

## • 工具酶的功能表征 •

**陈坚** 中国工程院院士，江南大学生物工程学院教授。1984年毕业于清华大学。1990年获无锡轻工业学院博士学位。现任国务院学位委员会轻工技术与工程学科评议组召集人、教育部科技委农林学部副主任、粮食发酵工艺与技术国家工程实验室主任、*Food Bioscience* 主编、国际食品科学院 (IAFoST) Fellow、《生物工程学报》编委。针对发酵工业中高产量、高转化率、高生产强度三大关键工程技术难题进行系统研究，在本领域权威杂志发表论文146篇，获中国发明专利88项、国际发明专利8项；以第一完成人获国家技术发明二等奖2项、国家科技进步二等奖1项、何梁何利科学技术创新奖、中国专利金奖；国家“973”项目首席科学家、国家杰出青年基金获得者；全国百篇优秀博士学位论文指导教师。



**周景文** 江南大学生物工程学院教授、博士生导师，江南大学未来食品科学中心副主任，《生物工程学报》编委。江南大学发酵工程博士、哈佛大学化学与化学生物系博士后。主要从事发酵工程研究，相关工作实现了多项发酵产品的工业生产。曾先后获得国家技术发明奖二等奖、中国专利金奖等科研奖励，入选国家自然科学基金优秀青年科学基金、教育部青年长江学者。



# 维生素 C 生物合成相关脱氢酶研究进展

陈玥<sup>1</sup>，周景文<sup>1,2</sup>，陈坚<sup>1,2</sup>

1 江南大学 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室，江苏 无锡 214122

2 江南大学 未来食品科学中心，江苏 无锡 214122

陈玥，周景文，陈坚. 维生素 C 生物合成相关脱氢酶研究进展. 生物工程学报, 2021, 37(6): 1827-1844.

Chen Y, Zhou JW, Chen J. Progress in vitamin C biosynthesis related dehydrogenases. Chin J Biotech, 2021, 37(6): 1827-1844.

**摘要:** 维生素 C 是一种人体必需的维生素，在食品制药等领域拥有巨大的市场。工业上维生素 C 主要以微生物发酵生产的 2-酮基-L-古龙酸为前体，然后通过内酯化反应获得。微生物发酵中，山梨糖途径和葡萄糖酸途径因为转化率高一直是研究的热点。文中从维生素 C 生物合成相关脱氢酶的角度阐述了：山梨糖途径和葡萄糖酸途径中关键脱氢酶在定位、底物谱、辅因子和电子传递上的特点；山梨糖途径和葡萄糖酸途径中面临的主要问题和改造策略等。最后讨论了维生素 C 生物合成中山梨糖途径和葡萄糖酸途径可能的研究方向。

**关键词:** 维生素 C，2-酮基-L-古龙酸，脱氢酶，山梨糖，葡萄糖酸，微生物发酵生产

**Received:** July 24, 2020; **Accepted:** October 28, 2020

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 31830068), National Science Fund for Excellent Young Scholars, China (No. 21822806).

**Corresponding authors:** Jian Chen. Tel/Fax: +86-510-85918312; E-mail: jchen@jiangnan.edu.cn

Jingwen Zhou. Tel/Fax: +86-510-85914371; E-mail: zhoujw1982@jiangnan.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31830068)，国家优秀青年科学基金 (No. 21822806) 资助。

# Progress in vitamin C biosynthesis related dehydrogenases

Yue Chen<sup>1</sup>, Jingwen Zhou<sup>1,2</sup>, and Jian Chen<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

<sup>2</sup> Science Center for Future Foods, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

**Abstract:** Vitamin C is an essential vitamin for human beings. It has a huge market in the fields of food and pharmaceuticals. 2-keto-L-gulonic acid is an important precursor to produce vitamin C by microbial fermentation in industrial. In microbial fermentations, the L-sorbose pathway and the D-gluconate pathway have been the focus of research because of high yield. This article aims at stating recent research progress in dehydrogenases related to biosynthesis of vitamin C in the L-sorbose pathway and the D-gluconate pathway. The properties of dehydrogenase in terms of localization, substrate specificity, cofactors, and electron transport carrier are elaborated. And then, the main problems and strategies are reviewed in the L-sorbose pathway and in the D-gluconate pathway. Finally, future research on the dehydrogenases in the biosynthesis of vitamin C through L-sorbose pathway and D-gluconate pathway is discussed.

**Keywords:** vitamin C, 2-keto-L-gulonic acid, dehydrogenase, sorbose, gluconic acid, microbial fermentation

## 1 维生素 C 生物合成途径

维生素 C (Vitamin C, VC) 又称抗坏血酸 (L-ascorbic acid, L-AA), 是人体必需的一种维生素, 广泛应用于食品制药等领域, 全球市场在 10 万 t/年以上<sup>[1]</sup>。维生素 C 是天然产物生物合成的典型案例。目前, 几乎所有的维生素 C 都是通过生物发酵法生产获得。研究较多的维生素 C 的生物合成路线主要有山梨糖途径和葡萄糖酸途径 (图 1)。

### 1.1 山梨糖途径

山梨糖途径以中间产物山梨糖为标志。目前工业上主要使用的“二步发酵法”, 即是采用山梨糖途径。在这一途径中, 氧化葡萄糖酸杆菌 *Gluconobacter oxydans* 中的山梨醇脱氢酶 (Sorbitol dehydrogenase, SLDH) 将 D-山梨醇氧化生成 L-山梨糖, 然后通过巨大芽孢杆菌 *Bacillus megaterium* (俗称大菌) 和普通生酮基古龙酸菌 *Ketogulonicigenium vulgare* (俗称小菌) 的混菌发酵, 利用小菌中的山梨糖脱氢酶 (Sorbitol dehydrogenase, SDH 或 SSDH) 和山梨酮脱氢酶 (Sorbosone dehydrogenase, SNDH) 将 L-山梨糖氧化生成维生素 C 的前体物质 2-酮基-L-古龙酸 (2-keto-L-gulonic acid, 2-KLG)<sup>[2]</sup>。

### 1.2 葡萄糖酸途径

“新二步发酵法”采用的则是葡萄糖酸途径, 该途径以中间产物 2,5-二酮基-D-葡萄糖酸为标志, 先通过草生欧文氏菌 *Erwinia herbicola* 中的葡萄糖脱氢酶 (Glucose dehydrogenase, GDH)、葡萄糖酸脱氢酶 (Gluconic acid dehydrogenase, GADH) 和 2-酮基-D-葡萄糖酸脱氢酶 (2-keto-D-gluconic acid dehydrogenase, 2-GADH) 将 D-葡萄糖顺序氧化生成 D-葡萄糖酸、2-酮基-D-葡萄糖酸 (2-KGA) 和 2,5-二酮基-D-葡萄糖酸 (2,5-DKGA)<sup>[3-4]</sup>, 然后通过谷氨酸棒状杆菌 *Corynebacterium glutamicum* 中的 2,5-二酮基-D-葡萄糖酸还原酶 (2,5-diketo-D-gluconic acid reductase, 2,5-DKGR) 将 2,5-二酮基-D-葡萄糖酸还原生成 2-酮基-L-古龙酸<sup>[5-6]</sup>。

### 1.3 其他途径

维生素 C 的生物合成还有其他一些途径。由于产量和转化率远不及经典的二步发酵法和新二步发酵法, 相关研究较少。

#### 1.3.1 艾杜糖途径

在醋酸菌等细菌中存在 L-艾杜糖途径 (L-idonic acid pathway), D-葡萄糖被氧化成 D-葡萄糖酸, 随后被氧化脱氢形成 5-酮基-D-葡萄糖

酸, 5-酮基-D-葡萄糖酸在细胞内被还原为 L-艾杜糖酸, 然后 L-艾杜糖酸可被进一步氧化生成 2-酮基-L-古龙酸<sup>[7]</sup>。

### 1.3.2 古龙酸途径

与 L-艾杜糖酸途径不同的是, 在 L-古龙酸途径 (L-gulonic acid pathway) 中, 5-酮基-D-葡萄糖酸不是被还原生成 L-艾杜糖酸, 而是被还原生成 L-古龙酸, 进而被氧化生成 2-酮基-L-古龙酸<sup>[7]</sup>。

### 1.3.3 植物中的维生素 C 合成途径

在植物中, 维生素 C 的合成途径从 D-葡萄糖开始, 通过 6-磷酸-葡萄糖等 9 步反应, 直接生成

维生素 C<sup>[1]</sup>。整个途径只有最后两步反应涉及脱氢酶, 分别是 L-半乳糖脱氢酶催化 L-半乳糖生成 L-半乳糖内酯, 然后 L-半乳糖内酯脱氢酶催化 L-半乳糖内酯生成维生素 C。

### 1.3.4 动物中的维生素 C 合成途径

在动物中, 维生素 C 的合成途径从 D-葡萄糖开始, 通过 6-磷酸-葡萄糖等 8 步反应, 直接生成维生素 C<sup>[1]</sup>。动物中维生素 C 合成途径的最后两步反应和植物相同, 不同的是, 在动物中维生素 C 的合成还额外需要一个 UDP-葡萄糖脱氢酶参与反应。

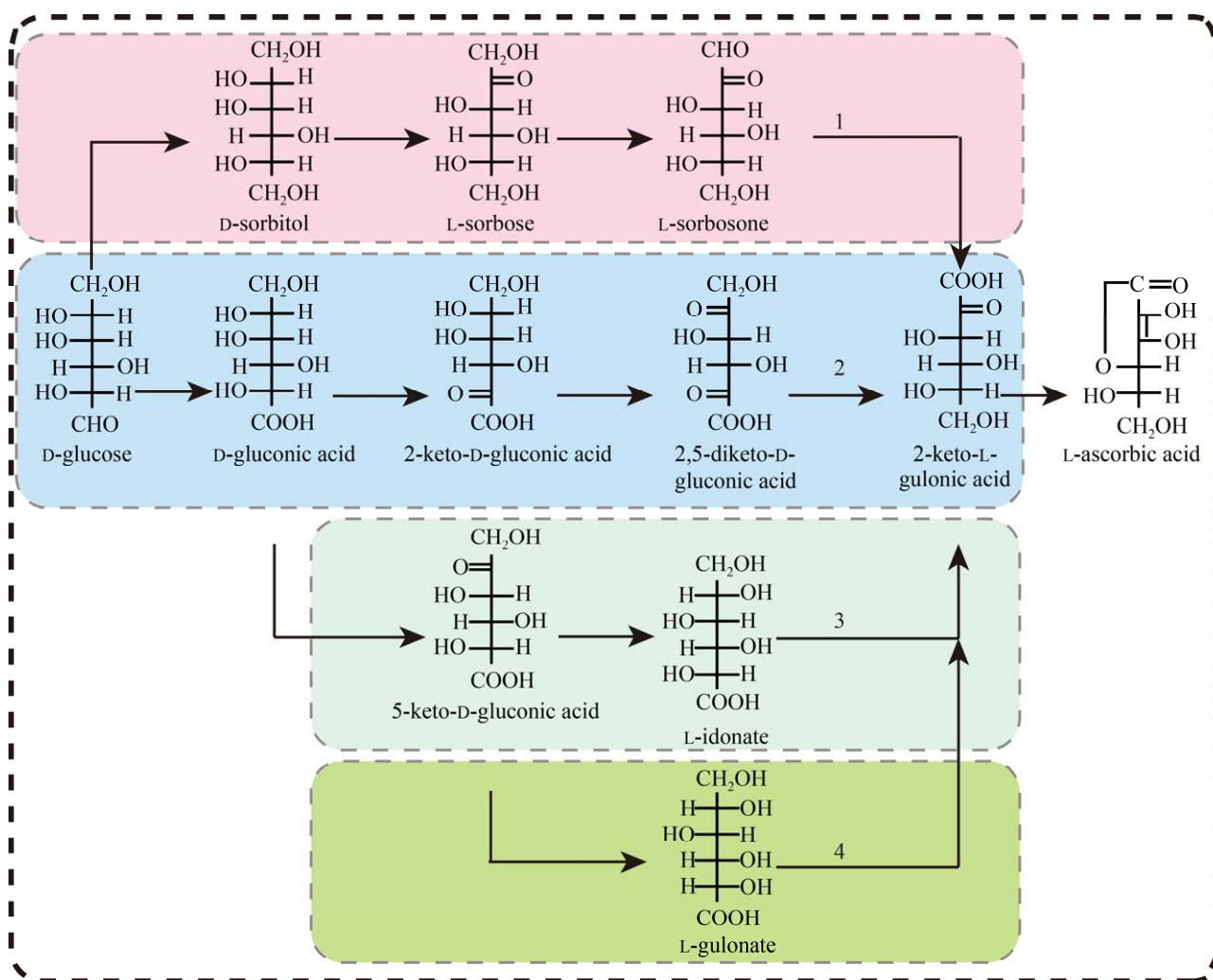


图1 维生素 C 主要的生物合成路线

Fig. 1 The main pathways for the biosynthesis of vitamin C. 1: L-sorbose pathway; 2: D-gluconate pathway; 3: L-idonate pathway; 4: L-gulonate pathway.

## 2 维生素 C 生物合成相关脱氢酶的特点

维生素 C 生物合成的山梨糖途径和葡萄糖酸途径中,共有 7 种关键脱氢酶参与了 2-酮基-L-古龙酸的合成,分别是山梨醇脱氢酶、山梨糖脱氢酶、山梨酮脱氢酶、葡萄糖脱氢酶、葡萄糖酸脱氢酶、2-酮基-D-葡萄糖酸脱氢酶、2,5-二酮基-D-葡萄糖酸还原酶。这些酶的详细信息如表 1 所示。根据这些关键脱氢酶的蛋白序列,通过 SMART 网站对其结构信息进行了分析<sup>[41]</sup>,其结果如图 2 所示。

### 2.1 山梨糖途径

山梨糖途径有 3 个脱氢酶参与,分别是山梨醇脱氢酶、山梨糖脱氢酶和山梨酮脱氢酶。如图 3 所示,山梨糖途径中相关脱氢酶分布大多位于细胞膜上,以 PQQ (Pyrroloquinoline quinone) 为辅因子,具有较高的催化效率。但同时,山梨糖途径中的脱氢酶也普遍具有底物专一性差、电子传递途径复杂等特点。

#### 2.1.1 山梨糖途径的脱氢酶多定位于细胞膜上

氧化葡萄糖酸杆菌中发挥主要作用的山梨醇脱氢酶是位于细胞膜上的 PQQ 依赖的山梨醇脱氢酶 (PQQ-SLDHs)<sup>[8,42]</sup>。该酶由两个亚基组成,最早在 1985 年由 Ameyama 等纯化得到<sup>[10]</sup>,由基因 *sldBA* 编码<sup>[43]</sup>。小亚基 *sldB* 负责山梨醇脱氢酶在膜上的定位,大亚基 *sldA* 包含一个信号肽序列,主要负责 D-山梨醇到 L-山梨糖的催化功能。除此以外,氧化葡萄糖酸杆菌的细胞膜上还存在一种 FAD (Flavin adenine dinucleotide) 依赖的山梨醇脱氢酶 (FAD-SLDHs)<sup>[44]</sup>,FAD-SLDHs 也催化 D-山梨醇生成 L-山梨糖,由 3 个亚基组成:小亚基 *sldS*、大亚基 *sldL* 和一个细胞色素 c 亚基 *sldC*<sup>[45]</sup>。

普通生酮基古龙酸菌 (小菌) 来源的山梨糖脱氢酶是一种膜结合的以 PQQ 为辅因子的山梨糖脱氢酶 (PQQ-SDHs),因为该酶具有山梨糖脱氢酶和山梨酮脱氢酶的双重活性,能够在体外添加 PQQ 和电子受体 PMS 的情况下,直接催化 L-山梨糖生

成 2-酮基-L-古龙酸,而不积累 L-山梨酮<sup>[19,21]</sup>,因此该酶也被称作 PQQ 依赖的山梨糖-山梨酮脱氢酶 (PQQ-SSDHs)。在普通生酮基古龙酸菌 DSM 4025 基因组中,一共有 4 个 *ssdh*,分别为 *ssda1* (GenBank 登录号: AB092515.1)、*ssda2* (GenBank 登录号: AB092516.1)、*ssda3* (GenBank 登录号: AB092517.1) 和 *ssdb* (GenBank 登录号: AB092518.1),均位于细胞膜上<sup>[46-47]</sup>。在普通生酮基古龙酸菌 WSH-001 基因组 (GenBank 登录号: CP002018.1) 中发现有 5 个 *ssdh*,分别是位于基因组上的 KVVU\_2159 (*ssda1*)、KVVU\_2142 (*ssda2*)、KVVU\_0203 (*ssda3*) 和 KVVU\_1366 (*ssdb*),以及位于内源质粒 (GenBank 登录号: CP002020.1) 上的 KVVU\_PA0245 (*ssda1*)<sup>[48-49]</sup>,这 5 个 PQQ-SSDHs 均属于膜结合蛋白。在普通生酮基古龙酸菌 WSH-001 基因组中还存在另外 2 个山梨酮脱氢酶 GSNDH (Glucose/sorbose dehydrogenase) 和 SNDH (Sorbose dehydrogenase),通过序列预测发现这 2 个山梨酮脱氢酶具有疏水跨膜结构,可能是膜结合蛋白<sup>[21,49]</sup>。与普通生酮基古龙酸菌来源的山梨糖脱氢酶不同,在氧化葡萄糖酸杆菌 UV10<sup>[24]</sup>和氧化葡萄糖酸杆菌 T-100<sup>[23]</sup>中,还存在一种膜结合的山梨糖脱氢酶 SDH。此外,还有少量其他来源的膜结合山梨酮脱氢酶 (SNDH) 的报道,如 Shinjoh 等在 1994 年发现液化醋杆菌 *Acetobacter liquefaciens* 中的膜结合的山梨酮脱氢酶 (mSNDH)<sup>[26]</sup>,Yakushi 等在 2020 年发现一种 PQQ 依赖的膜结合山梨酮脱氢酶 (PQQ-mSNDH)<sup>[27]</sup>。

在氧化葡萄糖酸杆菌中,存在 2 种胞内的山梨醇脱氢酶,分别是 NAD (Nicotinamide adenine dinucleotide) 依赖的山梨醇脱氢酶 (NAD-SLDHs)<sup>[50]</sup>和 NADP (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) 依赖的山梨醇脱氢酶 (NADP-SLDHs)<sup>[51]</sup>。其中,NAD-SLDHs 可催化 D-山梨醇生成 D-果糖,NADP-SLDHs 又被称作 L-山梨糖还原酶,在胞内催化 D-山梨醇生成 L-山梨糖。同时,在氧化葡萄糖

表 1 维生素生物合成相关酶的详细信息  
Table 1 The detailed information of related dehydrogenases in the biosynthesis of vitamin C

| Enzymes    | Organism                                      | MW         | Location | Cofactor            | $K_m$<br>(mmol/L) | $K_{cat}$ ( $s^{-1}$ ) | pH        | TM    | Substrate   | Product  | References |
|------------|---|------------|----------|---------------------|-------------------|------------------------|-----------|-------|---|--|------------|
| PQQ-SLDHs  | <i>Gluconobacter suboxydans</i> IFO 3255      | 80         | M        | PQQ                 | 18                | —                      | 6.0       | 30    | D-sorbitol  | L-sorbose  | [8-9]      |
|            | <i>Gluconobacter industrius</i> IFO 3260      | —          | M        | PQQ                 | 34                | —                      | 7.5–8.0   | —     | Glycerol, D-mannitol, D-arabinol, etc<br>D-sorbitol | Dihydroxyacetone, D-fructose, D-xylose, etc<br>L-sorbose |            |
| NAD-SLDHs  | <i>Gluconobacter oxydans</i> WSH-003          | 36.6       | C        | NAD <sup>+</sup>    | 0.004 92          | 0.664                  | 12        | 57    | Glycerol, D-mannitol, D-arabitol                    | Dihydroxyacetone, D-fructose, D-xylose                   | [10]       |
|            | <i>Gluconobacter suboxydans</i> IFO 3257      | 26         | C        | NAD <sup>+</sup>    | 5                 | —                      | 9.5–10.0  | —     | D-sorbitol  | D-fructose   | [11]       |
| NADP-SLDHs | <i>Gluconobacter oxydans</i> G624             | 54         | C        | NAD(P) <sup>+</sup> | 38.9              | 3820                   | 10        | 70    | D-sorbitol  | L-sorbose  | [13]       |
|            | <i>Gluconobacter oxydans</i> CGMCC 1.110      | 29         | C        | NAD(P) <sup>+</sup> | 125               | 2.57                   | 8.5       | —     | D-sorbitol  | L-sorbose  | [14]       |
| FAD-SLDHs  | <i>Gluconobacter melanogenus</i> IFO 3294     | 30         | C        | NADP <sup>+</sup>   | —                 | —                      | 7.0–9.0   | —     | D-sorbitol  | D-xylose, D-fructose<br>L-sorbose                        | [15]       |
|            | <i>Gluconobacter oxydans</i> N44-1            | 60         | C        | NADP <sup>+</sup>   | —                 | —                      | 10.0–10.5 | —     | D-sorbitol  | L-sorbose  | [16]       |
| PQQ-SSDHs  | <i>Gluconobacter suboxydans</i> IFO 3254      | 63, 51, 17 | M        | FAD                 | —                 | —                      | 4.5       | 25    | D-sorbitol  | L-sorbose  | [17-18]    |
|            | <i>Ketogulonigenium vulgare</i> DSM 4025 SSDA | 63         | M        | PQQ                 | —                 | —                      | 7–9       | 30–40 | D-sorbitol, D-glucose, etc<br>L-sorbose             | 2-KLG  | [19-20]    |
|            | SSDB  | 63         | M        | PQQ                 | —                 | —                      | —         | —     | D-sorbitol, D-glucose, etc<br>L-sorbose             | D-glucose, D-gluconate, etc<br>2-KLG, vitamin C          |            |

(待续)

(续表 1)

| Enzymes   | Organism                                      | MW   | Location | Cofactor            | $K_m$<br>(mmol/L) | $K_{cat}$ ( $s^{-1}$ ) | pH       | TM      | Substrate  | Product     | References |
|-----------|---|------|----------|---------------------|-------------------|------------------------|----------|---------|--|-------------|------------|
|           | <i>Ketogulonigenium vulgare</i> WSH-001       |      |          |                     |                   |                        |          |         |  |             | [21]       |
|           | SSDA1   | 63   | M        | PQQ                 | 17.2              | 0.253                  | 8.0      | 32.5    | L-sorbose  | 2-KLG       |            |
|           |   |      |          |                     |                   |                        |          |         | Glyoxal, D-sorbitol, 1-propanol, 2-propanol                        | —           |            |
|           | SSDA3   | 63   | M        | PQQ                 | 7.4               | 0.4                    | 8.0      | 30      | L-sorbose  | 2-KLG       |            |
|           | SSDB  | 63   | M        | PQQ                 | 24.7              | 2.25                   | 7.5      | 30      | Glyoxal, D-sorbitol, ethanol, glycerol, etc                        | —           | [22-23]    |
|           |   |      |          |                     |                   |                        |          |         | Glyoxal, D-sorbitol, 2-propanol, D-mannitol, etc                   | —           |            |
|           |   |      |          |                     |                   |                        |          |         | Glyoxal, D-sorbitol, 2-propanol, D-mannitol, etc                   | —           |            |
| FAD-SDHs  | <i>Gluconobacter oxydans</i> T-100            | 57.6 | M        | FAD                 | 100               | —                      | 9.0      | 48      | L-sorbose  | L-sorbose   | [24]       |
|           | <i>Gluconobacter oxydans</i> UV10             | 58   | M        | FAD                 | 100               | —                      | 7.0      | 48      | L-sorbose  | L-sorbose   | [25]       |
|           | <i>Gluconobacter oxydans</i> GO112            | 60   | M        | FAD                 | 36                | —                      | 6.86     | 40      | L-sorbose  | L-sorbose   | [26]       |
| mSNDHs    | <i>Acetobacter liquefaciens</i> IFO 12258     | 48.2 | M        | —                   | —                 | —                      | —        | —       | L-sorbose  | 2-KLG       | [27]       |
| PQQ-SNDHs | <i>Gluconacetobacter liquefaciens</i> RCTMR10 | 48   | M        | PQQ                 | —                 | —                      | —        | —       | L-sorbose  | 2-KLG       | [22-23]    |
| cSNDHs    | <i>Gluconobacter oxydans</i> T-100            | 53.6 | C        | NAD(P) <sup>+</sup> | —                 | —                      | —        | —       | L-sorbose  | 2-KLG       | [28]       |
|           | <i>Gluconobacter oxydans</i> UV10             | 50   | C        | NAD(P) <sup>+</sup> | 0.045 5 (0.010 6) | —                      | over 9.0 | over 60 | L-sorbose  | 2-KLG       | [29]       |
| PQQ-GDHs  | <i>Gluconobacter oxydans</i> 621H             | 88.5 | M        | PQQ                 | 5.9               | 318.6                  | 6        | —       | Glyoxal, hydroxyacetaldehyde, glutaraldehyde, propionaldehyde, etc | D-gluconate | [29]       |
|           |   |      |          |                     |                   |                        |          |         | D-glucose  | —           |            |
|           |   |      |          |                     |                   |                        |          |         | 2-keto-D-glucose, D-galactose, etc                                 | —           |            |

(待续)

(续表 1)

| Enzymes        | Organism                                      | MW            | Location | Cofactor            | $K_m$<br>(mmol/L) | $K_{cat}$ ( $s^{-1}$ ) | pH  | TM | Substrate                              | Product                | References |
|----------------|---|---------------|----------|---------------------|-------------------|------------------------|-----|----|--|------------------------|------------|
|                | <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAL 5 | 86            | M        | PQQ                 | 0.1               | 186.3                  | 7.2 | —  | D-glucose                              | D-gluconate            | [30]       |
|                | <i>Gluconobacter suboxydans</i> IFO 12528     | 87            | M        | PQQ                 | 7.7               | 180.6,<br>160.5        | 6.0 | —  | 2-keto-D-glucose,<br>D-galactose       | —                      | [31]       |
| NAD(P)-GDHs    | <i>Gluconobacter oxydans</i> 621H             | 28.7          | C        | NADP <sup>+</sup>   | 29.6              | 84.8                   | —   | —  | D-glucose                              | D-gluconate            | [32-33]    |
|                | <i>Gluconobacter suboxydans</i> IFO 12528     | 40            | C        | NADP <sup>+</sup>   | 2.47              | 106                    | —   | —  | D-mannose                              | —                      | [34]       |
|                | <i>Acetobacter diazotrophicus</i> LMG 7603    |               | C        | NAD(P) <sup>+</sup> | —                 | —                      | —   | —  | D-glucose                              | D-gluconate            | [35]       |
| FAD-GDHs       | <i>Burkholderia cepacia</i> FERM BP-7306      | 18, 60,<br>38 | M        | FAD                 | 2.8               | —                      | 7.0 | 70 | D-glucose                              | D-gluconate            | [36]       |
| FAD-GADHs      | <i>Erwinia cypripedii</i> ATCC 29267          | 24, 68,<br>47 | M        | FAD                 | —                 | —                      | 5.0 | —  | D-gluconate                            | 2-keto-D-gluconate     | [37]       |
|                | <i>Gluconobacter dioxycetonicus</i> IFO 3271  | 23, 65,<br>44 | M        | FAD                 | —                 | —                      | —   | —  | D-gluconate                            | 2-keto-D-gluconate     | [38]       |
| FAD-2-GADHs    | <i>Gluconobacter oxydans</i> IFO 3293         | 25, 61,<br>47 | M        | FAD                 | 50                | —                      | 4.0 | 39 | 2-keto-D-gluconate                     | 2,5-diketo-D-gluconate | [39]       |
| NADPH-2,5-DKGR | <i>Corynebacterium</i> sp. ATCC 31090         | 35            | C        | NADPH               | 26                | —                      | 6.4 | —  | 2,5-diketo-D-gluconate                 | 2-KLG                  | [40]       |
|                |   |               |          |                     | 155, 160          | —                      | —   | —  | 5-keto-D-fructose,<br>dihydroxyacetone | —                      |            |
|                | <i>Corynebacterium</i> sp. SHS752001          | 31            | C        | NADPH               | —                 | —                      | —   | —  | 2,5-diketo-D-gluconate                 | 2-KLG                  | [4]        |

The MW means the molecular weight of single subunit (kDa). The location M/C means that the protein is a membrane binding enzyme or an intracellular enzyme. The abbreviation pH and TM means the optimum pH and TM means the optimum temperature (°C). The symbol “—” means that the result is not detected or stated.



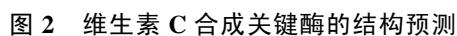


Fig. 2 The structure prediction of related dehydrogenases in the biosynthesis of vitamin C. The prediction was conducted by the website SMART. The dehydrogenases listed were PQQ-SLDH (GenBank Accession No. AB065091), NAD-SLDHs (GenBank Accession No. JH668179), NADP-SLDHs (GenBank Accession No. KU535615), FAD-SLDHs (GenBank Accession No. AB039821), PQQ-SSDA1 (GenBank Accession No. AB092515), PQQ-SSDA2 (GenBank Accession No. AB092516), PQQ-SSDA3 (GenBank Accession No. AB092517), PQQ-SSDB (GenBank Accession No. AB092518), FAD-SDHs (GenBank Accession No. AR008349), mSNDHs (GenBank Accession No. D28511), PQQ-SNDHs (GenBank Accession No. LC373924), cSNDH (GenBank Accession No. AR008350), PQQ-GDHs (GenBank Accession No. CP000009), NADP-GDH (GenBank Accession No. CP000009), FAD-GDHs (GenBank Accession No. CP013431), FAD-GADHs (GenBank Accession No. U97665), FAD-2-GADHs (GenBank Accession No. AB985494), NADPH-2,5-DKGR-A (GenBank Accession No. M12799) and NADPH-2,5-DKGR-B (GenBank Accession No. M21193), respectively.



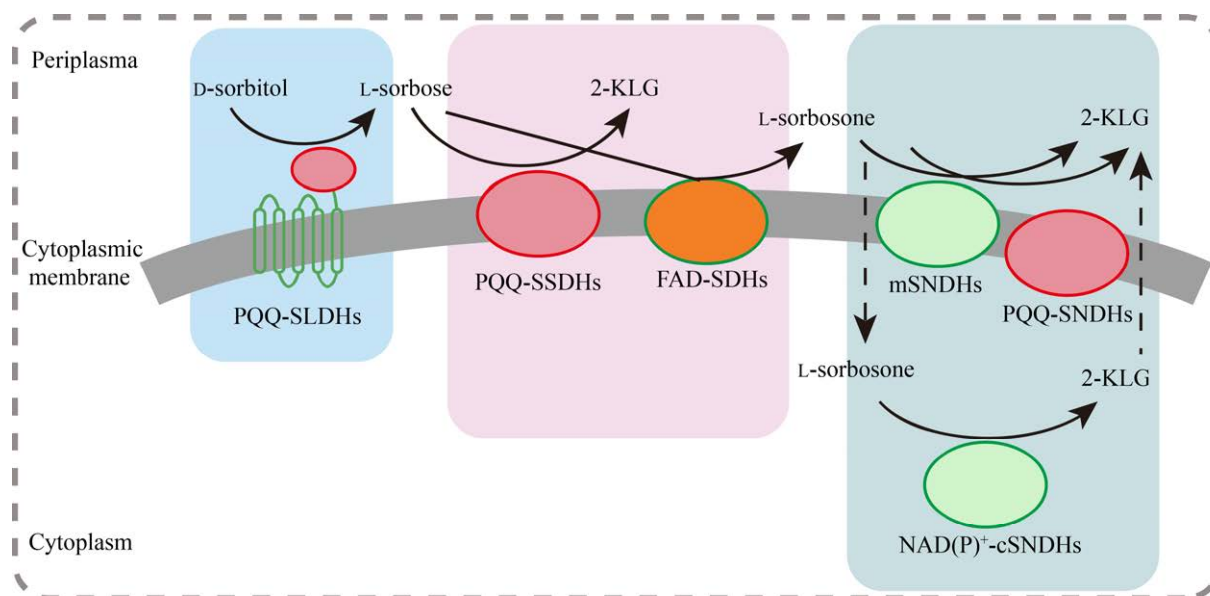


图 3 山梨糖途径相关脱氢酶分布示意图

Fig. 3 The location of related dehydrogenases in L-sorbose pathway.

糖酸杆菌 UV10<sup>[28]</sup>和氧化葡萄糖酸杆菌 T-100<sup>[23]</sup>中,都分离得到一种胞内的 NAD(P) 依赖的山梨酮脱氢酶 (cSNDH),且二者在催化性质上很类似<sup>[23]</sup>。

### 2.1.2 山梨糖途径脱氢酶的底物专一性不高

氧化葡萄糖酸杆菌来源的 PQQ-SLDHs 也被称为甘油脱氢酶,主要氧化具有 R 构型的 2 号碳位置的羟基,能氧化多种多元醇,如阿拉伯糖醇、山梨醇、甘露醇、赤藓糖醇和核糖醇等生成相对应的酮或糖<sup>[43]</sup>。同时,该酶也催化 D-葡萄糖生成 5-酮基-D-葡萄糖酸<sup>[9]</sup>。普通生酮基古龙酸菌来源的 PQQ-SSDHs 也具有广泛的底物谱。如普通生酮基古龙酸菌 DSM 4025 来源的 SSDA1、SSDA2 和 SSDA3 除了正常催化 L-山梨糖生成 L-山梨酮或者 2-酮基-L-古龙酸外,也可以催化 D-山梨醇生成 D-葡萄糖或者 L-古洛糖<sup>[46]</sup>,而 SSDB 可以催化 D-山梨醇生成 L-山梨糖<sup>[47]</sup>。王盼盼等使用显色法对普通生酮基古龙酸菌 WSH-001 来源的 PQQ-SSDHs 和 SNDHs 进行了底物谱分析<sup>[21]</sup>,结果发现 WSH-001 中的 PQQ-SSDHs 能催化 D-山梨醇、L-山梨糖、乙二醛、

甲醇、乙醇、甘油、1-丙醇、2-丙醇、D-甘露醇、肌醇、D-木糖醇、D-葡萄糖、D-半乳糖、D-甘露糖、D-木糖、D-鼠李糖、D-果糖、D-葡萄糖酸盐、D-葡萄糖醛酸、 $\delta$ -葡萄糖酸内酯等底物,SSDA1、SSDA1-P、SSDA2 和 SSDB 的最适底物是乙二醛,而 SSDA3 的最适底物是 1-丙醇,其中 SSDA3 对于 L-山梨糖的催化活性高于其余的 PQQ-SSDHs。造成这些 PQQ 依赖的膜脱氢酶底物专一性不高的原因,一个可能的解释是这些 PQQ 依赖的脱氢酶大部分拥有半开放式的底物结合口袋,只要底物分子靠近这个口袋就可以催化反应,而不像其他脱氢酶,底物结合口袋在脱氢酶的内部,需要底物完全进入底物结合口袋才可以进行催化作用<sup>[52]</sup>。弱氧化葡萄糖酸杆菌 IFO 3257 来源的 NAD-SLDHs 可以分别催化 D-山梨醇或木糖醇生成 L-山梨糖或 D-木酮糖<sup>[12]</sup>。来源于 WSH-001 的 2 个山梨酮脱氢酶 GSNDH 和 SNDH 在底物谱上非常相似,都能同乙二醛、D-葡萄糖、D-半乳糖、D-甘露糖、D-木糖、D-鼠李糖和 D-乳糖发生反应,而不与 D-山梨醇、L-山梨糖、D-果糖反应<sup>[21]</sup>。而

且,这两个山梨酮脱氢酶都被报道可以催化 L-山梨酮直接合成维生素 C<sup>[47]</sup>。氧化葡萄糖酸杆菌 UV10<sup>[28]</sup>和氧化葡萄糖酸杆菌 T-100<sup>[23]</sup>来源的 cSNDH 都属于乙醛脱氢酶家族,可以催化乙二醛、戊二醛、乙醛、丙醛等底物,但其最适底物都为 L-山梨酮。

特殊的是,氧化葡萄糖酸杆菌 UV10<sup>[28]</sup>、T-100<sup>[20]</sup>和 WSH-004<sup>[72]</sup>来源的 FAD 依赖的山梨糖脱氢酶 (FAD-SDHs),则与普通生酮基古龙酸菌来源的 PQQ-SSDHs 不同,具有很高的底物专一性,只与 L-山梨糖发生反应,而不与葡萄糖、山梨醇、果糖等反应。这种很高的底物专一性,对于利用其构建一步发酵菌株,具有重要意义。

### 2.1.3 山梨糖途径脱氢酶的辅因子多数是 PQQ

氧化葡萄糖酸杆菌来源的 PQQ-SLDHs 是催化 D-山梨醇生成 L-山梨糖的主要的脱氢酶<sup>[8,42]</sup>,普通生酮基古龙酸菌来源的 PQQ-SSDHs、GSNDH 及 SNDH 是糖酸转化过程中最关键的脱氢酶<sup>[49]</sup>,二者都以 PQQ 为辅因子。同时 Yakushi 等也报道了一种氧化葡萄糖酸杆菌来源的 PQQ-mSNDH<sup>[27]</sup>。

氧化葡萄糖酸杆菌细胞膜上存在 FAD-SLDHs,该酶不是 D-山梨醇到 L-山梨糖转化的关键酶,且只在高浓度的 D-山梨醇存在时发挥作用<sup>[44-45]</sup>。氧化葡萄糖酸杆菌细胞膜中还存在着 FAD-SDHs<sup>[23-24]</sup>,这是少数氧化葡萄糖酸杆菌能够产 2-KLG 的关键酶。此外,氧化葡萄糖酸杆菌细胞内的 NAD-SLDHs<sup>[50]</sup>和 NADP-SLDHs<sup>[51]</sup>分别以 NAD<sup>+</sup>和 NADP<sup>+</sup>为辅因子,cSNDH<sup>[23,28]</sup>以 NAD(P)<sup>+</sup>为辅因子。

### 2.1.4 脱氢酶电子传递途径复杂

山梨糖途径中大部分脱氢酶的电子传递都与呼吸链偶联<sup>[53-54]</sup>,研究发现这些脱氢酶的电子传递途径以及脱氢酶与呼吸链的偶联方式存在很大差异。Ameyama 等发现,在氧化葡萄糖酸杆菌中,PQQ-SLDHs 将电子传递给泛醌<sup>[55]</sup>,最终可能传递给细胞色素 *bo*<sub>3</sub> 末端氧化酶<sup>[44]</sup>,而 FAD-SLDHs 则

是最终将电子传递给细胞色素 C (Cytochrome *c*<sub>551</sub>)<sup>[17]</sup>或者氰化物不敏感的末端氧化酶 (Cyanide-insensitive terminal oxidase, CIO)<sup>[44]</sup>。韩晓东等通过对普通生酮基古龙酸菌 Y25 来源的 PQQ-SSDHs 晶体结构的解析,发现其下游电子传递载体是 cytochrome *c*<sub>551</sub>,可能进而将电子传递给 cytochrome *c*<sub>552</sub>,最终传递给细胞色素 c 氧化酶<sup>[56]</sup>。常用电子传递载体吩嗪硫酸甲酯 (Phenazine methosulfate, PMS) 和二氯酚靛酚 (2,6-dichlorophenol indophenol, DCIP) 对大部分脱氢酶都具有促进作用,如氧化葡萄糖酸杆菌 UV10 来源的 FAD-SDHs,在电子传递载体 PMS 存在的条件下,可以直接催化 L-山梨糖生成 L-山梨酮,而不需要添加其他辅因子<sup>[24]</sup>。王盼盼等通过对普通生酮基古龙酸菌 WSH-001 中的 PQQ-SSDHs 进行研究,发现 PMS 或者 DCIP 对于 SSDA1 和 SSDA3 的活性有促进作用,铁氰化钾 (K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]) 能够提高 SSDA1 和 SSDA3 的酶活,却对 SSDA1-P、SSDA2 和 SSDB 的活性有抑制作用<sup>[21]</sup>。综上,虽然对于山梨糖途径中相关脱氢酶的电子传递途径作了许多研究,但是对于其中关键脱氢酶特别是山梨糖脱氢酶电子传递途径的研究还有待深入。同时,如何协调山梨糖途径中相关脱氢酶与呼吸链的偶联以及这些脱氢酶电子传递途径的复杂性,也是后续代谢改造提高 2-酮基-L-古龙酸产量不可避免的问题。

## 2.2 葡萄糖酸途径

葡萄糖酸途径有 4 个酶参与,分别是葡萄糖脱氢酶、葡萄糖酸脱氢酶、2-酮基-D-葡萄糖酸脱氢酶和 2,5-二酮基-D-葡萄糖酸还原酶。如图 4 所示,该途径中大部分脱氢酶位于细胞膜上,主要以 FAD 为辅因子,具有催化活性高和底物特异性高等特点。脱氢反应中的电子主要传递给泛醌。同时,葡萄糖酸途径中 PQQ-GDHs 结构与 PQQ-SLDHs 类似,由一个负责定位小亚基和一个负责催化的大亚基组成,都以 PQQ 为辅因子。

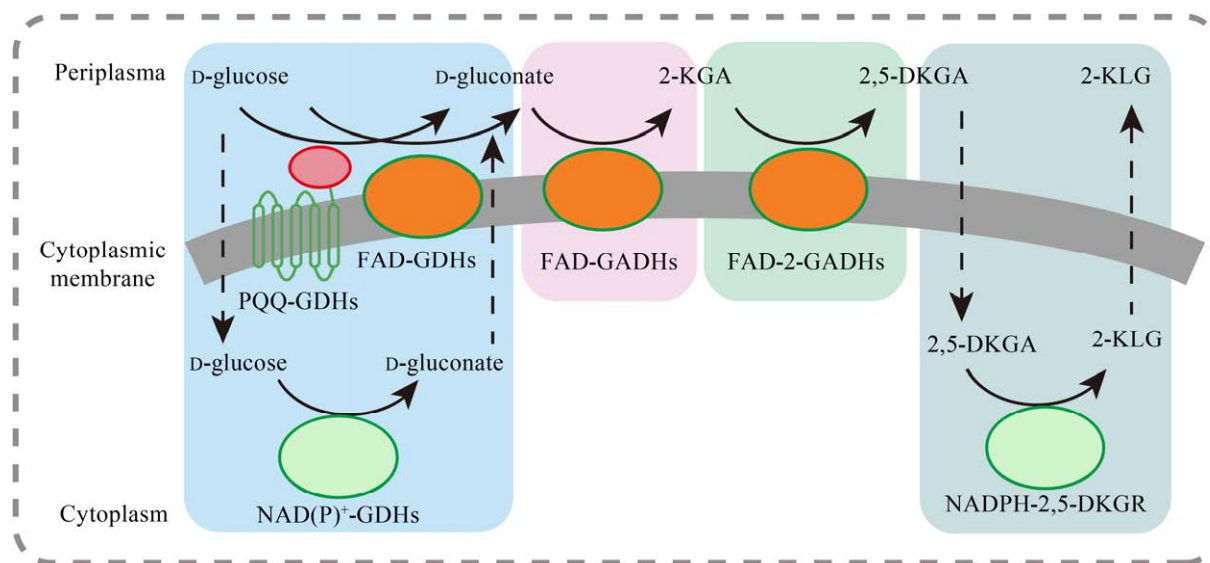


图 4 葡萄糖酸途径中相关脱氢酶分布示意图

Fig. 4 The location of dehydrogenases in gluconate pathway.

### 2.2.1 葡萄糖酸途径的脱氢酶大多位于细胞膜上

葡萄糖酸途径中的前 3 个酶,葡萄糖脱氢酶、葡萄糖酸脱氢酶和 2-酮基-D-葡萄糖酸脱氢酶均位于细胞膜上。其中,细胞膜上的 PQQ 依赖的葡萄糖脱氢酶 (PQQ-GDHs) 相对于胞内的 NAD 为辅因子的葡萄糖脱氢酶 (NAD-GDHs) 具有更高的活性<sup>[35]</sup>。除此,Inose 等发现了细胞膜上以 FAD 为辅因子的葡萄糖脱氢酶 (FAD-GDHs)<sup>[36]</sup>,包含小亚基 (S)、大亚基 (L) 和一个细胞色素 *c* 亚基 (C)。细胞膜上以 FAD 为辅因子的葡萄糖酸脱氢酶 (FAD-GADHs) 与 FAD-SLDHs 类似,也由 3 个亚基组成,包括 1 个共价结合 FAD 的大亚基、1 个结合 3 个血红素 *c* 的细胞色素亚基和 1 个对脱氢酶的跨膜<sup>[38]</sup>和活性<sup>[57]</sup>必不可少的小亚基。细胞膜上以 FAD 为辅因子的 2-酮基-D-葡萄糖酸脱氢酶 (FAD-2-GADH) 在基因结构上与 FAD-GADHs 类似,也是由 3 个亚基组成<sup>[39]</sup>。

2,5-二酮基-D-葡萄糖酸还原酶 (NADPH-2,5-DKGR) 是胞内酶,共有两种,分别是由 Anderson 等<sup>[3]</sup>和 Jeffrey 等<sup>[40]</sup>从谷氨酸棒状杆菌中发现的 2,5-DKGR I (或 2,5-DKGR-A) 和 Grindley

等<sup>[4]</sup>发现的 2,5-DKGR II (或 2,5-DKGR-B)。二者都在胞内催化 2,5-二酮基-D-葡萄糖酸还原生成 2-KLG。

### 2.2.2 葡萄糖酸途径的脱氢酶底物专一性很高

相比于山梨糖途径,葡萄糖酸途径中大部分脱氢酶具有很高的底物专一性,可以避免山梨糖途径中不同脱氢酶对同一底物的竞争问题。因此该途径中脱氢酶可以在一个菌株中同时表达,而不用考虑山梨糖途径中脱氢酶的底物特异性冲突等问题。葡萄糖酸途径中高底物专一性的脱氢酶主要来源于 FAD 依赖的脱氢酶,如 Yamaoka 等发现的 FAD-GADHs 只与 D-葡萄糖酸反应,不与其他糖醇和有机酸反应<sup>[58]</sup>。Shinagawa 等发现的 FAD-2-GADH 只与 2-酮基-D-葡萄糖酸反应,不与其他底物反应<sup>[39]</sup>。

同时,Attwood 等发现的 PQQ-GDHs 能够与麦芽糖<sup>[31]</sup>、L-阿拉伯糖、D-阿洛糖、杜拉糖和纤维二糖<sup>[59]</sup>等反应,但是在己糖中 PQQ-GDHs 只与葡萄糖反应<sup>[31]</sup>。Miller 等发现 2,5-DKGR 底物特异性不高,能与底物 5-酮基-D-果糖和二羟基丙酮反应,但不与 D-果糖、L-山梨糖、5-酮基-D-葡萄糖酸、2-酮基-L-古龙酸、2-酮基-D-葡萄糖酸、丙

酮酸或羟基丙酮酸反应<sup>[40]</sup>。

### 2.2.3 脱氢酶的辅因子多数是 FAD

细胞膜上的脱氢酶多以 PQQ 或者 FAD 为辅因子,与山梨糖途径中大部分脱氢酶以 PQQ 为辅因子不同,葡萄糖酸途径中大多数脱氢酶以 FAD 为辅因子。FAD-GADHs<sup>[58]</sup>和 FAD-2-GADH<sup>[39]</sup>这两个酶都以 FAD 作为辅因子,在第一步反应中除了 PQQ 依赖的 PQQ-GDHs 外,也存在 FAD-GDHs 以 FAD 作为辅因子<sup>[36]</sup>。

除此,还有胞内的葡萄糖脱氢酶 NAD(P)-GDHs 以 NAD(P)为辅因子<sup>[34-35]</sup>。而 2,5-DKGR 则严格以 NADPH 为辅因子,以 NADH 作为辅因子不发生反应<sup>[3-4,40]</sup>。

### 2.2.4 脱氢酶电子传递链类似

FAD-GDHs<sup>[36]</sup>、FAD-GADHs<sup>[58]</sup>和 FAD-2-GADH<sup>[39]</sup>这几个酶都以 FAD 作为辅因子,在电子传递上也非常类似,都是先传递电子到辅酶 Q,然后传递给泛醇氧化酶 (Ubiquinol oxidases, UOX) 或者氰化物不敏感氧化酶 (Cyanide-insensitive oxidase, CIO)<sup>[58]</sup>。PQQ-GDHs 似乎可以直接将电子传递给呼吸链甚至电极上<sup>[60]</sup>。

## 3 维生素 C 生物合成相关脱氢酶的应用和改造

### 3.1 山梨糖途径中相关脱氢酶的应用和改造

山梨糖途径中,来源于氧化葡萄糖酸杆菌的 PQQ-SLDHs 具有很高的活性<sup>[8,42]</sup>,因此第一步中 D-山梨醇到 L-山梨糖的转化可以在 16 h 内达到 95% 以上<sup>[61]</sup>。而主要的限速步骤还是在 L-山梨糖到 2-KLG,即糖酸转化效率上。在之前的研究中,有大量的工作集中在过量表达或者敲除相关脱氢酶上面。

#### 3.1.1 过量表达氧化葡萄糖酸杆菌来源的 PQQ-SLDHs

普通生酮基古龙酸菌天然利用 D-山梨醇生产 L-山梨糖的能力很低,因此考虑在普通生酮基古龙酸菌中过表达来自氧化葡萄糖酸杆菌的

PQQ-SLDHs,以增强 D-山梨醇到 L-山梨糖的合成。傅术琳等在普通生酮基古龙酸菌 DSM 4025 中过表达来自氧化葡萄糖酸杆菌的 PQQ-SLDHs,发现 2-KLG 产量并没有明显提高,但是山梨醇到 L-山梨糖的转化以及到 2-KLG 的转化率有提高,说明氧化葡萄糖酸杆菌来源的 PQQ-SLDHs 在普通生酮基古龙酸菌中发挥了活性,但是可能 PQQ-SLDHs 与普通生酮基古龙酸菌细胞膜上电子传递载体不匹配,PQQ-SLDHs 没有能够发挥出在氧化葡萄糖酸杆菌中的催化活性<sup>[20]</sup>。

#### 3.1.2 过量表达普通生酮基古龙酸菌来源的 PQQ-SSDHs 和 (G)SNDH

因为大部分氧化葡萄糖酸杆菌都能高效利用 D-山梨醇产 L-山梨糖,但是基本不能利用 L-山梨糖产 2-KLG,所以最初的构想是把普通生酮基古龙酸菌中的山梨糖脱氢酶 PQQ-SSDHs 和山梨酮脱氢酶 (G)SNDH 在氧化葡萄糖酸杆菌中异源表达,构建能够产 2-KLG 的一步菌株。高丽丽等通过在氧化葡萄糖酸杆菌 WSH-003 中组合表达普通生酮基古龙酸菌 WSH-001 来源的 PQQ-SSDHs 和 (G)SNDH,可以实现单菌一步从 D-山梨醇发酵产 2-KLG,其中最高的组合 KVVU\_0203 和 KVVU\_0095 能够达到 39.2 g/L<sup>[2]</sup>。虽然后面课题组作了进一步改造和优化,如不同启动子增强 PQQ 供给<sup>[62]</sup>、发酵培养基和发酵过程的优化<sup>[63]</sup>等,最终产量仍然无法与二步发酵法媲美,可能过表达的 PQQ-SSDHs 与氧化葡萄糖酸杆菌的 PQQ-SLDHs 竞争底物 D-山梨醇<sup>[64]</sup>。

异源表达普通生酮基古龙酸菌来源的 PQQ-SSDHs 和山梨酮脱氢酶 (G)SNDH 存在许多问题。普通生酮基古龙酸菌的电子呼吸链与新的宿主细胞不一致,表达的 PQQ-SSDHs 在新宿主可能出现降解现象,如在氧化葡萄糖酸杆菌中就存在部分降解现象,导致普通生酮基古龙酸菌的 PQQ-SSDHs 在氧化葡萄糖酸杆菌中表达达不到理想的效果<sup>[65]</sup>。而将普通生酮基古龙酸菌的 PQQ-SSDHs 在大肠杆菌<sup>[66-67]</sup>、氧化葡萄糖酸杆菌<sup>[68]</sup>、

乙酸钙不动杆菌<sup>[69]</sup>、脱氮副球菌<sup>[70]</sup>等宿主中表达,均发现不能达到在普通生酮基古龙酸菌中的强催化活性。

### 3.1.3 过量表达氧化葡萄糖酸杆菌的 SDH 和 SNDH

虽然大部分氧化葡萄糖酸杆菌都拥有山梨酮-山梨糖脱氢酶 (*Sndh-sdh*) 基因簇,但是只有少数的氧化葡萄糖酸杆菌被报道产 2-KLG,如氧化葡萄糖酸杆菌 UV10<sup>[28]</sup>、氧化葡萄糖酸杆菌 T-100<sup>[23]</sup>和氧化葡萄糖酸杆菌 WSH-004<sup>[71]</sup>等。Saito 等在氧化葡萄糖酸杆菌 G624 中过表达氧化葡萄糖酸杆菌 T-100 来源的 *sdh-sndh*,可以将 2-KLG 产量提高到 16 g/L<sup>[23]</sup>,进一步更换启动子和阻断 L-艾杜糖酸途径后,产量达到 130 g/L<sup>[22]</sup>,是迄今报道的最高产量。侯伟等在氧化葡萄糖酸杆菌 621H 中过表达氧化葡萄糖酸杆菌 H763 来源的 *sndh-sdh*,通过对发酵液进行薄层层析检测,发现能够产 2-KLG<sup>[72]</sup>。

### 3.1.4 阻断山梨糖途径中副产物途径

在氧化葡萄糖酸杆菌中有多个山梨醇脱氢酶,其中胞内 NADP 依赖的山梨醇脱氢酶 NADP-SLDHs<sup>[51]</sup>又被称作 L-山梨糖还原酶,因为其主要显示出 L-山梨糖还原酶的活性。将山梨糖还原酶以及其他胞内山梨糖代谢酶敲除可以有效提高从 L-山梨糖到 2-KLG 的转化率<sup>[73]</sup>。2-KLG 在氧化葡萄糖酸杆菌<sup>[22,74]</sup>或者普通生酮基古龙酸菌中<sup>[75-76]</sup>可能存在降解途径生成 L-艾杜糖酸,将该途径去除能够有利于 2-KLG 的积累。

## 3.2 葡萄糖酸途径中相关脱氢酶的应用和改造

葡萄糖酸途径以 2,5-二酮基-D-葡萄糖酸为中间产物,通过野生菌筛选和代谢改造,已经获得能够高产 2,5-二酮基-D-葡萄糖酸的工程菌株<sup>[77-79]</sup>。因此,葡萄糖酸途径的关键问题是 2,5-二酮基-D-葡萄糖酸到 2-KLG 的转化过程。围绕这个问题,大量工作集中在 2,5-二酮基-D-葡萄糖酸还原酶的辅因子改造和阻止 2,5-二酮基-D-葡萄糖酸的降解上。

### 3.2.1 2,5-二酮基-D-葡萄糖酸还原酶 (2,5-DKGR) 的辅因子供给

无论是 Anderson 等<sup>[3]</sup>和 Jeffrey 等<sup>[40]</sup>从谷氨酸棒状杆菌中发现的 2,5-DKGR I (或者 2,5-DKGR-A),还是 Hardy 等<sup>[4]</sup>发现的 2,5-DKGR II (或者 2,5-DKGR-B),都严格以 NADPH 为辅因子。Banta 等<sup>[80]</sup>通过改造得到 NADH 依赖的 2,5-DKGR,但其活性更偏好 NADPH。2,5-DKGR 对于 NAD(P)H 的依赖使得细胞需要提供和消耗大量的 NAD(P)H。而在细胞内,通常 NADPH 的含量低于 NADH,更是远远低于 NADP<sup>+</sup>。要将 2,5-二酮基-D-葡萄糖酸尽量转化为 2-KLG 需要大量的 NADH 或 NADPH,不然通过 2,5-二酮基-D-葡萄糖酸还原酶的逆反应,积累的 2-KLG 也可能逆向生成 2,5-二酮基-D-葡萄糖酸。由于 NADH 和 NADPH 十分昂贵,不宜直接添加到发酵培养基中,大量的 NA(P)DH 只能通过辅因子再生改造来提供。有一种思路是将葡萄糖酸途径中第一步 PQQ-GDHs 部分用 NADP-GDHs 替代,可以促进 NADPH 的再生过程,但是这样会降低 D-葡萄糖酸的利用效率,延长发酵周期,同时 D-葡萄糖酸在胞内还可以通过 Entner-Doudoroff pathway 等途径<sup>[81]</sup>被进一步利用,从而整个发酵过程的转化率也会降低。

### 3.2.2 中间产物 2,5-二酮基-D-葡萄糖酸的降解

细菌中存在许多还原酶能够将 2,5-二酮基-D-葡萄糖酸还原成其他副产物,如欧文氏菌中存在两个 2-酮基醛糖还原酶,可以同时催化还原 2,5-二酮基-D-葡萄糖酸、2-酮基-L-古龙酸和 2-酮基-D-葡萄糖酸的第二位酮基<sup>[82]</sup>。Yum 等在酮体短杆菌也发现 2-酮基醛糖还原酶<sup>[37]</sup>。除了生物酶降解,2,5-二酮基-D-葡萄糖酸自身稳定性较差<sup>[78]</sup>,对热和碱均敏感。新二步发酵法中,第一步通过欧文氏菌转化得到的 2,5-二酮基-D-葡萄糖酸需要在 40 °C 以下的温度中进行除菌和纯化分离以防止其降解,在生产工艺上造成不便。

## 4 总结与展望

通过对维生素 C 生物合成中山梨糖途径和葡萄糖酸途径中脱氢酶的回顾,我们发现山梨糖途径中普通生酮基古龙酸菌中脱氢酶普遍拥有催化活性高但底物专一性不强的特点,而葡萄糖酸途径中的脱氢酶普遍专一性高,但辅因子再生和中间产物的降解是一个急需解决的问题。普通生酮基古龙酸菌中的 PQQ-SSDHs 可以竞争利用底物 D-山梨醇,这个问题可以通过结构生物学和酶工程等技术对底物结合口袋进行理性设计和改造,获得底物专一性高的 PQQ-SSDHs。或者通过代谢调控策略,将 D-山梨醇这个底物和 PQQ-SSDHs 在时空上分开,比如改造更强的山梨醇脱氢酶 PQQ-SLDHs 或者筛选时序启动子等将 PQQ-SSDHs 推迟表达,这样可以使氧化葡萄糖酸杆菌尽快将 D-山梨醇利用产生 L-山梨糖,然后 L-山梨糖才与 PQQ-SSDHs 反应生成 2-KLG。同时,因为氧化葡萄糖酸杆菌来源的 FAD-SDHs 具有很高的底物特异性,但是酶活不高,可以通过过表达 FAD-SDHs 或者进行突变筛选和理性设计获得更高活性的 FAD-SDHs 来提高糖酸转化率<sup>[83]</sup>。葡萄糖酸途径中的 2,5-二酮基-D-葡萄糖酸转化需要大量 NADH 或者 NADPH,用 NADP-GDHs 替代 PQQ-GDHs,可以促进 NADPH 的再生过程,但是这样会降低 D-葡萄糖酸的利用效率和转化率,需要全局考虑细胞的代谢和辅因子调控过程。结合结构生物学和酶工程等技术,或许也可以通过理性设计和筛选获得不依赖 NAD(P)H 的 2,5-二酮基-D-葡萄糖酸还原酶。在后续研究工作中,不管是山梨糖途径还是葡萄糖酸途径,都需要结合结构生物学、酶工程和代谢工程等策略,来提高生物技术合成 2-KLG 的产量、转化率和生产强度。

## REFERENCES

- [1] Wang PP, Zeng WZ, Xu S, et al. Current challenges facing one-step production of L-ascorbic acid. *Biotechnol Adv*, 2018, 36(7): 1882-1899.
- [2] Gao LL, Hu YD, Liu JC, 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.
- [3] Anderson S, Marks CB, Lazarus R, et al. Production of 2-keto-L-gulonate, an intermediate in L-ascorbate synthesis, by a genetically modified *Erwinia herbicola*. *Science*, 1985, 230(4722): 144-149.
- [4] Grindley JF, Payton MA, Van De Pol H, et al. Conversion of glucose to 2-keto-L-gulonate, an intermediate in L-ascorbate synthesis, by a recombinant strain of *Erwinia citreus*. *Appl Environ Microbiol*, 1988, 54(7): 1770-1775.
- [5] Hancock RD, Viola R. The use of micro-organisms for L-ascorbic acid production: current status and future perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 56(5/6): 567-576.
- [6] Kaswurm V, Van Hecke W, Kulbe KD, et al. Engineering of a bi-enzymatic reaction for efficient production of the ascorbic acid precursor 2-keto-L-gulonic acid. *Biochem Eng J*, 2013, 79: 104-111.
- [7] Miki T, Hasegawa T, Sahashi Y. Studies on 5-keto-D-gluconate obtained by fermentation relating to L-ascorbic acid. I. Catalytic reduction of 5-keto-D-gluconate to L-idonate. *J Vitaminol (Kyoto)*, 1960, 6(3): 205-210.
- [8] Miyazaki T, Tomiyama N, Shinjoh M, et al. Molecular cloning and functional expression of D-sorbitol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans* IFO3255, which requires pyrroloquinoline quinone and hydrophobic. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2002, 66(2): 262-270.
- [9] Matsushita K, Fujii Y, Ano Y, et al. 5-keto-D-gluconate production is catalyzed by a quinoprotein glycerol dehydrogenase, major polyol dehydrogenase, in *Gluconobacter* species. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(4): 1959-1966.
- [10] Ameyama M, Shinagawa E, Matsushita K, et al. Solubilization, purification and properties of membrane-bound glycerol dehydrogenase from *Gluconobacter industrius*. *Agric Biol Chem*, 1985, 49(4): 1001-1010.
- [11] Liu L, Zeng WZ, Du GC, et al. Identification of



- NAD-dependent xylitol dehydrogenase from *Gluconobacter oxydans* WSH-003. ACS Omega, 2019, 4(12): 15074-15080.
- [12] Adachi O, Toyama H, Theeragool G, et al. Crystallization and properties of NAD-dependent D-sorbitol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans* IFO 3257. Biosci Biotechnol Biochem, 1999, 63(9): 1589-1595.
- [13] Kim TS, Patel SKS, Selvaraj C, et al. A highly efficient sorbitol dehydrogenase from *Gluconobacter oxydans* G624 and improvement of its stability through immobilization. Sci Rep, 2016, 6: 33438.
- [14] Cheng HR, Jiang N, Shen A, et al. Molecular cloning and functional expression of D-arabitol dehydrogenase gene from *Gluconobacter oxydans* in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett, 2005, 252(1): 35-42.
- [15] Adachi O, Ano Y, Moonmangmee D, et al. Crystallization and properties of NADPH-dependent L-sorbose reductase from *Gluconobacter melanogenus* IFO 3294. Biosci Biotechnol Biochem, 1999, 63(12): 2137-2143.
- [16] Sugisawa T, Hoshino T, Fujiwara A. Purification and properties of NADPH-linked L-sorbose reductase from *Gluconobacter melanogenus* N44-1. Agric Biol Chem, 1991, 55(8): 2043-2049.
- [17] Shinagawa E, Ameyama M. D-sorbitol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*, membrane-bound. Methods Enzymol, 1982, 89: 141-145.
- [18] Shinagawa E, Matsushita K, Adachi O, et al. Purification and characterization of D-sorbitol dehydrogenase from membrane of *Gluconobacter suboxydans* var.  $\alpha$ . Agric Biol Chem, 1982, 46(1): 135-141.
- [19] Asakura A, Hoshino T. Isolation and characterization of a new quinoprotein dehydrogenase, L-sorbose/L-sorbose dehydrogenase. Biosci Biotechnol Biochem, 1999, 63(1): 46-53.
- [20] 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. Biosci Biotechnol Biochem, 2005, 69(3): 659-662.
- [21] Wang PP, Zeng WZ, Du GC, et al. Systematic characterization of sorbose/sorbose dehydrogenases and sorbose dehydrogenases from *Ketogulonicigenium vulgare* WSH-001. J Biotechnol, 2019, 301: 24-34.
- [22] Saito Y, Ishii Y, Hayashi H, et al. Direct fermentation of 2-keto-L-gulonic acid in recombinant *Gluconobacter oxydans*. Biotechnol Bioeng, 1998, 58(2/3): 309-315.
- [23] 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. Appl Environ Microbiol, 1997, 63(2): 454-460.
- [24] Sugisawa T, Hoshino T, Nomura S, et al. Isolation and characterization of membrane-bound L-sorbose dehydrogenase from *Gluconobacter melanogenus* UV10. Agric Biol Chem, 1991, 55(2): 363-370.
- [25] Zhang W, Yan B, Wang J, et al. Purification and characterization of membrane-bound L-sorbose dehydrogenase from *Gluconobacter oxydans* GO112. Enzyme Microb Technol, 2006, 38(5): 643-648.
- [26] Shinjoh M, Sugisawa T, Masuda S, et al. Efficient conversion of L-sorbose to 2-keto-L-gulonic acid by *Acetobacter liquefaciens* strains. J Ferment Bioeng, 1994, 78(6): 476-478.
- [27] Yakushi T, Takahashi R, Matsutani M, et al. The membrane-bound sorbose dehydrogenase of *Gluconacetobacter liquefaciens* is a pyrroloquinoline quinone-dependent enzyme. Enzyme Microb Technol, 2020, 137: 109511.
- [28] Hoshino T, Sugisawa T, Fujiwara A. Isolation and characterization of NAD(P)-dependent L-sorbose dehydrogenase from *Gluconobacter melanogenus* UV10. Agric Biol Chem, 1991, 55(3): 665-670.
- [29] Meyer M, Schweiger P, Deppenmeier U. Effects of membrane-bound glucose dehydrogenase overproduction on the respiratory chain of *Gluconobacter oxydans*. Appl Microbiol Biotechnol, 2013, 97(8): 3457-3466.
- [30] Sará-Páez M, Contreras-Zentella M, Gómez-Manzo S, et al. Purification and characterization of the membrane-bound quinoprotein glucose dehydrogenase of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 5. Protein J,



- 2015, 34(1): 48-59.
- [31] Ameyama M, Shinagawa E, Matsushita K, et al. D-glucose dehydrogenase of *Gluconobacter suboxydans*: solubilization, purification and characterization. J Ind Eng Chem, 1981, 45(4): 851-861.
- [32] Rauch B, Pahlke J, Schweiger P, et al. Characterization of enzymes involved in the central metabolism of *Gluconobacter oxydans*. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 88(3): 711-718.
- [33] Prust C, Hoffmeister M, Liesegang H, et al. Complete genome sequence of the acetic acid bacterium *Gluconobacter oxydans*. Nat Biotechnol, 2005, 23(2): 195-200.
- [34] Adachi O, Matsushita K, Shinagawa E, et al. Crystallization and characterization of NADP-dependent D-glucose dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. Agric Biol Chem, 1980, 44(2): 301-308.
- [35] Attwood MM, Van Dijken JP, Pronk JT. Glucose metabolism and gluconic acid production by *Acetobacter diazotrophicus*. J Fermentat Bioeng, 1991, 72(2): 101-105.
- [36] Inose K, Fujikawa M, Yamazaki T, et al. Cloning and expression of the gene encoding catalytic subunit of thermostable glucose dehydrogenase from *Burkholderia cepacia* in *Escherichia coli*. Biochim Biophys Acta, 2003, 1645(2): 133-138.
- [37] Yum DY, Lee YP, Pan JG. Cloning and expression of a gene cluster encoding three subunits of membrane-bound gluconate dehydrogenase from *Erwinia cyripedii* ATCC 29267 in *Escherichia coli*. J Bacteriol, 1997, 179(21): 6566-6572.
- [38] Toyama H, Furuya N, Saichana I, et al. Membrane-bound, 2-keto-D-gluconate-yielding D-gluconate dehydrogenase from "*Gluconobacter dioxyaceticus*" IFO 3271: molecular properties and gene disruption. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(20): 6551-6556.
- [39] Shinagawa E, Matsushita K, Adachi O, et al. Purification and characterization of 2-keto-D-gluconate dehydrogenase from *Gluconobacter melanogenus*. Agric Biol Chem, 1981, 45(5): 1079-1085.
- [40] Miller JV, Estell DA, Lazarus RA. Purification and characterization of 2,5-diketo-D-gluconate reductase from *Corynebacterium* sp. J Biol Chem, 1987, 262(19): 9016-9020.
- [41] Letunic I, Bork P. 20 years of the SMART protein domain annotation resource. Nucleic Acids Res, 2018, 46(D1): D493-D496.
- [42] Hoshino T, Sugisawa T, Shinjoh M, et al. Membrane-bound D-sorbitol dehydrogenase of *Gluconobacter suboxydans* IFO 3255—enzymatic and genetic characterization. Biochim Biophys Acta, 2003, 1647(1/2): 278-288.
- [43] Sugisawa T, Hoshino T. Purification and properties of membrane-bound D-sorbitol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans* IFO 3255. Biosci Biotechnol Biochem, 2002, 66(1): 57-64.
- [44] Soemphol W, Adachi O, Matsushita K, et al. Distinct physiological roles of two membrane-bound dehydrogenases responsible for D-sorbitol oxidation in *Gluconobacter frateurii*. Biosci Biotechnol Biochem, 2008, 72(3): 842-850.
- [45] Toyama H, Soemphol W, Moonmangmee D, et al. Molecular properties of membrane-bound FAD-containing D-sorbitol dehydrogenase from thermotolerant *Gluconobacter frateurii* isolated from Thailand. Biosci Biotechnol Biochem, 2005, 69(6): 1120-1129.
- [46] Asakura A, Hoshino T. Alcohol/aldehyde dehydrogenase from *Gluconobacter oxydans* DSM 4025 FERM BP-3812: US, 5437989. 1995-08-01.
- [47] Pappenberger G, Hohmann H. Industrial production of L-ascorbic acid (vitamin C) and D-isoascorbic acid//Zorn H, Czermak P, Eds. Biotechnology of Food and Feed Additives. Berlin, Heidelberg: Springer, 2013: 143-188.
- [48] Liu LM, Li Y, Zhang J, et al. Complete genome sequence of the industrial strain *Ketogulonicigenium vulgare* WSH-001. J Bacteriol, 2011, 193(21): 6108-6109.
- [49] Gao LL, Du GC, Zhou JW, 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 *Ketogulonicigenium vulgare* WSH-001. Biotechnol Prog, 2013, 29(6): 1398-1404.
- [50] Soemphol W, Saichana N, Yakushi T, et al.

- Characterization of genes involved in D-sorbitol oxidation in thermotolerant *Gluconobacter frateurii*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2012, 76(8): 1497-1505.
- [51] Soemphol W, Toyama H, Moonmangmee D, et al. L-sorbose reductase and its transcriptional regulator involved in L-sorbose utilization of *Gluconobacter frateurii*. *J Bacteriol*, 2007, 189(13): 4800-4808.
- [52] Toyama H, Mathews FS, Adachi O, et al. Quinohemoprotein alcohol dehydrogenases: structure, function, and physiology. *Arch Biochem Biophys*, 2004, 428(1): 10-21.
- [53] Richhardt J, Luchterhand B, Bringer S, et al. Evidence for a key role of cytochrome *bo3* oxidase in respiratory energy metabolism of *Gluconobacter oxydans*. *J Bacteriol*, 2013, 195(18): 4210-4220.
- [54] 李野, 厉学, 张怡轩. 酮古龙酸菌与呼吸链偶联的 2-KGA 代谢途径研究进展. *微生物学报*, 2014, 54(10): 1101-1108.
- Li Y, Li X, Zhang YX. 2-KGA metabolism coupling respiratory chain in *Ketogulonigenium vulgare*-a review. *Acta Microbiol Sin*, 2014, 54(10): 1101-1108 (in Chinese).
- [55] Ameyama M, Matsushita K, Ohno Y, et al. Existence of a novel prosthetic group, PQQ, in membrane-bound, electron transport chain-linked, primary dehydrogenases of oxidative bacteria. *FEBS Lett*, 1981, 130(2): 179-183.
- [56] Han XD, Xiong XH, Jiang DQ, et al. Crystal structure of L-sorbose dehydrogenase, a pyrroloquinoline quinone-dependent enzyme with homodimeric assembly, from *Ketogulonigenium vulgare*. *Biotechnol Lett*, 2014, 36(5): 1001-1008.
- [57] Yamaoka H, Ferri S, Sode MFK. Essential role of the small subunit of thermostable glucose dehydrogenase from *Burkholderia cepacia*. *Biotechnol Lett*, 2004, 26(22): 1757-1761.
- [58] Shinagawa E, Matsushita K, Adachi O, et al. D-gluconate dehydrogenase, 2-keto-D-gluconate yielding, from *Gluconobacter dioxyaceticus*: purification and characterization. *Agric Biol Chem*, 1984, 48(6): 1517-1522.
- [59] Matsushita K, Toyama H, Yamada M, et al. Quinoproteins: structure, function, and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 58(1): 13-22.
- [60] Fusco G, Göbel G, Zannoni R, et al. Polymer-supported electron transfer of PQQ-dependent glucose dehydrogenase at carbon nanotubes modified by electropolymerized polythiophene copolymers. *Electrochim Acta*, 2017, 248: 64-74.
- [61] Hu YD, Wan H, Li JH, et al. Enhanced production of L-sorbose in an industrial *Gluconobacter oxydans* strain by identification of a strong promoter based on proteomics analysis. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2015, 42(7): 1039-1047.
- [62] 陈吉铭, 堵国成, 陈坚, 等. 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. *食品与生物技术学报*, 2016, 35(6): 611-616.
- Chen JM, Du GC, Chen J, et al. Integration and enhancement of 2-keto-L-gulonic acid synthesis pathway in *Gluconobacter oxydans* from *Ketogulonigenium vulgare*. *Food Sci Biotechnol*, 2016, 35(6): 611-616 (in Chinese).
- [63] 杨燕花, 吕永坤, 陈吉铭, 等. 2-酮基-L-古龙酸一步发酵生产菌株发酵过程优化. *食品与发酵工业*, 2016, 42(7): 60-64.
- Yang YH, Lyu YK, Chen JM, et al. Bioprocess optimization for the production of 2-keto-L-gulonic acid by a one-step fermentation strain. *Food Ferment Ind*, 2016, 42(7): 60-64 (in Chinese).
- [64] Chen S, Jia N, Ding MZ, et al. Comparative analysis of L-sorbose dehydrogenase by docking strategy for 2-keto-L-gulonic acid production in *Ketogulonigenium vulgare* and *Bacillus endophyticus* consortium. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2016, 43(11): 1507-1516.
- [65] 高书颖, 张惟材, 汪建华, 等. 山梨糖脱氢酶和氨甲酰化酶的融合表达. *生物技术通讯*, 2005, 16(2): 144-146.
- Gao SY, Zhang WC, Wang JH, et al. Fusion expression of sorbose dehydrogenase and N-carbamoylase. *Letts Biotechnol*, 2005, 16(2): 144-146 (in Chinese).
- [66] 韦娜, 陈惠鹏, 张惟材. SDH-SV2C-L4 融合蛋白的表达及山梨糖脱氢酶活性检测. *生物技术通讯*, 2011, 22(3): 354-357.
- Wei N, Chen HP, Zhang WC. Expression of the

- fusion protein SDH-SV2C-L4 and detection of its SDH activity. *Lett Biotechnol*, 2011, 22(3): 354-357 (in Chinese).
- [67] 高书颖, 张惟材, 汪建华, 等. 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.
- Gao SY, Zhang WC, Wang JH, et al. Integration and expression of *sdh* gene in *Escherichia coli*. *Acta Microbiol Sin*, 2005, 45(1): 139-141 (in Chinese).
- [68] 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.
- Zhao Y, Zhang WC, Chen HP. Expression of sorbose dehydrogenase in *Gluconobacter* with Tn5 transposon. *Lett Biotechnol*, 2007, 18(5): 727-730 (in Chinese).
- [69] 熊向华, 陈伟, 汪建华, 等. 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.
- Xiong XH, Chen W, Wang JH, et al. Expression of sorbose dehydrogenase in *Acinetobacter calcoaceticus*. *Lett Biotechnol*, 2010, 21(6): 783-786 (in Chinese).
- [70] 朱斌, 熊向华, 汪建华, 等. 山梨糖脱氢酶在脱氮副球菌中的表达. *生物技术通讯*, 2012, 23(2): 204-206.
- Zhu B, Xiong XH, Wang JH, et al. Expression of sorbose dehydrogenase in *Paracoccus denitrificans*. *Lett Biotechnol*, 2012, 23(2): 204-206 (in Chinese).
- [71] Chen Y, Liu L, Shan XY, et al. High-throughput screening of a 2-keto-L-gulonic acid-producing *Gluconobacter oxydans* strain based on related dehydrogenases. *Front Bioeng Biotechnol*, 2019, 7: 385.
- [72] 侯伟, 熊向华, 陈微微, 等. 氧化葡萄糖杆菌 *sndh-sdh* 基因簇的克隆表达. *生物技术通讯*, 2012, 23(3): 389-392.
- Hou W, Xiong XH, Chen WW, et al. Cloning, expression and activity analysis of *sndh-sdh* gene cluster of *Gluconobacter oxydans*. *Lett Biotechnol*, 2012, 23(3): 389-392 (in Chinese).
- [73] Wang EX, Ding MZ, Ma Q, et al. Reorganization of a synthetic microbial consortium for one-step vitamin C fermentation. *Microb Cell Fact*, 2016, 15: 21.
- [74] Hoshino T, Sugisawa T, Tazoe M, et al. Metabolic pathway for 2-keto-L-gulonic acid formation in *Gluconobacter melanogenus* IFO 3293. *Agric Biol Chem*, 1990, 54(5): 1211-1218.
- [75] 蒋宇扬, 郭振勇, 靳素英, 等. 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, 14(3): 339-341.
- Jiang YY, Guo ZY, Jin SY, et al. Study on 2-keto-L-gulonate reductase in vitamin C fermentation. *Chin J Biotech*, 1998, 14(3): 339-341 (in Chinese).
- [76] 蒋宇扬, 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. *生物工程学报*, 1997, 13(4): 400-405.
- Jiang YY, Guo ZY, Zhang CG. Study on the purification of 2-keto-L-gulonate reductase and its physical, chemical and enzymic properties. *Chin J Biotech*, 1997, 13(4): 400-405 (in Chinese).
- [77] Strophane RM, Perlman D. Fermentation of glucose by *Acetobacter melanogenus*. *Biotechnol Bioeng*, 1977, 19(4): 459-465.
- [78] Sonoyama T, Tani H, Matsuda K, et al. Production of 2-keto-L-gulonic acid from D-glucose by two-stage fermentation. *Appl Environ Microbiol*, 1982, 43(5): 1064-1069.
- [79] Qazi GN, Parshad R, Verma V, et al. Diketo-gluconate fermentation by *Gluconobacter oxydans*. *Enzyme Microb Technol*, 1991, 13(6): 504-507.
- [80] 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 Mol Evol*, 2002, 55(6): 623-631.
- [81] Richhardt J, Bringer S, Bott M. Role of the pentose phosphate pathway and the Entner-Doudoroff pathway in glucose metabolism of *Gluconobacter oxydans* 621H. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(10): 4315-4323.
- [82] 陈策实, 尹光琳. 棒状杆菌 2,5-DKG 还原酶基因在欧文氏菌中的表达. *生物工程学报*, 1999, 15(2): 3-5.
- Chen CS, Yin GL. Expression of 2,5-DKG reductase I gene from *Corynebacterium* in *Erwinia* SCB125. *Chin J Biotech*, 1999, 15(2): 3-5 (in Chinese).
- [83] Shan XY, Liu L, Zeng WZ, et al. High throughput screening platform for a FAD-dependent L-sorbose dehydrogenase. *Front Bioeng Biotech*, 2020, 8: 194.

(本文责编 陈宏宇)