

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54(10):1101–1108; 4 October 2014
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.10.001

酮古龙酸菌与呼吸链偶联的 2-KGA 代谢途径研究进展

李野^{1,2}, 厉学¹, 张怡轩^{1*}

¹ 沈阳药科大学生命科学与生物制药学院, 辽宁 沈阳 110016

² 东北制药集团股份有限公司, 辽宁 沈阳 110026

摘要: 酮古龙酸菌可将底物 L-山梨糖转化为维生素 C 的前体 2-酮基-L-古龙酸(2-KGA)。该菌共存在 5 种反应参与 2-KGA 代谢, 包括: ①D-山梨醇氧化为 L-山梨糖; ②L-山梨糖氧化为 L-山梨酮; ③L-山梨酮(吡喃型)氧化为 2-KGA; ④L-山梨酮(呋喃型)氧化为维生素 C。⑤2-KGA 还原为 L-艾杜糖酸。其中 L-山梨糖/L-山梨酮脱氢酶(SSDH)参与反应①②③, L-山梨糖脱氢酶(SDH)参与反应②③, L-山梨酮脱氢酶(SNDH)参与反应③④, 醛脱氢酶(ALDH)参与反应③, 2-KGA 还原酶(2-KGR)参与反应⑤。SDH/SSDH/ALDH 属于 I 型醌酶, 其辅酶为 1 分子 PQQ; SNDH 属 II 型醌酶, 与 PQQ、heme C 共同构成 quinoxinoproteins, 2 种醌酶均分布于周质空间中与呼吸链相偶联, 意味着这种膜上直接氧化过程伴随 ATP 产生, 使得菌体可以利用环境中的底物实现快速供能。

关键词: 酮古龙酸菌, 2-酮基-L-古龙酸, 醌酶, 呼吸链, 电子传递

中图分类号: Q935 **文章编号:** 0001-6209(2014)10-1101-08

我国维生素 C 二步发酵工艺历经 40 余年, 通过不断的菌株驯化与工艺改进, 逐步取代国外的“莱氏”半合成工艺, 使得我国成为全球维生素 C 最重要的生产国与供应商。该工艺包括两个发酵过程: 第一步是在氧化葡萄糖酸杆菌(*Gluconobacter oxydans*)作用下将 D-山梨醇(D-sorbitol)氧化为 L-山梨糖(L-sorbose)。第二步是在混合菌系的作用下, 将 L-山梨糖转化为 2-酮基-L-古龙酸(2-KGA)。最后经过化学转化使 2-KGA 生成维生素 C。第二步发酵生产 2-KGA 是决定维生素 C 产率和成本的关键步骤。在其混合菌系中: 酮古龙酸菌(*Ketogulonigenium vulgare*)是 2-KGA 的生产菌株,

负责将 L-山梨糖转化为 2-KGA。但该菌独立生长及产 2-KGA 能力非常弱, 需要巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)伴生, 它自身可独立生长, 却不能转化 L-山梨糖为 2-KGA^[1]。

近年来, 随着 Urbance 等将中国产 2-KGA 菌 DSM4025 归类于 *Ketogulonigenium* 属 *vulgare* 种^[2-3], 及人们对以吡咯喹啉醌(PQQ)为辅酶的新型氧化还原酶体系-醌酶体系的研究逐渐加深, 认为 *Ketogulonigenim* sp. 产 2-KGA 酶系统与葡萄糖杆菌属(*Gluconobacter* sp.)体内存在的 L-山梨酮途径的酶系统^[4]具有本质差异, 前者主要由醌酶, 即 L-山梨糖脱氢酶(SDH)及 L-山梨酮脱氢酶(SNDH)完

基金项目: 国家自然科学基金(NSFC31370125); 沈阳市科技局项目(F13-201-9-00)

* 通信作者。E-mail: zhangyxzsh@163.com

作者简介: 李野(1983–), 男, 辽宁沈阳人, 东北制药集团 VC 工艺研究室产品工程师, 硕士研究生, 从事维生素 C 二步发酵研究。E-mail: leeye.830611@163.com

收稿日期: 2013-12-19; **修回日期:** 2014-03-17

成^[5-6]。

中国学者已完成 *K. vulgare* WB0104 (序列尚未公布)^[7]、*K. vulgare* Y25 (同为 DSM4025^[8])^[9]、*K. vulgare* WSH-001^[10] 及其伴生菌 *B. megaterium* WSH-002^[11] 的全基因组测序, 亦对 WSH-001 成功构建了代谢组网络^[12]。并通过对发酵体系蛋白质组、代谢组分析, 发现在发酵过程中伴随限制性氧胁迫 (ROS), 通过添加谷胱甘肽可以显著地增强菌体的代谢生长^[13-14]。但依然有很多问题尚待解决, 如从 *K. vulgare* 分离到的多种产 2-KGA 的酶, 哪些起主要作用, 为何 *K. vulgare* SDH 基因可以在宿主葡萄糖杆菌^[15]、大肠杆菌^[16]、乙酸钙不动杆菌^[17] 等中表达却不能使宿主产 2-KGA。本综述拟从已报道的相关功能蛋白及对 *K. vulgare* 基因组进行注释和分析, 对产 2-KGA 代谢过程中的酶系组成、代谢途径、底物脱氢后的电子传递及对其自身的生理意义进行概述。

1 *K. vulgare* 产 2-KGA 的代谢反应及其酶系统组成

前人的研究工作表明, *K. vulgare* 以 D-山梨醇、L-山梨糖、L-山梨酮 (L-sorbose) 为底物转化生成 2-KGA, 也可直接产生维生素 C^[18], 且 2-KGA 亦可降解为 L-艾杜糖酸 (L-idonate)^[19-20]。这些代谢可归纳为 7 种酶催化的 5 种反应: ①D-山梨醇氧化为 L-山梨糖; ②L-山梨糖氧化为 L-山梨酮; ③L-山梨酮 (吡喃型, L-sorbose 2, 6-lactone) 氧化为 2-KGA; ④L-山梨酮 (呋喃型, L-sorbose 1, 4-lactone) 氧化为维生素 C; ⑤2-KGA 还原为 L-艾杜糖酸; 见表 1。其中, L-山梨糖/L-山梨酮脱氢酶 (SSDH)^[5] (表 1, 类别 3), 具有逐级氧化 D-山梨醇→L-山梨糖→L-山梨酮→2-KGA 的功能; 在 *K. vulgare* Y25^[24]、S₂^[25]、WB0104^[26-27] 中分别发现水溶性 SDH (表 1, 类别 4); 在 *K. vulgare* DSM4025 中发现可将 L-山梨酮既氧化为 2-KGA 又氧化为维生素 C 的 L-山梨酮脱氢酶 (SNDHs)^[6], 该发现亦被 Fu^[28]、Zou^[12] 等证实。本文作者发现 KVV_0095 编码蛋白序列与贾茜等^[29] 2003 年在 *K. vulgare* WB0104 报告的一种由 429aa 构成的 SNDH 序列相同 (表 1, 类别 5)。

贾茜等研究发现, 当重组 L-山梨酮脱氢酶 (rSNDH) 与重组 L-山梨糖脱氢酶 (rSDH) 体外共同

氧化 L-山梨糖 (L-山梨酮) 至 2-KGA 时存在明显的协同效应, 转化效率较单独氧化时提高 2-4 倍^[27]。另外 Gao 等证实, 在 *K. vulgare* WSH-001 中存在的 5 种 SDH 与 2 种 SNDH 中, SDH (KVV_2142) 对 L-山梨糖具有其它 SDH 3-10 倍的反应活性; SNDH (KVV_0095) 相对于质粒中存在的 SNDH (KVV_PB0115) 具有 2 倍的活性。同时亦证实 SDH 与 SNDH 具有协同作用^[31]。该现象提示, SDH 与 SNDH 均对产 2-KGA 过程具有较大的贡献, 二者的协同可能是菌体产 2-KGA 高效的保证。

Toyama 等的研究发现, Ca²⁺ 作为 PQQ 上的活性位点^[32] 参与电子传递过程, 且 Schmid 等认为 PQQ、Mg²⁺、Ca²⁺ 的存在可以提高醌酶活性, 而 Cu²⁺、Zn²⁺、Fe³⁺、EDTA 等则会显著的抑制醌酶活性^[33], 故推测 *K. vulgare* SCB329^[21] 及 GO112^[22] 中分离的 SDH (表 1, 类别 1) 与 *K. vulgare* WB0104 中 139.053 ± 4.96 kDa 中的蛋白 (表 1, 类别 4) 属同一类功能蛋白 (它们的蛋白亚基分子量均为 60 kDa)。同理推测, 表 1 类别 6 中的醛脱氢酶 (ALDH) 亦属于醌酶。而 *K. vulgare* 2980 中由 4 个 46 kDa 同源亚基组成的 190 kDa SDH^[23] (表 1, 类别 2) 则不属于醌酶而属于胞内以 NAD (P) 为辅酶的氧化还原酶, 由于 NAD (P) H 可作为供氢体推动内还原反应, 所以推测该酶亦可以将 L-山梨酮还原为 L-山梨糖。另外蒋宇扬等^[19] 亦从 *K. vulgare* 2980 体内发现的 2-KGA 还原酶 (2-KGR), 可将 2-KGA 还原为 L-艾杜糖酸 (见表 1, 类别 7)。赵巍^[20] 利用转座子 Tn5 构建了 2-KGR 失活的突变株, 将 2-KGA 转化率提高 3%, 同样说明上述反应的存在。

本文作者对 *K. vulgare* Y25 全基因组分析, 发现 4 个编码 SDH 基因 (KEGG: EIO_2658, EIO_0653, EIO_2636, EIO_3072) 及 2 个 SNDH 基因 (KGEE: EIO_0536, EIO_3305); 对 *K. vulgare* WSH-001 的全基因组分析则发现 5 个编码 SDH 基因 (KEGG: KVV_0203, KVV_1366, KVV_PA0245, KVV_2159, KVV_2142,) 及 2 个 SNDH 基因 (KEGG: KVV_0095, KVV_PB0115)。其中 SDH 基因以多拷贝形式存在暗示了其对于产 2-KGA 的重要作用^[9]。

Zou 在对 WSH-001 代谢网络构建过程中发现葡萄糖酸 2-脱氢酶 (gluconate 2-dehydrogenase) (KEGG: KVV_PB0008) 具有 2-KGR 功能, 可使 2-

表 1. *K. vulgare* 体内与产 2-KGA 相关的酶类
Table 1 . The enzymes involved in the metabolism of 2-KGA in *K. vulgare*

No.	reaction /Location	name	prosthetic group	inhibitor /activator	strain No.	Mol. wt. /subunit	gene	Ref.
1	②, ③possibly/ periplasm	SDH	PQQ possibly	Cu ²⁺ , EDTA et al./Mg ²⁺ , Ca ²⁺ et al.	SCB329	60kDa	unknown	[21]
				Mn ²⁺ , Fe ²⁺ , Cu ²⁺ , ED-TA, citric acid/Ca ²⁺	GO112	116kDa/2 homologous subunits of 60kDa	unknown	[22]
2	② reversible/cyto-plasm	SDH	NAD (P) pos-sibly	Co ²⁺ /Fe ³⁺	2980	190kDa/4 homologous subunits of 46kDa	unknown	[23]
3	①②③/periplasm	SSDH	PQQ	Cu ²⁺ , Mn ²⁺ Fe ³⁺ , Zn ²⁺ , Fe ²⁺ , Co ²⁺ , Ni ²⁺ , EDTA et al. as inhibitors	DSM4025	135kDa/62. 5kDa and 64. 5kDa subunits	unknown	[5] [18] [6]
					Y25	66. 4kDa	[24]	[24]
4	②③/periplasm	SDH	PQQ	unknown	S2	66kDa	unknown	[25]
					WB0104	139. 053 ± 4. 96kDa/ 2 homologous subunits of 60. 499kDa	SEQ_5-8 possibly	[26] [27]
5	③④/periplasm	SNDHs	PQQ, heme C	iodoacetate, Cu ²⁺ /PQQ, Ca ²⁺	DSM4025	SNDH ₁ : 2-3 homologous subunits of 75kDa SNDH ₂ : 75kDa and 55kDa subunits SNDH ₃ : 55kDa	GI 73760068 coding 75kDa subunit, 55kDa subunit is con-verted by 75kDa subunit	[6] [28] [25]
					WB0104	45. 474kDa	the same as KVU_0095	[29]
					DSM4025	91 ± 5kDa / 2 homologous subunits of 44 ± 2kDa	unknown	[30] [6]
7	⑤ reversible /cytoplasm	KGR	NADP	Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Ni ²⁺ , EDTA, Ni ²⁺ et al. /Ca ²⁺ , PQQ et al. some rare earth elements as inhibitors	2980	90kDa / 32kDa and 53kDa subunits	[20]	[20] [19]

KGA 还原为艾杜糖酸(⑤);同时推测菌体中亦可能表达三种内酯酶(Lactonase)基因(KEGG: KVV_1414, KVV_2383, KVV_PB0206),可使 2-KGA 转化为维生素 C^[12];另外张惟材等对 Y25 注释过程中认为该菌体内亦存在一种醌酶 D-山梨醇氧化酶(SLDH)(EIO_1909),可将 D-山梨醇氧化为 L-山梨糖(①)。

2 产 2-KGA 关键酶的脱氢过程与氧化磷酸化过程的关系

2.1 产 2-KGA 关键酶参与的代谢反应在细胞中的定位

醌酶氧化还原体系主要存在于变形菌门(Proteobacteria)的醋杆菌属(Acetobacter sp.)、葡萄糖杆菌属(Gluconobacter sp.)、假单胞菌属(Pseudomonas sp.)和甲基营养菌(Methylotrophs)等菌体中^[32]。根据辅酶的种类可将醌酶分为 I、II 和

III 型。I 型辅酶为 1 分子 PQQ(如甲基营养菌的甲醇脱氢酶, MDH);II 型辅酶为 1 分子 PQQ 和 1 分子血红素 C(heme C),与醌酶本身或其中亚基构成醌-血红素蛋白(quinohemoproteins);III 型醌酶只发现于葡萄糖杆菌属或醋杆菌属中^[33],组成复杂,以乙醇脱氢酶(ADH)为例,由 3 个亚基组成,分别为三血红素细胞色素 C 亚基(triheme cytochrome c subunit),醌-血红素蛋白及一个不带辅酶的亚基^[32]。III 型醌酶为膜蛋白锚定于细胞膜外表面。I 型和 II 型醌酶为可溶性蛋白,目前只发现存在于周质空间中而非胞内^[32]。K. vulgare 属于变形菌门,其体内的 SDH, SSDH, ALDH 以 PQQ 为辅酶;SNDHs 以 PQQ 及 heme C 为辅酶,故它们分别属于 I 型与 II 型醌酶,并且已知 K. vulgare GO112 中发现的 SDH 是从周质空间中分离^[22],所以本文作者认为 K. vulgare 中分离的醌酶均存在于周质空间中。综合上述分析,K. vulgare 产 2-KGA 的关键酶功能及其细胞分布如图 1 所示。

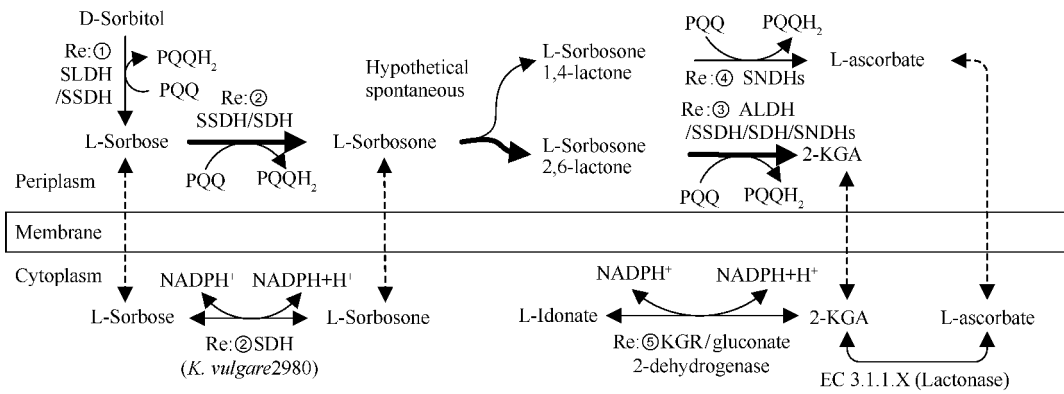


图 1. K. vulgare 体内产 2-KGA 代谢反应在细胞中的分布

Figure 1. The cellular distribution of 2-KGA metabolic reaction in K. vulgare. Re means reactions in Table 1 bold lines mean the main reactions (functions), the thin lines mean other reactions, the gray lines and gray words mean reactions (functions) presumed from genome annotation information, dash arrows mean the membrane process.

2.2 产 2-KGA 关键酶脱氢后的电子传递过程

K. vulgare 中 SDH, SSDH, ALDH 与甲基营养细菌中 MDH 类似,同属于 I 型醌酶,该型醌酶通常与 PQQ 非共价结合,在底物脱氢过程中将 PQQ 还原为 PQQH₂, PQQH₂ 进一步将电子交予游离于周质空间中的可溶性细胞色素 C^[32]。甲基营养细菌中 MDH 电子传递通路如下:甲醇→MDH→PQQ→cyt. C_L→cyt. C_H→cyt. C 终端氧化酶,其生理学上的电子受体是 cyt. C_L^[34]。程红等认为 K. vulgare Y25 中

SDH 将 L-山梨糖脱氢后将电子传递至可溶性 cyt. C_L,但 cyt. C_L 不能直接将电子传递至 cyt. C 终端氧化酶^[35]。

考察脱氮副球菌(P. denitrificans) I 型醌酶甲醇脱氢酶(MDH)在周质空间中的电子传递过程可知,MDH 在脱氢后将电子传递至水溶性的 cyt. C₅₅₁, cyt. C₅₅₁将进一步将电子传递至膜上 cyt. bb 复合体或水溶性细胞色素 C(如 cyt. C₅₅₀或 cyt. C_{553i})并进一步传递至 cyt. aa3 终端氧化酶^[36]。本文作

者在对 *K. vulgare* Y25 基因组分析后发现, *K. vulgare* 膜上存在完整的呼吸链基因,呼吸链中与氮副球菌内 *cyt. bb* 复合体对应的蛋白为 *cyt. bc1* 复合体 (EC:1. 10. 22), 并发现 Y25 中存在 *cyt C₅₅₁* 基因 (KEGG: EIO_2635), 故 *K. vulgare* 中 *cyt. C₅₅₁* 可能将电子进一步交与膜上细胞色素 *bc1* 复合体 (*cyt. bc1 complex*) 或另一种水溶性 *cyt. C*, 进而将电子传递至细胞色素终端氧化酶。

K. vulgare 体内 SNDHs 中存在 PQQ 与 heme C 共同构成醌-血红素蛋白^[6], 该酶属 II 型醌酶与假单胞菌属中 II 型 ADH 结构相似。II 型 ADH 将乙醇脱氢后 PQQ 将电子交予 heme C, heme C 进一步将电

子交与蓝铜蛋白 (blue copper protein) 与天青蛋白 (azurin), 进而传递至膜上细胞色素终端氧化酶 (membrane-bound cytochrome C oxidase)^[32]。而 *K. vulgare* 中尚未发现天青蛋白或蓝铜蛋白这样的电子受体, 故 Miyazaki 等认为 *K. vulgare* 中 SNDHs 在脱氢后直接将电子传递至细胞色素终端氧化酶^[6]。

综合上述的分析, 再结合 KEGG 对 *K. vulgare* 膜上氧化磷酸化代谢网络的构建, 可将 *K. vulgare* 醌酶 SDH (SSDH, ALDH), SNDHs 在周质空间中脱氢过程与呼吸链相偶联的代谢过程分析总结如图 2 所示。

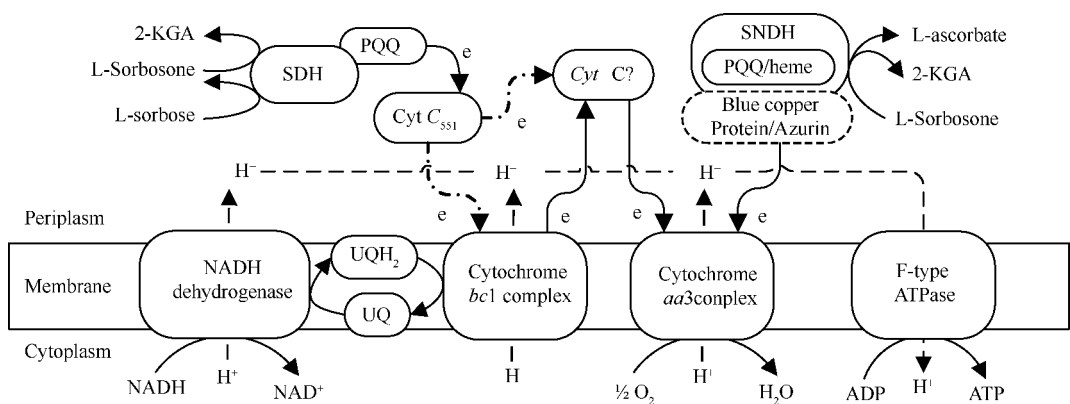


图 2. *K. vulgare* 产 2-KGA 醌酶脱氢电子传递过程与呼吸链相偶联

Figure 2. The process of quinoenzymes catalysis and subsequent respiratory chain to produce 2-KGA in *K. vulgare*. Bold arrows mean the electron transfer pathway, the dash arrows mean possible electron transfer pathway, gray dashes and gray words mean electron transfer components.

2.3 产 2-KGA 过程伴随 ATP 产生

虽然目前尚未有研究报道 *K. vulgare* 体内 II 型醌酶 SNDH 在脱氢时 heme C 上的还原电位, 但已知假单胞菌在 Type II ADH 将乙醇脱氢氧化为乙醛的过程中 heme C 还原电位为 +188mV (pH8.0), 电子传递至 azurin 时为 +280 mV (pH8.0)^[32, 37], 进一步传递至细胞色素氧化酶后与 O₂ 结合则将变为 +820 mV^[38]。已知呼吸链上电子传递过程中电子还原电位高于 +158.3mV 便可偶联 ATP 产生^[38], 所以当电子从 +280 mV 升至 +820mV 过程中具有足够的电势推动细胞色素氧化酶外排质子进而产生 ATP。同理由于 I 型醌酶脱氢最终亦将电子交与细胞色素氧化酶, 故认为也将伴随 ATP 生成。已知在氧化葡萄糖杆菌 IF03293 体内, L-山梨酮还原为 L-山梨糖伴随 NADPH 的消耗, L-山梨酮氧化为 2-KGA 伴随 NADPH 的生成^[2], 所以 L-山梨糖→L-山梨酮→

2-KGA 这一逐级氧化过程本身是释放能量的过程, 既为存在产能的先决条件, 故推测: SDH, SSDHs, ALDH 与 SNDH 脱氢释放电子在逐级传递的过程中, 无论是将电子交与细胞色素 *bc1* 复合体还是细胞色素氧化酶均可以伴随质子的外排从而推动 ATP 合成酶产生 ATP。

3 产 2-KGA 代谢对 *K. vulgare* 的生理意义

K. vulgare DSM4025 体内的 SSDHs 具有广泛的底物谱, 包括 L-山梨糖、乙醇、正丙醇、异丙醇、丙醛、甘油醛、正丁醇、2-丁醇、正戊醇、己醇、D-果糖、D-甘露醇、D-葡萄糖、庚醇^[5]。醌酶的这种特性帮助 *K. vulgare* 在自然环境中, 利用周围丰富的物质快速产生能量为自身生长代谢所需。故 *K. vulgare*

利用底物 L-山梨糖产 2-KGA 的过程其本质上是对菌体糖代谢产 NADH 供能的一种补充。虽然醌酶电子传递的受体均在呼吸链下游,产生的能量较 NADH 经 NADH 脱氢酶脱氢产生的能量为少,但是这些反应均发生在周质空间,使得菌体可以快速的利用环境中的底物产生 ATP,从而实现快速供能,满足自身生长需要和种族繁衍的需求。

4 展望

随着组学研究手段的日益成熟,使得人们对 *K. vulgare* 产 2-KGA 的代谢过程有了深刻认知。国内外的学者已经对 *K. vulgare* 做了较深刻的理论研究。由此,利用代谢工程手段,通过增强醌酶-呼吸链电子传递效率,达到增强醌酶底物脱氢电子传递速率,可提高产 2-KGA 速率;另一方面,通过优化 *K. vulgare* 呼吸链电子传递途径,减少自由电子外溢,降低菌体 ROS 产生,可提高代谢水平。如果对 *K. vulgare* 生理代谢及完整呼吸链的功能基因簇可实现体外重构,可进一步考虑利用合成生物学手段,构建合适的底盘生物系统,实现 2-KGA 的单菌发酵,并最终实现维生素 C 二步发酵工艺的突破。

参考文献

- [1] Zhou J, Yi H, Wang L, Zhang W, Yuan YJ. Metabolomic analysis of the positive effects on *Ketogulonigenium vulgare* growth and 2-keto-L-gulonic acid production by reduced glutathione. *Omics : A Journal of Integrative Biology*, 2012, 16 (7-8) : 387-396.
- [2] Hoshino T, Sugisawa T, Tazoe M, Shinjoh M, Fujiwara A. Microbial production of 2-keto-L-gulonic acid from L-sorbose and D-sorbitol by *Gluconobacter melanogenus*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1990, 54 (5) : 1211-1218.
- [3] Urbance J, Bratina B, Stoddard S, Schmidt T. Taxonomic characterization of *Ketogulonigenium vulgare* gen. nov., sp. nov. and *Ketogulonigenium robustum* sp. nov., which oxidize L-sorbose to 2-keto-L-gulonic acid. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, 51 (3) : 1059-1070.
- [4] Makover S, Ramsey G, Vane F, Witt C, Wright R. New mechanisms for the biosynthesis and metabolism of 2-keto-L-gulonic acid in bacteria. *Biotechnology and Bioengineering*, 1975, 17 (10) : 1485-1514.
- [5] Asakura A, Hoshino T. Isolation and characterization of a new quinoprotein dehydrogenase, L-sorbose/L-sorbose dehydrogenase. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1999, 63 (1) : 46-53.
- [6] Miyazaki T, Sugisawa T, Hoshino T. Pyrroloquinoline quinone-dependent dehydrogenases from *Ketogulonigenium vulgare* catalyze the direct conversion of L-sorbose to L-ascorbic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72 (2) : 1487-1495.
- [7] Yang F, Jia Q, Xiong ZH, Zhang XB, Wu HT, Zhao Y, Yang J, Zhu JP, Dong J, Xue Y, Sue LL, Shen Y, Jin Q. Complete genome analysis of *Ketogulonigenium* sp. WB0104. *Chinese Science Bulletin*, 2006, 51 (8) : 941-945. (in Chinese)
杨帆, 贾茜, 熊朝晖, 张笑冰, 吴洪涛, 赵颖, 杨剑, 朱俊萍, 董杰, 薛颖, 孙立连, 沈岩, 金奇. 酮古龙酸菌 WB0104 的全基因组分析. *科学通报*, 2006, 51 (8) : 923-927.
- [8] 傅术琳. 普通生酮基古龙酸菌产酸相关基因及表达研究, 西北农林科技大学, 博士学位论文, 2007.
- [9] Xiong XH, Han S, Wang JH, Jiang ZH, Chen W, Jia N, Wei HL, Cheng H, Yang YX, Zhu B, You S, He JY, Hou W, Chen MX, Yu CJ, Jiao YH, Zhang WC. Complete genome sequence of the bacterium *Ketogulonigenium vulgare* Y25. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193 (1) : 315-316.
- [10] Liu L, Li Y, Zhang J, Zhou Z, Liu J, Li X, Zhou J, Du G, Wang L, Chen J. Complete genome sequence of the industrial strain *Ketogulonigenium vulgare* WSH-001. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193 (21) : 6108-6109.
- [11] Liu L, Li Y, Zhang J, Zou W, Zhou Z, Liu J, Li X, Wang L, Chen J. Complete genome sequence of the industrial strain *Bacillus megaterium* WSH-002. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193 (22) : 6389-6390.
- [12] Zou W, Liu L, Zhang J, Yang H, Zhou M, Hua Q, Chen J. Reconstruction and analysis of a genome-scale metabolic model of the vitamin C producing industrial strain *Ketogulonigenium vulgare* WSH-001. *Journal of Biotechnology*, 2012, 161 (1) : 42-48.
- [13] Ma Q, Zhang W, Zhang L, Qiao B, Pan C, Yi H, Wang L, Yuan YJ. Proteomic analysis of *Ketogulonigenium vulgare* under glutathione reveals high demand for thiamin transport and antioxidant protection. *PLoS One*, 2012, 7 (2) : e32156.
- [14] Ma Q, Zhou J, Zhang W, Meng X, Sun J, Yuan YJ. Integrated proteomic and metabolomic analysis of an

- artificial microbial community for two-step production of vitamin C. *PLoS One*, 2011, 6(10): e26108.
- [15] Zhao Y, Zhang WC, Chen HP. Expression of Sorbose Dehydrogenase in *Gluconobacter* with Tn5 Transposon. *Letters in Biotechnology*, 2007, 18(5): 727-730. (in Chinese)
- 赵岩, 张惟材, 陈惠鹏. 利用转座系统在葡萄糖杆菌中表达山梨糖脱氢酶. 生物技术通讯, 2007, 18(5): 727-730.
- [16] Gao SY, Zhang WC, Wang JH, Guo AG. Integration and expression of *sdh* in *Escherichia coli*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2005, 45(1): 139-141. (in Chinese)
- 高书颖, 张惟材, 汪建华, 郭嵩光. 山梨糖脱氢酶基因在大肠杆菌染色体上整合及表达. 微生物学报, 2005, 45(1): 139-141.
- [17] Xiong XH, Chen W, Wang JH, You S, Zhang WC. Expression of Sorbose Dehydrogenase in *Acinetobacter calcoaceticus*. *Letters in Biotechnology*, 2010, 21(6): 783-786. (in Chinese)
- 熊向华, 陈伟, 汪建华, 游松, 张惟材. 山梨糖脱氢酶在乙酸钙不动杆菌中的表达. 生物技术通讯, 2010, 21(6): 783-786.
- [18] Sugisawa T, Miyazaki T, Hoshino T. Microbial production of L-ascorbic acid from D-sorbitol, L-sorbose, L-gulose, and L-sorbose by *Ketogulonicigenium vulgare* DSM 4025. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2005, 69(3): 659-662.
- [19] Jiang YY, Guo ZY, Jin SY, Lin JS, Zhang CG. Study on 2-keto-L-gulonate Reductase in Vitamin C Fermentation. *Chinese Journal of Biotechnology*, 1998, 18(3): 106-108. (in Chinese)
- 蒋宇扬, 郭振勇, 靳素英, 蔺继尚, 张成刚. 维生素 C 发酵中 2-酮-L-古龙酸还原酶的研究. 生物工程学报, 1998, 18(3): 106-108.
- [20] 赵巍. VC2980 基因操作系统及筛选模型的建立和 *kgf* 基因克隆. 中国科学院沈阳应用生态研究所, 博士学位论文, 1997.
- [21] Xue ZY, Yin GL. Study on the purification of L-sorbose dehydrogenase and its physical chemical and enzyme properties. *Microbiology China*, 2000, 27(2): 89-92. (in Chinese)
- 薛震役, 尹光琳. L-山梨糖脱氢酶的纯化及性质的研究. 微生物学通报, 2000, 27(2): 89-92.
- [22] Zhang W, Yan B, Wang J, Yao J, Yu Z. Purification and characterization of membrane-bound L-sorbose dehydrogenase from *Gluconobacter oxydans* G0112. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 38(5): 643-648.
- [23] 郝林. 维生素 C 二步混菌发酵中 L-山梨糖脱氢酶的研究, 中国科学院沈阳应用生态研究所, 博士学位论文, 2001.
- [24] 张惟材, 焦迎晖, 袁红杰, 谢莉. 一种新的 L-山梨糖脱氢酶基因及其编码的蛋白质. 中国专利: CN 1262656, 2006.
- [25] Xie L, Zhang D, Dou YF, Zhang LP, Zhao BH. Purification of L-sorbose/L-sorbose Dehydrogenase from *Ketogulonicigenium vulgare* and Construction and Selection of Genomic Library. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2007, 23(5): 891-895. (in Chinese)
- 谢莉, 张铎, 窦燕峰, 张丽萍, 赵宝华. 醇醛脱氢酶的分离纯化及其基因文库的构建和筛选. 生物工程学报, 2007, 23(5): 891-895.
- [26] Hao AY, Jia Q, Wu HT, Zhou HR, Geng WF, Gao WL, Zhao JQ, He JG. Isolation and characteristics research of L-sorbose dehydrogenase in *Ketogulonigenium* sp. WB0104. *Industrial Microbiology*, 2008, 38(1): 10-14. (in Chinese)
- 郝爱鱼, 贾茜, 吴洪涛, 周华芮, 耿文飞, 高文利, 赵军强, 贺建功. 酮古龙酸菌 WB0104 中 L-山梨糖脱氢酶的分离和性质研究. 工业微生物, 2008, 38(1): 10-14.
- [27] 贾茜, 吴洪涛, 郝爱鱼, 金奇, 修建新, 卫灿东, 刘爱兵, 耿文飞, 祝仕清, 杨丽霞, 孙君伟, 杨帆, 米造吉. 一种 L-山梨糖脱氢酶及其编码基因与应用. 中国专利: CN 101085987B. 2010.
- [28] Fu S, Zhang W, Guo A, Wang J. Identification of promoters of two dehydrogenase genes in *Ketogulonicigenium vulgare* DSM 4025 and their strength comparison in *K. vulgare* and *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 75(5): 1127-1132.
- [29] 贾茜, 金奇, 吴洪涛, 杨帆, 孙君伟, 张笑冰, 郝爱鱼, 耿文飞, 徐平, 修建新, 赵颖, 谢萍, 米造吉. 一种 L-山梨糖脱氢酶及其编码基因与应用. 中国专利: CN 100395332. 2008.
- [30] Hoshino T, Sugisawa T. Aldehyde dehydrogenase enzyme. United States Patent: US 5776742. 1998.
- [31] Gao L, Du G, Zhou J, Chen J, Liu J. Characterization of a group of pyrroloquinoline quinone-dependent dehydrogenases that are involved in the conversion of L-sorbose to 2-Keto-L-gulonate in *Ketogulonicigenium vulgare* WSH-001. *Biotechnology Progress*, 2013, 29

- (6) : 1398-1404.
- [32] Toyama H, Mathews FS, Adachi O, Matsushita K. Quinohemoprotein alcohol dehydrogenases: structure, function, and physiology. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2004, 428 (1) : 10-21.
- [33] Schmid RD, Urlacher V. *Modern Biooxidation*. Wiley.com, 2007.
- [34] Kim HG, Phan TN, Jang TS, Koh M, Kim SW. Characterization of *Methylophaga* sp. strain SK1 Cytochrome C_L Expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Microbiological*, 2005, 43 (6) : 499-502.
- [35] Cheng H, Xiong XH, Zhao Y, Wang JH, Zhang YX, Zhang WC. Expression, Maturation and Activity Analysis of Cytochrome c of *Ketogulonigenium vulgare*. *Letters in Biotechnology*, 2011, 22 (4) : 488-492. (in Chinese)
- 程红, 熊向华, 赵岩, 汪建华, 张怡轩, 张惟材. 酮古龙酸菌细胞色素 c 的表达, 成熟及活性分析. *生物技术通讯*, 2011, 22 (4) : 488-492.
- [36] Baker SC, Ferguson SJ, Ludwig B, Page MD, Richter O-MH, van Spanning RJ. Molecular Genetics of the Genus *Paracoccus*: Metabolically Versatile Bacteria with Bioenergetic Flexibility. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, 62 (4) : 1046-1078.
- [37] Adachi O, Kubota T, Hacisalihoglu A, Toyama H, Shinagawa E, Duine JA, Matsushita K. Characterization of quinohemoprotein amine dehydrogenase from *Pseudomonas putida*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1998, 62 (3) : 469-478.
- [38] 王镜岩. 生物化学. 第三版. 北京: 高等教育出版社, 2003.

2-KGA metabolism coupling respiratory chain in *Ketogulonigenium vulgare* – A review

Ye Li^{1,2}, Xue Li¹, Yixuan Zhang^{1*}

¹School of Life and Biopharmaceutics, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, Liaoning Province, China

²Northeast Pharmaceutical Group Co., Ltd., Shenyang 110026, Liaoning Province, China

Abstract: 2-keto-L-gulonate (2-KGA) is the key intermediate of vitamin C, which can be biosynthesized by *Ketogulonigenium vulgare*. There are five reactions related to 2-KGA metabolism, including: (1) Oxidation of D-sorbitol to L-sorbose; (2) Oxidation of L-sorbose to L-sorbose; (3) Oxidation of L-sorbose (Pyranose form) to 2-KGA; (4) Oxidation of L-sorbose (Furanose form) to vitamin C, and (5) Reduction of 2-KGA to L-idonate. L-sorbose/L-sorbose dehydrogenase (SSDH) is responsible for the reaction of 1 through 3, L-sorbose dehydrogenase (SDH) is responsible for the reaction of 2 and 3, L-sorbose dehydrogenase (SNDH) is responsible for the reaction of 3 and 4, aldehyde dehydrogenase (ALDH) is responsible for the reaction of 3, 2-KGA reductase (2-KGR) is responsible for the reaction of 5. Enzymes of SDH, SSDH and ALDH belong to Quinoprotein Type I that uses PQQ as the only prosthetic group. SNDH belongs to Quinoprotein Type II that is quinohemoprotein assembling *heme c* and PQQ. They are all soluble in the periplasm and coupled with the respiratory chain. The substrate respiration to generate ATP directly on the outside cellular membrane means this strain can use the substrate quickly in the natural environment for the necessary bioenergy required.

Keywords: *Ketogulonigenium vulgare*, 2-keto-L-gulonate, quinoprotein, respiratory chain, electron transfer

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (NSFC31370125) and by the Science and Technology Innovation Program of Shenyang Technology Bureau, Liaoning Province (F13-201-9-00)

* Corresponding author. E-mail: zhangyxzh@163.com

Received: 19 December 2013/Revised: 17 March 2014