

普通生酮基古龙酸菌 2-酮基-L-古龙酸合成途径在氧化葡萄糖酸杆菌中的整合表达与强化

陈吉铭^{1,2}, 堵国成^{1,2}, 陈 坚^{1,2}, 周景文^{*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)

摘要: 目前工业生产 VC 的方法为二步发酵法, 但该法涉及两步 3 种微生物, 存在操作工序繁琐、需要消耗大量原材料及能源等缺点。一步发酵法被认为能够降低生产成本并对 VC 的工业化生产起到革命性的改变。为了克服重组质粒易丢失及需要添加抗生素等不利因素, 将普通生酮基古龙酸菌(*K. vulgare* WSH-001)中的山梨糖脱氢酶基因(*sdh*)和山梨酮脱氢酶基因(*sndh*)整合到氧化葡萄糖酸杆菌(*G. oxydans* WSH-003)基因组, 得到一步发酵生产菌株 *G. oxydans-ss*。将其在 1 L 的罐中发酵, 72 h 时 2-KLG 产量达到最高, 为 37.6 g/L。为了进一步提高 2-KLG 的产量, 还采用了辅因子工程。吡咯喹啉醌(Pyrroloquinoline quinone, PQQ)是 SDH 和 SNDH 的辅酶, 通过在 *G. oxydans-ss* 中过量表达来自 *K. vulgare* WSH-001 的 *pqq*ABCDE 基因, 得到重组菌 *G. oxydans-ss/pqq*ABCDE。将其在 1 L 的罐中发酵, 84 h 时 2-KLG 产量达到最高, 为 44.5 g/L。以上结果对 VC 的一步发酵起到了一定的促进作用, 使一步发酵法生产 VC 的工业化生产有望实现。

关键词: 维生素 C; 山梨糖脱氢酶; 山梨酮脱氢酶; 吡咯喹啉醌

中图分类号: Q 78 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2016)06—0611—06

Integration and Enhancement of 2-Keto-L-Gulonic Acid Synthesis Pathway in *Gluconobacter xydans* from *Ketogulonicigenium vulgare*

CHEN Jiming^{1,2}, DU Guocheng^{1,2}, CHEN Jian^{1,2}, ZHOU Jingwen^{*1,2}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Vitamin C (VC), as a kind of vitamins and antioxidants, is widely used in pharmaceutical, food, beverage, and feed industries. 2-keto-L-gulonic acid (2-KLG) is the precursor of vitamin C. Recently, the two-step fermentation is used as the main route for vitamin C production. However, this route involves three microorganisms and requires an additional second sterilization process, which significantly increases the cost of both raw materials and energy requirement. Therefore, a one-step fermentation process is considered to be more cost-effective and revolutionary in VC industry. In order to overcome the disadvantages of plasmid overexpression, while the plasmid may be lost and need to add antibiotics in medium, the recombinant strain *G. oxydans-ss* was

收稿日期: 2014-12-31

基金项目: 国家 863 计划项目(2012AA022103)。

* 通信作者: 周景文(1982—), 男, 安徽庐江人, 工学博士, 教授, 主要从事合成生物学研究。E-mail: zhoujw1982@jiangnan.edu.cn

constructed by integrating sorbose dehydrogenase gene (*sdh*) and sorbosone dehydrogenase gene (*sndh*) from *K.vulgare* WSH-001 into the genome of *G.oxydans* WSH-003. This recombinant strain produced 37.6 g/L of 2-KLG after 72 h in 1 L fermentor. The overexpression of pyrroloquinolinequinone (PQQ), a cofactor of SDH and SNDH, has increased the yield of 2-KLG up to 44.5 g/L after 84 h. These results indicated the significant progress in vitamin C industry and show the possibility of development of one-step fermentation for 2-KLG production in future.

Keywords: vitamin C, sorbose dehydrogenase, sorbosone dehydrogenase, pyrroloquinoline quinone

VC 俗称 L-抗坏血酸(L-ascorbic acid),具有很强的还原性。它作为一种维生素和抗氧化剂,广泛应用于制药、食品等工业^[1-2]。目前,VC 总产量的50%用于医疗上补充 VC 及医药制剂,15%用于饮料工业,25%用于其他食品工业,10%用于饲料工业^[3]。

工业上生产 VC 的方法为二步发酵法,它是先用氧化葡萄糖酸杆菌(*Gluconobacter oxydans*)将山梨醇转化成山梨糖,再通过普通生酮基古龙酸菌(*Ketogulonigenium vulgare*)和巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)的混菌发酵体系将山梨糖转化成 2-KLG^[4]。2-KLG 是 VC 的前体,通过简单的酸化过程就能转化成 VC^[5]。但该法涉及两步 3 种微生物,存在操作工序繁琐、菌种传代困难、原材料及能源消耗大等一系列问题,造成 VC 价格显著高于类似的其他发酵产品^[6]。因此,单菌一步发酵法生产 VC 是降低其生产成本的根本解决方法^[4]。

一步发酵生产 VC 的方法有两类。一种是以葡萄糖为底物的一步发酵法,采用草生欧文氏菌(*Erwiniaherbicola*)先将葡萄糖转化生成 2,5-二酮基-D-葡萄糖酸(2,5-DKG),再用棒杆菌属(*Corynebacterium* sp.)将 2,5-DKG 转化生成 2-KLG^[7]。但 2,5-DKG 不稳定,导致该法生产效率较低。另一种是以山梨醇为底物的一步发酵法,通过在 *G. oxydans* 中导入山梨糖脱氢酶基因(*sdh*)和山梨酮脱氢酶基因(*sndh*),将山梨醇经过单菌一步发酵直接转化生成 2-KLG。*G. oxydans* T100 以 5 g/dL 的山梨醇单独发酵可以生产 2-KLG,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 *G. oxydans* G624 中表达,用表达质粒 pSDH155 构建的重组菌株以 5 g/dL 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%^[8]。另外,将 *K.vulgare* WSH-001 中的 *sdh* 和 *sndh* 基因构建到质粒 pGUC 中,并在 *G. oxydans* WSH-003 中表达,发酵 168 h,2-KLG 的产量为 32.4 g/L^[4]。但质粒表达

sdh 和 *sndh* 基因,存在质粒易丢失及需要添加抗生素等不利因素,不适于工业化应用。

为了解决上述问题,将工业菌株 *K.vulgare* WSH-001 中的 *sdh* 和 *sndh* 基因整合到 *G. oxydans* WSH-003 基因组中,得到重组菌 *G. oxydans*-ss。在 500 mL 的摇瓶发酵 168 h,2-KLG 的产量为 22.1 g/L;1 L 的罐发酵,72 h 时产量可达 37.6 g/L。吡咯喹啉醌(Pyrroloquinolinequinone,PQQ)是 20 世纪 70 年代末发现的 1 种氧化还原酶的新辅酶,是继黄素核苷酸(FMN、FAD)和烟酰胺核苷酸(MAD、NADP)之后发现的第 3 种辅酶^[9]。*K.vulgare* WSH-001 中的 SDH 和 SNDH 被证明是 PQQ 结合脱氢酶^[10]。通过在重组菌中过量表达来自 *K.vulgare* WSH-001 的 *pqq*ABCDE 基因,得到重组菌 *G. oxydans*-ss/*pqq*ABCDE。在 500 mL 的摇瓶发酵 168 h,2-KLG 的产量为 28.1 g/L;1 L 的罐发酵,84 h 时产量达到最高,为 44.5 g/L。以上结果对 VC 的一步发酵起到了一定的促进作用,使一步发酵法 VC 工业化生产有望实现。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 *G.oxydans* WSH-003 和 *K.vulgare* WSH-001,购于江苏江山制药有限公司;大肠杆菌 *E. coli* JM109,购买自 Novagen 公司,用于载体构建;T-Vector pMD19 (Simple),购买自宝生物工程(大连)有限公司;重组质粒 pGUC-*sdh*-GS-*sndh*,作者所在研究室构建^[4]。质粒 pBBR1MCS-5 用于在 *G. oxydans* 中过量表达 *pqq* 基因。质粒 pKD13 用来扩增卡那霉素抗性基因。

1.1.2 培养基及培养条件

1)LB 培养基:酵母粉 5 g/L,蛋白胨 10 g/L,氯化钠 10 g/L;Y-S 种子培养基:酵母粉 10 g/L,山梨

醇 150 g/L; Y-S 发酵培养基: 酵母浸膏 20 g/L, 山梨醇 150 g/L。固体培养基为相应的液体培养基中加入 20 g/L 琼脂。

2) *E. coli* JM109 培养条件: 从 LB 固体平板上划线得到 *E. coli* JM109 单菌落, 挑取单菌落接种至加有 25 mL LB 培养基的 250 mL 的摇瓶中, 放置于 37 °C 转速为 200 r/min 的摇床上培养。

3) *G. oxydans* 的摇瓶发酵培养条件: 从 Y-S 固体平板上划线得到 *G. oxydans* 单菌落, 挑取单菌落接种至加有 25 mL Y-S 种子培养基的 250 mL 的摇瓶中, 放置于 30 °C 转速为 200 r/min 的摇床上培养 36 h, 按体积分数 10% 接种量转接至加有 45 mL Y-S 发酵培养基的 500 mL 的摇瓶中, 放置于 30 °C 转速为 200 r/min 的摇床上培养 168 h。

4) *G. oxydans* 的 1 L 容积机械搅拌罐发酵培养条件: 从 Y-S 固体平板上划线得到 *G. oxydans* 单菌落, 挑取单菌落接种至加有 75 mL Y-S 种子培养基的 500 mL 的摇瓶中, 放置于 30 °C 转速为 200 r/min 的摇床上培养 36 h, 按体积分数 15% 接种量转接至加有 425 mL Y-S 发酵培养基的 1 L 容积罐中, 温度设置为 30 °C, 搅拌转速为 400 r/min, 通气量为 1.5 L/(L·min), 培养 168 h。

1.1.3 主要试剂和仪器 *E. coli* JM109 感受态的制备, 使用生工生物工程(上海)股份有限公司高效感

受态细胞制备试剂盒; *E. coli* 质粒的提取, 使用生工生物工程(上海)股份有限公司 Sanprep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒; 细菌基因组的提取, 使用生工生物工程(上海)股份有限公司 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒; DNA 片段的回收、纯化, 用 Thermo 公司 GeneJET Gel Extraction Kit; 限制性内切酶、连接酶和 DNA 聚合酶等, 购买自宝生物工程(大连)有限公司; 1 L 容积机械搅拌发酵罐, 产自美国 NBS 公司, 型号为 BIOFLO 110; 高效液相色谱仪, 产自 Agilent 公司, 型号为 Agilent 1100; 还有 Gene PulserXcell™ Bio-Rad 电转仪等常规仪器设备。

1.2 方法

1.2.1 重组基因片段的构建 以质粒 pGUC-*sdh*-GS-*sndh* 为模板扩增基因片段 *sdh*-GS-*sndh*, 以 *G. oxydans* WSH-003 的基因组为模板分别扩增 *tufB* 启动子序列和山梨糖还原酶(sorbose reductase)基因上下游基因片段 *sr1*、*sr2*, 以质粒 pKD13 为模板扩增卡那霉素抗性基因(*km*)。所用引物如表 1 所示。将上述基因分别连接 T-Vector pMD19 (Simple), 得到重组质粒 pMD-*sr1*、pMD-*tufB*、pMD-*sdh*-GS-*sndh*、pMD-*km*、pMD-*sr2*。将上述重组质粒分别转化 *E. coli* JM109, 挑取转化子进行菌落 PCR 验证, 挑阳性克隆接种、提质粒, 并送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

表 1 本研究中所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物	序列(5'-3')
<i>sr1</i> -F	CCCAAGCTTGTGCTTCCTGGCAAAGTTCCG
<i>sr1</i> -R	GGGGTACCTTCCGCAGAGGGCCCTTCTT
<i>tufB</i> -F	GGGGTACCCAGGTATTGGAATGAGTCGCCC
<i>tufB</i> -R	CCGCTCGAGCGTCTATCTCCAAAACCTGCCT
<i>sdh</i> -GS- <i>sndh</i> -F	CCCAAGCTTGGGGTACCCCGCTCGAGATGAAACTGACGACCCTGCTGC
<i>sdh</i> -GS- <i>sndh</i> -R	CGGGATCCAGGCGCGCCGACTAGTTTACGCAGCGGAAATCCGC
<i>km</i> -F	GACTAGTTCGACCTGCAGTTCGAAAGTTC
<i>km</i> -R	AGGCGCGCCGTGTAGGCTGGAGCTGCT
<i>sr2</i> -F	AGGCGCGCCATGCCGGGCAAAGGTGA
<i>sr2</i> -R	CGGGATCCTGTGGGCTTGTGCTAGTCTC
<i>tufB</i> -F'	GACTAGTGAGGTATTGGAATGAGTCGCC
<i>tufB</i> -R'	CACGTGCGTCTATCTCCAAAACCTGC
<i>pqq</i> ABCDE-F	GACTAGTCACGTGCGGAGGAAACCGATCCATTTG
<i>pqq</i> ABCDE-R	TCCCCCGGGTCAGCTATCCGCGCGTGCAT

注: 下划线所示区域为限制性内切酶的酶切位点。

将测序正确的质粒 pMD-*tufB*、pMD-*sdh*-GS-*sndh* 分别用限制性内切酶 *Kpn*I 和 *Xho*I 切割后连接到质粒 pMD-*tufB*-*sdh*-GS-*sndh* 上, 将其转化 *E.*

coli JM109, 挑取转化子进行菌落 PCR 验证, 挑阳性克隆接种、提质粒。按上述方法依次将另外的 3 个基因片段连接到质粒 pMD-*tufB*-*sdh*-GS-*sndh* 上, 最

终得到重组质粒 pMD-sr1-tufB-sdh-GS-sndh-km-sr2 (p-ss)。将重组质粒 p-ss 分别用限制性内切酶 *Hind*III、*Bam*HI 切割, 得到基因片段 sr1-tufB-sdh-GS-sndh-km-sr2(ss)。

1.2.2 重组质粒 pBBR-tufB-pqqABCDE 的构建 以 *G. oxydans* WSH-003 的基因组为模板扩增 tufB 启动子序列, 以 *K. vulgare* WSH-001 基因组为模板扩增 pqqABCDE 基因。所用引物见上表 1。将上述基因分别连接 T-Vector pMD19 (Simple), 得到重组质粒 pMD-tufB、pMD-pqqABCDE。将上述重组质粒分别转化 *E. coli* JM109, 挑取转化子进行菌落 PCR 验证, 挑阳性克隆接种、提质粒, 并送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。将测序正确的上述质粒分别用限制性内切酶 *Spe*I 和 *Pml*I 切割后连接, 得到重组质粒 pMD-tufB-pqqABCDE。将 pMD-tufB-pqqABCDE 与质粒 pBBR1MCS-5 用限制性内切酶 *Spe*I 和 *Sma*I 切割后连接, 得到重组质粒 pBBR-tufB-pqqABCDE。

1.2.3 重组菌 *G. oxydans*-ss 的构建 用电转化的方法将基因片段 ss 导入 *G. oxydans* WSH-003 中^[11]。通过同源臂交换, 将 *sdh* 和 *sndh* 整合到 *G. oxydans* WSH-003 基因组, 得到重组菌 *G. oxydans*-ss。从 Y-S 固体平板上挑选 *G. oxydans* WSH-003 单菌落接种至 25 mL Y-S 液体培养基, 30 °C、200 r/min 预培养 36 h; 按体积分数 10% 接种量转接新鲜的 Y-S 液体培养基, 30 °C、200 r/min 培养至 OD₆₀₀=1.6~1.8; 将上述菌液离心并用预冷的体积分数 10% 甘油溶液重悬菌体 3 次, 得到感受态细胞。将 5 μL ss 基因片段加入 100 μL 感受态细胞中混匀, 冰浴 1~2 min; 将上述混合物加入预冷的电转杯中, 按照 Bio-Rad 电转仪的说明进行电转。电转条件为: 1 800 V 电场强度, 200 Ω 电阻, 25 μF 电容; 电击结束后, 立即加入 400 μL 预冷的 Y-S 液体培养基; 30 °C、200 r/min 培养 2 h 后涂布卡那抗性平板, 30 °C 培养至长出单菌落, 挑取转化子进行菌落 PCR 验证。

1.2.4 重组菌 *G. oxydans*-ss/pqqABCDE 的构建 按 1.2.3 方法将重组质粒 pBBR-tufB-pqqABCDE 导入 *G. oxydans*-ss, 得到重组菌 *G. oxydans*-ss/pqqABCDE。

1.2.5 2-KLG 及 PQQ 的分析方法 2-KLG 的浓度用高效液相色谱(HPLC)检测^[12]。检测条件: 色谱柱 Aminex HPX-87H (Bio-Rad); 流动相 5 mmol/L H₂SO₄, 体积流量 0.6 mL/min, 柱温 35 °C, 进样量 5 μL, 检

测器为示差折光检测器。PQQ 的检测用酶法检测^[13]。将 1 mL 显色剂、30 μL 酶液和 2 μL PQQ 标样或发酵上清液混匀; 取 200 μL 上述溶液加入 96 孔板中, 立即放入酶标仪, 用 OD₆₂₀ 滤镜, 每 30 s 检测一次, 检测 10 min; 根据时间和显色剂褪色速率关系绘制标准曲线, 并据此确定发酵液中 PQQ 浓度。

2 结果与讨论

2.1 重组基因片段的构建

以质粒 pGUC-sdh-GS-sndh 为模板扩增基因 *sdh*-GS-*sndh*, 以 *G. oxydans* WSH-003 的基因组为模板分别扩增 tufB、sr1、sr2, 以质粒 pKD13 为模板扩增 km。将上述基因构建到 T-Vector pMD19 (Simple), 得到重组质粒 p-ss。将质粒酶切, 得到重组基因片段 ss, 如图 1 所示。

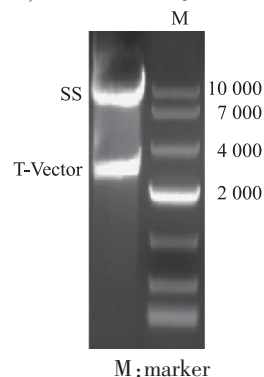


图 1 重组质粒 p-ss 酶切验证

Fig. 1 Confirmation of plasmid p-ss

2.2 重组质粒 pBBR-tufB-pqqABCDE 的构建

以 *G. oxydans* WSH-003 的基因组为模板扩增 tufB, 以 *K. vulgare* WSH-001 基因组为模板扩增基因 pqqABCDE。将上述基因构建到 T-Vector pMD19 (Simple), 得到重组质粒 pMD-tufB-pqqABCDE。将其与质粒 pBBR1MCS-5 酶切后连接, 得到重组质粒 pBBR-tufB-pqqABCDE, 将其酶切验证, 如图 2 所示。

2.3 重组菌 *G. oxydans*-ss 发酵生产 2-KLG

用电转化方法将基因片段 ss 导入 *G. oxydans* WSH-003 中, 得到重组菌 *G. oxydans*-ss。将野生菌 *G. oxydans* WSH-003、*G. oxydans*-ss 分别在 500 mL 的摇瓶中培养 168 h, HPLC 检测 2-KLG 产量。*G. oxydans* WSH-003 发酵 168 h 后, 2-KLG 的产量为 9.6 g/L, *G. oxydans*-ss 的 2-KLG 产量为 22.1 g/L, 是野生菌产量的 2.3 倍。将 *G. oxydans* WSH-003、*G. oxydans*-ss 分别在 1 L 容积罐中发酵 168 h, 每隔 12 h

取样, HPLC 检测 2-KLG 产量, 结果如图 3 所示。可见, *G. oxydans* WSH-003 在 96 h 时, 2-KLG 产量达到最高, 为 19.3 g/L; 重组菌 *G. oxydans-ss* 在 72 h 时, 2-KLG 的产量达到最高, 为 37.6 g/L, 是野生菌最高产量的 1.9 倍。2-KLG 在达到最大值后, 两个菌的产量都有缓慢下降, 168 h 时, *G. oxydans* WSH-003 的 2-KLG 产量为 15.2 g/L; *G. oxydans-ss* 的 2-KLG 产量为 34.1 g/L。究其原因, 可能是在氧化葡萄糖酸杆菌中存在分解 2-KLG 的代谢途径。

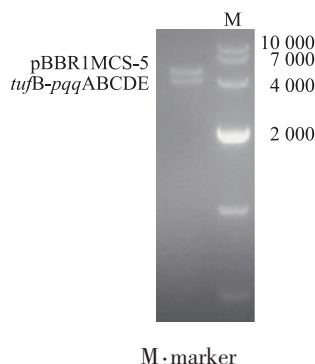


图 2 重组质粒 pBBR-tufB-pqqABCDE 酶切验证

Fig. 2 Confirmation of plasmid pBBR-tufB-pqqABCDE

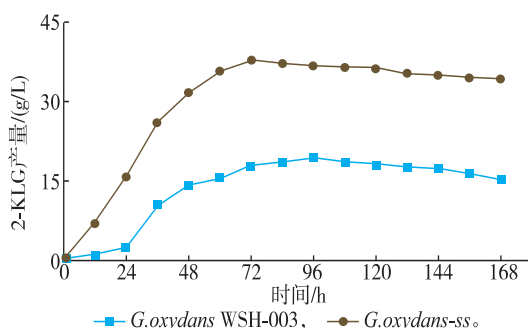


图 3 2-KLG 产量变化图

Fig. 3 Production of 2-KLG

2.4 重组菌 *G. oxydans-ss/pqqABCDE* 发酵生产 2-KLG

用电转化的方法将重组质粒 pBBR-tufB-pqqABCDE 导入 *G. oxydans-ss* 中, 得到重组菌 *G. oxydans-ss/pqqABCDE*。将 *G. oxydans-ss*、*G. oxydans-ss/pqqABCDE* 分别在 500 mL 的摇瓶中培养 168 h, *G. oxydans-ss* 的 2-KLG 产量为 22.1 g/L, *G. oxydans-ss/pqqABCDE* 的 2-KLG 产量为 28.1 g/L, 比 *G. oxydans-ss* 的产量提高了 27.1%。将上述两个菌株分别在 1 L 容积罐中发酵 168 h, 每隔 12 h 取样, HPLC 检测 2-KLG 产量, 酶法检测 PQQ 含量, 结果如图 4、图 5 所示。

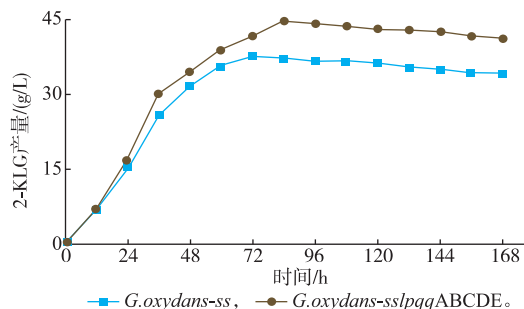


图 4 2-KLG 产量变化图

Fig. 4 Production of 2-KLG

从图 4 可见, *G. oxydans-ss* 在发酵 72 h 时, 2-KLG 产量达最高, 为 37.6 g/L; *G. oxydans-ss/pqqABCDE* 在发酵 84 h 时, 2-KLG 的产量达最高, 为 44.5 g/L。随着发酵时间延长, 两个菌的 2-KLG 产量都有不同程度的下降。发酵 168 h, *G. oxydans-ss* 的 2-KLG 产量为 34.1 g/L, *G. oxydans-ss/pqqABCDE* 的 2-KLG 产量为 41.0 g/L, 比 *G. oxydans-ss* 的产量提高了 20.2%。

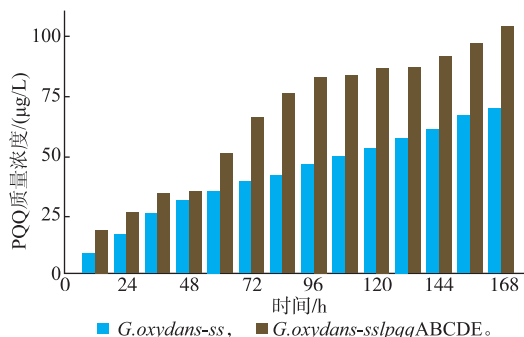


图 5 PQQ 含量变化图

Fig. 5 Concentration of PQQ

从图 5 可见, 两菌的 PQQ 含量随发酵时间延长而逐渐上升, 168 h 时, *G. oxydans-ss* 的 PQQ 质量浓度为 69.2 μg/L, *G. oxydans-ss/pqqABCDE* 的 PQQ 质量浓度为 104.2 μg/L, 是前者含量的 1.5 倍。结果显示, 过量表达 *pqq* 基因能够提高 2-KLG 产量。

3 结 语

由于目前生产 VC 的二步发酵法存在操作工序繁琐, 需要消耗大量原材料及能源等缺点, 科研工作者都在寻找一种更经济的方法来替代二步发酵法, 其中一步发酵法是目前研究的热点。本研究通过将 *K. vulgare* WSH-001 中的 *sdh* 和 *sndh* 基因整合到 *G. oxydans* WSH-003 基因组, 构建成 VC 一步

发酵生产菌株 *G. oxydans-ss* 法。500 mL 的摇瓶发酵 168 h, 2-KLG 的产量为 22.1 g/L; 1 L 容积罐发酵 168 h, 2-KLG 产量为 34.1 g/L。为了进一步提高 2-KLG 产量, 还采用了辅因子工程。*K. vulgare* WSH-001 中的 SDH 和 SNDH 被证明是 PQQ 结合脱氢酶。通过在重组菌中过量表达来自 *K. vulgare* WSH-001 的 *pqq*ABCDE 基因, 得到重组菌 *G. oxydans-ss/pqq*ABCDE。500 mL 的摇瓶发酵 168 h, 2-KLG 产量为 28.1 g/L, 比 *G. oxydans-ss* 的产量提高了 27.1%; 1 L 容积罐发酵 168 h, 2-KLG 的产量为 41.0 g/L, 比

G. oxydans-ss 的产量提高了 20.2%。高丽丽等在 *G. oxydans*/pGUC-k0203-GS-k0095 中过量表达 *pqq* 基因后, 2-KLG 产量提高了 21.0%^[4]。说明过量表达 *pqq* 基因能够提高 2-KLG 产量。但在发酵后期, 2-KLG 产量都有一定程度下降, 这可能是在 *G. oxydans* WSH-003 中存在分解 2-KLG 的代谢途径。下一步可考虑通过敲除 2-KLG 的分解代谢途径关键基因来提高 2-KLG 产量。本研究对 VC 的一步发酵起到了一定促进作用, 使未来一步发酵法 VC 工业化生产有望实现。

参考文献:

- [1] Fossati T, Solinas N, Porro D, et al. L-ascorbic acid producing yeasts learn from plants how to recycle it [J]. **Metabolic Engineering**, 2011, 13(2):177-185.
- [2] ZOU W, LIU L, CHEN J. Structure, mechanism and regulation of an artificial microbial ecosystem for vitamin C production[J]. **Critical Reviews in Microbiology**, 2013, 39(3):247-255.
- [3] Pappenberger G, Hohmann H-P. Industrial production of L-ascorbic acid (vitamin C) and D-isoascorbic acid [J]. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, 2014, 143:143-188.
- [4] GAO L, HU Y, LIU J, et al. Stepwise metabolic engineering of *Gluconobacter oxydans* WSH-003 for the direct production of 2-keto-L-gulonic acid from D-sorbitol[J]. **Metabolic Engineering**, 2014, 24:30-37.
- [5] Takagi Y, Sugisawa T, Hoshino T. Continuous 2-keto-L-gulonic acid fermentation by mixed culture of *Ketogulonigenium vulgare* DSM 4025 and *Bacillus megaterium* or *Xanthomonas maltophilia* [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2010, 86(2):469-480.
- [6] ZHU Y, LIU J, DU G, et al. Sporulation and spore stability of *Bacillus megaterium* enhance *Ketogulonigenium vulgare* propagation and 2-keto-L-gulonic acid biosynthesis[J]. **Bioresource Technology**, 2012, 107:399-404.
- [7] Anderson S, Marks C, 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.
- [8] Saito Y, Ishii Y, Hayashi H, et al. Cloning of genes coding for L-sorbose and L-sorbose 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.
- [9] Misra H, Rajpurohit Y, Khairnar N. Pyrroloquinolinequinone and its versatile roles in biological processes [J]. **Journal of Biosciences**, 2012, 37(2):313-325.
- [10] GAO L, DU G, ZHOU J, et al. Characterization of a group of pyrroloquinoline quinone-dependent dehydrogenases that are involved in the conversion of L-sorbose to 2-keto-L-gulonic acid in *Ketogulonigenium vulgare* WSH-001 [J]. **Biotechnology Progress**, 2013, 29(6):1398-1404.
- [11] Peters B, Junker A, Brauer K, et al. Deletion of pyruvate decarboxylase by a new method for efficient markerless gene deletions in *Gluconobacter oxydans*[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2013, 97(6):2521-2530.
- [12] DU J, BAI W, SONG H, et al. Combinational expression of sorbose/sorbose dehydrogenases and cofactor pyrroloquinoline quinone increases 2-keto-L-gulonic acid production in *Ketogulonigenium vulgare*-*Bacillus cereus* consortium [J]. **Metabolic Engineering**, 2013, 19:50-56.
- [13] Geiger O, Gorisch H. Enzymatic determination of pyrroloquinoline quinone using crude membranes from *Escherichia coli*[J]. **Analytical Biochemistry**, 1987, 164(2):418-423.