

## 产肌醇酿酒酵母基因工程菌的构建

黄贞杰<sup>1\*</sup> 陈由强<sup>2</sup> 陈丽霞<sup>1</sup> 陈淑增<sup>1</sup> 王容贞<sup>1</sup> 陈文标<sup>1</sup>

(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】过表达酿酒酵母肌醇合成关键酶基因 *INO1*, 促进肌醇合成, 构建能够分泌肌醇的基因工程菌株。【方法】构建 rDNA 介导的 *INO1* 基因多拷贝整合表达载体 pURIH, 电转化酿酒酵母 Y01 菌株, 构建工程菌株 YI2-1 和 YI2-2, 荧光定量 PCR 方法分析 *INO1* 基因表达量。敲除 *KanMX* 抗性基因, HPLC 检测重组菌发酵液中肌醇含量。【结果】获得 *INO1* 基因过表达菌株 YI2-1 和 YI2-2, YI2-1 的 *INO1* 基因表达量是出发菌 Y01 的 16.235 倍。敲除 *KanMX* 抗性基因的菌株命名为 YI2-1 $\Delta$ KP, 初步检测 YI2-1 $\Delta$ KP 产肌醇量为 627 mg/L。【结论】rDNA 介导的 *INO1* 基因多拷贝整合表达载体 pURIH 能够有效地过表达目的基因; 过表达菌株合成的肌醇不仅能满足自身的需要, 而且能够向胞外分泌, 具有潜在的工业应用价值。

**关键词:** 肌醇, 过表达, *ScINO1*, 基因工程菌, 酿酒酵母

## Construction of genetically engineered *Saccharomyces cerevisiae* for inositol production

HUANG Zhen-Jie<sup>1\*</sup> CHEN You-Qiang<sup>2</sup> CHEN Li-Xia<sup>1</sup> CHEN Shu-Zeng<sup>1</sup>  
WANG Rong-Zhen<sup>1</sup> CHEN Wen-Biao<sup>1</sup>

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

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

**Abstract:** [Objective] This study aimed to construct a genetically engineered *Saccharomyces cerevisiae* strain for inositol production by overexpressing its *INO1* gene that encodes inositol-1-phosphate synthase. [Methods] The integrated multi-copy expression vector pURIH was constructed via an rDNA-mediated method and transformed into *S. cerevisiae* Y01 strain. The expression levels of *INO1* in genetically engineered strains were analyzed through quantitative RT-PCR. *KanMX* resistance gene was knocked out to promote an efficient inositol production, which

**Foundation item:** Medical Health Youth Fund in Fujian Province (No. 2014-1-87); National Demonstrative Higher Vocational Colleges Construction Projects of Quanzhou Medical College (No. XJ1317); Earmarked Fund for Modern Agro-industry Technology Research System (No. CARS-20-4-4)

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

Received: November 15, 2015; Accepted: March 01, 2016; Published online (www.cnki.net): March 10, 2016

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); 泉州医学高等专科学校“国家骨干院校建设”重点资助科研项目(No. XJ1317); 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: 2015-11-15; 接受日期: 2016-03-01; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-03-10

was detected through HPLC. **[Results]** Two genetically engineered strains, namely, YI2-1 and YI2-2, were constructed. These strains could highly express *INO1*. YI2-1 produced 16.235 times more inositol than Y01 did. The *KanMX* resistance gene was knocked out in the YI2-1 $\Delta$ KP strain, which efficiently produced up to 627 mg/L inositol. **[Conclusion]** pURIH could be applied to overexpress homologous *INO1* in *S. cerevisiae*. The amount of inositol produced by the engineered strain was sufficient and thus could be employed in engineering applications.

**Keywords:** Inositol, Overexpression, *ScINO1*, Genetically engineered microorganisms, *Saccharomyces cerevisiae*

肌醇(Inositol)又称环己六醇,分子式为 $C_6H_{12}O_6$ ,相对分子量是180.16,具有诸多重要的生理活性,广泛应用于医药、食品及饲料等行业。肌醇是细胞膜的组成成分之一,是胞内第二信使磷脂酰肌醇(Phosphatidylinositol, PI)合成的前体,不仅在钙平衡和信号传递方面起重要作用<sup>[1]</sup>,还能保持脑细胞的结构完整<sup>[2]</sup>。肌醇浓度被证实与新生儿脑病、阿尔茨海默病、唐氏综合症等持续性神经功能障碍有关;此外,肌醇还可改善PCOS(多囊卵巢综合症)女性的胰岛素敏感性和排卵功能,治疗妇女代谢综合症<sup>[3-5]</sup>,具有抗氧化、抗衰老、抗炎功能<sup>[6]</sup>。

肌醇的传统生产方法一般是从小麦胚或麸皮中提取出植酸钙,再加压水解制得肌醇,但此方法存在制备过程复杂、成本投入高、污染环境等缺点。所以肌醇供求之间的矛盾必需通过其它有效途径来解决,而用微生物发酵法生产肌醇正是解决这一矛盾的途径。利用微生物法生产肌醇具有很好的应用前景。

酵母从葡萄糖开始合成肌醇的生物合成与代谢途径基本明晰<sup>[7]</sup>。在肌醇的合成过程中,肌醇-1-磷酸合成酶是关键酶,该酶的表达受到其产物肌醇的反馈抑制,野生菌株中肌醇-1-磷酸合成酶只在对数期或缺少肌醇的情况下表达。该酶的编码基因为*INO1*,是酵母中受控制最严格的基因之一,对*INO1*基因启动子的研究发现,其启动子的上游存在一些重复序列,称作UAS<sub>INO</sub>元件。UAS<sub>INO</sub>是对肌醇敏感的序列,如果培养基中含有肌醇,它会被激活而影响*INO1*的表达,酵母细胞中的肌醇-1-磷酸合成酶便受到阻遏,细胞中的肌醇合成停止<sup>[8-11]</sup>。Ye等<sup>[12]</sup>研究发现酿酒酵母中肌醇焦磷酸激酶和*KCS1*

编码的碱性亮氨酸拉链结构域(Basic leucine zipper domains)都是*INO1*表达所需要的,敲除肌醇焦磷酸激酶的编码基因*KCS1*引发肌醇营养缺陷,细胞内肌醇和磷脂酰肌醇减少。表明*INO1*的转录受肌醇焦磷酸合成的调控。Justin等<sup>[13]</sup>在*Escherichia coli*中过表达拟南芥的磷脂酰肌醇合成酶1,从而通过发酵制取肌醇。张厚程等<sup>[14]</sup>用含*INO1*的两个不同质粒对肌醇营养缺陷型粟酒裂殖酵母菌进行转化,发现两个质粒均能在粟酒裂殖酵母中自主复制并使其变成肌醇原养型。以上研究表明,通过调控肌醇生物合成与代谢途径中相关基因的表达,从而提高肌醇的合成量是可行的,特别是肌醇合成过程中的关键酶基因*INO1*。本研究通过构建rDNA介导的*INO1*基因多拷贝整合表达载体pURIH,电转化酿酒酵母Y01菌株,构建了高效表达*INO1*基因的肌醇基因工程菌YI2-1及抗性基因敲除后的菌株YI2-1 $\Delta$ KP,为微生物发酵法产肌醇奠定了一定的基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:**酿酒酵母S288c(二倍体),大连理工大学生命科学与技术学院赵心清教授惠赠;酿酒酵母Y01(二倍体)、大肠杆菌DH5 $\alpha$ 由农业部福建甘蔗生物学与遗传育种重点实验室保存。pURH、pURIH本研究构建;pUG6、pSH65载体由福建师范大学工业微生物教育部工程研究中心惠赠。pMD19-T Simple Vector购于TaKaRa公司。

**1.1.2 主要试剂和仪器:**鲑鱼精DNA, Sigma公司; Trizol、荧光定量试剂盒, Roche公司; DNase I (RNase Free), TaKaRa公司; 反转录试剂盒,

Fermentas 公司; Transfast *Taq* DNA 聚合酶、纯化试剂盒, 北京全式金生物技术有限公司; 其余生化药品为进口或国产分析纯试剂。UV-1100 紫外分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司, 7500 Real-Time PCR System, Applied Biosystems; Waters e2695 HPLC, 美国 Waters 公司。

**1.1.3 培养基:** (1) YPD 培养基(g/L): 酵母提取物 10、葡萄糖 20、蛋白胨 20, pH 自然,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min。(2) Zeocin 抗性选择培养基: 用 ddH<sub>2</sub>O 将 Zeocin 粉末溶解后用无菌过滤器过滤。配制成浓度为 100 g/L 的 Zeocin 母液, 避光保存。用时直接加入到灭菌后冷却至 50 °C 左右的 YPD 培养基中使其终浓度为 50 mg/L。由于 Zeocin 致死浓度和 pH 有关, 因此在 YPD 培养基灭菌前先用 NaOH 溶液调节 pH 至 7.0。(3) G418 抗性选择培养基: 冷却至 50 °C 左右的 YPD 培养基中按需要加入 G418, 配制不同终浓度的 G418 抗性培养基。(4) YPG 诱导培养基(g/L): 酵母提取物 10、半乳糖 20、蛋白胨 20。

## 1.2 引物设计

根据 GenBank 数据库公布的酿酒酵母 S288c 的 *INO1* 基因序列与 S288c 基因组上位于 rDNA 前后的序列, 利用软件 Prime Premier 5.0 分别设计 *INO1* 特异性引物和验证引物。在 RTPrimerDB (<http://medgen.ugent.be/rtprimerdb>) 网站找到已证实可用的 qRT-PCR 内参引物 *ACT1* 等。引物序列见表 1。

表 1 本实验所涉及到的引物  
Table 1 The primers in this study

Primer	Sequence (5'→3')	Size (bp)
<i>INO1</i> -F	CGGTATTGGCGAATAAGCAC	20
<i>INO1</i> -R	TTGAGTCATGGAGCCGAAGT	20
<i>ACT1</i> -F	AGAGTTGCCCCAGAAGAACA	20
<i>ACT1</i> -R	GGCTTGGATGGAAACGTAGA	20
rDNA-F	TTGTGGTGTCTGATGAGCGTGTA	23
rDNA-R	TGTCGGGGCTGGCTTAACTAT	21
<i>KanMX</i> -F	GTATGCGATAGTTCCTCACTCTTT	24
<i>KanMX</i> -R	ACTCTGGTGGAGGCTCGTAG	20

## 1.3 *ScINO1* 的克隆及含 *ScINO1* 基因的酵母多拷贝表达载体 pURIH 的构建

利用 PCR 技术, 以模式菌株酿酒酵母 S288c 的基因组 DNA 为模板, 扩增酿酒酵母肌醇-1-磷酸合成酶基因(*ScINO1*)包含 1 602 bp 的开放读码框。在 PUG6 上连入 rDNA 片段及组成型强启动子 *PGK* 和 *CYC1* 终止子, 构建 rDNA 介导的多拷贝整合表达载体 pURH, 并将 *ScINO1* 基因连入载体 pURH, 获得 *ScINO1* 基因超表达载体 pURIH<sup>[15]</sup>。

## 1.4 pURIH 的转化及筛选

采用高效的酿酒酵母电击转化法<sup>[16]</sup>, 将 *Kpn* I 酶线性化的 pURIH 载体转化感受态酿酒酵母 Y01。*Kpn* I 的单酶切位点位于 2.2 kb rDNA 片段的中部, 重组质粒载体经该酶线性化后可以整合到酿酒酵母染色体的特定部位, 实现多拷贝同源重组。电转条件为: 2 mm 转化杯; 电压: 1.5 kV; 电阻: 200 Ω, 电容: 25 μF。通过 G418 (0.5–2.0 g/L) 梯度平板筛选转化子。挑取高拷贝转化子。采用酵母基因组提取试剂盒提取菌落 PCR 阳性克隆子的基因组 DNA, 用 rDNA-F、rDNA-R 引物 PCR 验证载体是否已整合到酿酒酵母的染色体上。

## 1.5 重组菌及对照菌株生长曲线的测定

分别将出发菌株 Y01、过表达菌株 YI2-1 和 YI2-2 按 1% 的接种量接种于 0.05 L YPD 液体培养基中, 30 °C、220 r/min 培养, 每隔 4 h 取样并用紫外分光光度计在 600 nm 波长下测定其光吸收值以分析生长速率。以未接种的 YPD 液体培养基作为空白对照。以 *OD*<sub>600</sub> 值为纵坐标, 生长时间为横坐标, 做生长曲线。

## 1.6 实时荧光定量 PCR 分析

收集 YPD 液体培养基培养 24 h 的 Y01、YI2-1 和 YI2-2 菌株菌体, 液氮研磨, Trizol 提取总 RNA, DNase 酶进行 RNA 纯化后, 用 Fermentas 反转录试剂盒进行 Reverse Transcription PCR 来扩增 cDNA, 以此为模板进行 qRT-PCR 分析。选择 ABI7500 荧光定量 PCR 仪, 采用两步法按以下程序进行定时定量 PCR 反应: 95 °C 30 s; 95 °C 10 min,

95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 40 个循环; 熔解曲线分析: 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 95 °C 15 s。以酿酒酵母中的 *ACT1* 为内参基因(引物 *ACT1-F/R*), 每个基因的检测分别设置 3 个平行, 使用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法分析实验数据。重复 3 次实验, 使用 GraphPad prism 5 分析作图。

### 1.7 KanMX 筛选标记的切除

采用高效电转法将质粒 pSH65 转化到 YI2-1 克隆子中, 接着在 YPG 液体培养基中诱导培养 4 h (诱导产生的 Cre 酶切除方向相同的 2 个 loxp 位点间的含有 KanMX 筛选标记的序列, 留下 1 个 loxp 位点), 再将菌液涂布在 YPD 平板上培养 1–2 d, 挑取在 YPD 平板上的克隆子, 做菌落 PCR 验证。将抗性基因敲除的菌株在 YPD 培养基中传代 10–15 次, 涂布 YPD 平板, 单菌落长出后影印至带有 Zeocin 抗性的 YPD 平板, 从不含 Zeocin 的 YPD 平板上挑取丢失 Zeocin 抗性的酵母单菌落重新划线于含有 Zeocin 的平板上验证确实丢失了 pSH65 质粒。

### 1.8 高效液相色谱法测发酵液肌醇含量

发酵液中肌醇含量的测定: 培养液振荡提取后经离心、滤纸过滤再用三氯甲烷萃取, 上层水溶液经旋转蒸发浓缩, 浓缩液过 0.45  $\mu\text{m}$  过滤器于样品瓶内, 采用美国 Waters e2695 HPLC 检测。液相色谱分析条件如下: 色谱柱: Waters sugar-pak I 柱 (6.5 mm $\times$ 300 mm); 流动相: 去离子水; 流速: 0.4 mL/min; 柱温: 90 °C; 检测器: Waters 2414 示差检测器。

## 2 结果与分析

### 2.1 pURIH 的构建

构建得到整合表达载体 pURIH, 其大小为 8 864 bp, 测序 pURIH 整个载体, 结果表明 *PGK* 启动子、*INO1* 目的基因、*CYCI* 终止子在载体上连接完全正确。pURIH 采用了来源于宿主酿酒酵母自身的 3 个表达元件: 组成型强启动子 *PGK*、*CYCI* 终止子和 rDNA 同源重组序列, 能够实现目的基因的多拷贝整合及稳定表达。同时在表达盒两端有一对同尾酶 *Avr II*/*Spe I*, 可插入多个基因表达盒, 实现

多基因共表达。载体构建过程见图 1。

### 2.2 酿酒酵母过表达 *INO1* 菌株的筛选

通过 G418 (0.5–2 g/L) 梯度平板筛选转化子。挑取高拷贝转化子。采用酵母基因组提取试剂盒提取菌落 PCR 验证为阳性克隆子的基因组 DNA, 通过 rDNA-F (酿酒酵母基因组上位于 rDNA 前的第 237 位碱基开始的序列)、rDNA-R (pURIH 载体的第 91 位碱基开始) 进行引物 PCR 验证(图 2), 扩增得到的 DNA 片段为整合在酿酒酵母基因组上的 3 部分相连片段, 包括 rDNA 上游片段、rDNA 及 pURIH 载体部分片段。电泳条带与预期大小相符, 约为 2 667 bp。说明 rDNA 介导的过表达载体 pURIH 成功地与酿酒酵母 Y01 的基因组发生同源重组, 命名为 YI1。为获得目的基因更高表达量的菌株, 以已经整合的菌株 Y01 为出发菌株再次进行电转化并验证, 挑选最高 G418 浓度(3 g/L)的 YPD 平板上两个长势较好的单克隆, 以此作为重组菌, 命名为 YI2-1 和 YI2-2。

### 2.3 重组菌与出发菌 Y01 生长曲线的比较

YPD 液体培养基摇瓶培养出发菌和过表达菌, 实验结果表明(图 3), 过表达菌 YI2 对数期菌体生长速率均快于出发菌株 Y01。说明过表达 *INO1* 能够提高菌体细胞活力, 肌醇对细胞生长有一定的促进调控作用。

### 2.4 重组菌与出发菌 *INO1* 基因转录水平的比较

将反转录所得 Y01、YI2-1 和 YI2-2 菌株的 cDNA 进行 qRT-PCR 检测。用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法对菌株中 *INO1* 的表达量进行分析。以出发菌 Y01 为对照, 进行归一化处理, 作图比较(图 4): YI2-1 菌株 *INO1* 平均表达量是 Y01 的 16.235 倍, YI2-2 是 Y01 的 11.163 倍。结果说明本研究构建的 *INO1* 基因工程菌在基因表达水平上是成功的。

### 2.5 无 KanMX 抗性基因菌株的获得

通过转化 pSH65 诱导出 Cre 酶切除 *KanMX* 抗性基因, 挑取 YPD 平板上克隆子, 用 *KanMX-F*、*KanMX-R* 引物做菌落 PCR 验证(图 5)。结果与预期

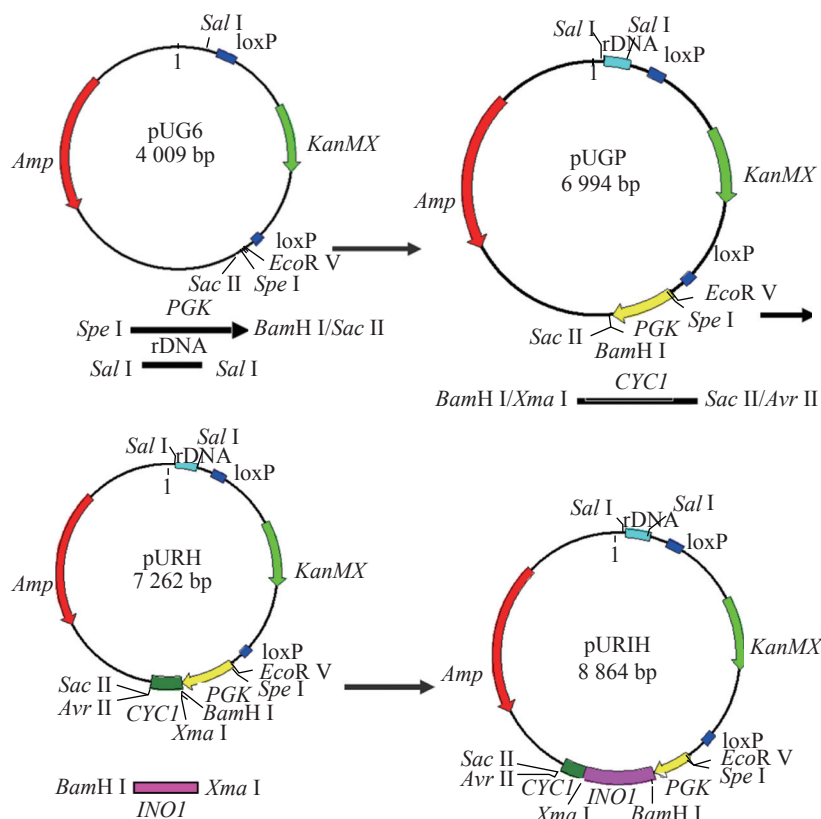


图 1 表达载体 pURH 和 pURIH 的构建

Figure 1 Construction of the integrative plasmids pURH and pURIH

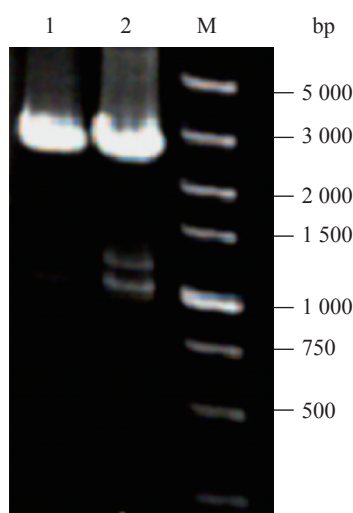


图 2 PCR 验证阳性转化子

Figure 2 PCR identification of positive clones

注: 1-2: 阳性转化子的 PCR 扩增片段; M: DL5000 DNA marker.

Note: 1-2: PCR products of recombinants; M: DL5000 DNA marker.

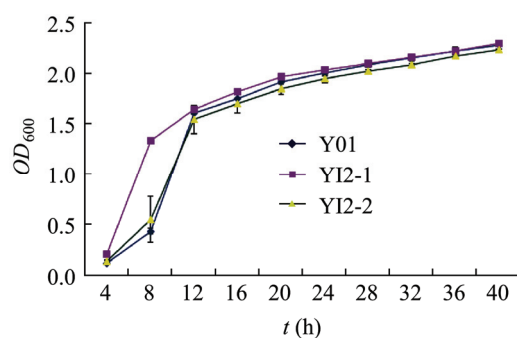
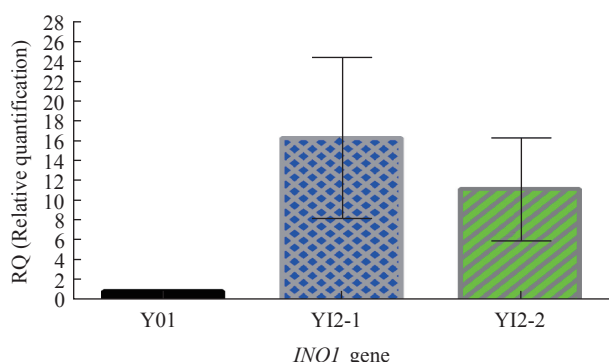
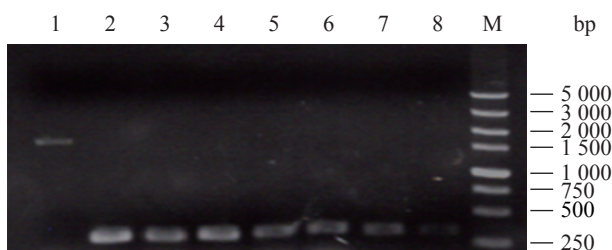


图 3 Y01、YI2-1 和 YI2-2 生长曲线

Figure 3 Culture curve of Y01, YI2-1 and YI2-2

一致, 实验组 *KanMX* 抗性基因敲除的 PCR 条带大小为 312 bp, 对照组的 PCR 条带大小为 1 862 bp。说明所挑取的克隆子 *KanMX* 抗性基因敲除成功。pSH65 质粒经过传代丢失, 阴影平板筛选。最后对菌种进行保藏, 命名 YI2-1 $\Delta$ KP。

图4 *INO1* 基因的表达分析Figure 4 Gene expression levels of *INO1*图5 *KanMX* 抗性删除 PCR 验证Figure 5 PCR identification of recombinants with the *KanMX* knockout

注: 1: 对照组 PCR 扩增片段; 2-8: 敲除 *KanMX* 基因重组子的 PCR 扩增片段; M: DL5000 DNA marker.

Note: 1: Control; 2-8: PCR products of recombinants of delete *KanMX*; M: DL5000 DNA marker.

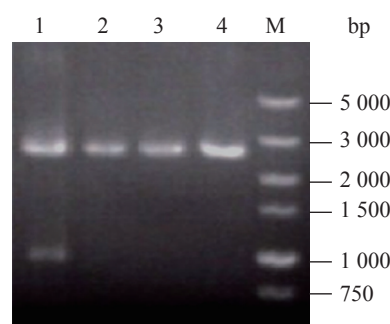
## 2.6 过表达菌株的遗传稳定性研究

将过表达菌株 Y12-1、Y12-1 $\Delta$ KP, 连续传代 20 代后, 用酵母基因组提取试剂盒提取基因组为模板, 用引物 rDNA-F、rDNA-R 进行 PCR 验证。结果见图 6: 电泳条带与预期大小相符, 约为 2 667 bp, 表明转化的目的基因通过 rDNA 介导整合在酿酒酵母基因组上, 使构建的过表达菌株 Y12-1、Y12-1 $\Delta$ KP 具有很高的遗传稳定性。

## 2.7 *INO1* 过表达菌株肌醇合成量的检测

摇瓶发酵检测 *INO1* 过表达菌株在 30 °C、220 r/min 通气培养 50 h 后的肌醇积累量。经试验考察色谱条件确定为: 色谱柱: Waters sugar-pak I 柱 (6.5 mm $\times$ 300 mm); 流动相: 去离子水; 流速: 0.4 mL/min; 柱温: 90 °C 时葡萄糖和肌醇可良好分离。

以出发菌为对照, 菌株同时做 3 个平行, 发酵实验重复 3 次。测得 Y12-1 产肌醇量为 325 mg/L,

图6 PCR 验证 Y12-1、Y12-1 $\Delta$ KP 遗传稳定性Figure 6 Genetic stability test of Y12-1 and Y12-1 $\Delta$ KP

注: 1-2: Y12-1 基因组 PCR 扩增片段; 3-4: Y12-1 $\Delta$ KP 基因组 PCR 扩增片段; M: DL5000 DNA marker.

Note: 1-2: PCR products of the Y12-1 genome; 3-4: PCR products of the Y12-1 $\Delta$ KP genome; M: DL5000 DNA marker.

Y12-1 $\Delta$ KP 为 627 mg/L, 而出发菌株 Y01 发酵液中检测不出肌醇。表明过表达菌株合成的肌醇不仅能满足自身的需要, 而且能够向胞外分泌。

## 3 结论

微生物法生产肌醇具有巨大的优势和潜力, 发展和应用生物高新技术, 用其推动肌醇生产、逐步降低产品成本, 是肌醇生产研究的趋势。为适应市场多方面的需求, 微生物发酵工程及其产业化发展是其必然趋势, 而获取优化的微生物发酵肌醇产品的关键还在于加强选育高效、高产、优质的生产菌种, 并保持其在生产过程中的适应性和稳定性。因此, 本研究利用基因工程技术改造酿酒酵母菌种, 通过过表达肌醇合成关键酶基因 *INO1*, 提高肌醇合成途径的正调控, 促进肌醇合成; 并敲除用于筛选用的抗生素抗性基因, 最终构建安全无毒害的肌醇基因工程菌株, 为微生物发酵法产肌醇, 最终实现其工业化生产和规模化应用奠定了基础。

本研究构建的酵母高效表达载体 pURH, 采用了来源于宿主酿酒酵母自身的 3 个表达元件, 能够实现目的基因的多拷贝整合及稳定表达。同时在表达盒两端有一对同尾酶 *Avr II*/*Spe I*, 可插入多个基因表达盒, 实现多基因共表达。由 qRT-PCR 检测可知, 将目的基因 *INO1* 插入 pURH 获得的 rDNA 介导的整合表达载体 pURIH 能够实现 *INO1* 基因在酿酒酵母中的超表达。

酿酒酵母菌株的生长曲线表明,过表达菌对数期菌体生长速率均快于出发菌株;YI2-1 的生长速率与 YI2-2 存在着差异,这与菌株 *INO1* 表达量的分析结果一致。说明过表达 *INO1* 能够提高酿酒酵母细胞活力,表达量越高的菌株活力越强。这与 Hong 等<sup>[17]</sup>研究发现过表达 *INO1* 对酵母耐高乙醇起着重要作用一致。以上结果存在的原因可能包括以下两方面:(1) 肌醇是磷脂酰肌醇(PI)合成的前体,在酵母菌细胞中与 CDP-1,2-二酰基甘油(CDP-DAG)经 PI 合成酶催化反应生成 PI。PI 是酵母菌的磷脂主要组成成分,PI 在磷酸化激酶的作用下可以形成多种磷酸化形式,在真核细胞中对于细胞形态、信号传导、代谢调控和细胞的各种生理功能发挥重要作用<sup>[18]</sup>。(2) 肌醇有类似维生素 B1 和生物素的功能,为酵母生长因子。

最后,本研究对过表达菌株发酵产物肌醇进行初步的检测探究,建立了一种采用示差检测器检测肌醇的高效液相色谱法。结果表明,该方法可使发酵液中葡萄糖和肌醇良好分离,测定得 YI2-1 $\Delta$ KP 肌醇产量为 627 mg/L。而抗性基因敲除前的菌株肌醇产量相对较低,可能原因是高拷贝数的 *MX* 抗性标记对酵母有一定的毒害作用<sup>[19]</sup>,从而影响酵母肌醇代谢等过程。具体原因还需进一步的研究。此外,与 Hisashi 等<sup>[20]</sup>的研究相比较,发酵液中肌醇含量较低。从可获得的资料分析知,培养基对发酵有较大的影响,因培养基不同,其发酵类型表现为一、二型发酵,其发酵过程中有厌氧发酵阶段,较高浓度的葡萄糖对肌醇产生有抑制作用<sup>[7]</sup>。因此,后期对培养基、发酵条件的优化,有望进一步提高过表达菌株肌醇产量。

## 参 考 文 献

- [1] Divecha N, Irvine RF. Phospholipid signaling[J]. Cell, 1995, 80(2): 269-278
- [2] Kim H, McGrath BM, Silverstone PH. A review of the possible relevance of inositol and the phosphatidylinositol second messenger system (PI-cycle) to psychiatric disorders-focus on magnetic resonance spectroscopy (MRS) studies[J]. Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental, 2005, 20(5): 309-326
- [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]. Berlin: Springer International Publishing, 2014: 59-67
- [6] Coballase-Urrutia E, Pedraza-Chaverri J, Camacho-Carranza R, et al. Antioxidant activity of *Heterotheca inuloides* extracts and of some of its metabolites[J]. Toxicology, 2010, 276(1): 41-48
- [7] 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
- [8] Shirra MK, Arndt KM. Evidence for the involvement of the Glc7-Reg1 phosphatase and the Snf1-Snf4 kinase in the regulation of *INO1* transcription in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Genetics, 1999, 152(1): 73-87
- [9] 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
- [10] Graves JA, Henry SA. Regulation of the yeast *INO1* gene: the products of the *INO2*, *INO4* and *OPI1* regulatory genes are not required for repression in response to inositol[J]. Genetics, 2000, 154(4): 1485-1495
- [11] Wang YN, Liu TB, Delmas G, et al. Two major inositol transporters and their role in cryptococcal virulence[J]. Eukaryotic Cell, 2011, 10(5): 618-628
- [12] Ye CQ, Bandara WMMS, 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
- [13] Justin AM, Kader JC, Collin S. Synthetic capacity of *Arabidopsis* phosphatidylinositol synthase 1 expressed in *Escherichia coli*[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2003, 1634(1/2): 52-60
- [14] 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, 2002, 37(6): 544-547 (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
- [15] Huang ZJ, Chen L, Zhang JS, et al. Cloning of *ScINO1* 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. *ScINO1* 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
- [16] 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
- [17] 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
- [18] Chi ZM, Zhang HC, Zhao SZ. Biosynthesis of phosphatidylinositol and its physiological functions in yeasts[J]. Progress in Biotechnology, 2002, 22(2): 40-43 (in Chinese)  
池振明, 张厚程, 赵双枝. 酵母菌磷脂酰肌醇(PI)的生物合成及其重要的生理学功能[J]. 生物工程进展, 2002, 22(2): 40-43
- [19] 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
- [20] Hisashi S, Yusuke M. Microorganism producing inositol with high yield, and method for manufacturing inositol by using same: WO, 2013125666 A1[P]. 2013-08-2