

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.202401015



维生素 B₆ 的合成代谢及其生产应用

李丹妮, 郑忠亮

(武汉大学 生命科学学院, 湖北 武汉 430072)

摘要: 为了得到环保、便捷且效率更高的维生素 B₆ 代谢生产途径,综述了维生素 B₆ 作为重要的生物活性小分子在不同生物体中参与天然合成代谢途径及目前研究发现的偶然代谢途径;同时,总结了利用生物酶法与代谢工程生产维生素 B₆ 的生物合成法。结果表明:通过生物合成维生素 B₆ 可以代替化学合成法,但未来仍需要研究者对代谢途径进行不断优化、筛选,以得到更高产量的维生素 B₆。

关键词: 维生素 B₆; 系统代谢工程; 偶然途径; 酶催化

中图分类号: Q 56

文献标志码: A

文章编号: 1000-5013(2024)05-0588-08

Synthesis Metabolism and Production Application of Vitamin B₆

LI Danni, ZHENG Zhongliang

(College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: In order to achieve an environmentally friendly, convenient, and more efficient metabolic production pathway for vitamin B₆, the natural metabolic and serendipitous pathways of vitamin B₆ as an important bioactive small molecule in various organisms are comprehensively reviewed. Additionally, the biosynthesis method of vitamin B₆ production by enzyme and metabolic engineering techniques is summarized. The results indicate that biosynthesis can serve as an alternative method to chemical synthesis for producing vitamin B₆. However, further research is needed to continuously optimize and screen the metabolic pathway to obtain higher yields of vitamin B₆.

Keywords: vitamin B₆; system metabolic engineering; serendipitous pathway; enzyme catalysis

维生素 B₆ (vitamin B₆, VB₆) 是一种重要的水溶性 B 族维生素,由吡哆醇、吡哆醛、吡哆胺、磷酸吡哆醇、磷酸吡哆醛、磷酸吡哆胺 6 种形式组成,其中,磷酸吡哆醛(pyridoxal 5-phosphate, PLP)具有生物活性,磷酸吡哆胺(pyridoxamine 5-phosphate, PMP)只在较小程度上具有活性。PLP 作为生物体内的活性小分子,以辅酶的形式参与各种代谢过程,至今为止在生物体中发现了 160 多种利用 PLP 作为辅因子的酶,这些 PLP 依赖性酶涵盖了多种反应类型,如外消旋、脱羧、 β/γ -消除和取代反应^[1-3]。最近有研究发现,在自然界早期进化过程中,PLP 和金属的结合可以替代酶促转氨基反应,这些研究结果证明了 PLP 作为常见的辅酶即使在没有酶的情况下也可以充当代谢反应的催化剂^[4]。

在人体的肠道中,只有非磷酸化的 VB₆ 形式才可以进入肠细胞,从肠细胞出去以后在肝脏中被磷酸化,VB₆ 的 6 种形式在不同的细胞中有不同的运输形式。同时,PLP 作为人体中的活性小分子,以辅

收稿日期: 2024-01-18

通信作者: 郑忠亮(1976-),男,副教授,博士,主要从事酶工程、应用生物化学的研究。E-mail: biochem@whu.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30800190, 81372441)

酶的形式协助酶参与神经递质合成、叶酸合成、血红素生物合成、单碳单元转移,从而促进核酸生物合成、鞘磷脂合成和碳水化合物的代谢。维生素 B₆ 还与糖尿病、心脏病、癌症、心血管等多种疾病有关^[5-6]。除了与上述疾病的发生机制相关,VB₆ 还可以应用到临床治疗中。新冠肺炎患者通常产生过度的 T 细胞反应和过量的促炎细胞因子来应对病毒,PLP 有助于抑制部分患者的细胞因子风暴与炎症的发生^[7-8]。P57 是一种细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂^[9],它通过调节 VB₆ 代谢,在低温治疗中有潜在的应用价值。磷酸吡哆醛激酶(pyridoxal kinase,PdxK)是 P57 在体温调节中的一个未知的靶点,在临床治疗环境中通过降低体温保护人体组织在神经血管、心血管缺血性疾病中避免造成细胞死亡^[10]。

基于此,本文综述了维生素 B₆ 的合成代谢及其生产应用。

1 维生素 B₆ 的合成代谢通路

生物体存在 2 种不同的 VB₆ 从头合成途径,即 5-磷酸脱氧木酮糖(deoxyxylulose 5-phosphate, DXP)依赖性途径和非依赖性途径。DXP 依赖性途径主要存在于 α -和 γ -蛋白细菌中,如革兰氏阴性模式菌大肠杆菌,并且在大肠杆菌的这一途径中,磷酸吡哆醇磷酸酶尚未被鉴定,可能使用具有非特异性底物的磷酸酶^[1]。DXP 非依赖性生物合成途径仅涉及 PLP 合成酶复合体(PLP synthase complex, PdxST),在革兰氏阳性模式菌枯草芽孢杆菌、真菌、原生动物、古菌、植物和后生动物中发现。至今为止还没有发现同时具有 2 种 VB₆ 从头合成途径的生物体,包括人类和其他哺乳动物在内的许多生物体只存在 VB₆ 相互转化的补救途径^[11]。

1.1 DXP 依赖性途径

DXP 依赖性途径含有来自 2 个分支途径的 7 种酶,均起始于丙三醇的磷酸化途径,如图 1 所示。

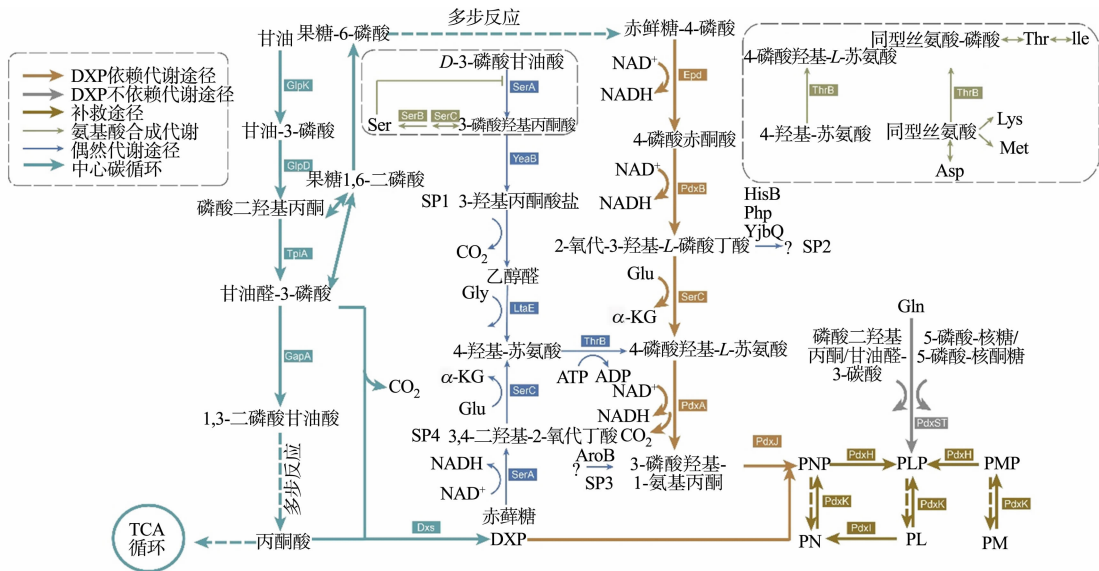


图 1 维生素 B₆ 相关的代谢合成途径

Fig. 1 Metabolic synthesis pathways related to vitamin B₆

4-磷酸赤藓糖(erythrose 4-phosphate,E4P)在 4-磷酸赤藓糖脱氢酶(erythrose 4-phosphate dehydrogenase,Epd)及辅酶 NAD⁺ 的催化下脱氢生成 4-磷酸赤酮酸(4-phosphoerythronate,4PE),接着在 4-磷酸赤酮酸脱氢酶(4-phosphoerythronate dehydrogenase,PdxB)及辅酶 NAD⁺ 的催化下脱氢生成 2-氧代-3-羟基-4-磷酸丁酸(2-oxo-3-hydroxy-4-phosphobutanoate,OHPB),PdxB 在一些生物体中被同源酶 PdxR 取代,如在 *Sinorhizobium meliloti* 中^[12]。OHPB 与谷氨酸(glutamate,Glu)在 3-磷酸丝氨酸氨基转移酶(3-phosphoserineaminotransferase,SerC)的催化作用下生成 α -酮戊二酸(α -ketoglutarate, α -KG)与 4-磷酸羟基-L-苏氨酸(4-phosphohydroxy-L-threonine,4HTP), α -KG 可以作为 PdxB 的生理再氧化剂。4HTP 作为底物在 4-磷酸羟基-L-苏氨酸脱氢酶(4-phosphohydroxy-L-threonine dehydrogenase,PdxA)及辅酶 NAD⁺ 的催化下生成 3-磷酸羟基-1-氨基丙酮(3-phosphohydroxy-1-aminoace-

tone,PHA),3-磷酸甘油醛(glyceraldehyde 3-phosphate,G3P)与丙酮酸(pyruvate,Pyr)在 1-脱氧木酮糖 5-磷酸合成酶(1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase,DXS)作用下生成 DXP,其与 PHA 在磷酸吡哆醇合成酶(PNP synthase,PdxJ)催化下生成磷酸吡哆醇(pyridoxine 5-phosphate,PNP),PNP 在 PNP 氧化酶(PNP oxidase,PdxH)氧化下生成终产物 PLP。

1.2 非 DXP 依赖性途径

非 DXP 依赖性途径由 PdxST 合酶组成,其中 PdxT 部分亚基通过序列比较预测是 I 类谷氨酰胺酶家族的成员,特征是半胱氨酸-组氨酸-谷氨酸催化三联体。谷氨酰胺氨基转移酶通常由 2 个结构域组成,即合酶和谷氨酰胺酶结构域。在谷氨酰胺酶结构域中,谷氨酰胺被水解产生谷氨酸和氨,然后被转移到合酶结构域,并用于合成相应的含氮化合物 PLP。谷氨酰胺酰胺转移酶复合物由 24 个蛋白质单元组成,这些蛋白质单元像齿轮一样组装,是 1 个与 12 个 PdxT 亚基相连的 12 元体 PdxS。在 PdxS 的 N-末端有 1 个独特的 α -螺旋,命名为 α N,催化与 PdxT 亚基的相互作用^[11,13]。在模式菌枯草芽孢杆菌的 PdxT 中, β 3 折叠和螺旋 α 3 区域之间 Gly⁴⁷与 Ala⁸⁰的肽氮形成氧阴离子孔,其被发现与 PdxS、谷氨酰胺形成三元复合物以进行正确的催化^[14]。该三元结构表明 PdxT 内部的氧阴离子构象通过与 PdxS 的 α N 相互作用而稳定,也因此证明了二者之间的依赖性。此外,PdxST 合酶复合物的结构表明,氨在谷氨酰胺酶和合酶活性位点之间的远程转移通过 PdxS β -桶内富含甲硫氨酸的隧道。谷氨酰胺酰胺转移酶复合体结构复杂、催化效率低,不利于通过改造手段提高酶的催化活性,因此,在 VB₆ 发酵生产的改良过程中很少选择这条代谢途径^[1,14]。

1.3 维生素 B₆ 补救途径

在生物体中,无论是否含有维生素 B₆ 的从头合成途径,它都存在补救途径。不含从头合成途径的有机体可以通过从外界吸收吡哆醇(pyridoxine,PN)、吡哆醛(pyridoxal,PL)和吡哆胺(pyridoxamine,PM)在体内相互转化为维生素 B₆ 的 6 种形式。

补救途径主要含有 2 种酶:PdxK 和 PdxH,PN/PL/PM 均可以在前者的作用下生成 PNP/PLP/PMP。在大肠杆菌和其他原核生物中发现含有由基因 *pdxY* 编码的同源 PL 激酶 PdxY,PdxY 与 PdxK 激酶具有非常低的序列同一性(约 30%),该蛋白也在补救途径中发挥作用,但与 PdxK 相比,催化活性非常低。PNP 与 PMP 均可以在 PdxH 的催化下生成 PLP,3 种磷酸化的 VB₆ 分子在磷酸酶的作用下脱磷酸化。研究者发现,*ybhA* 基因编码一种 PLP 磷酸酶,该酶属于卤酸脱卤酶(HAD)超家族。在大肠杆菌体内发现 1 种 PdxI 酶,在辅酶 NADP⁺ 的协助下,将 PL 还原成 PN。PLP 和 PMP 的互转在转氨酶的作用下进行。据研究,在枯草芽孢杆菌中可能不存在 PdxH 酶,枯草芽孢杆菌中的 *pdxST* 敲除突变体对 PL 是营养缺陷型,而 PN 与突变体的互补性非常弱。枯草芽孢杆菌可以吸收并磷酸化 PL,但很难(或不能)为其生长需求募集 PN,这很可能是由于缺乏专用的 PNP 氧化酶,并且在枯草芽孢杆菌基因组中缺失了编码大肠杆菌 PNP 氧化酶的 *pdxH* 同源物^[15-16]。

2 维生素 B₆ 的生产应用

2.1 维生素 B₆ 的生物合成

纵观维生素 B₆ 的生产过程,从化学合成法到采用绿色、环保的微生物发酵,展现了现代生物基因改造手段的不断进化。化学合成大多围绕噻唑法不断改良,产率提高的同时也引发了环保的问题,化学过程使用了过多的溶剂,如苯和甲苯,且工业副产品处理困难、成本高昂,如大量的磷酸盐^[17]。此外,高温和氯化反应增加了安全风险,国内多家工厂曾出现因生产带来污染而停工的现象,通过微生物生产维生素也因此快速发展。

虽然 PLP 是在生物体内起作用的维生素 B₆ 形式,由于人体肠道无法吸收磷酸化的 VB₆,因此,商业化的维生素 B₆ 大多为 PN^[6]。VB₆ 合成的研究集中在 DXP 依赖途径,所用的工程菌主要有大肠杆菌(*Escherichia coli*,*E. coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*,*B. subtilis*)、苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*,*S. meliloti*)等。早在 20 世纪 70 年代,人们就将目光投入到原核生物上,最早基因工程还没有达到现在的水平,只通过表达野生型菌株得到维生素 B₆。随着对微生物体内代谢途径研究的

深入,研究者开始对上述模式菌株进行简单改造,通过过表达 VB₆ 合成途径中的一种或多种天然或异源的酶来达到提高 VB₆ 的产量的目的^[18-20]。工程菌生产维生素 B₆ 的优化方式,如表 1 所示。表 1 中:*t* 为时间;*ρ* 为产量;*Ec* 为 *Escherichia coli*; *Sm* 为 *Sinorhizobium meliloti*; *Eme* 为 *Ensifer meliloti*; *Gni* 为 *Glaciecola nitratreducens*; MM 为基本培养基。

表 1 工程菌生产维生素 B₆ 的优化方式

Tab. 1 Optimization method for producing vitamin B₆ by engineering bacteria

| 菌株 | 培养基 | 优化策略 | 产物 | $\rho/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ | <i>t</i> /h | 文献 |
|---|---------------------|---|-----------------|--------------------------------------|-------------|------|
| <i>Escherichia coli</i> | MM+酵母提取物 | <i>epd</i> - <i>Ec</i> , <i>pdxJ</i> - <i>Ec</i> , <i>dxs</i> - <i>Ec</i> | VB ₆ | >78 | 31 | [18] |
| <i>Sinorhizobium meliloti</i> IFO14782 | MM+酵母提取物 | — | PN | 103 | 168 | [10] |
| <i>Sinorhizobium meliloti</i> IFO14782 | MM+酵母提取物 | <i>pdxP</i> - <i>Sm</i> , <i>pdxJ</i> - <i>Ec</i> | PN | 149 | 216 | [10] |
| <i>Sinorhizobium meliloti</i> IFO14782 | MM+酵母提取物 | <i>pdxJ</i> - <i>Sm</i> | PN | 362 | 168 | [10] |
| <i>Sinorhizobium meliloti</i> IFO14782 | MM+酵母提取物 | <i>epd</i> - <i>Ec</i> , <i>pdxJ</i> - <i>Sm</i> | PN | 1 300 | 168 | [10] |
| <i>Bacillus subtilis</i> | MM+酵母提取物+ 4HT+DX | Δ <i>pdxST</i> , <i>epd</i> - <i>Ec</i> , <i>pdxR</i> 和 <i>serC</i> 一个表达盒, <i>pdxA</i> - <i>Sm</i> 与 <i>pdxJ</i> - <i>Sm</i> 一个表达盒 | PN | 54 | 72 | [14] |
| <i>Bacillus subtilis</i> | MM+氨基酸 混合物+4HT | Δ <i>pdxST</i> , <i>pdxA</i> - <i>Ec</i> 与 <i>pdxJ</i> - <i>Sm</i> 一个表达盒, <i>bcaP</i> (Δ 1094 ~ 1 159), P_{spac} <i>dxs</i> <i>erm</i> , Δ <i>trpEDFCAB</i> ; <i>tet P</i> * _{hom} (T63C) | PN | 72 | 72 | [15] |
| <i>Escherichia coli</i> | FM1.4 培养基 | Δ <i>pdxH</i> :: <i>pdxST</i> , Δ <i>pta</i> :: <i>Ptac</i> - <i>pdxP</i> (<i>Eme</i>), <i>p15ASL</i> - <i>Ptac</i> - <i>epd</i> (<i>Gni</i>)- <i>pdxB</i> (<i>Ec</i>) - <i>dxs</i> (<i>Eme</i>)- <i>P</i> _{J231119} - <i>serC</i> (<i>Ec</i>), <i>pRSFDuet-1</i> - <i>P3</i> - <i>pdxA</i> (<i>H136N</i>)- <i>pdxJ</i> (<i>E104T</i> / <i>I218L</i> / <i>G194C</i>)突变体 | PN | 1 400 | 48 | [1] |

Commichau 等^[15]通过在枯草芽孢杆菌中过表达 DXP 依赖性合成维生素 B₆ 途径的 5 个基因生成 PN 生产菌株,将来源于大肠杆菌和苜蓿中华根瘤菌的基因 *pdxA*, *pdxJ*, *epd*, *serC* 与 *pdxR* 组装到 2 个表达盒中,并插入到敲除了 *pdxST* 的枯草芽孢杆菌染色体。通过优化生长条件并共同加入 4-羟基-苏氨酸(4-hydroxy-*L*-threonine, 4HT)和脱氧木酮糖(deoxyxylulose, DX)来提高产率。尽管通过在培养基中加入特定被 4HT 抑制合成的氨基酸可以优化生长条件,但是氨基酸的存在仍会产生反馈抑制,改造后的菌株对引入的异源维生素 B₆ 途径的一种或多种酶存在强烈的选择压力,暴露了异源表达生产 PN 技术的局限性。

前人的研究成果显示,仅利用过表达某种或某几种基因可能会暂时提高维生素 B₆ 的产量,但是得到的工程菌不稳定、遗传性差,远不如通过适应性突变得到的菌株性状稳定,推测原因有以下 3 点。

- 1) 参与 DXP 代谢途径的 7 种酶的动力学性质不同,其中, *PdxA* 与 *PdxJ* 属于限速酶,在代谢通路中催化速率较慢,而 *Epd*, *PdxB* 与 *SerC* 反应速率快,如果不控制酶的表达量很容易造成毒性中间产物 4HTP 过度积累,最终使菌株死亡,4HTP 合成的过程使同型丝氨酸激酶(homoserine kinase, ThrB)酶促反应功能单一化,抑制了多种氨基酸的合成(图 1)。
- 2) 生物体内内环境的调控作用会维持 PLP 的稳定,据显示,PLP 仅以非常小的催化量被需要,并且一些酶储存 PLP,其可以被转移到依赖于 PLP 的载酶。再加上低效的酶通过维生素 B₆ 生物合成途径的代谢通量非常低,因此,实际生产中应减弱终产物 PLP 对 VB₆ 合成途径的抑制。
- 3) 模式菌株被动地转入基因后进行发酵并不稳定,几代以后容易造成基因丢失,而通过改变培养环境得到的适应性突变菌株却可以得到稳定的遗传。
- 有了以上研究经验,为了提高生产菌的遗传稳定性,Commichau 等^[16]运用适应性突变的策略,在添加了 4HT 的培养基中获得了耐受型枯草芽孢杆菌突变菌,并发现 *bcaP* 基因的 1 094~1 159 碱基缺失,由于该基因编码 *B. subtilis* 和 *Lactococcus lactis* 中的支链氨基酸渗透酶,推测 *bcaP* 的缺失减慢了

4HT 的吸收速度,并解除了对氨基酸合成的竞争性抑制。*hom-thrC-thrB* 操纵子编码参与苏氨酸生物合成转化的酶,通过适应性突变所得到的耐受型菌株的启动子发生变异,命名该突变为 P_{*hom} (T63C)。 P_{*hom} (T63C)启动子突变导致对苏氨酸抑制的解除,增强了对干扰苏氨酸生物合成的 4-HO-Thr 的抗性。芳香族化合物的积累表明,新的维生素 B_6 代谢途径与色氨酸生物合成途径之间存在相互干扰。为了防止菌株产生副产物,研究者构建了删除色氨酸操纵子的菌株 $\Delta trpEDFCAB$,发现此时维生素 B_6 途径和 Trp 生物合成途径之间的干扰解除。为了提高突变株的产率,在添加了 DX 的培养基中获得了适应性突变,在枯草芽孢杆菌中组成型表达生成 DXP 的同源酶(基因型 $P_{spac} dxs erm$),至此,在宿主菌体内产生了非天然 DXP 依赖性 VB_6 合成途径^[11,16]。

近期,Liu 等^[1]通过迭代多模块优化策略做出了以下改进。

1) 在大肠杆菌系统中解耦连 PN 和 PLP 的生产途径,有机体不会因为 PLP 含量过高而抑制 DXP 依赖途径的发生。在敲除 *pdxH* 基因的位点插入 *pdxSH*,并通过调节核糖体结合位点(ribosomebinding site,RBS)强度提高翻译强度。同时,将 PNP 磷酸酶(*PNP phosphatase, pdxP*)基因插入大肠杆菌的磷酸乙酰转移酶(*phosphate acetyltransferase, pta*)基因座中,从而避免了 PNP 积累对氨基酸代谢的抑制。

2) 对关键酶 PdxA 和 PdxJ 进行理性设计,通过将 PdxA 的 His136 位点突变为 Asn 氨基酸,发现可以使酶与底物产生直接相互作用,有利于 PdxA 的稳定催化,从而提高收率。PdxJ 的突变体(E104T/I218L/G194C)也被证明可以提高酶的催化能力。

3) 敲除 3-磷酸甘油酸脱氢酶基因(*3-phospho-D-glycerate dehydrogenase, serA*)补充甘氨酸、 α -KG,促进 SerC 从主要合成丝氨酸转向对 VB_6 的合成,以甘氨酸(glycine, Gly)替代丝氨酸(serine, Ser),以防止丝氨酸的浓度过高而对菌株造成的生长抑制。 α -KG 作为 PdxB 的生理再氧化剂促进了代谢的进行。

4) 把维生素 B_6 合成途径划分为上游推动部分和下游拉动部分,在 4HTP 处分离。上游部分由低拷贝质粒表达 *Epd*, *Dxs*, *PdxB* 和 *SerC* 组成,通过提供足够的 DXP 和中间 4HTP 来增强推动驱动力,下游通路由高拷贝质粒表达关键酶 PdxA 和 PdxJ 组成以增加拉力。

2.2 维生素 B_6 的偶然途径合成

研究者对模式菌株大肠杆菌与枯草芽孢杆菌突变体进行抑制因子筛选,使其携带天然途径或异源基因的突变,从而揭示了 PLP 生物合成的新途径。这些途径由具有多种底物的非特异性酶和已经参与维生素 B_6 生物合成的酶组成。因此,*E. coli* 与 *B. subtilis* 含有多种混杂的酶,导致所谓的偶然途径(serendipitous pathway, SP),使细菌绕过被破坏的维生素 B_6 生物合成途径。

以大肠杆菌为例,截止目前,研究者已发现至少 4 条偶然途径可以在敲除了 VB_6 合成途径中的酶时提供临时的补充合成途径(图 1)。他们通过将含有 3 276 个来自大肠杆菌的 ORF 引入质粒中,并在敲除 *pdxB* 基因的大肠杆菌中过表达,发现其中有 7 种不同基因的过表达恢复了 $\Delta pdxB$ 菌株的生长。

通路 1 的具体途径已经被研究者诠释,这条途径是通过 YeaB(未知具体功能)、*L*-丙氨酸醛缩酶(*L-allo-threonine aldolase, LtaE*)和 ThrB 将 3-磷酸羟基丙酮酸盐(3-phosphohydroxy-pyruvate, 3PHP)从丝氨酸合成途径拉向合成维生素 B_6 。这种新型代谢途径所产生的中间产物可能含有对宿主生长不利的物质,如 4HT 与 3-羟基丙酮酸(3-hydroxy-pyruvate, 3HP),3HP 抑制丝氨酸和支链氨基酸的产生,而 4HT 干扰苏氨酸的生物合成。正常代谢网络的成分以 3 种方式干扰新的 PLP 合成途径:丝氨酸通过负反馈机制抑制 SerA 作用,并阻止新途径中第 1 个中间体 3PHP 的形成;同型丝氨酸(Homo-serine, Homo-Ser)在新的合成途径中抑制 4HT 向 4HTP 的转化,因为 ThrB 可以非特异性的磷酸化 4HT 与同型丝氨酸;乙酰羧基酸合成酶的同工酶将 3HP 从新的途径中转移出来,形成 1 个代谢产物。

通路 2 由咪唑焦磷酸脱水酶和组氨酸磷酸酶(imidazoleglycerolphosphatedehydratase and histidinol phosphatase, HisB)、Php(未知具体功能)和 YjbQ(未知具体功能)3 种酶构成,通过生成 OHPB 进入代谢途径。

通路 3 目前只发现了 3-脱氢奎尼酸合成酶(*3-dehydroquinate synthase, aroB*)基因,由于 AroB 没有可检测的 4HTP 脱氢酶活性,推测其可能通过生成 PHA 替代原有代谢途径,目前还没有研究对通路

2 和通路 3 进行详细的解释。

近些年,研究者利用 $\Delta pdxB$ 菌株在含有葡萄糖作为唯一碳源的培养基中进化上百代,得到了在葡萄糖中生长旺盛并可以合成 PLP 的菌株发现了第 4 条偶然途径。这条途径由已经参与 VB₆ 合成的 SerA, SerC 和 ThrB 组成,起始于 SerA 对赤藓糖(Erythronate)的氧化,除此以外还发现了这些酶以外的基因突变^[21-24]。

除了在大肠杆菌中,在枯草芽孢杆菌也发现了非天然代谢途径,通过对敲除了 $pdxST$ 基因并插入 $pdxH$ 与 $pdxJ$ 基因的菌株进行适应性实验室进化得到了含有 $\Delta bshC$ 缺陷基因的菌株,再次进行适应性突变得到了 $ytoQ$ (未知具体功能)基因表达增强,使得突变株的 PLP 生成速度达到了与野生型一致的水平^[25-26]。

研究表明,偶然代谢途径的出现并不一定需要该途径中编码酶的基因发生突变,也可能是由于人为突变改变了代谢产物中其他蛋白质和代谢产物的水平,在进化过程中由选择压力形成的新代谢路径中起作用的酶开始对原本结合能力较弱的非天然底物产生作用。偶然途径的出现提示,在模式菌株中合成维生素 B₆ 不仅依赖于天然代谢,还可采用由于酶底物的非特异性而产生的偶然代谢途径,这些途径可以在一定程度上减少合成 VB₆ 所需的步骤。想要利用偶然合成途径需要解决宿主的天然途径对非天然代谢的影响,可以改造偶然途径的非特异性代谢中间酶,将氨基酸合成途径与 VB₆ 代谢途径分开,同时由于丝氨酸的多效性,如果想要提高通路 1 的流通量,可以增加其他中间产物的量,而不应通过在培养基中添加丝氨酸补充物获得。

3 总结与展望

鉴于维生素 B₆ 对疾病治疗、保健品、科研材料、工业生产的重要性,高效、绿色环保、简单快捷地生产 VB₆ 对化学及生物领域仍是不断发展的方向。近年来,随着系统代谢工程的提出,系统生物学、合成生物学、进化工程与传统的代谢工程结合在了一起,从而促进高性能菌株的发展,这些领域的出现也为生物合成 VB₆ 提供了更多的思路。在后续对 VB₆ 合成的研究中,科研工作者不仅要考虑产物的产率,还要从实验菌株的稳定性入手。

从微观角度看,研究可以从 DNA 水平、转录水平、蛋白质翻译水平进行,DNA 水平可以通过 CRISPR-Cas 进行基因编辑、适应性实验室进化(adaptive laboratory evolution, ALE)等技术,从而避免质粒转化造成的基因丢失、菌株性状不稳定;转录水平可以从更换启动子、核糖开关、不同拷贝水平载体入手,也可以通过 CRISPRi, CRISPRa 对转录进行抑制或激活、随机突变等方式改变启动子强度,或者采用动态方式使用可以响应代谢环境变化的启动子;翻译水平可以通过使用稳定性不同的核糖体结合位点实现^[27-30]。

从宏观角度看,可以从已经明晰的主要代谢途径入手,提高碳利用效率,增加主要途径的代谢流量,减少并分离旁支的分流,解除限速步骤,防止中间有毒代谢产物的积累。同时,也需要考虑还原力(NAD⁺/NADP⁺)与能量(ATP)产生与消耗的平衡。有研究者在优化生产 L-赖氨酸时就提出碳通量的可用性对产物的生物合成至关重要,增加前体的供应、增强核心代谢途径、削弱竞争代谢途径是将碳通量引导到产物合成的有效途径。除此以外,还需要考虑产物对代谢调控的抑制,可以通过在宿主体内增强转运蛋白的表达来减弱反馈抑制^[31]。除了主要代谢途径,也可以利用较短的偶然代谢途径,但是需要分开偶然代谢与这些酶参与的其他代谢途径之间的相互作用。

随着计算手段的进步,机器学习在代谢设计的基因注释、途径设计与构建、代谢流量优化等方面均有应用,可以利用 Rosetta, FoldX, Discovery Studio 等软件对酶的结构进行理性设计与改造。酶的设计可以从对酶的底物通道、表面、环(loop)区改造入手,改变酶分子中的通道结构影响底物、产物和反应中间体在酶分子内部的转移。改变酶分子表面的氨基酸可以改变酶与底物、辅酶、反应中间体的相互作用,引入新的相互作用并消除局部的不良效应。Loop 区远离活性位点氨基酸的改造可以通过构象变化影响底物的识别和催化,提高对存在对映体底物的立体选择性^[32-34]。酶的突变可以增强酶的热稳定性或与底物结合能力,使得酶促反应的专一性增强,加快其在代谢通路中的反应进程。

无论是以上哪一种方法都需要不断尝试,目前生物学方法生产维生素 B₆ 因产量低而没有替代化学法,未来仍需要在前人研究的基础上完善、更新传统的方法体系,从而得到可以大规模生产的发酵策略。

参考文献:

[1] LIU Linxia,LI Jinlong,GAI Yuanming,*et al.* Protein engineering and iterative multimodule optimization for vitamin B₆ production in *Escherichia coli*[J]. Nature Communications,2023,14(1):5304. DOI:10. 1038/s41467-023-40928-0.

[2] DU Yiling,RYAN K. Pyridoxal phosphate-dependent reactions in the biosynthesis of natural products[J]. Natural Product Reports,2019,36(3):430-457. DOI:10. 1039/c8np00049b.

[3] LIANG Jing,HAN Qian,TAN Yang,*et al.* Current advances on structure-function relationships of pyridoxal 5'-phosphate-dependent enzymes[J]. Frontiers in Molecular Biosciences,2019,6:4. DOI:10. 3389/fmolb. 2019. 00004.

[4] DHERBASSY Q,MAYER R,MUCHOWSKA K,*et al.* Metal-pyridoxal cooperativity in nonenzymatic transamination[J]. Journal of the American Chemical Society,2023,145(24):13357-13370. DOI:10. 1021/jacs. 3c03542.

[5] STACH K,STACH W,AUGOFF K. Vitamin B₆ in health and disease[J]. Nutrients,2021,13(9):3229. DOI:10. 3390/nu13093229.

[6] WILSON M,PLECKO B,MILLS P,*et al.* Disorders affecting vitamin B₆ metabolism[J]. Journal of Inherited Metabolic Disease,2019,42(4):629-646. DOI:10. 1002/jimd. 12060.

[7] KUMRUNGSEE T,ZHANG Peipei,CHARTKUL M,*et al.* Potential role of vitamin B₆ in ameliorating the severity of COVID-19 and its complications[J]. Frontiers in Nutrition,2020,7:562051. DOI:10. 3389/fnut. 2020. 562051.

[8] ITO T. Role of the conserved pyridoxal 5'-phosphate-binding protein YggS/PLPBP in vitamin B₆ and amino acid homeostasis[J]. Bioscience, Biotechnolpgy and Biochemistry,2022,86(9):1183-1191. DOI:10. 1093/bbb/zbac113.

[9] GUO Hui,TIAN Tao,NAN Kejun,*et al.* P57: A multifunctional protein in cancer (review)[J]. International Journal of Oncology,2010,36(6):1321-1329. DOI:10. 3892/ijo_00000617.

[10] WANG Ruina,XIAO Lei,PAN Jianbo,*et al.* Natural product P57 induces hypothermia through targeting pyridoxal kinase[J]. Nature Communications,2023,14(1):5984. DOI:10. 1038/s41467-023-41435-y.

[11] ROSENBERG J,ISCHEBECK T,COMMICHAU F. Vitamin B₆ metabolism in microbes and approaches for fermentative production[J]. Biotechnology Advances,2017,35(1):31-40. DOI:10. 1016/j. biotechadv. 2016. 11. 004.

[12] TAZOE M,ICHIKAWA K,HOSHINO T. Flavin adenine dinucleotide-dependent 4-phospho-D-erythronate dehydrogenase is responsible for the 4-phosphohydroxy-L-threonine pathway in vitamin B₆ biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti*[J]. Journal of Bacteriology,2006,188(13):4635-4645. DOI:10. 1128/JB. 01999-05.

[13] RICHTS B,ROSENBERG J,COMMICHAU F. A survey of pyridoxal 5'-phosphate-dependent proteins in the gram-positive model bacterium *Bacillus subtilis*[J]. Frontiers in Molecular Biosciences,2019,6:32. DOI:10. 3389/fmolb. 2019. 00032.

[14] FITZPATRICK T,AMRHEIN N,KAPPES B,*et al.* Two independent routes of de novo vitamin B₆ biosynthesis: Not that different after all[J]. Biochemical Journal,2007,407(1):1-13. DOI:10. 1042/BJ20070765.

[15] COMMICHAU F,ALZINGER A,SANDE R,*et al.* 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. DOI:10. 1016/j. ymben. 2014. 06. 007.

[16] COMMICHAU F,ALZINGER A,SANDE R,*et al.* Engineering *Bacillus subtilis* for the conversion of the antime-tabolite 4-hydroxy-L-threonine to pyridoxine[J]. Metabolic Engineering,2015,29:196-207. DOI:10. 1016/j. ymben. 2015. 03. 007.

[17] 徐勇智,范卫东,党登峰,等. 维生素 B₆ 的合成研究进展[J]. 广州化工,2012,40(12):50-51. DOI:10. 3969/j. issn. 1001-9677. 2012. 12. 019.

[18] TAZOE M,ICHIKAWA K,HOSHINO T. Biosynthesis of vitamin B₆ in *Rhizobium*: *In vitro* synthesis of pyridoxine from 1-deoxy-D-xylulose and 4-hydroxy-L-threonine[J]. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry,2002,66(4):934-936. DOI:10. 1271/bbb. 66. 934.

[19] HOSHINO T,ICHIKAWA K,TAZOE M. Recombinant microorganism for the production of vitamin B₆: US2006/0228785 A1[P]. 2006-06-15[2024-01-01].

[20] ACEVEDO-ROCHA C,GRONENBERG L,MACK M,*et al.* Microbial cell factories for the sustainable manufac-

- turing of B vitamins[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2019, 56: 18-29. DOI: 10.1016/j.copbio.2018.07.006.
- [21] KIM J, FLOOD J, KRISTOFICH M, *et al.* Hidden resources in the *Escherichia coli* genome restore PLP synthesis and robust growth after deletion of the essential gene *pdxB*[J]. The Proceedings of the National Academy of Sciences, 2019, 116(48): 24164-24173. DOI: 10.1073/pnas.1915569116.
- [22] KIM J, KERSHNER J, NOVIKOV Y, *et al.* Three serendipitous pathways in *E. coli* can bypass a block in pyridoxal-5'-phosphate synthesis[J]. Molecular Systems Biology, 2010, 6: 436. DOI: 10.1038/msb.2010.88.
- [23] KIM J, COPLEY S. Inhibitory cross-talk upon introduction of a new metabolic pathway into an existing metabolic network[J]. The Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012, 109(42): E2856-E2864. DOI: 10.1073/pnas.1208509109.
- [24] ROSENBERG J, MULLER P, LENTES S, *et al.* ThrR, a DNA-binding transcription factor involved in controlling threonine biosynthesis in *Bacillus subtilis*[J]. Molecular Microbiology, 2016, 101(5): 879-893. DOI: 10.1111/mmi.13429.
- [25] ROSENBERG J, YEAK K, COMMICHAU F. A two-step evolutionary process establishes a non-native vitamin B₆ pathway in *Bacillus subtilis* [J]. Environmental Microbiology, 2018, 20(1): 156-168. DOI: 10.1111/1462-2920.13950.
- [26] RICHTS B, COMMICHAU F. Underground metabolism facilitates the evolution of novel pathways for vitamin B₆ biosynthesis[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2021, 105(6): 2297-2305. DOI: 10.1007/s00253-021-11199-w.
- [27] CHOI K, JANG W, YANG D, *et al.* Systems metabolic engineering strategies: Integrating systems and synthetic biology with metabolic engineering[J]. Trends in Biotechnology, 2019, 37(8): 817-837. DOI: 10.1016/j.tibtech.2019.01.003.
- [28] ZHAN Yangyang, XU Yong, ZHENG Pengling, *et al.* Establishment and application of multiplexed CRISPR interference system in *Bacillus licheniformis* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(1): 391-403. DOI: 10.1007/s00253-019-10230-5.
- [29] 朱欣娜, 戴住波, 樊飞宇, 等. 微生物细胞工厂[J]. 科学通报, 2023, 68(13): 1626-1636.
- [30] 刘洋, 牟庆璇, 石雅南, 等. 微生物细胞工厂的代谢调控[J]. 生物工程学报, 2021, 37(5): 1541-1563. DOI: 10.13345/j. cjb. 200688.
- [31] LIU Jie, OU Ying, XU Jianzhong, *et al.* L-lysine production by systems metabolic engineering of an NADPH auto-regulated *Corynebacterium glutamicum* [J]. Bioresource Technology, 2023, 387: 129701. DOI: 10.1016/j.biortech.2023.129701.
- [32] QU Ge, BI Yuexin, LIU Beibei, *et al.* Unlocking the stereoselectivity and substrate acceptance of enzymes: Proline-induced loop engineering test[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2022, 61(1): e202110793. DOI: 10.1002/anie.202110793.
- [33] PRAVDA L, BERKA K, VAREKOVA R, *et al.* Anatomy of enzyme channels[J]. BMC Bioinformatics, 2014, 15(1): 379. DOI: 10.1186/s12859-014-0379-x.
- [34] XIAO Shifeng, PATSALO V, SHAN Bing, *et al.* Rational modification of protein stability by targeting surface sites leads to complicated results[J]. The Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013, 110(28): 11337-11342. DOI: 10.1073/pnas.1222245110.

(责任编辑: 黄晓楠 英文审校: 刘源岗)