

# 斜卧青霉转录调控因子 BglR 的缺失对 纤维素酶生产的影响

周广麒<sup>1</sup> 李晶晶<sup>1</sup> 李忠海<sup>2,3</sup> 吕晶<sup>1</sup> 王明钰<sup>2</sup> 曲音波<sup>2</sup> 方诩<sup>2\*</sup>

(1. 大连工业大学 生物工程学院 辽宁 大连 116034)

(2. 山东大学 微生物技术国家重点实验室 山东 济南 250100)

(3. 山东大学 药学院 山东 济南 250012)

**摘要:** 【目的】斜卧青霉(*Penicillium decumbens*)作为高效分泌纤维素酶的重要丝状真菌,其纤维素酶的合成与分泌在转录水平上被调控。进一步研究纤维素酶基因表达的转录调控,构建高效高产纤维素酶的工业菌株。【方法】根据斜卧青霉 114-2 在不同碳源生长条件下基因组表达谱的差异,发现新的转录调控因子 BglR (PDE-01706),该蛋白与产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*) Pc20g04780 的锌指结构蛋白具有 59% 同源性。通过基因同源双交换,得到 BglR 缺失突变株  $\Delta bglR-1$ ,对突变株  $\Delta bglR-1$  的表型、营养生长、产纤维素酶活、蛋白分泌能力及发酵液 pH 变化进行研究。【结果】转录调控因子 BglR 的缺失可导致突变株  $\Delta bglR-1$  的  $\beta$ -葡萄糖苷酶活力提高 40%,并造成其滤纸酶活、内切葡聚糖酶及木聚糖酶活明显降低。【结论】结果表明转录调控因子 BglR 对于斜卧青霉纤维素酶的调控有重要作用。

**关键词:** 斜卧青霉, BglR, 转录调控因子, 纤维素酶,  $\beta$ -葡萄糖苷酶

\*通讯作者: Tel: 86-531-88364363; 信箱: fangxu@sdu.edu.cn

收稿日期: 2012-01-04; 接受日期: 2012-04-01

# Effects of a novel transcription factor BglR from *Penicillium decumbens* on cellulase production

ZHOU Guang-Qi<sup>1</sup> LI Jing-Jing<sup>1</sup> LI Zhong-Hai<sup>2,3</sup> LÜ Jing<sup>1</sup>  
WANG Ming-Yu<sup>2</sup> QU Yin-Bo<sup>2</sup> FANG Xu<sup>2\*</sup>

(1. School of Bioengineering, Dalian Polytechnic University, Dalian, Liaoning 116034, China)

(2. The State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan, Shandong 250100, China)

(3. School of Pharmaceutical Science, Shandong University, Jinan, Shandong 250012, China)

**Abstract: [Objective]** *Penicillium decumbens* is an important filamentous fungus that efficiently secretes cellulases. The biosynthesis and secretion of these cellulases are regulated on transcription levels. In order to further study the mechanism of transcriptional regulation of cellulases encoding genes and construct industrial strains with high cellulases production, **[Methods]** We identified a transcription regulator BglR (PDE-01706) from *P. decumbens* 114-2 by comparing gene expression profiles under different carbon sources condition. This transcription regulator shares a 59% sequence identity with the zinc finger protein Pc20g04780 from *Penicillium chrysogenum*. *P. decumbens*  $\Delta bglR-1$  knockout strain was constructed with homologous double crossover recombination. The phenotype of this strain was investigated, including its hyphal growth, protein secretion level, cellulase secretion level and extracellular pH level. **[Results]** It was shown that the deletion of the transcription factor BglR in *P. decumbens*  $\Delta bglR-1$  leads to an increase of extracellular  $\beta$ -glucosidase activity by 40%, and a lowered filter paper activity, endoglucanases and xylanase level. **[Conclusion]** From these results it is proposed that BglR plays a major role in the regulation of cellulase production of *P. decumbens*.

**Keywords:** *Penicillium decumbens*, BglR, Transcription regulation factor, Cellulase,  $\beta$ -Glucosidase

纤维素是世界上最具潜力的可再生资源。丝状真菌能产生多种纤维素酶和半纤维素酶,用于降解纤维素成为可发酵的糖类。斜卧青霉(*Penicillium decumbens*)作为重要的高产纤维素酶丝状真菌之一,可进行多种同源或异源蛋白的表达,并经过多轮物理和化学诱变获得了抗阻遏突变菌株 JU-A10 (源于斜卧青霉野生菌株 114-2)<sup>[1-2]</sup>。目前,为进一步提高菌种产纤维素酶的能力,有必要对纤维素酶基因表达的转录调控深入研究,进而更为有效地进行高产纤维素酶菌

株的分子改造。

转录调控因子在丝状真菌纤维素酶基因的表达调控过程中起到非常关键的作用<sup>[3-4]</sup>。黑曲霉(*Aspergillus niger*)中 *xlnR* 编码一种 Zn(II)<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> 双核 DNA 簇结合蛋白,该蛋白主要促进纤维素酶和木聚糖酶基因的表达<sup>[5]</sup>。在瑞氏木霉(*Trichoderma reesei*)中,ACEI<sup>[6]</sup>的缺失可增加主要纤维素酶和木聚糖酶的表达量,从而导致 ACEI 突变株在以纤维素为碳源的培养基上相比出发菌株生长更快。ACEII<sup>[7]</sup>在体外与 *cbh1* 启动子区

结合, 正向调控 *cbh1*、*cbh2*、*egl1* 及 *egl2* 基因的表达。在粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)中, 锌指结构蛋白 CRE-1 作为全局转录因子, 直接或间接地影响纤维素酶基因的抑制和激活作用<sup>[8]</sup>。在葡萄糖存在条件下, CRE-1 可介导碳源代谢物阻遏效应从而抑制纤维素降解相关基因的表达, 而在纤维素诱导条件下, CRE-1 通过与结合在纤维素酶基因启动子区的正调控因子竞争, 阻遏纤维素酶和半纤维素酶基因的表达<sup>[8]</sup>。目前, 斜卧青霉转录调控因子 CreA、ACEI 和 XlnR 的功能已进行了初步的研究, CreA 和 ACEI 影响了纤维素酶和木聚糖酶的表达量; XlnR 对于纤维素酶及半纤维素酶的高效表达起明显的正向调控作用<sup>[9]</sup>。随着斜卧青霉基因组测序的完成和生物信息学的深入分析, 从基因组数据库中挖掘新的纤维素酶转录调控因子, 对解析纤维酶基因的转录调控以及构建高效的产纤维素酶工业菌株具有重要意义。

目前, 关于斜卧青霉转录调控因子的报道较少, 对于斜卧青霉中纤维素酶表达调控的具体机制需深入研究, 根据斜卧青霉 114-2 在不同碳源生长条件下基因组表达谱的差异, 发现了一新的转录调控因子 BglR (PDE-01706), 并对该转录调控因子缺失突变株  $\Delta bglR-1$  的表型、营养生长、产纤维素酶活力、蛋白分泌能力及发酵液的 pH 值进行初步研究, 验证了转录调控因子 BglR 的功能。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:** 斜卧青霉 Ku-39 ( $\Delta ku70::hph$ )及质粒 PME2892 由山东大学微生物技术国家重点实验室保藏。

**1.1.2 培养基:** 麸皮培养基: 麸皮 100 g, 琼脂粉 20 g, 水 1 000 mL, 自然 pH,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 30 min。

原生质体转化培养基<sup>[10]</sup>。突变株表型分析培养基: Mandel's 营养盐液<sup>[11]</sup>100 mL, 分别添加不同碳源(葡萄糖 20 g、微晶纤维素 10 g、可溶性淀粉 20 g、微晶纤维素和葡萄糖各 10 g), 其中在含有微晶纤维素或可溶性淀粉为碳源的培养基中添加 1 mL 的 Triton-100, 琼脂粉 15 g, 去离子水 1 000 mL, pH 5.5,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 30 min。酶活力测定培养基: Mandel's 营养盐液 100 mL, 麸皮 20 g, 纤维素 5 g, 脱木素木糖渣 10 g, 去离子水 1 000 mL, pH 5.5,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 30 min。基本培养基: Mandel's 营养盐液 100 mL, 葡萄糖 20 g, 蛋白胨 2 g, 去离子水 1 000 mL, pH 5.5,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 30 min。

**1.1.3 主要试剂:** *Taq* 酶、*FastPfu* DNA 聚合酶, TransGen Biotech; 限制性内切酶 *EcoR* I, Fermentas; 琼脂糖凝胶/PCR 产物纯化试剂盒, Biomiga; 细胞壁裂解酶, Sigma L1412-25G; 改良型 Bradford 法蛋白质浓度测定试剂盒, Sangon Biotech; Southern 杂交试剂盒, Roche Diagnostics. Corp.。

### 1.2 方法

**1.2.1  $\Delta bglR::ptrA$  敲除盒的构建:** 根据斜卧青霉 *bglR* 序列设计引物(表 1)。

$\Delta bglR::ptrA$  敲除盒上、下游同源臂的扩增分别以引物对 6-F1 和 6-*ptrAR*, 6-*ptrAF* 和 6-R1 为引物, 以斜卧青霉 Ku-39 染色体 DNA 为模板。*PtrA* (Pyrimidine 抗性筛选标记基因)表达盒以质粒 PME2892 为模板, *PtrAF1* 和 *PtrAR1* 为引物扩增。通过 Double-joint PCR 方法<sup>[12]</sup>, 以 6-F2 和 6-R2 为嵌套引物扩增  $\Delta bglR::ptrA$  敲除盒(扩增条件见表 2), 该敲除盒经琼脂糖凝胶纯化回收后直接用于斜卧青霉 Ku-39 原生质体转化。

**1.2.2 原生质体制备以及转化方法:** 参见文献[10]。

**1.2.3 Southern blotting:** 参考 Southern 杂交试剂盒说明。扩增  $\Delta bglR::ptrA$  敲除盒上游侧翼序列制备探针; 斜卧青霉 Ku-39 和转化子  $\Delta bglR-1$  染

表 1 *ΔbgIR::ptrA* 敲除盒构建所用引物序列  
Table 1 Primers used in the process of double-joint PCR

引物名称 Primer	序列 Sequence (5'→3')
6-F1	ACAACGGAAGCGACAGTCAA
6-F2	AGGAGGCGAGGAGTTACGAG
6-PtraR	AATGGGATCCCGTAATCAATTGCCCGAGACGCTGGTGCGAATCCT
6-PtraF	CAAGAGCGGCTCATCGTACCCCATGGCTTTGCTGTTCTTTGTGC
6-R2	GGTCGCGGCTGAGCATGTAG
6-R1	CGGCAATGGATGGCTGGTAC
PtraF1	GGGCAATTGATTACGGGATC
PtraR1	ATGGGGTGACGATGAGCCGC

表 2 Double-joint PCR 扩增条件  
Table 2 Cycling conditions used for double-joint PCR

反应 Reaction	循环数 Cycle number	温度和时间 Temperature and time
第一轮 PCR The first round PCR	32	94 °C 2 min; 94 °C 20 s; 58 °C 30 s; 72 °C 1 min 30 s; 72 °C 10 min
第二轮 PCR The second round PCR	12	94 °C 2 min; 94 °C 30 s; 58 °C 10 min; 72 °C 3 min 30 s; 72 °C 10 min
第三轮 PCR The third round PCR	32	94 °C 2 min; 94 °C 20 s; 58 °C 30 s; 72 °C 3 min; 72 °C 10 min

染色体 DNA 采用 *EcoR* I 酶切, 酶切产物醇沉浓缩后经琼脂糖凝胶电泳分离; DNA 片段转膜方法: 毛细管虹吸印迹法<sup>[13]</sup>。

**1.2.4 酶活力测定<sup>[14-15]</sup>:** 测定酶活力及所需底物(表 3)。酶活力单位定义: 1 个酶活力单位(IU)为每分钟水解底物产生 1 μmol 还原糖或对硝基苯酚所需的酶量。

**1.2.5 发酵液蛋白质含量测定:** 参考改良型 Bradford 法蛋白质浓度测定试剂盒说明。

**1.2.6 生物量测定:** 分别吸取 100 μL 浓度为  $1 \times 10^6$  个/mL 的菌株 Ku-39 和 *ΔbgIR-1* 突变株新鲜孢子悬液至 50 mL 基本培养基中, 30 °C、200 r/min 培养。当培养至 24、33、42、51、60、69 h 时分别取样, 每个菌株的取样时间点均设 3 个平行培养样品。将菌悬液真空过滤抽干, 80 °C 烘干 24 h, 称重。

表 3 测定酶活力及所用底物  
Table 3 Enzyme activity and substrate

酶活力 Enzyme activity	底物 Substrate
滤纸酶活力 Filter paper activity	定量滤纸, Whatman
β-葡萄糖苷酶活力 β-Glucosidase activity	水杨苷, Sigma
木聚糖酶活力 Xylanase activity	桦木木聚糖, Sigma
内切葡聚酶活力 Endoglucanase activity	羧甲基纤维素钠
外切葡聚糖酶活力 Exoglucanase activity	对硝基苯纤维二糖苷, Sigma

**1.2.7 pH 值测定:** 当突变株 *ΔbgIR-1* 和出发菌株 Ku-39 产酶培养至 24、48、72、96、120、144、168 h 时, 分别吸取上述 2 种发酵液 1.5 mL 至离心管中, 8 000 r/min 离心 1 min 后, 吸取上清液至另一离心管中, 用微量电极(Thermo-Electron,

Orion 8103BNUWP)测定 pH。

**1.2.8 表型分析:** 将突变株  $\Delta bglR-1$  以及出发菌株 Ku-39 的新鲜分生孢子悬液稀释至  $1 \times 10^6$  个/mL, 吸取 1  $\mu$ L 稀释后的菌悬液分别点接于以葡萄糖、微晶纤维素、可溶性淀粉及微晶纤维素和葡萄糖为碳源的平板, 30  $^{\circ}$ C 培养 9 d。含可溶性淀粉培养基上的菌株经碘化钾溶液染色。

**1.2.9 核苷酸序列号:** 将斜卧青霉野生菌株 114-2 的 *bglR* 基因序列提交至 GenBank 数据库, 获得登录号 JN977581。

## 2 结果与分析

### 2.1 *bglR* 基因序列分析

根据斜卧青霉 114-2 在不同碳源条件下表达谱的差异, 发现了一新的转录调控因子编码基因 *bglR*, 将该基因序列提交至 GenBank 数据库分析。*bglR* 基因携带有 784 bp 编码区, 包含一个内含子, 位于 +408 - +538 位点之间。将 BglR 蛋白序列进行结构域分析, 表明 BglR 包含一个锌指 Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> 型结构域(aa 142-164), 该结构域参与 DNA 结合。将 BglR 蛋白序列与产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum*) Pc20g04780 进行序列比对, 存在 59% 的同源性。

### 2.2 $\Delta bglR::ptrA$ 敲除盒的构建

如图 1 所示, 分别用引物对 6-F1 和 6-*ptrA*R、6-*ptrA*F 和 6-R1 为引物, Ku-39 染色体 DNA 为模板扩增得到  $\Delta bglR::ptrA$  敲除盒上、下游侧翼序列 (泳道 1、3), *PtrA*F1 和 *PtrA*R1 为引物, 质粒 PME2892 为模板扩增得到 *PtrA* 表达盒序列 (泳道 2)。以  $\Delta bglR::ptrA$  敲除盒上、下游侧翼序列及 *PtrA* 表达盒序列为模板, 6-F2 和 6-R2 为第三轮嵌套引物, 采用 Double-joint PCR 方法扩增得到  $\Delta bglR::ptrA$  敲除盒 (泳道 4), 该敲除盒大小为 5.738 kb。 $\Delta bglR::ptrA$  敲除盒经 *EcoR* I 酶切后产生 2.0 kb 和 3.8 kb 大小片段 (泳道 5), 说明  $\Delta bglR::ptrA$  敲除盒构建成功。

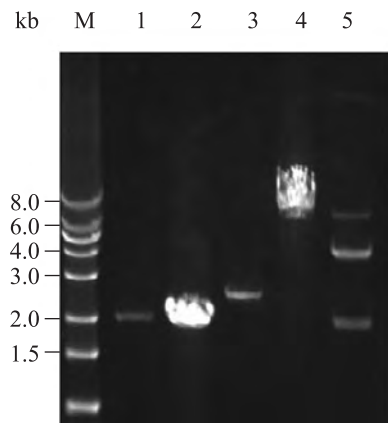


图 1  $\Delta bglR::ptrA$  敲除盒构建 PCR 片段电泳图

Fig. 1 PCR products analysis of  $\Delta bglR::ptrA$  deletion cassette by agarose gel electrophoresis

注: M: Marker; 1: *bglR* 上游侧翼序列; 2: *ptrA* 筛选标记; 3: *bglR* 下游侧翼序列; 4:  $\Delta bglR::ptrA$  敲除盒; 5: *EcoR* I 酶切  $\Delta bglR::ptrA$  敲除盒。

Note: M: Marker; 1: Up-stream sequence of *bglR* gene; 2: Expression cassette of *ptrA*; 3: Down-stream sequence of *bglR* gene; 4:  $\Delta bglR::ptrA$  deletion cassette; 5:  $\Delta bglR::ptrA$  deletion cassette digested with *EcoR* I.

### 2.3 Southern blotting 验证

如图 2A 所示, 转化子  $\Delta bglR-1$  在 2.371 kb 位置出现目的杂交条带 (泳道 2), 菌株 Ku-39 在相应位置未出现杂交条带, 而在 7.008 kb 处出现目的杂交条带 (泳道 1), 说明敲除盒以同源双交换的方式整合到了斜卧青霉 Ku-39 染色体 *bglR* 基因位点 (参见图 2B), *bglR* 基因敲除成功, 且在染色体其他位点无随机插入 (异源整合) 现象发生。

### 2.4 斜卧青霉 $\Delta bglR-1$ 突变株的表型分析

出发菌株 Ku-39 和突变株  $\Delta bglR-1$  在以葡萄糖、纤维素和可溶性淀粉为碳源的培养基上的生长表型及透明圈与相比无明显变化, 而在葡萄糖和纤维素复合碳源平板上,  $\Delta bglR-1$  突变株产生的透明圈比出发菌株 Ku-39 更明显 (图 3)。

### 2.5 酶活和蛋白含量的变化

如图 4 所示, BglR 的缺失可导致突变株  $\Delta bglR-1$  的滤纸酶活力、内切葡聚糖酶活力及木聚糖酶活力降低 (图 4A、4C、4D), 而  $\beta$ -葡萄糖苷酶

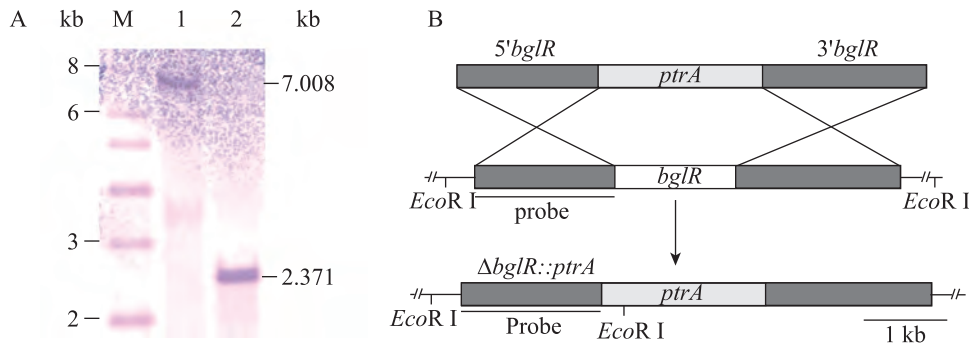


图2 Southern blotting 杂交分析  $\Delta bglR-1$  转化子(A)及  $\Delta bglR::ptrA$  敲除盒与  $bglR$  位点同源双交换示意图(B)

Fig. 2 Southern blotting analysis of the  $bglR$  gene of *P. decumbens* Ku-39 disruptants  $\Delta bglR-1$  (A) and schematic model of the approach used to disrupt the  $bglR$  gene using the  $ptrA$  marker gene (B)

注: A: M: Marker; 1: *EcoR* I 酶切斜卧青霉 Ku-39 基因组 DNA; 2: *EcoR* I 酶切  $\Delta bglR-1$  突变株基因组 DNA.

Note: A: M: Marker; 1: *P. decumbens* Ku-39 genomic DNA digested with *EcoR* I; 2:  $\Delta bglR-1$  genomic DNA digested with *EcoR* I.

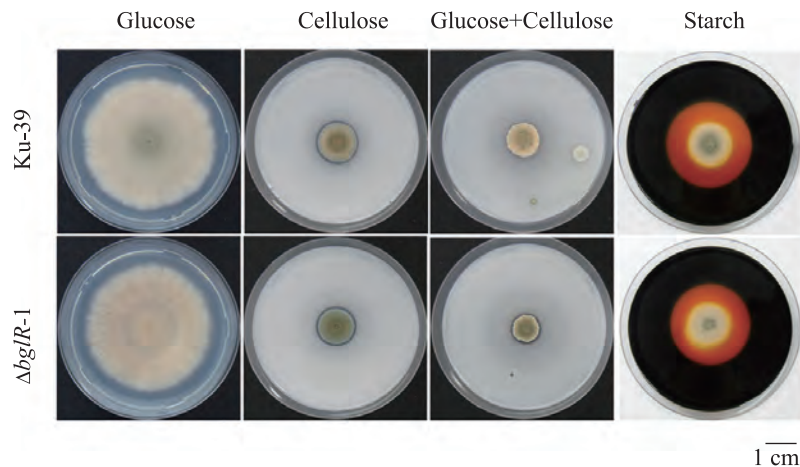


图3 斜卧青霉 Ku-39 和  $\Delta bglR-1$  表型平板分析

Fig. 3 Phenotype of *P. decumbens* Ku-39 and  $\Delta bglR-1$

活力以及蛋白含量相比出发菌株 Ku-39 有明显提高(图 4B、4F)。另一方面, 外切葡聚糖酶活力没有发生明显变化(图 4E)。结果说明转录调控因子 BglR 的缺失可以正向调控胞外的蛋白质含量以及  $\beta$ -葡萄糖苷酶活力的表达, 而对滤纸酶活、内切葡聚糖酶活、木聚糖酶活力的表达有负向调控作用。

## 2.6 生物量的变化

在基本培养基中,  $\Delta bglR-1$  突变株与出发菌

株相比生长较快, 培养至 51 h 时, 菌体量接近最大值(图 5), 表明转录调控因子 BglR 的缺失有利于  $\Delta bglR-1$  突变株在液体培养条件下的营养生长。

## 2.7 pH 值的变化

由图 6 可以看出,  $\Delta bglR-1$  突变株发酵液中 pH 值的变化趋势与 Ku-39 发酵液中 pH 的变化趋势相比变化明显, 表明 BglR 的缺失可以影响  $\Delta bglR-1$  突变株在液体培养条件下 pH 变化。

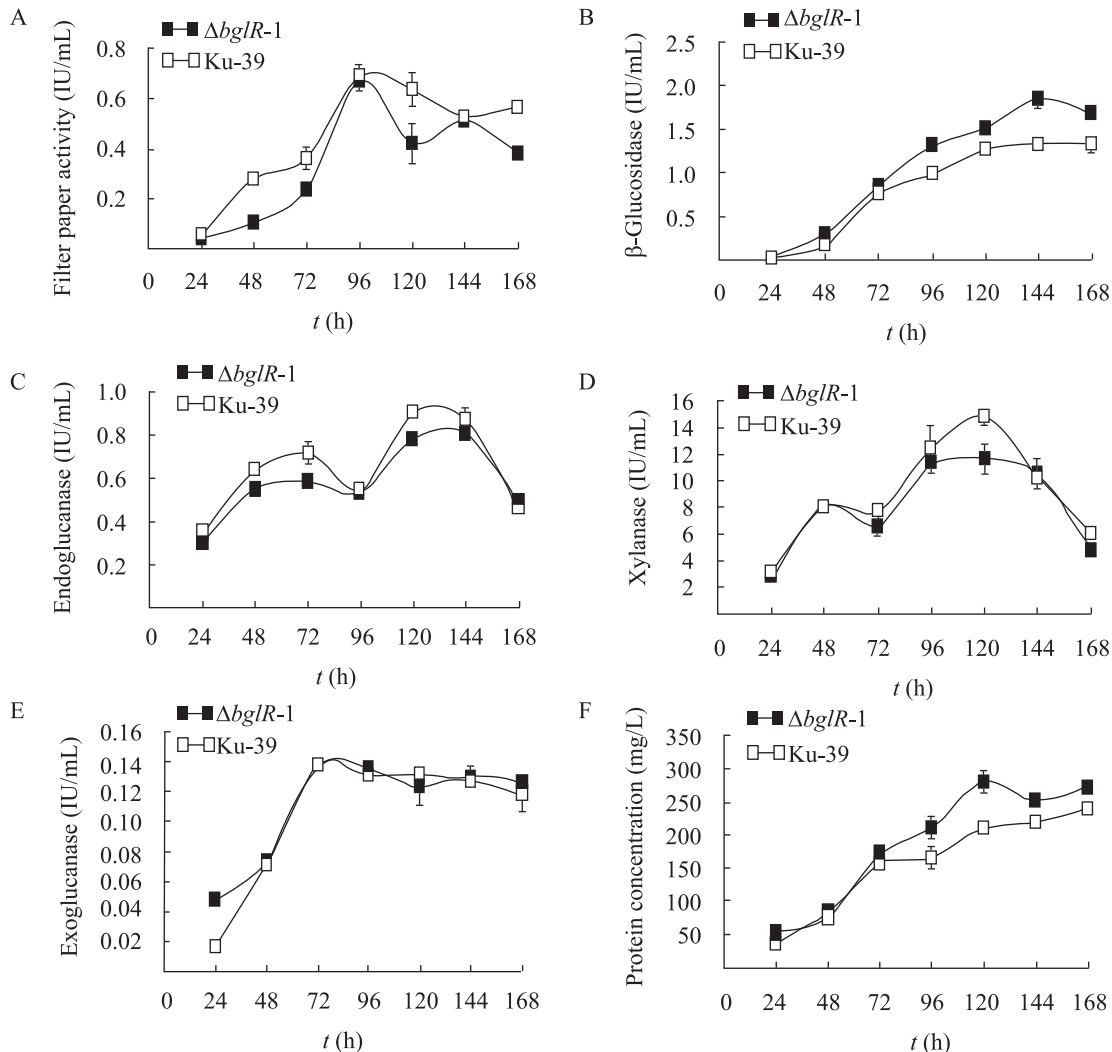


图 4 斜卧青霉 Ku-39 和  $\Delta bglR-1$  酶活力及蛋白质含量的测定

Fig. 4 Curve of enzyme and protein production from *P. decumbens* Ku-39 and  $\Delta bglR-1$

注: A: 滤纸酶活力; B:  $\beta$ -葡萄糖苷酶活力; C: 内切葡聚糖酶活力; D: 木聚糖酶活力; E: 外切葡聚糖酶活力; F: 发酵液蛋白质含量。

Note: A: Filter paper activity; B:  $\beta$ -Glucosidase activity; C: Endoglucanase activity; D: Xylanase activity; E: Exoglucanase activity; F: Protein concentration.

### 3 讨论

根据斜卧青霉 114-2 在不同碳源生长条件下(葡萄糖、麸皮和纤维素、纤维素)基因组表达谱的差异,发现了一新的转录调控因子编码基因 *bglR* (PDE-01706)。*bglR* 基因在葡萄糖为碳源生长条件下的转录水平,分别是在麸皮和纤维素复合碳源培养条件下转录水平的 7 倍,是纤维素为

唯一碳源生长条件下该基因的转录水平的 29 倍(数据未发表),因此,我们推断该基因编码产物在纤维素降解利用过程中与纤维素酶基因的表达存在潜在的影响。根据 GenBank 数据库分析,*bglR* 编码一种  $Cys_2His_2$  锌指结构蛋白,属于真菌特有的转录调控因子,在其他丝状真菌中存在该蛋白的同源序列,但对其功能均未开始研究。

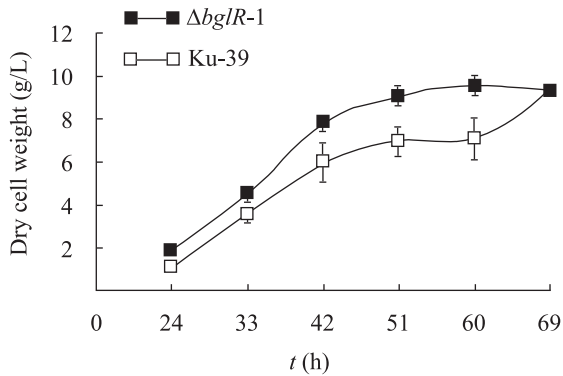


图5 斜卧青霉 Ku-39 和  $\Delta bglR-1$  生物量的测定  
Fig. 5 Curve of dry cell weight from *P. decumbens* Ku-39 and  $\Delta bglR-1$

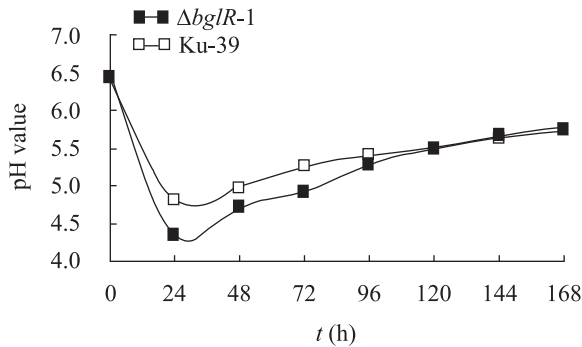


图6 斜卧青霉 Ku-39 和  $\Delta bglR-1$  发酵液 pH 值的测定  
Fig. 6 Curve of pH value from *P. decumbens* Ku-39 and  $\Delta bglR-1$

为初步研究 BglR 对斜卧青霉产纤维素酶的影响, 首先通过同源重组双交换的方式获得 BglR 缺失突变株  $\Delta bglR-1$ , 对该突变株的纤维素酶活测定表明, 滤纸酶活、内切葡聚糖酶及木聚糖酶活力相比出发菌株明显降低, 表明 BglR 的缺失可导致上述酶编码基因表达活性的增加。在产纤维素酶丝状真菌中, 已对 CreA<sup>[8]</sup>、XlnR<sup>[5]</sup>、ACEI<sup>[6]</sup>及 ACEII<sup>[7]</sup>等纤维素酶基因表达调控相关的转录调控因子进行了研究。Aro 等<sup>[7]</sup>在瑞氏木霉中对转录调控因子 ACEII 进行敲除, 导致内切葡聚糖酶和木聚糖酶活力降低, 表明 ACEII 是内切葡聚糖酶和木聚糖酶表达的转录激活因子, 对其表达具有正向调控作用。XlnR 则是调控 *egl1*、*xyn1* 及 *xyn2* 基因表达所需的重要转录激活因子,

XlnR 的缺失可降低内切葡聚糖酶和木聚糖酶的表达量<sup>[16-17]</sup>。在斜卧青霉 Ku-39 中, 虽然转录调控因子 BglR 的缺失对滤纸酶活、内切葡聚糖酶及木聚糖酶活力的影响与 ACEII、XlnR 的功能相类似, 但 BglR 全面的转录调控机理还需进一步的研究。

在斜卧青霉 Ku-39 中, 转录调控因子 BglR 的缺失可导致  $\Delta bglR-1$  突变株的  $\beta$ -葡萄糖苷酶活力提高 40%, 表明该转录调控蛋白对  $\beta$ -葡萄糖苷酶的基因表达具有负向调控作用。 $\beta$ -葡萄糖苷酶是木质纤维素降解过程中的关键酶, 可作用于纤维二糖, 从非还原端催化  $\beta$ -葡萄糖苷键水解, 释放  $\beta$ -D-葡萄糖<sup>[18-19]</sup>, 但  $\beta$ -葡萄糖苷酶所受的转录调控与内切葡聚糖酶和外切葡聚糖酶没有直接的相关性<sup>[20]</sup>, 这说明  $\beta$ -葡萄糖苷酶可能与内切葡聚糖酶和外切葡聚糖酶存在不同的调控机制。同时,  $\Delta bglR-1$  突变株的生物量和胞外蛋白质含量均明显提高, 尤其蛋白质含量是出发菌株的 1.33 倍, 该结果有利于增强斜卧青霉作为工业菌株生产酶蛋白的重要性。

斜卧青霉作为一株重要的产纤维素酶丝状真菌, 已在生物质的微生物工业化利用中发挥了重要的作用。为进一步深入研究丝状真菌利用纤维素过程中纤维素酶的表达调控, 在斜卧青霉中发现一新的转录调控因子 BglR 编码基因, 该转录调控因子对纤维素酶的表达具有明显的影响, 由于在其他丝状真菌中还未对转录调控因子 BglR 同源蛋白的功能开展相关的研究, 因此, 对斜卧青霉 BglR 的功能进行全面深入的分析对进一步完善纤维素酶基因表达调控网络模型和纤维素酶工业菌株的理性改造具有重要意义。

## 参考文献

- [1] Qu YB, Zhao X, Gao PJ, et al. Cellulase production from spent sulfite liquor and paper-mill waste fiber[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology,



- 1991, 28-29(1): 363-368.
- [2] 赵昕, 曲音波, 高培基. 抗黑液毒性的纤维素酶产生菌选育的探讨[J]. 纤维素科学与技术, 1993, 1(2): 28-32.
- [3] Kubicek CP, Mikus M, Schuster A, et al. Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina*[J]. Biotechnology for Biofuels, 2009, 2: 19.
- [4] 辛琪, 徐金涛, 汪天虹, 等. 丝状真菌红褐肉座菌(*Hypocrea jecorina*)纤维素酶基因的转录调控研究进展[J]. 微生物学报, 2010, 50(11): 1431-1437.
- [5] Noguchi Y, Tanaka H, Kanamaru K, et al. Xylose triggers reversible phosphorylation of XlnR, the fungal transcriptional activator of xylanolytic and cellulolytic genes in *Aspergillus oryzae*[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2011, 75(5): 953-959.
- [6] Saloheimo A, Aro N, Ilmen M, et al. Isolation of the *ace1* gene encoding a Cys<sub>2</sub>-His<sub>2</sub> transcription factor involved in regulation of activity of the cellulase promoter *cbh1* of *Trichoderma reesei*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(8): 5817-5825.
- [7] Aro N, Saloheimo A, Ilmen M, et al. ACEII, a novel transcriptional activator involved in regulation of cellulase and xylanase genes of *Trichoderma reesei*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(26): 24309-24314.
- [8] Sun JP, Glass NL. Identification of the CRE-1 cellulolytic regulon in *Neurospora crassa*[J]. PLoS One, 2011, 6(9): e25654 1-14.
- [9] 郑凯. 斜卧青霉基因表达谱的差异分析研究[D]. 济南: 山东大学博士学位论文, 2009: 76-77.
- [10] Li ZH, Du CM, Zhong YH, et al. Development of a highly efficient gene targeting system allowing rapid genetic manipulations in *Penicillium decumbens*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87(3): 1065-1076.
- [11] 曲音波, 高培基, 王祖农. 斜卧青霉纤维素酶的研究 II. JU<sub>1</sub>菌株的生理特征和酶合成调控问题的初探[J]. 山东大学学报: 自然科学版, 1987, 22(3): 97-104.
- [12] Yu JH, Hamari Z, Han KH, et al. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi[J]. Fungal Genetics and Biology, 2004, 41(11): 973-981.
- [13] Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [14] Wood TM, Bhat KM. Methods for measuring cellulase activities[J]. Methods in Enzymology, 1988, 160: 87-112.
- [15] 刘自勇. 斜卧青霉纤维素酶基因的初步研究[D]. 济南: 山东大学硕士学位论文, 2008: 13-14.
- [16] Stricker AR, Mach RL, de Graaff LH. Regulation of transcription of cellulases- and hemicellulases-encoding genes in *Aspergillus niger* and *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*)[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 78(2): 211-220.
- [17] van Peij NN, Gielkens MM, de Vries RP, et al. The transcriptional activator XlnR regulates both xylanolytic and endoglucanase gene expression in *Aspergillus niger*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(10): 3615-3619.
- [18] Kawai R, Yoshida M, Tani T, et al. Production and characterization of recombinant *Phanerochaete chrysosporium*  $\beta$ -glucosidase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2003, 67(1): 1-7.
- [19] Martins LF, Kolling D, Camassola M, et al. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(5): 1417-1424.
- [20] Foreman PK, Brown D, Dankmeyer L, et al. Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(34): 31988-31997.