

调控黑曲霉葡萄糖转运系统增强柠檬酸的合成

殷 娴^{1,2}, 李江华^{1,2}, 刘 龙^{1,2}, 堵国成^{1,2}, 陈 坚^{*1,2}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 柠檬酸是目前世界上需求量最大的有机酸,年产量达到 170 万吨,主要由黑曲霉进行深层有氧发酵来生产。强化葡萄糖的吸收是增强柠檬酸合成的重要策略。对黑曲霉基因组中预测到的葡萄糖转运蛋白进行进化树分析和多序列比对,鉴定到与 K/HGT1 亲缘关系较近的高亲和力葡萄糖转运蛋白基因,其编码的蛋白质序列含 11 个跨膜区,命名为 AnHGT1。在葡萄糖限制性培养基上进行生长测定,发现 HGT1 转化子的菌落直径比 H915-1 增加了 50%~150%。通过在发酵后期添加 30 g/L 葡萄糖,发现 HGT1 的葡萄糖消耗速率比 H915-1 快 12 h。最终 HGT1 转化子的柠檬酸产量比野生型菌株 H915-1 增加 14.7%,发酵时间减少 6 h,最大比产酸速率增加了 29.5%。

关键词: 高亲和力葡萄糖转运蛋白;HGT1;柠檬酸;黑曲霉

中图分类号: Q 93 **文章编号:** 1673-1689(2019)12-0059-07 **DOI:** 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.12.009

Regulation of Glucose Transporter Systems for Enhancing Citrate Production in *Aspergillus niger*

YIN Xian^{1,2}, LI Jianghua^{1,2}, LIU Long^{1,2}, DU Guocheng^{1,2}, CHEN Jian^{*1,2}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;
2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Citrate is one of the high-volume organic acids with the global production of 1.7 million tons annually mainly produced by microbial process using *Aspergillus niger* as natural producer. Glucose absorption was the first step of citrate fermentation and needed to be enhanced. The sugar transporters were analyzed based on transcriptome data, phylogenetic tree analysis and sequences alignment. The evm.model.unitig_0.1770 gene, whose relationship was the closest with K/HGT1, was predicted containing 11 transmembrane segments and named as HGT1. The growth test on glucose limited medium showed the diameter of HGT1 transformants were 50% to 150% larger than the diameter of H915-1. After addition of 30 g/L glucose into fermentation medium, the glucose consuming time of HGT1 transformants reduced for 12 h than that of H915-1. Finally, the citrate titer

收稿日期: 2016-11-28

基金项目: 国家优秀青年科学基金项目(31622001);江南大学博士研究生科学研究基金项目(JUDCF11008);江苏省研究生创新工程资助项目(CXZZ11_0477)。

作者简介: 殷 娴(1982—), 博士研究生, 主要从事发酵工程研究。E-mail: yinxianshirley@yahoo.com.cn

* 通信作者: 陈 坚(1962—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品生物技术和生化工程研究。E-mail: jchen@jiangnan.edu.cn

引用本文: 殷娴, 李江华, 刘龙, 等. 调控黑曲霉葡萄糖转运系统增强柠檬酸的合成[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(12): 59-65.

of HGT1 transformant was increased for 14.7% comparing to H915-1, the fermentation time reduced for 6 h and the maximum specific citrate production rate increased for 29.5%.

Keywords: high-affinity glucose transporter, HGT1, citrate, *Aspergillus niger*

柠檬酸 (citrate) 是最具商业价值的有机酸之一,年产量达到 170 万吨。黑曲霉(*Aspergillus niger*)是主要的柠檬酸生产菌^[1],然而根据 Alvarez-Vasquez 的模型,柠檬酸生产强度还可以有 5 倍的提高空间^[2]。目前黑曲霉的代谢工程改造策略围绕中心代谢通路和呼吸链展开^[3],表达糖酵解途径^[4-5]和 TCA 循环^[6-8]的关键酶以及交替氧化酶^[9]均无法提升柠檬酸产量,仅加强 rTCA 循环^[10]对柠檬酸合成有促进作用。在柠檬酸工业生产中,原料为淀粉,淀粉经过淀粉酶液化后过滤,得到清液和混液,通过清液和混液进行勾兑得到种子和发酵培养基,此时培养基中约一半的碳源为葡萄糖,一半碳源以多聚葡萄糖的形式存在,而工业生产菌在发酵初期合成大量糖化酶,将多聚葡萄糖分解为葡萄糖,因此,在发酵前期培养基中碳源已经基本以葡萄糖的形式存在,所以柠檬酸发酵对碳源的吸收实际上就是对葡萄糖的吸收。Torres 的研究发现黑曲霉中存在两类葡萄糖转运蛋白,一为高亲和力葡萄糖转运蛋白, K_m 值约为 260 $\mu\text{mol/L}$,另一类为低亲和力的葡萄糖转运蛋白, K_m 值约为 3.67 mmol/L^[11]。低亲和力葡萄糖转运蛋白可以提供柠檬酸发酵足够的代谢通量,但该系统仅在葡萄糖浓度高于 50 g/L 时起作用^[11]。葡萄糖转运是柠檬酸发酵的第一步,调整葡萄糖转运系统对柠檬酸发酵的影响值得研究。目前黑曲霉中已经鉴定到一个高亲和力葡萄糖转运蛋白 mstA^[12],该蛋白质在产酶黑曲霉 CBS513.88 和产酸原始菌株 ATCC1015 中存在,而在黑曲霉柠檬酸生产菌株 H915-1 中不存在,因此,H915-1 中的高亲和力葡萄糖转运蛋白需要进行鉴定。

在真菌中存在很多假定的葡萄糖转运蛋白,它们归类于主要协同转运蛋白超家族(major facilitator superfamily, MFS)^[13-14],可以是单向转运蛋白或 H^+ 同向转运蛋白,有些可以转运多种底物。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的葡萄糖转运目前研究得最透彻,含有至少 20 个转运蛋白参与葡萄糖的转运^[15],一些转运蛋白具有信号转导功能^[16-17]。在构巢曲霉(*A. nidulans*)基因组中预测到了 17 个已糖

转运蛋白^[18],白念珠菌(*Candida albicans*)基因组中含有 20 个假定的葡萄糖转运蛋白^[19]。在真菌中存在多种葡萄糖转运蛋白,说明特定条件下转运系统是多个基因差异性表达的结果。每一个转运蛋白有其特定的底物、亲和力和转运能力,调整转运蛋白可以使赋予菌体营养摄入的灵活性,使之适应多样的营养环境。

黑曲霉 H915-1 基因组中预测到 21 个葡萄糖转运蛋白,其中 1 个低亲和力葡萄糖转运蛋白在整个发酵过程中高表达,5 个高亲和力葡萄糖转运蛋白低表达(GEO 号 GSE74544)。本研究对一个假定的葡萄糖转运蛋白的功能进行鉴定,最终通过过表达转运蛋白提升了柠檬酸产量。

1 材料与方法

1.1 菌株和培养基

大肠杆菌 DH5 α 用作载体构建的宿主菌。黑曲霉 H915-1 为江苏国信协联能源有限公司(柠檬酸产量居中国第三位)的柠檬酸生产菌株,作为出发菌株。

大肠杆菌转化子利用含 100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素的 LB 培养基进行筛选,黑曲霉转化子利用含 150 $\mu\text{g/mL}$ 潮霉素的 ME 培养基(3%麦芽提取物,0.5%蛋白胨)进行筛选。柠檬酸发酵培养基为玉米清液和玉米混液的混合物,含 15%总糖和 0.08%总氮。不同葡萄糖浓度的发酵实验使用合成培养基(3 g/L NH_4NO_3 , 0.1 g/L KH_2PO_4 , 1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.015 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.001 67 g/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.008 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 3.74 g/L CaCl_2),葡萄糖浓度分别调整为 3%、5%、8%和 10%。葡萄糖限制性培养基中的葡萄糖质量浓度则分别调整为 0.05、0.1 g/L 和 0.5 g/L。

1.2 实验方法

1.2.1 表达载体的构建 共表达所用表达框包含 hph 抗性基因表达框以及 AnHGT1 表达框。载体 pUCDT 利用 *Kpn* I 和 *Bam* HI 进行酶切。HGT1 基因(NCBI 序列号 XM_001399160.2)以 H915-1 的 cDNA 为模板,利用引物 gpd-HGT-F 和 Trp-HGT-

R 进性 RT-PCR 扩增,序列两端含有 20 bp pUCDT 同源序列,利用 Vazyme One Step Clone Kit 进行同源重组形成载体 pGTH。随后 pGTH 利用 *Spe* I 和 *Not* I 进行酶切,并与用相同限制性内切酶酶切的 pHPH 连接,形成 pHGTH,包含了 2 个表达框。利用引物 pMD-F 和 pMD-R 以 pHGTH 为模板,PCR 扩增得到共表达框。所用引物序列见表 1。共表达框示意图见图 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'→3')
构建表达框的引物	
gpd-HGT-F	CTTGAGCAGACATCACCGGTACCATGTTGATTG GCAACATCTACG
Trp-HGT-R	TAACGTTTAAAGTGGATCGGATCCTTATGCTGTG GCCTCCTGGGA
pMD-F	GGCCATGAAATCCAATCATTTTC
pMD-R	GAGTGGGCGCTTACACAGTA
qPCR 引物	
HGT-F	CTGACGATGAGGACTGTT
HGT-R	GAAAGCGGACCTGAAATC
Actin-F	CGGAACCTATTGGCTTGG
Actin-R	ACAGAACGATATTGAGGTAGA

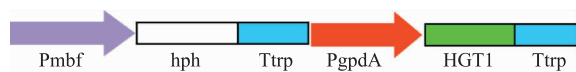


图 1 HGT1 二元表达框示意图

Fig. 1 Structure of HGT1 binary expression cassette

1.2.2 进化树分析 利用 Clustal Omega 软件对 DNA 序列进行比对,利用 MEGA5 进行进化树分析^[20]。

1.2.3 跨膜区域预测 利用在线软件 TMHMM Server v. 2.0 (www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/),对序列跨膜区域进行预测。

1.2.4 黑曲霉 H915-1 的转化 通过制备原生质体^[21],利用 PEG 介导法进行转化^[22]。所有的转化子在抗性培养基上经过 3 次单克隆培养进行纯化,纯化后的菌株进行 qPCR 鉴定。

1.2.5 黑曲霉 H915-1 的柠檬酸摇瓶发酵 黑曲霉种子培养:将黑曲霉孢子悬液以终浓度 4×10^5 个/mL 接种至种子培养基,在 35 ℃ 转速 250 r/min 培养 24 h。

摇瓶发酵:将种子培养液以体积分数 10% 接种量接种至发酵培养基以 250 r/min、35 ℃ 培养至还原糖耗尽,测定柠檬酸产量。

1.2.6 HPLC 检测有机酸 收集样品后,利用

miracloth 过滤去除菌球,溶液在 4 ℃ 经 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液经过相应稀释后,用 0.22 μm 滤膜过滤。利用 Aminex 87-H 有机酸柱进行 HPLC 检测,流动相 5 mmol/L H₂SO₄,流速 0.6 mL/min,温度 35 ℃,利用紫外检测器在 210 nm 处进行检测。

1.2.7 总糖和还原糖的测定 DNS 法测定还原糖:配制 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 g/L 的葡萄糖溶液。分别取葡萄糖溶液(或样品)1.0 mL,与 1 mL DNS 混匀,沸水浴加热 15 min,冰浴冷却后稀释定容至 10 mL,测 OD₅₄₀。

总糖的测定:取 5 mL 发酵液至 25 mL 三角瓶中,加入 6 mol/L HCl 5 mL,在沸水浴中加热 25 min 进行水解,冷却至室温。将溶液转移到 50 mL 烧杯中,调 pH 至 7~8 之间,定容至 100 mL,过滤,适当稀释后用 DNS 法测定还原糖。

还原糖的检测。利用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法检测还原糖含量。

未分解还原糖含量=总糖含量-还原糖含量。

1.2.8 qPCR 检测柠檬酸发酵过程 HGT1 基因的表达 黑曲霉发酵 8 h 和 24 h 时快速取样,用 miracloth 收集菌体,并用无菌去离子水清洗并压干,置于液氮中冻存。用 RNeasy Plant Mini Kit 参照说明书进行样品总 RNA 的抽提,利用 Takara 公司 PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser 进行反转录,qPCR 所用引物见表 1,引物 *T_m* 值为 55 ℃,产物长度为 120~150 bp,内参为 actin。误差线为 3 个生物学重复。

2 结果与讨论

2.1 柠檬酸发酵过程中葡萄糖吸收速率的变化

对黑曲霉 H915-1 柠檬酸发酵的总糖和还原糖进行测定。柠檬酸发酵前,原料淀粉经淀粉酶液化后部分分解,初始还原糖质量浓度约为 9%,未分解多糖在发酵过程中由黑曲霉分泌的糖化酶进一步降解。因此,发酵前期的还原糖质量浓度增加,为避免糖化酶分泌不足造成培养基中的淀粉持续分解,发酵后期的还原糖生成影响糖耗速率检测。在一组接种种子培养基的同时添加过量糖化酶(糖化酶酶活为 2.5 g/(mL·min),添加量为 40 μL),另一组则不添加糖化酶。2 组均在 16 h 时还原糖含量达最高值,添加糖化酶后培养基中的未分解多糖在 16 h 消化完全,未添加糖化酶的培养基则在 24 h 将未

分解多糖完全消化(图 2)。还原糖的消耗速率均在发酵后期放缓,从 80 h 的 2.09 g/L/h 逐步下降 104 h 的 1.16 g/(L·h),至 116 h 糖消耗速率仅为 0.35 g/(L·h),因此需解决糖耗速率放缓的问题。由于黑曲霉产酸阶段主要由低亲和力的葡萄糖转运蛋白承担吸收葡萄糖,在发酵后期,随着葡萄糖浓度的减少,将逐步过渡到高亲和力的葡萄糖转运蛋白接管葡萄糖的吸收,因此有必要研究葡萄糖转运系统对柠檬酸合成的影响。

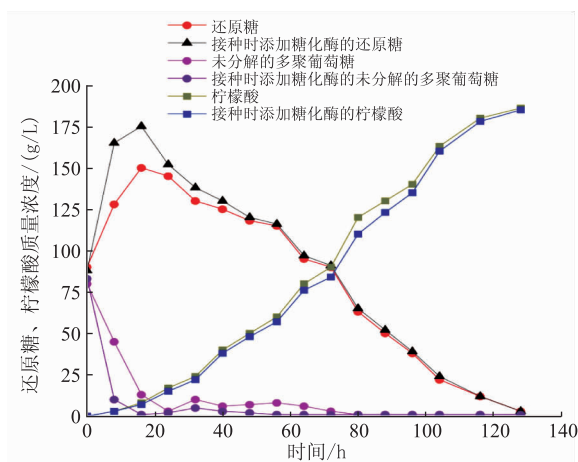


图 2 柠檬酸发酵过程中还原糖、未分解多糖质量浓度及柠檬酸质量浓度

Fig. 2 Concentration of reducing sugar, undegraded sugar and citrate titer during fermentation

2.2 葡萄糖转运蛋白的进化树分析、多序列比对及跨膜预测

对黑曲霉 H915-1 柠檬酸发酵过程中在转录水平获得表达的糖转运蛋白采用进化树分析(图 3),参考序列为 Swiss-Prot 数据库所有高亲和力葡萄糖转运蛋白。ScHXT2 为酿酒酵母的高亲和力葡萄糖

转运蛋白^[23],并没有鉴定到与之亲缘关系较近的蛋白。ScSnf3 为酿酒酵母的高亲和力葡萄糖转运蛋白,同时是葡萄糖转运的负调节因子,在低葡萄糖浓度下通过抑制 RGT1 参与诱导 HXT2 的表达^[15],evm.model.unitig_4.946 与之亲缘关系较近。KIHGT1 为乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)的高亲和力葡萄糖转运蛋白,同时可以转运半乳糖^[24],evm.model.1.1149、evm.model.unitig_0.1770 和 evm.model.unitig_3.1098 与之亲缘关系较近;进一步对这 4 条序列进行比对, evm.model.1.1149、evm.model.unitig_0.1770 和 evm.model.unitig_3.1098 与 KIHGT1 的同源性分别为 41.7%、41.0%和 43.1%(图 4)。随后对 evm.model.unitig_0.1770 进行跨膜预测,发现该蛋白含有 11 个跨膜区域,N 端在细胞膜内,C 端预测在胞内(图 5),对其命名为 AnHGT1。

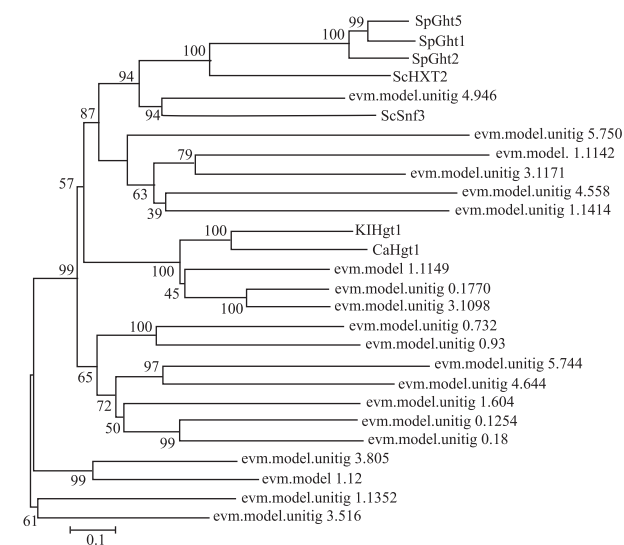


图 3 葡萄糖转运蛋白序列的进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of the sequences of glucose transporters by Neighbour-joining (NJ) method

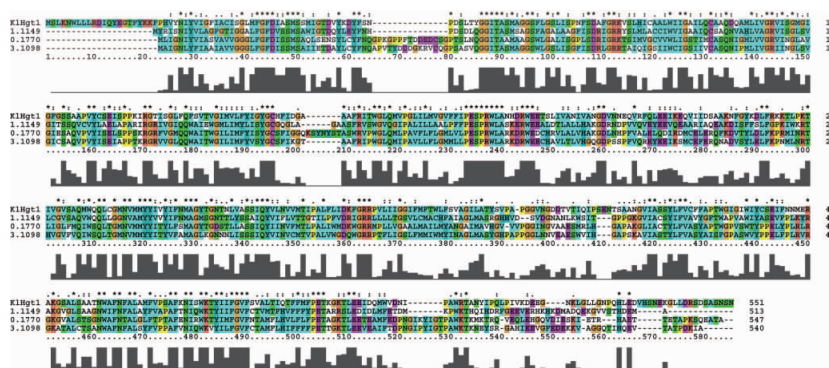


图 4 葡萄糖转运蛋白的多重序列比对分析

Fig. 4 Multiple sequence alignment of glucose transporters

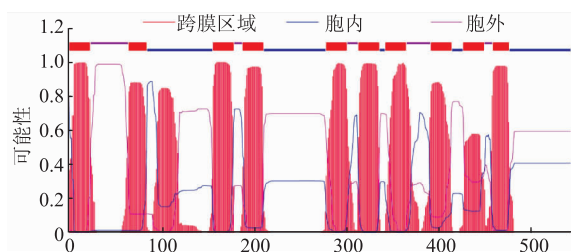


图 5 evm.model.unitig_0.1770 的跨膜预测

Fig. 5 Transmembrane helices in evm.model.unitig_0.1770

2.3 黑曲霉 HGT1 转化子的柠檬酸发酵

克隆黑曲霉自身的 HGT1 基因并构建表达框以转化黑曲霉 H915-1,得到 HGT1 转化子。对转化子进行柠檬酸发酵,利用 qPCR 检测 HGT1 基因的表达(图 6),以 H915-1 发酵 8 h 的 HGT1 表达量为 1,H915-1 中的 HGT1 基因始终弱表达;HGT1 转化子的基因在 8 h 的相对表达量是 H915-1 的 44.5 倍,24 h 的相对表达量则下降为 22.4 倍,证明 HGT1 基因在转化子中的表达,同时由于 HGT1 的启动子为 *Pgpda*,说明 *Pgpda* 在柠檬酸发酵中启动基因表达能力有所减弱。发酵前期还原糖生成速度放缓,意味着糖化酶的合成量有所降低,由于糖化酶组成型表达,因此与菌体量相耦联,可能 HGT1 的大量表达反而使菌体生长放缓,从发酵 40 h 开始,HGT1 转化子的还原糖消耗快于 H915-1,最终转化子的柠檬酸产量为 145.2 g/L,比 H915-1 增加了 14.7%,发酵时间缩短了 6 h(图 7(a)),最大比产酸速率提升了 29.5%(图 7(b))。由于发酵中后期,HGT1 的表达量比较于菌体生长阶段减弱,可能 HGT1 的表达量需要在合适的范围内才有利于菌体利用碳源。

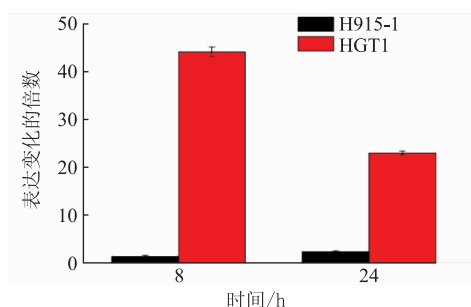


图 6 qPCR 检测 HGT1 基因的表达

Fig. 6 qPCR for varification of HGT1 gene expression

进一步检测 HGT1 转化子在不同浓度碳源下的柠檬酸发酵,如图 8(a)所示,在复合培养基中,初始葡萄糖浓度从 3%逐步提升至 10%,HGT1 转化子的

柠檬酸产量始终比 H915-1 提高 6%左右,表明 HGT1 的表达有利于柠檬酸的合成。利用合成培养基,在发酵 120 h 碳源耗尽的情况下,添加 30 g/L 葡萄糖到培养基中,检测葡萄糖的消耗,由图 8(b)可知,HGT1 转化子对葡萄糖的吸收快于 H915-1,转化子完全消耗葡萄糖花费了 26 h,而 H915-1 则在 38 h 时依然可检测到微量的葡萄糖,证明了 HGT1 的表达蛋白具有葡萄糖转运的功能,在低浓度碳源条件下促进了葡萄糖的吸收。同时,HGT1 转化子的柠檬酸产量始终高于 H915-1,表明促进葡萄糖的转运可进一步促进 H915-1 合成柠檬酸。

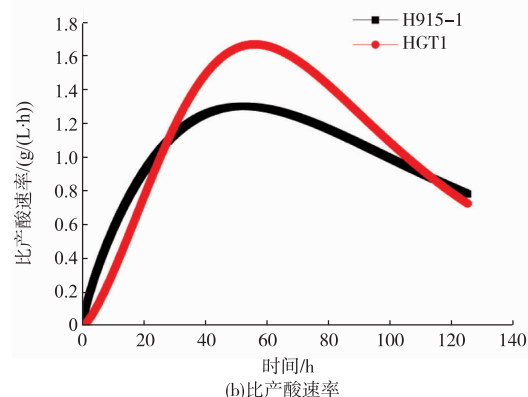
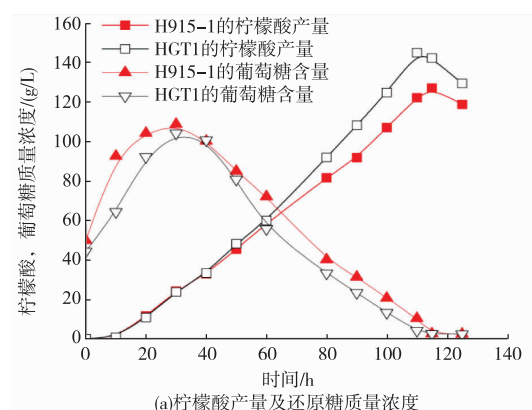
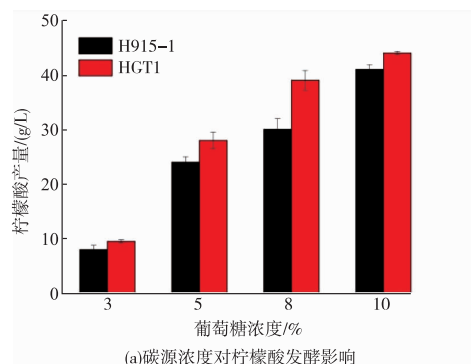
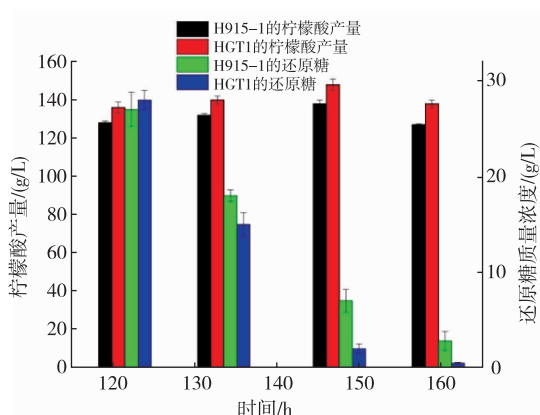


图 7 HGT1 转化子的柠檬酸发酵

Fig. 7 Citrate fermentation of HGT1 transformants



(a)碳源浓度对柠檬酸发酵影响



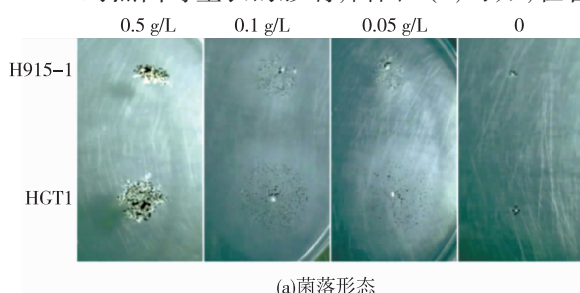
(b) 柠檬酸发酵的葡萄糖添加实验(在发酵120 h时添加了30 g/L葡萄糖)

图8 不同条件下的柠檬酸发酵

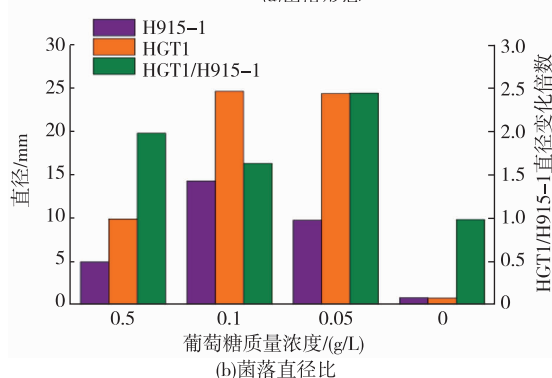
Fig. 8 Citrate fermentation under different conditions

2.4 HGT1 对黑曲霉在葡萄糖限制性培养基上生长的影响

在平板上涂布稀释的黑曲霉孢子,在34℃静置培养24 h至长出单菌落,将单菌落接种于低浓度碳源培养基上,34℃培养4 d,测量菌落直径,检测HGT1对黑曲霉生长的影响,由图9(a)可知,在各质



(a) 菌落形态



(b) 菌落直径比

图9 葡萄糖限制性培养基上菌落的生长

Fig. 9 Growth of strains in limited glucose media

量浓度葡萄糖限制性培养基上^[25],HGT1转化子的菌落生长强于H915-1。转化子和H915-1的菌丝形态没有明显差异,在0.5 g/L葡萄糖质量浓度下形成致密菌落,菌落直径较小,显微镜下显示菌丝为短粗状,孢子囊较大;降低碳源质量浓度至0.1 g/L导致菌丝成发散的细丝状,并贴在培养基表面生长以吸收贫瘠的碳源,孢子囊细小,但和菌丝一样分散生长,使菌落直径比0.5 g/L葡萄糖时更大。但进一步降低葡萄糖质量浓度并没有扩大菌落,因为菌体生长受碳源限制而更缓慢。由菌落直径比(图9(b))可知,HGT1转化子在各质量浓度葡萄糖限制性培养基上生长的菌落直径比H915-1增加约50%~150%,说明HGT1的组成型表达有利于菌体在低质量浓度葡萄糖培养基上生长,意味着糖转运速度的加快,证明HGT1蛋白具有转运葡萄糖的功能。

3 结语

本文作者对黑曲霉H915-1基因组中假定的葡萄糖转运蛋白进行了研究,通过进化树分析、序列比对分析,获得与KIHGT1亲缘关系较近的evm.model.unitig_0.1770序列,经跨膜预测该蛋白含有11个跨膜区域,N端在细胞膜内,C端在胞内,将其命名为AnHGT1。在H915-1中组成型表达HGT1基因,转化子的柠檬酸产量比对照增加了14.7%,发酵时间缩短了6 h,最大比产酸速率提升了29.5%。且在不同碳源浓度的培养基中,HGT1转化子的柠檬酸产量均高于H915-1,表明增加葡萄糖吸收速度有利于强化柠檬酸合成。葡萄糖补加实验表明HGT1转化子完全消耗葡萄糖的时间比H915-1缩短了12 h,证明了HGT1蛋白具有转运葡萄糖的功能。在限制性葡萄糖培养基上的生长实验,发现HGT1转化子的菌落直径比对照增加50%~150%,进一步证明HGT1具有转运葡萄糖的功能。本研究提高了黑曲霉菌株生产柠檬酸的产量,对柠檬酸产业具有积极意义,并且确定了新的高亲和力葡萄糖转运蛋白的功能,丰富了对黑曲霉葡萄糖转运系统的认识,为后续改造黑曲霉提供了依据。

参考文献:

- [1] PAPAGIANNI M. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling[J]. *Biotechnol Adv*, 2007, 25(3): 244-263.
- [2] ALVAREZ-VASQUEZ F, GONZALEZ-ALCON C, NESTOR V T. Metabolism of citric acid production by *Aspergillus niger*:

- model definition, steady-state analysis and constrained optimization of citric acid production rate [J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 2000, 70(1):82-108.
- [3] YIN X, LI J, SHIN H D, et al. Metabolic engineering in the biotechnological production of organic acids in the tricarboxylic acid cycle of microorganisms. Advances and prospects[J]. **Biotechnol Adv**, 2015, 33(6 Pt 1):830-841.
- [4] RUIJTER G, PANNEMAN H, VISSER J. Overexpression of phosphofructokinase and pyruvate kinase in citric acid-producing *Aspergillus niger*[J]. **BBA-Gen Subjects**, 1997, 1334(2):317-326.
- [5] VAN L D S, TAMAYO-RAMOS J A, SCHONEWILLE T, et al. Overexpression of a modified 6-phosphofructo-1-kinase results in an increased itaconic acid productivity in *Aspergillus niger*[J]. **AMB Express**, 2013, 3(1):57.
- [6] MEIJER S, OTERO J, OLIVARES R, et al. Overexpression of isocitrate lyase—glyoxylate bypass influence on metabolism in *Aspergillus niger*[J]. **Metab Eng**, 2009, 11(2):107-116.
- [7] RUIJTER G J, PANNEMAN H, XU D B, et al. Properties of *Aspergillus niger* citrate synthase and effects of citA overexpression on citric acid production[J]. **FEMS Microbiol Lett**, 2000, 184(1):35-40.
- [8] MEIJER S, NIELSEN M L, OLSSON L, et al. Gene deletion of cytosolic ATP:citrate lyase leads to altered organic acid production in *Aspergillus niger*[J]. **J Ind Microbiol Biot**, 2009, 36(10):1275-1280.
- [9] KIRIMURA K, OGAWA S, HATTORI T, et al. Expression analysis of alternative oxidase gene (aox1) with enhanced green fluorescent protein as marker in citric acid-producing *Aspergillus niger*[J]. **J Biosci Bioeng**, 2006, 102(3):210-214.
- [10] DE JONGH W A, NIELSEN J. Enhanced citrate production through gene insertion in *Aspergillus niger* [J]. **Metab Eng**, 2008, 10(2):87-96.
- [11] TORRES N V, RIOLCIMAS J M, WOLSCHEK M, et al. Glucose transport by *Aspergillus niger*: The low affinity carrier is only formed during growth on high glucose concentrations[J]. **Appl Microbiol Biot**, 1996, 44(6):790-794.
- [12] JORGENSEN T R, VANKUYK P A, POULSEN B R, et al. Glucose uptake and growth of glucose-limited chemostat cultures of *Aspergillus niger* and a disruptant lacking MstA, a high-affinity glucose transporter[J]. **Microbiology**, 2007, 153(Pt6):1963-1973.
- [13] SUN L, ZENG X, YAN C, et al. Crystal structure of a bacterial homologue of glucose transporters GLUT1-4 [J]. **Nature**, 2012, 490:361-366.
- [14] GREGOR MADEJ M, SUN L F, YAN N, et al. Functional architecture of MFS d-glucose transporters[J]. **Proc Natl Acad Sci USA**, 2014, 111(7):E719-E727.
- [15] JOHNSTON M. Feasting, fasting and fermenting. Glucose sensing in yeast and other cells[J]. **Trends Genet**, 1999, 15(1):29-33.
- [16] KIM J H, JOHNSTON M. Two glucose-sensing pathways converge on Rgt1 to regulate expression of glucose transporter genes in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **J Biol Chem**, 2006, 281(36):26144-26149.
- [17] RODKAER S V, FAERGEMAN N J. Glucose- and nitrogen sensing and regulatory mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **FEMS Yeast Res**, 2014, 14(5):683-696.
- [18] WEI H, VIENKEN K, WEBER R, et al. A putative high affinity hexose transporter, hxtA, of *Aspergillus nidulans* is induced in vegetative hyphae upon starvation and in ascogenous hyphae during cleistothecium formation [J]. **Fungal Genet Biol**, 2004, 41(2):148-156.
- [19] FAN J F, CHATURVEDI V, SHEN S H. Identification and phylogenetic analysis of a glucose transporter gene family from the human pathogenic yeast *Candida albicans*[J]. **J Mol Evol**, 2002, 55(3):336-346.
- [20] SIEVERS F, WILM A, DINEEN D, et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega[J]. **Mol Syst Biol**, 2011, 7:539.
- [21] YIN Xian, PANG Dongqia, HAN Ruizhi, et al. Protoplasting improvement of industrial citrate-producing *Aspergillus niger* for DNA transformation[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2016, 35(9):963-970.
- [22] BLUMHOFF M, STEIGER M G, MARX H, et al. Six novel constitutive promoters for metabolic engineering of *Aspergillus niger* [J]. **Appl Microbiol Biot**, 2013, 97(1):259-267.
- [23] KASAHARA T, MAEDA M, ISHIGURO M, et al. Identification by comprehensive chimeric analysis of a key residue responsible for high affinity glucose transport by yeast HXT2[J]. **J Biol Chem**, 2007, 282(18):13146-13150.
- [24] BARUFFINI E, GOFFRINI P, DONNINI C, et al. Galactose transport in *Kluyveromyces lactis*: major role of the glucose permease Hgt1[J]. **FEMS Yeast Res**, 2006, 6(8):1235-1242.
- [25] KLOCKOW C, STAHL F, SCHEPER T, et al. In vivo regulation of glucose transporter genes at glucose concentrations between 0 and 500 mg/L in a wild type of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **J Biotechnol**, 2008, 135(2):161-167.