

## 瑞氏木霉表达黑曲霉葡萄糖氧化酶

# Recombinant *Aspergillus niger* Glucose Oxidase Expressed in *Trichoderma reesei*

母敬郁<sup>1</sup>, 王 峤<sup>2</sup>, 杨纯中<sup>2</sup>, 王恩思<sup>1\*</sup>, 王 清<sup>2</sup>, 黄 跃<sup>2</sup>

MU Jing-Yu<sup>1</sup>, WANG Qiao<sup>2</sup>, YANG Daniel<sup>2</sup>, WANG En-Si<sup>1\*</sup>, WANG Qing<sup>2</sup> and HUANG Yue<sup>2</sup>

1 吉林大学药学院, 长春 130021

2 微星生物技术公司, 加拿大 L9H 7H9

1 School of Pharmaceuticals, Jilin University, Changchun 130021, China

2 MicroStar Biotech Inc., Hamilton, Ontario L9H 7H9, Canada

**摘 要** 利用高表达分泌纤维素酶的真菌瑞氏木霉表达重组的黑曲霉葡萄糖氧化酶。在大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中构建瑞氏木霉纤维素酶 CBHI 启动子和 CBHI 信号肽基因-黑曲霉葡萄糖氧化酶基因-瑞氏木霉纤维素酶 CBHI 终止子-构巢曲霉的甘油醛 3 磷酸脱氢酶启动子-大肠杆菌抗潮霉素 B 磷酸转移酶基因-构巢曲霉色氨酸 C 终止子-pUC19(命名为 pCBHGOD)质粒,线性化后用瑞氏木霉纤维素酶 CBHI 启动子和 CBHI 信号肽基因-黑曲霉葡萄糖氧化酶基因-瑞氏木霉纤维素酶 CBHI 终止子-构巢曲霉的甘油醛 3 磷酸脱氢酶启动子-大肠杆菌抗潮霉素 B 磷酸转移酶基因-构巢曲霉色氨酸 C 终止子(命名为 CBHGOD)核酸片段转化瑞氏木霉 QM9414 原生质体。用 PCR 扩增方法筛选出同源重组葡萄糖氧化酶基因的瑞氏木霉突变株。用麦杆诱导瑞氏木霉突变株,生产黑曲霉葡萄糖氧化酶,Western blot 分析重组的葡萄糖氧化酶分子量与 Sigma 公司的天然黑曲霉葡萄糖氧化酶一致,生产的重组酶活性 25u/mL,相当于 Sigma 公司葡萄糖氧化酶标准品的产量为 0.5g/L。瑞氏木霉可用于生产黑曲霉葡萄糖氧化酶。

**关键词** 瑞氏木霉,黑曲霉,葡萄糖氧化酶,同源重组

中图分类号 Q784,Q786,TQ925+.3 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)01-0082-05

**Abstract** It was expected that recombinant *Aspergillus niger* glucose oxidase could be expressed in *Trichoderma reesei* with stable activity. *T. reesei* CBHI promoter - CBHI ss. gene-*A. niger* glucose oxidase gene - *T. reesei* CBHI terminator - *A. nidulans* gpd promoter - *E. coli* Hygromycin B phosphotransferase gene - *A. nidulans* trpC terminator - pUC19 (pCBHGOD) vector was constructed in *E. coli* DH5 $\alpha$  by PCR application and gene cloning methods. *T. reesei* QM9414 protoplast was transformed by *T. reesei* CBHI promoter-CBHI ss. Gene- *A. niger* glucose oxidase gene-*T. reesei* CBHI terminator-*A. nidulans* gpd promoter - *E. coli* Hygromycin B phosphotransferase gene-*A. nidulans* trpC terminator linear DNA fragment (CBHGOD fragment) that was made by digestion of pCBHGOD with *Kpn* I. *T. reesei* mutant clone with homologous recombinant *A. niger* glucose oxidase gene was selected by PCR method. Recombinant glucose oxidase was produced by mutant *T. reesei* strain under induction of wheat straw for 5 days. Recombinant glucose oxidase molecular mass was showed the same as native *A. niger* glucose oxidase standard from Sigma company by Western blot analysis. Recombinant glucose oxidase activity was 25u/mL in medium. The yield was 0.5 g/L in comparison with Sigma company glucose oxidase standard. There was no recombinant GOD degradation during *Trichoderma reesei* cultivation that was showed in Western blot analysis. *Trichoderma reesei* has capability to be a new

recombinant host for *Aspergillus niger* GOD production.

**Key words** *Trichoderma reesei* , *Aspergillus niger* , glucose oxidase , homologous recombination

葡萄糖氧化酶( Glucose Oxidase ,简称 GOD.E.C. 1.1.34 )是一种需氧脱氢酶 ,它能利用分子氧作电子受体 ,专一地催化  $\beta$ -D-葡萄糖氧化成为葡萄糖酸和过氧化氢<sup>[1]</sup>。近年来 ,葡萄糖氧化酶被广泛地应用于食品工业和发酵工业 ,及作为医学诊断试剂和环境检测的分析工具<sup>[2]</sup>。黑曲霉( *Aspergillus niger* , 简写 *A. niger* )是工业上用于生产葡萄糖氧化酶的主要菌种 ,由于 GOD 在生产过程中广泛分布于胞外 ( 占 38% )、胞壁上( 占 34% )、胞浆中( 占 12% )和粘质液中( 占 16% )<sup>[3]</sup> ,在产品纯化过程中同时从培养液中和菌丝体中回收 GOD 并不现实 ,所以其产量总有相当大的丢失。因此用基因工程等其他方法构建更优良的生产 GOD 的微生物一直受到各国科学家的重视<sup>[4,5]</sup>。瑞氏木霉( *Trichoderma reesei* , 简写 *T. reesei* )是公认的生产分泌蛋白质最高的工业微生物之一<sup>[6]</sup> ,在适宜条件下分泌蛋白质表达量占总蛋白的 50% ,其中纤维素酶 CBHI 产量占分泌蛋白质的 60% ,CBHI 最高产量可达到 40g/L 发酵液<sup>[7]</sup>。黑曲霉和瑞氏木霉同属丝状真菌界霉菌 ,用瑞氏木霉的纤维素酶 CBHI 启动子诱导表达黑曲霉葡萄糖氧化酶 ,应是微生物工业提高葡萄糖氧化酶产量的可行方法。

# 1 材料和方法

## 1.1 材料

构巢曲霉( *Aspergillus nidulans* , ATCC 38163 )、黑曲霉( *Aspergillus niger* , ATCC 9029 )、瑞氏木霉 *Trichoderma reesei* QM9414 , ATCC 26921 ) , 含 Hygromycin B phosphotransferase gene 质粒的大肠杆菌 ( ATCC 37647 ) , 都购自 American Type Culture Collection( ATCC )。PCR 反应引物由加拿大 Sigma Genosys 公司合成 ,构建的重组 DNA 载体核酸序列测定由加拿大 McMaster 大学分子生物学和生物技术研究中心( MOBIX )完成。黑曲霉 GOD 标准品购于 Sigma 公司 ,黑曲霉 GOD 兔源抗体购自 RDI ( Research Diagnostics Inc. ) , Opti-4CN 羊抗兔检测盒购自 BIO-RAD 公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 PCR 所用引物及其序列 :

F1 5'-CACGTGTGATTTAATAGCTCCATGTC-3'  
R1 5'-GGTACCACAGTACACGAGGACTTCTA-3'

F2 5'-CACGTGATGAAAAAGCCTGAACTCACC  
GACGTCTG-3'  
R2 5'-CTATTCCTTTGCCCTCGGACGAGTG-3'  
F3 5'-CACGTGCCTCGTCCTGTCACAACCTACC-3'  
R3 5'-GGTGATGTCTGCTCAAGCG-3'  
F4 5'-GCGGCCGCCACCACCACCACCACCCTAAAGC  
TCCGTGCGAAAGCCTG-3'  
R4 5'-GGGTCTCGGCTACGTTGTCATC-3'  
F5 5'-CTCGAGGAATTCTCACCCTGAATGTAGG-3'  
R5 5'-GCACGAGCTGTGCCAAGAAG-3'  
F6 5'-GCAATAAGATGCGGCCGCTAGCAATGGCATTG  
AAGCCAG-3'  
R6 5'-GTAATGAATAGCGGCCGCCCTGCATGGAAGC  
ATAATCTTCC-3'  
F7 5'-CACGTGCACCCTTGACGACTGTCCG-3'

1.2.2 外源载体构建 :提取 *A. nidulans* , *A. niger* , *T. reesei* 基因组 DNA<sup>[8]</sup> 和提取含 Hygromycin B phosphotransferase gene 的质粒作 PCR 反应模板 ,用引物 F1 和引物 R1 扩增 *A. nidulans* 的色氨酸 ( $\alpha$  trpC ) 终止子 ,用引物 F2 和引物 R2 扩增大肠杆菌抗潮霉素 B ( Hygromycin B , 简写 HygB ) 磷酸转移酶基因 ,用引物 F3 和引物 R3 扩增 *A. nidulans* 甘油醛 3 磷酸脱氢酶( Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase , 简写 gpd )启动子 ,用引物 F4 和引物 R4 扩增 *T. reesei* CBHI 终止子 ,用引物 F5 和引物 R5 扩增 *T. reesei* CBHI 启动子和 CBHI 信号肽基因 ,用引物 F6 和引物 R6 扩增 *A. niger* 葡萄糖氧化酶基因。CBHI 启动子和 CBHI 信号肽基因-GOD 基因-CBHI 终止子-gpd 启动子-潮霉素 B 磷酸转移酶基因-trp C 终止子-pUC19 质粒( 命名为 pCBHGOD )构建过程见图 1。

1.2.3 转化 DNA 片段制备 :在大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中提取 pCBHGOD 质粒 ,用 *kpn* I 消化后 ,在 1% Agarose gel 上提取 CBHI 启动子-CBHI 信号肽基因-GOD-CBHI 终止子-gpd 启动子-HygB 磷酸转移酶基因-trpC 终止子核酸片段( 命名为 CBHGOD 核酸片段 ) ,用 QIAGEN 公司 QZAEX II gel extraction kit 纯化。

1.2.4 转化 *T. reesei* QM9414 原生质体 :按 Penttila 方法<sup>[9]</sup>制备瑞氏木霉 QM9414 原生质体 ,并用一条 CBHGOD 核酸片段转化 *T. reesei* QM9414 原生质体。在基本培养基潮霉素 B 琼脂选择平板上 [ 20mg/mL

glucose, 5mg/mL (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 15mg/mL KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.6mg/mL MgSO<sub>4</sub>, 0.6mg/mL CaCl<sub>2</sub>, 0.005mg/mL FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.0016mg/mL MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, 0.0014

mg/mL ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.002mg/mL CoCl<sub>2</sub>, 2% Agar, 100μg/mL Hygromycin B 培养 3d 后挑出阳性克隆继续传代。

pUC19 + Sma I → + trp C terminator ⇒ trp C term-pUC19, + Eco721 → + Hygromycin B phosphotransferase gene ⇒ Hyg B Phosphotransferase-trp C term-pUC19, + Eco721 → + gpd promoter ⇒ gpd prom-HygB phosphotransferase-trpC term-pUC19, + Eco721 → + CBHI term ⇒ CBHI term-gpd prom-HygB phosphotransferase-trp C term-pUC19, + Not I + Klenow fragment 5'→3' fill-in → + CBHI prom - CBHI ss. ⇒ CBHI prom - CBHI ss. - CBHI term - gpd prom - HygB phosphotransferase - trpC term - pUC19, + Not I → + GOD + Not I ⇒ CBHI prom - CBHI ss. - GOD - CBHI term - gpd prom - HygB phosphotransferase - trpC term - pUC19 (pCBHGOD)

图 1 CBHI 启动子和 CBHI 信号肽基因-GOD 基因-CBHI 终止子-gpd 启动子-潮霉素 B 磷酸转移酶基因 -trp C 终止子-pUC19 (命名为 pCBHGOD) 质粒构建

Fig. 1 Construction of CBHI I prom-CBHI I ss.- GOD - CBHI I term - gpd prom - Hyg B phosphotransferase - trp C term - pUC19 (pCBHGOD)

**1.2.5 转化阳性克隆株鉴定** :以转化重组株基因组 DNA 为模板,用引物 F5 和引物 R6,PCR 扩增 CBHI prom-CBHI ss-GOD 基因片段。用引物 F6 和引物 R4,PCR 扩增 GOD-CBHI term 基因片段。用引物 F7 和引物 R4,PCR 扩增 CBHI 部分基因-CBHI 终止子基因片段。选择只有 CBHI prom-CBHI ss-GOD 和 GOD-CBHI term 的 PCR 扩增结果都为阳性,并且 CBHI 部分基因-CBHI 终止子的 PCR 扩增结果为阴性的重组株,作为同源重组的候选株。

**1.2.6 重组 GOD 的瑞氏木霉突变株诱导表达** :在基本培养基里用绞碎的麦杆诱导在 CBHI 区重组 GOD 的瑞氏木霉生产 GOD,调控培养液 PH = 5,在第 5 天取上清液用 Western blot 检测重组 GOD 产品。

**1.2.7 葡萄糖氧化酶活性分析** 按 Kelley 方法<sup>[10]</sup>测定葡萄糖氧化酶活性。

## 2 结果

### 2.1 外源 DNA 载体序列分析

pCBHGOD 质粒送加拿大 McMaster 大学 MOBIX 做核酸序列测定,将所有各段测序结果送加做全序列分析,结果证明所有 PCR 扩增的基因片段插入 pUC19 载体时,DNA 连接点都准确,并且插入序列没有发生突变。

### 2.2 线性化 DNA 转化 *T. reesei* QM9414 原生质体机率

Kpn I 消化后得到的 CBHGOD 核酸片段全长约 8.5kb,取 5 μg DNA 转化 1 × 10<sup>8</sup>/mL *T. reesei* QM9414 原生质体 200 μL 3d 后计数转化率为 10 ~ 50 转化株/μg DNA。

### 2.3 同源重组 GOD 的瑞氏木霉突变株鉴定

随机挑选 3 个阳性转化株,通过 PCR 方法区分同源重组和随机插入突变株,以 *T. reesei* QM9414 野

生型基因组做 PCR 背景对照。3 对引物 PCR 扩增都为阳性,外源 DNA 是随机插入到基因组中,CBHI 基因结构区没被破坏。CBHI prom-GOD 和 GOD-CBHI term 引物 PCR 扩增为阳性,而 CBHI 部分基因片段-CBHI term 引物 PCR 扩增为阴性,外源 DNA 是同源重组到基因组中,CBHI 基因被 GOD 替换。*T. reesei* QM9414 野生型基因组作对照,CBHI prom-GOD 和 GOD-CBHI term 引物扩增为阴性,只有 CBHI 部分基因片段-CBHI term 引物扩增为阳性。图 2 显示这三个转化株中,株-1 和株-3 为同源重组候选株,株-2 为随机插入候选株。

### 2.4 *T. reesei* QM9414 葡萄糖氧化酶转化株诱导表达产物分析

麦杆切碎后放入 *T. reesei* 基本培养液中诱导 GOD 表达,同源重组株-1 和株-3 及随机插入株-2 都能产生分泌的 GOD,而 *T. reesei* QM9414 野生型不产生 GOD。图 3 是 Western blot 分析培养上清液,显示 *T. reesei* 产生的黑曲霉 GOD 分子量与 Sigma 公司天然黑曲霉 GOD 分子量一致,亚基分子量都为 80kD。在 pH = 5 培养液条件下,诱导至第 5 天仍未见 GOD 降解,Western blot 分析结果只可见一条带。

### 2.5 重组 GOD 表达产量

测定同源重组转化株-1 在诱导第 5 天时,GOD 活性为 25u/mL 上清培养液,而 *T. reesei* QM9414 野生型在同等条件下测不到 GOD 活性。以 Sigma 公司天然黑曲霉 GOD 标准品比活换算,重组 GOD 产量达到 0.5g/L。

## 3 讨论

考虑到用瑞氏木霉生产黑曲霉 GOD 的生物安全性,作者在设计 trpC 终止子 3'端引物时,人为地加入了核酸限制性内切酶 Kpn I 识别位点,同时在

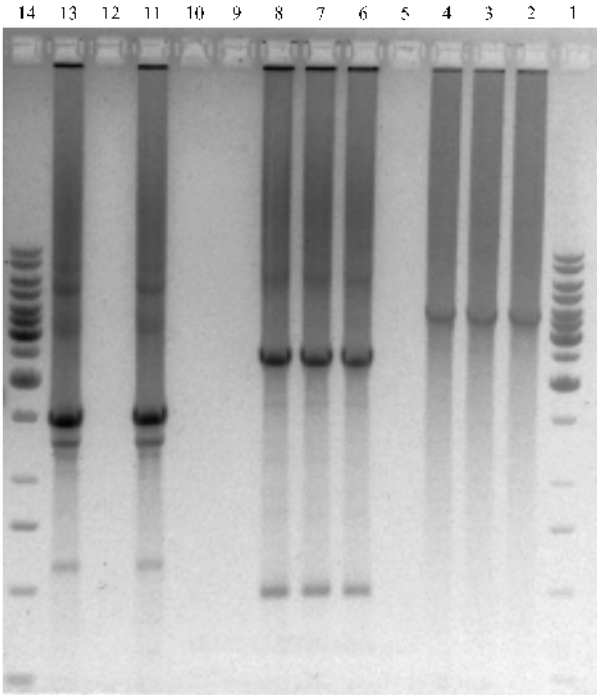


图2 PCR方法检测同源重组和随机插入的转化株

Fig.2 PCR test for homologous recombination and random insertion in transformants

1,14: MBI GeneRuler 1kb DNA ladder # SM0311 (0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 5, 6, 8, 10kb); 2~5: primer F5 and primer R6 PCR for transformant 1, 2, 3, and wildtype QM9414 (positive PCR band is 4015 bp); 6~9: primer F6 and primer R4 PCR for transformant 1, 2, 3, and wildtype QM9414 (positive PCR band is 2408 bp); 10~13: primer F7 and primer R4 PCR for transformant 1, 2, 3, and wildtype QM9414 (positive PCR band is 1512 bp).

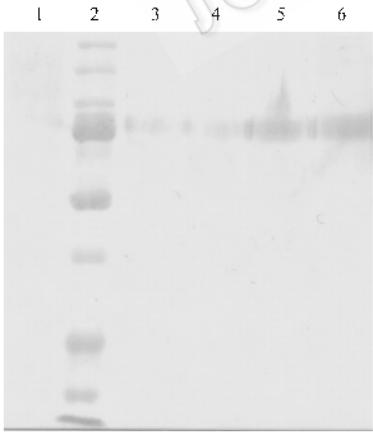


图3 10%分离胶 Western blot 分析麦杆诱导重组瑞氏木霉生产黑曲霉 GOD

Fig.3 10% separate gel Western blot analysis for recombinant *A. niger* GOD produced in *T. reesei* under induction of wheat straw

1: *T. reesei* QM9414 wild type; 2: Bio-Rad 161-0374 prestained protein marker (10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150, 250 kD); 3: transformant strain 3; 4: transformant strain 2; 5: transformant strain 1; 6: sigma *A. niger* GOD standard.

前有一个 *Kpn* I 识别序列,在核醇分析软件 CLONE 里确定 CBHI 启动子, CBHI 信号肽基因, GOD 基因, CBHI 终止子, *gpd* 启动子, *HygB* 磷酸转移酶基因, *trpC* 终止子的 DNA 序列都不存在 *Kpn* I 识别序列。因此,可以用 *Kpn* I 消化 pCBHGOD, 去掉大肠杆菌来源的 pUC19 质粒序列,特别是 ampicillin 抗性基因,尽量保护生物工程产品的种属相对安全性。

本文选用 *T. reesei* 最强的 CBHI 启动子诱导 GOD 表达,采用可被 *T. reesei* 识别的构巢曲霉强 *gpd* 启动子诱导选择标志物 *HygB* 磷酸转移酶表达,把两个不同目的的表达序列串联在一起,就极大地保证了转化后,在 *HygB* 选择培养基上存活的阳性克隆,都有生产 GOD 的能力。但用 PCR 方法筛选同源重组和随机插入转化株时,在定性的角度上,是一个简单、安全、快速的好方法,但不能定量地选择出每一个转化株内转化 DNA 的数量。只有进一步诱导表达后,测 GOD 的产量和活性来筛选工业生产上实用的转化株。

瑞氏木霉作为微生物工业常用的发酵菌种,已有多种外源蛋白质转化不同种的瑞氏木霉<sup>[11-15]</sup>。但由于瑞氏木霉有其自身偏爱的密码子,并且有糖基化表达蛋白质的能力等特点,使得非丝状真菌来源的蛋白质,可能由于转录 RNA 后不稳定而使信使 RNA 产量低,或由于自身折叠在宿主细胞内不正确从而会影响其在细胞内分泌通道中的转位,或由于其对宿主的蛋白酶过度敏感而易被破坏,在瑞氏木霉中产量或活性能达到工业上可应用的程度比较困难<sup>[16,17]</sup>。重组宿主表达的外源蛋白质越是种源接近,其活性就越稳定和产量就越高<sup>[18]</sup>。同源的蛋白质在 CBHI 启动子调控下,产量和产品活性显著高于其它外源蛋白质在 CBHI 启动子调控下的表达<sup>[19]</sup>。黑曲霉和瑞氏木霉都是丝状真菌,黑曲霉糖蛋白 GOD 在瑞氏木霉中生产时,糖基化程度和蛋白质折叠过程等应该与天然黑曲霉 GOD 生产机制相似<sup>[20,21]</sup>,因此存在高表达重组 GOD 的可能性。在 CBHI 信号肽引导下重组 GOD 以泌出形式表达,利于简化下游的纯化步骤。瑞氏木霉在 CBHI 启动子诱导条件下不会分泌生产触酶(catalase),极大地避免了触酶对 GOD 产品的污染。瑞氏木霉对培养基和诱导条件要求简单,可较大地降低工业上生产 GOD 的成本。Western blot 分析和重组 GOD 活性测定,都证明重组瑞氏木霉可生产有活性的黑曲霉葡萄糖氧化酶。

## REFERENCES (参考文献)

- [ 1 ] Hatzinikolaou DG, Hansen OC, Macris BJ *et al.* A new glucose oxidase from *Aspergillus niger*: characterization and regulation studies of enzyme and gene. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1996, **46**: 371 – 381
- [ 2 ] Gouda MD, Singh SA, Rao AG *et al.* Thermal inactivation of glucose oxidase: mechanism and stabilization using additives. *J Bio Chem*, 2003, **278**( 27 ): 24324 – 24333
- [ 3 ] Clarke KG, Johnstone-Robertson M, Price B *et al.* Location of glucose oxidase during production by *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, August 17, pp.1 – 6 [Epub ahead of print]
- [ 4 ] Khattab AA, Bazaraa WA. Screening, mutagenesis and protoplast fusion of *Aspergillus niger* for the enhancement of extracellular glucose oxidase production. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2005, **32**: 289 – 294
- [ 5 ] Luque R, Orejas M, Perotti NI *et al.* pH control of the production of recombinant glucose oxidase in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, **97**: 332 – 337
- [ 6 ] Chand P, Aruna A, Maqsood AM *et al.* Novel mutation method for increased cellulase production. *J App Microbio*, 2005, **98**( 2 ): 318 – 323
- [ 7 ] Durand S, Clanet M, Tiraby G. Genetic improvement of *Trichoderma reesei* for large scale cellulase production. *Enzyme and Microbio Technol*, 1988, **10**: 341 – 345
- [ 8 ] Liu D, Coloe S, Baird R *et al.* Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. *J Clin Microbio*, 2000, **38**( 1 ): 471
- [ 9 ] Penttila M, Nevalainen H, Ratto M *et al.* A versatile transformation system for the cellulytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Gene*, 1987, **61**: 155 – 164
- [ 10 ] Kelley RL, Reddy CA. Purification and characterization of glucose oxidase from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *J Bacteriol*, 1986, **166**( 1 ): 269 – 274
- [ 11 ] Nykanen MJ, Raudaskoski M, Nevalainen H *et al.* Expression of barley endopeptidase B in *Trichoderma reesei*. *App and Environmental Microbio*, 1997, **63**( 12 ): 4938 – 4940
- [ 12 ] Bergquist P, Te'o V, Gibbs M *et al.* Expression of xylanase enzymes from thermophilic microorganisms in fungal hosts. *Extremophiles*, 2002, **6**: 177 – 184
- [ 13 ] Paloheimo M, Mantyla A, Kallio J *et al.* High-yield production of a bacterial xylanase in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* requires a carrier polypeptide with an intact domain structure. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**( 12 ): 7073 – 7082
- [ 14 ] Murray P, Aro N, Collins C *et al.* Expression in *Trichoderma reesei* and characterization of a thermostable family 3  $\beta$ -glucosidase from the moderately thermophilic fungus *Talaromyces emersonii*. *Protein Expression and Purification*, 2004, **38**: 248 – 257
- [ 15 ] Leskinen S, Mantyla A, Fagerstrom R *et al.* Thermostable xylanases, Xyn10A and Xyn11A, from the actinomycete *Nonomuraea flexuosa*: isolation of the genes and characterization of recombinant Xyn11A polypeptides produced in *Trichoderma reesei*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, **67**: 495 – 505
- [ 16 ] Bergquist PL, Te'o VS, Gibbs MD *et al.* Recombinant enzymes from thermophilic micro-organisms expressed in fungal hosts. *Biochemical Society Transactions*, 2004, **32**( 2 ): 293 – 297
- [ 17 ] Collen A, Saloheimo M, Bailey M *et al.* Protein production and induction of the unfolded protein response in *Trichoderma reesei* strain Rut-C30 and its transformant expressing endoglucanase I with a hydrophobic tag. *Biotechnology and Bioengineering*, 2005, **89**( 3 ): 335 – 344
- [ 18 ] Kiiskinen LL, Kruus K, Bailey M *et al.* Expression of *Melanocarpus albomyces* laccase in *Trichoderma reesei* and characterization of the purified enzyme. *Microbiology*, 2004, **150**: 3065 – 3074
- [ 19 ] Karlsson J, Saloheimo M, Siika-Aho M *et al.* Homologous expression and characterization of Cel61A(EG IV) of *Trichoderma reesei*. *Eur J Biochem*, 2001, **268**: 6498 – 6507
- [ 20 ] Miettinen-Oinonen A, Torkkeli T, Paloheimo M *et al.* Overexpression of the *Aspergillus niger* pH2.5 acid phosphatase gene in a heterologous host *Trichoderma reesei*. *J Biotech*, 1997, **58**: 13 – 20
- [ 21 ] Maras M, van Die I, Contreras R *et al.* Filamentous fungi as production organisms for glycoproteins of bio-medical interest. *Glycoconjugate Journal*, 1999, **16**: 99 – 107