

# 真菌降解木质纤维素的功能基因组学研究进展

田朝光<sup>1</sup>, 马延和<sup>2</sup>

1 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308

2 中国科学院微生物研究所 微生物资源国家重点实验室, 北京 100101

**摘要:** 木质纤维素利用的核心问题之一是生物质的降解, 即如何将生物质由高聚大分子降解为可发酵的小分子糖, 又称为糖化。自然界中向胞外大量分泌降解生物质酶类的微生物主要是真菌, 研究真菌木质纤维素降解途径的分子机理对生物质的综合利用意义重大, 是木质纤维素能否实现全面生物炼制的关键之一。以下将针对真菌降解木质纤维素的研究进展, 特别是对利用功能基因组学所取得的进展进行评述。

**关键词:** 木质纤维素, 真菌, 功能基因组

## Progress in lignocellulose deconstruction by fungi

Chaoguang Tian<sup>1</sup>, and Yanhe Ma<sup>2</sup>

1 Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

2 State Key laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

**Abstract:** Inefficient degradation of lignocellulose is one of the main barriers for the utilization of renewable plant biomass for biofuel production. The bottleneck of the biorefinery process is the generation of fermentable sugars from complicated biomass polymers. In nature, the main microbes of lignocelluloses deconstruction are fungi. Therefore, elucidating the mechanism of lignocelluloses degradation by fungi is of critical importance for the commercialization of lignocellulosic biofuels. This review focuses on the progress in lignocelluloses degradation pathways in fungi, especially on the advances made by functional genomics studies.

**Keywords:** lignocelluloses, fungi, functional genomics

由于能源供应的日益短缺和温室效应的不断加剧, 可再生清洁能源的发展成为当今世界的重要问题<sup>[1]</sup>。生物质能源作为潜力巨大和环境友好的新能源是各国都争相研究的重点<sup>[2]</sup>。地球上最主要的生物质来自绿色植物, 主要由 3 类大分子组成, 含量最多的是纤维素, 由成百上千个葡萄糖分子聚合而

成, 为地球上存在最丰富的有机大分子, 储量约为 850 亿 t<sup>[3]</sup>; 其次是半纤维素, 储量约为 500 亿 t; 第三类是木质素, 由结构复杂的含芳香环的有机分子聚合而成, 约占 20%, 即 350 亿 t。如果能够成功利用储量巨大的生物质能源, 人类社会不仅能源供应无须担忧, 而且由于生物质能源不会增加 CO<sub>2</sub> 排

**Received:** May 27, 2010; **Accepted:** July 12, 2010

**Supported by:** National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2007CB707801), One Hundred Person Project of the Chinese Academy of Sciences.

**Corresponding author:** Chaoguang Tian. Tel: +86-22-84861947; Fax: +86-22-84861948; E-mail: tian\_cg@tib.cas.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2007CB707801), 中国科学院百人计划项目资助。

放,使地球温室效应得到控制,具有巨大的经济和社会效益<sup>[4]</sup>。

要利用生物质,主要有 2 个基本代谢步骤<sup>[2]</sup>:第一步要将复杂的生物质大分子降解为单糖(又称之为糖化,主要产物是葡萄糖和木糖)。这一步目前主要有两种方法:第一是物理化学法,如高温汽爆、强酸处理等,物理法能量消耗巨大,成本很高且对环境带来威胁;另一种是生物酶法,主要是利用真菌来源的纤维素酶系来处理生物质得到单糖。由于生物酶法条件温和、环境友好而倍受关注。第二步是将已得到的单糖通过生物转化(发酵)得到各类生物基产品(如乙醇、丁醇等)。

如何将生物质降解为单糖是生物质利用的重要瓶颈<sup>[5]</sup>。因为不管是哪种降解方法,目前的成本都太高,不具有商业化能力,从而很难走出实验室,服务于人类社会。要想真正利用生物质,必须在生物质降解技术上有所突破。要提高生物质降解酶系的效率,传统诱变技术已经取得了很大进步,提升空间有限,必须在生物质降解的分子基础上下功夫、找突破,而新一代各类组学技术,为揭示生物质降解的分子机理提供了极为重要的新思路。生物质降解分子机理的阐明,必将大大加快新一代快速高效的纤维素酶系和菌系的研发进程,显著降低生物质的糖化成本,为全面实现生物质的真正利用提供理论支撑。

## 1 真菌降解木质纤维素的功能基因组学研究进展

在自然界能够降解木质纤维素的微生物中,最为重要的是真菌系统。木质纤维素降解为小分子糖的整个过程非常复杂,至少几十种酶参与,相互协同作用,破坏植物细胞壁的复杂结构,从而降解木质素、纤维素和半纤维素。在木质素降解真菌中,研究最多的是隶属担子菌门的白腐菌、褐腐菌和子囊菌门的丝状真菌(木霉、脉孢菌、青霉菌等)。随着组学时代的来临,真菌降解木质纤维素的功能基因组学研究进展很快,给深入理解这一复杂生物学途径和生物质利用提供了新的思路。

### 1.1 白腐菌

是一类能够有效降解木质素的真菌,主要是担子菌。在白腐菌中,有些优先降解利用木质素,对纤维素较少利用,如 *Phanerochaete chrysosporium*,称之为选择性去木质素(Selective delignification);有些白腐菌对木质素利用没有选择性(Non-selective delignification),能够同时降解木质素和纤维素,如 *Trametes versicolor*<sup>[6]</sup>。由于木质素呈黄褐色,而纤维素呈白色,所以经此类真菌降解后的生物质由于去除了木质素,富含纤维素而呈现白色,所以称该类真菌为白腐菌。在白腐菌中,参与木质素降解的酶类主要是过氧化物酶(Peroxidases),通过对木质素进行氧化,将其降解。过氧化物酶有 3 类:木素过氧化物酶 LiP(Lignin peroxidase),锰过氧化物酶 MnP(Manganese peroxidase),通用过氧化物酶 VP(Versatile peroxidase),这 3 类酶的功能有一定的分工协作,具体机制还有待进一步研究。参与木质素降解的另一类研究较多的酶是漆酶(Laccase),为一类含铜的多酚氧化酶,广泛存在于多种木质纤维素降解真菌中。与过氧化物酶不同的是,漆酶利用 O<sub>2</sub> 分子作为氧化剂,而且通常分子量大于过氧化物酶,可达到 60 kDa 以上。与多数分泌型酶蛋白一样,过氧化物酶和漆酶都是糖基化蛋白<sup>[6-7]</sup>。

研究最多的白腐菌是 *Phanerochaete chrysosporium*,其基因组序列于 2004 年公布<sup>[8]</sup>。其基因组序列分析和随后的转录组和分泌蛋白组研究带来了许多新的发现<sup>[9-11]</sup>。转录组分析发现,545 个基因或蛋白在木质纤维素降解过程中表达呈现显著变化。木质纤维素培养基与丰富培养基的基因表达谱比较分析发现,分别有 208 个基因在碳源限制培养基,163 个基因在氮源限制培养基,136 个基因在纤维素培养基中显著上调,包括大量的氧化还原酶、碳水化合物代谢相关酶(纤维素内切酶、外切酶,木聚糖酶等)、糖转运蛋白,在氮缺乏的培养基中发现谷氨酰胺蛋白酶高度表达。另外有高达 190 种功能未知的蛋白,而且部分未知功能蛋白含有信号肽和 CBM 结构域,显然与木质纤维素代谢有关<sup>[9]</sup>。而在稍早的分泌蛋白研究中发现,纤维素培养条件和木材培养条件分泌蛋白的表达谱很相似,大量纤维素类酶表达

分泌。说明对于木质素降解真菌 *P. chrysosporium*, 纤维素同样是很好的木质素降解相关酶类的诱导物<sup>[11]</sup>, 尽管通常认为其为选择性降解木质素型 (Selective delignification)。在纤维素培养条件下, 木聚糖酶的表达远远低于木材锯末的培养物, 说明木聚糖酶和纤维素酶是分开调控的<sup>[11]</sup>。另外, 在 *P. chrysosporium* 中, 葡萄糖同样抑制木质纤维素酶的表达, 即使在氮饥饿的条件下, 葡萄糖同样抑制木质纤维素酶的表达。在白腐菌基因组中没有发现传统的漆酶基因, 取而代之的是与漆酶有着远缘关系的多铜氧化酶 MCO (Multicopper oxidases)<sup>[8]</sup>, 说明漆酶可以帮助木质素降解, 但不是木质素降解的必需基因<sup>[12]</sup>。149 个 P450 基因的发现, 暗示 P450 可能与木质素降解代谢途径相关。综合起来, 各类数据说明, 木质素降解是一个非常复杂的问题。功能基因组学研究显示很多新基因参与了该过程, 为木质素降解机理的研究提供了新的目标靶点和思路。但要彻底阐释木质素降解机理还需要对功能基因组学中得到的数据进行功能验证, 比如基因敲除等, 而这些在担子菌研究方面, 还有许多障碍需要克服。

## 1.2 褐腐菌

主要类群也属于担子菌, 是生态系统中的重要一员, 特别是在自然环境的碳循环中, 扮演重要角色。褐腐菌 (比如 *Postia placenta*) 主要降解纤维素和半纤维素, 不能降解木质素, 但可以分泌酶类修饰木质素的结构, 如木质素的去甲基化, 使得纤维素和半纤维素充分暴露, 从而被降解。这样, 降解后的残渣主要是木质素, 呈现褐色, 所以将它们称为褐腐菌<sup>[7]</sup>, 研究最多的是 *Postia placenta*。2009 年, Martinez 等分析了 *P. placenta* 的基因组、转录组和分泌组。结果显示, *P. placenta* 具有独特的胞外酶系统, 包括不寻常的胞外糖水解酶 (Glycoside hydrolases, GH), 但没有发现纤维素外切酶 (CBH) 和纤维素结合结构域家族 1 (CBM1)。当 *P. placenta* 以纤维素为唯一碳源生长时, 许多半纤维素酶和纤维素内切酶有非常高的表达, 而分泌蛋白组的质谱分析验证了转录水平的变化<sup>[12]</sup>。褐腐菌与白腐菌同属担子菌, 但只有后者能够降解木质素, 这一降解途径的进化机理也吸引了不少科学家去探索。到底

褐腐菌 *Postia placenta* 有没有木质素降解基因呢? 基因组分析没有发现 3 类过氧化物酶基因 (LiP, MnP 和 VP) 和漆酶基因, 与其不能降解木质素相一致<sup>[8,12]</sup>。

## 1.3 里氏木霉 *Trichoderma reesei*

里氏木霉 *Trichoderma reesei* 是最著名的纤维素降解真菌, 属于子囊菌。二战期间在美军军营发现<sup>[13]</sup>, 在随后的 60 多年研究中, 经过不断的诱变筛选, 里氏木霉细胞外纤维素酶的产量可达 40 g/L, 有报道称达到 100 g/L<sup>[14]</sup>, 是至今为止发现的各类纤维素降解微生物中最高的。尽管诱变育种取得了显著进展, 但纤维素酶的成本依然很高, 仍然需要显著提高效率, 降低用酶量。加上对纤维素酶表达分泌及其调控机理都知之甚少, 这些都需要从生物学分子基础上加大研究, 提供思路。功能基因组学使人们可以从整个基因组水平来探索这些问题, 给许多分子操作困难的物种带来新的研究思路。里氏木霉由于是商业纤维素酶的主要生产菌种, 受到的关注和研究众多。2008 年其基因组序列测序完成, 发展了基因克隆等遗传转化系统。基因组分析结果显示, *Trichoderma reesei* 基因组含有 200 个糖水解酶 (GH), 与该纲其他丝状真菌 (*Neurospora crassa* 171, *Magnaporthe grisea* 231, *Fusarium graminearum* 243) 的平均值 215 相差不大。但含有的纤维素结合蛋白却是数目最少的, 只有 36 个, 其中经典纤维素酶 (endo- 和 exo-) 是最少的, 只有 11 个<sup>[15]</sup>。前文提到木霉分泌蛋白量可以高达 100 g/L, 所以, 其分泌途径备受关注, 基因组数据分析表明, 里氏木霉含有较多的分泌途径相关基因, 如蛋白质降解途径的内质网相关基因和分泌相关的膜融合蛋白基因, 均多于酿酒酵母<sup>[15]</sup>。里氏木霉基因组的另一个特点是许多糖水解酶在基因组中呈簇分布, 可能有利于此类基因表达的高效调控。比较基因组学也是阐释生物学机理的重要手段, 特别是对于研究诱变获得的高产菌株的生物学机理。通过比较原始出发菌株和诱变后菌株的基因组水平差异, 与性状联系起来分析, 有望揭示突变株纤维素酶高产的机理。RUT C30 是公开可以得到的最高产酶菌株, 纤维素酶产量可以达到 40 g/L。它是由原始菌株 Q6a 经过两轮

诱变 (Q6a→M7→RG14→RUT C30) 得到。2009年, 美国科学家通过新一代测序技术将两轮诱变中得到的菌株 (RG14, RUT C30) 基因组测序, 从中窥探到纤维素酶高产菌株的奥秘<sup>[16]</sup>。比较基因组学分析显示, 在高产菌株 RUT C30 基因组中, 与原始菌株相比, 至少有 223 个单核苷酸突变 (SNP): 包括 43 个氨基酸变化的突变, 功能分布在细胞核转运、mRNA 稳定性、转录调控和分泌途径等; 15 个小的基因组缺失或插入。另外有 18 个大的缺失, 总的缺失基因组高达 80 kb, 其中含有 10 个转录因子基因, 包括调控葡萄糖阻遏途径的转录因子 Cre1。这些缺失的转录因子对木霉纤维素降解途径的调控可能有重要作用。

#### 1.4 粗糙脉孢菌 *Neurospora crassa*

粗糙脉孢菌 *Neurospora crassa* 是一种模式真菌, 作为生物医学研究的模式生物已有 80 年研究历史, 积累了大量文献、工具和研究资源。同时粗糙脉孢菌又是一个天然的纤维素快速降解菌, 在干枯的树干上或禾本科草类的茎秆上, 经常可以分离到。纤维素降解能力很强。以 2% 晶体纤维素 Avicel 为唯一碳源, 粗糙脉孢菌在 4 d 内就可以将其全部降解, 而木霉生长速度显著慢于粗糙脉孢菌, 降解同样的纤维素约需要作用 7 d。比较里氏木霉实验室菌株 QM9414 与粗糙脉孢菌野生型 FGSC2489 的产酶能力发现, 前 4 天, 粗糙脉孢菌显著高于木霉, 但随后木霉会赶超, 但二者产酶差别并不大, 最终产酶量差异不到 1.5 倍<sup>[17]</sup>。粗糙脉孢菌纤维素酶的研究可以追溯到 50 年前, 1954 年, 丹麦科学家 Hirsch 发现在滤纸作为唯一碳源的粗糙脉孢菌培养液中检测到了相当高的还原糖, 可达到 0.84 mg/mL<sup>[18]</sup>。随后, Eberhart 等对粗糙脉孢菌纤维素酶进行了较为系统地研究, 分别研究了  $\beta$ -葡糖糖苷酶及粗糙脉孢菌纤维素酶调控<sup>[19-21]</sup>。1995 年, 粗糙脉孢菌纤维素外切酶 1 (CBH1) 被克隆测序<sup>[22]</sup>。作为第一个被测序的真菌, 2003 年粗糙脉孢菌基因组数据公布。伴随粗糙脉孢菌基因组的发布, 有 5 篇分析粗糙脉孢菌基因组的文章发表, 包括 2 篇 Nature 杂志文章<sup>[23-27]</sup>。而随后美国 NIH 启动粗糙脉孢菌功能基因组计划 (2004-2012) 更是让这一模式真菌的研究再攀高

峰, 该项目分 4 个专题。专题 1 是全基因组范围基因敲除突变体 (Knock out) 的构建, 截至到目前为止, 已经有 7 384 个基因的敲除菌株释放在公共菌种库 FGSC (Fungal Genetics Stock Center, USA), 包括多数的木质纤维素降解相关基因, 如 CBH1 (FGSC 15630)、CBH2 (FGSC 15633) 等。专题 2 是基因组整合数据库的构建, 由麻省理工的 Broad 研究所完成, 目前数据库中涵盖各类基因注释数据, 是非常好的一个数据库。专题 3 由加州大学伯克利校区 Louise Glass 实验室承担, 研制脉孢菌全基因组基因芯片和分析其转录组。基因芯片已经于 2007 年研制成功<sup>[28]</sup>。利用该芯片已经有 53 个转录组分析完成并投放在丝状真菌基因表达数据库 ([www.yale.edu/townsend](http://www.yale.edu/townsend))<sup>[29]</sup>。专题 4 为 SNP 和表观遗传学研究。由于粗糙脉孢菌具有非常雄厚的研究资源和快速的纤维素降解能力, 是研究生物质糖代谢分子基础、木质纤维素降解机理的理想菌种。

粗糙脉孢菌在纤维素降解机理研究中有得天独厚的研究资源和很好的前期功能基因组学研究基础。当以芒草 *Miscanthus* 秸秆为唯一碳源培养 *N. crassa* 时, 转录组分析显示至少有 769 个基因表达水平与蔗糖培养基相比有显著差异, 其中 231 个显著性地被芒草生物质快速诱导上调, 包括 19 个纤维素酶基因, 14 个半纤维素酶基因, 7 个转录因子, 10 个糖转运蛋白和大约 100 个未知功能基因。其中 CBH1 上调 426 倍, CBH2 上调 230 倍。当比较微晶纤维素 (Avicel) 和蔗糖培养液的转录组时, 至少有 187 个基因显著被纤维素诱导上调, 其中 CBH1 上调 382 倍, CBH2 上调 251 倍。这些都为下一步通过基因工程、代谢工程获得新一代纤维素酶系和实现生物质资源提供了新的基因靶点。在粗糙脉孢菌基因组中, 含有 7 个类纤维素外切酶 (CBH-like) 基因。16 个内切酶 (Endoglucanases) 基因中包括 14 个 GH61 家族蛋白。80% 以上预测的纤维素酶都有转录组数据和分泌蛋白组数据予以支持<sup>[17]</sup>。*N. crassa* 生长在芒草和晶体纤维素培养液中时, 至少有 50 个分泌蛋白被鉴定。其中包括预测的 23 种 *N. crassa* 纤维素酶中的 10 种。对 16 个同时有转录组数据和蛋白质组数据支持的基因敲除突变体分析显示, 敲

除 CBH1, 纤维素降解能力显著降低; 敲除 CBH2 纤维素降解能力有所下降, 但不如 CBH1 突变体明显, 这与里氏木霉不同, 里氏木霉 CBH2 突变体表型要明显强于 CBH1<sup>[30]</sup>。说明粗糙脉孢菌 CBH 的功能与木霉中的 CBH 分工可能有所不同, CBH1 在粗糙脉孢菌中更加重要, 而 CBH2 在木霉中较为重要, 与之一致的是, 有人认为, 在木霉中, CBH2 的产物可能有纤维二糖, 而纤维二糖可能作为纤维素酶诱导物之一<sup>[31]</sup>。粗糙脉孢菌基因组有 14 个 GH61 纤维素内切酶基因, 其中 10 个基因得到转录组和蛋白质组数据验证, 而且 GH61 已经被证实是一类重要的纤维素酶, 但里氏木霉只有 3 个 GH61<sup>[15,32]</sup>。诺维信最新专利数据显示, 向木霉纤维素酶系中添加 *Thielavia terrestris* GH61 酶蛋白, 在达到相同糖化率的条件下, 显著降低加酶量<sup>[33]</sup>。

发表在 2010 年 9 月 9 日 Science 在线速递关于粗糙脉孢菌纤维二糖、寡糖特异转运蛋白 CDT1、CDT2 功能研究及其在纤维素乙醇发酵上的应用研究, 是近期生物质能源研究的新进展<sup>[34]</sup>。该研究显示, 将粗糙脉孢菌 CDT1、CDT2 转入酿酒酵母, 使原本不能利用纤维二糖的酵母可以利用纤维二糖发酵生产乙醇, 这样直接发酵纤维二糖, 可以节约能量, 提高纤维素全糖发酵效率以及对缓解纤维素酶的反馈抑制有所帮助, 为实现生物质燃料生产提供了新思路。

### 1.5 其他真菌

除了以上讨论的真菌以外, 青霉菌 *Penicillium*, 嗜热侧孢霉 *Sporotrichum thermophile* 等也进入科学家视野, 利用各类组学技术, 进行纤维素降解机理和应用研究。山东大学微生物技术国家重点实验室分离出了一株产酶较高的斜卧青霉 *P. decumbens*, 探索通过基因组重排来提高酶的产量<sup>[35]</sup>, 目前正在对其进行全基因组测序和其他功能基因组学研究。嗜热侧孢霉的已有研究也表明<sup>[36]</sup>, 其纤维素酶也有自己的特点, 比如耐高温, 但由于研究工具和遗传转化系统的缺乏, 研究目前还处在初步阶段。

## 2 小结与展望

真菌生物质分解代谢途径如图 1<sup>[17]</sup>所示, 分为

诱导和利用两个阶段。在诱导阶段, 微生物感受木质纤维素底物存在, 用自身基线水平的木质纤维素水解酶类降解少许底物, 产生信号分子, 诱导木质纤维素酶系基因大量表达。在经过一段时间的大量表达之后, 进入利用阶段, 纤维素酶系的表达放缓, 但仍然维持较高水平的表达; 糖转运及随后代谢相关基因大量表达, 持续完成木质纤维素降解和随后的糖代谢。这一模型仍有许多内容有待充实, 比如微生物是如何感知木质纤维素存在及不同真菌感受的信号分子是什么, 各类纤维素酶的表达调控机制, 分泌途径的调控等。

木质纤维素降解途径虽然取得了很大进展, 但离彻底阐释整个途径还有很多路要走。利用功能基因组学工具, 可以在发现关键基因和调控节点上快速进步, 但纤维素酶系之间的协同作用机制, 以及蛋白质分子是如何结合木质纤维素并将之降解的分子机理及整个系统的调控机理阐释都不是一日之功。必须持之以恒地进行研究, 包括从遗传学、酶学、生物物理等各方面进行深入探讨, 在不断地解析新机制, 积累新知识的基础上, 结合各类基因工程、代谢工程来重构木质纤维素降解酶系、菌系, 发展出一整套快速经济的木质纤维素酶解体系, 为真正实现生物质的全面利用提供知识和物质基础。

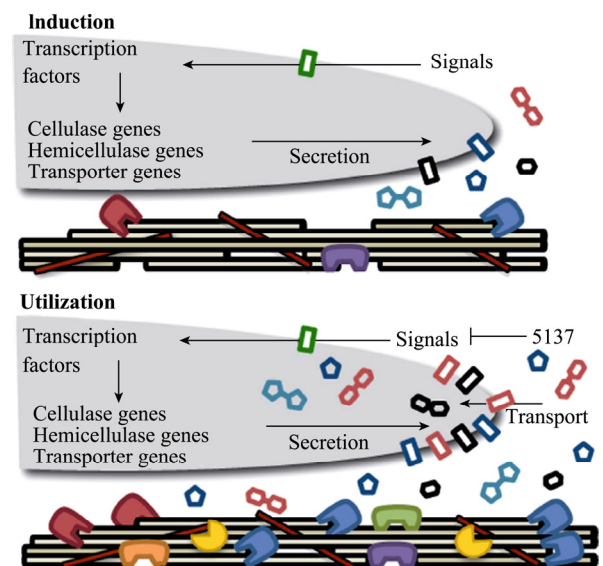


图 1 真菌生物质糖代谢途径模式图<sup>[17]</sup>

Fig. 1 The model of lignocellulose degradation by fungi<sup>[17]</sup>.

而在众多的木质纤维素降解微生物中, 粗糙脉孢菌是作为纤维素降解机理研究的理想模式菌, 因此深入开展粗糙脉孢菌木质纤维素降解的分子机理研究, 对揭示真菌生物质降解途径, 阐释生物质糖代谢的分子基础和新一代纤维素酶系的重构具有重要意义, 我们将围绕 973 项目“生物炼制细胞工厂的科学基础”的科学问题“生物质糖代谢的分子基础”, 继续利用粗糙脉孢菌体系, 结合功能基因组学、遗传学和生物化学工具, 对真菌降解纤维素分子机理和生物质糖代谢途径展开研究, 为早日实现木质纤维素的生物炼制作出贡献。

## REFERENCES

- [1] Rubin EM. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*, 2008, **454**(7206): 841–845.
- [2] Department of Energy. Breaking the Biological Barriers to Cellulosic Ethanol: A Joint Research Agenda, 2005.
- [3] Ma YH, Yu B. The current status and future perspective of biorefinery//Bureau of Life Sciences and Biotechnology, Chinese Academy of Sciences. The CAS Annual Report of Industrial Biotechnology 2008. Beijing: Science Press, 2008.  
马延和, 于波. 生物炼制技术的发展现状与趋势//中国科学院生命科学与生物技术局. 工业生物技术发展报告 2008. 北京: 科学出版社, 2008.
- [4] Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, *et al.* Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2002, **66**(3): 506–577.
- [5] Arantes V, Saddler JN. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnol Biofuels*, 2010, **3**: 4.
- [6] Ward G, Hadar Y, Dosorelz CG. The Biodegradation of lignocellulose by white rot fungi//Arora DK, ed. *Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications*. Boca Raton: CRC Press, 2004: 393–407.
- [7] Gamauf BMC, Seiboth B. Degradation of plant cell wall polymers by fungi//Kubicek CP, Druzhinina IS, eds. *Environmental and Microbial Relationships*. 2nd ed. New York: Springer Press, 2007: 325–340.
- [8] Martinez D, Larrondo LF, Putnam N, *et al.* Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nat Biotechnol*, 2004, **22**(6): 695–700.
- [9] Vanden Wymelenberg A, Gaskell J, Mozuch M, *et al.* Transcriptome and secretome analyses of *Phanerochaete chrysosporium* reveal complex patterns of gene expression. *Appl Environ Microbiol*, 2009, **75**(12): 4058–4068.
- [10] Kersten P, Cullen D. Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Fungal Genet Biol*, 2007, **44**(2): 77–87.
- [11] Sato S, Liu F, Koc H, *et al.* Expression analysis of extracellular proteins from *Phanerochaete chrysosporium* grown on different liquid and solid substrates. *Microbiology*, 2007, **153**(Pt 9): 3023–3033.
- [12] Martinez D, Challacombe J, Morgenstern I, *et al.* Genome, transcriptome, and secretome analysis of wood decay fungus *Postia placenta* supports unique mechanisms of lignocellulose conversion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(6): 1954–1959.
- [13] Mandels M, Reese ET. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. *J Bacteriol*, 1957, **73**(2): 269–278.
- [14] Cherry JR, Fidantsef AL. Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Curr Opin Biotechnol*, 2003, **14**(4): 438–443.
- [15] Martinez D, Berka RM, Henrissat B, *et al.* Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nat Biotechnol*, 2008, **26**(5): 553–560.
- [16] Le Crom S, Schackwitz W, Pennacchio L, *et al.* Tracking the roots of cellulase hyperproduction by the fungus *Trichoderma reesei* using massively parallel DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(38): 16151–16156.
- [17] Tian C, Beeson WT, Iavarone AT, *et al.* Systems analysis of plant cell wall degradation by the model filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(52): 22157–22162.
- [18] Hirsch HM. Temperature-dependent cellulase production by *Neurospora crassa* and its ecological implications. *Experientia*, 1954, **10**(4): 180–182.
- [19] Eberhart B, Cross DF, Chase LR. Beta-glucosidase system of *Neurospora crassa*. I. Beta-glucosidase and cellulase activities of mutant and wild-type strains. *J Bacteriol*, 1964, **87**: 761–770.
- [20] Eberhart BM, Beck RS, Goolsby KM. Cellulase of *Neurospora crassa*. *J Bacteriol*, 1977, **130**(1): 181–186.
- [21] Myers MG, Eberhart B. Regulation of cellulase and cellobiase in *Neurospora crassa*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1966, **22**(5): 782–785.
- [22] Taleb F, Radford A. The cellulase complex of *Neurospora crassa*: cbh-1 cloning, sequencing and homologies. *Gene*, 1995, **161**(1): 137–138.



- [23] Hynes MJ. The *Neurospora crassa* genome opens up the world of filamentous fungi. *Genome Biol*, 2003, **4**(6): 217.
- [24] Kasbekar DP. Blueprint of a red mould: unusual and unexpected findings in the *Neurospora* genome sequence. *J Biosci*, 2003, **28**(4): 361–362.
- [25] Selker EU, Tountas NA, Cross SH, *et al.* The methylated component of the *Neurospora crassa* genome. *Nature*, 2003, **422**(6934): 893–897.
- [26] Galagan JE, Calvo SE, Borkovich KA, *et al.* The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature*, 2003, **422**(6934): 859–868.
- [27] Mannhaupt G, Montrone C, Haase D, *et al.* What's in the genome of a filamentous fungus? Analysis of the *Neurospora* genome sequence. *Nucleic Acids Res*, 2003, **31**(7): 1944–1954.
- [28] Tian C, Kasuga T, Sachs MS, *et al.* Transcriptional profiling of cross pathway control in *Neurospora crassa* and comparative analysis of the Gcn4 and CPC1 regulons. *Eukaryot Cell*, 2007, **6**(6): 1018–1029.
- [29] Zhang Z, Townsend JP. The filamentous fungal gene expression database (FFGED). *Fungal Genet Biol*, 2010, **47**(3): 199–204.
- [30] Suominen PL, Mantyla AL, Karhunen T, *et al.* High frequency one-step gene replacement in *Trichoderma reesei*. II. Effects of deletions of individual cellulase genes. *Mol Gen Genet*, 1993, **241**(5/6): 523–530.
- [31] Seiboth B, Hakola S, Mach RL, *et al.* Role of four major cellulases in triggering of cellulase gene expression by cellulose in *Trichoderma reesei*. *J Bacteriol*, 1997, **179**(17): 5318–5320.
- [32] Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, *et al.* The carbohydrate-active enzymes database (CAZy): an expert resource for glycomics. *Nucleic Acids Res*, 2009, **37**(Database issue): D233–238.
- [33] Harris P, Brown K, Zaretshky E, *et al.* Polypeptides having cellulolytic enhancing activity and nucleic acids encoding same: US 2009/0019608 A1 2009, 2009.
- [34] Galazka JM, Tian C, Beeson WT, *et al.* Cellodextrin transport in yeast for improved biofuel production. *Science*, 2010, DOI: 10.1126/science.1192838.
- [35] Cheng Y, Song X, Qin Y, *et al.* Genome shuffling improves production of cellulase by *Penicillium decumbens* JU-A10. *J Appl Microbiol*, 2009, **107**(6): 1837–1846.
- [36] Bhat KM, Maheshwari R. *Sporotrichum thermophile* growth, cellulose degradation, and cellulase activity. *Appl Environ Microbiol*, 1987, **53**(9): 2175–2182.

## 《生物工程学报》对摘要的写作要求

1. 研究报告摘要: 基本要素包括研究目的、方法、结果和结论 (不用单列标题书写)。目的 (Purpose): 主要说明作者写此文章的目的, 或说明本文主要要解决的问题; 方法 (Methods): 重点说明作者的主要工作过程及使用的方法。应用性文章如需要, 可注明条件、使用的主要设备和仪器。结果 (Results): 本文最后得出的结果 (实验数据部分)。结论 (Conclusions): 如为基础研究, 应写明本文的创新之处, 及文章在讨论部分表述的观点; 如为应用性研究, 应尽可能提及本文结果和结论的应用范围和应用情况或应用前景。

2. 综述摘要: 包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望, 尤其要注意结合自己的研究工作。

3. 英文摘要的撰写要点: 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但比中文摘要更详尽。英文摘要完成后, 务必请英文较好、且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。凡不符合要求的, 即使学术上可以达到刊出的水平, 本刊也将推迟发表。

(1) 建议使用第一人称, 尽量不使用第三人称和被动语态。

(2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊尽量不用, 这样可以免好多长句, 以求简单清晰。

(3) 尽量使用清晰简练的短句, 避免很长的句子。注意正确使用英文写作习惯和语法。

(4) 摘要应当使用过去时态, 语法正确, 句子通顺。

(5) 摘要中避免使用缩写语, 除非是那些人人皆知的 (如DNA、ATP等), 或者确实是非常长, 而且出现多次的短语才允许用缩写语, 并且在第一次出现时要写出全称。

(6) 在英语摘要中, 不要使用任何汉字字符, 包括标点、括号、温度、希腊字母等。

(7) 句子的开头处最好不要使用数字。