

黑曲霉组成型表面展示南极假丝酵母脂肪酶 B 及其发酵调控

李远锋, 靳坤, 王登刚, 梁书利, 郑穗平, 林影

华南理工大学 生物科学与工程学院 广东省发酵与酶工程重点实验室, 广东 广州 510006

李远锋, 靳坤, 王登刚, 等. 黑曲霉表面展示南极假丝酵母脂肪酶 B 及其发酵调控. 生物工程学报, 2018, 34(7): 1189–1196.

Li YF, Jin S, Wang DG, et al. Constitutive display of *Candida antarctica* lipase B on the cell surface of *Aspergillus niger* and regulation of its fermentation. Chin J Biotech, 2018, 34(7): 1189–1196.

摘要: 黑曲霉表面展示南极假丝酵母脂肪酶 B (CALB) 可有效应用于食品、化妆品、医药等行业。以黑曲霉 *Aspergillus niger* SH-1 为宿主细胞构建诱导型糖化酶基因启动子表面展示 CALB, 在较高浓度葡萄糖碳源的发酵中 CALB 表达会受到抑制, 发酵后期菌体容易出现菌丝断裂和展示酶活力下降等问题。采用组成型 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因启动子替代诱导型糖化酶基因启动子的细胞表面展示 CALB 黑曲霉菌株可有效解决上述问题, 该菌株不但可以利用葡萄糖, 而且还能利用木糖为发酵碳源, 以木糖为碳源发酵在 144 h 展示酶水平达到 1 100.28 U/g。文中探讨了甘蔗渣水解液发酵生产黑曲霉表面展示 CALB, 初步达到预期的结果, 为甘蔗渣的综合利用提供了新途径。

关键词: 黑曲霉, 脂肪酶, 细胞表面展示, 组成型启动子

Constitutive display of *Candida antarctica* lipase B on the cell surface of *Aspergillus niger* and regulation of its fermentation

Yuanfeng Li, Shen Jin, Denggang Wang, Shuli Liang, Suiping Zheng, and Ying Lin

Guangdong Key Laboratory of Fermentation and Enzyme Engineering, School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, Guangdong, China

Abstract: Displaying *Candida antarctica* lipase B (CALB) on the cell surface of *Aspergillus niger* is effectively applied for the industries of food, cosmetics, pharmaceutical and so on. Displaying CALB using induced promoter of glucoamylase on the cell surface of *A. niger* SH-1 has some problems such as inhibiting its expression under high concentration of glucose, mycelium cleavage and decreasing enzyme activity in the later period of fermentation process. Displaying CALB manipulated by constitutive promoter from glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase instead of glucoamylase on the cell surface of *A. niger* SH-1, called AN-GpdA, could solve the above problems effectively. Furthermore, it can not only use glucose, but also

Received: December 4, 2017; **Accepted:** March 19, 2018

Supported by: Science and Technology Planning Project of Guangzhou City (No. 201607010307).

Corresponding author: Ying Lin. Tel: +86-20-39380698; E-mail: feylin@scut.edu.cn

广州市科技计划项目 (No. 201607010307) 资助。

xylose as a sole carbon source. Enzyme activity of AN-GpdA using xylose for fermentation reached 1 100.28 U/g of dry cell. We also used lignocellulose such as the hydrolysate of bagasse for fermentation with good performance. The result would provide a novel strategy for the utilization of bagasse.

Keywords: *Aspergillus niger*, lipase, cell surface display, constitutive promoter

脂肪酶不但催化脂肪水解,而且在非水相中能高效催化转酯和酯化等反应,具有反应条件温和等特性^[1-2],由此脂肪酶被广泛应用于化学、食品、化妆品、医药等行业。南极假丝酵母脂肪酶 B (*Candida antarctica* lipase B, CALB) 因具有与其他脂肪酶不同的性质和特殊的结构,如对水溶性以及非水溶性底物都有很强的催化活性,可用于催化合成反应、油脂转化等^[3-4],同时还具有很显著的手性选择性和区域选择性,可以在有机相中催化不对称的水解、胺解、酯化和酯交换等反应^[5-6],使其成为研究热点。

丝状真菌具有较强的蛋白质分泌能力和较完备的蛋白质装配加工运输途径,并具有蛋白质胞外分泌量大、表达蛋白有天然活性的优点^[7-8]。其中黑曲霉 *Aspergillus niger* 作为一种通用的蛋白表达系统,特别适合于食品和药品的生产,并被美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 定义为通常认为安全 (Generally regarded as safe, GRAS) 的微生物^[9]。食品加工行业已经认可通过黑曲霉生产的酶制剂^[10]。细胞表面展示技术通过外源蛋白与锚定蛋白融合表达在细胞表面上,简化了蛋白纯化和固定化步骤,具有较大的工业应用价值^[11]。目前仅有少数关于丝状真菌表面展示系统的报道,如米曲霉细胞表面展示系统^[12-13]和笔者实验室从头构建的黑曲霉细胞表面展示系统^[14],在黑曲霉糖化酶基因启动子 (pGlaA) 操控下,将带有 FLAG 标签的 CALB 与 *A. niger* 内源的壁蛋白 CwpA^[15]融合,实现了 CALB 在黑曲霉菌丝表面的活性展示。尽管 pGlaA 已被应用于外源蛋白表达中,但其作为一种诱导型启动子,在淀粉或其衍生物的培

养基中可以诱导产酶,在木糖培养基中不能诱导产酶^[16]。在利用葡萄糖及其类似物等碳源时,仅在较低浓度时有强诱导作用,而在高浓度诱导的作用受到抑制^[17-18],使得工业化发酵生产控制困难。

甘油醛 3-磷酸脱氢酶是糖酵解第 6 步的酶,该基因启动子 (pGpdA) 为组成型启动子,无需添加任何诱导物,可自发调控结构基因进行表达^[19]。已有许多成功利用该启动子表达外源蛋白的报道,例如在酱油曲霉中使用 pGpdA 克隆表达来自烟曲霉的 α -半乳糖苷酶^[20];在黑曲霉中表达大肠杆菌来源的 β -半乳糖苷酶、 β -葡萄糖醛酸酶^[21]以及葡萄糖氧化酶^[22]等。

本研究基于实验室已有的黑曲霉表面展示 CALB (AN-GlaA) 菌株的基础上进行改造^[14],将诱导型启动子 pGlaA 替换为组成型启动子 pGpdA (AN-GpdA),通过对所构建菌株的发酵控制研究,拟解决发酵过程中高浓度葡萄糖、木糖等抑制产酶、发酵后期菌丝裂解造成展示酶活力严重下降等问题,初步探讨了甘蔗渣水解液为碳源发酵产品的条件,为甘蔗渣的综合利用提供了新途径。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌种

实验中所用的菌株和质粒见表 1。

1.1.2 酶与试剂

KOD FX 聚合酶购自东洋纺 (上海) 生物技术有限公司。CloneEZ 重组克隆试剂盒购自南京金斯瑞生物科技有限公司。各种限制性内切酶 (如 *Not* I、*Sal* I) 购自 NEB 公司。鼠抗 FLAG

表 1 本实验用菌株及质粒

Table 1 Strains and plasmids in this study

Strains	Description	Source
<i>E. coli</i> TOP 10	Cloning host	Life Technologies
<i>A. niger</i> SH-1	Expressing host	Lab collection
Plasmids		
pCALB-C	pGlaA-CALB-Flag-CwpA	[14]

单抗 Mouse anti-FLAG 购自美国 Agilent 公司。Alexa Fluor488 标记羊抗鼠 IgG 购自美国 Invitrogen 公司。酵母提取物和胰蛋白胨购自 Oxoid 公司。对硝基苯酚丁酸酯 (pNPB) 和聚乙烯醇 (PVA-124) 购自 Sigma-Aldrich 公司。牛血清白蛋白 (BSA) 购自北京普博欣生物公司。其余分析纯试剂均购自天津市大茂化学试剂厂。

对硝基苯酚丁酸酯 (pNPB) 底物配制: 25 mmol/L pNPB 与 1% 曲拉通-100 溶解于 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0), 使用均质机乳化至均匀, 于-20 °C 保存。

1.1.3 培养基

Luria-Bertani (LB): 1% 胰蛋白胨, 0.5% 酵母抽提物, 1% NaCl。乙酰胺 CD 种子培养基: 2% 蔗糖, 0.2% KCl, 0.05% MgSO₄, 0.1% K₂HPO₄, 0.001% FeSO₄·7H₂O, 0.05% 琼脂, 85% H₃PO₄ 调节 pH 至 5.5, 使用前加入经 0.22 μm 滤膜过滤除菌后的乙酰胺至 10 mmol/L。乙酰胺蔗糖 CD 高渗固体培养基: 乙酰胺 CD 种子培养基的基础上, 更换琼脂为 2%, 并加入 1.5 mmol/L CsCl。

三丁酸甘油酯固体培养基: 0.2% PVA-124, 0.5% 三丁酸甘油酯, 0.3% NaNO₃, 0.1% K₂HPO₄, 0.05% KCl, 0.05% MgSO₄, 1% 葡萄糖, 2% 琼脂, 0.25% 曲拉通, 调节 pH 至 5.5。APY: 1% 酵母提取物, 0.75% 蛋白胨, 1.5% (NH₄)₂SO₄, 0.84% KH₂PO₄, 0.18% Na₂HPO₄·12H₂O。GAPY: 在 APY 添加葡萄糖至终浓度为 6%。XAPY: 在 APY 添加木糖母液至终浓度为 6%。AN-GlaA 发酵在 APY

诱导产酶, 每 12 h 添加葡萄糖至终浓度为 0.25%。

甘蔗渣水解液发酵培养基: 称取适量甘蔗渣用 4.5% 氢氧化钠 (S/L=1:25) 在 80 °C 预处理 4 h, 水洗至中性, 再加入柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (pH 4.8, S/L=1:20) 和纤维素酶 (20 FPU/g 底物) 48 °C 酶解反应 80 h。过滤后, 旋转蒸发, 得到终浓度为 6% 甘蔗渣水解液, 再添加 APY 中的各成分。

1.2 黑曲霉细胞表面展示载体的构建

从 *A. niger* SH-1 细胞中提取全基因组, 设计引物 gpdA1261F/SsglaAF (表 2)。PCR 扩增出 pGpdA 的编码基因。以 pCALB-C 质粒为模板, 设计引物 gpdARnew/SSglaAR (表 2)。PCR 扩增出信号肽 SSglaA 的编码基因。PCR 反应体系与 PCR 扩增 pGpdA 的编码基因相同。上述两种产物经 PCR 产物纯化试剂盒纯化后, 共同作为模板, 以 gpdA1261F/SSglaAR 为引物, 进行融合 PCR, 得到 pGpdA-SSgla 的编码基因。PCR 反应体系与 PCR 扩增 pGpdA 的编码基因相同。利用限制性内切酶 (*Not* I、*Sal* I) 处理 pCALB-C, 切除 pGlaA-SSgla 片段, 得到产物回收纯化后与上述融合 PCR 的产物用 CloneEZ 重组克隆试剂盒连接。随后转化 *E. coli* TOP 10, 得到构建的质粒 pCALB-D (图 1)。

表 2 用于基因扩增的引物

Table 2 Primers used for PCR

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
gpdARnew	AGATCGGAACGACATTG TTTAGATGTGTCTATGTG GCG	38
SSglaAF	TAGACACATCTAAACAA TGTCGTTCCGATCTCTAC TCGC	39
SSglaAR	CACCAAAGGAGTGCGG TCGACGCGCTTGAAAT CACATTGC	42
gpdA1261F	CAATAGACATCAGTAGC GGCCGCACAGAGGCCA GAGCATCACC	43

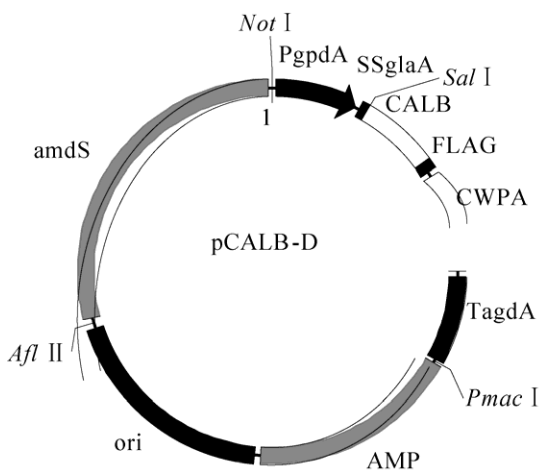


图1 pCALB-D质粒图谱

Fig. 1 Map of the plasmid pCALB-D.

1.3 重组黑曲霉菌展示 CALB 菌构建和产酶验证

提取 pCALB-D 质粒,进行 *A. niger* SH-1 原生质体转化,涂布于乙酰胺蔗糖 CD 高渗平板获得菌落,再转移至三丁酸甘油酯平板筛选转化子。挑取水解圈明显的转化子接至乙酰胺蔗糖 CD 液体培养基扩大培养,将乙酰胺 CD 液体培养基培养的菌液离心,弃去上清,菌体用生理盐水洗涤 2 次,然后接种到 50 mL GAPY 中,用 500 mL 摇瓶发酵,装液量 10%, 30 °C, 250 r/min。从第 48 h 开始取样,每 24 h 取样 1 次,检测相关发酵产酶指标。

1.4 分析方法

1.4.1 生物量测定

发酵液经过适当稀释后,于 595 nm 波长下测定吸光度,该数值反应菌体生物量。在一定的范围内,随着生物量的积累, OD_{595} 线性增加。

1.4.2 酶活力测定

采用吸光度法测定展示脂肪酶活力^[14]。发酵菌液用 Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 洗涤 2 次,再用等体积 Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 重悬,用于检测菌丝展示脂肪酶活性。菌液稀释至合适的倍数后,以对硝基苯酚丁酸酯 (pNBP) 作为底

物,在 pH 8.0、45 °C 条件下反应 5 min,酶标仪测定吸光度 (OD_{405})。空白使用 Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 替代样品,在相同条件下反应检测。展示脂肪酶活力测定体系:900 μ L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0),50 μ L 稀释合适倍数的菌液,50 μ L pNBP 底物,反应体系共计 1 mL,反应后取 200 μ L 检测吸光度 (OD_{405})。展示脂肪酶活力单位 (1 U) 定义为:在 pH 8.0、45 °C 条件下,每 1 min 水解 pNBP 生成 1 μ mol 对硝基苯酚所需的酶量。

计算公式:酶活力 (U/g)=($OD_{405}-OD_{blank}$) \times M \times K \times 1 000/(W \times $OD_{595}\times$ T)。

其中 OD_{405} :待测样品在 405 nm 波长的吸光值; OD_{blank} :空白对照品在 405 nm 波长的吸光值;M:样品的稀释倍数;K:水解生成对硝基苯酚的标准曲线系数,数值上等于标准曲线方程 $x=1$ 时的 y 值 (μ mol/L),实验室测得该系数的值为 0.12;T:反应时间,5 min;W:1 L 发酵液 1 OD_{595} 对应的菌体干重 (g/L),本实验所用的系数值为 0.33; OD_{595} :待测样品的生物量。

1.4.3 表面展示脂肪酶黑曲霉细胞免疫荧光分析

构建的质粒 pCALB-D 带有 FLAG 标签,所以可以通过激光扫描共聚焦显微镜检测经荧光染色的表面展示脂肪酶黑曲霉细胞^[23]。菌体用冰冷的磷酸盐缓冲液洗 (pH 7.4) 2 次后,用含 1% BSA 的磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 重悬菌体,加入适量鼠抗 FLAG 单抗 Mouse anti-FLAG,轻敲混匀,孵育 2 h。再用含 1% BSA 的磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 洗涤并重悬菌体,加入适量 Alexa Fluor488 标记羊抗鼠 IgG 抗体,轻敲混匀,避光孵育 1 h。然后用含 1% BSA 的磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 洗涤并重悬菌体,用 Carl Zeiss LSM710 激光共聚焦显微镜对黑曲霉菌体进行荧光显微镜检测。

2 结果与分析

2.1 表面展示脂肪酶黑曲霉细胞免疫荧光分析

表面展示 CALB 黑曲霉菌株 AN-GpdA 利用

葡萄糖为碳源培养后洗涤菌体,用免疫荧光染色处理,宿主菌 *A. niger* SH-1 作为对照,在激光共聚焦显微镜下观察(图 2)。在 488 nm 光源的激发下,重组菌细胞表面呈现明显的特异性绿色荧光。因为 FLAG 标签被设计在 CALB 和细胞壁锚定蛋白之间,这一结果可以从蛋白质水平表明外源蛋白 CALB 已经成功地展示在细胞表面。

2.2 利用葡萄糖为碳源黑曲霉生长形态及展示脂肪酶产酶分析

分别研究了黑曲霉 AN-GlaA 菌株(诱导型表达)和 AN-GpdA 菌株(组成型表达)在 APY 发酵培养基培养 168 h 的展示酶产酶情况,其发酵展示酶活力曲线如图 3 所示。在 96 h 前随着培养时间的增加,两株菌展示的 CALB 活力均在升高,其中在 96 h AN-GpdA 的展示 CALB 酶活力达 466.40 U/g,比同时期的 AN-GlaA 展示 CALB 酶活力(322.35 U/g)提高了约 45%,且 AN-GpdA

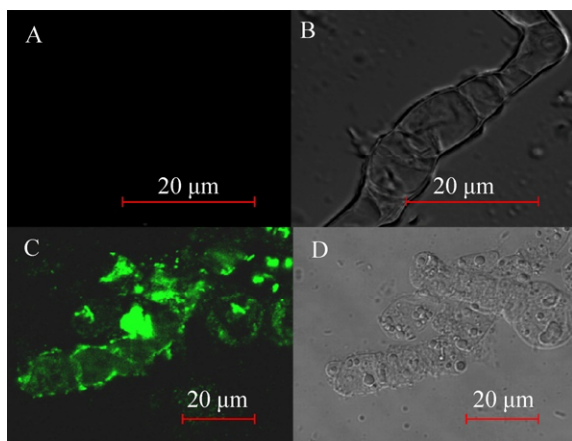


图 2 *A. niger* 菌丝激光扫描共聚焦显微镜免疫荧光分析

Fig. 2 Immunofluorescence microscopy assay of labeled *A. niger* mycelium by laser scanning confocal microscope. (A, B) Fluorescence and differential interference contrast micrographs of control host strain *A. niger* SH-1 respectively. (C, D) Fluorescence and differential interference contrast micrographs of recombinant AN-GpdA respectively.

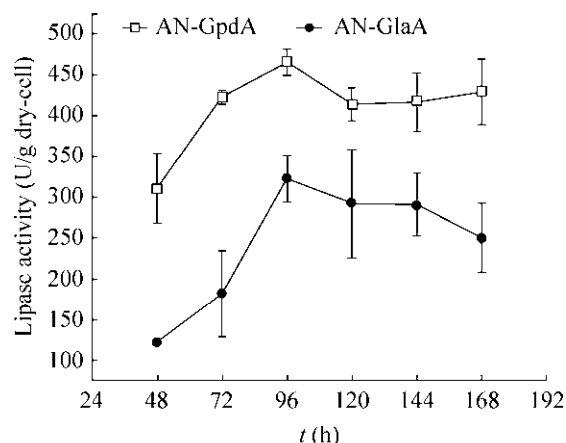


图 3 AN-GlaA 和 AN-GpdA 利用葡萄糖为碳源发酵展示 CALB 酶活力

Fig. 3 Displaying CALB activity on the cell surface of AN-GlaA and AN-GpdA both using glucose as carbon source.

继续培养发酵到 168 h 展示 CALB 酶活力较为稳定,而 AN-GlaA 展示酶活力在 168 h 下降 22%。说明 AN-GpdA 展示 CALB 产酶效果较 AN-GlaA 更具优势,在发酵后期(96–168 h) AN-GlaA 展示的酶活力明显下降,推测其与碳源限制和菌丝形态相关。本研究使用的宿主菌 *A. niger* SH-1 为无孢黑曲霉,在液体发酵中呈现出菌丝较短、多分支的现象。在葡萄糖限制(0.3–0.6 mmol/L)发酵后期(168 h) AN-GlaA 菌株出现了菌丝断裂并裂解(图 4A 和 4B)致使展示酶活力下降。AN-GpdA 菌株在发酵过程中含有充足的葡萄糖,缓解 AN-GlaA 在发酵过程中碳源匮乏的问题,维持菌丝较为良好的形态(图 4C 和 4D)大部分菌丝体健壮,轮廓清晰。

2.3 利用木糖为碳源黑曲霉生长形态及展示脂肪酶产酶分析

AN-GlaA 菌株可利用木糖生长,但不能诱导生产展示 CALB 酶,只有当洗去木糖后,转入 APY 培养基并添加适量葡萄糖才恢复诱导产酶(数据未显示);而 AN-GpdA 菌株不仅可以利用葡萄糖

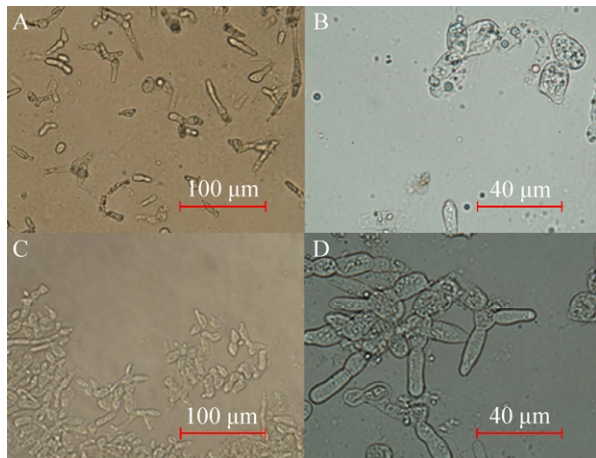


图4 AN-GlaA 和 AN-GpdA 利用葡萄糖为碳源发酵 168 h 的细胞形态

Fig. 4 The mycelial morphology of AN-GlaA and AN-GpdA fermentation using glucose as carbon source at 168 h. (A, B) AN-GlaA magnified 400 and 1 000 times, respectively. (C, D) AN-GpdA magnified 400 and 1 000 times, respectively.

产酶，也可以在木糖为唯一碳源时进行产酶。AN-GpdA 菌株利用木糖为碳源发酵展示 CALB 酶活力生产曲线如图 5 所示，发酵到 144 h 时展示 CALB 活力最高，达到 1 100.28 U/g，其展示酶活力明显高于其利用葡萄糖为碳源发酵产酶。推测可能原因是无孢黑曲霉在利用木糖和葡萄糖代谢存在差异，利用前者为碳源时，糖转化率、胞内还原力 (NADH/NAD⁺) 和 ATP 含量均比后者高，且有机酸积累量少，有利于产物积累^[24]；同时木糖作为唯一碳源对细胞壁的结构产生明显影响，从而改变菌丝的形态、长度、区室多少和结团等，如图 6 所示，相比于利用葡萄糖为碳源的细胞培养 (图 6A、6B)，利用木糖为碳源 (图 6C、6D) 培养发酵，形成的菌丝体更纤细、更长，区室也更多，且部分区室膨大、更粗壮，这对展示 CALB 活力影响至关重要。对于黑曲霉来说，其生长形态与蛋白产量受到能量输入的较大影响，随着能量输入的增大，菌体形态由球状向丝状转变，继而带来了较高的蛋白产量^[25-26]。

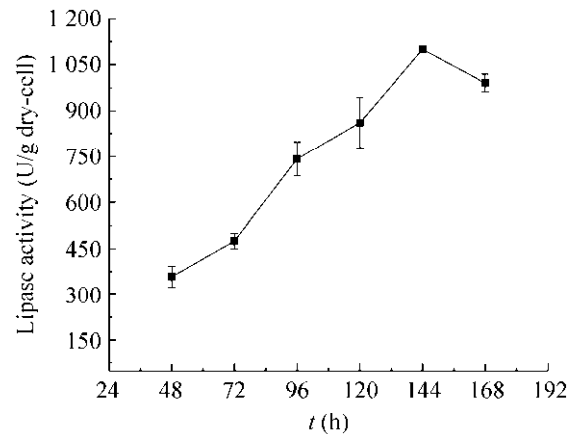


图5 AN-GpdA 利用木糖为碳源展示 CALB 酶活力
Fig. 5 Displaying CALB activity on the cell surface of AN-GpdA using xylose as carbon source.

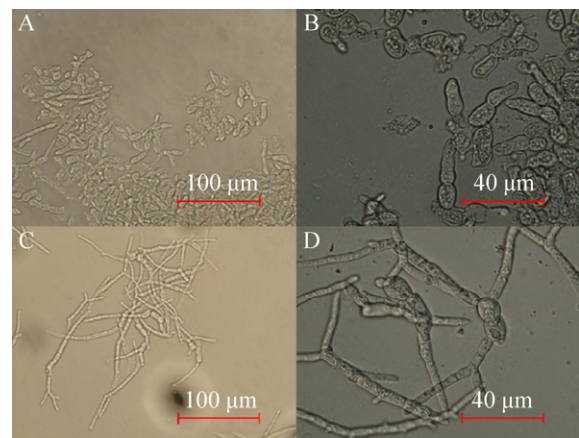


图6 AN-GpdA 发酵 144 h 的菌丝形态

Fig. 6 The mycelial morphology of AN-GpdA fermentation at 144 h. (A, B) AN-GpdA using glucose as carbon source magnified 400 and 1 000 times, respectively. (C, D) AN-GpdA using xylose as carbon source magnified 400 and 1 000 times, respectively.

2.4 利用甘蔗渣水解液为碳源发酵黑曲霉展示脂肪酶产酶分析

葡萄糖和木糖作为木质纤维素中主要的单糖成分，本研究利用木质纤维素甘蔗渣的水解液作为碳源，添加相应营养成分用于研究 AN-GpdA 菌株的发酵产酶，其发酵展示 CALB 酶活力曲线如图 7 所示，168 h 时展示 CALB 活力达到 600.42 U/g。

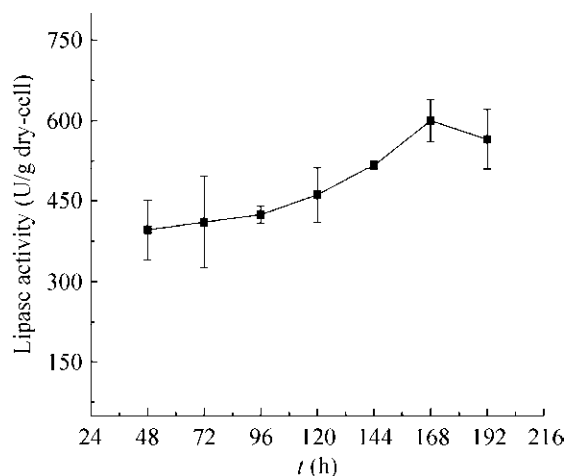


图7 AN-GpdA 利用甘蔗渣水解液为碳源展示 CALB 酶活力

Fig. 7 Displaying CALB activity on the cell surface of AN-GpdA using bagasse hydrolysate as carbon source.

相比利用葡萄糖或木糖等单一碳源，利用甘蔗渣水解液达到最高展示酶活力的时间较晚，可能是纤维素水解物中存在着乙酸、羟甲基糠醛、糠醛、甲酸等有害物质，影响了细胞的生长与产酶，因此延长了菌体产酶时间^[27]。

3 讨论

本研究通过替换黑曲霉表面展示 CALB 菌株 (AN-GlaA) 的诱导型启动子 pGlaA 为组成型启动子 pGpdA，所构建黑曲霉表面展示 CALB 菌株 AN-GpdA，有效改善了其展示 CALB 的发酵性能，使其在发酵过程中生长的同时进行产酶，无需添加诱导剂，操作简便。利用葡萄糖为碳源发酵至 96 h 其展示脂肪酶活力达到 466.40 U/g，与同时期的 AN-GlaA 相比提高了接近 45%，而且酶活力更加稳定。AN-GpdA 还可利用木糖产酶，因木糖具有较高的代谢效率以及菌体形态发生变化，达到较高的展示酶活力 (1 100.28 U/g)。最后以水解制备的甘蔗渣水解液为碳源发酵，获得了良好的产酶性能。利用高效分泌蛋白的无孢黑曲霉作为宿主构建蛋白展示细胞具有表达量高及丝状真菌

表面疏水性对脂肪酶酯化催化的促进作用，本研究采用组成型启动子，有利于改善无孢黑曲霉的生长稳定和酶的展示表达效率，拓展了黑曲霉木糖及木质纤维素水解物等碳源的利用，在华南地区利用废弃甘蔗渣水解物为发酵原料，符合地方绿色工业发展需求。

REFERENCES

- [1] Divakar S, Manohar B. Use of lipases in the industrial production of esters//Polaina J, MacCabe AP, eds. Industrial Enzymes. Dordrecht: Springer, 2007: 283–300.
- [2] Hasan F, Shah AA, Hameed A. Industrial applications of microbial lipases. Enzyme Microb Technol, 2006, 39(2): 235–251.
- [3] Anthonsen T, Hoff BH. Resolution of derivatives of 1,2-propanediol with lipase B from *Candida antarctica*: effect of substrate structure, medium, water activity and acyl donor on enantiomeric ratio. Chem Phys Lipids, 1998, 93(1/2): 199–207.
- [4] Anderson EM, Larsson KM, Kirk O. One biocatalyst—many applications: the use of *Candida antarctica* B-lipase in organic synthesis. Biocatal Biotransform, 1998, 16(3): 181–204.
- [5] Jin Z, Ntwali J, Han SY, et al. Production of flavor esters catalyzed by CALB-displaying *Pichia pastoris* whole-cells in a batch reactor. J biotechnol, 2012, 159(1/2): 108–114.
- [6] Park CG, Kwon MA, Song JK, et al. Cell-free synthesis and multifold screening of *Candida antarctica* lipase B (CalB) variants after combinatorial mutagenesis of hot spots. Biotechnol Progr, 2011, 27(1): 47–53.
- [7] Kwon MJ, Jørgensen TR, Nitsche BM, et al. The transcriptomic fingerprint of glucoamylase over-expression in *Aspergillus niger*. BMC Genomics, 2012, 13: 701.
- [8] Punt PJ, van Biezen N, Conesa A, et al. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. Trends Biotechnol, 2002, 20(5): 200–206.
- [9] Schuster E, Dunn-Coleman N, Frisvad JC, et al. On the safety of *Aspergillus niger*—a review. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 59(4/5): 426–435.
- [10] Fleißner A, Dersch P. Expression and export:

- recombinant protein production systems for *Aspergillus*. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 87(4): 1255–1270.
- [11] Liu Y, Zhang R, Lian ZS, et al. Yeast cell surface display for lipase whole cell catalyst and its applications. J Mol Catal B Enzym, 2014, 106: 17–25.
- [12] Adachi T, Ito J, Kawata K, et al. Construction of an *Aspergillus oryzae* cell-surface display system using a putative GPI-anchored protein. Appl Microbiol Biotechnol, 2008, 81(4): 711–719.
- [13] Tabuchi S, Ito J, Adachi T, et al. Display of both N- and C-terminal target fusion proteins on the *Aspergillus oryzae* cell surface using a chitin-binding module. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 87(5): 1783–1789.
- [14] Pan ZY, Yang ZM, Pan L, et al. Displaying *Candida antarctica* lipase B on the cell surface of *Aspergillus niger* as a potential food-grade whole-cell catalyst. J Ind Microbiol Biotechnol, 2014, 41(4): 711–720.
- [15] Damveld RA, Arentshorst M, VanKuyk PA, et al. Characterisation of CwpA, a putative glycosylphosphatidylinositol-anchored cell wall mannoprotein in the filamentous fungus *Aspergillus niger*. Fungal Genet Biol, 2005, 42(10): 873–885.
- [16] Hata Y, Kitamoto K, Gomi K, et al. Functional elements of the promoter region of the *Aspergillus oryzae glaA* gene encoding glucoamylase. Curr Genet, 1992, 22(2): 85–91.
- [17] Ganzlin M, Rinas U. In-depth analysis of the *Aspergillus niger* glucoamylase (*glaA*) promoter performance using high-throughput screening and controlled bioreactor cultivation techniques. J Biotechnol, 2008, 135(3): 266–271.
- [18] Zhu XG, Wang HM, Qiu RX, et al. The synergistic effects of two CCAAT boxes in *Aspergillus niger glaA* gene promoter on activation of *PglaA* transcription. Sci China Ser C: Life Sci, 2004, 47(2): 139–147.
- [19] Punt PJ, Dingemans MA, Kuyvenhoven A, et al. Functional elements in the promoter region of the *Aspergillus nidulans gpdA* gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Gene, 1990, 93(1): 101–109.
- [20] Gürkök S, Söyler B, Biely P, et al. Cloning and heterologous expression of the extracellular alpha-galactosidase from *Aspergillus fumigatus* in *Aspergillus sojae* under the control of *gpdA* promoter. J Mol Catal B Enzym, 2010, 64(3/4): 146–149.
- [21] Redkar RJ, Herzog RW, Singh NK. Transcriptional activation of the *Aspergillus nidulans gpdA* promoter by osmotic signals. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(6): 2229–2231.
- [22] El-Enshasy H, Hellmuth K, Rinas U. *GpdA*-promoter-controlled production of glucose oxidase by recombinant *Aspergillus niger* using nonglucose carbon sources. Appl Biochem Biotechnol, 2001, 90(1): 57–66.
- [23] Su GD, Huang DF, Han SY, et al. Display of *Candida antarctica* lipase B on *Pichia pastoris* and its application to flavor ester synthesis. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 86(5): 1493–1501.
- [24] Dou C, Xu Q, Song P, et al. Metabolism of *Rhizopus oryzae* with xylose or glucose as carbon resource. Acta Microbiol Sin, 2011, 51(4): 468–473 (in Chinese). 窦畅, 徐晴, 宋萍, 等. 米根霉利用木糖与葡萄糖的代谢差异. 微生物学报, 2011, 51(4): 468–473.
- [25] Ibrahim D, Welooosamy H, Lim SH. Effect of agitation speed on the morphology of *Aspergillus niger* HFD5A-1 hyphae and its pectinase production in submerged fermentation. World J Biol Chem, 2015, 6(3): 265–271.
- [26] Colin VL, Baigorí MD, Pera LM. Tailoring fungal morphology of *Aspergillus niger* MYA 135 by altering the hyphal morphology and the conidia adhesion capacity: biotechnological applications. AMB Express, 2013, 3: 27.
- [27] Zhang HS, Zhang J, Bao J. High titer gluconic acid fermentation by *Aspergillus niger* from dry dilute acid pretreated corn stover without detoxification. Bioresour Technol, 2016, 203: 211–219.

(本文责编 陈宏宇)