

# 组合菌发酵葡萄糖生产 $V_C$ 前体——2-酮基-古龙酸的研究进展

王洪滨 张利平

(河北大学生命科学学院, 保定, 071002)

TQ92 A

**摘要** 利用组合菌从葡萄糖发酵生产 2-酮基-L-古龙酸,进而产生  $V_C$ ,为改变化学合成  $V_C$  及降低成本,提供了一条新途径。组合菌有特殊的生理功能和多种组合方式,其应用较为复杂。随着分子生物学技术的发展, $V_C$  发酵有利用组合菌向单一菌发展的趋势。文中从研究菌种组合、发酵途径、菌种选育、构建基因工程菌等方面对国内外  $V_C$  发酵的研究概况作一综述,并提出进一步研究和探索的方向。

**关键词** 组合菌, 2-酮基-L-古龙酸,  $V_C$

$V_C$ , 又名 L-抗坏血酸,是人体必需的一种维生素和抗氧化剂,在医药和食品工业上有相当大的市场<sup>[1]</sup>,它的生物合成近年来一直受到广泛的重视。目前,  $V_C$  的重要前体 2-酮基-L-古龙酸(2-KLG)的工业化生产主要采用“莱氏法”<sup>[2]</sup>和由我国发明的“二步发酵法”<sup>[3]</sup>。由于“二步发酵法”以微生物发酵代替了化学合成,具有简化工艺,减少污染,降低成本等诸多优点,为多数国内外企业所选用。各国的科学家对其进行了大量的研究,以进一步提高得率,降低成本,完善发酵工艺。

## 1 研究现状

### 1.1 菌种组合

对于  $V_C$  混合菌发酵菌株的组合,国内外进行了大量研究,旨在提高发酵产酸率,并更加适合工业化生产。日本的 Takeda 化学工业公司<sup>[4]</sup>使用葡萄糖酸杆菌(*Gluconobacter oxydans*)与芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属 *Pseudomonas*、变形菌属(*Protens*)、柠檬酸菌属(*Citrobacter*)、欧文氏菌属(*Erwinia*)、埃希氏菌属(*Escherichia*)等中的一种微生物混合均能将 L-山梨糖氧化为 2-

KLG,这样大大提高了混合菌株的选择范围。尹光琳<sup>[3]</sup>等在二步发酵法中发现氧化葡萄糖酸杆菌和条纹假单胞杆菌(*Pseudomonas striata*),两者同时存在时,才能顺利进行由 L-山梨糖转化成 2-KLG 这一生物氧化过程,并在世界首次实现了微生物工业发酵生产  $V_C$ 。仲崇斌<sup>[5]</sup>等发现了掷孢酵母菌(*Sporobolomyces roseus*)作为伴生菌与氧化葡萄糖酸杆菌的组合新菌系,具较强抗酸能力,酸转化力提高,发酵周期缩短,表现出较大的产酸潜力和可修饰性。马成新等<sup>[6]</sup>选育出具有转化山梨糖生产 2-KGA 能力很强的蛭弧菌 J26,这一发酵方式中只蛭弧菌 J26 一种菌,其具有侵入宿主生长周期和不依赖宿主生长周期的 2 种繁殖模式,为  $V_C$  的生产开辟了新领域。

### 1.2 发酵途径

生产  $V_C$  的工业方法主要有“莱氏法”<sup>[2]</sup>

(其工艺路线为: D-葡萄糖  $\xrightarrow{H_2/高压}$  D-山梨醇  
*Gluconobacter melanogenus*  $\xrightarrow{氧化}$  L-山梨糖  $\xrightarrow{化学氧化}$  双丙酮-2-酮基-L-古龙酸  $\xrightarrow{H_2O^+}$  2-酮基-L-古龙酸  $\rightarrow$  L-抗坏血酸)和“二步发酵法”<sup>[3]</sup>

(其工艺路线为: D-葡萄糖  $\xrightarrow{H_2/高压}$  D-山梨醇  
*Gluconobacter melanogenus* 或 *Acetobacter suboxydans*  $\rightarrow$  山

第一作者: 硕士研究生。

收稿时间: 2003-01-20, 改回时间: 2003-05-15

梨糖  $\xrightarrow{\text{Gluconobacter oxydans 和 Bacillus sp.}}$  2-酮基-L-古龙酸  $\rightarrow$  L-抗坏血酸。圆山高康等发明的串联发酵法<sup>[7]</sup>是从葡萄糖起始的二步发酵,第1步中菌株1将葡萄糖氧化成2,5-二酮基-D-葡萄糖酸(2,5-DKG);第2步中菌株2发酵2,5-DKG转化产生2-KLG。虽然此方法还不能实现工业化,但为构建基因工程菌的研究奠定了基础。其工艺路线为: $D\text{-葡萄糖} \xrightarrow{\text{Erwinia sp.}}$  2,5-二酮基-D-葡萄糖酸  $\xrightarrow{\text{Corynebacterium sp 或 Brevibacterium sp.}}$  2-酮基-L-古龙酸  $\rightarrow$  L-抗坏血酸。马成新等<sup>[6]</sup>利用蛭弧菌新种J26对直接转化山梨糖为2-KGA进行了研究,为Vc发酵找到新的方法。美国的Roche维生素公司的Ruckel等<sup>[8]</sup>在生产中发现混菌发酵L-山梨糖的转化率并不高,于是发明了新的发酵途径。先在一个发酵罐中将D-山梨醇转化成L-山梨糖,再在另一个发酵罐中将L-山梨糖转化为2-KLG;第1步使用葡萄糖杆菌或醋酸杆菌,第2步使用氧化葡萄糖杆菌,其中第一步发酵液要进行一次消毒,其工艺路线为: $D\text{-山梨醇} \xrightarrow{\text{Gluconobacter suboxydans 或 Acetobacter aceti sub sp.}}$  L-山梨糖,消毒并转罐,  $L\text{-山梨糖} \xrightarrow{\text{Gluconobacter oxydans}}$  2-KGA  $\rightarrow$  L-抗坏血酸。

### 1.3 菌种选育

提高混菌的菌种活力,改良菌种性状,以提高混菌发酵生产Vc前体——2-KLG的转化率,是人们微生物发酵生产2-KLG的一个主要目的。由于Vc混菌发酵过程中,产酸菌单独生存繁殖能力较弱,故除了常用的物理化学方法外,国内外学者还对其他诱变方法进行了尝试。盛勤等<sup>[9]</sup>采用原生质体融合技术构建融合子,以期达到简化氧化葡萄糖杆菌和软化芽孢杆菌的分离,纯化和配比等工艺以及提高产量的目的。固定化细胞的使用稳定性和储存稳定性比游离细胞有明显的增加,且固定化细胞对pH值有较宽的适应范围。吉爱国等<sup>[10]</sup>通过聚乙烯醇海藻酸钙包埋法将氧化葡萄糖杆菌和棒杆菌的休止细胞共固定化生产2-KLG。韩国的Lee等<sup>[11]</sup>以2-KLG作为唯一碳源筛选到含

有高活性的L-山梨醇脱氢酶的微生物,从而为高产2-KLG菌种的筛选提供了一条新途径。

### 1.4 基因工程菌的构建

目前,Vc基因工程菌的构建,已成为近年来的研究的热门。一方面,葡萄糖串联发酵对“莱氏法”已作了相当大的简化,但仍需要二步生物氧化反应。棒杆菌中的2,5-DKG还原酶可以立体专一的还原2,5-DKG为2KLG。如果将2,5-DKG还原酶的基因转入欧文氏菌中,就可以实现由二步发酵向一步发酵转化。另一方面,Vc生产的“二步发酵法”中,由L-山梨糖脱氢酶(SDH)催化L-山梨糖转化为L-山梨酮,再由L-山梨酮脱氢酶(SNDH)催化生成2-KLG,故研究清楚这2种酶对基因工程菌的构建也十分重要。因此,目前主要研究2,5-DKG还原酶和SDH和SNDH。Yoshimasa<sup>[12]</sup>从氧化葡萄糖杆菌T-100中分离纯化得到L-山梨糖脱氢酶和L-山梨酮脱氢酶,以已知的SDH序列作为引物,T-100的基因组DNA为模板,经PCR扩增得到一个180bp的产物;以其为探针构建T-100的基因组文库。同时以探针克隆DNA序列并将此序列在大肠杆菌中表达,发现大肠杆菌同时具有SDH和SDNH的活性。以T-100中的质粒和质粒pHSG298构建一个穿梭型载体并与克隆的DNA连接形成表达型质粒载体pSDH155,将其导入氧化葡萄糖杆菌T-100的突变株G624,这样获得的2-KLG产量比T-100提高了230%。Lazarus等<sup>[13]</sup>通过对2,5-DKG还原酶进行研究证明用氨基酸修饰可以提高酶的热稳定性和催化效果。Masako<sup>[14]</sup>研究发现L-山梨糖生产菌亚氧化葡萄糖杆菌(Gluconobacter suboxydans) IFO 3291中依赖NADPH的L-山梨糖还原酶(SR)可以同化胞内L-山梨糖,但基因破碎显示此酶并无SR活性且不同化L-山梨糖;这说明SR主要作为胞内的L-山梨糖还原酶而不是氧化酶。Shinjoh等<sup>[15]</sup>研究了克隆醋酸杆菌IFO12258的细胞膜上的L-山梨醇脱氢酶基

因并在氧化葡萄糖酸杆菌 OX4 中表达从而提高了从 L-山梨醇向 2-KGA 转化的速度和产量。这些成果都为基因工程菌的构建和维生素 C 一步发酵打下了基础。

## 2 结 语

根据目前的研究现状,笔者认为对于微生物发酵生产 V<sub>C</sub> 的前体 2-酮基-L-古龙酸中组合菌应加进行以下方面的研究和探索。

### 2.1 对重要酶的研究

目前,对微生物发酵生产 V<sub>C</sub> 中酶的作用的研究越来越受到国内外学者的重视。除了对 2,5-DKG 还原酶和 L-山梨糖脱氢酶进行包括纯化、基因测序、克隆和在 V<sub>C</sub> 发酵菌中表达等方面的研究,还对此过程发酵菌代谢途径中起重要作用的酶,如 L-山梨酮脱氢酶、2-酮基-L-古龙酸还原酶等进行了研究和探讨。这些研究不仅为 V<sub>C</sub> 发酵生产中基因工程菌的构建作了必要的准备,而且也为 V<sub>C</sub> 发酵工艺的完善和产率的提高提供了可寻的途径。今后,一方面,要进一步筛选出 2-KLG 产生菌代谢途径中重要的酶基因;另一方面,也要从育种的角度选育出含有多种酶的菌种,同时,还要在提高酶活等方面进行研究。

### 2.2 组合菌发酵生产 V<sub>C</sub> 机制的研究

在组合菌发酵生产 V<sub>C</sub> 中,产酸菌是可以产生 2-KLG 的,但单独存在产酸能力较小;而伴生菌是不产酸的,但与产酸菌共同发酵明显可以促进产酸。关于这方面作用机制

的研究,国内外的报道还不是很多。国内中科院沈阳生态研究所<sup>[16]</sup>进行了细胞和分子水平的初步研究。随着现代分子生物学技术的不断发展,在深入研究产酸菌和伴生菌遗传性状的基础上,从基因水平去研究和探讨组合菌产酸机理,可望得到满意的结论。

## 参 考 文 献

- 1 Crawford T C et al. Adv Carbohydr Chem Biochem., 1980(39):79~155
- 2 尹光琳. 工业微生物. 1991,23(1):29~30
- 3 尹光琳,陶增鑫,于龙华等. 微生物学报, 1980, 20(3):246~251
- 4 Takeda Chemical Industries Ltd. U. S. Patent. 517660. 1995-08-22
- 5 仲崇斌,于海,吕主奎等. 生物技术, 2001, 11(2):25~27
- 6 马成新,焦鹏,胡江春等. 微生物学杂志. 1998,18(2):1~6
- 7 Sonoyama T et al. Eur Patent. 142169, 1985
- 8 Ruckel Markus. U. S. Patent 352724, July 13, 1999-07-13
- 9 盛勤,冯瑞山,陈建华等. 中国药科大学学报, 1996,27(10):618~620
- 10 Ji A, Gao P. Appl Biochem Biotechnol, 2001, 6(94):213~223
- 11 Lee H W, Pan J G. J Ind Microbiol Biotechnol 1999, 23(2):106~111
- 12 Yoshimasa S, Yoshinori, Hiromi H. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 2: 454~460
- 13 Lazarus et al. U. S. Patent, 5912161. 1999-06-15
- 14 Masako S, Masaaki T, Tetsuo H. Journal of Bacteriology, 2002, 2:861~863
- 15 Shinjoh M, Tomiyama N, Asakura A et al. Appl Environ Microbiol 1995, 2(61):413~420
- 16 吕淑霞,冯树,张忠泽等. 微生物学通报, 2001,28(5):10~14

## Research Progress on Production of V<sub>C</sub> Precursor——2-Keto-L-Gulonic Acid from Glucose by Bacterial Component System

Wang Hongbin Zhang Liping

(College of Life Science, Hebei University, Baoding, 071002)

**ABSTRACT** Bacterial component system is provided as a new process for producing vitamin C precursor - 2-keto-L-gulonic acid from glucose, which can change the way of producing medicine by chemical reaction and reduce costs. Special physiological functions and many combination patterns of bacterial component system have been found but they were very complicated for application. With the development of molecular biology, the trend from bacterial component system to single strain fermentation has been formed. Therefore, bacterial component system has important value or research in theory and potential of development. Research on producing vitamin C by fermentation was discussed, including bacterial combination, fermentation ways, building gene engineering bacteria and fermentation technology and condition. What's more, direction of research and exploration in the future was suggested.

**Key words** bacterial component system, 2-keto-L-gulonic acid, vitamin C