

代谢工程改造酿酒酵母合成肌醇

黄贞杰^{1*} 陈由强² 陈丽霞¹ 陈淑增¹

(1. 泉州医学高等专科学校 福建 泉州 362010)

(2. 福建师范大学生命科学学院 福建 福州 350108)

摘要: 【目的】肌醇别名环己六醇，是一种具有生物活性的糖醇，在医药、食品和饲料等领域具有重要的应用价值。为获得生产肌醇的微生物细胞工厂，通过代谢工程改造，构建生产肌醇的酿酒酵母工程菌株。【方法】对酿酒酵母肌醇合成途径的正负调控同时改造，过表达肌醇-3-磷酸合成酶基因 *ino1*，敲除肌醇生物合成的转录抑制子基因 *opi1* 和抗性基因 *kanMX*，获得重组菌。利用气相色谱法检测重组菌发酵液中肌醇含量。【结果】构建了生物安全性的产肌醇基因工程菌株，摇瓶培养产量为 1.021 g/L。【结论】通过过表达 *ino1* 和敲除 *opi1* 来改造酿酒酵母，能够有效提高重组菌的肌醇产量，为下一步的微生物发酵法产肌醇的工业应用奠定基础。

关键词: 肌醇，基因敲除，*ino1*，*opi1*，基因工程菌，酿酒酵母

Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for inositol production

HUANG Zhen-Jie^{1*} CHEN You-Qiang² CHEN Li-Xia¹ CHEN Shu-Zeng¹

(1. Quanzhou Medical College, Quanzhou, Fujian 362010, China)

(2. College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350108, China)

Abstract: [Objective] Inositol, also named cyclohexanol, is a kind of bioactive sugar alcohol. It was widely used in pharmaceutical, food and feed industries. To obtain the microbial cell factory that produced more inositol, the recombinant *Saccharomyces cerevisiae* was constructed by metabolic engineering. [Methods] Positive and negative regulation of inositol biosynthesis was modified. The Inositol-3-phosphate synthase gene (*ino1*) was overexpressed in *S. cerevisiae*. Meanwhile, the transcription inhibitor gene (*opi1*) that inhibits the biosynthesis of inositol and the antibiotic resistance gene (*kanMX*) for screening strains were knocked out of recombinant *S. cerevisiae*. Inositol content in fermentation broth of engineered strains was detected by Gas chromatography.

Foundation item: Medical Health Youth Fund in Fujian Province (No. 2014-1-87); National Earmarked Fund for Modern Agro-industry Technology Research System of China (No. CARS-20-4-4)

*Corresponding author: Tel: 86-595-22136955; E-mail: hzj887@126.com

Received: June 28, 2017; Accepted: July 28, 2017; Published online (www.cnki.net): August 08, 2017

基金项目: 福建省医药卫生科研人才培养项目资助计划(No. 2014-1-87); 国家现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目(No. CARS-20-4-4)

*通讯作者: Tel: 86-595-22136955; E-mail: hzj887@126.com

收稿日期: 2017-06-28; 接受日期: 2017-07-28; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-08-08

[Results] Biological safety engineered strain *S. cerevisiae* was constructed and shake flask fermentation results showed the yield of inositol was 1.021 g/L. **[Conclusion]** Over-expression of *ino1* gene and *opi1* gene knocked out could efficiently enhance the productivity of inositol in *S. cerevisiae*. The results provided the foundation for industrial application of inositol production by microbial fermentation.

Keywords: Inositol, Gene knockout, *ino1*, *opi1*, Genetically engineered microorganisms, *Saccharomyces cerevisiae*

肌醇(Inositol)是一种具有生物活性的环状糖醇,分布在动植物,特别是全谷物和柑橘类水果内,是动物及微生物的生长因子,广泛应用于医药、食品和饲料领域。肌醇具有抗焦虑、抗炎等功效,可应用于辅助治疗神经性疾病^[1],肌醇失衡被证实与阿尔茨海默病(Alzheimer's disease)、双相性精神障碍(Bipolar disorder)、癫痫等神经退行性疾病相关^[2]。肌醇可改善多囊卵巢综合症女性的排卵功能和胰岛素敏感性^[3-5]。此外,肌醇是氟代肌醇、脉通等药物的中间体,在治疗肿瘤、动脉粥样硬化等方面有较好的疗效^[6]。肌醇也是葡萄糖二酸微生物法生产的前体物^[7]。

目前肌醇的生产方法,主要是提取米糠、麸皮等底物中的植酸钙,进行加压水解制备。其产率低,且存在污染环境、成本投入高等缺点。所以有必要通过其他有效途径来解决肌醇供求之间的矛盾。生物法制备肌醇因其长足的发展空间,越来越受到研究者的重视,主要包括微生物酶催化法产肌醇和微生物发酵法产肌醇^[8]。目前微生物发酵法产肌醇所用的菌株有酵母菌、大肠杆菌以及枯草芽孢杆菌^[9]等。

酵母中肌醇的生物合成途径基本明晰^[10]。其中肌醇-3-磷酸合成酶是关键酶,其编码基因是 *ino1*。张厚程等^[11]将含有 *ino1* 的质粒转化于肌醇营养缺陷型粟酒裂殖酵母菌内,使其成为肌醇原养型,其中 *Sch.P944* 菌株的肌醇分泌量达到 816 mg/L。Hisashi 等^[12]对酿酒酵母进行改造,过表达 *ino1*,并且降低糖酵解酶的活性,重组菌通过培养,利用 15.1 g/L 葡萄糖可产 3.1 g/L 的肌醇,通气补料培养其肌醇生产强度达到 4.0 g/(L·d)。Konishi 等^[13]

对不具有内源肌醇合成途径的 *Escherichia coli* 进行代谢改造,得到工程菌株 AKC-016-G22,其肌醇产量为 2.31 g/L。

opi1 为转录调控因子基因,它编码的蛋白质是肌醇生物合成的一个负调节子^[14]。Henry 等通过敲除酿酒酵母中 *opi1*,构建了能够分泌肌醇的工程菌株 YS2 (ATCC-74033)等^[15]。

以上表明,利用基因工程改造酿酒酵母促进肌醇的合成是可行的。因此,本研究在已有研究基础上,通过构建高效表达 *ino1* 的肌醇基因工程菌,在此基础上敲除重组菌中 *opi1*,以期构建高产肌醇的工程菌株。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: *S. cerevisiae* Y01 (二倍体)由福建师范大学生命科学学院保存;*S. cerevisiae* S288c 由上海交通大学微生物代谢国家重点实验室赵心清教授惠赠。pUG6、pSH65 载体为本实验室保存,pUG6 携带有 G418 抗性基因,*kanMX* 的两端带有 *loxP* 位点。pURIH 为本实验室构建。

1.1.2 主要试剂和仪器: G418 购自北京索莱宝科技有限公司;鲑鱼精 DNA 购自 Sigma 公司;Fastpfly Fly DNA Polymerase、DNA Marker、Plasmid MiniPrep Kit 购自北京全式金生物技术有限公司;TIANamp Yeast DNA Kit (离心柱型)购自天根生化科技(北京)有限公司。2720 Thermal Cycler PCR 仪、7500 Real-Time PCR System, Applied Biosystems 公司;GC-2010 Plus 气相色谱仪,岛津公司;Gene Pulser Xcell™ 电穿孔系统, Bio-Rad 公司。

1.1.3 培养基: (1) LB 培养基(g/L): 酵母粉 5.0, 蛋白胨 10.0, 氯化钠 10.0。(2) YPD 培养基(g/L): 酵母粉 10.0, 蛋白胨 20.0, 葡萄糖 20.0。(3) G418 抗性培养基: 将 G418 按需要加入到冷却至 50 °C 左右的 YPD 培养基中, 配制成不同终浓度的抗性培养基。(4) Zeocin 抗性培养基: 将 Zeocin 母液加入到冷却至 46 °C 左右的 YPD 固体培养基中, 终浓度为 50 mg/L。(5) YPG 诱导培养基(g/L): 酵母粉 10.0, 半乳糖 20.0, 蛋白胨 20.0。(6) 摇瓶发酵培养基(g/L): Yeast Nitrogen Base 6.7, 葡萄糖 12.0, 硫酸铵 4.0。

1.2 引物设计

根据 *S. cerevisiae* S288c 的 *opi1* 和 *ino1* 序列以及 pUG6 质粒序列, 分别设计 *opi1* 敲除组件引物、*ino1* 特异性引物及相关验证引物。引物序列见表 1。敲除组件引物设计原理和结构见图 1。*opi1*-disrupt-F、*opi1*-disrupt-R 的 5'端 45 个碱基, 用来与 *opi1* 进行同源重组。

opi1-disrupt-R 的 3'端分别是 19、22 个碱基与质粒 pUG6 中 *LoxP*-*kanMX*-*LoxP* 两侧的上、下游的片段序列相同, 用来扩增 *LoxP*-*kanMX*-*LoxP*。

表 1 本实验所涉及到的引物 Table 1 Primers used in this study		
Primers	Sequences (5'→3')	Sizes (bp)
<i>ACT1</i> -F	AGAGTTGCCCCAGAAGAACA	20
<i>ACT1</i> -R	GGCTTGGATGGAAACGTAGA	20
<i>ino1</i> -F	CGGTATTGGCGAATAAGCAC	20
<i>ino1</i> -R	TTGAGTCATGGAGCCGAAGT	20
<i>opi1</i> -disrupt-F	TGTGTATCAGGACAGTGTTTTAA ACGAAGATACTAGTCATTGATGC AGCTGAAGCTTCGTACGC	64
<i>opi1</i> -disrupt-R	TATTACTGGTGGTAATGCATGAA AGACCTCAATCTGTCTCGGTTAG CATAGGCCACTAGTGGATCTG	67
<i>opi1</i> -F	AGTCTTTCCCCTGGGTCAGATAC AA	21
<i>opi1</i> -R	GAGCCATTCAAAGGTAAAGAGG GTC	22
<i>opi1</i> -mid	CAGCGAGCAGTCTATTGTGGTGA AA	21

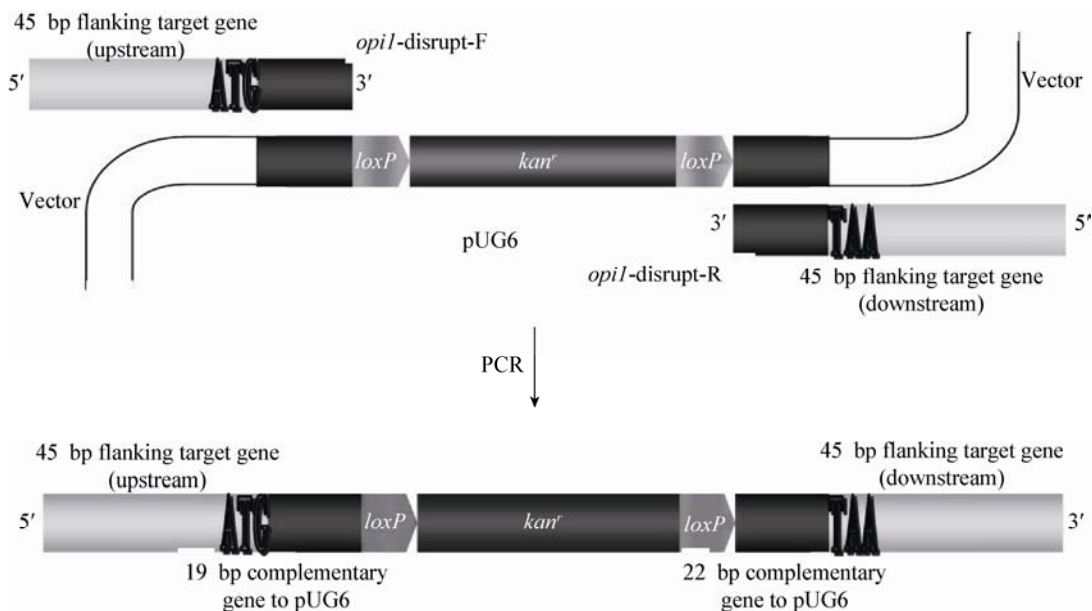


图 1 敲除组件引物设计原理和结构
Figure 1 Design the primers for gene disruption cassette

1.3 含 *Scino1* 的酵母多拷贝整合表达载体 pURIH 的构建及转化

pURIH 整合表达载体的构建过程及转化酿酒酵母 Y01 详见参考文献[16-17]。

1.4 *opil* 敲除组件的构建

以 pUG6 质粒 DNA 为模板, 利用引物 *opil*-disrupt-F 和 *opil*-disrupt-R, 用高保真酶 Fastpfu Fly DNA Polymerase 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 (50 μ L): 5 \times Buffer 10 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 5.0 μ L, 上下游引物(10 μ mol/L)各 2.0 μ L, pUG6 (1 μ g/ μ L) 1.0 μ L, Fastpfu Fly DNA Polymerase 1.0 μ L, ddH₂O 29 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 10 s, 55 $^{\circ}$ C 25 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。琼脂糖凝胶电泳分析后, 使用 Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System 柱式 DNA 胶回收试剂盒进行胶回收, 保存于-20 $^{\circ}$ C 备用。

1.5 *opil* 及 *kanMX* 筛选标记的敲除

根据 Cre/loxP 系统敲除原理^[18], 以 pUG6 质粒为模板, 使用引物 *opil*-disrupt-F 和 *opil*-disrupt-R 进行 PCR 得到删除组件, 测序验证后, 采用高效的酿酒酵母电击转化法^[19], 将其转化酿酒酵母工程菌 YI2-1 Δ KP。电转化条件为: 电压: 1.5 kV, 电容: 25 μ F, 电阻: 200 Ω , 2 mm 转化杯。通过 G418 抗性平板筛选, 基因组 PCR 验证后, 获得发生同源重组的阳性转化子。再将 pSH65 质粒转化阳性转化子, 利用 YPG 液体培养基诱导培养 4 h, 经半乳糖诱导表达产生 Cre 酶切除 *kanMX*。提取基因组进行 PCR 验证, 验证正确后在 YPD 液体培养基中连续传代 10-15 代丢失质粒 pSH65, 影印 Zeocin 抗性平板筛选, 得到 *opil* 单倍体缺陷型菌株。重复以上步骤敲除 *opil* 等位基因, 最终得到 *opil* 二倍体缺陷型菌株, 将其命名为 YI2-1 Δ *opil*。

1.6 酵母菌株发酵培养

活化酿酒酵母菌株后, 挑取平板上的酵母单菌落, 接种到 5 mL YPD 液体培养基中, 在 30 $^{\circ}$ C、220 r/min 条件下培养 18 h。然后按 1% 的接种量接

种至含有 50 mL 无肌醇发酵培养基的摇瓶中进行二级扩大培养。将二级种子液按接种后菌体 OD₆₀₀ 为 0.2 的量接种至含有 100 mL 无肌醇发酵培养基的 250 mL 三角瓶中培养。

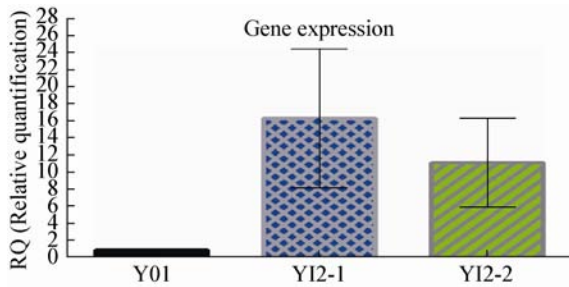
1.7 气相色谱法检测肌醇含量

工程菌株接种于发酵培养基中, 30 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养 50 h 后, 将上述发酵液的一部分进行离心(6 000 r/min, 5 min), 上清液过 0.45 μ m 过滤器于样品瓶内, 再按照 GB5413.25-2010 食品安全国家标准婴幼儿食品和乳品中肌醇的测定中的第二法——气相色谱法进行样品处理。使用岛津气相色谱仪 GC-2010 Plus 进行分析测定。色谱柱为 RTX-1701 (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m), 程序设定: 进样口温度: 280 $^{\circ}$ C; 检测器温度: 300 $^{\circ}$ C; 载气氮气: 1.06 mL/min; 氢气流速: 40 mL/min; 空气: 400 mL/min; 不分流; 进样量: 1 μ L; 程序升温: 120 $^{\circ}$ C 0 min、190 $^{\circ}$ C 20 min、220 $^{\circ}$ C 10 min。

2 结果与分析

2.1 *ino1* 过表达菌株的筛选

以 pUG6 质粒为骨架, 连入 rDNA 片段和 *ino1* 表达框, 启动子为 PGK, 终止子为 CYC1。最终获得多拷贝整合表达载体 pURIH。再将 pURIH 转化酿酒酵母 Y01 菌株, 经 G418 (0.5-2.0 g/L) 浓度梯度平板筛选, 提取高拷贝转化子的基因组进行 PCR 验证后, 获得重组菌 YI1。为获得 *ino1* 表达量更高的菌株, 将表达载体 pURIH 电转化 YI1 菌株。经筛选, 最终构建工程菌株 YI2-1 和 YI2-2。荧光定量 PCR 方法分析菌株 *ino1* 表达量, 结果显示 YI2-1 菌株 *ino1* 的 mRNA 水平是出发菌 Y01 的 16.235 倍(图 2)。表明成功构建了 *ino1* 过表达菌。敲除 *kanMX*, 将不含 *kanMX* 的菌株命名为 YI2-1 Δ KP。重组菌株进行摇瓶发酵实验, 检测得 YI2-1 肌醇产量为 325 mg/L、YI2-1 Δ KP 为 627 mg/L。两株重组菌肌醇产量存在差别的原因可能是, *MX* 抗性标记对酵母有一定的毒性作用^[20]。

图2 *ino1* 的表达分析Figure 2 Gene expression levels of *ino1*

2.2 *opi1* 敲除组件的构建

以质粒pUG6作为模板, 使用引物*opi1*-disrupt-F和*opi1*-disrupt-R进行PCR得到基因删除组件, PCR扩增产物纯化回收后, 1%琼脂糖电泳分析表明, 组件基因片段大小与理论预计大小1703 bp相符(图3), 测序正确, 说明成功获得*opi1*敲除组件。

2.3 *opi1* 缺陷菌株的构建

采用高效的酿酒酵母电击转化法将敲除组件转化酿酒酵母工程菌Y12-1ΔKP, 多次转化实验后, 筛选平板上长有3个菌落。以验证引物*opi1*-F/*opi1*-R(位于*opi1*的上下游)为引物, 以转化

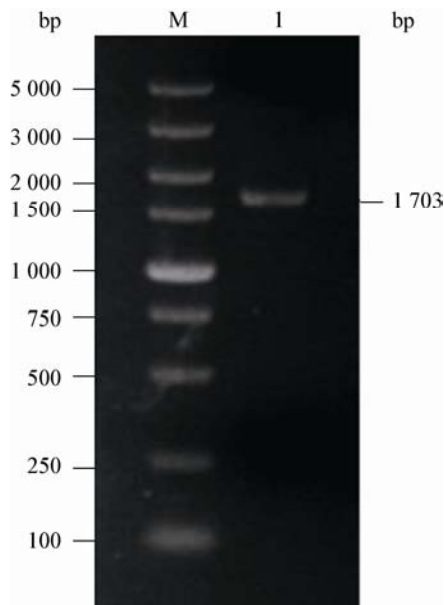


图3 PCR扩增敲除组件

Figure 3 Verification of gene disruption cassette

注: 1: 敲除组件的PCR扩增片段; M: DL5000 DNA marker.

Note: 1: PCR product of disruption cassette; M: DL5000 DNA marker.

子基因组为模板经PCR验证, 如果敲除组件与转化子基因组发生了同源重组, 那么PCR产物大小为2140 bp, 对照组为1740 bp。结果显示1号和3号为阳性转化子, 2号为阴性菌落(图4)。

转化pSH65质粒至阳性酿酒酵母菌株内, 半乳糖诱导培养后, 提取菌体基因组DNA作为模板进行PCR验证, 得到*opi1*单倍体缺陷型菌株。

使用同样的方法删除另一条等位基因, 获得*opi1*双倍体缺陷菌株。提取*opi1*缺陷菌株的基因组为模板, 如果是单倍体缺陷菌株, 以中间引物*opi1*-mid/*opi1*-R为引物的PCR产物大小是775 bp, 以*opi1*上下游引物*opi1*-F/*opi1*-R为引物的PCR产物大小为1740 bp和632 bp。如果是双倍体缺陷菌株, 以中间引物*opi1*-mid/*opi1*-R为引物则无PCR产物, 以*opi1*-F/*opi1*-R为引物的PCR产物大小是632 bp。经PCR验证, 结果符合预期(图5), 说明成功敲除了*opi1*, 获得*opi1*双倍体缺陷菌株, 命名为Y12-1Δ*opi1*。

2.4 菌株摇瓶发酵生长情况

摇瓶发酵培养48 h, 出发菌株Y01、过表达

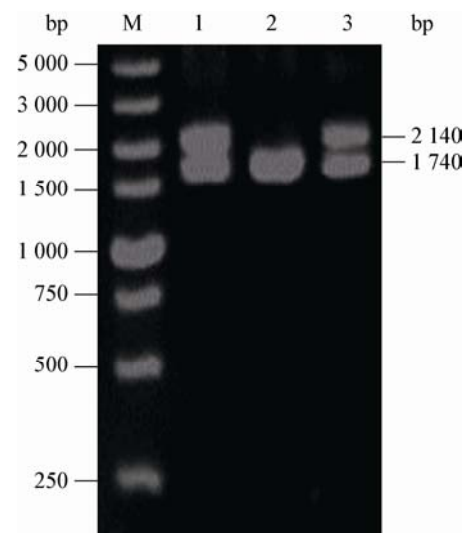


图4 PCR验证阳性转化子

Figure 4 PCR identification of positive clones

注: M: DL5000 DNA marker; 1、3: 阳性转化子的PCR扩增片段; 2: 阴性转化子的PCR扩增片段。

Note: M: DL5000 DNA marker; 1, 3: PCR products of positive clones; 2: PCR product of negative clone.

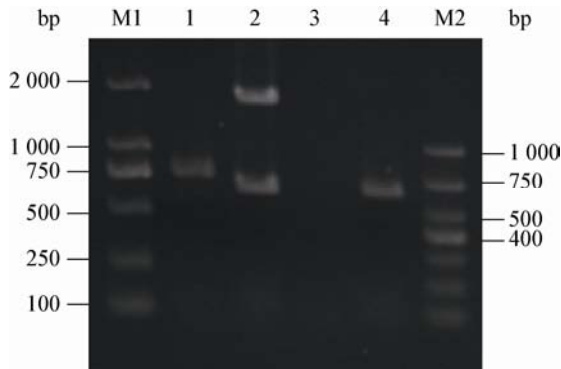


图5 *opil* 基因敲除菌株的鉴定

Figure 5 Detection for *opil* gene deficient mutant

注: M1: DL2000 bp DNA marker; M2: DL1000 bp DNA marker; 1: *opil*-mid/*opil*-R 引物、*opil* 单倍体缺陷菌基因组 PCR 产物; 2: *opil*-F/*opil*-R 引物、*opil* 单倍体缺陷菌基因组 PCR 产物; 3: *opil*-mid/*opil*-R 引物、*opil* 双倍体缺陷菌基因组 PCR 产物; 4: *opil*-F/*opil*-R 引物、*opil* 双倍体缺陷菌基因组 PCR 产物。
Note: M1: DL2000 bp DNA marker; M2: DL1000 bp DNA marker; 1: PCR product from *opil* haploid deficient mutant by primers *opil*-mid/*opil*-R; 2: PCR products from *opil* haploid deficient mutant by primers *opil*-F/*opil*-R; 3: PCR product from *opil* diploid deficient mutant by primers *opil*-mid/*opil*-R; 4: PCR product from *opil* diploid deficient mutant by primers *opil*-F/*opil*-R.

ino1 的菌株 YI2-1ΔKP, 以及 *opil* 敲除后的菌株 YI2-1Δ*opil* 的生长情况如图 6 所示。YI2-1ΔKP 生长最好, 敲除了 *opil* 的菌株 YI2-1Δ*opil* 与之相比较, *OD* 值要小, 说明 *opil* 缺失可能对细胞有一定影响。但重组菌的生长速率均比出发菌株高, 较早进入对数期。说明肌醇的合成能够增强菌株细胞的活力。

2.5 重组菌发酵液肌醇含量测定

YI2-1Δ*opil* 重组菌摇瓶发酵培养 50 h 后, 对发酵上清液进行样品处理。使用岛津气相色谱仪 GC-2010 Plus 进行分析测定, GC 检测结果如图 7 所示。以出发菌为对照, 经重复实验, 根据肌醇浓

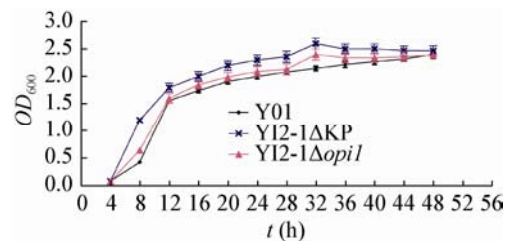


图6 Y01、YI2-1ΔKP 和 YI2-1Δ*opil* 生长曲线

Figure 6 Growth curves of Y01, YI2-1ΔKP and YI2-1Δ*opil*

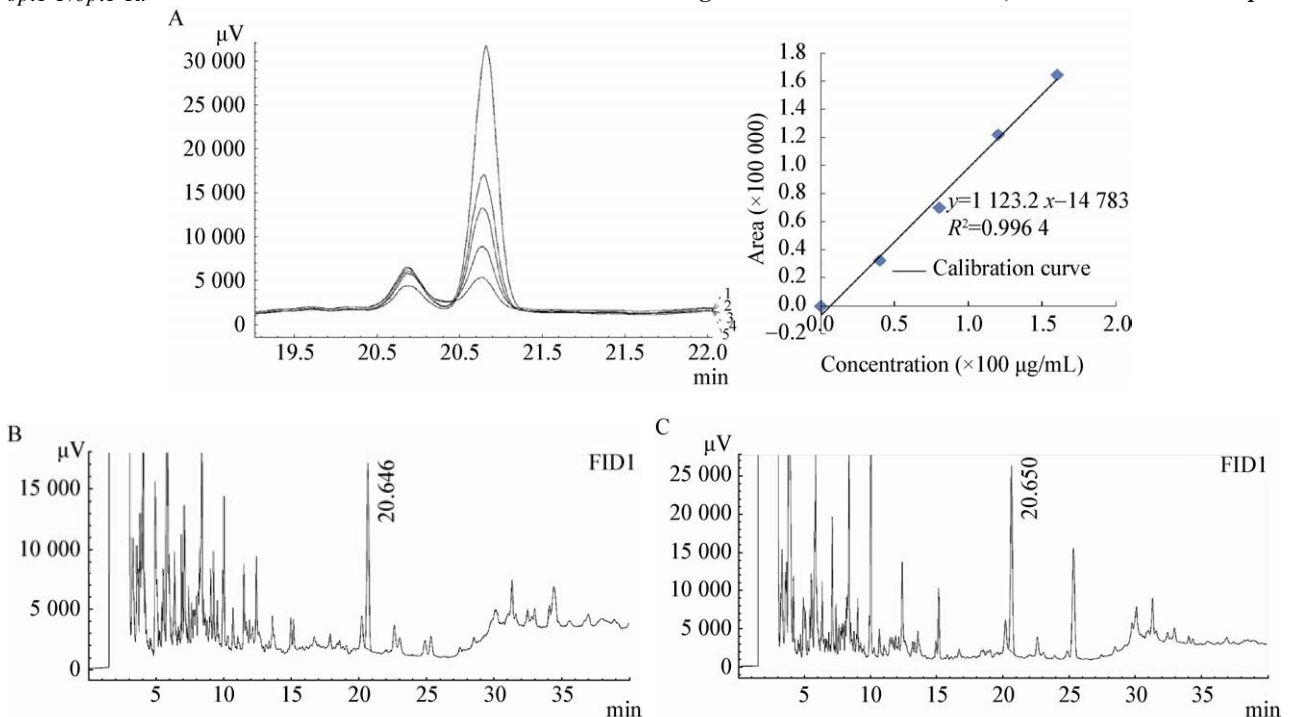


图7 肌醇标准品和重组菌发酵液的 GC 图

Figure 7 GC chromatogram of the standard sample and the product from recombinant *S. cerevisiae*

注: A、B: 肌醇标准品; C: YI2-1Δ*opil* 菌株发酵液。

Note: A, B: Inositol; C: The product from YI2-1Δ*opil*.

度的标准曲线(图 7A), 测得 YI2-1 Δ *opi1* 菌株发酵液肌醇量为 1.021 g/L, 而出发菌株不产肌醇。该结果表明, 通过过表达 *ino1* 以及敲除 *opi1* 能有效促进肌醇的合成。

3 讨论

本研究表明, 对酿酒酵母进行过表达 *ino1* 和敲除 *opi1* 改造, 能够有效提高重组菌的肌醇产量。在酵母肌醇的生物合成途径中, 肌醇-3-磷酸合成酶是关键酶, 其编码基因是 *ino1*, 但 *ino1* 的表达受 UAS_{INO} 元件及肌醇焦磷酸合成的调控^[21-23], 如果培养基中含有肌醇, UAS_{INO} 会被激活而影响 *ino1* 的表达。然而胞内肌醇主要用于合成众多磷脂化合物和胆碱等^[24], 因此野生型酵母菌不外分泌肌醇。本研究通过过表达 *ino1* 获得能够分泌肌醇的菌株 YI2-1, 进一步证实了 *ino1* 在酵母肌醇生物合成中起到正调控的重要作用。

对 YI2-1 菌株 *kanMX* 敲除研究发现, *kanMX* 去除后, 重组菌的肌醇产量提高。根据 Babazadeh 等^[20]的研究可知 *MX* 抗性标记对酿酒酵母具有一定的毒性作用, 可能是这个原因造成的影响, 具体原因有待于进一步的研究。因此, 考虑到生产菌株的性能及生物安全性, 有必要将用于筛选用的抗性基因敲除掉。

Opi1 是肌醇生物合成的转录抑制子, 能够招募辅抑制因子 Sin3 和 Cyc8 与 Ino2 转录子结合^[25], 从而抑制 *ino1* 的表达程度。因此, 为消除 *Opi1* 对肌醇合成的抑制作用, 本研究将 *opi1* 敲除。发酵实验结果表明, *opi1* 缺失的工程菌株发酵产物肌醇, 与只过表达 *ino1* 菌株相比, 产量提高了 62.8%。这进一步证明了 *opi1* 对肌醇生物合成的负反馈作用, 敲除 *opi1* 能够更有效地促进酿酒酵母肌醇的合成。另外, 摇瓶培养生长情况表明, *opi1* 缺失菌株的生长速率要比 YI2-1 Δ KP 菌株低。这可能因为 *Opi1* 不仅调控肌醇生物合成, *Opi1* 作为转录调控因子还调控多个基因^[14], *opi1* 缺失对菌株细胞有一定的影响^[26]。但与出发菌株相比,

重组菌 YI2-1 Δ *opi1* 活力还是比较强的。这可能是由于肌醇作为 PI (磷脂酰肌醇) 的前体物及酵母生长因子, 能够增强细胞活力^[27], 弥补了其缺失。

Hisashi 等^[12]研究构建的产肌醇酿酒酵母工程菌株时, 利用合成培养基进行通气培养(1.2 L/min, 680 r/min), 其肌醇生产强度为 4.0 g/(L·d)。Konishi 等^[28]研究发现通过增强肌醇单磷酸酶活性, 这样的转化体的肌肉肌醇生产能力大幅提高, 导入了肌醇单磷酸酶基因的菌株 AKC-018, 其肌肉肌醇产量为 1.84 g/L, 该菌株中的肌醇单磷酸酶活性的亢进使得肌肉肌醇生产率与对照相比提高了 1.5–5.0 倍。本研究构建的生物安全的肌醇产生菌 YI2-1 Δ *opi1* 与上述研究者相比, 在肌醇产量上还不够理想, 还存在一些差距。这可能是由于培养基对发酵结果有较大影响^[10], 而本研究为初步发酵培养, 所用发酵培养基简单, 培养方式为摇瓶分批培养。因此, 在后期的研究中还需要加强对培养基配方和发酵工艺的优化, 以及进一步改造重组菌, 如过表达肌醇单磷酸酶基因等, 以期进一步提高重组菌株的肌醇产量。

参考文献

- [1] Taylor M, Wilder H, Bhagwagar Z, et al. Inositol for depressive disorders[J]. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2004(1): CD004049. DOI: 10.1002/14651858.CD004049.pub2
- [2] Frej AD, Otto GP, Williams RS. Tipping the scales: Lessons from simple model systems on inositol imbalance in neurological disorders[J]. European Journal of Cell Biology, 2017, 96(2): 154-163
- [3] Genazzani AD, Santagni S, Rattighieri E, et al. Modulatory role of D-chiro-inositol (DCI) on LH and insulin secretion in obese PCOS patients[J]. Gynecological Endocrinology, 2014, 30(6): 438-443
- [4] Genazzani AD, Santagni S, Ricchieri F, et al. Myo-inositol modulates insulin and luteinizing hormone secretion in normal weight patients with polycystic ovary syndrome[J]. Journal of Obstetrics and Gynaecology Research, 2014, 40(5): 1353-1360
- [5] Genazzani AD, Prati A, Despini G, et al. PCOS from Lifestyle to the Use of Inositol and Insulin Sensitizers[A]/Genazzani AR, Brincat M. Frontiers in Gynecological Endocrinology[M]. New York: Springer International Publishing, 2014: 59-67
- [6] Vucenic I, Shamsuddin AM. Cancer inhibition by inositol hexaphosphate (IP₆) and inositol: from laboratory to clinic[J]. The Journal of Nutrition, 2003, 133(11): 3778S-3784S
- [7] Gong X, Liu Y, Wang C, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of glucaric acid[J].

- Chinese Journal of Biotechnology, 2017, 33(2): 228-236 (in Chinese)
巩旭, 刘叶, 王鑫, 等. 代谢工程改造酿酒酵母合成葡萄糖二酸[J]. 生物工程学报, 2017, 33(2): 228-236
- [8] Huang ZJ, Chen YQ. Advances in microbial production of inositol[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(16): 384-389 (in Chinese)
黄贞杰, 陈由强. 微生物法生产肌醇研究进展[J]. 食品工业科技, 2015, 36(16): 384-389
- [9] Yamaoka M, Osawa S, Morinaga T, et al. A cell factory of *Bacillus subtilis* engineered for the simple bioconversion of *myo*-inositol to *scyllo*-inositol, a potential therapeutic agent for Alzheimer's disease[J]. Microbial Cell Factories, 2011, 10: 69
- [10] Liu WB, Jin YK, You S. Current situation and development of the study on preparation methods of *myo*-inositol[J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University, 2012, 29(3): 234-240 (in Chinese)
刘文宝, 金玉坤, 游松. 肌醇制备方法的现状与进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2012, 29(3): 234-240
- [11] Zhang HC, Chi ZM, Yu DK, et al. Effects of *ino1* gene expression in *Schizosaccharomyces pombe* on invertase secretion and phosphoinositol (PI) synthesis[J]. Journal of Shandong University (Natural Science), 2002, 37(6): 544-547,551 (in Chinese)
张厚程, 池振明, 于典科, 等. *ino1* 基因在粟酒裂殖酵母中的表达及对蔗糖酶分泌和磷脂合成的影响[J]. 山东大学学报: 理学版, 2002, 37(6): 544-547,551
- [12] Hisashi S, Yusuke M, Rie T. Microorganism producing inositol with high yield, and method for manufacturing inositol by using same: WO, 2013125666 A1[P]. 2013-08-29
- [13] Konishi K, Imazu S, Sato M. Method for producing *myo*-inositol and *myo*-inositol derivative: CN, 104271756 A[P]. 2015-01-07
- [14] Santiago TC, Mamoun CB. Genome expression analysis in yeast reveals novel transcriptional regulation by inositol and choline and new regulatory functions for *Opi1p*, *Ino2p*, and *Ino4p*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(40): 38723-38730
- [15] Henry SA, White MJ. Inositol-excreting yeast: US, 5599701 A[P]. 1997-02-04
- [16] Huang ZJ, Chen L, Zhang JS, et al. Cloning of *Scin1* gene and construction of yeast multi-copy integration expression vector[J]. Journal of Fujian Normal University (Natural Science Edition), 2012, 28(6): 100-105 (in Chinese)
黄贞杰, 陈玲, 张积森, 等. *Scin1* 基因克隆及酵母多基因多拷贝整合表达载体的构建[J]. 福建师范大学学报: 自然科学版, 2012, 28(6): 100-105
- [17] Huang ZJ, Chen YQ, Chen LX, et al. Construction of genetically engineered *Saccharomyces cerevisiae* for inositol production[J]. Microbiology China, 2016, 43(7): 1540-1546 (in Chinese)
黄贞杰, 陈由强, 陈丽霞, 等. 产肌醇酿酒酵母基因工程菌的构建[J]. 微生物学通报, 2016, 43(7): 1540-1546
- [18] Gueldener U, Heinisch J, Koehler GJ, et al. A second set of *loxP* marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast[J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30(6): e23
- [19] Xu ZW, Zhang Y, Wang ZX, et al. A highly efficient protocol for transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris* by electroporation[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2010, 49(3): 98-101
- [20] Babazadeh R, Jafari SM, Zackrisson M, et al. The *Ashbya gossypii EF-1a* promoter of the ubiquitously used MX cassettes is toxic to *Saccharomyces cerevisiae*[J]. FEBS Letters, 2011, 585(24): 3907-3913
- [21] Kagiwada S, Zen R. Role of the yeast VAP homolog, *Scs2p*, in *ino1* expression and phospholipid metabolism[J]. Journal of Biochemistry, 2003, 133(4): 515-522
- [22] Wang Y, Liu TB, Delmas G, et al. Two major inositol transporters and their role in cryptococcal virulence[J]. Eukaryotic Cell, 2011, 10(5): 618-628
- [23] Ye CQ, Bandara WMS, Greenberg ML. Regulation of inositol metabolism is fine-tuned by inositol pyrophosphates in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2013, 288(34): 24898-24908
- [24] Henry SA, Gaspar ML, Jesch SA. The response to inositol: regulation of glycerolipid metabolism and stress response signaling in yeast[J]. Chemistry and Physics of Lipids, 2014, 180: 23-43
- [25] Kliewe F, Engelhardt M, Aref R, et al. Promoter recruitment of corepressors Sin3 and Cyc8 by activator proteins of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Current Genetics, 2017, 63(4): 739-750
- [26] Luévano-Martínez LA, Appolinario P, Miyamoto S, et al. Deletion of the transcriptional regulator *opi1p* decreases cardiolipin content and disrupts mitochondrial metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2013, 60: 150-158
- [27] Hong ME, Lee KS, Yu BJ, et al. Identification of gene targets eliciting improved alcohol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* through inverse metabolic engineering[J]. Journal of Biotechnology, 2010, 149(1/2): 52-59
- [28] Konishi K, Imazu S, Sato M. Method for producing *myo*-inositol and *myo*-inositol derivative: US, 20160194667[P]. 2016-07-07