

· 核心技术创新 ·

田朝光 博士, 博士生导师, 中国科学院特聘研究员。主要研究方向是真菌合成生物学, 具体以丝状真菌为对象, 利用合成生物学方法, 结合代谢工程技术, 开展工业丝状真菌底盘细胞基础和应用研究, 构建可用于工业蛋白质和生物基化学品发酵生产的细胞工厂。先后主持国家重点研发计划、国家自然科学基金委国际合作重点项目、面上项目、中科院先导专项课题以及企业委托重大项目等各类科研任务近 20 项。在 *Science*、*PNAS* 等杂志发表文章 40 余篇, 申请专利 20 余项, 包括 PCT 专利 3 项。



秸秆真菌降解转化与可再生化工

李金根^{1,2}, 刘倩^{1,2}, 刘德飞^{1,2}, 张永利^{1,2}, 郑小梅^{1,2}, 朱欣娜^{1,2}, 刘萍萍^{1,2}, 高乐^{1,2}, 王婧婷^{1,2}, 蔺玉萍^{1,2}, 张以恒^{1,2}, 张学礼^{1,2}, 田朝光^{1,2}

1 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308

2 国家合成生物技术创新中心, 天津 300308

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. 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. Chin J Biotech, 2022, 38(11): 4283-4310.

摘要: 秸秆生物质是储量巨大的碳资源, 我国每年可用的生物质资源接近 10 亿 t, 如果可以转化为燃料乙醇等生物基化学品, 有望减少至少 2 亿 t 的原油进口量, 因此发展秸秆生物转化生产燃料乙醇和大宗化学品是生物制造的核心组成。中国科学院天津工业生物技术研究所 (以下简称“天津工业生物所”) 自建所之初, 便提出了“两个替代一个提升”, 其中包括以可再生碳资源替代不可再生石化资源生产大宗化学品。发展秸秆生物转化是研究所的长期战略, 建所 10 年来, 在这一领域进行了持续系统地研究, 取得了显著进展。本文重点综述真菌系统的生物质降解与转化, 包括丝状真菌纤维素降解机理, 生物质炼制整合路线研发等, 实现了生物质一步转化燃料乙醇、苹果酸等多种大宗能源材料化学品。在可再生化工研究方面, 重点介绍了丁二酸、乳酸等一批大宗有机酸, 以可再生碳资源为原料进行生产的工业化进展, 展示了生物制造替代石化路线生产大宗

Received: July 27, 2022; **Accepted:** September 7, 2022

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2018YFA0900500); National Natural Science Foundation of China (32071424, 31972878)

Corresponding author: TIAN Chaoguang. Tel: +86-22-84861947; Fax: +86-22-84861948; E-mail: tian_cg@tib.cas.cn

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFA0900500); 国家自然科学基金 (32071424, 31972878)

化学品的潜力。天津工业生物所在秸秆生物转化和可再生化工方面的研究，为我国建设发展低碳经济社会提供了有效参考路径，有望为我国实现双碳战略目标作出自己的独特贡献。

关键词：生物质；纤维素酶；整合生物炼制；代谢工程；生物基产品

Plant biomass degradation by filamentous fungi and production of renewable chemicals: a review

LI Jingen^{1,2}, LIU Qian^{1,2}, LIU Defei^{1,2}, ZHANG Yongli^{1,2}, ZHENG Xiaomei^{1,2}, ZHU Xinna^{1,2}, LIU Pingping^{1,2}, GAO Le^{1,2}, WANG Jingting^{1,2}, LIN Yuping^{1,2}, ZHANG Yiheng^{1,2}, ZHANG Xueli^{1,2}, TIAN Chaoguang^{1,2}

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

2 National Technology Innovation Center of Synthetic Biology, Tianjin 300308, China

Abstract: Plant biomass represents a vast resource of carbon. In China, it is estimated that 1 billion tons of biomass is available each year. The conversion of these biomass resources into bioethanol or other bio-based chemicals, if fully commercialized, may reduce at least 200 million tons of crude oil import. Therefore, bioethanol and bulk chemicals are the core components of the biomanufacturing using plant biomass as carbon sources. Since the foundation of Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences (TIB, CAS), we have proposed a strategy of “two replacements and one upgrade”. Utilizing renewable carbon resources instead of non-renewable petrochemical resources to produce bulk chemicals is included in our strategy. It is a long-term effort for TIB to develop plant biomass biomanufacturing to produce renewable chemicals. Continuous and systematic research was carried out in these two fields, and significant progress has been made in the past 10 years since the foundation of TIB. Here we review the progress of TIB in this field, mainly focusing on fungal system, including the mechanism of cellulose degradation by filamentous fungi and the strategy of consolidated bioprocessing of biomass. Based on this, malic acid, fuel ethanol and other bulk chemicals were produced through one-step conversion of biomass. Besides, the commercial processes for production of bulk chemicals such as succinic and lactic acid from renewable carbon resources, which were developed by TIB, were also be discussed. These examples clearly demonstrated that bulk chemicals can be obtained from biomass instead of from petroleum. Research on plant biomass biotransformation and renewable chemicals production in TIB has provided an alternative route for the development of low-carbon bioeconomy in China, and will contribute to the goal of carbon neutralization of China.

Keywords: biomass; cellulase; consolidated bioprocessing; metabolic engineering; bio-based products

生物质是地球上大规模可再生的有机碳资源，以农业废弃生物质秸秆为原料生产液体燃料和大宗化学品，是解决当前能源和环境危机最有希望的方式之一，已成为全球研究的热点，

具有十分重要的战略意义^[1]。目前秸秆生物炼制的主要在研路线是三段式工艺，包括生物质原料预处理、纤维素酶发酵和生物质酶解糖化，以及糖化液的乙醇等产品发酵。三段式工艺经

过 20 余年的研究, 总体上已经获得了显著进步, 纤维素酶生产成本显著降低, 每千克酶 (干重) 成本大约 10–20 美元, 但纤维素酶活力较低, 使得生物质酶解过程仍然较长 (72 h)。针对第一步预处理工艺, 尚没有得到产业界一致认可的工艺胜出, 在我国汽爆工艺的报道较多。三段式技术已经建立了多个示范工厂, 实际运行中发现成本尤其是纤维素酶成本仍然较高, 目前秸秆纤维素乙醇工厂尚未能大规模产业应用, 生物炼制技术仍然需要持续研发。除了在现有基础上持续改进之外, 需要在包括纤维素降解机理和生物炼制路线等方面有新的理论, 带来生产工艺上的重大突破, 进一步显著降低纤维素乙醇等大宗燃料化学品生物炼制成本, 促进生物炼制大规模产业化进程。

自然界纤维素降解复杂多样, 主要有原核细菌体系和真菌体系, 有单菌体系研究和混菌体系研究等, 本文主要综述单一真菌体系纤维素降解转化研究进展。丝状真菌是目前国内外纤维素酶工业生产主要体系, 其中里氏木霉 (*Trichoderma reesei*)、青霉菌 (*Penicillium*) 和嗜热毁丝霉 (*Myceliophthora thermophila*) 是其中的典型代表^[2-4]。模式丝状真菌粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*) 很早就被发现具有降解利用纤维素的能力, 是典型的纤维素降解真菌, 已经成为研究纤维素酶表达调控机制的模式菌株^[5]。然而, 纤维素的生物降解机制仍然不是特别清晰, 成为了限制生物炼制产业化的一个重要原因。天然纤维素降解机制由最初的原初反应假说^[6], 发展到目前普遍被学者接受的酶协同机制^[7]。认为天然纤维素在协同降解过程中, 纤维素内切酶 (endoglucanases, EG) 可作用于纤维素分子内的无定形区, 随机水解 β -1,4 糖苷键, 产生新末端; 外切酶 I (cellobiohydrolase I, CBHI) 和外切酶 II

(cellobiohydrolase II, CBHII) 分别从还原端和非还原端作用于纤维素结晶区, 在纤维素分子中依次切下纤维二糖。在内切酶和外切酶的共同作用下, 纤维素被降解为可溶性寡聚糖, 而后在 β -糖苷酶 (beta-glycosidase, BG) 水解作用下被降解为葡萄糖^[8]。2010 年前后, 裂解多糖单加氧酶 (lytic polysaccharide monooxygenase, LPMO) 的发现进一步修正了现有纤维素协同降解机制^[9-10]。在纤维素为唯一碳源的发酵液中, 纤维素降解菌株胞外分泌酶系超过 100 个蛋白, 目前所研究的酶系只是含量较高的一些组分, 纤维素降解机理还需要进一步研究, 不排除出现领域内新的理论, 天津工业生物所在这一领域也有多个团队在研究。

生物质组分复杂, 主要由纤维素 (40%–50%, 葡萄糖高聚物)、半纤维素 (20%–40%, 包括木糖、阿拉伯糖、半乳糖等多种糖组成的高聚物)、木质素 (20%–30%, 芳香类化合物组成的复杂高聚物) 等构成。纤维素降解菌, 尤其是丝状真菌纤维素酶分泌菌株, 一般具有丰富的木质纤维素酶系和复杂精细的调控网络, 能够根据生物质来源和结构的不同, 调整自身纤维素酶的表达, 实现生物质快速降解利用。另外, 丝状真菌具备完整的五碳糖 (C5) 和六碳糖 (C6) 利用途径, 有利于实现生物质全组分利用, 提升目标产物产率。天津工业生物所在生物炼制技术路线研发方面, 经过多年的探索, 也提出了真菌整合生物炼制技术 (fungal consolidated bioprocessing technique, 简称真菌 CBP 技术), 该技术以纤维素降解真菌为体系, 应用代谢工程技术, 提升真菌化学品合成代谢能力, 实现纤维素边降解边发酵, 从而一步转化生物质合成燃料乙醇等大宗能源材料化学品。

实现石油基材料化学品的生物制造, 是可再

生化工产业的核心路径。天津工业生物所在过去 10 年里,充分发挥在代谢工程领域的团队优势,实现了包括丁二酸、D-乳酸等多个大宗材料化学品生物制造的万吨级产业化,给可再生化工产业发展树立了典范,清晰展示了生物制造在低碳经济社会发展的独特贡献。未来在秸秆生物转化的产品和应用产业上还有很多空间,除了备受瞩目的燃料乙醇以外,在淀粉等人工粮食方面也有望产生新的突破。本文将对天津工业生物所在秸秆生物转化、可再生化工以及未来研究进行阐述。

1 真菌降解生物质分子机理研究

生物质转化为燃料或化学品一般要经过预处理、酶解、发酵以及最后产品的分离纯化。酶解步骤主要使用来源真菌的纤维素酶,尽管近年来纤维素酶的生产水平有了显著提升,但由于酶解过程中反应时间较长,消耗纤维素酶量大,导致总体成本仍然偏高,不能满足生物炼制的经济性要求。因此必须进一步显著降低生物质糖化成本,要实现这一目标,必须深入研究纤维素降解的分子机理,从而提升整个真菌纤维素酶表达和生物质糖化效率。

随着系统生物学和合成生物学的发展,当前各类组学技术的涌现和基因组编辑、基因表达调控等重要使能技术的应用,为揭示生物质降解的分子机理提供了极为重要的新思路和新技术,使得研究者能从多个层次系统地解析生物质降解的分子基础。近年来,纤维素酶基因表达调控研究主要集中在工业丝状真菌中,如木霉、曲霉。目前已知的主要基因调控因子有转录激活因子 XINR、激活因子 ACE2、转录抑制因子 ACE1、锌指结构转录因子 PACC、CCAAT 结合复合体 HAP2/3/5、葡萄糖阻遏蛋白 CRE-1 和 GATA 因子 AREA。在木霉和曲霉中,转录激活因子 XLNR/XYR1 对纤维素酶和

半纤维素酶的基因表达具有重要的调控作用。与之不同的是,在镰刀霉和粗糙脉孢菌中,XLNR/XYR1 的同源基因并不是纤维素酶基因表达所必需的,而是半纤维素利用相关基因表达所必需的,参与半纤维素酶基因的表达调控。Louise Glass 教授团队对粗糙脉孢菌转录因子敲除菌株库在纤维二糖上进行了生长表型筛选和酶活力检测,发现了 2 个在子囊真菌中较保守的 Zn(II)2Cys6 家族转录因子 CLR-1 和 CLR-2,研究结果表明 CLR-1 和 CLR-2 是所有主要的纤维素酶基因和大部分半纤维素酶基因诱导表达所必需的转录因子^[11]。在纤维素条件下,突变株 $\Delta clr-1$ 和 $\Delta clr-2$ 无法表达和分泌纤维素酶。然而,在木聚糖条件下,这 2 个突变株的生长和半纤维素酶分泌不受影响。由此推测,在一些纤维素降解丝状真菌中,CLR-1 和 CLR-2 是粗糙脉孢霉调控纤维素酶表达的关键因子,且纤维素酶和半纤维素酶的表达调控是相互独立的。纤维二糖及其转糖基产物是纤维素酶最初的诱导物质。在这些诱导物质的诱导下,CLR-1 首先被激活,然后促进能够有效利用纤维二糖的相关基因表达,如 CLR-2 等。转录因子 CLR-2 可以进一步直接诱导纤维素酶和某一半纤维素酶的表达。在构巢曲霉中,纤维素酶诱导表达的必需基因是 *clrB* (*clr-2* 的同源基因),而不是 *clrA* (*clr-1* 的同源基因)。然而,构巢曲霉 *clrA* 的敲除突变株,丧失了利用纤维二糖的能力^[12]。因此,CLR-1/CLR-2 在丝状真菌感受纤维二糖诱导途径中具有重要的保守作用。

CLR-1 和 CLR-2 属于锌指蛋白转录因子超家族。锌指蛋白是一类具有手指结构域的转录因子,对基因表达调控、胚胎发育、细胞分化、增强植物抗逆性等方面具有重要作用。在 1983 年,锌指蛋白最初在非洲爪蟾卵母细胞中

转录因子 TFIIIA 中被发现,是迄今在真核生物基因组中分布最广的一类蛋白,也是真核生物转录调控因子中最大的家族之一。该锌指家族蛋白是真菌所特有的转录因子,可以以单体、同源二聚体或异源二聚体形式与 DNA 结合。锌指蛋白可以根据高度保守的氨基酸序列分为 3 大类:(1) 经典 Cys2His2 型锌指蛋白,是真核生物中最普遍的一类转录调控因子,一般以单体的形式与核酸相互作用,如曲霉的碳代谢阻遏调控因子 CREA、人的转录因子 SP1;(2) Cys4 型锌指蛋白,与 Cys2His2 型锌指蛋白不同的是,这类转录因子以二聚体的形式与 DNA 相互作用,其同源二聚体与目标基因的反向重复相结合,而异源二聚体则与正向重复序列相结合;(3) C6 型锌指又称锌簇或锌双核簇(Zn(II)2Cys6 或 Zn2C6),包含一个由 6 个半胱氨酸围绕着 2 个锌离子而形成的 DNA 结合域。

丝状真菌在纤维素碳源环境中,通常会出现碳源阻遏效应(carbon catabolite repression, CCR),解抑制、碳饥饿、纤维素水解酶基因上调表达等一系列转录重编程过程,纤维素降解后释放的葡萄糖,反过来又会导致 CCR 的激活,从而抑制纤维素酶的表达。纤维素降解和葡萄糖阻遏 2 个途径的分子调控机理,尚未清楚。加州大学 Louise Glass 教授实验室克隆鉴定了多个生物质降解关键转录调控元件^[3]。近期,该实验室为了解析粗糙脉孢菌感应生物质中复杂碳水化合物分子机制,开展了 40 种不同碳源(包括多种生物质、寡糖和单糖)条件下的转录组学分析,系统研究了真菌细胞对不同碳源的感应及应答(图 1)。结合体外 DNA 亲和纯化测序技术(DNA affinity purification sequencing, DAP-seq),鉴定了关键转录因子(CLR-1, CLR-2, COL-26, VIB-1, XLR-1, PDR-1, PDR-2, ARA-1)潜在调控靶点,并构建了生物

质降解调控网络^[13]。研究表明,转录因子 VIB-1 在碳代谢中起到全局性的调控作用,CRE-1 介导的碳分解代谢物抑制通过调控糖转运蛋白、转录因子、糖分解代谢相关因子和植物细胞壁降解酶(plant cell wall-degrading enzymes, PCWDEs)基因表达进而起到抑制纤维素降解的作用。该研究所产生的数据值得我们从真菌糖酵解途径关键酶表达调控的角度进一步挖掘。

丝状真菌为了平衡细胞生长和存活,需要感知外部环境和细胞内部的能量状态。其中蛋白磷酸化在对外界诱导信号感应以及信号胞内的传导过程中有着重要的作用。目前,关于蛋白激酶研究主要集中在有丝分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)方面。有研究证明 MAPK 信号传导途径与纤维素酶表达调控有着密切关系。在里氏木霉中,TKM2 是一种 SLT2 类型的 MAPK 蛋白。在突变株 $\Delta tkm2$ 中和纤维素酶相关基因显著上调,而纤维素酶转录抑制因子 CRE1 和 ACE2 出现明显下调,此外发现激活因子 XYR1 和 ACE1 的转录水平变化不明显^[14];TKM3 是一种 Hog1-type 类型的 MAPKs 蛋白,突变株 $\Delta tkm3$ 的纤维素酶表达量显著降低,其酶活水平也相应降低。此外,另有研究表明在许多转录因子上出现了 TKM3 的磷酸化位点,暗示 TKM3 可以通过调控这些转录因子的磷酸化状态,进而影响纤维素酶的表达^[15]。

环腺苷一磷酸(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)途径是微生物很多重要生理功能的核心信号传导途径,在真菌中 cAMP 途径是极度保守的。cAMP 的浓度提高会激活蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA),进而影响下游的靶基因,对纤维素酶表达进行调控,此过程同时会受到光强度的影响。在里氏

木霉中, 作为 cAMP 信号途径中的两个关键元件, 腺苷酸环化酶 (ACY1) 和依赖于 cAMP 的蛋白激酶 A (PKAC1), 都参与了纤维素酶基因的表达调控^[16]。无论是在光照还是黑暗条件下, ACY1 都对纤维素酶的表达起正调控作用, 而 PKAC1 在光照条件下对纤维素酶的表达起正调控作用, 但是在黑暗条件下则表现出负调控作用。此外, 在真核生物中, PKA 和雷帕霉素靶蛋白 (target of rapamycin, TOR) 能够促进菌体的生长。在酿酒酵母中, 蛋白激酶

YAK1 和 SCH9 是 cAMP 途径中两个关键的靶基因。目前有研究通过序列比对和功能分析的方法分别找到了它们在里氏木霉中的同源基因 *Tryak1* 和 *Trsch9*, 并对其功能进行了初步探索。结果表明, 在不同的碳源上, 突变株 $\Delta Tryak1$ 和 $\Delta Trsch9$ 均表现出生长变差和产孢能力下降的现象, 同时细胞壁的完整性也受到了影响。此外还发现突变株 $\Delta Trsch9$ 会导致纤维素酶表达缺陷, 而突变株 $\Delta Tryak1$ 却可以显著提高纤维素酶的表达水平^[17]。

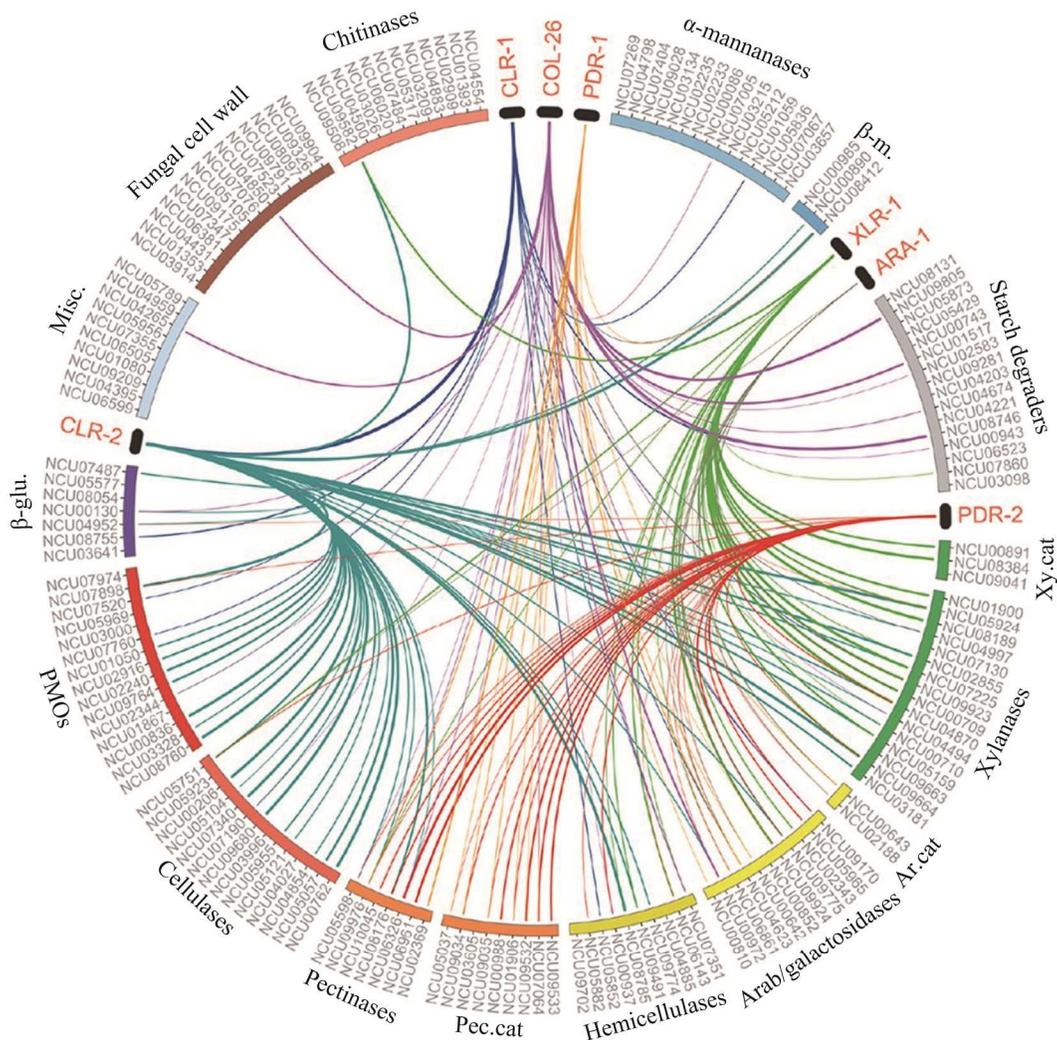


图 1 粗糙脉孢菌生物质降解调控网络 (红色字体为主要转录因子; 黑色字体为靶点基因)^[13]

Figure 1 Overlapping regulons of regulators for regulating biomass degradation in *Neurospora crassa*^[13] (transcription factors (red); target genes (black)).

2009年,田朝光研究员在美国加州大学伯克利分校 Louise Glass 实验室做博士后期间,以粗糙脉孢菌为体系对纤维素降解利用进行了全基因组学水平的系统研究^[18]。2009年12月田朝光研究员回国加入天津工业生物所建立研究组,以丝状真菌生物质降解分子机理研究为主要研究内容之一。利用粗糙脉孢菌,选取我国主要的5种农作物(大麦、小麦、玉米、水稻以及大豆)秸秆作为唯一碳源,采用第二代高通量测序技术进行了转录组测序(RNA sequencing, RNA-Seq),系统探讨了真菌对不同生物质底物的响应特点。转录组基因差异分析显示,5种秸秆共同诱导了430个基因上调表达,是响应植物生物质的核心基因,其中包含大量碳水化合物活性酶(carbohydrate-active enzymes, CAZys)基因。在这个响应核心中,虽然有一些基因也在碳饥饿条件下上调表达,但仍有252个基因被植物生物质特异诱导。进一步与微晶纤维素(avicel)、木聚糖(xylan)以及果胶(pectin)所诱导的基因进行比较分析,发现88个基因仅在生物质上被诱导表达。筛选这88个特异基因突变体库中的转录因子单突变体,发现缺失了转录因子RCA-1能显著提高粗糙脉孢菌在农作物秸秆上的产酶水平;并推测可能是因为在生物质上缺失RCA-1有助于解抑制纤维素酶正调控的核心元件之一CLR-2的表达。在 $\Delta rca-1$ 的基础上再缺失负调控因子CRE-1,能进一步提高粗糙脉孢菌在生物质上生长时木质纤维素酶的表达水平^[19]。

木质纤维素酶系的合成分泌分子基础是生物质降解分子机理的重要组成。而内质网是纤维素酶合成分泌重要场所,我们利用粗糙脉孢菌体系,深入研究了纤维素酶合成过程中的内质网压力应激分子基础。通过分析纤维素为碳源条件下,低强度以及高强度内质网应激RNA-Seq数据,766个基因被鉴定为纤维素酶

合成分泌过程内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)靶基因,其中223个和186个基因表达分别受非折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)途径核心激酶/核酸酶IRE-1以及转录因子HAC-1调控。全基因组水平分析粗糙脉孢菌266个转录因子在内质网应激条件下的动态变化发现33个转录因子显著上调,6个转录因子显著下调。转录水平上调的33个转录因子中,20个对应基因的单突变体能够对内质网应激药物表现出生长敏感表型,其中包括了已知的UPR调控因子HAC-1和CPC-1。该研究鉴定出木质纤维素酶分泌途径3个新转录因子(RES-1、RES-2和RRG-2)。相比野生型, $\Delta res-1$ 纤维素酶分泌量提高了30%,而 $\Delta res-2$ 与 $\Delta rrg-2$ 则降低约30%。转录组分析这3个转录因子发现其功能与调控木质纤维素酶分泌以及内质网应激反应相关^[20]。

随后,通过对里氏木霉高产菌株RUT-C30和野生型QM6a发生突变的164个基因在粗糙脉孢菌中进行了同源基因比对,其中86个同源基因在粗糙脉孢菌中具有纯合突变体。通过系统分析所有同源基因突变体的纤维素酶分泌能力,发现12个突变体纤维素酶产量显著高于野生型。其中,纤维素酶产量最高的菌株为NcAp3m(NCU03998)基因突变体,该基因编码衔接蛋白3复合体(adaptor protein 3 complex, AP-3)上的 μ 亚基。同时该突变体的半纤维素酶产量也显著高于野生型。我们发现,Ncap3m可能参与了胞内分泌蛋白的降解途径,当缺失该基因后,导致部分分泌蛋白降解失控而分泌到胞外,从而增加了整个纤维素酶的产量(图2)。此外,当缺失编码AP-3复合体 β 亚基Ncap3b(NCU06569)的基因后,突变体表型与缺失 μ 亚基菌株相似。综合起来,本研究表明AP-3复合体显著影响丝状真菌纤维素酶的分泌,为纤维素酶高产菌的进一步改造提供了新的思路^[21]。

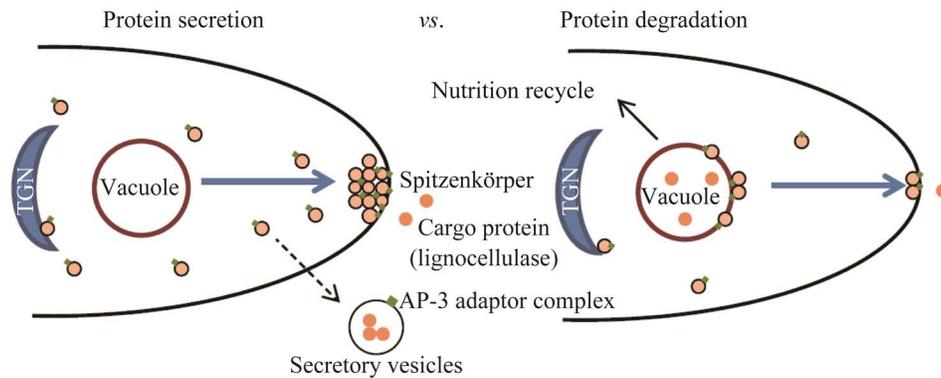


图2 粗糙脉孢菌 AP-3 复合物介导的木质纤维素酶降解机制^[21]

Figure 2 Schematic model illustrating a proposed mechanism for adaptor protein AP-3 complex-mediated lignocellulase fate decision in *Neurospora crassa*^[21].

纤维素酶表达调控网络涉及众多元件，而很多元件尚未被克隆鉴定，限制了人们对整个调控网络的认识和理解。利用粗糙脉孢菌丰富的单基因突变体库，结合各种组学技术、遗传学和分子生物学方法，天津工业生物所田朝光团队对锌指转录因子家族和丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族基因突变体进行了系统的研究^[18-19,22-24]，筛选鉴定出了与纤维素酶表达调控相关的 9 个转录因子^[19,23]和 7 个蛋白激酶^[22,25]。随后，该团队以粗糙脉孢菌和嗜热毁丝霉为研究对象，对筛选鉴定的转录因子 CLR-4^[26]和蛋白激酶 STK-12^[27]调控纤维素降解机制进行了深入研究。研究表明，CLR-4 的缺失显著影响 cAMP 信号途径传导，并发现环腺苷酸参与调控纤维素酶基因的表达，CLR-4 不仅直接调控纤维素酶关键调控因子 CLR-1 和 CLR-2 的表达，而且还可以通过调控腺苷酸环化酶的转录，从而起到调控纤维素酶基因表达的作用(图 3)^[26]。STK-12 是负责纤维素酶转录水平“刹车”的重要调控元件，敲除该基因后，转录激活因子 CLR-2 表达上调，而 RES-1 和 RCA-1 (编码 2 个纤维素酶阻遏物) 表达下调，纤维素酶基因则长时间维持高水平转录(图 4)^[27]。

STK-12 通过 IGO-1 的介导来调节纤维素酶的产生，TORC1 信号途径能够通过抑制 STK-12 功能在一定程度上促进纤维素酶的产生，而 STK-12 和 CRE-1 分别在两条平行途径中起着抑制纤维素酶基因表达的作用，该结果阐明了纤维素酶基因在纤维素诱导条件下如何在转录水平上受到抑制的机制，并为改造工业真菌提供了新策略。

为了挖掘深层发酵中对丝状真菌发酵产酶性能具有重要影响的形态发育相关基因，田朝光团队对粗糙脉孢菌单基因突变体库中的 95 株形态突变株在结晶纤维素为碳源的条件下进行系统筛选，获得了发酵液粘度和蛋白产量显著变化的 8 株突变株。其中突变株 $\Delta ncw-1$ 发酵液蛋白含量和纤维素酶活力均有所提高，但其发酵液菌丝较长，粘度值显著升高，该基因缺失后引起细胞壁的变化，与纤维二糖的转运及纤维素酶诱导途径相关^[28]。突变体 $\Delta gul-1$ 发酵液蛋白水平较野生型菌株提高 20%，菌丝体干重与野生型菌株相比没有显著差异，而发酵液粘度下降 75%^[29]，根据该项研究，在里氏木霉中敲除 *gul-1* 的同源基因 (*gull*) 有类似效果^[30]，与出发株相比，*gull* 失活菌株在纤维素培养基

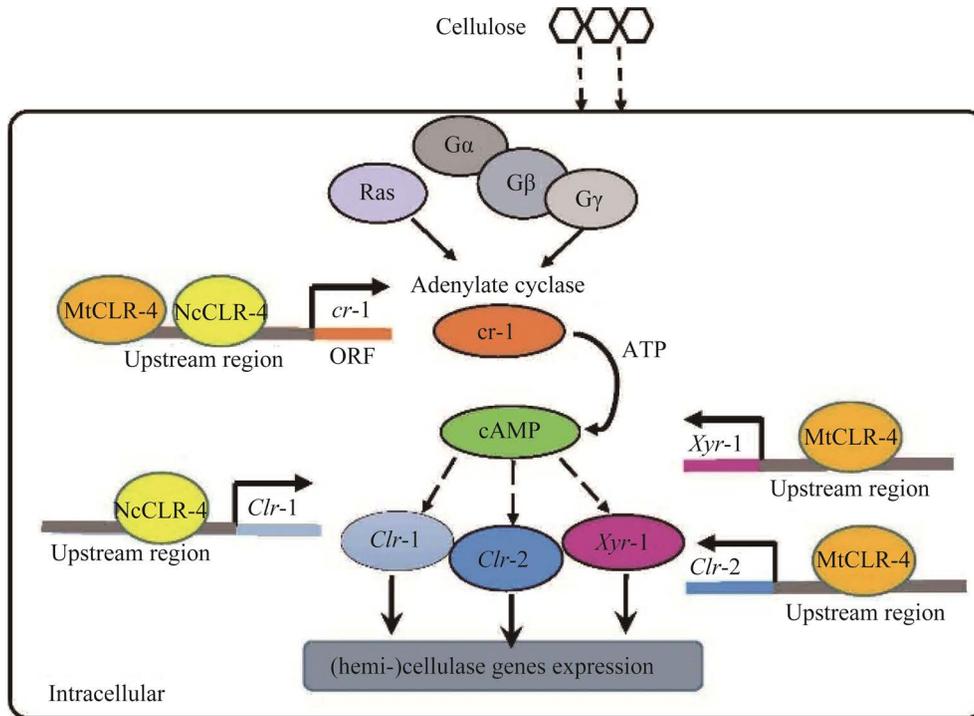


图3 CLR-4在纤维素酶表达调控中的调控机制^[26]

Figure 3 Schematic model depicting roles of transcription factors NcCLR-4 and MtCLR-4 in regulating cellulase gene expression^[26].

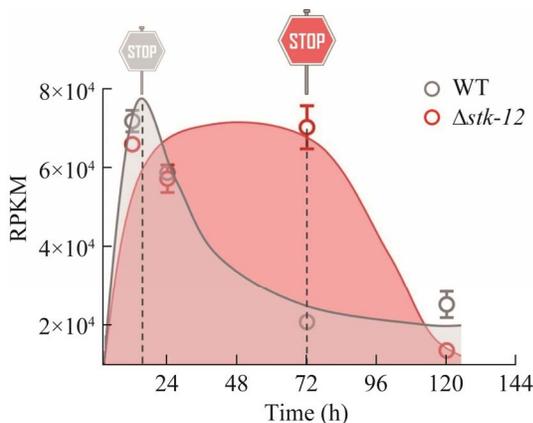


图4 激酶 STK-12 在纤维素酶表达调控中的作用机制^[27]

Figure 4 Mechanism of kinase STK-12 in cellulase expression and regulation^[27].

上侧向分支明显增多,在液体发酵培养基中菌丝团变得更加紧致,发酵液粘度显著下降(约40%),而纤维素酶活力有一定程度的提高

(22%)。这些结果说明, GUL1 的功能在丝状真菌中可能比较保守,其编码基因是理性改造菌丝形态的理想靶标。这些与产酶水平相关的形态、粘度基因的获得有利于深入分析菌丝形态变化对发酵性状的影响,有助于丝状真菌工业酶高产工程菌株的理性重构。

2 生物质全糖利用研究

2.1 生物质糖转运蛋白研究

生物质成分复杂,纤维素和半纤维素降解后,水解液中含有葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖等多种 C5 和 C6 (图 5)。生物质全糖利用对生物炼制产业化推进具有重要影响,如何加强 C5/C6 全利用和共利用是生物炼制领域的重要课题,国内外有众多团队进行了深入研究。

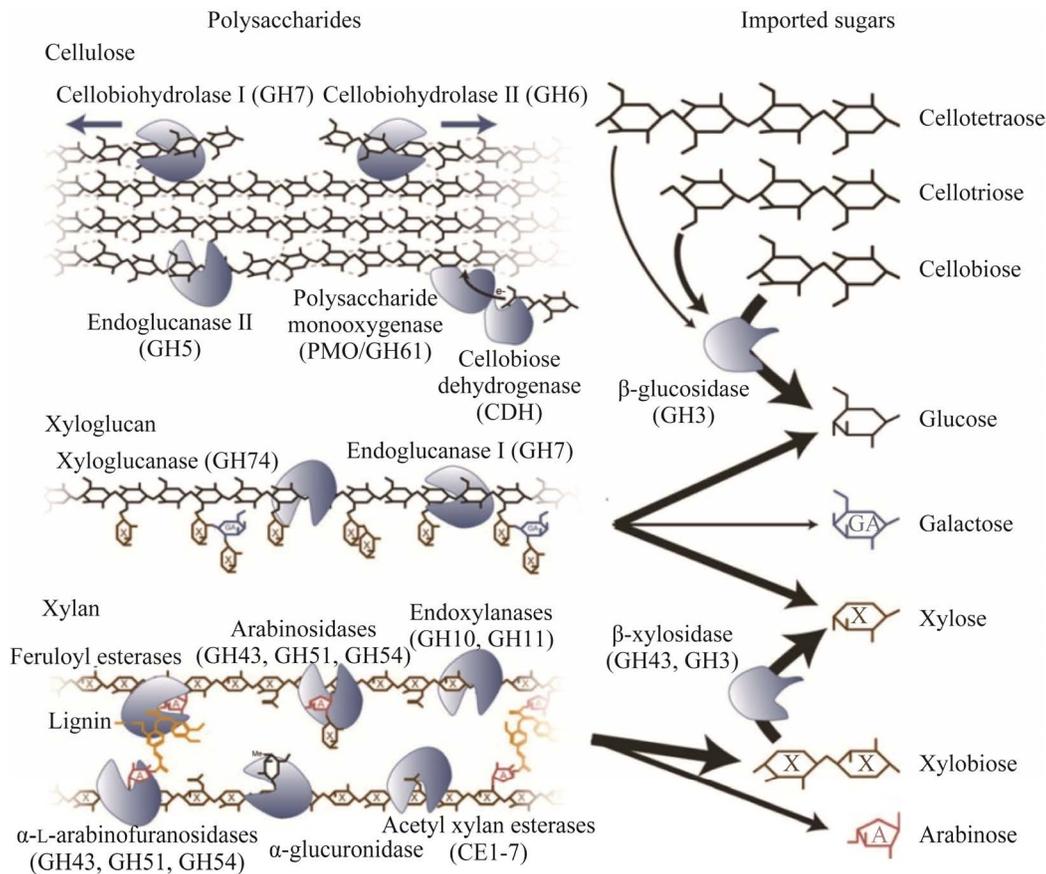


图5 木质纤维素主要水解产物^[13]

Figure 5 Main hydrolytic products of lignocellulose^[13].

酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 作为传统发酵菌株, 是燃料乙醇发酵生产的主要菌株。实现酿酒酵母高效利用各类生物质糖类发酵替代单纯葡萄糖发酵, 是提升生产效率、降低发酵成本的关键。目前, 酿酒酵母高效利用 C5 和 C6 糖的研究取得了显著进展。天然酿酒酵母不具有代谢碳糖的能力, 研究者将真菌或细菌木糖代谢途径引入酿酒酵母中以实现 C5 糖代谢。真菌木糖同化途径由两种氧化还原酶组成, 即 NADPH 依赖的木糖还原酶 (xylose reductase, XR) 和 NAD 依赖的木糖醇脱氢酶 (xylitol dehydrogenase, XDH), 而细菌途径仅使用一种酶木糖异构酶 (xylose isomerase, XI) 催化木糖转化为木酮糖。随后, 木酮糖被

木酮糖激酶 (xylulokinase, XK) 催化为 5-磷酸木酮糖, 然后进入非氧化戊糖磷酸途径 (pentose phosphate pathway, PPP) 完成进一步代谢。阿拉伯糖的代谢途径与木糖代谢相似, 目前均已成功导入酿酒酵母中。但研究发现工程酿酒酵母中葡萄糖利用速率比木糖发酵速率快 3-10 倍^[31]。此外, 由于 CCR 效应, 葡萄糖存在抑制木糖利用, 利用纤维素水解液发酵过程中存在“二次发酵”的现象。目前酿酒酵母 CCR 调控机制尚未明晰, 葡萄糖抑制木糖代谢的关键要素尚未鉴定。Kahar 等尝试去抑制葡萄糖抑制信号, 以降低 CCR 效应, 然而重组菌株的木糖代谢改善非常有限, 并且在任何一种情况下都不能同时消耗葡萄糖和木糖^[32]。

糖转运是糖利用的关键,在酿酒酵母中己糖转运蛋白具备转运木糖的能力,但对葡萄糖的亲合力显著高于木糖。一般认为葡萄糖对木糖的抑制作用,可能源于对木糖转运的抑制作用。因此,筛选鉴定高亲和力木糖转运蛋白,实现葡萄糖和木糖的共转运成为了实现 C5 和 C6 共利用的关键。在工程酿酒酵母中,过表达异源高亲和力转运蛋白,如 GXS1P (来源于间型假丝酵母 (*Candida intermedia*))、XUT3P (来源于树干毕赤酵母 (*Scheffersomyces stipitis*)) 以及 MGT05196P (来源于季也蒙念珠菌 (*Meyerozyma guilliermondii*))^[33-35],能够促进重组菌株对木糖的利用。蛋白质工程在改善糖转运蛋白底物亲和力方面起到了重要作用。Young 等发现将来源于树干毕赤酵母的 XUT3P 突变后 (E538K),显著提高了木糖转运能力,导入酿酒酵母工程菌株后,木糖的利用效率提升 70%^[34]。其中,糖转运蛋白中保守氨基酸序列(GG/FXXXG)中氨基酸残基的突变,导致转运底物由葡萄糖变为木糖。将 GXS1P 关键位点 (F38、I39、M40) 突变后,丧失葡萄糖运输能力,但能够转运木糖。但是,这些转运蛋白突变体仍然受到葡萄糖抑制作用^[36]。随后,研究者将木糖代谢途径 (XR-XDH-XK) 导入至己糖转运蛋白缺失的酿酒酵母 (EBY.WV4000) 中构建了木糖糖转运蛋白突变体筛选工具菌株。德国 Bole 研究团队失活了酿酒酵母 EBY.WV4000 菌株葡萄糖利用途径,利用培养基中葡萄糖对木糖转运系统的竞争性抑制,筛选到了半乳糖转运蛋白 GAL2P 突变体 GAL2 (N376F) 和 GAL2 (N376V)。其中, GAL2 (N376F) 丧失己糖转运能力,但对木糖的亲合力显著提升;突变 N376V 后解除了葡萄糖对木糖转运的抑制作用,使得 GAL2 具有能够同时转运葡萄糖和木糖的能力^[37]。

另外,研究发现纤维二糖 (纤维素水解液中主要产物) 不抑制木糖发酵。Ha 等将来源于粗糙脉孢菌的纤维寡糖转运蛋白 CDT 及 β -葡萄糖苷酶导入酿酒酵母,实现了纤维二糖与木糖的共利用,乙醇的生产效率达到 0.50 g/(L·h),转化率达到 0.36 g/g^[38],为实现生物质全糖利用提供新的策略,随后,该团队利用该策略实现了纤维二糖及半乳糖的协同利用。尽管在酿酒酵母 C5 和 C6 共利用方面取得了诸多进展,但是迄今为止尚未开发出一株工程化菌株能够像代谢葡萄糖一样高效利用葡萄糖和木糖的混合物。今后在糖转运蛋白改造及糖代谢调控方面的进展可能进一步促进酿酒酵母对生物质水解糖的共同利用。

近年来,丝状真菌生物质糖的利用研究逐渐开展,先后克隆鉴定一批与生物质利用紧密相关的寡糖转运蛋白和己糖、戊糖转运蛋白,包括粗糙脉孢菌寡糖转运蛋白 (CDT-1 和 CDT-2)^[39]、木糖转运蛋白 (AN25、XAT-1、XYT-1)^[40-41]、阿拉伯糖转运蛋白 (LAT-1)^[42]、葡萄糖转运蛋白 (GLT-1、HGT-1/2) 等,里氏木霉己糖转运蛋白 (CRT-1^[43]、TrSTR1^[44])、草酸青霉寡糖转运蛋白 (CDTC、CDTD 及 CDTG)^[45]以及嗜热毁丝霉阿拉伯糖转运蛋白 (MtLAT-1),黑曲霉高亲和力葡萄糖转运蛋白 (MSTA、MSTG 和 MSTH)^[46],哈茨木霉中的高亲和力葡萄糖转运蛋白 (GTT1)^[47]。除了以上所提到的纤维寡糖、葡萄糖及戊糖转运蛋白外,也鉴定其他糖转运蛋白,包括纤维二糖酸转运蛋白 CBT-1/CLP-1 (NCU05853)^[49-50]、半乳糖醛酸转运蛋白 GAT-1 (NCU00988)^[48]以及葡萄糖感应蛋白 RCO-3 (NCU02582)^[51]。这些糖转运蛋白的系统研究为代谢工程改造提升产物生产强度提供了关键靶点及元件。

粗糙脉孢菌是典型木质纤维素降解菌株,

能够利用木质纤维素的主要水解产物葡萄糖、木糖及阿拉伯糖进行代谢。粗糙脉孢菌具有公开的基因组信息,完善的遗传操作手段及全基因组范围的单基因突变体,近年来已经成为了研究木质纤维素降解及其水解后糖分子利用的模式生物。天津工业生物所田朝光团队与美国 Louise 团队合作首次从粗糙脉孢菌中克隆鉴定了纤维寡糖转运蛋白 CDT-1 和 CDT-2^[39]。纤维素寡糖是木质纤维素主要的水解产物,CDT-1 和 CDT-2 的研究为提升酿酒酵母生物质糖利用能力提供了关键元件(详见上文)。在研究中发现,尽管 CDT-1 在酿酒酵母中寡糖转运能力强于 CDT-2。但是,在原始宿主粗糙脉孢菌中,CDT-2 却更为重要,在纤维素作为碳源条件下,敲除 CDT-2 比敲除 CDT-1 表现出更加显著的生长缺陷^[39]。因此暗示 CDT-2 在粗糙脉孢菌纤维素降解中有更多功能有待挖掘。进一步研究发现,CDT-2 敲除株不仅在纤维素条件下生长有缺陷,在半纤维素为碳源条件下,生长缺陷更加严重。转录组分析表明,CDT-2 作为一个寡糖转运蛋白,不仅在纤维素降解中起到重要作用,而且参与半纤维降解利用过程。利用酿酒酵母 EBY.VW4000 菌株生长回补实验,证实了 CDT-2 不仅是纤维素寡糖转运蛋白,而且能够转运木寡糖,可以通过影响纤维寡糖和木寡糖的转运而影响纤维素和半纤维素的降解^[52]。随后,田朝光团队发现了纤维寡糖转运途径中一个全新元件 CLP1 (NCU05853),该蛋白是纤维寡糖转运蛋白的同源蛋白,同时也是纤维寡糖诱导纤维素酶表达途径的一个关键新元件。非常有意思的是,同期美国加州大学 Jamie H. D. Cate 团队发现 CLP1 (命名为 CBT-1) 具有纤维二糖酸转运能力。纤维二糖脱氢酶在协同纤维素单加氧酶 LPMO 降解纤维素过程中,将纤维二糖降解为纤维二糖酸^[53]。CLP1 的系统研

究对于提升生物质糖利用具有重要意义,目前该转运蛋白已用于酿酒酵母的代谢工程改造^[49]。

天津工业生物所田朝光团队对粗糙脉孢菌中的糖转运蛋白进行了系统分析,通过糖转运蛋白功能分析发现粗糙脉孢菌基因组中存在 39 个糖转运蛋白基因。通过比较分析粗糙脉孢菌在不同生物质单糖条件下的表达谱,先后克隆鉴定了多个糖转运蛋白基因,包括葡萄糖转运蛋白 GLT-1 (NCU01633)、木糖转运蛋白 XYT-1 (NCU05627) 以及同时具有木糖和阿拉伯糖转运功能的转运蛋白 XAT-1 (NCU01132)。其中 XYT-1 对木糖的亲合力及其最大转运速率均高于前期鉴定的木糖特异性转运蛋白 AN25 (NCU00821)^[41]。此外,进一步研究发现粗糙脉孢菌基因 NCU02188 能够被阿拉伯糖高效特异性诱导表达,其所编码的蛋白质含 12 个跨膜结构域,具有 MFS (major facilitator superfamily) 家族转运蛋白的特点,因此推测 NCU02188 为阿拉伯糖转运蛋白,命名为 LAT-1。随后,该团队对 LAT-1 及其在嗜热毁丝霉中的同源基因 Mycth_95427 (命名为 *Mtlat-1*) 进行了进一步研究。发现 LAT-1 和 MtLAT-1 氨基酸序列具有较高的同源性(83%),但两者的转运底物特异性却迥然不同,MtLAT-1 为特异性阿拉伯糖转运蛋白,而 LAT-1 则具有转运多种糖类的功能。此外,LAT-1 和 MtLAT-1 均为离子驱动型转运蛋白(symporter),具有较低的底物亲和力(K_m),但最大转运速率(V_{max})较高,其中 LAT-1 对底物的最大转运速率 V_{max} 为目前已经报道的最高值^[54]。高婧芳等在酿酒酵母中构建了荧光共振能量转移技术 (fluorescence resonance energy transfer, FRET),分析了粗糙脉孢菌在葡萄糖条件下 17 个高表达的假定糖转运蛋白,发现 2 个

转运蛋白 (NCU01868 和 NCU08152, 分别命名为 NcHXT-1 和 NcHXT-2) 具有转运多种己糖底物的功能, 在酿酒酵母 *EBY.VW4000* 中过表达后, 能恢复菌株在葡萄糖、半乳糖或甘露糖的液体培养基中生长并生成乙醇的能力。蛋白质多序列比对发现 NcHXT-1/-2 在很多纤维素降解真菌中均具有保守的同源蛋白, 为真菌降解利用木质纤维素及酵母利用生物质单糖发酵提供了新的改造靶点^[55]。

葡萄糖转运是真菌研究中重要基础科学问题。在粗糙脉孢菌中, 从分子水平解析葡萄糖转运系统的转运蛋白组成及其分子机理, 对丝状真菌葡萄糖转运途径的功能理解和代谢工程改造有重要意义。天津工业生物所田朝光研究组通过分析粗糙脉孢菌不同葡萄糖浓度梯度下的转录组学, 克隆鉴定了该菌葡萄糖转运系统核心转运蛋白, 整个系统核心包含 3 个转运蛋白: 低亲和力葡萄糖转运蛋白 (命名为 GLT-1) 和高亲和力葡萄糖转运蛋白 (命名为 HGT-1/2); 并研究了它们的转运特征和调控系统特征, GLT-1 具有较高的 K_m 值 ((1842 ± 3.38) mmol/L), 而 HGT-1/2 分别具有很低的 K_m 值 ((16.13 ± 0.95) μ mol/L 和 (98.97 ± 22.02) μ mol/L)。随后, 该团队对粗糙脉孢菌高/低亲和力葡萄糖转运蛋白的表达调控进行了系统分析, 研究发现 COL-26 是调控葡萄糖高/低双转运系统表达的核心元件, 能够与转运元件基因 (*glt-1* 和 *hgt-1/2*) 启动子序列直接结合以激活基因表达。此外, *glt-1* 和 *hgt-1* 的表达受到葡萄糖感应元件 RCO-3 的调控。进一步研究显示, 粗糙脉孢菌中 COL-26 在所有葡萄糖浓度下均发挥作用, 而 RCO-3 则主要在葡萄糖存在时发挥作用^[51]。这些研究对深入理解丝状真菌葡萄糖转运机理和工业真菌代谢工程改造生产生物基化学品都有重要推动意义。

2.2 生物质糖代谢研究

纤维素降解微生物将高聚化的植物生物质降解为可溶解和可利用的简单糖类, 如葡萄糖、木糖以及多种寡糖, 并加以利用。糖代谢是生命的核心基础代谢途径, 对于绝大多数异养生物来说, 糖既是碳源, 又是能源。在漫长进化过程中, 生物细胞会逐渐形成与所处环境相适应的糖转运体系和复杂的中央碳代谢途径调控系统 (糖酵解、三羧酸循环以及相应多级调控系统), 研究丝状真菌生物质糖代谢机制, 对于代谢工程改造提升生物质糖利用效率具有重要意义。

木质纤维素的水解产物包括葡萄糖、木糖、阿拉伯糖及半乳糖等, 其中葡萄糖进入微生物细胞后一般均通过糖酵解途径进行代谢, 形成细胞生命合成所需的中间体及能量 (图 6), 受到多级调控系统控制, 如 GPCR-cAMP-PKA 信号途径、G 蛋白感应调控通路以及转录因子调控途径。在丝状真菌中, 木糖代谢途径主要由氧化还原酶 (XR-XDH-XK) 构成, 该途径中关键酶的表达受到转录调控。在曲霉和木霉中, XLNR/XYR1 具有调控戊糖代谢的功能, 并在纤维素酶及半纤维素酶表达分泌中起到关键作用。在木霉中, XYR1 能够调控木聚糖酶, 纤维二糖水解酶及纤维素内切酶的表达, 同时对戊糖代谢具有重要的调控功能, 能够直接调控木糖还原酶 XR 的表达。丝状真菌阿拉伯糖代谢途径与木糖代谢途径相似。在黑曲霉中, XLNR 和 ARAR 参与调控阿拉伯糖和木糖代谢, 但两者的作用不尽相同。*araR* 可以部分回补 *xlnR* 突变体木糖生长缺陷, 但对 *araR* 突变体的阿拉伯糖或阿拉伯醇代谢缺陷, *xlnR* 的回补能力几乎为零^[56]。

半乳糖是组成半纤维素的重要单糖, 其在半纤维素水解产物中的含量仅次于木糖和阿拉

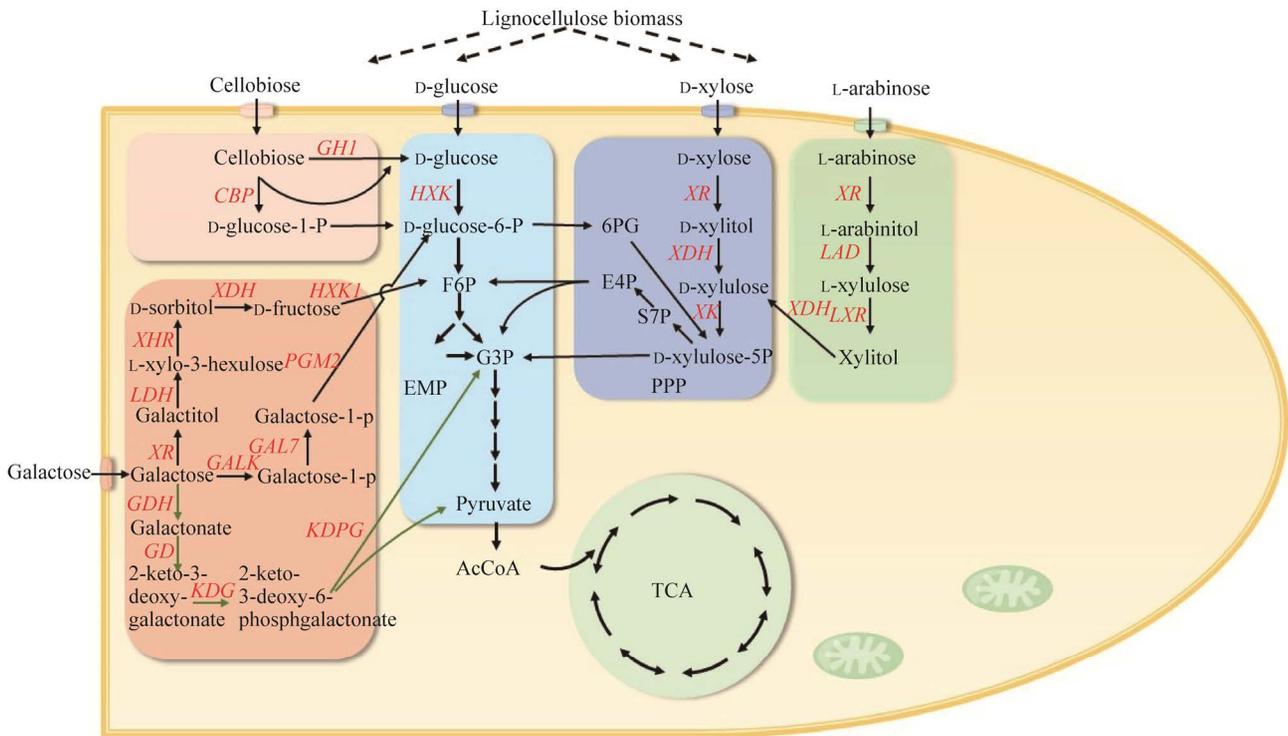


图 6 丝状真菌生物质糖代谢途径

Figure 6 Catabolism pathways of biomass sugars in filamentous fungi.

伯糖。在海洋藻类生物质中半乳糖的干重的含量要高于葡萄糖。其中在红巨藻中，半乳糖的含量甚至高达 86.2%。在大多数原核细胞和真核细胞中，D-半乳糖主要通过经典的 Leloir 途径来分解代谢。但是通过 Leloir 途径，将半乳糖异构为葡萄糖，才能进入下一步的糖酵解途径。该途径高度依赖于半乳糖激酶，进入糖酵解途径后，所生成中间产物对半乳糖的转运及代谢可能具有抑制作用，因此，此途径受到诸多调控因子控制，不能高效代谢半乳糖。在一些丝状真菌中，如构巢曲霉、黑曲霉和里氏木霉等，存在氧化还原途径 (oxido-reductive pathway) 用于代谢半乳糖。在该途径中，半乳糖被转化为半乳糖醇，并被进一步催化生成 L-山梨糖。随后，L-山梨糖被还原为 D-山梨糖醇，后者依次转化为 D-果糖和 D-果糖-1-磷酸，果糖-1-磷酸可以进入糖酵解途径，在不同真菌

中催化氧化还原途径特定步骤的酶也不同。

生物质糖快速代谢是实现生物质高效转化合成目标化学品的关键之一，天津工业生物所近 10 年来在该方面取得了显著进展。田朝光团队系统分析了粗糙脉孢菌在不同生物质单糖 (葡萄糖、木糖和阿拉伯糖) 条件下的转录组学数据，发现粗糙脉孢菌对阿拉伯糖在转录水平的响应明显不同于木糖^[41]。相对于葡萄糖条件，在阿拉伯糖条件下，大量 CAZys 基因的转录水平显著上调，其中包括 8 个半纤维素酶基因。大量糖转运基因，多糖代谢相关基因以及脂类和脂肪酸代谢的基因同样被阿拉伯糖显著诱导；而在木糖条件下，仅有少量基因的表达显著不同于葡萄糖条件。在阿拉伯糖条件下，粗糙脉孢菌中大部分糖转运蛋白基因被诱导表达，其诱导表达的基因数目多于葡萄糖、木糖、木聚糖及结晶纤维素所诱导的糖转运蛋白

基因, 包括纤维二糖转运蛋白基因 (*cdt-2*), 葡萄糖转蛋白基因 (*rco-3*) 以及木糖转运蛋白基因 (*an25*) 等。阿拉伯糖除了作为碳源供微生物生长外, 还可能作为糖代谢过程中的信号分子, 在粗糙脉孢菌木质纤维素降解利用中发挥重要作用。进一步研究发现缺失木糖还原酶后严重影响了半纤维素酶基因在阿拉伯糖条件下的转录水平, 但并未导致阿拉伯糖诱导作用的完全丧失。说明除阿拉伯醇外, 阿拉伯糖或其他衍生物可作为半纤维素酶的诱导物。

在研究丝状真菌生物质糖代谢过程中, 同时分析了纤维素降解菌嗜热毁丝霉在半乳糖条件下转录组学数据, 结果发现在嗜热毁丝霉中存在着两条半乳糖代谢途径: Leloir 途径和氧化还原途径^[57]。其中, 半乳糖激酶 GALK 是 Leloir 途径的关键元件, 缺失后会导致 Leloir 途径受损, 同时氧化还原途径得到激活。此外, 半乳糖激酶或其催化产物参与糖转运蛋白的诱导表达, 敲除 *galk* 并过表达糖转运蛋白, 能够显著促进半乳糖的利用。为了提升嗜热毁丝霉半乳糖代谢效率, 导入外源半乳糖高效途径 Dey Ley-Doudoroff 途径, 该途径不依赖于半乳糖激酶, 且仅仅需要 4 种酶就可将半乳糖彻底分解代谢: D-半乳糖脱氢酶、D-半乳糖酸脱水酶、2-酮-3-脱氧-半乳糖酸激酶以及 2-酮-3-脱氧-6-磷酸半乳糖酸酯醛缩酶。获得嗜热毁丝霉重组菌株 HW2705 对半乳糖的利用率提高了 57%。菌丝的干重比野生型菌株增加了 18%, 为改善其半乳糖代谢, 实现生物质全糖高效利用, 为提升生物炼制经济效率提供了新思路与新策略。

生物质水解过程中, 纤维二糖是主要水解产物, 在进入细胞后主要通过两条途径进行降解, 一个是葡萄糖苷酶途径, 纤维二糖通过 β -葡萄糖苷酶的催化, 生产两分子葡萄糖, 而后

进入糖酵解途径; 另一是磷解酶途径, 在纤维二糖磷解酶的作用下, 纤维二糖降解为一分子葡萄糖和一分子 1-磷酸葡萄糖, 继而进入糖酵解途径。相比葡萄糖苷酶途径, 磷解酶途径降解纤维二糖会节省一分子 ATP, 有利于节约细胞能量提升目标产物。田朝光研究组发现, 在嗜热毁丝霉基因组编码至少存在 8 个 β -葡萄糖苷酶编码基因 (其中 3 个细胞内 β -葡萄糖苷酶基因 (*bgl1*, Mycth_115968; *bgl2*, Mycth_38200; *bgl3*, Mycth_62925) 具有较高的表达水平), 但只有一个纤维二糖磷酸化酶编码基因 Mycth_2308030 (*Mtcpp*)^[57]。值得注意的是, 尽管磷解途径具有能量优势, 但纤维二糖磷解速率受到热力学限制 ($\Delta G^\circ=+3.6$ kJ/mol)。发现加强底物供应提升胞内底物浓度, 是提高反应速率, 打破热力学平衡常用的策略。在嗜热毁丝霉苹果酸发酵菌株中强化纤维二糖转运模块后, 重现菌株 JG207cdt 在纤维二糖和结晶纤维素条件下苹果酸产量分别为 84.4 g/L 和 69.7 g/L, 其转化率分别为 1.13 g/g 和 0.93 g/g。为了协调优化胞内纤维二糖代谢, 将来源于 *C. thermocellum* 的磷解酶基因 *Ctcpp* 导入嗜热毁丝霉苹果酸发酵菌株中, 同时对胞内 β -葡萄糖苷酶进行突变, 菌株 JG412 Δ *bgl2* Δ *bgl3* 在纤维二糖和结晶纤维素条件下的苹果酸产量分别为 101.2 g/L 和 77.4 g/L^[58]。这些研究为提升生物质全糖利用提供了新的策略, 用于提升纤维二糖条件下的乙醇产量及产率。

另外, 木质素 (lignin) 是生物质中含量仅次于纤维素的组成部分, 由 3 种不同的苯丙烷单体 (对羟基苯基丙醇 (H 型)、愈创木酚丙醇 (G 型) 和紫丁香醇 (S 型)) 通过 C-C 和 C-O 键随机聚合而成。由于木质素碳氧比高和芳烃丰富, 是生产生物燃料和其他高价值化学品等产品的最有前景的材料。在木质纤维素结构

中,木质素直接与纤维素或半纤维直接相连,形成稳定的立体结构。由于木质素中缺乏水解的糖苷键,对降解木质素的酶系提出了更高的要求。有研究表明,缺乏有效的木质素降解和转化技术将是制约生物精炼工厂可持续性和成本竞争力的主要瓶颈。在自然界中,白腐菌、褐腐菌和软腐菌是3种能有效降解木质素的真菌,其中白腐菌是最能高效降解木质素菌种。目前发现自然界中有3种酶可降解木素:木素过氧化物酶、锰过氧化物酶以及酚氧化酶(又叫漆酶, laccase)。但现在生物质酶解法降解木质素的效率依然较低,并且纤维素降解菌对木质素降解物的利用率也较低,限制了木质素的直接生物转化。通过化学或物理方法,可将木质素有效降解为5-羟甲基糠醛、乙酰丙酸和糠醛等物质,目前已有诸多利用木质素降解物合成脂类及芳香族化学品的报道。

3 秸秆转化真菌整合生物炼制技术研究

目前生物炼制主要采用“三段式”工艺,即原料预处理、纤维素酶合成和生物质酶解糖化,以及水解发酵。经过近20年的发展,3种工艺逐渐成熟。尤其是近年来纤维素酶表达分泌调控机制解析以及众多纤维素酶生产菌株的构建,极大地推进了生物质酶解工艺的发展。其中有报道指出工业菌株里氏木霉和嗜热毁丝霉的蛋白质产量均超过100 g/L。尽管如此,在多个生物炼制工艺研究中,纤维素酶成本仍占总成本的30%以上,加上目前常用乙醇生产菌株仍然不能高效利用生物质全糖,严重限制了生物炼制技术的持续发展。CBP体系将产酶、生物质酶解和产品发酵集中在一个反应器完成(又称一锅法),该技术不仅可以节省纤维素酶发酵成本,而且不用单独酶解过程,会

大大降低整个生物基化学品的生产成本,是秸秆生物炼制产业化的新希望。CBP体系起初主要是单菌体系,近年来混菌体系也进展很快,本文主要综述单菌体系进展,混菌体系研究进展可参考其他综述^[59]。

在CBP单菌体系中,纤维素酶的分泌及目标产品合成由单个微生物完成,相比分段式生物炼制,对候选微生物提出更高的要求:(1)能够分泌大量纤维素水解酶;(2)对木质素及其衍生物具有较高的耐受性;(3)碳阻遏效应较小;(4)能够合成化学品或生物燃料并对其产物具有较高的耐受性。目前主要通过两种策略构建CBP菌株:策略一,将木质纤维素水解酶进行异源表达,将传统发酵微生物改造为能够以木质纤维素为底物进行发酵的工业菌株;策略二,利用分子遗传手段对木质纤维素水解酶分泌菌株进行代谢工程改造,使之在利用纤维素降解利用过程中能够合成目标产物。其中,策略一主要以常见的模式发酵菌株为研究对象,如*S. cerevisiae*、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*)、产酸克雷伯菌(*Klebsiella oxytoca*)等^[60-63]。其中发展最为迅速的为以表面展示技术为依托,在酿酒酵母中表达纤维素水解酶,实现重组酵母利用纤维素合成生物燃料乙醇。但值得注意的是由于这类微生物蛋白分泌能力有限,重组菌株生产的木质纤维素酶难以满足体内目标产物合成对木质纤维素快速降解的需要,加上分泌的大多纤维素酶活性偏弱,导致底物利用率较低且底物应用范围窄。木质纤维素结构的复杂性决定了生物质快速降解需要多种水解酶协调作用,但纤维素水解酶在发酵菌株的异源表达仍难以实现。此外纤维素酶的合成分泌需要消耗细胞内大量的物质和能量,这些是否以及如何影响细胞目标产物合成尚未明了。策略二主要以纤维素降解菌为研究对

象,如极端嗜热厌氧菌属 (*Caldicellulosiruptor*)、梭菌属 (*Clostridium*)、曲霉属 (*Aspergillus*)、脉孢菌 (*Neurospora*)、木霉属 (*Trichoderma*)和毁丝霉属 (*Myceliophthora*) 等^[64-67]。

嗜热毁丝霉属于毁丝霉属,能够分泌大量的耐热纤维素酶,在其基因组中存在超过 200 个 CAZys 基因,涵盖了大多数的水解酶家族。嗜热毁丝霉在纤维素和葡萄糖中的生长速率和细胞速率几乎一致,其纤维素利用速率约为里氏木霉的 5 倍,热纤梭菌的 2.5 倍^[68]。该真菌分泌的纤维素酶具有良好的热稳定性和催化活性,其生长温度 (45–50 °C) 与纤维素酶最适催化温度 (~50 °C) 接近,使得该体系在纤维素酶生产和生物炼制工业上具有突出的优势,是近年来国际上重点发展的工业生物技术新体系。美国 Dyadic 公司以嗜热毁丝霉为出发菌株开发了 C1 蛋白表达系统 (www.dyadic.com)。

天津工业生物所田朝光团队自 2013 年开始研究嗜热毁丝霉系统,先后构建了该真菌遗传操作系统、基于 CRISPR/Cas9 体系的基因组编辑技术以及全基因组尺度代谢网络模型^[69-71],并以此为基础对嗜热毁丝霉进行了基因组水平代谢途径重构,目前该团队已将嗜热毁丝霉开发为高效真菌底盘,用于合成有机酸及有机醇(图 7)。前期在嗜热毁丝霉构建了 rTCA 途径和苹果酸转运系统,创建了苹果酸高产菌株。该菌株能够以单糖(葡萄糖、木糖和阿拉伯糖),寡糖(纤维素二糖),及复杂原料(纤维素、半纤维素、玉米芯、农作物秸秆等)为碳源,高效合成苹果酸^[71]。在摇瓶中,以纤维素为原料,苹果酸产量达到 65.4 g/L。随后,通过过表达磷酸烯醇丙酮酸羧化酶 PPC 和苹果酸脱氢酶 MDH,进一步加强了 rTCA 途径,结合 CO₂ 浓缩模块的强化,苹果酸的合成效率得到了显著提高,以纤维素为唯一碳源条件下,苹果酸

摇瓶发酵产量达到 83.3 g/L,转化率为 1.11 g/g。在 5 L 发酵罐中,直接以纤维素为原料,工程菌株苹果酸产量达到 181 g/L,转化率为 0.992 g/g;以生物质玉米芯为碳源,经过发酵工艺优化后苹果酸产量超过 150 g/L,达到目前利用生物质合成大宗化学品领域已报道的最高水平。在 CBP 发酵中,纤维素降解速率和苹果酸合成效率是生物质高效转化的两个关键要素。研究发现,随着菌株苹果酸合成能力的提高,发酵液中蛋白质浓度纤维素酶酶活随之增加。但通过人工调控提升纤维素酶分泌后,如提高纤维素酶激活因子 CLR-2 的表达水平,重组菌株的苹果酸合成效率未发生变化,暗示在 CBP 菌种创建过程中,胞内的代谢工程改造可能是主要因素,纤维素降解菌株可以根据胞内的物质代谢调控纤维素酶的分泌^[72]。所以,研究组将 CBP 菌株的创建工作主要集中在胞内目标产物合成途径改造方面。基于 rTCA 途径,田朝光团队筛选了富马酸酶 CkFUM 和富马酸合成酶 FR,创建富马酸发酵菌种和琥珀酸发酵菌种^[73]。在发酵中,以纤维素为原料直接发酵,琥珀酸产量超过 50 g/L,通过后期途径优化有望进一步提升,为推进生物质直接发酵合成琥珀酸提供基础菌株。

丙二酸是非常重要的药物中间体,目前主要由化学方式合成,在生产过程中氰化钠是其主要的原料,易造成环境污染或安全问题。基于天津所在合成生物学方面的积累,尤其是在途径设计及关键酶元件筛选及改造方面取得的进展,田朝光团队从头设计了丙二酸的合成途径,从 rTCA 途径中间产物草酰乙酸出发,经过酮酸脱羧酶催化合成丙二酸半醛,再通过半醛脱氢酶催化合成丙二酸,具有途径短、理论得率高的优势。通过体外酶反应,鉴定了关键元件酮酸脱羧酶基因,成功在嗜热毁丝霉构建了丙

二酸合成途径, 实现了丙二酸的生物合成^[74]。

以上研究说明嗜热毁丝霉是非常出色的大宗化学品合成细胞底盘, 为了进一步扩展其在生物制造方面的应用, 该团队在嗜热毁丝霉野生型菌株中过表达来源于酿酒酵母的乙醇脱氢酶基因 *adh1*, 突变体在葡萄糖条件下的乙醇产量提高 57%。随后过表达来源于粗糙脉孢菌的葡萄糖转运蛋白 GLT-1 和纤维二糖转运系统 (CDT-1/CDT-2), 以加强菌株底物转运效率, 进一步提升乙醇的合成效率, 在纤维二糖条件下, 乙醇产量达到 11.3 g/L^[75]。如果可以利用真菌 CBP 技术, 实现生物质一步发酵转化纤维素乙醇, 具有重大意义。田朝光团队继续利用嗜热毁丝霉体系, 结合工程生物学理念和基因组水平代

谢途径重构, 在持续努力下, 2020 年一步发酵纤维素乙醇技术取得阶段性突破, 实现了纤维素一步直接发酵燃料乙醇超过 20 g/L (中国发明专利 201911349044.4, 2020112833774), 该技术正在进一步提升优化, 有望为我国纤维素燃料乙醇产业化提供新的技术供给。同时, 该团队还开展了纤维素直接发酵合成乳酸的研究工作, 目前已经取得了阶段性的进展, 乳酸产量已经超过 40 g/L。丝状真菌遗传背景比较复杂, 菌种改造较为困难, 但其在纤维素降解方面的优势不容忽视, 随着基因组编辑技术等合成生物学使能技术的发展, 丝状真菌在生物制造领域将起到重要作用, 也希望我们的工作能够推进丝状真菌在新一代生物质炼制技术的发展。

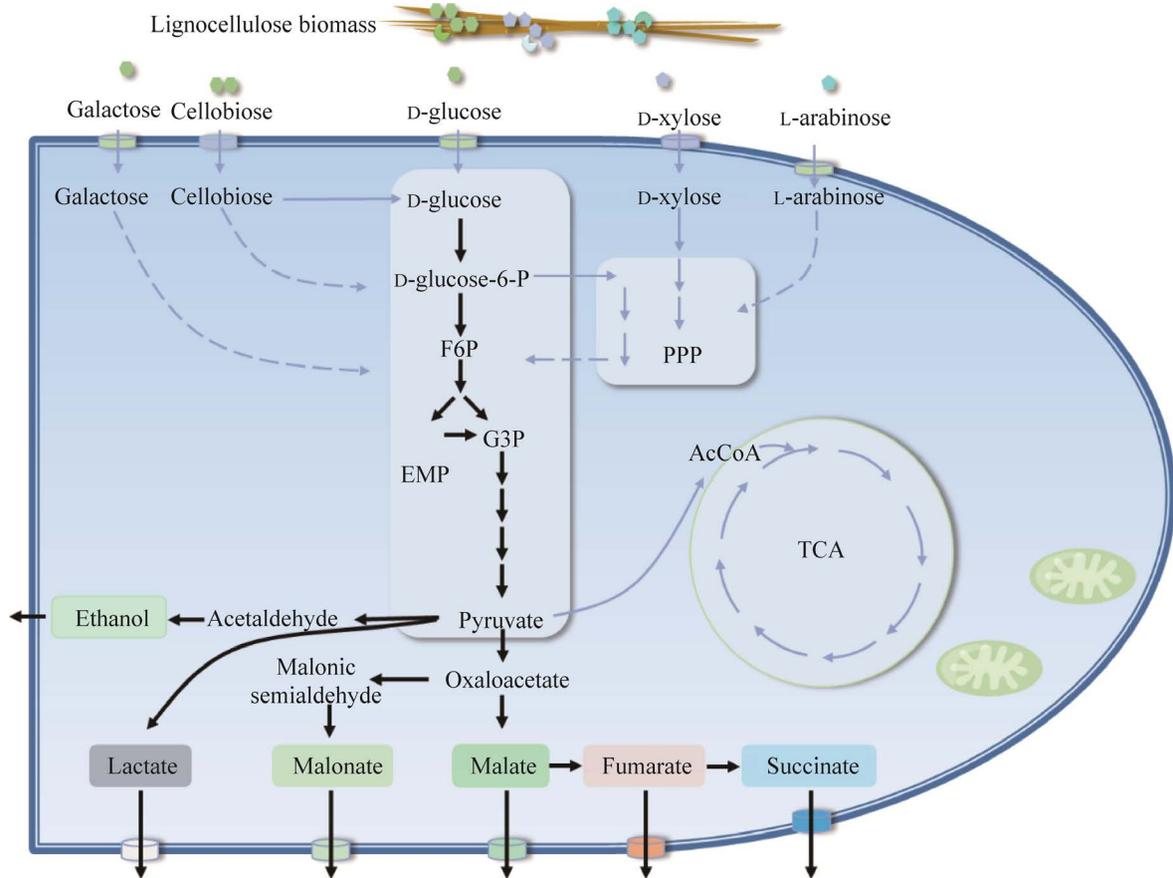


图 7 以嗜热真菌为底盘细胞, 创制生物质转化合成有机酸及有机醇细胞工厂^[69-71]

Figure 7 Development of cell factories for conversion of biomass into organic acids and alcohols based on thermophilic fungi^[69-71].

4 可再生化工研究

近年来,生物制造关键核心技术与底层技术研发不断取得突破,正在进入快速产业化阶段,新产品开发速度和过程工艺的绿色环保水平大幅度提升,生物制造正在成为构建可持续发展路线和提升生物经济发展能力的战略驱动力量。依托生物制造技术,能够实现化工原料和化工过程的替代,有望彻底变革未来物质生产和加工模式。预计未来 10 年,石油化工和煤化工产品的 35% 可被生物制造产品所替代,成为可再生产品,对能源、材料、化工等领域产生广泛影响。天津工业生物所在可再生碳源发酵生产大宗有机酸研究领域取得了显著进展,在代谢工程设计,工业菌种构建和提升方面,一批菌种实现了产业化,为低碳经济发展作出了独特贡献。

4.1 丁二酸

丁二酸 (succinic acid), 是一种四碳二羧酸, 是一种优秀的平台化合物, 被美国能源部列为未来 12 种最有价值的平台化合物之一, 可以衍生出很多下游产品, 如 1,4-丁二醇、四氢呋喃、 γ -丁内酯、N-甲基吡咯烷酮和 2-吡啶酮。大约有 250 种可以用苯为原料生产的化工产品都可以通过丁二酸为原料生产。另一方面, 丁二酸还是生产聚丁二酸丁二醇酯 (poly(butylene succinate), PBS) 全生物降解塑料的关键原料。市场潜力达 160 亿美元/年。

生物法发酵生产丁二酸所使用的菌种主要有两大类。一类是天然产丁二酸菌, 主要有产丁二酸放线杆菌 (*Actinobacillus succinogens*)、产丁二酸曼海姆菌 (*Mannheimia succiniciproducens*)、产丁二酸厌氧螺菌 (*Anaerobiospirillum succiniciproducens*)。另一类是通过代谢工程改造的工程菌, 如大肠杆菌和

酿酒酵母等。天然产丁二酸菌虽然能够高产丁二酸, 但自身存在很多缺陷。如在发酵过程中, 糖酸转化率最高为 0.9 g/g, 仍低于理论值 1.12 g/g, 有相当一部分碳源流入到其他有机酸的合成。另外, 天然产丁二酸菌发酵过程中需要丰富培养基, 增加了生产成本和下游分离纯化成本, 限制了其大规模工业化生产。大肠杆菌在糖发酵过程中虽然只积累少量的丁二酸, 但由于其生理遗传背景清晰, 易于基因改造。美国佛罗里达大学 Ingram 研究团队^[76]通过敲除 *adhE*、*ldhA*、*ackA*、*pflB*、*mgsA*、*poxB*、*tdcDE*、*citF*、*aspc*、*sfca*、*pta* 基因, 构建出的工程菌 KJ134 在厌氧条件下丁二酸产量达到 83 g/L, 糖酸转化率达到 0.92 g/g。天津工业生物所张学礼研究团队^[77]用 C5 磷酸戊糖途径替代 C6 糖酵解途径, 通过增强葡萄糖代谢的还原力供给量, 从而解决丁二酸合成途径中还原力不足的问题, 显著提高了丁二酸的糖酸转化率。工程菌株 HX-024 在 300 m³ 发酵罐上, 发酵 36 h 后, 丁二酸产量达 100 g/L, 糖酸转化率达 1.02 g/g, 糖酸转化率指标达到目前国际最高水平。大肠杆菌厌氧发酵生产丁二酸技术与山东兰典生物科技股份有限公司 (兰典) 合作。目前, 兰典建成了年产 2 万 t 丁二酸的规模化生产线, 首次在国内实现了发酵法生产丁二酸的产业化, 生产成本比传统的石油化工路线降低 20%。该技术的实现对降低丁二酸生产成本, 摆脱石油资源的依赖, 促进可降解塑料产业的推广具有重要的意义。

4.2 乳酸

乳酸 (lactic acid) 为一元酸, 由于分子中有一个不对称碳原子, 存在 DL 两种构型。其中, L-乳酸最重要的应用是合成生物可降解材料聚 L-乳酸。L-乳酸的生产方式包括化学合成法、酶法和微生物发酵法。其中微生物发酵法

因其生产成本低、工艺绿色环保等优势成为产业化主要方式。自然界中大部分微生物(如细菌、真菌、蓝细菌和藻类)可以天然合成 L-乳酸,但产率、生产速率和光学纯度较低,不适合产业化生产。经过工业化改造的微生物,如芽孢杆菌、大肠杆菌和一些非模式菌株,产 L-乳酸的效率和纯度得到极大地提升,目前已实现了规模化发酵生产。

芽孢杆菌属于生物安全菌株,能在基础培养基上生长且底物利用范围广,具有耐高温等优点,成为生产 L-乳酸的适用菌株。2008 年,我国最大的 L-乳酸生产企业河南金丹乳酸科技有限公司使用凝结芽孢杆菌 JD-76L 在国内率先实现了 L-乳酸的规模化工业生产,达到年产 10 万 t。随着研究进展,越来越多的芽孢杆菌正不断被发现和改造用于 L-乳酸生产。中国科学院微生物研究所马延和研究团队^[78]从嗜碱湖中筛选得到了一株芽孢杆菌 WL-S20,优化发酵条件后 L-乳酸产量达到 225 g/L,转化率达到 99.3%,并且发酵液中未检测到 D-乳酸。通过代谢工程改造芽孢杆菌可以有效改善其生产 L-乳酸的效能和特性,美国弗吉尼亚理工大学张以恒研究团队^[79]在芽孢杆菌中过表达了葡聚糖内切酶 BsCEL5,实现了工程菌直接发酵纤维素水解液生产 L-乳酸。随着合成生物学技术的不断进步和芽孢杆菌自身优良特性的进一步改造,未来芽孢杆菌将是生产 L-乳酸非常重要的工业菌种。

相对于芽孢杆菌,大肠杆菌作为一种模式微生物不仅具有生长快、底物利用范围广等优势。天津工业生物所张学礼研究团队在大肠杆菌 ATCC 8739 中创建了 L-乳酸合成途径,使 L-乳酸的生产和细胞的生长相偶联,利用代谢进化,获得一株耐高温产 L-乳酸工程菌,厌氧发酵 48 h 产 L-乳酸 150 g/L,产率达到 1.9 mol/mol,

在发酵液中未检测到 D-乳酸(中国授权专利 CN112852693B)^[80]。后期通过合成生物学改造进一步优化大肠杆菌高效生产 L-乳酸,未来使用大肠杆菌实现 L-乳酸的工业化生产也指日可待。

D-乳酸的重要应用是合成生物可降解材料聚 D-乳酸。聚 D-乳酸的物质性能(如热特性)要优于聚 L-乳酸,但 D-乳酸的生产成本高,高光学纯度的单体难以制备等因素限制了聚 D-乳酸的广泛应用。自然界中多种微生物如大肠杆菌、乳酸菌,都可以天然产 D-乳酸,但天然菌株的 D-乳酸产量很低,不能直接用于工业化生产。应用合成生物学的技术,酵母菌、芽孢杆菌和大肠杆菌被改造成 D-乳酸合成的细胞工厂。高光学纯 D-乳酸的发酵技术多年来一直被国际大公司垄断,如美国 NatureWorks、荷兰 Purac 等,他们生产的 D-乳酸常用来生产聚乳酸。天津工业生物所张学礼研究团队从一株野生型大肠杆菌出发,失活富马酸还原酶(fumarate reductase, FRD)、丙酮酸甲酸裂解酶(pyruvate formate-lyase, PFLB)和甲基乙二醛合成酶(methylglyoxal synthetase, MGSA),获得一株在厌氧条件下只生产 D-乳酸的工程菌(美国授权专利 US9944957B2)^[81]。该菌株在厌氧发酵条件下传代 520 代后获得的工程菌 Dlac-012 可以生产 131.4 g/L 的 D-乳酸,转化率达到 1.88 mol/mol,并能耐受 14% 的葡萄糖浓度。进一步在温度逐步提高的发酵条件下经过 360 代进化后获得的工程菌 Dlac-206 则能在 46 °C 发酵条件下利用葡萄糖厌氧发酵生产 D-乳酸,D-乳酸产量可达到 102 g/L,而转化率可达到 1.94 mol/mol,光学纯度高达 99.5%,完全满足聚乳酸聚合单体的需求。2014 年,张学礼团队与山东寿光巨能金玉米有限公司合作,建成 D-乳酸万吨级生产线。该技术的产业化打

破了国外公司长期以来在 D-乳酸发酵技术上的垄断, 对我国可降解生物基塑料聚乳酸的快速发展和性能改进具有很好的促进和推进作用。

4.3 苹果酸

L-苹果酸 (L-malic acid) 是一种重要的天然有机酸, 广泛用于食品、香料、饮料、化工、塑料、医药保健等行业。苹果酸在有机酸工业中具有重要的地位和作用, 其潜在工业市场容量 100 万 t/年, 市场前景广阔。传统的苹果酸生产基于石油化工, 为 D/L-苹果酸, 由于人体不能代谢 D-苹果酸, 限制了其在食品和医药行业的应用。以微生物发酵生产单一 L-苹果酸因其原材料来源广泛、环境污染小、能耗低等特点受到人们广泛关注和高度重视, 是国内外争相研究的热点产品。在真核生物细胞质中, 首先丙酮酸在丙酮酸羧化酶的作用下转化为草酰乙酸, 并固定一分子 CO_2 , 之后由苹果酸脱氢酶催化形成苹果酸。ATP 与辅因子 NADH 在整个葡萄糖合成苹果酸过程中是平衡的, 加上 CO_2 的固定, 使得苹果酸的合成理论最大值为 2 mol/mol 葡萄糖。因此, 在微生物代谢工程过程中, 一般以此途径为基础对目标菌株进行改造, 以期获得苹果酸高产工业菌株。诺维信公司通过代谢工程手段对 *A. oryzae* NRRL3488 进行了改造, 相比出发菌株其苹果酸产量得到了明显提高。在 2 L 发酵罐中, 工程菌株 (2103a-68) 以葡萄糖为碳源在 164 h 内苹果酸产量达到了 154 g/L, 产率为 0.94 g/(L·h)^[82]。

在国内, 多家科研单位以丝状真菌为体系, 通过代谢工程构建苹果酸发酵菌株。江南大学刘龙团队利用米曲霉体系, 通过过表达丙酮酸羧化酶和苹果酸脱氢酶, 强化胞质还原型 TCA 途径, 苹果酸产量达到 42.3 g/L, 而后该团队进一步通过加强糖酵解途径及其苹果酸转运

能力, 使得菌株的苹果酸产量进一步提升到 165 g/L, 转化率为 0.68 g/g, 发酵产率为 1.38 g/(L·h)^[83]。天津科技大学刘浩团队利用黑曲霉体系, 同样通过强化 rTCA 途径及苹果酸转运系统, 结合敲除代谢支路草酸合成途径, 获得了苹果酸高产菌株, 在发酵罐中苹果酸产量达到 201.24 g/L, 转化率为 0.945 g/g, 发酵产率为 0.93 g/(L·h)^[84]。纤维素降解高温真菌嗜热毁丝霉发酵温度为 45–50 °C, 相比中温的曲霉系统 (34 °C 发酵) 可以显著节省冷却用能, 从而降低能耗成本。天津工业生物所田朝光团队以该嗜热真菌为体系, 通过强化 rTCA 途径及 L-苹果酸转运模块, 结合 CO_2 浓缩转运模块构建, 获得发酵法生产苹果酸的嗜热真菌体系^[72], 随后通过系统优化苹果酸产量得到了显著提高, 以葡萄糖为原料, 苹果酸产量达到 226 g/L, 转化率为 0.88 g/g, 发酵产率为 1.57 g/(L·h)。田朝光团队与安徽丰源集团合作联合开发以淀粉糖为原料生产苹果酸技术, 目前苹果酸年产万吨级生产线已于今年开始投产运行。随后, 该团队将卡尔文途径 (Calvin-Benson-Bassham, CBB) 关键酶, 磷酸核酮糖激酶 (phosphoribulokinase, PRK) 和 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶 (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, Rubisco), 导入了嗜热真菌苹果酸发酵菌种, 显著提升了目标产物产量, 在木糖和阿拉伯糖条件下的苹果酸产量分别提高了 24% 和 15%。结合底物转运强化, 进一步提升木糖的利用效率。以粉碎的玉米芯为唯一碳源, 苹果酸产量达到 40 g/L, 转化率为 0.53 g/g。其中, CO_2 固定速率为 33.8 mg/(L·h), ^{13}C 含量为 0.44 mol/mol 苹果酸, 表明每生产 1 t 苹果酸, 消耗 1.89 t 玉米芯, 并固定 0.14 t CO_2 ^[85]。

为了加强对嗜热毁丝霉代谢网络特性的理解, 进而提高这一整合生物炼制底盘细胞的计

算设计能力, 该团队构建了首个嗜热毁丝霉高质量全基因组尺度代谢网络模型 (Genome-scale metabolic models, GEM) GEM iDL1450, 包含 1 450 个基因、2 592 个反应和 1 784 个代谢物。与 Biolog 表型板可利用碳/氮源获得的实验数据相比, 模型预测碳/氮源可利用准确度分别达 83.0%和 83.6%^[71]。目前以嗜热毁丝霉为底盘, 已经构建了多株整合生物炼制大宗化学品生产菌株。借助所构建的嗜热毁丝霉 GEM, 以大宗化学品为目标产物, 模拟了氧耗浓度对目标产品生产速率的影响, 从而指导发酵过程参数控制。此外, 将代谢网络模型和转录组数据进行系统整合, 揭示了嗜热毁丝霉不同温度条件下的代谢扰动。嗜热毁丝霉代谢网络模型的构建, 有助于研究者从系统水平上对这一嗜热真菌代谢特性的理解, 将为其工业化进程提供理性指导。

4.4 柠檬酸

柠檬酸 (citric acid) 是生物体重要的中间代谢物, 也是产量最大的重要大宗有机酸。柠檬酸在食品、医药、化工、纺织、环保等领域中具有广泛的应用。随市场需求的持续增长, 全球柠檬酸产量达 200 万 t, 产值超过 20 亿美元, 并以每年 3.5% 的速度递增。我国是柠檬酸的生产与出口大国, 柠檬酸产量约占全球总量的 70% 以上。黑曲霉是柠檬酸行业的主力生产菌株, 全球 80% 以上的柠檬酸由黑曲霉深层发酵生产。黑曲霉具有强大的胞外水解酶系可以高效转化复杂的碳源, 实现柠檬酸的快速积累, 其糖酸转化率可达到 0.95 g/g, 发酵水平可达到 170 g/L^[86]。伴随产能过剩与市场竞争激烈, 柠檬酸行业利润空间狭小, 柠檬酸生产菌种的选育升级是解决整个柠檬酸产业困境的关键。长期以来, 由于黑曲霉遗传操作难度大, 缺乏有效的遗传编辑工具, 柠檬酸生产菌种多

以随机诱变获得, 这导致菌种发酵性能的提升进入瓶颈期。

天津所孙际宾与郑平团队首次提出使用 5S rRNA 启动子来驱动 sgRNA 表达的策略, 以此建立了基于 CRISPR/Cas9 系统的高效基因组编辑工具包^[87-88], 率先突破了黑曲霉的遗传操作瓶颈。通过与中粮生物化学股份有限公司合作研发, 基于时间序列多组学整合分析, 全面解析了柠檬酸高产机理^[86,89], 利用高效基因编辑技术与丰富的基因调控元件^[90-91], 鉴定出显著影响柠檬酸生产的关键元件^[92-94]。结合高效诱变定向筛选育种策略, 获得了具有自主知识产权的柠檬酸高产新菌株, 产酸水平提高 11.8%, 糖酸转化率提高 11.63%。这些研究成功解决了传统柠檬酸发酵生产的关键瓶颈问题, 推动了我国柠檬酸行业的高质量发展, 为绿色可持续发展与产业升级改造提供了重要的借鉴。

5 秸秆生物化工未来展望

5.1 秸秆直接发酵生产大宗化学品

大力发展生物质能源化工已经成为我国重大战略, 尤其是发展以秸秆为原料的纤维素乙醇技术, 是实现我国能源安全、环境治理以及社会可持续发展重要路径。根据国家能源局 2017 年制定的方案, 到 2025 年, 力争实现纤维素燃料乙醇规模化生产, 先进生物液体燃料技术、装备和产业整体达到国际领先水平, 形成更加完善的市场化运行机制。秸秆生物转化近年来陷入困境, 其中一个原因是基础研究遇到瓶颈, 包括解析微生物参与纤维素降解酶系中更多重要组分和协同机理, 这方面自 2010 年 LPMO 发现之后尚未有大的突破, 纤维素降解酶系组分及其协同机理上亟需新的突破, 构建生物质降解新理论, 指导生物质高效降解技术

的研发。另一个重要瓶颈是木质素利用问题,前期研究主要集中在纤维素和半纤维素转化利用上,在木质素降解机理方面的了解远远不够,目前的生物炼制体系通常是将木质素部分以燃烧供热的方式加入综合利用。由于木质素能量含量高,是否可以有更新的利用方式将木质素中的能量汲取出来促进纤维素和半纤维素的转化,值得思考。CBP 技术不需要单独生产纤维素酶和酶解过程,是降低秸秆生物转化成本的另一个选择,随着技术的进步和更多体系的探索研究,尤其是高温纤维素降解真菌体系,可能会迎来新的发展,为纤维素乙醇等生物炼制产业带来新的技术机遇。另外,数据驱动的科学新范式将广泛推动工程生物学研究,未来在秸秆生物转化中也将发挥更重要的作用,包括重要真菌 CBP 菌种的基因组尺度代谢网络模型,高品质数据和新型数据挖掘和分析算法等,将显著促进改造靶点预测和指导代谢工程改造等领域。

5.2 秸秆蛋白

蛋白质资源紧缺以及传统种植业和养殖业带来的生态环境压力已经成为全球性问题之一,在中国尤为严峻。为了解决这一日益凸显的问题,世界各国近年来正在积极寻求开发新的蛋白质资源。微生物蛋白具有蛋白质和必需氨基酸含量丰富、繁殖快、生产效率高、能够利用工农业废弃物、环境足迹低、强可持续性等优势,被认为是最具有开发潜力的蛋白质新资源,可应用于饲料和食品行业^[95-96]。目前,秸秆生产饲料微生物蛋白主要以青贮、微贮等传统技术的自然菌种或复合微生物菌剂以及固态发酵工艺为主,用作家畜特别是反刍动物的粗饲料,粗蛋白含量低于 15%,与传统饲料蛋白原料豆粕(43%–48%)和鱼粉(50%–70%)的粗蛋白含量相去甚远,而且秸秆蛋白饲料的粗纤

维多,导致适口性差、消化率低,是限制秸秆制备饲料微生物蛋白的主要因素^[97-98]。在秸秆制备食品微生物蛋白方面,秸秆需要经过纤维素酶酶解释放出更容易被微生物利用的单糖或寡糖,经过生物安全菌种发酵,生产食品安全级的微生物蛋白^[99]。以秸秆为原料生产微生物蛋白是一个长链条产业。未来尤其需要在纤维素酶生产、微生物菌种和发酵工艺等方面加快推进技术创新,突破传统技术的限制因素,实现秸秆制蛋白的规模化生产,为人类和动物的蛋白质营养供给提供循环、可持续的生物解决方案。

5.3 秸秆制淀粉

粮食安全是我国的基本国策,但是 2020 年中国食物自给率已降到大约 70%,因此需要不断拓宽新的粮食生产来源以应对可能的粮食危机。淀粉是粮食成分中最重要的组成部分,联合国粮食及农业组织(Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO)推荐的健康食谱中,每人每日摄入热量的 50%–70%应该来自淀粉。为了同时解决粮食以及秸秆处理和利用的问题,天津工业生物所张以恒团队首次提出了无糖损的多酶法“秸秆制淀粉”技术方案,通过 100%能效留存的糖苷键定向重排将纤维素转化为淀粉^[100]。以稀酸预处理的玉米秸秆为原料,体外多酶分子机器和酿酒酵母联产人造淀粉和单细胞蛋白,实现农林废弃物的高效利用有望成为另一个秸秆生物转化方案。为了进一步提高生物炼制工厂的经济可行性,可以考虑通过设计创制人工酶——D-木酮糖 4-差向异构酶,能将 D-型糖转化为 L-型糖,将半纤维素 D-木糖转化为高值健康糖——L-阿拉伯糖(图 8)。如果人造淀粉被用于高端应用,如手性药物色谱柱基质、抗性淀粉、长直链淀粉、药物缓释载体^[101]、高密度储氢载体^[102-103],生物炼制工厂将有着更高的经济可行性。

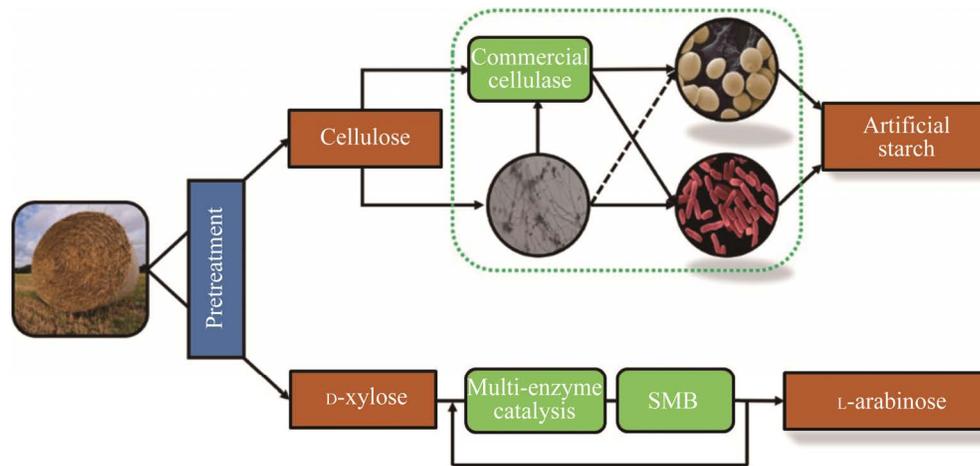


图 8 秸秆生物转化淀粉和阿拉伯糖

Figure 8 Bioconversion of starch and L-arabinose from straw.

总之，利用工程生物学理念，开展秸秆生物转化和可再生化工研究，包括纤维素降解与转化途径的关键酶、代谢途径的设计、构建和优化，有望显著提升工程菌种原料到产品的原子经济性和生产强度等，促进秸秆纤维素到材料化学品、能源化学品以及淀粉等的高效转化，为减少化石资源消耗，助力碳减排提供源头科技支撑。

REFERENCES

- [1] Rubin EM. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*, 2008, 454(7206): 841-845.
- [2] Makela MR, Donofrio N, De Vries RP. Plant biomass degradation by fungi. *Fungal Genet Biol*, 2014, 72: 2-9.
- [3] Huberman LB, Liu J, Qin LN, et al. Regulation of the lignocellulolytic response in filamentous fungi. *Fungal Biol Rev*, 2016, 30(3): 101-111.
- [4] Meng J, Makela MR, De Vries RP. Molecular engineering to improve lignocellulosic biomass based applications using filamentous fungi. *Adv Appl Microbiol*, 2021, 114: 73-109.
- [5] Znameroski E A, Glass N L. Using a model filamentous fungus to unravel mechanisms of lignocellulose deconstruction. *Biotechnol Biofuels*, 2013, 6(1): 6. DOI: 10.1186/1754-6834-6-6.
- [6] Reese ET, Siu R GH, Levinson HS. The biological degradation of the soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. *J Bacteriol*, 1950, 59: 485-497.
- [7] Wood TM. Properties of cellulolytic enzyme systems. *Biochem Soc Trans*, 1985, 13(2): 407-410.
- [8] Himmel ME, Ding SY, Johnson DK, et al. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*, 2007, 315(5813): 804-807.
- [9] Harris PV, Welner D, Mcfarland KC, et al. Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: structure and function of a large, enigmatic family. *Biochem*, 2010, 49(15): 3305-3316.
- [10] Morgenstern I, Powlowski J, Tsang A. Fungal cellulose degradation by oxidative enzymes: from dysfunctional GH61 family to powerful lytic polysaccharide monooxygenase family. *Brief in Funct Genomics*, 2014, 13(6): 471-481.
- [11] Coradetti ST, Craig JP, Xiong Y, et al. Conserved and essential transcription factors for cellulase gene expression in ascomycete fungi. *PNAS*, 2012, 109(19): 7397-7402.
- [12] Coradetti ST, Xiong Y, Glass NL. Analysis of a conserved cellulase transcriptional regulator reveals inducer-independent production of cellulolytic enzymes in *Neurospora crassa*. *Microbiologyopen*, 2013, 2(4): 595-609.
- [13] Wu VW, Thieme N, Huberman LB, et al. The regulatory and transcriptional landscape associated with carbon utilization in a filamentous fungus. *PNAS*,

- 2020, 117(11): 6003-6013.
- [14] Wang M, Dong Y, Zhao Q, et al. Identification of the role of a MAP kinase Tmk2 in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *Sci Rep*, 2014, 4: 6732.
- [15] Wang MY, Zhao QS, Yang JH, et al. A mitogen-activated protein kinase Tmk3 participates in high osmolarity resistance, cell wall integrity maintenance and cellulase production regulation in *Trichoderma reesei*. *PLoS One*, 2013, 8(8): e72189.
- [16] Schuster A, Tisch D, Seidl-Seiboth V, et al. Roles of protein kinase A and adenylate cyclase in light-modulated cellulase regulation in *Trichoderma reesei*. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78(7): 2168-2178.
- [17] Lv X, Zhang W, Chen G, et al. *Trichoderma reesei* Sch9 and Yak1 regulate vegetative growth, conidiation, and stress response and induced cellulase production. *J Microbiol*, 2015, 53(4): 236-242.
- [18] Tian CG, Beeson WT, Iavarone AT, et al. Systems analysis of plant cell wall degradation by the model filamentous fungus *Neurospora crassa*. *PNAS*, 2009, 106(52): 22157-22162.
- [19] Wang B, Cai PG, Sun WL, et al. A transcriptomic analysis of *Neurospora crassa* using five major crop residues and the novel role of the sporulation regulator rca-1 in lignocellulase production. *Biotechnol Biofuels*, 2015, 8: 21. DOI: 10.1186/s13068-015-0208-0.
- [20] Fan FY, Ma GL, Li JG, et al. Genome-wide analysis of the endoplasmic reticulum stress response during lignocellulase production in *Neurospora crassa*. *Biotechnol Biofuels*, 2015, 8: 66. DOI: 10.1186/s13068-015-0248-5.
- [21] Pei X, Fan F, Lin L, et al. Involvement of the adaptor protein 3 complex in lignocellulase secretion in *Neurospora crassa* revealed by comparative genomic screening. *Biotechnol Biofuels*, 2015, 8: 124. DOI: 10.1186/s13068-015-0302-3.
- [22] 李慧燕, 林良才, 肖冬光, 等. 粗糙脉孢菌 C₂H₂ 转录因子家族基因敲除突变体产纤维素酶筛选分析. *菌物学报*, 2016, 35(2): 161-169.
Li HY, Lin LC, Xiao DG, et al. Genome-wide screening of C₂H₂ family transcription factor gene knock-out mutants for high expression of cellulase in *Neurospora crassa*. *Mycosystema*, 2016, 35(2): 161-169 (in Chinese).
- [23] 王珊珊, 林良才, 贾士儒, 等. 粗糙脉孢菌丝氨酸/苏氨酸激酶家族基因敲除库纤维素酶表达分泌研究. *微生物学通报*, 2017, 44(06): 1303-1311.
Wang SS, Lin LC, Jia SR, et al. Cellulase expression analysis of serine/threonine kinase gene deletion mutants of *Neurospora crassa*. *Microbiol China*, 2017, 44(6): 1303-1311 (in Chinese).
- [24] 田朝光, 林良才, 李金根. 一种强化丝状真菌蛋白质生产的方法: CN201510225828.1, China. 2020-06-26.
- [25] 田朝光, 马国力, 樊飞宇. 一种改善丝状真菌蛋白分泌能力的方法: CN201510225762.6, China. 2020-06-26.
- [26] Liu Q, Li J, Gao R, et al. CLR-4, a novel conserved transcription factor for cellulase gene expression in ascomycete fungi. *Mol Microbiol*, 2019, 111(2): 373-394.
- [27] Lin L, Wang S, Li X, et al. STK-12 acts as a transcriptional brake to control the expression of cellulase-encoding genes in *Neurospora crassa*. *PLoS Genet*, 2019, 15(11): e1008510.
- [28] Lin L C, Chen Y, Li J G, et al. Disruption of non-anchored cell wall protein NCW-1 promotes cellulase production by increasing cellobiose uptake in *Neurospora crassa*. *Biotechnol Lett*, 2017, 39(4): 545-551.
- [29] Lin L, Sun Z, Li J, et al. Disruption of gul-1 decreased the culture viscosity and improved protein secretion in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Microb Cell Fact*, 2018, 17(1): 96.
- [30] Zhao Q, Liu Q, Wang Q, et al. Disruption of the *Trichoderma reesei* gull gene stimulates hyphal branching and reduces broth viscosity in cellulase production. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2021, 48(1-2).
- [31] Garcia Sanchez R, Karhumaa K, Fonseca C, et al. Improved xylose and arabinose utilization by an industrial recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain using evolutionary engineering. *Biotechnol Biofuels*, 2010, 3: 13. DOI: 10.1186/1754-6834-3-13.
- [32] Kahar P, Taku K, Tanaka S. Enhancement of xylose uptake in 2-deoxyglucose tolerant mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng*, 2011, 111(5): 557-563.
- [33] Leandro MJ, Goncalves P, Spencer-Martins I. Two glucose/xylose transporter genes from the yeast *Candida intermedia*: first molecular characterization of a yeast xylose-H⁺ symporter. *Biochem J*, 2006, 395(3): 543-549.
- [34] Young EM, Comer AD, Huang H, et al. A molecular transporter engineering approach to improving xylose catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng*, 2012, 14(4): 401-411.
- [35] Wang C, Bao X, Li Y, et al. Cloning and characterization of heterologous transporters in

- Saccharomyces cerevisiae* and identification of important amino acids for xylose utilization. *Metab Eng*, 2015, 30: 79-88.
- [36] Young EM, Tong A, Bui H, et al. Rewiring yeast sugar transporter preference through modifying a conserved protein motif. *PNAS*, 2014, 111(1): 131-136.
- [37] Farwick A, Bruder S, Schadeweg V, et al. Engineering of yeast hexose transporters to transport D-xylose without inhibition by D-glucose. *PNAS*, 2014, 111(14): 5159-5164.
- [38] Ha SJ, Galazka JM, Kim SR, et al. Engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of simultaneous cellobiose and xylose fermentation. *PNAS*, 2011, 108(2): 504-509.
- [39] Galazka JM, Tian C, Beeson WT, et al. Cellodextrin transport in yeast for improved biofuel production. *Science*, 2010, 330(6000): 84-86.
- [40] Jing D, Li S, Zhao H. Discovery and characterization of novel D-xylose-specific transporters from *Neurospora crassa* and *Pichia stipitis*. *Mol Biosyst*, 2010, 6(11): 2150-2156.
- [41] Li J, Lin L, Li H, et al. Transcriptional comparison of the filamentous fungus *Neurospora crassa* growing on three major monosaccharides D-glucose, D-xylose and L-arabinose. *Biotechnol Biofuels*, 2014, 7(1): 31. DOI: 10.1186/1754-6834-7-31.
- [42] Benz J P, Chau B H, Zheng D, et al. A comparative systems analysis of polysaccharide-elicited responses in *Neurospora crassa* reveals carbon source-specific cellular adaptations. *Mol Microbiol*, 2014, 91(2): 275-299.
- [43] Havukainen S, Valkonen M, Koivuranta K, et al. Studies on sugar transporter CRT1 reveal new characteristics that are critical for cellulase induction in *Trichoderma reesei*. *Biotechnol Biofuels*, 2020, 13(158).
- [44] Huang Z, Chen X, Qin L, et al. A novel major facilitator transporter TrSTR1 is essential for pentose utilization and involved in xylanase induction in *Trichoderma reesei*. *Biochem Bioph Res Co*, 2015, 460(3): 663-669.
- [45] Jie L, Liu G, Mei C, et al. Cellodextrin transporters play important roles in cellulase induction in the cellulolytic fungus *Penicillium oxalicum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(24): 10479-10488.
- [46] Laothanachareon T, Bruinsma L, Nijssse B, et al. Global transcriptional response of *Aspergillus niger* to blocked active citrate export through deletion of the exporter gene. *J Fungi (Basel)*, 2021, 7(6): 409.
- [47] Delgado-Jarana J, Moreno-Mateos M A, Benitez T. Glucose uptake in *Trichoderma harzianum*: role of *gtt1*. *Eukaryot Cell*, 2003, 2(4): 708-717.
- [48] Benz JP, Protzko RJ, Andrich JMS, et al. Correction to: identification and characterization of a galacturonic acid transporter from *Neurospora crassa* and its application for *Saccharomyces cerevisiae* fermentation processes. *Biotechnol Biofuels*, 2017, 10: 287. DOI: 10.1186/s13068-017-0955-1.
- [49] Li X, Chomvong K, Yu VY, et al. Cellobionic acid utilization: from *Neurospora crassa* to *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels*, 2015, 8: 120. DOI: 10.1186/s13068-015-0303-2.
- [50] Wang B, Li J, Gao J, et al. Identification and characterization of the glucose dual-affinity transport system in *Neurospora crassa*: pleiotropic roles in nutrient transport, signaling, and carbon catabolite repression. *Biotechnol Biofuels*, 2017, 10: 17. DOI: 10.1186/s13068-017-0705-4.
- [51] Li J, Liu Q, Li J, et al. RCO-3 and COL-26 form an external-to-internal module that regulates the dual-affinity glucose transport system in *Neurospora Crassa*. *Biotechnol Biofuels*, 2021, 14(1): 33. DOI: 10.1186/s13068-021-01877-2.
- [52] Cai P, Gu R, Wang B, et al. Evidence of a critical role for cellodextrin transport 2 (CDT-2) in both cellulose and hemicellulose degradation and utilization in *Neurospora crassa*. *PLoS One*, 2014, 9(2): e89330.
- [53] Cai P, Wang B, Ji J, et al. The putative cellodextrin transporter-like protein CLP1 is involved in cellulase induction in *Neurospora crassa*. *J Biol Chem*, 2015, 290(2): 788-796.
- [54] Li J, Xu J, Cai P, et al. The functional analysis of two L-arabinose transporters from filamentous fungi reveals promising characteristics for improved pentose utilization in yeast. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81(12): 4062-4070.
- [55] 高婧芳, 王邦, 韩晓云, 等. 全基因组水平扫描鉴定粗糙脉孢菌糖转运蛋白及其在酿酒酵母已糖发酵中的评价. *生物工程学报*, 2017, 33(1): 79-89. Gao JF, Wang B, Han XY, et al. Genome-wide screening of predicted sugar transporters in *Neurospora crassa* and the application in hexose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Chin J Biotech*, 2017, 33(1): 79-89 (in Chinese).
- [56] Klaubauf S, Narang HM, Post H, et al. Similar is not the same: differences in the function of the (hemi-) cellulolytic regulator XlnR (Xlr1/Xyr1) in filamentous

- fungi. *Fungal Genet Biol*, 2014, 72: 73-81.
- [57] Wang H, Sun T, Zhao Z, et al. Transcriptional profiling of *Myceliophthora thermophila* on galactose and metabolic engineering for improved galactose utilization. *Front Microbiol*, 2021, 12: 664011. DOI: 10.3389/fmicb.2021.664011.
- [58] Li J, Gu S, Zhao Z, et al. Dissecting cellobiose metabolic pathway and its application in biorefinery through consolidated bioprocessing in *Myceliophthora thermophila*. *Fungal Biol Biotechnol*, 2019, 6: 21. DOI: 10.1186/s40694-019-0083-8.
- [59] Liu Y, Tang Y, Gao H, et al. Challenges and future perspectives of promising biotechnologies for lignocellulosic biorefinery. *Molecules*, 2021, 26(17): 5411.
- [60] Lawford HG, Rousseau JD. Performance testing of *Zymomonas mobilis* metabolically engineered for cofermentation of glucose, xylose, and arabinose. *Appl Biochem Biotechnol*, 2002, 98-100: 429-448.
- [61] Ingram LO, Aldrich HC, Borges ACC, et al. Enteric bacterial catalysts for fuel ethanol production. *Biotechnol Prog*, 1999, 15(5): 855-866.
- [62] Wood BE, Yomano LP, York SW, et al. Development of industrial-medium-required elimination of the 2,3-butanediol fermentation pathway to maintain ethanol yield in an ethanologenic strain of *Klebsiella oxytoca*. *Biotechnol Prog*, 2005, 21(5): 1366-1372.
- [63] Van Zyl WH, Lynd LR, Den Haan R, et al. Consolidated bioprocessing for bioethanol production using *Saccharomyces cerevisiae*. *Biofuels*, 2007, 108: 205-235.
- [64] Roche CM, Glass NL, Blanch HW, et al. Engineering the filamentous fungus *Neurospora crassa* for lipid production from lignocellulosic biomass. *Biotechnol Bioeng*, 2014, 111(6): 1097-1107.
- [65] Chung D, Cha M, Guss AM, et al. Direct conversion of plant biomass to ethanol by engineered *Caldicellulosiruptor bescii*. *PNAS*, 2014, 111(24): 8931-8936.
- [66] Argyros DA, Tripathi SA, Barrett TF, et al. High ethanol titers from cellulose by using metabolically engineered thermophilic, anaerobic microbes. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(23): 8288-8294.
- [67] Gusakov AV. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. *Trends Biotechnol*, 2011, 29(9): 419-425.
- [68] Berka RM, Grigoriev IV, Otilar R, et al. Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi *Myceliophthora thermophila* and *Thielavia terrestris*. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(10): 922-927.
- [69] Liu Q, Gao R, Li J, et al. Development of a genome-editing CRISPR/Cas9 system in thermophilic fungal *Myceliophthora* species and its application to hyper-cellulase production strain engineering. *Biotechnol Biofuels*, 2017, 10: 1. DOI: 10.1186/s13068-016-0693-9.
- [70] Xu J, Li J, Lin L, et al. Development of genetic tools for *Myceliophthora thermophila*. *BMC Biotechnology*, 2015, 15: 35. DOI: 10.1186/s12896-015-0165-5.
- [71] Liu D, Xu Z, Li J, et al. Reconstruction and analysis of genome-scale metabolic model for thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila*. *Biotechnol Bioeng*, 2022, 119(7): 1926-1937.
- [72] Li J, Lin L, Sun T, et al. Direct production of commodity chemicals from lignocellulose using *Myceliophthora thermophila*. *Metab Eng*, 2019, 61 (2020): 416-426.
- [73] Gu S, Li J, Chen B, et al. Metabolic engineering of the thermophilic filamentous fungus *Myceliophthora thermophila* to produce fumaric acid. *Biotechnol Biofuels*, 2018, 11: 323. DOI: 10.1186/s13068-018-1319-1.
- [74] Gu S, Zhao Z, Yao Y, et al. Designing and constructing a novel artificial pathway for malonic acid production biologically. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, 9: 820507.
- [75] Li J, Zhang Y, Li J, et al. Metabolic engineering of the cellulolytic thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila* to produce ethanol from cellobiose. *Biotechnol Biofuels*, 2020, 13: 23. DOI: 10.1186/s13068-020-1661-y.
- [76] Jantama K, Zhang X, Moore JC, et al. Eliminating side products and increasing succinate yields in engineered strains of *Escherichia coli* C. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 101(5): 881-893.
- [77] Zhu X, Tan Z, Xu H, et al. Metabolic evolution of two reducing equivalent-conserving pathways for high-yield succinate production in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2014, 24: 87-96.
- [78] Meng Y, Zhang X, Yu B, et al. Efficient production of L-lactic acid with high optical purity by alkaliphilic *Bacillus* sp. WL-S20. *Bioresour Technol*, 2012, 116: 334-339.
- [79] Zhang X Z, Sathitsuksanoh N, Zhu Z G, et al. One-step production of lactate from cellulose as the sole carbon source without any other organic nutrient by recombinant cellulolytic *Bacillus subtilis*. *Metab Eng*, 2011, 13(4): 364-372.
- [80] 张学礼, 刘萍萍, 唐金磊. 生产 L-乳酸的重组大肠杆菌及其应用: CN202011006212. 中国. 2021-11-16. Zhang XL, Liu PP, Tang JL. Recombinant escherichia coli for producing L-lactic acid and application. CN202011006212. China. 2021-11-16.
- [81] Ma Y, Zhang X, Xu H, et al. Recombinant *Escherichia coli* for producing D-lactate and use thereof: U.S.A. 2018-04-17.
- [82] Brown S H, Bashkirova L, Berka R, et al. Metabolic

- engineering of *Aspergillus oryzae* NRRL 3488 for increased production of L-malic acid. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(20): 8903-8912.
- [83] Chen X, Wang Y, Dong X, et al. Engineering rTCA pathway and C4-dicarboxylate transporter for L-malic acid production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, 101(10): 4041-4052.
- [84] Xu Y, Shan L, Zhou Y, et al. Development of a Cre-loxP-based genetic system in *Aspergillus niger* ATCC1015 and its application to construction of efficient organic acid-producing cell factories. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, 103(19): 8105-8114.
- [85] Li J, Chen B, Gu S, et al. Coordination of consolidated bioprocessing technology and carbon dioxide fixation to produce malic acid directly from plant biomass in *Myceliophthora thermophila*. *Biotechnol Biofuels*, 2021, 14(1): 186. DOI: 10.1186/s13068-021-02042-5.
- [86] Tong Z Y, Zheng X M, Tong Y, et al. Systems metabolic engineering for citric acid production by *Aspergillus niger* in the post-genomic era. *Microb Cell Fact*, 2019, 18(1): 28. DOI: 10.1186/s12934-019-1064-6.
- [87] Zheng X, Zheng P, Sun J, et al. Heterologous and endogenous U6 snRNA promoters enabled CRISPR/Cas9 mediated genome editing in *Aspergillus niger*. *Fungal Biol Biotechnol*, 2018, 5: 2. DOI: 10.1186/s40694-018-0047-4.
- [88] Zheng X, Zheng P, Zhang K, et al. 5S rRNA promoter for guide RNA expression enabled highly efficient CRISPR/Cas9 genome editing in *Aspergillus niger*. *Acs Synthetic Biology*, 2019, 8(7): 1568-1574.
- [89] Zheng X, Yu J, Cairns T C, et al. Comprehensive improvement of sample preparation methodologies facilitates dynamic metabolomics of *Aspergillus niger*. *Biotechnol J*, 2019, 14(3): e1800315.
- [90] Zhang L H, Zheng X M, Cairns T C, et al. Disruption or reduced expression of the orotidine-5'-decarboxylase gene *pyrG* increases citric acid production: a new discovery during recyclable genome editing in *Aspergillus niger*. *Microb Cell Fact*, 2020, 19(1): 76. DOI: 10.1186/s12934-020-01334-z.
- [91] Lu YD, Zheng XM, Wang Y, et al. Evaluation of *Aspergillus niger* six constitutive strong promoters by fluorescent-auxotrophic selection coupled with flow cytometry: a case for citric acid production. *J Fungi (Basel)*, 2022, 8(6): 568.
- [92] Cairns TC, Feurstein C, Zheng XM, et al. A quantitative image analysis pipeline for the characterization of filamentous fungal morphologies as a tool to uncover targets for morphology engineering: a case study using *apID* in *Aspergillus niger*. *Biotechnol Biofuels*, 2019, 12: 149. DOI: 10.1186/s13068-019-1473-0.
- [93] Zheng XM, Cairns TC, Ni XM, et al. Comprehensively dissecting the hub regulation of PkaC on high-productivity and pellet macromorphology in citric acid producing *Aspergillus niger*. *Microbial Biotechnology*, 2022, 15(6): 1867-1882.
- [94] Cairns TC, Zheng XM, Feurstein C, et al. A Library of *Aspergillus niger* chassis strains for morphology engineering connects strain fitness and filamentous growth with submerged macromorphology. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, 9: 820088.
- [95] Bratosin BC, Darjan S, Vodnar DC. Single cell protein: a potential substitute in human and animal nutrition. *Sustainability*, 2021, 13:16.
- [96] Ciani M, Lippolis A, Fava F, et al. Microbes: food for the future. *Foods*, 2021, 10(5): 971.
- [97] 梁运祥, 胡宝娥, 陈宏声, 等. 利用生物技术, 加快秸秆“高值饲料化”转化, 促进草食畜牧业发展. *饲料工业*, 2022, 43(12): 1-9.
- [98] Liang YX, Hu BE, Chen HS, et al. Development of herbivore industry by speeding up feed conversion of crop straw with biotechnology. *Feed Ind*, 2022, 43(12): 1-9 (in Chinese).
- [99] 张晓庆, 王梓凡, 参木友, 等. 中国农作物秸秆产量及综合利用现状分析. *中国农业大学学报*, 2021, 26(9): 30-41.
- [100] Zhang XQ, Wang ZF, Can Muyou, et al. Analysis of yield and current comprehensive utilization of crop straws in China. *J China Agric Univ*, 2021, 26(9): 30-41 (in Chinese).
- [101] Yang F, Jin Z, Nawaz M, et al. Oligosaccharides in straw hydrolysate could improve the production of single-cell protein with *Saccharomyces cerevisiae*. *J Sci Food Agr*, 2022, 102(7): 2928-2936.
- [102] You C, Chen H, Myung S, et al. Enzymatic transformation of nonfood biomass to starch. *PNAS*, 2013, 110(18): 7182-7187.
- [103] 张以恒. 忆王义翘教授对生物炼制的贡献和我对此领域未来发展的观点. *合成生物学*, 2021, 2(4): 497-508.
- [104] Zhang YH. Remembering professor Daniel I.C. Wang's contribution to biorefining and my perspective on the progress. *Synth Biol J*, 2021, 2(4): 497-508 (in Chinese).
- [105] Zhang YH, Huang WD. Constructing the electricity-carbohydrate-hydrogen cycle for a sustainability revolution. *Trends Biotechnol*, 2012, 30(6): 301-306.
- [106] Zhang YH, Evans BR, Mielenz JR, et al. High-yield hydrogen production from starch and water by a synthetic enzymatic pathway. *PLoS One*, 2007, 2(5): e456.

(本文责编 郝丽芳)