

研究报告

产肌醇毕赤酵母细胞工厂的优化

朱宏宇¹, 王晓璐¹, 刘亚君², 涂涛¹, 柏映国^{*1}, 张杰^{*1}

1 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所 动物营养学国家重点实验室, 北京 100193

2 中国科学院青岛生物能源与过程研究所, 山东 青岛 266101

朱宏宇, 王晓璐, 刘亚君, 涂涛, 柏映国, 张杰. 产肌醇毕赤酵母细胞工厂的优化[J]. 微生物学通报, 2023, 50(9): 3731-3746.

ZHU Hongyu, WANG Xiaolu, LIU Yajun, TU Tao, BAI Yingguo, ZHANG Jie. Optimization of a *Komagataella phaffii* cell factory for producing inositol[J]. Microbiology China, 2023, 50(9): 3731-3746.

摘要:【背景】肌醇是一种 B 族维生素, 广泛应用于食品、医药、饲料等领域。微生物发酵法是最具前景的肌醇生产方法, 但使用大肠杆菌生产的肌醇在食品及医药领域中的使用受到限制。毕赤酵母作为生物安全菌株是工业上生产异源蛋白的良好宿主, 其本身含有天然的肌醇合成途径, 具有被改造成为高效生产肌醇细胞工厂的潜力。【目的】通过代谢工程改造毕赤酵母工程菌株, 降低副产物的生成并提高肌醇的产量。【方法】以实验室前期构建的产肌醇毕赤酵母工程菌株为出发菌株, 确定副产物阿拉伯糖醇、核糖醇和甘露糖合成相关基因。通过关键基因敲除、发酵液中葡萄糖浓度控制降低副产物的产量。通过过表达甘油转运蛋白、甘油激酶和甘油-3-磷酸脱氢酶基因实现产肌醇毕赤酵母对甘油和葡萄糖的共利用, 得到重组菌 Z10。经过发酵条件优化, 进一步提高 Z10 的肌醇产量。【结果】在最优条件下, 重组菌 Z10 的肌醇产量达到 36.7 g/L, 是目前酵母类细胞工厂生产肌醇的最高值, 副产物总产量与出发菌株相比降低了 63.1%。【结论】在毕赤酵母中建立了降低阿拉伯糖醇、核糖醇和甘露糖合成的有效策略, 并通过甘油、葡萄糖共利用及相对应的发酵条件优化提高了肌醇产量, 为肌醇及其他高价值生物活性物质在毕赤酵母中的高效生产提供了重要参考。

关键词: 肌醇; 毕赤酵母; 细胞工厂; 代谢工程; 高密度发酵

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFD1300701); 农业科技创新工程(cxgc-ias-16); 青岛市自主创新重大专项(21-1-2-23-hz)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFD1300701), the Agricultural Science and Technology Innovation Program (cxgc-ias-16), and the Qingdao Independent Innovation Major Project (21-1-2-23-hz).

*Corresponding authors. E-mail: BAI Yingguo, baiyingguo@caas.cn; ZHANG Jie, zhangjie09@caas.cn

Received: 2023-03-11; Accepted: 2023-04-27; Published online: 2023-06-05

Optimization of a *Komagataella phaffii* cell factory for producing inositol

ZHU Hongyu¹, WANG Xiaolu¹, LIU Yajun², TU Tao¹, BAI Yingguo^{*1}, ZHANG Jie^{*1}

¹ State Key Laboratory of Animal Nutrition, Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

² Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266101, Shandong, China

Abstract: [Background] Inositol is a member of the vitamin B group and has been widely used in the fields of food, medicine, and feed. Microbial fermentation is considered as the most promising method for inositol production, while the inositol produced by *Escherichia coli* is restricted for food and medicine uses. As a GRAS (generally recognized as safe) strain, *Komagataella phaffii* has been employed as a robust host for producing heterologous proteins. *K. phaffii* possesses a native synthetic pathway of inositol and thus has great potential to be modified as a cell factory for the efficient production of inositol. [Objective] To reduce the by-products and enhance the inositol production via metabolic engineering of *K. phaffii*. [Methods] With the inositol-producing *K. phaffii* strain which was previously constructed in our lab as the starting strain, we identified the genes involved in the synthesis of arabitol, ribitol, and mannose. Through deletion of the key genes for synthesis and control of the glucose concentration in the fermentation, we decreased the production of by-products. The co-utilization of glycerol and glucose was achieved in the inositol-producing *K. phaffii* strain by overexpression of glycerol transporter, glycerol kinase, and glycerol-3-phosphate dehydrogenase, and a recombinant strain Z10 was obtained. Furthermore, inositol production was improved by optimization of the fermentation conditions. [Results] The inositol production of the recombinant strain Z10 under the optimal conditions reached 36.7 g/L, the highest titer reported to date by a yeast cell factory. The by-products of Z10 was reduced by 63.1% compared with that of the starting strain. [Conclusion] An effective strategy was established in *K. phaffii* for decreasing the production of arabitol, ribitol, and mannose. Through the co-utilization of glycerol and glucose and the optimization of fermentation conditions, the inositol production was increased. The findings of this study provide a reference to the application of *K. phaffii* for the efficient production of inositol and other high-value bioactive substances.

Keywords: inositol; *Komagataella phaffii*; cell factory; metabolic engineering; high-density fermentation

肌醇又称环己六醇，是葡萄糖的一种同分异构体，广泛分布在动植物体内，是人类和动物健康的重要营养素^[1-3]。肌醇具有降低胆固醇水平、治疗糖尿病、增强机体免疫力等生物活性^[4-6]，因其生物活性作用和广阔的应用

前景，已被广泛应用于食品、医疗、饲料等领域^[7-9]。目前，肌醇的工业化生产方法主要有植酸盐水解法、体外酶催化合成法和微生物发酵法。植酸盐水解法是以米糠、麸皮等为原料，提取其中的肌醇-6-磷酸及其衍生物，通过

加压水解法, 在高温、高压、强酸、强碱等条件下生成肌醇^[2], 该方法虽然能够大批量生产肌醇, 但建立在高污染、高成本的基础之上^[10]。体外酶催化合成法是利用 α -葡聚糖磷酸化酶、蔗糖磷酸化酶、多磷酸葡萄糖激酶、磷酸葡萄糖变位酶等催化淀粉、蔗糖、葡萄糖等底物生成葡萄糖-6-磷酸, 然后再通过肌醇-3-磷酸合成酶(*inositol-3-phosphate synthase*, IPS)和肌醇单磷酸酶(*inositol-1-monophosphatase*, IMP)的级联反应生产肌醇^[11-13]; 该方法虽然生产效率高, 但需要分别制备多种催化酶, 反应系统不稳定, 产物分离纯化复杂, 导致该方法在经济上缺乏竞争力^[14]。微生物发酵法利用葡萄糖、甘油等廉价碳源通过高效微生物细胞工厂发酵生产肌醇, 因其对环境友好的生产工艺及较低的生产成本被认为是最具发展前景的肌醇生产方法^[15-16]。

目前, 利用代谢工程技术改造用来生产肌醇的主要宿主为大肠杆菌^[17-18]。通过过表达酿酒酵母来源的肌醇-3-磷酸合成酶基因(*INO1*), 成功在大肠杆菌中建立了肌醇合成途径, 在优化的发酵条件下肌醇产量可达 887 mg/L^[18]。通过阻断或弱化糖酵解、磷酸戊糖途径调节合成代谢和生长代谢的平衡, 筛选高活性关键酶 IPS 和 IMP, 可以显著提高肌醇的产量^[15,17]。然而大肠杆菌的鲁棒性较弱, 对发酵液中一些抑制剂的耐受性较差, 同时存在严重的碳代谢抑制, 并且利用大肠杆菌生产肌醇存在食品安全等问题^[16,19]。酿酒酵母作为遗传背景清晰的模式菌株, 已被改造成肌醇生产菌株^[20]。黄贞杰等^[21]通过高效表达基因 *INO1* 获得了酿酒酵母肌醇生产菌株, 产量为 627 mg/L; 进一步敲除抑制肌醇生物合成的转录因子基因 *opi1*, 将肌醇产量提高到了 1.021 g/L。近年来, 毕赤酵母(*Komagataella phaffii*)被开发为生产各种高

价值生物活性化合物的高效细胞工厂^[22-24]。毕赤酵母不仅是普遍认可的安全菌株, 而且通过简单的基础培养基便可以快速生长到较高的细胞密度, 能够实现高密度发酵且本身具有肌醇的合成途径^[25-26]。因此, 以毕赤酵母作为底盘细胞构建高产肌醇的细胞工厂具有较大的潜力。本实验室在前期的工作中通过增强内源肌醇合成途径敲除肌醇转运蛋白, 动态调控糖酵解和磷酸戊糖途径的碳代谢流, 首次构建了毕赤酵母肌醇生产菌株, 但产量对于工业化生产水平还有一定差距^[16]。

本研究基于实验室前期构建的产肌醇毕赤酵母工程菌株^[16], 针对肌醇产量较低、副产物较多的问题, 分析工程菌株的代谢产物及相关代谢网络, 通过对副产物合成途径的改造及碳源协同利用策略的建立阻断或下调副产物的合成, 并进一步提高肌醇的产量。本研究为利用毕赤酵母工业化生产肌醇奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

研究所用菌株和质粒如表 1 所示。

1.1.2 引物

研究所用引物信息见表 2, 所有引物合成和测序均由北京睿博兴科生物技术有限公司完成。

1.1.3 主要试剂和仪器

Taq DNA 聚合酶、2×Phanta[®] Max Master Mix (Dye Plus) DNA 高保真聚合酶、2×ClonExpress[®] Ultra One Step Cloning Kit, 南京诺唯赞生物科技有限公司; DNA 提取试剂盒和分子量标准试剂, 北京化工试剂有限公司; 微量元素溶液 PTM1, 上海瑞楚生物科技有限公司; 用于毕赤酵母细胞破碎的 Tissue Extraction/PCR 试剂盒,

表 1 本研究所用的菌株与质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this work

菌株/质粒 Strains/Plasmids	相关特性 Relevant characteristic	来源 Sources
Strains		
<i>Escherichia coli</i> Trans1-T1	Commercial host for cloning, F ⁻ 80 (<i>lacZ</i>) Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>hsdR</i> (r_k^- , m_k^+) <i>ΔrecA1398endA1tonA</i>	TransGen Biotech
<i>K. phaffii</i> JQ08	<i>K. phaffii</i> GS115, P _{GAP} - <i>IPS</i> , Δ P <i>pITR1::ScIPS</i> -P _{HXX1} - <i>EcIMP</i> , Δ P <i>pITR2</i> , Δ <i>pfk2</i> , P _{GUT1} - <i>pgi</i> , P _{GUT1} - <i>zwf</i> , P _{GUT1} - <i>pfk1</i>	[16]
<i>K. phaffii</i> Z01	<i>K. phaffii</i> JQ08, Δ 0019	This study
<i>K. phaffii</i> Z02	<i>K. phaffii</i> JQ08, Δ 0775	This study
<i>K. phaffii</i> Z03	<i>K. phaffii</i> JQ08, Δ 0249	This study
<i>K. phaffii</i> Z04	<i>K. phaffii</i> JQ08, Δ 0368	This study
<i>K. phaffii</i> Z05	<i>K. phaffii</i> JQ08, Δ 0490	This study
<i>K. phaffii</i> Z06	<i>K. phaffii</i> JQ08, Δ 0776	This study
<i>K. phaffii</i> Z07	<i>K. phaffii</i> JQ08, Δ 0754-0988	This study
<i>K. phaffii</i> Z08	<i>K. phaffii</i> JQ08, P _{GUT1} - <i>1115</i>	This study
<i>K. phaffii</i> Z09	<i>K. phaffii</i> Z01, Δ 0754-0988	This study
<i>K. phaffii</i> Z10	<i>K. phaffii</i> Z09, <i>gut1</i> -P _{HXX1} - <i>gut2</i> , P _{GAP} - <i>gt2</i>	This study
Plasmids		
pT3-MazF-ZeoR	The mother vector for constructing genome editing plasmid	[16]
pT3-MazF-ZeoR- <i>gut1-gut2</i>	pT3-MazF-ZeoR derivative for <i>gut1</i> -P _{HXX1} - <i>gut2</i> integration	[27]
pT3-MazF-ZeoR- <i>gt2</i>	pT3-MazF-ZeoR derivative for P _{GAP} - <i>gt2</i> integration	[27]
pT3-MazF-ZeoR- Δ 0019	pT3-MazF-ZeoR derivative for PAS_chr2-2_0019 gene deletion	This study
pT3-MazF-ZeoR- Δ 0775	pT3-MazF-ZeoR derivative for PAS_chr2-1_0775 gene deletion	This study
pT3-MazF-ZeoR- Δ 0249	pT3-MazF-ZeoR derivative for PAS_chr2-1_0249 gene deletion	This study
pT3-MazF-ZeoR- Δ 0368	pT3-MazF-ZeoR derivative for PAS_chr4_0368 gene deletion	This study
pT3-MazF-ZeoR- Δ 0490	pT3-MazF-ZeoR derivative for PAS_chr1-1_0490 gene deletion	This study
pT3-MazF-ZeoR- Δ 0776	pT3-MazF-ZeoR derivative for PAS_chr2-1_0776 gene deletion	This study
pT3-MazF-ZeoR- Δ 0754-0988	pT3-MazF-ZeoR derivative for PAS_chr4_0754 and PAS_chr4_0988 genes deletion	This study
pT3-MazF-ZeoR- <i>1115</i>	pT3-MazF-ZeoR derivative for replacing the promoter of PAS_chr3_1115 gene with P _{GUT1}	This study

Yeastern 公司；博莱霉素、氨苄青霉素、甲醇，默克生命科学有限公司；限制性内切酶，纽英伦生物技术(北京)有限公司；肌醇，北京索莱宝科技有限公司；其余生化试剂，国药集团化学试剂有限公司。检测底物消耗和产物合成的高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)仪为岛津公司的 20A 系统，搭配示差折光检测器(refractive index detector, RID)和安捷伦公司的 Hi-Plex Ca 柱；分光光度计用于测量细胞光密度，Analytik Jena 公司；

电转仪和 PCR 仪，伯乐公司；离心机，日立公司。

1.1.4 培养基

大肠杆菌培养使用 LB 培养基，毕赤酵母常规培养使用 BMGY (buffered glycerol-complex medium)培养基，基因编辑过程中筛选阳性转化子使用甲醇诱导培养基^[16]。LB 和 BMGY 的固体培养基添加 20 g/L 琼脂粉。毕赤酵母摇瓶发酵和高密度发酵时使用酵母发酵培养基(g/L)：磷酸二氢钾 1.2，磷酸二氢铵 18.0，硫

表 2 文中所用的引物

Table 2 Primers used in this work

引物名称	引物序列
Primer name	Primer sequence (5'→3')
0775-up-F	GGCCGCCATGGCGGCCGCGCCACCTAGGATTTTGAAGAAATCTAAG
0775-up-R	GGGCGATCCAATCGAATTCAATGACATGTAATTGGCAAGGATATTAG
0775-small-F	CTAGGGCGATCCCAATCGAAGAGCAATGTCGGGGGCATTC
0775-small-R	GGTTGAAGAGTTGAAGAGTTAATGACATGTAATTGGCAAGGATATTAG
0775-down-F	CTTGCCAATTACATGTCATTAACCTTTCAACTCTTCAACCAGAATC
0775-down-R	GGCGGCCGCGAATTCAGTAGTCCATACTCAGTGCTACGAGAAATG
0775-test-F	CTCCTTGAGATCTACCCAAAAAGG
0775-test-R	CGAGTAGCGAACTGGGGATTAG
0249-up-F	CGGCCGCCATGGCGGCCGCGGCTAATAATGGAGTCATCTCCGGAAAC
0249-up-R	GGGCGATCCAATCGAATTCTATCAACTTGAAGGAAAGGAGAATGAAG
0249-small-F	CAAGCTAGGGCGATCCCAATCGCTTACAAACGAAATGGCACC
0249-small-R	GTTAGAGAGAAGAAAAGACATTATTTTATCAACTTGAAGGAAAGGAGAATGAAG
0249-down-F	CTTTCCTTCAAGTTGATAAAATAATGTCTTTTCTTCTCTCTAACAAGATTAG
0249-down-R	GCAGGCGGCCGCGAATTCAGTAGTCTCTGTGCATATCATAAATTGTCCACC
0249-test-F	CTCTTAGTGGGCTCGGAGTAG
0249-test-R	CGATATATGGGATGTGTGAGGAC
0368-up-F	CCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGATCGGATATAAGTGGTTGGATAAACG
0368-up-R	CAAGGGCGATCCAATCGAATTCGTTTAATGAAAGAGGAAAGAATTGTCC
0368-small-F	GCAAGCTAGGGCGATCCCAATCTACAAAATCTTTAGCTCTAGAAATAGAAGC
0368-small-R	CCGTGTAGTTTTTGAAGTGTAATTGGCTGTTTAATGAAAGAGGAAAGAATTGTCT
0368-down-F	GGACAATTCTTTCCTCTTTCATTAAACAGCCAATTTACACTTCAAAAACCTACAC
0368-down-R	GCAGGCGGCCGCGAATTCAGTAGTCTTTTCTACCCCATTTGG
0368-test-F	CAACTTAACAGTGTGGAGATTCTG
0368-test-R	GGCATAACAATTCAAGTATACACTGC
0490-up-F	GCATGCTCCCGGCCCGCCATGGCGGCCGCGGCCTGTTCAAGCGTTTTTCTTTACAC
0490-up-R	TGTTAGATCAAGGGCGATCCAATCGAATTCGTTGGATAATAGTGAGTGTAATGAAGCG
0490-small-F	CTTTAATTTGCAAGCTAGGGCGATCCCAATCTATTAATGGCGGGGCAGAATGC
0490-small-R	CAATTTTATTATTATATATGTCTCCGTGTTGGATAATAGTGAGTGTAATGAAGCG
0490-down-F	CTTCATTACACTCACTATTATCCAACACGGAGACATATATAATAATAAAATTGTAAGGTTT
0490-down-R	GACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCAGTAGTATAAAGTTCTGGATTACGCGTTTGGC
0490-test-F	GTGATCTTGATGAAGGCAAAGAC
0490-test-R	GTTTATCTTTCAGCCTAGCTACGCC
0776-up-F	GGCCGCCATGGCGGCCGCGGAACCTTCATTAGACAGTGACATACTCG
0776-up-R	GGGCGATCCAATCGAATTCCTGTAATCTATGAATCTTTAGGACGAAG
0776-small-F	CAAGCTAGGGCGATCCCAATCACATCCGAACACCTTCTGGAC
0776-small-R	CACTGATTGCTCTTCTTCTTCTGTAATCTATGAATCTTTAGGACGAAG
0776-down-F	CTAAAGATTCATAGATTACAGAAGAAGAAGAGCAATCAGTGTGTAAATG
0776-down-R	GGCCGCGAATTCAGTAGTATATTGTCAATCTTTTAAATTTGGATTCCCTG
0776-test-F	CTAAACTGCAGGTTTGACTATATGCTTG
0776-test-R	GCGAACTTATTTAGTCATTTTCATGTGC

(待续)

(续表 2)

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')
0754-0988-up-F	GCCGCCATGGCGGCCGCGGTCCACCTTTAACGTTTTAGACTAC
0754-0988-up-R	GATCAAGGGCGATCCAATCGAATTCCTTGGGTAAGGGAAAGGGAAG
0754-0988-small-F	CAAGCTAGGGCGATCCCAATCTCTTTTTCTTTTCATTTCTGGAGACTTTAACC
0754-0988-small-R	CCCTGCTCAATGTTGCTCTTTTTGGGTAAGGGAAAGGGAAGG
0754-0988-down-F	CCTTCCCTTTCCCTTACCCAAAAAGAGCAACATTGAGCAGGG
0754-0988-down-R	GCGGCCGCGAATTCAGTAGTATAGAAAGACACGAACCAATTTGG
0754-0988-test-F	CACTGCCATAAACAACGAGAGG
0754-0988-test-R	CTCAAAAGAGAACTACTAGGCGG
1115-up-F	GCATGCTCCCGGCCGCGCATGGCGGCCGCGGAGCACCTGCAACTGAGATG
1115-up-R	CAAGGGCGATCCAATCGAATTCGAAAATGTTCTTTCCTTGTATTAAAG
1115-small-F	CAAGCTAGGGCGATCCCAATCTGTGAAATTGAGAACTTCTTTAG
1115-small-R	CGTGTTTGATTCCGTCCATGCATCTCAAGTGAAAATGTTCTTTCCTTGTATTAAAG
1115-down-F	CCACAGATATATCTACTATAATGTCGTACAGACTATTTCAAATCG
1115-down-R	CGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCAGTAGTTCTCTGGTCTCATTTTTTGC
1115-test-F	GACACACGGTGTTGGACTTTTTG
1115-test-R	GTCGACTCGAGTATTTAACAAGAC
0019-up-F	GGCCGCCATGGCGGCCGCGGCTTCAAGAACTGGACTCCGG
0019-up-R	CAAGGGCGATCCAATCGAATTCCTTAATGGGGAGTGTGGGATAATAGTTG
0019-small-F	CAAGCTAGGGCGATCCCAATCTATTAACCTTTCTTTTCTTTTCCATCGCG
0019-small-R	GTAGAAAAATAATGAACGGCTCTTAATGGGGAGTGTGGGATAATAGTTG
0019-down-F	CAACTATTATCCACACTCCCCATTAAGAGCCGTTCAATTATTTTCTACATG
0019-down-R	GCAGGCGGCCGCGAATTCAGTAGTTGCAGAAGGTAAGGTTGGGAAAG
0019-test-F	GAGCTGATTGACTTGCGGC
0019-test-R	GAATATCAGGACCAGGATAGTAGG

酸镁 6.5, 硫酸钾 5.0, 硫酸钙 0.5, 甘油 50.0。用 KOH 调节 pH 值为 5.0, 121 °C 灭菌 21 min。高密度发酵时还需补充 4.4 mL/L 微量元素溶液 PTM1。

1.2 方法

1.2.1 基因编辑质粒的构建

毕赤酵母基因编辑质粒的构建参照本团队先前已经建立的方法^[16], 简述如下: 以毕赤酵母 GS115 基因组为模板, 采用引物对分别 PCR 扩增靶基因的上游(Arm1)和下游(Arm2)各 1 000 bp 同源臂片段, 以及上游同源臂 3'端相同的 200 bp 短臂片段(Arm1-200), 通过核酸凝胶电泳、回收纯化后, 将纯化后的片段

Arm2 与 Arm1-200 通过 overlap PCR 扩增得到 Arm1-200-Arm2 整合片段。将片段 Arm1 和 Arm1-200-Arm2 通过同源重组试剂盒分别克隆到质粒 pT3-MazF-ZeoR 的 *Sac* II 和 *Spe* I 的位点上, 得到完整的基因敲除质粒。为了构建基因敲入和替换质粒, 只需将目的基因或片段插入到基因敲除质粒的短臂片段 Arm1-200 和下游同源臂 Arm2 之间。

1.2.2 毕赤酵母的转化与重组菌株筛选

利用 *Not* I 限制性内切酶线性化基因编辑质粒并通过电穿孔转化法转入毕赤酵母细胞中, 转化后的菌液在 30 °C 复苏 30 min 后涂布于含有 100 mg/L 博来霉素的 BMGY 平板上。

在 30 °C 培养箱中培养 2 d 待克隆长出后, 通过菌落 PCR 验证抗性筛选基因表达盒是否正确整合到基因组上(检测引物见表 2), PCR 反应体系和条件参考之前的报道^[28]。挑取阳性转化子接种于无抗生素的甲醇诱导培养基中(YNB 培养基, 添加 1% 甲醇), 30 °C、200 r/min 恒温培养 48 h, 取菌液用 PCR 验证抗性筛选基因表达盒是否被诱导去除(检测引物见表 2)^[28]。将阳性克隆菌液稀释至 10^{-6} 涂布于无抗生素的 BMGY 平板, 待出现单克隆后再次进行菌落 PCR 验证, 确认抗性基因表达盒已被移除, 获得纯化的基因敲除/敲入/替换重组菌株^[28]。

1.2.3 摇瓶发酵与发酵罐补料发酵

摇瓶发酵生产肌醇: 将保存于-80 °C 的重组菌株接种于 40 mL BMGY 培养基中, 30 °C、200 r/min 培养 48 h, 作为一级种子液。接种 200 μ L 一级种子液于 200 mL 发酵培养基中(1 L 摇瓶), 在 30 °C、200 r/min 条件下培养 120 h, 每 12 h 取样 2 mL 发酵液并置于-80 °C 保存, 用于后期代谢产物的检测。每个重组菌株的发酵设置 3 个平行。

高密度发酵生产肌醇: 选取摇瓶发酵中肌醇产量最高的菌株进行高密度发酵。转接一级种子液于 3 瓶 200 mL BMGY 培养基中, 30 °C、200 r/min 培养过夜作为二级种子液。将二级种子液全部接种于含有 8 L 发酵培养基的 10 L 发酵罐中, 在 30 °C、pH 5.0、800 r/min 的条件下进行发酵, 通过补加氨水调控 pH。发酵前期, 菌株以甘油为碳源生长, 当甘油消耗完后补料为 700 g/L 葡萄糖或甘油和葡萄糖的混合液(甘油:葡萄糖为 1:9)。严格控制发酵液中葡萄糖浓度低于 10 g/L, 期间实时测定葡萄糖浓度并适量补充葡萄糖, 维持葡萄糖不被完全消耗。

1.2.4 代谢产物检测

采用高效液相色谱法检测发酵液中的肌

醇、阿拉伯糖醇、核糖醇、甘露糖以及葡萄糖的含量。发酵液稀释适当倍数后取 1 mL 于 12 000 r/min 离心 15 min, 使用 0.22 μ m 孔径滤器过滤上清, 取过滤后的上清液制样检测。检测仪器为 RID, 色谱柱为安捷伦 Hi-Plex Ca 柱(7.7 mm \times 300 mm, 8 μ m), 流动相为 ddH₂O, 流速为 0.5 mL/min, 柱温箱保持在 80 °C, 进样量 10 μ L。每个待测样品分别有 3 个平行样, 试验结果取自 3 个平行的平均值。用肌醇、阿拉伯糖醇、核糖醇、甘露糖和葡萄糖等标准品构建标准曲线。细胞生长量用分光光度计于波长 600 nm 处测定吸光度值。

1.2.5 统计分析

使用统计软件 SPSS 19 分析数据, 采用单因素方差分析(one-way analysis of variance, ANOVA)进行统计分析后使用 Tukey HSD 检验进行多重比较。此结果以平均值 \pm 均值标准误(standard error of mean, SEM)表示, 当 $P < 0.05$ 时表示差异显著。

2 结果与讨论

2.1 副产物合成关键基因的鉴定与改造

前期通过减弱糖酵解和磷酸戊糖途径的碳代谢流加强肌醇合成途径、敲除肌醇转运蛋白, 首次构建了毕赤酵母肌醇生产菌株 JQ08(图 1)。通过 HPLC 检测发现菌株 JQ08 在发酵过程中会产生大量的副产物, 主要包括阿拉伯糖醇、核糖醇和甘露糖(图 2), 产量甚至高于目标产物肌醇, 严重影响肌醇的生产效率。针对副产物产量较高的问题, 本研究通过分析出发菌株 JQ08 的代谢产物及代谢网络, 利用基于同源重组的基因编辑工具改造副产物阿拉伯糖醇、核糖醇和甘露糖合成途径的关键酶基因, 降低分支途径碳通量, 使副产物产量降低到较低水平, 从而提高目的产物肌醇的合成效率。

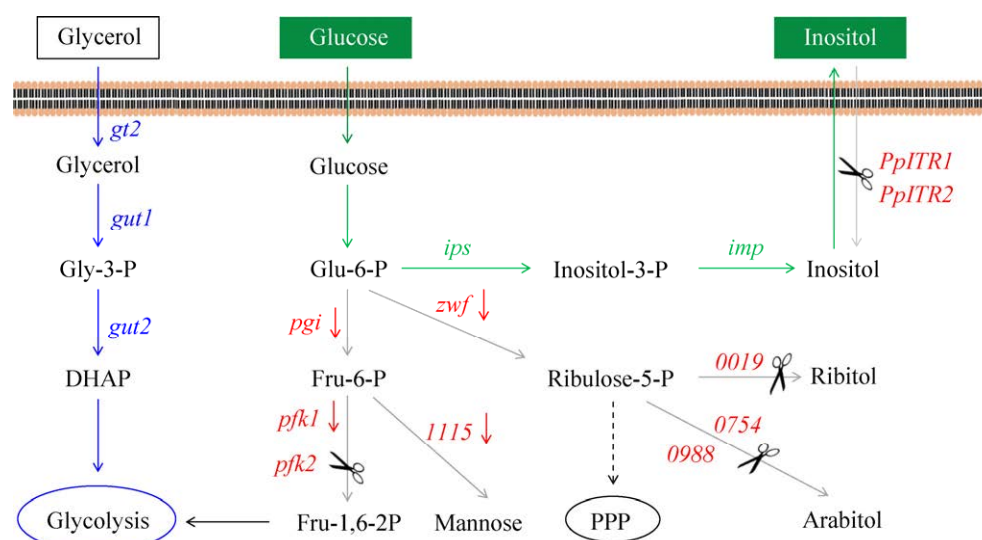


图 1 毕赤酵母肌醇合成代谢图 绿色箭头表示肌醇合成途径；蓝色箭头表示甘油分解代谢途径；剪刀和红色箭头表示对基因进行敲除或弱化. *gt2*: 甘油转运蛋白 2 基因; *gut1*: 甘油激酶基因; *gut2*: 甘油-3-磷酸脱氢酶基因; *ips*: 肌醇-3-磷酸合成酶基因; *imp*: 肌醇单磷酸酶基因; *pgi*: 葡萄糖-6-磷酸异构酶基因; *zwf*: 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因; *pfk1*: 果糖-6-磷酸激酶 α 亚基基因; *pfk2*: 果糖-6-磷酸激酶 β 亚基基因; *PpITR1*: 肌醇转运蛋白 1 基因; *PpITR2*: 肌醇转运蛋白 2 基因; *1115*: 甘露糖-6-磷酸异构酶基因; *0019*: 核糖醇脱氢酶基因; *0754* 和 *0988*: 阿拉伯糖醇脱氢酶基因

Figure 1 Biosynthesis pathway of inositol in *Komagataella phaffii*. Green arrows indicate the inositol synthesis pathway; Blue arrows indicate the glycerol catabolic pathway; Scissors and red arrows indicate gene deletion or attenuation. *gt2*: Glycerol transporter 2 gene; *gut1*: Glycerol kinase gene; *gut2*: Glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene; *ips*: Inositol-3-phosphate synthase gene; *imp*: Inositol monophosphatase gene; *pgi*: Glucose-6-phosphate isomerase gene; *zwf*: Glucose-6-phosphate dehydrogenase gene; *pfk1*: α -subunit of heterooctameric phosphofructokinase gene; *pfk2*: β -subunit of heterooctameric phosphofructokinase gene; *PpITR1*: Inositol transporter 1 gene; *PpITR2*: Inositol transporter 2 gene; *1115*: Mannose-6-phosphate isomerase gene; *0019*: Ribitol dehydrogenase gene; *0754* and *0988*: Arabitol dehydrogenase gene.

2.1.1 副产物阿拉伯糖醇和核糖醇合成关键基因的鉴定与敲除

副产物阿拉伯糖醇和核糖醇的合成前体物都是核酮糖-5-磷酸，该化合物是由葡萄糖转化为葡萄糖-6-磷酸随后进入磷酸戊糖途径 (pentose phosphate pathway, PPP) 生成。由于肌醇的合成前体同样为葡萄糖-6-磷酸，因此阿拉伯糖醇和核糖醇的合成与肌醇的生产存在竞争关系(图 1)，所以需要阻断或减弱副产物的合成。通过京都基因与基因组百科全书

(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 数据库预测分析发现，催化核酮糖生成阿拉伯糖醇的阿拉伯糖醇脱氢酶基因可能为 *0019* (PAS_chr2-2_0019)，而催化核酮糖生成核糖醇的核糖醇脱氢酶基因并未发现。鉴于这两类基因功能相似，推测毕赤酵母中的阿拉伯糖醇脱氢酶和核糖醇脱氢酶序列应该具有较高的相似度，所以利用 *0019* 的氨基酸序列在 NCBI 数据库进行了 BLAST 分析，筛选得到 7 个与 *0019* 序列相似度较高的基因：

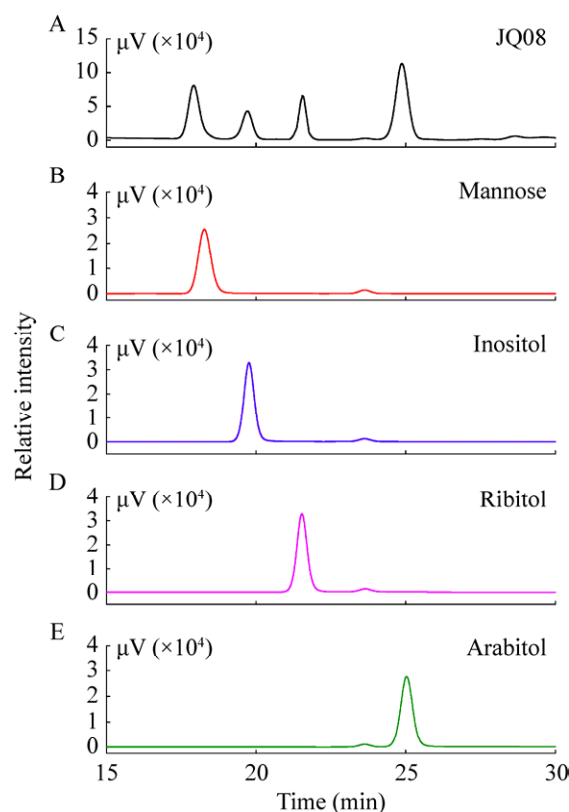


图2 重组菌株 JQ08 主要代谢产物的 HPLC 分析
A: 重组菌株 JQ08. B: 甘露糖. C: 肌醇. D: 核糖醇. E: 阿拉伯糖醇

Figure 2 HPLC analysis of the main metabolites of recombinant strain JQ08. A: Recombinant strain JQ08. B: Mannose. C: Inositol. D: Ribitol. E: Arabitol.

0775 (PAS_chr2-1_0775)、0249 (PAS_chr2-1_0249)、0368 (PAS_chr4_0368)、0490 (PAS_chr1-1_0490)、0776 (PAS_chr2-1_0776)、0754 (PAS_chr4_0754)和 0988 (PAS_chr4_0988)。由于 0754 和 0988 在基因组上相邻, 并且序列相似性达到 67.3%, 因此选择一同敲除。按照 1.2.1 中所述方法, 分别构建了 7 个基因敲除质粒, 用以敲除筛选到的 8 个糖醇脱氢酶基因。通过转化与甲醇诱导筛选, 成功敲除了基因 0019、0775、0249、0368、0490、0776 和 0754-0988, 获得的基因敲除菌株分别命名为 *K. phaffii* Z01、

Z02、Z03、Z04、Z05、Z06 和 Z07。

将获得的 7 株毕赤酵母工程菌株在 10 L 发酵罐中进行高密度发酵, 验证各基因的敲除对阿拉伯糖醇和核糖醇合成的影响, 以菌株 JQ08 作为对照。如图 3 所示, 突变株 Z01、Z03 和 Z04 的生物量相较其他菌株略有降低, 但都未出现生长延滞情况。相较于出发菌株 JQ08, 各突变株肌醇产量均无显著改变, 阿拉伯糖醇产量均显著降低 ($P < 0.05$), 其中菌株 Z02、Z04、Z05 和 Z07 的阿拉伯糖醇产量分别为 34.7、36.7、28.5 和 1.4 g/L, 相较出发菌株分别降低了 26.8%、22.6%、39.9%和 97.0%, 说明 0775、0368、0490 和 0754-0988 对阿拉伯糖醇合成具有一定的影响, 特别是 0754-0988 起了关键作用。虽然 KEGG 数据库预测 0019 为阿拉伯糖醇脱氢酶基因, 但发酵结果显示, 突变株 Z01 的核糖醇产量相较于出发菌株显著降低 ($P < 0.05$), 为 5.8 g/L, 降低了 74.2%, 说明 0019 可能为核糖醇脱氢酶基因。另外, 敲除 0754-0988 后核糖醇的产量也有一定的降低, 同时该菌株的肌醇产量得到 14.1%的提升。由以上结果可知, 0754-0988 和 0019 分别为催化阿拉伯糖醇和核糖醇合成的关键基因。

2.1.2 副产物甘露糖合成关键基因表达调控与葡萄糖浓度对甘露糖生产的影响

由葡萄糖生成甘露糖需要经过 4 步催化反应: (1) 葡萄糖磷酸化生成葡萄糖-6-磷酸; (2) 葡萄糖-6-磷酸异构生成果糖-6-磷酸; (3) 果糖-6-磷酸在甘露糖-6-磷酸异构酶作用下生成甘露糖-6-磷酸; (4) 甘露糖-6-磷酸经过脱磷酸作用生成甘露糖。其中, 前两步催化反应是糖酵解的关键步骤, 关系到葡萄糖的代谢, 而最后一步催化反应的酶一般具有较宽的底物特异性, 且很难通过序列确定其功能^[29]。因此, 为了降低副产物甘露糖的产量, 选择对其合成途径上

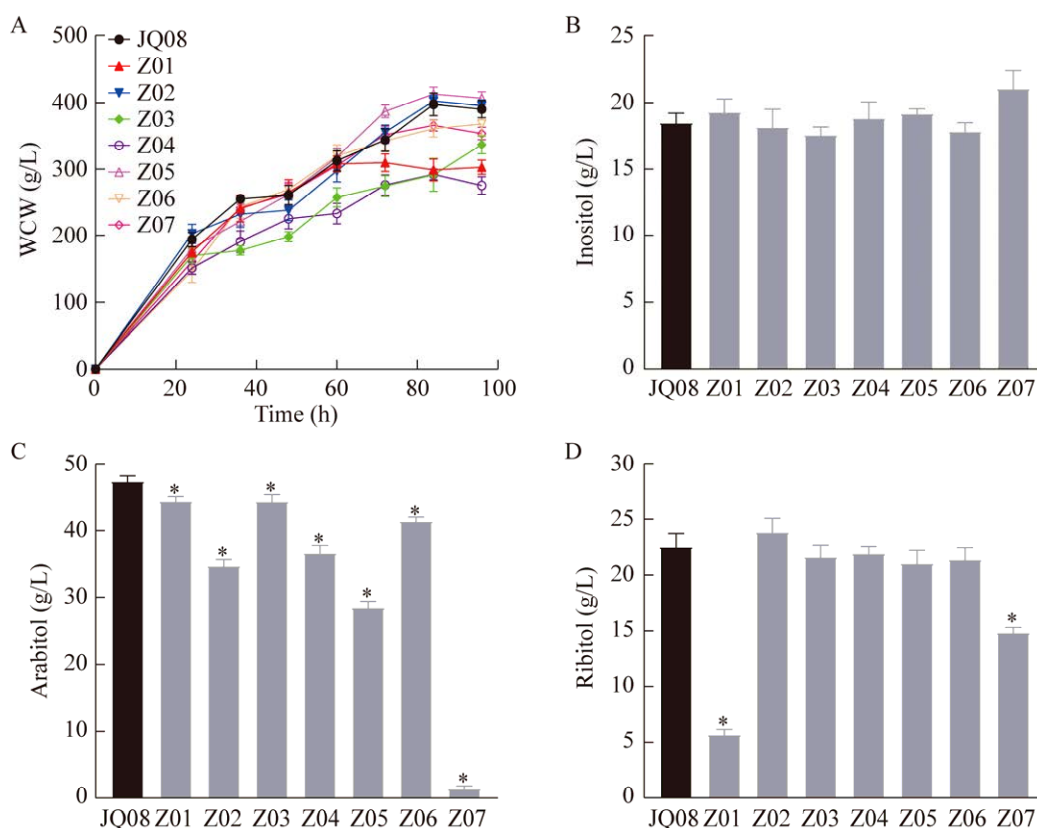


图3 重组菌株 Z01、Z02、Z03、Z04、Z05、Z06 和 Z07 的表型验证 A: 菌体湿重. B: 肌醇产量. C: 阿拉伯糖醇产量. D: 核糖醇产量. *: $P < 0.05$

Figure 3 Fermentation profiles of recombinant strains Z01, Z02, Z03, Z04, Z05, Z06 and Z07. A: Wet cell weight. B: Inositol production. C: Arabitol production. D: Ribitol production. *: $P < 0.05$.

的第三步催化酶甘露糖-6-磷酸异构酶基因 *III5* (PAS_chr3_1115) 进行敲除, 但经过多次尝试始终无法获得该基因敲除菌株。由于毕赤酵母中多数糖蛋白均由甘露糖修饰, 缺失甘露糖合成途径后某些关键酶无法被修饰, 导致活性降低或者无活性, 从而造成菌株死亡或生长不佳, 因此可能导致了该基因无法被敲除。因此, 选择利用同源重组基因编辑技术将该基因的启动子替换为甘油诱导启动子 P_{GUT1} , 以保证该基因在以葡萄糖为碳源发酵时保持较低的表达量, 得到突变菌株 Z08。如图 4 所示, *III5* 表达的弱化并未对菌株的生长造成影响。相较于对照菌株 JQ08, 突变株 Z08 的甘露糖产量显

著提高($P < 0.05$), 达到了 43.2 g/L, 并且肌醇的产量显著降低($P < 0.05$)。因此, 弱化基因 *III5* 的表达并不能有效降低甘露糖的产量(图 4B)。

甘露糖属于六碳糖, 其本身也可以作为碳源被毕赤酵母利用, 但由于葡萄糖的碳代谢抑制作用, 有葡萄糖时甘露糖得以积累。在之前的发酵中, 发酵液中的葡萄糖浓度被控制在了 20–30 g/L 的水平, 因此我们希望通过降低发酵液中的葡萄糖浓度来降低副产物甘露糖的生产。在接下来开展的 JQ08 高密度发酵中, 葡萄糖的浓度被严格控制在低于 10 g/L 的水平, 同时也开展了高葡萄糖浓度(>50 g/L)的发酵作为对照。如图 4C 所示, 在高葡萄糖浓度的发

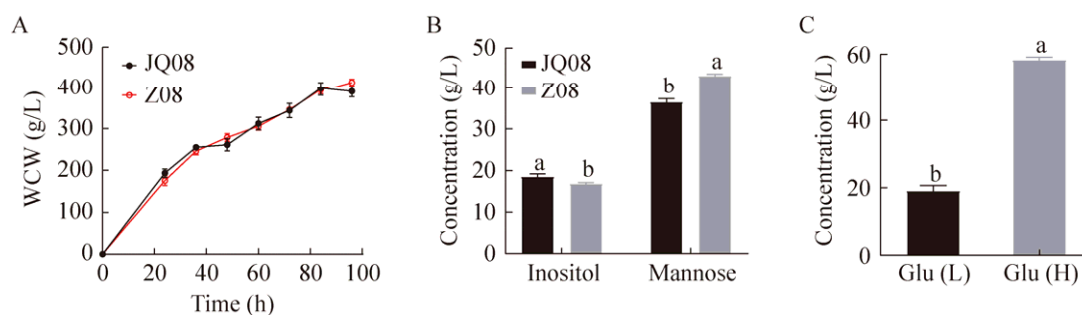


图4 重组菌株 JQ08 和 Z08 的表型验证 A: 菌体湿重. B: 肌醇与甘露糖产量. C: JQ08 在低(L, <10 g/L) 或高(H, >50 g/L)浓度葡萄糖发酵中甘露糖的产量. 不同小写字母代表有差异显著($P<0.05$)

Figure 4 Fermentation profiles of recombinant strains JQ08 and Z08. A: Wet cell weight. B: Inositol and mannose production. C: Mannose production of JQ08 in the fermentation with low (L, <10 g/L) or high (H, >50 g/L) glucose concentration. Different lowercase letters represent the significant difference ($P<0.05$).

醇中, 甘露糖的产量高达 58.4 g/L, 而在低葡萄糖浓度的发酵中, 甘露糖的产量显著降低 ($P<0.05$), 降到 18.9 g/L, 与高葡萄糖浓度发酵相比降低 67.6%。因此, 通过调控补料速度维持发酵液中葡萄糖处于较低浓度, 可显著降低副产物甘露糖的合成。

2.1.3 阿拉伯糖醇、核糖醇合成关键基因共敲除与低葡萄糖浓度发酵对产物生产的影响

经鉴定, 0754-0988 和 0019 是毕赤酵母中阿拉伯糖醇和核糖醇合成过程中的关键基因,

因此利用同源重组基因编辑技术构建了这 3 个基因共敲除的重组菌株 Z09。将 Z09 进行高密度发酵过程中实时监测调控发酵液中葡萄糖的浓度, 维持葡萄糖处于较低浓度(<10 g/L), 发酵结果如图 5 所示。突变菌株 Z09 副产物的产量均显著降低($P<0.05$), 阿拉伯糖醇、核糖醇和甘露糖的产量分别为 1.6、5.6 和 18.6 g/L, 与对照菌株 JQ08 相比分别降低 96.6%、75.1%和 49.0%, 副产物总量降低了 75.8%。同时, Z09 的肌醇产量显著提高($P<0.05$), 达到 24.4 g/L, 相

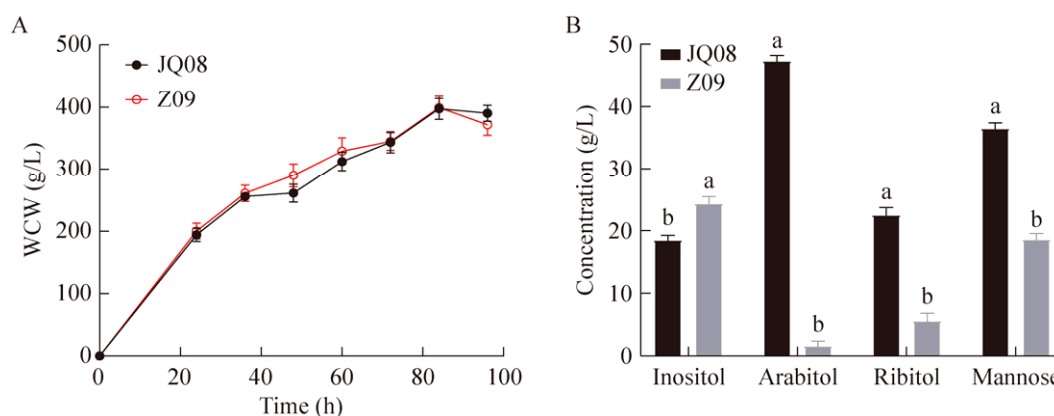


图5 重组菌株 Z09 的表型验证 A: 菌体湿重. B: 肌醇、阿拉伯糖醇、核糖醇和甘露糖产量. 不同小写字母代表有差异显著($P<0.05$)

Figure 5 Fermentation profiles of recombinant strain Z09. A: Wet cell weight. B: Production of inositol, arabitol, ribitol and mannose. Different lowercase letters represent the significant difference ($P<0.05$).

较 JQ08 提升 31.9%。此外,通过检测发酵过程中细胞湿重发现 0019 和 0754-0988 的敲除对菌株的生长并无显著影响,突变菌株 Z09 的生长趋势及最高菌体量与对照菌株相比无明显差异。因此,0754-0988 和 0019 的敲除及低葡萄糖浓度发酵是降低毕赤酵母副产物阿拉伯糖醇、核糖醇和甘露糖合成的有效策略。

2.2 甘油和葡萄糖协同利用对产物合成的影响

微生物发酵法高效合成生化产品面临的一个主要挑战是如何平衡细胞生长与产物合成二者之间的碳流量分配。当以葡萄糖作为唯一碳源发酵毕赤酵母肌醇生产菌株时,细胞生长与产物合成都需要消耗葡萄糖-6-磷酸,较低的肌醇产量表明,仅有少部分葡萄糖-6-磷酸用于供给肌醇合成^[15]。You 等^[17]通过协同利用甘油和葡萄糖平衡细胞生长及产物合成之间的碳流量分布,在大肠杆菌中实现了肌醇的高效生产。但毕赤酵母野生菌株具有较强的碳代谢抑制现象,在葡萄糖存在时,甘油的代谢途径被抑制^[27]。本实验室前期通过过表达甘油转运

蛋白基因 *gt2*、甘油激酶基因 *gut1* 和甘油-3-磷酸脱氢酶基因 *gut2*, 成功实现了毕赤酵母对葡萄糖和甘油的共代谢^[27]。因此,为了提高菌株对甘油的利用,本研究在重组菌株 Z09 中过表达了甘油转运和分解代谢的相关基因 *gt2*、*gut1* 和 *gut2*, 得到菌株 Z10。对 Z10 进行高密度发酵,补料时的碳源为葡萄糖和甘油的混合液(质量比为 1:1, 700 g/L)。如图 6 所示,实现葡萄糖和甘油共利用后,突变株 Z10 的核糖醇和甘露糖产量显著降低($P<0.05$),阿拉伯糖醇的产量略微降低,副产物总量与突变株 Z09 相比下降 54.7%;而目的产物肌醇的产量也显著降低($P<0.05$),只有 6.2 g/L。另外,通过生长曲线可以发现,Z10 的生物量相较 Z09 和 JQ08 出现了一定程度的下降(图 6A),所以猜测可能是由于发酵过程中甘油和葡萄糖的比例或者发酵条件控制不合适,导致菌体生长不佳,从而使肌醇的产量大幅度降低。

2.3 发酵条件的优化

在发酵过程中提供适量比例的碳源有利于工程菌株的生长和目标产物的合成,针对突变

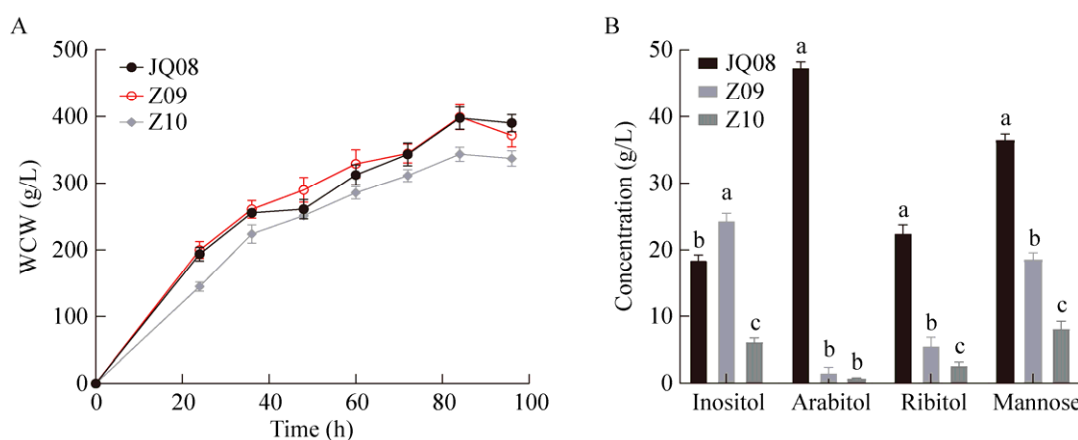


图 6 重组菌株 Z10 的表型验证 A: 菌体湿重. B: 肌醇、阿拉伯糖醇、核糖醇和甘露糖产量. 不同小写字母代表有差异显著($P<0.05$)

Figure 6 Fermentation profiles of recombinant strain Z10. A: Wet cell weight. B: Production of inositol, arabitol, ribitol and mannose. Different lowercase letters represent the significant difference ($P<0.05$).

株 Z10 提供不适比例的甘油和葡萄糖可能会引起该菌株的代谢紊乱, 造成肌醇合成量降低。综合考量肌醇的合成及菌体生长情况, 设置了 5 种含有不同比例甘油和葡萄糖的发酵培养基用于突变菌株 Z10 的发酵研究。如图 7 所示, 在基础盐培养基 YNB 中添加不同比例的甘油和葡萄糖(YNB+Gly/Glu), 并使用摇瓶对 Z10 进行发酵时, 菌株 Z10 对甘油的消耗量显著高于对葡萄糖的消耗量, 且由于该培养基的营养较为匮乏, 导致菌株生长受到抑制, 最高 OD_{600} 仅为 2.0 左右, 造成肌醇产量非常低, 不同碳源比例条件下的结果也无显著差异。为了改善菌株的生长状况, 在培养基中添加 2.0 g/L 的酵母粉(yeast+Gly/Glu)再次进行摇瓶发酵, 该培养基中不同碳源比例条件下的菌株都生长较好, 相较 YNB+Gly/Glu 的培养条件最大菌体量显著提升(图 7B)。同时, 葡萄糖的消耗量也得到提高, 显著高于甘油的消耗量, 从而促进了肌醇的生产(图 7A)。当甘油/葡萄糖为 1/9 时, 肌醇的产量最高, 达到 1.8 g/L, 相较 YNB+Gly/Glu

的培养条件提升了 5 倍。

溶氧量(dissolved oxygen, DO)是高密度发酵过程中重要的控制参数, 通入适当的空气能够缩短发酵时间、增加细胞数量、提高细胞的存活率。另有文献报道, 氧气的供给量能够很大程度地影响细胞的能量代谢, 从而影响毕赤酵母的中心碳代谢流^[30]。前期研究发现, 当以葡萄糖为碳源时, 适当降低 DO 可以提高肌醇的生产^[16]。突变菌株 Z10 已经实现了葡萄糖和甘油的共代谢, 该菌株的碳代谢模式较菌株 Z09 发生了很大的变化, 因此, 选择再次探究以甘油和葡萄糖为混合碳源时 DO 对菌株生长和产物合成的影响。针对突变菌株 Z10, 在甘油/葡萄糖为 1/9 及添加 2.0 g/L 酵母粉的培养基中开展高密度发酵, 设置 DO 水平为 5%、15% 和 30%, 对照菌株 Z09 发酵时碳源依旧为葡萄糖。如图 8 所示, 当 DO 控制在较低水平的 5% 时, Z10 的菌体生物量明显低于高 DO 时的生物量。这是由于在发酵过程中随着酵母细胞量的不断增加, 保持低 DO 无法满足酵母细

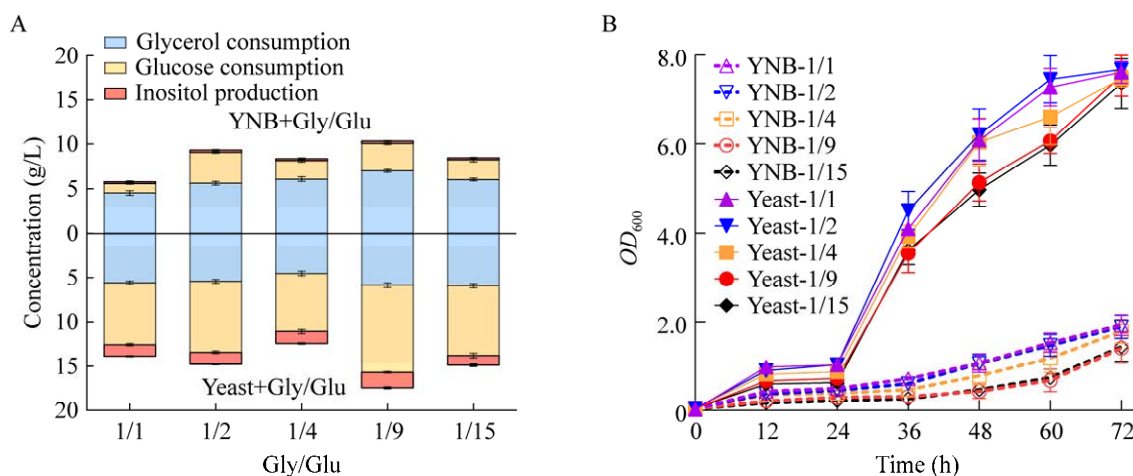


图 7 重组菌株 Z10 的发酵条件优化 A: 不同碳源比例与酵母粉的添加对 Z10 发酵的影响. B: 不同碳源比例与酵母粉的添加对 Z10 生长的影响

Figure 7 Optimization of fermentation conditions for recombinant strain Z10. A: Effects of carbon source ratio and yeast powder addition on the fermentation profiles of Z10. B: Effects of carbon source ratio and yeast powder addition on the growth profile of Z10.

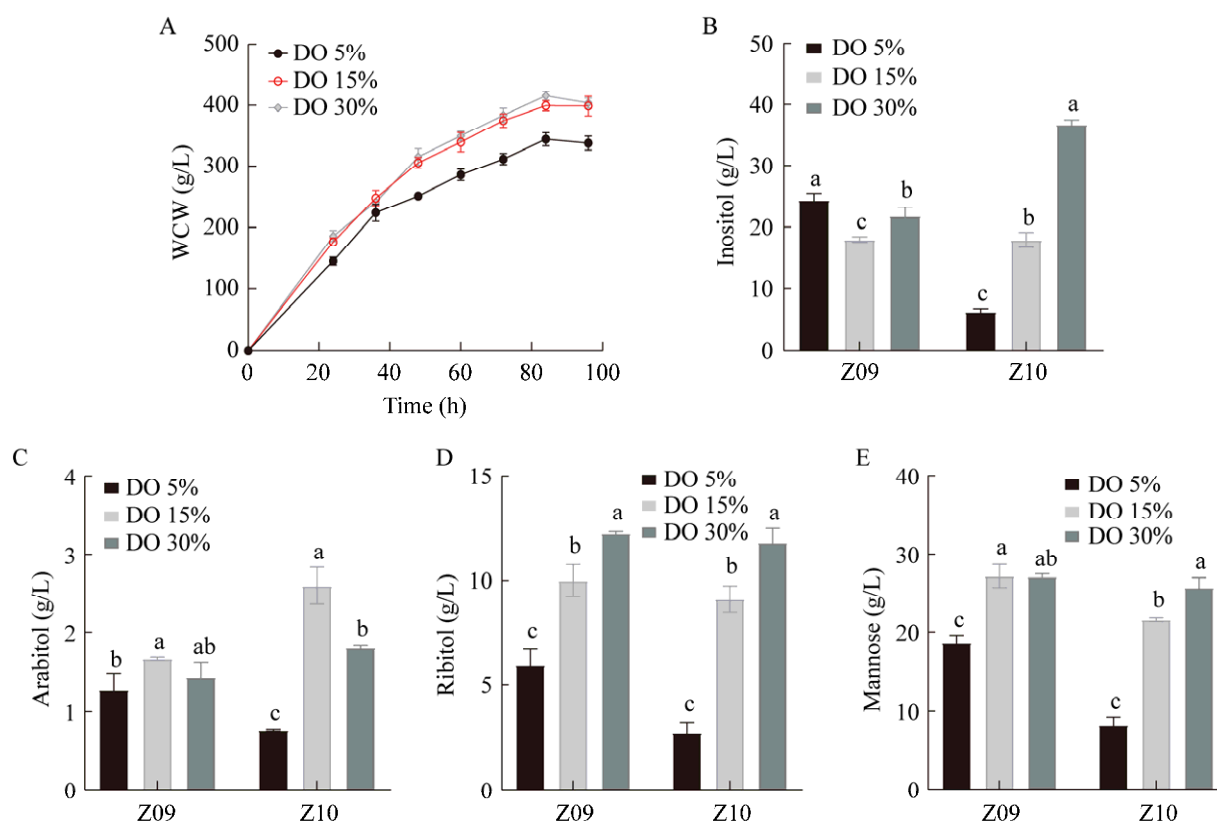


图8 溶氧量对重组菌株 Z09 和 Z10 高密度发酵的影响 A: 菌体湿重. B: 肌醇产量. C: 阿拉伯糖醇产量. D: 核糖醇产量. E: 甘露糖产量. 不同小写字母代表有差异显著($P < 0.05$)

Figure 8 Effect of dissolved oxygen (DO) on high-density fermentation profiles of recombinant strains Z09 and Z10. A: Wet cell weight. B: Inositol production. C: Arabitol production. D: Ribitol production. E: Mannose production. Different lowercase letters represent the significant difference ($P < 0.05$).

胞快速生长的需求。突变株 Z09 在不同 DO 条件下的肌醇产量分别为 24.4、18.0 和 21.8 g/L，其中 DO 为 5% 时产量最高，与之前低 DO 有利于肌醇生产的研究结论^[16]相似。与以葡萄糖为碳源发酵的 Z09 不同，突变株 Z10 在以甘油和葡萄糖为碳源发酵时，在不同 DO 条件下肌醇的产量变化较大，其中 DO 为 30% 时产量最高，达到 36.7 g/L，相较 DO 为 5% 时提升 4.9 倍。另外，随着 DO 的升高及生物量的增加，突变株 Z10 的阿拉伯糖醇、核糖醇和甘露糖等产物的产量也显著提高($P < 0.05$)，DO 为 30% 时副产物总量相较 DO 为 5% 时提升 2.4 倍，但相较出发菌株 JQ08 副产物总量仍然降低了 63.1%。通

过对发酵培养基和发酵条件的优化，最终在保持较低副产物生产的同时，大幅提高了肌醇产量。

3 结论

本研究通过对毕赤酵母代谢网络进行分析，确定了分支代谢途径阿拉伯糖醇和核糖醇合成的关键基因。通过敲除分支途径关键基因、控制发酵葡萄糖浓度，显著降低了副产物阿拉伯糖醇、核糖醇和甘露糖的产量。通过过表达甘油转运和代谢的相关基因，实现了甘油和葡萄糖在毕赤酵母中协同利用，并通过调整碳源比例及溶氧量优化了发酵条件，肌醇的产量进

一步提高。最终在高密度发酵条件下, 肌醇产量达到 36.7 g/L, 是目前酵母类菌株生产肌醇的最高产量, 为利用毕赤酵母工业化生产肌醇奠定了基础。

REFERENCES

- [1] NOVENTA M, VITAGLIANO A, QUARANTA M, BORGATO S, ABDULRAHIM B, GIZZO S. Preventive and therapeutic role of dietary inositol supplementation in periconceptional period and during pregnancy: a summary of evidences and future applications[J]. *Reproductive Sciences*, 2016, 23(3): 278-288.
- [2] MICHELL RH. Do inositol supplements enhance phosphatidylinositol supply and thus support endoplasmic reticulum function?[J]. *British Journal of Nutrition*, 2018, 120(3): 301-316.
- [3] BENVENGA S, ANTONELLI A. Inositol(s) in thyroid function, growth and autoimmunity[J]. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 2016, 17(4): 471-484.
- [4] CROZE ML, SOULAGE CO. Potential role and therapeutic interests of *myo*-inositol in metabolic diseases[J]. *Biochimie*, 2013, 95(10): 1811-1827.
- [5] ÖZTURAN A, ARSLAN S, KOCAADAM B, ELIBOL E, İMAMOĞLU İ, KARADAĞ MG. Effect of inositol and its derivatives on diabetes: a systematic review[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2019, 59(7): 1124-1136.
- [6] LÓPEZ-GAMBERO AJ, SANJUAN C, SERRANO-CASTRO PJ, SUÁREZ J, RODRÍGUEZ de FONSECA F. The biomedical uses of inositols: a nutraceutical approach to metabolic dysfunction in aging and neurodegenerative diseases[J]. *Biomedicines*, 2020, 8(9): 295.
- [7] LI SA, JIANG WD, FENG L, LIU Y, WU P, JIANG J, KUANG SY, TANG L, TANG WN, ZHANG YA, YANG J, TANG X, SHI HQ, ZHOU XQ. Dietary *myo*-inositol deficiency decreased intestinal immune function related to NF- κ B and TOR signaling in the intestine of young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 76: 333-346.
- [8] SACCHINELLI A, VENTURELLA R, LICO D, Di CELLO A, LUCIA A, RANIA E, CIRILLO R, ZULLO F. The efficacy of inositol and N-acetyl cysteine administration (ovarian HP) in improving the ovarian function in infertile women with PCOS with or without insulin resistance[J]. *Obstetrics and Gynecology International*, 2014, 2014: 1-5.
- [9] YAMAOKA M, OSAWA S, MORINAGA T, TAKENAKA S, YOSHIDA KI. 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(1): 1-6.
- [10] MAGALA M, KOHAJDOVÁ Z, KAROVIČOVÁ J. Degradation of phytic acid during fermentation of cereal substrates[J]. *Journal of Cereal Science*, 2015, 61: 94-96.
- [11] YOU C, SHI T, LI YJ, HAN PP, ZHOU XG, ZHANG YH P. An *in vitro* synthetic biology platform for the industrial biomanufacturing of *myo*-inositol from starch[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2017, 114(8): 1855-1864.
- [12] ZHONG C, YOU C, WEI P, ZHANG YH P. Thermal cycling cascade biocatalysis of *myo*-inositol synthesis from sucrose[J]. *ACS Catalysis*, 2017, 7(9): 5992-5999.
- [13] WANG JP, CHENG H, ZHAO ZH, ZHANG YM. Efficient production of inositol from glucose via a tri-enzymatic cascade pathway[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 353: 127125.
- [14] ZHANG YH P, SUN JB, MA YH. Biomanufacturing: history and perspective[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2017, 44(4): 773-784.
- [15] TANG EJ, SHEN XL, WANG J, SUN XX, YUAN QP. Synergetic utilization of glucose and glycerol for efficient *myo*-inositol biosynthesis[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2020, 117(4): 1247-1252.
- [16] ZHANG QQ, WANG XL, LUO HY, WANG YR, WANG Y, TU T, QIN X, SU XY, HUANG HQ, YAO B, BAI YG, ZHANG J. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for *myo*-inositol production by dynamic regulation of central metabolism[J]. *Microbial Cell Factories*, 2022, 21(1): 1-12.
- [17] YOU R, WANG L, SHI CR, CHEN H, ZHANG SS, HU MR, TAO Y. Efficient production of *myo*-inositol in *Escherichia coli* through metabolic engineering[J]. *Microbial Cell Factories*, 2020, 19(1): 1-10.
- [18] YI MH, YANG LZ, MA J, LIU H, HE M, HU CY, YU P. Biosynthesis of *myo*-inositol in *Escherichia coli* by engineering *myo*-inositol-1-phosphate pathway[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2020, 164: 107792.
- [19] BAMBA T, YUKAWA T, GUIRIMAND G, INOKUMA K, SASAKI K, HASUNUMA T, KONDO A. Production of 1,2,4-butanetriol from xylose by *Saccharomyces cerevisiae* through Fe metabolic

- engineering[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 56: 17-27.
- [20] 李言, 笕心怡, 张雨晨, 方馨, 周萍萍. 酿酒酵母芳樟醇耐受性的工程改造[J]. *微生物学通报*, 2022, 49(8): 3062-3078.
- LI Y, DA XY, ZHANG YC, FANG X, ZHOU PP. Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved tolerance to linalool[J]. *Microbiology China*, 2022, 49(8): 3062-3078 (in Chinese).
- [21] 黄贞杰, 陈由强, 陈丽霞, 陈淑增. 代谢工程改造酿酒酵母合成肌醇[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(10): 2289-2296.
- HUANG ZJ, CHEN YQ, CHEN LX, CHEN SZ. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for inositol production[J]. *Microbiology China*, 2017, 44(10): 2289-2296 (in Chinese).
- [22] GUO F, DAI ZX, PENG WF, ZHANG SJ, ZHOU J, MA JF, DONG WL, XIN FX, ZHANG WM, JIANG M. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for malic acid production from methanol[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2021, 118(1): 357-371.
- [23] QIN XL, LU JJ, ZHANG Y, WU XL, QIAO XF, WANG ZP, CHU J, QIAN JC. Engineering *Pichia pastoris* to improve S-adenosyl-L-methionine production using systems metabolic strategies[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2020, 117(5): 1436-1445.
- [24] ZHANG XY, WANG DG, DUAN YH, ZHENG XY, LIN Y, LIANG SL. Production of lycopene by metabolically engineered *Pichia pastoris*[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2020, 84(3): 463-470.
- [25] HENRY S A, GASPAR M L, JESCH S A. The response to inositol: regulation of glycerolipid metabolism and stress response signaling in yeast[J]. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2014, 180: 23-43.
- [26] SCHWARZHANS JP, LUTTERMANN T, GEIER M, KALINOWSKI J, FRIEHS K. Towards systems metabolic engineering in *Pichia pastoris*[J]. *Biotechnology Advances*, 2017, 35(6): 681-710.
- [27] WANG XL, ZHAO XM, LUO HY, WANG YR, WANG Y, TU T, QIN X, HUANG HQ, BAI YG, YAO B, SU XY, ZHANG JJ. Metabolic engineering of *Komagataella phaffii* for synergetic utilization of glucose and glycerol[J]. *Yeast*, 2022, 39(6-7): 412-421.
- [28] PAN RQ, ZHANG J, SHEN WL, TAO ZQ, LI SP, YAN X. Sequential deletion of *Pichia pastoris* genes by a self-excisable cassette[J]. *FEMS Yeast Research*, 2011, 11(3): 292-298.
- [29] KUZNETSOVA E, PROUDFOOT M, GONZALEZ CF, BROWN G, OMELCHENKO MV, BOROZAN I, CARMEL L, WOLF YI, MORI H, SAVCHENKO AV, ARROWSMITH CH, KOONIN EV, EDWARDS AM, YAKUNIN AF. Genome-wide analysis of substrate specificities of the *Escherichia coli* haloacid dehalogenase-like phosphatase family[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(47): 36149-36161.
- [30] BAUMANN K, CARNICER M, DRAGOSITS M, GRAF AB, STADLMANN J, JOUHTEN P, MAAHEIMO H, GASSER B, ALBIOL J, MATTANOVICH D, FERRER P. A multi-level study of recombinant *Pichia pastoris* in different oxygen conditions[J]. *BMC Systems Biology*, 2010, 4(1): 141.