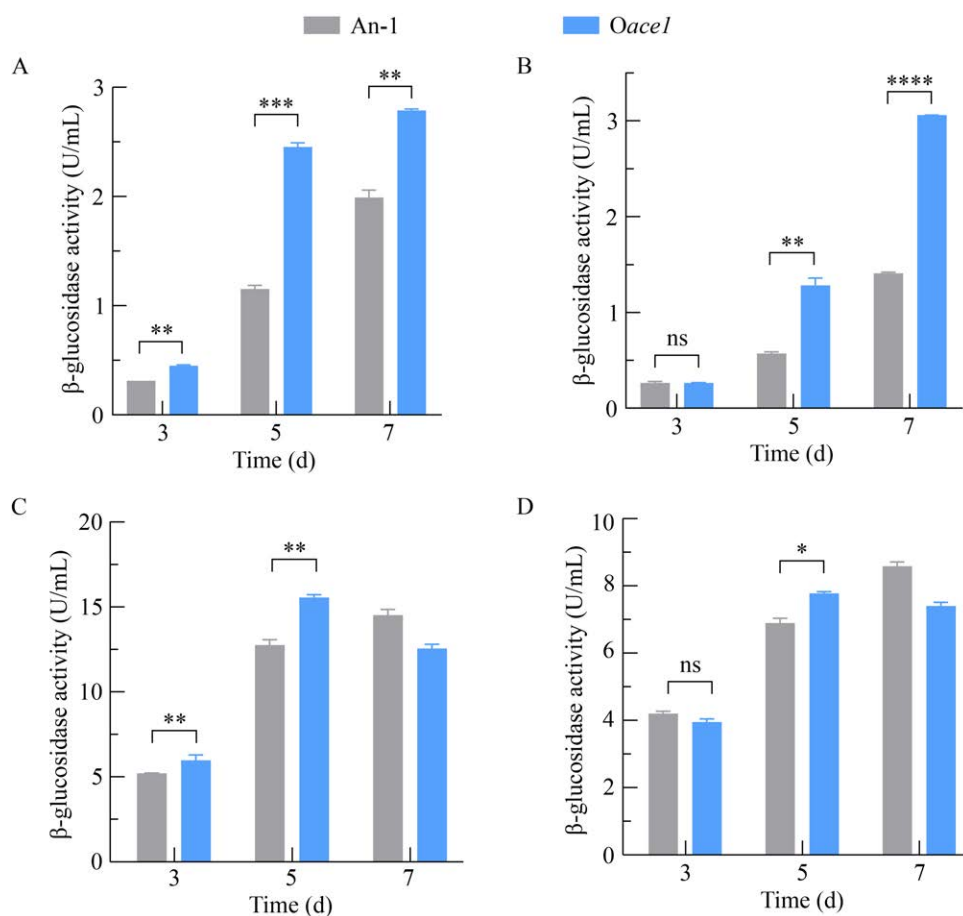


图 8 过表达 *ace1* 基因促进黑曲霉分泌 β -葡萄糖苷酶 A–B: 以微晶纤维素为诱导物; C–D: 以玉米芯为诱导物; A 和 C 以纤维二糖为底物测定 BGL 酶活; B 和 D 以 pNPG 为底物测定 BGL 酶活。

Figure 8 Impact of overexpression of *ace1* gene on β -glucosidase (BGL) production in *Aspergillus niger*. A–B: Using microcrystalline cellulose as the inducer; C–D: Using corncob as the inducer. A and C represent BGL activity determined by cellobiose as substrate; B and D represent BGL enzyme activity assayed with pNPG as substrate. ns: Not significant; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$.

3 讨论

有关部门的相关方案指出,提高纤维素酶的酶解效率是木质纤维素原料利用的关键^[26],然而商业化纤维素酶制剂中 BGL 占比少,阻碍了纤维素水解糖的高效制备与应用。*A. niger* 虽然具备分泌 BGL 的优势,但产酶能力受到转录调控网络的制约^[13],潜在关键调控因子有待挖掘和鉴定。鉴于 ACE1 转录因子在丝状真菌表达纤维素酶的重要作用,本研究进一步探讨了其在 *A. niger* 中的调控功能,以为高产 BGL 菌株的调控改造提供关键靶点。

A. niger An-1 中 *ace1* 基因的敲除造成了 BGL 酶活的下降,说明 ACE1 该酶的表达中具有正调控作用,这一现象与其他丝状真菌中 ACE1 作为纤维素酶负调控因子的功能有所不同。研究表明,N端缺少 242 个氨基酸的 *T. reesei* ACE1,在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中呈现出对 *cbh1* 启动子的激活作用,但全长的 ACE1 被证实是主要纤维素酶的负调控因子^[19],说明 ACE1 的 N 端区域具有重要功能。*A. niger* 与 *T. reesei* ACE1 的 N 端氨基酸序列相似度仅有 27%,这或许造成了两者在调控功能上的差异。在分子机制方面,淀粉酶调控因子 AMYR 在 *A. niger* 中正调控 BGL 表达,*amyR* 基因的敲除降低了 *A. niger* BGL 的酶活^[15]。类似地,*T. reesei* AMYR 的同源转录因子 BGLR 正调控 *bgl* 基因的表达^[27]。而 *P. oxalicum ace1* 基因的缺失下调了淀粉酶调控因子 AMYR 的表达^[20],因此,推测 ACE1 通过调控 AmyR 的表达影响 *A. niger* BGL 合成。

在以葡萄糖为碳源的 PDA 平板上,*ace1* 基因敲除后 *A. niger* 形态没有差异,但是在以甜菊糖苷为碳源的培养基中,形态发育受到阻碍。类似地,*T. reesei ace1* 缺失菌株在葡萄糖上正常生长,但是纤维素平板上的菌落直径变小^[18],说明转录因子 ACE1 对 *A. niger* 和 *T. reesei* 生长发育

的调控依赖于碳源。然而,*P. oxalicum ace1* 缺失菌株在葡萄糖为碳源的培养基上菌落变小^[20],表明不同菌株中转录因子 ACE1 对形态发育的调控有所差异。

丝状真菌所产黄色素被鉴定属于 sorbicillinoids 家族,是由聚酮合酶基因簇催化合成^[28],YPR1 与 YPR2 分别为调控黄色素生成的激活因子和抑制因子^[29]。过表达 *ypr1* 基因和敲除 *ypr2* 基因,所构建的工程菌株 *T. reesei* 增强了黄色素合成,却伴随着生物量降低、细胞壁受损、抗逆性减弱和纤维素酶基因表达水平的下降^[30]。在本研究中,*ace1* 基因的敲除使 *A. niger* 产生了大量黄色素,表明该调控因子负调控了黄色素的合成。

4 结论

综上所述,本研究首次揭示了 *A. niger* ACE1 的功能多样性:*ace1* 基因的敲除导致 *A. niger* 在甜菊糖苷和微晶纤维素培养基上菌落形态的变化,菌丝和孢子的形成出现了延迟,BGL 酶活下降以及黄色素累积增加,表明 ACE1 正调控了 *A. niger* 的菌丝生长发育、*bgl* 基因的表达,而负调控了黄色素的合成。另外,本研究进一步过表达了 *ace1* 基因,提高了 *A. niger* BGL 酶活。在后续研究中,本团队将解析 ACE1 影响 *bgl* 基因表达的具体调控机制,以便构建 *A. niger* BGL 的转录调控网络。另一方面,采用组合操纵 ACE1 与其他关键转录因子的方式,获得高效产酶菌株,以实现更高水平的 BGL 酶活。

作者贡献声明

王硕:方案设计,实验操作,数据分析,撰写文章;叶伟:方案设计;王昕、马东旭:写作指导,修改文章;吕育财、龚大春:监督指导,审阅。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] TRIPATHI M, LAL B, SYED A, MISHRA PK, ELGORBAN AM, VERMA M, SINGH R, MOHAMMAD A, SRIVASTAVA N. Production of fermentable glucose from bioconversion of cellulose using efficient microbial cellulases produced from water hyacinth waste[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 252: 126376.
- [2] RANJAN R, RAI R, BHATT SB, DHAR P. Technological road map of cellulase: a comprehensive outlook to structural, computational, and industrial applications[J]. Biochemical Engineering Journal, 2023, 198: 109020.
- [3] DEY P, SINGH J, SCARIA J, ANAND AP. Improved production of cellulase by *Trichoderma reesei* (MTCC 164) from coconut mesocarp-based lignocellulosic wastes under response surface-optimized condition[J]. 3 Biotech, 2018, 8(9): 402.
- [4] GONG CJ, CAO LP, FANG DL, ZHANG JQ, KUMAR AWASTHI M, XUE DS. Genetic manipulation strategies for ethanol production from bioconversion of lignocellulose waste[J]. Bioresource Technology, 2022, 352: 127105.
- [5] MA XY, GAO M, LIU S, LI Y, SUN XH, WANG QH. An innovative approach for reducing the water and alkali consumption in the lactic acid fermentation via the reuse of pretreated liquid[J]. Bioresource Technology, 2022, 352: 127108.
- [6] 李金根, 刘倩, 刘德飞, 张永利, 郑小梅, 朱欣娜, 刘萍萍, 高乐, 王婧婷, 蔺玉萍, 张以恒, 张学礼, 田朝光. 秸秆真菌降解转化与可再生化工[J]. 生物工程学报, 2022, 38(11): 4283-4310.
- [7] LI JG, LIU Q, LIU DF, ZHANG YL, ZHENG XM, ZHU XN, LIU PP, GAO L, WANG JT, LIN YP, ZHANG YH, ZHANG XL, TIAN CG. Plant biomass degradation by filamentous fungi and production of renewable chemicals: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(11): 4283-4310 (in Chinese).
- [8] 曹张磊, 王德培, 张岚. 提高根瘤农杆菌介导黑曲霉转化效率的研究[J]. 天津科技大学学报, 2016, 31(2): 20-25.
- [9] CAO ZL, WANG DP, ZHANG L. Improvement of transformation efficiency of *Aspergillus niger* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Journal of Tianjin University of Science & Technology, 2016, 31(2): 20-25 (in Chinese).
- [10] 刘相致, 程驰, 赵悦, 汪超俊, 张颖, 薛闯. 里氏木霉中纤维素酶的合成诱导及调控[J]. 中国生物工程杂志, 2022, 42(10): 93-104.
- [11] LIU XZ, CHENG C, ZHAO Y, WANG CJ, ZHANG Y, XUE C. Induction and regulation of cellulase synthesis in *Trichoderma reesei*[J]. China Biotechnology, 2022, 42(10): 93-104 (in Chinese).
- [12] 刘国栋, 高丽伟, 曲音波. 青霉生产木质纤维素降解酶系的研究进展[J]. 生物工程学报, 2021, 37(3): 1058-1069.
- [13] LIU GD, GAO LW, QU YB. Progress in the production of lignocellulolytic enzyme systems using *Penicillium* species[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021, 37(3): 1058-1069 (in Chinese).
- [14] 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[J]. Bioresource Technology, 2021, 329: 124746.
- [15] MA XY, LI SP, TONG XX, LIU K. An overview on the current status and future prospects in *Aspergillus* cellulase production[J]. Environmental Research, 2024, 244: 117866.
- [16] 姚善涇, 蔡礼年, 林东强. 黑曲霉作为分泌蛋白细胞工厂的研究进展[J]. 化工学报, 2019, 70(10): 3690-3703.
- [17] YAO SJ, CAI LN, LIN DQ. Progress in *Aspergillus niger* as cell factory for secretory proteins[J]. CIESC Journal, 2019, 70(10): 3690-3703 (in Chinese).
- [18] KERKAERT JD, HUBERMAN LB. Regulation of nutrient utilization in filamentous fungi[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2023, 107(19): 5873-5898.
- [19] CULLETON H, McKIE V, de VRIES RP. Physiological and molecular aspects of degradation of plant polysaccharides by fungi: What have we learned from *Aspergillus*[J]. Biotechnology Journal, 2013, 8(8): 884-894.
- [20] STRICKER AR, MACH RL, de GRAAFF LH. Regulation of transcription of cellulases- and hemicellulases-encoding genes in *Aspergillus niger* and *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*)[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 78(2): 211-220.
- [21] RAULO R, KOKOLSKI M, ARCHER DB. The roles of the zinc finger transcription factors XlnR, ClrA and ClrB in the breakdown of lignocellulose by *Aspergillus niger*[J]. AMB Express, 2016, 6(1): 5.
- [22] VANKUYK PA, BENEN JAE, WÖSTEN HAB, VISSER J, de VRIES RP. A broader role for AmyR in *Aspergillus niger*: regulation of the utilisation of D-glucose or D-galactose containing oligo- and polysaccharides[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(1): 285-293.
- [23] SALOHEIMO A, ARO N, ILMÉN M, PENTTILÄ M. Isolation of the ace1 gene encoding a Cys(2)-His(2) transcription factor involved in regulation of activity of the cellulase promoter *cbh1* of *Trichoderma reesei*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(8): 5817-5825.
- [24] ARO N, ILMÉN M, SALOHEIMO A, PENTTILÄ M. ACE1 of *Trichoderma reesei* is a repressor of cellulase and xylanase expression[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(1): 56-65.
- [25] 张艳美. 草酸青霉纤维素降解酶系主要转录调控因子研究及菌株改良[D]. 济南: 山东大学, 2014.
- [26] ZHANG YM. Functional analysis of the major (hemi)cellulase transcription factors in *Penicillium oxalicum* and strain engineering[D]. Jinan: Shandong University, 2014 (in Chinese).
- [27] 杨帆. 转录因子 CRE1 及 ACE1 在嗜热毁丝霉纤维素酶基因表达调控中的作用[D]. 深圳: 深圳大学, 2015.
- [28] YANG F. The regulatory roles of transcription factors CRE1 and ACE1 in cellulase gene expression in *Myceliophthora thermophila*[D]. Shenzhen: Shenzhen

- University, 2015 (in Chinese).
- [22] ZHU ZH, ZOU G, CHAI SX, XIAO ML, WANG YM, WANG PP, ZHOU ZH. The protein methyltransferase TrSAM inhibits cellulase gene expression by interacting with the negative regulator ACE1 in *Trichoderma reesei*[J]. *Communications Biology*, 2024, 7: 375.
- [23] SUN XH, ZHANG XH, HUANG HQ, WANG Y, TU T, BAI YG, WANG YR, ZHANG J, LUO HY, YAO B, SU XY. Engineering the *cbh1* promoter of *Trichoderma reesei* for enhanced protein production by replacing the binding sites of a transcription repressor ACE1 to those of the activators[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(5): 1337-1346.
- [24] XIA Y, YANG LR, XIA LM. Combined strategy of transcription factor manipulation and β -glucosidase gene overexpression in *Trichoderma reesei* and its application in lignocellulose bioconversion[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2018, 45(9): 803-811.
- [25] FONSECA LM, PARREIRAS LS, MURAKAMI MT. Rational engineering of the *Trichoderma reesei* RUT-C30 strain into an industrially relevant platform for cellulase production[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2020, 13: 93.
- [26] 工业和信息化部. 工业和信息化部等六部门关于印发加快非粮生物基材料创新发展三年行动方案的通知[EB/OL]. (2023-01-09) [2025-07-05]. https://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2023-01/14/content_5736864.htm.
- Ministry of Industry and Information Technology. Official notice on the issuance of the three-year action plan for accelerating innovative development of non-food biomass-based materials, jointly released by the ministry of industry and information technology and five other ministries[EB/OL]. (2023-01-09) [2025-07-05]. https://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2023-01/14/content_5736864.htm (in Chinese).
- [27] NITTA M, FURUKAWA T, SHIDA Y, MORI K, KUHARA S, MORIKAWA Y, OGASAWARA W. A new Zn(II)₂Cys₆-type transcription factor BglR regulates β -glucosidase expression in *Trichoderma reesei*[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2012, 49(5): 388-397.
- [28] HOU XW, ZHANG XP, XUE MY, ZHAO ZT, ZHANG HZ, XU D, LAI DW, ZHOU LG. Recent advances in sorbicillinoids from fungi and their bioactivities (covering 2016–2021)[J]. *Journal of Fungi*, 2022, 8(1): 62.
- [29] ZHANG WX, AN N, GUO JQ, WANG ZX, MENG XF, LIU WF. Influences of genetically perturbing synthesis of the typical yellow pigment on conidiation, cell wall integrity, stress tolerance, and cellulase production in *Trichoderma reesei*[J]. *Journal of Microbiology*, 2021, 59(4): 426-434.
- [30] YANG J, LI JX, ZHANG F, ZHAO XQ. Global regulation of fungal secondary metabolism in *Trichoderma reesei* by the transcription factor Ypr1, as revealed by transcriptome analysis[J]. *Engineering Microbiology*, 2023, 3(2): 100065.