维生素E生物合成的相关进展

杨景丽^{1,2†}, 孙鸿^{1,2†}, 宋浩^{1,2*}

1. 天津大学化工学院, 天津 300072;

2. 天津大学合成生物学前沿科学中心/系统生物工程教育部重点实验室, 天津 300072

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: hsong@tju.edu.cn

2020-06-11 收稿, 2020-07-22 修回, 2020-07-23 接受, 2020-07-24 网络版发表

国家自然科学基金(21621004)和国家重点基础研究发展计划(2018YFA0901300)资助

摘要 维生素E是具有抗氧化活性的脂溶性化合物,是维持机体代谢的必需维生素,被广泛应用于食品、医药及化妆品等多个领域,市场需求量极大.市场上的维生素E主要来自化学合成和从植物油馏出物中提取.传统的化学合成方式因不能合成特定的立体构型而受到限制.植物提取的方法也受制于有限的植物资源和高时间成本.利用微生物合成特定构型的复杂天然化合物是一种经济、清洁的方法.本综述首先总结了维生素E生物合成的代谢途径及其研究进展,其次对维生素E生物合成的关键中间体尿黑酸和牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸的代谢途径在模式微生物中的代谢工程改造进行了总结,最后对于利用微生物来生物合成维生素E的现状进行了概述,并对其前景进行了展望.

关键词 维生素E, 尿黑酸, 牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸, 合成生物学

1922年,维生素E(vitamin E, VE)被Evans和Bishop^[1]发现,是一类重要的具有抗氧化活性的脂溶性化合物,其是由莽草酸途径来源的极性芳香族头部和亲脂性类异戊二烯侧链组成的一种两亲性分子,根据侧链的饱和度和芳香环上甲基数目和位置的不同分为 α 、 β 、 γ 、 δ -生育酚和 α 、 β 、 γ 、 δ -生育三烯酚这8种化合物^[2].

维生素E是维持人体正常代谢和机能的必需维生素,具有抗癌^[3]、抗心血管疾病^[4]等作用.维生素E拥有的多种功能,在工业上有广泛的用途,如作为人类膳食补充的保健品、抗癌抗衰老的医药品^[3]、动物饲养中的饲料添加剂以及作为活性成分添加到化妆品中等.目前维生素E已成为国际市场上用途最广、需求量极大的维生素品种之一,与维生素A、维生素C一起被列为维生素系列三大支柱产品^[5].

天然维生素E仅在植物和光合藻类中生成^[6].市场

上的天然维生素E主要从植物油脱臭馏出物中进行提取精炼,存在资源消耗多、成本较高等问题^[7].对于植物来源的维生素E,增加目标产品产量的主要策略是通过代谢工程改造植株或者从植物细胞的培养物中提取^[8].但是因为植物的代谢工程改造比较复杂、难度较大,而且植物细胞培养的方法也常常会因为生长速率低,产量不稳定,培养基很容易受到污染等而使目标产物的合成受到限制^[9].尽管已经有很多报道通过化学合成得到生育酚的外消旋体,但是化学合成难以满足对特定立体构型的维生素E类单体的需求^[10],同时国家对绿色生产的要求也限制了一部分的化学合成.

随着全球对清洁、可持续性更高工艺的重视以及工业期待着能够合成难以化学合成的特定手性异构体,利用代谢工程生产生物化学产品并成功应用的案例不断增加.基于此,本文综述了维生素E的天然合成路径,

引用格式: 杨景丽, 孙鸿, 宋浩. 维生素E生物合成的相关进展. 科学通报, 2020, 65: 4037–4046

Yang J L, Sun H, Song H. The progress of the biosynthesis of vitamin E (in Chinese). Chin Sci Bull, 2020, 65: 4037–4046, doi: [10.1360/TB-2020-0706](https://doi.org/10.1360/TB-2020-0706)

以及合成其所需的关键前体在不同工业模式生物中的相关途径和常用的代谢工程策略的研究进展, 并对生物合成维生素E的前景进行了思考和展望。

1 维生素E的天然合成途径及其生物合成研究进展

1.1 维生素E的天然合成途径

早在几十年前, 科学家们成功鉴定出拟南芥、藻类等光合生物维生素E合成途径中的相关基因, 完整的维生素E生物合成途径已被发现^[6]。

维生素E在藻类和植物中的生物合成途径十分相似^[11], 均需要两个关键前体, 即尿黑酸(homogentisate, HGA)和牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸(geranylgeranyl diphosphate, GGDP)。如图1所示, HGA由莽草酸途径产生, 莽草酸途径合成的酪氨酸经过两步酶催化反应后

生成HGA。首先酪氨酸脱氨基生成对羟基苯丙酮酸(*p*-hydroxyphenylpyruvic acid, *p*-HPP), 随后*p*-HPP在对羟基苯丙酮酸双加氧酶(hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, HPPD)的氧化作用下生成HGA^[12]。牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸在生物中广泛存在, 主要由2-甲基-赤藓糖醇-4-磷酸(2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate, MEP)途径或甲羟戊酸途径(mevalonate pathway, MVA)产生。在尿黑酸牻牛儿基转移酶(homogentisate geranylgeranyl transferase, HGGT)的催化下使HGA和GGDP发生缩合反应, 生成生育三烯酚合成的共同中间体2-甲基-6-牻牛儿基牻牛儿基苯醌(2-methyl-6-geranylgeranylbenzoquinol, MGGBQ)。或者GGDP在牻牛儿基牻牛儿基二磷酸还原酶(geranylgeranyl diphosphate reductase, GGDR)的催化下生成植基焦磷酸(phytyl diphosphate, PDP), 之后再在尿黑酸植基转移酶(homogentisate phytyl transferase, HPT)的催化下PDP与HGA

图1 (网络版彩色)生物合成维生素E相关的代谢途径。MVA: 甲羟戊酸; MEP: 2-甲基-赤藓糖醇-4-磷酸; tHMG1: 截短的3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶; ERG9: 角鲨烯合酶; GGDPs: 牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合成酶; DXS: 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶; IDI: 异戊二烯焦磷酸异构酶; GGDR: 牻牛儿基牻牛儿基二磷酸还原酶; PDH: 预苯酸脱氢酶; HPPD: 对羟基苯丙酮酸双加氧酶; HGGT: 尿黑酸牻牛儿基转移酶; HPT: 尿黑酸植基转移酶; MGGBQ-MT: 2-甲基-6-牻牛儿基牻牛儿基苯醌甲基转移酶; MPBQ-MT: 2,3-二甲基-6-植基苯醌甲基转移酶; TC: 生育酚环化酶; TMT: 生育酚甲基转移酶

Figure 1 (Color online) The pathways related to the biosynthesis of vitamin E. MVA, mevalonic acid; MEP, 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate; tHMG1, truncated HMG-CoA reductase; ERG9, squalene synthase; GGDPs, geranylgeranyl diphosphate; DXS, 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthesis; IDI, isopentenyl diphosphate isomerase; GGDR, geranylgeranyl diphosphate reductase; PDH, prephenate dehydrogenase; HPPD, hydroxyphenylpyruvate dioxygenase; HGGT, homogentisate geranylgeranyl transferase; HPT, homogentisate phytyl transferase; MGGBQ-MT, 2-methyl-6-geranylgeranylbenzoquinol methyltransferase; MPBQ-MT, 2,3-dimethyl-6-phytyl-1,4-benzoquinol methyltransferase; TC, tocopherol cyclase; TMT, tocopherol methyltransferase

发生缩合反应,生成生育酚合成的共同中间体2-甲基-6-植基苯醌(2-methyl-6-phytylbenzoquinol, MPBQ). MGGBQ和MPBQ可在对应的由*vte3*基因编码的甲基转移酶(MGGBQ-MT和MPBQ-MT)的催化下分别生成2,3-二甲基-6-牻牛儿基牻牛儿基苯醌(2,3-dimethyl-6-geranylgeranyl-1,4-benzoquinol, DMGGBQ)和2,3-二甲基-6-植基苯醌(2,3-dimethyl-6-phytyl-1,4-benzoquinol, DMPBQ). MGGBQ/MPBQ在由*vte1*基因编码的生育酚环化酶(tocopherol cyclase, TC)的催化下分别生成 δ -生育三烯酚/生育酚. DMGGBQ/DMPB可在TC的催化下生成 γ -生育三烯酚/生育酚. 最后, δ -生育三烯酚/生育酚、 γ -生育三烯酚/生育酚可在生育酚甲基转移酶(tocopherol methyltransferase, TMT)的作用下分别生成对应的生育三烯酚和生育酚的 β -和 α -异构体(图1).

此外,有研究者在拟南芥中发现了一种植醇循环途径.它通过降解叶绿素来生产PDP^[13],进而可以增进合成生育酚类产品的代谢流(图2).当植物受到环境胁迫时,植物中的MEP路径受到限制,编码脱镁叶绿素水解酶(pheophytin pheophorbide hydrolase, PPH)的基因会被激活,从而引发叶绿素降解产生植醇.之后植醇在由基因*vte5*所编码的植醇激酶(phytyl kinase, PK)的作用下发生磷酸化反应,从而生成植基单磷酸后者在植基单磷酸激酶(phytyl phosphate kinase, PPK)的作用下生成PDP^[14]. PDP再经后续酶催化反应生成相应构型的生育酚.

1.2 维生素E的生物合成进展

在鉴定维生素E生物合成基因后,已采取了多种策略,包括代谢工程、经典育种和突变育种,以提高植物

植醇循环途径

图2 (网络版彩色)植醇循环途径. CDL1: 叶绿素脱植基酶; PPH: 脱镁叶绿素水解酶; PK: 植醇激酶; PPK: 植基单磷酸激酶

Figure 2 (Color online) The phytol recycling pathway. CDL1, chlorophyll dephytylase 1; PPH, pheophytin pheophorbide hydrolase; PK, phytyl kinase; PPK, phytyl phosphate kinase

的维生素E含量. 这些研究除了提高了植物中维生素E的含量外,还揭示了限制植物生物合成维生素E的瓶颈.研究者们发现中间体HGA和GGDP/PDP的积累量对于维生素E的合成很重要,所以通过代谢改造增加中间体HGA和植物醇的供应常作为增强植物中维生素E生物合成的策略.表1总结了常见的改造方法.在大豆和玉米种子中通过增加HGGT的表达使得维生素E的含量有了大幅度的提高,尤其是大豆种子中的生育三烯酚的总量提升显著,是野生型的15倍^[15,16].在拟南芥中过表达编码HPT、HPPD、PK和PPK等酶的基因对提高生育酚的产量也有明显作用^[13,17-19].在烟草、蓝藻等中增加HPT和HPPD两个酶的表达也可以明显的提高维生素E的产量^[16,20].

综合以上对植株的代谢工程改造策略的分析,针对能够天然生产生育三烯酚的单子叶种子中,通过过表达HGGT能够显著地增加生育三烯酚的产量,但是

表1 植物中生物合成维生素E途径中相关的代谢工程改造进展

Table 1 The overview of metabolic engineering for the improved vitamin E biosynthesis in plants

酶	植株	方法	产量	文献
HGGT	大豆种子	过表达	生育三烯酚总量4800 ng/g, 相比野生植株提高约15倍	[15]
HGGT	玉米种子	异源表达大麦来源的HGGT	维生素E总量约提高6倍	[16]
HPT	大豆、油菜、拟南芥种子	过表达	大豆、油菜中无变化, 拟南芥中从40%提升至100%	[15,17,21]
HPPD和PDH	烟草和拟南芥	同时过表达	维生素E分别增加2倍和10倍; 游离HGA增加约800倍	[18]
PK	拟南芥	过表达	有生育酚积累, 从无到有	[19]
PPK	拟南芥	过表达	生育酚产量提升15%	[13]
HPT	番茄、拟南芥叶片	过表达	分别提升3.6倍和4.4倍	[17,20]
HPPD	蓝藻	过表达	生育酚增加7倍	[15]

过表达HPT则不会对生育酚的产量有显著的影响^[15,16]. 通过过表达HPPD来增加游离HGA的积累对于生育三烯酚的生成更加有效, 而对于生育酚的积累则影响不大^[15,16,18]. 植物中生育酚合成的关键前体PDP主要来源于叶绿素的降解和循环利用^[13,19], 但参与叶绿素降解的基因及其相关的调控机制尚不清晰, 且叶绿素对于光合生物的生存和代谢至关重要, 在细胞中受到严格调控, 对叶绿素降解的调控机制的研究将是通过代谢工程改造来提高植物中生育酚产量的主要挑战.

除代谢工程改造植株外, 有学者通过体外培养植物愈伤组织^[22]以及植物细胞培养^[8]来生产维生素E, 但仅获得了 α -生育酚, 且产量远远低于完整植株的水平.

光合藻类因能够天然合成维生素E也受到了学者的关注. 对其的研究主要集中于调节藻类的生长环境或添加诱导剂等刺激细胞的应激调节. Mendiola等人^[23]通过超临界流体萃取的工艺从螺旋藻中获得了富含维生素E的馏分. 高光胁迫也会使得对于绿藻中的维生素E的含量有明显提高^[24]. 在裂丝藻中添加茉莉酸甲酯作为诱导剂来调节与藻类应激胁迫相关的基因表达也可以增加特定异构体的生育酚的产量^[25]. 但藻类特殊的培养条件限制了它的工业应用.

2 尿黑酸生物合成的相关途径

尿黑酸来自合成芳香族氨基酸的莽草酸途径, 对羟基苯丙酮酸双加氧酶通过催化对羟基苯丙酮酸生成HGA, HGA作为前体用于维生素E的生物合成^[26].

莽草酸途径广泛存在于植物、细菌、真菌、藻类以及原生生物中^[27]. 莽草酸途径起始于3-脱氧-D-阿拉伯庚酮糖酸-7-磷酸合酶(3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphatesynthase, DAHPS)催化磷酸烯醇式丙酮酸(phosphoenolpyruvic acid, PEP)和赤藓糖-4-磷酸(erythrose-4-phosphate, E4P)生成3-脱氧-D-阿拉伯庚酮糖

酸-7-磷酸(3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate, DAHP)^[28]. 之后经多步催化后产生重要枢纽物质——分支酸, 分支酸用于其他芳香族氨基酸的合成. 在植物的次级代谢物的生产过程中, 莽草酸途径是不可缺少的, 同时它也为合成HGA提供了重要的前体供给^[29].

在能天然合成维生素E的光合植物和蓝藻细胞中, 预苯酸转化成 p -HPP需要三步酶催化反应. 而来源于酵母中的预苯酸脱氢酶(prephenate dehydrogenase, PDH)可直接一步催化预苯酸生成 p -HPP^[30]. 过表达酵母来源的PDH酶已被证明可以增加 p -HPP的前体供应从而增加HGA及后续产物的产量, 如在已表达拟南芥HPPD的烟草植株中过表达酵母PDH, 叶片中生育三烯酚大量积累^[31].

对于莽草酸途径的代谢工程改造主要集中于解除酪氨酸对预苯酸脱氢酶活性的反馈抑制从而提高分支酸产量^[32]. 或者通过调节PEP和E4P两者之间的比例或优化其合成途径, 以增加莽草酸途径的碳流量^[33]. 迄今为止, 大多数莽草酸途径生物合成的代谢工程策略已经在大肠杆菌上进行了尝试. 但文献中也记录了一些其他细菌的报告. 表2说明了最近几年报道的用于增强莽草酸生物合成的工程微生物菌株的最新概况.

过去的几年中, 研究者们通过利用不同的碳源在微生物中生产莽草酸, 如大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和谷氨酸棒状杆菌等. 对于莽草酸生物合成的进一步增强可着手于调节莽草酸途径的酶水平, 防止过度表达给底盘细胞增添的不必要的代谢负担以及选择合适的碳源或者通过共同发酵来有效地提高莽草酸途径的产量.

3 牻牛儿苗基牻牛儿苗焦磷酸生物合成的相关途径

牻牛儿苗基牻牛儿苗焦磷酸是一种二萜类物质, 是基于异戊二烯的天然产物. 其碳骨架是通过萜类代谢的中

表 2 增强莽草酸生物合成的工程微生物菌株的最新概况

Table 2 Recent overview of the metabolic engineering strains for the enhanced biosynthesis of shikimate

底盘细胞	莽草酸产量(g/L)	碳源	发酵时间(h)	发酵模式	文献
谷氨酸棒状杆菌	141	葡萄糖	48	补料分批发酵	[34]
大肠杆菌	27.41	甘油和葡萄糖	48	补料分批发酵	[35]
大肠杆菌	14.6	葡萄糖	- ^{a)}	补料分批发酵	[36]
大肠杆菌	13.15	葡萄糖	54	补料分批发酵	[37]
大肠杆菌	5.33	甘油	24	分批发酵	[38]

a) “-”表示文献中未披露相关数据

心代谢中间体, 即异戊烯基焦磷酸(isopentenyl diphosphate, IPP)和二甲基丙烯基焦磷酸(dimethylallyl diphosphate, DMAPP)的缩合形成的。生物中存在着两种不同的生物化学途径可以合成它们, 即2-甲基-赤藓糖醇-4-磷酸途径^[39]和甲羟戊酸途径^[40]产生。胞质MVA途径基本上在所有真核生物和古细菌中提供IPP和DMAPP, 而MEP途径在真细菌藻类、高等植物和原生生物的质体中起作用^[41]。在光合生物中, 两种前体途径都会被利用到, 但每个途径在不同的亚细胞区室中起不同的作用。有一些研究表明, 在植物的次级代谢中, 细胞质体和细胞液中存在IPP/DMAPP的交换^[42]。在两种前体途径共存的情况下中, 通常, MEP途径为C₁₀单萜、C₂₀二萜和C₄₀四萜的合成提供C₅异戊二烯二磷酸, 而MVA途径为C₁₅倍半萜、C₂₇₋₂₉固醇、C₃₀三萜及其皂苷衍生物。在仅有单个途径存在的情况下, 如酵母、大肠杆菌等则单个途径提供所有类异戊二烯物质合成的前体。

3.1 MEP途径的相关基因工程改造

随着人们对维生素E合成的研究发现, 植物中牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸的自身合成完全可以满足于对维生素E合成的供应, 因此对代谢工程改造来提高植物中维生素E含量的研究主要集中于提高前体HGA的供应以及改造后续参与HGA与GGDP/PDP缩合的基因。基因工程改造植物MEP途径来增加维生素E的含量的研究较少。但在大肠杆菌等其他生物中, MEP途径的基因工程改造研究被广泛研究。表3总结了近几年通过代谢改造MEP路径来生产类异戊二烯产品的典型案例。

针对维生素E的异源生物合成, 2008年, Albermann等人^[49]对大肠杆菌进行了基因工程改造, 通过添加异源牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合酶(CrtE)使法呢基基焦

磷酸(FPP)和异戊烯基焦磷酸盐(IPP)缩合生成牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸(GGDP)。该研究首次实现了维生素E异源合成, 成功得到了产 δ -生育三烯酚的工程改造菌种(15 μ g/(g cdw))。2013年, Ghanegaonkar等人^[50]在大肠杆菌中进行了MEP途径的优化, 通过加强异戊二烯焦磷酸异构酶(isopentenyl diphosphate isomerase, IDI)和1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶(1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthesis, DXS)的表达水平, 构建了生成生育三烯酚前体MGGBQ的大肠杆菌工程菌种, 使得MGGBQ的产量提高了135%(1.42 mg/(g cdw))。

对大肠杆菌中的MEP进行基因工程改造的许多尝试已经清楚地表明, 平衡催化效率、能量需求和碳流量(即前体或中间体合成中的代谢流)对于实现高产的类异戊二烯类产品至关重要。最后, 在大肠杆菌中共同表达植物CP450还原酶的植物膜蛋白, 特别是细胞色素P450的有效表达, 仍然是生产更高价值的功能化类异戊二烯的最大挑战。

3.2 MVA途径的相关基因工程改造

MVA途径广泛存在于真核生物、古细菌及某些细菌物种中, 利用糖酵解产生的乙酰辅酶A生成异戊烯焦磷酸(IPP)^[51]。IPP经异构酶催化生成DMAPP、IPP和DMAPP构成合成类异戊二烯的重要C₅前体。鉴于类异戊二烯物质的重要性, 对于MVA路径的研究在过去几十年中一直是重要的主题。通过工程改造MVA途径, 在大肠杆菌和酵母中异源地生产了许多具有经济和药理学价值的类异戊二烯或其中间体, 并且已采用不同的策略来提高MVA的生产效率。在大肠杆菌中引入整个酵母的MVA路径已被验证比单纯改造其本身的MEP路径对于类异戊二烯物质的生产更加有效^[52]。

如图1中MVA路径所示, 目前, 利用基因工程改造

表3 近几年改造MEP路径生产类异戊二烯的进展

Table 3 Recent overview of the isoprenoid's biosynthesis by engineering the MEP pathway

底盘细胞	产品	产量	发酵时间(h)	发酵模式	文献
大肠杆菌	香叶醇(C ₁₀)	1.19 g/L	48	- ^{a)}	[43]
大肠杆菌	番茄红素(C ₄₀)	3.52 g/L	120	补料分批发酵	[44]
大肠杆菌	番茄红素(C ₄₀)	20 mg/g	48	摇瓶发酵	[45]
大肠杆菌	β -胡萝卜素(C ₄₀)	2.10 g/L	56	补料分批发酵	[46]
大肠杆菌	紫杉烯(C ₄₀)	1.00 g/L	120	补料分批发酵	[47]
大肠杆菌	柠檬烯	35.8 mg/L	72	摇瓶发酵	[48]

a) “-”表示文献中未披露相关数据

酵母MVA途径以改善化合物生产的研究主要集中在以下几方面: (1) 通过过表达截短的3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase基因以增加IPP的产量^[53]; (2) 通过敲除角鲨烯合酶ERG9, 或者将其启动子替换成弱启动子来下调*erg9*基因的表达, 以来减少角鲨烯的合成, 从而增加FPP向萜类物质合成的代谢通量^[54]; (3) 过表达内源性FPP合成酶(ERG20)或GGDP合成酶(GGDPS), 增加FPP或GGPP的产量^[55]. 其中, 过表达截短的tHMG和增加GGDP合成酶的表达是优化MVA途径最基本且普遍的方式. 表4对近几年MVA路径的代谢工程研究进展进行了一个总结.

尽管过去几十年来, 类异戊二烯化合物的异源表达取得了重大进展, 但大肠杆菌或酿酒酵母中产生的绝大部分类异戊二烯的产量仍不足以实现商业化^[44]. 通过联合应用合成生物学和化学合成来生产青蒿素^[53]为工程化带来了希望. 目前, 在消除中间体对大肠杆菌宿主细胞的毒性以及细胞培养物中产物积累对辅因子和反馈调节的影响等方面还需要进行更广泛的探索和尝试^[52]. 由于酿酒酵母对法呢烯等一些类异戊二烯的耐受性要高于大肠杆菌^[53], 其他副产物对菌株造成污染的风险也随之较低. 尽管如此, 利用酿酒酵母生成也存在着一定的困难. 相比大肠杆菌, 角鲨烯的积累不利于酿酒酵母生长, 而且酿酒酵母比大肠杆菌生长要慢, 所以对于酿酒酵母中的酶或途径的机制的代谢工程研究需要进一步探讨.

4 总结与展望

随着对维生素E的研究越来越多, 因其广泛的作用其市场的需求量也越来越大. 虽然化学合成生育酚的技术已经很成熟, 但由于其无法合成特定立体构型的

维生素E单体从而影响维生素E的活性, 而被广泛地应用于动物饲料添加剂. 在保健、医疗、美容等方面, 人们更趋向于选择天然合成的维生素E.

在提高天然生物合成维生素E的产量方面, 学者们主要集中于通过代谢工程改造植物株来增加其产量, 如过表达与中间体HGA和GGDP/PDP的供应相关的酶. 通过体外培养植物愈伤组织和植物细胞的方法来获得维生素E也进行了一些尝试. 现有的天然维生素E仍主要从植物油中提取, 此种方法受制于植物资源的有限以及培养的时间成本过高.

利用光合藻类来作为生产维生素E的潜在方式的相关研究主要集中于通过添加诱导剂或高光胁迫来增加维生素E的产量, 因光合藻类培养条件的严苛, 需要考虑介质、通气、混合和照明的能量输入、光生物反应器、收割、人工、提取和纯化等成本. 因藻类易受污染, 在完全开放的养殖系统中进行藻类的商业规模种植是不可行的.

随着合成生物学的快速发展, 利用合成生物学在微生物中人为地构建高价值天然化合物的生物合成途径来实现合成目标产物的策略, 为生产目标化合物提供了更快、更经济的生产方式, 而且在微生物宿主中构建目标产物的合成途径还可以减少天然宿主中的途径中间体向其他竞争途径的代谢通量. 在维生素E的异源微生物的合成方面, 已有学者在大肠杆菌中构建异源代谢通路而成功合成了维生素E的一个单体 δ -生育三烯酚(15 $\mu\text{g}/(\text{g cdw})$). 本课题组通过将外源基因(*hpd*、*hpt*、*vte1*)整合至酿酒酵母基因组上成功构建酿酒酵母生物合成 δ -生育三烯酚的代谢通路, 并通过表达MVA路径相关基因*thmg1*和*ggpps*a提高了前体GGDP的积累量, 成功地在酿酒酵母中合成了 δ -生育三烯酚, 通过发酵培养基优化和2 L发酵罐培养最终获得了

表 4 近几年改造MVA路径生产类异戊二烯的进展

Table 4 Recent overview of the isoprenoid's biosynthesis by engineering the MVA pathway

底盘细胞	产品	产量	发酵时间(h)	发酵模式	文献
大肠杆菌	β -法尼烯(C_{15})	8.7 g/L	120	分批发酵	[52]
大肠杆菌	蒎烯(C_{10})	140 mg/L	24	摇瓶发酵	[56]
大肠杆菌	β -胡萝卜素(C_{40})	3.2 g/L	52	补料分批发酵	[57]
酿酒酵母	青蒿素(C_{15})	25 g/L	120	分批发酵	[53]
酿酒酵母	番茄红素(C_{40})	1.61 g/L	- ^{a)}	补料分批发酵	[54]
酿酒酵母	异戊二烯(C_5)	37 mg/L	- ^{a)}	摇瓶发酵	[55]

a) “-”表示文献中未披露相关数据

4.10 mg/L的 δ -生育三烯酚^[58]。除了在宿主菌中尽可能地提高前体HGA和GGDP/PDP的供应外,对催化HGA和GGDP/PDP最终合成维生素E单体的酶活性的研究也是一个重要的方向。未来可利用基因工程及合成生物学等生物技术,结合维生素E生物合成的天然途径,

以及合成其所必需的前体在其他优势模式微生物中的代谢工程策略,从而能够在不同的模式微生物中探索更加多元的天然维生素E的合成途径,寻找合适的微生物宿主菌来合成维生素E,并通过代谢工程、酶工程等策略改善酶活性从而提高维生素E产量。

参考文献

- Evans H M, Bishop K S. On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. *Science*, 1922, 56: 650–651
- Kamal-Eldin A, Appelqvist L A. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, 1996, 31: 671–701
- La Fata G, Weber P, Mohajeri M H. Effects of vitamin E on cognitive performance during ageing and in Alzheimer's disease. *Nutrients*, 2014, 6: 5453–5472
- Sozen E, Demirel T, Ozer N K. Vitamin E: Regulatory role in the cardiovascular system. *IUBMB Life*, 2019, 71: 507–515
- Parker P M. The 2009 report on naturally occurring vitamin E: World market segmentation by city. *City Segm Rep*, 2010, 1: 12–15
- Sattler S E, Cahoon E B, Coughlan S J, et al. Characterization of tocopherol cyclases from higher plants and cyanobacteria. Evolutionary implications for tocopherol synthesis and function. *Plant Physiol*, 2003, 132: 2184–2195
- Sivakumar G, Bacchetta L, Gatti R, et al. HPLC screening of natural vitamin E from mediterranean plant biofactories—A basic tool for pilot-scale bioreactors production of α -tocopherol. *J Plant Physiol*, 2005, 162: 1280–1283
- Caretto S, Nisi R, Paradiso A, et al. Tocopherol production in plant cell cultures. *Mol Nutr Food Res*, 2010, 54: 726–730
- Kolewe M E, Gaurav V, Roberts S C. Pharmaceutically active natural product synthesis and supply via plant cell culture technology. *Mol Pharm*, 2008, 5: 243–256
- De Luca V, Salim V, Atsumi S M, et al. Mining the biodiversity of plants: A revolution in the making. *Science*, 2012, 336: 1658–1661
- Backasch N, Schulz-Friedrich R, Appel J. Influences on tocopherol biosynthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Plant Phys*, 2005, 162: 758–766
- Fiedler E, Soll J, Schultz G. The formation of homogentisate in the biosynthesis of tocopherol and plastoquinone in spinach chloroplasts. *Planta*, 1982, 155: 511–515
- Vom Dorp K, Hölzl G, Plohm C, et al. Remobilization of phytol from chlorophyll degradation is essential for tocopherol synthesis and growth of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2015, 27: 2846–2859
- Almeida J, Azevedo M S, Spicher L, et al. Down-regulation of tomato *PHYTOL KINASE* strongly impairs tocopherol biosynthesis and affects prenillipid metabolism in an organ-specific manner. *J Exp Bot*, 2016, 67: 919–934
- Karunanandaa B, Qi Q, Hao M, et al. Metabolically engineered oilseed crops with enhanced seed tocopherol. *Metab Eng*, 2005, 7: 384–400
- Zhang C, Cahoon R E, Hunter S C, et al. Genetic and biochemical basis for alternative routes of tocotrienol biosynthesis for enhanced vitamin E antioxidant production. *Plant J*, 2013, 73: 628–639
- Collakova E, DellaPenna D. Homogentisate phytyltransferase activity is limiting for tocopherol biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2003, 131: 632–642
- Rippert P, Scimemi C, Dubald M, et al. Engineering plant shikimate pathway for production of tocotrienol and improving herbicide resistance. *Plant Physiol*, 2004, 134: 92–100
- Valentin H E, Lincoln K, Moshiri F, et al. The *Arabidopsis* vitamin E pathway *gene5-1* mutant reveals a critical role for phytol kinase in seed tocopherol biosynthesis. *Plant Cell*, 2006, 18: 212–224
- Seo Y S, Kim S J, Harn C H, et al. Ectopic expression of apple fruit homogentisate phytyltransferase gene (MdHPT1) increases tocopherol in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) leaves and fruits. *Phytochemistry*, 2011, 72: 321–329
- Hunter S C, Cahoon E B. Enhancing vitamin E in oilseeds: Unraveling tocopherol and tocotrienol biosynthesis. *Lipids*, 2007, 42: 97–108
- Antognoni F, Faudale M, Poli F, et al. Methyl jasmonate differentially affects tocopherol content and tyrosine amino transferase activity in cultured cells of *Amaranthus caudatus* and *Chenopodium quinoa*. *Plant Biol*, 2009, 11: 161–169
- Mendiola J A, García-Martínez D, Rupérez F J, et al. Enrichment of vitamin E from *Spirulina platensis* microalga by SFE. *J Supercrit Fluids*, 2008, 43: 484–489
- Kruk J, Szymańska R, Krupinska K. Tocopherol quinone content of green algae and higher plants revised by a new high-sensitive fluorescence detection method using HPLC—Effects of high light stress and senescence. *J Plant Physiol*, 2008, 165: 1238–1247
- Sivakumar G, Jeong K, Lay Jr J O. Biomass and RRR- α -tocopherol production in *Stichococcus bacillaris* strain siva2011 in a balloon bioreactor.

[Microb Cell Fact](#), 2014, 13: 79

- 26 Dähnhardt D, Falk J, Appel J, et al. The hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 is not required for plastoquinone biosynthesis. [FEBS Lett](#), 2002, 523: 177–181
- 27 Henstrand J M, McCue K F, Brink K, et al. Light and fungal elicitor induce 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase mRNA in suspension cultured cells of parsley (*Petroselinum crispum* L.). [Plant Physiol](#), 1992, 98: 761–763
- 28 Keith B, Dong X N, Ausubel F M, et al. Differential induction of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase genes in *Arabidopsis thaliana* by wounding and pathogenic attack. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 1991, 88: 8821–8825
- 29 Eudes A, Berthomieu R, Hao Z, et al. Production of muconic acid in plants. [Metab Eng](#), 2018, 46: 13–19
- 30 Luttk M A H, Vuralhan Z, Sui E, et al. Alleviation of feedback inhibition in *Saccharomyces cerevisiae* aromatic amino acid biosynthesis: Quantification of metabolic impact. [Metab Eng](#), 2008, 10: 141–153
- 31 Jiang J, Jia H, Feng G, et al. Overexpression of Medicago sativa TMT elevates the α -tocopherol content in *Arabidopsis* seeds, alfalfa leaves, and delays dark-induced leaf senescence. [Plant Sci](#), 2016, 249: 93–104
- 32 Gerlt J. Evolution of function in (β/α)8-barrel enzymes. [Curr Opin Chem Biol](#), 2003, 7: 252–264
- 33 Curran K A, Leavitt J M, Karim A S, et al. Metabolic engineering of muconic acid production in *Saccharomyces cerevisiae*. [Metab Eng](#), 2013, 15: 55–66
- 34 Kogure T, Kubota T, Suda M, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for shikimate overproduction by growth-arrested cell reaction. [Metab Eng](#), 2016, 38: 204–216
- 35 Liu X, Lin J, Hu H, et al. Site-specific integration and constitutive expression of key genes into *Escherichia coli* chromosome increases shikimic acid yields. [Enzyme Microb Technol](#), 2016, 82: 96–104
- 36 Chen X, Li M, Zhou L, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for improving shikimate synthesis from glucose. [Bioresour Technol](#), 2014, 166: 64–71
- 37 Gu P, Su T, Wang Q, et al. Tunable switch mediated shikimate biosynthesis in an engineered non-auxotrophic *Escherichia coli*. [Sci Rep](#), 2016, 6: 29745
- 38 Lee M Y, Hung W P, Tsai S H. Improvement of shikimic acid production in *Escherichia coli* with growth phase-dependent regulation in the biosynthetic pathway from glycerol. [World J Microb Biotechnol](#), 2017, 33: 25
- 39 Frank A, Groll M. The methylerythritol phosphate pathway to isoprenoids. [Chem Rev](#), 2017, 117: 5675–5703
- 40 Dudareva N, Andersson S, Orlova I, et al. From The Cover: The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2005, 102: 933–938
- 41 Lombard J, Moreira D. Origins and early evolution of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis in the three domains of life. [Mol Biol Evol](#), 2011, 28: 87–99
- 42 Opitz S, Nes W D, Gershenzon J. Both methylerythritol phosphate and mevalonate pathways contribute to biosynthesis of each of the major isoprenoid classes in young cotton seedlings. [Phytochemistry](#), 2014, 98: 110–119
- 43 Zhou J, Wang C, Yang L, et al. Geranyl diphosphate synthase: An important regulation point in balancing a recombinant monoterpene pathway in *Escherichia coli*. [Enzyme Microb Technol](#), 2015, 68: 50–55
- 44 Sun T, Miao L, Li Q, et al. Production of lycopene by metabolically-engineered *Escherichia coli*. [Biotechnol Lett](#), 2014, 36: 1515–1522
- 45 Zhang C, Chen X, Zou R, et al. Combining genotype improvement and statistical media optimization for isoprenoid production in *E. coli*. [PLOS One](#), 2013, 8: e75164
- 46 Zhao J, Li Q, Sun T, et al. Engineering central metabolic modules of *Escherichia coli* for improving β -carotene production. [Metab Eng](#), 2013, 17: 42–50
- 47 Ajikumar P K, Xiao W H, Tyo K E J, et al. Isoprenoid pathway optimization for taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*. [Science](#), 2010, 330: 70–74
- 48 Du F L, Yu H L, Xu J H, et al. Enhanced limonene production by optimizing the expression of limonene biosynthesis and MEP pathway genes in *E. coli*. [Bioresour Bioprocess](#), 2014, 1: 10
- 49 Albermann C, Ghanegaonkar S, Lemuth K, et al. Biosynthesis of the vitamin E compound δ -tocotrienol in recombinant *Escherichia coli* cells. [ChemBioChem](#), 2008, 9: 2524–2533
- 50 Ghanegaonkar S, Conrad J, Beifuss U, et al. Towards the *in vivo* production of tocotrienol compounds: Engineering of a plasmid-free *Escherichia coli* strain for the heterologous synthesis of 2-methyl-6-geranylgeranyl-benzoquinol. [J Biotechnol](#), 2012, 164: 238–247
- 51 Bloch K, Chaykin S, Phillips A H, et al. Mevalonic acid pyrophosphate and isopentenylpyrophosphate. *J Biol Chem*, 1959, 234: 2595–2604
- 52 You S, Yin Q, Zhang J, et al. Utilization of biodiesel by-product as substrate for high-production of β -farnesene via relatively balanced mevalonate pathway in *Escherichia coli*. [Bioresour Technol](#), 2017, 243: 228–236
- 53 Paddon C J, Westfall P J, Pitera D J, et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. [Nature](#), 2013, 496: 528–532

- 54 Xie W, Lü X, Ye L, et al. Construction of lycopene-overproducing *Saccharomyces cerevisiae* by combining directed evolution and metabolic engineering. [Metab Eng](#), 2015, 30: 69–78
- 55 Lv X, Xie W, Lu W, et al. Enhanced isoprene biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by engineering of the native acetyl-CoA and mevalonic acid pathways with a push-pull-restrain strategy. [J Biotechnol](#), 2014, 186: 128–136
- 56 Tashiro M, Kiyota H, Kawai-Noma S, et al. Bacterial production of pinene by a laboratory-evolved pinene-synthase. [ACS Synth Biol](#), 2016, 5: 1011–1020
- 57 Peng Q, Wang X, Shang M, et al. Isolation of a novel alkaline-stable lipase from a metagenomic library and its specific application for milkfat flavor production. [Microb Cell Fact](#), 2014, 13: 1
- 58 Sun H, Yang J, Lin X, et al. *De novo* high-titer production of delta-tocotrienol in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. [J Agric Food Chem](#), 2020, 68: 7710–7717

Summary for “维生素E生物合成的相关进展”

The progress of the biosynthesis of vitamin E

Jingli Yang^{1,2†}, Hong Sun^{1,2†} & Hao Song^{1,2*}¹ School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China;² Frontier Science Center for Synthetic Biology, Key Laboratory of Systems Bioengineering (Ministry of Education), Tianjin University, Tianjin 300072, China

† Equally contributed to this work

* Corresponding author, E-mail: hsong@tju.edu.cn

Vitamin E is a fat-soluble compound with powerful antioxidative and anticancer activity, which constitutes eight isoforms, namely α -, β -, γ -, δ -tocopherol and α -, β -, γ -, δ -tocotrienol. With the wide use of vitamin E in food, medicine, cosmetics and other fields, the demand of vitamin E in market is huge. Currently in the market, vitamin E is about 80% from chemical synthesis and 20% from extraction of oil distillates derived from plants or seeds. However, chemical synthesis of vitamin E suffered from the use of toxic catalysts, making the process environmentally unfriendly and unsustainable. In addition, the chemical synthesis technologies mainly synthesized the racemate of vitamin E and the enantiomerically pure vitamin E is mostly extracted from limited agricultural resources. Recently, using microorganisms to heterologously express metabolic pathways originated from plants is an attractive strategy due to the environmentally friendly, economic and easily scalable. Moreover, the progress of synthetic biology and metabolic engineering enabled the genetically tractable microorganisms such as *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* to successfully produce many natural compounds. As the natural pathways and related enzymes to synthesize vitamin E have been found in the last decades, it is feasible to engineer microorganisms to produce vitamin E. δ -tocotrienol, one isoform of vitamin E, was *de novo* heterologously synthesized in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* with the production of 15 $\mu\text{g}/(\text{g cdw})$ and the titer of 4.10 mg/L (1.3 mg/(g cdw)), respectively. In this review, we firstly summarized the natural pathways and the recent progress on the enhanced biosynthesis of Vitamin E. Then the pathways and the recent advances on metabolically engineering strategies for the enhanced key intermediates (homogentisate and geranylgeranyl diphosphate) in industrial model microorganism was summarized. Specifically, we reviewed the advances on the shikimate pathway and the 2-C-methyl-d-erythritol-4-phosphate (MEP) and mevalonic acid (MVA) pathway in different chassis. Finally, we summarized the present situation and prospected the potential of biosynthesis of vitamin E in microorganisms. Based on the current researches on the improving production of vitamin E in microorganisms, in addition to enhance the supply of the precursors (homogentisate and geranylgeranyl diphosphate) by metabolic engineering, more attention needs to be paid to improve the enzyme activities of the key enzymes like homogentisate phytyl transferase (HPT) and tocopherol/tocotrienol cyclase (TC), which restricted the conversion rate of the precursors to the target product vitamin E. In the future, biotechnology such as genetic engineering, metabolic engineering and synthetic biology can be combined with the natural pathway of vitamin E to biosynthesize specific monomer or mixture of vitamin E in different model microorganisms. To further improve the production of vitamin E in the engineered microorganism, diverse genes and enzymes from multiple species involved in the biosynthesis of vitamin E needs to be characterized and functionalized. Enzyme engineering could also be used to improve the enzyme activities and consequently enhance the production of vitamin E.

vitamin E, homogentisate, geranylgeranyl diphosphate, synthetic biologydoi: [10.1360/TB-2020-0706](https://doi.org/10.1360/TB-2020-0706)