

· 功能食品配料生物合成 ·

柳志强 浙江工业大学生物工程学院教授、博士生导师，“生物催化与微生物发酵”全国高校黄大年式教师团队主要成员。长期从事生物制造领域基础研究和产业应用，在 *Journal of the American Chemical Society*、*Angewandte Chemie International Edition*、*ACS Synthetic Biology* 等期刊发表论文 200 余篇，授权中国发明专利 70 余项。入选浙江省“万人计划”科技创新领军人才、浙江省 151 人才工程第一层次、江苏省双创领军人才、浙江省“钱江人才”等计划。主持或参与了多种医药健康化学品的技术创新和产业集聚，实现了研究成果的产业化应用，建成了 10 余条工业化生产线，近三年新增销售 150 亿元以上。研究成果荣获中国专利优秀奖 1 项、省部级科学技术奖一等奖 6 项、浙江省专利金奖 1 项，2 项技术成果入选“科创中国”先导技术榜。



水溶性维生素的生物合成

张博^{1,2}, 廖宇哲^{1,2}, 余浩楠^{1,2}, 王广豪^{1,2}, 柳志强^{1,2*}, 郑裕国^{1,2}

1 浙江工业大学 手性生物制造国家地方联合工程研究中心, 浙江 杭州 310014

2 浙江工业大学 生物工程学院 浙江省生物有机合成技术研究重点实验室, 浙江 杭州 310014

张博, 廖宇哲, 余浩楠, 王广豪, 柳志强, 郑裕国. 水溶性维生素的生物合成[J]. 生物工程学报, 2024, 40(8): 2528-2551.

ZHANG Bo, LIAO Yuzhe, YU Haonan, WANG Guanghao, LIU Zhiqiang, ZHENG Yuguo. Biosynthesis of water-soluble vitamins[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(8): 2528-2551.

摘要: 维生素是维持生物体正常生理功能所必需的一类有机物质, 大部分维生素无法由人体合成, 少部分维生素只能有限地合成, 无法满足自身需求, 因而需要通过摄入含维生素的食物或药品来满足自身需要。近年来, 维生素被广泛应用于医药、食品或饲料添加剂、化妆品等行业中, 人们对维生素的需求也不断增加。维生素的合成方法可分为化学合成法与生物合成法两大类, 相较于化学法, 生物法合成维生素具有环境友好、安全性高、成本低廉等优势, 因此研究生物合成维生素的方法具有一定应用价值。本文综述了近年来水溶性维生素生产领域中生物合成法的研究进展, 总结了水溶性维生素(B 族维生素、维生素 C)生物合成的研究成果, 并对生物合成水溶性维生素的发展进行了展望。

关键词: 水溶性维生素; 生物合成; 合成生物学; 代谢工程; 新质生产力

资助项目: 国家重点研发计划(2018YFA0901400); 国家自然科学基金(32070099, 31971342)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFA0901400) and the National Natural Science Foundation of China (32070099, 31971342).

*Corresponding author. E-mail: microlu@zjut.edu.cn

Received: 2024-02-28; Accepted: 2024-06-24; Published online: 2024-06-27

Biosynthesis of water-soluble vitamins

ZHANG Bo^{1,2}, LIAO Yuzhe^{1,2}, YU Haonan^{1,2}, WANG Guanghao^{1,2}, LIU Zhiqiang^{1,2*}, ZHENG Yuguo^{1,2}

1 The National and Local Joint Engineering Research Center for Biomanufacturing of Chiral Chemicals, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China

2 Key Laboratory of Bioorganic Synthesis of Zhejiang Province, College of Biotechnology and Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China

Abstract: Vitamins are a class of organic substances essential for maintaining the normal physiological function of organisms. Most vitamins cannot be synthesized by the human body, and a small number of vitamins can only be synthesized in a limited manner, which cannot meet the body needs. Therefore, people need to take food or drugs containing vitamins to meet the body needs. Nowadays, vitamins are widely used in medicine, food or feed additives, cosmetics and other industries, and the demand for vitamins is growing. Vitamins are mainly produced by chemical synthesis and biosynthesis. Compared with chemical synthesis, biosynthesis of vitamins is praised for the environmental friendliness, high safety, and low costs. Therefore, it is of great practical significance to study the biosynthesis methods of vitamins. This paper reviews the research progress in the methods and summarizes the research results in the biosynthesis of water-soluble vitamins (B vitamins and vitamin C) in recent years and then makes an outlook on the future development in this field.

Keywords: water-soluble vitamins; biosynthesis; synthetic biology; metabolic engineering; new quality productive forces

维生素是生物体维持正常生理功能所必需的一类微量有机物质,按其溶解性可分为水溶性维生素和脂溶性维生素两大类^[1]。水溶性维生素主要由B族维生素与维生素C组成,其易溶于水而不溶于有机溶剂,因而人体吸收后在体内储存少、易排出。由于其难以在体内储存,因此需要经常补充,摄入需求较大。近年来,随着水溶性维生素在食品、医疗等领域的应用不断扩大,其市场需求也不断提高。据统计,维生素B族与维生素C分别占据了全球维生素市场33%和21%的份额,现如今我国已成为水溶性维生素的生产大国,产量位居全球第一^[2]。因此,改进维生素生产工艺具有重要的意义。

水溶性维生素的生产历史悠久。天然水溶

性维生素受原料和提取技术的限制,产量低、价格高,因此人工合成居主导地位,占总产量的80%左右^[2]。水溶性维生素的人工合成方法可分为化学合成法与生物合成法。化学合成法现已广泛应用于多种维生素的生产,如通过直线法合成维生素B₁^[3]、氨氧化法生产维生素B₃^[4]等。同时,生物合成法(图1)以其安全高效、绿色环保的特点成为了当下的研究热点。早期对水溶性维生素生物合成的研究主要集中在对维生素的天然生产菌进行理化诱变以筛选获得产量更高的菌株,但这种方法具有较大的不确定性,耗费的时间长且需要进行大量的筛选工作。同时诱变法很难实现有利突变的叠加,无法充分发挥菌体的维生素生产潜力。

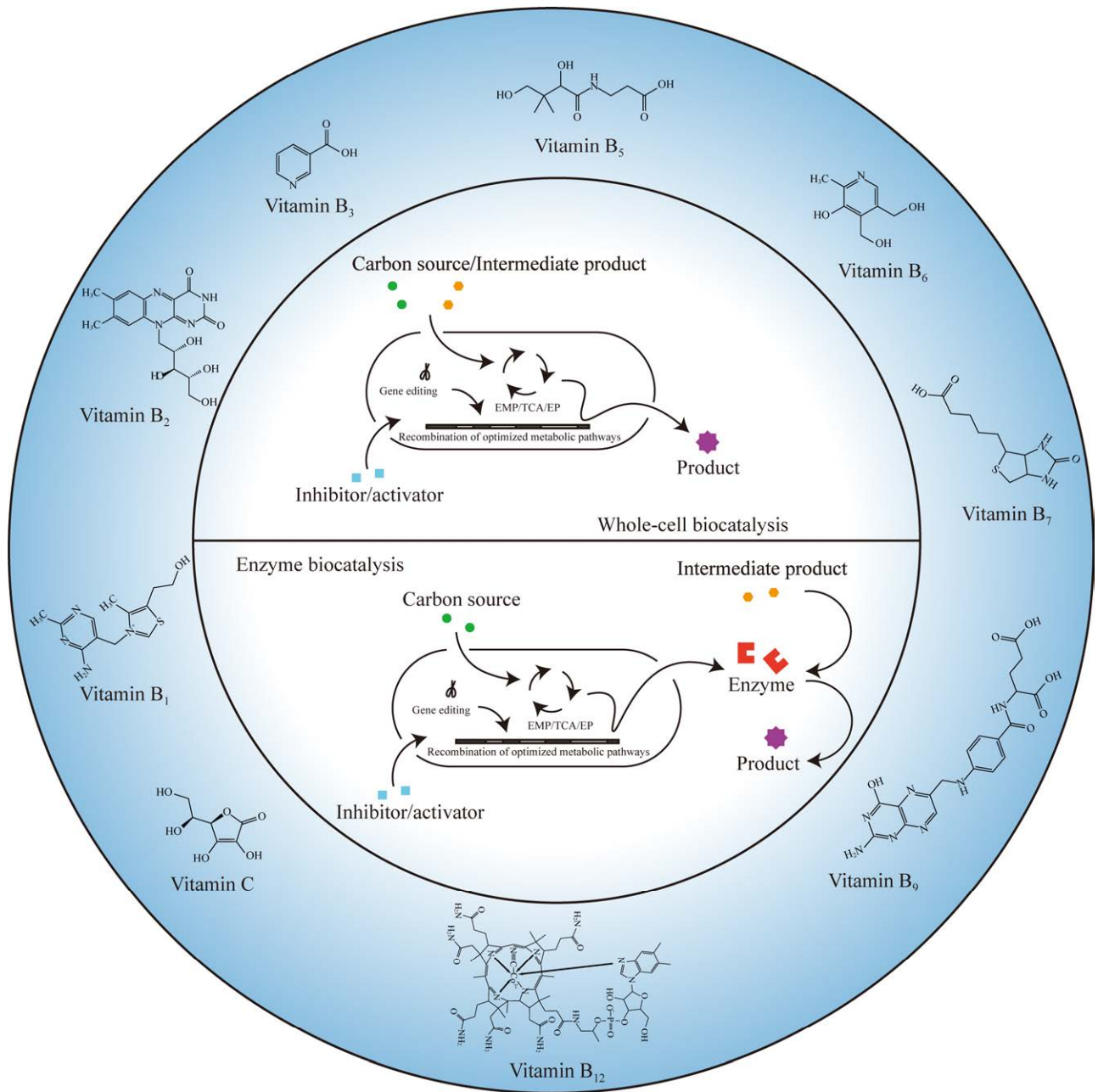


图1 水溶性维生素与生物合成技术

Figure 1 Water-soluble vitamins and biosynthesis techniques.

随着技术的进步，水溶性维生素的生物合成迅速发展。代谢工程基于生物的代谢网络，通过对底盘细胞的代谢网络进行优化，同时通过对关键代谢节点进行改造进而调控酶的活性，并对支路途径进行修饰，使菌株更多地将

物质与能量代谢用于维生素合成途径中，显著地提高了维生素的产量^[5-7]；合成生物技术则是通过人工设计与构建新的生物学元件，进一步组成基因通路等生物系统，合成生物学将复杂的代谢通路构建过程简化为“程式”的组件拼

接。尽管该技术仍有许多尚未解决的问题(如对底盘中“必需基因”的认识尚浅,且简单拼接的体系很难兼顾基因的简并与相互作用),但基于该思路的尝试也为菌株改造提供了许多参考^[8-11]。

本文就近年来生物合成法生产水溶性维生素的研究进行了综述,列举了微生物发酵生产水溶性微生物的实例,希望能为生物法生产水溶性维生素提供参考。

1 B 族维生素

B 族维生素是一类水溶性小分子化合物,在体内广泛参与各种生理过程,在人体内存留时间短,需要经常补充。B 族维生素的结构各不相同,但普遍以辅酶的形式参与体内糖、蛋白质和脂肪的代谢过程中。

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,也是最早被提纯的水溶性维生素。维生素 B₁ 的生物活性形式为硫胺素焦磷酸(thiamine pyrophosphate, TPP),是催化丙酮酸发生脱羧反应的丙酮酸脱氢酶复合体 E1 亚基的辅因子,也是三羧酸循环中的 α -酮戊二酸脱氢酶复合体的辅因子,同时还参与了磷酸戊糖途径中转酮醇酶催化的反应。

维生素 B₁ 由嘧啶环和噻唑环通过亚甲基结合而成,目前工业化生产由化学法进行生产,其化学合成可分为汇聚式^[12](分别构建嘧啶环和噻唑环并结合)和直线式(先构建嘧啶环,在此基础上构建噻唑环)两种类型,但其汇聚式路线收率较低,因而常采用直线式路线。该路线可进一步按构建嘧啶环原料的不同分为丙二腈路线^[13]和丙烯腈路线^[3],前者较为简洁,但成本较高;后者成本低,但路线较长,收率也有所下降;后续通过“催化-缩合”两步构建噻唑环,获得维生素 B₁。

2022 年全球与中国维生素 B₁ 市场总量分别为 48.94 亿元与 18.92 亿元,预计全球市场总量在 2028 年达 70.32 亿元;维生素 B₁ 主要应用于食品领域,目前亚太地区是其最大的销售市场,约占总市场份额的 35%,其次是欧洲和北美市场,两者约占 50%;主要生产厂商包括:天新药业(江西省)、兄弟科技(浙江省)、华中药业(湖北省)、DSM(荷兰)、新发药业(山东省)等^[14-15]。

关于维生素 B₁ 的生物法合成研究主要集中于原核生物底盘细胞。维生素 B₁ 的生物合成过程与化学汇聚法类似,分别形成嘧啶环与噻唑环,由二者连接后得到。目前在原核生物中已鉴定出 12 个参与硫胺素生物合成的基因并进行了单基因过表达研究(图 2)。其中,6 个基因涉及噻唑环的生物合成(*thiF*、*thiS*、*thiG*、*thiH*、*thiI* 和 *dxs*),1 个参与嘧啶环的生物合成(*thiC*),1 个是噻唑和嘧啶连接所需(*thiE*),另外 4 个激酶基因(*thiD*、*pdxK*、*thiL* 和 *thiM*)前两个涉及嘧啶合成,后两个分别涉及嘧啶噻唑环和合成与硫胺素补救途径^[16]。对原核生物硫胺素代谢通路的研究瓶颈在于铁硫代谢与硫胺素代谢间的相互影响,同时由于关键酶 ThiC 活性不高影响了整体效率。众多研究在不同菌株内针对与硫胺素代谢途径中的嘧啶、噻唑环合成相关的基因进行了基因工程改造,不同程度上提高了硫胺素的产量。在枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)中, Schyns 等^[17]对 *thiN*、*ykoD*、*yuaJ* 进行了敲除,使硫胺素产量提高到 1.2 mg/L;在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中, Cardinale 等^[18]经过遗传改造并结合天然 *thiFSGH*、*thiC*、*thiE* 和 *thiD* 或 *thiM* 基因的过表达,使硫胺素的产量提高到 0.8 mg/L; *E. coli* 的突变体 PT-R1 的硫胺素产量是野生型的 3 倍,达到了 1.6 mg/L,该突变体中关键酶基因(*thiM*、*thiD*、*thiE*)不受硫胺素的抑制,而在野生型中硫胺素会阻遏对应酶的生成^[19]。利用酵母

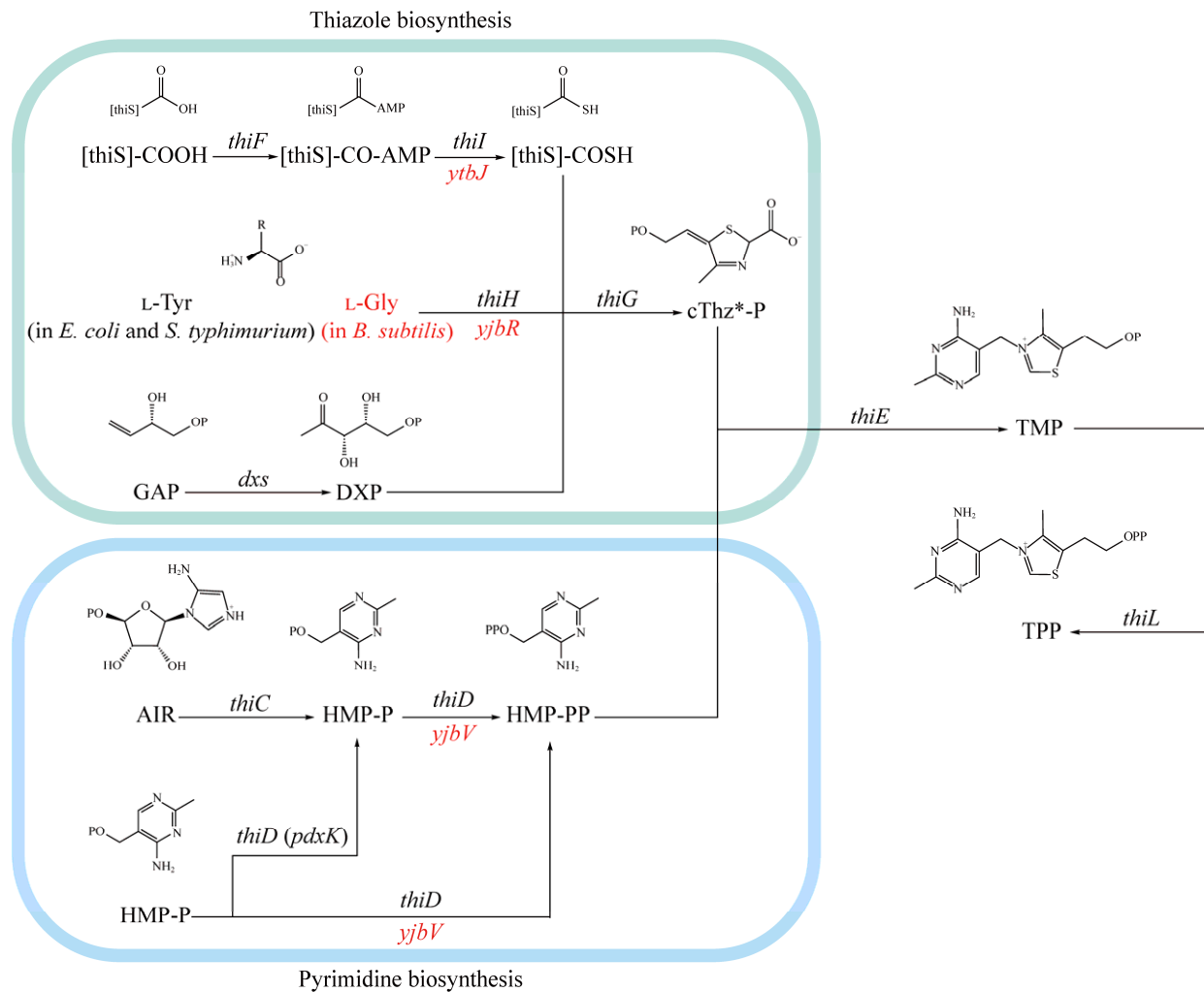


图2 维生素 B₁ 生物合成路径

Figure 2 Vitamin B₁ biosynthesis pathway. *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* genes are marked in black, and *Bacillus subtilis* genes are marked in red. *thiS*: Sulfur carrier protein; Tyr: Tyrosine; Gly: Glycine; GAP: D-glyceraldehyde 3-phosphate; DXP: 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate; cThz*-P: 2-[(2R,5Z)-2-carboxy-4-methylthiazol-5(2H)-ylidene]ethyl phosphate; AIR: 5-amino-1-(5-phospho-β-D-ribose)imidazole; HMP-P: 4-amino-2-methyl-5-(phosphoxymethyl)pyrimidine; HMP-PP: 4-amino-2-methyl-5-(diphosphoxymethyl)pyrimidine; TMP: Thiamine phosphate; TPP: Thiamine diphosphate.

生产维生素 B₁ 的研究仍处于起步阶段，酵母中的天然高产菌株硫胺素的产量为 76.38 μg/L^[20]，远低于 *E. coli* 的产量，且硫胺素的反馈抑制作用在酵母中依然存在^[21]。

维生素 B₁ 也能够植物中生产，Strobbe 等^[22]通过同时过表达 *thiE*、*thiI*、*thiC* 这 3 个基因，提高了植株的硫胺素产量，并且发现硫胺

素产量的提高可以提高其胁迫抗性。同时，为解决谷物碾磨过程中的硫胺素损失，Minhas 等^[23]通过调控水稻中硫胺素的转运，提高水稻胚乳中硫胺素含量，实现了维生素 B₁ 在食物中较高量的积累。

1.2 维生素 B₂

维生素 B₂ 又称核黄素，具有参与呼吸链能

量产生,促进葡萄糖、脂肪和蛋白质的代谢以及保护细胞免受自由基的损伤等多种作用。

维生素 B₂ 的化学合成是以葡萄糖或化学合成的 D-核糖为起始原料,经 6–9 个步骤合成核黄素^[24-25],该过程步骤多、耗时长,且在成本与环保方面并不具备优势,因此后续出现了一种化学半合成法,即通过生物法发酵获得 D-核糖作为原料再进行化学合成,但这种方法仍未解决全化学法存在的问题。

2023 年,全球维生素 B₂ 总产能约 10 000 t,生产企业主要有广济药业(湖北省)、DSM (荷兰)、巴斯夫(德国),三家企业总产能超过全球产能 80%,呈现三寡头垄断格局;目前国内维生素 B₂ 的生产主要由广济药业和海嘉诺药业(原迪赛诺)主导,其他企业包括海嘉诺药业旗下内蒙古赤峰制药股份有限公司和山东恩贝^[26]。

现阶段的维生素 B₂ 主要由生物法合成,早期的合成底盘是真核生物。使用核黄菌(*Ashbya gossypii*)这种天然产生核黄素的菌株发酵生产核黄素,野生型菌株核黄素产量可达 5 g/L^[27]。PARK 等^[28]利用随机差异诱变与筛选,获得了产量达 14 g/L 的菌株。无名假丝酵母(*Candida famata*)也表现出极大的核黄素生产潜力,其突变体核黄素产量高达 20 g/L^[29]。

在原核生物中,利用枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)进行维生素 B₂ 生物合成的研究较多,Wu 等^[30]基于统计实验设计,首先在摇瓶培养中优化培养基组分,采用两级 Plackett-Burman 设计(PB 设计,一种用于筛选关键因素的两水平试验设计方法)来筛选对核黄素生产有显著影响的培养基成分,在测试的 15 个变量中,葡萄糖、NaNO₃、K₂HPO₄、ZnSO₄ 和 MnCl₂ 被确定为影响核黄素产生的最显著因素,最佳培养基的核黄素摇瓶产量达到了 6.65 g/L,在 5 L 发酵罐中 48 h 内 *B. subtilis* RH44 中的核黄素水平提高到

了 16.4 g/L。现有的商业化菌株 *B. subtilis* KCCM 10445 保存于韩国微生物资源中心(Korea Culture Center of Microorganisms, KCCM)。该菌株为 *B. subtilis* AS5 突变体在含噻脯氨酸的培养基中培养筛选所得核黄素生产力最高的突变菌株,其核黄素产量达 26.8 g/L^[31]。同时,Koizumi 等^[32]利用产氨棒杆菌(*Corynebacterium ammoniagenes*),通过将启动子活性最强的 DNA 片段引入核黄素生物合成基因的上游区域,同时提高 GTP 环水解酶 II 的活性,最终在 72 h 内积累了 15.3 g/L 的核黄素。Liu 等^[33]在 *E. coli* LS31T 中,通过敲除 *purR*,下调 *guaC*,过表达 *fbp*、*purF*、*prs*、*gmk*、*ndk* (图 3)基因,结合对腺嘌呤二核苷酸磷酸/烟酰胺腺嘌呤二核苷酸比率和呼吸链活性的优化,最终获得的菌株 *E. coli* LS72T 在补料分批培养条件下产量达 21 g/L。

食品行业也尝试直接应用维生素 B₂ 生产菌株。Thakur 等^[34]论证了在发酵产品(如发酵乳、酸奶和奶酪)发酵过程中添加工程改造益生菌来提高产品中的核黄素浓度,并进一步通过摄入过程使宿主肠道菌群具备原位生产维生素 B₂ 能力的可行性;而对于益生菌合成维生素 B₂ 的研究也有所进展:植物乳杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*)和费氏丙酸杆菌(*Propionibacterium freudenreichii*)能够合成约 0.6 mg/L 和 3 mg/L 的维生素 B₂,这为通过食物途径补充核黄素提供了新思路^[34]。

1.3 维生素 B₃

维生素 B₃ 又称烟酸/尼克酸,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(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD)和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸酯(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADP)合成的重要前体物质。

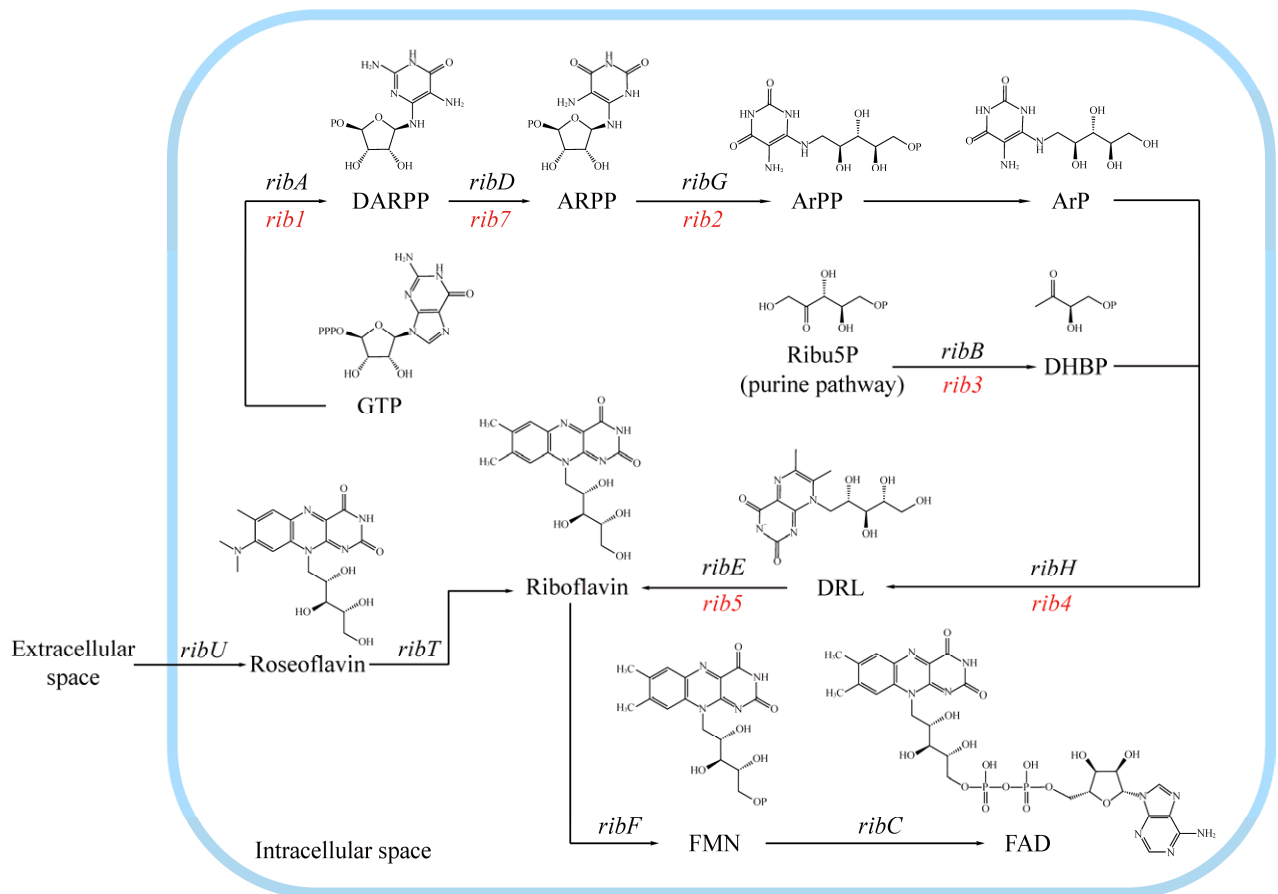


图3 维生素 B₂ 生物合成路径

Figure 3 Vitamin B₂ biosynthetic pathway. *Bacillus subtilis* genes are marked in black, and *Ashbya gossypii* genes are marked in red. GTP: Guanosine 5'-triphosphate; DARPP: 2,5-diamino-6-(5-phospho-D-riboseylamino)pyrimidin-4(3H)-one; ARPP: 5-amino-6-(riboseylamino)-2,4-(1H,3H)-pyrimidinedione 5'-phosphate; ArPP: 5-amino-6-(5-phospho-D-ribitylamino)uracil; ARP: 5-amino-6-(D-ribitylamino)uracil; Ribu5P: D-ribose 5-phosphate; DHPB: 1-deoxy-L-glycero-tetrol 4-phosphate; DRL: 6,7-dimethyl-8-(1-D-ribityl)lumazine; FMN: Riboflavin 5'-phosphate; FAD: Flavin adenine dinucleotide oxidized.

维生素 B₃ 的工业生产方法主要为氨氧化法^[4]和电解氧化法^[35], 前者生产成本低, 但反应需要在 300 °C 以上, 后者生产成本低, 但电解效率不高。

2022 年全球维生素 B₃ 的市场营收达到了 39.65 亿元, 市场规模达 19.3 亿元; 预计 2028 年全球维生素 B₃ 市场规模将达到 56.64 亿元; 维生素 B₃ 行业内主要竞争企业包括: Lonza (瑞士)、DSM (荷兰)、中瑞药业(天津市)、Lasons

(印度)、兄弟科技(浙江省)、Aarti Drugs (印度)等^[36]。

目前维生素 B₃ 的生物合成并未实现工业化生产, 现阶段的研究主要集中于在 3-取代基吡啶到维生素 B₃ 的酶法催化, 该方向存在两个思路: 其一是利用水解酶生产烟酸, 其二是利用水合酶生产烟酰胺。Mathew 等^[37]利用紫红色红球菌(*Rhodococcus rhodochrous*) J1 细胞内自带的腈水解酶将 3-氰吡啶转化为烟酸, 26 h 烟酸

转化量达 172 g/L; Sharma 等^[38]则利用诺卡氏菌(*Nocardia globerula*) NHB-2 自身自带的胍水解酶将 3-氰吡啶转化为烟酸, 9 h 烟酸转化量达 123 g/L, 转化率达 98.6%; Badoei-Dalfard 等^[39]使用嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*) AC21 的胍水解酶生产烟酸, 10 h 产量达 116.2 g/L; Pai 等^[40]将来自粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*) MTCC 126 的胍水解酶加入到 *E. coli* JM109 中, 使得重组的 *E. coli* JM109 可以直接将 3-氰吡啶转化为烟酸, 5 h 烟酸转化量达 123 g/L, 转化率达 100%。但胍水解酶应用于大规模合成烟酸仍存在一系列问题, 如通过发酵培养生产胍水解酶的菌株生物量较低、烟酸合成的整体生产效率较低、胍酶的表达过程需要应用的诱导剂如异丙基硫代半乳糖苷(isopropyl β -D-thiogalactoside, IPTG)会提高发酵成本等。为解决这些问题, Dong 等^[41-42]将恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)的胍水解酶基因在 *E. coli* 中进行了异源表达, 实现了无诱导条件下的高密度发酵, 将烟酸产量由 *P. putida* 诱变株最高纪录的 189 g/L 提高到重组 *E. coli* 的 541 g/L, 且大大降低了转化时间, 避免了诱导剂的毒性与成本问题对发酵的影响。

除了酶法合成维生素 B₃, 生物发酵法合成维生素 B₃ 近年来也有报道。Belenky 等^[43]发现酵母细胞中烟酰胺核糖核苷(nicotinamide riboside, NR)转运蛋白的缺失有助于其胞外分泌, 且该蛋白缺失同样有助于烟酸的增加; 他们通过在酵母细胞中平衡 NAD⁺的前体调节细胞内 NAD⁺代谢过程(图 4), 使烟酰胺核糖核苷产量达到 8 mg/L。

1.4 维生素 B₅

维生素 B₅ 又称泛酸, 因广泛存在于动植物中而得名。是辅酶 A 和酰基载体蛋白生物合成的重要前体物质, 在脂肪酸代谢方面起着重要的作用。

维生素 B₅ 仅 D 型具有生物活性, 第一代生产技术是通过化学法合成获得泛酸, 但其成本昂贵、环保压力较大(尤其是拆分过程耗时耗力); 现阶段市场上主要使用的是第二代化学酶法生产技术, 先通过化学合成 DL-泛解酸内酯, 再经过酶法拆分得到 D-泛酸; 目前以微生物作为底盘细胞发酵维生素 B₅ 的第三代生产技术已成为研究热点, 常用的底盘有谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)和 *E. coli*; 随着微生物底盘细胞各项技术指标的不断提升, 有望实现大规模应用^[44]。

2022 年, 我国维生素 B₅ 市场规模为 73.1 亿元, 同比增长 7.82%; 国外维生素 B₅ 生产企业主要有巴斯夫(德国)、罗氏制药(美国)、DSM(荷兰)等, 国内规模较大的维生素 B₅ 生产企业主要有亿帆医药、华恒生物、兄弟科技、新发药业、天新药业、新和成、华辰制药等; 其中, 亿帆医药市场占比较大, 达到 27.84%; 其次为新发药业, 市场占比为 21.43%^[45-46]。

现有的泛酸工业化生产方法中, 化学酶法占主要地位。该方法首先通过化学法合成 D-、L-泛解酸内酯。由于只有 D-泛酸具有生物活性, 因此需要利用 D-泛解酸内酯水解酶进行 DL-泛解酸内酯的立体专一拆分。Liu 等^[47-48]通过在酵母细胞中异源表达串珠镰刀菌(*Fusarium moniliforme*)的泛解酸内酯水解酶, 同时通过对该酶的定向进化, 获得了活性达野生型的 10.5 倍, 且可在酸性条件下催化的新酶。通过全生物发酵法获得泛酸的方法也有报道, 巴斯夫公司公布了无 3-(2-羟基-3-甲基-丁酰氨基)-丙酸[3-(2-hydroxy-3-methylbutyrylamino)-propionic acid, 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, 降低 HMBPA 的合成, 从而提高泛酸的产量, 其 48 h 产量达 63 g/L^[49]。

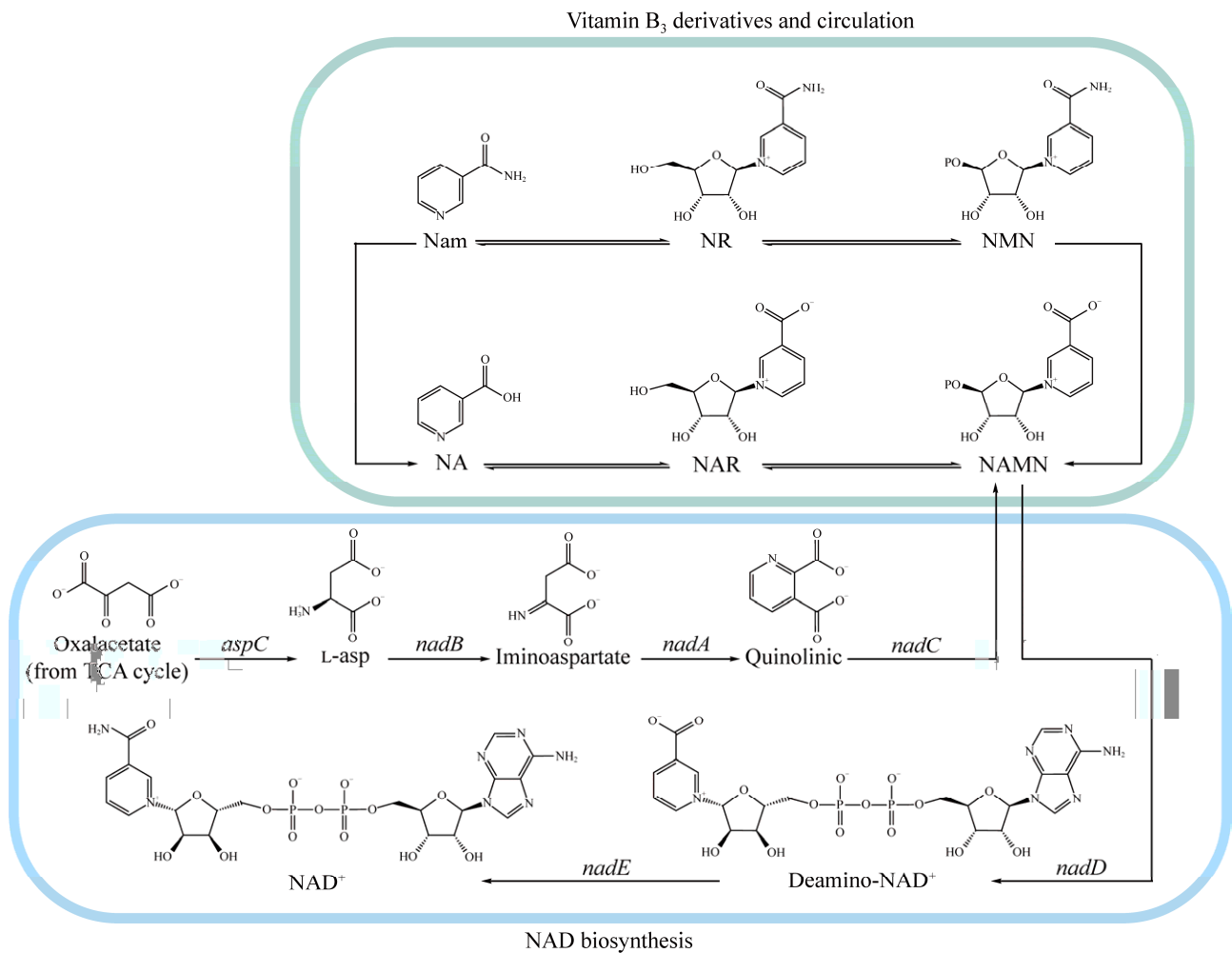


图 4 维生素 B₃ 生物合成路径

Figure 4 Vitamin B₃ Biosynthetic pathway. asp: Aspartate; Iminoaspartate: 2-iminobutanedioate; Quinolinic: 2,3-pyridinedicarboxylic acid; NaMN: β -nicotinate D-ribonucleotide; NAR: Niacin nucleoside; NA: Nicotinic acid; Nam: Niacinamide; NR: Nicotinamide nucleoside; NMN: Nicotinamide mononucleotide.

E. coli 中, 泛酸由 β -丙氨酸和泛解酸缩合而成。天冬氨酸经天冬氨酸脱羧酶(PanD)脱羧生成 β -丙氨酸; 泛解酸前体丙酮酸先转化为磷酸烯醇式丙酮酸, 然后在乙酰乳酸合酶(IlvBN)、乙酰羟酸还原异构酶(IlvC)、酮泛酸羟甲基转移酶(PanB)和酮泛酸还原酶(PanE)等一系列泛酸合成关键酶依次作用下形成泛解酸, 最终泛解酸和 β -丙氨酸在泛酸合成酶(PanC)的作用下缩合形成泛酸(图 5), 因此 D-泛酸的生产方案有以下改进。

基于前体 D-泛解酸和 β -丙氨酸, 通过补充两种前体可实现 D-泛酸部分途径的酶法生产。Tigu 等^[50]通过在 *E. coli* 中异源表达来自 *C. glutamicum* 的泛酸合成酶 PanC, 泛酸产率达 97.1 g/L。但该方法的前体泛解酸价格较高, 制约了该路线的应用。

进一步的研究大多基于外源添加 β -丙氨酸, 强化菌体自身通路合成泛解酸并最终生产泛酸的思路进行构建。Moriya 等^[51-52]通过对 *E. coli* 诱变育种和相关基因的过表达获得了 D-泛酸产

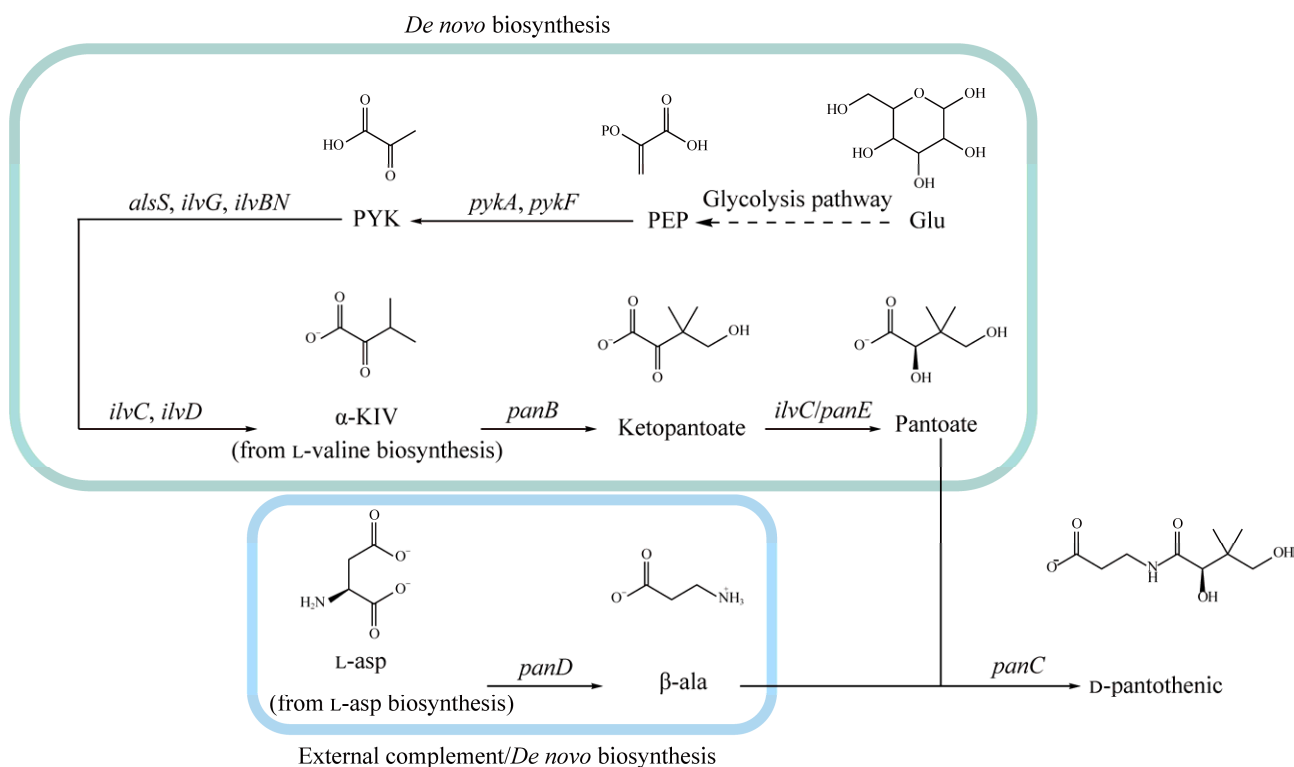


图 5 维生素 B₅ 生物合成路径

Figure 5 Vitamin B₅ Biosynthetic pathway. Glu: Glucose; PEP: Phosphoenolpyruvic acid; PYK: Pyruvate; α -KIV: 3-methyl-2-oxobutanoic acid; Asp: Aspartic acid; Ala: Alanine

菌株 FV5069/pFV31, 外源添加 β -丙氨酸后, D-泛酸产量达到 65.4 g/L。但该菌株采取的诱变方法缺乏对有益突变机制的阐述, 对后续的修饰不利, 对泛酸的过量生产机制研究的帮助较少。

Chassagnole 等^[53]对 *C. glutamicum* 进行代谢修饰, D-泛酸累积量小于 2 g/L。Zhang 等^[54-55]通过 *E. coli* 的系统代谢分析增强泛酸通路, 削弱旁路通路, 使得泛酸产量达 32.32 g/L。Zou 等^[44]将烟酰胺和烟酸(NADPH 的前体)添加到野生型 *E. coli* DPA11A01 的生长培养基中, D-泛酸产量显著升高。此外, 选择和过表达 NADPH 从头合成的必需基因(*zwf*、*icd*、*maeB*、*pntAB*、*sthA*、*yjfB*、*ppnk* 和 *pos5*)以增加细胞内的 NADPH 库; 携带 *pos5* 和 *ppnk* 共表达质粒的重组菌 DPA11A14 在 5 L 生物反应器中, 采用补料分批发酵, 可

生产 63.58 g/L 的泛酸。

1.5 维生素 B₆

维生素 B₆ 又称吡哆素, 包括吡哆醇、吡哆醛及吡哆胺, 在体内以磷酸酯的形式存在, 能够作为辅酶参与蛋白质、碳水化合物、某些神经介质、核酸和 DNA、维生素 B₁₂、维生素 B₂、脂类的合成或代谢作用。

当前维生素 B₆ 在工业上主要采用噁唑法合成^[56], 且目前的研究也多集中于噁唑法合成工艺的改进^[57], 虽然这种方法具有原料易得、收率高、成本低等特点, 但是合成过程产生的中间体具有一定毒性, 且腐蚀性强, 因此亟须使用生物法取代。

2022 年全球维生素 B₆ 产能约 19 700 t, 国内占比超过 90%; 需求方面, 国内维生素 B₆ 以出口

为主,近几年维生素 B₆ 出口量约占总产量的 70%–80%;据统计,2022 年全球维生素 B₆ 产能约 19 700 t,其中天新药业以 6 500 t 居行业第一,新和成 22 年投产 6 000 t 居行业第二,这两者产能占比超过 60%;从产量来看,2022 年全球维生素 B₆ 产量约 8 900 t,其中天新药业(江西省)、新和成(浙江省)、帝斯曼(荷兰)占比分别为 67.4%、10.1%、9.0%^[58]。

维生素 B₆ 的生物合成分为从头合成途径和补救途径。从头合成途径,又称 DXP (deoxyxylulose 5-phosphate, 1-脱氧-D-木酮糖 5-磷酸)依赖途径,可以分为两条线路:一条是两种底物分别在 D-赤藓糖-4-磷酸脱氢酶(Epd)、赤藓酸-4-磷酸脱氢酶(PdxB)、酶磷酸丝氨酸氨基转移酶(PdxF/SerC)、4-羟基苏氨酸-4-磷酸脱氢酶(PdxA)、1-脱氧木酮糖-5-磷酸合酶(Dxs)、吡哆醇 5'-磷酸合酶(PdxJ)、吡哆醇酶 5'-磷酸氧化酶(PdxH)这 7 种酶(图 6)的作用下产生维生素 B₆^[59]。Yocum 等^[60]通过在 *E. coli* 中引入 *B. subtilis* 的 *pdxST* 基因,使得维生素 B₆ 产量达 60 mg/L。Hoshino 等^[61]在 *E. coli* 中过表达自身的 *epd*、*pdxJ* 和 *dxs* 基因,产量达 78 mg/L。苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*) IFO14782 是维生素 B₆ 的天然过量生产者,野生型产量可达 100 mg/L, Hoshino 等^[62]在该菌株中过表达 *dxs* 基因,同时引入并过表达大肠杆菌的 *epd* 基因,维生素 B₆ 的产量增加到 1.3 g/L。Commichau 等^[63]将来源于 *S. meliloti* IFO14782 的 *pdxR*、*serC*、*pdxA* 和 *pdxJ* 基因和来自 *E. coli* 的 *epd* 基因进行密码子优化、组装并在 *B. subtilis* 中进行了异源表达,维生素 B₆ 的产量达 41 mg/L,但该异源表达体系存在途径酶表达不平衡问题,有毒中间体 4HTP (4-phosphohydroxy-L-threonine, 4-磷酸-L-苏糖醇)积累显著影响细胞的正常生长(抑制苏氨酸合成)。另一条是来源于磷酸戊糖途径的 4-羟基-L-

苏氨酸(4-hydroxy-L-threonine, 4HT)转化为 4HTP 进入代谢路径。Commichau 等^[64]发现枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)的突变体对 4HT (同样抑制苏氨酸合成)具有内源性抗性,通过引入 *E. coli* 的 *pdxA* 基因和 *S. meliloti* 的 *pdxJ*、*thrB* 基因,维生素 B₆ 产量达 65 mg/L,但 4HT 到维生素 B₆ 的转化率较低,说明有部分底物流入了尚未明确的宿主途径中,需要通过进一步研究削弱相关代谢途径以提高转化率。

补救途径,又称非 DXP 依赖途径,谷氨酰胺在基因 *pdxST* 作用下与甘油醛 3-磷酸、D-核糖 5-磷酸缩合形成维生素 B₆^[59]。该途径的通量不高,因此并不适合作为维生素 B₆ 的主要合成途径,但最近的研究发现该途径被作为解耦合成与生长的回补路径显著提升了维生素 B₆ 的合成:Liu 等^[65]在 *E. coli* 中为了解耦大肠杆菌中维生素 B₆ 生产与自身代谢,敲除了 *pdxH* 基因阻断 5'-磷酸吡哆醇(pyridoxine 5'-phosphate, PNP)向 5'-磷酸吡哆醛(pyridoxal 5'-phosphate, PLP)转化,将其引入到吡哆醇(pyridoxine, PN)生产途径中;同时为了补偿细胞生长所需的 PLP,引入了 *B. subtilis* 的 *pdxST* 基因并结合启动子微调,通过非 DXP 依赖型途径产生少量 PLP 以满足生长需要。在整体优化方面,Liu 等^[65]将维生素 B₆ 合成途径以有毒中间体 4HTP 为标志分为上游推送与下游拉取两部分进行改造:上游推送模块中,对反应初始处的 Epd 和 Dxs 酶分别进行了同源基因挖掘与异源替换,并将中间酶 SerC 在上游酶 PdxB 附近过表达,有效提高了目标产物合成途径的代谢通量,产生了足够的前体 4HTP 与 DXP;下游拉取模块中,对反应瓶颈处的 PdxA 和 PdxJ 酶进行重新设计与编码序列的密码子优化,提高了催化效率并降低了有毒中间体 4HTP 的积累,最终维生素 B₆ 补料分批发酵产量达 1 409 mg/L。

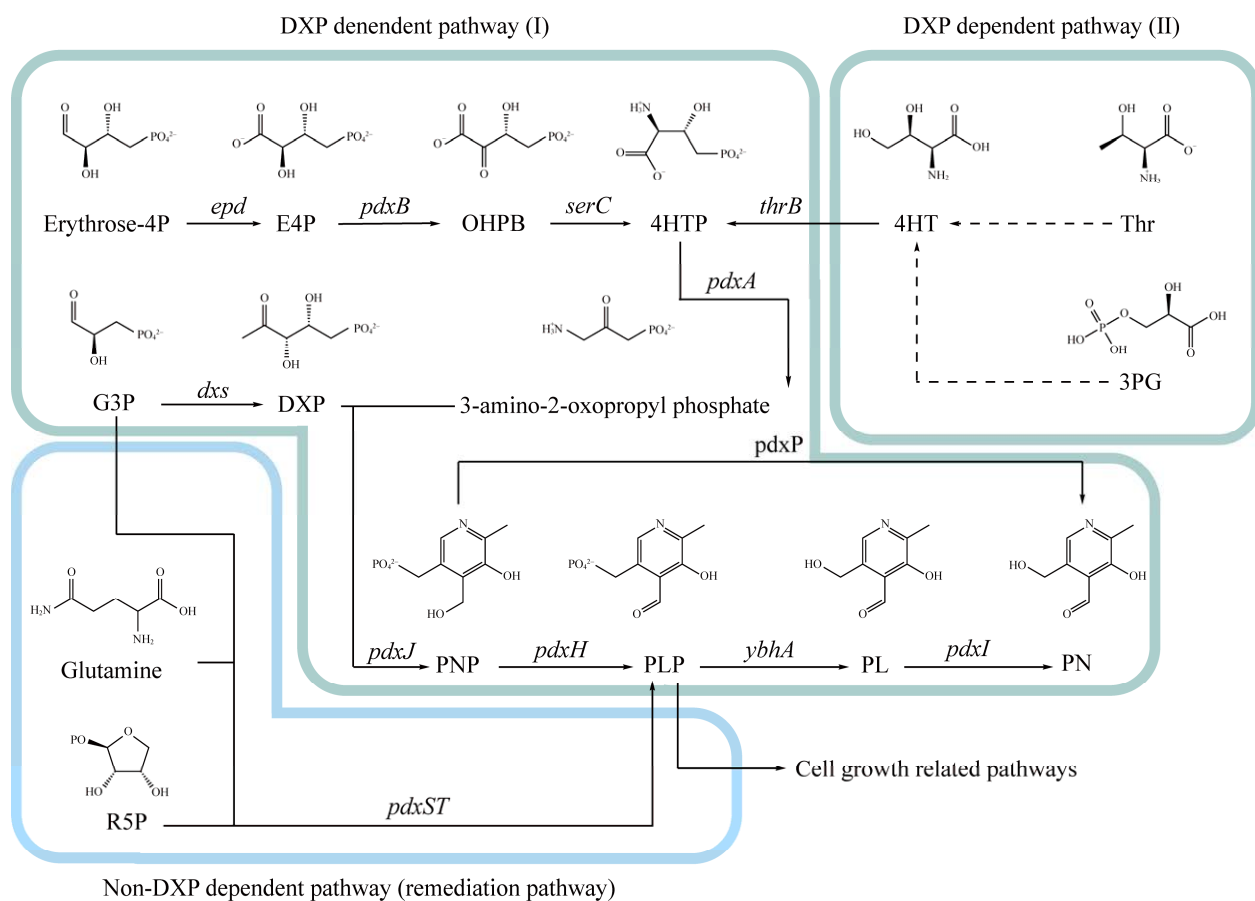


图 6 维生素 B₆ 生物合成路径

Figure 6 Vitamin B₆ Biosynthetic pathway. 3PG: 3-phospho-glycerate; Thr: Threonine; 4HT: 4-hydroxy-L-threonine; Erythrose-4P: Erythrose-4-phosphate; E4P: 4-phosphoerythronate; OHPB: 3-phospho-4-hydroxy-phospho- α -ketobutyrate; 4HTP: 4-phosphohydroxy-L-threonine; G3P: Glyceraldehyde-3-phosphate; DXP: Deoxyxylulose 5-phosphate; R5P: Ribose-5-phosphate; PNP: 5'-phosphopyridoxine; PLP: Phosphopyridoxal; PL: Pyridoxal; PN: Pyridoxine.

1.6 维生素 B₇

维生素 B₇ 又称为维生素 H 或生物素, 是脂肪和蛋白质正常代谢中不可或缺的物质。

维生素 B₇ 的化学合成采取 Sternbach 合成路线^[66]。由于生物素具有 3 个手性中心, 分子结构复杂, 因此化学合成属不对称合成, 且需要进行光学拆分。该方法技术要求较高、生产时间较长, 但其成本较低, 因此仍是当前工业化生产维生素 B₇ 的主流方法。

2022 年全球维生素 B₇ 市场规模达 2.6 亿美元,

预计 2026 年市场规模将达到 3.8 亿美元; 同年, 维生素 B₇ 市场销售额达到了 1.7 亿美元, 预计 2029 年将达到 2.1 亿美元; 现阶段, 我国已成为全球维生素 B₇ 生产和出口大国, 国内企业在国际市场上占据的地位越来越高, 其供应商主要有新和成(浙江省)、圣达生物(山东省)、泰格(安徽省)、科兴生物(济南市)、海嘉诺(上海市)、浙江医药(浙江省)等, 六大企业合计市场占比超 9 成。亚太是全球最大的市场, 占有大约 33% 的市场份额, 之后是欧洲和北美, 分别占比 30% 和 25%^[67]。

维生素 B₇ 的生物合成研究早期是基于生物素天然生产菌种如百脉根中间根瘤菌 (*Mesorhizobium loti*)、球形芽孢杆菌 (*Bacillus sphaerius*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 等, 通过调节启动子、解除反馈抑制等方法, 提高生物素的产量。Streit 等^[68]在土壤杆菌 (*Agrobacterium*) 和根瘤菌 (*Rhizobium*) HK40 中过表达来源于 *E. coli* 的启动子 *tac*, 并向 BioB (生物素合成酶) 引入修饰后的核糖体结合位点 (ribosome binding site, RBS), 使生物素产量达 110 mg/L。

对常见底盘的经典诱变结合代谢改造的研究也取得了一定的成果, Kanzaki 等^[69]对 *E. coli* 的诱变与改造使生物素产量达 970 mg/L, Bower 等^[70]在 *B. subtilis* 中的诱变及对生物素操纵子基因的调控则使生物素产量超过 1 g/L。

对生物素合成途径的研究发现, 其限速步骤以及全过程的过表达可以显著增强生物素积累。Ifuku 等^[71]与 Chakravartty 等^[72]分别就 *E. coli* 的 *bioB* 基因操纵子与 *briA* 基因对应的酶

活性位点进行了研究, 确定了生物素合成中的限速步骤。Lin 等^[73]和 Ikeda 等^[74]分别就 *E. coli*、*C. glutamicum*、*P. putans* 的生物素合成限速步骤进行了研究, 发现在 *E. coli* 和 *P. putans* 中生物素合成依赖于 *bioC-bioH* 通路 (图 7), 而 *C. glutamicum* 中则存在 *bioI-bioW* 通路。Xiao 等^[75]基于此对 *P. putans* 采取了以下 4 个举措: 通过启动子和核糖体结合位点工程, 过表达 *bioC-bioH* 路径的限速酶; 同时删除负调节因子和生物素输入基因以解除生物素生物合成的调节; 加强生物素生物合成辅助因子 (S-腺苷-L-蛋氨酸和 [Fe-S] 簇) 的供应; 从 *B. subtilis* 引入 *BioI-BioW* 途径, 使生物素产量达 271.88 mg/L。Wei 等^[76]以 *E. coli* 为底盘, 引入了来自 *P. putida* 的生物素操纵子基因 (*bioBFHCD* 集群和 1 个 *bioA* 基因)、来自 *B. subtilis* 的 *bioW* 基因 (编码 pimeloyl-CoA 合酶) 和来自 *S. cerevisiae* 的 *sam2* 基因 (编码 S-腺苷-L-甲硫氨酸合酶), 以促进生物素的生产。在补加前体庚二酸和 L-甲硫氨酸的条件下生物素产量达 208.7 mg/L。但来自 Manandhar

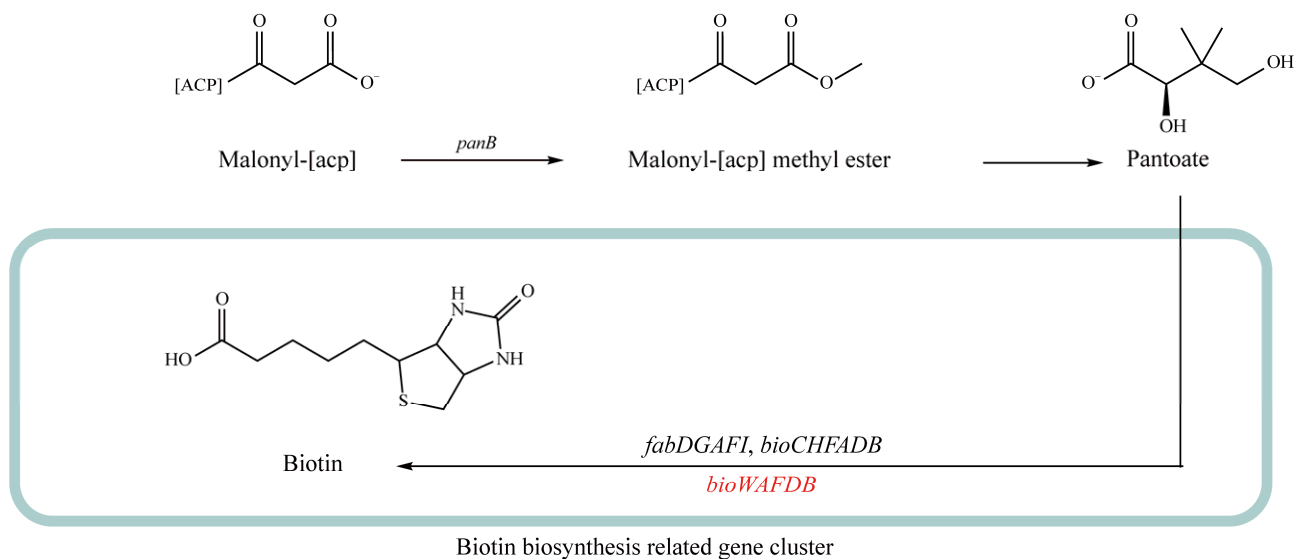


图 7 维生素 B₇ 生物合成路径

Figure 7 Vitamin B₇ Biosynthetic pathway. *Pseudomonas putida* genes are marked in black, and *Bacillus subtilis* genes are marked in red. ACP: Acyl carrier protein.

等^[77]的研究表明过表达生物素合成途径基因会导致其中间代谢产物量下降,对菌体的生长产生不利的影响。

1.7 维生素 B₉

维生素 B₉ 又称叶酸,是一组化学结构相似,生化特征相近的化合物的统称,由蝶啶、对氨基苯甲酸与一个或多个谷氨酸结合而成,参与核苷酸和氨基酸的合成。

维生素 B₉ 的化学生产合成方法成本低、产能高,是现阶段工业生产的主流方法,但由于涉及不对称中心的拆分,该过程中 5-MeTHF 易失活,故而收率不理想。

2021 年全球维生素 B₉ 原料药市场规模达到了 7 244 万美元,预计 2028 年将达到 10 457 万美元;中国占据了全球将近 90% 的产量,2021 年市场产量规模为 5 770 万美元,约占全球的 87.9%,预计 2028 年将达到 8 190 万美元,届时全球占比将达到 88.0%;中国的维生素 B₉ 大部分用来出口,出口比例接近 60%,国内消费量较小;2021 年,中国国内销售收入约为 1 990 万美元,约占全球的 27.5%,到 2028 年国内销售收入将达到 2 820 万美元;目前全球维生素 B₉ 主要生产厂商包括江西天新药业、帝斯曼(DSM)、常州制药、常州牛塘化工、河北冀衡药业、浙江圣达生物、常州新鸿医药等,2021 年前 7 大主要厂商份额占比超过 74%^[78]。

维生素 B₉ 的生物法合成主要采用以下几种底盘:在原核生物中,利用乳酸杆菌(*Lactobacillus*)和嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)等乳酸菌可从头生产叶酸^[79],该方法常用于乳制品生产中,通过乳酸菌直接增加产品的维生素 B₉ 含量^[80],但乳酸菌用于大规模工业化生产时需要复杂的营养培养基,且过程的优化和控制相对困难^[81]。Jägerstad 等^[82]在 *B. subtilis* 中,通过增加前体物质供应,并阻断

5-甲基四氢叶酸的分解代谢途径(图 8),5-MeTHF (5-methyltetrahydrofolate, 5-甲基四氢叶酸)产量达到 952.05 μg/L。

近年来,以真核生物为底盘进行叶酸发酵研究取得了一定进展^[83-84]。酿酒酵母菌株和其他酵母菌,如洛氏梅奇酵母(*Metschnikowia lochheadii*)、嗜蜜德巴氏酵母菌(*Debaryomyces melissophilus*)和万氏德巴氏酵母菌(*Debaryomyces vanriji*)是天然的叶酸生产者,其叶酸产量相对于细胞干重可达 40–140 μg/g^[85]。毕赤酵母(*Scheffersomyces stipitis*)作为一种 Crabtree 阴性酵母(Crabtree 效应,克勒勃屈利效应,也称葡萄糖效应,指的是高浓度葡萄糖培养基和有氧条件下细胞生长受到抑制且生成乙醇,而毕赤酵母不受该效应影响)^[86],且其代谢途径中存在磷酸戊糖途径^[87],较高的戊糖途径通量有助于中间产物赤藓糖 4-磷酸积累并协助叶酸合成^[88],因此被视为生产叶酸的优良底盘。Mastella 等^[89]利用 *S. stipitis* 发酵生产叶酸,通过向培养基中加入木糖,向磷酸戊糖途径补充戊糖以增加代谢通量,有效提高了叶酸的产量,其野生型叶酸产量达 3.72 mg/L。棉阿舒囊霉(*Ashbya gossypii*)野生型叶酸产量达 40 μg/L,经 *FOL* 基因的过表达、GTP 环水解酶限制步骤的解除与竞争路径代谢通量的重定向,产量达 6 595 μg/L^[90]。

1.8 维生素 B₁₂

维生素 B₁₂ 又称钴胺素,是一种含有 3 价钴的多环系化合物。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。

Eschenmoser 等^[91]研究出了维生素 B₁₂ 的化学合成方法,但该过程由 70 多个合成步骤组成,复杂程度高。因此现阶段的维生素 B₁₂ 工业生产方法为发酵法。

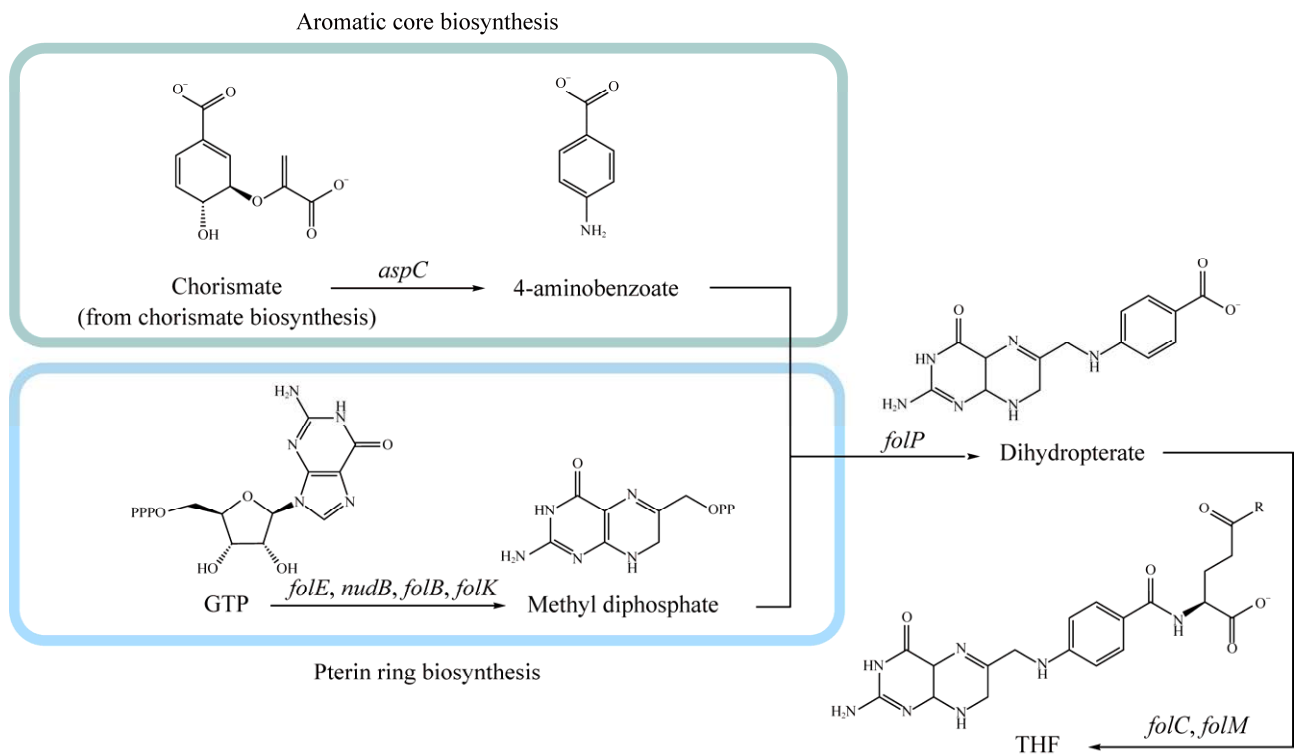


图 8 维生素 B₉ 生物合成路径

Figure 8 Vitamin B₉ Biosynthetic pathway. GTP: Guanosine triphosphate; THF: Tetrahydrogen folic acid.

2022 年中国维生素 B₁₂ 市场规模达到 4.15 亿元，全球市场规模为 15.18 亿元，其中国内维生素 B₁₂ 市场容量为 4.15 亿元，全球维生素 B₁₂ 市场规模将以 7.05% 的平均增速增长，预计在 2028 年达到 23.01 亿元；目前，维生素 B₁₂ 行业内重点企业有华北制药(中国)、Sanofi (法国)、华荣制药(中国)、金维制药(中国)^[92]。

微生物从头合成维生素 B₁₂ 主要通过两种途径进行，即需要氧(有氧)和氧敏感(厌氧)途径，每种途径都涉及 20 多个酶促步骤和大约 30 个基因。此外，一些菌株还可以通过补救途径吸收类钴胺素来合成钴胺素。

天然生产维生素 B₁₂ 的微生物有丙酸杆菌(*Propionibacterium*)、脱氮假单胞菌(*Pseudomonas denitrificans*)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)和诺卡氏菌(*Nocardia*)等^[94]。其中丙酸杆菌(包

括 *P. shermanii* 和 *P. freudenreichii* 两种)和脱氮假单胞菌被用于工业生产。其中丙酸杆菌产量略低，但菌体具有不产生内外毒素的优势；而脱氮假单胞菌产量更高。早期的维生素 B₁₂ 生物法合成研究主要集中于诱变的方法^[93]。Martens 等^[94]将随机诱变与基因工程方法相结合，提高了维生素 B₁₂ 的产量。

近年来，许多代谢工程策略也被应用于维生素 B₁₂ 的生产中。Kiatpapan 等^[95-96]在丙酸杆菌中更换了链霉菌(*Streptomyces*)基因 *choA*、球形红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)基因 *hema* 的启动子并进行了异源表达，两者对应的酶活均提升了 2 倍左右。基于此，Piao 等^[97]进一步尝试了在 *P. freudenreichii* IFO1242 中表达了 *hem*、*cob*、*cbi* 这 3 个与维生素 B₁₂ 合成相关的基因家族，其中 *cobA* 过表达使维生素 B₁₂ 产量

相较于野生型提高了 1.7 倍。通过进一步整合 *hemAB* 与 *cobA*, 产量达 1.7 mg/L。

维生素 B₁₂ 核糖开关对维生素 B₁₂ 的生物合成影响也有报道, Cai 等^[98]在 *S. meliloti* 中通过构建核糖开关文库, 选取来自鼠伤寒沙门菌 (*Salmonella typhimurium*) 的 *btuB* 为调控元件, 将产量提升至 156 mg/L, 但发酵周期长达 1 周, 无法应用于实际生产。Moore 等^[99]开发了一种基于质粒的表达策略, 克隆了不含调节元件的 *cbi* 操纵子以绕过钴胺素对核糖开关的影响; 这些菌株在以甘油作为碳源的最小培养基上生长, 产量达 200 mg/L, 是当前报道的最大值, 且业界普遍认为, 通过优化发酵条件, 钴胺素的产量可被提升至 300 mg/L。

维生素 B₁₂ 的无细胞体系酶法催化也有新的进展。Fang 等^[100]以 5-氨基乙酰丙酸 (5-aminolevulinic acid, 5-ALA) 为原料, 通过无细胞反应体系进行级联催化反应合成 AdoCbl 的方法; 整合并优化了 30 多个生物催化反应, 克服了反馈抑制、检测复杂、中间产物不稳定、辅因子不平衡与竞争等问题, 实现了维生素 B₁₂ 的无细胞合成, 其以 5-氨基乙酰丙酸 (5-ALA) 为底物时的产量达 417.41 μg/L。

2 维生素 C

维生素 C 又称抗坏血酸, 是体内多种酶促反应途径的重要辅助因子, 其还原性在清除氧化自由基上发挥重要作用。维生素 C 是全球产销规模最大的维生素品种之一, 其生产商主要集中于中国, 70% 以上的产品主要用于出口, 2021 年山东省维生素 C 出口额完成 26 539.94 万美元, 占全国维生素 C 出口总额的 28.17%, 全国排名第一; 河北省维生素 C 出口额完成 24 464.13 万美元, 占全国维生素 C 出口总额的 25.96%, 全国排名第二; 江苏省维生素 C 出口

额完成 15 298.43 万美元, 占全国维生素 C 出口总额的 16.24%, 全国排名第三^[101]。主要出口地为美国、德国、荷兰、日本, 其中美国占比第一, 占比 20.17%, 德国占比第二, 占比 9.57%, 荷兰占比 8%, 日本占比 6.35%, 其他国家占比 51.03%。目前维生素 C 主要产商有石药集团、山东鲁维、江山制药 (2015 年被帝斯曼收购)、山东天力、东北制药、新和成等企业^[101]。

维生素 C 的工业合成一般是首先合成中间体 2-酮-L-古洛糖酸 (L-xylo-hex-2-ulosonic acid, 2-KLG), 再将该中间体经盐酸酸化即可获得维生素 C。最经典的中间体工业生产方法是莱氏法, 一种混合发酵法。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-KLG^[102], 但该方法需要用到有毒试剂, 且成本相对较高。我国科学家尹光琳等^[103]基于莱氏法作出了改进, 发明了由 *G. oxydans*、巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 和普通生酮基古龙酸菌 (*Ketogulonicigenium vulgare*) 组成的三菌二步发酵法, D-山梨糖醇首先通过 *G. oxydans* 转化为山梨糖, 山梨糖由混菌体系: 大菌 (伴生菌, 负责促进小菌生长及产酸) *B. megaterium* 和小菌 (产酸菌, 负责将山梨糖转化为 2-KLG) *K. vulgare* 转化为 2-KLG, 该方法不使用有毒化学试剂, 而且成本更低。但混菌发酵技术相较于单菌发酵存在稳定性差、效率低的问题, 制约了其大规模标准化生产。为了消除混菌体系的影响, 研究者提出了以下两个思路: (1) 用活性物质替代伴生菌, 保证产酸菌正常生长。满都拉等^[104]应用蛋白作为伴生活性物质取代伴生菌, 单菌发酵有效提高了维生素 C 的收率, 同时缩短了发酵周期。在产酸菌方面, Wang 等^[105]向传统产酸菌 *K. vulgare* 引入磷酸酮酶 (*xfp*) 和磷酸转乙酰酶 (*pta*) 基因构成的糖代谢途径 (涉及乙酰 CoA 生物合成), 使得

2-KLG 产量增加了 22.27%。(2) 选育无须伴生菌的产酸菌。Wang 等^[106]发现新菌株产酮古洛糖酸菌(*Ketogulonicigenium robustum*) SPU_B003 的单菌发酵产率高于 *K. vulgare*, 并根据两者的基因组差异推测完整的生物合成途径有助于提高产酸菌 2-KLG 产量。Sugisawa 等^[107]利用 *K. vulgare* DSM 4025 单菌发酵 L-山梨醇, 不再生成中间体而直接生成 1.37 g/L 抗坏血酸, 简化了流程。Sauer 等^[108]利用过表达内源性 D-阿拉伯糖基-1,4-内酯氧化酶以及 L-半乳糖脱氢酶的出芽酵母细胞, 以半乳糖为前体产生 100 mg/L 的抗坏血酸。Zeng 等^[109]在大肠杆菌中表达山梨糖/山梨醇脱氢酶, 优化催化条件重组表达吡咯喹啉醌(pyrrroloquinoline quinone, PQQ), 以 L-山梨糖为底物全细胞催化生产 2-KGA 产量达 72.4 g/L。在以 *G. oxydans* 为底盘的实验中, Li 等^[110-111]通过平衡细胞内和细胞外 D-葡萄糖代谢通量, 同时引入山梨酮脱氢酶与山梨糖脱氢酶, 系统地增强了整个 2-KLG 生物合成途径, 成功实现了“一菌一步法”的维生素 C 合成。工程菌株产生 30.5 g/L 2-KLG, 转化率达 39.0%。

3 总结与展望

水溶性维生素广泛参与生物体的各类生理活动, 对生物体正常生长发育起着不可或缺的作用。生物法合成水溶性维生素以其安全高效、绿色环保的优势, 对于工业合成水溶性维生素有着重要的研究意义与应用价值。早期研究主要通过诱变手段来选育具有较高水溶性维生素生产潜力的菌株, 并获得了一定成果。但诱变法本身的不可控性极大提高了工作量, 且无法明确菌株高产机理以供进一步修饰。随着基因测序、基因编辑、高通量筛选技术的发展, 生物法生产水溶性维生素进入了新的阶段。采用代谢工程对维生素的生物合成路径进行改造,

向底盘菌株中引入新的代谢通路或调整原有的代谢通路, 在保证菌株正常生理活动的前提下, 尽可能多地将物质与能量引入水溶性维生素的代谢途径中, 实现菌株正常生长与高产水溶性维生素之间的平衡。

在 B 族维生素中, 迄今为止只有维生素 B₂ 的全途径生物合成技术相对成熟并用于实际生产(商业化菌株), 其未来研究方向可采用鲁棒性更强的菌株(如耐高温酵母)作为底盘以提高工程菌抗逆性能。其余维生素的生物合成中, 维生素 B₅、维生素 B₁₂ 已经实现用发酵法进行工业化生产, 但仍有较大的提升空间, 而维生素 B₁、维生素 B₆、维生素 B₇、维生素 B₉ 的生物合成仍处于研究阶段。这些维生素的生物合成研究思路与维生素 B₂ 较为类似, 都是在底盘中构建以葡萄糖等简单底物为原料合成对应水溶性维生素的代谢途径。以维生素 B₅ 为例, 作为一种双前体(D-泛解酸与 β-丙氨酸)合成的水溶性维生素, 现有主流的研究思路是“合成 D-泛解酸, 补充 β-丙氨酸”以降低维生素 B₅ 的合成对底盘菌造成的压力, 研究者通过过表达等方式对维生素 B₅ 代谢通路进行增强, 同时通过对相关通路进行调整, 通过削弱非必要的途径, 将更多的代谢通量引入维生素 B₅ 的代谢通路中。维生素 B₃ 合成技术的研究思路则是获取转化速率高、原料利用率高的水解/水合酶用于中间产物 3-取代吡啶至烟酸或烟酰胺的酶法催化^[37-41], 这一思路在维生素 B₅ 的酶法拆分、维生素 B₁₂ 的全酶法合成中也有体现。其余 B 族维生素的合成只实现了部分途径的生物合成, 全合成途径还存在着代谢通量失衡、中间产物损失、次生代谢物存在毒性造成目标产物产量低等通性问题需要研究者进一步解决。维生素 C 的合成目前已有较为成熟的“三菌两步”生物合成方法, 但第二步中的混菌发酵对发酵控制提出了

较高的要求, 因此现有的研究方向为将伴生菌替换为生物活性物质或构建无须伴生菌的工程产酸菌株, 实现单菌发酵^[104-105]。同时, 提高产酸菌的转化效率也是研究方向之一。周景文团队^[109]目前已经实现了“一菌一步”生物合成方法, 解决了目前“三菌两步”生物合成法步骤繁

琐、周转发酵液费时费力的问题, 但生产效率低, 未能实现工业化, 还需研究者们进一步深入研究。

现如今, 通过对细胞内代谢流的重新分配以实现水溶性维生素的增产的研究取得了一定成果(表 1)。但传统的代谢工程方法在实践过程

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	Yield (mg/L)	References
VB1	<i>E. coli</i>	Mutant PT-R1	1.6	[18]
		<i>thiFSGH^{OE}</i> , <i>thiC^{OE}</i> , <i>thiE^{OE}</i> , <i>thiD^{OE}</i> , <i>thiM^{OE}</i>	0.8	[18]
	<i>B. subtilis</i>	<i>AthiN</i> , <i>ΔykoD</i> , <i>ΔyuaJ</i>	1.2	[17]
VB2	<i>A. gossypii</i>	Wide-type	5 000	[27]
		W122032, Mutant	13 700	[28]
	<i>C. famata</i>	ATCC 20849; 20850, mutated	20 000	[29]
	<i>B. subtilis</i>	RH44, media optimization	16 400	[30]
		KCCM 10445, Mutant	26 800	[31]
	<i>C. ammoniagenes</i>	GTP cyclohydrolase II modification	15 300	[32]
	<i>E. coli</i>	<i>ΔpurR</i> , <i>guaC^{GD}</i> , <i>fbp^{OE}</i> , <i>purF^{OE}</i> , <i>prs^{OE}</i> , <i>gmk^{OE}</i> , <i>ndk^{OE}</i>	21 000	[33]
	<i>L. plantarum</i>	Wide-type	0.6	[34]
	<i>P. freudenreichii</i>	Wide-type	3	[34]
VB3	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Anrt1</i> , <i>Anrkl</i> , <i>Δurhl</i> , <i>Δpml</i>	8	[43]
VB5	<i>C. glutamicum</i>	<i>ΔilvA</i> , <i>ilvBNCD^{OE}</i> , <i>panBC^{OE}</i>	1 000	[53]
	<i>B. subtilis</i>	<i>ilvBHCD^{OE}</i> , <i>panBCDE^{OE}</i> , <i>serA^{OE}</i> , <i>glyA^{OE}</i>	63 000	[49]
	<i>E. coli</i>	<i>zwf^{OE}</i> , <i>icd^{OE}</i> , <i>maeB^{OE}</i> , <i>pntAB^{OE}</i> , <i>sthA^{OE}</i> , <i>yjfb^{OE}</i> , <i>ppnk^{OE}</i> , <i>pos5^{OE}</i> <i>epd^{OE}</i> , <i>pdxJ^{OE}</i> , <i>dxs^{OE}</i>	63 580	[44]
VB6	<i>E. coli</i>	<i>dxs^{OE}</i> , <i>E. coli epd^{OE}</i>	78	[61]
	<i>S. meliloti</i>	<i>E. coli pdxA^{OE}</i> , <i>S. meliloti pdxJ^{OE}</i> , <i>thrB^{OE}</i>	1 300	[62]
	<i>B. subtilis</i>	<i>epd^{GR}</i> , <i>dxs^{GR}</i> , <i>pdxA^{GR}</i> , <i>pdxJ^{GR}</i> , <i>SerC^{OE}</i> , <i>ΔpdxH</i> , <i>B. subtilis pdxST^{OE}</i>	65	[64]
	<i>E. coli</i>	Modified biotinoperon ^{OE} , BioB ^{OE}	1 409	[65]
	<i>Agrobacterium</i>	Mutant	110	[68]
VB7	<i>E. coli</i>	<i>P. putida bioABFHCD^{OE}</i> , <i>B. subtilis bioW^{OE}</i> , <i>yeast sam2^{OE}</i>	970	[69]
			209	[76]
	<i>B. subtilis</i>	Mutant	>1 000	[70]
<i>P. mutans</i>	<i>bioC-bioH^{OE}</i> , <i>B. subtilis BioW-BioI^{OE}</i>	272	[73-75]	
VB9	<i>B. subtilis</i>	Block 5-methyltetrahydrofolate catabolic pathway	0.95	[82]
	<i>S. stipitis</i>	Wide-type	3.7	[89]
	<i>A. gossypii</i>	<i>Δmet7</i> , <i>Δade12</i> , <i>Δrib1</i> ; <i>fol^{OE}</i>	6.6	[90]
VB12	<i>S. meliloti</i>	<i>hemE^{OE}</i> , <i>ΔcobI</i>	156	[98]
	<i>P. freudenreichii</i>	<i>hem^{OE}</i> , <i>cob^{OE}</i> , <i>cbi^{OE}</i>	1.7	[97]
	<i>P. denitrificans</i>	<i>cobF^{OE}</i> - <i>cobM^{OE}</i> , <i>cogA^{OE}</i> , <i>cobE^{OE}</i>	214	[99]
	<i>P. shermanii</i>	Overexpression of related biosynthetic genes	206	[99]
VC	<i>G. oxydans</i>	Overexpression of related biosynthetic genes	30 500	[110-111]
	<i>E. coli</i> , <i>G. oxydans</i>	<i>E. coli</i> : expression of different sorbide/sorbitol dehydrogenase	72 400	[109]

中遇到了一些问题：在将代谢通量引入水溶性维生素合成途径后，产量提高不及预期乃至降低。这是由于目前对生物体代谢的认识仍处于较为浅显的阶段，对基因间相互作用与细胞资源平衡等方面的了解并不深入，许多调整代谢通路的操作并未考虑该过程对相关基因及代谢平衡的影响。基于此，合成生物学方法通过对代谢途径“由个体到整体的重新设计”，为优化代谢途径以及代谢途径与细胞的适配提供了新的思路与方法^[112]。除了对生物底盘的理性认知，最难也是急需的一点则是对预测合理编辑和合成生物底盘的软件工具的开发和应用。近期“新质生产力”作为最大的焦点之一在国内引起了广泛关注。目前世界正处于第四次工业革命的窗口期，合成生物产业作为新时代创新的主力军，必将为我国高质量发展作出不可或缺贡献。随着新技术的不断涌现以及对生物体代谢途径研究的不断深入，相信水溶性维生素的生物合成将为工业生产提供更好的方案。

REFERENCES

- [1] 王宏亮. 维生素的概述及研究进展[J]. 临床药物治疗杂志, 2022, 20(12): 40-45.
WANG HL. Overview and research progress of vitamins[J]. Clinical Medication Journal, 2022, 20(12): 40-45 (in Chinese).
- [2] 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]. [2024-02-28]. http://stock.finance.sina.com.cn/stock/go.php/vReport_Show/kind/lastest/rptid/641126651806/index.phtml.
- [3] NISHIHARA K, NAKAI MJKK. New process for vitamin B1 intermediate[J]. 1991, 55: 433.
- [4] CHUCK RJ, ZACHER U. Process for the preparation of nicotinic acid: US6077957A[P]. 2000-06-20.
- [5] NIELSEN J. Metabolic engineering[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001, 55(3): 263-283.
- [6] STEPHANOPOULOS G, VALLINO JJ. Network rigidity and metabolic engineering in metabolite overproduction[J]. Science, 1991, 252(5013): 1675-1681.
- [7] BAILEY JE. Toward a science of metabolic engineering[J]. Science, 1991, 252(5013): 1668-1675.
- [8] BENNER SA, SISMOUR AM. Synthetic biology[J]. Nature Reviews Genetics, 2005, 6: 533-543.
- [9] KEASLING JD. Synthetic biology for synthetic chemistry[J]. ACS Chemical Biology, 2008, 3(1): 64-76.
- [10] ANDRIANANTOANDRO E, BASU S, KARIG DK, WEISS R. Synthetic biology: new engineering rules for an emerging discipline[J]. Molecular Systems Biology, 2006, 2: 2006.0028.
- [11] TYO KE, ALPER HS, STEPHANOPOULOS GN. Expanding the metabolic engineering toolbox: more options to engineer cells[J]. Trends in Biotechnology, 2007, 25(3): 132-137.
- [12] CLINE JK, WILLIAMS RR, FINKELSTEIN J. Studies of crystalline vitamin B1. XVII. synthesis of vitamin B1[J]. Journal of the American Chemical Society, 1937, 59(6): 1052-1054.
- [13] HROMATKA O. Process of preparing Derivatives of pyrimidine: US2235638A[P]. 1941-03-18.
- [14] 中国维生素 B1 (单硝酸硫胺素)行业规模及市场格局分析报告[EB/OL]. [2024-02-28]. https://www.sohu.com/a/758568194_121825642.
- [15] 2022-2028 全球及中国维生素 B1 (食品应用)行业研究及“十四五规划”分析报告[EB/OL]. [2024-02-28]. <https://www.qyresearch.com.cn/reports/vitamin-b1-food-application-p940752.html>.
- [16] BEGLEY TP, DOWNS DM, EALICK SE, McLAFFERTY FW, van LOON APM, TAYLOR S, CAMPOBASSO N, CHIU HJ, KINSLAND C, REDDICK JJ, XI J. Thiamin biosynthesis in prokaryotes[J]. Archives of Microbiology, 1999, 171(5): 293-300.
- [17] SCHYNS G, POTOT S, GENG Y, BARBOSA TM, HENRIQUES A, PERKINS JB. Isolation and characterization of new thiamine-deregulated mutants of *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(23): 8127-36.
- [18] CARDINALE S, TUEROS FG, SOMMER MOA. Genetic-metabolic coupling for targeted metabolic engineering[J]. Cell Reports, 2017, 20(5): 1029-1037.
- [19] KAWASAKI T, IWASHIMA A, NOSE Y. Regulation of thiamine biosynthesis in *Escherichia coli*[J]. The Journal of Biochemistry, 1969, 65(3): 407-416.
- [20] ROCCHI R, WOLKERS-ROOIJACKERS JCM, LIAO ZT, TEMPELAARS MH, SMID EJ. Strain diversity in *Saccharomyces cerevisiae* thiamine production capacity[J]. Yeast, 2023, 40(12): 628-639.

- [21] KAWASAKI Y, NOSAKA K, KANEKO Y, NISHIMURA H, IWASHIMA A. Regulation of thiamine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Bacteriology, 1990, 172(10): 6145-6147.
- [22] STROBBE S, VERSTRAETE J, STOVE C, van der STRAETEN D. Metabolic engineering provides insight into the regulation of thiamin biosynthesis in plants[J]. Plant Physiology, 2021, 186(4): 1832-1847.
- [23] MINHAS AP, TULI R, PURI S. Pathway editing targets for thiamine biofortification in rice grains[J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 975.
- [24] ERNST H, SCHMIDT W, PAUST J. Preparation of riboflavin: US4567261A[P]. 1986-01-28.
- [25] ERNST H, ECKHARDT H, PAUST J. Preparation of riboflavin, and 4,5-dimethyl-N-(D)-ribityl-2-(O-alkoxyphenylazo)-aniline intermediates: US4656275A[P]. 1987-04-07.
- [26] 新用途加持维生素 B2 销量破纪录[EB/OL]. [2024-02-28]. https://www.yyjib.com.cn/yyjib/202108/20210823153308338_10868.shtml.
- [27] SZCZEŚNIAK T, KARABIN L, SZCZEPANKOWSKA M, WITUCH K. Biosynthesis of riboflavin by *Ashbya gossypii*. I. The influence of fats of the animal origin on the riboflavin production[J]. Acta Microbiologica Polonica Series B: Microbiologia Applicata, 1971, 3(1): 29-34.
- [28] PARK EY, ITO Y, NARIYAMA M, SUGIMOTO T, LIES D, KATO T. The improvement of riboflavin production in *Ashbya gossypii* via disparity mutagenesis and DNA microarray analysis[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 91(5): 1315-1326.
- [29] DONALD LH, CRAIG AW, MICHAEL JY, LINDA AB. Method for producing riboflavin with *Candida famata*: US5164303A[P]. 1992-11-17.
- [30] WU QL, CHEN T, GAN Y, CHEN X, ZHAO XM. Optimization of riboflavin production by recombinant *Bacillus subtilis* RH44 using statistical designs[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 76(4): 783-794.
- [31] HAN LK, HYANG C, HO LK, APT. KS, KWON HJ, HOON PY, HEE PJ. Microorganisms and process for the production of riboflavin by fermentation: EP1426450A1[P]. 2004-06-09.
- [32] KOIZUMI S, YONETANI Y, MARUYAMA A, TESHIBA S. Production of riboflavin by metabolically engineered *Corynebacterium ammoniagenes*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2000, 53(6): 674-679.
- [33] LIU S, HU WY, WANG ZW, CHEN T. Rational engineering of *Escherichia coli* for high-level production of riboflavin[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(41): 12241-12249.
- [34] THAKUR K, TOMAR SK, DE S. Lactic acid bacteria as a cell factory for riboflavin production[J]. Microbial Biotechnology, 2016, 9(4): 441-451.
- [35] KULKA M. Electrolytic oxidation of quinoline and 3-picoline[J]. Journal of the American Chemical Society, 1946, 68(12): 2472.
- [36] 烟酸(维生素 B3)市场出货量及增长分析[EB/OL]. [2024-02-18]. <https://www.shangyexinzhi.com/article/10495614.html>.
- [37] MATHEW CD, NAGASAWA T, KOBAYASHI M, YAMADA H. Nitrilase-catalyzed production of nicotinic acid from 3-cyanopyridine in *Rhodococcus rhodochromus* J1[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1988, 54(4): 1030-1032.
- [38] SHARMA NN, SHARMA M, KUMAR H, BHALLA TC. *Nocardia globerula* NHB-2: bench scale production of nicotinic acid[J]. Process Biochemistry, 2006, 41(9): 2078-2081.
- [39] BADOEI-DALFARD A, KARAMI Z, RAMEZANI-POUR N. Bench scale production of nicotinic acid using a newly isolated *Stenotrophomonas maltophilia* AC21 producing highly-inducible and versatile nitrilase[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2016, 133: S552-S559.
- [40] PAI O, BANOTH L, GHOSH S, CHISTI Y, BANERJEE UC. Biotransformation of 3-cyanopyridine to nicotinic acid by free and immobilized cells of recombinant *Escherichia coli*[J]. Process Biochemistry, 2014, 49(4): 655-659.
- [41] DONG TT, GONG JS, GU BC, ZHANG Q, LI H, LU ZM, LU ML, SHI JS, XU ZH. Significantly enhanced substrate tolerance of *Pseudomonas putida* nitrilase via atmospheric and room temperature plasma and cell immobilization[J]. Bioresource Technology, 2017, 244(Pt 1): 1104-1110.
- [42] GONG JS, ZHANG Q, GU BC, DONG TT, LI H, LI H, LU ZM, SHI JS, XU ZH. Efficient biocatalytic synthesis of nicotinic acid by recombinant nitrilase via high density culture[J]. Bioresource Technology, 2018, 260: 427-431.
- [43] BELENKY P, STEBBINS R, BOGAN KL, EVANS CR,

- BRENNER C. Nrt1 and Tna1-independent export of NAD⁺ precursor vitamins promotes NAD⁺ homeostasis and allows engineering of vitamin production[J]. *PLoS One*, 2011, 6(5): e19710.
- [44] ZOU SP, ZHANG Z, ZHAO K, LIU ZQ, ZHENG YG. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for improved D-pantothenic acid biosynthesis by enhancing NADPH availability[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2022, 187: 108603.
- [45] 我国维生素 B5 市场规模逐渐扩大 龙头企业已经显现 [EB/OL]. [2024-02-18]. <http://www.newsijie.com/chanye/yiyao/jujiao/2023/0612/11331477.html>.
- [46] 2022 年中国维生素 B5 (泛酸钙) 行业现状及竞争格局分析, 价格回暖, 市场竞争加剧 [EB/OL]. [2024-07-18]. <https://www.huaon.com/channel/trend/902287.html>.
- [47] LIU ZQ, SUN ZH. Cloning and expression of D-lactonohydrolase cDNA from *Fusarium moniliforme* in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Biotechnology Letters*, 2004, 26(24): 1861-1865.
- [48] LIU ZQ, SUN ZH, LENG Y. Directed evolution and characterization of a novel D-pantonohydrolase from *Fusarium moniliforme* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(16): 5823-5830.
- [49] HERMANN T, PATTERSON TA, PERO JG, YOCUM RR, BALDENIUS KU, BECK C, YOCUM RR. Processes for enhanced production of pantothenate: US7220561B2[P]. 2003-07-18.
- [50] TIGU F, ZHANG JL, LIU GX, CAI Z, LI Y. A highly active pantothenate synthetase from *Corynebacterium glutamicum* enables the production of D-pantothenic acid with high productivity [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(14): 6039-6046.
- [51] HIKICHI Y, MORIYA T, MIKI H, YAMAGUCHI T, NOGAMI I. Production of D-pantoic acid and D-pantothenic acid: US5518906A[P]. 1996-05-21.
- [52] MORIYA T, HIKICHI Y, MORIYA Y, YAMAGUCHI T. Process for producing D-pantoic acid and D-pantothenic acid or salts thereof: US5932457A[P]. 1997-01-08.
- [53] CHASSAGNOLE C, DIANO A, LÉTISSE F, LINDLEY ND. Metabolic network analysis during fed-batch cultivation of *Corynebacterium glutamicum* for pantothenic acid production: first quantitative data and analysis of by-product formation [J]. *Journal of Biotechnology*, 2003, 104(1/2/3): 261-272.
- [54] ZHANG B, CHEN L, JIN JY, ZHONG N, CAI X, ZOU SP, ZHOU HY, LIU ZQ, ZHENG YG. Strengthening the (R)-pantoate pathway to produce D-pantothenic acid based on systematic metabolic analysis [J]. *Food Bioscience*, 2021, 43: 101283.
- [55] ZHANG B, ZHANG XM, WANG W, LIU ZQ, ZHENG YG. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for D-pantothenic acid production [J]. *Food Chemistry*, 2019, 294: 267-275.
- [56] ABOUL-ENEIN HY, LOUTFY MA. Pyridoxine Hydrochloride [M]//FLOREY K. Analytical Profiles of Drug Substances. London: Academic Press. 1984: 447-86.
- [57] ZOU Y, SHI XJ, ZHANG GB, LI ZH, JIN C, SU WK. Improved “oxazole” method for the practical and efficient preparation of pyridoxine hydrochloride (vitamin B₆) [J]. *Organic Process Research & Development*, 2013, 17(12): 1498-1502.
- [58] 2023 年中国维生素 B6 行业市场研究报告 [EB/OL]. [2024-02-18]. https://www.sohu.com/a/685270688_120928700.
- [59] MUKHERJEE T, HANES J, TEWS I, EALICK SE, BEGLEY TP. Pyridoxal phosphate: biosynthesis and catabolism [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2011, 1814(11): 1585-1596.
- [60] YOCUM RR, WILLIAMS MK, PERO JG. Methods and organisms for production of B₆ vitamins: US20050164335A1[P]. 2005-07-28.
- [61] HOSHINO T, ICHIKAWA K, TAZOE M. Recombinant microorganism for the production of vitamin B₆: US20060228785[P]. 2006-10-12.
- [62] HOSHINO T, ICHIKAWA K, NAGAHASHI Y, TAZOE M. Microorganism and process for preparing vitamin B₆: US20060127992A1[P]. 2006-06-15.
- [63] COMMICHAU FM, ALZINGER A, SANDE R, BRETZEL W, MEYER FM, CHEVREUX B, WYSS M, HOHMANN HP, PRÁGAI Z. Overexpression of a non-native deoxyxylulose-dependent vitamin B₆ pathway in *Bacillus subtilis* for the production of pyridoxine [J]. *Metabolic Engineering*, 2014, 25: 38-49.
- [64] COMMICHAU FM, ALZINGER A, SANDE R, BRETZEL W, REUB DR, DORMEYER M, CHEVREUX B, SCHULDES J, DANIEL R, AKEROYD M, WYSS M, HOHMANN HP, PRÁGAI Z. Engineering *Bacillus subtilis* for the conversion of the antimetabolite 4-hydroxy-L-threonine to pyridoxine [J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 29: 196-207.
- [65] LIU LX, LI JL, GAI YM, TIAN ZZ, WANG YY, WANG TH, LIU P, YUAN QQ, MA HW, LEE SY, ZHANG DW. Protein engineering and iterative

- multimodule optimization for vitamin B₆ production in *Escherichia coli*[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 5304.
- [66] STERNBACH LH, WOLF GM. Synthesis of biotin: US2489235A[P]. 1949-11-22.
- [67] 2023–2029 全球与中国维生素 B7 (生物素)市场现状及未来发展趋势[EB/OL]. [2024-02-18]. <https://www.qyresearch.com.cn/reports/vitamin-b7-biotin-p2058807.html>.
- [68] STREIT WR, ENTCHEVA P. Biotin in microbes, the genes involved in its biosynthesis, its biochemical role and perspectives for biotechnological production[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 61(1): 21-31.
- [69] KANZAKI N, KAWAMOTO T, MATSUI J, NAKAHAMA K, IFUKU O. Microorganism resistant to threonine analogue and production of biotin: US6284500B1[P]. 2001-09-04.
- [70] BOWER SG, PERKINS JB, YOCUM RR, PERO JG. Biotin biosynthesis in *Bacillus subtilis*: US6057136A[P]. 2000-05-02.
- [71] IFUKU O, HAZE S, KISHIMOTO J, KOGA N, YANAGI M, FUKUSHIMA S. Sequencing analysis of mutation points in the biotin operon of biotin-overproducing *Escherichia coli* mutants[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1993, 57(5): 760-765.
- [72] CHAKRAVARTTY V, CRONAN JE. The wing of a winged helix-turn-helix transcription factor organizes the active site of BirA, a bifunctional repressor/ligase[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(50): 36029-36039.
- [73] LIN S, CRONAN JE. Closing in on complete pathways of biotin biosynthesis[J]. *Molecular BioSystems*, 2011, 7(6): 1811-1821.
- [74] IKEDA M, NAGASHIMA T, NAKAMURA E, KATO R, OHSHITA M, HAYASHI M, TAKENO S. *In vivo* roles of fatty acid biosynthesis enzymes in biosynthesis of biotin and α -lipoic acid in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(19): e01322-17.
- [75] XIAO F, WANG HJ, SHI ZW, HUANG QY, HUANG L, LIAN JZ, CAI J, XU ZN. Multi-level metabolic engineering of *Pseudomonas putillensis* ATCC31014 for efficient production of biotin[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 61: 406-415.
- [76] WEI PP, ZHU FC, CHEN CW, LI GS. Engineering a heterologous synthetic pathway in *Escherichia coli* for efficient production of biotin[J]. *Biotechnology Letters*, 2021, 43(6): 1221-1228.
- [77] MANANDHAR M, CRONAN JE. Pimelic acid, the first precursor of the *Bacillus subtilis* biotin synthesis pathway, exists as the free acid and is assembled by fatty acid synthesis[J]. *Molecular Microbiology*, 2017, 104(4): 595-607.
- [78] 行业报告: 全球叶酸原料药市场规模分析[EB/OL]. [2024-02-18]. <https://zhuanlan.zhihu.com/p/575981001>.
- [79] LEBLANC J, GIORI G, SMID E, HUGENHOLTZ J, SESMA F. Folate production by lactic acid bacteria and other food-grade microorganisms[J]. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, 2007, 1: 329-39.
- [80] HUGENHOLTZ J, SMID EJ. Nutraceutical production with food-grade microorganisms[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, 13(5): 497-507.
- [81] HAYEK SA, IBRAHIM SA. Current limitations and challenges with lactic acid bacteria: a review[J]. *Food and Nutrition Sciences*, 2013, 4(11): 73-87.
- [82] JÄGERSTAD M, JASTREBOVA J. Occurrence, stability, and determination of formyl folates in foods[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(41): 9758-9768.
- [83] CURRAN KA, LEAVITT JM, KARIM AS, ALPER HS. Metabolic engineering of muconic acid production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Metabolic Engineering*, 2013, 15: 55-66.
- [84] ZHU LH, WANG JH, XU S, SHI GY. Improved aromatic alcohol production by strengthening the shikimate pathway in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Process Biochemistry*, 2021, 103: 18-30.
- [85] HJORTMO S, PATRING J, JASTREBOVA J, ANDLID T. Inherent biodiversity of folate content and composition in yeasts[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2005, 16(6/7): 311-316.
- [86] SU YK, WILLIS LB, JEFFRIES TW. Effects of aeration on growth, ethanol and polyol accumulation by *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 and *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2015, 112(3): 457-469.
- [87] JEFFRIES TW, van VLEET JRH. *Pichia stipitis* genomics, transcriptomics, and gene clusters[J]. *FEMS Yeast Research*, 2009, 9(6): 793-807.
- [88] SHIN M, KIM JW, YE SJ, KIM S, JEONG D, LEE DY,

- KIM JN, JIN YS, KIM KH, KIM SR. Comparative global metabolite profiling of xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* SR8 and *Scheffersomyces stipitis*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(13): 5435-5446.
- [89] MASTELLA L, SENATORE VG, GUZZETTI L, COPPOLINO M, CAMPONE L, LABRA M, BELTRANI T, BRANDUARDI P. First report on Vitamin B₉ production including quantitative analysis of its vitamers in the yeast *Scheffersomyces stipitis*[J]. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts, 2022, 15(1): 98.
- [90] SERRANO-AMATRIAIN C, LEDESMA-AMARO R, LÓPEZ-NICOLÁS R, ROS G, JIMÉNEZ A, REVUELTA JL. Folic acid production by engineered *Ashbya gossypii*[J]. Metabolic Engineering, 2016, 38: 473-482.
- [91] ESCHENMOSER A. Organische naturstoffsynthese heute vitamin B12 als beispiel[J]. Naturwissenschaften, 1974, 61(12): 513-525.
- [92] 2023 年维生素 B12 市场需求分析: 中国维生素 B12 市场规模为 4.15 亿元 [EB/OL]. [2024-02-18]. <https://www.chinabgao.com/info/1248065.html>.
- [93] KANG Z, ZHANG JL, ZHOU JW, QI QS, DU GC, CHEN J. Recent advances in microbial production of δ -aminolevulinic acid and vitamin B₁₂[J]. Biotechnology Advances, 2012, 30(6): 1533-1542.
- [94] MARTENS JH, BARG H, WARREN MJ, JAHN D. Microbial production of vitamin B₁₂[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 58(3): 275-285.
- [95] KIATPAPAN P, YAMASHITA M, KAWARAICHI N, YASUDA T, MUROOKA Y. Heterologous expression of a gene encoding cholesterol oxidase in probiotic strains of *Lactobacillus plantarum* and *Propionibacterium freudenreichii* under the control of native promoters[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2001, 92(5): 459-465.
- [96] KIATPAPAN P, HASHIMOTO Y, NAKAMURA H, PIAO YZ, ONO H, YAMASHITA M, MUROOKA Y. Characterization of pRGO1, a plasmid from *Propionibacterium acidipropionici*, and its use for development of a host-vector system in propionibacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(11): 4688-4695.
- [97] PIAO YZ, YAMASHITA M, KAWARAICHI N, ASEGAWA R, ONO H, MUROOKA Y. Production of vitamin B12 in genetically engineered *Propionibacterium freudenreichii*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2004, 98(3): 167-173.
- [98] CAI YY, XIA MM, DONG HN, QIAN Y, ZHANG TC, ZHU BW, WU JC, ZHANG DW. Engineering a vitamin B₁₂ high-throughput screening system by riboswitch sensor in *Sinorhizobium meliloti*[J]. BMC Biotechnology, 2018, 18(1): 27.
- [99] MOORE SJ, MAYER MJ, BIEDENDIECK R, DEERY E, WARREN MJ. Towards a cell factory for vitamin B₁₂ production in *Bacillus megaterium*: bypassing of the cobalamin riboswitch control elements[J]. New Biotechnology, 2014, 31(6): 553-561.
- [100] FANG H, LI D, KANG J, JIANG PT, SUN JB, ZHANG DW. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for *de novo* biosynthesis of vitamin B₁₂[J]. Nature Communications, 2018, 9: 4917.
- [101] 2022 年中国维生素 C 发展现状、市场竞争格局及发展趋势 [EB/OL]. [2024-02-28]. <https://www.163.com/dy/article/HR45JK710552SV13.html>.
- [102] Reichstein T, Grussner A. Productive synthesis of L-ascorbic acid, vitamin C[J]. Helvetica Chimica Acta, 1934.
- [103] 尹光琳, 陶增鑫, 于龙华, 王大耜, 谈家林, 严自正, 宁文珠, 王长会, 王书鼎, 姜慧凤, 张秀明, 冯晓云, 赵强, 魏文巧. L-山梨糖发酵产生维生素 C 前体: 2-酮基-L-古龙酸的研究 I. 菌种的分离筛选和鉴定[J]. 微生物学报, 1980, 20(3): 246-251.
- YIN GL, TAO ZX, YU LH, WANG DS, TAN JL, YAN ZZ, NING WZ, WANG CH, WANG SD, JIANG HF, ZHANG XM, FENG XY, ZHAO Q, WEI WQ. Studies on the production of vitamin C precursor 2-ketoyl-L-Gulonic acid from L-sorbate fermentation I. Isolation, screening and identification of strains[J]. Acta Microbiologica Sinica, 1980, 20(3): 246-251 (in Chinese).
- [104] 满都拉, 杨伟超, 徐慧, 张忠泽. 维生素 C 二步发酵中伴生菌促进产酸菌产酸机制的研究 [C]. 中国微生物学会学术年会, 2013.
- MAN DL, YANG WC, XU H, ZHANG ZZ. Study on the mechanism of promoting acid-producing bacteria by associated bacteria in the two-step fermentation of vitamin C [C]. Annual Conference of Chinese Society of Microbiology, 2013 (in Chinese).
- [105] WANG CY, LI Y, GAO ZW, LIU LC, WU YC, ZHANG MY, ZHANG TY, ZHANG YX. Reconstruction and analysis of carbon metabolic

- pathway of *Ketogulonicigenium vulgare* SPU B805 by genome and transcriptome[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 17838.
- [106] WANG CY, LI Y, GAO ZW, LIU LC, ZHANG MY, ZHANG TY, WU CF, ZHANG YX. Establishing an innovative carbohydrate metabolic pathway for efficient production of 2-keto-L-gulonic acid in *Ketogulonicigenium robustum* initiated by intronic promoters[J]. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17(1): 81.
- [107] 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[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2005, 69(3): 659-662.
- [108] SAUER M, BRANDUARDI P, VALLI M, PORRO D. Production of L-ascorbic acid by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(10): 6086-6091.
- [109] ZENG WZ, WANG PP, LI N, LI JH, CHEN J, ZHOU JW. Production of 2-keto-L-gulonic acid by metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 318: 124069.
- [110] LI D, DENG ZW, HOU XD, QIN ZJ, WANG XL, YIN DJ, CHEN Y, RAO YJ, CHEN J, ZHOU JW. Structural insight into the catalytic mechanisms of an L-sorbosone dehydrogenase[J]. *Advanced Science*, 2023, 10(30): e2301955.
- [111] LI G, LI D, ZENG WZ, QIN ZJ, CHEN J, ZHOU JW. Efficient production of 2-keto-L-gulonic acid from D-glucose in *Gluconobacter oxydans* ATCC9937 by mining key enzyme and transporter[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 384: 129316.
- [112] EL-SAMAD H. The next emergence of synthetic biology[J]. *GEN Biotechnology*, 2024, 3(1): 1-2.

(本文责编 郝丽芳)