



从制造到智造: 维生素B₁₂与合成生物学的不解之缘

康倩^{1,2}, 吕荣玉^{1,2,3}, 张大伟^{1,2*}

1. 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308

2. 中国科学院天津工业生物技术研究所, 低碳合成工程生物学重点实验室, 天津 300308

3. 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457

* 联系人, E-mail: zhang_dw@tib.cas.cn

2024-06-11 收稿, 2024-08-13 修回, 2024-09-10 接受, 2024-09-12 网络版发表

国家重点研发计划(2020YFA0907800)、国家自然科学基金(22325807, 22178372, 22208367)、中国博士后科学基金会与天津市联合资助项目(2023T008TJ)资助

摘要 合成生物学以生命科学为基础, 辅以工程化思维, 融合了物理学、化学、计算机科学等学科知识, 旨在改造、设计、构建新型的生物体系. 维生素B₁₂作为横跨医学、化学和生物学三学科的“明星小分子”, 近百年来一直备受研究人员的重视, 其生物制造在合成生物学发展的推动下不断创新. 本文探讨了自1926年维生素B₁₂小分子被发现至今的重要研究成果和内容, 其中囊括在早期医学、化学研究时期, 维生素B₁₂相关研究的重要诺奖级成果; 天然合成维生素B₁₂菌株挖掘、催化途径解析及遗传工具开发; 人工重组合成维生素B₁₂菌株和体系的构建及优化等重要内容. 聚焦近30年来, 合成生物学系统研究方法的提出和推进对维生素B₁₂生物制造有显著促进作用. 这些进展推动了维生素B₁₂从简单的天然菌种“制造”过程走向更具设计性、智能化的人工菌种与人工体系的“智造”过程转变. 此外, 维生素B₁₂复杂的天然合成途径成为经典的研究范本, 为合成生物学发展提供了优秀的经典案例, 与合成生物学的发展结下“不解之缘”.

关键词 合成生物学, 维生素B₁₂, 生物制造, 细胞工厂, 无细胞合成

维生素(vitamin), 指高等动植物维持机体正常代谢所必需的, 但自身不能合成或合成量不足, 必须靠外源供给获得的一类小分子有机化合物^[1]. 维生素B₁₂, 又名钴胺素(cobalamin), 是一种水溶性维生素. 通常认为, 维生素B₁₂分子是自然界中天然合成的最复杂的小分子化合物之一, 也是唯一含有金属离子的维生素分子. 钴胺素的常规化学结构如图1所示, 包括一个中心咕啉环(钴胺酰胺, cobamide)、下配体5,6-二甲基苯并咪唑(5,6-dimethylbenzimidazole, DMB)和上配体基团组成. 自然界中常见的钴胺素, 可根据上配体基团的不同进行分类, 划分为5'脱氧腺苷钴胺素(5'-deoxyadenosylcobalamin, AdoCbl)、甲基钴胺素(methylcobalamin, MeCbl)、羟

基钴胺素(hydroxocobalamin, OHCbl, 或称为水合钴胺素)和氰基钴胺素(cyanocobalamin, CNCbl). 其中心咕啉环结构是一个含钴离子的、经过侧链修饰的类卟啉环结构. 在环合成的过程中, 四个吡咯环(含有一个氮原子的五元环结构)经过环缩合过程, 消除一个碳原子后进行连接, 再在中心整合一个钴离子, 形成了一个结构类似于血红素和叶绿素的大环结构, 构成维生素B₁₂分子的中心大环基本结构. 后续经过一系列环上侧链修饰反应, 构成中心咕啉环结构; 下配体合成经过多步催化反应, 构成一个通过氨丙醇连接的 α -核唑(α -ribazole)结构, 此部分结构主要来源于DMB. 此外, 在一些细菌中, 在下配体合成阶段通过引入不同的核苷酸环结构,

引用格式: 康倩, 吕荣玉, 张大伟. 从制造到智造: 维生素B₁₂与合成生物学的不解之缘. 科学通报, 2025, 70: 44–59

Kang Q, Lv R, Zhang D. From manufacturing to intelligent manufacturing: the symbiotic tale of synthetic biology and vitamin B₁₂ (in Chinese). Chin Sci Bull, 2025, 70: 44–59, doi: 10.1360/TB-2024-0624

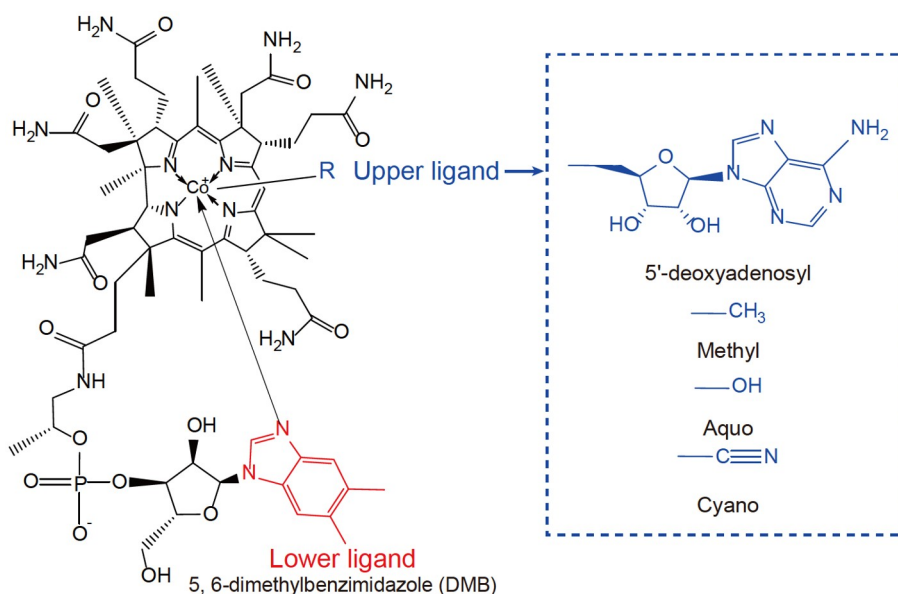


图1 维生素B₁₂的化学结构

Figure 1 The molecular structure of vitamin B₁₂

也可合成下配体结构不同的钴胺素类似物, 该类物质又被成为假钴胺素^[2]. 上配体基团的不同决定着钴胺素种类的不同, 其中AdoCbl和MeCbl是生物体内可直接合成的活性形式钴胺素, 通常以辅酶的形式在生物体内参与多种代谢反应. 然而, AdoCbl和MeCbl中上配体与钴离子间连接的C-Co键因为烷基的强斥电作用, 极易发生断裂, 对光照敏感. AdoCbl和MeCbl的光解产物主要为OHCbl. CNCbl是在维生素B₁₂工业生产或检测过程中, 应用氰酸盐处理替换上配体基团后形成的钴胺素形式, CNCbl的光稳定性明显增强, 是维生素B₁₂常见的商品化形式^[3].

合成生物学区别于传统分子生物学和经典系统生物学, 以生物科学所积累知识为基础, 借鉴工程学标准化、模块化和可设计等原则, 汇聚化学、物理学、信息科学等技术手段, “自下而上”地对生命体进行设计或改造^[4]. 自2000年Eric Kool重新定义合成生物学之后^[5], 合成生物学研究报道呈现井喷式爆发, 生物学研究的创造力日渐体现. 张先恩等人分别在2019^[6]和2024年^[4]对国内外合成生物学发展历史与脉络进行总结, 对合成生物学发展中多种理论技术创新、基因组编辑技术创新、细胞工厂和新生物系统构建创新成果进行了系统地介绍.

得益于将工程化思维设计引入菌株改造过程^[7,8], CRISPR基因编辑技术的发现与应用^[9,10], 蛋白质设

计^[11]、蛋白质功能预测^[12]、结构预测^[13]等多种研究和技术的发展, 构建人工重组菌株高效细胞工厂生产青蒿素前体^[14]、维生素B₁₂^[15]、大麻素前体^[16]等多种天然产物, 及构建新型无细胞催化体系, 实现合成大麻素前体^[17]、人工合成淀粉^[18]、36个酶体外合成维生素B₁₂^[19]等生化制品的研究成果相继报道, 展现出近些年合成生物学的蓬勃发展. 其中, 维生素B₁₂作为早期有机化学合成领域的里程碑性代表性化合物, 作为复杂天然产物的“明星小分子化合物”, 在合成生物学突飞猛进的今天, 其合成、生产方式与合成生物技术的发展关系更加紧密. 这种关联体现在维生素B₁₂的合成研究受益于多个突破性合成生物学技术的发展, 同时, 复杂长途径天然产物代表分子维生素B₁₂的生物合成增色了合成生物技术的成果. 其中构建人工重组大肠杆菌合成维生素B₁₂^[15], 构建36个酶无细胞催化体系合成维生素B₁₂的研究成果^[19], 先后被元英进课题组^[20]、张先恩课题组^[4]列举或介绍为合成生物学研究代表作. 在维生素B₁₂相关研究内容中, 研究人员相继应用了“格物致知”与“建物致知”相关理论思想, 展示了多种合成生物学理念对维生素B₁₂生物合成的深刻理解和认知. 维生素B₁₂的研究历程长达百余年, 从早期的简单“制造”到如今的“智造”, 从最初的天然菌种合成, 到现在的重组人工菌种合成、人工多酶体系智造. 维生素B₁₂与合成生物学的发展相互促进, 互相成就, 结下了

不解之缘(图2)。

维生素B₁₂的发现、研究与合成,至今经历了近百年的发展。从最初因其生理功能而被发现,到后来的化学结构解析、全化学合成方法开发、生理合成过程解析、微生物细胞工厂合成改造和无细胞催化合成技术开发,相关研究内容从医学、化学跨界至生物学研究,并在分子生物学技术和系统生物学理念的探究和解析基础上,以合成生物学为工具进行深度探究。维生素B₁₂凭借其天然合成途径的独特性、复杂性等特点,成为合成生物学探究的范本式案例,完整贯穿体现了合成生物学设计、改造与技术迭代的发展规律,相关研究成果从“格物致知”到“造物致知”,突破生、化、医三种学科限制,多学科交叉,引导维生素B₁₂的智造发展。

1 维生素B₁₂的医学应用与化学合成

20世纪初,维生素B₁₂分子因其生理功能而被人们所知晓。随着X射线、化学合成等技术的发展,该分子的化学结构被明确解析。随后,一些维生素B₁₂依赖的催化酶逐步被发掘,维生素B₁₂的医药功能及膳食添加剂等功能也逐渐促使其成为横跨医学、化学、生物学三学科的“明星小分子化合物”。

1.1 维生素B₁₂的发现与鉴定

1926年,美国医生Minot和Murphy首次报道描述了如何通过给病人喂食肝脏粗提取物可以有效治疗恶性贫血症状(pernicious anemia, PA)^[21],使得维生素B₁₂因其生理医药功能而首次进入人们的视线。二人也因为

发明了PA的肝脏治疗法,连同Whipple(美国医生,研究基础贡献者),共同获得了1934年诺贝尔生理学或医学奖(图3)。此后,科学家争先挖掘肝脏中相关重要活性成分,成功对相关活性成分进行分离^[22]与结晶^[23],并命名该活性分子为维生素B₁₂,又因为分子中包含钴离子,该化合物又被命名为钴胺素^[3]。1954年, Hodgkin及合作者^[24]应用X射线技术,解析出维生素B₁₂的化学结构(氰基钴胺素, CNCbl),揭示维生素B₁₂是一个缩合的类卟啉环结构,并在吡咯环衍生的大环结构中包含有一个钴离子;1957年, Hodgkin等人^[25]再次解析活性形式维生素B₁₂腺苷钴胺素(AdoCbl)的化学结构。维生素B₁₂分子的化学结构解析这一工作,助力Hodgkin因“解析了多种重要的化合物结构”而获得了1964年诺贝尔化学奖(图3)。自此,维生素B₁₂分子正式被人们所熟知,并在医药应用中发挥出重要的疾病治疗相关作用。

1.2 全化学合成维生素B₁₂

1973年,经过十余年的研究, Woodward团队与Eschenmoser团队合作报道了利用超过60多步化学反应,实现了维生素B₁₂的全化学合成这一工作^[26]。维生素B₁₂的全化学合成过程极其复杂,科学家先合成维生素B₁₂的关键中心结构分子钴啉酸(cobyrinic acid),接着设计一个拼接式的合成方案,合成化合物大分子的各个局部结构部分,再进行局部分子结构间的对接和大分子组装。这种方法后来成为合成所有复杂结构有机分子而普遍采用的方法。此外, Woodward团队的Hoffmann凭借团队在合成维生素B₁₂等一系列工作中的成果总结出的

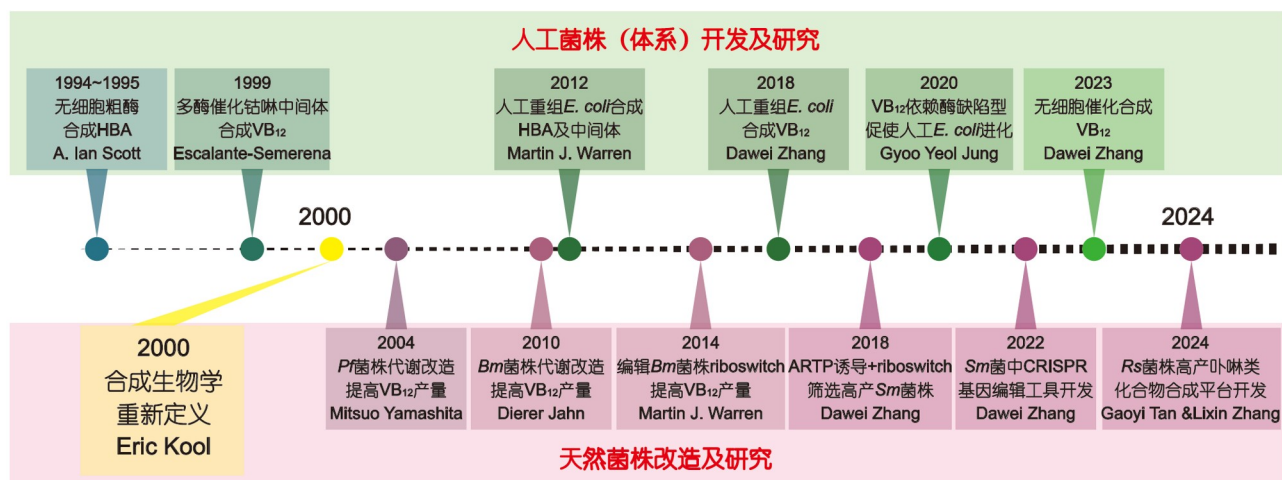


图2 维生素B₁₂的合成生物学研究相关代表成果

Figure 2 The representative researches of vitamin B₁₂ in synthetic biology

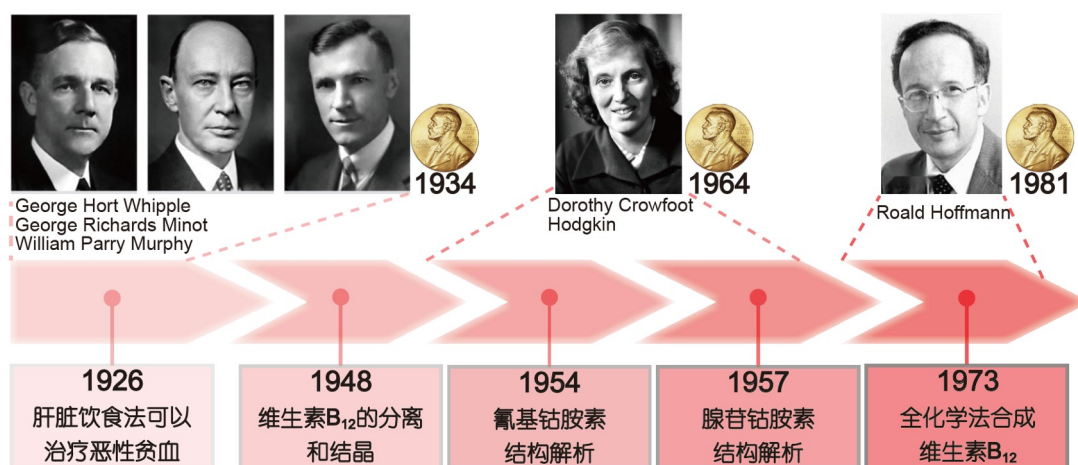


图3 维生素B₁₂早期医学、化学相关研究重要成果

Figure 3 The key research advancements on vitamin B₁₂ in the early fields of medicine and chemistry

“分子轨道对称守恒定律”，获得1981年诺贝尔化学奖(图3)。

1.3 维生素B₁₂的生理作用及医药应用

早期，维生素B₁₂因其可以辅助治疗恶性贫血的生理作用而被发现并逐渐被解析，从那之后，随着两种活性形式维生素B₁₂(腺苷钴胺素AdoCbl和甲基钴胺素MeCbl)的化学结构被解析，许多AdoCbl和MeCbl依赖的催化酶被分离并解析出来，如大肠杆菌来源的甲硫氨酸合成酶^[27]、谢氏丙酸杆菌来源的L-甲基丙二酰CoA异构酶^[28]等。在哺乳动物生理代谢活动中，以上两种活性形式的钴胺素均以辅酶的形式参与多种生物催化反应。其中AdoCbl主要在一些重排反应和异构反应中担任辅酶的角色，如作为甲基丙二酰CoA异构酶催化反应的辅酶，参与单链脂肪酸代谢、氨基酸代谢和胆固醇代谢等过程；而MeCbl主要参与甲基转移反应，如在甲硫氨酸合成酶中担任辅酶的作用，参与叶酸循环、同型半胱氨酸代谢和甲硫氨酸代谢等过程^[29]。除此之外，在原核细胞中，还有许多钴胺素依赖的酶如二醇脱氢酶、乙醇胺解氨酶、核糖核苷酸还原酶等^[29-31]。

维生素B₁₂因其生理催化作用与不可替代性，在医药方面有着广泛的应用。在医药方面，维生素B₁₂主要被应用于治疗和辅助治疗维生素B₁₂缺乏症及其并发症。维生素B₁₂缺乏症是一种营养缺乏症，主要由于维生素B₁₂摄入不足、吸收不良或生物利用度不足引起^[31]，是一个全球性的、重要的公共卫生问题，影响着全球

约6%的人口^[32]。维生素B₁₂缺乏症在老人、儿童及发展中国家高发，主要会造成人的血液性症状和神经性症状，如巨幼红细胞型贫血等。该缺乏症在婴幼儿中多表现为喂养障碍、抽搐、发育迟缓等^[33]，在成年人中多表现为神经功能受损、认知障碍、抑郁、听力丧失、黄斑变性等^[34-37]。

除了应用于医药，维生素B₁₂也作为重要的饲料添加剂，应用于家禽、家畜的饲养过程中，且其在饲料添加方向的应用长期占据着维生素B₁₂主要的市场份额。此外，维生素B₁₂还被拓展应用于化妆品添加、食品添加剂中^[38]。

2 天然菌株合成维生素B₁₂

目前，应用菌株发酵合成维生素B₁₂仍是工业生产的主流合成方法。在近百年的维生素B₁₂合成研究过程中，从早期的天然合成菌株筛选、催化合成酶鉴定，到后期的酶促反应解析，人工重构底盘细胞的构建等相关科学探索和技术发展，一直以来都是备受关注的研究课题。

高等动植物自身无法合成维生素B₁₂，只有部分原核生物可以实现维生素B₁₂的从头合成。维生素B₁₂的从头合成途径，指以5-氨基乙酰丙酸(5-ALA)分子为底物的维生素B₁₂合成途径，该说法对应以钴啉醇酰胺(cobinamide)等钴啉化合物类似物为底物的微生物补救合成途径。生物合成维生素B₁₂相关研究的第一次突破得益于基因组测序技术，有文献总结在1985年之前，还没有任何的钴胺素相关基因被报道和挖掘出来^[39]。从头合

成维生素B₁₂途径较为复杂, 根据反应途径中是否需要氧气参与, 可被划分为好氧合成途径和厌氧合成途径, 或称之为晚期钴离子插入途径和早期钴离子插入途径(图4)。早期针对维生素B₁₂合成途径的研究主要集中于对费氏丙酸杆菌(*Propionibacterium freudenreichii*, 早期称为谢氏丙酸杆菌*Propionibacterium shermanii*)合成途

径的挖掘与解析^[39]。该类菌利用厌氧合成途径来催化从头合成维生素B₁₂。同样利用厌氧合成途径从头合成维生素B₁₂的菌株还有鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)^[40]和巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)^[41]，利用好氧合成途径从头合成维生素B₁₂的菌株研究主要针对脱氮假单胞菌(*Pseudomonas denitrificans*)^[42]、莱

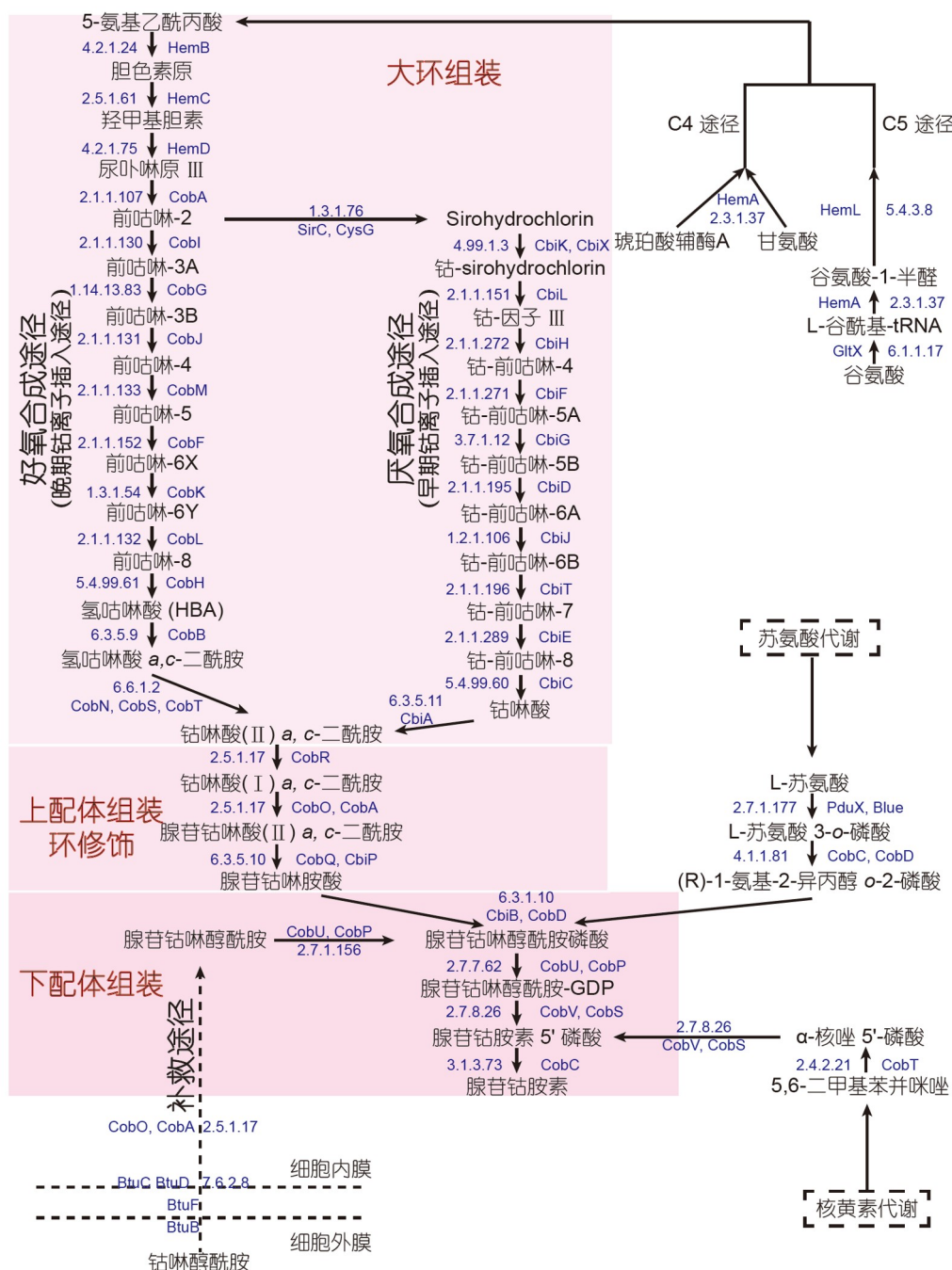


图 4 微生物来源的维生素B₁₂天然合成途径

Figure 4 The natural biosynthetic pathway of vitamin B₁₂ in microorganisms

膜红细菌(*Rhodobacter capsulatus*)^[43]、类球红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)和苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)^[44]等进行。

2.1 维生素B₁₂天然合成途径解析

5-ALA是合成血红素、叶绿素、维生素B₁₂等化合物的重要前体物质,是一种非蛋白质氨基酸。在生物体内,5-ALA一般由C₄或C₅途径合成:其中在C₄途径中,甘氨酸和琥珀酰CoA在5-ALA合成酶(5-aminolevulinate synthase, HemA, EC2.3.1.37)的催化下合成5-ALA^[45],在C₅途径中,谷氨酸在谷氨酰-tRNA合成酶(glutamate-tRNA ligase, GltX, EC6.1.1.17)^[46]、谷氨酰-tRNA还原酶(glutamyl-tRNA reductase, HemA, EC1.2.1.70)^[47]、谷氨酰氨基转移酶(glutamate-1-semialdehyde 2, 1-aminomutase, HemL, EC5.4.3.8)^[48]的级联催化下生成5-ALA。合成的5-ALA首先在胆色素原合成酶(porphobilinogen synthase, HemB, EC4.2.1.24)^[49]的催化下两两聚合,合成一个吡咯环化合物胆色素原(porphobilinogen)。四个胆色素原在胆色素原脱氨酶(porphobilinogen deaminase, HemC, EC2.5.1.61)^[50]的催化下脱氨聚合,合成一个四吡咯大环化合物羟甲基胆素(hydroxymethylbilane)。之后,羟甲基胆素在尿卟啉原III合成酶(uroporphyrinogen III synthase, HemD, EC4.2.1.75)^[51]的催化下脱水闭环,形成尿卟啉原III(uroporphyrinogen III),构成维生素B₁₂中大环分子的主要结构。尿卟啉原III在尿卟啉原III甲基转移酶(uroporphyrin-III^(C2,7)-methyltransferase, CobA, EC2.1.1.107)^[52]的催化下,以S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosyl-L-methionine, SAM)为甲基供体,进行大环分子上2、7位侧链的甲基化修饰,合成前咕啉-2(precorrin-2)(图4)。

以precorrin-2为底物级联催化合成维生素B₁₂中间体钴啉酸 α,c -二酰胺(cobyrinate α,c -diamide, CBAD)可分为好氧合成途径和厌氧合成途径。在厌氧合成途径中,precorrin-2经过脱氢反应(EC1.3.1.76)生成sirohydrochlorin。Sirohydrochlorin在钴螯合酶(EC4.99.1.3)的催化下生成cobalt-sirohydrochlorin。接着,cobalt-sirohydrochlorin再经过一系列甲基化修饰、还原反应、水解反应、异构反应、氨基化修饰,最终合成CBAD(图4)。在好氧合成途径中,precorrin-2先分别经过一系列甲基化修饰、还原反应、异构反应之后合成氢咕啉酸(hydrogenobyrinate, HBA),接着HBA再经过氨基化修饰和钴螯合反应,形成CBAD。好氧合成途径和厌氧合成途

径分别以是否需要氧气参与,或钴离子螯合反应顺序前后进行划分,存在于不同的原核生物体内。

在合成CBAD分子之后,维生素B₁₂合成途径中大环组装与修饰部分基本结束。CBAD先在CBAD还原酶(Cob(II)yrinate α,c -diamide reductase, CobR, EC2.5.1.17)^[53,54]的催化下以FMNH₂为还原力供给,进行中心钴离子Co²⁺到Co⁺的还原,合成Cob(I)yrinate α,c -diamide(CBAD(I)),文献^[53]报道称中心钴离子的还原是接下来腺苷转移反应的必要条件。经历过中心钴离子的还原之后,CBAD(I)在钴胺酰胺腺苷转移酶(cobinamide adenosyltransferase, CobA, EC2.5.1.17)^[55,56]的催化下,从ATP分子中转移一分子腺苷基团,连接于中心钴离子上,紧接着,再经由腺苷钴啉胺酸合成酶(adenosyl-cobyrinic acid synthase, CbiP, EC6.3.5.10)^[57,58]催化,以ATP分子为能量供给,以L-谷氨酰胺为氨基供体,进行四个侧链的氨基化修饰,形成腺苷钴啉胺酸(adenosylcobyrinate, AdoCby)。至此为止,维生素B₁₂分子中心大环结构侧链修饰全部完成,且上配体腺苷基团组装完成。

之后,AdoCby分子先在腺苷钴啉醇酰胺合成酶(adenosylcobinamide-phosphate synthase, CobD/CbiB, EC6.3.1.10)^[59]的催化下组装来源于L-苏氨酸的(R)-1-氨基-2-异丙醇O-2-磷酸((R)-1-amino-2-propanol O-2-phosphate),再在钴啉醇酰胺磷酸鸟苷转移酶(cobinamide phosphate guanylyltransferase, CobU, EC2.7.7.62)^[60]的催化下从GTP分子上转移鸟苷基团至上一步反应催化激活的侧链磷酸位点,合成腺苷钴啉醇酰胺-GDP(adenosylcobinamide-GDP)。接着腺苷钴啉醇酰胺-GDP在腺苷钴胺素5'磷酸合成酶(adenosylcobalamin 5'-phosphate synthase, CobS, EC2.7.8.26)^[61]的催化下,将来自5,6-二甲基苯并咪唑(5,6-dimethylbenzimidazole, DMB)的 α -核唑5'磷酸(α -ribazole 5'-phosphate)替换GMP基团,并在腺苷钴胺素磷酸磷酸酶(adenosylcobalamin 5'-phosphate phosphatase, CobC, EC3.1.3.73)^[62,63]的催化下脱去磷酸基团,完成辅酶B₁₂分子腺苷钴胺素的最终组装(图4)。

除了上述所述的维生素B₁₂从头合成途径之外,部分原核生物体内还存在维生素B₁₂合成的补救途径(salvage pathway),即从细胞外转运维生素B₁₂类似物钴啉醇酰胺等钴啉化合物,以此为底物催化合成腺苷钴胺素的途径。胞外钴啉化合物转运至原核细胞胞内一般通过ATP-binding cassette(ABC)转运系统实现。钴啉化

化合物的转运需要经过BtuC、BtuD、BtuF、BtuB酶催化实现。其中BtuB是位于细胞外膜上的TonB依赖的转运蛋白,负责结合胞外的钴啉类化合物,将其转运至周质空间,与周质结合蛋白BtuF相结合。接着,BtuF将钴啉类化合物传递给位于细胞内膜的BtuCD复合体上,其中BtuC为膜透过酶,BtuD为ATP酶^[64]。转运进细胞的钴啉醇酰胺在ATP:类咕啉腺苷转移酶(ATP:co(I)rrinoid adenosyltransferase, CobO或CobA, EC2.5.1.17)的催化下合成腺苷钴啉醇酰胺(adenosylcobinamide), adenosylcobinamide再在钴啉醇酰胺磷酸鸟苷转移酶(cobinamide phosphate guanylyltransferase, CobU)的催化下合成腺苷钴啉醇酰胺磷酸,其催化酶是一种具有激酶和鸟苷转移酶活性的双功能酶,同样负责催化下一步以GTP为鸟苷基团供给的鸟苷转移反应^[65]。

如图4所示,维生素B₁₂的天然菌株合成途径整体以中心大环结构的组装与修饰、上配体的组装和下配体的组装为顺序,涉及多步、多种催化反应,并与核黄素代谢、氨基酸代谢等途径有诸多交集。

2.2 天然菌株遗传改造及基因编辑技术发展

微生物发酵生产维生素B₁₂的技术有多种优化与改造策略,近年来,一些综述文章^[66,67]总结了较多利用增加前体物质投入、优化培养基配方与发酵工艺等策略的不同菌株维生素B₁₂生产提升的研究,本文不再赘述。除上述发酵工艺等优化策略之外,分子生物学等系列工具的开发和优化也在推动维生素B₁₂合成菌株的研究不断推进。

维生素B₁₂合成菌株的改造提升一般应用随机突变筛选、过表达催化途径酶编码基因、异源表达催化酶编码基因、下调细胞中原有支路途径等策略。如在*P. freudenreichii*菌株中过表达属于*hem*、*cob*、*cbi*基因家族的维生素B₁₂合成基因之后,Piao等人^[68]发现通过在质粒上过表达*cobA*、*cbiLF*、*cbiEGH*基因,可以分别提高*P. freudenreichii*的维生素B₁₂产量1.7、1.9和1.5倍,且通过过表达*cobU*和*cobS*基因对维生素B₁₂产量也稍有提升。此外,该项研究还指出,组合异源过表达*R. sphaeroides*来源的*hemA*基因和过表达同源的*hemB*和*cobA*基因,也可使得改造的*P. freudenreichii*的维生素B₁₂产量提高2.2倍。Biedendieck等人^[69]为提高*B. megaterium*的维生素B₁₂合成量,分别在质粒和基因组上过表达*cbiX*、*sirA*、*hemAXCDBL*操纵子和*cbiXJCDETLF-GAcysG^AcbiYbtuR*操纵子等催化酶编码基因及操纵子

基因序列;利用反义RNA(antisense RNA)策略弱化了*hemZ*基因表达,即弱化了维生素B₁₂合成途径的支路途径;通过重组表达引入3个维生素B₁₂结合蛋白(谷氨酸异构酶GlmS、核糖核苷酸三磷酸还原酶RtpR和甲硫氨酸合成酶MetH)来结合生成的维生素B₁₂,一定程度上减轻了维生素B₁₂积累造成的反馈抑制调节。Liu等人^[70]在黏着剑菌(*Ensifer adhaerens Casida A*)中敲除及弱化西罗血红素合成途径基因,可将底盘细胞的维生素B₁₂产量提升45.1%,证明敲除或弱化血红素合成途径的策略可以有效地提升菌株的维生素B₁₂产量。

在维生素B₁₂的天然合成途径中,核糖开关(riboswitch)是一种重要的调节工具。核糖开关一般分布在维生素B₁₂催化合成酶编码基因mRNA的5'非翻译区域,通过代谢物结合后引发的RNA结构改变来调控基因的表达,是一种在生物体中保守的代谢调节装置^[71]。Vitreschak等人^[72]研究了一种在细菌中普遍存在的RNA结构元件,证明该元件对维生素B₁₂代谢和转运的调控起着重要作用,并且从66个细菌基因组中挖掘出了近200个相似RNA元件。Fowler等人^[73]利用维生素B₁₂核糖开关*btuB*元件设计传感器(sensor),并以此为工具,探究了大肠杆菌中的辅酶B₁₂代谢和转运过程。Moore等人^[74]研究发现,*B. megaterium*中的*cbi*操纵子序列的表达受维生素B₁₂核糖开关的转录调节,并测定该核糖开关在钴胺素含量约为5 nmol/L时便关闭,停止操纵子编码基因的转录。基于这一发现,研究人员移除核糖开关序列之后,重组的*B. megaterium*可以在补充甘油的最小培养基中实现维生素B₁₂产量的大幅提升。

尽管上述分子生物学工具对维生素B₁₂合成菌株的改造有部分进展,但是,由于天然维生素B₁₂合成途径复杂,途径间反应调控多,所以单点调控或几个合成基因的上调和下调都较难获得维生素B₁₂菌株产量的系统性突破,维生素B₁₂合成高产菌株仍来源于天然合成菌株及基于天然菌株的定向进化和筛选。因此,建立良好的感应、筛选和检测系统,可以加速维生素B₁₂合成菌株的产量提升。Cai等人^[75]通过设定及筛选核糖开关文库,得到*S. typhimurium*来源的*btuB*是良好的核糖开关元件,以此为基础,建立了基于流式细胞仪的高通量阳性菌株筛选方法,结合常压室温等离子(atmospheric and room temperature plasma, ARTP)诱变方法,快速筛选获得*S. meliloti*突变菌株并对该菌株的基因组进行了重测序分析,获得的突变菌株的维生素B₁₂产量较野生型提高21.9%,可达156 ± 4.2 mg/L。除了应用核糖开关作

为维生素B₁₂感应元件之外,以钴胺素为辅酶的催化酶也可作为维生素B₁₂检测与筛选的工具.在原核生物中,甲硫氨酸合成反应由MetH和MetE两种酶分别催化完成,其中MetE催化甲基四氢叶酸(methyltetrahydrofolate)上的甲基转移至半胱氨酸,合成甲硫氨酸;MetH催化甲基钴胺素上的甲基转移至半胱氨酸,合成甲硫氨酸.所以, MetH催化合成甲硫氨酸是典型的钴胺素依赖的催化反应.以此为原理,在*S. typhimurium*和*E. coli*中敲除MetE酶编码基因,只保留钴胺素依赖催化酶MetH编码基因,并作相应遗传基因改造,可构建一系列维生素B₁₂合成检测菌株,在最小培养基平板中进行钴胺素合成的生物法检测^[76,77].

除了上述菌株改造、优化策略之外,基因编辑技术的发展同样对维生素B₁₂合成菌株的进化影响重大.依照前文所述,目前维生素B₁₂生产菌株仍以天然维生素B₁₂合成菌株和以此为基础的进化菌株为主.然而,天然合成菌株不像大肠杆菌、酵母等模式菌株一样拥有研究较为完善的基因编辑技术,通常只能应用转座子插入等传统的基因组编辑技术进行遗传改造,较难实现基因组的灵活编辑.因此,非模式菌种中的新型基因编辑技术的开发对提升维生素B₁₂的发酵合成产量同样重要. Cui等人^[78]创新性地天然维生素B₁₂合成菌株*S. meliloti*中构建引入基于Cas12k的碱基编辑技术C12KGET,该技术不依赖同源重组,可以实现10 kb大片段基因的插入,效率达到100%.作者以此高效基因编辑工具编辑改造*S. meliloti*底盘细胞的基因组序列,通过整合表达*R. capsulatus*来源的cobA基因,可提升菌株维生素B₁₂产量25%.

3 人工菌株合成维生素B₁₂

维生素B₁₂合成途径挖掘热潮始于20世纪90年代,至今,人类对这种复杂天然小分子的自然合成途径逐渐了解与解析,顺应经典生物学发展规律,尝试通过构建人工重组模式菌株来合成维生素B₁₂或维生素B₁₂中间体的合成生物学相关工作在近些年被相继报道,且主要报道工作均在大肠杆菌中完成.

3.1 模式生物底盘细胞合成维生素B₁₂中间体

2004年,McGoldrick等人^[79]为证明荚膜红细菌(*Rhodobacter capsulatus*)来源的CobZ酶的催化功能,将该基因编码序列(orf663)与其余*R. capsulatus*来源的7个Cob酶编码基因应用“Link and Lock”的质粒构建方式

串联表达于一个基于质粒的操纵子上,引入大肠杆菌BL21(DE3)菌株中,实现人工重组大肠杆菌合成维生素B₁₂中间体HBA. 2012年,Deery等人^[80]使用相似的人工操纵子序列进行改造,构建一系列基于大肠杆菌为底盘细胞的HBA中间体合成菌株.并以该系列菌株为材料,证明在HBA合成途径中,多个Cob催化酶与其催化底物或产物间存在较为紧密的结合状态,并利用这一酶与底物/产物结合的生理状态,开发出基于亲和标签蛋白纯化方法下的HBA合成中间体纯化法,将其命名为“酶捕获法(enzyme-trap approach)”. 2005年, Roessner等人^[57]在大肠杆菌中共表达*P. freudenreichii*来源的CobA编码基因和肠道沙门氏菌(*Salmonella enterica*)厌氧合成途径来源的CbiA、C、D、E、T、F、G、H、J、K、L、P编码基因,实现在重组大肠杆菌中合成维生素B₁₂中间体钴啉酸*a*, *c*-二酰胺(cobyrinic acid *a*, *c*-diamide, CBAD),并证明了CbiD的甲基化酶催化反应. 2024年, Tan和Zhang及合作者^[81]开发的利用光合微生物高效合成卟啉类化合物的工作,或将为维生素B₁₂等以卟啉类化合物为前体物质的化合物合成提供丰富的底物池,为一系列从卟啉类出发化合物的合成提供新思路与材料基础(图2).

3.2 人工重组菌株合成维生素B₁₂的构建与发展

1996年, Raux等人^[77]为研究鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)中钴胺素合成途径,将*S. typhimurium*中Cob酶操纵子序列引入大肠杆菌细胞中,利用微生物法检测,得出构建的大肠杆菌重组菌株可以从头合成钴啉酸和钴胺素. 2014年, Ko等人^[82]将脱氮假单胞菌(*Pseudomonas denitrificans*)来源的超过25个编码基因克隆至三个质粒上,并引入大肠杆菌BL21(DE3)底盘细胞中,通过厌氧发酵重组菌株并优化发酵条件,用生物法检测重组大肠杆菌发酵液中辅酶B₁₂,证明重组大肠杆菌中可以生产辅酶B₁₂. 2018年, Fang等人^[15]首先解析了维生素B₁₂好氧合成途径中钴螯合与腺苷咕啉醇酰胺磷酸的合成机理,然后将维生素B₁₂合成途径划分成5个模块,采用“自下而上”的策略将*R. capsulatus*、羊布鲁氏菌(*Brucella melitensis*)、*S. meliloti*、*S. typhimurium*、沼泽红假单胞菌(*Rhodospseudomonas palustris*)五个来源的28个异源基因引入大肠杆菌底盘细胞的质粒和基因组中,构建可以从头合成维生素B₁₂的大肠杆菌底盘细胞,相关合成结果应用液相-质谱联用进行鉴定. 研究人员还对该菌株进行发酵条件优化,实

现了应用人工重组大肠杆菌合成维生素B₁₂产量达307 μg/g(约0.67 mg/L)。

通过构建人工重组维生素B₁₂合成的大肠杆菌,实现了维生素B₁₂相关合成生物学研究的首次重大突破,为全新的维生素B₁₂合成生物体系的设计和构建成功奠定了标准。在此研究基础上,通过代谢工程优化策略和发酵工程优化策略^[83,84]等经典合成生物学改造思路与方法,以大肠杆菌为底盘细胞合成维生素B₁₂及中间体HBA的菌株产量得到进一步提升。此外, Noh等人^[85]通过在重组的维生素B₁₂合成大肠杆菌底盘细胞中敲除*metE*基因,构建钴胺营养缺陷型大肠杆菌,促进重组大肠杆菌自适应进化,提升重组菌株合成钴胺素能力。近期,研究人员开发出基于CRISPR-Cas9和MetClo组装的高效标准化迭代基因组编辑技术(standardized iterative genome editing, SIGE)^[86],用于在大肠杆菌中进行多位点、大片段的基因插入,且将该项技术应用于合成维生素B₁₂的人工重组菌株构建过程中,实现高效、快速地重组菌株构建及优化过程,同时推动合成生物学基因组编辑工具的开发。

表1对近20年来文献报道的生物合成维生素B₁₂的部分重要成果进行归纳汇总,其中包括应用天然维生素B₁₂合成菌株、人工重组维生素B₁₂合成大肠杆菌和无细胞催化体系实现的维生素B₁₂的合成情况。

4 人工无细胞体系催化合成维生素B₁₂

维生素B₁₂天然合成途径冗长,催化反应途径中存在多种、多层次调控机制。为了深度解析天然维生素B₁₂合成途径中调控与催化机制,研究人员将酶催化工具与多酶催化工具引入维生素B₁₂研究中,尝试进行催化反应验证、催化酶特征解析、多酶催化合成维生素B₁₂及其合成中间体尝试。

4.1 多酶催化合成维生素B₁₂中间体

1994和1995年, Roessner等人^[99,100]在大肠杆菌中异源单表达*P. denitrificans*来源的一系列Cob酶编码基因,利用SDS-PAGE检测酶的异源表达,并组合应用纯化的5-ALA脱氢酶hemB、PBG脱氢酶hemC、尿卟啉原III合成酶hemD的纯化酶液,以5-ALA、SAM、NADH和NADPH等为底物,催化合成维生素B₁₂中间体HBA。2008年, Lawrence等人^[53]在大肠杆菌中异源表达*B. melitensis*来源的CobR蛋白并进行纯化,在酶催化体系中证明CobR酶类咕啉还原酶催化活性,可以催化

CBAD中心钴离子的还原。2009年, Lundqvist等人^[101]利用大肠杆菌底盘细胞异源表达*B. melitensis*来源的CobN、CobS、CobT酶并进行纯化,在体外条件下孵育这三个蛋白形成一个大的蛋白复合体,证明其中CobS和CobT可以形成分子量大小为520 kDa的六聚体形式。并且该研究还以HBA为底物,通过引入CobNST复合酶和ATP、Co²⁺等体外催化条件,利用酶催化合成CBAD。2016年, Fang等人^[102]在大肠杆菌中异源表达*P. denitrificans*来源的hemB、hemC、hemD和*R. capsulatus*来源的CobA酶并进行纯化,构建包含5-ALA、SAM和四个催化酶的催化体系合成precorrin-2,通过响应面法优化酶及底物配比,提高precorrin-2催化合成速度达0.19 μmol/(L min)左右。1999年, Maggio-Hall和Escalante-Semerena^[103]以腺苷钴啉醇酰胺、DMB、NMN、GTP为底物,利用异源表达的*S. typhimurium*来源的CobU、CobS、CobT、CobC催化合成腺苷钴胺素5'-磷酸和腺苷钴胺素,并验证了CobS和CobC酶催化反应。2023年, Xiao等人^[104]利用设计SAM再生级联催化反应,并应用组装HBA合成途径12个催化酶,以5-ALA作为底物、以L-甲硫氨酸开启体系中甲基化反应的设计,实现了无细胞催化合成HBA的体系构建及合成产量提升。

以上述工作为代表的维生素B₁₂合成途径酶催化研究工作,及多酶组装合成维生素B₁₂中间体的尝试,为维生素B₁₂天然合成途径的研究、催化酶功能的解析提供了良好的研究和分析工具,也为无细胞催化合成维生素B₁₂技术的发展提供了丰富的技术参考。

4.2 无细胞催化从头合成维生素B₁₂

随着维生素B₁₂天然合成途径的逐步解析,酶催化反应的组装催生了利用无细胞催化技术合成维生素B₁₂的尝试。2023年, Kang等人^[19]将天然维生素B₁₂合成途径中24步催化反应划分为五个模块,进行逐个模块的构建、测试与打通。并且,作者设计引入8个催化反应组成的辅因子再生系统,通过组装36个酶的无细胞催化系统,实现了以5-ALA为底物合成维生素B₁₂的体系构建,并构建及优化了以HBA为底物催化合成维生素B₁₂的无细胞催化体系。尽管目前无细胞催化合成维生素B₁₂技术产量尚未及工业微生物发酵水平,但研究人员认为,构建无细胞催化体系实现维生素B₁₂的体外合成,对研究天然维生素B₁₂合成途径、解析其中酶催化反应,甚至未来构建高效、快速地引入无细胞催化方

表 1 近年文献中报道的部分菌株发酵或合成策略合成维生素B₁₂情况Table 1 Some reported strategies of fermentation and synthesis of vitamin B₁₂ in recent years

菌株	主要策略	培养规模	产量(mg/L)	培养周期(h)	产率(mg/(L h))	发表年份
<i>Propionibacterium freudenreichii</i> CICC 10019	应用膨胀床吸附反应器反应, 副产物丙酸移除, DMB补充	1.5 L 7 L	58.8 43.04	160	0.368 0.269	2012 ^[87]
	膜分离、半连续耦合发酵	7 L	56.76	160	0.35	2020 ^[88]
	检测中间体及调整DMB投入	100 L	39.15	120	0.326	2012 ^[89]
<i>Propionibacterium freudenreichii</i> PTCC 1674	应用废弃葵花籽油作为碳源组分	100 cm ³	2.74	140	0.020	2015 ^[90]
<i>Pseudomonas denitrificans</i>	发酵溶氧调控及细胞形态监控	50 L	239.7	168	1.427	2016 ^[91]
	流加葡萄糖和甜菜碱并进行pH控制		214.13	168	1.275	2008 ^[92]
	应用麦芽糖浆和玉米浸膏发酵生产	120 m ³	198.27	180	1.102	2015 ^[93]
	调节、控制发酵溶氧		198.9	168	1.183	2012 ^[94]
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 320	新型分离菌株、培养基发酵条件优化		140	168	0.833	2016 ^[44]
	新型设计C12KGET基因编辑工具改造菌株	250 mL	92	168	0.548	2022 ^[78]
	ARTP诱变筛选高产菌株		156	168	0.929	2018 ^[75]
<i>Ensifer adhaerens</i> hmm	关键基因表达强度调整与优化、补料发酵	250 mL	130.1 171.2	180 228	0.723 0.761	2022 ^[95]
<i>Ensifer adhaerens</i> S305	新型分离菌株、VB ₁₂ 途径基因表达调整	500 mL	245.6	120	2.047	2023 ^[96]
<i>Bacillus megaterium</i> DSM 319	培养基优化、三步发酵法	250 mL	0.204	36	0.006	2014 ^[97]
<i>Lactobacillus reuteri</i> ZJ03	多碳源组合发酵	250 mL	0.180	72	0.003	2015 ^[98]
<i>Escherichia coli</i>	人工重组构建维生素B ₁₂ 合成大肠杆菌		0.67	24	0.028	2018 ^[15]
	无质粒人工重组大肠杆菌, 应用基于CRISPR的新型基因组编辑工具构建	250 mL	1.49	24	0.0621	2024 ^[86]
无细胞催化体系	组装多酶, 分别以5-ALA为底物、以HBA为底物无细胞催化合成维生素B ₁₂	1.5 mL	0.42 5.78	29 14	0.0014 0.41	2023 ^[19]

法的维生素B₁₂生产方式或组合生产方式都提供了较好的理论与数据支撑。

人工重组维生素B₁₂合成大肠杆菌的构建与无细胞催化合成维生素B₁₂体系的开发, 均展示着研究人员对天然合成维生素B₁₂途径的深入解析。两种方法是合成生物学技术发展在维生素B₁₂合成研究中的具象化体现, 目前均处于技术优化阶段。两种技术方法各有优劣, 开发过程与目标有不同的侧重点与应用期许。相较而言, 因为人工重组菌株合成维生素B₁₂技术基于经典的发酵技术, 拥有技术工艺成熟、操作简单等技术优势。并且, 人工重组菌株相较天然菌株而言, 发酵周期明显缩短, 前者在一定程度上提高单位产量后, 有望在工业

生产应用方面体现出较好的潜力与优势; 无细胞催化合成维生素B₁₂技术理论转化率高、反应透明、检测方便。但多酶的制备成本、辅因子及底物的投入成本较高, 操作过程复杂, 暂不适用于大规模工业生产。因此, 无细胞催化合成维生素B₁₂技术更适用于作为天然催化途径解析工具、新酶和新途径的挖掘工具, 应用于小规模样品的合成、新型维生素B₁₂类似物产品开发以及相关科学研究领域的研究。

5 合成生物学发展推动维生素B₁₂智造

维生素B₁₂是目前发现的最复杂的维生素分子之一, 也是唯一含有金属离子的维生素, 从被发现到其合

成过程研究,经历了近百年的时间.从应用角度来讲,该类分子参与多种关键动植物代谢催化反应,是真核生物生命活动必不可少的一类膳食补充剂;从合成过程角度来说,该类分子的生物合成途径复杂,其微生物催化从头合成途径中涉及多种、多步、不同类型催化反应,可作为典型的天然催化合成复杂小分子化合物的研究范本.所以,在近百年来,维生素B₁₂的相关研究一直备受重视.

本课题组在过去近十年间专注于维生素B₁₂的合成生物学研究与应用,进行了广泛且深入的探索:①天然菌株挖掘与改造:成功挖掘并优化高效天然合成菌株*S. meliloti* 320^[44];开发了天然菌株的高通量诱变筛选进化方法^[75];基于CRISPR技术,开发了天然菌株基因组编辑工具C12KGET^[78]和CRISPR/Cas12eGET^[105];设计了维生素B₁₂生物传感器与高通量筛选方法^[106].②人工重组菌株从头构建:实现通过构建人工重组大肠杆菌合成维生素B₁₂^[115];通过代谢工程技术提高了大肠杆菌产B₁₂中间体HBA产量^[84];利用发酵工程提升大肠杆菌合成维生素B₁₂产量^[83];开发高效标准化基因组编辑工具,实现重组大肠杆菌产维生素B₁₂合成的快速提升^[86].③新型合成技术与方法开发:通过体外组装36个酶,实现维生素B₁₂的无细胞从头催化合成^[19];设计

并构建新型SAM再生体系,优化无细胞催化合成HBA体系^[104].

在维生素B₁₂的合成研究中,合成生物学相关研究技术一直占据重要的地位.无论是从早期维生素B₁₂依赖催化酶发掘、合成维生素B₁₂物种挖掘、维生素B₁₂合成催化酶解析、以微生物为底盘细胞的维生素B₁₂发酵工程技术优化,到后来的人工重组合成维生素B₁₂底盘细胞构建、非模式生物的基因编辑工具开发、无细胞催化合成维生素B₁₂方法开发,合成生物学相关理念与技术贯穿整个维生素B₁₂研究与生产发展历程.相关研究思路也从发掘、改造到合成生物学引领下的解析、设计、构建,不断推动维生素B₁₂生物合成途径的认知,从而实现其生物合成技术从“制造”逐渐向“智造”的转变.

在今后相关研究与技术的发展过程中,计算机科学与生物学的学科交叉与融合、人工智能技术的新兴与发展,可以预见地将推动维生素B₁₂的合成生物学研究与应用更加智能化、高效化发展.利用模型预测、大数据分析、机器学习等新兴技术,或将减少探索与优化过程中的试错环节.结合多酶催化技术清晰透明的反应过程追踪,合成生物学研究新兴技术将成为今后维生素B₁₂相关研究的强有力工具.

参考文献

- Wang Y Y, Liu L X, Jin Z X, et al. Advances in metabolic engineering for vitamins production (in Chinese). *Chin J Biotechnol*, 2021, 37: 1748–1770 [王岩岩, 刘林霞, 金朝霞, 等. 代谢工程在维生素生产中的应用及研究进展. *生物工程学报*, 2021, 37: 1748–1770]
- Barker H A, Weissbach H, Smyth R D. A coenzyme containing pseudovitamin B₁₂. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1958, 44: 1093–1097
- Martens J H, Barg H, Warren M, et al. Microbial production of vitamin B₁₂. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 58: 275–285
- Li Y J, Fu X F, Zhang X E. A brief overview of synthetic biology (in Chinese). *China Biotechnol*, 2024, 44: 52–60 [李玉娟, 傅雄飞, 张先恩. 合成生物学发展脉络概述. *中国生物工程杂志*, 2024, 44: 52–60]
- Rawls R L. ‘Synthetic biology’ makes its debut. *Chem Eng News*, 2000, 78: 49–53
- Zhang X E. Synthetic biology in China: Review and prospects (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2019, 49: 1543–1572 [张先恩. 中国合成生物学发展回顾与展望. *中国科学: 生命科学*, 2019, 49: 1543–1572]
- Elowitz M B, Leibler S. A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. *Nature*, 2000, 403: 335–338
- Gardner T S, Cantor C R, Collins J J. Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*. *Nature*, 2000, 403: 339–342
- Wiedenheft B, Sternberg S H, Doudna J A. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature*, 2012, 482: 331–338
- Cong L, Ran F A, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339: 819–823
- Dou J, Vorobieva A A, Sheffler W, et al. De novo design of a fluorescence-activating β -barrel. *Nature*, 2018, 561: 485–491
- Ryu J Y, Kim H U, Lee S Y. Deep learning enables high-quality and high-throughput prediction of enzyme commission numbers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116: 13996–14001
- Varadi M, Anyango S, Deshpande M, et al. AlphaFold Protein Structure Database: Massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Res*, 2021, 50: D439–D444
- Ro D K, Paradise E M, Ouellet M, et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature*, 2006, 440: 940–943

- 15 Fang H, Li D, Kang J, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for de novo biosynthesis of vitamin B₁₂. *Nat Commun*, 2018, 9: 4917
- 16 Luo X, Reiter M A, d'Espaux L, et al. Complete biosynthesis of cannabinoids and their unnatural analogues in yeast. *Nature*, 2019, 567: 123–126
- 17 Valliere M A, Korman T P, Woodall N B, et al. A cell-free platform for the prenylation of natural products and application to cannabinoid production. *Nat Commun*, 2019, 10: 565
- 18 Cai T, Sun H, Qiao J, et al. Cell-free chemoenzymatic starch synthesis from carbon dioxide. *Science*, 2021, 373: 1523–1527
- 19 Kang Q, Fang H, Xiang M, et al. A synthetic cell-free 36-enzyme reaction system for vitamin B₁₂ production. *Nat Commun*, 2023, 14: 5177
- 20 Ding M Z, Li B Z, Wang Y, et al. Significant research progress in synthetic biology (in Chinese). *Synth Biol J*, 2020, 1: 7–28 [丁明珠, 李炳志, 王颖, 等. 合成生物学重要研究方向进展. *合成生物学*, 2020, 1: 7–28]
- 21 Minot G R. Treatment of pernicious anemia by a special diet. *JAMA*, 1926, 87: 470
- 22 Smith E L. Purification of anti-pernicious anaemia factors from liver. *Nature*, 1948, 161: 638–639
- 23 Rickes E L, Brink N G, Koniuszy F R, et al. Crystalline vitamin B₁₂. *Science*, 1948, 107: 396–397
- 24 Brink C, Hodgkin D C, Lindsey J, et al. Structure of vitamin B₁₂: X-ray crystallographic evidence on the structure of vitamin B₁₂. *Nature*, 1954, 174: 1169–1171
- 25 Hodgkin D C, Kamper J, Lindsey J, et al. The structure of vitamin B formula I. An outline of the crystallographic investigation of vitamin B formula. *Proc Royal Soc A*, 1957, 242: 228–263
- 26 Woodward R B. The total synthesis of vitamin B₁₂. *Pure Appl Chem*, 1973, 33: 145–178
- 27 Dixon M M, Huang S, Matthews R G, et al. The structure of the C-terminal domain of methionine synthase: Presenting S-adenosylmethionine for reductive methylation of B₁₂. *Structure*, 1996, 4: 1263–1275
- 28 Mancia F, Keep N H, Nakagawa A, et al. How coenzyme B₁₂ radicals are generated: The crystal structure of methylmalonyl-coenzyme A mutase at 2 Å resolution. *Structure*, 1996, 4: 339–350
- 29 Osman D, Cooke A, Young T R, et al. The requirement for cobalt in vitamin B₁₂: A paradigm for protein metalation. *Biochim Biophys Acta*, 2021, 1868: 118896
- 30 Costa F G, Deery E, Warren M, et al. New insights into the biosynthesis of cobamides and their use—ScienceDirect. In: Liu H W, Begley T, eds. *Comprehensive Natural Products III (Third Edition)*. Amsterdam: Berlin, 2020, 5. 364–394
- 31 Bridwell-Rabb J, Drennan C L. Vitamin B₁₂ in the spotlight again. *Curr Opin Chem Biol*, 2017, 37: 63–70
- 32 Azzini E, Raguzzini A, Polito A. A brief review on vitamin B₁₂ deficiency looking at some case study reports in adults. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 9694
- 33 Dror D K, Allen L H. Effect of vitamin B₁₂ deficiency on neurodevelopment in infants: Current knowledge and possible mechanisms. *Nutr Rev*, 2008, 66: 250–255
- 34 Leishear K, Boudreau R M, Studenski S A, et al. Relationship between vitamin B₁₂ and sensory and motor peripheral nerve function in older adults. *J Am Geriatrics Soc*, 2012, 60: 1057–1063
- 35 Lildballe D L, Fedosov S, Sherliker P, et al. Association of cognitive impairment with combinations of vitamin B₁₂-related parameters. *Clin Chem*, 2011, 57: 1436–1443
- 36 Biemans E, Hart H E, Rutten G E H M, et al. Cobalamin status and its relation with depression, cognition and neuropathy in patients with type 2 diabetes mellitus using metformin. *Acta Diabetol*, 2015, 52: 383–393
- 37 Gopinath B, Flood V M, Rochtchina E, et al. Homocysteine, folate, vitamin B-12, and 10-y incidence of age-related macular degeneration. *Am J Clin Nutr*, 2013, 98: 129–135
- 38 Ma H, Wang L L, Zhang C X, et al. Biosynthesis, fermentation and application of vitamin B₁₂—A review (in Chinese). *Chin J Biotechnol*, 2008, 24: 927–932 [马蕙, 王丽丽, 张春晓, 等. 维生素B₁₂的生物合成、发酵生产与应用. *生物工程学报*, 2008, 24: 927–932]
- 39 Warren M J, Raux E, Schubert H L, et al. The biosynthesis of adenosylcobalamin (vitamin B₁₂). *Nat Prod Rep*, 2002, 19: 390–412
- 40 Lawrence J G, Roth J R. Evolution of coenzyme B₁₂ synthesis among enteric bacteria: Evidence for loss and reacquisition of a multigene complex. *Genetics*, 1996, 142: 11–24
- 41 Moore S J, Lawrence A D, Biedendieck R, et al. Elucidation of the anaerobic pathway for the corrin component of cobalamin (vitamin B₁₂). *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 14906–14911
- 42 Crouzet J, Levy-Schil S, Cameron B, et al. Nucleotide sequence and genetic analysis of a 13.1-kilobase-pair *Pseudomonas denitrificans* DNA fragment containing five cob genes and identification of structural genes encoding Cob(I)alamin adenosyltransferase, cobyric acid synthase, and bifunctional cobinamide kinase-cobinamide phosphate guanylyltransferase. *J Bacteriol*, 1991, 173: 6074–6087
- 43 Pollich M, Klug G. Identification and sequence analysis of genes involved in late steps in cobalamin (vitamin B₁₂) synthesis in *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol*, 1995, 177: 4481–4487
- 44 Dong H, Li S, Fang H, et al. A newly isolated and identified vitamin B₁₂ producing strain: *Sinorhizobium meliloti* 320. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2016, 39: 1527–1537

- 45 Hornberger U, Liebetanz R, Tichy H V, et al. Cloning and sequencing of the *hemA* gene of *Rhodobacter capsulatus* and isolation of a δ -aminolevulinic acid-dependent mutant strain. *Mol Gen Genet*, 1990, 221: 371–378
- 46 Breton R, Sanfaçon H, Papayannopoulos I, et al. Glutamyl-tRNA synthetase of *Escherichia coli*. Isolation and primary structure of the *gluX* gene and homology with other aminoacyl-tRNA synthetases. *J Biol Chem*, 1986, 261: 10610–10617
- 47 Masahisa I, Katsuji M, Masamichi H, et al. Cloning and characterization of genes involved in the biosynthesis of δ -aminolevulinic acid in *Escherichia coli*. *Gene*, 1992, 121: 127–132
- 48 Ilag L L, Jahn D, Eggertsson G, et al. The *Escherichia coli hemL* gene encodes glutamate 1-semialdehyde aminotransferase. *J Bacteriol*, 1991, 173: 3408–3413
- 49 Bollivar D W, Clauson C, Lighthall R, et al. Rhodobacter capsulatus porphobilinogen synthase, a high activity metal ion independent hexamer. *BMC Biochem*, 2004, 5: 17
- 50 Biel A J, Canada K, Huang D, et al. Oxygen-mediated regulation of porphobilinogen formation in *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol*, 2002, 184: 1685–1692
- 51 Mohr C D, Sonstebly S K, Deretic V. The *Pseudomonas aeruginosa* homologs of *hemC* and *hemD* are linked to the gene encoding the regulator of mucoidy AlgR. *Molec Gen Genet*, 1994, 242: 177–184
- 52 Blanche F, Debussche L, Thibaut D, et al. Purification and characterization of S-adenosyl-L-methionine: Uroporphyrinogen III methyltransferase from *Pseudomonas denitrificans*. *J Bacteriol*, 1989, 171: 4222–4231
- 53 Lawrence A D, Deery E, McLean K J, et al. Identification, characterization, and structure/function analysis of a corrin reductase involved in adenosylcobalamin biosynthesis. *J Biol Chem*, 2008, 283: 10813–10821
- 54 Mera P E, Escalante-Semerena J C. Dihydroflavin-driven adenosylation of 4-coordinate Co(II) corrinoids. *J Biol Chem*, 2010, 285: 2911–2917
- 55 Suh S, Escalante-Semerena J C. Purification and initial characterization of the ATP: Corrinoid adenosyltransferase encoded by the *cobA* gene of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*, 1995, 177: 921–925
- 56 Debussche L, Couder M, Thibaut D, et al. Purification and partial characterization of Cob(I)alamin adenosyltransferase from *Pseudomonas denitrificans*. *J Bacteriol*, 1991, 173: 6300–6302
- 57 Roessner C A, Williams H J, Scott A I. Genetically engineered production of 1-desmethylcobyrinic acid, 1-desmethylcobyrinic acid a,c-diamide, and cobyrinic acid a,c-diamide in *Escherichia coli* implies a role for CbiD in C-1 methylation in the anaerobic pathway to cobalamin. *J Biol Chem*, 2005, 280: 16748–16753
- 58 Blanche F, Couder M, Debussche L, et al. Biosynthesis of vitamin B₁₂: Stepwise amidation of carboxyl groups b, d, e, and g of cobyrinic acid a,c-diamide is catalyzed by one enzyme in *Pseudomonas denitrificans*. *J Bacteriol*, 1991, 173: 6046–6051
- 59 Zayas C L, Claas K, Escalante-Semerena J C. The CbiB protein of *Salmonella enterica* is an integral membrane protein involved in the last step of the de novo corrin ring biosynthetic pathway. *J Bacteriol*, 2007, 189: 7697–7708
- 60 O'Toole G A, Escalante-Semerena J C. Purification and characterization of the bifunctional CobU enzyme of *Salmonella typhimurium* LT2. *J Biol Chem*, 1995, 270: 23560–23569
- 61 Cameron B, Blanche F, Rouyez M C, et al. Genetic analysis, nucleotide sequence, and products of two *Pseudomonas denitrificans* cob genes encoding nicotinate-nucleotide: Dimethylbenzimidazole phosphoribosyltransferase and cobalamin (5'-phosphate) synthase. *J Bacteriol*, 1991, 173: 6066–6073
- 62 O'Toole G A, Trzebiatowski J R, Escalante-Semerena J C. The cobC gene of *Salmonella typhimurium* codes for a novel phosphatase involved in the assembly of the nucleotide loop of cobalamin. *J Biol Chem*, 1994, 269: 26503–26511
- 63 Zayas C L, Escalante-Semerena J C. Reassessment of the late steps of coenzyme B₁₂ synthesis in *Salmonella enterica*: Evidence that dephosphorylation of adenosylcobalamin-5'-phosphate by the CobC phosphatase is the last step of the pathway. *J Bacteriol*, 2007, 189: 2210–2218
- 64 Escalante-Semerena J C. Conversion of cobinamide into adenosylcobamide in bacteria and archaea. *J Bacteriol*, 2007, 189: 4555–4560
- 65 Newmister S A, Otte M M, Escalante-Semerena J C, et al. Structure and mutational analysis of the archaeal GTP:AdoCbi-P guanylyltransferase (CobY) from *Methanocaldococcus jannaschii*: Insights into GTP binding and dimerization. *Biochemistry*, 2011, 50: 5301–5313
- 66 Balabanova L, Averianova L, Marchenok M, et al. Microbial and genetic resources for cobalamin (vitamin B₁₂) biosynthesis: From ecosystems to industrial biotechnology. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 4522
- 67 Calvillo Á, Pellicer T, Carnicer M, et al. Bioprocess strategies for vitamin B₁₂ production by microbial fermentation and its market applications. *Bioengineering*, 2022, 9: 365
- 68 Piao Y, Yamashita M, Kawarachi N, et al. Production of vitamin B₁₂ in genetically engineered *Propionibacterium freudenreichii*. *J Biosci Bioeng*, 2004, 98: 167–173
- 69 Biedendieck R, Malten M, Barg H, et al. Metabolic engineering of cobalamin (vitamin B₁₂) production in *Bacillus megaterium*. *Microb Biotechnol*, 2010, 3: 24–37
- 70 Liu Y, Chang Y, Wang Q, et al. Effect of blocking the haem synthesis pathway and weakening the haem synthesis pathway for sirohaem on the

- growth of and vitamin B₁₂ synthesis in *Ensifer adhaerens* Casida A. [Bioprocess Biosyst Eng](#), 2023, 46: 1825–1835
- 71 Mandal M, Breaker R R. Gene regulation by riboswitches. [Nat Rev Mol Cell Biol](#), 2004, 5: 451–463
- 72 Vitreschak A G, Rodionov D A, Mironov A A, et al. Regulation of the vitamin B₁₂ metabolism and transport in bacteria by a conserved RNA structural element. [RNA](#), 2003, 9: 1084–1097
- 73 Fowler C C, Brown E D, Li Y. Using a riboswitch sensor to examine coenzyme B₁₂ metabolism and transport in *E. coli*. [Chem Biol](#), 2010, 17: 756–765
- 74 Moore S J, Mayer M J, Biedendieck R, et al. Towards a cell factory for vitamin B₁₂ production in *Bacillus megaterium*: Bypassing of the cobalamin riboswitch control elements. [New Biotechnol](#), 2014, 31: 553–561
- 75 Cai Y, Xia M, Dong H, et al. Engineering a vitamin B₁₂ high-throughput screening system by riboswitch sensor in *Sinorhizobium meliloti*. [BMC Biotechnol](#), 2018, 18: 27
- 76 Taranto M P, Vera J L, Hugenholtz J, et al. *Lactobacillus reuteri* CRL1098 produces cobalamin. [J Bacteriol](#), 2003, 185: 5643–5647
- 77 Raux E, Lanois A, Levillayer F, et al. *Salmonella typhimurium* cobalamin (vitamin B₁₂) biosynthetic genes: Functional studies in *S. typhimurium* and *Escherichia coli*. [J Bacteriol](#), 1996, 178: 753–767
- 78 Cui Y, Dong H, Tong B, et al. A versatile Cas12k-based genetic engineering toolkit (C12KGET) for metabolic engineering in genetic manipulation-deprived strains. [Nucleic Acids Res](#), 2022, 50: 8961–8973
- 79 McGoldrick H M, Roessner C A, Raux E, et al. Identification and characterization of a novel vitamin B₁₂ (cobalamin) biosynthetic enzyme (CobZ) from *Rhodobacter capsulatus*, containing flavin, heme, and Fe-S cofactors. [J Biol Chem](#), 2005, 280: 1086–1094
- 80 Deery E, Schroeder S, Lawrence A D, et al. An enzyme-trap approach allows isolation of intermediates in cobalamin biosynthesis. [Nat Chem Biol](#), 2012, 8: 933–940
- 81 Chen H, Wang Y, Wang W, et al. High-yield porphyrin production through metabolic engineering and biocatalysis. [Nat Biotechnol](#), 2024, doi: 10.1038/s41587-024-02267-3
- 82 Ko Y, Ashok S, Ainala S K, et al. Coenzyme B₁₂ can be produced by engineered *Escherichia coli* under both anaerobic and aerobic conditions. [Biotechnol J](#), 2014, 9: 1526–1535
- 83 Li D, Fang H, Gai Y, et al. Metabolic engineering and optimization of the fermentation medium for vitamin B₁₂ production in *Escherichia coli*. [Bioprocess Biosyst Eng](#), 2020, 43: 1735–1745
- 84 Jiang P, Fang H, Zhao J, et al. Optimization of hydrogenobyrinic acid biosynthesis in *Escherichia coli* using multi-level metabolic engineering strategies. [Microb Cell Fact](#), 2020, 19: 118
- 85 Noh M H, Lim H G, Moon D, et al. Auxotrophic selection strategy for improved production of coenzyme B₁₂ in *Escherichia coli*. [iScience](#), 2020, 23: 100890
- 86 Fang H, Zhao J, Zhao X, et al. Standardized iterative genome editing method for *Escherichia coli* based on CRISPR-Cas9. [ACS Synth Biol](#), 2024, 13: 613–623
- 87 Wang P, Wang Y, Liu Y, et al. Novel *in situ* product removal technique for simultaneous production of propionic acid and vitamin B₁₂ by expanded bed adsorption bioreactor. [Bioresour Technol](#), 2012, 104: 652–659
- 88 Wang Z, Xu G, Du W, et al. Efficient *ex-situ* biosynthesis of vitamin B₁₂ by *Propionibacterium freudenreichii* using membrane separation coupling technology. [Biochem Eng J](#), 2020, 161: 107688
- 89 Wang P, Wang Y, Su Z. Improvement of adenosylcobalamin production by metabolic control strategy in *Propionibacterium freudenreichii*. [Appl Biochem Biotechnol](#), 2012, 167: 62–72
- 90 Hajfarajollah H, Mokhtarani B, Mortaheb H, et al. Vitamin B₁₂ biosynthesis over waste frying sunflower oil as a cost effective and renewable substrate. [J Food Sci Technol](#), 2015, 52: 3273–3282
- 91 Wang Z J, Shi H, Wang P. The online morphology control and dynamic studies on improving vitamin B₁₂ production by pseudomonas denitrificans with online capacitance and specific oxygen consumption rate. [Appl Biochem Biotechnol](#), 2016, 179: 1115–1127
- 92 Li K T, Liu D H, Chu J, et al. An effective and simplified pH-stat control strategy for the industrial fermentation of vitamin B₁₂ by *Pseudomonas denitrificans*. [Bioprocess Biosyst Eng](#), 2008, 31: 605–610
- 93 Xia W, Chen W, Peng W, et al. Industrial vitamin B₁₂ production by *Pseudomonas denitrificans* using maltose syrup and corn steep liquor as the cost-effective fermentation substrates. [Bioprocess Biosyst Eng](#), 2015, 38: 1065–1073
- 94 Li K, Zhou J, Cheng X, et al. Study on the dissolved oxygen control strategy in large-scale vitamin B₁₂ fermentation by *Pseudomonas denitrificans*. [J Chem Tech Biotech](#), 2012, 87: 1648–1653
- 95 Xu S, Xiao Z, Yu S, et al. Enhanced cobalamin biosynthesis in *Ensifer adhaerens* by regulation of key genes with gradient promoters. [Synth Syst Biotechnol](#), 2022, 7: 941–948
- 96 Liu Y, Huang W, Wang Q, et al. Research on the targeted improvement of the yield of a new VB₁₂-producing strain, *Ensifer adhaerens* S305, based on genomic and transcriptomic analysis. [BMC Biotechnol](#), 2023, 23: 53

- 97 Mohammed Y, Lee B, Kang Z, et al. Development of a two-step cultivation strategy for the production of vitamin B₁₂ by *Bacillus megaterium*. [Microb Cell Fact](#), 2014, 13: 102
- 98 Gu Q, Zhang C, Song D, et al. Enhancing vitamin B₁₂ content in soy-yogurt by *Lactobacillus reuteri*. [Int J Food Microbiol](#), 2015, 206: 56–59
- 99 Roessner A C, Spencer J B, Stolowich N J, et al. Genetically engineered synthesis of precorrin-6x and the complete corrinoid, hydrogenobyric acid, an advanced precursor of vitamin B₁₂. [Chem Biol](#), 1994, 1: 119–124
- 100 Roessner C A, Spencer J B, Ozaki S, et al. Overexpression in *Escherichia coli* of 12 vitamin B₁₂ biosynthetic enzymes. [Protein Expression Purification](#), 1995, 6: 155–163
- 101 Lundqvist J, Elmlund D, Heldt D, et al. The AAA+ motor complex of subunits CobS and CobT of cobaltochelatase visualized by single particle electron microscopy. [J Struct Biol](#), 2009, 167: 227–234
- 102 Fang H, Dong H, Cai T, et al. *In vitro* optimization of enzymes involved in precorrin-2 synthesis using response surface methodology. [PLoS ONE](#), 2016, 11: e0151149
- 103 Maggio-Hall L A, Escalante-Semerena J C. *In vitro* synthesis of the nucleotide loop of cobalamin by *Salmonella typhimurium* enzymes. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 1999, 96: 11798–11803
- 104 Xiao K, Kang Q, Xiang M, et al. Optimization of hydrogenobyric acid synthesis in a cell-free multienzyme reaction by novel S-adenosyl-methionine regeneration. [ACS Synth Biol](#), 2023, 12: 1339–1348
- 105 Liu G, Wang H, Tong B, et al. An efficient CRISPR/Cas12e system for genome editing in *Sinorhizobium meliloti*. [ACS Synth Biol](#), 2023, 12: 898–903
- 106 Yang X, Wang H, Ding D, et al. A hybrid RNA-protein biosensor for high-throughput screening of adenosylcobalamin biosynthesis. [Synth Syst Biotechnol](#), 2024, 9: 513–521

Summary for “从制造到智造: 维生素B₁₂与合成生物学的不解之缘”

From manufacturing to intelligent manufacturing: the symbiotic tale of synthetic biology and vitamin B₁₂

Qian Kang^{1,2}, Rongyu Lv^{1,2,3} & Dawei Zhang^{1,2*}

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

² Key Laboratory of Engineering Biology for Low-Carbon Manufacturing, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

³ School of Biological Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

* Corresponding author, E-mail: zhang_dw@tib.cas.cn

Synthetic biology, which approaches biotechnological problems with an engineering mindset, integrates knowledge from disciplines such as physics, chemistry, and computer science, aiming to transform, design, and construct novel biological systems. This interdisciplinary field is distinct in its systematic, modular, and design-oriented methodology, which contrasts with the more traditional trial-and-error techniques of biology. By applying engineering principles, synthetic biology enables precise manipulation and optimization of biological processes, leading to significant advancements in biotechnology. One particularly valuable compound that has benefited from this approach is vitamin B₁₂.

Vitamin B₁₂ is a valuable compound with diverse applications in medicine, chemistry, and biology, which has inspired continuous research for nearly a century. Early breakthroughs in vitamin B₁₂ research, especially those related to its chemical structure and biological functions, earned several Nobel Prizes and contributed to fundamental knowledge in medical and chemical fields. Currently, the production of vitamin B₁₂ has traditionally relied on natural microbial strains, which synthesize the compound through complex biochemical pathways. Recently, its biotechnological production has received a fresh impetus due to advances of synthetic biology.

This paper explores the important achievements of vitamin B₁₂ research since its discovery in 1926, including the Nobel prize-winning achievements during the early periods of medical and chemical investigation, which laid the groundwork for understanding the compound's structure and function. Additionally, since the 1980s, the isolation of naturally occurring strains that synthesize vitamin B₁₂, along with the analysis of their catalytic pathways, has sparked a surge of interest in the biotechnological production of vitamin B₁₂. Subsequently, the development of genetic tools of natural strains capable of synthesizing vitamin B₁₂ has significantly advanced its biosynthetic production. Recently, construction and optimization of engineered vitamin B₁₂ production strains using *Escherichia coli*, along with synthetic systems based on cell-free multienzyme catalysis, have been reported. These advancements highlight promising new strategies for the future of biotechnological vitamin B₁₂ synthesis.

In summary, this article particularly highlights the significant promotion of vitamin B₁₂ biomanufacturing by the introduction and advancement of systematic synthetic biology research methods in the past decade. These advancements have propelled vitamin B₁₂ production from a simple “manufacturing” process based on natural strains towards a more sophisticated, intelligent, technology-driven approach. By introducing systematic synthetic biology methods, such as developing efficient genetic engineering technologies for natural synthesis strains, creating artificial strains capable of producing vitamin B₁₂, and assembling flexible cell-free vitamin B₁₂ synthesis systems—The production process has become not only more efficient but also highly controllable, enabling precise regulation of biosynthesis. The integration of computational tools, systems biology, and high-throughput screening has further accelerated the optimization of production systems, making the process more intelligent and design-driven.

Furthermore, the intricate natural synthesis pathway of vitamin B₁₂ serves as a paradigm for synthetic biology research. Its complexity and the challenges associated with its synthesis offer an excellent classical example of how synthetic biology can be applied to solve intricate biological problems. By studying and modifying this pathway, researchers can better understand the principles of pathway engineering and apply these insights to other complex biosynthetic processes. In doing so, synthetic biology continues to drive the evolution of vitamin B₁₂ production and other biotechnological applications, promoting innovation and furthering the development of the field.

synthetic biology, vitamin B₁₂, biological manufacturing, cell factory, cell-free synthesis

doi: [10.1360/TB-2024-0624](https://doi.org/10.1360/TB-2024-0624)