

工业生物技术

山梨酮脱氢酶模块与酮古龙酸杆菌底盘细胞的适配分析

陈思^{1,2}, 贾楠^{1,2}, 丁明珠^{1,2}, 元英进^{1,2}

1 天津大学 化工学院 系统生物工程教育部重点实验室, 天津 300072

2 天津化学化工协同创新中心, 天津 300072

陈思, 贾楠, 丁明珠, 等. 山梨酮脱氢酶模块与酮古龙酸杆菌底盘细胞的适配分析. 生物工程学报, 2016, 32(9): 1224–1232.

Chen S, Jia N, Ding MZ, et al. Fitness analysis between the L-sorbose dehydrogenase modules and *Ketogulonigenium vulgare* chassis. Chin J Biotech, 2016, 32(9): 1224–1232.

摘要: 酮古龙酸杆菌 *Ketogulonigenium vulgare* 是维生素 C 二步混菌发酵过程中的产酸菌。山梨酮脱氢酶 (L-sorbose dehydrogenase, 缩写为 SNDH) 作为维生素 C 直接前体 2-酮基-L-古龙酸 (2-KGA) 合成的关键酶, 其作用机制并不十分清楚。借助全基因组测序抽提 2 个山梨酮脱氢酶基因, 分别位于基因组 (缩写为 *sndhg*) 和质粒 (缩写为 *sndhp*) 上。通过工程化改造技术在工业产酸菌中构建山梨酮脱氢酶功能模块, 比较其对 2-KGA 产量的影响。研究发现 *sndhg* 过表达对菌株产酸影响不明显, *sndhp* 过表达使菌株明显产生副产物。将 *sndhg* 和 *sndhp* 分别配合辅因子 PQQ 合成基因 *pqqA*, 分别构建 *sndhg-pqqA* 和 *sndhp-pqqA* 模块, 得到的工程菌株产酸情况与之前的结果大致相同。将 4 株 *K. vulgare* 工程菌株分别与内生芽孢杆菌 *Bacillus endophyticus* 混合培养传代 50 d 后, 分离菌株进行混菌发酵, 其 2-KGA 的转化率分别提高了 15.4%、179%、0.65% 和 125%。表明混菌适应性进化策略是一种增加功能模块与底盘细胞适配性, 进而快速获得优良性状菌种的有效方法。

关键词: 酮古龙酸杆菌, 山梨酮脱氢酶, 适配性, 适应性进化, 混菌体系

Received: December 10, 2015; **Accepted:** January 15, 2016

Supported by: National Basic Research and Development Program of China (973 Program) (No. 2014CB745100), National Natural Science Foundation of China (No. 21390203), the Ph.D Programs Foundation of Ministry of Education of China (No. 20120032120013).

Corresponding author: Mingzhu Ding. Tel: +86-22-60973987; E-mail: mzding@tju.edu.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2014CB745100), 国家自然科学基金 (No. 21390203), 教育部博士点基金新教师类课题 (No. 20120032120013) 资助。

Fitness analysis between the L-sorbose dehydrogenase modules and *Ketogulonigenium vulgare* chassis

Si Chen^{1,2}, Nan Jia^{1,2}, Mingzhu Ding^{1,2}, and Yingjin Yuan^{1,2}

¹ Key Laboratory of Systems Bio-engineering (Ministry of Education), School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China

² Collaborative Innovation Center of Chemical Science and Engineering (Tianjin), Tianjin 300072, China

Abstract: *Ketogulonigenium vulgare* is an acid-producing strain in the process of two-step vitamin C fermentation. L-sorbose dehydrogenase (SNDH) is one of the key enzymes during the biosynthesis of 2-keto-L-gulonic acid (2-KGA), the precursor of vitamin C. However, the catalytic mechanism of SNDH is unclear. According to the whole genome sequencing of *K. vulgare*, two genes encoding sorbose dehydrogenases, one derived from the chromosome (named as *sndhg*) and one from plasmid (named as *sndhp*), were introduced into an industrial strain *K. vulgare*. The overexpression of gene *sndhg* had hardly effect on 2-KGA production, and the overexpression of gene *sndhp* produced an obvious byproduct in the fermentation broth. Combinational expression of *sndhg/sndhp* with *pqqA* (obtaining *sndhg-pqqA* and *sndhp-pqqA* modules) in *K. vulgare* resulted in the similar fermentation phenotype to two previous strains. After serial sub-cultivation of co-cultured *Bacillus endophyticus* with each engineered *K. vulgare* for 50 d, the conversion rate of 2-KGA increased by 15.4%, 179%, 0.65% and 125% compared with that of the parental *K. vulgare* with *B. endophyticus*. This study shows that adaptive evolution of microbial consortium is an effective strategy to increase the fitness between functional modules and chassis, thus quickly getting better strains for production of 2-KGA.

Keywords: *Ketogulonigenium vulgare*, L-sorbose dehydrogenase, fitness, adaptive evolution, mixed culture system

维生素 C 是维生素类药中发展最快、产量最大、用途最广的品种^[1]。我国 VC 二步发酵法由中国科学院微生物研究所和北京制药厂于 20 世纪 70 年代初发明。第一步由氧化葡萄糖酸杆菌 *Gluconobacter oxydans* 将 D-山梨醇氧化为 L-山梨糖。第二步由酮古龙酸杆菌 *Ketogulonigenium vulgare* 及伴生菌混合培养将 L-山梨糖转化为 VC 的前体 2-酮基-L-古龙酸 (2-KGA)^[2]。*K. vulgare* 作为功能菌完成 L-山梨糖到 2-KGA 的转化, 单独生长时十分缓慢且产酸量很低^[3], 伴生菌负责辅助产酸菌的生长及产酸。其中, 山梨糖/山梨酮脱氢酶能将 L-山梨糖转化为 L-山梨酮, 进而转化为维生素 C 的前体 2-KGA。PQQ 作为醌酶类辅因子, 参与氧化还原反应, 调节微生物呼吸链电子传递^[4], 同时 PQQ 还作为 L-山梨糖/山

梨酮脱氢酶的辅因子发挥重要作用。

K. vulgare 作为非模式微生物, 其遗传背景尚不清晰, 基因操作的相关研究有限, 糖酸转化的代谢路径不清晰且相关酶系的蛋白结构和催化反应机理不明确, 限制了对菌株的工程改造。Cai 等^[5]利用来源于乳酸菌 *Lactococcus lactis* 的叶酸合成基因簇, 弥补了 *K. vulgare* 体内叶酸代谢路径的缺乏, 提高了细胞密度和产酸能力。杜瑾等通过在 *K. vulgare* 体内组合表达山梨糖/山梨酮脱氢酶和辅因子 PQQ 合成路径的模块^[6], 使混菌发酵的产酸水平提高了 20%。但由于基因组信息的缺乏, 对关键酶的研究较为局限, 该研究中只选用了 1 个山梨糖脱氢酶基因和 1 个山梨酮脱氢酶基因。江南大学陈坚课题组通过在氧化葡萄糖酸杆菌内过表达山梨糖脱氢酶和山梨酮脱氢

酶,在该菌中实现了由山梨糖到 2-KGA 的转化过程^[7],发酵 168 h 获得 2-KGA 32.4 g/L。此外,本实验室曾借助系统生物学方法对混菌体系进行代谢组学与蛋白组学偶联的解析^[8-9],深入挖掘了两菌间相互作用机制。同时,利用混菌培养传代 150 d 的方式加强混菌的相互作用^[10],糖酸转化率提高 16%,并借助代谢组^[11]与蛋白组^[12]成功挖掘了两菌相互强化的分子机制。

本研究中,针对前人较少研究的山梨酮脱氢酶(L-sorbose dehydrogenase,缩写为 SNDH)进行序列比对分析,发现 2 个山梨酮脱氢酶基因,分别位于基因组(缩写为 *sndhg*)和质粒(缩写为 *sndhp*)上。*sndhg* 和 *sndhp* 序列差异很大,同源性只有 30.39%。通过在工业应用的产酸菌 *K. vulgare* HKv604 中构建两种山梨酮脱氢酶功能模块,比较其对 2-KGA 产量的影响,同时,结合混菌长期传代加强两菌相互作用的适应性进化策略,让改造后的 *K. vulgare* 工程菌株与伴生菌互为进化压力,研究适应性进化实验对 2-KGA 产量及模块作用的影响。旨在解析两种模块在 *K. vulgare* 中的作用机制的同时,增加山梨酮脱氢酶模块与底盘细胞 *K. vulgare* 之间的适配,寻找强化 *K. vulgare* 产酸路径及削弱缺陷路径的方案。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

本文所使用的维生素 C 二步发酵菌株为工业应用菌种酮古龙酸杆菌 *K. vulgare* HKv604 与伴生菌内生芽孢杆菌 *Bacillus endophyticus*^[13]。构建 *K. vulgare* 工程菌株所用的质粒为广宿主低拷贝的 pBBR1MCS2^[14],由军事科学院微生物研究所张惟材教授惠赠。脱氧核糖核苷酸(dATP、

dTTP、dGTP 和 dCTP)和 *Taq* DNA 聚合酶购自北京天根生物技术有限公司。限制性内切酶和连接反应试剂为 TaKaRa 公司产品,质粒小量抽提试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、基因组提取试剂盒和 PCR 产物纯化试剂盒为北京天根生物技术有限公司产品。其他化学试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 工程菌株构建

本实验室先前对菌株 *K. vulgare* Hbe602 进行了全基因组测序,包含染色体和两个质粒,结果递交于 NCBI 库中(CP012908、CP012909、CP012910)。*K. vulgare* 编码 2 个山梨酮脱氢酶 L-sorbose dehydrogenase,分别位于染色体 DNA(简称 *sndhg*)和质粒 2(简称 *sndhp*)上,GI 号分别为 939480045 和 939479492,Blast 结果显示两个基因间的同源性只有 30.39%。根据基因序列设计引物(表 1),扩增菌株 *K. vulgare* 基因组上两个山梨酮脱氢酶基因及 PQQ 合成基因 *pqqA*,构建组合模块(图 1)。通过电转化法将含有目的基因的质粒导入 *K. vulgare* HKv604

表 1 引物序列

Table 1 Sequence of primes

Prime names	Sequence (5'-3')	Restriction sites
SNDHGF	CGGggtaccGCCACCA GCATCCAGCAA	<i>Kpn</i> I
SNDHGR	CCCaagettATAGGCAG AGGCGTCAAAAC	<i>Hind</i> III
SNDHPF	CGGggtaccCTGATCCA GTAAGCCACCA	<i>Kpn</i> I
SNDHPR	CCCaagettGCCGCATT AACCGTGATAG	<i>Hind</i> III
pqqAF	GGactagtGCGGAGGA AACCGATCCATT	<i>Spe</i> I
pqqAR	ACgagctcTCAGCTATC CGCGCGTGCAT	<i>Sac</i> I

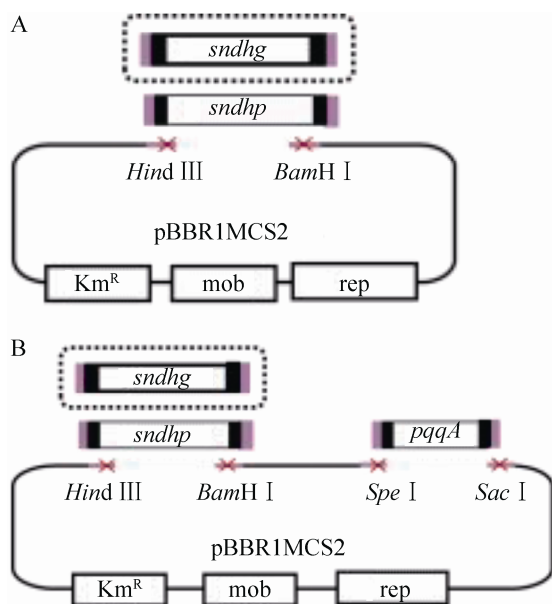


图 1 工业 *K. vulgare* 中 L-山梨酮脱氢酶模块 (A) 及其与辅因子合成基因 *pqqA* 组合的功能模块 (B) 的构建

Fig. 1 Construction of the functional modules including (A) genes encoding L-sorbose dehydrogenase (*sndhg*, *sndhp*) and (B) genes encoding L-sorbose dehydrogenase with PQQ (*sndhg-pqqA*, *sndhp-pqqA*) in *K. vulgare*.

中, 在含卡那霉素的抗性平板筛选阳性转化子提质粒进行酶切验证。获得了过表达 *sndhg*、*sndhp*、*sndhg-pqqA* 和 *sndhp-pqqA* 的 4 株 *K. vulgare* 工程菌株, 分别命名为 SyBE_Kv0001116021、SyBE_Kv0001116022、SyBE_Kv00011160210 和 SyBE_Kv00011160220。

1.2.2 培养基配制

种子培养基 (1 L 培养基): 玉米浆 3 g, 牛肉膏 3 g, 酵母膏 3 g, 尿素 1 g, 蛋白胨 10 g, KH_2PO_4 1 g, $MgSO_4$ 0.2 g, $CaCO_3$ 1 g, 定容至 0.8 L。配制固体培养基还需添加琼脂 20 g。调节 pH 6.8, 121 °C 灭菌 20 min。另称取 20 g/L-山梨糖定容至 0.2 L 单独灭菌, 接菌前添加至种子培养

基中。

发酵培养基 (1 L 培养基): 玉米浆 15 g, 尿素 12 g, KH_2PO_4 1 g, $MgSO_4$ 0.5 g, $CaCO_3$ 2 g, 定容至 0.8 L, 调节 pH 6.8–7.0, 121 °C 灭菌 20 min。另称取 80 g 山梨糖定容至 0.2 L 单独灭菌, 接菌前添加至发酵培养基中。

1.2.3 酮古龙酸杆菌单菌发酵

将活化的菌株用无菌水从平板上吹洗下来, 加入 50 mL 新鲜培养基 (含 50 μ g/mL 卡那霉素) 内, 在 30 °C、250 r/min 摇床中培养 48 h, 转接培养 24 h, 获得种子液。测定种子液的细胞浓度, 计算初始接菌浓度为 $OD_{600}=0.3$ 所需的种子液体积, 加入新鲜培养基中发酵。

1.2.4 底物与产物的检测

本研究中底物与产物的测定选用高效液相色谱法 (HPLC)。取菌液 1 mL, 12 000 r/min 离心 5 min, 将上清转移至离心管中, 用 0.5 mol/L 硫酸溶液稀释适当的倍数, 水系滤膜过滤后, 通过 HPLC 进行检测。色谱柱选用 Bio-Rad HPX-87H, 流动相为 0.5 mol/L H_2SO_4 , 流动相流速为 0.6 mL/min, 柱温设定为 65 °C, 示差检测器检测样品。

1.2.5 混菌传代驯化与发酵

改造后的 *K. vulgare* 和 *B. endophyticus* 通过平板活化和种子液培养获得活性较好的菌种。按初始 OD_{600} 比为 3 : 1 进行种子液混合, 接入有 50 mL 新鲜种子培养液的 250 mL 摇瓶中进行混菌培养, 30 °C、250 r/min 摇床振荡培养 24 h。取 2 mL 混菌培养液转接到 50 mL 新鲜种子培养基中在相同的条件下进行培养, 连续传代 50 d 取转接后剩余的混菌培养液 1 mL, 12 000 r/min 离心 5 min, 将上清移至离心管中用于 2-KGA 的 HPLC 测定, 菌体经 1 mL 0.5 mol/L HCl 处理用于混菌 OD_{600} 的测定。对第 50 天的混菌分纯, 将 50 代 *K. vulgare*

与伴生菌 *B. endophyticus* 配合混菌发酵,测定产酸量和 OD_{600} 值。

2 结果与讨论

2.1 山梨酮脱氢酶功能模块对 *K. vulgare* 的影响

利用传统的分析手段和基因工程手段,研究者们解析了 *K. vulgare* 中将山梨糖转化为古龙酸的反应途径及相关酶学特性^[15-16],认为山梨酮脱氢酶对参与山梨糖转化为 2-KGA 的过程中起到重要作用。本文的研究工作通过对比两个山梨酮脱氢酶模块的效果,进一步认识其功能。将工程菌 SyBE_Kv0001116021 和 SyBE_Kv0001116022 进行单菌发酵,底物 L-山梨糖的浓度为 20 g/L。底物消耗和产物 2-KGA 浓度随时间的变化如图 2 所示。在 48 h 发酵过程中菌株的耗糖速率基本相同,细胞的生长速率也没有太大差别。发酵到 36 h 后,不再消耗 L-山梨糖,2-KGA 的产量也趋于稳定。过表达山梨酮脱氢酶基因的菌株产酸量都低于对照菌株,过表达 *sndhp* 的菌株生产 2-KGA 的能力最弱。通过上述数据可知,过表达 *sndhp* 并不影响细胞对底物山梨糖的吸收利用和转化,但是山梨糖流向副产物途径的通量较大,导致 2-KGA 产量明显降低。图 3 是 24 h 测得改造菌株单菌发酵菌液的 HPLC 结果,底物 L-山梨糖的出峰时间为 9.50 min,产物峰为 7.87 min。观察可知过表达 *sndhg* 对 L-山梨糖代谢路径没有太大影响。过表达 *sndhp* 的菌株发酵液在 7.40 min 出现了副产物峰,耗糖量并没有降低。本文采用的高效液相色谱 87H 柱子上离得近的物质一般结构比较接近,从图 3 可以肯定该副产物与目标产物 2-KGA 的性质较为接近,这与本研究确定的山梨酮脱氢酶的特异性较差的结论较为

一致,而之前的文献报道有提到一种副产物 L-艾杜糖酸^[17],本研究得到的也有可能是类似物质。结果表明 *sndhp* 过表达编码的蛋白酶能很好地利用底物 L-山梨糖,但底物有相当一部分被转化为副产物,进一步说明 *sndhp* 编码的山梨酮脱氢酶对 L-山梨糖转化 2-KGA 反应专一性较差。

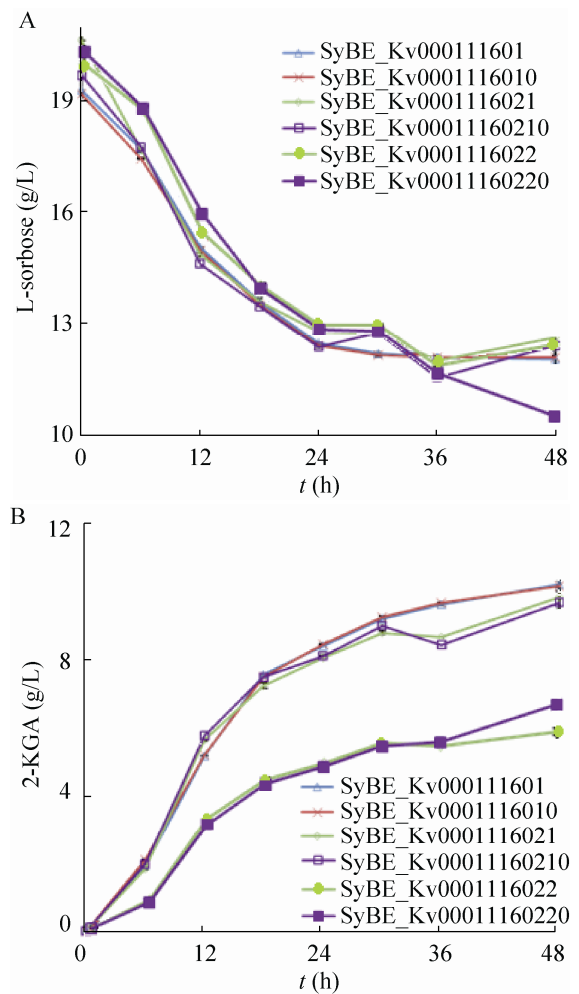


图2 山梨酮脱氢酶模块对 *K. vulgare* 耗糖 (A) 与产酸 (B) 的影响

Fig. 2 Influence of *sndhg* (SyBE_Kv0001116021), *sndhp* (SyBE_Kv0001116022), *sndhg-pqqA* (SyBE_Kv00011160210), *sndhp-pqqA* (SyBE_Kv00011160220) modules on (A) sorbose consumption and (B) 2-KGA production of *K. vulgare*.

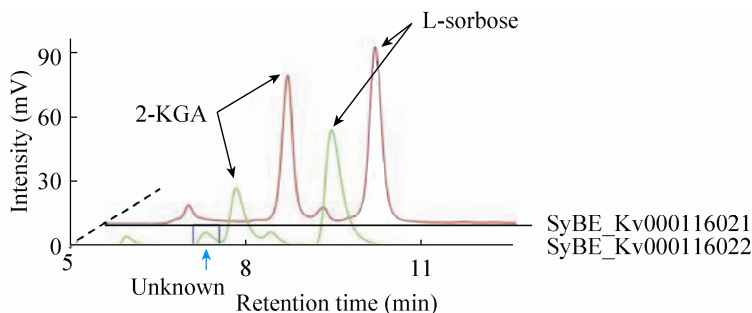


图3 改造 *K. vulgare* 发酵产物的 HPLC 检测

Fig. 3 HPLC analysis of the engineered strains.

2.2 山梨酮脱氢酶与辅因子 PQQ 组合对 *K. vulgare* 及混菌发酵的影响

醌酶与其辅因子 PQQ 的合成是两个相对独立的过程。大肠杆菌中不含合成 PQQ 的基因, 但有编码 PQQ 依赖型葡萄糖脱氢酶的基因^[18]。耐辐射球菌 *Deinococcus radiodurans* 中具有合成 PQQ 相关基因而不含醌酶合成基因^[19]。而 *K. vulgare* 中同时具有醌酶和 PQQ 合成基因, 考虑到山梨酮脱氢酶属于醌酶家族, 在参与氧化还原反应的过程中需要配合辅因子 PQQ 进行物质的氧化, 单独过表达山梨酮脱氢酶可能会导致细胞体内辅因子不平衡, 从而使氧化还原反应受阻。在大肠杆菌、酿酒酵母等模式生物中, 针对 NADH、NADPH 等辅因子的代谢调控已取得显著效果^[20-21]。为此, 本研究进行了功能模块与辅因子配合表达。

过表达 *sndhg* 的菌株 SyBE_Kv000116021, 发酵 48 h 消耗底物 0.402 g, 2-KGA 的产量为 9.83 g/L; 过表达模块 *sndhg-pqqA* 的菌株 SyBE_Kv0001160210 消耗底物 0.365 g, 2-KGA 的产量为 9.68 g/L。可能是辅因子配合带来的积极影响与辅因子过表达对细胞生长造成的负担相互抵消, 导致总体无影响。混菌发酵 120 h, 原始菌株 SyBE_Kv00011601 与伴生菌混菌发酵的产酸量

为 70.5 g/L, 含空载体的菌株 SyBE_Kv000116010 与伴生菌混菌发酵的产酸量为 69.1 g/L, 过表达基因 *sndhg* 菌株混菌发酵的产酸量为 66.3 g/L, 过表达 *sndhg-pqqA* 的菌株混菌发酵的产酸量为 67.6 g/L (图 4)。改造菌株的混菌发酵产酸量较对照菌株低, 可能由于代谢负担造成。

sndhp 配合辅因子合成基因 *pqqA* 获得的菌株 SyBE_Kv0001160220 的耗糖速率有了较大提高。过表达 *sndhp* 的菌株 SyBE_Kv000116022 发酵 48 h

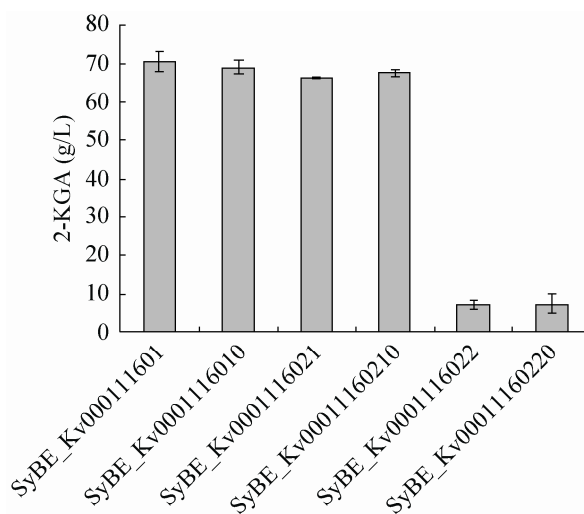


图4 山梨酮脱氢酶模块及其与辅酶合成模块组合对混菌发酵生产 2-KGA 的影响

Fig. 4 Effects of *sndh* modules on the 2-KGA production and L-sorbose consumption in the consortium.

后消耗底物 0.367 g, 2-KGA 产量为 5.75 g/L; 过表达 *sndhp-pqqA* 的菌株 SyBE_Kv00011160220 底物消耗为 0.477 g, 2-KGA 的产量为 6.55 g/L, 提升了 13.9%。说明辅因子的加入对 *sndhp* 编码的山梨酮脱氢酶参与的氧化还原反应有积极作用。混菌发酵结果, 原始菌株混菌发酵的产酸量为 70.5 g/L, 含有空载体的菌株混菌发酵的产酸量为 69.1 g/L, 过表达 *sndhp* 菌株混菌发酵的产酸量为 7.41 g/L, 过表达 *sndhp-pqqA* 的菌株混菌发酵的产酸量为 7.42 g/L。辅因子合成功能模块对 *sndhp* 编码的山梨酮脱氢酶催化反应无明显作用。

2.3 混菌配合适应性进化对混菌发酵的影响

适应性进化与理性设计改造策略不同, 能在大量不同基因出现突变, 有效提高功能模块与底盘细胞间的适配性^[22]。运用合成生物技术构建工程菌株生产生物燃料、生物化学品等工作中, 结合适应性进化能显著提高菌株适应性、底物利用效率和生产率^[23-24]。为此, 将改造后的 *K. vulgare* 与伴生菌配合进行适应性进化实验, 图 5 为进化 50 d 过程中 4 个工程菌混菌体系 2-KGA 的变化情况。图中曲线的断点是因为在传代过程中发生了染菌情况, 通过对其中的两菌进行了分离纯化后重新混合传代所致。曲线均存在一定的波动, 但总体上趋于稳定。适应性进化的机制是生物体随外界环境条件的改变而改变了自身的特性或生活方式, 适应于新环境的基因型会留下更多的子代, 从而不断进化。以前研究表明, 二步混菌生产维生素 C 的发酵体系中, *K. vulgare* 与其伴生菌内生芽孢杆菌既存在着代谢物质上的交流, 营养物质和生存空间上的竞争^[9]。伴生菌在生长和产芽孢过程中释放促进产酸菌生长和产酸^[25], *K. vulgare* 能够降解培养基中的蛋

白为伴生菌提供大量氨基酸, 通过促进伴生菌快速生长并进入衰亡期产生芽孢^[26]。借助产酸菌与伴生菌的相互作用, 通过传代的方式, 互为环境压力, 使得两菌配合更为默契, 从而得到更优化的发酵体系。分离菌株进行混菌发酵, 经过传代进化实验菌株 SyBE_Kv0001116021 的 2-KGA 的产量提高了 15.4%, 菌株 SyBE_Kv0001116022 的 2-KGA 产量提升 179%。菌株 SyBE_Kv00011160210 在进化前后 2-KGA 的产量并未发生明显改变, 菌株 SyBE_Kv00011160220 进化后 2-KGA 产量提高了 125% (图 6)。由上述结果可看出适应性

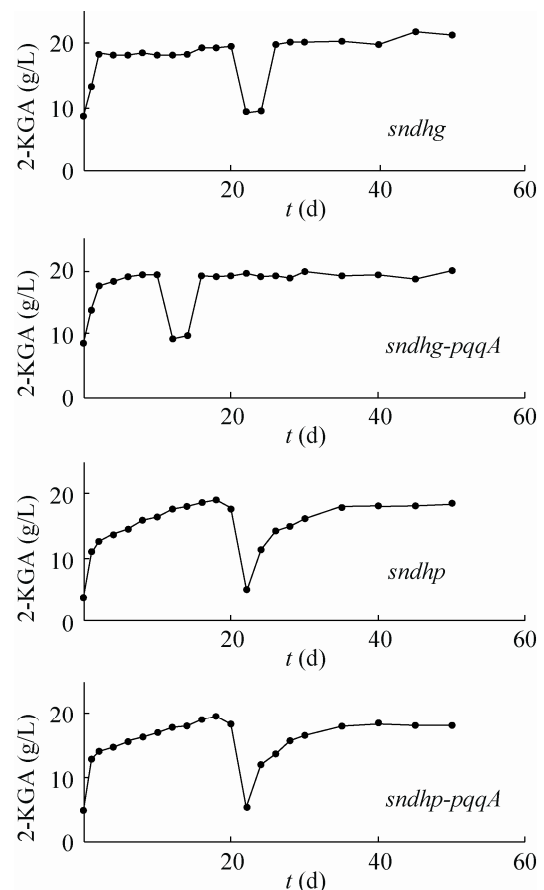


图 5 混菌传代 50 d 过程中 2-KGA 产量

Fig. 5 The 2-KGA production of mixed culture in the process of sub-cultivation for 50 d.

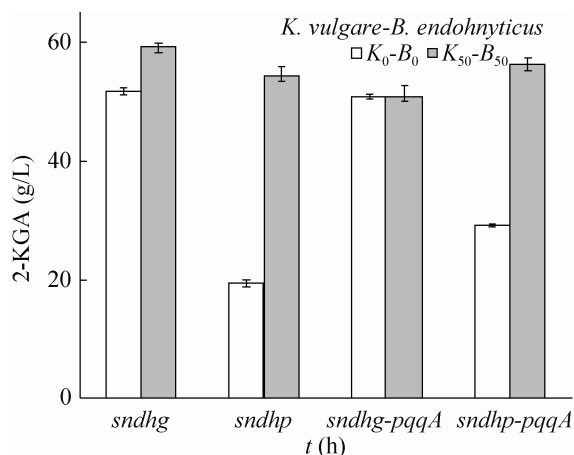


图6 传代菌株混菌发酵产酸图

Fig. 6 2-KGA production of the sub-cultivated *K. vulgare* and *B. endophyticus* consortium.

进化对菌株的作用效果明显,能很好地削弱副产物路径的作用,提高混菌产酸效率。

3 结论

本文在工业 *K. vulgare* 中构建 L-山梨酮脱氢酶基因 *sndhg*、*sndhp* 及其与辅因子组合的 *sndhg-pqqA* 和 *sndhp-pqqA* 模块,期望通过产酸功能模块与辅因子合成模块的适配性研究,比较其作用差异。研究发现,*K. vulgare* 单独发酵时,配合辅因子模块组合 *sndhg-pqqA* 与功能模块单独表达 *sndhg* 对比无明显区别,而混菌发酵时 *sndhg-pqqA* 过表达使得产酸量获得了少量的提升。*sndhp-pqqA* 工程菌单独发酵时产酸量较 *sndhp* 提升 13.9%,然而混菌发酵无明显效果。结合适应性进化策略,将上述改造的 *K. vulgare* 工程菌株与伴生菌 *B. endophyticus* 混合传代培养,两菌间互为动态进化压力。混菌系统在 50 d 传代完成后,2-KGA 的转化率得到了一定的提升,2-KGA 的产量分别提高 15.4%、179%、0.65% 和 125%。从另一角度说明该混菌体系中两菌的

共同进化作用,使该模块产生副产物的作用削弱。由此可见,混菌适应性进化策略是一种增加功能模块与底盘细胞适配性,进而快速获得优良性状菌种的有效方法。

REFERENCES

- [1] Chauhan AS, Ramteke RS, Eipeson WE. Properties of ascorbic acid and its applications in food processing: a critical appraisal. *J Food Sci Technol*, 1998, 35(5): 381–392.
- [2] Yin GL, He JM, Ren SX, et al. Production of vitamin C precursor-2-keto-L-gulonic acid from L-sorbose by a novel bacterial component system of SCB329-SCB933. *Ind Microbiol*, 1997, 27: 1–7.
- [3] Ma Q, Zhang WW, Zhang L, et al. Proteomic analysis of *Ketogulonigenium vulgare* under glutathione reveals high demand for thiamin transport and antioxidant protection. *PLoS ONE*, 2012, 7(2): e32156.
- [4] Wang X, Zhang WC. Advances in biosynthesis of pyrroloquinoline quinone. *Lett Biotechnol*, 2007, 18(3): 534–538.
王歆, 张惟材. 吡咯喹啉醌生物合成研究进展. *生物技术通讯*, 2007, 18(3): 534–538.
- [5] Cai L, Yuan MQ, Li ZJ, et al. Genetic engineering of *Ketogulonigenium vulgare* for enhanced production of 2-keto-L-gulonic acid. *J Biotechnol*, 2012, 157(2): 320–325.
- [6] Du J, Bai W, Song H, et al. Combinational expression of sorbose/sorbosone dehydrogenases and cofactor pyrroloquinoline quinone increases 2-keto-L-gulonic acid production in *Ketogulonigenium vulgare*-*Bacillus cereus* consortium. *Metab Eng*, 2013, 19: 50–56.
- [7] Gao LL, Hu YD, 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. *Metab Eng*, 2014, 24: 30–37.
- [8] Ma Q, Zhou J, Zhang W, et al. Integrated proteomic and metabolomic analysis of an artificial microbial community for two-step production of vitamin C.

- PLoS ONE, 2011, 6(10): e26108.
- [9] Du J, Zhou J, Xue J, et al. Metabolomic profiling elucidates community dynamics of the *Ketogulonicigenium vulgare*-*Bacillus megaterium* consortium. *Metabolomics*, 2012, 8(5): 960–973.
- [10] Zou Y, Hu ML, Lv YJ, et al. Enhancement of 2-keto-gulonic acid yield by serial subcultivation of co-cultures of *Bacillus cereus* and *Ketogulonigenium vulgare*. *Bioresource Technol*, 2013, 132: 370–373.
- [11] Ding MZ, Zou Y, Song H, et al. Metabolomic analysis of cooperative adaptation between co-cultured *Bacillus cereus* and *Ketogulonicigenium vulgare*. *PLoS ONE*, 2014, 9(4): e94889.
- [12] Ma Q, Zou Y, Lv YJ et al. Comparative proteomic analysis of experimental evolution of the *Bacillus cereus*-*Ketogulonicigenium vulgare* co-culture. *PLoS ONE*, 2014, 9(3): e91789.
- [13] Jia N, Du J, Ding MZ, et al. Genome sequence of *Bacillus endophyticus* and analysis of its companion mechanism in the *Ketogulonigenium vulgare*-*Bacillus* strain consortium. *PLoS ONE*, 2015, 10(8): e0135104.
- [14] Kovach ME, Phillips RW, Elzer PH, et al. pBRR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Biotechniques*, 1994, 16(5): 800.
- [15] Asakura A, Hoshino T. Isolation and characterization of a new quinoprotein dehydrogenase, L-sorbose/L-sorbosone dehydrogenase. *Biosci Biotech Biochem*, 1999, 63(1): 46–53.
- [16] Miyazaki T, Sugisawa T, Hoshino T. Pyrroloquinoline quinone-dependent dehydrogenases from *Ketogulonicigenium vulgare* catalyze the direct conversion of L-sorbosone to L-ascorbic acid. *Appl Environ Microb*, 2006, 72(2): 1487–1495.
- [17] Zou W, Liu LM, Zhang J, et al. Reconstruction and analysis of a genome-scale metabolic model of the vitamin C producing industrial strain *Ketogulonicigenium vulgare* WSH-001. *J Biotechnol*, 2012, 161(1): 42–48.
- [18] Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 1997, 277(5331): 1453–1462.
- [19] Shrivastava M, Rajpurohit YS, Misra HS, et al. Survival of phosphate-solubilizing bacteria against DNA damaging agents. *Can J Microbiol*, 2010, 56(10): 822–830.
- [20] San KY, Bennett GN, Berrios-Rivera SJ, et al. Metabolic engineering through cofactor manipulation and its effects on metabolic flux redistribution in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2002, 4(2): 182–192.
- [21] Heux S, Cachon R, Dequin S. Cofactor engineering in *Saccharomyces cerevisiae*: expression of a H₂O-forming NADH oxidase and impact on redox metabolism. *Metab Eng*, 2006, 8(4): 303–314.
- [22] Portnoy VA, Bezdán D, Zengler K. Adaptive laboratory evolution--harnessing the power of biology for metabolic engineering. *Curr Opin Biotech*, 2011, 22(4): 590–594.
- [23] Hong KK, Nielsen J. Adaptively evolved yeast mutants on galactose show trade-offs in carbon utilization on glucose. *Metab Eng*, 2013, 16: 78–86.
- [24] Peng BY, Shen Y, Li XW, et al. Improvement of xylose fermentation in respiratory-deficient xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng*, 2012, 14(1): 9–18.
- [25] Zhang J, Liu J, Shi ZP, et al. Manipulation of *B. megaterium* growth for efficient 2-KLG production by *K. vulgare*. *Process Biochem*, 2010, 45(4): 602–606.
- [26] Zhou J, Ma Q, Yi H, et al. Metabolome profiling reveals metabolic cooperation between *Bacillus megaterium* and *Ketogulonicigenium vulgare* during induced swarm motility. *Appl Environ Microb*, 2011, 77(19): 7023–7030.

(本文责编 陈宏宇)