

文章编号:1673-1689(2008)05-0001-07

生物技术法生产维生素 C 的研究进展

张静^{1,2}, 刘立明^{*1,2}, 刘杰³, 秦苏东³, 堵国成^{1,2}, 陈坚^{1,2}

(1. 江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江苏无锡 214122; 2. 江南大学生物工程学院, 江苏无锡 214122; 3. 江苏江山制药有限公司, 江苏靖江 214500)

摘要: 维生素 C 是一种重要的有机酸, 广泛应用于药物、食品、饮料、化妆品和饲料等中。相对于“莱氏法”而言, 生物技术法生产维生素 C 具有低成本、高品质等优势, 其主要包括一步发酵工艺和第二步发酵工艺, 而后者又包括以葡萄糖为底物的串联工艺和以 D-山梨醇为底物的工艺。在对比各种生产方法的基础上, 鉴于以 D-山梨醇为底物的发酵工艺是唯一用于工业生产的生产方法, 重点介绍了发酵法生产维生素 C 在发酵条件优化和一步发酵工程菌株的构建等方面的研究进展, 并给出了生物技术法将来可能的发展方向。

关键词: 维生素 C; 2-酮基-L-古龙酸; 发酵生产; 一步发酵

中图分类号: Q 819; R977.23

文献标识码: A

Progress in Biotechnological Production of Vitamin C

ZHANG Jing^{1,2}, LIU Li-ming^{*1,2}, LIU Jie³, QIN Shu-dong³,
DU Guo-cheng^{1,2}, CHEN Jian^{1,2}

(1. Key Lab of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Jiangsu Jiangshan Pharmaceutical Co., Ltd., Jingjiang 214500, China)

Abstract: Vitamin C, an important organic acid, is widely used in the industries of pharmaceuticals, cosmetics, food, beverage and feed additives, etc. Compared with the Reichstein method, biotechnological production of vitamin C is an abstractive approach due to the low cost but high product quality. In this manuscript, biosynthesis of vitamin C, including one-step fermentation and two-step fermentation, were firstly discussed and compared. Considering the industrial production of vitamin C through the oxidation of D-sorbitol or L-sorbose to 2-keto-L-gulonic acid is the only and efficient method, we then focused on the progress of the fermentation condition optimization and one-step fermentation strains construction. Furthermore, the prospects of the biotechnological production vitamin C were also presented.

Key words: vitamin C; 2-keto-L-gulonic acid; fermentative production; one-step fermentation

收稿日期: 2008-05-08.

基金项目: 国家杰出青年基金项目(20625619); 国家 863 计划项目(2006AA020303), 国家“十一五”支撑计划项目(2007BAI46B02); 国家 973 项目(2007CB714303).

作者简介: 张静(1981-), 女, 河北邯郸人, 发酵工程博士研究生.

* 通讯作者: 刘立明(1976-), 男, 安徽宿松人, 工学博士, 副教授, 主要从事工业生物技术的研究. Email: mingli@jiangnan.edu.cn

维生素 C, 又称抗坏血酸, 作为人体必需的一种维生素和抗氧化剂, 广泛应用于制药工业、食品工

业、饮料工业、化妆品工业和饲料工业等, 如表 1 所示。

表 1 维生素 C 及其衍生物的主要用途

Tab. 1 Application of vitamin C and its derivatives

用途	示例
制药工业	用于治疗乙型肝炎、惊厥、突发性血小板减少性紫癜、动脉硬化、病毒性心肌炎; 用于治疗癌症; 用于治疗继发性红皮病, 抗皮肤过敏等; 治疗亚硝酸中毒、支气管哮喘和急性病毒性肝炎。
食品工业	防止氧化褐变; 改变食品风味; 食品护色; 防止罐壁腐蚀; 防止油脂氧化。
饮料工业	作为添加剂, 具有防腐保鲜功能。
化妆品工业	用于治疗黄褐斑; 清除自由基, 延缓衰老。
饲料工业	用于提高动物抗应激能力, 增强免疫功能, 促进骨骼发育, 提高繁殖率。
生化试剂	用于磷的测定

随着维生素 C 应用范围不断扩大, 维生素 C 的市场需求量也在不断地增长。最早实现维生素 C 工业化生产的工艺是德国 Reichstein 于 1934 年发明的五步化学反应和一步生物转化, 将葡萄糖转化为 2-酮基-L-古龙酸 (2-Keto-L-Gulonic acid, 2-KGA), 再经酯化生成维生素 C。但该方法存在能耗高、消耗大量有机溶剂、环境污染严重等缺点。因此需要开发更经济、更具有竞争力的生物转化法或完全生物转化法。与“莱氏法”生产维生素 C 的六步化学反应相比, 用微生物从 D-山梨醇或 D-葡萄糖经两步发酵生成 2-KGA, 再经甲醇酯化生产维生素 C 的生物技术法, 具有工艺流程简单、生产周期短、成本低廉等优点。

1 生物技术法生产维生素 C

根据生产工艺不同, 生物技术法生产维生素 C 可分为二步发酵法和一步发酵法: (1) 二步发酵法即先用生物转化法生成 2-KGA 或 2-酮基-L-古龙酸钙 (Ca-KGA), 再用化学法合成 L-抗坏血酸; (2) 一步发酵法直接生物转化生成 L-抗坏血酸。其中二步发酵法又包括以葡萄糖为底物的串联发酵工艺和以 D-山梨醇为底物的发酵工艺。串联发酵工艺以 D-葡萄糖为底物, 首先由欧文氏菌 (*Erwinia* sp.) 转化 D-葡萄糖为 2,5-二酮基-D-葡萄糖酸 (2,5-diketo-D-gluconate, 2,5-DKG), 随后由棒状杆菌 (*Corynebacterium*) 将 2,5-DKG 转化为 2-KGA。以 D-山梨醇为底物的二步发酵法是研究得最早、也是研究得最多最深入的生产方法。在这一过程中, 醋酸菌 (*Acetobacteria*) 转化 D-山梨醇为 L-山梨糖, 再由大菌也即巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 和小菌氧化葡萄糖酸杆菌 (*Gluconobacter oxydans*) 共同完成由 L-山梨糖到 2-酮基-L-古龙酸 (2-

KGA) 的转化。其中小菌为产酸菌, 单独培养时生长微弱, 产酸较少; 大菌为伴生菌, 不产酸, 但促进小菌生长或产酸。我国科研工作者对该工艺的发酵优化研究从未间断, 已在培养基优化、两菌关系、细胞融合、生态调节、单菌发酵等方面作了大量工作, 进一步提高了工艺稳定性、产量和产率。一步发酵法是以二步发酵法的菌种为基础利用基因工程技术构建基因工程菌, 实现从葡萄糖或山梨醇到 2-KGA 的一步发酵。维生素 C 的制备方法见表 2。

2 以高产量、高产率和高生产强度为目标的发酵条件优化

对于任何一种发酵产品, 肯定存在着抑制该物质大量积累的影响因素。如果从代谢调控、微生物生理等角度研究这些因素对产酸积累的影响规律, 进而提出相应的控制方法或策略, 可望实现产品的高产量、高产率和高生产强度的相对统一。这是因为高产量有利于产物的后提取; 高产率则有利于降低原料成本; 在保证最大产量和产率的前提下加速底物消耗, 可以缩短发酵时间, 降低能耗, 降低生产成本, 提高生产效率。如何采用现代生物技术, 实现目标代谢产物生产的高产量、高产率和高生产强度, 对于提升维生素 C 的工业化生产水平具有重要的意义。

2.1 营养条件和溶氧对维生素 C 发酵的影响

由于维生素 C 发酵是采用大小菌混合培养, 最佳培养条件需兼顾两菌的最佳生长条件和小菌的最佳产酸条件。研究发现, 种子培养基的碳源、氮源、溶氧、生长因子及环境因子等都可以有效地调节菌系的生长代谢, 使大、小菌种子达到最佳生长状态, 从而对维生素 C 发酵产生重要影响^[13]。与单菌发酵相比, 维生素 C 混合菌代谢规律更加复杂。

表 2 维生素 C 的制备方法
Tab.2 Manufacturing methods of Vitamin C

方法	最终产物	底物	微生物/化学方法	生产特性			参考文献
				产量/ (g/L)	产率/ (g/(L·h))	转化 率/%	
莱氏法	2-KGA	D-葡萄糖	五步化学反应和一步生物转化	—	—	50	[1]
		葡糖酸	<i>Gluconobacter oxydans</i> ATCC 9937 and <i>Corynebacterium</i> sp. ATCC 31090	9.43	0.13	38	[2]
		D-山梨醇	<i>Gluconobacter melanogenus</i> Z84	60	0.42	60	[3]
	2-KGA	D-山梨醇	<i>Gluconobacter oxydans</i> NB6939/pS-DH-tufB1	88	1.22	88	[4]
			<i>Gluconobacter Melanogenus</i> U13	60	0.42	60	[3]
		L-山梨糖	<i>Gluconobacter oxydans</i> IGO112 and <i>Bacillus megaterium</i> IBM302	75.8	1.58	94.8	[5]
			<i>Gluconobacter oxydans</i> SCB329 and <i>Bacillus thuringiensis</i> SCB933	130.92	2.85	90	[6]
L-山梨酮	<i>Gluconobacter oxydans</i> U13(p7A6Δ4)	32.7	0.272 5	83.4	[7]		
生物技术法	Ca-KGA	D-葡萄糖	<i>Erwinia</i> sp. SHS 2629001 and <i>Corynebacterium</i> sp. SHS 752001	106.3	1.16	84.6	[8]
		D-葡萄糖	<i>Xanthomonas campestris</i> 2286	20.4	0.408	5.1	[9]
		D-山梨醇	<i>Ketogulonigenium vulgare</i> DSM 4025 ^{TP}	0.09	0.003 8	0.11	[10]
	L-抗坏血酸	L-山梨糖	<i>Ketogulonigenium vulgare</i> DSM 4025 ^{TP}	0.908	0.045	1.14	[10]
			<i>Ketogulonigenium vulgare</i> DSM 4025 ^{TP}	1.37	0.34	27.4	[10]
		D-半乳糖醛醛	<i>Candida norvegensis</i>	1.3	0.027	8.7	[11]
		L-半乳糖	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> and <i>Zygosaccharomyces bailii</i>	0.1	6.7×10 ⁻⁴	40	[12]

以氮源代谢为例,维生素 C 工业生产中普遍采用尿素和玉米浆作为氮源,其代谢特性体现在:(1)尿素的加入有两方面的作用,即作为生理碱性物质调节体系 pH 和为菌体代谢提供氮源;(2)体系的蛋白质含量随发酵时间不断增加;(3)玉米浆中的 17 种氨基酸按变化规律分为 3 类^[14]。玉米浆含有大量不确定的自然组分且各批次之间存在较大差异也会造成 2-KGA 的产量和发酵周期不稳定。确定菌体生长和产酸需要的特殊生长因子是控制 2-KGA 生产稳定性的先决条件。Leduc 等^[15]研究发现,叶酸及其衍生物能够促进 2-KGA 生产菌株普通生酮基古龙酸菌 LMPP-20356 的生长和产酸,而维生素、谷胱甘肽、血晶素、PQQ、胞嘧啶和尿嘧啶等对其生长和产酸没有明显的影响。

溶氧也是维生素 C 发酵过程中的一个重要影响因素。R. Giridhar 等人^[16]研究发现,在从 D-山梨醇分批发酵生产 L-山梨糖的过程中添加质量分

数 4% 的氧载体(N-十六烷),可以使发酵周期缩短 2 h,产量提高 17%;在流加发酵过程中,添加质量分数 4% 的氧载体可以使发酵周期缩短 5 h,产量提高 26%。

2.2 消除底物抑制效应,提高 2-KGA 的产量和产率

微生物转化 D-山梨醇为 L-山梨糖是“莱氏法”和以 D-山梨醇为底物的二步发酵法生产维生素 C 的重要工业发酵过程。在此过程中发现高浓度的 D-山梨醇严重抑制微生物的生长,使 D-山梨醇的氧化速率明显降低,导致发酵液中 L-山梨糖的浓度不高,从而增加分离纯化的难度和成本。控制山梨醇的起始质量浓度为 200 g/L,山梨糖的产量和产率分别为 200 g/L 和 14.2 g/(L·h)^[17]。在此基础上,采用 600 g/L 山梨醇进行恒速流加,使山梨糖的产量为分批发酵的 1.6 倍^[18];而采用线性变化流加策略(0.5~0.04 L/h)流加 600 g/L 山梨醇,可使

山梨糖产量达到 272.37 g/L^[19]；而采用 200 g/L 山梨醇进行分批发酵 10 h 后，指数流加 700 g/L 的山梨醇则使山梨糖产量达到 290 g/L 等^[20]。

在 L-山梨糖进一步转化为 2-KGA 的过程中，L-山梨糖的质量浓度过高会产生菌体代谢异常，使 2-KGA 的产量和产率下降。80 g/L 山梨糖进行分批发酵 35~40 h 后，2-KGA 的产量为 65~75 g/L。实际生产中多采用匀速流加工艺，对匀速流加山梨糖工艺的生产数据进行分析发现，整个发酵过程中产酸速度曲线呈马鞍形，而理想的产酸速度曲线应该只有一个峰值。根据发酵的速度曲线流加山梨糖使产酸速度曲线更接近于理想速度曲线。在发酵 10 h 和 20 h 分别补加一次山梨糖，使山梨糖的质量浓度达到 100 g/L 和 140 g/L，2-KGA 的产量为 120~135 g/L，转化率为 90% 左右。

2.3 提高生产菌株耐高温能力，减少能量消耗

研究发现，混合菌系中的大菌巨大芽孢杆菌可以在 33 ℃ 很好地生长，而小菌氧化葡萄糖酸杆菌则很难在高于 30 ℃ 时生长和产酸。因此提高氧化葡萄糖酸杆菌的耐高温性能可减少维生素 C 生产中的能耗。

由于氧化葡萄糖酸杆菌耐高温生理机制十分复杂，其耐高温的性状并不是由一个或数个基因控制，它涉及到大量的基因产物及其相关的代谢途径。在高温对氧化葡萄糖酸杆菌细胞作用机制未完全阐明之前，用基因工程等手段，很难提高菌体的耐高温性能。目前耐高温菌株选育仍旧采用诱变育种策略^[21]和从自然界中分离筛选的方法等^[22]。用离子注射方法处理小菌氧化葡萄糖酸杆菌 G0，获得耐热突变株 GI13，该突变株与巨大芽孢杆菌 B0 组成的新菌系在 33 ℃ 时糖酸转化率为 94%，且突变株 GI13 的 L-山梨糖脱氢酶(L-sorbose dehydrogenase, SDH)活性比出发菌株提高了近 1 倍^[21]。同样，转化 D-山梨醇为 L-山梨糖的醋酸菌也只能在低于 32 ℃ 时生长^[23]。Moonmangmee 等^[22]从植物中分离出能在 37 ℃ 生长并产糖的醋酸菌 CHM54，该菌在 30 ℃ 发酵质量分数 5% 的 D-山梨醇 24 h 内的醇糖转化率为 80%，而发酵温度为 37 ℃ 时 24 h 内的醇糖转化率达到 96%。

2.4 阻断副产物代谢途径，提高 2-KGA 的产量

在对 *Pseudomonas putida* ATCC 21812 和 *Gluconobacter melanogenus* IFO 3293 发酵生产 2-KGA 的代谢途径进行研究时，发现了一种能够利用 NAD(P)H 为辅酶将代谢终产物 2-KGA 转化为副产物 L-艾杜糖酸(L-idenic acid, L-IA)的 2-KGA

还原酶。在维生素 C 生产菌株酮古龙酸菌 WB0104^[24]中也发现了此酶。另外，草生欧文氏菌 SCB125 的 2-酮基葡萄糖酸还原酶(2-ketoaldonate reductase, 2-KRA) A 和 B 能够以 2,5-DKG 和 2-KGA 为底物。这些支路代谢都不利于 2-KGA 的积累。对支路代谢的关键酶进行基因敲除是提高 2-KGA 产量和产率的比较有效的方法之一。为此，陈芳等^[25]在 *tkrA* 基因插入链霉素抗性基因，用不稳定型质粒 pBR322 导入受体菌进行同源重组得到敲除 *tkrA* 基因的重组菌株，由于同工酶基因 *tkrB* 的存在，直接的酶活检测还无法进行。化学诱变也是减弱或阻断支路代谢、提高 2-KGA 产量的有效手段。Saito 等^[4]用 MNNG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, 甲基硝基亚硝基胍)对葡萄糖一步发酵生产 2-KGA 的重组菌株进行诱变，得到阻断 L-艾杜糖酸代谢途径的氧化葡萄糖酸杆菌突变株 NB6939，使 2-KGA 的产量达到 31 g/L，比原菌提高约一倍。

2.5 通过辅因子代谢调控手段，提高 2-KGA 的产量

维生素 C 发酵过程中涉及多种含有辅因子的酶系，如 SDH；L-山梨酮脱氢酶(L-sobosone dehydrogenase, SNDH)；2,5-二酮基-D-葡萄糖酸还原酶(2,5-diketo-D-gluconic acid reductase, 2,5-DKGR)；2-酮基-L-古龙酸还原酶(2-keto-L-gulonic acid reductase, 2-KGAR)等。其中 SDH 根据菌株不同可以用 FAD^[26]或 PQQ (Pyrroloquinoline Quinone, 吡咯喹啉醌)^[27]作为辅因子；*G. melanogenus* UV10 中 SNDH 以 NAD(P)为辅因子；*Corynebacterium* ATCC 31090 中的 2,5-DKGR^[28]和氧化葡萄糖酸杆菌中的 2-KGAR^[29]都以 NAD(P)H 作为辅因子。

调控胞内辅因子的浓度、形式或改变酶对辅因子的利用偏好，可以有效地提高 2-KGA 的产量，缩短发酵周期。以 2,5-二酮基-D-葡萄糖酸还原酶为例，棒状杆菌中存在 2,5-DKGR A 和 B，其中 2,5-DKGR A 既可以利用 NADH 也可以利用 NADPH，但其与 NADH 解离常数约是与 NADPH 解离常数的 260 倍，更倾向于用 NADPH 作为辅因子。而胞内 NADH 的浓度约为 NADPH 的 3 倍，且稳定性和经济性较好。Sanli 等对棒状杆菌的 2,5-DKGRA 进行双重位点突变，得到 2,5-DKGRA (F22Y/A272G)与 NADH 的解离常数降低至原酶的 1/3^[30]；进一步得到四重突变 2,5-DKGRA (F22Y/K232G/R238H/A272G)与 NADH 的解离

常数进一步降低至原酶的 $1/4^{[31]}$,大大降低了 2,5-DKGRA 体外生产 2-KGA 的成本。

2.6 混合培养两菌关系对维生素 C 生产的影响

以 D-山梨醇为底物的二步发酵法生产维生素 C 是混合培养法生产代谢产物的典型实例,其第二步发酵由产酸菌小菌和其伴生菌大菌混合发酵完成。小菌单独培养困难且产酸能力很低;大菌单独培养容易,不产 2-KGA,但可促进小菌生长或产酸。能与小菌混合培养合成 2-KGA 的伴生菌有很多,除常用的巨大芽孢杆菌外,还有蜡样芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌等,某些酵母亦有该作用。

大小菌之间是一种协同共生关系,即大菌促进小菌生长和产酸,小菌也使大菌生长加快^[13]。但细胞中合成 2-KGA 的酶活力与氧化葡萄糖酸杆菌的细胞量成正比,与巨大芽孢杆菌的细胞量多少无关。更进一步研究表明,巨大芽孢杆菌在代谢过程中释放出 30~50 kDa^[32]和 >100 kDa^[33]的生物活性物质,参与氧化葡萄糖酸杆菌生长和产酸过程。这一胞外活性物质是蛋白质。

2.7 染菌对维生素 C 生产稳定性的影响

影响维生素 C 发酵生产稳定性的因素很多,其中噬菌体感染、玉米浆组分的稳定性是最主要的影响因素。噬菌体感染是造成维生素 C 发酵异常的主要原因之一,常会导致生产延滞或产酸降低,甚至倒罐。目前,一种简单有效的方法是筛选获得抗噬菌体特性的优良菌株。尹光琳^[6]等采用紫外诱变、化学诱变和原生质体融合等方法选育到一组抗染菌能力极强的新菌系氧化葡萄糖酸杆菌 SCB329-苏云金芽孢杆菌 SCB933,此菌系在多年的生产和试验中均未发生污染现象,使生产稳定性提高,降低了生产成本。

3 一步发酵工艺

由于二步发酵过程中工艺复杂,影响因素较多,难以精确控制,同时 3 种微生物生长消耗了大量的原材料和能源。如能以 D-葡萄糖或 D-山梨醇为碳源进行一步发酵生产维生素 C 前体 2-KGA,将是维生素 C 产业中革命性的进步。目前,关于维生

素 C 一步发酵工艺的研究主要集中在两个方面:(1)以 D-山梨醇为底物的二步发酵生产菌种为基础构建一步发酵菌株;(2)以葡萄糖为底物的串联工艺的菌株为基础,构建一步发酵菌株。

研究发现,氧化葡萄糖酸杆菌 T100 以质量分数 5%的山梨醇单独发酵可以产生 2-KGA,但产量和转化率很低,分别为 7.0 g/L 和 13.1%。而把此菌的 SDH 和 SNDH 基因在氧化葡萄糖酸杆菌 G624 中表达,用表达质粒 pSDH155 构建的重组菌株以质量分数 5%的山梨醇为底物发酵的产酸量和转化率分别提高到 16 g/L 和 30%^[4]。进一步用化学诱变手段阻断 L-艾杜糖途径,用大肠杆菌的 *tufB1* 启动子替换原有的启动子,得到的重组菌株转化质量分数 10%的山梨醇为 2-KGA 的产量和转化率达到 88 g/L 和 82.6%^[34]。

虽然 D-山梨醇一步发酵生产 2-KGA 取得了很大进展,但此方法还必须以葡萄糖通过高压加氢制备山梨醇为原料,各国的科学家也在积极探索从葡萄糖直接发酵产生 2-KGA 的途径。Anderson 等人^[28]在欧文氏菌 ATCC 21998 中表达来源于棒状杆菌 ATCC 31090 的 2,5-DKG 还原酶基因,用表达质粒 ptrp1-35 构建的重组菌株在饱和的葡萄糖溶液中发酵得到 1 g/L 的 2-KGA。林红雨等^[35]把欧文氏菌和棒状杆菌进行原生质体融合,得到的重组细胞的 2-KGA 产量达到 2.07 g/L。

4 结 语

分析现有的研究报道,已对发酵法生产维生素 C 前体-2-KGA 生产菌的选育与改良、发酵过程的优化控制等进行了广泛的研究。为了进一步提高发酵法生产维生素 C 的竞争力,今后的研究工作应集中在:(1)深入研究以 D-山梨醇为底物的二步发酵工艺中大小菌混合培养的关系,这是提高生物技术法生产维生素 C 的关键;(2)生物技术法生产维生素 C 的关键酶的催化机制和调控机制还需要进一步研究;(3)对一步发酵菌株关于 2-KGA 生产基因的表达系统继续进行深入的研究,找出影响发酵产率的关键因素。

参考文献(References):

- [1] Bremus C, Herrmann U, Bringer-Meyer S, et al. The use of microorganisms in L-ascorbic acid production[J]. *Journal of Biotechnology*, 2006, 124(1): 196-205.
- [2] Ji A G, Gao P J. Synthesis of 2-Keto-L-Gulonic acid from gluconic acid by Co-Immobilized *Gluconobacter oxydans* and

- Corynebacterium sp*[J]. **Biotechnology Letters**,1998,20(10):939-942.
- [3] Sugisawa T, Hoshino T, Masuda S, et al. Microbial-Production of 2-Keto-L-Gulonic acid from L-Sorbose and D-Sorbitol by *Gluconobacter-Melanogenus*[J]. **Agricultural and Biological Chemistry**,1990,54(5):1201-1209.
- [4] Saito Y, Ishii Y, Hayashi H, et al. Cloning of genes coding for L-Sorbose and L-Sorbosone dehydrogenases from *Gluconobacter oxydans* and microbial production of 2-Keto-L-Gulonate, a precursor of L-Ascorbic acid, in a recombinant *G. Oxydans* strain[J]. **Applied and Environmental Microbiology**,1997,63(2):454-460.
- [5] Xu A, Yao J, Yu L, et al. Mutation of *Gluconobacter oxydans* and *Bacillus megaterium* in a Two-Step process of L-Ascorbic acid manufacture by ion beam[J]. **Journal of Applied Microbiology**,2004,96(6):1317-1323.
- [6] 尹光琳, 何建明, 任双喜, 等. 新组合菌系 SCB329-SCB933 利用 L-山梨糖发酵产生维生素 C 前体-2-酮基-L-古龙酸的研究 I: 新组合菌系 SCB329-SCB933 的生物学特性[J]. **工业微生物**,1997,27(1):1-7.
YIN Guang-ling, HE Jian-min, REN Suang-xi, et al. Production of Vitamin C Precursor -2-Keto-L-Gulonic acid from L-Sorbose by a novel bacterial component system of SCB329-SCB933[J]. **Industrial Microbiology**, 1997, 27(1):1-7. (in Chinese)
- [7] Shinjoh M, Tomiyama N, Asakura A, et al. Cloning and nucleotide sequencing of the Membrane-Bound L-Sorbosone dehydrogenase gene of *Acetobacter-Liquefaciens* IFO-12258 and Its expression in *Gluconobacter-Oxydans*[J]. **Applied and Environmental Microbiology**,1995,61(5):2069-2069.
- [8] Sonoyama T, Tani H, Matsuda K, et al. Production of 2-Keto-L-Gulonic acid from D-Glucose by Two-Stage fermentation [J]. **Applied and Environmental Microbiology**,1982,43(5):1064-1069.
- [9] Rao Y M, Sureshkumar G K. Direct biosynthesis of ascorbic acid from glucose by *Xanthomonas campestris* through induced free-radicals[J]. **Biotechnology Letters**,2000,22(5):407-411.
- [10] Sugisawa T, Miyazaki T, Hoshino T. Microbial production of L-Ascorbic acid from D-Sorbitol, L-Sorbose, L-Gulose, and L-Sorbosone by *Kketogulonicigenium vulgare* DSM 4025[J]. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**,2005,69(3):659-662.
- [11] Petrescu S, Hulea S A, Stan R, et al. A yeast-strain that uses D-Galacturonic acid as a substrate for L-Ascorbic-acid biosynthesis[J]. **Biotechnology Letters**,1992,14(1):1-6.
- [12] Sauer M, Branduardi P, Valli M, et al. Production of L-Ascorbic acid by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii*[J]. **Applied and Environmental Microbiology**,2004,70(10):6086-6091.
- [13] 周彬, 李义, 刘耀平, 等. VC 二步发酵中的微生物生态调控[J]. **应用生态学报**,2002,13(11):1452-1454.
ZHOU Bin, Li Yi, LIU Yao-ping, et al. Microbiological eco-regulation in Vc two-step fermentation[J]. **Chinese Journal of Applied Ecology**, 2002, 13(11):1452-1454. (in Chinese)
- [14] 李强, 刁幼羽, 向波涛, 等. 山梨糖发酵产生 2-酮基-L-古龙酸氮源代谢规律[J]. **微生物学报**,1996,36(1):19-24.
LI Qiang, DIAO jin-yu, XIANG Bo-tao, et al. Studies on metabolism of nitrogen source in fermentation of 2-Keto-L-Gulonic acid[J]. **Acta Microbiologica Sinica**,1996,36(1):19-24. (in Chinese)
- [15] Leduc S, de Troostembergh J C, Lebeault J M. Folate requirements of the 2-Keto-L-Gulonic Acid-Producing strain *Ketogulonigenium vulgare* LMP P-20356 in L-Sorbose/CSL medium[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2004,65(2):163-167.
- [16] Giridhar R, Srivastava A K. Productivity enhancement in L-Sorbose fermentation using oxygen vector[J]. **Enzyme and Microbial Technology**,2000,27(7):537-541.
- [17] Giridhar R N, Srivastava A K. Productivity improvement in L-Sorbose biosynthesis by fedbatch cultivation of *Gluconobacter oxydans*[J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**,2002,94(1):34-38.
- [18] Giridhar R, Srivastava A K. Fed-Batch cultivation of *Acetobacter suboxydans* for the microbial oxidation of D-Sorbitol to L-Sorbose[J]. **Bioprocess Engineering**,2000,23(6):575-577.
- [19] Giridhar R, Srivastava A K. Computer coupled substrate feeding strategies for efficient conversion of D-Sorbitol to L-Sorbose in fed-batch culture[J]. **Process Biochemistry**,2001,36(8-9):829-834.
- [20] Srivastava A K, Lasrado P R. Fed-Batch sorbitol to sorbose fermentation by *A. suboxydans*[J]. **Bioprocess and Biosystems Engineering**,1998,18(6):457-461.
- [21] Yan B, Xu A, Zhang W, et al. Accumulation of 2-Keto-L-Gulonate at 33 °C by a thermotolerant *Gluconobacter oxydans* mutant obtained by ion beam implantation[J]. **Plasma Science & Technology**,2006,8(2):237-241.
- [22] Moonmangmee D, Adachi O, Ano Y, et al. Isolation and characterization of thermotolerant *Gluconobacter* strains catalyzing oxidative fermentation at higher temperatures[J]. **Biosci Biotechnol Biochem**,2000,64(11):2306-2315.

- [23] Yang F C, Lim Y H. Kinetic study of the bioconversion of D-Sorbitol to L-Sorbose by *Acetobacter pasteurianus*[J]. *Process Biochemistry*, 1997, 32(3): 233-236.
- [24] Yang F, Jia Q, Xiong Z H, et al. Complete genome analysis of *Ketogulonigenium sp.* WB0104[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2006, 51(8): 941-945.
- [25] 陈芳, 陈策实, 李越, 等. 欧文氏菌 2-酮基醛糖还原酶基因敲除的研究[J]. *微生物学报*, 2000, 40(5): 475-481.
CHEN Fang, CHEN Ci-shi, LI Yue, et al. Studies on gene knocking out of 2-keto aldose reductases from *Erwinia sp.* SCB125[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2000, 40(5): 475-481. (in Chinese)
- [26] Sugisawa T, Hoshino T, Nomura S, et al. Isolation and characterization of Membrane-Bound L-Sorbose dehydrogenase from *Gluconobacter-Melanogenus* UV10[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1991, 55(2): 363-370.
- [27] 王虹. 维生素 C 两步发酵中关键步骤的分子生物学研究[D]. 北京: 军事医学科学院生物工程研究所, 2005.
- [28] Anderson S, Marks C B, Lazarus R, et al. Production of 2-Keto-L-Gulonate, an intermediate in L-Ascorbate synthesis, by a genetically modified *erwinia herbicola*[J]. *Science*, 1985, 230(4722): 144-149.
- [29] 蒋雨树, 郭振勇, 张成刚. 2-酮-L-古龙酸还原酶分离纯化及其理化、酶学性质的研究[J]. *生物工程学报*, 1997, 13(4): 400-405.
JIANG Yu-yang, GUO Zen-yong, ZHANG Chen-gang. Study on the purification of 2-keto-L-gulonate reductase and its physical, chemical and enzymic properties[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 1997, 13(4): 400-405. (in Chinese)
- [30] Banta S, Anderson S. Verification of a novel NADH-Binding motif; combinatorial mutagenesis of three amino acids in the Cofactor-Binding pocket of *corynebacterium* 2, 5-Diketo-D-Gluconic acid reductase[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2002, 55(6): 623-631.
- [31] Banta S, Swanson B A, Wu S, et al. Optimizing an artificial metabolic pathway: engineering the cofactor specificity of *Corynebacterium* 2,5-Diketo-D-Gluconic acid reductase for use in Vitamin C biosynthesis[J]. *Biochemistry*, 2002, 41(20): 6226-6236.
- [32] 冯树, 张舟, 张成刚, 等. 混合培养中巨大芽孢杆菌对氧化葡萄糖酸杆菌的作用[J]. *应用生态学报*, 2000, 11(1): 119-122.
FENG Shu, ZHANG Zou, ZHANG Chen-gang, et al. Effect of *Bacillus megaterium* on *Gluconobacter oxydans* in mixed culture[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2000, 11(1): 119-122. (in Chinese)
- [33] 吕淑霞, 冯树, 张忠泽, 等. VC 二步发酵中伴生菌的作用机制[J]. *微生物学通报*, 2001, 28(5): 10-13.
LU Shu-xia, FENG Shu, ZHANG Zhong-ze, et al. The effect of *Bacillus megaterium* in vitamin C two-step fermentation [J]. *Microbiology*, 2001, 28(5): 10-13. (in Chinese)
- [34] Saito Y, Ishii Y, Hayashi H, et al. Direct fermentation of 2-Keto-L-Gulonic acid in recombinant *Gluconobacter oxydans* [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1998, 58(2-3): 309-315.
- [35] 林红雨, 陈策实, 尹光琳. 欧文氏菌和棒杆菌的属间融合研究[J]. *微生物学通报*, 1999, 26(1): 3-6.
LIN Hong-yu, CHEN Chi-shi, YIN Guang-lin. Intergeneric cell fusion of *corynebacterium* and *erwinia*[J]. *Microbiology*, 1999, 26(1): 3-6. (in Chinese)

(责任编辑:秦和平)