

调控酿酒酵母类异戊二烯合成途径强化芳樟醇合成

孙明雪¹, 刘继栋¹, 堵国成^{1,2}, 周景文¹, 陈坚^{1,2}

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

2 江南大学粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122

孙明雪, 刘继栋, 堵国成, 等. 调控酿酒酵母类异戊二烯合成途径强化芳樟醇合成. 生物工程学报, 2013, 29(6): 751-759.

Sun MX, Liu JD, Du GC, et al. Regulation of isoprenoid pathway for enhanced production of linalool in *Saccharomyces cerevisiae*. Chin J Biotech, 2013, 29(6): 751-759.

摘要: 芳樟醇是一种重要单萜, 广泛应用于食品、医药、日化等工业领域。然而芳樟醇在植物中含量低且难提取, 限制了其大规模生产。目前通常以酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 作为单萜生物合成宿主, 其内源类异戊二烯合成途径提供合成单萜物质的前体——香叶基二磷酸 (GPP)。由于该途径代谢通量较低, 导致 GPP 供应不足, 极大地降低了异源单萜的合成效率。为了调节该途径的代谢通量, 构建酿酒酵母整合表达载体 pRS305-tHMG1 和游离表达载体 pYLIS-ID11, 并分别转入酿酒酵母 CEN.PK2-1C 中, 获得酿酒酵母工程菌 LS01 和 LS02。同时将载体 pYLIS-ID11 转入酿酒酵母工程菌 LS01 中, 构建酿酒酵母工程菌 LS03。GC-MS 检测结果显示, 通过提高异戊二烯二磷酸异构酶 (*ID11*) 和羟甲基戊二酸单酰辅酶 A (*HMG-CoA*) 还原酶活性区域 (*tHMG1*) 的表达水平, 最终使芳樟醇产量提高 1.3 倍至 (127.71±7.68) μg/L。结果表明, 通过调控类异戊二烯合成途径, 强化 GPP 合成前体供给, 可以显著提高酿酒酵母中芳樟醇的产量。

关键词: 酿酒酵母, 芳樟醇, 类异戊二烯合成途径, *tHMG1*, *ID11*

Received: December 3, 2012; **Accepted:** January 7, 2013

Supported by: Key Program of National Natural Science Foundation of China (No. 31130043), National Natural Science Foundation of China (No. 31000807), Key Program of Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK2011004), Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK2010150).

Corresponding author: Jingwen Zhou. Tel: +86-510-85329031; Fax: +86-510-85918309; E-mail: zhoujw1982@jiangnan.edu.cn

国家自然科学基金重点项目 (No. 31130043), 国家自然科学基金 (No. 31000807), 江苏省自然科学基金重点项目 (No. BK2011004), 江苏省自然科学基金 (No. BK2010150) 资助。

Regulation of isoprenoid pathway for enhanced production of linalool in *Saccharomyces cerevisiae*

Mingxue Sun¹, Jidong Liu¹, Guocheng Du^{1,2}, Jingwen Zhou¹, and Jian Chen^{1,2}

¹ Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

² National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Linalool is an important monoterpene, and widely used in food, pharmaceutical and cosmetic industry. The low concentration in plants and the difficulties in extraction restrict its large scale production. *Saccharomyces cerevisiae* can provide the monoterpene precursor, geranyl diphosphate (GPP) through its endogenous isoprenoid pathway. Therefore, it could be used as the host for monoterpene production. However, the weak metabolic flux through the isoprenoid pathway leads to the insufficient supply of GPP, and results in low monoterpene productivity. In order to increase the metabolic flux, we constructed the integrated expression plasmid pRS305-tHMG1 and free expression plasmid pYLIS-ID11 to enhance the expression levels of isopentenyl diphosphate isomerase (*ID11*) and a truncated 3-hydroxyl-3-methylglutaryl-CoA reductase gene (*tHMG1*). The two plasmids were separately transformed into *S. cerevisiae* CEN.PK2-1C, resulting in strains LS01 and LS02. The plasmid pYLIS-ID11 was further transformed into strain LS01, resulting in strain LS03. GC-MS analysis showed that the linalool concentration was increased by 1.3 times and reached (127.71±7.68) µg/L. In conclusion, enhancement of the supply of GPP precursors through the regulation of isoprenoid pathway could increase the linalool production in *S. cerevisiae*.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, linalool, isoprenoid pathway, *tHMG1*, *ID11*

芳樟醇属于非环单萜醇,是一种植物次级代谢产物^[1],在食品、香化、医药、日化等领域均具有重要应用价值^[2]。目前,芳樟醇的合成主要采用植物提取和化学合成两种方法。化学合成方法通常比较昂贵,并且由于萜类物质具有特定的亲和性和专一性,通常只能较为经济地合成部分结构简单的萜类^[3]。从天然芳香植物中提取单萜因产量和提取效率较低、易受各种自然因素影响,导致大部分单萜类化合物的价格居高不下^[4]。利用微生物细胞合成单萜,因其原料来源广泛、产物单一且生产周期短,成为替代植物提取和化学合成的方法之一^[5]。

目前以酿酒酵母作为合成萜类物质的真核表达系统正日益得到研究者的重视^[6-7]。酿酒酵

母通过内源类异戊二烯代谢途径提供香叶基二磷酸(GPP),可作为单萜生物合成的前体物质(图1)^[8]。2007年,Oswald等在酿酒酵母中引入仙女扇 *Clarkia breweri* 来源的芳樟醇合成酶基因,但是由于异源芳樟醇合成酶表达量过低,导致检测不到目的产物芳樟醇^[9]。2008年,Herrero等在野生型酿酒酵母的类异戊二烯生物合成途径上引入芳樟醇合成代谢支路,成功构建重组菌株并且能够有效分泌芳樟醇^[10]。2010年,Rico等在酿酒酵母中成功表达了仙女扇来源的芳樟醇合成酶基因,并通过调节类异戊二烯生物合成途径使芳樟醇产量进一步提高,达到 30.19 µg/L^[11]。

为了获得高产芳樟醇的酿酒酵母工程菌株,本研究在已经成功表达来源于软枣猕猴桃

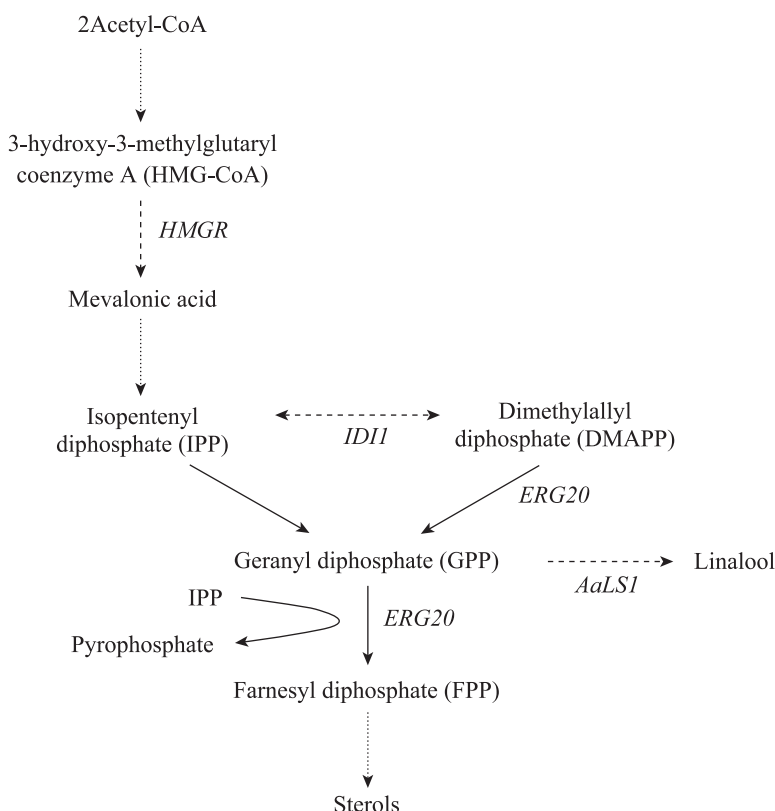


图1 酿酒酵母中类异戊二烯代谢途径 (包括芳樟醇合成支路)

Fig 1 Isoprenoid pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, including the branch point to (*S*)-linalool. Dotted arrows indicate that more than one reaction is required to convert the substrate to the product indicated. Dashed arrows indicate the engineered steps.

Actinidia arguta 的芳樟醇合成酶基因的基础上^[12], 进一步调控类异戊二烯生物合成途径, 增加芳樟醇合成前体的供给, 实现了对 *tHMGI* 与 *IDII* 基因的调控, 使芳樟醇的产量提高了 1.3 倍, 从 $(59.85 \pm 4.05) \mu\text{g/L}$ 增加至 $(127.71 \pm 7.68) \mu\text{g/L}$ 。本研究在酿酒酵母工程菌中获得较高的芳樟醇产量, 为实现芳樟醇的工业化生产奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 工具酶及试剂

芳樟醇 (97%) 购自 Sigma-Aldrich 公司。限

制性内切酶、T4 DNA 连接酶、*ExTaq* DNA 聚合酶、pMD18-T Simple Vector、感受态制备试剂盒、胶回收、片段回收试剂盒均购自宝生物工程 (大连) 有限公司。各种化学试剂均为分析纯。

1.1.2 菌株与质粒

本研究所用菌株及质粒如表 1 所示。

1.1.3 培养基

LB 培养基: 蛋白胨 10 g/L, 酵母膏 5 g/L, 氯化钠 10 g/L, 需要时加入氨苄青霉素至终浓度为 $100 \mu\text{g/mL}$; YNB 液体培养基: 硫酸铵 5 g/L, YNB 1.7 g/L, 葡萄糖 20 g/L, pH 调至 5.6, $115 \text{ }^\circ\text{C}$ 灭菌 15 min, 灭菌后加入过滤除菌的卡那霉素

表 1 本研究中所用的菌株及质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Descriptions	Source
CEN.PK2-1C	<i>MATa; ura3-52; trp1-289; leu2-3,112; his3Δ 1; MAL2-8^C; SUC2</i>	EUROSCARF
LS01	<i>MATa; ura3-52; trp1-289; leu2-3,112; his3Δ 1; MAL2-8^C; SUC2::P_{TEF1}-tHMG1</i>	This study
LS02	<i>MATa; ura3-52; trp1-289; leu2-3,112; his3Δ 1; MAL2-8^C; SUC2, [pYLIS-IDI1]</i>	This study
LS03	<i>MATa; ura3-52; trp1-289; leu2-3,112; his3Δ 1; MAL2-8^C; SUC2::P_{TEF1}-tHMG1, [pYLIS-IDI1]</i>	This study
LS04	<i>MATa; ura3-52; trp1-289; leu2-3,112; his3Δ 1; MAL2-8^C; SUC2, [pYLIS]</i>	This study
pRS305-TEF1	<i>S. cerevisiae</i> integration expression vector	[13]
pY26-TEF1-GPD	<i>S. cerevisiae</i> bidirectional expression vector	[14]
pRS305-tHMG1	<i>P_{TEF1}-tHMG1</i>	This study
pYLIS	<i>P_{GPD}-AaLS1</i>	This study
pYLIS-IDI1	<i>P_{GPD}-AaLS1P_{TEF1}-IDI1</i>	This study

至终浓度为 100 μg/mL。根据需要选择添加亮氨酸、组氨酸、色氨酸、尿嘧啶等,使其在培养基中终浓度为 50 μg/mL,氨基酸溶液在 105 °C 灭菌 10 min; YPD 液体培养基:蛋白胨 20 g/L,酵母膏 10 g/L,葡萄糖 20 g/L,115 °C 灭菌 15 min,在灭菌后加入过滤除菌的卡那霉素至终浓度为 100 μg/mL。固体培养基均在液体培养基中添加 2% 的琼脂粉。

1.1.4 摇瓶培养条件

种子液的制备:将重组菌从氨基酸缺陷型平板上刮取一单菌落至 20 mL YNB 液体培养基中,30 °C、200 r/min 培养 24 h 后,即为种子液。重组菌发酵实验:转接种子液至 50 mL 新鲜 YPD 液体培养基,使 *OD*₆₀₀ 达到 0.05,在 30 °C、200 r/min 培养 48 h。

1.2 方法

1.2.1 DNA 片段的扩增与重组

以酿酒酵母 CEN.PK2-1C 基因组为模板,用

引物 IDI1-R 和 IDI1-F 扩增 *IDI1* 基因序列(引物序列见表 2),获得基因长度 867 bp 的 *IDI1* 基因。PCR 程序:94 °C 预变性 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经胶回收纯化后,与载体连接 pMD18-T Simple,阳性克隆小量抽提质粒酶切鉴定,并进行 DNA 测序。将序列正确并纯化的 PCR 产物经过 *Not* I 和 *Sac* II 双酶切,连接至经相同限制性内切酶酶切的双启动子表达载体 pYLIS 中,获得 *AaLS1* 基因与 *IDI1* 基因共表达载体 pYLIS-IDI1。

tHMG1 基因是 HMG-CoA 还原酶具有催化作用的蛋白 C 末端编码区域^[15]。以酿酒酵母 CEN.PK2-1C 基因组为模板,用 HMG1-R 和 HMG1-F 进行 PCR 扩增 *tHMG1* 基因(引物序列见表 2),获得基因长度 1 578 bp 的 *tHMG1* 基因。PCR 程序:94 °C 预变性 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经胶回收纯化后,连接 pMD18-T

表 2 PCR 扩增所需引物

Table 2 Primers used for PCR amplification

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Restriction site
IDI1-F	ATTTGCGGCCGCATGACTGCCGACAACAAT	<i>Not</i> I
IDI1-R	TCCCCGCGGTTATAGCATTCTATGAATTTGC	<i>Sac</i> II
HMG1-F	GACTAGTATGGACCAATTGGTGAAAAC	<i>Spe</i> I
HMG1-R	CGGATCCTTAGGATTTAATGCAGGTGACG	<i>Bam</i> H I

Simple, 少量抽提质粒酶切鉴定, 进行 DNA 测序。将序列正确并纯化的 PCR 产物经过 *Spe* I 和 *Bam*H I 双酶切, 连接至经相同限制性内切酶酶切的酿酒酵母整合表达载体 pRS305-TEF1 中, 获得 *tHMG1* 基因整合表达载体 pRS305-tHMG1。

1.2.2 重组菌株的构建

酿酒酵母转化均采用醋酸锂化学转化方法^[16]。转化后涂布于相对应的氨基酸缺陷 YNB 平板, 挑选转化子, 菌落 PCR 验证。

1.2.3 气相色谱与质谱 (GC-MS) 分析与检测

在 20 mL 顶空进样瓶中, 加入 2 g NaCl, 注入 5 mL 预冷的发酵溶液样品, 加盖密封垫和铝帽, 压紧。顶空吸附温度 95 °C 保温 30 min。使用 Shimadzu GCMS-QP2010 气相色谱-质谱联用仪检测。色谱条件: Rax-Wax 色谱柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm); 程序升温条件: 初始温度 60 °C, 保持 30 s, 以 8 °C/min 升温至 100 °C, 立即以 30 °C/min 升温至 200 °C, 保持 3 min; 进样口温度为 240 °C, 载气 (氦气) 流速为 1 mL/min; 不分流。质谱条件: EI 电离源, 电子能量 70 eV; 质量扫描方式: 选择离子扫描: *m/z* 71, 93 和 121; 定量离子 71。

采用外标法测定芳樟醇样品的浓度, 计算结果取 3 个平行发酵实验的平均值; 配制 4 个浓度梯度的标准溶液, 分别为 10、100、1 000、

10 000 μg/L, 分别测定在 GC-MS 上的响应值, 绘制标准曲线。

1.2.4 麦角固醇测定方法

采用吸光度法测定酿酒酵母菌株麦角固醇含量, 具体测定方法见参考文献^[17]。其中菌体干重 (Dry cell weight) 测定方法, 首先收集发酵液, 4 000 r/min 离心 10 min, 蒸馏水洗涤菌体 1~2 次后取沉淀, 60 °C 烘至恒重, 称重。

2 结果与分析

2.1 *IDI1* 基因的克隆和表达载体构建

以酿酒酵母 CEN.PK2-1C 基因组 DNA 为模板, 采用 PCR 法扩增 *IDI1* 基因, 扩增出特异性谱带, 大小约为 867 bp。对 PCR 产物进行测序, 将序列正确 PCR 产物经 *Not* I 和 *Sac* II 酶切并纯化后, 与经相同酶切的载体 pYLIS 连接。在含有氨苄抗性的 LB 平板上筛选阳性克隆, 并通过菌落 PCR 鉴定阳性克隆 (图略)。抽提重组克隆菌株质粒经 *Not* I 和 *Sac* II 酶切得到相应大小片段 (图 2), 验证 *IDI1* 基因与载体相连, 载体 pYLIS-IDI1 构建成功。

2.2 *tHMG1* 基因克隆和整合表达载体构建

以酿酒酵母 CEN.PK2-1C 基因组 DNA 为模板, 采用 PCR 法扩增 *tHMG1* 基因, 扩增出特异

性条带,大小约为 1 578 bp。PCR 产物进行测序,将序列正确 PCR 产物经 *Spe* I 和 *Bam*H I 酶切并纯化后,与经相同酶切的载体 pRS305-TEF1 连接。在含有氨苄的 LB 平板上筛选阳性克隆,并通过菌落 PCR 鉴定阳性克隆(图略)。抽提重组质粒经 *Spe* I 和 *Bam*H I 酶切得到相应大小片段(图 3),验证 *tHMG1* 基因与载体相连,载体 pRS305-*tHMG1* 构建成功。

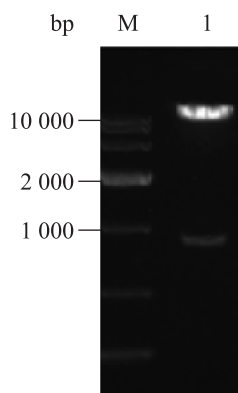


图 2 pYLIS-IDI1 质粒的酶切验证

Fig. 2 Identification of plasmid pYLIS-IDI1 by enzyme digestion. M: DNA marker DL10 000; 1: pYLIS-IDI1 digested with *Not* I and *Sac* II.

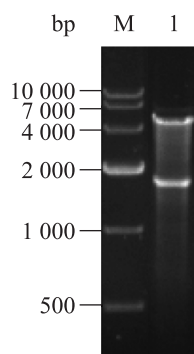


图 3 pRS305-*tHMG1* 质粒的酶切验证

Fig. 3 Identification of plasmid pRS305-*tHMG1* by enzyme digestion. M: DNA marker DL10 000; 1: pRS305-*tHMG1* digested with *Bam*H I and *Spe* I.

2.3 酿酒酵母工程菌株构建

将整合表达质粒 pRS305-*tHMG1* 导入酿酒酵母 CEN.PK2-1C,成功构建酿酒酵母 *tHMG1* 基因整合表达菌株 LS01。将 *IDI1* 基因表达载体 pYLIS-*IDI1* 导入酿酒酵母 CEN.PK2-1C 和 LS01 中,分别构建工程菌株 LS02 和 LS03。

2.4 调控类异戊二烯合成途径对麦角固醇含量的影响

麦角固醇是类异戊二烯合成途径终产物甾醇的主要前体,同时也是酿酒酵母细胞膜的重要组成部分。因此,类异戊二烯合成途径代谢流的变化可能会伴随麦角固醇合成的增加或减弱,而麦角固醇含量微小变化能够反应代谢途径上的重要改变^[18]。通过测定酿酒酵母工程菌株麦角固醇含量(图 4),发现在表达两基因后麦角固醇合成量从 (14.26 ± 1.11) mg/g DCW 增加至

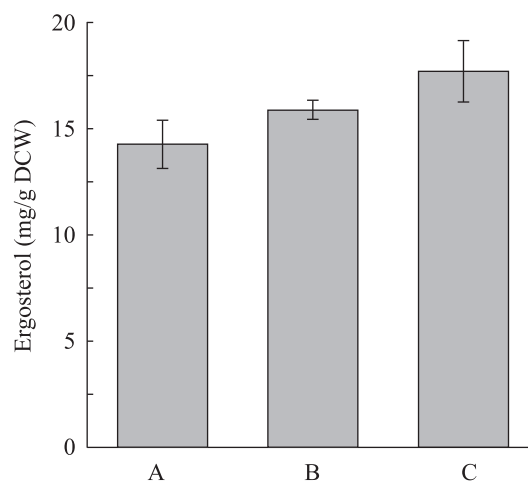


图 4 调控类异戊二烯合成途径对麦角固醇含量的影响

Fig. 4 Effect on the content of ergosterol by regulating the isoprenoid pathway in *S. cerevisiae*. A: the control strain expressing the gene of *AaLS1*; B: the strain LS02 expressing the genes of *AaLS1* and *IDI1*; C: the strain LS03 expressing the genes of *AaLS1*, *IDI1* and *tHMG1*.

(17.68±1.44) mg/g DCW。结果表明, 调控 *IDII* 和 *tHMG1* 基因可以增加麦角固醇合成量。

2.5 类异戊二烯合成途径的调控

为了进一步提高芳樟醇产量, 必须消除代谢途径的限制因素, 提高限制酶的表达水平。*IDII* 基因编码类异戊二烯基焦磷酸异构酶, 该酶参与可逆的异构化反应实现 IPP 与 DMAPP 的相互转化, 是控制所有萜类生物合成的第一步, 调控该酶的表达水平对单萜化合物合成具有重要作用^[19]。在酿酒酵母中, 调节 *IDII* 基因表达量, 表达质粒 pYLIS-*IDII*, 使芳樟醇含量提高了 69.6%, 达到 (101.46±3.45) μg/L, 单位细胞芳樟醇含量从 8.61 μg/g DCW 提高至 15.24 μg/g DCW。HMG-CoA 还原酶是类异戊二烯合成途径上的关键限速酶, 它催化 HMG-CoA 合成甲羟戊酸的反应为不可逆的, 其活性的不足会导致该途径代谢通量降低。因此, 我们进一步提高 HMG-CoA 还原酶水平, 构建 *tHMG1* 基因整合表达菌株, 并在该菌株中表达质粒 pYLIS-*IDII*, 使芳樟醇产量提高至 (127.71±7.68) μg/L, 单位细胞芳樟醇含量提高 9.4%, 增加至 16.66 μg/g DCW (图 5)。通过对工程菌株生长曲线进行检测, 发现表达 *tHMG1* 基因使菌体生长有一定程度提高, 可能由于代谢流增加对菌体生长有促进作用, 表达 *IDII* 基因后菌体生长有减弱趋势。总体来说, 在酿酒酵母工程菌合成芳樟醇过程中, 产物芳樟醇未对菌株生长造成致命影响 (图 6)。

3 讨论

在酿酒酵母工程菌株成功表达软枣猕猴桃来源的芳樟醇合成酶基因的基础上, 本研究强化类异戊二烯合成途径, 调控 *IDII* 与 *tHMG1* 基因表

达水平, 使芳樟醇产量达到 (127.71±7.68) μg/L, 是 Rico 等^[11]报道在酿酒酵母工程菌中获得的芳樟醇最高产量的 3 倍。

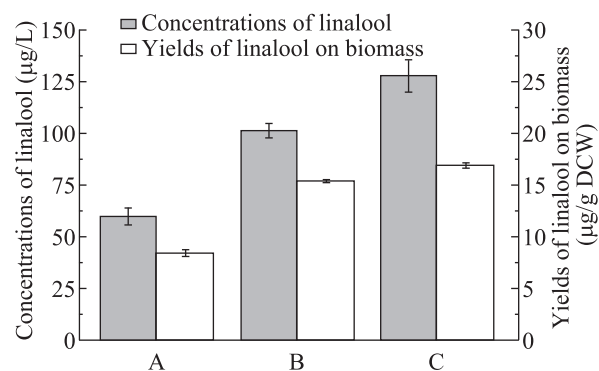


图 5 调控类异戊二烯途径芳樟醇产量和单位细胞芳樟醇含量

Fig. 5 Final concentrations of linalool and yields of linalool on biomass after regulating the isoprenoid pathway. A: the control strain LS04 expressing the gene of *AaLSI*; B: the strain LS02 expressing the genes of *AaLSI* and *IDII*; C: the strain LS03 expressing the genes of *AaLSI*, *IDII* and *tHMG1*.

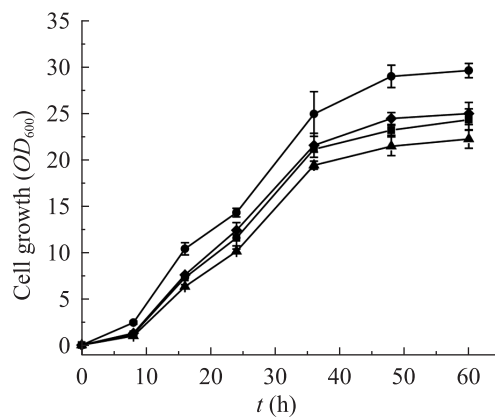


图 6 酿酒酵母工程菌生长曲线的测定

Fig. 6 Growth curves of engineered strains. (◆) the control strain transformed with the empty vector of pY26-TEF1-GPD in CEN.PK2-1C; (▲) the strain LS02 expressing the genes of *AaLSI* and *IDII*; (●) the strain LS03 expressing the genes of *AaLSI*, *IDII* and *tHMG1*; (■) the strain LS04 expressing the gene of *AaLSI*.

酿酒酵母能够通过内源类异戊二烯合成途径合成 GPP, 但是水平较低, 限制了芳樟醇合成量, 因此提高胞内 GPP 供给是增加芳樟醇产量的关键。对 *IDII* 基因的调控能够调节 IPP/DMAPP 比例, 将代谢流平衡转向对 GPP 生产有利的方向, 进而增加单萜物质的合成^[20]。过量表达 *IDII* 基因后使芳樟醇产量从 $(59.84 \pm 4.05) \mu\text{g/L}$ 提高至 $(101.46 \pm 3.45) \mu\text{g/L}$ 。在类异戊二烯合成途径中, 研究证实 HMG-CoA 还原酶是关键限速酶, 解除该酶的限制作用对促进类异戊二烯化合物积累起重要作用^[21]。Verwaal 等^[22]在酿酒酵母中过量表达该酶活性区域 *tHMG1* 基因使胡萝卜素产量显著提高。Rico 等^[11]通过提高 *tHMG1* 基因表达水平, 使芳樟醇产量从 $(21.92 \pm 1.75) \mu\text{g/L}$ 提高至 $(30.19 \pm 3.88) \mu\text{g/L}$ 。我们在改造 *IDII* 基因的基础上, 进一步表达 *tHMG1* 基因, 使芳樟醇产量提高 1.3 倍, 达到 $(127.71 \pm 7.68) \mu\text{g/L}$ 。

本研究通过调控类异戊二烯合成途径代谢流, 提高 GPP 合成前体供给, 构建芳樟醇高产的酿酒酵母工程菌。继续对培养基和培养条件等进行优化, 将获得更高芳樟醇产量, 为进一步实现工业化生产奠定基础。

REFERENCES

- [1] Chang MCY, Keasling JD. Production of isoprenoid pharmaceuticals by engineered microbes. *Nat Chem Biol*, 2006, 2(12): 674–681.
- [2] Mahmoud SS, Croteau RB. Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci*, 2002, 7(8): 366–373.
- [3] Dudareva N, Pichersky E. Metabolic engineering of plant volatiles. *Curr Opin Biotechnol*, 2008, 19(2): 181–189.
- [4] Siddiqui MS, Thodey K, Trenchard I, et al. Advancing secondary metabolite biosynthesis in yeast with synthetic biology tools. *FEMS Yeast Res*, 2012, 12(2): 144–170.
- [5] Nevoigt E. Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol R*, 2008, 72(3): 379–412.
- [6] Huang BB, Guo J, Yi B, et al. Heterologous production of secondary metabolites as pharmaceuticals in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett*, 2008, 30(7): 1121–1137.
- [7] Kong JQ, Zhi XH, Wang W, et al. Synergistic effect of amorpho-4,11-diene synthase gene in engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Chin J Biotech*, 2011, 27(2): 196–202 (in Chinese).
孔建强, 支晓慧, 王伟, 等. 紫穗槐-4,11-二烯合酶基因在酵母工程菌中具有协同. *生物工程学报*, 2011, 27(2): 196–202.
- [8] Kirby J, Keasling JD. Biosynthesis of plant isoprenoids: perspectives for microbial engineering. *Ann Rev Plant Biol*, 2009, 60: 335–355.
- [9] Oswald M, Fischer M, Dirninger N, et al. Monoterpenoid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*, 2007, 7(3): 413–421.
- [10] Herrero Ó, Ramón D, Orejas M. Engineering the *Saccharomyces cerevisiae* isoprenoid pathway for *de novo* production of aromatic monoterpenes in wine. *Metab Eng*, 2008, 10(2): 78–86.
- [11] Rico J, Pardo E, Orejas M. Enhanced production of a plant monoterpene by overexpression of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase catalytic domain in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microb*, 2010, 76(19): 6449–6454.
- [12] Chen XY, Yauk Y, Nieuwenhuizen NJ, et al. Characterisation of an (*S*)-linalool synthase from kiwifruit (*Actinidia arguta*) that catalyses the first committed step in the production of floral lilac compounds. *Funct Plant Biol*, 2010, 37(3): 181–189.

- 232–243.
- [13] Sikorski RS, Hieter P. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 1989, 122(1): 19–27.
- [14] Li AM, Liu ZS, Li QX, et al. Construction and characterization of bidirectional expression vectors in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*, 2008, 8(1): 6–9.
- [15] Munoz-Bertomeu J, Sales E, Ros R, et al. Up-regulation of an N-terminal truncated 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase enhances production of essential oils and sterols in transgenic *Lavandula latifolia*. *Plant Biotechnol J*, 2007, 5(6): 746–758.
- [16] Gietz RD, Schiestl RH, Willems AR, et al. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*, 1995, 11(4): 355–360.
- [17] Asadollahi MA, Maury J, Moller K, et al. Production of plant sesquiterpenes in *Saccharomyces cerevisiae*: effect of *ERG9* repression on sesquiterpene biosynthesis. *Biotechnol Bioeng*, 2007, 99(3): 666–677.
- [18] Fischer MJC, Meyer S, Claudel P, et al. Metabolic engineering of monoterpene synthesis in yeast. *Biotechnol Bioeng*, 2011, 108(8): 1883–1892.
- [19] Berthelot K, Estevez Y, Deffieux A, et al. Isopentenyl diphosphate isomerase: a checkpoint to isoprenoid biosynthesis. *Biochimie*, 2012, 94(8): 1621–1634.
- [20] Ignea C, Cvetkovic I, Loupassaki S, et al. Improving yeast strains using recyclable integration cassettes, for the production of plant terpenoids. *Microb Cell Fact*, 2011, 10(1): 4.
- [21] Ohto C, Muramatsu M, Obata S, et al. Overexpression of the gene encoding HMG-CoA reductase in *Saccharomyces cerevisiae* for production of prenyl alcohols. *Appl Microbiol Biot*, 2009, 82(5): 837–845.
- [22] Verwaal R, Wang J, Meijnen J, et al. High-level production of beta-carotene in *Saccharomyces cerevisiae* by successive transformation with carotenogenic genes from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(13): 4342–4350.

(本文责编 陈宏宇)