

丝状真菌高效表达异源蛋白研究进展

钟耀华, 王晓利, 汪天虹

山东大学微生物技术国家重点实验室, 济南 250100

摘要: 丝状真菌是具有高效分泌蛋白质潜力的真核表达系统, 能对蛋白质进行翻译后修饰, 如蛋白质糖基化等; 并且比植物、昆虫和哺乳动物细胞具有更快的生长速率。近年来, 随着真菌分子遗传技术和菌种改良策略的进步, 尤其是真菌基因组学的发展, 利用丝状真菌生产异源蛋白越来越受到关注。综述了丝状真菌作为细胞工厂生产异源蛋白的最新探索与进展, 其中包括功能基因组学在蛋白表达与分泌研究中的应用, 同时探讨了异源蛋白表达和生产的改进策略。

关键词: 丝状真菌, 异源蛋白表达, 蛋白质分泌, 蛋白质糖基化, 功能基因组学

Recent Advances in the Production of Heterologous Proteins in Filamentous Fungi

Yaohua Zhong, Xiaoli Wang, and Tianhong Wang

State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China

Abstract: Filamentous fungi can secrete large amounts of proteins, glycosylate proteins and grow faster than plant, insect or mammalian cells. With the advances in fungal molecular genetics, strain improvement, and especially fungal genomics, filamentous fungi are developed as microbial cell factories for the production of heterologous proteins. This review focuses on recent developments of filamentous fungi as production hosts, such as protein quality control mechanisms, the secretion pathways, protein modification, strain stability, and most importantly the application of functional genomics in protein expression. At the same time, the strategies for improving heterologous protein production were also discussed in details.

Keywords: filamentous fungi, heterologous protein expression, protein secretion, protein glycosylation, fungal genomics

丝状真菌在发酵工业上长期以来一直用于抗生素、酶类和有机酸等的生产, 尤其在工业用酶生产中确立了核心地位^[1]。工业用酶的国际市场每年大约数十亿美元, 并且在不断增长, 其中近 40%的酶类生产来自丝状真菌^[2]。丝状真菌强大的分泌酶类等蛋白质的能力是与它们的生活方式相适应的^[3]。菌丝顶端和分支不断生长向底物拓殖, 利用菌丝体

分泌各种大量的蛋白将底物降解为可被吸收的营养分子供生长需要。例如, 某些瑞氏木霉(*Trichoderma reesei*)菌株分泌的胞外总蛋白可达 40 g/L^[4]。这种高效生产和分泌蛋白的能力是细菌无法相比的, 同时, 丝状真菌还能进行各种翻译后加工, 如糖基化修饰、蛋白酶切割和二硫键的形成等, 这使其成为能够完成真核蛋白质精确的翻译后修饰的潜在表达宿

Received: August 31, 2007; **Accepted:** November 22, 2007

Supported by: the National Natural Science Foundation of China (Nos. 30670029, 30270024), the National Basic Research Program (973) of China (No. 2003CB716006) and the Natural Science Research Foundation for the Doctoral Program of Higher Education Ministry of China (No. 20040422042).

Corresponding author: Tianhong Wang. Tel: +86-531-88366118; E-mail: wangtianhong@sdu.edu.cn

国家自然科学基金(Nos.30670029, 30270024)、国家重点基础研究规划(973) (No. 2003CB716006) 和教育部博士点基金(No. 20040422042)资助。

主^[5]。即使与酵母相比,丝状真菌糖基化作用也明显占有优势,因为它与哺乳动物更接近,甚至可形成与哺乳动物一致的糖基化结构(GlcNac2Man5),而酵母生产的蛋白总表现出高甘露糖型(GlcNac2Man20)^[6]。工业丝状真菌在安全性方面更值得放心,由于许多菌种如黑曲霉(*Aspergillus niger*)、米曲霉(*A. oryzae*)和 *T. reesei* 等长期以来应用于食品及食品加工,已被联邦食品与药品管理局认定属于 GRAS(generally recognized as safe)和 FDA(food-additive)范围的菌株^[6,7]。与哺乳动物细胞、昆虫等高等生物表达系统相比,丝状真菌培养简便,成本低,而且生长迅速,容易大规模开发形成产业化。另外,由于产物可分泌到培养基中,不需要破壁提取产物,分离纯化等下游加工过程简单。同时,丝状真菌的发酵工艺比较成熟,为工程菌迅速投入工业生产打下了良好基础^[8]。

传统上,提高丝状真菌产物产量的方法是突变筛选或者优化发酵条件。通常,工业菌株筛选育种(selective breeding)很难成功,因为许多工业重要的丝状真菌缺乏有性阶段^[9]。二十年前,在构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)、*A. niger* 和 *T. reesei* 等几种工业重要真菌中发展起来的 DNA 介导转化系统开启了探索以这些真菌作为蛋白表达系统的研究方向。此后的发展非常迅速,各种基因工程方法如强启动子控制、引入多拷贝基因、表达融合蛋白、缺失蛋白酶活力等提高重组蛋白表达的技术已比较成熟,为丝状真菌高效生产异源蛋白奠定了基础^[10]。许多同源和异源真菌蛋白在丝状真菌中已实现高效表达,但是来源于其他高等生物如动物和植物基因的表达受到瓶颈限制而产量不高^[11]。为了充分挖掘丝状真菌作为细胞工厂生产异源蛋白的巨大潜力,目前研究主要集中在胞内蛋白质量控制的细胞机制、分泌途径改造、蛋白修饰加工以及工程菌稳定性等方面,并取得了显著进步。尤其是自 2002 年 FGI(fungal genome initiative)发表第一份真菌测序白皮书以来,真菌基因组测序和相关“组学”实验技术的发展迅速^[12],如基因微阵列技术和蛋白质组学等,这些“组学”研究为实现丝状真菌高效表达异源蛋白提供了更为广阔的前景。本文对上述提到的这些最新探索与进展进行了综述,同时对丝状真菌异源蛋白表达和生产的改进策略进行了探讨。

1 丝状真菌在表达异源蛋白中的应用

丝状真菌作为代谢物和酶的来源已有几百年历史,而利用其表达蛋白的研究和应用仅仅 20 年的光景,比大肠杆菌生产蛋白(如人胰岛素)的商业应用(1981 年)晚了不到 10 年时间。这主要得益于真菌分子遗传技术的进步,丝状真菌 DNA 转化系统的建立为生产重组蛋白奠定了基础^[13]。编码目的蛋白的基因借助载体转入丝状真菌宿主并整合到基因组中,可以实现稳定表达。利用丝状真菌大量分泌蛋白的能力生产具有经济价值的异源蛋白已经成为上世纪 90 年代以来丝状真菌分子遗传学和代谢工程研究的热点^[11]。

丝状真菌表达的异源蛋白主要分为两类:工业用酶和高等生物的基因产物(通常是药物)。虽然丝状真菌表达异源蛋白的水平总是比生产内/同源蛋白低得多,但一些实例已取得了相当的成功。表 1 总结了丝状真菌表达系统生产的主要异源蛋白及产量。从中可以看到,丝状真菌异源表达其他真菌蛋白如肌醇六磷酸酶和天门冬氨酸蛋白酶的产量最高可至 2~3 g/L^[11,15],这显然是可以工业化生产的水平。丝状真菌表达人类白细胞介素 hIL-6 是一个有潜在价值的领域,利用不同曲霉宿主结合使用不同的启动子对 hIL-6 进行了表达研究。结果发现,摇瓶培养的蛋白产量从 0.1 mg/L 到 150 mg/L 不等,其中以 PglA 为启动子并与内源葡萄糖淀粉酶 A 相融合的 *A. niger* 转化子最高产量达到了 150 mg/L^[16]。另外一种哺乳动物蛋白牛凝乳酶原(bovine prochymosin)在抱盛曲霉(*A. awamori*)的产量达到了 1 g/L 的水平,在食品应用中已经工业化生产^[13]。在表达植物蛋白方面,Moreljo 等作出了突出贡献,他们利用 *A. awamori* 生产植物甜蛋白 Thaumatin,经过 3 年的不断努力,终于使其产量由最初 9 mg/L 提高到 150 mg/L 的水平^[17-19]。最近报道了另一种植物甜蛋白 Neoculin(NCL)的表达研究^[20],该项研究具有一定创新性,因为 NCL 是一种异源二聚体蛋白,Nakajima 等利用带有 KEX2 剪切位点的 α -淀粉酶分别与两个蛋白亚基融合,结果成功获得了与天然 NCL 同样活性的重组 NCL。嗜热酶具有很高的应用价值,2002 年 Faria 等以 *T. reesei* 为宿主成功将嗜热真菌 *Humicola grisea* var. *thermoidea* 的木聚糖酶 2 进行了表达,摇瓶产量达到了 500 mg/L^[21]。而刚刚

表 1 丝状真菌表达的主要异源蛋白及产量
Table 1 Yields of the major heterologous proteins produced in filamentous fungi

| Heterologous protein | Expression system | Donor | Yield / (mg/L) | Refs |
|--|-------------------|------------------------------------|----------------|------|
| Thaumatin | <i>A. awamori</i> | <i>Thaumatococcus daniellii</i> | 150 | [19] |
| α -galactosidase | <i>A. awamori</i> | <i>Cyamopsis tetragonoloba</i> | 12 | [13] |
| Bovine prochymosin | <i>A. awamori</i> | calf | 1000 | [13] |
| Interferon | <i>A. awamori</i> | human | > 2000 | [13] |
| llama variable heavy-chain antibody fragments (VHHs) | <i>A. awamori</i> | human | 7.5 | [26] |
| Interleukin 6 | <i>A. niger</i> | human | 150 | [16] |
| Porcine pancreatic phospholipase A | <i>A. niger</i> | pig | 10 | [74] |
| Hen egg white lysozyme | <i>A. niger</i> | hen | 209 | [75] |
| tissue-type plasminogen activator (t-PA) | <i>A. niger</i> | human | 12 | [58] |
| IgG1 (κ), trastuzumab | <i>A. niger</i> | human | 900 | [14] |
| Fab' antibody fragment | <i>A. niger</i> | human | 1 200 | [14] |
| Mn-dependent peroxidase | <i>A. niger</i> | <i>Phanerochaete chrysosporium</i> | 100 | [76] |
| Neoculin | <i>A. oryzae</i> | <i>Curculigo latifolia</i> | 2 | [20] |
| Aspartic proteinase | <i>A. oryzae</i> | <i>Rhizomucor miehei</i> | 3000 | [15] |
| Phytase | <i>T. reesei</i> | <i>Aspergillus spp.</i> | 2000 | [11] |
| Endochitinase | <i>T. reesei</i> | <i>T. harzianum</i> | 130 | [77] |
| Xylanase 2 | <i>T. reesei</i> | <i>Humicola grisea</i> | 500 | [78] |

报道的一项研究显示, *T. reesei* 成功表达了另一种嗜热真菌 *Chaetomium thermophilum* 的三个木聚糖酶 Ct xyn11A、Ct xyn11B 和 Ct xyn11C, 在 70°C 下的酶活力比出发菌株分别提高了 260 倍、100 倍和 2.5 倍^[22]。因此, 利用丝状真菌为宿主可能是获得工业生产水平嗜热酶的有希望选择。鉴于丝状真菌生产和分泌异源蛋白的巨大潜力, 以丝状真菌作为细胞工厂的研究和开发在最近几年已经成为生物技术的热点领域^[6, 11, 23]。

工业上用于异源蛋白表达的丝状真菌生产菌株主要是 *A. niger*、*A. oryzae*、*T. reesei*、*A. awamori*、*A. nidulans*、*A. foetidus*、*A. sojae*、长枝木霉(*T. longibrachiatum*)等, 其中前 4 种是最为常用的。直到现在, 被开发用于重组蛋白生产的丝状真菌为数并不多。现代真菌生物技术的蓬勃发展吸引了传统发酵工业和其他工业领域的广泛关注, 为避开那些已受专利保护的菌株, 寻找新的真菌表达宿主就很有必要。最近报道的一个比较有吸引力的表达系统是 *Chrysosporium luknowense* (一种白腐真菌), 其优点是: 高转化效率、中性 pH 条件下进行蛋白质表达、发酵液粘度低以及发酵时间较短等^[24]。另一个表达异源蛋白的生产菌株是禾谷镰刀菌 (*Fusarium graminearum*), 这种真菌经过严格检测而在人类食

品上得以应用, 用于生产首个真菌蛋白 Quorn, 因此它也是生产药用蛋白的理想菌株^[25]。正在发展的其他系统还有日本曲霉 (*A. japonicus*)和酱油曲霉 (*A. sojae*)等。

2 影响丝状真菌异源蛋白表达的因素及改良策略

丝状真菌生产异源蛋白遇到的问题主要是大多数哺乳动物、植物和细菌来源的蛋白远低于真菌内源蛋白表达水平(每升发酵液数十克), 通常仅达到每升发酵液几十毫克^[6, 13]。表达蛋白的产量至少在每升几克的水平, 才能适应或达到工业发酵规模的需求^[2]。而目前除了凝乳酶原等少数蛋白的产量稍高之外, 其他异源蛋白产量都远达不到这个水平。为了使丝状真菌获得异源蛋白的高表达和分泌产量, 克服该瓶颈的研究一直在不断开展。异源蛋白产量低的瓶颈问题可以发生在不同水平, 如转录、翻译、翻译后修饰加工、分泌和胞外降解等^[13]。先前的研究主要集中在基因拷贝数、转录水平和目的蛋白的降解方面。许多实例显示, 通过强启动子、增加基因拷贝数、密码子优化、降低蛋白水解活力以及与内源基因融合等可以一定程度提高目的蛋白的产量^[10], 此类研究和综述已不少, 在此不作赘述。由于

前三种策略的运用已经使转录和翻译水平的限制缩减到很低, 甚至已有报道称 mRNA 水平并不是限制因子^[26]。所以, 为了充分挖掘丝状真菌巨大的蛋白分泌生产潜力, 最近的研究开始转向胞内蛋白质量控制的细胞机制、分泌途径研究、糖基化作用和工程菌的稳定性等方面。

2.1 蛋白质质量控制的细胞机制

过量表达的异源蛋白超出细胞承受能力, 多肽链不能及时正确折叠, 从而在内质网内形成错误折叠或未折叠的蛋白质积累, 严重影响蛋白的转运和分泌, 这是影响异源蛋白产量低的重要因素^[13,27]。在表达系统中, 转移到内质网的大流量蛋白对蛋白折叠、转运以及合成蛋白的质量控制提出了更高要求。对于蛋白质质量控制而言, 丝状真菌的研究紧随哺乳动物和酵母之后, 目前已取得很大进展^[28-30]。流经内质网的过量蛋白, 尤其是那些未折叠的蛋白和错误折叠的蛋白, 诱发了通称为蛋白分泌压力响应或内质网(ER)压力响应。非折叠蛋白响应(unfolded protein response, UPR)是其中重要的一种机制, UPR的作用是当蛋白压力增加时, 上调分子伴侣 Bip(binding protein)和蛋白质二硫键异构酶 PDI(protein disulphide isomerase)等折叠酶的表达水平, 促进蛋白质的折叠和运输, 减轻细胞压力^[31]。UPR途径的成分已从 *T. reese* 和 *A. nigeri* 等分离到, 这些成分包括 IRE1、HAC1 以及 UPR 功能基因 *Pdi1* 的同源基因等^[29,32,33]。细胞中未折叠蛋白的感受器是跨膜激酶 Ire1p, 它能检测到未折叠蛋白的聚集, 并将信号传递到细胞核内, 诱导 UPR 特异转录因子 *Hac1* mRNA 的剪接。*Hac1* 可结合到 UPR 功能基因 *Pdi1* 等基因的上游启动转录^[30]。*HAC1* mRNA 剪切过程与酿酒酵母是不同的, 酿酒酵母中是剪切掉 250 nt 的内含子, 而丝状真菌中是 5'端区域被截短并除去 20 nt 的内含子^[33,34]。UPR 与内质网相关蛋白降解途径(ER-associated protein degradation, ERAD)是紧密相联的, ERAD 可将错误折叠或未组装的蛋白直接导入蛋白酶体被 26S 巨大蛋白酶降解^[35]。最近, 在丝状真菌中提出一个新的反馈途径, 命名为分泌压力抑制(repression under secretion stress, RESS)^[36]。该途径在分泌压迫切时发挥作用, 下调一些基因的转录水平。只有正确折叠的蛋白被转运到高尔基体隔室, 在这里蛋白被进一步修饰, 调整蛋白

的功能和稳定性。

对丝状真菌蛋白质质量控制机制的深入研究为增加异源蛋白表达产量提供了改进的方向, 近几年, 从该领域开展了许多工作。*A. niger* 中过量表达 *HacA* 持续诱导 UPR 响应, 使异源白腐菌(*Trametes versicolor*)虫漆酶的产量提高了 7 倍, 而使牛前凝乳酶原的产量提高了 2.8 倍^[37]。*A. awamori* 中过量表达 *BipA* 使植物甜蛋白 Thaumatin 的分泌量获得了 2.5 倍的提高, 达到了 25 mg/L, 但内源淀粉酶和葡萄糖淀粉酶的产量不受影响, 另一方面, 利用反义 RNA 抑制 *BipA* 表达后, Thaumatin 的分泌量减少了 80%, 而没有影响内源蛋白产量^[38]。不过, 也有另外的例子, 在 *T. reesei* 中过表达 *hac1* 对异源虫漆酶的表达没有促进作用, 其他一些研究中也发现过表达 UPR 相关基因产物对于提高异源蛋白的产量没有相应效果^[11], 因此, 这一诱导过程在丝状真菌中可能是产物依赖性的。

2.2 蛋白质分泌途径

分泌途径是胞外蛋白生产的关键, 丝状真菌中囊泡转运和蛋白分泌途径可能是异源蛋白生产的瓶颈所在, 并且具有潜在的可提高分泌能力的机制^[39]。在丝状真菌中, 多细胞管状菌丝由圆柱型隔壁组成, 它们由带孔的隔壁分开, 蛋白分泌一般认为主要发生在菌丝顶端^[19,40]。但是, 对囊泡转运的分子机理的了解仍然很少^[28]。最近一个代表性的工作是在 *A. oryzae* 中利用绿色荧光蛋白(EGFP)系统观测 N-乙酰顺丁烯二酰亚胺敏感因子吸附蛋白受体 SNARE^[41]。SNAREs 的作用是保证识别的特异性和介导运输小泡与目标膜的融合。位于运输小泡上的叫作 v-SNAREs, 位于靶膜上的叫作 t-SNAREs。v-SNAREs 和 t-SNAREs 相互缠绕形成跨 SNAREs 复合体(trans-SNAREs complexes), 并通过这个结构将运输小泡的膜与靶膜拉在一起, 实现运输小泡特异性停泊和融合。有趣的发现是, 一些丝状真菌包括 *Neurospora crassa*^[42]、*A. oryzae*^[41]、*A. niger* 和 *T. reesei*^[43]具有两个质膜 syntaxin 样 t-SNAREs 受体——Sso1p and Sso2p, 而 *A. nidulans* 和 *A. fumigatus* 仅具有一个蛋白^[41], 这暗示着丝状真菌存在两种(或更多种)不同分泌途径。如果的确存在几个分泌途径, 这可能会解释丝状真菌的高分泌能力, 甚至可能在不需影响菌丝顶端生长的条件下提高同源和异源蛋

白的产量。

与EGFP融合的秘密蛋白经常定位到隔壁上^[44, 45], 这说明蛋白分泌不仅发生在菌丝顶端也直接出现在隔壁上。与此相一致的是, 质膜 SNAREs 受体也发现存在于隔壁上^[41]。目前有多少隔壁参与了蛋白分泌还不清楚。尽管有一些争论, 但是利用超分支突变来提高菌丝顶端数目的尝试工作结果可以提高蛋白产量, 其中, 葡萄糖淀粉酶产量提高了至少 1 倍^[46]。因此, 针对隔壁的工程改造也可能有助于提高异源蛋白产量。

2.3 糖基化作用

对于具有生物活性的分泌蛋白来说, 转录后修饰是一个非常关键的步骤。以 *T. reesei* 为例, 据估计约 50% 的蛋白是糖基化的, 所以丝状真菌糖基化作用的研究对于提高异源蛋白表达是很有必要的^[47]。抑制糖基化会降低分泌蛋白的产量, 并诱导非折叠蛋白响应(UPR)^[23], 但是, *A. nidulans* 葡萄糖淀粉酶的过量生产导致了随后的糖基化水平上调^[48], 这表明糖基化加工过程与分泌途径蛋白流变化是相适应的。不过, 工业生产中葡萄糖淀粉酶水平远高于研究中检测的表达量, 糖基化系统在分泌蛋白的不同水平上是否有变化仍然未知^[23]。更深入的研究应该关注在丝状真菌蛋白多糖成分的合成、结构及其功能方面, 无论该酶是同源的还是异源的。

目前已有在酵母中进行人源 N-糖基化研究的报道, 敲除酵母糖基化途径中的内源基因, 并引入相关的真核糖基化酶基因可以对同源及异源蛋白进行人源糖基化修饰^[49]。丝状真菌很可能还具有与哺乳动物系统相似的蛋白修饰性能, 如 N-糖基化等, 这些优点将极大地促进丝状真菌人源糖基化工程的实现。目前, 在丝状真菌中已鉴定了几个与其他生物特异糖基化基因同源的基因, 这为丝状真菌蛋白质的糖基化研究奠定了基础。有研究显示, *A. niger* NW195 的 N-糖基化途径已经人源化, 它是通过表达 HDEL 标签的 *T. reesei* α -甘露糖苷酶和人类 N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 I, 结果在新合成的蛋白中发现有至少 40% 新合成的蛋白上存在 GlcNacMan₅GlcNac₂ 型 N 聚糖^[50]。山东大学微生物技术国家重点实验室开展 *T. reesei* N-聚糖人源化改造已经取得了初步的成果(实验结果另文报道)。另外, 真菌蛋白非人源磷酸甘露糖和呋喃半乳糖的存在, 可能需要人们加深

对丝状真菌人源蛋白质糖基化的进一步研究, 为实现表达人类功能性蛋白奠定基础。同时, 酵母和丝状真菌表达的所有糖蛋白都是非唾液酸型的, 末端唾液酸都必须通过体外操作加入。但是, 真菌细胞壁表面的成分之一就是唾液酸, 这为进一步的研究提供了新的方向。

对 *T. reesei* 纤维二糖水解酶 Cel7A 的研究证实, 培养基的组成对蛋白质糖基化有一定的影响。在基本培养基中可以得到完全的 N 型或 O 型糖基化, 但是, 在复合的生长培养基中观察到多种形式及不同程度的糖基化, 这是胞外多糖修饰酶的分泌后修饰作用造成的^[51]。已有报道显示, 分泌蛋白的 O-糖基化与蛋白的有效分泌相关^[52]。在 *T. reesei* 中, 抑制蛋白的 O-糖基化与抑制 N-糖基化相比, 前者能明显阻滞蛋白分泌^[53]。甘露糖磷酸二酯合成酶(dolichylphosphate mannose synthase, DPMS)是 *T. reesei* 蛋白 O-糖基化形成的一个关键酶。在 *T. reesei* 中过量表达酵母 DPM1 促进 O-糖基化形成, 结果使胞外蛋白的产量提高了 7 倍^[54]。同时发现, 过量表达 DPM1 的 *T. reesei* 细胞壁与野生型完整细胞壁相比, 形成松散的丛毛状结构, 因此推测, 正是因为细胞壁的这种松散空隙使其渗透性增加, 从而提高了分泌蛋白的流量。最近的一项研究也表明, 在 *A. nidulans* DPMS 突变株中过量表达酵母 DPM1 可显著提高葡萄糖淀粉酶的分泌量, 同时电子显微镜观测发现在细胞周质空间有分泌蛋白的累积^[55]。这些研究显示, 促进蛋白 O-糖基化的形成将有助于蛋白的分泌, 从而为提高异源蛋白生产量提供了一个重要策略。

2.4 工程菌的稳定性

异源蛋白产量远不如内源蛋白高, 工程菌本身的稳定性问题也是一个重要方面。菌株稳定性是蛋白生产稳定的前提, 因此在实际生产应用中, 必须对工程菌的稳定性引起重视。

真菌菌丝中存在多核现象, 转入的目的蛋白基因一般不可能同时整合到所有细胞核中, 这样不包含整合 DNA 的细胞核与整合 DNA 的细胞核就会同时出现在同一隔室。传代培养后, 非转化细胞核就会从菌丝中分离出来而形成无生产能力的部分或个体。即使重组 DNA 在一个细胞的两个核中都发生了整合, 但也不可能在两个核中整合在同一位点, 那

么,产生的转化子就会是异核的^[56]。所以,在获得初始转化子后,筛选一定数量单孢子并周期性地贮存新鲜单孢子是必要的,这样可以降低阴性转化子或异核的可能性。许多文献已经报道,重组 DNA 可能会从基因组中删除^[57,58]。另一方面,无论是同源的还是异源的基因以多拷贝形式整合进入一些真菌基因组后,可能会由于不同的机制导致基因沉默现象,一般称为同源依赖的基因沉默^[59]。与异常 RNA 的产生或者同源 DNA 甲基化有关的压制(quelling)一般发生在营养菌丝阶段^[60]。重组 DNA 的甲基化在 *N. crassa*、*A. niger* 中已经发现,但是 DNA 甲基化在 *A. niger*、*A. oryzae* 和 *T. reesei* 中调控基因表达的作用还没有深入研究。为防止目的蛋白基因的丢失,在初步筛选转化子时应尽量多保存高产菌株,并进行多轮传代与生物学重复实验,以确保工程菌和蛋白表达的稳定性的。

还有一个值得注意的方面,就是生产重组蛋白的菌株通常会被那些不生产重组蛋白的菌株替代。重组蛋白的生产利用了更多的能量和代谢资源,增加了细胞代谢的负担^[61]。同时,这些重组蛋白对真菌生长无益,因而低产量或不生产重组蛋白的菌株比生产菌株具有更快的生长速率^[62]。其中,环境因素起到了重要作用,而且还会影响酶生产的稳定性。重组葡萄糖淀粉酶在 pH 4.0 的复合培养基中可以高浓度生产,然而,在 pH 5.4 的同样培养基中很快就丧失生产能力^[63]。无论菌株是在高或低 pH 值培养,还是在合成或复合培养基中培养,重组转化子的生产有时是不稳定的^[57]。培养基组成和 pH 值可以增加或降低丝状真菌重组蛋白的生产稳定性,尽管其中原因仍未知。因此,重组菌株的培养要进行不同生长条件的尝试,才能使菌株的异源蛋白生产达到最佳状态。

3 与丝状真菌蛋白表达和分泌相关的基因组学及功能基因组学研究

丝状真菌异源蛋白表达的产量在应用不同策略时效果也不一样,因此,完全阐明和解决异源蛋白产量的瓶颈问题需要一个更整体化的水平——如转录组和蛋白质组水平——来研究与蛋白产量相关的分泌和翻译后修饰等机制^[64]。基因组学的发展为此提供了极佳的契机,最近几年,真菌基因组学测序

工作进展十分迅速,尤其在 2003 年之后,每年有 10 多种真菌全基因组数据公开,到目前为止(2007 年 11 月)NCBI 数据库中全基因组数据已公开释放的真菌有 73 种(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genomes/>)。真菌基因组资源的获得和相关实验技术的进步开启了对丝状真菌基因功能包括蛋白表达分泌机制的全面了解的序幕,尤其是近两年的研究不断涌现。

在转录组水平上,2005 年 Sims 等^[65]第一次实现对丝状真菌异源蛋白表达和分泌的转录组分析。该研究利用微阵列技术分析了 *A. nidulans* 异源表达牛凝乳酶时在摇瓶分批培养和恒化器培养两种条件下的基因表达谱变化,发现分批培养分泌途径相关的表达上调基因数目(292 个)远高于恒化器培养(139 个),这说明分批培养更易引发高水平的细胞响应;借助 UPR 转录因子 *HacA* 和囊泡转运基因的表量变化,发现 DTT 比异源蛋白对分泌途径的破坏更大,说明利用 DTT 处理菌株来研究 UPR 反应机制可能会有偏差;借助内源分泌蛋白基因表达谱的变化进一步证实丝状真菌存在分泌压力抑制(RESS)响应,由异源蛋白引发的 RESS 可将内源分泌蛋白 xylanase 1、 α -amylase 和 cellobiose hydrolase 等表达下调。这项工作对全面了解异源蛋白分泌的细胞响应机制具有重要意义。而最近对 *T. reesei* 异源表达人源 tPA(tissue plasminogen activator)分泌压力下的转录反应与 *S. cerevisiae* 进行了比较^[66]。本研究首次展现了 *T. reesei* 分泌压力相关的全部基因群,并发现了 *T. reesei* 压力响应的新特征,两个核小体基因 Histone 2A 和 Histone 4 得到特异表达上调。由此推测,丝状真菌除了已知的分泌压力途径外,可能还存在新类型的响应。2007 年刚刚发表的一项研究是利用 Affymetrix DNA GeneChips 技术和个别验证方法(independent verification)完成了对 *A. niger* 蛋白分泌相关压力响应的基因组范围转录分析^[27],该研究证实了 *HacA* 表达的转录后控制,阐明了分泌压力下差异化翻译的基因,并发现一个未鉴定的 *A. niger* 基因 *An02g13410* (可能是乙酰基 CoA 转运因子)也参与了分泌压力反应。这些转录组学的研究成果为深入认识蛋白分泌和分泌相关压力的分子基础,实现菌种改良和鉴定目标基因提供了重要信息。

蛋白质组分析有助于在分子水平上系统理解细胞整体事件的发生,分泌蛋白质组相关研究在理解

丝状真菌蛋白生产和分泌方面是尤其重要的。Medina 等在这一领域具有开创性贡献, 他们建立了真菌分泌蛋白质组研究的样品制备策略^[67], 并借此鉴定了 *A. flavus* 降解芸香苷 rutin 的 22 个分泌蛋白, 从而对降解次级代谢物以供细胞生长的酶类有了深入了解。利用 LC-MS/MS 方法继续这项工作, 鉴定了另外 51 个分泌蛋白, 其中 18 个被证明是属于芸香苷 rutin 降解途径的成分^[68]。Oda 等^[69] 利用 2D 电泳分离蛋白和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI- TOF-MS)技术进行肽指纹图谱(Peptide Mass Fingerprinting, PMF)分析了 *A. oryzae* 的分泌蛋白组, 鉴定了液体和固体培养时产生的 29 个胞外蛋白, 其中 α -amylase 和 β -glucosidase 在液体培养时隐藏在细胞壁中, 在固体生长时穿过细胞壁分泌到胞外。丝状真菌蛋白组学的研究可从整体上认识分泌途径的特点, 并发现新的分泌蛋白, 有助于快速找到蛋白生产和分泌的瓶颈, 为实现异源蛋白的高效生产指明方向。

4 展望

丝状真菌作为异源蛋白生产的细胞工厂具有巨大潜力。随着多年研究的深入, 目前克服异源蛋白产量低的瓶颈问题集中在翻译后水平、修饰加工过程和分泌途径等方面。丝状真菌分子遗传操作技术的成熟^[8,10,70], 尤其是基因组学及其相关技术的迅速发展^[12], 使得对蛋白质表达在整体方面和细节方面有了更深入的了解。值得注意的是, 几个异源蛋白工业化生产成功的实例坚定了研究和开发的信心, 也成为努力的目标。在丝状真菌中刚刚兴起的功能基因组学研究将为这项难关的成功突破带来新的机遇。同时, 筛选超分泌突变菌株^[71] 和构建精确表达调控系统^[72]等新技术也不断在丝状真菌中发展起来。与丝状真菌生理相关的可控培养特性研究和生物工程策略^[73]也是正在兴起的另一支重要生力军。正如 Peter J. Punt^[6] 指出的“目前已发展到了最后突破阶段, 获得工业水平的高值蛋白指日可待”。随着研究的迅速发展, 高值异源蛋白生产的丝状真菌细胞工厂的出现将在发酵生物技术领域引领一个新时代。

REFERENCES

[1] Nevalainen KMH, Te'oa VSJ. Enzyme production in industrial fungi: molecular genetic strategies for integrated

strain improvement. *Applied Mycology and Biotechnology*, 2003, **3**: 241–259.

- [2] Yaver DS, Lamsa M, Munds R, Brown SH, Johnstone JA, Brody H. Using DNA-tagged mutagenesis to improve heterologous protein production in *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genetics and Biology*, 2000, **29**: 28–37.
- [3] Levin AM, de Vries RP, Wösten HAB. Localization of protein secretion in fungal colonies using a novel culturing technique; the ring-plate system. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, **69** (2): 399–401.
- [4] Durand H, Clanet M, Tiraby G. Genetic improvement of *Trichoderma reesei* for large scale cellulase production. *Enzyme Microb Technol*, 1988, **10**: 341–345.
- [5] van den Hombergh JP, van de Vondervoort PJ, Fraissinet-Tachet L, Visser J. *Aspergillus* as a host for heterologous protein production: the problem of proteases. *Trends in Biotechnology*, 1997, **15**: 256–263.
- [6] Punt PJ, van Biezen N, Conesa A, Albers A, Mangnus J, van den Hondel C. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends in Biotechnology*, 2002, **20**: 200–206.
- [7] Nevalainen H, Suominen P, Taimisto K. On the safety of *Trichoderma reesei*. *Journal of Biotechnology*, 1994, **37**(3): 193–200.
- [8] Wang TH, Wu J, Zou YX. Advances of molecular biology of *Trichoderma reesei*. *Mycosystema*, 2000, **19**(1): 147–152.
- 汪天虹, 吴静, 邹玉霞. 瑞氏木霉分子生物学研究进展. *菌物学报*, 2000, **19**(1): 147–152.
- [9] Berka RM, Barnett CC. The development of gene expression systems for filamentous fungi. *Biotechnology Advances*, 1989, **7**: 127–154.
- [10] Wang TH. *Microbial Molecular Breeding Technology*, 1nd ed. Beijing: Chemical Industry Press, 2005.
- 汪天虹. 微生物分子育种原理与技术. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [11] Nevalainen KMH, Te'oa VSJ, Bergquist PL. Heterologous protein expression in filamentous fungi. *TRENDS in Biotechnology*, 2005, **23**: 468–474.
- [12] Wang TH, Zhong YH, Wang XL. Progress of studies on fungal genomics. *Science & Technology Review*, 2007, **25**(11): 48–52.
- 汪天虹, 钟耀华, 王晓利. 丝状真菌基因组学研究进展. *科技导报*, 2007, **25**(11): 48–52.
- [13] Gouka RJ, Punt PJ, van den Hondel CA. Efficient production of secreted proteins by *Aspergillus*: progress, limitations and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1997, **47**(1): 1–11.
- [14] Ward M, Lin C, Victoria DC, Fox BP, Fox JA, Gieswein C, Park M, Wang H. Characterization of humanized antibodies secreted by *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, **70**: 2567–2576.
- [15] Christensen T, Woeldike H, Boel E, Hjortshøj K. High level expression of recombinant genes in *Aspergillus*

- oryzae*. *Biotechnology*, 1988, **6**: 1419–1422.
- [16] Gouka RJ, Punt PJ, Hessing JG, van den Hondel CA. Analysis of heterologous protein production in defined recombinant *Aspergillus awamori* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, **62**: 1951–1957.
- [17] Moralejo FJ, Cardoza RE, Gutierrez S, Martin JF. Thaumatin production in *Aspergillus awamori* by use of expression cassettes with strong fungal promoters and high gene dosage. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, **65**: 1168–1174.
- [18] Moralejo FJ, Watson AJ, Jeenes DJ, Archer DB, Martín JF. A defined level of protein disulfide isomerase expression is required for optimal secretion of thaumatin by *Aspergillus awamori*. *Molecular Genetics and Genomics*, 2001, **266**: 246–253.
- [19] Masai K, Maruyama J, Sakamoto K, Nakajima H, Akita O, Kitamoto K. Square-plate culture method allows detection of differential gene expression and screening of novel, region-specific genes in *Aspergillus oryzae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, **71**: 881–891.
- [20] Nakajima K, Asakura T, Maruyama J, Morita Y, Oike H, Kitamoto K, Abe K. Extracellular production of neoculin, a sweet-tasting heterodimeric protein with taste-modifying activity, by *Aspergillus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, **72**: 3716–3723.
- [21] de Faria FP, Te’O VS, Bergquist PL, Azevedo MO, Nevalainen KM. Expression and processing of a major xylanase (XYN2) from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea* in *Trichoderma reesei*. *Letters in Applied Microbiology*, 2002, **34**: 119–123.
- [22] Mäntylä A, Paloheimo M, Hakola S, Lindberg E, Lantto R, Suominen P. Production in *Trichoderma reesei* of three xylanases from *Chaetomium thermophilum*: a recombinant thermoxylanase for biobleaching of kraft pulp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, **76**: 377–386.
- [23] Archer DB. Filamentous fungi as microbial cell factories for food use. *Current Opinion in Biotechnology*, 2000, **11**: 478–483.
- [24] Emalfarb MA, Burlingame RP, Olson PT. Transformation system in the field of filamentous fungal hosts. *US Patent*, 2003, 6573086.
- [25] Royer JC, Moyer DM, Reiwitich SG. *Fusarium graminearum* A3/5 as a novel host for heterologous protein production. *Biotechnology*, 1995, **13**: 1479–1483.
- [26] Joosten V, Gouka RJ, van den Hondel CAMJJ, Verrips CT, Lokman BC. Expression and production of llama variable heavy-chain antibody fragments (VHHs) by *Aspergillus awamori*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, **66**: 384–392.
- [27] Guillemette T, van Peij NN, Goosen T, Lanthaler K, Robson GD, van den Hondel CA, Stam H, Archer DB. Genomic analysis of the secretion stress response in the enzyme-producing cell factory *Aspergillus niger*. *BMC Genomics*, 2007, **8**: 158.
- [28] Conesa A, Punt PJ, van Luijk N, van den Hondel CA. The secretion pathway of filamentous fungi: a biotechnological view. *Fungal Genetics and Biology*, 2001, **33**: 155–171.
- [29] Valkonen M, Penttilä M, Saloheimo M. The *ire1* and *ptc2* genes involved in the unfolded protein response pathway in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Molecular Genetics and Genomics*, 2004, **272**: 443–451.
- [30] Davé A, Jeenes DJ, Mackenzie DA, Archer DB. HacA-independent induction of chaperone-encoding gene *bipA* in *Aspergillus niger* strains overproducing membrane proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, **72**(1): 953–955.
- [31] Patil C, Walter P. Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Current Opinion in Cell Biology*, 2001, **13**(3): 349–355.
- [32] Saloheimo M, Lund M, Penttilä ME. The protein disulfide isomerase gene of the fungus *Trichoderma reesei* is induced by endoplasmic reticulum stress and regulated by the carbon source. *Molecular Genetics and Genomics*, 1999, **262**(1): 35–45.
- [33] Saloheimo M, Valkonen M, Penttilä M. Activation mechanisms of the HAC1 mediated unfolded protein response in filamentous fungi. *Molecular Microbiology*, 2003, **47**: 1149–1161.
- [34] Mulder HJ, Saloheimo M, Penttilä M, Madrid SM. The transcription factor HACA mediates the unfolded protein response in *Aspergillus niger*, and up-regulates its own transcription. *Molecular Genetics and Genomics*, 2004, **271**: 130–140.
- [35] Travers KJ, Patil CK, Wodicka L, Lockhart DJ, Weissman JS, Walter P. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER associated degradation. *Cell*, 2000, **101**(3): 249–258.
- [36] Al-Sheikh H, Watson AJ, Lacey GA, Punt PJ, Jeenes DJ, Penttilä M, Alcocer MJ, Archer DB. Endoplasmic reticulum stress leads to the selective transcriptional down regulation of the glucoamylase gene in *Aspergillus niger*. *Molecular Microbiology*, 2004, **53**(6): 1731–1742.
- [37] Valkonen M, Ward M, Wang H, Penttilä M, Saloheimo M. Improvement of foreign-protein production in *Aspergillus niger* var *awamori* by constitutive induction of the unfolded-protein response. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69**: 6979–6986.
- [38] Lombraña M, Moralejo FJ, Pinto R, Martín JF. Modulation of *Aspergillus awamori* thaumatin secretion by modification of *bipA* gene expression. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, **70**(9): 5145–5152.
- [39] Shoji J, Arioka M, Kitamoto K. Dissecting cellular components of the secretory pathway in filamentous fungi: insights into their application for protein production. *Biotechnology Letters*. 2008, **30**(1): 7–14.
- [40] Wösten HA, Moukha SM, Sietsma JH, Wessels JG. Localization of growth and secretion of proteins in *Aspergillus niger*. *Journal of General Microbiology*, 1991, **137**: 2017–2023.

- [41] Kuratsu M, Taura A, Shoji JY, Kikuchi S, Arioka M, Kitamoto K. Systematic analysis of SNARE localization in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genetics and Biology*, 2007, **44**: 1310–1323.
- [42] Gupta GD, Free SJ, Levina NN, Keränen S, Heath IB. Two divergent plasma membrane syntaxin-like SNAREs, nsyn1 and nsyn2, contribute to hyphal tip growth and other developmental processes in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*, 2003, **40**: 271–286.
- [43] Valkonen M, Kalkman ER, Saloheimo M, Penttilä M, Read ND, Duncan RR. Spatially segregated snare protein interactions in living fungal cells. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, **282**: 22775–22785.
- [44] Gordon CL, Khalaj V, Ram AF, Archer DB, Brookman JL, Trinci AP, Jeenes DJ, Doonan JH, Wells B, Punt PJ, van den Hondel CA, Robson GD. Glucoamylase: green fluorescent protein fusions to monitor protein secretion in *Aspergillus niger*. *Microbiology*, 2000, **146**: 415–426.
- [45] Masai K, Maruyama J, Nakajima H, Kitamoto K. *In vivo* visualization of the distribution of a secretory protein in *Aspergillus oryzae* hyphae using the RntA-EGFP fusion protein. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry*, 2003, **67**: 455–459.
- [46] te Biesebeke R, Record E, van Biezen N, Heerikhuisen M, Franken A, Punt PJ, van den Hondel CA. Branching mutants of *Aspergillus oryzae* with improved amylase and protease production on solid substrates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, **69**: 44–50.
- [47] Diener SE, Chellappan MK, Mitchell TK, Dunn-Coleman N, Ward M, Dean RA. Insight into *Trichoderma reesei*'s genome content, organization and evolution revealed through BAC library characterization. *Fungal Genetics and Biology*, 2004, **41**: 1077–1087.
- [48] Wallis GL, Swift RJ, Hemming FW, Trinci AP, Peberdy JF. Glucoamylase overexpression and secretion in *Aspergillus niger*: analysis of glycosylation. *Biochim Biophys Acta*, 1999, **1472**: 576–586.
- [49] Gerngross TU. Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. *Nature Biotechnology*, 2004, **22**: 1409–1414.
- [50] Vervecken W, Callewaert N, Geysens S, Contreras R. Modification of the N-glycosylation pathway of lower eukaryotes to mammalian type. Biochemistry Technology Division Abstracts, ACS New Orleans Conference, 2003.
- [51] Stals I, Sandra K, Geysens S, Contreras R, Van Beeumen J, Claeysens M. Factors influencing glycosylation of *Trichoderma reesei* cellulases. I: postsecretorial changes of the O- and N-glycosylation pattern of Cel7A. *Glycobiology*, 2004, **14**: 713–724.
- [52] Agaphonov MO, Packeiser AN, Chechenova MB, Choi ES, Ter-Avanesyan MD. Mutation of the homologue of GDP-mannose pyrophosphorylase alters cell wall structure, protein glycosylation and secretion in *Hansenula polymorpha*. *Yeast*, 2001, **18**: 391–402.
- [53] Kubicek CP, Panda T, Schrefel-Kunar G, Messner R, Gruber F. O-linked- but not N-linked-glycosylation is necessary for secretion of endoglucanase I and II by *Trichoderma reesei*. *Canadian Journal of Microbiology*, 1987, **33**: 698–703.
- [54] Kruszewska J, Butterweck AH, Kurzątkowski W. Overexpression of the *Saccharomyces cerevisiae* mannosylphosphodolichol synthase-encoding gene in *Trichoderma reesei* results in an increased level of protein secretion and abnormal cell ultrastructure. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, **65**: 2382–2387.
- [55] Perlińska-Lenart U, Kurzątkowski W, Janas P. Protein production and secretion in an *Aspergillus nidulans* mutant impaired in glycosylation. *Acta Biochimica Polonica*, 2005, **52**(1): 195–205.
- [56] Wiebe MG. Stable production of recombinant proteins in filamentous fungi: problems and improvements. *Mycologist*, 2003, **17**: 140–144.
- [57] Mainwaring DO, Wiebe MG, Robson GD, Goldrick M, Jeenes DJ, Archer DB, Trinci AP. Effect of pH on hen egg white lysozyme production and evolution of a recombinant strain of *Aspergillus niger*. *Journal of Biotechnology*, 1999, **75**: 1–10.
- [58] Wiebe MG, Karandikar A, Robson GD, Montijn R, van den Hondel CA, Punt PJ. Production of tissue plasminogen activator (t-PA) in *Aspergillus niger*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2001, **76**: 164–174.
- [59] Faugeron G. Diversity of homology-dependent gene silencing strategies in fungi. *Current Opinion in Microbiology*, 2000, **3**: 144–148.
- [60] Selker EU. Epigenetic phenomena in filamentous fungi: useful paradigms or repeat-induced confusion? *Trends in Genetics*, 1997, **13**: 296–301.
- [61] Withers JM, Swift RJ, Wiebe MG, Robson GD, Punt PJ, van den Hondel CA, Trinci AP. Optimization and stability of glucoamylase production by recombinant strains of *Aspergillus niger* in chemostat culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 1998, **59**: 407–418.
- [62] Wiebe MG, Robson GD, Shuster J, Trinci APJ. Evolution of a recombinant (glucoamylase-producing) strain of *Fusarium venenatum* A3/5 in chemostat culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 2001, **73**: 146–156.
- [63] Swift RJ, Karandikar A, Griffen AM, Punt PJ, van den Hondel CA, Trinci AP, Wiebe MG. The effect of organic nitrogen sources on recombinant glucoamylase production by *Aspergillus niger* in chemostat culture. *Fungal Genetics and Biology*, 2000, **31**: 125–133.
- [64] Nevalainen H, Te'o V, Penttilä M, Pakula T. Heterologous gene expression in filamentous fungi: A holistic view. *Applied Mycology and Biotechnology*, 2005, **5**: 211–237.
- [65] Sims AH, Gent ME, Lanthaler K, Dunn-Coleman NS, Oliver SG, Robson GD. Transcriptome analysis of recombinant protein secretion by *Aspergillus nidulans* and the unfolded-protein response *in vivo*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, **71**(5): 2737–2747.
- [66] Arvas M, Pakula T, Lanthaler K, Saloheimo M, Valkonen

- M, Suortti T, Robson G, Penttilä M. Common features and interesting differences in transcriptional responses to secretion stress in the fungi *Trichoderma reesei* and *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics*, 2006, **7**: 32.
- [67] Medina ML, Kiernan UA, Francisco WA. Proteomic analysis of rutin-induced secreted proteins from *Aspergillus flavus*. *Fungal Genetics and Biology*, 2004, **41**: 327–335.
- [68] Medina ML, Haynes PA, Brecci L, Francisco WA. Analysis of secreted proteins from *Aspergillus flavus*. *Proteomics*, 2005, **5**: 3153–3161.
- [69] Oda K, Kakizono D, Yamada O, Iefuji H, Akita O, Iwashita K. Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under submerged and solid-state culture conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, **72**: 3448–3457.
- [70] Wang TH, Merja P, Gao PJ, Wang CH, Zhong L. Isolation and identification of xylitol dehydrogenase gene from *Trichoderma reesei*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 1998, **14**(3): 320–325.
汪天虹, Merja Penttil, 高培基, 王春卉, 钟玲. 瑞氏木霉木糖醇脱氢酶基因的分离与鉴定. *生物工程学报*, 1998, **14**(3): 320–325.
- [71] Weenink XO, Punt PJ, van den Hondel CA, Ram AF. A new method for screening and isolation of hypersecretion mutants in *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, **69**: 711–717.
- [72] Pachlinger R, Mitterbauer R, Adam G, Strauss J. Metabolically independent and accurately adjustable *Aspergillus* sp. expression system. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, **71**: 672–678.
- [73] Wang L, Ridgway D, Gu T, Moo-Young M. Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. *Biotechnology Advances*, 2005, **23**: 115–129.
- [74] Roberts IN, Jeenes DJ, MacKenzie DA, Sumner IG, Archer DB. Heterologous gene expression in *A. niger*: a glucoamylase-porcine pancreatic phospholipase A2 fusion protein is secreted and processed to yield mature enzyme. *Gene*, 1992, **122**: 155–161.
- [75] Masuda T, Kitabatake N. Developments in biotechnological production of sweet proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2006, **102**(5): 375–389.
- [76] Conesa A, van den Hondel CA, Punt PJ. Studies on the production of fungal peroxidases in *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66**: 3016–3023.
- [77] Margolles-Clark E, Hayes CK, Harman GE, Penttilä M. Improved production of *Trichoderma harzianum* endochitinase by expression in *Trichoderma reesei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, **62**(6): 2145–2151.
- [78] de Faria FP, Te'O VS, Bergquist PL, Azevedo MO, Nevalainen KM. Expression and processing of a major xylanase (XYN2) from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea* in *Trichoderma reesei*. *Letters in Applied Microbiology*, 2002, **34**: 119–123.

© 2008 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部联合征订全面启动

2008 年中科院微生物所期刊联合编辑部联合征订全面启动



《微生物学报》月刊(每月 4 日出版), 单价 55.00 元, 全年定价 660 元。刊号: ISSN 0001-6209; CODEN WSHPA8。国内邮发代号: 2-504; 国外邮发代号: BM67。



《生物工程学报》月刊(每月 25 日出版), 单价 65.00 元, 全年定价 780 元。刊号: ISSN 1000-3061; CODEN SGXUED。国内邮发代号: 82-13; 国外邮发代号: BM5608。



《微生物学通报》月刊(每月 20 日出版), 单价 48.00 元, 年价 576 元。刊号: ISSN 0253-2654; CODEN WSWPDI。国内邮发代号: 2-817; 国外邮发代号: BM413。



《菌物学报》双月刊(单月 15 日出版), 单价 80 元, 全年定价 480 元。刊号: ISSN 1672-6472/Q, CODEN JXUUAЕ。国内邮发代号: 2-499; 国外邮发代号: Q723。

欢迎广大读者直接与本刊发行部联系订购, 我们将按期免费为您邮寄

汇款地址: (100101)北京市朝阳区大屯路中科院微生物所 B401

收信人: 《 》编辑部; 电话: (010)64807521; E-mail: bjb@im.ac.cn

请在附言处注明“订刊费”及所订期刊名称、年代、卷、期和数量

欲知详细信息请查看如下网址: <http://journals.im.ac.cn>