



微生物细胞工厂合成甲基萘醌的研究进展

孙盼星^{1,2†}, 李锋^{1,2,3†}, 宗奕吾^{1,2}, 宋浩^{1,2,3*}

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;

3. 天津大学青岛海洋技术研究院, 青岛 266237

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: hsong@tju.edu.cn

2022-05-09 收稿, 2022-07-05 修回, 2022-07-06 接受, 2022-07-07 网络版发表

国家重点基础研究发展计划(2018YFA0901300)、国家自然科学基金创新研究群体项目(21621004)和青岛创业创新领军人才计划(19-3-2-39-zhc)资助

摘要 甲基萘醌又称维生素K₂, 是人体必需的维生素之一, 可以有效预防和治疗维生素K₂缺乏性出血症、骨质疏松症、心血管疾病、慢性肾病等疾病, 因此在食品和药品等领域有重要的应用价值. 甲基萘醌的合成方法有两种: 化学合成和生物合成. 化学合成法的产率低、分离过程复杂等缺点限制了其规模化应用, 而生物合成则利用可以天然合成甲基萘醌的微生物来生产甲基萘醌, 具有操作简单、产物易分离等优点. 本文首先总结了甲基萘醌生物合成过程及代谢途径的概况, 包括底物摄取途径、莽草酸途径、萜烯骨架途径和甲基萘醌途径的研究进展. 其次, 针对这些途径的代谢工程改造, 总结了大肠杆菌和枯草芽孢杆菌两种细胞工厂应用了哪些代谢工程策略, 并介绍了限制甲基萘醌合成的关键途径和已构建的微生物细胞工厂合成甲基萘醌的产量情况. 最后, 比较了两种细胞工厂的工业应用价值, 并对未来提高细胞工厂的产物合成能力进行了展望.

关键词 甲基萘醌, 代谢途径, 代谢策略, 微生物细胞工厂

1929年, Henrik Dam发现了一种可以有效治疗皮下和肌肉出血的抗出血因子, 随后将其命名为维生素K, 并发表在1935年的*Nature*上^[1,2]. Dam在后来对维生素K的结构鉴定中发现维生素K有两种类型: 维生素K₁、维生素K₂^[3]. 其中维生素K₁又称叶绿醌, 维生素K₂又叫甲基萘醌(menaquinone), 相较于叶绿醌, 甲基萘醌的生物活性更高^[4]. 甲基萘醌是以2-甲基-1,4-萘醌为母环, 并在其C3位带有不同数目异戊二烯单元侧链的一系列化合物的总称. 按照侧链异戊二烯单元数目的不同, 它有多种亚型, 常见的有甲基萘醌-4、甲基萘醌-7、甲基萘醌-8等(图1). 其中, 甲基萘醌-7在人体中的生物活性最强, 市场应用范围最广^[5].

研究表明, 甲基萘醌在人体内具有许多功能. 首先, 它可以作为维生素K依赖型蛋白的辅因子, 参与该蛋白中谷氨酸残基的羧化反应, 进而保证维生素K依赖型蛋白可以发挥凝血、骨矿化、抑制血管壁钙化等功能, 因此, 甲基萘醌也被用来治疗维生素K₂缺乏性出血症、骨质疏松症、心脑血管疾病^[3,6-9]. 其次, 甲基萘醌还可以作为细胞核受体的配体, 参与相关基因的表达过程, 从而保证细胞正常的生长发育^[10]. 此外, 最新研究表明, 甲基萘醌还可以用于预防和治疗肿瘤、帕金森综合征等疾病^[11,12].

由于甲基萘醌拥有上述众多的功能, 许多国家按照不同的质量监督标准将其作为食品营养强化剂应用

引用格式: 孙盼星, 李锋, 宗奕吾, 等. 微生物细胞工厂合成甲基萘醌的研究进展. 科学通报, 2022, 67: 4055–4067

Sun P X, Li F, Zong Y W, et al. Advances in the synthesis of menaquinone using microbial cell factories (in Chinese). Chin Sci Bull, 2022, 67: 4055–4067, doi: [10.1360/TB-2022-0532](https://doi.org/10.1360/TB-2022-0532)

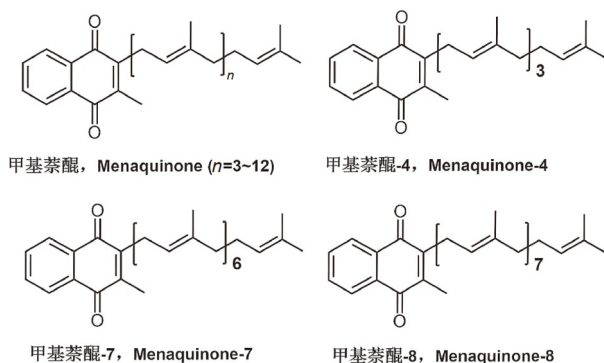


图1 甲基萘醌的结构及甲基萘醌-4、甲基萘醌-7、甲基萘醌-8的结构

Figure 1 Structure of menaquinone, and structures of menaquinone-4, menaquinone-7 and menaquinone-8

于食品和药品领域^[5,13]。日本首先于2001年批准将甲基萘醌作为药品用于骨质疏松症和维生素K₂缺乏性出血症的治疗^[14]。随后,美国食品药品监督管理局在2008年批准将甲基萘醌作为食品及食品添加剂,并在2017年的美国药典中发布了关于甲基萘醌-7安全使用的评估报告^[14]。我国食品安全标准与检测评估司于2016年宣布通过了甲基萘醌作为食品营养强化剂的评估,并明确指出其来源需为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)^[15]。据有关报告显示,2022年我国甲基萘醌的原料市值将超过百亿,未来更是将突破千亿规模^[16,17]。因此,有必要提高甲基萘醌的产业化合成水平,以满足市场需求。

市场上的甲基萘醌生产方式主要有两种:化学合成和生物合成^[13]。化学合成法主要是基于Friedel-Crafts烷基化反应原理,以2-甲基-1,4-萘醌为底物,与不同长度的聚异戊二烯反应来合成甲基萘醌^[18,19]。但是该法具有产率低、副产物多、产物分离过程繁琐等缺点^[20],因此其产业化水平有限。相比之下,生物合成法则具有操作简单、产物易分离等特点^[13],非常适合工业化生产甲基萘醌。生物合成法主要是基于许多微生物体内存在甲基萘醌生物合成途径的原理,如枯草芽孢杆菌、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色酿脓葡萄球菌和天蓝色链霉菌等,这些菌株在自然情况下就可以合成甲基萘醌,生物合成法主要就是对这些菌株进行工程发酵来获得甲基萘醌^[21,22]。但因缺乏成熟的代谢工程技术与手段,生物法合成甲基萘醌的研究以往主要集中在菌株改良(菌株诱变等)和发酵参数(碳源、氮源、发酵方式等)优化等方面^[13,23-25],这使得研究者很难从代谢途径和基因层面去认识甲基萘醌合成的限制因素。近年来,随着代谢工程技术与手段的进步,研

究者开始以枯草芽孢杆菌和大肠杆菌两种遗传背景清晰的模式工程菌为底盘菌株,采用各种代谢工程策略来构建高效合成甲基萘醌的微生物细胞工厂^[26-38],这为我们从代谢途径和基因层面去理解甲基萘醌生物合成的瓶颈提供了指导。

1 甲基萘醌的生物合成过程及途径

甲基萘醌的生物合成过程如图2所示。按照模块化策略,该过程可分为4个代谢途径:底物摄取途径(substrate uptake pathway)、莽草酸途径(shikimate pathway)、萜烯骨架途径(terpenoid backbone pathway)、甲基萘醌途径(menaquinone pathway)。合成的甲基萘醌最后储存于磷脂分子层内的脂溶性空间发挥功能^[39]。在甲基萘醌合成过程中,底物摄取途径向莽草酸途径提供D-赤藓糖-4-磷酸(D-erythrose 4-phosphate, E4P)和磷酸烯醇丙酮酸(phosphoenolpyruvate, PEP),向萜烯骨架途径提供丙酮酸(pyruvate, PYR)和3-磷酸甘油醛(glyceraldehyde 3-phosphate, G3P)。莽草酸途径以E4P和PEP为底物,经过连续7步反应生成分支酸(chorismate, CHA)。萜烯骨架途径以PYR和G3P为底物合成多聚异戊二烯基焦磷酸(polyterpenoids diphosphate)。最后,甲基萘醌途径以CHA和多聚异戊二烯基焦磷酸为底物合成甲基萘醌。

1.1 底物摄取途径

底物摄取途径主要是指将底物转化为各种中间代谢物(E4P、PEP、PYR和G3P)的途径,如图2(a)所示。合成甲基萘醌的微生物细胞工厂常用的底物有两种:葡萄糖和甘油。当以葡萄糖为底物时,葡萄糖首先进入糖酵解途径生成6-磷酸果糖,然后6-磷酸果糖经转酮醇酶(transketolase, Tkt)催化生成E4P,同时6-磷酸果糖经过两步反应生成G3P。G3P在转醛醇酶(transaldolase, TktA)的催化下可生成E4P,或经过4步反应生成PEP,PEP随后在丙酮酸激酶(pyruvate kinase, Pyk)的催化下生成PYR。当以甘油为底物时,甘油首先经过甘油激酶(glycerol kinase, GlpK)催化生成1-磷酸甘油,随后1-磷酸甘油在甘油-3-磷酸脱氢酶(glycerol-3-phosphate dehydrogenase, GlpD)催化下生成磷酸二羟丙酮,磷酸二羟丙酮经磷酸甘油醛异构酶(triosephosphate isomerase, TpiA)催化生成G3P,随后G3P可生成E4P、PEP或流入其他代谢途径。

*E. coli*和*B. subtilis*的底物利用有所不同。*E. coli*常

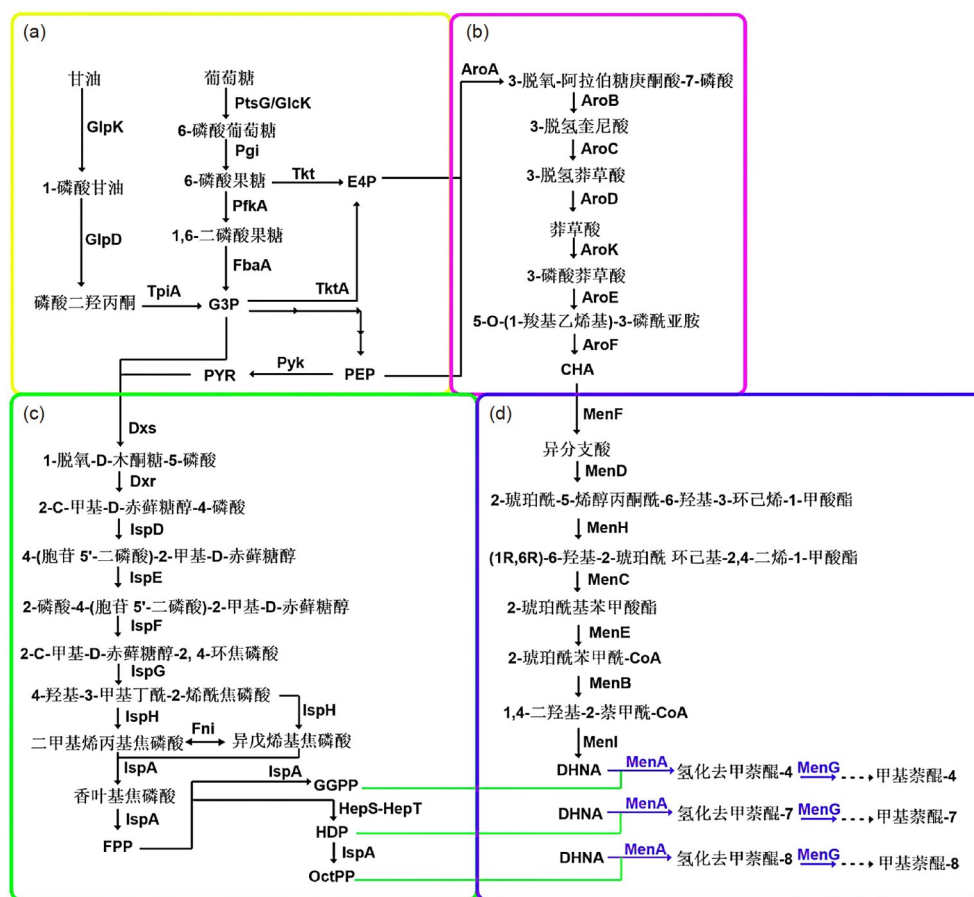


图 2 甲基萘醌的生物合成过程。(a) 底物摄取途径。GlpK, 甘油激酶; GlpD, 甘油-3-磷酸脱氢酶; TpiA, 磷酸甘油醛异构酶; PstG, 磷酸转移酶系统-葡萄糖特异性转运酶; GlcK, 葡萄糖苷酶; Pgi, 葡萄糖-6-磷酸异构酶; Tkt, 转酮醇酶; PfkA, 6-磷酸果糖激酶; FbaA, 果糖二磷酸醛缩酶; TktA, 转醛醇酶; Pyk, 丙酮酸激酶; E4P, D-赤藓糖-4-磷酸; PEP, 磷酸烯醇丙酮酸; G3P, 3-磷酸甘油醛; PYR, 丙酮酸。(b) 莽草酸途径。AroA, 3-脱氧-阿拉伯糖庚酮酸-7-磷酸合酶; AroB, 3-脱氢奎尼酸合成酶; AroC, 3-脱氢莽草酸合酶; AroD, 莽草酸脱氢酶; AroK, 莽草酸激酶; AroE, 3-磷酸莽草酸1-羧基乙烯基转移酶; AroF, 分支酸合酶; CHA, 分支酸。(c) 萜烯骨架途径。Dxs, 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合酶; Dxr, 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸羧基还原酶; IspD, 2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸胞苷转移酶; IspE, 4-磷酸胞苷酰-2-C-甲基-D-赤藓糖醇激酶; IspF, 2-C-甲基-D-赤藓糖醇-2, 4-二磷酸合酶; IspG, 4-羟基-3-甲基丁酰-2-烯基二磷酸合酶; IspH, 4-羟基-3-甲基丁-2-烯基二磷酸还原酶; Fni, 异戊烯基焦磷酸delta-异构酶; IspA, 法尼基焦磷酸合酶; HepS-HepT, 七聚异戊二烯基焦磷酸合酶I和II; FPP, 法尼基焦磷酸; GGPP, 香叶基香叶基焦磷酸; HDP, 全反式-七聚异戊二烯基焦磷酸; OctPP, 全反式-八聚异戊二烯基焦磷酸。(d) 甲基萘醌途径。MenF, 异分支酸合酶; MenD, 2-琥珀酰-5-烯醇丙酮酸-6-羟基-3-环己烯-1-羧基-1-羧基合酶; MenH, 2-琥珀酰基-6-羟基-2, 4-环己二烯基-1-羧基合酶; 琥珀酰基苯甲酸合酶; MenE, 2-琥珀酰基苯甲酰-CoA连接酶; MenB, 1,4-二羟基-2-萘甲酰-CoA合酶; MenI, 1,4-二羟基-2-萘甲酰CoA水解酶; MenA, 1,4-二羟基-2-萘甲酰辛烯基转移酶; MenG, 去甲基-甲基萘醌甲基转移酶; DHNA, 1,4-二羟基-2-萘甲酸

Figure 2 The biosynthetic pathway of menaquinone. (a) Substrate uptake pathway. GlpK, glycerol kinase; GlpD, glycerol-3-phosphate dehydrogenase; TpiA, triosephosphate isomerase; PstG, phosphotransferase system (PTS) glucose-specific enzyme; GlcK, glucokinase; Pgi, glucose-6-phosphate isomerase; Tkt, transketolase; PfkA, 6-phosphofructokinase; FbaA, fructose-bisphosphate aldolase; TktA, transaldolase; Pyk, pyruvate kinase; E4P, D-erythrose 4-phosphate; PEP, Phosphoenolpyruvate; G3P, Glyceraldehyde 3-phosphate; PYR, Pyruvate. (b) Shikimate pathway. AroA, 3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase; AroB, 3-dehydroquininate synthase; AroC, 3-dehydroquininate dehydratase; AroD, shikimate dehydrogenase; AroK, shikimate kinase; AroE, 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase; AroF, chorismate synthase; CHA, Chorismate. (c) Terpenoid backbone pathway. Dxs, 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase; Dxr, 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase; IspD, 2-D-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase; IspE, 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol kinase; IspF, 2-D-methyl-D-erythritol 2, 4-cyclodiphosphate synthase; IspG, 4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase; IspH, 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase; Fni, isopentenyl-diphosphate delta-isomerase; IspA, farnesyl diphosphate synthase; HepS-HepT, heptaprenyl diphosphate synthase component I and II; FPP, Farnesyl diphosphate; GGPP, Geranylgeranyl diphosphate; HDP, all-trans-Heptaprenyl diphosphate; OctPP, all-trans-Octaprenyl diphosphate. (d) Menaquinone pathway. MenF, isochorismate synthase; MenD, 2-succinyl-5-enolpyruvyl-6-hydroxy-3-cyclohexene-1-carboxylate synthase; MenH, 2-succinyl-6-hydroxy-2, 4-cyclohexadiene-1-carboxylate synthase; MenC, o-succinylbenzoate synthase; MenE, o-succinylbenzoic acid-CoA ligase; MenB, 1,4-dihydroxy-2-naphthoyl-CoA synthase; MenI, 1,4-dihydroxy-2-naphthoyl-CoA hydrolase; MenA, 1,4-dihydroxy-2-naphthoate heptaprenyltransferase; MenG, demethylmenaquinone methyltransferase; DHNA, 1,4-Dihydroxy-2-naphthoate

以葡萄糖为底物来生产甲基萜醌, 而 *B. subtilis* 常以甘油为底物亦或是甘油和葡萄糖为混合底物来生产甲基萜醌. 这或许是因为 *B. subtilis* 有一定的底物偏好性: 当以葡萄糖为底物时, *B. subtilis* 更偏向于生长^[40]; 而以甘油为底物时, *B. subtilis* 更偏向生产甲基萜醌^[41].

1.2 莽草酸途径

莽草酸途径是自然界仅有的能合成芳香性化合物的生物代谢途径, 并广泛存在于植物、细菌、真菌中^[42]. 这些芳香性化合物包括: 芳香性氨基酸、黄酮类化合物、醌类化合物等, 其中醌类化合物就主要包括泛醌和甲基萜醌^[43]. 莽草酸途径首先以 E4P 和 PEP 为底物, 在 3-脱氧-阿拉伯糖庚酮酸-7-磷酸合酶(3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase, AroA)催化生成 3-脱氧-阿拉伯糖庚酮酸-7-磷酸, 随后 3-脱氧-阿拉伯糖庚酮酸-7-磷酸经过连续 6 步反应生成 CHA(图 2(b)). 在 *E. coli* 中, 有 3 个同工酶(AroG、AroH、AroF)可以催化 E4P 和 PEP 生成 3-脱氧-阿拉伯糖庚酮酸-7-磷酸的反应, 而这 3 个同工酶分别是受苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸的反馈抑制^[42]. 而在 *B. subtilis* 中, 仅有 1 个 3-脱氧-阿拉伯糖庚酮酸-7-磷酸合酶可以催化 E4P 和 PEP 的缩合. 在 *E. coli* 和 *B. subtilis* 中, 莽草酸途径的催化酶都已经得到了鉴定^[42].

1.3 萜烯骨架途径

萜烯骨架途径是指合成多聚异戊二烯基焦磷酸的途径, 这些多聚异戊二烯基焦磷酸可以为甲基萜醌的合成提供聚异戊二烯侧链. 这些多聚异戊二烯基焦磷酸主要包括香叶基香叶基焦磷酸(geranylgeranyl diphosphate, GGPP)、全反式七聚异戊二烯基焦磷酸(all-trans-Heptaprenyl diphosphate, HDP)、全反式八聚异戊二烯基焦磷酸(all-trans-octaprenyl diphosphate, OctPP), 其中 GGPP、HDP、OctPP 分别用来合成甲基萜醌-4、甲基萜醌-7、甲基萜醌-8(图 2(d)).

自然界已鉴定的萜烯骨架途径有两种. 第一种称为 2-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸(2-methyl-erythritol-4-diphosphate, MEP)途径, 又称 MEP 途径或非甲羟戊酸途径, 如图 2(c)所示. MEP 途径是于 20 世纪末发现的一种萜类骨架途径, 主要存在于原核生物中, 如 *E. coli*、*B. subtilis* 等细菌. 另一种是甲羟戊酸(mevalonate, MVA)途径, 如图 3 所示. 相比于 MEP 途径, MVA 途径发现更早, 且广泛存在于动物、酵母、古菌中. 特别是酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)MVA 途径的各个反应酶都

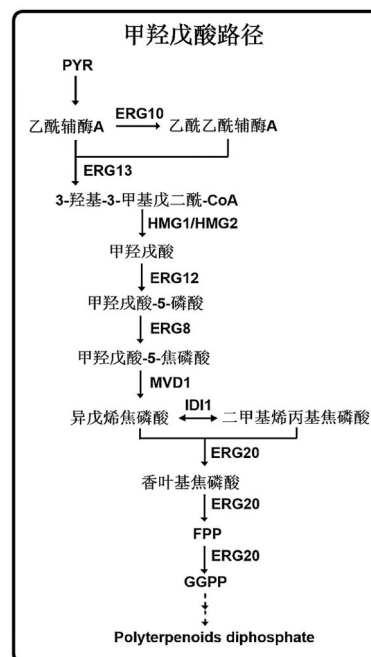


图 3 甲羟戊酸途径. PYR, 丙酮酸; ERG10, 乙酰辅酶A酰基转移酶; ERG13, 羟甲基戊二酰辅酶A合酶; HMG1/HMG2, 羟甲基戊二酰-CoA合成酶/羟甲基戊二酰-CoA还原酶; ERG12, 甲羟戊酸激酶; ERG8, 磷酸甲羟戊酸激酶; MVD1, 甲羟戊酸焦磷酸脱羧酶; IDI1, 异戊烯基焦磷酸delta-异构酶; ERG20, 法尼基焦磷酸合成酶; polyterpenoids diphosphate, 多聚异戊二烯基焦磷酸

Figure 3 Mevalonate pathway. PYR, pyruvate; ERG10, acetyl-CoA acetyltransferase; ERG13, hydroxymethylglutaryl-CoA synthase; HMG1/HMG2, hydroxymethylglutaryl-CoA reductase; ERG12, mevalonate kinase; ERG8, phosphomevalonate kinase; MVD1, diphosphomevalonate decarboxylase; IDI1, isopentenyl-diphosphate delta-isomerase; ERG20, farnesyl diphosphate synthase

已得到了鉴定^[44,45], 因此在细胞工厂的构建中常常被外源引入来增强萜烯骨架途径的代谢通量, 以提高萜类化合物的产量.

MEP和MVA途径分别利用不同的底物来合成多聚异戊二烯基焦磷酸的通用前体: 二甲基烯丙基焦磷酸(dimethylallyl diphosphate, DMAPP)和异戊烯基焦磷酸(isopentenyl diphosphate, IPP). MEP途径以底物摄取途径提供的PYR和G3P为底物, 经过1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合酶(1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, Dxs)和1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸羧酸异构还原酶(1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, Dxr)催化生成MEP, 随后MEP经过5步反应生成DMAPP和IPP. 而MVA途径以PYR为底物经过4步反应生成MVA, 然后MVA经过3步反应生成DMAPP和IPP. 将IPP单元添加到DMAPP的核心分子中, 会产生长度增加的多聚异

戊二烯基焦磷酸, 包括法尼基焦磷酸(Farnesyl diphosphate, FPP)、GGPP、HDP、OctPP. 这些多聚异戊二烯基焦磷酸会生成不同的萜类化合物. 研究表明, MEP途径和MVA途径具有协同作用: 同时过表达MVA途径和MEP途径比单独过表达其中任一途径更能促进DMAPP和IPP的合成^[46], 并且这种协同作用已经在大肠杆菌和枯草芽孢杆菌中得到了证明.

1.4 甲基萘醌途径

甲基萘醌途径是以CHA和多聚异戊二烯基焦磷酸为底物来合成甲基萘醌的途径. 而甲基萘醌是细菌电子传递链的必要成分之一, 可以行使电子传递功能^[47]. 根据萜烯骨架途径提供的多聚异戊二烯基焦磷酸的形式不同, 不同细菌可以合成不同亚型的甲基萘醌: *E. coli*合成甲基萘醌-8; *B. subtilis*合成甲基萘醌-4、甲基萘醌-7; 天蓝色链霉菌合成甲基萘醌-8.

目前已知的甲基萘醌途径有两种: 经典途径和Futalosine途径. 经典途径最早由Bentley和Meganathan^[2]在1982年提出并命名, 它主要存在于*E. coli*和*B. subtilis*等细菌中. 经典途径共有9步反应(图2(d)). 首先, CHA经过异分支酸合酶(isochorismate synthase, MenF)催化生成异分支酸(Isochorismate, ICHA), 编码MenF的基因位于操纵子*menFDHBE*C中^[48], 而该操纵子编码的其余5个酶可以将ICHA连续催化生成1,4-二羟基-2-萘酰-CoA(1,4-Dihydroxy-2-naphthoyl-CoA, DHNA-CoA), 随后, DHNA-CoA水解酶(1,4-dihydroxy-2-naphthoyl-CoA hydrolase, MenI)将DHNA-CoA催化形成1,4-二羟基-2-萘甲酸(1,4-dihydroxy-2-naphthoate, DHNA). DHNA可与GGPP、HDP、OctPP在DHNA辛烯基转移酶(1,4-dihydroxy-2-naphthoate heptaprenyltransferase, MenA)催化下发生脱羧和烷基化反应分别生成氢化去甲萘醌-4、氢化去甲萘醌-7、氢化去甲萘醌-8, 然后再由去甲基-甲基萘醌甲基转移酶(demethylmenaquinone methyltransferase, MenG)催化发生甲基化反应分别生成氢化甲基萘醌-4、氢化甲基萘醌-7、氢化甲基萘醌-8. 氢化甲基萘醌是甲基萘醌的还原形式, 当将电子传递给电子受体后, 即形成甲基萘醌. Futalosine途径取自代谢中间体futalosine(一种核苷类化合物), 它由Hiratsuka首先在天蓝色链霉菌鉴定, 并随后在幽门螺杆菌、空肠弯曲杆菌等致病菌中也发现了该途径, 该途径一共包含8步反应(图4)^[22,49]. CHA依次经过分支酸脱水酶(chorismate dehydratase, MqnA)、氨基脱氧futalosine合酶(aminodeoxyfutalosine synthase, MqnE)、腺苷脱氨酶(aminodeoxyfutalosine deaminase, MqnF)催化生成futalosine, 然后futalosine依次经过futalosine水解酶(futalosine hydrolase, MqnB)、环-去次黄嘌呤futalosine合成酶(cyclic dehypoxanthinyl futalosine synthase, MqnC)、1,4-二羟基-6-萘甲酸合酶(1,4-dihydroxy-6-naphthoate synthase, MqnD)催化反应生成DHNA. 最后, DHNA与OctPP连续发生异戊二烯化、脱羧化、甲基化、脱氢反应生成甲基萘醌-8^[22,50-54]. 最后, 两步催化异戊二烯化、脱羧化、甲基化、脱氢等反应的酶目前尚未有确定^[52,54-56].

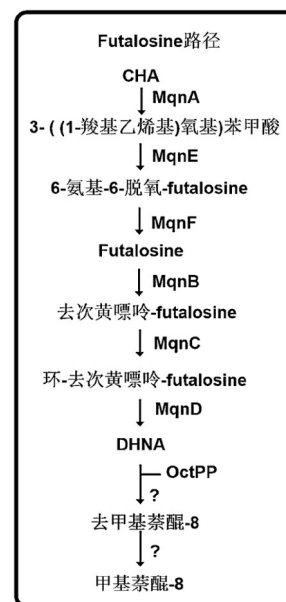


图4 天蓝色链霉菌中的Futalosine途径^[22,49]. CHA, 分支酸; DHNA, 1,4-二羟基-6-萘甲酸; OctPP, 八聚异戊二烯基焦磷酸; MqnA, 莽草酸脱水酶; MqnE, 氨基脱氧futalosine合成酶; MqnF, 氨基脱氧futalosine脱氨酶; MqnB, futalosine水解酶; MqnC, 环状脱氧futalosine合成酶; MqnD, 1,4-二羟基-6-萘甲酸合成酶

Figure 4 Futalosine pathway of *Streptomyces coelicolor*.^[22,49] CHA, chorismate; DHNA, 1,4-dihydroxy-6-naphthoate; OctPP, all-trans-octaprenyl diphosphate; MqnA, chorismate dehydratase; MqnE, aminodeoxyfutalosine synthase; MqnF, aminodeoxyfutalosine deaminase; MqnB, futalosine hydrolase; MqnC, cyclic dehypoxanthinyl futalosine synthase; MqnD, 1,4-dihydroxy-6-naphthoate synthase

sine合酶(aminodeoxyfutalosine synthase, MqnE)、腺苷脱氨酶(aminodeoxyfutalosine deaminase, MqnF)催化生成futalosine, 然后futalosine依次经过futalosine水解酶(futalosine hydrolase, MqnB)、环-去次黄嘌呤futalosine合成酶(cyclic dehypoxanthinyl futalosine synthase, MqnC)、1,4-二羟基-6-萘甲酸合酶(1,4-dihydroxy-6-naphthoate synthase, MqnD)催化反应生成DHNA. 最后, DHNA与OctPP连续发生异戊二烯化、脱羧化、甲基化、脱氢反应生成甲基萘醌-8^[22,50-54]. 最后, 两步催化异戊二烯化、脱羧化、甲基化、脱氢等反应的酶目前尚未有确定^[52,54-56].

由于Futalosine途径存在于幽门螺杆菌、空肠弯曲杆菌等致病菌中, 且人体内无该途径, 因此Futalosine途径的相关酶常被用作研发抗菌药物的靶点^[57], 目前尚无该途径应用于细胞工厂的报道. 但借鉴MVA途径和MEP途径的协同策略, 未来可对Futalosine途径和经典途径的协同作用做进一步验证.

2 细胞工厂合成甲基萘醌的研究进展

确定了甲基萘醌的合成过程及代谢途径后, 研究人员开始以遗传背景清晰的两种模式工程菌(大肠杆菌和枯草芽孢杆菌)为细胞工厂, 并采用过表达、异源MVA途径协同、动态调控、敲除等策略来增强底物摄取途径、莽草酸途径、MEP途径、经典途径的代谢通量, 以提高细胞工厂的产物合成性能. 研究表明, 在大肠杆菌中, MEP途径和经典途径是限制甲基萘醌合成的关键途径. 而在枯草芽孢杆菌中, MEP途径是限制甲基萘醌合成的关键途径. 表1和2分别总结了大肠杆菌和枯草芽孢杆菌合成甲基萘醌的代谢工程策略与研究进展.

2.1 大肠杆菌

在大肠杆菌MEP途径和经典途径的代谢工程改造中, 常用的代谢工程策略有过表达、异源MVA途径协同、敲除等. Kong和Lee^[34]首先过表达了MEP途径中的*ispA*(编码IspA)、*dxr*(编码Dxr)、*fni*(编码Fni)基因, 使得甲基萘醌-8的合成量较出发菌提高了1倍, 然后尝

试过表达经典途径中的*menA*(编码MenA)、*menB*(编码MenB)、*menC*(编码MenC)、*menD*(编码MenD)、*menE*(编码MenE)、*menF*(编码MenF)、*ubiE*(*menG*的同源基因, 编码甲基萘醌生物合成甲基转移酶)基因, 发现只有过表达*menA*使得甲基萘醌-8的产量提高了2倍. 此外, 为抑制CHA流向泛醌合成途径, Kong和Lee^[34]敲除了泛醌途径的*ubiCA*(编码UbiC和UbiA, 可催化CHA生成泛醌), 使得甲基萘醌-8的合成量相比于对照组提高了30%. 为构建合成甲基萘醌-7的大肠杆菌, Gao等人^[35]和Liu等人^[58]首先尝试过表达了BsHepPPS(来自枯草芽孢杆菌的HepS-HepT, 由*hepS-hepT*编码), 并优化了异源MVA途径各个酶和BsHepPPS的表达量, 成功构建了合成甲基萘醌-7的细胞工厂. 为进一步促进甲基萘醌-7的合成, Gao等人^[36]还过表达了经典途径的操纵子*menFDHBE*C、*menA*、*ubiE*等. 此外, 由于甲基萘醌仅能储存于质膜的脂溶性空间, Gao等人还采用了膜工程策略: 过表达1,2-二酰基甘油3-葡糖基转移酶(1,2-diacylglycerol 3-glucosyltransferase, 由*almgs*编码, 负责膜弯曲^[59])和敲除*nlpI*(编码lipoprotein, 脂蛋白, 敲除后可

表1 大肠杆菌合成甲基萘醌的代谢工程策略和研究进展

Table 1 Metabolic engineering strategies and research advances for the synthesis of menaquinone in *Escherichia coli*

甲基萘醌类型	代谢工程策略	产量	文献
甲基萘醌-8	过表达MEP途径的 <i>ispA</i> 、 <i>dxr</i> 、 <i>fni</i> ; 经典途径的 <i>menA</i> ; 敲除 <i>ubiCA</i>	290 μg/g WCW(每克细胞湿重)(300 mL带挡板摇瓶)	[34]
甲基萘醌-7	异源MVA途径协同; 过表达枯草芽孢杆菌的 <i>hepS</i> 、 <i>hepT</i> ; 敲除 <i>ubiCA</i>	8.8 mg/L(5 L发酵罐)	[35]
甲基萘醌-7	异源MVA途径协同; 过表达枯草芽孢杆菌的 <i>hepS</i> 、 <i>hepT</i> ; 过表达经典途径的 <i>menFDHBE</i> C、 <i>menA</i> 、 <i>UbiE</i> ; 膜工程策略: 过表达 <i>almgs</i> 和敲除 <i>nlpI</i>	129 mg/L(250 mL摇瓶); 1.35 g/L(1 L发酵罐)	[36]

表2 枯草芽孢杆菌合成甲基萘醌的代谢工程策略与研究进展

Table 2 Metabolic engineering strategies and research advances for the synthesis of menaquinone in *Bacillus subtilis*

甲基萘醌类型	代谢工程策略	产量	文献
甲基萘醌-7	过表达 <i>menA</i> 、 <i>dxs</i> 、 <i>dxr</i> 、 <i>yacM</i> - <i>yacN</i> 、 <i>glpD</i> , 敲除 <i>dhbB</i>	69.5 ± 2.8 mg/L(2 L带挡板摇瓶)	[26]
甲基萘醌-7	过表达 <i>dxs</i> 、 <i>dxr</i> 、 <i>idi</i> 和 <i>menA</i>	50 mg/L(250 mL摇瓶)	[29]
甲基萘醌-7	过表达和敲除策略; 双功能分子开关Phr60-Rap60-Spo0A	360 mg/L (250 mL摇瓶); 200 mg/L(15 L发酵罐)	[28]
甲基萘醌-7	过表达 <i>aroG^{br}</i> 、 <i>vhb</i> 和敲除 <i>mgsA</i> 、 <i>araM</i> 、 <i>cyd</i> 策略	281.4 ± 5.0 mg/L(5 L发酵罐)	[27]
甲基萘醌-7	过表达策略	410 mg/L(250 mL摇瓶); 310 mg/L(15 L发酵罐)	[30]
甲基萘醌-7	过表达MEP途径和发酵优化	415 mg/L(250 mL摇瓶); 242 mg/L(50 L发酵罐)	[31]
甲基萘醌-4	过表达经典途径, MEP途径, 外源MVA途径协同策略	120.1 ± 0.6 mg/L(250 mL摇瓶); 145 ± 2.8 mg/L(3 L发酵罐)	[32]
甲基萘醌-4	过表达策略, PhrQ-RapQ-ComA系统	178.9 ± 2.8 mg/L(250 mL摇瓶); 217 ± 4.1 mg/L(3 L发酵罐)	[33]
甲基萘醌-7	全局Regulator-SinR调控	102.56 ± 2.84 mg/L	[37]

拓展膜内空间^[60]来拓展甲基萘醌-7的储存空间, 组合敲除等其他策略, 最终构建了甲基萘醌-7产量为1.35 g/L的细胞工厂^[35]。这些结果表明, 在大肠杆菌中, MEP途径和经典途径都是限制甲基萘醌合成的关键途径。

在底物摄取途径的改造中, Gao等人^[36]敲除了基因*poxB*(编码PYR氧化酶)来抑制PYR生成乙酸, 过表达了基因*acs*(编码乙酰辅酶A合成酶)来促进乙酰辅酶A的合成, 进而增强MVA途径的代谢通量(图3)。对于改造莽草酸途径来促进甲基萘醌的合成, *E. coli*尚无相关研究, 或许是因为*E. coli*的莽草酸途径有3个同工酶(AroG、AroH、AroF)可以催化第一步反应^[61,62], 这使得该途径可以提供足够的CHA来合成甲基萘醌。

综合应用过表达、异源MVA途径协同、敲除、膜工程等策略, 改造后的*E. coli*实现了1.35 g/L的甲基萘醌产量^[36], 这也是已知微生物细胞工厂合成甲基萘醌的最高产量(表1)。但需注意, 该细胞工厂的应用范围受限。首先, 经过改造的*E. coli*食品安全性有待评估, 其次, 我国颁布的甲基萘醌应用许可中规定了甲基萘醌的来源菌株须为枯草芽孢杆菌^[15,63], 这就使得*E. coli*合成甲基萘醌的研究仅具有理论指导意义, 而不具有实际的工业应用价值。

2.2 枯草芽孢杆菌

在枯草芽孢杆菌MEP途径的代谢工程改造中, 常用的代谢工程策略有过表达、动态调控、异源MVA途径协同等。Yang等人^[26]首先使用*P*₄₃启动子在基因组上过表达*dxs*(编码Dxs)、*dxr*、*ispD-ispF*(编码IspD和IspF)、*ispE*(编码IspE)、*ispH*(编码IspH)和*ispA*等基因来鉴定MEP途径的关键酶, 结果发现, 基因*dxs*、*dxr*、*ispD-ispF*的过表达可以显著地促进甲基萘醌-7的合成, 因而他们认为, Dxs、Dxr、IspD、IspF是枯草芽孢杆菌MEP途径中的限速酶^[26]。Ma等人^[29]在过表达MEP途径中*dxs*、*dxr*、*fni*等基因时, 发现仅增强MEP途径的代谢通量, 就可以使得枯草芽孢杆菌的甲基萘醌-7合成量较对照组提高11倍, 达到了50 mg/L。并且在过表达*dxs*、*dxr*、*fni*等基因后, Ma等人^[29]采用分析中间代谢物的方式揭示了MEP途径存在限制产物合成的新瓶颈, 即IspG和IspH催化的反应步骤。Cui等人^[28]在对MEP途径改造中, 使用了不同强度的启动子过表达了该途径的*dxs*、*dxr*、*ispH*、*fni*和*ispA*基因来增强MEP途径的代谢通量, 使得微生物生产甲基萘醌-7的产量达到了

33.1 mg/L。在Cui等人^[28]所构建细胞工厂基础上, Chen等人^[31]将枯草芽孢杆菌MEP途径各基因的启动子替换为*P*₄₃启动子, 进一步提高了细胞工厂的生产性能。

虽然过表达策略增强了产物合成途径的代谢通量, 但这种静态的代谢工程策略往往造成了细胞内的代谢负担, 这种代谢负担最终会抑制细胞生长^[64]。相比之下, 将细胞生产和细胞生长解耦的动态调控策略则可以很好地平衡细胞生长和生产的关系。动态调控手段包含3种: 中间代谢物响应启动子调控、转录因子响应的生物传感器调控、群体响应(quorum sensing, QS)系统调控^[65]。目前仅有QS系统调控应用到了枯草芽孢杆菌MEP途径的代谢工程改造中^[28,33]。Cui等人^[28]构建了Phr60-Rap60-Spo0A双功能分子开关来实现基因的动态激活或抑制(图5(a))。Phr60是枯草芽孢杆菌中的一种信号分子, 与细胞密度呈正相关。在细胞密度增加时, 积累的Phr60可以抑制蛋白质(Rap60)的活性, 而Rap60可以抑制磷酸化组氨酸激酶(KinA-P)和转录调节因子(Spo0A-P)的活性, 同时KinA-P可以激活Spo0A-P活性^[66]。因为Spo0A-P可以与相关基因上游的启动子结合来激活或抑制该基因的表达, 那么Phr60的积累就可以激活Spo0A-P, 进而实现基因的激活和抑制功能(图5(a))^[67]。Cui等人^[28]首先解析了Spo0A-P对相关基因的调控机制, 并以激活型启动子*P*_{abrB}和抑制型启动子*P*_{spoiA}为基础, 建立了一个响应Spo0A浓度的启动子库, 当Spo0A-P增多时, 可以同时实现基因定向激活和定向抑制的功能。在完成Phr60-Rap60-Spo0A双功能分子开关构建后, Cui等人^[28]将该系统应用于合成甲基萘醌-7的细胞工厂构建。该分子开关动态激活的基因主要位于MEP途径(*ispH*和*hepS-hepT*), 动态抑制的基因有*uppS*(编码异戊烯转移酶, UppS)和*pyk*。UppS可以消耗FPP从而减少MEP流向经典途径的代谢通量, Pyk可以催化PEP生成PYR, 从而减少莽草酸途径的代谢通量^[68,69]。此外, Yuan等人^[33]构建了PhrQ-RapQ-ComA系统(图5(b)), 该系统仅具有基因激活功能。PhrQ是枯草芽孢杆菌内的一种信号分子, 它可以抑制蛋白质RapQ的活性^[70]。ComA是枯草芽孢杆菌中的一种全局转录调控因子, 通过与部分基因上游的启动子结合来实现基因的表达水平上调, 同时ComA活性受蛋白质RapQ抑制, 因此PhrQ可以激活ComA, 从而上调目的基因的表达水平^[71~73]。同样, Yuan等人^[33]构建了可以响应ComA浓度调控的启动子文库, 并将其应用到微生物细胞工厂的构建中。在构建的细胞工厂中, 表达水平上调

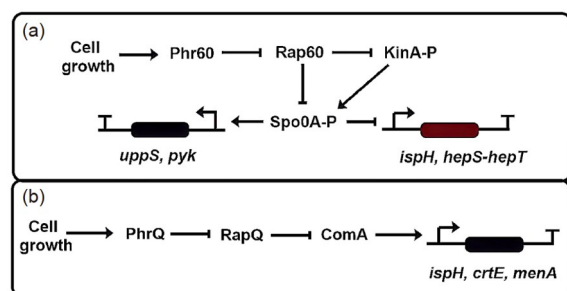


图5 动态调控策略。(a) Phr60-Rap60-Spo0A系统^[28]。激活基因: *ispH*、*hepS-hepT*; 抑制基因: *uppS*、*pyk*。(b) PhrQ-RapQ-ComA系统^[33]。激活基因: *ispH*、*crtE*

Figure 5 Dynamic regulation strategies. (a) Phr60-Rap60-Spo0A system^[28]. Activated genes: *ispH*, *hepS-hepT*; inhibited genes: *uppS*, *pyk*. (b) PhrQ-RapQ-ComA system^[33]. Activated genes: *ispH*, *crtE*

的基因有*ispH*、*crtE*(编码geranylgeranyl pyrophosphate synthetase, GGPP合酶)、*menA*(图5(b)), 最终组合其他策略实现了178.9 mg/L的甲基萘醌-4产量。

此外, 异源MVA途径协同策略也已应用到枯草芽孢杆菌合成甲基萘醌的研究中。在过表达经典途径和MEP途径的相关基因后, Yuan等人^[32]在枯草芽孢杆菌中引入了异源的MVA途径, 并采用过表达等策略最终使得甲基萘醌-4的产量达到了 120.1 ± 0.6 mg/L (250 mL摇瓶)、 145 ± 2.8 mg/L (3 L发酵罐)。以上过表达、动态调控、异源MVA途径协同策略的应用结果表明, MEP途径是限制甲基萘醌合成的关键途径。

枯草芽孢杆菌经典途径、莽草酸途径、底物摄取途径的代谢工程策略有过表达、敲除等, 这些策略不仅鉴定了相关途径的限速步骤, 也增强了合成甲基萘醌过程的代谢通量。

在经典途径中, Yang等人^[26]将操纵子*menFDH-BEC*和*hepS-menG-hepT*的启动子原位取代为*P_{lapS}*, 并将*menA*、*menI*基因过表达, 发现增强操纵子*menFDH-BEC*和基因*menI*的表达并不能促进细胞工厂合成甲基萘醌, 而当*HepS-HepT*、*MenG*、*MenA*的表达量提高时, 可以有效促进甲基萘醌的合成。同样, Cui等人^[28]在构建合成甲基萘醌的细胞工厂时, 选择过表达*menF*、*menE*、*menB*等基因, 初始3 d的发酵实验表明, 这3个基因的过表达可以促进甲基萘醌的合成, 但在第4~6天, 相比于对照组, 实验组的产量没有变化。这些结果表明经典途径的关键酶是*MenA*和*MenG*^[74]。为增强经典途径的代谢通量, Yang等人^[26,27]和Cui等人^[28]敲除了基因*dhbB*, 因为其编码的异分支酸裂解酶(*DhbB*)可以使异分支酸流向肠杆菌素合成途径, 从而降低经典途

径的代谢通量。

在莽草酸途径, Yang等人^[26]采用*P₄₃*启动子过表达*aroA*(编码AroA)、*aroD*(编码AroD)、*aroK*(编码AroK)、*aroE*(编码AroE)等基因, 发现它们并没有促进甲基萘醌的合成。考虑到莽草酸途径的AroA、AroK可能受芳香性氨基酸的反馈抑制, Yang等人^[26]认为, *aroA*、*aroD*、*aroK*、*aroE*等基因的过表达促进了莽草酸合成芳香性氨基酸, 这些合成的芳香性氨基酸反过来抑制了AroA的活性。为去除枯草芽孢杆菌莽草酸途径第一步反应存在的反馈抑制, Yang等人^[27]和Cui等人^[28]都异源引入了大肠杆菌的*aroG^{fbr}*(与基因*aroA*同源), 来解除莽草酸途径的反馈抑制。此外, Cui等人^[28]还将枯草芽孢杆菌莽草酸途径中*aroK*基因的启动子替换为*P₄₃*启动子, 来解除芳香性氨基酸对该酶的抑制。这表明, 枯草芽孢杆菌中莽草酸途径的AroA和AroK催化的反应是甲基萘醌生物合成过程的限速步骤。

在底物摄取途径中, 枯草芽孢杆菌一般以甘油为底物, Yang等人^[27]鉴定了GlpD和GlpK是该途径的限速酶, 过表达GlpD和GlpK可以促进甲基萘醌的合成。此外, 为了向莽草酸途径和MEP途径提供更多的代谢前体, Yang等人^[27]还敲除了*mgsA*(编码丙酮醛合成酶, MgsA)和*araM*(编码1-磷酸甘油脱氢酶, AraM)基因来抑制磷酸二羟丙酮流向其他反应。为了增强枯草芽孢杆菌的胞内代谢, Yang等人^[27]还敲除*cyd*(编码细胞色素bd)基因, 过表达*vhb*(编码血红蛋白, 来自透明颤菌(*Vitreoscilla*))基因。当以葡萄糖为底物时, Cui等人^[28]采用过表达基因*tkt*(编码Tkt)的方式来增强E4P前体的供应。此外, 他们还异源表达了*kdpG*基因(编码2-脱氢-3-脱氧-磷酸葡萄糖酸醛缩酶, KdpG), KdpG可将6-磷酸-D-葡萄糖酸转化为PYR和G3P, 进而增强MEP途径的代谢通量。

此外, 在增强MEP途径、经典途径、莽草酸途径和底物摄取途径代谢通量的基础上^[28], Cui等人^[30]考虑到甲基萘醌-7的储存位置和电子传递功能, 因此从枯草芽孢杆菌的生物膜层面过表达了细胞膜合成的信号蛋白(cell membrane components signals transduction protein, TatAD-CD), 从电子传递层面过表达了甲基萘醌-细胞色素c还原酶(menaquinol-cytochrome c reductase, QcrA-C), 最终使得细胞工厂的甲基萘醌-7产量达到了310 mg/L (15 L发酵罐)。

综合应用以上各种代谢工程策略, 改造后的枯草芽孢杆菌实现的甲基萘醌最高产量为310 mg/L^[30,36](表

2), 但这仅是大肠杆菌1.35 g/L最高产量的23%。此外, 大肠杆菌达到1.35 g/L的最高产量仅需52 h, 而枯草芽孢杆菌实现310 mg/L的最大产量需要96 h^[30,36]。因此, 无论从甲基萘醌的产量还是从其单位时间产率上, 枯草芽孢杆菌的甲基萘醌生产性能都不如大肠杆菌。并且从生长性能来看, 大肠杆菌在52 h的 A_{600} 就达到了122, 而枯草芽孢杆菌96 h时的 A_{600} 仅为30左右, 枯草芽孢杆菌的生长性能也不如大肠杆菌。

3 总结与展望

甲基萘醌是人体必需维生素之一, 近些年来随着其功能研究的深入, 它的市场规模也在逐年增长, 有关报告更是预测了其市值将超过千亿元^[16,17]。虽然化学法可以合成甲基萘醌, 但该法产率低、副产物多、产物分离过程繁琐等缺点限制了其规模化应用。相比之下, 生物合成法则具有操作简单、产物易分离等特点, 且已得到了工业化应用。目前生物合成法使用的工业菌株是经过诱变的枯草芽孢杆菌, 其甲基萘醌的最大合成能力仅为226 mg/L^[75], 这并不能满足急剧增长的市场需求。因此, 有必要从基因水平去提高微生物细胞工厂的甲基萘醌合成能力。

大肠杆菌和枯草芽孢杆菌均具有清晰的遗传背景和成熟的分子生物学技术, 在代谢工程中常被用作微生物细胞工厂来生产各种化学品、药品等^[76,77], 并且两种菌株在自然情况下都可以合成甲基萘醌, 因此研究人员开始采用各种代谢工程策略来改造大肠杆菌和枯草芽孢杆菌, 以提高它们的甲基萘醌合成能力, 大肠杆菌和枯草芽孢杆菌作为细胞工厂合成甲基萘醌的最新进展分别见表1和2。从细胞工厂的甲基萘醌产量上看, 大肠杆菌的生长性能和产物生产性能均优于枯草芽孢杆菌。但从细胞工厂的应用前景上看, 大肠杆菌的食品应用前景不如枯草芽孢杆菌^[15,63]。特别在枯草芽孢杆菌中, 细胞工厂实现的甲基萘醌最大产量仅为310 mg/L^[30], 这相比于工业菌株的226 mg/L, 仅提高了27.1%, 因此其工业应用价值有待进一步提高。

为提高枯草芽孢杆菌合成甲基萘醌的能力, 有必要继续对其进行代谢工程改造, 以提高枯草芽孢杆菌的甲基萘醌合成性能。传统代谢工程的研究往往采用

过表达关键基因的策略, 但在过表达关键基因的基础上, 代谢途径中限速反应通量的增加往往使得其他反应步骤成为新的代谢瓶颈。因此, 在已构建细胞工厂的基础上, 提高枯草芽孢杆菌的产物合成能力首先需要鉴定甲基萘醌合成途径的新瓶颈, 并继续增强甲基萘醌生物合成过程的代谢通量。大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的代谢工程改造使我们从代谢途径和基因层面理解了甲基萘醌生物合成的瓶颈, 但采用各种策略解决这些瓶颈后, 其他代谢途径或反应往往成为了新的限制因素。如Ma等人^[29]在过表达MEP途径的*dxs*、*dxr*、*fni*等基因后, 采用分析中间代谢物的方式揭示了限制产物合成的新瓶颈, 即IspG和IspH催化的反应步骤。其次, 还需考虑产物的储存空间问题, 细胞工厂的生产性能不仅与产物的代谢通量有关, 还与其自身的产物储存性能有关, 因此有必要尝试拓展细胞工厂中甲基萘醌的储存空间。甲基萘醌是脂溶性产物, 仅能存在于细胞内的脂溶性空间, 而枯草芽孢杆菌仅具有单层细胞膜, 相比于大肠杆菌的双层细胞膜, 甲基萘醌在枯草芽孢杆菌内的储存空间十分有限。且大肠杆菌的膜工程改造已经表明, 拓展甲基萘醌的储存空间可以促进甲基萘醌的合成, 因此有必要对枯草芽孢杆菌进行膜工程改造或拓展其胞内的脂溶性空间。最后, 还可以从全局代谢层面来寻找高效的全局调控因子来实现产物合成的动态调控。甲基萘醌的合成过程较为复杂, 且涉及众多途径及基因的过表达, 传统代谢工程策略的应用使得细胞工厂的代谢不平衡加重, 这种代谢不平衡往往导致了中间代谢物的积累, 并最终抑制细胞生长^[64]。尽管部分动态调控策略已经应用到了合成甲基萘醌的细胞工厂构建, 但动态激活或抑制的基因数量有限。近年来, 随着人们对代谢网络的认识加深, 从全局调控层面来寻找促进产物合成的靶点逐渐成为了代谢工程研究的焦点^[78,79]。借鉴这种策略, Wu等人^[37]首先利用组学等手段从全局调控层面鉴定了甲基萘醌合成过程的一个调控因子——SinR, 经过4个定点突变的SinR^{quad}实现了甲基萘醌合成途径众多基因的同时调控。因此, 有必要通过代谢组学、蛋白组学等手段从代谢网络调控层面来寻找甲基萘醌合成的调控靶点, 保证细胞生长性能的前提下, 实现细胞生产性能的最大化。

参考文献

- 1 Dam H. The antihæmorrhagic vitamin of the chick: Occurrence and chemical nature. *Nature*, 1935, 135: 652–653

- 2 Bentley R, Meganathan R. Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria. *Microbiol Rev*, 1982, 46: 241–280
- 3 Ferland G. The discovery of vitamin K and its clinical applications. *Ann Nutr Metab*, 2012, 61: 213–218
- 4 Dowd P, Ham S W, Naganathan S, et al. The mechanism of action of vitamin K. *Annu Rev Nutr*, 1995, 15: 419–440
- 5 Simes D C, Viegas C S B, Araújo N, et al. Vitamin K as a diet supplement with impact in human health: Current evidence in age-related diseases. *Nutrients*, 2020, 12: 138
- 6 Suttie J W. The importance of menaquinones in human nutrition. *Annu Rev Nutr*, 1995, 15: 399–417
- 7 Theuvsen E, Smit E, Vermeer C. The role of vitamin K in soft-tissue calcification. *Adv Nutr*, 2012, 3: 166–173
- 8 Palermo A, Tuccinardi D, D’Onofrio L, et al. Vitamin K and osteoporosis: Myth or reality? *Metabolism*, 2017, 70: 57–71
- 9 Silaghi C N, Ilyés T, Filip V P, et al. Vitamin K dependent proteins in kidney disease. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 1571
- 10 Hirota Y, Suhara Y. New aspects of vitamin K research with synthetic ligands: Transcriptional activity via SXR and neural differentiation activity. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 3006
- 11 Vos M, Esposito G, Edirisinghe J N, et al. Vitamin K₂ is a mitochondrial electron carrier that rescues Pink1 deficiency. *Science*, 2012, 336: 1306–1310
- 12 Ivanova D, Zhelev Z, Getsov P, et al. Vitamin K: Redox-modulation, prevention of mitochondrial dysfunction and anticancer effect. *Redox Biol*, 2018, 16: 352–358
- 13 Ren L, Peng C, Hu X, et al. Microbial production of vitamin K₂: Current status and future prospects. *Biotechnol Adv*, 2020, 39: 107453
- 14 Marles R J, Roe A L, Oketch-Rabah H A. US pharmacopeial convention safety evaluation of menaquinone-7, a form of vitamin K. *Nutr Rev*, 2017, 75: 553–578
- 15 Department of Food Safety Standards, Risk Surveillance and Assessment. Announcement on New Varieties of Food Additives such as Calcium Alginate. Three New Varieties of Food Nutrition Fortifiers Including L-magnesium Threonate (in Chinese). 2016, <http://www.nhc.gov.cn/cms-search/xxgk/getManuscriptXxgk.htm?id=125c3d8fa2034de3b7d52a82608709d2> [食品安全标准与监测评估司. 关于海藻酸钙等食品添加剂新品种的公告. L-苏糖酸镁等3种食品营养强化剂新品种. 2016, <http://www.nhc.gov.cn/cms-search/xxgk/getManuscriptXxgk.htm?id=125c3d8fa2034de3b7d52a82608709d2>]
- 16 Chen Y B. Innovation lives up to life—The revolutionary pluripotent vitamin K₂ (in Chinese). 2020, <http://cnfood.cn/article?id=1370206871180283905> [陈奕彬. 创新不负生命绽放——革命性多能性维生素K₂. 2020, <http://cnfood.cn/article?id=1370206871180283905>]
- 17 Chen J P. Vitamin K₂: Lead calcium into bone—A revolutionary vitamin: Prevent osteoporosis and hardening of arteries (in Chinese). In: Proceedings of the 19th Academic Symposium of Daneng Nutrition Center, 2016 [陈杰鹏. 维生素K₂: 领钙入骨——革命性的维生素: 防止骨质疏松及血管硬化. 见: 达能营养中心第十九届学术研讨会论文集, 2016]
- 18 Braasch-Turi M, Crans D C. Synthesis of naphthoquinone derivatives: Menaquinones, lipoquinones and other vitamin K derivatives. *Molecules*, 2020, 25: 4477
- 19 Yerramsetti N, Dampanaboina L, Mendu V, et al. Synergistic factors ensue high expediency in the synthesis of menaquinone [K₂] analogue MK-6: Application to access an efficient one-pot protocol to MK-9. *Tetrahedron*, 2020, 76: 131696
- 20 Isler O, Rüegg R, Chopard-dit-Jean L H, et al. Synthese und Isolierung von Vitamin K₂ und isoprenologen Verbindungen. *Helv Chim Acta*, 1958, 41: 786–807
- 21 Almquist H J, Pentler C F, Mecchi E. Synthesis of the antihemorrhagic vitamin by bacteria. *Exp Biol Med*, 1938, 38: 336–338
- 22 Hiratsuka T, Furihata K, Ishikawa J, et al. An alternative menaquinone biosynthetic pathway operating in microorganisms. *Science*, 2008, 321: 1670–1673
- 23 Hu L X, Feng J J, Wu J, et al. Identification of six important amino acid residues of MenA from *Bacillus subtilis natto* for enzyme activity and formation of menaquinone. *Enzyme Microb Technol*, 2020, 138: 109583
- 24 Berenjian A, Mahanama R, Kavanagh J, et al. Vitamin K series: Current status and future prospects. *Crit Rev Biotechnol*, 2015, 35: 199–208
- 25 Wu W J, Ahn B Y. Statistical optimization of medium components by response surface methodology to enhance menaquinone-7 (vitamin K₂) production by *Bacillus subtilis*. *J Microbiol Biotechnol*, 2018, 28: 902–908
- 26 Yang S, Cao Y, Sun L, et al. Modular pathway engineering of *Bacillus subtilis* to promote *de novo* biosynthesis of menaquinone-7. *ACS Synth Biol*, 2019, 8: 70–81
- 27 Yang S, Wang Y, Cai Z, et al. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for high-titer production of menaquinone-7. *AIChE J*, 2019, 66: e16754
- 28 Cui S, Lv X, Wu Y, et al. Engineering a bifunctional Phr60-Rap60-Spo0A quorum-sensing molecular switch for dynamic fine-tuning of menaquinone-7 synthesis in *Bacillus subtilis*. *ACS Synth Biol*, 2019, 8: 1826–1837
- 29 Ma Y, McClure D D, Somerville M V, et al. Metabolic engineering of the MEP pathway in *Bacillus subtilis* for increased biosynthesis of menaquinone-7. *ACS Synth Biol*, 2019, 8: 1620–1630
- 30 Cui S, Xia H, Chen T, et al. Cell membrane and electron transfer engineering for improved synthesis of menaquinone-7 in *Bacillus subtilis*. *iScience*, 2020, 23: 100918

- 31 Chen T, Xia H, Cui S, et al. Combinatorial methylerythritol phosphate pathway engineering and process optimization for increased menaquinone-7 synthesis in *Bacillus subtilis*. *J Microbiol Biotechnol*, 2020, 30: 762–769
- 32 Yuan P, Cui S, Liu Y, et al. Combinatorial engineering for improved menaquinone-4 biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Enzyme Microb Technol*, 2020, 141: 109652
- 33 Yuan P, Sun G, Cui S, et al. Engineering a comA quorum-sensing circuit to dynamically control the production of menaquinone-4 in *Bacillus subtilis*. *Enzyme Microb Technol*, 2021, 147: 109782
- 34 Kong M K, Lee P C. Metabolic engineering of menaquinone-8 pathway of *Escherichia coli* as a microbial platform for vitamin K production. *Biotechnol Bioeng*, 2011, 108: 1997–2002
- 35 Gao Q, Chen H, Wang W, et al. Menaquinone-7 production in engineered *Escherichia coli*. *World J Microbiol Biotechnol*, 2020, 36: 132
- 36 Gao Q, Chen H, Wang G, et al. Highly efficient production of menaquinone-7 from glucose by metabolically engineered *Escherichia coli*. *ACS Synth Biol*, 2021, 10: 756–765
- 37 Wu J, Li W, Zhao S G, et al. Site-directed mutagenesis of the quorum-sensing transcriptional regulator SinR affects the biosynthesis of menaquinone in *Bacillus subtilis*. *Microb Cell Fact*, 2021, 20: 113
- 38 Gu Y, Xu X, Wu Y, et al. Advances and prospects of *Bacillus subtilis* cellular factories: From rational design to industrial applications. *Metab Eng*, 2018, 50: 109–121
- 39 Van Cleave C, Murakami H A, Samart N, et al. Location of menaquinone and menaquinol headgroups in model membranes. *Can J Chem*, 2020, 98: 307–317
- 40 Halmeschlag B, Putri S P, Fukusaki E, et al. Poly- γ -glutamic acid production by *Bacillus subtilis* 168 using glucose as the sole carbon source: A metabolomic analysis. *J Biosci Bioeng*, 2020, 130: 272–282
- 41 Berenjian A, Mahanama R, Talbot A, et al. Efficient media for high menaquinone-7 production: Response surface methodology approach. *New Biotechnol*, 2011, 28: 665–672
- 42 Huccetogullari D, Luo Z W, Lee S Y. Metabolic engineering of microorganisms for production of aromatic compounds. *Microb Cell Fact*, 2019, 18: 41
- 43 Herrmann K M. The shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism. *Plant Physiol*, 1995, 107: 7–12
- 44 Boronat A, Rodriguez-Concepcion M. Terpenoid biosynthesis in prokaryotes. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2015, 148: 3–18
- 45 Schempp F M, Drummond L, Buchhaupt M, et al. Microbial cell factories for the production of terpenoid flavor and fragrance compounds. *J Agric Food Chem*, 2018, 66: 2247–2258
- 46 Yang C, Gao X, Jiang Y, et al. Synergy between methylerythritol phosphate pathway and mevalonate pathway for isoprene production in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2016, 37: 79–91
- 47 Yang C K, Kashyap D R, Kowalczyk D A, et al. Respiratory chain components are required for peptidoglycan recognition protein-induced thiol depletion and killing in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Sci Rep*, 2021, 11: 64
- 48 Borris R, Danchin A, Harwood C R, et al. *Bacillus subtilis*, the model Gram-positive bacterium: 20 years of annotation refinement. *Microb Biotechnol*, 2018, 11: 3–17
- 49 Hosokawa N, Naganawa H, Kasahara T, et al. Futosine and its derivatives, new nucleoside analogs. *Chem Pharm Bull*, 1999, 47: 1032–1034
- 50 Cooper L E, Fedoseyenko D, Abdelwahed S H, et al. *In vitro* reconstitution of the radical S-adenosylmethionine enzyme MqnC involved in the biosynthesis of futosine-derived menaquinone. *Biochemistry*, 2013, 52: 4592–4594
- 51 Joshi S, Fedoseyenko D, Mahanta N, et al. Aminofutosine synthase (MqnE): A new catalytic motif in radical SAM enzymology. *Methods Enzymol*, 2018, 606: 179–198
- 52 Joshi S, Fedoseyenko D, Mahanta N, et al. Novel enzymology in futosine-dependent menaquinone biosynthesis. *Curr Opin Chem Biol*, 2018, 47: 134–141
- 53 Mahanta N, Hicks K A, Naseem S, et al. Menaquinone biosynthesis: Biochemical and structural studies of chorismate dehydratase. *Biochemistry*, 2019, 58: 1837–1840
- 54 Zhi X Y, Yao J C, Tang S K, et al. The futosine pathway played an important role in menaquinone biosynthesis during early prokaryote evolution. *Genome Biol Evol*, 2014, 6: 149–160
- 55 Kim R Q, Offen W A, Davies G J, et al. Structural enzymology of *Helicobacter pylori* methylthioadenosine nucleosidase in the futosine pathway. *Acta Crystlogr D Biol Crystlogr*, 2014, 70: 177–185
- 56 Joshi S, Fedoseyenko D, Mahanta N, et al. Antibacterial strategy against *H. pylori*: Inhibition of the radical SAM enzyme MqnE in menaquinone biosynthesis. *ACS Med Chem Lett*, 2019, 10: 363–366
- 57 Shimizu Y, Ogasawara Y, Matsumoto A, et al. Aplasmomycin and boromycin are specific inhibitors of the futosine pathway. *J Antibiot*, 2018, 71: 968–970
- 58 Liu N, Liu B, Wang G, et al. Lycopene production from glucose, fatty acid and waste cooking oil by metabolically engineered *Escherichia coli*.

- Biochem Eng J, 2020, 155: 107488
- 59 Wu T, Ye L, Zhao D, et al. Engineering membrane morphology and manipulating synthesis for increased lycopene accumulation in *Escherichia coli* cell factories. *3 Biotech*, 2018, 8: 269
- 60 Wu T, Li S, Ye L, et al. Engineering an artificial membrane vesicle trafficking system (AMVTS) for the excretion of β -carotene in *Escherichia coli*. *ACS Synth Biol*, 2019, 8: 1037–1046
- 61 Davies W D, Davidson B E. The nucleotide sequence of *aroG*, the gene for 3-deoxy-D-arabinobepulosonate-7-phosphate synthetase (phe) in *Escherichia coli* K12. *Nucl Acids Res*, 1982, 10: 4045–4058
- 62 Xiong B, Zhu Y, Tian D, et al. Flux redistribution of central carbon metabolism for efficient production of L-tryptophan in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, 2021, 118: 1393–1404
- 63 Kaper J B, Nataro J P, Mobley H L. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*, 2004, 2: 123–140
- 64 Lv Y, Qian S, Du G, et al. Coupling feedback genetic circuits with growth phenotype for dynamic population control and intelligent bioproduction. *Metab Eng*, 2019, 54: 109–116
- 65 Wu G, Yan Q, Jones J A, et al. Metabolic burden: Cornerstones in synthetic biology and metabolic engineering applications. *Trends Biotechnol*, 2016, 34: 652–664
- 66 Boguslawski K M, Hill P A, Griffith K L. Novel mechanisms of controlling the activities of the transcription factors Spo0A and ComA by the plasmid-encoded quorum sensing regulators Rap60-Phr60 in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 2015, 96: 325–348
- 67 Piggot P J, Hilbert D W. Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Curr Opin Microbiol*, 2004, 7: 579–586
- 68 Wang Y, Desai J, Zhang Y, et al. Bacterial cell growth inhibitors targeting undecaprenyl diphosphate synthase and undecaprenyl diphosphate phosphatase. *ChemMedChem*, 2016, 11: 2311–2319
- 69 Licona-Cassani C, Lara A R, Cabrera-Valladares N, et al. Inactivation of pyruvate kinase or the phosphoenolpyruvate: Sugar phosphotransferase system increases shikimic and dehydroshikimic acid yields from glucose in *Bacillus subtilis*. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2014, 24: 37–45
- 70 Yang Y, Wu H J, Lin L, et al. A plasmid-born Rap-Phr system regulates surfactin production, sporulation and genetic competence in the heterologous host, *Bacillus subtilis* OKB105. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99: 7241–7252
- 71 Core L, Perego M. TPR-mediated interaction of RapC with comA inhibits response regulator-DNA binding for competence development in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 2003, 49: 1509–1522
- 72 Roggiani M, Dubnau D. ComA, a phosphorylated response regulator protein of *Bacillus subtilis*, binds to the promoter region of *srfA*. *J Bacteriol*, 1993, 175: 3182–3187
- 73 Comella N, Grossman A D. Conservation of genes and processes controlled by the quorum response in bacteria: Characterization of genes controlled by the quorum-sensing transcription factor ComA in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 2010, 57: 1159–1174
- 74 Tsukamoto Y, Kasai M, Kakuda H. Construction of a *Bacillus subtilis* (*natto*) with high productivity of vitamin K₂ (menaquinone-7) by analog resistance. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2014, 65: 2007–2015
- 75 Berenjian A, Mahanama R, Talbot A, et al. Designing of an intensification process for biosynthesis and recovery of menaquinone-7. *Appl Biochem Biotechnol*, 2014, 172: 1347–1357
- 76 Wang J, Ma W, Wang X. Insights into the structure of *Escherichia coli* outer membrane as the target for engineering microbial cell factories. *Microb Cell Fact*, 2021, 20: 73
- 77 Su Y, Liu C, Fang H, et al. *Bacillus subtilis*: A universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. *Microb Cell Fact*, 2020, 19: 173
- 78 Wang Y P, Sun Z G, Zhang C Y, et al. Comparative transcriptome analysis reveals the key regulatory genes for higher alcohol formation by yeast at different α -amino nitrogen concentrations. *Food Microbiol*, 2021, 95: 103713
- 79 Lu Y, Zhao H, Zhang C, et al. Insights into the global regulation of anaerobic metabolism for improved biohydrogen production. *Bioresour Technol*, 2016, 200: 35–41

Summary for “微生物细胞工厂合成甲基萘醌的研究进展”

Advances in the synthesis of menaquinone using microbial cell factories

Panxing Sun^{1,2†}, Feng Li^{1,2,3†}, Yiwu Zong^{1,2} & Hao Song^{1,2,3*}

¹ School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China;

² Key Laboratory of Systems Bioengineering (Ministry of Education), Frontier Science Center for Synthetic Biology, Tianjin University, Tianjin 300072, China;

³ Qingdao Institute of Marine Technology, Tianjin University, Qingdao 266237, China

† Equally contributed to this work

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

Menaquinone, also known as vitamin K₂, is an essential vitamin. It contains a series of compounds; it has a 2-methyl-1,4-naphthoquinone ring as the parent ring, and different numbers of isoprene unit side chains at its C3 position. The common forms of K₂ are menaquinone-4, menaquinone-7 and menaquinone-8. Menaquinone can effectively prevent and treat vitamin K₂ deficiency-associated bleeding disorders, osteoporosis, cardiovascular disease and chronic kidney disease. Therefore, it has important applications in the fields of food and medicine. And the market demand for menaquinone is growing year by year with increased research on its function, and it is expected to reach a hundred-billion-dollar market. There are two production methods of menaquinone: Chemical synthesis and biosynthesis. The large-scale application of chemical synthesis is limited for the disadvantages of low yield and complicated separation process. And biosynthesis uses microorganisms that can naturally synthesize menaquinone to produce menaquinone, which has the advantages of simple operation and easy product separation. Therefore, biosynthesis has a better application prospect. In this review, we first summarise the biosynthetic process and metabolic pathways of menaquinone, including the research progress of the substrate uptake, shikimate, terpenoid backbone and menaquinone pathways. Then, metabolic engineering strategies, which have been applied in cell factories, such as *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*, are summarised, including overexpression, heterologous MVA synergy, knockdown and dynamic regulation. Additionally, we have introduced the yield of menaquinone from constructed microbial cell factories. Finally, we discuss the value of the two types of cell factories for industrial applications. *E. coli* has achieved a yield of 1.35 g/L menaquinone-7, the highest yield known for constructed cell factories. However, the application permission of menaquinone passed in China requires that its source is from *B. subtilis*, and the maximum yield of menaquinone-7 is only 310 mg/L in *B. subtilis*, which is of limited value for industrial application. Therefore, there is a need to further improve the menaquinone synthesis capacity of *B. subtilis*. Based on the results of applying metabolic engineering strategies, future research on metabolic engineering of cell factories should focus on the following points. Firstly, to find new metabolic bottlenecks in modified cell factories and enhance the metabolic flux of rate-limiting reactions. Classic overexpression solves the problem of insufficient metabolic flux in the rate-limiting step, but also causes other reactions to become new bottlenecks that limit product synthesis. Secondly, to expand the product storage space of menaquinone, the cell membrane of *B. subtilis* could be modified, or the intracellular lipid-soluble space could be expanded. Fat-soluble menaquinone-7 can only exist in the fat-soluble space of cell factories, and membrane modification in *E. coli* has proved that expanding the fat-soluble space can promote the synthesis of menaquinone-7. Thirdly, to find new targets to promote menaquinone synthesis at the global regulatory level to maximise the production performance of cell factories. The biosynthesis of menaquinone is complex, involving metabolic engineering of many pathways. And these metabolic engineering strategies often cause metabolic imbalance of cell factories. Therefore, it is a good way to look for regulators that promote the synthesis of menaquinone from the global metabolic level of cell factories.

menaquinone, metabolic pathways, metabolic strategies, microbial cell factories

doi: [10.1360/TB-2022-0532](https://doi.org/10.1360/TB-2022-0532)