

嗜热毁丝霉高通量培养技术及其应用

李世新^{1,3}, 涂然^{*2,3}, 张永利³, 田朝光³, 王猛^{*3}

1 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457

2 重庆工商大学环境与资源学院, 重庆 400067

3 中国科学院天津工业生物技术研究所 中国科学院低碳合成工程生物学重点实验室, 天津 300308

李世新, 涂然, 张永利, 田朝光, 王猛. 嗜热毁丝霉高通量培养技术及其应用[J]. 微生物学通报, 2023, 50(9): 4180-4189.

LI Shixin, TU Ran, ZHANG Yongli, TIAN Chaoguang, WANG Meng. A high-throughput cultivation technology and its application for *Myceliophthora thermophila*[J]. Microbiology China, 2023, 50(9): 4180-4189.

摘要: 【背景】丝状真菌是一类重要的工业发酵生产宿主菌, 如何进行高通量纯菌培养和高效检测筛选性能优异的菌株是工业丝状真菌研究的重要方向。【目的】研究建立丝状真菌的高通量培养技术并测试应用效果。【方法】通过对丝状真菌培养过程中的制种、接种、培养和检测研究, 建立基于孔板的高通量培养技术, 并以嗜热毁丝霉为例对该技术进行验证。【结果】与传统的平板制种和摇瓶接种培养方式相比, 高通量孔板的培养方式将制种通量提高 24 倍, 单位面积产孢子能力提高 350%, 液体培养转接效率提高 10–40 倍, 并建立 96 孔板测定乙醇含量的高通量检测技术。【结论】将丝状真菌的培养和检测通量提高 1–2 个数量级, 为快速检测丝状真菌改造过程产生的大量性状不同菌株并获得目标菌株奠定基础, 为丝状真菌高通量筛选研究提供应用指导价值。
关键词: 丝状真菌; 高通量培养; 孔板制种; 嗜热毁丝霉; 乙醇

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFC2100201, 2021YFC2103300); 天津市合成生物技术创新能力提升行动项目(TSBICIP-PTJS-003, TSBICIP-KJGG-006); 重庆工商大学科研启动项目(2356003)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2100201, 2021YFC2103300), the Tianjin Synthetic Biotechnology Innovation Capacity Improvement Project (TSBICIP-PTJS-003, TSBICIP-KJGG-006), and the Chongqing Technology and Business University Start-up Project (2356003).

*Corresponding authors. E-mail: TU Ran, tu_r@ctbu.edu.cn; WANG Meng, wangmeng@tib.cas.cn

Received: 2023-01-30; Accepted: 2023-04-06; Published online: 2023-05-29

A high-throughput cultivation technology and its application for *Myceliophthora thermophila*

LI Shixin^{1,3}, TU Ran^{*2,3}, ZHANG Yongli³, TIAN Chaoguang³, WANG Meng^{*3}

1 College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

2 College of Environment and Resources, Chongqing Technology and Business University, Chongqing 400067, China

3 Key Laboratory of Engineering Biology for Low-carbon Manufacturing, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

Abstract: [Background] Filamentous fungi are a key group of host fungi in industrial fermentation. How to carry out high-throughput cultivation and screen out the efficient strains is an important direction of the research on industrial filamentous fungi. [Objective] To establish a high-throughput cultivation technology of filamentous fungi and evaluate its efficiency. [Methods] After studying the seed production, inoculation, cultivation, and detection of filamentous fungi, we established a microplate-based high-throughput cultivation technology and evaluated its performance with *Myceliophthora thermophila*. [Results] Compared with the traditional methods using either plate or shake flask for seed production, the microplate-based method increased the seed production by 24 folds, the spore production per unit area by 350%, and the transfer efficiency of liquid culture by 10–40 folds. Furthermore, a 96-well microplate-based high-throughput technique was developed for ethanol content determination. [Conclusion] The developed high-throughput technology increased the cultivation and detection efficiency of filamentous fungi by 1–2 orders of magnitude. This study lays a foundation for rapid screening of the target strains from a large number of variants with different traits and provides a reference for the research on filamentous fungi.

Keywords: filamentous fungi; high-throughput cultivation; microplate-based seed production; *Myceliophthora thermophila*; ethanol

丝状真菌又称“霉菌”，是依附于有机物生长的一种具有发达菌丝体的异养真核生物，广泛分布于土壤、水体等几乎所有已知环境中，其生物总量巨大^[1]。与常用的单细胞原核微生物大肠杆菌、芽孢杆菌或真核细胞酿酒酵母、毕赤酵母相比，丝状真菌在工业生产中具有原料要求低、高表达、高分泌、翻译后加工能力强等优势^[2]。因此，丝状真菌在发酵食品^[3]和次级代谢物生产中有重要应用^[4]，如蛋白^[5]、抗生素^[6]、脂质^[7]、色素^[8]和有机酸^[9]等物质。

嗜热毁丝霉(*Myceliophthora thermophila*)是一种在生产纤维素酶和生物基燃料方面具有巨

大潜力的工业丝状真菌，能够高产纤维素酶和快速降解纤维素。嗜热毁丝霉的最适生长范围为45–50 °C，在自然界常见于土壤及堆肥中，是耐高温纤维素酶的优良生产者，天然具有分泌大量生物质降解酶类的能力，并能充分利用降解产生的纤维二糖、葡萄糖和木糖等多种糖类，在纤维素和葡萄糖中的生长速率和细胞密度几乎一致^[10]。同时该菌最适生长温度较高，可以节约发酵过程中的冷却水用量，降低生产成本，被美国食品和药物管理局公认为安全状态，是商业木质纤维素分解酶制剂使用最广泛的生产菌株，已被证实可以用来大规模工业发酵^[11]。

嗜热毁丝霉菌株的改造离不开高效筛选技术,尤其是随着 CRISPR 技术的深入研究^[12],针对嗜热毁丝霉的基因改造有了全新的方式,大大提高了突变菌株的数量,但如何针对大量不同性状、不同基因型或表型的菌株进行高通量培养验证仍未解决。一是目前嗜热毁丝霉的培养大多采用培养皿(固体)和摇瓶(液体),由于培养体积大,占用设备空间大,造成试剂消耗高、有限空间下培养通量低、成本高等不足。二是传统方式下丝状真菌的培养时间漫长,单孢子获取方式烦琐,且在培养过程中易飞散造成污染,导致难以提高其检测筛选通量。因此,研究如何进行丝状真菌的高通量纯菌培养日益重要。

本文通过对丝状真菌的制种、接种、培养和检测等环节针对性的研究,建立了嗜热毁丝霉的高通量孔板培养技术,并以产乙醇为例验证可行性,以期工业丝状真菌的高通量改造筛选提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

嗜热毁丝霉 WT 菌株 ATCC 42464 购自美国模式菌株保藏中心。A1 及 A2 均为实验室改造所得乙醇高产菌株^[13],且乙醇产量排序为:WT<A1<A2。

1.1.2 培养基

MM 液体培养基(g/L): 50×Vogel's 盐^[14] 20.0, 蔗糖 20.0, 组氨酸 1.0。

MM 斜面培养基(g/L): 50×Vogel's 盐 20.0, 蔗糖 20.0, 琼脂 15.0, 组氨酸 1.0。

1.1.3 主要试剂和仪器

苯酚、EDTA、磷酸盐缓冲液、醇氧化酶、过氧化物酶、氨基安替比林和 H₂SO₄, Sigma-Aldrich 公司。培养箱,上海一恒科学仪器有限公司;超声清洗机,宁波新芝生物科技

有限公司;涡旋振荡器,Scientific Industries 公司;超净工作台,苏州安泰空气技术有限公司;酶标仪,Bio-Tek 公司;可见分光光度计,翱艺仪器(上海)有限公司;显微镜,徕卡显微系统;高通量培养摇床,上海旻泉仪器有限公司;高压液相色谱仪,苏州邦鑫电子有限公司;HPX-87H 色谱柱,Bio-Rad 公司;MTP-48-OFF 型梅花孔板及配套 F-GPR48-10 型封口膜,广州伯齐生物科技有限公司;P0650-RR 型 6 孔板、P2410 型 24 孔板、P9620 型 96 孔板,上海甘薇生物科技有限公司;CT001167 型透气封板膜,济南城投科贸有限公司;3590 型 96 孔微孔板(microtiter plate, MTP),康宁公司。

1.2 方法

1.2.1 丝状真菌培养制种

平皿制种:将灭菌后的 MM 培养基加热至完全溶解,倒入平皿后轻微摇晃至均匀分布整个平皿,待冷却凝固后,将嗜热毁丝霉的孢子 OD₄₂₀ 调为 0.1,取 50 μL 于平皿表面,涂布均匀后,封口膜单层封口,置于 45 °C 恒温培养箱中,倒置培养 10 d 左右,待孢子成熟。

试管制种:将灭菌后的 MM 培养基加热至完全溶解,取 3 mL 加入试管后,将试管略微倾斜,待培养基凝固后,取上述孢子 17 μL,保证单位面积接种量与平皿一致,盖子盖紧后,置于 45 °C 恒温培养箱中,培养 10 d 左右,待孢子成熟。

孔板制种:将灭菌后的 MM 培养基加热至完全溶解,取 3 mL 加入 24 孔板,冷却凝固后,同样取孢子 17 μL,保证单位面积接种量与平皿一致,用封板膜将口封紧,置于 45 °C 恒温培养箱中,培养 10 d 左右,待孢子成熟。

1.2.2 丝状真菌孢子悬液制备

平皿单孢子采用吹洗刮板的方式处理获得。超净台灭菌 30 min 后,关闭紫外灯,关闭

通风。将培养成熟的平板取出,在超净台中加入 1–2 mL 无菌水,摇晃润湿后,将接种环贴着培养基表面轻轻刮取,尽量在同一角度,避免刮破培养基。期间不断用平板中的无菌水润湿接种环,将培养基表面的孢子全部刮取下来后,吸取 1–2 mL 无菌水对培养基表面进行冲洗,得到含有孢子、菌丝及小块培养基的悬液。将无菌的擦镜纸折叠成一侧 3 层、一侧 9 层的圆锥形状,放置于离心管口处卡紧,吸取得到的悬液从 3 层侧过滤。重复过滤 3 次,将菌丝及培养基块等物质尽可能去除。将过滤后的孢子取 10 μ L 悬液置于显微镜下观察。

试管和孔板单孢子分别采用超声或者涡旋振荡方式获得。采用超声方式时,将含有培养成熟孢子的试管及孔板中加入 1–2 mL 无菌水,并用封口膜封口,然后放在超声设备中用 40 kHz 超声 7 min,其中处理和间隔时间均是 10 s,再将含有孢子的悬液吸取到离心管中。采用涡旋振荡方式时,将含有培养成熟孢子的试管及孔板中加入 1–2 mL 无菌水,封口后放在涡旋振荡仪上 1 500 r/min 处理 3 min,再将含有孢子的悬液吸取到离心管中。上述两种方式获得的单分散孢子分别取 10 μ L 悬液于显微镜下观察其分散情况。

孢子萌发率统计:培养通过吹洗刮板、超声及涡旋振荡 3 种方式获得的孢子稀释到同一浓度,并分别涂布于 MM 培养基,45 $^{\circ}$ C 静置培养 5 d 后取平板观察计数平板上生长的菌落数。每种样品做 3 个平行,取平均值。

1.2.3 孢子悬浮液接种和培养

通过优化的单孢子制备方式获得孢子悬液,按照 2.5×10^5 个/mL 的接种量将嗜热毁丝霉孢子悬液接种到不同培养容器中进行培养,包括梅花形 48 孔板、带挡板 24 孔板、普通 24 孔板、试管和带挡板 6 孔板。

1.2.4 产物检测

微孔板法测乙醇含量:参考文献[15]分别制备 RI 和 RII 两种溶液,通过 96 微孔板高通量检测样品的乙醇浓度。溶液 RI 中含有 6 mmol/L 苯酚、0.257 mmol/L pH 7.5 EDTA 和 0.1 mmol/L pH 7.5 磷酸盐缓冲液,溶液 RII 中含有 3 000 U/L 醇氧化酶、600 U/L 过氧化物酶、3.5 mmol/L 氨基安替比林和 0.1 mmol/L pH 7.5 磷酸盐缓冲液。测定绘制标准曲线时,先在 96 孔微孔板反应中加入溶液 RI 100 μ L,再分别加入不同浓度的乙醇标准液 10 μ L,最后加入 RII 100 μ L,注意应将 MTP 放置在冰上保持低温操作。测定实际样品时,将上述乙醇标准液更换成孔板培养得到的嗜热毁丝霉发酵上清液即可。反应开始时,将测定的 MTP 从冰上转移到 30 $^{\circ}$ C 反应 30–60 min,设定酶标仪的吸光度检测波长为 500 nm,每 30 min 测定吸光度数值(A_{500})。将 A_{500} 与乙醇浓度关联绘制标准曲线,根据标准曲线和样品 A_{500} 计算样品中的乙醇含量。

高压液相色谱(HPLC)测乙醇含量:取 1 mL 发酵液于 1.5 mL 离心管中,12 000 r/min 离心 10 min,上清液用 0.22 μ m 滤膜过滤,处理后的样品用 Waters e2695 型高压液相色谱测定产物乙醇含量,采用 HPX-87H 色谱柱,检测器为 2414 示差检测器,5 mmol/L H_2SO_4 为流动相,流速为 0.5 mL/min。

2 结果与分析

2.1 高通量制种技术的建立

提高丝状真菌制种通量,可以在菌株验证及培养过程中更快速高效地得到目标性状菌株,为此比较了平皿、试管及 24 孔板 3 种培养方式丝状真菌制种培养方式的通量及其单位面积产孢子能力。结果发现孔板培养方式不仅节省占用面积,而且具有更大的产孢子能力。如图 1 和图 2 所示,3 种培养方式获得的孢子数目

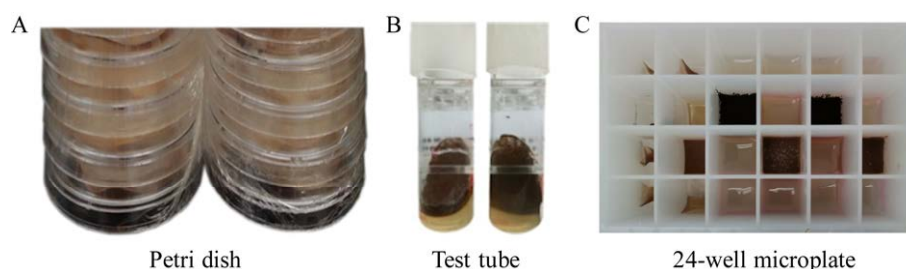


图1 不同制种方式的孢子生长状态

Figure 1 Spore growth state of different seed production methods.

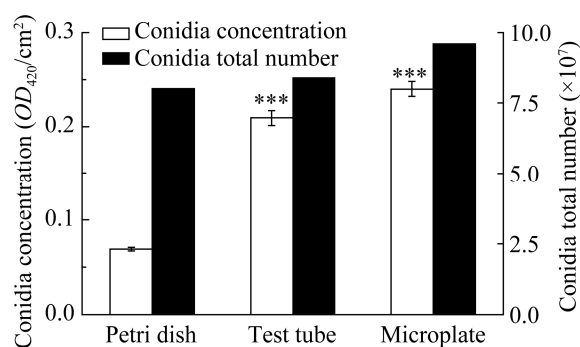


图2 不同制种方式的产孢子能力对比

Figure 2 Sporulation capacity of different seed production methods. ***: $P \leq 0.001$, $n=3$.

相差不大,但试管及孔板的产孢子面积远小于平皿培养。其中平皿培养的单位面积产孢子能力仅约为试管培养的33%,而24孔板的培养方式单位培养面积产孢子能力相较于平皿方式提高350%,培养通量提高24倍。

利用24孔板培养的方式不仅大幅提高了单位面积的产孢子能力,而且有效提高了制种通量,在菌株改造过程中有效增加了菌株检测筛选效率,减少了耗材成本和工作强度。

2.2 单分散孢子的制备

经过固体培养得到的孢子,在进行液体发酵之前需要对孢子进行单分散处理,以确保发酵结果的均一性及可重复性。为简便快速地获得单分散孢子,分别尝试使用3种不同方式对固体培养后的孢子进行处理,以确定最简便快

速的获得单分散孢子方式。

传统的吹洗刮板需要接种环等工具将培养皿中的孢子和菌丝全部刮取。如图3A所示,显微镜镜检表明所得孢子悬液中除孢子外含有大量菌丝等杂质物质,需采用无菌擦镜纸过滤除去杂质物质,不仅步骤较为烦琐,而且每次都只能洗涤一个平皿,洗涤效率低。对比传统的培养皿吹洗刮板方式,涡旋振荡能对多个容器同时进行操作,增加了制备孢子悬液的效率。利用涡旋振荡的方式对试管和24孔板进行孢子处理,如图3B所示,显微镜镜检表明得到的孢子悬液中几乎不含有菌丝,可以直接用于下一步试验,无需擦镜纸过滤操作。

超声同样能对多个容器内的孢子同时进行操作,利用超声的方式对试管及24孔板进行孢子处理,显微镜镜检发现所得孢子数目极低,表明超声仅能够使得小部分孢子从平皿上脱离,孢子得率较低。如图4所示,孢子计数试验结果表明吹洗刮板方式和涡旋振荡方式的孢子得率分别是 10^7 个/mL和 10^6 – 10^7 个/mL,而超声处理方式的孢子得率是 10^3 – 10^4 个/mL,是另两种方式的千分之一左右。此外,采用超声获得的孢子萌发率仅为吹洗刮板方式的81%,表明超声过程对孢子损伤较大。但是采用涡旋振

荡方式不仅能获得几乎所有单分散孢子,而且孢子得率和孢子萌发率与传统平皿吹洗刮板方式差别不大。

因此,利用涡旋振荡的方式对孢子进行单分散既避免了烦琐的孢子过滤步骤,又能够保证获得的孢子具有理想的萌发效率,相较于平皿的吹吸刮板方式极大地提高了孢子洗涤效率。

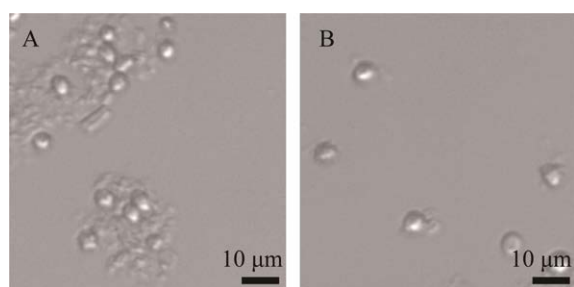


图3 不同单分散孢子制备方式的效果对比 A: 吹洗刮板. B: 涡旋振荡.

Figure 3 Monodisperse spores prepared by different methods. A: Scraping and blowing. B: Vortex oscillation.

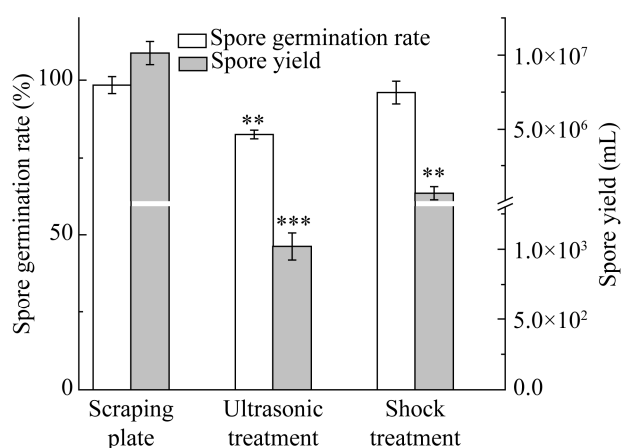


图4 不同处理方式的孢子得率及萌发率

Figure 4 Spore yield and germination rate by different treatments. **: $P \leq 0.01$, ***: $P \leq 0.001$, $n=3$.

2.3 高通量液体培养技术的建立

目前实验室采用的丝状真菌液体培养方式为三角瓶摇瓶培养,这种培养方式效率较低,每次只能对单个摇瓶接种和取样,且体积较大、通量低。为了提高丝状真菌液体培养效率,寻求高通量的液体培养方法,分别比较了梅花形 48 孔板、挡板 24 孔板、普通 24 孔板、试管及挡板 6 孔板等培养容器中菌液的生长状态及发酵产物的产量。

如图 5 和图 6 所示,通过比较菌液的生长状态发现,利用梅花形 48 孔板、普通 24 孔板及试管培养的菌液不均匀,有严重的黏壁现象,并且不同样品间菌液的生长状态具有较大差距,重复性不佳;而利用带有挡板的 24 孔板和 6 孔板培养的菌液质地均匀,黏壁现象不明显。表明利用孔板的培养效果优于梅花形孔板和试管培养,可能是因为由于 24 孔板及 6 孔板中加有挡板,增大了培养基在振荡培养过程中的混合状态,以及菌体与培养基的接触机会,增加了溶氧效果。

对挡板 24 孔板、挡板 6 孔板和普通摇瓶为培养容器的菌液乙醇产量进行测定比较,结果发现采用挡板 24 孔板为培养容器的乙醇产量远低于摇瓶发酵,其原因可能是孔板中的挡板提高了培养基的混合程度和溶解氧含量,而乙醇是厌氧培养产物,因此溶解氧增加导致乙醇产量降低。如图 7 所示,当采用挡板 6 孔板培养时乙醇产量较高,与摇瓶培养产量接近。图 6 中培养基载液量为 20 mL 的样品误差较大,可能原因一是由于载液量增多导致混合均匀性降低,二是因孔板在培养箱中位置不同导致振荡偏差。综上所述,虽然 24 孔板培养方式通量更高,但由于发酵产量较低而无法反映真实产量,在初筛大批量样品时选用较适宜,而后期少量样品复筛时采用 6 孔板效果更好,不仅贴近摇瓶发酵效果,而且转接培养效率提高数 10 倍。

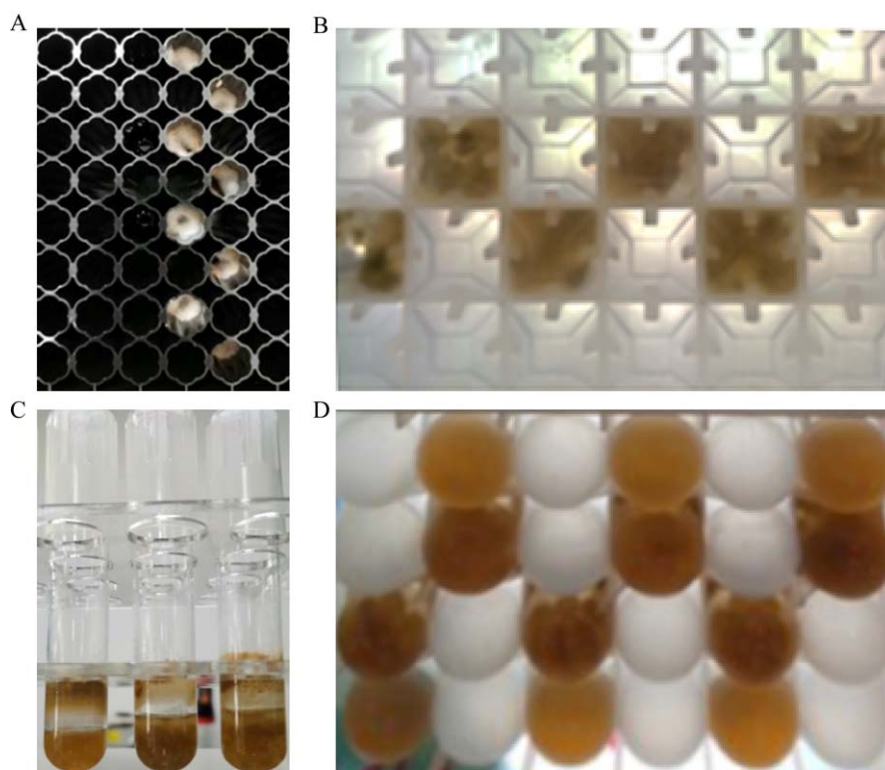


图5 不同培养容器液体培养结果 A: 48孔梅花板. B: 挡板24孔板. C: 试管. D: 普通24孔板

Figure 5 The results of liquid culture in different culture containers. A: 48-well plum microplate. B: Baffle 24-well microplate. C: Test tube. D: Normal 24-well microplate.

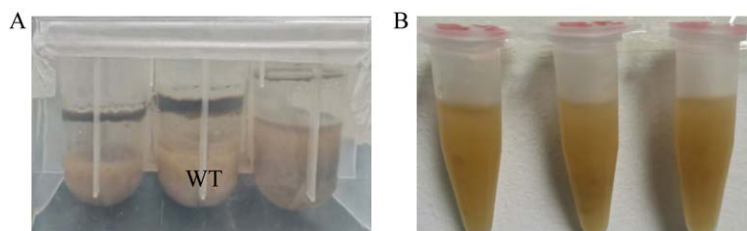


图6 挡板6孔板培养结果 A: 6孔挡板培养液. B: 吸出的培养液

Figure 6 Culture results of baffle 6-well plate. A: Culture in baffle 6-well plate. B: Extracted culture.

2.4 液体培养转速的条件优化

丝状真菌的液体培养过程中经常面临着菌丝结团形成菌丝球的情况,而菌丝球是霉菌在液体环境中的特有形态,可能跟温度、转速等因素有关。菌丝成球后的菌丝团具有特殊形态和细胞通透性,从而会影响菌丝的生长及代谢产物的生产。培养容器中的离心力可以通过公式计算:离心力(FC)=转速²×振幅,振幅和转速

会影响培养容器的离心力,从而影响培养基的混合^[16]。当使用孔板进行丝状真菌的培养过程中,由于孔板内装液量的限制,过大的振荡振幅可能会导致液体的飞溅造成菌体污染等问题。而且由公式可知离心力的变化随转速的二次方变化,为了改善丝状真菌培养过程中菌丝结团的问题,增加培养基的混合、选择合适的转速在丝状真菌液体培养时非常重要。

利用 24 孔板对嗜热毁丝霉菌株进行培养时,采用转速范围在 60–1 200 r/min、偏心距为 6 mm 的叠加式高通量振荡培养箱进行培养。如图 8 所示,比较 24 孔板在不同转速条件下的液体培养,当摇床的转速在 220 r/min 或 250 r/min 时,孔板中形成明显的菌丝团,菌体生长不均匀,不同样本之间的菌体含量误差较大;当转速提高至 850 r/min 时,培养后的菌液较为均一,存在少量菌丝团;当培养转速提高至 1 200 r/min 时,孔板中的菌液均匀,不同孔之间的培养结果平行性好。

综上所述,当采用孔板培养丝状真菌时,高转速不仅能够增加培养基的混合程度,使菌株均匀生长,也能提高培养基的传递效率,获得更高的丝状真菌生物量。

2.5 孔板高通量检测乙醇技术研究

菌株经过液体发酵所得产物的产量是评判菌株优良性的重要参数,常规方式是利用高压液相色谱对样品进行分析,而这种方式进行产物测定费用较高,并且需要消耗大量时间来冲洗色谱柱。当需要测定产量的不同菌株数目较多时,利用液相色谱技术耗时耗力效率低下。本研究以乙醇为目标发酵产品,研发利用孔板高通量检测发酵液技术。

如图 9 所示,将乙醇的标准品溶液稀释至不同浓度,在 96 微孔板中用双酶偶联方法测

定,发现当乙醇的浓度在 0–10 g/L 的范围内, A_{500} 与乙醇浓度呈线性关系。随后将野生型菌株 WT 和高产菌株 A1 两种菌株分别采用 6 孔板 10、15、20 mL 和摇瓶 100 mL 进行发酵,发酵产物分别利用 96 孔板双酶偶联方法测定和高压液相色谱进行分析。如图 10 所示,微孔板预测结果与色谱法结果基本相同,表明利用孔板方式进行乙醇含量的测定结果准确。

利用孔板方式测定发酵液中的乙醇含量具有通量高、速度快和操作简便的优势,显著增加了高产乙醇菌株的丝状真菌检测筛选效率。

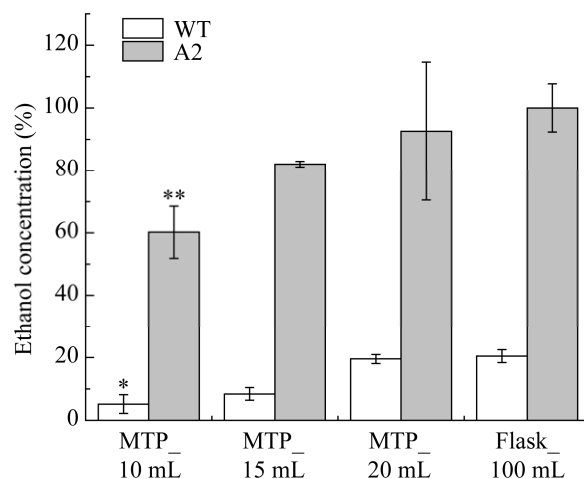


图 7 6 孔板培养与摇瓶的乙醇产量对比

Figure 7 Comparison of ethanol yield by shake flask and 6-well microplate cultivation. *: $P \leq 0.05$, **: $P \leq 0.01$, $n=2$.

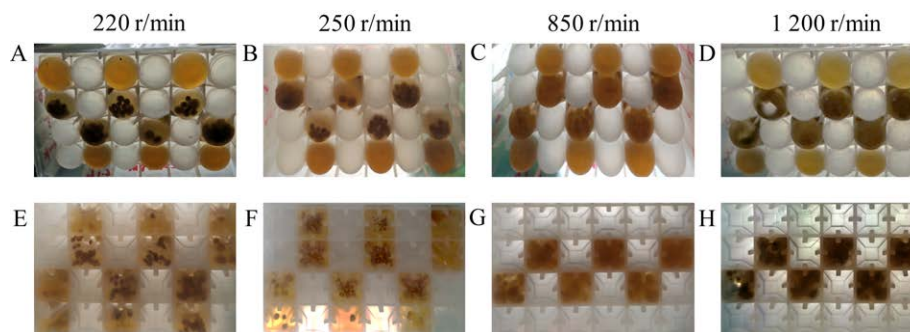


图 8 不同转速的 24 微孔板培养比较 A–D: 普通孔板. E–H: 挡板 24 孔板

Figure 8 Comparison of 24-well plate culture with different rotational speeds. A–D: Normal well microplates. E–H: Baffle microplates.

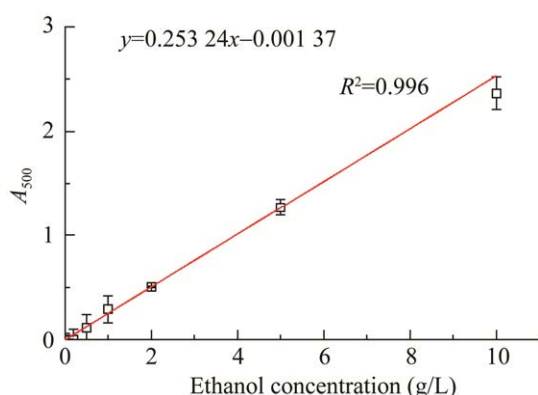


图9 96微孔板检测乙醇含量的标准曲线

Figure 9 Standard curve of ethanol concentration using 96-well MTP.

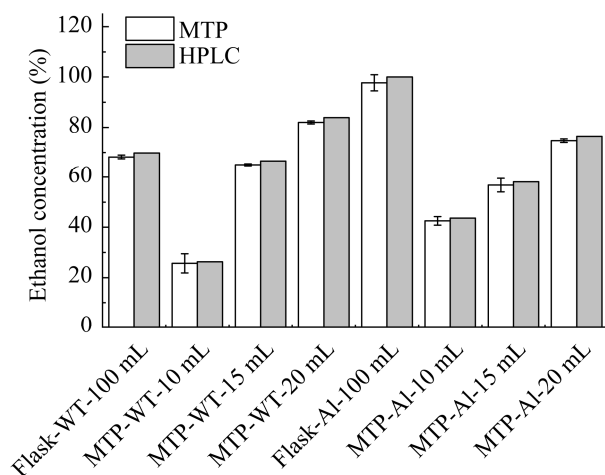


图10 孔板及摇瓶发酵乙醇产量测定

Figure 10 Determination of ethanol production cultured by MTP or shake flask fermentation.

3 讨论与结论

丝状真菌作为重要的工业发酵微生物，在蛋白质、抗生素等次级代谢产物的发酵生产中起着重要作用。随着对丝状真菌的基因组研究越来越深入，利用 CRISPR 等技术对丝状真菌的改造技术愈发成熟。然而在改造过程中会产生大量不同个体，其验证过程需要消耗大量人力物力，严重影响研究进度。本文通过对丝状真菌的制种、接种、培养和检测等各个环节针

对性的研究，简化了制种步骤，将制种通量提高 24 倍，改进了单分散孢子制备方式，大幅提高了单分散孢子制备效率，同时也优化了孔板培养条件，将液体培养转接效率提高 10 倍，并建立了基于孔板的乙醇产量高通量检测方法。

通过上述高通量技术研究，将丝状真菌的菌株培养与检测验证通量大幅提高，解决了丝状真菌菌株非理性改造时无法高通量培养验证和高效筛选获得目标菌株的瓶颈问题，为丝状真菌的高通量筛选研究提供了应用指导价值。

REFERENCES

- [1] 戈帆. 云南高原湖泊滇池的可培养丝状真菌多样性及其活性研究[D]. 昆明: 云南大学硕士学位论文, 2017. GE F. Diversity and bioactivities of filamentous fungi isolated from the Dianchi Lake of Yunnan Plateau[D]. Kunming: Master's Thesis of Yunnan University, 2017 (in Chinese).
- [2] KUN RS, GOMES ACS, HILDÉN KS, CEREZO SS, MÄKELÄ MR, de VRIES RP. Developments and opportunities in fungal strain engineering for the production of novel enzymes and enzyme cocktails for plant biomass degradation[J]. *Biotechnology Advances*, 2019, 37(6): 107361.
- [3] 彭俊, 励飞, 刘维. 丝状真菌在发酵豆粕中的应用研究概述[J]. *饲料博览*, 2020(3): 20-24, 29. PENG J, LI F, LIU W. Overview of research on the application filamentous fungi in fermented soybean meal[J]. *Feed Review*, 2020(3): 20-24, 29 (in Chinese).
- [4] 耿青如, 杨飞洋, 王雨荷, 车雨微, 杨坤龙. 丝状真菌次级代谢产物的功能与合成调控研究进展[J]. *菌物学报*, 2020, 39(3): 539-547. GENG QR, YANG FY, WANG YH, CHE YW, YANG KL. Research advance in functional and synthetic regulation of secondary metabolites of filamentous fungi[J]. *Mycosystema*, 2020, 39(3): 539-547 (in Chinese).
- [5] 冯欣欣, 李凤兰, 徐永清, 李磊, 贺付蒙, 冯艳忠, 袁强, 刘娣. 新疆寒冷地区腐木中产纤维素酶菌株的筛选与低温产酶特性[J]. *浙江农业学报*, 2021, 33(8): 1468-1476. FENG XX, LI FL, XU YQ, LI L, HE FM, FENG YZ, YUAN Q, LIU D. Screening of cellulase producing strains from rotten wood in Xinjiang cold area and analysis of their characteristics of enzyme production at

- low temperature[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2021, 33(8): 1468-1476 (in Chinese).
- [6] 杜凤翔, 郭晓媚, 杨琳, 高书山. 真菌来源的药用天然产物[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(9): 2411-2418.
- DU FX, GUO XM, YANG L, GAO SS. Natural medicinal products of fungal origin[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(9): 2411-2418 (in Chinese).
- [7] CHANG LL, CHEN HQ, TANG X, ZHAO JX, ZHANG H, CHEN YQ, CHEN W. Advances in improving the biotechnological application of oleaginous fungus *Mortierella alpina*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(16): 6275-6289.
- [8] 张银. 丝状真菌发酵生产食品色素的研究[J]. *中国调味品*, 2015, 40(1): 115-118.
- ZHANG Y. Research on fermentation and production of food pigments with filamentous fungi[J]. *China Condiment*, 2015, 40(1): 115-118 (in Chinese).
- [9] HU W, LI WJ, YANG HQ, CHEN JH. Current strategies and future prospects for enhancing microbial production of citric acid[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(1): 201-209.
- [10] 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.
- 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).
- [11] 来亚鹏, 刘刚, 王娟. 嗜热真菌 β -葡萄糖苷酶基因克隆表达与调控的研究进展[J]. *纤维素科学与技术*, 2017, 25(2): 69-76.
- LAI YP, LIU G, WANG J. Advances on gene cloning, expression and regulation of β -glucosidase from thermophilic fungi[J]. *Journal of Cellulose Science and Technology*, 2017, 25(2): 69-76 (in Chinese).
- [12] LIU R, CHEN L, JIANG YP, ZHOU ZH, ZOU G. Efficient genome editing in filamentous fungus *Trichoderma reesei* using the CRISPR/Cas9 system[J]. *Cell Discovery*, 2015, 1: 15007.
- [13] LI JY, ZHANG YL, LI JG, SUN T, TIAN CG. Metabolic engineering of the cellulolytic thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila* to produce ethanol from cellobiose[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2020, 13: 23.
- [14] VOGEL HJ. A convenient growth medium for *Neurospora*[J]. *Microbial Genetics Bull*, 1956, 13: 42-46.
- [15] QI XN, ZHANG YY, TU R, LIN YP, LI X, WANG QH. High-throughput screening and characterization of xylose-utilizing, ethanol-tolerant thermophilic bacteria for bioethanol production[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2011, 110(6): 1584-1591.
- [16] 李超. 计算流体力学在生物过程优化与放大中的应用[D]. 上海: 华东理工大学硕士学位论文, 2013.
- LI C. The application of computational fluid dynamics in optimization and scale-up of bioprocess[D]. Shanghai: Master's Thesis of East China University of Science and Technology, 2013 (in Chinese).