

耐热黑曲霉 3.316 菌株全基因组测序及分析

高亚男 朱凤妹 李军[✉]

河北科技师范学院 河北 秦皇岛 066600

摘要: 黑曲霉 3.316 是一株耐热型丝状真菌, 最高生长温度达 47℃, 在工业发酵中有着巨大的应用潜力。为了更加充分地在工业发酵中利用其耐热特性, 需要对菌株信息进行全面了解。通过 PacBio Sequel 测序平台的 CLR 测序方式对黑曲霉 3.316 菌株进行全基因组测序。结果表明, 基因组最后得到 15 个 contigs, 总长度为 34 956 132bp, GC 含量为 49.21%, 预测到 10 032 个编码基因, 在 GO、KOG、KEGG 数据库分别有 6 901、2 118 和 9 494 个基因得到注释。通过分析比较得到黑曲霉耐热性与抗氧化相关基因超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 有密切关系, 这为后续研究黑曲霉 3.316 耐热特性提供可靠信息, 同时为应对工业发酵中的高能耗、高生产成本以及高温环境的现状提供优良菌株。

关键词: 黑曲霉, 全基因组测序, 基因功能注释

[引用本文] 高亚男, 朱凤妹, 李军, 2021. 耐热黑曲霉 3.316 菌株全基因组测序及分析. 菌物学报, 40(7): 1737-1750

Gao YN, Zhu FM, Li J, 2021. Whole-genome sequencing and analysis of a thermotolerant strain *Aspergillus niger* 3.316. Mycosystema, 40(7): 1737-1750

Whole-genome sequencing and analysis of a thermotolerant strain *Aspergillus niger* 3.316

GAO Ya-Nan ZHU Feng-Mei LI Jun[✉]

Hebei Normal University of Science & Technology, Qinhuangdao, Hebei 066600, China

Abstract: *Aspergillus niger* 3.316 is a heat-resistant filamentous fungus strain with a maximum growth temperature of 47°C, having an application potential for fermentation industry. In order to make full use of its functionality in industrial fermentation, a comprehensive understanding of the strain information is required. The whole genome of *Aspergillus niger* 3.316 strain was sequenced through CLR sequencing method of the PacBio Sequel sequencing platform. The results showed that the genome finally obtained 15 contigs with a total length of 34 956 132bp and GC content of 49.21%, and 10 032 coding genes were predicted. There are 6 901, 2 118 and

基金项目: 国家自然科学基金 (31570374, 31470542); 河北省自然科学基金 (C2015407059)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31570374, 31470542), and Natural Science Foundation of Hebei Province (C2015407059).

✉ Corresponding author. E-mail: spgcn@163.com

ORCID: GAO Ya-Nan (0000-0003-0540-5616)

Received: 2020-12-11, accepted: 2021-03-23

9 494 genes annotated in the GO, KOG, and KEGG databases, respectively. Through analysis and comparison, it is found that the heat tolerance of *Aspergillus niger* is closely related to the antioxidant-related genes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). This finding provides reliable information for the follow-up study on the heat resistance characteristics of *Aspergillus niger* 3.316, and solving the high energy consumption, high production costs and high temperature environment affecting industrial fermentation.

Key words: *Aspergillus niger*, whole genome sequencing, gene function annotation

黑曲霉 *Aspergillus niger* 是一种丝状真菌, 常见于粮食和土壤中 (Kowalczyk *et al.* 2014)。黑曲霉具有表达量大、分泌率高、便于大规模培养等特点, 常作为生产蛋白的宿主 (李杰等 2017; Liu *et al.* 2018) 和生产次级代谢产物的细胞工厂 (Sloothaak *et al.* 2016; Sarkari *et al.* 2017)。作为发酵工业的安全菌株, 广泛用于有机酸、酶制剂 (Harshvadan *et al.* 2015; 林毅英 2018) 生产等。

一般黑曲霉菌株的最适生长范围为 25–27℃, 较少有超过 36℃, 在发酵工业过程中, 高温会降低黑曲霉细胞的存活率, 严重制约了发酵产品的质量和产量, 甚至造成菌体死亡。而在实际生产中除气候变化升温外, 细胞新陈代谢和机械搅拌也大量产热, 会使发酵醪液的温度达到 40℃ 以上, 这就需要消耗大量的冷却水和动力能源, 出于节约生产成本的考虑需要生产菌种能够具备耐高温的能力, 同时高温也可以抑制发酵过程中杂菌的生长, 因此, 分析具备耐高温能力的黑曲霉菌株对降低控制过程能耗和生产成本至关重要。经实验室前期研究发现黑曲霉 3.316 菌株具有良好的耐热特性, 其最适生长范围在 33–37℃ 之间, 最高生长温度高达 47℃ (Deng *et al.* 2020), 这对解决发酵工业过程高温产生危害的问题极为重要。

为使黑曲霉 3.316 的耐热特性在发酵工业中得到有效利用, 需要对菌株进行全基因

组测序以便更好地了解其背景信息。到目前为止, 已有 4 株黑曲霉完成了全基因组测序, 分别是黑曲霉 CBS513.88 (Pel *et al.* 2007)、ATCC9029 (Andersen & Nielsen 2009)、ATCC1015 (Andersen *et al.* 2011) 和 SH2 (Yin *et al.* 2014)。随着测序技术的发展, 第 3 代测序技术 (PacBio Sequel) 已成为全基因组测序的一种高效检测手段, 其具有超长读长、无需 PCR 扩增、运行时间短等特点 (Ee *et al.* 2014; Kiran *et al.* 2015), 在鉴定微生物类别和开发工程菌中起到重要作用 (Li *et al.* 2014; Yu *et al.* 2014; 乌日拉嘎等 2016), 广泛地应用于生物、医学等领域。

本研究应用 PacBio Sequel 测序平台对黑曲霉 3.316 进行全基因组测序, 同时对基因序列进行基因预测和功能注释, 为黑曲霉 3.316 功能基因的挖掘与利用以及作为细胞工厂提供可靠的数据, 同时也为其后续耐热性研究提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 黑曲霉 3.316, 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心 (CGMCC)。

1.1.2 培养基: PDA 培养基: 琼脂 15g, 蔗糖 30g, 硝酸钠 3g, 七水硫酸镁 0.5g, 氯化钾 0.5g, 四水硫酸亚铁 0.01g, 蒸馏水 1 000mL, pH 6.0–6.5, 121℃ 条件下灭菌 20min。察氏

培养基: 蔗糖 30g, 硝酸钠 3g, 七水硫酸镁 0.5g, 氯化钾 0.5g, 四水硫酸亚铁 0.01g, 蒸馏水 1 000mL, pH 6.0–6.5, 121℃ 条件下灭菌 20min (闫青等 2017)。

1.1.3 仪器: MJX-250B-Z 霉菌培养箱 (上海博迅实业有限公司医疗设备厂); ZQPL-200 立式全温振荡培养箱 (天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司); 琼脂糖凝胶电泳仪 (德国耶拿分析仪器股份公司); PacBio Sequel 测序平台 (PacBio Biosciences 公司)。

1.1.4 试剂: 琼脂糖 (Gene Tech 有限公司); DNA 黏合酶 (大连宝生物工程有限公司); 真菌 DNA 提取试剂盒 (赛默飞世尔科技有限公司); SMRT bell TM Template kit 试剂盒 (上海宾智生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取: 将黑曲霉 3.316 菌株于 PDA 斜面培养基上进行活化培养。挑取长势良好的菌丝配置成孢子悬液并按 10% 比例接种于察氏培养基中, 于 35℃、155r/min 培养 60h。收集菌丝球经 PBS 洗脱, 采用 CTAB 法提取基因组 DNA (King *et al.* 2015), 并通过琼脂糖凝胶电泳和脉冲电泳检测 DNA 的纯度和完整性。

1.2.2 文库构建和 PacBio 测序: 将上述电泳检测得到的 DNA 合格样品, 按照文库构建的步骤来完成文库的制备 (丁芮涵 2020)。通过 Qubit 定量、Agilent 2100 检测文库质量, 随后进行 PacBio Sequel 平台测序。

1.2.3 基因组序列组装与预测: 对测序得到的数据进行过滤处理, 由于黑曲霉 3.316 为丝状真菌, 所以运用 SMRT Link v5.1.0 (<https://www.pacb.com/support/software-downloads/>) 软件 (Reiner *et al.* 2018; Simon *et al.* 2018) 对 reads 进行基因组组装。通过 Genewise 软件 (Birney *et al.* 2004), 其参数设置为: blast_

eval≤1E-5, align_rate≥0.5, 并以黑曲霉 ATCC 1015 为比对对象, CLR 测序方式进行全基因组测序和基因预测。

1.2.4 基因功能注释: 将预测基因的蛋白序列与 Nr、Swiss-Prot、KEGG、KOG、GO、TCDB (Transporter Classification Database)、PHI (Pathogen Host Interactions Database)、DFVF (Database of Fungal Virulence Factors)、P450 (cytochromeP450)、Secretory、CAZy (Carbohydrate-Active enZymes Database) 数据库进行 Diamond (Conesa *et al.* 2005) 比对注释 (evalue≤1E-5)。选取最高 score 的比对结果进行注释 (默认 identity≥40%, coverage≥40%)。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 检测分析

提取黑曲霉 3.316 基因组 DNA 经过琼脂糖凝胶电泳和脉冲电泳 (图 1), 可以看

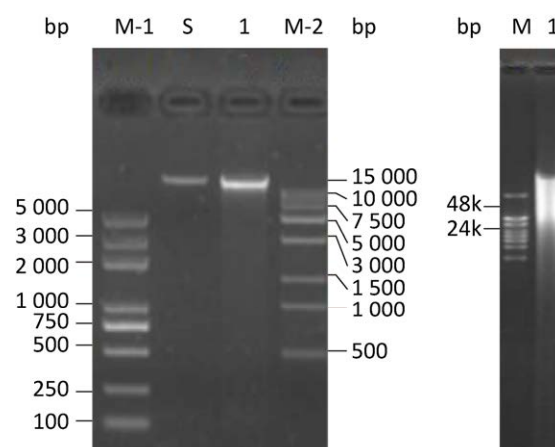


图 1 黑曲霉 3.316 DNA 电泳图谱 M-1: Tranns 2k plus; M-2: 1kb DNA extension ladder; M: 1kb DNA extension ladder; S: 标准品; 1: 样品

Fig. 1 *Aspergillus niger* 3.316 DNA electrophoresis pattern. M-1: Tranns 2k plus; M-2: 1kb DNA extension ladder; M: 1kb DNA extension ladder; S: Standard product; 1: Sample.

到一条清晰条带，其条带大小主要分布在 30–50kb 之间，此外，经过 NanoDrop 和 Qubit 检测，得出 DNA 浓度为 316ng/μL，DNA 纯度为 1.09（DNA 纯度=NanoDrop 浓度/Qubit 浓度，本次测得的 NanoDrop 浓度为 345，Qubit 浓度为 316），综合得到 DNA 的片段大小、纯度、浓度以及完整性说明提取的 DNA 符合标准，可以建库。

2.2 基因组组装与预测

采用 PacBio Sequel 测序平台对黑曲霉 3.316 进行全基因组测序，其测序数据统计见表 1。

结果显示黑曲霉 3.316 过滤后的有效 reads 为 320 797 个，平均测序读长为 10 097bp。使用 SMRT Link v5.1.0 软件对黑曲霉 3.316 进行基因组组装，其组装结果统计情况见表 2。

结果显示，黑曲霉 3.316 组装后基因组共获得 15 个 contigs，总长度为 34 956 132bp，GC 含量为 49.21%。通过使用 Genewise 软件，以黑曲霉 ATCC1015 为比对对象，对黑曲霉 3.316 进行基因预测，得到 10 032 个编码的基因，读长总值为 16 454 354bp、读长平均值为 1 640bp，其基因的长度分布见表 3。黑曲

表 1 测序数据统计

Table 1 Sequencing data statistics

样本	平均测序质量得分	Reads 个数	数据量	平均测序读长	测序读长 N50 长度
Sample	Mean concordance	Number of reads	Number of bases (bp)	Mean read length (bp)	N50 (bp)
黑曲霉 3.316 <i>Aspergillus niger</i> 3.316	0.90	320 797	3 239 017 298	10 097	12 940

表 2 组装结果统计

Table 2 Statistics of assembly results

样本	Contig 总数	最大的 contig 长度	N50 长度	Contigs 的总长度	Contig 的 GC 含量
Sample	Contigs	Max length (bp)	N50 length (bp)	Total length (bp)	GC (%)
黑曲霉 3.316 <i>Aspergillus niger</i> 3.316	15	6 089 951	3 838 533	34 956 132	49.21

表 3 编码基因长度分布

Table 3 Length distribution of coding genes

序列长度	基因个数	百分比	序列长度	基因个数	百分比	序列长度	基因个数	百分比
Sequence length (bp)	Gene No.	Ratio (%)	Sequence length (bp)	Gene No.	Ratio (%)	Sequence length (bp)	Gene No.	Ratio (%)
0–100	0	0.00	900–1 000	565	5.63	1 800–1 900	306	3.05
100–200	0	0.00	1 000–1 100	659	6.57	1 900–2 000	248	2.47
200–300	131	1.31	1 100–1 200	553	5.51	2 000–2 100	228	2.27
300–400	233	2.32	1 200–1 300	517	5.15	2 100–2 200	190	1.89
400–500	295	2.94	1 300–1 400	476	4.74	2 200–2 300	176	1.75
500–600	347	3.46	1 400–1 500	474	4.72	2 300–2 400	138	1.38
600–700	371	3.70	1 500–1 600	548	5.46	2 400–2 500	162	1.61
700–800	447	4.72	1 600–1 700	487	4.85	>2 500	1 572	15.67
800–900	503	5.01	1 700–1 800	406	4.05	Total	10 032	100

霉 3.316 的序列长度主要分布在 700–1 700bp 及>2 000bp 的范围内, 其中>2 000bp 的基因分布最多, 达到 1 572 个基因, 占全部编码基因的 15.67%。

2.3 基因功能注释

将预测基因与相应数据库进行比对, 其基因功能分析结果分别有 9 998、3 466、9 494、2 118、528、6 901、1 288、442、216、715、494 个基因在对应的 Nr、SwissProt、KEGG、KOG、TCDB、GO、PHI、DFVF、P450、Secretory、CAZy 数据库获得注释(图 2)。主要的数据库注释分析如下。

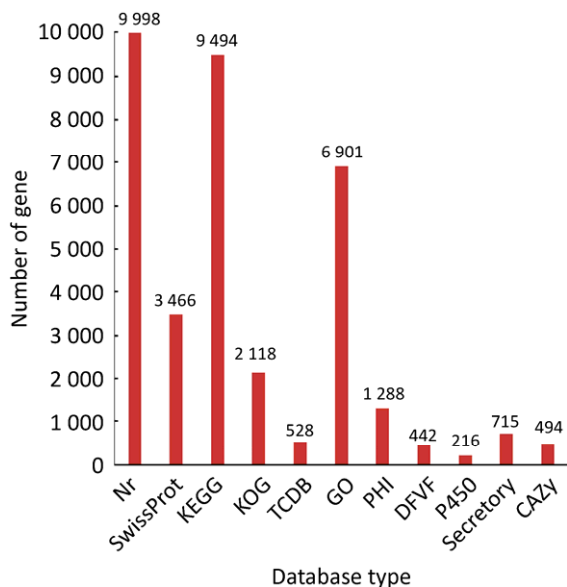


图 2 基因功能分析结果统计图

Fig. 2 Statistical graph of gene function analysis results.

2.3.1 GO 功能注释: GO 数据库是用于描述基因功能的通用系统, 主要包括分子功能、细胞成分和生物过程 3 个方面(王媛 2017)。其黑曲霉 3.316 GO 功能注释统计结果, 黑曲霉 3.316 在 GO 功能注释中共有 6 901 个基因得到注释, 占全部编码基因百分比为 68.79%(图 3)。

在细胞成分分类中, 有 13 种功能特性得到注释, 其中细胞、细胞组分注释到的基因最多, 为 2 595 个, 其次和细胞器有关的基因为 1 166 个; 在生物过程类中, 有 24 种功能特性得到注释, 其中与代谢功能有关的基因富集最为显著, 达到 3 752 个, 与细胞过程相关基因有 3 568 个; 在分子功能类中, 有 12 种功能特性得到注释, 其中连接功能注释到的基因个数最高达到 3 549 个, 其次是催化活性为 3 496 个。在 GO 数据库中与抗氧化相关的基因有 21 个, 具体信息见表 4。

2.3.2 KEGG 功能注释: KEGG 数据库是综合分析基因组信息、生化系统信息以及化学分析信息的通用系统(张继垒 2018; 宋希磊 2019)。由黑曲霉 3.316 的 KEGG 功能注释统计结果可知, 在 KEGG 功能注释中共有 9 494 个基因得到注释, 占全部编码基因百分比为 94.61%(图 4)。

在细胞过程类中, 有 5 种通路得到注释, 其中运输和分解代谢物通路的基因数目富集最为明显, 为 266 个, 其次是细胞生长和死亡通路基因注释相对较多, 为 159 个; 在环境信息处理类中, 有 3 种通路得到注释, 其中信号转导通路基因注释最为明显, 为 235 个; 在遗传信息处理类中, 有 4 种通路得到注释, 其中翻译通路的基因数目最多, 为 284 个; 在人类疾病类中, 有 12 种通路得到注释, 其中感染性疾病通路基因占比最高, 为 152 个; 在代谢类中, 有 12 种通路得到注释, 主要集中在碳水化合物代谢和氨基酸代谢通路, 基因个数分别为 344 个和 293 个; 在生物系统类中, 有 10 种通路得到注释, 其中最为明显的是内分泌系统, 基因个数为 106 个, 其次是环境适应性, 基因个数为 97 个。在 KEGG 数据库中与能量代谢相关的通路主要有 3 条, 具体信息见表 5。

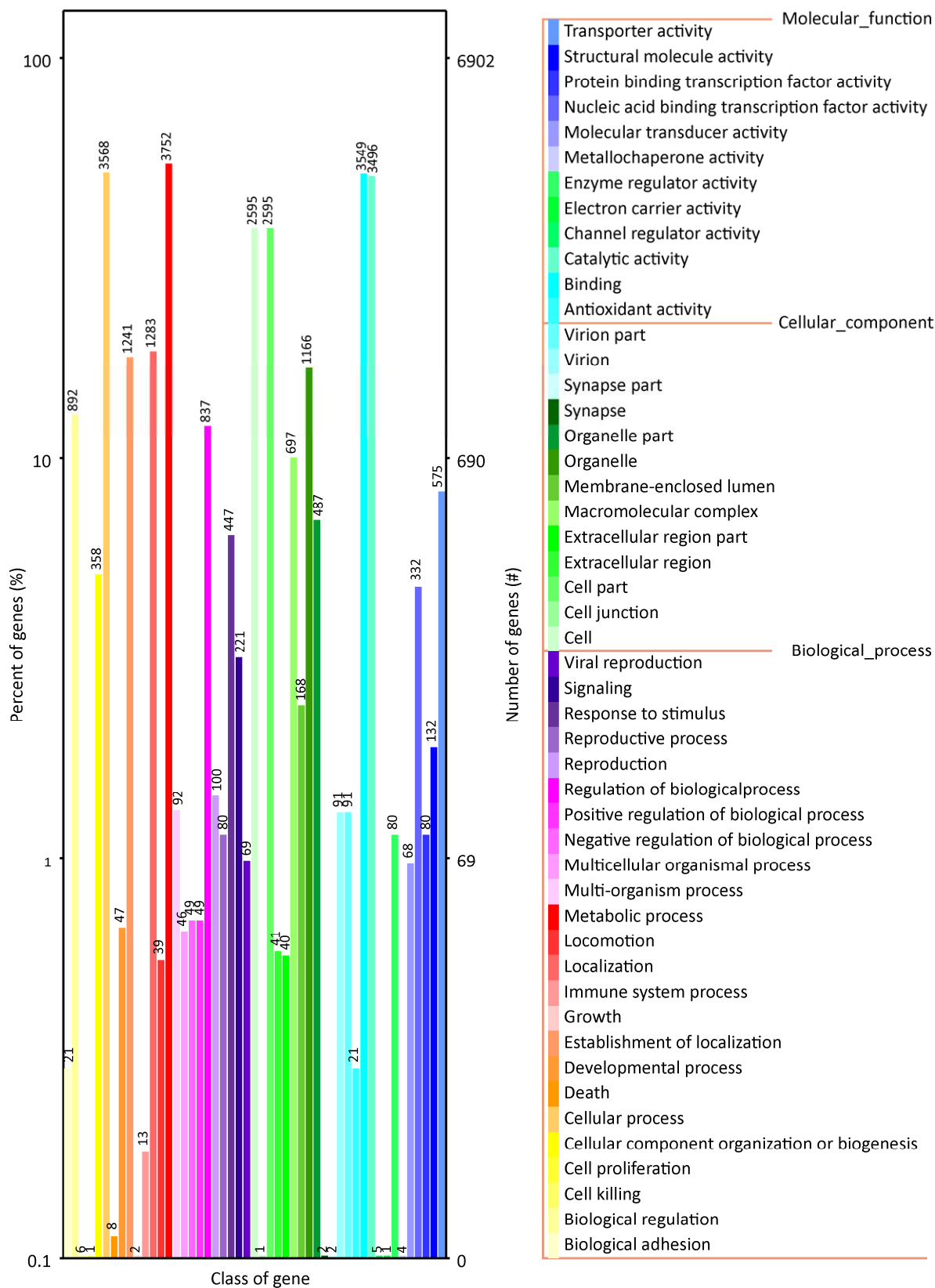


图 3 GO 功能注释图

Fig. 3 GO function annotation diagram.

表 4 抗氧化基因

Table 4 Antioxidant gene

序号	Gene 编码	GO 编码	GO 描述
No.	Gene ID	GO ID	GO description
1	A01252	0046872; 0004784	Metal ion binding; superoxide dismutase activity
2	A02081	0046872; 0004784	Metal ion binding; superoxide dismutase activity
3	A05749	0046872; 0004784	Metal ion binding; superoxide dismutase activity
4	A02387	0004602; 0016491	Glutathione peroxidase activity; oxidoreductase activity
5	A00938	0004601	Peroxidase activity
6	A02569	0004601	Peroxidase activity
7	A02945	0004601; 0020037	Peroxidase activity; heme binding
8	A05807	0020037; 0004601	Peroxidase activity; heme binding
9	A07222	0004601	Peroxidase activity
10	A0970	0004601; 0005509	Peroxidase activity; calcium ion binding
11	A07251	0050664; 0004601; 0043565; 000370	Oxidoreductase activity, acting on NADH or NADPH, oxygen as acceptor; peroxidase activity; sequence-specific DNA binding; sequence-specific DNA binding transcription factor activity
12	A09917	0004601; 0020037	Peroxidase activity; heme binding
13	A02946	0004096; 0020037	Catalase activity; heme binding
14	A03347	0020037; 0004096	Catalase activity; heme binding
15	A06250	0020037; 0004096	Catalase activity; heme binding
16	A07488	0004096; 0020037	Catalase activity; heme binding
17	A07870	0020037; 0008324; 0004096	Catalase activity; heme binding; cation transmembrane transporter activity
18	A08237	0020037; 0004096	Catalase activity; heme binding
19	A08846	0020037; 0004096	Catalase activity; heme binding
20	A09902	0004096; 0030151; 0020037; 0030170	Catalase activity; molybdenum ion binding; pyridoxal phosphate binding; heme binding
21	A02964	0020037; 0004096	Catalase activity; heme binding

2.3.3 KOG 功能注释：KOG 数据库是一个针对真核生物直系同源基因注释的数据库（孙霞 2013；金伟伟 2017）。KOG 数据库按照功能一共可以分为 25 类，由黑曲霉 3.316 KOG 功能注释统计结果可知，在 KOG 功能注释中共有 2 118 个基因得到注释，占全部编码基因百分比为 21.11%（图 5）。其中一般功能预测基

因富集最为显著，达到 278 个，其次是翻译后修饰和修复基因注释为 227 个，而能量产生与转化、氨基酸的转运与代谢、核糖体的结构与生物的合成、信号的转导机制、碳水化合物的转运与代谢以及细胞内转运、分泌和囊泡运输基因注释也相对较多，分别为 200 个、195 个、194 个、131 个、115 个和 115 个。

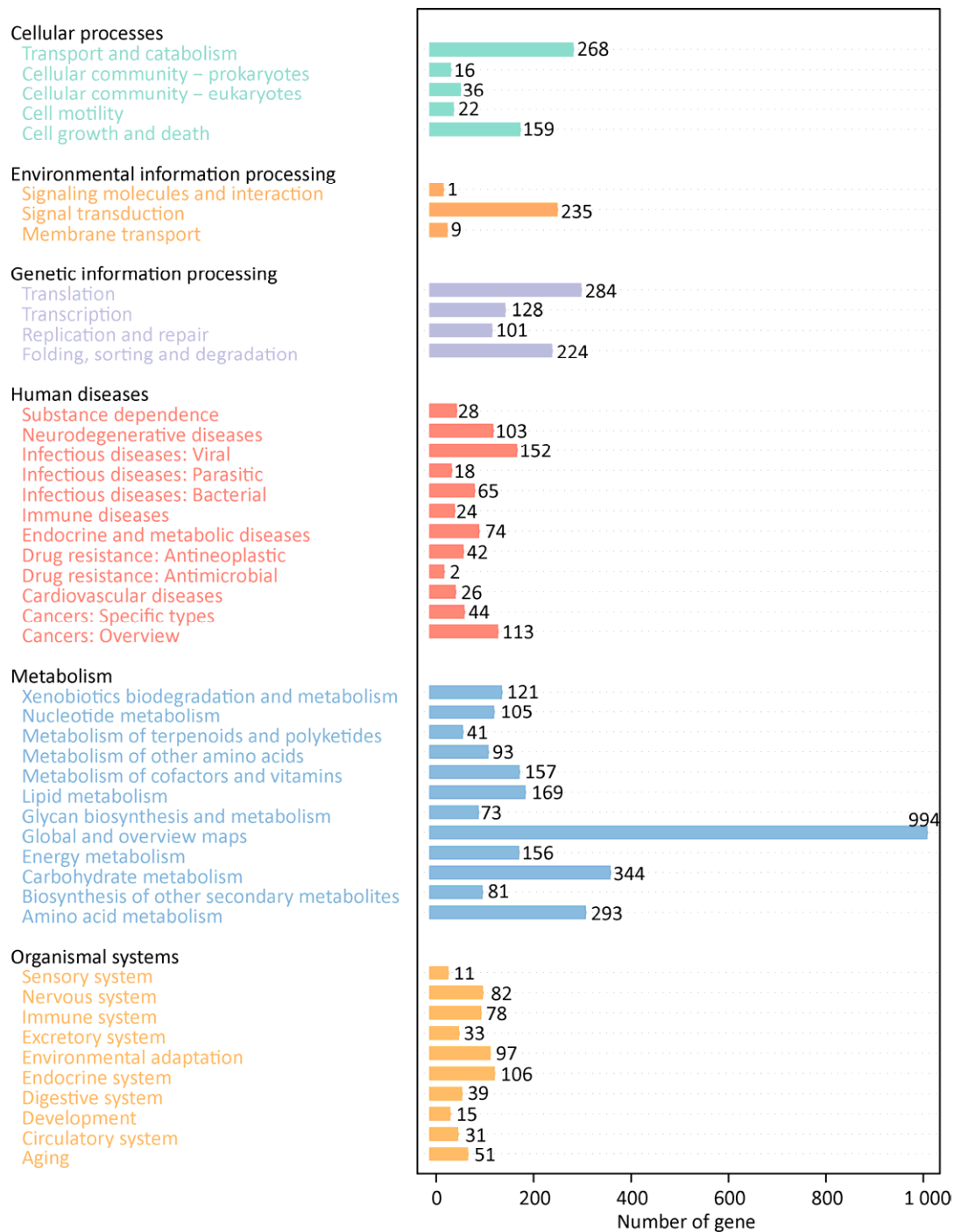


图 4 KEGG 功能注释图

Fig. 4 KEGG function annotation diagram.

3 讨论

微生物基因组学和测序技术的发展，为阐明单个基因的功能向解析整个基因的表达

调控提供了坚实的数据基础，使我们能够快速、经济地完成微生物的全基因组测序和功能注释(张博阳等 2018)。本研究利用 PacBio Sequel 第三代测序技术对耐热型黑曲霉

表 5 能量代谢的主要通路

Table 5 Main pathway of energy metabolism

序号	Pathway 编码	Pathway 水平	确定的 KOs
No.	Pathway ID	Pathway level	Identified KOs
1	map00563	Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchor biosynthesis	K09658, K03861, K03858, K03859, K05293, K05292, K05291, K05284, K05287, K03434, K05286, K05289, K05285, K03857, K05288, K05283, K07542
2	map00020	Citrate cycle (TCA cycle)	K00382, K00164, K00658, K01899, K01900, K00031, K00030, K01648, K01679, K01681, K01647, K00026, K01958, K00161, K00162, K00627, K01610, K00234, K00235, K00236, K00237
3	map00010	Glycolysis/Gluconeogenesis	K01624, K00128, K00129, K01568, K00002, K13953, K00121, K00161, K00162, K00627, K00016, K00873, K01689, K00134, K01803, K00850, K03841, K01810, K01835, K00844, K01792, K01785, K00382, K00927, K01610, K01895, K15633

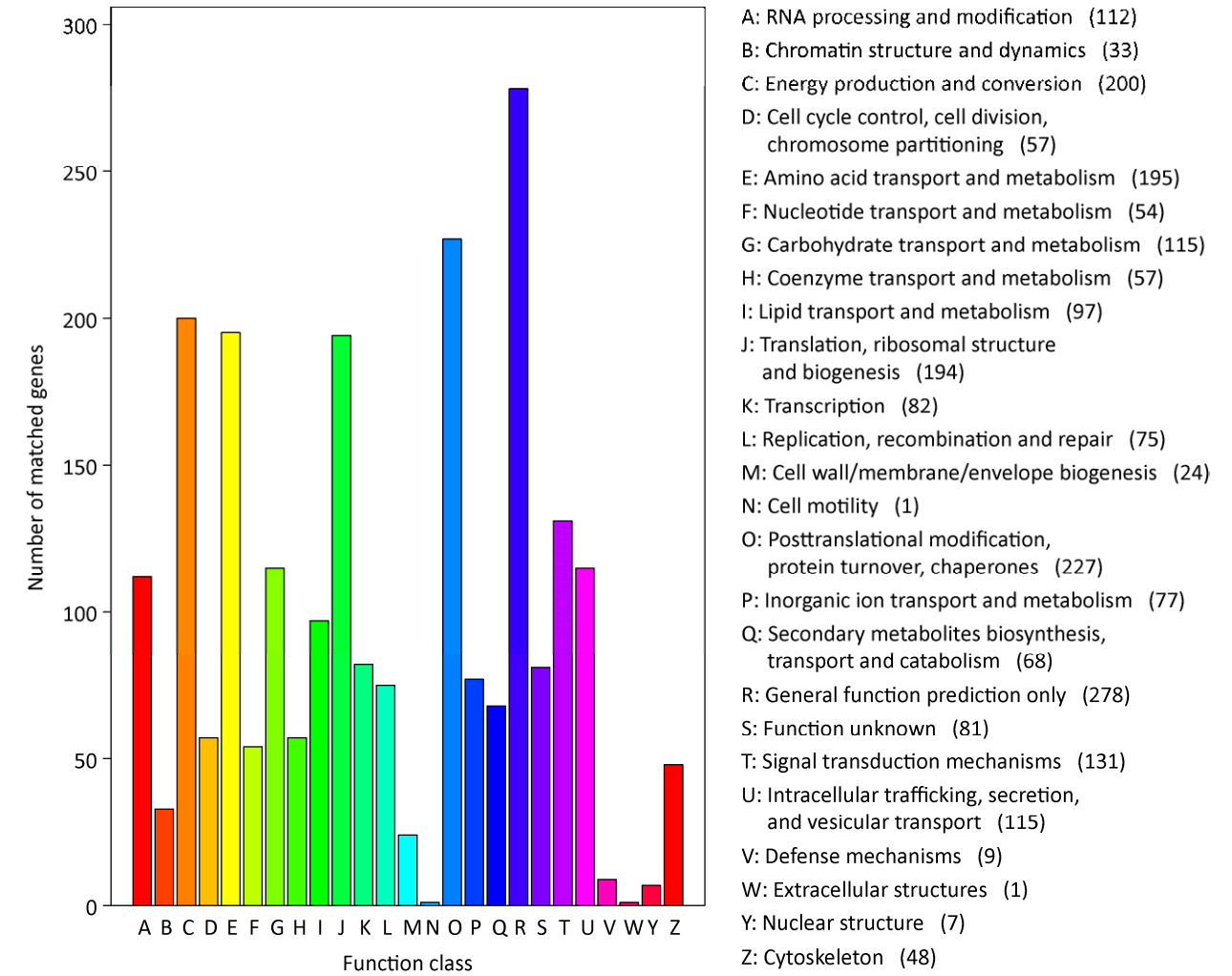


图 5 KOG 功能注释图

Fig. 5 KOG function annotation diagram.

3.316 菌株进行全基因组测序,从分子生物学角度研究了该菌株的生物学特性以及代谢功能机制,得到的结论如下:通过序列组装,确定其基因组大小为 35.21Mb,GC 含量 49.21%,共获得 15 个 contigs,总长度为 34 956 132bp,预测到编码基因个数为 10 032 个,其编码基因的总长度 16 454 354bp,平均长度 1 640bp。通过功能注释,在 GO 数据库中有 6 901 个基因得到注释,主要集中在细胞、细胞组分、代谢功能、细胞过程、连接功能和催化活性,在 KEGG 数据库有 9 494 个基因得到注释,主要集中在运输和分解代谢物通路、信号转导通路、翻译通路、碳水化合物代谢和氨基酸代谢通路,在 KOG 数据库中有 2 118 个基因得到注释,主要集中在一般功能预测、翻译后修饰和修复、能量产生与转化、氨基酸运输和代谢、核糖体结构和生物合成、信号转导机制、碳水化合物的转运。

通过对黑曲霉 3.316 进行全基因组测序结果与实验室前期蛋白组学研究结果进行分析,得到黑曲霉 3.316 具有耐热性的原因可能如下:在 GO 分类中发现与抗氧化相关的 21 个基因,其中参与最多的是 SOD 和 CAT, SOD 能够及时将超氧阴离子分解为 H_2O_2 和 O_2 (Li & Yu 2007), CAT 通过将 SOD 催化产物 H_2O_2 分解为 H_2O 和 O_2 从而具有清除 ROS 的能力 (Kwok *et al.* 2004), 实验室前期蛋白组学研究表明,这两种蛋白在高温条件下均出现了上调,同时也说明这两种蛋白确实与黑曲霉 3.316 的耐热性相关 (Deng *et al.* 2020)。Caspeta *et al.* (2014) 指出酿酒酵母的耐热性主要通过提高其抗氧化性能来实现。Kumar *et al.* (2011) 发现热胁迫会引起氧化应激,产生氧化胁迫以及相应的抗氧化防御的诱导,体内 SOD 和 CAT 就会增加。黑曲霉 3.316 具有耐热性可能与 SOD、CAT 增加有

关,这需要后续进行基因敲除试验进行验证。

在 KEGG 分类中发现与能量代谢相关的通路主要有 3 条,分别是 GPI 锚定合成、TCA 循环和糖酵解途径,GPI 锚定合成过程中的细胞壁组织蛋白 Ecm33 可以防止细胞壁变弱 (Pardo *et al.* 2004), TCA 循环在真菌细胞主要是高温下为细胞提供能量进行代谢 (Cavalcanti *et al.* 2014),糖酵解过程中丙酮酸的快速合成可以有效地应对高温造成的 ROS 损伤 (Zhang *et al.* 2017), 实验室前期蛋白组学分析结果表明,这 3 条通路在高温条件下均发生了加剧 (Deng *et al.* 2020),同时也说明这 3 条通路确实与黑曲霉 3.316 耐热性相关。Nasution *et al.* (2015) 通过敲除编码糖基磷脂酰肌醇锚定质膜蛋白的 *dfg5* 基因提高了酿酒酵母的耐热性。Postmus *et al.* (2008) 发现在热休克期间糖酵解途径被激活并且整个代谢途径的流动增加 5–10 倍。黑曲霉 3.316 具有耐热性离不开能量代谢途径,但是由哪一条代谢途径发挥作用还不清楚,这需要后续进行蛋白组学试验验证。

通过与已经测序的黑曲霉 SH2、CBS513.88、ATCC1015 菌株基因组信息进行比较,发现黑曲霉 3.316 菌株共有 15 条 contig,与黑曲霉 ATCC1015 的 contigs 数量相当,说明该菌株的基因组足够精确用于基因组注释 (Baker 2006),其 GC 含量为 49.21%与其他 3 株黑曲霉的 GC 含量相当,说明该菌株 DNA 双链稳定不易解旋 (陈海燕等 2012),其 tRNA 含量与黑曲霉 SH2 含量相当并且高于其他 2 株黑曲霉,说明该菌株的蛋白质合成能力较强 (林毅英 2018),并且对于其作为异源基因表达宿主十分重要 (Andersen *et al.* 2011) (表 6)。

本研究采用全基因组测序技术对耐热型黑曲霉 3.316 生物学特性和代谢功能机制

表 6 四株黑曲霉基因组比较

Table 6 Comparison of genomes of four *Aspergillus niger* strains

基因组特征	黑曲霉 3.316	黑曲霉 SH2	黑曲霉 CBS513.88	黑曲霉 ATCC1015
Genome characteristics	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
	3.316	SH2	CBS513.88	ATCC1015
Contigs 或 scaffolds 总数	15 contigs	349 contigs	19 scaffolds	24 contigs
Contigs or scaffolds				
GC 含量	49.21	50.26	49.50	50.31
GC content (%)				
tRNA 个数	280	273	238	257
Number of tRNA				

进行初步探究, 得到大量基因组信息, 通过将全基因组测序基因分析结果与实验室前期的蛋白组学结果进行比较发现黑曲霉的耐热特性可能与抗氧化基因超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 有密切联系, 这为减少工业发酵中形成的高温造成的不良影响、解决发酵过程中的高能耗和高生产成本问题提供优良的发酵菌株, 也为研究黑曲霉 3.316 的耐高温特性奠定详细的背景信息, 对后续研究黑曲霉 3.316 具有重要意义。

[REFERENCES]

- Andersen MR, Nielsen J, 2009. Current status of systems biology in aspergilli. *Fungal Genetics and Biology*, 46(1): S180-S190
- Andersen MR, Salazar MP, Schaap PJ, van dVPJL, Culley D, Thykaer J, Frisvad JC, Nielsen KF, Albang R, Albermann K, 2011. Comparative genomics of citric-acid-producing *Aspergillus niger* ATCC 1015 versus enzyme-producing CBS 513.88. *Genome Research*, 21(6): 885-897
- Baker SE, 2006. *Aspergillus niger* genomics: past, present and into the future. *Medical Mycology*, (Suppl. 1): S17
- Birney E, Clamp M, Durbin R, 2004. Gene wise and genomewise. *Genome Research*, 14(5): 988
- Caspeta L, Chen Y, Ghiaci P, Feizi A, Buskov S, Hallstrm BM, Petranovic D, Nielsen J, 2014. Altered sterol composition renders yeast thermotolerant. *Science*, 346(6205): 75-78
- Cavalcanti JH, Esteves-Ferreira AA, Quinhones CG, Pereira-Lima IA, Nunes-Nesi A, Fernie AR, Araújo WL, 2014. Evolution and functional implications of the tricarboxylic acid cycle as revealed by phylogenetic analysis. *Genome Biology and Evolution*, 6: 2830-2848
- Chen HY, Yan SB, Feng Y, Ma JX, 2012. A preliminary study on the thermostable mechanism of *Thermus aquaticus*. *Jilin Agriculture C Version*, 2012(6): 38 (in Chinese)
- Conesa A, Gotz S, Garcia-Gomez J, Terol J, Talon M, Robles M, 2005. Blast2go: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21(18): 3674-3676
- Deng XY, Du B, Zhu FM, Gao YN, Li J, 2020. Proteomic analysis of *Aspergillus niger* 3.316 under heat stress. *Microbiology Open*, 9(5): e1012
- Ding RH, 2020. Screening and identification of a strain of *Streptomyces* (CX3) and its biocontrol effect on blueberry canker. Master Thesis, Liaoning University, Shenyang. 1-83 (in Chinese)
- Ee R, Lim YL, Yin WF, Chan KG, 2014. *De novo* assembly of the quorum-sensing *Pandora* sp. strain RB-44 complete genome sequence using Pacbio Single-Molecule Real-Time sequencing technology. *Genome Announcements*, 2(2):

- e00245-14
- Harshvadan P, Digantkumar C, Amita S, 2015. Improved yield of α -l-arabinofuranosidase by newly isolated *Aspergillus niger* ADH-11 and synergistic effect of crude enzyme on saccharification of maize stover. *Bioresources and Bioprocessing*, 2(1): 11
- Jin WW, 2017. Identification of *Bacillus subtilis* J-5 and analysis of its antibacterial ability. Master Thesis, Hebei University of Technology, Tianjin. 52-62 (in Chinese)
- King R, Urban M, Hammond-Kosack MCU, Hassani-Pak K, Hammond-Kosack KE, 2015. The completed genome sequence of the pathogenic ascomycete fungus *Fusarium graminearum*. *BMC Genomics*, 16(1): 544
- Kiran S, Swarnkar MK, Pal M, Thakur R, Gulati A, 2015. Complete genome sequencing of protease-producing novel *Arthrobacter* sp. strain IHBB 11108 using Pacbio Single-Molecule Real-Time sequencing technology. *Genome Announcements*, 3(2): e00346-15
- Kowalczyk JE, Benoit I, Vries RPD, 2014. Regulation of plant biomass utilization in *Aspergillus*. *Advances in Applied Microbiology*, 88: 31-56
- Kumar S, Kalyanasundaram GT, Gummadi SN, 2011. Differential response of the catalase, superoxide dismutase and glycerol-3-phosphate dehydrogenase to different environmental stresses in *Debaryomyces nepalensis* NCNY 3413. *Current Microbiology*, 62(2): 382-387
- Kwok LY, Schlüter D, Clayton C, Soldati D, 2004. The antioxidant systems in *Toxoplasma gondii* and the role of cytosolic catalase in defence against oxidative injury. *Molecular Microbiology*, 51(1): 47-61
- Li J, Li S, Yu SZ, Liu HH, Zhang H, 2017. Expression of Lac4 gene of *Pleurotus sajor-caju* in *Aspergillus niger*. *Journal of Northeast Agricultural University*, 48(4): 7-14 (in Chinese)
- Li JR, Yu P, 2007. Expression of Cu, Zn-superoxide dismutase gene from *Saccharomyces cerevisiae* in *Pichia pastoris* and its resistance to oxidative stress. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 136(1): 127-139
- Li XG, Ding CF, Zhang TL, Wang XX, 2014. Fungal pathogen accumulation at the expense of plant-beneficial fungi as a consequence of consecutive peanut monoculturing. *Soil Biology and Biochemistry*, 72: 11-18
- Lin YY, 2018. A high-yielding glucoamylase-based *Aspergillus niger* industrial strain genome assembly and annotation and functional gene comparison study. Master Thesis, South China University of Technology, Guangzhou. 25-63 (in Chinese)
- Liu F, Wang B, Ye Y, Pan L, 2018. High level expression and characterization of tannase tan7 using *Aspergillus niger* SH-2 with low-background endogenous secretory proteins as the host. *Protein Expression and Purification*, 144: 71-75
- Nasution O, Lee J, Srinivasa K, Choi IG, Lee YM, Kim E, Choi W, Kim W, 2015. Loss of Dfg5 glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane protein confers enhanced heat tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Environmental Microbiology*, 17(8): 2721-2734
- Pardo M, Monteoliva L, Vazquez P, Martinez R, Molero G, Nombela C, Gil C, 2004. PST1 and ECM33 encode two yeast cell surface GPI proteins important for cell wall integrity. *Microbiology*, 150: 4157-4170
- Pel HJ, de Winde JH, Archer DB, Dyer PS, Hofmann G, Schaap PJ, Turner G, de Vries RP, Albang R, Albermann KAJ, 2007. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nature Biotechnology*, 25(2): 221-231
- Postmus J, Canelas AB, Bouwma J, Bakker BM, van Gulik W, de Mattos MJT, Brul S, Smits GJ, 2008. Quantitative analysis of the high temperature-induced glycolytic flux increase in *Saccharomyces cerevisiae* reveals dominant

- metabolic regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 283(35): 23524-23532
- Reiner J, Pisani L, Qiao W, Singh R, Yang Y, Shi L, Khan WA, Sebra R, Cohen N, Babu A, 2018. Cytogenomic identification and long-read single molecule real-time (SMRT) sequencing of a bardet-biedl syndrome 9 (BBS9) deletion. *Npj Genomic Medicine*, 3(1): 3
- Sarkari P, Marx H, Blumhoff ML, Mattanovich D, Steiger MG, 2017. An efficient tool for metabolic pathway construction and gene integration for *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, 245(Pt B): 1327-1333
- Simon A, Adam A, Vermeesch JR, Hestand MS, 2018. Single molecule real-time (SMRT) sequencing comes of age: applications and utilities for medical diagnostics. *Nucleic Acids Research*, 46(5): 2159-2168
- Sloothaak J, Tamayo-Ramos JA, Odoni DI, Laathanachareon T, Derntl C, Mach-Aigner AR, Martins dos Santos VAP, Schaap PJ, 2016. Identification and functional characterization of novel xylose transporters from the cell factories *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei*. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1): 148
- Song XL, 2019. The potential mechanism of nematode intestinal endophytes on the colonization of biocontrol bacteria. Master Thesis, Nanyang Normal University, Nanyang. 29-34 (in Chinese)
- Sun X, 2013. Digital gene expression profile and key gene cloning and expression analysis during flower bud differentiation of chrysanthemum "Shenma". PhD Dissertation, Shandong Agricultural University, Qingdao. 1-123 (in Chinese)
- Wang Y, 2017. Research on identification and control mechanism of patulin-producing bacteria in kiwifruit. PhD Dissertation, Northwest A&F University, Yangling. 1-185 (in Chinese)
- Wuri LG, Xu HY, Feng SZ, Sun ZH, Menghe BLG, Zhang HP, 2016. The research progress of the first technology and the first application of three generations. *China Dairy Industry*, 2016(4): 33-37 (in Chinese)
- Yan Q, Zhu FM, Peng LS, Wang X, Zhang YX, Li J, 2017. Prediction of the active site and heat-resistant structure of *Aspergillus niger* β -glucosidase. *Food Science*, 38(6): 81-87 (in Chinese)
- Yin C, Wang B, He P, Lin Y, Pan L, 2014. Genomic analysis of the aconidial and high-performance protein producer, industrially relevant *Aspergillus niger* SH2 strain. *Gene*, 541(2): 107-114
- Yu Z, Yang J, Zhou J, Yu XQ, Liu L, Lv H, 2014. Water stratification affects the microeukaryotic community in a subtropical deep reservoir. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 61(2): 126-133
- Zhang BY, Zhu TH, Han S, Wang Y, Li SJ, Qiao TM, 2018. Sequencing and analysis of the whole genome of *Streptomyces sampsonii* KJ40. *Microbiology Bulletin*, 45(4): 805-818 (in Chinese)
- Zhang JL, 2018. *Ehrlichia canis* isolation and identification, genomics and animal infection model establishment. PhD Dissertation, Yangzhou University, Yangzhou. 1-277 (in Chinese)
- Zhang X, St. Leger RJ, Fang W, 2017. Pyruvate accumulation is the first line of cell defense against heat stress in a fungus. *Mbio*, 8(5): e1217-e1284
- [附中文参考文献]
- 陈海燕, 严尚滨, 冯印, 马井喜, 2012. 水生栖热菌耐热机制初探. *吉林农业 C 版*, 2012(6): 38
- 丁芮涵, 2020. 一株链霉菌 (CX3) 筛选鉴定及其对蓝莓溃疡病菌生防作用的研究. 辽宁大学硕士论文, 沈阳. 1-83
- 金伟伟, 2017. 枯草芽孢杆菌 J-5 的鉴定及其抑菌能力的分析. 河北工业大学硕士论文, 天津. 52-62
- 李杰, 李双, 于盛竹, 刘欢欢, 张会, 2017. 凤尾

- 菇 (*pleurotus sajor-caju*) 漆酶 Lac4 基因在黑曲霉中表达研究. 东北农业大学学报, 48(4): 7-14
- 林毅英, 2018. 基于三代测序技术的高产糖化酶黑曲霉工业菌株基因组组装与注释及功能基因比较研究. 华南理工大学硕士论文, 广州. 25-63
- 宋希磊, 2019. 线虫肠道内生菌对生防细菌定植障碍的潜在机制. 南阳师范学院硕士论文, 南阳. 29-34
- 孙霞, 2013. 菊花‘神马’花芽分化期的数字基因表达谱及关键基因的克隆和表达分析. 山东农业大学博士论文, 青岛. 1-123
- 王媛, 2017. 猕猴桃展青霉素产生菌的识别分析及控制机制研究. 西北农林科技大学博士论文, 杨凌. 1-185
- 乌日拉嘎, 徐海燕, 冯淑贞, 孙志宏, 孟和毕力格, 张和平, 2016. 测序技术的研究进展及三代测序的应用. 中国乳品工业, 2016(4): 33-37
- 闫青, 朱凤妹, 彭利沙, 王翔, 张永祥, 李军, 2017. 黑曲霉 β -葡萄糖苷酶的活性位点和耐热结构预测. 食品科学, 38(6): 81-87
- 张博阳, 朱天辉, 韩珊, 王莹, 李姝江, 譙天敏, 2018. 桑氏链霉菌 KJ40 全基因组测序及分析. 微生物学通报, 45(4): 805-818
- 张继垒, 2018. 犬埃立克体 (*Ehrlichia canis*) 分离鉴定, 基因组学及动物感染模型的建立. 扬州大学博士论文, 扬州. 1-277

(本文责编: 韩丽)