

维生素 B₁₂的生物合成研究*张玉明^{1,2} 王雷^{1,2} 王云山¹ 张利平¹ 苏志国²

1(河北大学生命科学学院,保定,071002) 2(中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室,北京,100080)

摘 要 维生素 B₁₂广泛应用于医药、食品和畜牧业,主要由微生物发酵得到。脱氮假单胞菌(*Pseudomonas denitrificans*)和费氏丙酸杆菌(*Propionibacterium freudenreichii*)是主要的生产菌种。与之相应,维生素 B₁₂存在好氧和厌氧 2 条生物合成途径,生物合成过程十分复杂,2 条合成途径大体相同又各有特点。维生素 B₁₂发酵产量的提高有待于菌种的改良和发酵工艺的改进。了解维生素 B₁₂生物合成途径和代谢调控机制具有重要意义,可为育种工作提供理论基础。

关键词 钴胺素,维生素 B₁₂,生物合成,费氏丙酸杆菌

1 维生素 B₁₂简介

维生素 B₁₂又称为钴胺素(cobalamin),是一类含有钴的咕啉类化合物总称,最初是由 Minot 和 Murphy 于 1926 年在肝的粗匀浆物中发现的。1948 年维生素 B₁₂从肝和肾组织中得到纯化,1956 年 Dorothy Hodgkin 用 X 射线法证明了其晶体结构^[1]。维生素 B₁₂分子量大于 1 000 u,被称为自然界中由生物合成的最为复杂的小分子物质^[2]。

维生素 B₁₂分子由 3 部分组成:中心咕啉环、中心环轴向 Co β 配基部分及 1 个含有核苷酸环的 Co α 配基。中心咕啉环由相连的 4 个吡咯和 1 个钴原子组成,钴整合在 4 个吡咯中心。咕啉环向上方的配基不同(即 Co β 配基不同),则会产生不同形式的钴胺素类物质。羟基钴胺素(hydroxycobalamin)、氰基钴胺素(cyanocobalamin)、脱氧腺苷钴胺素(deoxyadeno-

sylobalamin)和甲基钴胺素(methylcobalamin)是维生素 B₁₂主要存在形式。其中氰基钴胺素不是维生素 B₁₂的天然存在形式,它是在工业提纯时用氰化物取代天然钴胺素而得到的产物^[3],商品形式的维生素 B₁₂多为氰基钴胺素。

人体自身不能合成维生素 B₁₂,主要通过摄食动物源食品来获得。维生素 B₁₂具有重要的生理作用,其中脱氧腺苷钴胺素和甲基钴胺素以辅酶的形式参与体内 DNA 合成、促进脂肪及糖类代谢,并且具有维持及产生神经细胞髓鞘的作用^[4,5]。其他形式的钴胺素进入哺乳动物体内后,都会被相应酶催化转变为这 2 种活性形式。

2 维生素 B₁₂的生产菌种

表 1 中列出了具备一定工业应用价值的维生素 B₁₂生产菌种及其大致生产过程和产量^[6],其中脱氮

表 1 具有维生素 B₁₂生产能力的菌种及其生产过程

维生素 B ₁₂ 生产菌种	培养基主要成分	发酵条件	V _{B₁₂} 产量/mg·L ⁻¹
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	葡萄糖	厌氧,添加 DMB	206.0
<i>Rhodopseudomonas protamicus</i>	葡萄糖	添加 DMB	135.0
<i>Propionibacterium shermanii</i>	葡萄糖	添加 DMB	60.0
<i>Pseudomonas denitrificans</i>	蔗糖	好氧,添加甜菜碱(betaine)	60.0
<i>Nocardia rugosa</i>	葡萄糖	好氧	18.0
<i>Rhizobium cobalaminogenum</i>	蔗糖	好氧	16.5
<i>Micromonospora sp.</i>	葡萄糖	添加 DMB	11.5
<i>Streptomyces olivaceus</i>	葡萄糖	添加 DMB	6.0
<i>Nocardia gardneri</i>	十六烷	好氧	4.5
<i>Butyribacterium methylotrophicum</i>	甲醇	厌氧	3.6
<i>Pseudomonas sp.</i>	甲醇	添加 DMB	3.2
<i>Arthrobacter hyalinus</i>	异丙醇	添加 DMB	1.1

假单胞菌(*Pseudomonas denitrificans*)和费氏丙酸杆菌(*Propionibacterium freudenreichii*)已经广泛应用于工业发酵生产维生素 B₁₂^[7]。

第一作者:硕士研究生。

* 国家自然科学基金重点基金资助(No.20136020)

收稿日期:2005-01-28

3 维生素 B₁₂ 的生物合成路径

维生素 B₁₂ 的生物合成十分复杂, 涉及相关合成基因 30 余个^[7]。Battersby 和 Scott 实验室的工作者通过对脱氮假单胞菌 (*Pseudomonas denitrificans*) 的研究, 阐明了维生素 B₁₂ 好氧合成路径^[8]。对厌氧合成路径的研究成果源于以下 3 株菌: 鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、费氏丙酸杆菌 (*Propionibacterium freudenreichii*)^[9] 和巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)。研究方法涉及分子克隆、酶学、化学合成、同位素标记和核磁共振等, 最终历时 25 年才绘制出维生素 B₁₂ 的合成路线图。下面将以微生物合成腺苷钴胺素为例, 分 3 部分概述维生素 B₁₂ 好氧及厌氧合成过程。

3.1 5-氨基乙酰丙酸 (5-aminolaevulinic acid, ALA) 缩合形成尿卟啉原Ⅲ (Uroporphyrinogen Ⅲ)

5-氨基乙酰丙酸的合成有 2 种途径: 一种是由琥珀酰辅酶 A 和甘氨酸缩合产生 (称为 C4 途径); 另一种途径较为复杂, 由谷氨酸的完整碳骨架转化得到, 需要 tRNA 及 3 个酶参与 (称为 C5 途径)^[10]。尿卟啉原Ⅲ是维生素 B₁₂ 中心咕啉环的前体, 8 分子 5-氨基乙酰丙酸经氨基乙酰丙酸脱氢酶 (HemB)、胆色素原脱氢酶 (HemC) 和尿卟啉原合成酶 (HemD) 的催化, 最终缩合成尿卟啉原Ⅲ。尿卟啉原Ⅲ的合成标志着维生素 B₁₂ 的中心环碳骨架初步形成。

3.2 催化尿卟啉原Ⅲ (Uroporphyrinogen Ⅲ) 合成腺苷钴胺酸 (Adenosylcobyrinic acid)

尿卟啉原Ⅲ甲基转移酶是维生素 B₁₂ 生物合成的关键酶, 催化将 S-腺苷-L-甲硫氨酸 (S-adenosyl-L-methionine, SAM) 上的 2 个甲基转移到尿卟啉原Ⅲ分子上, 第 1 个甲基转移到中心环 C-2 位置形成前咕啉 1 (precorrin-1), 接着在 C-7 位置进行第 2 次甲基化反应, 产生前咕啉 2 (precorrin-2)。至此好氧和厌氧合成路径没有区别, 在随后的中心环缩合反应 2 条合成路径开始出现差异。

在好氧路径中, 前咕啉 2 在 C-20 位再次发生甲基化生成前咕啉 3 (precorrin-3)。由 cobG 编码的单加氧酶 (monooxygenase) 催化 2 个氧原子加入中心咕啉环的 A 环, 形成了分子内 γ -内酯, 导致 A、D 环间的碳原子以乙酸的形式脱去^[11]。前咕啉 3 经过咕啉环缩合反应及 3 次以 SAM 为供体的甲基化反应, 形成重要中间体前咕啉 6 (precorrin-6)。前咕啉 6 经过甲基化、甲基基团重排和酰胺化反应形成氢咕啉酸 a, c-

二酰胺 (Hydrogenobyrinic acid a, c-diamide)。好氧菌利用依赖于 ATP 的钴整合酶催化钴元素插入到氢咕啉酸 a, c-二酰胺的咕啉环中心^[12], 从而得到具有钴元素的中间体-钴啉酸 a, c-二酰胺 (Cobyrinic acid a, c-diamide)。

厌氧路径中, 形成前咕啉 2 后随即发生了钴整合反应, 形成钴前咕啉 2 (cobalt precorrin-2)。在鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 和费氏丙酸杆菌 (*Propionibacterium freudenreichii*) 中钴整合酶是由 CysG 或 CbiK 编码的。CysG 蛋白在维生素 B₁₂ 的厌氧合成过程中具有非常重要的作用, 它不但具有转甲基酶活性和催化钴整合的能力, 同时还具有铁整合酶和依赖于 NAD/NADH 的氧化还原酶活性^[13]。相对于好氧合成菌而言, 厌氧菌中钴的整合较早。钴元素在此阶段的整合对随后 V_{B₁₂} 中心咕啉环的缩合是有重要意义的。位于咕啉环中心的钴原子带有一个正电荷, 它直接介导了中心咕啉环的 A 环分子重排, 导致 A、D 环间的碳原子以乙醛的形式脱掉^[14]。在厌氧合成路径中提前整合的钴元素起到了好氧合成菌中氧原子的作用。在中心咕啉环缩合的同时, 钴前咕啉 2 又发生了 3 次以 SAM 为甲基供体的甲基化反应, 形成了重要中间体钴前咕啉 6 (cobalt precorrin-6)。钴前咕啉 6 再经过甲基化、甲基重排及酰胺化反应生成钴啉酸 a, c-二酰胺 (Cobyrinic acid a, c-diamide)。

前咕啉 2 催化合成钴啉酸 a, c-二酰胺后, 好氧和厌氧合成路径又重新趋于一致。在脱氮假单胞菌 (*Pseudomonas denitrificans*) 中 CobO 编码的蛋白质具有腺苷转移酶活性, 它催化腺苷基团与钴啉酸 a, c-二酰胺中的钴相连, 形成腺苷钴啉酸 a, c-二酰胺 (Adenosylcobyrinic acid a, c-diamide)。在厌氧合成菌 *Salmonella typhimurium* 中, CobA 具有腺苷转移酶活性, 与好氧菌中的 CobO 是同功酶。最后, 与腺苷钴啉酸 a, c-二酰胺相连的 4 个羧基再次发生酰胺化反应, 就生成了腺苷钴啉胺酸 (Adenosylcobyrinic acid)。至此, 带有腺嘌呤核苷酸的中心咕啉环合成完毕。

3.3 催化腺苷钴啉胺酸 (Adenosylcobyrinic acid) 最终合成腺苷钴胺素 (Adenosylcobalamin)

这一部分主要包括与中心咕啉环相连的 Coa 配基的合成。腺苷钴啉胺酸咕啉环侧链上唯一未酰胺化的羧基与氨丙醇 (R-1-amino-2-propanol) 的氨基相连形成腺苷钴啉醇酰胺 (Adenosylcobinamide)。随后, 氨丙醇的羟基发生磷酸化, 生成磷酸化腺苷钴啉

醇酰胺。磷酸化腺苷钴啉醇酰胺通过磷酸化的侧链与鸟嘌呤核苷酸(GMP)连接就形成了腺苷-二磷酸鸟嘌呤核苷酸-咕啉醇酰胺(Adenosyl-GDP-cobinamide)。钴胺素合成的最后一步是由 α -ribazole (1- α -D-ribofuranosyl 5,6-dimethylbenzimidazole) 替换腺苷-二磷酸鸟嘌呤核苷酸-咕啉醇酰胺中的鸟嘌呤核苷酸(GMP)。 α -ribazole 的合成需要二甲苯并咪唑(5,6-dimethylbenzimidazole, DMB)和烟酸单核苷酸(nicotinic acid mononucleotide, NaMN)的参与^[15]。二甲苯并咪唑(DMB)的前体是核黄素(Riboflavin);烟酸单核苷酸(NaMN)是合成烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)过程中的1个中间产物。钴胺素合成酶催化 α -ribazole 替代腺苷-二磷酸鸟嘌呤核苷酸-咕啉醇酰胺分子中的鸟嘌呤核苷酸(GMP)后就完成了复杂的腺苷钴胺素的合成。

4 维生素 B₁₂合成相关基因的研究

随着基因组大规模测序技术的发展,维生素 B₁₂合成相关基因数据库已经建立。这样只要通过相似性比较就可判断某一未知菌是否具有维生素 B₁₂合成基因。在进行维生素 B₁₂合成菌的基因组研究时,发现了多个与厌氧或好氧合成维生素 B₁₂的特异相关的特征基因^[1]。如在 *Bacillus megaterium* 和 *Salmonella typhimurium* 中 *cbiD*、*cbiG* 基因和用于编码不依赖于 ATP 的钴整合酶的 *cbiK* 或 *cbiX* 基因被认为是厌氧合成菌的特征基因^[9]。维生素 B₁₂好氧合成菌的特征基因是从 *Pseudomonas denitrificans* 中发现的 *cobS*、*cobN*、*cobT* 基因,它们共同编码1个依赖于 ATP 的三亚基钴整合酶。*cobE*、*cobW*、*cobF* 和 *cobG* 基因也是好氧合成菌的特征基因,其中 *cobG* 是编码单加氧酶的基因。

应用于工业生产的维生素 B₁₂合成菌都具有典型的厌氧或好氧合成机制,并且对这些菌种相关合成基因的研究也佐证了这一观点。于是长期以来一直认为划分维生素 B₁₂两条合成路径的依据就是是否有氧气参与。然而随着对更多具备维生素 B₁₂合成能力的微生物的研究,人们发现好氧和厌氧合成路径并不是完全独立的。例如荚膜红细菌(*Rhodobacter capsulatus*)在厌氧及好氧条件下均具有合成维生素 B₁₂的能力,并且钴元素的整合是发生在较晚的阶段,这说明它具有一种全新的中心咕啉环缩合机制。研究发现荚膜红细菌缺失编码单加氧酶的 *cobG* 基因,维生素 B₁₂合成过程中咕啉环的缩合由一种铁硫蛋白催化完

成^[17]。此外,研究发现绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)同时具有维生素 B₁₂合成的好氧和厌氧特征基因,它在有无氧气的条件下均具备合成能力。

现已证明是否有氧气参与并不是区分2条合成路径的关键,它们的本质区别是中心咕啉环的缩合机制不同。钴原子的整合对于中心咕啉环的缩合具有重要作用,因此以钴原子整合时间的早晚来划分维生素 B₁₂合成路径已经得到共识^[1]。只是由于应用于生产的菌种都具有典型的厌氧或好氧合成机制,所以好氧合成路径和厌氧合成路径的称法还一直在发酵工业中沿用。

5 维生素 B₁₂发酵生产近况

脱氮假单胞菌(*Pseudomonas denitrificans*)和费氏丙酸杆菌(*Propionibacterium freudenreichii*)是目前工业应用最广的维生素 B₁₂生产菌^[18]。脱氮假单胞菌最早应用于工业生产,对它的研究也最为透彻。法国 RPR(Rhone-Poulenc Rorer)实验室利用传统诱变育种方法和基因工程手段已经成功改造了脱氮假单胞菌,使其产量达到约 300 mg/L。与脱氮假单胞菌相比,费氏丙酸杆菌虽然产量不高,但是它也有自己的优点。费氏丙酸杆菌符合美国 FDA 的 GRAS(generally recognized as safe)要求,在生长过程中不产生内毒素和外毒素^[19],可以广泛应用于医药和食品添加剂工业。此外费氏丙酸杆菌发酵生产维生素 B₁₂几乎不需要通气,具有能耗低、染菌概率小等优势,目前利用费氏丙酸杆菌发酵生产维生素 B₁₂越来越引起人们关注。

费氏丙酸杆菌发酵生产维生素 B₁₂包括2个阶段:第1阶段厌氧培养,目的为增加菌体量,同时使菌体积累钴胺素前体物质;第2阶段,向培养基中添加二甲苯并咪唑(DMB)使菌体合成维生素 B₁₂^[20]。费氏丙酸杆菌在生长时会产生大量丙酸和乙酸,有机酸的积累会抑制菌体生长^[21],延长了发酵周期。通过耦合发酵措施来解除有机酸抑制,提供菌体量和发酵水平是目前国际上的研究热点。间歇溶氧培养及中空纤维组成细胞循环技术都有研究报道。间歇溶氧培养明显促进了菌体生长速率,提高了菌体收率。但实验证明间歇溶氧培养只是单纯提高了菌体收率,而维生素 B₁₂的产量并没有有效提高。这是由于氧气的存在破坏了维生素 B₁₂合成酶的活性。应用中空纤维膜所组成的细胞循环系统,可以有效去除发酵液中有机关酸,从而大大提高维生素 B₁₂产量,但存在大量碳

源随丙酸一起流失的缺点。尽人们对管耦合发酵的研究取得了一定进展,但由于技术有待完善或总体成本偏高还未能应用于生产。国内现阶段主要采取补充氨水等碱性物质中和有机酸,促进菌体生长。

6 结束语

发酵周期过长、菌体量和产物积累量不一致,都直接导致了维生素 B₁₂ 的生产成本过高。高产菌株的获得是发酵生产的关键,在改进发酵工艺的同时,对生产菌的育种工作也备受关注,目前利用传统方法诱变育种和基因工程育种的研究方兴未艾。维生素 B₁₂ 是微生物次级代谢产物,反馈调节机制对菌体中维生素 B₁₂ 的积累具有重要作用。只有进行详尽代谢工程研究,才能真正做到定向改造菌种,最终达到解除反馈抑制、提高维生素 B₁₂ 产量的目的。相信随着实验技术的不断改进,维生素 B₁₂ 合成机制将会完全阐明,代谢工程育种亦会得到广泛应用。

参 考 文 献

- 1 Raux E, Schubert H L, Warren M J. Cell Mol Life Sci, 2000(57):1880~1893
- 2 Raux E, Heidi L S, Jennifer M R, et al. Vitamin B₁₂: Insights into Biosynthesis's Mount Improbable. Bioorganic Chemistry, 1999 (27):100~118
- 3 罗伟,郝常明. 维生素 B₁₂ 的研究及其进展[J]. 中国食品添加剂, 2002(3):15~18
- 4 Sumedha Gulati, Lawrence C B, Ruma B. Posttranscriptional Regulation of Mammalian Methionine Synthase by B₁₂ [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1999 (259):436~442
- 5 Banerjee R, Vlasie M. Biochemical Society Transactions, 2002(30):621~624
- 6 Bykhovsky V Y, Zaitseva N I, Eliseev A A. Tetrapyrroles: diversity, biosynthesis, and biotechnology[J]. Appl Biochem Microbiol, 1998(34):1~18
- 7 Roth J R, Lawrence J G, Rubenfield M et al. J Bacteriol, 1993(175):3303~3316
- 8 Blanche F, Cameron B, Crouzet J, et al. Angew Chem Int Ed Engl, 1995(34):383~411
- 9 Pornpimon Kiatpapan, Yoshikatsu Murooka. Genetic Manipulation System in Propionibacteria[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2002(93):1~8
- 10 刘秀艳,叶敏,徐向阳. 产生 5-氨基乙酰丙酸光合细菌生物学研究进展[J]. 生物工程进展, 2000, 20(3):67~70
- 11 Patricio J Santander, Charles A Roessner, Neal J Stolowich. Chemistry & Biology, 1997(4):659~666
- 12 Debussche L, Couder M, Thibaut D, et al. J Bacteriol, 1992(174):7445~7451
- 13 Warren M J, Bolt E L, Roessner C A et al. Biochem J, 1994(302):837~844
- 14 Wang J, Stolowich N J, Santander P J, et al. Proc. Natl Acad Sci, 1996(93):14 320~14 322
- 15 Bettina S, Bernhard V, Paul R. Biosynthesis of vitamin B₁₂ in anaerobic bacteria[J]. Eur J Biochem, 1998(254):620~625
- 16 Scott A I, Roessner C A, Patricio J S. Genetic and Mechanistic Exploration of the Two Pathways of Vitamin B₁₂ Biosynthesis[J]. The Porphyrin Handbook, 2003(12):211~228
- 17 H McGoldrick I, E Deery, M Warren, et al. Cobalamin (V_{B12}) biosynthesis in Rhodobacter capsulatus[J]. Biochemical Society Transactions, 2002(30):646~648
- 18 曾碧榕,何旭敏,夏海平,等. 维生素 B₁₂ 工业生产技术的进展[J]. 中国医药工业杂志, 2003, 34(8):421~424
- 19 Salminen S, Wright A, Morelli L, et al. Demonstration of safety of probiotics[J]. Int J Food Microbiol. 1998 (44): 93~106
- 20 Martens J H, Barg H, Warren M J, et al. Microbial production of vitamin B₁₂[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2002 (58):275~285
- 21 仪宏,王丽丽,冯惠勇. 丙酸积累对薛氏丙酸杆菌生长及产酸的影响[J]. 微生物学通报, 2003, 30(3):29~32

Research on Biosynthesis of Vitamin B₁₂

Zhang Yuming^{1,2} Wang Lei^{1,2} Wang Yunshan²

Zhang Liping¹ Su Zhiguo²

1(College of Life Science Hebei University, Baoding, 071002, China)

2(The State Key Lab of Biochemical Engineering, the institute of Process Engineering of the Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100080, China)

ABSTRACT Vitamin B₁₂ is widely used for medicine and food additive. Vitamin B₁₂ is produced mainly by fermentation either by an aerobic bacterium, *Pseudomonas denitrificans*, or an aerotolerant bacterium, *Propionibacterium freudenreichii*. Biosynthesis of V_{B12} is complex. The aerobic pathways are described and compared in this article. Strain improvement and optimization of fermentation condition is important for V_{B12} production. Elucidation of the biosynthesis and the regulatory mechanisms of the pathway are meaningful for microbial breeding.

Key words cobalamin Vitamin B₁₂, biosynthesis, *Propionibacterium freudenreichii*