

· 产品篇 ·

张大伟 中国科学院天津工业生物技术研究所研究员、博士生导师。长期从事工业微生物菌种构建、代谢工程、合成生物学及相关工业生物技术产品方面研究，多项技术成果已经在企业应用，并产生显著经济效益。在 *Nature Communications*、*Biosensor and Bioelectronics*、*ACS Synthetic Biology* 等期刊发表文章 80 余篇，申请专利 50 余项。荣获 2020 年天津市科学技术进步奖一等奖 (1/6)、2018 年中国产学研合作“创新奖”。荣获 2017 年天津市杰出青年科学基金资助，入选 2018 年天津市科技创新领军人才、2018 年滨海新区杰出青年培养计划。



代谢工程在维生素生产中的应用及研究进展

王岩岩^{1,2}, 刘林霞¹, 金朝霞², 张大伟¹

1 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308

2 大连工业大学 生物工程学院, 辽宁 大连 116033

王岩岩, 刘林霞, 金朝霞, 等. 代谢工程在维生素生产中的应用及研究进展. 生物工程学报, 2021, 37(5): 1748-1770.

Wang YY, Liu LX, Jin ZX, et al. Advances in metabolic engineering for vitamins production. Chin J Biotech, 2021, 37(5): 1748-1770.

摘要: 维生素是维持人体生命活动必需的一类有机物质, 机体本身一般不能合成或合成量不足, 因此需经食物或其他强化产品获取。目前, 维生素产品已广泛应用于医药、食品添加剂、饲料添加剂、化妆品等领域, 而且全球对维生素的需求也是呈逐年增长态势。维生素的生产方法主要包括化学合成法和生物合成法。化学合成法通常安全隐患大、反应条件严苛、废物污染严重, 相比之下, 代谢工程生产维生素绿色环保安全、能耗低, 因此建立微生物细胞工厂具有重大的科学意义和应用需求。文中回顾了近 30 年来代谢工程在维生素生产领域的研究进展, 详细阐述了水溶性维生素 (维生素 B₁、B₂、B₃、B₅、B₆、B₇、B₉、B₁₂ 和维生素 C 的前体) 和脂溶性维生素 (维生素 A、维生素 D 的前体、维生素 E 和维生素 K) 的生物合成研究现状, 并对其发酵生产的瓶颈进行了探讨, 最后对合成生物技术创建维生素生产菌种进行了展望。

关键词: 维生素, 代谢工程, 微生物发酵法, 合成生物技术

Received: October 30, 2020; **Accepted:** February 1, 2021

Supported by: Tianjin Synthetic Biotechnology Innovation Capacity Improvement Project (Nos. TSBICIP-KJGG-004-03, TSBICIP-CXRC-004).

Corresponding author: Dawei Zhang. Tel: +86-22-24828749; E-mail: zhang_dw@tib.cas.cn

天津市合成生物技术创新能力提升行动 (Nos. TSBICIP-KJGG-004-03, TSBICIP-CXRC-004) 资助。

Advances in metabolic engineering for vitamins production

Yanyan Wang^{1,2}, Linxia Liu¹, Zhaoxia Jin², and Dawei Zhang¹

¹ Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

² School of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116033, Liaoning, China

Abstract: Vitamins are organic substances that are essential for the maintenance of life activities. Generally, vitamins need to be obtained from the diet or from some synthetic source as the body cannot synthesize vitamins, or the amounts of the synthesized vitamins are insufficient. At present, vitamins are widely used in medicine, food additives, feed additives, cosmetics and other fields, and the global demand for vitamins is constantly growing. Vitamins can be produced from chemical or microbial synthesis. Chemical synthesis usually requires harsh reaction conditions, produces serious wastes, and creates great potential safety hazard. In contrast, microbial synthesis of vitamins is greener, safer, and requires much less energy input. This review summarizes the advances in metabolic engineering for vitamins production in the past 30 years, with a focus on production of water-soluble vitamins (vitamins B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₇, B₉, B₁₂ and vitamin C precursors) and lipid-soluble vitamins (vitamin A, precursors of vitamin D, vitamin E and vitamin K). Moreover, the bottlenecks for fermentative production of vitamins are discussed, and future perspectives for developing next generation vitamins producing strains using synthetic biotechnology are prospected.

Keywords: vitamins, metabolic engineering, microbial fermentation, synthetic biotechnology

维生素 (Vitamins) 是哺乳动物不能自行合成的基本元素, 但又是所有生物体新陈代谢所必需的^[1]。很多生物体都需要外源维生素的供给, 因此在食品添加剂、饲料添加剂、医药原料药等领域具有广泛应用的前景。据统计, 全球维生素的增速超过 4%, 从获取方式上看, 维生素可分为发酵制品和化学合成品。化学合成法生产维生素不仅价格昂贵, 而且会伴随有毒废物的产生、回收困难等问题, 因此烦琐复杂的化学合成法技术逐渐被淘汰, 人们开始热衷于安全高效的发酵生产方法。合成生物技术通过一系列生物技术手段改造细胞内的网络代谢结构^[2], 从而将细胞作为“底盘”及“可编程”整体, 开发出有效的组装策略, 测试外源元件和模块加载后的适配性, 组成精细、可定制化的生物应用系统^[3]。合成生物学包括三大主要技术: 基因编辑技术、DNA 组装技术和体内定向进化技术^[4], 如图 1 所示。该技术绿色、清洁、环保, 不受自然资源制约, 可持续发展, 具有广阔的发展前景。因此, 利用合成生物学技术可以驱动其他工业菌种的迭代进化, 也可有效

推动维生素高产菌株的改造更新^[5]。近年来, 微生物发酵生产技术已成为维生素生产的主要技术, 由此开启了维生素工业生产的新纪元。此技术也在食品、医药、农业、畜牧业等领域得到了广泛应用。

目前已知的维生素有 30 多种, 其中与生命健康有关的维生素有 20 多种^[6]。维生素分为水溶性和脂溶性两大类。水溶性维生素易溶于水、不溶于有机溶剂, 吸收后体内储存很少, 很多都随尿液排出。脂溶性维生素易溶于有机溶剂而不溶于水, 它会被脂肪吸收并储存在体内^[7]。植物和微生物可以从头合成维生素, 但人类和动物必须通过饮食等满足维生素需求。维生素行业各细分品种中, 维生素 B 族、维生素 E、维生素 C 和维生素 A 市场份额占比最大, 分别为 33%、30%、21% 和 13%, 其他维生素市场份额占比较小, 总占比仅 3%^[8]。

我国维生素工业起源于 20 世纪 50 年代末, 当时主要以生产医药原料为目的; 进入 70 年代, 我国已能自行生产若干种 B 族维生素, 并成功研究

了维生素 C 两步法生产工艺；80 年代，我国已基本形成除生物素以外的各种维生素生产体系，但中间体仍依赖进口，产量和规模远不能满足市场需求；90 年代以后，我国维生素和中间体产业均取

得了突破性进展^[9]。目前我国已成为全球屈指可数的能够生产迄今发现的所有维生素品种的极少数国家之一，同时也是全球最大的维生素出口国之一，生产工艺及产品质量均处于全球领先地位。

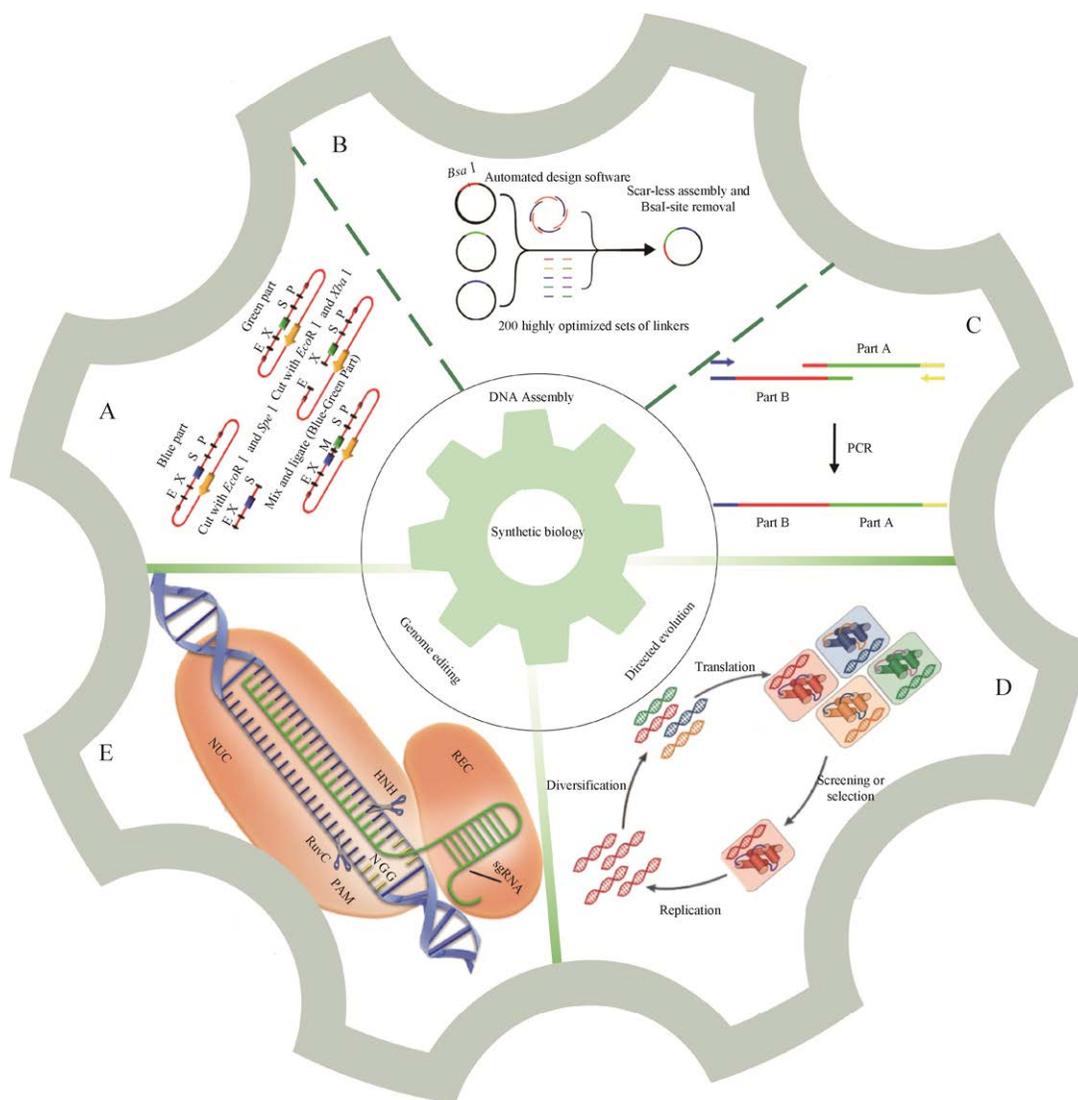


图 1 合成生物学主要技术

Fig. 1 Major techniques of synthetic biology. (A) Biobrick technique. (B) Golden Gate technique. (C) Overlap-PCR technique. (D) The process of directed evolution in the laboratory, mimicking that of biological evolution^[10]. (E) Genome editing technique.

现如今，随着维生素应用领域的不断延伸及科学技术的不断进步，微生物发酵法生产维生素的生产方法也在逐渐发展。在生物技术不发达时

期，人们大多采用化学方法生产维生素，主要采用化学试剂诱变、紫外线辐射或激光诱变、 N^+ 离子束的应用等^[11-13]。而现在的生物方法主要包括

出发菌株的构建和诱变筛选、遗传修饰技术、培养基条件优化、生物反应器的构建等^[14]。两种方法在工业生产和实验室研究都各有优势。化学合成方法在合成某些维生素时,存在成本高、环境污染严重、产生难以分开的异构体且废物处理成本高等问题,例如维生素 K₂ 中最具生物活性的 MK-7,其顺式结构没有活性,反式结构才具有活性^[15],若采用化学合成方法,会同时产生两种异构体,需要进一步分离纯化,导致生产成本提高,而生物合成方法常可以避免这个问题^[16]。虽然化学合成方法所生产的产品质量没有问题,但是部分生产方法也会让人产生焦虑和怀疑。例如,工业上生产方法比较成熟的维生素 B₂,其生产方法有酵母菌发酵法、基因工程菌发酵法、化学合成法和化学半合成法,其中化学合成法具有颇多难以解决的问题,如生产步骤烦琐、分离纯化困难、成本高、收率低等,目前已完全被取代,而两种生物发酵法则为世界主流供应商主要采用的生产方法。因此,微生物发酵法因其成本低、污染小、可分离顺反异构体等优点而备受关注^[8]。当前微生物发酵法已得到人们的极大认可,随着合成生物技术的不断发展,工业微生物菌种改造技术的不断提高,微生物发酵法生产维生素在工业应用中已得到长足发展。文中就近 30 年来生物合成法合成维生素的研究进展进行了概述,汇总了微生物发酵法生产水溶性/脂溶性维生素的实例,以期绿色生产维生素的探究提供参考。

1 水溶性维生素

1.1 B 族维生素

B 族维生素有 12 种以上,其中被世界公认的人体必需维生素有 9 种,全部是水溶性维生素^[6],它们在体内存留的时间只有数小时,因此必须每天补充。B 族维生素是所有人体组织必不可少的营养和能量,是食物释放能量的关键。B 族维生素多作为辅酶,参与体内糖、蛋白质和脂肪的代谢,因此被列为一个家族^[17]。

1.1.1 维生素 B₁

维生素 B₁,又称硫胺素,是首个被发现的 B 族维生素,其生物活性形式为焦磷酸硫胺素(Thiamine pyrophosphate, TPP),作为重要的辅酶形式参与葡萄糖代谢和神经传导等功能。硫胺素是噻唑和嘧啶相连的二环化合物,在硫胺素的生物合成过程中,先分别合成嘧啶和噻唑部分,最终偶联形成 TPP。

硫胺素在细菌和真菌中的生物合成很大程度上受到了 TPP 核糖开关的调控。TPP-响应的核糖开关是已知的最广泛的核糖开关类别,在细菌、古菌、真菌和植物中均有鉴定,并且是最早发现的核糖开关代表之一,它们可以调节参与辅酶硫胺素及其磷酸化衍生物的生物合成和运输的基因表达。Cardinale 等在大肠杆菌 *Escherichia coli* 中,通过以核糖开关为基础的 TPP 生物传感器揭示了硫胺素的转运子,经过遗传改造并结合天然 *thiFSGH*、*thiC*、*thE* 和 *thiD* 或 *thiM* (图 2) 基因的过表达,TPP 的产量提高到 0.8 mg/L^[18]。

硫胺素生物合成途径中的 *thiC/thiH* 参与 Fe-S 代谢,被 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM) 代谢物抑制,而且 ThiC 酶 (图 2) 的催化活性非常低 ($k_{\text{cat}}=0.14 \text{ min}^{-1}$),是主要的代谢瓶颈之一。另外,生物合成途径基因的平衡表达问题也是本产品发酵生产的难点。硫胺素化学生产成本很低,工程菌株还需提高产量和得率,才能有望进行工业化生产。

1.1.2 维生素 B₂

核黄素是黄素单核苷酸 (FMN) 和黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD) 的重要前体物质。当维生素 B₂ 不足时,会引起机体持续性贫血。到 2018 年,核黄素已经完全实现发酵法生产,其工程菌株主要包括枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 与核黄菌 *Ashbya gossypii*。核黄素的生物合成是从鸟苷三磷酸和 5-磷酸核糖开始的,通过 6 个酶促步骤完成^[19]。中国湖北广济药业股份有限公司利用一株对脯氨酸类似物

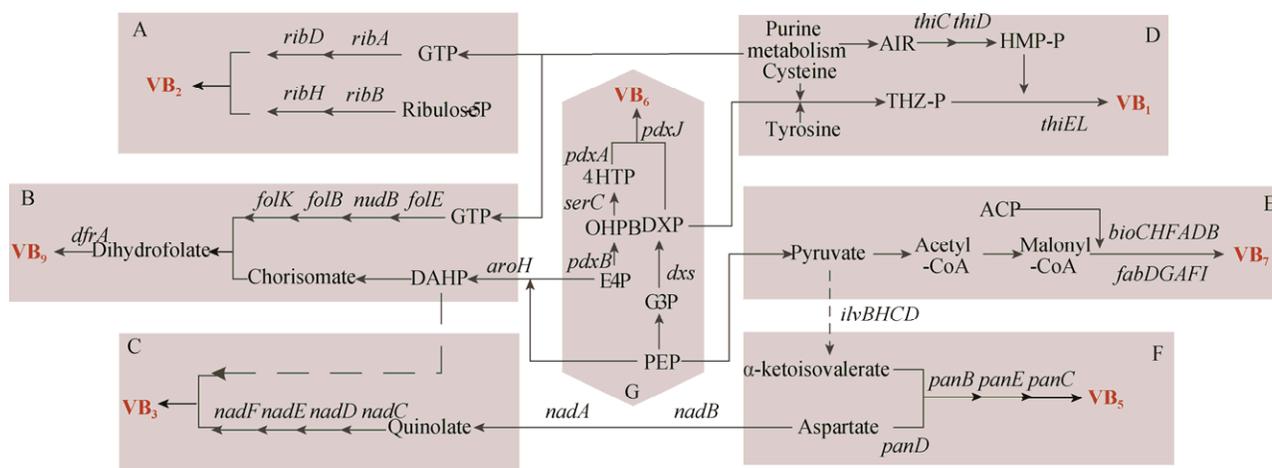


图2 B族维生素代谢网络途径

Fig. 2 Metabolic pathway of B vitamins. (A) Riboflavin biosynthesis pathway in *Bacillus subtilis*. RibA: GTP cyclohydrolase II; RibB: 3,4-dihydroxy 2-butanone 4-phosphate synthase; RibD: diaminohydroxyphosphoribosylaminopyrimidine deaminase; RibH: 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase. (B) Vitamin B₉ biosynthesis pathway in *B. subtilis*. AroH: chorismate mutase; FolE: GTP cyclohydrolase IA; NudB: dihydroneopterin triphosphate diphosphatase; FolB: 7,8-dihydroneopterin aldolase/epimerase/oxygenase; FolK: 2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyl-dihydropteridine diphosphokinase; DfrB: dihydrofolate reductase. (C) Vitamin B₃ biosynthesis pathway in *E. coli*. NadB: L-aspartate oxidase; NadA: quinolinate synthase; NadC: nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase; NadD: nicotinate-nucleotide adenyltransferase; NadE/NadF: NAD⁺ synthase. (D) Thiamine biosynthesis pathway in *E. coli*. ThiC/ThiD: phosphomethylpyrimidine synthase; ThiE: thiamine-phosphate pyrophosphorylase; ThiL: thiamine-monophosphate kinase. (E) Vitamin B₇ biosynthesis pathway in *E. coli*. BioC: malonyl-CoA O-methyltransferase; BioH: pimeloyl-(acyl-carrier protein) methyl ester esterase; BioF: 8-amino-7-oxononanoate synthase; BioA: 8-amino-7-oxononanoate aminotransferase; BioD: dethiobiotin synthetase; BioB: biotin synthase; FabD: S-malonyltransferase; FabG: 3-oxoacyl-(acyl-carrier protein) reductase; FabA: 3-hydroxyacyl-(acyl-carrier protein) dehydratase; FabF: 3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase II; Fab I: enoyl-(acyl-carrier protein) reductase I. (F) Pathway for *de novo* synthesis of vitamin B₅. *ilvBHCD*: increases the transcription levels of the *ilv* genes; *PanDBEC*: pantothenate biosynthetic genes. (G) *De novo* biosynthesis pathway of vitamin B₆. PdxB: erythronate-4-phosphate dehydrogenase; SerC: phosphoserine aminotransferase; PdxA: 4-hydroxythreonine-4-phosphate dehydrogenase; PdxJ: pyridoxine 5-phosphate synthase; Dxs: 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase.

表现出抗性的 *B. subtilis* (KCCM-10445) 来合成核黄素，并生产超过 26 g/L 的核黄素^[20]，但在 2018 年 9 月 20 日欧盟公布由 *B. subtilis* KCCM-10445 生产的维生素 B₂ 产品存在一定风险。专家组认为该产品存在遗传修饰菌株携带编码抗菌药物耐药性基因和 DNA 扩散的风险，所以要求从市场上撤回。

有研究采用不同的流加发酵方式对重组 *B. subtilis* 进行发酵生产维生素 B₂，对于葡萄糖限制流加培养，通过人工控制葡萄糖流加速率使培养基中的葡萄糖浓度为 1–2 g/L 时，所构建的重

组菌可以达到较高的核黄素产量和菌体量，分别为 12.5 g/L 和 34.7 g/L^[21]。Shi 等在 *B. subtilis* 中，通过经典诱变策略和对核黄素操作子以及嘌呤途径的调控等策略，使核黄素的发酵产量达到 826.52 mg/L^[22]。*A. gossypii* 具天然高产核黄素的特征，也是首先进行核黄素发酵的菌种。1990 年，德国巴斯夫股份有限公司 (BASF) 将 *A. gossypii* 发酵工艺商业化后进行了大规模的发酵生产利用。通过遗传改造核黄素合成基因等，现在的工业菌株和优化的工艺控制可以使核黄素的效价超过 20 g/L^[23]。

Tatsuo 曾发现 *rib* 操纵子基因的过表达可以增加核黄素的产量^[24]。近年来无名假丝酵母 *Candida famata* 在核黄素发酵中得到了广泛应用。有数据表明,通过过表达 *sef1* 和 *imh3* 基因,并利用经典的诱变方法,在 *C. famata* 中构建了一株核黄素高产菌株 AF-4,可以生产 $(1\ 026\pm 50)$ mg/L 的核黄素,这对探索核黄素的工业化生产作出了巨大贡献^[25]。

当前核黄素的生产瓶颈主要有工程株的遗传稳定性不好,另外发酵产生的副产物较多,这都制约着核黄素产量达到新高。未来核黄素的生产工艺将会得到进一步提高,除了在该领域的技术进步外,在工程工艺目标的选择方面也有可能得到改进。到目前为止,工程菌株的大部分努力都是围绕维生素 B₂ 的合成途径进行的,但还可以探索其他成本降低策略,例如:(1) 扩大底物范围,以更廉价的碳源(如木质纤维素材料或淀粉)生产维生素;(2) 提高菌株的健壮性,甚至允许露天发酵;(3) 提高菌株的耐温性,或采用耐高温酵母生产,以降低生物反应器冷藏成本、节省耗能和时间、缩短发酵周期等。

1.1.3 维生素 B₃

维生素 B₃ 包括 3 种形式:烟酸(Nicotinic acid)、烟酰胺(Nicotinamide)和烟酰胺核糖核苷(Nicotinamide nucleotide),它们是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸酯(NADP)合成的重要前体物质^[26]。NAD⁺既是氢化物转移酶的辅酶,也是多种酶的底物,包括 Sirtuins 蛋白脱乙酰基酶(ADP-核糖)聚合酶(ParP)和 ADP-核糖环化酶(CadpR)^[27]。在氧化还原反应中,NAD⁺和 NADH 相互转化,而总 NAD 量不变。到目前为止,维生素 B₃ 并没有商业化的发酵过程,其工业生产方法主要为氨氧化法和电解氧化法,但是前者生产成本低、反应需要在 300 °C 以上,后者生产成本低,但电解效率不高,故而限制着烟酸的工业生产^[8]。但化学合成法结

合生物催化路径可作为未来发展方向之一,包括来自玫瑰色红细菌 *Rhodococcus rhodochrous* 的脲水解酶或脲水合酶和酰胺酶将 3-氰基吡啶水解为烟酸,或将 3-氰基吡啶水合为烟酰胺。

维生素 B₃ 的生物合成前体为必需氨基酸——色氨酸。在酵母底盘细胞中,烟酰胺核糖核苷转运蛋白 Nrt1 的缺失有利于其泵出胞外,而且烟酸的输出也由于烟酸转运蛋白 Tna1 的缺失而增加,揭示细胞通过平衡 NAD⁺ 的前体——烟酸的运输来调节细胞内 NAD⁺ 代谢过程,在添加 0.005 mol/L 烟酸的基础上,酵母细胞可生产 8 mg/L 的烟酰胺核糖核苷^[28]。

1.1.4 维生素 B₅

维生素 B₅ 又称泛酸(Pantothenic acid),是辅酶 A (Coenzyme A, CoA) 和酰基载体蛋白(Acyl carrier protein, ACP) 生物合成的重要前体物质^[29],在脂肪酸代谢方面起着重要的作用。泛酸具有旋光性且不稳定,仅 D 型具有生物活性,泛酸钙是其主要的商品形式,广泛应用于食品、畜牧、医疗等领域,因此工业上通常使用稳定性较好的衍生物,如泛酸钙、泛醇等^[30],泛酸的合成分为化学法和微生物合成法,其中的微生物法可直接合成 D 型泛酸。据公开资料表明,亿帆医药股份有限公司作为全球最大的供应商,采用酶生物拆分法进行生产。微生物酶法拆分 DL-泛解酸内酯具有成本低、环境友好等特点,考虑到化学法合成泛酸成本昂贵、环保压力较大等问题,采用微生物法合成维生素 B₅ 会是必然趋势,由此,将微生物酶解法生产维生素 B₅ 推向了技术顶峰^[8,31]。

在 *B. subtilis* 和 *E. coli* 中,泛酸是由前体丙酮酸和天冬氨酸开始经 7 个酶催化形成。泛解酸和 β-丙氨酸(通过 L-天冬氨酸-α-脱羧酶 PanD 脱羧生成)经过泛酸合成酶(PanC)缩合形成泛酸(图 2)。Leonardi 等通过敲除谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* 中的 *ilvA* 基因并过表达 *ilvBNCD* 和 *panBC* 基因(图 2),泛酸的含量高达 1 000 mg/L^[29]。Hüser 等进一步弱化 *ilvE*

的表达, 泛酸的含量达到 1.75 g/L^[32]。另外, 有研究证明, *C. glutamicum* 的泛酸合成酶 PanC 比活达 205.1 U/mg, 向含有该酶的 *E. coli* 中添加底物 (D-泛解酸和 β -丙氨酸), 可以在 32 h 内产生 97.1 g/L 的泛酸, 转化率达 99.1%, 产率为 3.0 g/(L·h), 这也是迄今为止所报道的最高产率^[33], 但是该报道最高产率的工作有着生产缺陷, 需要外源添加底物泛解酸, 而泛解酸的市场价格极高, 这严重制约了这种生产方法的工业化。

在泛酸的生产模式当中, 最主要的生物催化方法就是泛解酸内酯水解法。利用水解酶所催化的动力学进行拆分, 具有产品光学纯度高、绿色节能等优点, 更适用于工业化生产。水解酶可分为 L-泛解酸内酯水解酶和 D-泛解酸内酯水解酶, 二者可以选择性水解相应的泛解酸内酯, DL-泛解酸内酯经 L-泛解酸内酯水解酶水解, 留下 D-泛解酸内酯, 产生的 L-泛解酸再经过化学内酯、外消旋后, 转变为 DL-泛解酸内酯。D-泛解酸内酯水解酶水解过程同该水解过程类似^[34]。Kataoka 等报道称, 许多镰刀菌属的微生物都能产生 D-泛内酯水解酶, 可以选择性地水解 DL-泛内酯中的 D-异构体。其水解产物 D-丙二酸很容易用溶剂从泛内酯中分离出来, 然后在酸性条件下加热转化为 D-泛内酯^[35]。

生物转化法除了显著增加了泛酸的产量外, 同时也导致副产物 β -丙氨酸-2-羟基异戊酸 (HMBPA) 的产生。OmniGene Bioproducts /巴斯夫股份有限公司公布了无 HMBPA 的泛酸组合物的制备方法, 通过敲除 *panE2*, 减少泛酸激酶的量, 适当增加丝氨酸量, 降低 HMBPA 的合成, 从而提高泛酸的产量, 在 48 h 的分批补料发酵中产量可达 82–86 g/L, 实现了泛酸的最高产^[36]。

1.1.5 维生素 B₆

维生素 B₆ 包括吡哆醇、吡哆醛和吡哆胺及其相应的磷酸酯衍生物, 在生物体内以磷酸盐的形式存在。维生素 B₆ 在体内的活性形式主要是 5-磷酸吡哆醛 (PLP), 作为许多酶的辅因子参与到

氨基酸、糖类等多种代谢过程^[37]。据统计, 维生素 B₆ 下游主要用于医药、食品保健、饲料等领域, 目前国际上饲料添加剂中维生素 B₆ 的用量很大, 已超过医药方面的用量。我国作为维生素 B₆ 的最大生产国, 维生素 B₆ 整体出口量呈逐年上升趋势, 2019 年出口量达到 6 422.9 t, 为历史新高^[8]。当前工业上采用的主流方法为噁唑法, 且目前的研究也多集中于噁唑法合成工艺的改进, 虽然这种方法具有原料易得、收率高等特点, 但是合成过程产生的中间体具有一定毒性, 且腐蚀性强, 存在一定的安全隐患, 不符合绿色工业化生产, 故而未来发展重在生物合成方法。

维生素 B₆ 的从头合成途径包括两条: 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸依赖性途径 (DXP-依赖性途径) 和 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸非依赖性途径 (DXP-非依赖性途径)^[38]。苜蓿中华根瘤菌 *Sinorhizobium meliloti* 具有天然高产维生素 B₆ 的特征, 野生型 *S. meliloti* IFO14782 菌株在 7 d 内产生 84 mg/L 的吡哆醇^[39]。通过在该菌株中过表达磷酸吡哆醇 (PNP) 合成酶 PdxJ (图 2), 7 d 内产生 362 mg/L 的吡哆醇^[40]。而过表达来自 *E. coli* 的 4-磷酸赤藓糖脱氢酶 (Epd) (图 2) 和自身的 5-磷酸吡哆醇合成酶 (PdxJ), 可将维生素 B₆ 的产量进一步提高到 1.3 g/L^[41], 这也是目前报道的最高产量。*B. subtilis* 也已被设计用于生产维生素 B₆。通过过表达自身的吡哆醛-5 磷酸合成酶 (PdxS) 与吡哆醛-5 磷酸合成酶 (PdxT) (图 2), 菌株在 48 h 内可产生 36 mg/L 的吡哆醇^[42], 而通过遗传改造利用 DXP-依赖性途径生产维生素 B₆, 维生素 B₆ 的产量仅达到 14 mg/L, 通过优化发酵条件和外源添加 4-羟基苏氨酸和脱氧果糖, 最终产量可达到 54 mg/L。

在生物合成过程中, PdxJ 酶活力较低 ($k_{cat}=0.07\text{ s}^{-1}$), 该酶催化的反应步骤是维生素 B₆ 生物合成途径中的限速步骤, 其中间代谢产物 4-磷酸羟基-苏氨酸 (4HTP) 具有细胞毒性, 是维生素 B₆ 生物合成的主要瓶颈。目前, 维生素 B₆ 采用化

学合成法合成,成本较低,而发酵法,至少要在48 h内达到10 g/L的发酵产量,才能成为有效的发酵过程,因此要实现工业化生产还需要科研工作者们坚持不懈的努力。

1.1.6 维生素 B₇

维生素 B₇ 又称生物素 (Biotin), 作为辅因子可参与体内二氧化碳的固定和羧化过程。工业上生物素的生产是通过一个很长的、多步骤的化学过程进行的, D-生物素目前的大生产工艺主要以 Sternbach 合成路线为基础, 现行的工业化生产方法就是在此基础上进行改进。除非生物合成方法可以以低廉的成本获得较高的产出, 否则很难撼动化学合成工艺在工业生产上的地位。生物素具有3个手性中心, 分子结构复杂, 合成工艺属不对称合成, 化学合成过程包括光学拆分步骤, 技术难度高、壁垒高, 且从投料到出品需要一个月的时间, 使得生物素市场前进的步伐变得更加迟缓。因此, 通过微生物发酵过程生产生物素是最理想的合成方式。近年来, 有报道称一些微生物可以产生生物素, 例如 *C. glutamicum*、百脉根中间根瘤菌 *Mesorhizobium loti*、*S. meliloti*、球形芽胞杆菌 *Bacillus sphaericus*、库特氏菌属 *Kurthia* sp.、酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 等。

Streit 等在土壤杆菌 *Agrobacterium* 和根瘤菌 *Rhizobium* HK40 中, 过表达来自 *E. coli* 的生物素强启动子 *tac*, 并在生物素合成酶 (BioB) (图 2) 前面引入已修饰的核糖体结合位点 (RBS), 可以产生 110 mg/L 的生物素^[43]。Bower 等通过重组和调控 *B. subtilis* 中的生物素操纵子基因, 使生物素产量超过 1 g/L^[44]。Clack 等通过化学诱变的方式降低了易变假单胞菌 *Pseudomonas putabilis* 中生物素的负反馈调节, 并导入含有自身生物素合成操纵子的表达载体后, 通过优化发酵条件, 其发酵罐中的生物素产量达到 15 g/L^[45]。

B. subtilis 中天然生物素操纵子中的大多数酶受到 S-腺苷-L-甲硫氨酸 (SAM) 副产物的强

烈抑制, 而生物素合成酶 (BioC、BioB、BioA、BioK) (图 2) 对辅因子 SAM 呈现出高需求, SAM 可以通过代谢工程手段提高, 但是并未发现可解除反馈抑制的突变菌株。BioB 催化效率极低 (转化数 $k_{cat}=0.12 \text{ min}^{-1}$), 有研究证实, 通过向 *B. subtilis* 中添加赖氨酸, BioK 利用赖氨酸作为生物素前体的氨基供体, 可产生生物素前体 (脱磷生物素) 600 mg/L, 但最终只生产了 21 mg/L 生物素, 因此提高生物素合成过程中生物素合酶的催化效率, 是未来实现工业化生产的首要任务^[46-47]。

1.1.7 维生素 B₉

维生素 B₉ 又称叶酸 (Folic acid), 是一个由 3 部分组成的分子家族: 一个来源于对氨基苯甲酸 (PABA) 的中心芳香族核心, 一个可以修饰的蝶呤环, 以及一个或多个谷氨酸的链。天然叶酸主要以多聚谷氨酸的形式存在, 其生物活性形式是四氢叶酸, 在一碳转移反应中起辅因子的作用, 参与核苷酸和氨基酸的合成。L-5-甲基四氢叶酸 (5-MeTHF) 在 2005 年底已被欧盟批准成为食品增补剂, 缺乏叶酸会导致红细胞中血红蛋白的生成减少, 损伤成熟细胞及巨幼细胞性贫血^[48]。5-MeTHF 的研究主要集中在化学合成方面, 合成方法涉及不对称中心的拆分, 但此过程中 5-MeTHF 易失活, 故而收率不理想。

许多人使用工程乳酸菌或酵母菌株作为强化叶酸的生产菌, 例如乳酸杆菌 *Lactobacillus* 和嗜热链球菌 *Streptococcus thermophilus* 等乳酸菌可从头生产叶酸, 以此来增加发酵乳产品中的叶酸水平。Gerstad 等发现在 *B. subtilis* 中, 通过增加前体物质供应, 并且阻断 5-甲基四氢叶酸的分解代谢途径后, 5-MeTHF 产量达到 952.05 $\mu\text{g/L}$ ^[49]。另外, *A. gossypii* 是一种丝状真菌, 天然高产维生素 B₂, 而核黄素和叶酸的合成存在一个共同的前体鸟苷-5'-三磷酸 (GTP), 表明 *A. gossypii* 可能是叶酸的良好生产者。*A. gossypii* 可自然合成 40 $\mu\text{g/L}$ 的叶酸, 经代谢工程处理后可达 6 595 $\mu\text{g/L}$, 是当前

报道过的最高生产效价^[50]。

由于目前维生素 B₉ 的化学合成成本很低, 除非限制化学合成过程中对于环境不友好部分, 否则生物合成维生素 B₉ 将会面临一个较高的经济壁垒。

1.1.8 维生素 B₁₂

维生素 B₁₂ 又叫钴胺素 (Cobalamin), 是唯一一种含有金属元素的维生素。氰钴胺和羟钴胺是钴胺素的合成形式, 而腺苷钴胺素和甲基钴胺素作为辅因子参与酶反应过程。在自然界中, 维生素 B₁₂ 是由微生物通过从头合成途径或补救合成途径合成的, 但高等动物和植物不能自身合成^[51]。虽然在 19 世纪, 已有研究者完成了维生素 B₁₂ 的全化学合成, 但由于化学合成方法过于复杂且成本昂贵, 因此全球主要供应商都是借助于微生物发酵来生产维生素 B₁₂^[8]。目前, 维生素 B₁₂ 主要通过费氏丙酸杆菌 *Propionibacterium freudenreichii*、谢氏丙酸杆菌 *Propionibacterium shermanii* 以及脱氮假单胞菌 *Pseudomonas denitrificans* 等进行大规模的工业化生产^[52], 且国内生产维生素 B₁₂ 的发酵水平为 200–300 mg/L^[53]。

近年来发现, 维生素 B₁₂ 核糖开关在细菌中被广泛应用, 它可以促进维生素 B₁₂ 的生物合成^[54]。Cai 等在 *S. meliloti* 中首次使用了核糖开关元件, 成功开发了流式细胞术高通量筛选系统, 并获得了维生素 B₁₂ 菌株, 但产量却不是很高, 而且维生素 B₁₂ 的效价很大程度上取决于培养基的条件^[55]。另外, 利用随机诱变方法, 通过紫外线、亚硝基胍 (NTG)、亚硝基甲基脒和次乙亚胺诱变来构建维生素 B₁₂ 菌株^[56-58]。据报道, *P. denitrificans* 产出维生素 B₁₂ 的最高滴度为 200 mg/L^[59]。研究者普遍认为, 在优化的发酵条件下, 这些工程生产菌株的产量可能高达 300 mg/L。据公开资料显示, 全球维生素 B₁₂ 产能约为 110 t, 生产主要集中于中国, 截至 2018 年, 中国共颁发了 13 张维生素 B₁₂ 的良好生产规范 (GMP) 证书, 主要生产企业有 4 家, 这 4 家公司的产能、产量以及出口量占据全国 90% 左右, 其中河北玉星生物工程有限公司

为全球最大的维生素 B₁₂ 供应商, 占全球维生素 B₁₂ 产量近 70% 的份额^[8]。

1.2 维生素 C

维生素 C 又称 L-抗坏血酸 (L-AA), 是体内多种酶促反应途径的重要辅助因子。它可以作为抗氧化剂清除自由基及减少氧化应激^[60]。其主要的饮食来源是新鲜蔬菜和水果, 缺乏维生素 C 会引起坏血病。维生素 C 是人体维持正常生命活动必需的维生素, 也是全球用量最大的维生素。维生素 C 及其衍生物的全球市场量已超 15 万 t/年, 年产值超 80 亿元^[8]。

维生素 C 最经典的工业生产法是莱氏法, 是一种混合发酵法^[61-62]。该方法使用低聚酮酸钾和氧化葡萄糖酸杆菌 *Gluconobacter oxydans* 共同生产 2-酮-L-古洛糖酸 (2-KGA), 2-KGA 是抗坏血酸的重要前体^[63-65], 再经盐酸酸化得到维生素 C。维生素 C 混菌发酵法是我国 20 世纪 70 年代在医药产业的标志性成果。当国外还在以化学法生产的时候, 我国首创了两步生物发酵法生产工艺, 并在 1986 年被瑞士罗氏股份有限公司以 550 万美元的高价独家收购, 创造了当年单项技术出口交易额记录。其生产主要依赖由 *G. oxydans*、巨大芽胞杆菌 *Bacillus megaterium* 和普通生酮基古龙酸菌 *Ketogulonicigenium vulgare* 组成的经典三菌二步发酵法 (图 3), 该方法对莱氏法进行了简化, 生产中避免了有毒化学试剂, 而且成本更低。其糖酸转化过程由两种菌混合发酵完成, 其中产酸菌俗称小菌, 单独生长缓慢, 产酸量低, 伴生菌俗称大菌, 具有促进小菌生长及产酸的作用。目前发现多种菌株均可作为伴生菌, 但是混合发酵对伴生菌有着绝对依赖性, 两种菌存在营养和生态位的竞争, 因此, 混菌发酵技术稳定性差、效率低, 这也阻碍了维生素 C 的工业化生产。为了解决上述问题, 满都拉等以伴生活性物质 (一个 36.3 kDa 的酸性蛋白) 替代伴生菌, 解除了伴生依赖性, 实现了单菌发酵, 新工艺能够有效地提高维生素 C 的收率并且缩短发酵周期^[66]。Sugisawa 等首次报道细菌可以通过 L-山梨糖醇产

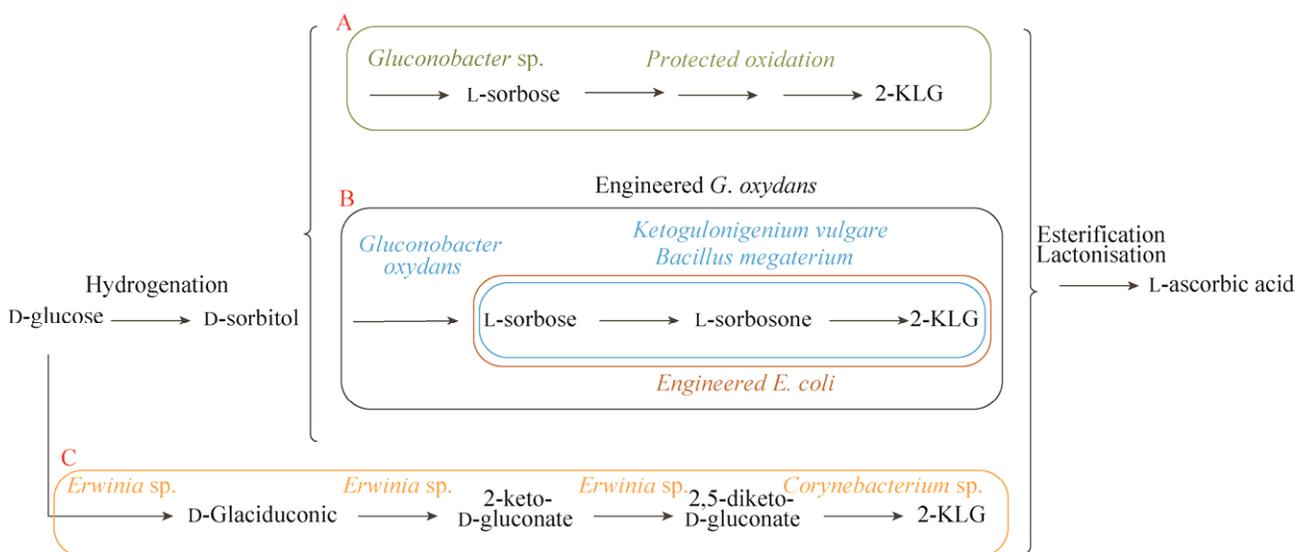


图3 L-抗坏血酸合成路径

Fig. 3 L-ascorbic acid synthesis pathway. (A) Classical Reichstein process: the seven-step Reichstein process involving one fermentation and six chemical transformations. (B) Two steps fermentation by three bacteria: *G. oxydans*, *B. megaterium* and *K. vulgare*. (C) 2,5-diketo-D-gluconic acid pathway: mixed or two stage fermentations with *Erwinia* sp. and *Corynebacterium* sp. or other species for the direct synthesis of 2-KLG from D-glucose.

生维生素 C, 其结果是, 在静置条件下 *K. vulgare* DSM 4025 可以产生 1.37 g/L 的 L-AA^[67]。Kim 报道称来自白色念珠菌 *Candida albicans* 和 *S. cerevisiae* 的酶不仅在体外可以将 D-阿拉伯糖转化为 D-阿拉伯糖-1,4-内酯, 而且还可以将 L-半乳糖转化为 L-半乳糖-1,4-内酯^[68-69]。有实验表明, 构建过表达内源性 D-阿拉伯糖-1,4-内酯氧化酶和 L-半乳糖脱氢酶的出芽酵母细胞可以产生约 100 mg/L 的 L-抗坏血酸^[70]。

高媛等通过构建功能性山梨糖/山梨酮脱氢酶的过表达 *E. coli* 菌株, 并优化催化条件重组表达吡咯喹啉醌 (PQQ), 在 5 L 生物反应器中, 以 L-山梨糖为底物, 应用全细胞催化法生产 2-KGA 的产量达 72.4 g/L, 底物转化率和生产强度分别为 71.2% 和 1.57 g/(L·h)^[71]。另外, 设计了一种由 *G. oxydans* 和重组 *E. coli* 组成的共培养系统, 通

过该共培养系统, 由山梨糖醇合成 2-KGA, 2-KGA 产量为 16.8 g/L, 转化率为 33.6%^[72]。

莱氏法作为经典的化学合成维生素 C 的方法, 也在不断地改造升级。三菌两步发酵法采用生物化学方法替代莱氏法的部分生产路线, 是目前国内厂家主要采用的方法, 但一步发酵法由于其单菌优势将有望取代混菌法而成为未来维生素 C 工业化生产的主流方式。

以上汇总的微生物发酵法生产水溶性维生素的实例如表 1 所示。

2 脂溶性维生素

2.1 维生素 A

维生素 A 是具有视黄醇生物活性的 β -紫罗宁衍生物的统称, 包括维生素 A₁ 及 A₂, 维生素 A₁ 即视黄醇, 共有 3 种形式: 视黄醇、视黄醇醋酸乙

表 1 代谢工程生产水溶性维生素的研究

Table 1 Metabolic engineering of microorganisms for the production of water-soluble vitamins

Vitamin	Species	Method	Main culture substances	Yield (mg/L)	Reference
VB ₁	<i>B. subtilis</i>	$\Delta thiN$; $\Delta ykoD$ and $\Delta yuaJ$	MM	1.27	[73]
	<i>E. coli</i>	$thiC^{OE}$; $thiE^{OE}$; $thiFSGH^{OE}$; and $thiD^{OE}$	MM	0.8	[18]
	<i>A. oryzae</i>	$thiP^{OE}$, $thiA^{OE}$, and $nmtA^{OE}$	CD-Dex medium (5% dextrin)	4-fold>WT	[74]
VB ₂	<i>B. subtilis</i>	$ribA^{OE}$ and $\Delta purR$ gene	MM	826.52	[22]
	<i>E. ashbyii</i>		MM	2.45	[75]
			molasses and peanut seed cake		
	<i>A. gossypii</i>	$\Delta mlls$ and $acr268C^{OE}$	YD; YR; rapeseed oil	700	[76]
	<i>C. famata</i>	$seF1^{OE}$ and imH_3^{OE}	YPD; fluorophenilalanine	1 026±50	[25]
	<i>Lactic acid bacteria</i>	$ribA^{OE}$ $ribB^{OE}$ $ribC^{OE}$ $ribG^{OE}$ $ribH^{OE}$ (promoter related genes)	Nisin induction	24	[23]
VB ₃	<i>S. cerevisiae</i>	$\Delta nrt1$, $\Delta nrk1$, $\Delta urh1$, $\Delta pmp1$	2× YPD; nicotinic acid	8	[28]
VB ₅	<i>C. glutamicum</i>	$\Delta ilvA$ and $ilvBNCD^{OE}$ gene and $panBC^{OE}$	MM	1 000	[29]
	<i>B. subtilis</i>	$ilvBHCD^{OE}$, $panBCDE^{OE}$, $serA^{OE}$ and $glyA^{OE}$	MM	80 000	[77]
VB ₆	<i>E. coli</i>	epd^{OE} , $pdxJ^{OE}$ and dxs^{OE}	MM+YE	78	[39]
	<i>S. meliloti</i>	epd^{OE} and $pdxJ^{OE}$	MM+YE	1 300	[24]
	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i> $pdxA^{OE}$ and <i>S. meliloti</i> $pdxJ^{OE}$	MM+AAs	65	[78]
VB ₇	<i>Agrobacterium/Rhizobium</i>	Overexpression of a modified biotin operon from <i>E. coli</i> ; $bioB^{OE}$	MM; betaine; diaminononanoic acid	110	[43]
	<i>E. coli</i>	Natural overexpressing plasmid biotin operon	MM; H-medium	11	[79]
	<i>B. subtilis</i>	$\Delta bioABFCD$ and $\Delta bioH$	MM	21	[47]
VB ₉	<i>A. gossypii</i>	$\Delta met7$; $\Delta ade12$; $\Delta rib1$; fol^{OE}	MA2 rich medium	7	[50]
VB ₁₂	<i>E. coli</i>	SUMT feedback suppression.	CM	0.67	[51]
	<i>S. meliloti</i>	$hemE^{OE}$ and $\Delta cobI$	MM; DMBI; cobalt chloride	156±4.20	[55]
	<i>P. denitrificans</i>	$cobF^{OE}$ - $cobM^{OE}$ gene cluster and $cogA^{OE}$ and $cobE^{OE}$ genes	Betaine; beet molasses; choline chloride	214.30	[80]
	<i>P. shermanii</i>	Overexpression of related biosynthetic genes	MM; DMBI	206	[59]
VC	<i>S. cerevisiae</i> & <i>Zygosaccharomyces bailii</i>	$lgdh^{OE}$ and $alo1^{OE}$	MM	100	[70]
	<i>E. coli</i>	$ssdA1^{OE}$ and $ssdA3^{OE}$	LB; TB; D-sorbitol medium	72 400	[81]

V: vitamin. MM: minimal media. YD: yeast extract and glucose. YR medium: yeast extract and rapeseed oil; YPD: yeast extract peptone dextrose. CM: complete medium. YE: yeast extract. AAs: amino acids; SUMT: S-adenosyl-L-methionine: uroporphyrinogen III methyltransferase; DMBI: 5,6-dimethylbenzimidazole. LB: Luria-Bertani medium. TB: Terrific broth medium.

酯、视黄醇棕榈酸酯^[82]。维生素 A₂ 即 3-脱氢视黄醇, 其生理活性是维生素 A₁ 的 40%。β-胡萝卜素具有维生素 A 原活性, 实际是两个尾部相连的视黄醇分子, 通过中心裂解或偏心裂解可转变成两个或一个维生素 A^[83]。β-胡萝卜素又分为全反式和顺式异构体, 前者经过中心裂解, 可以生成两分子全反式视黄醇 (维生素 A), 而顺式 β-胡萝卜素转换为维生素 A 的产量则较低。柠檬醛是生产维生素 A 的关键原料, 目前全球仅有德国巴斯夫股份公司、中国新和成股份有限公司和日本株氏会社可乐丽三家企业能够生产柠檬醛, 总产能为 5.3 万 t/年, 巴斯夫为最主要的生产商, 占全球 70% 以上的市场份额, 而维生素 A 的关键起始原料 β-紫罗兰酮, 在工业大规模生产中是由柠檬醛为起始原料合成, 这便使得柠檬醛成为维生素 A 生产的主要瓶颈。目前来看, 全球最大的两家厂商巴斯夫股份有限公司和金达威股份有限公司, 均采用化学合成方法生产维生素 A, 前者采用 Roche (C15+C5) 的合成工艺, 后者采用 Roche (C14+C6) 的合成工艺, 也是维生素 A 的主要生产方法^[8], 后者工艺技术成熟、收率稳定, 除非生物合成技术可以垄断化学合成工艺, 否则生物合成技术将面临很高的技术壁垒。

维生素 A 中具有膳食维生素 A 意义的只有 β-胡萝卜素、α-胡萝卜素和 β-隐黄质 3 种^[84]。胡萝卜素主要由真菌和一些细菌、藻类产生。例如 Li 等利用 CRISPR/Cas9 的方法对 *E. coli* 中的各基因进行改造并组合调控, β-胡萝卜素的产量达到 2.0 g/L^[85]; Roukas 等认为, 在三孢布拉酶 *Blakeslea trispora* 中也可以获得较高产量的胡萝卜素^[86], 通过过氧化氢 (H₂O₂) 和 2,6-二叔丁基对甲基苯酚 (BHT) 诱导 *B. trispora* 产生氧化应激反应, 来提高超氧化物歧化酶 (Sod) 和过氧化氢酶 (Cat) 的比活, 进而显著提高胡萝卜素的产量。他们发现餐厨废油作为胡萝卜素的发酵碳源, 不仅廉价, 而且效果极好, 尤其是向培养基中添加转录因子 (CSL) 及 BHT, 胡萝卜素的最高产

量可达到 (2 021±75) mg/L 或 (49.3±0.2) mg/g DCW, 其中, β-胡萝卜素占 74.2%^[87]。Larroude 等在解脂耶氏酵母 *Yarrowia lipolytica* 中过表达异源胡萝卜素合成酶 (Crt) (图 4), 使其高产 β-胡萝卜素。通过筛选最佳启动子组合得到的工程菌株的发酵产量为 1.5 g/L, 通过优化发酵条件采用补料分批发酵方式, 进一步将 β-胡萝卜素的产量提高到 6.5 g/L 和 90 mg/g DCW^[88]。

2.2 维生素 D

维生素 D 是乃环戊烷多氢菲类化合物, 为固醇类衍生物, 可防止佝偻病的发生, 又称抗佝偻病维生素。维生素 D 根据其侧链结构的不同而有 D₂、D₃、D₄、D₅、D₆ 和 D₇ 等多种形式, 其中, 活性形式主要包括维生素 D₂ (麦角钙化醇) 和维生素 D₃ (胆钙化醇)^[89]。维生素 D₃ 主要采用化学合成法生产。据公开资料显示, 全球维生素 D₃ 产能约为 1 万 t/年, 其中超过 75% 的产能位于中国^[8]。当前维生素 D₃ 的工业生产所采用的生产工艺主要有两种: 溴化/脱溴化氢法和氧化还原法, 而实验室研究常采用微生物法进行合成, 虽然微生物合成法在合成过程中不会产生甲苯等杂质, 但是其生产技术还不能达到工业化水平, 因此化学合成法一直占据主导地位。

维生素 D 的前体可以通过发酵法生产得到, 例如麦角固醇就是维生素 D₂ 的前体物质。目前, 国内外生产麦角固醇有两种方法, 一种是采用酵母发酵法, 另一种是从青霉素发酵菌丝中提取^[90]。发酵法所用菌种主要为酵母, 麦角固醇是其细胞膜的主要组成成分。许向前等从不同麦角菌中分离出一株高产麦角固醇的黑麦麦角菌^[91]。通过菌丝烘干, 再加入丙醇浸泡过夜, 经过石油醚/丙酮洗脱后浓缩结晶, 可获得大量麦角甾醇粗品。此法与传统生产方法相比, 工艺简单、产量高, 且粗品经甲醇洗涤重结晶后, 纯度可达到 98% 以上。Tan 等通过对麦角甾醇发酵参数进行了优化, 结果发现溶解氧可作为酵母补料分批发酵的有效控

制参数。当溶解氧控制在 12% ($\pm 1\%$) 时, 采用脉冲补料法, 麦角甾醇总收率可达到 1 160 mg/L^[92]。

维生素 D₃ 作为维生素 D 的主要活性形式, 人体自身就能够合成, 人体的皮肤含有一种胆固醇, 经阳光照射后, 就变成了维生素 D₃, 但紫外线照射带来的皮肤癌上升以及空气的污染等问题, 使得人们接受日照的时间大大减少, 导致全世界范围内维生素 D 均呈现广泛缺乏的现象, 因此就需要通过其他途径摄取。维生素 D₃ 在人和动物体内并不能直接发挥作用, 而要经过肝代谢产生 25-羟基维生素 D₃ (25-OH-VD₃) 发挥作用, 25-OH-VD₃ 也是维生素 D 在体内的主要储存形式^[89]。目前, 25-OH-VD₃ 的生产工艺主要有化学合成法、光照射法。其中化学反应步骤烦琐、部

分还需要卤素试剂, 而且反应过程中会产生外消旋体, 分离难度大, 因此越来越多人把目光放在利用微生物来发酵生产维生素 D₃ 上。微生物生物合成方法利用的菌株主要包括有红球菌属 *Rhodococcus*、链霉菌属 *Streptomyces*、假诺卡氏菌 *Pseudonocardia* sp.、分枝杆菌属 *Mycobacterium* 等, 但目前研究却少有报道。维生素 D₃ 羟化酶 (Vdh) (图 4) 是一种细胞色素 P450 单加氧酶, 它可催化维生素 D₃ (VD₃) 的两步羟基化反应, 生成 25-OH-VD₃ 和 1- α ,25-二羟基维生素 D₃。Yasutake 等用一种天然生物活性抗菌肽-乳酸链球菌素, 处理含有羟化酶的红球菌细胞, 他们发现可以合成 573 mg/L 的 25-OH-VD₃^[93]。Sasaki 及其同事在实验室筛选了近 300 个链霉菌属菌株, 发现其中两

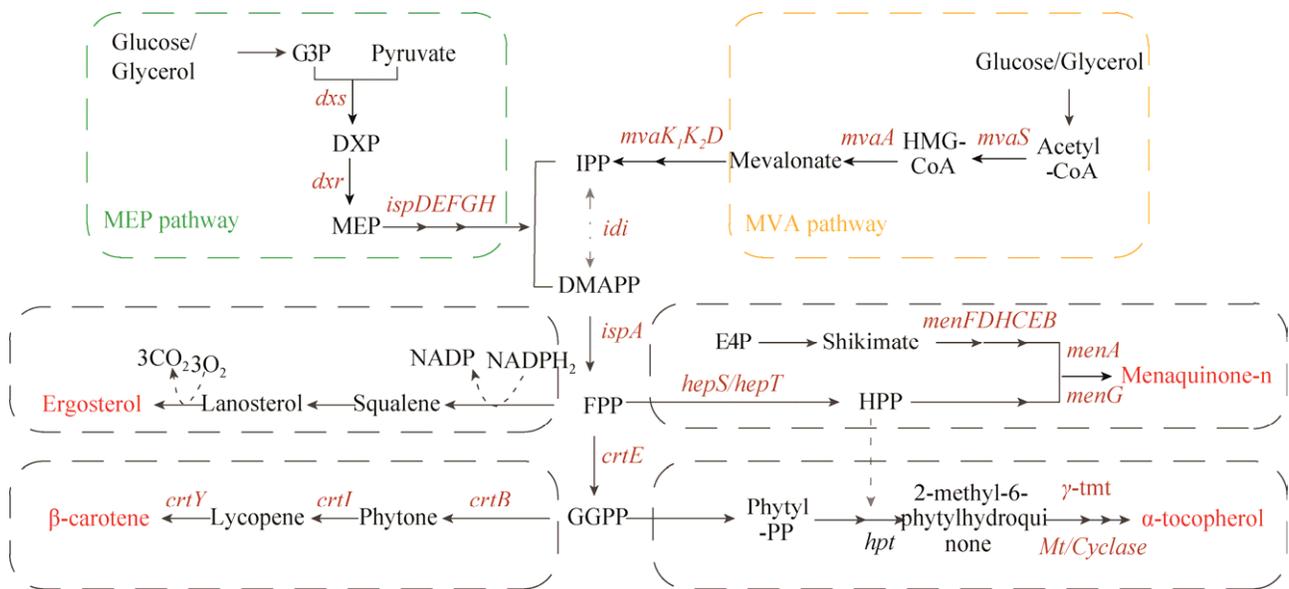


图 4 维生素 A、D、E、K 代谢网络途径

Fig. 4 Metabolic pathways of vitamin A, D, E, K. Dxs: 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase; Dxr: 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase; IspD: 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase; IspE: 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase; IspF: 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase; IspG: 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate synthase; IspH: 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase; MvaS: HMG-CoA synthase; MvaA: HMG-CoA reductase; MvaK1: mevalonate kinase; MvaK2: phosphomevalonate kinase; MvaD: diphosphomevalonate decarboxylase; Idi: isopentenyl diphosphate isomerase; IspA: geranyltransferase; CrtE: GGPP synthase; CrtB: phytoene synthase; CrtI: phytoene desaturase; CrtY: lycopene cyclase; HepS/HepT: heptaprenyl diphosphate synthase component I/II; MenF: isochorismate synthase; MenD: 2-succinyl-5-enolpyruvyl-6-hydroxy-3-cyclohexene-1-carboxylate synthase; MenH: demethylmenaquinone methyltransferase; MenC: o-succinylbenzoate synthase; MenE: o-succinylbenzoate-CoA ligase; MenB: 1,4-dihydroxy-2-naphthoyl-CoA synthase; MenA: 1,4-dihydroxy-2-naphthoate heptaprenyltransferase; MenG: demethylmenaquinone methyltransferase; γ -tmt: γ -tocopherol methyl-transferase; Mt: methyl-transferase.

种菌株的转化生产率约为 $7.0 \text{ mg}/(\text{L}\cdot\text{min})$ ^[94]。但是后续研究发现,反应在刚开始的几个小时内,羟基化效率是很高的,但随着时间的延长羟基化效率逐渐放缓,推测羟基化反应可能受积累的产物抑制。因此他们认为,要想大量合成 25-OH-VD₃,首先要解决的就是羟基化转化率的问题。但近年来,随着生物技术手段的不断更新迭进,25-OH-VD₃的生产面临一个最大的工艺瓶颈就是原料,要求原料必须是纯度大于95% (NF级别) 的胆固醇^[35],这也是未来高产维生素 D₃首要解决的任务。

2.3 维生素 E

维生素 E 是一组亲脂化合物,包含生育三烯醇和生育酚共 8 种自然形式,分别是 α 、 β 、 γ 和 δ -生育酚以及 α 、 β 、 γ 和 δ -生育三烯醇。其中, α -生育酚是生物活性最高的异构体^[95]。天然生育酚仅由光合作用的有机体(真核藻类、绿色植物和一些原核蓝藻)产生,是保护其免受活性氧侵害的有效抗氧化剂。另外,生育酚还在人类的免疫反应、细胞信号、生殖、抗癌活性和心血管等方面具有积极作用。维生素 E 是全球市场容量最大的维生素类产品之一,而且维生素 E 的需求也增长较快,据估计,中国对维生素 E 的需求增长率在 7%–8% 左右^[8]。天然维生素 E 主要存在于油料作物种子及植物油脂中,其中以植物油脂精炼副产品油脂脱臭馏出物中含量最多,是目前提取生产天然维生素 E 的主要来源,国外天然维生素 E 提取工艺较为成熟,主要是化学法与生物法等多种方法综合运用。国内天然维生素 E 的提取方法是将脱臭馏出物中的脂肪酸用低级醇进行酯化,然后进行中和、冷却结晶来获得较高含量的天然维生素 E 浓缩物。

经过不断探索,人们发现天然生育酚的最佳来源是微生物。愈来愈多人采用微生物发酵合成的法尼烯为中间体来合成维生素 E 前体异植物醇,进而合成维生素 E,颠覆了国外垄断几十年的化学全合成技术,并在湖北省石首市建成了全

球最大的维生素 E 成产装置并成功投产^[8]。法尼烯最早从苹果树中分离得到,在植物防御方面起到重要作用。而法尼烯在植物中的含量极低,无法以提取天然产物的方式应用于市场,因此,利用微生物合成法尼烯成为当时的最佳方式^[96]。刘天罡等将 *E. coli* 作为出发菌株进行遗传修饰改造,通过对法尼烯合成的相关基因进行密码子优化;利用“体外定向合成代谢体系”确定了甲羟戊酸途径(MVA 途径)合成法尼烯各蛋白的最佳比例,通过控制各蛋白的比例,排除复杂的体内代谢网络对目标研究途径的干扰,得到目标途径实际催化过程的参数,以此获得该代谢途径效率最优情况下的酶催化比例,从而在最短时间内快速地提高法尼烯的产量^[97]。该方法比利用传统的基因工程随机改变代谢通路上的蛋白表达量更具有目标性,实验设计也更加理性、有效,使得法尼烯的摇瓶产量达到 1 g/L 以上,在生物技术领域也创造了重组大肠杆菌生产法尼烯的“传奇”。

Albermann 等通过过表达羟基苯丙酮酸双加氧(Hpd)、香叶酰焦磷酸合酶(CrtE)、香叶酰焦磷酸还原酶(Ggh)、生育酚环化酶(Cyc)(图 4)等,使其在 *E. coli* 中表达,从而合成维生素 E 化合物 δ -生育三烯醇($15 \text{ }\mu\text{g/g}$)^[98]。Shen 等结合采用新设计的冷击温控系统,成功实现产生育三烯酚工程菌株的细胞生物量积累和目标产物积累的分阶段控制,最终在 5 L 发酵罐中使总生育三烯酚产量达到 320 mg/L ^[99],为实现天然维生素 E 的全发酵法生产奠定了基础。

此外,光合微生物会积累大量的维生素 E^[100],微藻作为一大类具有极大能量潜力的光合微生物,它能够将太阳能转化为生物质能,这对于维生素的生物合成起着重要作用。

近年来,细小裸藻 *Euglena gracilis* 被更多地应用于生产高价值的产品,例如氨基酸、抗坏血酸等。*E. gracilis* 最有希望实现 α -生育酚的商业化生产,其生长率和 α -生育酚含量较高, α -生育酚

占细粒裸藻积累的生育酚总量的 97% 以上^[101]。*E. gracilis* 作为一种光自养、光异养和异养条件下生长的生物体, 可根据不同的生长环境模式和条件产生 α -生育酚^[102-103]。Tani 等在 *E. gracilis* 生长培养基中加入尿黑酸和 L-酪氨酸等前体物质使 α -生育酚的量积累达到 143.6 mg/L 或 5.1 mg/g DCW^[104]。Grimm 等选择了 3 种不同的培养模式来培养 *E. gracilis*, 发现在光异养和光自养条件下, 产物浓度相对较高, 因此光对 α -生育酚的积累具有一定的积极作用。与传统的生产来源相比, 在廉价的基本培养基中通过光合自养方式获得大量的 α -生育酚, 不仅大大节省了成本和资源, 而且还提高了生产效率^[105]。Vismara 等对浮游生物 *Tetraselmis suecica*、杜氏盐藻 *Dunaliella salina* 和 *E. gracilis* 进行了比较研究后发现, 使用乙酸钠作为 *E. gracilis* 的碳源, *E. gracilis* 中的生育酚含量最高^[106]。*Euglena* 菌种可能是未来用于生育酚工业化生产的一个潜在来源, 其主要限制瓶颈是培养物容易受到快速生长的微生物的污染, 其主要原因还是 *E. gracilis* 本身的脆弱性以及环境的严苛性, 使得 *E. gracilis* 在生长、生产过程中易于受到污染。

总的来说, 相比于化学全合成, 直接通过生物技术获取维生素 E 的方式产量低、成本高, 并不适合进行规模化生产。化学全合成虽然是目前维生素 E 的主要生产方式, 但该技术仍然存在很多问题, 例如合成路径复杂、技术壁垒高、成本高, 其生产设备大部分为专用设备, 且安全风险较大等, 因此, 开发更安全、更低成本、更高效率的合成维生素 E 新技术, 成为改善维生素 E 现状亟待解决的高难度问题。合成生物学作为新兴学科领域, 其产业技术的发展为许多行业的发展搭建了快捷通道, 并且提供了多种可能性, 具备仅通过几个关键技术就能巧妙绕开充满壁垒的传统合成路线的能力, 同时也为维生素 E 产业的发展提供了新的契机。

2.4 维生素 K

维生素 K 是脂溶性维生素, 由于它具有促进血液凝结、预防骨质疏松等功能, 因此又称为凝血维生素^[107]。维生素 K 有两种类型: 维生素 K₁ (叶绿醌/叶绿基甲萘醌) 和维生素 K₂ (甲萘醌)。维生素 K₁ 是由苜蓿、菠菜和其他绿叶植物等植物合成的, 而维生素 K₂ 是由微生物合成的, 结构上由萘醌环和异戊二烯侧链组成。根据异戊二烯侧链的长度进行分类, 其中, MK-7 被认为是维生素 K₂ 最具生物活性的形式, 具有最高的活性和最稳定的血清水平。维生素 K₂ 的生物合成途径主要包括糖酵解 (EMP) 途径、磷酸戊糖 (PPP) 途径、2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸酯 (MEP) 途径、甲羟戊酸 (MVA) 途径 (图 4) 和甲萘醌合成 (MK) 途径^[108]。

纳豆细菌被美国食品药品监督管理局 (FDA) 认证为食品行业中的安全细菌, 纳豆激酶分子量小, 更容易被人体吸收。此外, 纳豆细菌比其他细菌具有更强的产 MK-7 的能力。据报道, 从日本传统食品纳豆中分离出的 *B. subtilis* 被用作亲本菌株, 甲萘醌耐受的 *B. subtilis* 突变菌株 K3-176 在优化发酵培养基条件和成分之后, MK-7 的产量大约为 35.0 mg/L。随后, 他们使用菌株 D200-41 进行研究, 发现静态培养与搅拌通气培养相比可以显著提高 MK-7 的产量, 原因是静态培养中的细胞孢子形成较慢。同样地, 优化培养基条件后, MK 的最大浓度达到约 60 mg/L。

Zhou 等认为在 *E. coli* 中过表达 *ispG* 基因, 可以减少细胞内甲基赤藓糖醇环二磷酸 (MECPP) 的外流, 从而增加异戊二烯量的积累^[109]。另外, Liu 等过表达 *nudF*、*ispG* 和 *dxs* 基因, 以优化大肠杆菌的天然 MEP 途径, 最终将异戊二烯产量增加 2.1 倍, 为了放大发酵, 在 5 L 的分批培养中, 共产生 69 mg/L 的异戊二烯^[110]。

Cui 等通过开发一个基于 Phr60-Rap60-Spo0A 的双功能 QS 系统动态平衡目标产物的合

成与细胞生长之间的关系,通过动态控制枯草芽孢杆菌中MK-7的合成使MK-7产量提高了40倍,在摇瓶中产量从9 mg/L提升至360 mg/L,在15 L生物反应器中可达到200 mg/L。在枯草芽孢杆菌的静态培养中,生物膜的形成有利于合成有价值的天然产物MK-7。通过比较转录学,发现生物膜的形成和电子传递是促进MK-7合成的重要因素。通过过表达信号转导蛋白TatAD-CD和甲基酚胞色素折叠酶QcrA-C,工程菌株经过发酵后,MK-7效价提高到410 mg/L,这也是目前报

道的最高产量^[111]。由于顺式MK-7没有活性,所以反式MK-7成为焦点^[15]。在当下的市场环境中,天然全反式MK-7的生产是双骏生物通过纳豆菌液态发酵的,它是欧盟新资源食品认证的唯一PCT专利菌种发酵生产工艺,该工艺投料安全、天然可控,辅以物理多级膜浓缩工艺,零残留,零污染,在市场上占主流地位^[8]。相比于化学合成的25%–95%反式MK-7,其产量更高,杂质更少。

以上汇总的微生物发酵法生产脂溶性维生素的实例如表2所示。

表2 代谢工程生产脂溶性维生素的研究

Table 2 Metabolic engineering of microorganisms for the production of lipid-soluble vitamins

Vitamin	Species	Method	Main culture substances	Yield	Reference
VA	<i>Y. lipolytica</i>	<i>carS</i> ^{OE} ; $\Delta ku70$ and <i>ku80</i>	YPD and SC-URA media	0.41 mg/g (DCW)	[112]
	<i>B. trispora</i>	<i>sod</i> ^{OE} and <i>cat</i> ^{OE}	MM; WCO; CSL; BHT	(2 021±75) mg/L	[87]
	<i>S. cerevisiae</i>	Sequential control strategy	SD-URA media	1 156 mg/L	[113]
VD	<i>S. cerevisiae</i>	The DO was kept at 12%(±1%) and pulse fed-batch was used	MM	1 160 mg/L ergosterol (VD ₂)	[92]
	<i>R. erythropolis</i>	<i>vdh_{T107A}</i> ^{OE}	MM	573 mg/L	[93]
VE	<i>E. gracilis</i>		KH medium; homogentisate and L-tyrosine	5.10 mg/L	[104]
	<i>Stichococcus bacillaris</i>		MeJa; Algal culture	0.60 mg/g (DCW)	[53]
	<i>Nannochloropsis oculata</i>		F/2 medium; ammonium chloride	(2 325.80±39) µg/g (DCW)	[31]
VK	<i>B. subtilis</i>	Resistanced to HNA, pFP, mFP and βTA	MM; biotin	1 719 µg/100g natto	[108]
	<i>B. subtilis</i>	BS20: <i>P_{veg}-kinA-ΔPAS-A; ΔkinB; Δspo II A; Δspo0 II E; menF^{OE}; menB^{OE}; menE^{OE}; entC^{OE}; ΔdhbB; P_{hbs}-tkl; ppsA^{OE}; ΔptsG; aroG^{OE}::lox72; aroK^{OE}; ispA^{OE}; hepS/T^{OE}; kdpG^{OE}; dxr^{OE}; dxs^{OE}; fni^{OE}; menA^{OE}; P_{hag}-Rap60; P_{native}-Phr60::hag; P_{abrb}-pyk::pyk; P_{abrb}-uppS::uppS; P_{spoiA}-ispH::spo II E; P_{spoiA}-hepS/T::spo II A</i>	LB	200 mg/L	[114]
	<i>B. subtilis</i>	BS20-tatAD-CD ^{OE} , <i>qcrA-C</i> ^{OE}	LB	410 mg/L	[111]

SC-URA media: synthetic defined medium with glucose as carbon source and uracil omitted; WCO: waste cooking oil. CSL: corn steep liquor. BHT: butylated hydroxytoluene; SD-URA media: synthetic dropout medium without uracil. KH medium: Koren and Hutner medium; MeJa: methyl jasmonate.

3 总结与展望

维生素以其自身特有的优势在医疗、食品、生产生活、畜牧等领域中发挥着不可或缺的作用。在生物合成过程中,生物合成方法不仅实现了环境友好型,而且还可以以低廉的成本达到较高的产出,同时还可以提高生产效率、省时省力。微生物合成生物技术在维生素领域具有极大的开发和应用价值。在生物医药与新能源的开发上也实质性地推动了学科的发展。采用合成生物改造技术对底盘生产菌株进行改造与调整,平衡细胞自身生长与代谢,这对于菌体而言,减轻负担的同时,又使得目标产物获得更高的产出,从而达到“共赢”。

到目前为止,维生素 B₂ 的生物合成技术已经成熟并应用于工业化生产,其他 B 族维生素的代谢工程手段还需要不断地改进和探索,使筛选出的优良菌株更好地应用于工业化生产^[8]。维生素 B₂ 未来研究方向可采用耐高温酵母来生产,其优点在于避免发生 DNA 漂移。对于维生素 C 来说,目前工业生产规模大、产量高,生产方式以发酵为主,采用伴生活性制剂替代伴生菌,解除伴生依赖性,实现了单菌发酵^[66]。但目前的市場情况表明维生素 C 产能过剩、下游加工复杂,而市場需求主要集中在医药、食品领域,这也是未来上涨势头可能缓慢的原因^[8]。维生素 C 发酵技术在未来可根据多种伴生菌伴生机理,发掘出不同伴生菌的伴生活性物质,建立其合成代谢数据库,或采用稳定的同位素技术对暗物质进行标记和示踪;设计 2-KGA 合成的异源组装模块;研究其在微生物底盘细胞中的适配机制,从而实现更高的产品效价。

维生素 A 生产主要是针对 β -胡萝卜素的生物合成,部分细胞对维生素的需求意味着自身的生物合成还不能达到完全高产的状态,然而通过经典合理的微生物代谢工程,已经可以成功建立规模化的生产工艺,但中间体行业壁垒较高,外加复杂的合成与代谢过程^[8],这就使得未来的研究会面对更艰难的挑战。维生素 D 在国内的工业生

产已趋于稳定,主要是通过化学合成有活性的 25-羟基维生素 D₃ 和 1 α ,25-二羟基维生素 D₃,但存在一个最大的工艺瓶颈就是对原料的需求,原料要求必须是纯度大于 95% (NF 级别) 的胆固醇^[8]。所以开发出更多的生产菌,优化其代谢通路并使之高产才是解决原料问题的一大关键。维生素 E 生产工艺的不断优化和技术的进步,不仅降低了行业的整体成本,还促进了行业的发展。但不幸的是,尽管研究表明光合微生物有相当大的潜力生产生育酚,但这种方法成本高昂、难以商业化,再考虑到 *E. gracilis* 的脆弱性和培养环境的条件,光生物反应器的构建最有可能是生育酚未来生产的可行性研究方向,而且可操控的温敏调控系统也可能是生产维生素 E 的一种关键调控技术。在过去的几十年里,纳豆细菌一直是生产维生素 K 最有前景的细菌之一。许多研究者通过优化发酵类型、培养基方案和培养条件的设计,以及结合基因工程和其他代谢手段来增加维生素 K 的产量^[15],但还是很难达到较高产出,意味着未来仍需要科研学者不断努力、攻克难题。

然而,无论是哪一种目标产物,如果企业想要获得更高的产出,就需要进一步改进技术。通过 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术、碱基编辑技术去设计高产菌株;通过高通量筛选育种、生物反应器、自动化基因组装等技术,构建高产目标产物的菌种。合成生物学技术是以理性设计为指导,通过生物元件的挖掘与设计、元件和模块的组装与集成、系统的优化与适配^[115],最终获得性能优良的高产菌株,刚好解决了这个问题。这些新一代技术将成为未来研究的一个新的出发点和落脚点。此外,未来在合成生物技术领域也会有很多的挑战,例如,生物体系的柔性与工程体系的刚性之间的契合问题、生物体系的计算机模拟和预测水平、生物体系再造普适性、科技伦理等,都需要广大科研人员的艰辛探索。我们要改进现有的技术,并结合新的技术策略,充分利用其技术优势、取长补短,从而推动科技的进步。

REFERENCES

- [1] 路则宝. 维生素研究进展. 饮食保健, 2017, 4(14): 346.
- [2] 杨琛, 姜卫红, 杨晟, 等. 合成生物学与工业生物技术. 中国基础科学, 2009, 11(5): 38-39, 37.
Yang C, Jiang WH, Yang S, et al. Synthetic biology for industrial biotechnology. Chin Basic Sci, 2009, 11(5): 38-39, 37 (in Chinese).
- [3] 贾晓鹏, 高弘, 卓英, 等. 调控元件与底盘适配性的研发. 生物产业技术, 2013, (4): 24-29.
- [4] 李雷, 姜卫红, 覃重军, 等. 合成生物学使能技术的研究进展. 中国科学: 生命科学, 2015, 45(10): 950-968.
Li L, Jiang WH, Qin CJ, et al. Recent advances in the enabling technologies for synthetic biology. Sci Sin Vitae, 2015, 45(10): 950-968 (in Chinese).
- [5] 曾艳, 赵心刚, 周桔. 合成生物学工业应用的现状和展望. 中国科学院院刊, 2018, 33(11): 1211-1217.
Zeng Y, Zhao XG, Zhou J. Current situations and perspectives of industrial applications of synthetic biology. Chin Bull Acad Sci, 2018, 33(11): 1211-1217 (in Chinese).
- [6] 廖冰君, 左程丽. B 族维生素检测方法及其使用. 食品安全导刊, 2009, (8): 40-41.
Liao BJ, Zuo CL. Detection methods and application of vitamin B. China Food Saf, 2009, (8): 40-41 (in Chinese).
- [7] 皓月. 运动与维生素(下). 健康, 2015, (6): 64-67.
- [8] 张莲玮. 维生素行业深度报告: 13 个主要维生素品种生产工艺与市场格局解析[EB/OL]. (2020-04-25) [2020-10-16]. http://stock.finance.sina.com.cn/stock/go.php/vReport_Show/kind/lastest/rptid/641126651806/index.phtml.
- [9] 周会会, 赵楠. 秉一流技术, 觅多「维」天地——专访上海海嘉诺医药发展股份有限公司董事长张华先生. 中国畜牧杂志, 2018, 54(11): 157-162.
- [10] Packer MS, Liu DR. Methods for the directed evolution of proteins. Nat Rev Genet, 2015, 16(7): 379-94.
- [11] 罗自萍, 谭世语, 陈红梅, 等. 一种化学合成维生素 K₂ 的方法: CN, 201110277592.8. 2012-02-15.
- [12] 虞龙. 离子束生物工程在 V₆ 高产菌株选育中的应用研究[D]. 合肥: 中国科学院等离子体物理研究所, 1999.
- [13] 朱沁芳. 不同紫外线强度下健康成人维生素 D 与区域骨密度的关系. 中国现代医学杂志, 2019, 29(10): 53-57.
Zhu QF. Relationship between vitamin D and regional bone mineral density under different ultraviolet intensity. Chin J Mod Med, 2019, 29(10): 53-57 (in Chinese).
- [14] Song JY, Liu HX, Wang L, et al. Enhanced production of vitamin K₂ from *Bacillus subtilis* (natto) by mutation and optimization of the fermentation medium. Braz Arch Biol Technol, 2014, 57(4): 606-612.
- [15] Szterk A, Zmysłowski A, Bus K. Identification of *cis/trans* isomers of menaquinone-7 in food as exemplified by dietary supplements. Food Chem, 2018, 243: 403-409.
- [16] 张志刚. 不同顺反异构体比例的维生素 K₁ 的合成. 中国医药工业杂志, 2016, 47(2): 147-148.
Zhang ZG. Synthesis of vitamin K₁ with different ratio of *cis/trans* isomers. Chin J Pha Ind, 2016, 47(2): 147-148 (in Chinese).
- [17] 口角炎. 维生素 B 族的作用. 中国饲料添加剂, 2007, (9): 47.
- [18] Cardinale S, Tueros FG, Sommer MOA. Genetic-metabolic coupling for targeted metabolic engineering. Cell Rep, 2017, 20(5): 1029-1037.
- [19] Fischer M, Bacher A. Biosynthesis of flavocoenzymes. Nat Prod Rep, 2005, 22(3): 324-350.
- [20] EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP), Rychen G, Aquilina G, et al. Safety of vitamin B₂ (80%) as riboflavin produced by *Bacillus subtilis* KCCM-10445 for all animal species. EFSA J, 2018, 16(3): e5223.
- [21] 陈涛, 武秋立, 李晓静, 等. 不同流加发酵方式对重组枯草芽孢杆菌生产维生素 B₂ 的影响. 天津大学学报, 2006, 39(S1): 7-12.

- Chen T, Wu QL, Li XJ, et al. Effects of different fed-batch processes on vitamin B₂ production in recombinant *Bacillus subtilis*. J Tianjin Univ, 2006, 39(S1): 7-12 (in Chinese).
- [22] Shi ZM, Zhen SQ, Wittert GA, et al. Inadequate riboflavin intake and anemia risk in a Chinese population: five-year follow up of the Jiangsu Nutrition Study. PLoS ONE, 2014, 9(2): e88862.
- [23] 李晓静, 段云霞. 代谢工程在核黄素生产上的应用. 中国生物工程杂志, 2011, 31(2): 130-138.
Li XJ, Duan YX. Application of metabolic engineering in riboflavin production. Chin Biotechnol, 2011, 31(2): 130-138 (in Chinese).
- [24] Tatsuo H, Keiko I, Masaak T. Recombinant microorganism for the production of vitamin B₆: EP 1543139, 2007-06-13.
- [25] Dmytruk KV, Yatsyshyn VY, Sybirna NO, et al. Metabolic engineering and classic selection of the yeast *Candida famata* (*Candida flareri*) for construction of strains with enhanced riboflavin production. Metab Eng, 2011, 13(1): 82-88.
- [26] Chand T, Savitri B. Vitamin B₃, Niacin//Vandamme EJ, Revuelta JL, Eds. Industrial biotechnology of vitamins, biopigments, and antioxidants. Weinheim: John Wiley & Sons, Ltd, 2016: 5-22.
- [27] Verdin E. NAD⁺ in aging, metabolism, and neurodegeneration. Science, 2015, 350(6265): 1208-1213.
- [28] Belenky P, Stebbins R, Bogan KL, et al. Nrt1 and Tna1-independent export of NAD⁺ precursor vitamins promotes NAD⁺ homeostasis and allows engineering of vitamin production. PLoS ONE, 2011, 6(5): e19710.
- [29] Leonardi R, Jackowski S. Biosynthesis of pantothenic acid and coenzyme A. Ecosal Plus, 2007, 2(2).
- [30] 孙志浩. 泛酸系列产品生产、应用现状及展望. 化工科技, 2004, 12(5): 43-47.
Sun ZH. Production and application of pantothenic acid and its derivative. Sci Technol Chem Ind, 2004, 12(5): 43-47 (in Chinese).
- [31] Durmaz Y. Vitamin E (α -tocopherol) production by the marine microalgae *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) in nitrogen limitation. Aquaculture, 2007, 272(1/4): 717-722.
- [32] Hüser AT, Chassagnole C, Lindley ND, et al. Rational design of a *Corynebacterium glutamicum* pantothenate production strain and its characterization by metabolic flux analysis and genome-wide transcriptional profiling. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(6): 3255-3268.
- [33] 蔡真, 张君丽, 奇古, 等. 一种制备高效合成泛酸基因工程菌的方法及其应用: CN, 201710038544.0. 2017-01-19.
Cai Z, Zhang JL, Qi G, et al. Method for preparing genetically engineered bacteria for efficiently compounding pantothenic acid and application thereof: CN, 201710038544.0. 2017-01-19 (in Chinese).
- [34] 汪钊, 黄美娟, 高亮, 等. 化学酶法合成 D-泛解酸内酯的研究进展. 发酵科技通讯, 2016, 45(4): 193-198.
Wang Z, Huang MJ, Gao L, et al. Research progress of chemo-enzymatic synthesis of D-pantolactone. Bull Ferment Sci Technol, 2016, 45(4): 193-198 (in Chinese).
- [35] Kataoka M, Shimizu K, Sakamoto K, et al. Lactonohydrolase-catalyzed optical resolution of pantoyl lactone: selection of a potent enzyme producer and optimization of culture and reaction conditions for practical resolution. Appl Microbiol Biotechnol, 1995, 44(3): 333-338.
- [36] T·赫尔曼, T·A·帕特森, J·G·佩罗, 等. 制备 3-(2-羟基-3-甲基-丁酰氨基)-丙酸(hmbpa)的方法和微生物: EP, 1543104. 2003-09-16.
- [37] Eliot AC, Kirsch JF. Pyridoxal phosphate enzymes: mechanistic, structural, and evolutionary considerations. Annu Rev Biochem, 2004, 73: 383-415.
- [38] Tanaka T, Tateno Y, Gojobori T. Evolution of vitamin B₆ (pyridoxine) metabolism by gain and loss of genes. Mol Biol Evol, 2005, 22(2): 243-250.
- [39] Hoshino T, Ichikawa K, Nagahashi Y. Microorganism and process for preparing vitamin B₆: EP, 20030748039. 2007-04-18.

- [40] Hoshino T, Ichikawa K, Tazoe M. DNA encoding flavin-adenine-dinucleotide-dependent-D-erythronate-4-phosphate-dehydrogenase, *pdxr*, and microbial production of vitamin B₆? EP, 20030750631, 2003-09-25.
- [41] Rosenberg J, Ischebeck T, Commichau FM. Vitamin B₆ metabolism in microbes and approaches for fermentative production. *Biotechnol Adv*, 2017, 35(1): 31-34.
- [42] Belitsky BR. Physical and enzymological interaction of *Bacillus subtilis* proteins required for *de novo* pyridoxal 5'-phosphate biosynthesis. *J Bacteriol*, 2004, 186(4): 1191-1196.
- [43] Streit WR, Entcheva P. Biotin in microbes, the genes involved in its biosynthesis, its biochemical role and perspectives for biotechnological production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, 61(1): 21-31.
- [44] Bower SG, Perkins JB, Yocum RR, et al. Biotin biosynthesis in *Bacillus subtilis*: US, 6841366. 2005-01-11.
- [45] Clack BA, Youngblood AB. Nucleic acid for biotin production: US, 7423136B2. 2005-10-19.
- [46] Lin S, Hanson RE, Cronan JE. Biotin synthesis begins by hijacking the fatty acid synthetic pathway. *Nat Chem Biol*, 2010, 6(9): 682-688.
- [47] Van Arsdell SW, Perkins JB, Yocum RR, et al. Removing a bottleneck in the *Bacillus subtilis* biotin pathway: *bioA* utilizes lysine rather than *S*-adenosylmethionine as the amino donor in the KAPA-to-DAPA reaction. *Biotechnol Bioeng*, 2005, 91(1): 75-83.
- [48] Lucock M. Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Mol Genet Metab*, 2000, 71(1/2): 121-138.
- [49] Jägerstad MI, Jastrebova J. Occurrence, stability, and determination of formyl folates in foods. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(41): 9758-9768.
- [50] Serrano-Amatriain C, Ledesma-Amaro R, López-Nicolás R, et al. Folic acid production by engineered *Ashbya gossypii*. *Metab Eng*, 2016, 38: 473-482.
- [51] Fang H, Kang J, Zhang DW. Microbial production of vitamin B₁₂: a review and future perspectives. *Microb Cell Fact*, 2017, 16: 15.
- [52] 徐琼, 王志伟, 刘洋, 等. 维生素 B₁₂ 生物合成及检测技术研究进展. *食品工业*, 2019, 40(2): 271-276. Xu Q, Wang ZW, Liu Y, et al. Advances in biosynthesis and detection of vitamin B₁₂. *Food Ind*, 2019, 40(2): 271-276 (in Chinese).
- [53] Sivakumar G, Jeong K, Lay J O Jr. Biomass and *RRR-α*-tocopherol production in *Stichococcus bacillaris* strain siva2011 in a balloon bioreactor. *Microb Cell Fact*, 2014, 13: 79.
- [54] Nahvi A, Barrick JE, Breaker RR. Coenzyme B₁₂ riboswitches are widespread genetic control elements in prokaryotes. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(1): 143-150.
- [55] Cai YY, Xia MM, Dong HN, et al. Engineering a vitamin B₁₂ high-throughput screening system by riboswitch sensor in *Sinorhizobium meliloti*. *BMC Biotechnol*, 2018, 18: 27.
- [56] Blanche F, Cameron B, Crouzet J, et al. Vitamin B₁₂: how the problem of its biosynthesis was solved. *Angew Chem Int Ed*, 1995, 34(4): 383-411.
- [57] Blanche F, Cameron B, Crouzet J, et al. Vitamin B₁₂: wie das problem seiner biosynthese gelöst wurde. *Angew Chem*, 1995, 107(4): 421-452.
- [58] Blanche F, Cameron B, Crouzet J, et al. Polypeptides involved in the biosynthesis of cobalamines and/or cobamides, DNA sequences coding for these polypeptides, and their preparation and use: EP, 0516647. 1991-01-30.
- [59] Sych JM, Lacroix C, Stevens MJA. Vitamin B₁₂—physiology, production and application//Vandamme JM, Revuelta JL, Eds. *Industrial biotechnology of vitamins, biopigments, and antioxidants*. Weinheim: Wiley-VCH, 2016: 129-160.
- [60] Timoshnikov VA, Kobzeva TV, Polyakov NE, et al. Redox interactions of vitamin C and iron: inhibition of the pro-oxidant activity by deferiprone. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(11): 3967.
- [61] Hancock RD, Viola R. The use of micro-organisms for L-ascorbic acid production: current status and future perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*,

- 2001, 56(5/6): 567-576.
- [62] Hancock RD, Viola R. Biotechnological approaches for L-ascorbic acid production. *Trends Biotechnol*, 2002, 20(7): 299-305.
- [63] Bremus C, Herrmann U, Bringer-Meyer S, et al. The use of microorganisms in L-ascorbic acid production. *J Biotechnol*, 2006, 124(1): 196-205.
- [64] Pan CH, Wang EX, Jia N, et al. Reconstruction of amino acid biosynthetic pathways increases the productivity of 2-keto-L-gulonic acid in *Ketogulonicigenium vulgare*-*Bacillus endophyticus* consortium via genes screening. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2017, 44(7): 1031-1040.
- [65] Yin GL, Lin WC, Qiao CH, et al. Production of vitamin C precursor-2-keto-L-gulonic acid from D-sorbitol by mixed culture of microorganisms. *Acta Microbiol Sin*, 2001, 41(6): 709-715.
- [66] 满都拉, 杨伟超, 徐慧, 等. 维生素 C 二步发酵中伴生菌促进产酸菌产酸机制的研究//中国微生物学会学术年会论文集. 昆明: 中国微生物学会, 2013.
- [67] Sugisawa T, Miyazaki T, Hoshino T. Microbial production of L-ascorbic acid from D-sorbitol, L-sorbose, L-gulose, and L-sorbosone by *Ketogulonicigenium vulgare* DSM 4025. *Biosci Biotech Bioch*, 2005, 69(3): 659-662.
- [68] Kim ST, Huh WK, Kim JY, et al. D-arabinose dehydrogenase and biosynthesis of erythroascorbic acid in *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Prot Struct Mol Enzymol*, 1996, 1297(1): 1-8.
- [69] Kim ST, Huh WK, Lee BH, et al. D-arabinose dehydrogenase and its gene from *Saccharomyces cerevisia*. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Prot Struct Mol Enzymol*, 1998, 1429(1): 29-39.
- [70] Sauer M, Branduardi P, Valli M, et al. Production of L-ascorbic acid by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii*. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(10): 6086-6091.
- [71] 高媛, 曾伟主, 周景文, 等. 普通生酮基古龙酸菌中山梨糖脱氢酶和山梨酮脱氢酶的纯化及酶学性质分析. *微生物学报*, 2017, 57(10): 1546-1554.
- Gao Y, Zeng WZ, Zhou JW, et al. Purification and characterization of L-sorbose dehydrogenase and L-sorbosone dehydrogenase from *Ketogulonicigenium vulgare* WSH-001. *Acta Microbiol Sin*, 2017, 57(10): 1546-1554 (in Chinese).
- [72] 王盼盼. 2-酮基-L-古龙酸合成相关脱氢酶的酶学性质及催化研究[D]. 无锡: 江南大学, 2019.
- Wang PP. The study of characterization of dehydrogenases and their catalysis capability for 2-KLG synthesis[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2019 (in Chinese).
- [73] Schyns G, Potot S, Geng Y, et al. Isolation and characterization of new thiamine-deregulated mutants of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 2005, 187(23): 8127-8136.
- [74] Tokui M, Kubodera T, Gomi K, et al. Construction of a thiamine pyrophosphate high-producing strain of *Aspergillus oryzae* by overexpression of three genes involved in thiamine biosynthesis. *J Biosci Bioeng*, 2011, 111(4): 388-390.
- [75] Kalingan AE, Krishnan MRV. Application of agro-industrial by-products for riboflavin production by *Eremothecium ashbyii* NRRL 1363. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, 47(3): 226-230.
- [76] Sugimoto T, Kanamasa S, Kato T, et al. Importance of malate synthase in the glyoxylate cycle of *Ashbya gossypii* for the efficient production of riboflavin. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 83(3): 529-539.
- [77] Hohmann HP, Van Dijnl JM, Krishnappa L, et al. Host organisms: *Bacillus subtilis*//Wittmann C, Liao JC, Eds. *Industrial Biotechnology: Microorganisms*. New York: John Wiley & Sons, Ltd, 2016, 7: 221-297.
- [78] Commichau FM, Alzinger A, Sande R, et al. Engineering *Bacillus subtilis* for the conversion of the antimetabolite 4-hydroxy-L-threonine to pyridoxine. *Metab Eng*, 2015, 29: 196-207.
- [79] Ifuku O, Koga N, Haze SI, et al. Molecular analysis of growth inhibition caused by overexpression of the biotin operon in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1995, 59(2): 184-189.
- [80] Li KT, Liu DH, Chu J, et al. An effective and simplified pH-stat control strategy for the industrial fermentation of vitamin B₁₂ by *Pseudomonas*

- denitrificans*. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2008, 31(6): 605-610.
- [81] Zeng WZ, Wang PP, Li N, et al. Production of 2-keto-L-gulonic acid by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Bioresour Technol*, 2020, 318: 124069.
- [82] 曹丽波. 维生素的概述及分类. *现代畜牧科技*, 2014(2): 57.
- [83] 汪之项, 荫士安. β -胡萝卜素转化为维生素 A 的机制、调节和生物学意义. *国外医学(卫生学分册)*, 2003, 30(5): 283-287.
- [84] 金龙飞, 柳凌艳. 天然 β -胡萝卜素的制备及应用. *山西食品工业*, 2002(2): 6-9.
- [85] Li YF, Lin ZQ, Huang C, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* using CRISPR-Cas9 mediated genome editing. *Metab Eng*, 2015, 31: 13-21.
- [86] Roukas T. The role of oxidative stress on carotene production by *Blakeslea trispora* in submerged fermentation. *Crit Rev Biotechnol*, 2016, 36(3): 424-433.
- [87] Nanou K, Roukas T. Waste cooking oil: a new substrate for carotene production by *Blakeslea trispora* in submerged fermentation. *Bioresour Technol*, 2016, 203: 198-203.
- [88] Larroude M, Celinska E, Back A, et al. A synthetic biology approach to transform *Yarrowia lipolytica* into a competitive biotechnological producer of β -carotene. *Biotechnol Bioeng*, 2018, 115(2): 464-472.
- [89] Yan GL, Wen KR, Duan CQ. Enhancement of β -carotene production by over-expression of HMG-CoA reductase coupled with addition of ergosterol biosynthesis inhibitors in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Microbiol*, 2012, 64(2): 159-163.
- [90] 张照明. 青霉废菌丝体的综合利用. *现代化工*, 2002, 22(S1): 168-169.
Zhang ZM. Comprehensive utilization of waste mycelium of *Penicillium chrysogenum*. *Mod Chem Ind*, 2002, 22(S1): 168-169 (in Chinese).
- [91] 许向前, 洪文荣, 陈代杰. 黑麦麦角菌产生麦角甾醇的研究. *中国抗生素杂志*, 2006, 31(6): 379-381.
- Xu XQ, Hong WR, Chen DJ. Studies on ergosterol production by *Claviceps purpurea*. *Chin J Antibiot*, 2006, 31(6): 379-381 (in Chinese).
- [92] Tan TW, Zhang M, Gao H. Ergosterol production by fed-batch fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb Technol*, 2003, 33(4): 366-370.
- [93] Yasutake Y, Nishioka T, Imoto N, et al. A single mutation at the ferredoxin binding site of P450 vdh enables efficient biocatalytic production of 25-hydroxyvitamin D₃. *ChemBioChem*, 2013, 14(17): 2284-2291.
- [94] Sasaki J, Mikami A, Mizoue K, et al. Transformation of 25- and 1 α -hydroxyvitamin D₃ to 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ by using *Streptomyces* sp. strains. *Appl Environ Microbiol*, 1991, 57(10): 2841-2846.
- [95] Kaiser S, Di Mascio P, Murphy ME, et al. Physical and chemical scavenging of singlet molecular oxygen by tocopherols. *Arch Biochem Biophys*, 1990, 277(1): 101-108.
- [96] 马田, 邓子新, 刘天罡. 维生素 E 的“前世”和“今生”. *合成生物学*, 2020, 1(2): 174-186.
Ma T, Deng ZX, Liu TG. The past and present of vitamin E. *J Synth Biol*, 2020, 1(2): 174-186 (in Chinese).
- [97] 刘天罡, 朱发银, 邓子新. 一种生产法尼烯的菌株及其应用: CN, 201310209421.0. 2013-08-14.
Liu TG, Zhu FY, Deng ZX. Bacterial strain for producing farnesene and application of bacterial strain: CN, 201310209421.0. 2013-08-14.
- [98] Albermann C, Ghanegaonkar S, Lemuth K, et al. Biosynthesis of the vitamin E compound δ -tocotrienol in recombinant *Escherichia coli* cells. *ChemBioChem*, 2008, 9(15): 2524-2533.
- [99] Shen B, Zhou PP, Jiao X, et al. Fermentative production of Vitamin E tocotrienols in *Saccharomyces cerevisiae* under cold-shock-triggered temperature control. *Nat Commun*, 2020, 11: 5155.
- [100] Taketomi H, Shoda K, Katsui G. Results of screening test in tocopherols in microbial realm. *Vitamins (Japan)*, 1983, 57: 133-138.
- [101] Rodríguez-Zavala JS, Ortiz-Cruz MA,

- Mendoza-Hernández G, et al. Increased synthesis of α -tocopherol, paramylon and tyrosine by *Euglena gracilis* under conditions of high biomass production. *J Appl Microbiol*, 2010, 109(6): 2160-2172.
- [102] Ogbonna J, Ichige E, Tanaka H. Interactions between photoautotrophic and heterotrophic metabolism in photoheterotrophic cultures of *Euglena gracilis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 58(4): 532-538.
- [103] Price CA. The Biology of *Euglena*. Vol. 4, subcellular biochemistry and molecular biology. Dennis E. Buetow, Ed. Academic Press, San Diego, CA, 1989. xvi, 528 pp., illus. \$150. Science, 1990, 247(4944): 866-867.
- [104] Tani Y, Tsumura H. Screening for tocopherol-producing microorganisms and α -tocopherol production by *Euglena gracilis* Z. *Agric Biol Chem*, 1989, 53(2): 305-312.
- [105] Grimm P, Risse JM, Cholewa D, et al. Applicability of *Euglena gracilis* for biorefineries demonstrated by the production of α -tocopherol and paramylon followed by anaerobic digestion. *J Biotechnol*, 2015, 215: 72-79.
- [106] Vismara R, Vestri S, Kusmic C, et al. Natural vitamin E enrichment of *Artemia salina* fed freshwater and marine microalgae. *J Appl Psychol*, 2003, 15(1): 75-80.
- [107] Dam H. Cliv. The antihemorrhagic vitamin of the chick. *Nutr Rev*, 1973, 31(4): 1271.
- [108] Tsukamoto Y, Kasai M, Kakuda H. Construction of a *Bacillus subtilis* (natto) with high productivity of vitamin K₂ (menaquinone-7) by analog resistance. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2001, 65(9): 2007-2015.
- [109] Zhou K, Zou RY, Stephanopoulos G, et al. Metabolite profiling identified methylerythritol cyclodiphosphate efflux as a limiting step in microbial isoprenoid production. *PLoS ONE*, 2012, 7(11): e47513.
- [110] Liu HW, Wang Y, Tang Q, et al. MEP pathway-mediated isopentenol production in metabolically engineered *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*, 2014, 13: 135.
- [111] Cui SX, Xia HZ, Chen TC, et al. Cell membrane and electron transfer engineering for improved synthesis of menaquinone-7 in *Bacillus subtilis*. *iScience*, 2020, 23(3): 100918.
- [112] Gao SL, Tong YY, Zhu L, et al. Production of β -carotene by expressing a heterologous multifunctional carotene synthase in *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Lett*, 2017, 39(6): 921-927.
- [113] Xie WP, Ye LD, Lv XM, et al. Sequential control of biosynthetic pathways for balanced utilization of metabolic intermediates in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng*, 2015, 28: 8-18.
- [114] Cui SX, Lv XQ, Wu YK, et al. Engineering a bifunctional Phr60-Rap60-Spo0A quorum-sensing molecular switch for dynamic fine-tuning of menaquinone-7 synthesis in *Bacillus subtilis*. *ACS Synth Biol*, 2019 8(8): 1826-1837.
- [115] 王俊姝, 祁庆生. 合成生物学与代谢工程. *生物工程学报*, 2009, 25(9): 1296-1302.
Wang JS, Qi QS. Synthetic biology for metabolic engineering—a review. *Chin J Biotech*, 2009, 25(9): 1296-1302 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)