

# 厌氧真菌纤维降解酶及其应用潜力的研究进展

郭子琦, 李与琦, 成艳芬\*, 朱伟云

南京农业大学 国家动物消化道营养国际联合研究中心 消化道微生物研究室, 江苏 南京 210095

郭子琦, 李与琦, 成艳芬, 朱伟云. 厌氧真菌纤维降解酶及其应用潜力的研究进展[J]. 微生物学通报, 2023, 50(1): 377-391.

GUO Ziqi, LI Yuqi, CHENG Yanfen, ZHU Weiyun. Fiber-degrading enzymes of anaerobic fungi and their potential for applications: a review[J]. Microbiology China, 2023, 50(1): 377-391.

**摘要:** 反刍动物的瘤胃是已知的纤维降解能力最强的天然发酵罐, 其发酵粗纤维的能力很大程度上依赖于其中栖息的各类微生物的功能。厌氧真菌作为瘤胃内的一类低丰度菌群, 最先定殖到宿主动物摄入的纤维质饲料上, 并通过分泌大量高效的碳水化合物活性酶降解粗纤维。然而, 由于缺乏足够的基因组信息和有效的厌氧真菌遗传操作系统, 目前国内外对厌氧真菌分泌的纤维降解酶及其降解机制的研究进展有限。本文对厌氧真菌的分类及已发表的基因组信息进行概述, 介绍了各类纤维降解酶及纤维小体的组成结构和催化机制特点, 并对纤维降解酶在生物质能、饲料处理、纺织造纸及食品加工等方面的应用进行总结。研究厌氧真菌纤维降解酶的作用特性, 将有助于完善其在瘤胃环境中有效竞争资源并降解粗纤维的知识体系, 也将进一步了解其生物技术应用潜力, 为工业生产中应用酶制剂提供新思路。

**关键词:** 厌氧真菌; 纤维降解酶; 基因克隆表达

## Fiber-degrading enzymes of anaerobic fungi and their potential for applications: a review

GUO Ziqi, LI Yuqi, CHENG Yanfen\*, ZHU Weiyun

Laboratory of Gastrointestinal Microbiology, National Center for International Research on Animal Gut Nutrition, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China

**Abstract:** The rumen of ruminants is known as a natural fermenter with the strongest fiber-degrading ability. The various microorganisms inhabiting the rumen confer it the ability to digest plant feed. As a group of microorganisms with low abundance in the rumen, anaerobic

资助项目: 国家自然科学基金(31772627, 32061143034); 中央高校基本科研业务费专项资金(KYYJ202003)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31772627, 32061143034) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (KYYJ202003).

\*Corresponding author. E-mail: yanfencheng@njau.edu.cn

Received: 2022-04-26; Accepted: 2022-07-22; Published online: 2022-08-23

fungi are the first to colonize the cellulosic feed ingested by host animals and degrade lignocellulose by secreting massive efficient carbohydrate-active enzymes. However, due to the lack of sufficient genomic information and an effective genetic operating system for anaerobic fungi, the research on fiber-degrading enzymes secreted by anaerobic fungi and their degradation mechanisms is limited. This paper summarized the taxonomy and published genome information of the anaerobic fungi in the rumen, introduced the fiber-degrading enzymes and the structure and catalytic mechanism of cellulosomes, and recapitulated the applications of such enzymes in biomass energy, feed processing, textile, papermaking, and food processing. Studying the properties of fiber-degrading enzymes in anaerobic fungi will improve our understanding of their ability to degrade lignocellulose and their competition for resources in a highly complex rumen environment. Further, it will help us to learn the application potential of the enzymes in biotechnology and provide new strategies for the application of the enzymes in industries.

**Keywords:** anaerobic fungi; fiber-degrading enzyme; gene cloning and expression

瘤胃是目前已发现的降解粗纤维效率最高的天然体系<sup>[1]</sup>。为了保证在复杂植物纤维降解中的高效水平,瘤胃微生物群编码了丰富的碳水化合物结合模块(carbohydrate-binding modules, CBMs)和碳水化合物活性酶(carbohydrate-active enzymes, CAZymes),后者主要包括碳水化合物酯酶(carbohydrate esterases, CEs)、糖苷水解酶(glycoside hydrolases, GHs)、糖基转移酶(glycosyl transferases, GTs)、多糖裂解酶(polysaccharide lyases, PLs)和辅助氧化还原酶(auxiliary activities, AAs)<sup>[2]</sup>。之前关于 CAZymes 的研究报道主要集中于具有数量优势的瘤胃细菌。近年来,厌氧真菌因其在瘤胃碳循环中起到的关键作用也逐渐引起人们的关注。

从前人们认为数量庞大的瘤胃细菌和原虫主要负责草食动物体内植物纤维的降解,然而越来越多的研究发现,厌氧真菌最先定殖到纤维质饲料并开始降解<sup>[3-4]</sup>。厌氧真菌假根的物理穿透及所分泌酶和纤维小体的化学降解在消化粗纤维的过程中发挥了重要作用<sup>[5]</sup>。目前,国内外对厌氧真菌分泌的纤维降解酶及其降解机制的研究进展有限。本研究依据国内外关于厌

氧真菌纤维降解的相关报道,对瘤胃内厌氧真菌的分类及已发表的基因组信息进行概述,并对纤维小体的组成结构和催化机制特点等方面进行综述,同时介绍厌氧真菌纤维降解酶的应用前景和生物技术应用潜力,以期为今后厌氧真菌的纤维降解机制研究提供更为详实的理论基础。

## 1 瘤胃厌氧真菌的分类

20世纪70年代,Orpin<sup>[6]</sup>首次成功鉴定厌氧真菌后,国内外学者开始在反刍动物及后肠发酵动物的消化道内容及粪便内分离鉴定得到厌氧真菌。厌氧真菌属于 Fungi 界 *Neocallimastigomycota* 门 *Neocallimastigomycetes* 纲 *Neocallimastigales* 目 *Neocallimastigaceae* 科。目前,分离鉴定得到的 *Neocallimastigomycota* 门共包括 20 个属(表 1)。现阶段所研究的厌氧真菌均具有纤维降解能力,大部分能够降解植物细胞壁中的结构型碳水化合物。

厌氧真菌的分离鉴定主要采用“细胞形态学+分子生物学”的综合方法<sup>[21]</sup>。形态学特征包括菌体生长类型(单中心或多中心)、假根形态

表 1 不同宿主动物中分离得到的厌氧真菌

Table 1 Anaerobic fungi isolated from different host animals

Genus	Representative species	Host animal	Source	References
<i>Aestipascuomyces</i>	<i>A. dupliciliberans</i>	Aoudad sheep	Rumen	[7]
<i>Agriosomyces</i>	<i>Ag. longus</i>	Ovis orientalis	Feces	[8]
<i>Aklioshbomyces</i>	<i>Ak. papillarum</i>	Odocoileus virginianus	Feces	[8]
<i>Anaeromyces</i>	<i>An. mucronatus</i>	Bos taurus	Rumen	[9]
<i>Buwchfawromyces</i>	<i>B. eastonii</i>	Bulbalus bubalis	Feces	[10]
<i>Caecomyces</i>	<i>C. churrovis</i>	Ovis aries	Feces	[11]
<i>Capellomyces</i>	<i>Cap. elongates</i>	Capra aegagrus	Feces	[8]
<i>Cyllamyces</i>	<i>Cy. aberensis</i>	Bos taurus	Feces	[12]
<i>Feramyces</i>	<i>F. austinii</i>	Ammotragus lervia	Rumen	[13]
<i>Ghazallomyces</i>	<i>G. constrictus</i>	Axis axis	Feces	[8]
<i>Joblinomyces</i>	<i>J. apicalis</i>	Capra aegagrus	Feces	[8]
<i>Khoyollomyces</i>	<i>K. ramosus</i>	Eauus grevyi	Feces	[8]
<i>Liebetanzomyces</i>	<i>L. polymorphus</i>	Capra aegagrus	Rumen	[14]
<i>Neocallimastix</i>	<i>N. frontalis</i>	Ovis aries	Rumen	[15]
<i>Oontomyces</i>	<i>O. intercalaris</i>	Bos taurus	Rumen	[16]
<i>Orpinomyces</i>	<i>Or. joyonii</i>	Bos taurus	Rumen	[17]
<i>Paucimyces</i>	<i>Pa. communis</i>	Ovis aries	Feces	[18]
<i>Pecoramyces</i>	<i>Pe. ruminantium</i>	Cattle and sheep	Feces	[19]
<i>Piromyces</i>	<i>Pi. dumbonicus</i>	Elephas maximus	Feces	[20]
<i>Tahromyces</i>	<i>T. munnarensis</i>	Nilgiri tahr	Feces	[8]

(丝状根或球状根)及游动孢子的鞭毛数(单鞭毛或多鞭毛)等。分子生物学特征包括核糖体 RNA 基因的内部转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)和核糖体大亚基(large subunit, LSU)基因序列的多样性。由于 ITS 区域内的基因序列变异水平较高,相对更稳定的 LSU 序列分析法在鉴定厌氧真菌方面逐渐受到重视<sup>[22]</sup>。从 NCBI 数据库获得已经发表测序结果的全部厌氧真菌的 LSU 序列,经分析得到的系统发育树展示了不同属之间的亲缘关系(图 1)。

## 2 瘤胃厌氧真菌的游离纤维降解酶

### 2.1 纤维素酶

纤维素是自然界中分布最广、含量最多的一种多聚糖,是世界上最丰富的可再生碳源。

纤维素酶能够降解纤维素,催化纤维素中 1,4- $\beta$ -D-糖苷键水解生成葡萄糖,葡萄糖可以进一步发酵产生乙醇、有机酸和其他化学物质。厌氧真菌可以产生 GH1、GH3、GH5、GH6、GH8、GH9、GH16、GH31、GH45 和 GH48 的 CAZymes 降解纤维素(表 2)。Li 等<sup>[26]</sup>对菌株 *Pecoramyces* sp. F1 表达的纤维降解酶进行了详细的分析比较,发现 GH 家族最具多样化,并以 GH6 的丰度最高,体现了厌氧真菌对纤维二糖的高效降解能力。在许多微生物中,纤维二糖的积累抑制了内葡聚糖酶和外葡聚糖酶的活性。而 Hooker 等<sup>[27]</sup>将分离得到的菌株 *Piromyces* sp. UH3-1 接种到 4 种未经预处理的木质纤维底物(玉米秸秆、柳枝稷、橙皮和高粱),发现菌株 UH3-1 可以产生大量的  $\beta$ -葡萄糖苷酶,提高了裂解纤维二糖的速率,使其与代谢葡萄糖的速

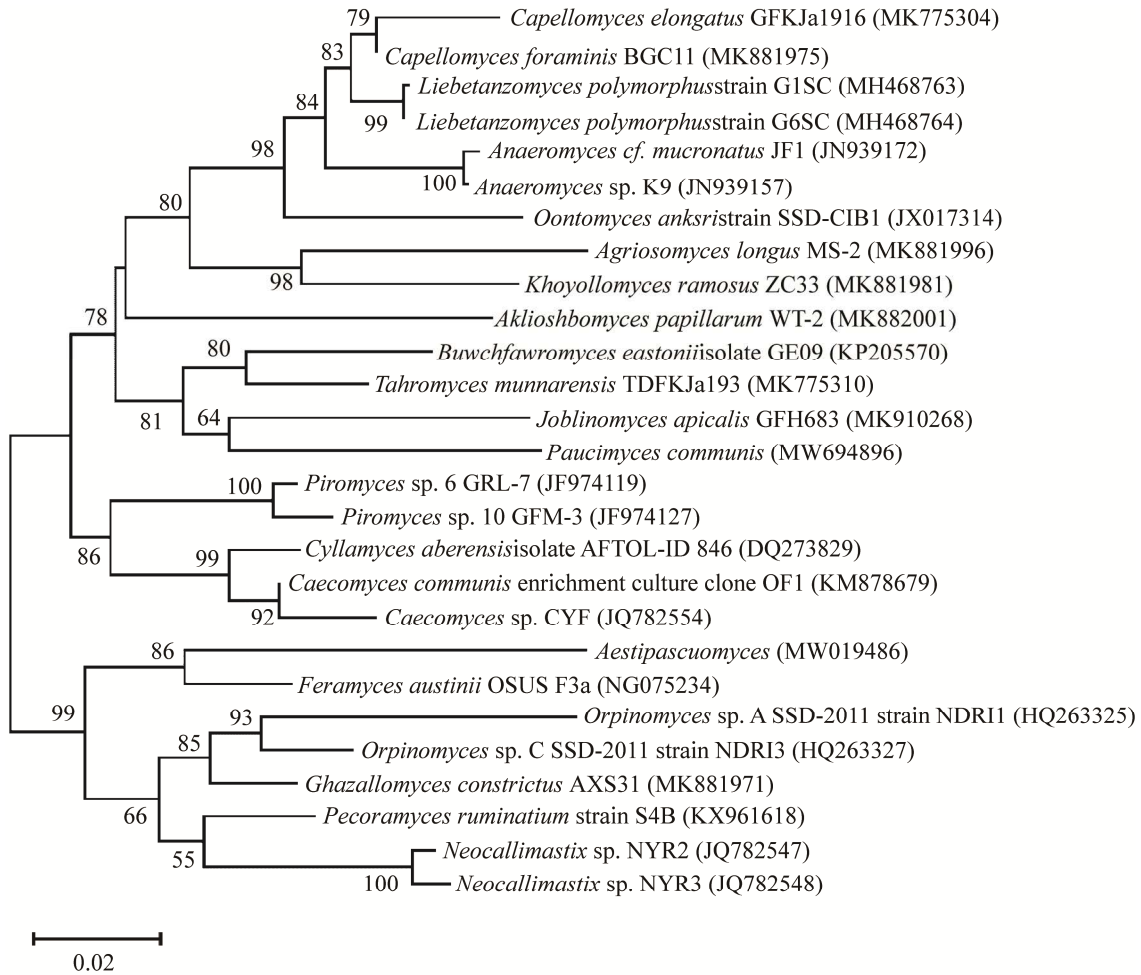


图1 厌氧真菌的系统发育树 基于 LSU 序列在 MEGA 11 中使用最大似然法构建系统发育树；序列从 NCBI 下载；统计支持率(来自 1 000 次重复)显示为具有超过 50% 引导支持的节点；括号内数字：菌株的 GenBank 登录号；分支处数字：Bootstrap 支持率；标尺：0.02 差异的分支长度

Figure 1 The phylogenetic tree of anaerobic fungi. Phylogenetic tree using maximum likelihood method in MEGA 11 based on LSU sequences; Source: Downloaded from NCBI; Bootstrap values (from 1 000 replicates) were shown for nodes with more than 50% bootstrap support; Numbers in brackets: GenBank accession numbers of the strain; Numbers in branch points: Percentages supported by bootstrap; Bar: 0.02 nucleotide divergence.

率相当。厌氧真菌对纤维二糖的降解能力，不仅有效解除产物累积效应，而且释放更易于利用的单糖，显著提高降解效率<sup>[28]</sup>。UH3-1 也表现出高效的六碳糖降解能力，高粱由于具有较多的游离糖<sup>[29]</sup>，成为降解最快的木质纤维生物质。

厌氧真菌纤维素酶的降解优势还体现在转录特点中。Couger 等<sup>[30]</sup>通过分析 *Pecoramyces*

*ruminantium* strain C1A 在 4 种不同类型的纤维素生物质(苜蓿、甘蔗、玉米秸秆和高粱)上生长时的转录组谱发现，部分 GH 家族的转录模式几乎不随纤维底物的不同而发生明显变化。这暗示厌氧真菌可能存在一定比例的核心基因，其表达不受底物的影响；此外还发现，*P. ruminantium* strain C1A 在单个聚合物(例如，纤维素或阿拉

伯木聚糖)的降解过程中同时参与了大量功能冗余的酶,而且因酶的位置(纤维小体内或游离酶)、靶向底物的性质(链长度和侧链的偏好)及底物目标位置(还原端或非还原端)的变化而进一步增强了互补性,提高了厌氧真菌在自然条件下对纤维生物量的降解速度和程度。

## 2.2 半纤维素酶

半纤维素是植物细胞壁的主要成分之一,半纤维素酶是复合型降解酶系,主要包括木聚糖酶、木糖苷酶、甘露聚糖酶和 $\beta$ -葡聚糖酶,发生协同作用将半纤维素降解为单糖。厌氧真

菌可以产生来源于GH2、GH10、GH11、GH31、GH39和GH43的CAZymes降解半纤维素(表2)。Henske等<sup>[31]</sup>在*Piromyces finnis*的转录组中发现处于优势含量的半纤维素酶基因,证明厌氧真菌在降解半纤维素方面还存在巨大潜能。将*Caecomycetes churrovis*与产甲烷菌*Methanobrevibacter thaueri*共培养,提高了*C. churrovis*在木聚糖上的生长速率和降解率<sup>[32]</sup>,同样证明了厌氧真菌的半纤维素降解能力。厌氧真菌与其他微生物共培养的发醇模式可以显著提高其酶产量<sup>[33]</sup>,推动基因和代谢工程在选育高效降解纤维生物质、

表2 厌氧真菌中糖苷水解酶的分类

Table 2 Classification of glycoside hydrolases in anaerobic fungi

GH family	Putative function	Organism	References
GH1	$\beta$ -glucosidase	<i>Neocallimastix patriciarum</i> W5, <i>P. ruminantium</i> strain C1A, <i>C. churrovis</i>	[10,23-24]
GH2	$\beta$ -galactosidase, mannanase, endo-1,4- $\beta$ -mannosidase	<i>P. ruminantium</i> strain C1A	[23]
GH3	$\beta$ -glucosidase	<i>Neocallimastix patriciarum</i> W5, <i>P. ruminantium</i> strain C1A, <i>Piromyces</i> sp. E2	[23-25]
GH5	Endo- $\beta$ -1,4-glucanase/cellulase; mannan endo- $\beta$ -1,4-mannosidase	<i>Neocallimastix patriciarum</i> W5, <i>P. ruminantium</i> strain C1A, <i>C. churrovis</i> , <i>Pecoramyces</i> sp. F1	[10,23-24,26]
GH6	Cellobiohydrolase	<i>Neocallimastix patriciarum</i> W5, <i>P. ruminantium</i> strain C1A, <i>C. churrovis</i> , <i>Pecoramyces</i> sp. F1	[10,23-24,26]
GH8	Endo- $\beta$ -1,4-glucanase/cellulase	<i>Neocallimastix patriciarum</i> W5, <i>P. ruminantium</i> strain C1A	[23-24]
GH9	Endo- $\beta$ -1,4-glucanase/cellulase	<i>Neocallimastix patriciarum</i> W5, <i>P. ruminantium</i> strain C1A, <i>C. churrovis</i>	[10,23-24]
GH10	Endo-1,4- $\beta$ -xylanase	<i>Neocallimastix patriciarum</i> W5, <i>P. ruminantium</i> strain C1A	[23-24]
GH11	Endo-1,4- $\beta$ -xylanase	<i>Neocallimastix patriciarum</i> W5, <i>P. ruminantium</i> strain C1A, <i>C. churrovis</i> , <i>Pecoramyces</i> sp. F1	[10,23-24,26]
GH16	$\beta$ -(1,3-1,4)-glucanase (Lichenase)	<i>Neocallimastix patriciarum</i> W5, <i>P. ruminantium</i> strain C1A, <i>C. churrovis</i>	[10,23-24]
GH31	$\alpha$ -glucosidase	<i>Neocallimastix patriciarum</i> W5, <i>P. ruminantium</i> strain C1A, <i>C. churrovis</i>	[10,23-24]
GH39	$\beta$ -xylosidase	<i>P. ruminantium</i> strain C1A, <i>C. churrovis</i>	[10,23]
GH43	$\beta$ -xylosidase; $\alpha$ -N-arabinofuranosidase; endo-1,4- $\beta$ -xylanase	<i>Neocallimastix patriciarum</i> W5, <i>P. ruminantium</i> strain C1A, <i>C. churrovis</i> , <i>Pecoramyces</i> sp. F1	[10,23-24,26]
GH45	Endo- $\beta$ -1,4-glucanase/cellulase	<i>Neocallimastix patriciarum</i> W5, <i>P. ruminantium</i> strain C1A	[23-24]
GH48	Reducing end-acting cellobiohydrolase; endo- $\beta$ -1,4-glucanase; chitinase	<i>Neocallimastix patriciarum</i> W5, <i>P. ruminantium</i> strain C1A, <i>Piromyces</i> sp. E2, <i>C. churrovis</i> , <i>Pecoramyces</i> sp. F1	[10,23-26]

高产甲烷共培养菌株过程中的应用。Gruninger 等<sup>[34]</sup>对 *Neocallimastix frontalis*、*Piromyces rhizinflata*、*Orpinomyces joyonii* 和 *Anaeromyces mucronatus* 进行转录组学研究发现,以 GH10 和 GH11 为代表的木聚糖酶在 4 种真菌中含量相近(13.9%–17.4%),而且都含有大量用于修饰半纤维素的假设蛋白(即已被预测存在但缺少实验证据表明其在体内表达的蛋白质),与截至目前已被鉴定的半纤维素酶具有低水平的序列相似性;这暗示厌氧真菌具有丰富的未描述的 CAZymes,而阻碍这些降解酶表达应用的因素尚不清晰;另外,对不同种的 CAZymes 转录本分析可知,真菌属种之间存在一定程度的代谢特化。参与半纤维素降解的转录本比例差异可能有助于减少瘤胃内对有限资源的直接竞争,促进肠道内多属种厌氧真菌的共存,成为其高效降解的优势之一。

### 2.3 其他 CAZymes

除糖苷水解酶外,厌氧真菌产生的碳水化合物酯酶、多糖裂解酶等其他 CAZymes 也在降解纤维底物时发挥重要作用。Kameshwar 等<sup>[25]</sup>发现 CE 家族中的 CE1、CE2、CE3、CE4、CE6 及 CE16 常与 GH 家族协作降解半纤维素,使其更易接触木聚糖主链,破坏半纤维素和木质素网络之间的共价连接。厌氧真菌在酶促过程中可以分泌比细菌丰度更高的 CE4 和 CE8<sup>[35]</sup>。CE12 常与 PL 家族协作降解果胶,厌氧真菌却只少量利用降解果胶形成的产物,这暗示其降解目的是使假根进一步深入植物组织,以便于更大程度上降解半纤维素及纤维素,在厌氧真菌初次定殖和消化纤维物质中发挥重要作用。厌氧真菌的高效降解能力不仅因为能分泌种类和数量繁多的 CAZymes,还缘于各降解酶家族之间及各降解酶家族与碳水化合物结合模块的合作效应。

## 3 瘤胃厌氧真菌的纤维小体

### 3.1 纤维小体的组成结构

与好氧微生物不同,厌氧微生物的纤维降解酶倾向于组装成多酶聚合体,协同作用分解木质纤维素。该多酶聚合体称为纤维小体。纤维小体首先被发现于厌氧细菌的酶系,直到 30 年前 Wilson 等<sup>[36]</sup>在 *N. frontalis* 中发现并利用凝胶层析法分离得到厌氧真菌的纤维小体。纤维小体主要由发生不同催化反应的纤维降解酶、无催化作用的锚定域(dockerin domain)、支架蛋白(scaffoldin)及黏附域(cohesin domain)组成。其中,序列各异的 dockerin domain 将诸多降解酶与 cohesin domain 和 scaffoldin 拼装在一起,其间的互作及特异性作用使各种酶蛋白稳定地结合在这种超分子结构中<sup>[35]</sup>。在其他消化道微生物中很少观察到非催化域 CBM,但其却在厌氧真菌中普遍存在,通常与 CAZymes 结合消化碳水化合物<sup>[23,30]</sup>。CBM10 结构域与厌氧真菌纤维小体中的 dockerin 结构类似,CBM1 结合纤维素并在植物细胞壁消化中发挥重要作用,CBM18 主要靶向几丁质<sup>[37]</sup>。CBM 可以增强 CAZymes 活性且在纤维小体中作为连接多种 CAZymes 的桥梁,加大了厌氧真菌对底物的附着及降解程度,成为厌氧真菌在竞争激烈的瘤胃生态系统中生存的关键。在厌氧真菌中,纤维小体通过 scaffoldin 和一些酶体上的 CBM 固定在底物细胞壁上<sup>[38]</sup>,同时也可以作为游离的多酶复合物被释放到细胞外基质中,增加酶浓度(图 2)。

### 3.2 纤维小体的催化机制特点

虽然人们对细菌纤维小体早已有了基本的研究了解,但关于厌氧真菌纤维小体的组装部分和机制特点的研究近年来突破明显。细菌和真菌的纤维小体成分的序列相似性较低,在结

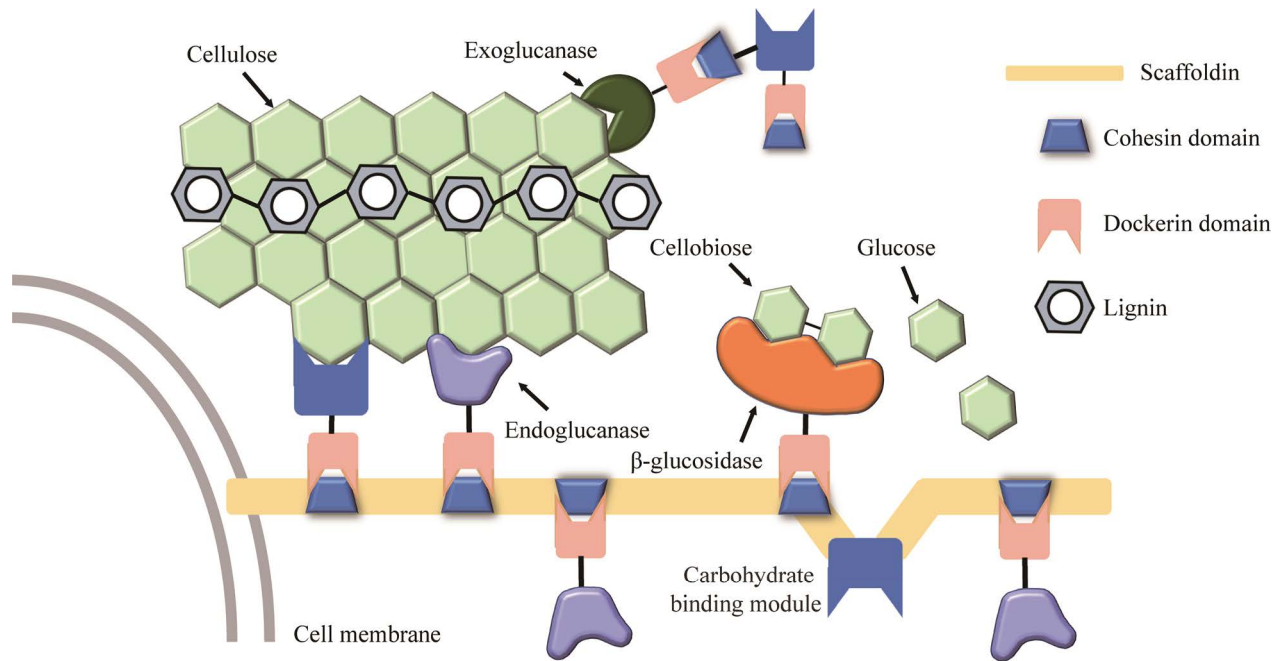


图 2 厌氧真菌的纤维小体及 CAZymes 的降解机制<sup>[37,39-40]</sup> 厌氧真菌在生物质转化过程中利用 CAZymes; 它们能够分泌产生游离的 CAZymes 和结合细胞的多酶复合物(纤维小体)

Figure 2 Degradation mechanism of cellulosomes and carbohydrate-active enzymes in anaerobic fungi<sup>[37,39-40]</sup>. Anaerobic fungi use CAZymes during biomass conversion; It has been suggested that their ability to produce secreted free CAZymes and cell-bound multi-enzyme complexes (cellulosomes).

合底物的特异性和亲和力上明显不同: (1) 成功鉴定了厌氧真菌纤维降解酶基因组的研究显示<sup>[41-42]</sup>, 只有少数酶可以同时映射到真菌和细菌上<sup>[43]</sup>, 纤维降解酶的整体序列在 2 个物种的进化存在差异; (2) 细菌和真菌纤维小体之间最明显的差异是结晶纤维素水解过程中产生的最终产物, 细菌纤维小体降解纤维素产生纤维二糖后即被细胞吸收, 而厌氧真菌纤维小体在纤维素降解过程中产生葡萄糖<sup>[44]</sup>; (3) 厌氧真菌纤维小体可以由不同种产生的催化蛋白依靠相同的 dockerin 连接组合而成, 细菌的纤维小体则体现出高度的种特异性<sup>[45]</sup>。

另外, 厌氧真菌纤维小体的作用效果受多方面因素调控, 而且具有广泛的应用潜力。Swift 等<sup>[39]</sup>将 *Anaeromyces robustus* 与产甲烷菌 *Methanobacterium*

*bryantii* 共培养, 发现编码纤维素降解、木聚糖降解和碳水化合物运输活动的蛋白基因被显著上调, 而且 75% 上调的 CAZymes 可以与 dockerin 或 CBM 结合; 另有 7 种 scaffold 蛋白表达上调, 表明 *M. bryantii* 的存在可以提高 *A. robustus* 纤维小体的转录水平。Gilmore 等<sup>[46]</sup>将海栖热袍菌 *Thermotoga maritima* 产生的 GH5 和 GH10 与 *P. finnis* 的 dockerin 结合, 构建得到具有较高活性及热稳定性的重组酶, 证明了厌氧真菌纤维小体的 dockerin 结构域蛋白是设计重组嵌合蛋白的优良模板。某些 GH 家族(如 GH3、GH6 和 GH45 等)还具有特征序列的模块, 可以用来扩展厌氧真菌纤维小体的底物库, 并提供细菌纤维小体所欠缺的酶活性<sup>[47]</sup>。Lillington 等<sup>[48]</sup>通过构造 3 种纤维小体重要蛋白质(dockerin、



scaffoldin 和 GH48)的抗体,结合氦离子与荧光显微镜技术,精准定位到单糖或纤维素碳源环境下生长的 *P. finnis* 菌群的纤维小体;分析结果发现,游动孢子产生的纤维小体不受生长基质的影响,而成熟细胞根状体产生的纤维小体作为水解木质纤维素的主要位置,容易受到单糖的抑制。进一步探索游动孢子中的基因调控模式,可以为真菌培养中解除抑制纤维素小体表达和提高水解酶产量提供解决策略。

## 4 瘤胃厌氧真菌纤维降解酶基因的克隆与表达

### 4.1 大肠杆菌表达纤维降解酶

大肠杆菌(*Escherichia coli*)表达系统操作使用简易、成本低廉,而且具有比生长速率快和周期短的优点。Ye 等<sup>[49]</sup>从 *O. joyonii* 中成功克隆并在 *E. coli* 中表达 *celB2*,通过羟基磷灰石层析纯化得到的纤维素酶对  $\beta$ -葡聚糖、地衣聚糖、羧甲基纤维素(carboxymethyl cellulose, CMC)、木聚糖底物有较高的活性,表达蛋白的最适 pH 值为 5.5 (在 pH 5.0–7.5 之间稳定),最适温度为 40 °C。Jones 等<sup>[50]</sup>用 *E. coli* 表达了 4 个编码 GH39 的厌氧真菌基因(*nf2152*、*nf2215*、*nf2523* 和 *pr2455*),对重组蛋白 NF2152 和 NF2523 进行表征,发现重组蛋白对罕见底物(黑麦阿糖基木聚糖和甜菜阿拉伯糖)的活性。马玉萍等<sup>[51]</sup>从厌氧真菌基因组中挑选 4 个 GH10 家族木聚糖酶基因,在 *E. coli* 中进行异源表达后测定其酶学性质,结果显示,4 种酶具有良好的 pH 和温度稳定性,对山毛榉木聚糖的亲合力高,  $\text{Ca}^{2+}$  对酶活起显著促进作用,具有潜在的工业应用价值。以上纤维降解酶在较宽的 pH 范围内保持活性,表明其在工业过程中可能具有足够的稳定性。然而,由于大肠杆菌是原核生物,表

达外源蛋白质时不能对蛋白质进行翻译后修饰,使得部分酶活性较低或无法检测到,具有局限性。

### 4.2 酵母表达纤维降解酶

一些酵母表达系统已被开发用于生物燃料工业。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是最具特征的异源基因表达酵母,自身仅分泌少量蛋白质,因此更有助于纯化目标蛋白,成为最常用的表达系统之一。毕赤酵母(*Pichia pastoris*)可以对多肽进行糖基化加工修饰,帮助其进行正确折叠,经过 30 多年的发展,蛋白表达技术已经相当稳定成熟,常用于 GH5、GH11 和 GH45 酶活测试实验<sup>[52]</sup>,应用高效和严格调控的启动子来生产重组蛋白。蛋白质被 *P. pastoris* 加工修饰后可大大提高酶活性,同时稳定了大规模发酵中影响产量和活性的参数(如 pH 等),达到工业用酶制剂的要求。马克思克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)作为兼性厌氧酵母,在代谢葡萄糖、乳酸、醋酸等底物时可以产生大量的乙酸乙酯,常被认为是生长最快的真核生物<sup>[53-54]</sup>。

微生物混合培养技术与克隆表达加工相比具有明显的优势,可以减少副产物的产生来提高产量,并增强整体培养物的耐受性<sup>[48]</sup>。Hillman 等<sup>[55]</sup>将 *Piromyces indianae* 与 *K. marxianus* 配对,构建得到一个两阶段生物处理平台(厌氧真菌在第一阶段将粗纤维水解成游离糖、有机酸和乙醇,然后微生物在第二阶段将其转化为所需产品); *K. marxianus* 不仅可以在 *P. indianae* 的水解培养基上生长,而且可以产生乙酸乙酯、2-苯基乙醇和异戊醇,将有机酸转化为有用的产物。*Neocallimastix californiae* 和 *A. robustus* 在培养中可将高达 49%的纤维质降解转化为游离葡萄糖,释放出的葡萄糖足以满足第二阶段酿酒酵母的生长需求<sup>[56]</sup>。尽管这种两阶段生物



生产系统仍需进一步优化, 但以上研究成功构建了兼具降解能力和生产能力的微生物混合培养物, 证实了从难以利用的未处理粗纤维中生产各种化学物质的可能性, 同时体现出厌氧真菌纤维降解酶的高效降解能力。

### 4.3 乳酸菌表达纤维降解酶

乳酸菌不仅是动物消化系统中常见的寄生菌, 而且具有生长快、免疫原性弱和自分泌蛋白量少的特点, 成为表达外源蛋白的理想候选者。Guo 等<sup>[57]</sup>利用乳酸杆菌(*Lactobacillus plantarum*)表达木聚糖酶 CbXyn10C 和 Bgxl, 对木聚糖、微晶纤维素和 CMC 均有活性。Ozkose 等<sup>[58]</sup>将瘤胃厌氧真菌(*Neocallimastix* sp.)的纤维素酶编码基因构建质粒结构体后, 通过电穿孔法将其在乳酸球菌(*Lactobacillus lactis*)中成功表达, 在 CMC 覆盖板上检测到丰富的羧甲基纤维素酶活性, 并作为青贮饲料添加剂应用, 使青贮的纤维值在仅仅 2 个月的青贮期内降低了 10%。将厌氧真菌纤维素酶编码基因稳定构建到乳酸菌, 可用于植物生物量的预处理, 快速降低青贮饲料的 pH, 提高饲料中非可溶性多糖的消化率, 从而显著提高青贮饲料的发酵品质和体外消化率。然而, 乳酸菌中的抗性基因很容易转移到环境中, 可能会对生物和生态造成危害, 此类安全性问题有待进一步关注研究。

## 5 纤维降解酶的应用

厌氧真菌可以表现出强于商业酶制剂的纤维降解酶活性, 但由于目前缺乏对其遗传基因的操纵技术, 无法成功建立一个稳定遗传表达的厌氧真菌模型菌株, 其纤维降解基因在其他表达系统模型中并不总是保持活性, 严重阻碍了应用进程。纤维降解酶在生物质能、饲料处理、造纸纺织和果蔬加工等方面都具有重要作用, 若能将厌氧真菌进行成功的基因改造, 将

在以上领域发挥巨大潜力。

### 5.1 纤维降解酶应用于生物质能

由于传统的不可再生能源化石燃料储量有限, 而生物质能具有环境友好、成本低廉及碳中和等特点, 加快开发利用生物质能等可再生能源已成为各界研究人士的普遍共识。生物液体燃料成为极具发展潜力的替代燃料, 燃料乙醇技术已经实现了规模化发展<sup>[59]</sup>。Li 等<sup>[60]</sup>利用厌氧真菌(*Pecoramyces* sp.) F1 与运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*) ATCC 31821 共培养发酵生产乙醇, 在木质纤维生物质无额外预处理的情况下, 乙醇的转化在 4 d 内完成, 产率达 0.32 g/g 葡萄糖。与葡萄糖和淀粉相比, 木质纤维素在生物转化过程中遇到的主要问题来自于其难以降解的复杂结构, 许多生产乙醇的微生物无法分解半纤维素中丰富的戊糖。然而, 厌氧真菌通过假根的物理穿透可以进一步深入植物组织, 同时分泌大量高活性的游离酶参与降解, 这说明发掘微生物降解戊糖的能力并与厌氧真菌纤维降解酶结合应用, 将成为今后生产生物乙醇的重要方向。

近年来, 秸秆已被用于厌氧消化或批量培养生产甲烷。一些物理和化学预处理方法可以改善秸秆的降解, 如蒸汽爆破、微波等热处理方法可以有效破坏纤维素的结晶度, 将半纤维素水解为可溶单糖, 从而提高底物在发酵过程的可及性<sup>[61]</sup>。Shi 等<sup>[62]</sup>对玉米秸秆进行蒸汽爆破预处理并用于厌氧真菌(*Pecoramyces* sp.) F1 和 *M. thaueri* 共培养发酵, 结果显示, 甲烷产量和底物消化率并未发生明显变化, 这表明厌氧真菌与产甲烷菌的共培养是一种很有前途的技术, 可以将木质纤维素基质转化为甲烷而无需进行任何预处理。Li 等<sup>[63]</sup>利用厌氧真菌(*Pecoramyces* sp.) F1 和 *M. thaueri* 共培养发酵玉米秸秆的不同部位, 结果显示, 共培养产生

的木聚糖酶活性远远高于纤维素酶, 同样展示了其对粗纤维的降解能力。如果将厌氧真菌所产纤维降解酶直接用于能源物质发酵, 可以在不影响甲烷产量的同时显著降低底物消耗量, 降低成本的同时提高生产效率。

## 5.2 纤维降解酶应用于动物饲料

在反刍动物日粮中添加外源纤维降解酶, 能够合理提高精饲料使用率, 改进饲料的营养成分, 以达到提高生长性能及畜产品质量的目的。厌氧真菌可以表现出强于商业酶制剂的纤维素酶和木聚糖酶活性, 但由于酶在瘤胃内降解迅速、成本较高等因素的限制, 目前缺少将其所产纤维降解酶直接添加至饲料的实例。研究进程停留在向反刍动物瘤胃内添加厌氧真菌培养物, 通过增加微生物数量和提高酶活性, 改善瘤胃的发酵特性。Lee 等<sup>[64]</sup>将分离得到的 *Orpinomyces* strain KNGF-2 培养物通过瘘管直接注入绵羊瘤胃, 显著提高了营养物质的体外和体内消化率及氮滞留率, 同时增加了粗纤维饲料的消化率和摄取量。

青贮饲料采用固态发酵模式, 是可靠且经济的饲用材料。Wang 等<sup>[65]</sup>将 *Piromyces* sp. CN6 CGMCC 14449 作为青贮添加剂并研究其对全株玉米青贮发酵品质、营养成分和体外消化率的影响, 厌氧真菌添加剂有效提高了青贮发酵 30 d 后干物质、中性洗涤纤维和酸性洗涤纤维的体外消化率, 成功改善了全株玉米的青贮品质和营养成分, 提高了粗纤维消化率。然而, 厌氧真菌作为一种严格的厌氧菌, 在培养、贮藏和饲养过程中存在诸多困难。若能在饲料中直接添加其所产纤维降解酶, 将大幅度降低操作难度, 提高普适性。

## 5.3 纤维降解酶应用于造纸及制浆工业

纤维降解酶在造纸及制浆工业中的应用仍是一个新兴领域。在纸浆漂白的预处理阶段加

入木聚糖酶, 能够破坏木聚糖的分子链, 疏松木质素与碳水化合物的交联结构, 进而提高漂白化学品至纸浆纤维的可达到度, 有利于木质素的去除和提高纸浆漂后的白度。You 等<sup>[66]</sup>在 *N. patriciarum* 中发现的 GH11 被命名为 Xyn-CDBFV, 其具有木聚糖水解能力, 在 60 °C、pH 10.0 条件下仍保持稳定的特性使其成为纸浆漂白的理想选择, 可进一步加快纤维降解酶的应用进程。Morrison 等<sup>[67]</sup>研究了 *P. ruminantium* strain C1A 高度转录的半纤维素水解酶 GH39 (命名为 Bg<sub>xg</sub>1) 的特性, 发现其表现出较强的 β-木糖苷酶、β-葡萄糖苷酶活性, 而且具有较高的亲和力和热稳定性。Bg<sub>xg</sub>1 作为具有多种活性的单一酶, 可有效降低生产成本。制浆过程可以通过机械加工或生化处理的方式实现, 但机械加工产生的纸浆块状和细粒含量较高, 而在生化制浆中使用纤维素酶可有效改善机械加工生产纸浆块粒含量高的缺点, 节省能源<sup>[68]</sup>。

## 5.4 纤维降解酶应用于食品加工

目前, 复合酶制剂(包括果胶裂解酶、果胶酯酶、纤维素内切酶 III、外切葡聚糖酶等)可以用于果蔬汁的提取和澄清, 酸性 α-淀粉酶特别应用于加工含淀粉较多的果蔬, 从而有效增加果蔬汁的提取量并提高品质。在对厌氧真菌基因组测序研究中, Kameshwar 等<sup>[25]</sup>发现 *N. californiae*、*Orpinomyces* sp. 和 *Piromyces* sp. E2 表现出果胶酶活性, 这使果蔬加工过程中添加厌氧真菌的纤维降解酶成为可能。Wen 等<sup>[69]</sup>在 *A. robustus* 中提取到木聚糖酶基因 *xyIAr10* (属于 GH10 家族), *P. pastoris* GS115 中表达的重组蛋白 ArXyn10 在 pH 4.0–8.0、35–45 °C 范围内保持较高的稳定性; 制作面包时向 100 g 高筋小麦粉中添加 7.5 mg 的 ArXyn10, 还原糖含量可提高 10.80%。Passarinho 等<sup>[70]</sup>也做了类似的研究: 从 *Orpinomyces* sp. strain PC-2 中得到的木聚糖酶

基因 *xynA*, 利用 *E. coli* 表达纯化后测试其水解全麦面粉的能力, 使面团体积增加了 60%, 质地硬度降低了 50% 以上。这证明厌氧真菌所产木聚糖酶在面包生产中具有潜在的应用前景。

## 6 存在的问题和展望

厌氧真菌在植物纤维组织降解中起着重要作用, 可以最先定殖到纤维质饲料并开始降解, 还具有大多酶制剂所不具备的降解晶体纤维素的能力。目前, 利用基因克隆表达技术优化生产纤维降解酶已得到重视和认可, 大肠杆菌和酵母成为生产应用中重要的表达系统, 然而仍然存在一些亟待解决的问题, 如: (1) 厌氧真菌苛刻的厌氧培养条件、复杂的营养需求及纤维降解酶产量低, 影响了瘤胃厌氧真菌纤维降解酶的大规模应用。针对此问题, 研究者可以优化厌氧真菌的发酵条件和添加比例, 测定不同条件和比例下厌氧真菌的生长情况及纤维底物的降解情况, 探求更高纤维降解酶产量的发酵模式。(2) 参与构成纤维小体的 CAZymes 分类并不清晰, 支架蛋白和锚定域结构对酶的降解活性的影响并不清楚。针对此问题, 研究者可以通过人工结合不同种 CAZymes 至纤维小体, 研究因酶种类不同而带来的降解特性差异。研究者还可以简化支架蛋白和锚定域的结构, 在不影响纤维降解酶产量及降解能力的情况下, 寻求其最低产量和最简结构。(3) 采用基因工程技术进行纤维降解酶的分子改造尚处于摸索阶段, 在生物质能、动物饲料、造纸制浆及食品加工等工业生产中应用厌氧真菌纤维降解酶的技术并不成熟。针对此问题, 研究者可以对酶的稳定性及活性进行分子改良后代替商业酶制剂应用到工业生产中, 从而得到普适性高、应用条件难度小、产量高的纤维降解酶。

研究厌氧真菌多样的纤维降解酶的特性,

将有助于完善其在瘤胃环境中有效竞争资源并降解粗纤维的知识体系, 也将进一步揭示其在工业生产中的应用潜能。

## REFERENCES

- [1] 郑娟善, 张剑搏, 梁泽毅, 丁学智. 瘤胃微生物对木质纤维素降解的研究进展[J]. 动物营养学报, 2020, 32(5): 2010-2019.  
ZHENG JS, ZHANG JB, LIANG ZY, DING XZ. Research progress on degradation of lignocellulose by rumen microorganisms[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2020, 32(5): 2010-2019 (in Chinese).
- [2] PARK YJ, JEONG YU, KONG WS. Genome sequencing and carbohydrate-active enzyme (CAZyme) repertoire of the white rot fungus *Flammulina elastica*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(8): 2379.
- [3] MAO SY, HUO WJ, ZHU WY. Microbiome-metabolome analysis reveals unhealthy alterations in the composition and metabolism of ruminal microbiota with increasing dietary grain in a goat model[J]. Environmental Microbiology, 2016, 18(2): 525-541.
- [4] EDWARDS JE, KINGSTON-SMITH AH, JIMENEZ HR, HUWS SA, SKØT KP, GRIFFITH GW, MCEWAN NR, THEODOROU MK. Dynamics of initial colonization of nonconserved perennial ryegrass by anaerobic fungi in the bovine rumen[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2008, 66(3): 537-545.
- [5] SOLOMON KV, HAITJEMA CH, HENSKE JK, GILMORE SP, BORGES-RIVERA D, LIPZEN A, BREWER HM, PURVINE SO, WRIGHT AT, THEODOROU MK, GRIGORIEV IV, REGEV A, THOMPSON DA, O'MALLEY MA. Early-branching gut fungi possess a large, comprehensive array of biomass-degrading enzymes[J]. Science, 2016, 351(6278): 1192-1195.
- [6] ORPIN CG. Studies on the rumen flagellate *Neocallimastix frontalis*[J]. Journal of General Microbiology, 1975, 91(2): 249-262.
- [7] STABEL M, HANAFY RA, SCHWEITZER T, GREIF M, ALIYU H, FLAD V, YOUNG D, LEBUHN M, ELSHAHED MS, OCHSENREITHER K, YOUSSEF NA. *Aestipascuomyces dupliciliberans* gen. nov., sp. nov., the first cultured representative of the uncultured SK<sub>4</sub> clade from aoudad sheep and alpaca[J]. Microorganisms, 2020, 8(11): 1734.

- [8] HANAFY RA, LANJEKAR VB, DHAKEPHALKAR PK, CALLAGHAN TM, DAGAR SS, GRIFFITH GW, ELSHAHED MS, YOUSSEF NH. Seven new *Neocallimastigomycota* genera from wild, zoo-housed, and domesticated herbivores greatly expand the taxonomic diversity of the phylum[J]. *Mycologia*, 2020, 112(6): 1212-1239.
- [9] BRETON A, BERNALIER A, DUSSER M, FONTY G, GAILLARD-MARTINIE B, GUILLOT J. *Anaeromyces mucronatus* nov. gen., nov. sp.: a new strictly anaerobic rumen fungus with polycentric thallus[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1990, 70(2): 177-182.
- [10] GRIFFITH GW, CALLAGHAN TM, PODMIRSEG SM, HOHLWECK D, EDWARDS JE, PUNIYA AK, DAGAR SS. *Buwchfawromyces eastonii* gen. nov., sp. nov.: a new anaerobic fungus (*Neocallimastigomycota*) isolated from buffalo faeces[J]. *Mycology*, 2015, 9: 11-28.
- [11] HENSKE JK, GILMORE SP, KNOP D, CUNNINGHAM FJ, SEXTON JA, SMALLWOOD CR, SHUTTHANANDAN V, EVANS JE, THEODOROU MK, O'MALLEY MA. Transcriptomic characterization of *Caecomyces churrovii*: a novel, non-rhizoid-forming lignocellulolytic anaerobic fungus[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10: 305.
- [12] OZKOSE E, THOMAS BJ, DAVIES DR, GRIFFITH GW, THEODOROU MK. *Cyllamyces aberensis* gen. nov. sp. nov., a new anaerobic gut fungus with branched sporangiophores isolated from cattle[J]. *Canadian Journal of Botany*, 2001, 79(6): 666-673.
- [13] HANAFY RA, ELSHAHED MS, YOUSSEF NH. *Feramyces austinii*, gen. nov., sp. nov., an anaerobic gut fungus from rumen and fecal samples of wild Barbary sheep and fallow deer[J]. *Mycologia*, 2018, 110(3): 513-525.
- [14] JOSHI A, LANJEKAR VB, DHAKEPHALKAR PK, CALLAGHAN TM, GRIFFITH GW, DAGAR SS. *Liebetanzomyces polymorphus* gen. et sp. nov., a new anaerobic fungus (*Neocallimastigomycota*) isolated from the rumen of a goat[J]. *Mycology*, 2018, 40: 89-110.
- [15] HEATH IB, BAUCHOP T, SKIPP RA. Assignment of the rumen anaerobe *Neocallimastix frontalis* to the *Spizellomycetales* (*Chytridiomycetes*) on the basis of its polyflagellate zoospore ultrastructure[J]. *Canadian Journal of Botany*, 1983, 61(1): 295-307.
- [16] DAGAR SS, KUMAR S, GRIFFITH GW, EDWARDS JE, CALLAGHAN TM, SINGH R, NAGPAL AK, PUNIYA AK. A new anaerobic fungus (*Oontomyces anksri* gen. nov., sp. nov.) from the digestive tract of the Indian camel (*Camelus dromedarius*)[J]. *Fungal Biology*, 2015, 119(8): 731-737.
- [17] LI JL, HEATH IB, CHENG KJ. The development and zoospore ultrastructure of a polycentric chytridiomycete gut fungus, *Orpinomyces joyonii* comb. nov.[J]. *Canadian Journal of Botany*, 1991, 69(3): 580-589.
- [18] HANAFY RA, YOUSSEF NH, ELSHAHED MS. *Paucimyces polynucleatus* gen. nov, sp. nov., a novel polycentric genus of anaerobic gut fungi from the faeces of a wild blackbuck antelope[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2021. DOI: 10.1099/ijsem.0.004832.
- [19] HANAFY RA, ELSHAHED MS, LIGGENSTOFFER AS, GRIFFITH GW, YOUSSEF NH. *Pecoramyces ruminantium*, gen. nov., sp. nov., an anaerobic gut fungus from the feces of cattle and sheep[J]. *Mycologia*, 2017, 109(2): 231-243.
- [20] LI JL, HEATH IB, BAUCHOP T. *Piromyces mae* and *Piromyces dumbonica*, two new species of uniflagellate anaerobic chytridiomycete fungi from the hindgut of the horse and elephant[J]. *Canadian Journal of Botany*, 1990, 68(5): 1021-1033.
- [21] 李袁飞. 共培养技术研究甲烷菌对厌氧真菌代谢的影响[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2017.
- LI YF. Investigation of the effect of methanogens on the metabolism of anaerobic fungi by co-culture technique[D]. Nanjing: Doctoral Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [22] FLAD V, YOUNG D, SEPPÄLÄ S, HOOKER C, YOUSSEF N, PODMIRSEG SM, NAGLER M, REILLY M, LI YF, FLIEGEROVÁ K, CHENG YF, GRIFFITH GW, ELSHAHED M, SOLOMON KV, O'MALLEY MA, THEODOROU MK. 17 the biotechnological potential of anaerobic gut fungi[A]//Genetics and Biotechnology[M]. Cham: Springer International Publishing, 2020: 413-437.
- [23] YOUSSEF NH, COUGER MB, STRUCHTEMEYER CG, LIGGENSTOFFER AS, PRADE RA, NAJAR FZ, ATIYEH HK, WILKINS MR, ELSHAHED MS. The genome of the anaerobic fungus *Orpinomyces* sp. strain C1A reveals the unique evolutionary history of a remarkable plant biomass degrader[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(15): 4620-4634.
- [24] HOOKER CA, LEE KZ, SOLOMON KV. Leveraging anaerobic fungi for biotechnology[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2019, 59: 103-110.

- [25] KAMESHWAR AKS, QIN WS. Genome wide analysis reveals the extrinsic cellulolytic and biohydrogen generating abilities of *Neocallimastigomycota* fungi[J]. *Journal of Genomics*, 2018, 6: 74-87.
- [26] LI YQ, MENG ZX, XU Y, SHI QC, MA YP, AUNG M, CHENG YF, ZHU WY. Interactions between anaerobic fungi and methanogens in the rumen and their biotechnological potential in biogas production from lignocellulosic materials[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(1): 190.
- [27] HOOKER CA, HILLMAN ET, OVERTON JC, ORTIZ-VELEZ A, SCHACHT M, HUNNICUTT A, MOSIER NS, SOLOMON KV. Hydrolysis of untreated lignocellulosic feedstock is independent of S-lignin composition in newly classified anaerobic fungal isolate, *Piromyces* sp. UH<sub>3</sub>-1[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11: 293.
- [28] HARHANGI HR, STEENBAKKERS PJ, AKHMANOVA A, JETTEN MS, DRIFT C, CAMP HJ. A highly expressed family 1  $\beta$ -glucosidase with transglycosylation capacity from the anaerobic fungus *Piromyces* sp. E2[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 2002, 1574(3): 293-303.
- [29] MATHUR S, UMAKANTH AV, TONAPI VA, SHARMA R, SHARMA MK. Sweet sorghum as biofuel feedstock: recent advances and available resources[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10: 146.
- [30] COUGER MB, YOUSSEF NH, STRUCHTEMEYER CG, LIGGENSTOFFER AS, ELSHAHED MS. Transcriptomic analysis of lignocellulosic biomass degradation by the anaerobic fungal isolate *Orpinomyces* sp. strain C1A[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, 8(1): 208.
- [31] HENSKE JK, GILMORE SP, HAITJEMA CH, SOLOMON KV, O'MALLEY MA. Biomass-degrading enzymes are catabolite repressed in anaerobic gut fungi[J]. *AIChE Journal*, 2018, 64(12): 4263-4270.
- [32] LEGGIERI PA, KERDMAN-ANDRADE C, LANKIEWICZ TS, VALENTINE MT, O'MALLEY MA. Non-destructive quantification of anaerobic gut fungi and methanogens in co-culture reveals increased fungal growth rate and changes in metabolic flux relative to mono-culture[J]. *Microbial Cell Factories*, 2021, 20(1): 199.
- [33] LI YF, LI YQ, JIN W, SHARPTON TJ, MACKIE RI, CANN I, CHENG YF, ZHU WY. Combined genomic, transcriptomic, proteomic, and physiological characterization of the growth of *Pecoramyces* sp. F1 in monoculture and co-culture with a syntrophic methanogen[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 435.
- [34] GRUNINGER RJ, NGUYEN TTM, REID ID, YANKE JL, WANG P, ABBOTT DW, TSANG A, MCALLISTER T. Application of transcriptomics to compare the carbohydrate active enzymes that are expressed by diverse genera of anaerobic fungi to degrade plant cell wall carbohydrates[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1581.
- [35] MA J, ZHONG P, LI YQ, SUN ZY, SUN XN, AUNG M, HAO LZ, CHENG YF, ZHU WY. Hydrogenosome, pairing anaerobic fungi and H<sub>2</sub>-utilizing microorganisms based on metabolic ties to facilitate biomass utilization[J]. *Journal of Fungi: Basel, Switzerland*, 2022, 8(4): 338.
- [36] WILSON CA, WOOD TM. The anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*: isolation and properties of a cellulosome-type enzyme fraction with the capacity to solubilize hydrogen-bond-ordered cellulose[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1992, 37(1): 125-129.
- [37] HAITJEMA CH, GILMORE SP, HENSKE JK, SOLOMON KV, de GROOT R, KUO AL, MONDO SJ, SALAMOV AA, LABUTTI K, ZHAO ZY, CHINIQUY J, BARRY K, BREWER HM, PURVINE SO, WRIGHT AT, HAINAUT M, BOXMA B, van ALEN T, HACKSTEIN JHP, HENRISSAT B, et al. A parts list for fungal cellulosomes revealed by comparative genomics[J]. *Nature Microbiology*, 2017, 2: 17087.
- [38] ARFI Y, SHAMSHOUM M, ROGACHEV I, PELEG Y, BAYER EA. Integration of bacterial lytic polysaccharide monoxygenases into designer cellulosomes promotes enhanced cellulose degradation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(25): 9109-9114.
- [39] SWIFT CL, BROWN JL, SEPPÄLÄ S, O'MALLEY MA. Co-cultivation of the anaerobic fungus *Anaeromyces robustus* with *Methanobacterium bryantii* enhances transcription of carbohydrate active enzymes[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2019, 46(9/10): 1427-1433.
- [40] PODOLSKY IA, SEPPÄLÄ S, LANKIEWICZ TS, BROWN JL, SWIFT CL, O'MALLEY MA. Harnessing nature's anaerobes for biotechnology and

- bioprocessing[J]. Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering, 2019, 10: 105-128.
- [41] MURPHY CL, YOUSSEF NH, HANAFY RA, COUGER MB, STAJICH JE, WANG Y, BAKER K, DAGAR SS, GRIFFITH GW, FARAG IF, CALLAGHAN TM, ELSHAHED MS. Horizontal gene transfer as an indispensable driver for evolution of *Neocallimastigomycota* into a distinct gut-dwelling fungal lineage[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2019, 85(15): e00988-e00919.
- [42] WANG Y, YOUSSEF NH, COUGER MB, HANAFY RA, ELSHAHED MS, STAJICH JE. Molecular dating of the emergence of anaerobic rumen fungi and the impact of laterally acquired genes[J]. mSystems, 2019, 4(4): e00247-e00219.
- [43] HAGEN LH, BROOKE CG, SHAW CA, NORBECK AD, PIAO HL, ARNTZEN MØ, OLSON HM, COPELAND A, ISERN N, SHUKLA A, ROUX S, LOMBARD V, HENRISSAT B, MICHELLE A, O'MALLEY MA, GRIGORIEV IV, TRINGE SG, MACKIE RI, PASA-TOLIC L, POPE PB, et al. Proteome specialization of anaerobic fungi during ruminal degradation of recalcitrant plant fiber[J]. The ISME Journal, 2021, 15(2): 421-434.
- [44] SEPPÄLÄ S, WILKEN SE, KNOP D, SOLOMON KV, O'MALLEY MA. The importance of sourcing enzymes from non-conventional fungi for metabolic engineering and biomass breakdown[J]. Metabolic Engineering, 2017, 44: 45-59.
- [45] BAYER EA, BELAICH JP, SHOHAM Y, LAMED R. The cellulosomes: multienzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides[J]. Annual Review of Microbiology, 2004, 58: 521-554.
- [46] GILMORE SP, LILLINGTON SP, HAITJEMA CH, de GROOT R, O'MALLEY MA. Designing chimeric enzymes inspired by fungal cellulosomes[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2020, 5(1): 23-32.
- [47] HESS M, PAUL SS, PUNIYA AK, van der GIEZEN M, SHAW C, EDWARDS JE, FLIEGEROVÁ K. Anaerobic fungi: past, present, and future[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 584893.
- [48] LILLINGTON SP, CHRISLER W, HAITJEMA CH, GILMORE SP, SMALLWOOD CR, SHUTTHANANDAN V, EVANS JE, O'MALLEY MA. Cellulosome localization patterns vary across life stages of anaerobic fungi[J]. mBio, 2021, 12(3): e0083221.
- [49] YE XY, NG TB, CHENG KJ. Purification and characterization of a cellulase from the ruminal fungus *Orpinomyces joyonii* cloned in *Escherichia coli*[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2001, 33(1): 87-94.
- [50] JONES DR, UDDIN MS, GRUNINGER RJ, PHAM TTM, THOMAS D, BORASTON AB, BRIGGS J, PLUVINAGE B, MCALLISTER TA, FORSTER RJ, TSANG A, SELINGER LB, ABBOTT DW. Discovery and characterization of family 39 glycoside hydrolases from rumen anaerobic fungi with polyspecific activity on rare arabinosyl substrates[J]. Journal of Biological Chemistry, 2017, 292(30): 12606-12620.
- [51] 马玉萍, 薛天涵, 成艳芬, 朱伟云. 瘤胃厌氧真菌木聚糖酶基因的表达与酶学特性研究[J]. 畜牧与兽医, 2021, 53(1): 24-30.
- MA YP, XUE TH, CHENG YF, ZHU WY. Cloning, expression and characteristics of xylanases from ruminal anaerobic fungus[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2021, 53(1): 24-30 (in Chinese).
- [52] CHETTRI D, VERMA AK, VERMA AK. Innovations in CAZyme gene diversity and its modification for biorefinery applications[J]. Biotechnology Reports: Amsterdam, Netherlands, 2020, 28: e00525.
- [53] SAKIHAMA Y, HIDESE R, HASUNUMA T, KONDO A. Increased flux in acetyl-CoA synthetic pathway and TCA cycle of *Kluyveromyces marxianus* under respiratory conditions[J]. Scientific Reports, 2019, 9: 5319.
- [54] MO WJ, WANG MZ, ZHAN RR, YU Y, HE YG, LU H. *Kluyveromyces marxianus* developing ethanol tolerance during adaptive evolution with significant improvements of multiple pathways[J]. Biotechnology for Biofuels, 2019, 12: 63.
- [55] HILLMAN ET, LI MW, HOOKER CA, ENGLAENDER JA, WHEELDON I, SOLOMON KV. Hydrolysis of lignocellulose by anaerobic fungi produces free sugars and organic acids for two-stage fine chemical production with *Kluyveromyces marxianus*[J]. Biotechnology Progress, 2021, 37(5): e3172.
- [56] HENSKE JK, WILKEN SE, SOLOMON KV, SMALLWOOD CR, SHUTTHANANDAN V, EVANS JE, THEODOROU MK, O'MALLEY MA. Metabolic characterization of anaerobic fungi provides a path forward for bioprocessing of crude lignocellulose[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2018, 115(4): 874-884.
- [57] GUO JG, XIE YX, YU Z, MENG G, WU Z. Effect of *Lactobacillus plantarum* expressing multifunctional glycoside hydrolases on the characteristics of alfalfa

- silage[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(19): 7983-7995.
- [58] OZKOSE E, AKYOL I, KAR B, COMLEKCIOGLU U, EKINCI MS. Expression of fungal cellulase gene in *Lactococcus lactis* to construct novel recombinant silage inoculants[J]. Folia Microbiologica, 2009, 54(4): 335-342.
- [59] 马隆龙, 唐志华, 汪丛伟, 孙永明, 吕雪峰, 陈勇. 生物质能研究现状及未来发展策略[J]. 中国科学院院刊, 2019, 34(4): 434-442.
- MA LL, TANG ZH, WANG CW, SUN YM, LYU XF, CHEN Y. Research status and future development strategy of biomass energy[J]. Bulletin of Chinese Academy of Sciences, 2019, 34(4): 434-442 (in Chinese).
- [60] LI YQ, XU Y, XUE YH, YANG SH, CHENG YF, ZHU WY. Ethanol production from lignocellulosic biomass by co-fermentation with *Pecoramyces* sp. F1 and *Zymomonas mobilis* ATCC 31821 in an integrated process[J]. Biomass and Bioenergy, 2022, 161: 106454.
- [61] SCHERZINGER M, KALTSCHMITT M. Thermal pre-treatment options to enhance anaerobic digestibility—a review[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2021, 137: 110627.
- [62] SHI QC, LI YQ, LI YF, CHENG YF, ZHU WY. Effects of steam explosion on lignocellulosic degradation of, and methane production from, corn stover by a co-cultured anaerobic fungus and methanogen[J]. Bioresource Technology, 2019, 290: 121796.
- [63] LI YQ, HOU ZS, SHI QC, CHENG YF, ZHU WY. Methane production from different parts of corn stover via a simple co-culture of an anaerobic fungus and methanogen[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 8: 314.
- [64] LEE SS, HA JK, CHENG KJ. Influence of an anaerobic fungal culture administration on *in vivo* ruminal fermentation and nutrient digestion[J]. Animal Feed Science and Technology, 2000, 88(3/4): 201-217.
- [65] WANG DD, ZHAO CC, LIU SM, ZHANG T, YAO JH, CAO YC. Effects of *Piromyces* sp. CN<sub>6</sub> CGMCC 14449 on fermentation quality, nutrient composition and the *in vitro* degradation rate of whole crop maize silage[J]. AMB Express, 2019, 9(1): 121.
- [66] YOU C, HUANG Q, XUE HP, XU Y, LU H. Potential hydrophobic interaction between two cysteines in interior hydrophobic region improves thermostability of a family 11 xylanase from *Neocallimastix patriciarum*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2010, 105(5): 861-870.
- [67] MORRISON JM, ELSHAHED MS, YOUSSEF N. A multifunctional GH39 glycoside hydrolase from the anaerobic gut fungus *Orpinomyces* sp. strain C1A[J]. PeerJ, 2016, 4: e2289.
- [68] NGUYEN DD, JEON BH, JEUNG JH, RENE ER, BANU JR, RAVINDRAN B, VU CM, NGO HH, GUO WS, CHANG SW. Thermophilic anaerobic digestion of model organic wastes: evaluation of biomethane production and multiple kinetic models analysis[J]. Bioresource Technology, 2019, 280: 269-276.
- [69] WEN ST, WU GG, WU HW. Biochemical characterization of a GH10 xylanase from the anaerobic rumen fungus *Anaeromyces robustus* and application in bread making[J]. 3 Biotech, 2021, 11(9): 406.
- [70] PASSARINHO ATP, VENTORIM RZ, MAITAN-ALFENAS GP, de OLIVEIRA EB, GUIMARÃES VM. Engineered GH11 xylanases from *Orpinomyces* sp. PC-2 improve techno-functional properties of bread dough[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2019, 99(2): 741-747.