

基于组学技术的维生素 C 二步混菌发酵研究进展

张博, 张倩, 郭瑞, 吕淑霞*

沈阳农业大学生物科学技术学院, 辽宁 沈阳 110866

张博, 张倩, 郭瑞, 吕淑霞. 基于组学技术的维生素 C 二步混菌发酵研究进展[J]. 微生物学通报, 2023, 50(5): 2191-2203.

ZHANG Bo, ZHANG Qian, GUO Rui, LYU Shuxia. Two-step fermentation of vitamin C with mixed bacteria based on omics: a review[J]. Microbiology China, 2023, 50(5): 2191-2203.

摘要: 二步发酵法是工业化生产维生素 C (vitamin C, Vc) 的主要方法, 其中第二步由伴生菌与产酸菌(普通生酮基古龙酸菌)组合进行混菌发酵产生 Vc 前体 2-酮基-L-古龙酸(2-keto-L-gluonic acid, 2-KLG)的机制, 一直是科研人员研究的重要科学问题。通过高通量基因组学、转录组学、蛋白组学、代谢组学等组学技术揭示生物系统中各个组分相互作用关系已经成为主要的研究手段。本文对近年来利用组学技术解析 Vc 混菌发酵中两菌互作关系、解除发酵系统的氧化胁迫、伴生活性物质、产酸菌群体感应、外源添加物、基因工程改造产酸菌促进产 2-KLG 等方面的研究进行综述, 并为进一步的探索和深入研究提供思路。

关键词: 维生素 C; 2-酮基-L-古龙酸; 混菌发酵; 相互作用机制

Two-step fermentation of vitamin C with mixed bacteria based on omics: a review

ZHANG Bo, ZHANG Qian, GUO Rui, LYU Shuxia*

College of Bioscience and Biotechnology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, Liaoning, China

Abstract: Two-step fermentation is the main method for the industrial production of vitamin C (Vc). The mechanism for the production of Vc precursor 2-keto-L-gluonic acid (2-KLG) in the second step with mixed bacteria composed of companion strain and 2-KLG-producing *Ketogulonigenium vulgare* has been a research focus. It has become a common method to reveal the interactions of various components in biological systems through high-throughput genomics, transcriptomics, proteomics, metabolomics and other omics. In this paper, we summarized the

资助项目: 国家自然科学基金(31370077); 辽宁省自然科学基金(20170540800)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31370077) and the Natural Science Foundation of Liaoning Province (20170540800).

*Corresponding author. E-mail: lushuxia@syau.edu.cn

Received: 2022-08-07; Accepted: 2022-10-09; Published online: 2022-11-28

research on the use of omics in elucidating the interactions between two bacteria in fermentation of Vc, the relief of oxidative stress, companion active substances, quorum sensing in *K. vulgare*, exogenous additives, and genetic modification of *K. vulgare* to promote 2-KLG production, providing ideas for further exploration and research.

Keywords: vitamin C; 2-keto-L-gulonic acid; fermentation with mixed bacteria; interaction mechanism

维生素 C (vitamin C, Vc), 又称 L-抗坏血酸(L-ascorbic acid, L-AA), 由于其具有清除自由基、抗氧化、中和毒素、促进抗体生成、分解皮肤中黑色素、预防色素沉着及促进禽畜生长发育等作用, 已广泛应用于保健品、药品、食品添加剂、化妆品营养剂、饲料等产业, 在全球维生素市场中占有巨大份额^[1]。工业化生产 Vc 的“二步发酵法”第一步由氧化葡萄糖杆菌(*Gluconobacter oxydans*)或生黑醋酸杆菌(*Gluconobacter melanogenus*)将 D-山梨醇转化为 L-山梨糖, 第二步再由芽孢杆菌属(*Bacillus*)伴生的普通生酮基古龙酸杆菌(*Ketogulonigenium vulgare*)将 L-山梨糖转化为 Vc 前体 2-酮基-L-古龙酸(2-keto-L-gulonic acid, 2-KLG)。在第二步混菌发酵体系中, 产酸菌 *K. vulgare* (俗称小菌)具有山梨糖脱氢酶(sorbose dehydrogenase, SDH)和山梨酮脱氢酶(sorbose dehydrogenase, SNDH), 但 *K. vulgare* 单独培养时生长缓慢且无法大量产酸; 在作为伴生菌的芽孢杆菌(俗称大菌, 无产 2-KLG 相关基因)存在时, 产酸菌才能够大量生长和产酸, 目前促进 *K. vulgare* 大量产酸的伴生菌基本都为芽孢杆菌属(*Bacillus*), 如巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、内生芽孢杆菌(*Bacillus endophyticus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)等; 此外, 某些酵母菌如掷孢酵母(*Sporobolomyces roseus*)和胶红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*)也能够促进 *K. vulgare* 大量产酸^[2]。工业生产

中所用伴生菌皆为芽孢杆菌, *K. vulgare* 与芽孢杆菌的相互作用关系, 以及芽孢杆菌促进 *K. vulgare* 大量产酸的机制等问题引起了科研人员的浓厚兴趣。

本文就近年来各组学分析研究 Vc 混菌发酵中伴生菌与产酸菌互作关系, 以及解除氧化胁迫、伴生活性物质、产酸菌群体感应、外源添加物、基因工程改造产酸菌促进其产 2-KLG 的研究进行综述, 以期后续研究提供思路。

1 基于组学的研究

借助多个组学水平的试验数据和生物信息学分析能够为两菌的相互作用关系提供更多的信息, 从整体上解释伴生菌促进产酸菌生长与产酸的机制。通过对组学数据的发掘, 科研人员获得了许多突破性的研究进展, 为提高产酸菌 2-KLG 产量提供了重要的理论依据。

1.1 基于基因组学的研究

产酸菌为革兰氏阴性菌, Urbance 等^[3]将能够利用 L-山梨糖转化为 2-酮基-L-古龙酸的产酸菌划分为一个新属即 *Ketogulonigenium*, 包括 *vulgare* 种和 *robustum* 种。新种属划分以来, 科研人员已筛选了多株产酸菌和伴生菌并对它们进行了全基因组测序(表 1)。对 *K. vulgare* WB0104 全序列分析注释结果表明, 产酸菌 DNA 复制系统相关基因较为完善, 但 DNA 修复系统不完善, 含有丰富的具有转录调节功能蛋白的编码基因, 转运蛋白基因总长占整个基因组总长的五分之一以上^[4]。*K. vulgare* WSH-001

表 1 维生素 C 生产菌株基因组信息

Table 1 Genome information of vitamin C producing strains

Strains	Genome scale (Mb)	G+C content (%)	Number of proteins	rRNA	tRNA	SDH	SNDH	Accession No.	References
产酸菌 Acid-producing bacteria									
<i>K. vulgare</i> WB0104	3.3	61.7	3 196	5	58	\	\	\	[4]
<i>K. vulgare</i> Hbe602	3.3	61.7	3 178	15	58	6	2	CP012908	[5]
<i>K. vulgare</i> WSH-001	3.3	61.7	3 115	15	58	5	2	CP002018	[6]
<i>K. vulgare</i> Y25	3.3	61.7	2 983	15	60	5	2	CP002224	[7]
<i>K. vulgare</i> SPU B805	3.0	61.7	2 947	15	59	5	1	CP017622	[8]
<i>K. vulgare</i> SKV	3.0	61.7	2 851	15	59	6	1	CP016592	[9]
<i>K. robustum</i> SPU_B003	2.7	62.3	2 545	18	61	3	2	CP019937	[10]
伴生菌 Companion bacteria									
<i>B. megaterium</i> WSH-002	5.1	39.0	5 274	33	117	*	*	CP003017	[11]
<i>B. endophyticus</i> Hbe603	4.9	36.6	5 038	33	81	*	*	CP011974	[12]
<i>B. thuringiensis</i> Bc601	6.1	35.3	5 931	39	107	*	*	CP015150	[12]
<i>B. megaterium</i> QM B1551	5.5	38.2	5 629	37	137	*	*	CP001983	[13]
<i>B. megaterium</i> DSM319	5.1	38.2	5 124	33	114	*	*	CP001982	[13]

\: 未给出明确信息; \\\: 基因组序列未提交到公共数据库; *: 此物种不存在该基因

\: No clear information is given; \\\: The genome sequence has not been submitted to the public database; *: The gene is not present in this species.

除三羧酸循环和磷酸戊糖途径外的其他碳代谢途径均存在关键基因的缺失, 甚至存在整条代谢途径的缺失, 并且 8 种氨基酸(组氨酸、脯氨酸、蛋氨酸、苏氨酸、甘氨酸、赖氨酸、亮氨酸和异亮氨酸)的从头合成途径存在一个或多个关键酶的缺失, 而脯氨酸、苏氨酸、甘氨酸和异亮氨酸在产酸菌的生长和 2-KLG 的产生中起重要作用^[14]。

将产酸菌 *K. vulgare* Hbe602 与 WSH-001 和 Y25 基因组序列比对发现其具有较高相似性, 对于相似性低于 90% 的基因通过比对发现主要为蛋白水解酶和转运蛋白, Hbe602 编码 18 种蛋白酶、48 种多肽和近 380 种转运相关蛋白, 推测能够帮助其有效分解利用环境和伴生菌提供的相关物质^[5]。基因组序列比对结果表明 *K. vulgare* SPU B805 与 SKV 相似性最高, SPU B805 无环状质粒, SPU B805 是首次发现在无质粒的情况下产 2-KLG 的产酸菌; 除 SKV

含一条环状质粒外, Hbe602、WSH-001、Y25 和 WB0104 均含有两条环状质粒; *K. vulgare* SPU B805 和 SKV 具有完整的 PPP 和 TCA 途径, 但 EMP 和 ED 途径不完整, Hbe602、WSH-001 和 Y25 含有完整的 PPP、ED 和 TCA 途径, 但 EMP 途径不完整; 此外, 通过基因组注释发现 SPU B805 氨基酸代谢相关基因所占比例最高为 15%, 但 SPU B805 却缺失了组氨酸醇磷酸酶、亮氨酸-丙氨酸转氨酶、丙氨酸转氨酶和天冬酰胺合成酶基因, 从而导致组氨酸、丙氨酸和天冬酰胺的生物合成途径不完整, 在 WSH-001 中, 多数氨基酸如组氨酸、甘氨酸、赖氨酸、脯氨酸、苏氨酸、蛋氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成途径不完整是由于缺少一种或多种关键酶, 而这些氨基酸生物合成途径的缺陷会减弱核酸和蛋白质的生物合成, 从而造成菌体生长弱^[8]。

Wang 等^[10]报道了一株单独发酵时 2-KLG 产

量高于 *K. vulgare* 的菌株 *K. robustum* SPU_B003, 与已报道的 *K. vulgare* 基因组相比, *K. robustum* SPU_B003 包含更多的 tRNAs、rRNAs、NAD 和 NADP 合成基因, 以及调控和细胞信号转导相关的基因; 此外, *K. robustum* SPU_B003 氨基酸合成途径比 *K. vulgare* 更完整, 因此推测完整的生物合成途径有助于提高产酸菌 2-KLG 产量。

伴生菌为革兰氏阳性菌, 能产生抗力内生孢子。与产酸菌相比, 伴生菌 *B. megaterium* WSH-002 的碳水化合物、氨基酸、辅酶与维生素转运和代谢途径相对完整, 负责蛋白质合成和分泌的基因占 9.26%, DNA 复制和修复系统也比较完善^[2]。伴生菌 *B. endophyticus* Hbe603 具有完整的产孢周期, 包含大量的转录因子, 具有丰富的转录调控蛋白来响应外界环境的变化, 与 *B. endophyticus* Hbe603 相比, *B. thuringiensis* Bc601 对外界环境的响应能力更强, 具有的双组分系统、孢衣和肽聚糖生物合成相关蛋白更多; 在营养物质的生物合成能力方面, 菌株 Bc601 中与碳水化合物运输和代谢相关的基因、能量产生和转化相关的基因及脂质代谢相关的基因均少于菌株 Hbe603; 在氨基酸代谢中, 菌株 Hbe603 比 Bc601 含有更多赖氨酸降解相关基因, 在酪氨酸代谢中, 两株菌都缺乏足够的基因, 在色氨酸代谢中, 两株菌都缺乏降解途径, 但两株菌均具有完整的苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成途径, 并且只有菌株 Bc601 具有将苯丙氨酸转化为酪氨酸的苯丙氨酸羟化酶; 菌株 Bc601 的谷胱甘肽代谢不完善, 菌株 Hbe603 含有 5 种能将谷胱甘肽转化为甘氨酸、半胱氨酸和谷氨酸的 γ -谷氨酰转肽酶; 在辅因子代谢和维生素代谢中, 两株菌均具有完整的叶酸、血红素、泛酸和辅酶 A 的生物合成途径, 但硫辛酸和生物素的生物合成途径存在缺陷, 而两株菌对外界环境的响应和营养物质合成的不同可

能反映了不同的伴生机制^[12]。

B. endophyticus Hbe603 与 *B. megaterium* QM B1551 有较近的亲缘关系, 菌株 Hbe603 与细胞膜生物合成和信号转导相关的基因数量低于 QM B1551, 而与碳水化合物转运和代谢、能量生产和转换及脂质运输和代谢相关的基因数量与菌株 QM B1551 相似; 此外, 将 *B. endophyticus* Hbe603 的芽孢形成相关基因与其他芽孢杆菌的芽孢形成相关基因进行了比较分析, 在与芽孢外衣有关的基因中, *B. endophyticus* Hbe603 只有 *cotA* 和 *cotE*, 缺少在 *B. subtilis* 中注释的 *cotB*、*cotC*、*cotG*、*cotM*、*cotO*、*cotY* 和 *ytxO*; 在与皮层有关的基因中, *B. endophyticus* Hbe603 有 *cotD*、*cotJA*、*cotJB*、*cotJC*、*cotF*、*yutH*、*yaaH*、*yheC* 和 *yheD*, 缺少在 *B. subtilis* 中注释的 *cotH*、*ymaG*、*cotT*、*yxeE*、*yeeK* 和 *ysnD*, *B. endophyticus* Hbe603 和 *B. megaterium* 都缺乏一些编码芽孢外衣糖基化的糖基转移酶的操纵子, 而这些相关基因的缺乏可能对伴生菌促进产酸菌产酸起到积极作用^[15]。

1.2 基于转录组学的研究

转录组学分析发现在混菌发酵过程中产酸菌 *K. vulgare* SPU B805 与碳水化合物代谢(PPP 和 TCA)相关的基因都具有较高的转录水平, 但与 EMP 和 ED 代谢途径相关的 6-磷酸果糖激酶编码基因(*pfk*)、葡萄糖酸 2-脱氢酶编码基因(*ga2dh*)、磷酸葡萄糖酸脱水酶编码基因(*edd*)和 2-酮-3-脱氧-6-磷酸葡萄糖酸醛缩酶编码基因(*eda*)的转录信号均未检测到, 证实产酸菌 *K. vulgare* SPU B805 的 EMP 和 ED 代谢途径是不完整的, 其胞质碳代谢主要通过 PPP 途径进行^[8]。

基于设计合成的 *K. vulgare* WSH-001 全基因组表达芯片, 对产酸菌在混菌发酵和单菌发酵下从转录水平进行研究发现, 在混菌发酵中产酸菌编码寡肽和氨基酸的 ABC 转运蛋白的

基因显著上调, 这些转运蛋白能够帮助产酸菌在消耗较少能量的情况下吸收利用其生长所需的氨基酸; 在单菌发酵下产酸菌中大量与铁转运和代谢相关的基因表达上调, 而铁元素能够形成 Fe-S 簇或血红素从而参与细胞众多代谢过程; 此外, 产酸菌 Fe-S 簇组装转录调节子 *suf* 操纵子中编码固氮酶辅因子合成蛋白出现上调, 该蛋白可以作为 Fe-S 簇合成的硫供体, *SUF* 系统是细菌细胞处于氧化胁迫或铁限制条件下的 Fe-S 簇合成途径, 而 *suf* 操纵子在受到氧化胁迫时上调, 以此来弥补由氧化胁迫失活的 Fe-S 簇组装转录调节子 *isc* 操纵子的功能, 因此推测产酸菌在单菌发酵过程中受到了自身氧化胁迫^[16]。

1.3 基于蛋白组学的研究

对单菌发酵和混菌发酵状态下胞内蛋白双向电泳(2-DE)表达图谱进行分析发现, 在伴生菌(*B. megaterium* WSH-002)伴生时产酸菌中核糖体结构组成、蛋白质翻译及氨基酸代谢相关蛋白大量表达, 同时伴生菌还增加了产酸菌辅因子代谢、次级代谢产物代谢、细胞壁及细胞膜合成等相关蛋白表达^[17]。此外, Ma 等^[18]构建了“二步发酵法”中第一步的氧化葡萄糖酸杆菌(*G. oxydans*)与第二步中的产酸菌(*K. vulgare*)和伴生菌(*B. endophyticus*)联合在一起的混菌发酵体系, 通过蛋白质组学研究发现, 产酸菌(*K. vulgare*)上调的蛋白中, 6-磷酸葡萄糖脱氢酶、6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶和醛酸转移酶参与 PPP, 表明随着混合菌发酵的进行, PPP 这一碳代谢的主要途径得到了增强; 同时结合代谢组学研究表明, 伴生菌(*B. endophyticus*)和氧化葡萄糖酸杆菌(*G. oxydans*)的存在提供了额外的营养物质促进了产酸菌(*K. vulgare*)的生长, 并通过提供更多的底物促进了 2-KLG 的生成。

作为伴生菌的芽孢杆菌都能够产生芽孢,

通过时序蛋白质组学发现, 在混菌发酵中, 产酸菌(*K. vulgare*)抵御活性氧胁迫的超氧化物歧化酶、谷胱甘肽转移酶、NADPH:醌氧化还原酶几个重要的脱氢酶在伴生菌(*B. megaterium*)生成芽孢时段上调, 一些参与山梨糖转化途径(山梨糖/山梨酮脱氢酶)、糖酵解途径(3-磷酸甘油醛脱氢酶)、三羧酸循环(苹果酸脱氢酶)和氨基酸代谢(磷酸甘油酸脱氢酶, 高丝氨酸脱氢酶)的酶表达变化与伴生菌的产孢时段一致, 高于其他时段^[19]。Zhu 等^[20]将伴生菌(*B. megaterium* WSH-002)芽孢形成基因 *spoOA* 和芽孢稳定性基因 *spoVFA* 分别敲除后与产酸菌组成进行混菌发酵, 结果产酸菌的酸转化率及细胞数出现显著下降。因此, 伴生菌产孢过程对于促进产酸菌生长和 2-KLG 形成起到关键性作用。

1.4 基于代谢组学的研究

研究人员通过基因组分析发现, 产酸菌在氨基酸合成途径和一些碳代谢途径存在关键基因的缺失外, 还存在多条其他代谢途径的缺失。Huang 等^[21]构建了 *K. vulgare* 全基因组规模的代谢模型(genome-scale metabolic model, GSMM) iWZ663, 发现产酸菌硫酸根代谢通路中缺失磷酸腺苷酰磷酸硫酸还原酶和腺苷酰硫酸还原酶, 会导致与碳水化合物、脂质和氨基酸等相关 18 个代谢反应的底物 CoA 合成受到阻碍, 因此推测硫酸盐代谢途径的缺失是产酸菌生长微弱的原因之一。之后, Ye 等^[22]在 *K. vulgare* 和 *B. megaterium* 两株菌全基因组规模的代谢模型(GSMM)基础上构建了两菌株化学计量代谢模型(iWZ-KV-663-BM-1055), 发现产酸菌的叶酸合成途径并不完整, 而叶酸合成子系统在伴生菌 *B. megaterium* 中是独有的, 推测当产酸菌与伴生菌共培养时, 叶酸和其前体可能会从伴生菌中分泌出来, 从而促进产酸菌的生长和 2-KLG 的产生; 此外, 通过流平衡分析(flux

balance analysis, FBA)发现伴生菌不仅提供产酸菌生长的必需营养物质,而且还提供其他非必需代谢产物如嘌呤和嘧啶,辅因子和氨基酸,以及 TCA 循环的中间产物来促进产酸菌生长。

贾楠^[23]通过比较基因组学与代谢组学研究了伴生菌(*B. thuringiensis* Bc601)与产酸菌(*K. vulgare*)继代共培养的适应机制,结果显示,在经过 150 代的继代培养后两株菌生长、抗氧化、转录和调控能力均显著增强,同时继代培养后的伴生菌(*B. thuringiensis* Bc601)氨基酸通透酶和产酸菌(*K. vulgare*)酰胺水解酶基因的突变使两株菌中部分氨基酸含量升高,并进一步增强了两株菌的代谢交换和生长能力。Ma 等^[19]通过时序蛋白质组学和代谢组学整合分析发现,在混菌发酵 18 h 后两株菌细胞内鸟嘌呤、腺嘌呤、次黄嘌呤和黄嘌呤的含量出现明显下降,而产酸菌(*K. vulgare*)中腺嘌呤磷酸核糖转移酶和黄嘌呤磷酸核糖转移酶的相对表达量在 18 h 和 23 h 时急剧上升,在单培养的产酸菌(*K. vulgare*)中加入鸟嘌呤、腺嘌呤、次黄嘌呤和黄嘌呤的混合物后,结果表明最终嘌呤混合物使产酸菌(*K. vulgare*)的生长提高了 1.4 倍, 2-KLG 产量提高了 1.6 倍。

借助胞内代谢组学分析发现,产酸菌(*K. vulgare* Hbe602)胞内仅能检测到 10 种氨基酸且表达量都处于较低的水平,并且产酸菌(*K. vulgare* Hbe602)缺乏足够的辅因子及核酸物质^[23]。在共培养时,伴生菌(*B. megaterium* HB601)能够释放大量的赤藓糖、赤藓糖醇、肌醇和鸟嘌呤这些代谢产物供产酸菌利用^[24]。同时继代共培养后的代谢组学分析表明,在继代过程中伴生菌(*B. cereus* HB601)能够向产酸菌(*K. vulgare* HB602)提供更多的营养物质(主要是氨基酸和嘌呤),同时产酸菌(*K. vulgare* HB602)增强了蛋白质降解和氨基酸转运能力^[25]。因此,

在混菌发酵过程中伴生菌能够弥补产酸菌代谢缺陷,从而促进产酸菌的生长与产酸。

2 基于组学分析促进产酸菌生长与产酸的研究

通过各组学分析揭示了 Vc 混菌发酵系统中两菌间的相互作用关系,获得了一些伴生菌促进产酸菌生长与产酸的推论,但需要进一步的试验来验证所获得的推论,才能够准确阐明混菌发酵时产酸菌大量产酸的原因。

2.1 解除产酸菌受到的氧化胁迫

前述转录组分析推测产酸菌在单独生长时受到氧化胁迫,同时麻浩等^[26]利用蛋白组学手段对混菌发酵过程中与产酸菌(*K. vulgare*)产 2-KLG 相关的蛋白进行了筛选,通过二维电泳及质谱鉴定发现,产酸菌(*K. vulgare*)和产酸相关的蛋白质中谷胱甘肽转移酶、巯基抗氧化蛋白、烷基氢过氧化物酶、超氧化物歧化酶(SOD)这 4 种参与抵抗活性氧(ROS)的抗氧化蛋白表达量曲线,与产酸菌产 2-KLG 的曲线呈近似正相关。

ROS 是好氧生物进行有氧代谢时产生的有害副产物,包括过氧化氢、羟自由基以及超氧阴离子自由基等^[27]。当 ROS 水平升高时会导致氧化应激,破坏细胞生物大分子(DNA、蛋白质和脂质),从而使细胞生长缓慢^[28]。产酸菌(*K. vulgare* 25B-1)在单独发酵时体系中的过氧化氢是混菌体系的 2.7–5.7 倍^[29],而且单菌体系清除过氧化氢的过氧化氢酶(CAT)活力远低于混菌发酵体系,从而使产酸菌(*K. vulgare* 25B-1)在生长过程中活性氧积累导致生长弱、产酸低^[30]。在混菌发酵过程中,伴生菌(*B. endophyticus* ST-1)加速了产酸菌(*K. vulgare* 25B-1)生长,同时产酸菌积累了大量 ROS,氧

化应激信号可传递给伴生菌使超氧化物歧化酶(*sodA*)、过氧化氢酶(*katE*)和谷胱甘肽过氧化物酶(*gp*)等抗氧化和调节氧化还原状态有关基因上调,而后在伴生菌芽孢形成时细胞裂解释放抗氧化相关的活性物质^[31]。因此推测,混菌发酵过程中伴生菌促进产酸菌产酸(2-KLG)的原因之一是由于伴生菌受到氧化胁迫后释放胞内抗氧化物质,从而提高了产酸菌抵抗 ROS 的能力并改善了细胞内的氧化还原状态。

Huang 等^[32]研究了混菌发酵体系中谷胱甘肽氧化还原系统[氧化型谷胱甘肽(oxidized glutathione, GSSG)/还原型谷胱甘肽(reduced glutathione, GSH)]对活性氧的清除作用,发现 GSH 单独存在时主要清除胞内活性氧, GSH 和 GSSG 共存时主要清除胞外活性氧,而且 GSSG 对 GSH 清除活性具有协同作用,当发酵体系添加的 GSH/GSSG 浓度比为 50:1 时为最佳比例,与对照相比产酸菌(*K. vulgare* 25B-1) 2-KLG 产量提高了 40.63%且发酵周期缩短了 24 h;此外,通过透射电镜发现, GSH/GSSG 体系中产酸菌出现细胞膜面积增大现象,而这有利于 SDH 和 SNDH 的表达从而增加产酸菌 2-KLG 产量。

2.2 伴生菌活性物质

伴生菌本身不具有将 L-山梨糖转化为 2-KLG 的代谢途径,但其代谢过程中释放出的生物活性物质能促进产酸菌的产酸^[33]。冯树等^[34]采用超滤分离、凝胶层析及聚丙烯酰胺凝胶电泳技术,对伴生菌(*B. megaterium* 833-25)胞外液中具有促进产酸作用的活性物质进行了分离和纯化,得到一种分子量约为 35 kDa 的蛋白质,能够促进产酸菌将 L-山梨糖转化为 2-KLG。吕淑霞等^[35]通过硫酸铵分级沉淀、柱层析及电泳技术对伴生菌(*B. megaterium* 25-B)胞外活性物质进行分离纯化,得到 33 kDa 和

44.3 kDa 的两种蛋白质添加到产酸菌发酵培养液中,与对照相比产酸菌 SDH 酶活提高 72.5%,而且 2-KLG 产量为单菌发酵的 15.78 倍,对于不同学者纯化的活性蛋白质分子质量存在差异可能是纯化方式及不同的伴生菌种类所致。在伴生菌(*B. megaterium* 2980)还未形成芽孢时,伴生菌胞内液、胞外液对产酸菌(*K. vulgare*)生长和产酸有较低的促进作用,并且胞内液的促进能力大于胞外液;而在生成芽孢后,伴生菌胞外液促进产酸菌生长和产酸的能力显著提高^[36],因此推测伴生菌是在产孢后将体内的蛋白活性物质释放从而促进产酸菌生长与产酸。

Jia 等^[15]通过蛋白定位分析检测了伴生菌(*B. endophyticus* Hbe603)释放到胞外环境的蛋白质,发现除产孢和鞭毛相关的蛋白质外,还有降解大分子物质的氨基酸酶、多糖脱乙酰酶和胞外酯酶,此外还有去除超氧化物保护细胞免受氧化损伤的超氧化物歧化酶和一些氧化还原酶类蛋白。截至目前,对于能够促进产酸菌产酸的具体蛋白质却并无明确鉴定,因此对于伴生菌释放的活性伴生物质还需要继续深入研究。

2.3 产酸菌的群体感应

细菌中普遍存在信息交流,在混菌系统中与菌信号转导相关的作用对其自身具有重要意义^[37]。Vc 混菌发酵中的伴生菌芽孢杆菌中广泛存在着与革兰氏阴性菌群体感应(quorum sensing, QS)相关的群体淬灭酶^[38],群体淬灭酶是细胞质酶^[39],其释放到细胞外部环境伴随着细胞裂解^[40]。群体淬灭酶能够将革兰氏阴性菌的酰基高丝氨酸内酯(N-acyl-homoserine lactone, AHL)信号分子降解,从而影响革兰氏阴性菌的群体感应^[41-42]。

群体感应(QS)是细菌依赖于细胞密度控制自身基因表达和协调菌群行为的一种机制,在革兰氏阴性菌的 QS 中,细菌能够利用产生的

AHL 信号分子在细胞间的扩散来感知自身和周围环境中其他细菌的数量变化,当信号分子的浓度达到一定阈值时会与转录活性蛋白结合,进而调控特定基因的表达^[43]。例如,有些革兰氏阴性菌的 QS 能够控制过氧化氢酶和超氧化物歧化酶基因的表达^[44-45],而过氧化氢酶和超氧化物歧化酶对于细菌抵抗 ROS 起着至关重要的作用。此外,有研究表明一些革兰氏阴性菌的 QS 能够调节菌体糖代谢相关基因和初级代谢相关基因,限制细菌对糖原的摄取并减缓细菌的初级代谢,因为在环境营养有限的条件下高细胞密度是不利于细菌生存的,因此通过限制营养摄取和减缓代谢能够提高细菌在稳定期的存活率,延长细菌在拥挤条件下的存活时间,确保个体的初级代谢稳态^[46-48]。

通过 NCBI 对全基因组测序的各产酸菌菌株查询发现均具有完整的群体感应系统(AHL 合成酶和转录活性蛋白受体)。先前研究表明产酸菌的产酸量与菌细胞数量呈正相关^[49],而 QS 又是基于细菌细胞密度的重要信号交流机制,在产酸菌单菌发酵时菌细胞数量及产酸量均处于较低的水平,因此,产酸菌的 QS 对于菌体自身是不是具有“代谢刹车作用”,在混菌发酵中伴生菌产生的群体淬灭酶作用于产酸菌的群体感应后对产酸菌细胞密度及自身代谢的影响如何,是不是对其生长和产酸起到重要的作用,目前这些两菌信号转导之间的相互作用并未得到广泛研究,所以对于产酸菌的群体感应及伴生菌对产酸菌群体感应的作用还需进一步深入探索。

2.4 外源添加物质

Huang 等^[21]在 pH 值稳定为 7.0 的混菌发酵罐中添加了谷胱甘肽,结果显示谷胱甘肽对产酸菌(*K. vulgare* WSH-001)产酸起到积极作用,与对照相比谷胱甘肽使发酵时间缩短 20.1%,

而且 2-KLG 产量提高了 20.9%。Ma 等^[50]对还原性谷胱甘肽作用下的产酸菌进行了比较蛋白质组学分析,蛋白质组学数据主成分分析显示,添加谷胱甘肽后产酸菌(*K. vulgare*)中与细胞膜功能相关的寡肽转运蛋白、硫胺素(vitamin B₁, VB₁)/焦磷酸硫胺素(thiamine pyrophosphate, TPP)转运蛋白、膜结合脱氢酶和维持膜完整性蛋白的表达量显著增加,而硫胺素转运获得的辅酶 TPP 能够增强 PPP 和 TCA 循环的酶活性,从而产生更多的 NADPH 形式的还原力和 ATP 形式的能量,进而用于对抗细胞内的 ROS。

此外,代谢组学分析表明,产酸菌由于缺乏相关生长代谢物质从而导致长势较弱,所以通过外源添加某些营养物质能够对产酸菌生长和产酸起到一定的促进作用。例如,适量的含氮碱基、谷氨酸单钠(monosodium glutamate, MSG)、腺苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)、二氢叶酸(dihydrofolic acid, FH₂)都能够促进产酸菌(*K. vulgare*)增殖并提高 2-KLG 产量^[51]。樊世存^[52]将不同浓度乙醛酸分别加入以玉米浆为培养基的混菌发酵体系中,结果表明产酸菌(*K. vulgare* WSH-001)生物量与产酸量随着乙醛酸量增加而增加,乙醛酸添加量为 0.5 g/L 时,产酸菌生物量、产酸量和产酸强度分别比对照提升 33.3%、5.1%与 5.7%。张倩等^[53-54]将从伴生菌(*B. pumilus* SH-B9)培养液中分离纯化的铁载体加入单独产酸菌(*K. vulgare* 25B-1)发酵体系中,结果表明,铁载体能显著提高产酸菌的产酸能力,而且铁载体浓度与促产酸菌产酸能力成正比。在混菌体系中添加不同的稀土离子(La³⁺、Ce³⁺、Nd³⁺、Sm³⁺),结果发现一定量的稀土离子也能够对产酸菌(*K. vulgare*)生长起到促进作用^[55]。由此表明,通过外源添加与生长代谢相关的物质能够一定程度上促进产酸菌生长与产酸,印证了产酸菌生长产酸弱的原因之

一是由于营养物质的匮乏。

2.5 产酸菌的基因工程改造

针对产酸菌细胞合成代谢途径某些关键基因的缺失导致生长产酸弱的问题, 通过基因工程手段对其进行改造能够使产酸菌的生长得到一些改善, 也有助于 2-KLG 的生成。叶酸是产酸菌细胞生长繁殖的关键因子, 将乳酸菌 (*Lactococcus lactis* MG1363) 中负责叶酸合成的基因簇 (*folB*、*folKE*、*folP*、*folQ*、*folC*) 在产酸菌 (*K. vulgare* Rif) 中异源过表达, 结果表明, 重组菌株细胞内叶酸浓度比野生型高 8 倍, 而且发酵罐培养条件下重组菌株细胞密度和 2-KLG 产量较对照分别提高 25% 和 35%^[56]。Pan 等^[57]通过在产酸菌 (*K. vulgare* Hkv604) 氨基酸生物合成途径中表达缺失的高丝氨酸激酶基因 *hsk* (来自 *G. oxydans* 与 *S. cerevisiae*) 有效提升了 2-KLG 产量, 重构苏氨酸途径的产酸菌 *hsk-g* (表达 *G. oxydans* 高丝氨酸激酶基因的菌株), 在共培养条件下与对照相比 2-KLG 产量提高了 44.11% 且发酵周期缩短了 28.57%, 这表明含有较为完整氨基酸合成途径的产酸菌更具有大量生产 2-KLG 的潜力。

Wang 等^[8]在产酸菌 (*K. robustum* SPU_B003) 中引入了一个新的乙酰 CoA 生物合成途径 (XFP-PTA 途径), 该途径通过内部启动子启动外源磷酸酮酶 (*xfp*) 和磷酸转乙酰酶 (*pta*) 基因优化后的结果表明, 与对照相比, 重组菌株乙酰 CoA 增加了约 2.4 倍且 2-KLG 产量增加了 22.27%; 而将产酸菌中的山梨糖脱氢酶 (*sdh*) 克隆进行过表达也能够一定程度上提高 2-KLG 产量^[58]。

3 展望

基因组学、转录组学、蛋白组学等多种生物组学技术的快速发展为科研人员提供了更多

的生物系统数据去进行分析研究, 但对于一个复杂的系统而言, 单一组学的分析研究无法准确地反映系统内部复杂的相互作用, 存在的局限性愈发明显。就 Vc 二步混菌发酵而言, 整个发酵体系属于一个复杂的生物系统, 研究表明伴生菌能够为产酸菌提供营养和伴生活性物质, 解除产酸菌受到的氧化胁迫, 创造一个适宜产酸的微环境。因此, 在考虑混菌发酵中两菌不同生长阶段的细胞密度、营养条件和其他遗传调控因子情况下, 对伴生菌促进产酸菌产酸的原因应综合多方面进行系统分析, 将基因、转录、蛋白、代谢等水平的研究整合在一起, 以确定基因动态调控的性质。在混菌发酵中伴生菌提供更多的营养物质后, 伴生菌产生的活性蛋白对产酸菌调节和维持代谢稳态如何发挥作用从而使产酸菌大量产酸, 是未来维生素 C 二步混菌发酵中值得重点关注的研究方向。

REFERENCES

- [1] GROSSO G, BEI R, MISTRETTA A, MARVENTANO S, CALABRESE G, MASUELLI L, GIGANTI MG, MODESTI A, GALVANO F, GAZZOLO D. Effects of vitamin C on health: a review of evidence[J]. *Frontiers in Bioscience: Landmark Edition*, 2013, 18(3): 1017-1029.
- [2] 邹伟, 刘杰, 刘立明, 陈坚. 基于基因组技术的维生素 C 生产菌株生理功能解析与应用[J]. *基因组学与应用生物学*, 2012, 31(5): 513-521.
ZOU W, LIU J, LIU LM, CHEN J. Application of genome-based approaches on the vitamin C producing industrial strains: a review[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2012, 31(5): 513-521 (in Chinese).
- [3] URBANCE JW, BRATINA BJ, STODDARD SF, SCHMIDT TM. Taxonomic characterization of *Ketogulonigenium vulgare* gen. nov., sp. nov. and *Ketogulonigenium robustum* sp. nov., which oxidize L-sorbose to 2-keto-L-gulonic acid[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, 51(Pt 3): 1059-1070.
- [4] 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[J]. 科学通报, 2006(8): 923-927.
- YANG F, JIA Q, XIONG CH, ZHANG XB, WU HT, ZHAO Y, YANG J, ZHU JP, DONG J, XUE Y, SUN LL, SHEN Y, JIN Q. Genome analysis of *Ketogulonigenium vulgare* WB0104[J]. Chinese Science Bulletin, 2006(8): 923-927 (in Chinese).
- [5] JIA N, DING MZ, DU J, PAN CH, TIAN G, LANG JD, FANG JH, GAO F, YUAN YJ. Insights into mutualism mechanism and versatile metabolism of *Ketogulonigenium vulgare* Hbe602 based on comparative genomics and metabolomics studies[J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 23068.
- [6] LIU LM, LI Y, ZHANG J, ZHOU ZM, LIU J, LI XM, ZHOU JW, DU GC, WANG L, CHEN J. Complete genome sequence of the industrial strain *Ketogulonigenium vulgare* WSH-001[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(21): 6108-6109.
- [7] 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[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(1): 315-316.
- [8] WANG CY, LI Y, GAO ZW, LIU LC, WU YC, ZHANG MY, ZHANG TY, ZHANG YX. Reconstruction and analysis of carbon metabolic pathway of *Ketogulonigenium vulgare* SPU B805 by genome and transcriptome[J]. Scientific Reports, 2018, 8: 17838.
- [9] JIA N, DING MZ, DU YZ, FENG S, GAO F, YUAN YJ. Complete genome sequence of the industrial bacterium *Ketogulonigenium vulgare* SKV[J]. Genome Announcements, 2016, 4(6): e01426-e01416.
- [10] WANG CY, LI Y, GAO ZW, LIU LC, ZHANG MY, ZHANG TY, WU CF, ZHANG YX. Establishing an innovative carbohydrate metabolic pathway for efficient production of 2-keto-L-gulonic acid in *Ketogulonigenium robustum* initiated by intronic promoters[J]. Microbial Cell Factories, 2018, 17(1): 81.
- [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[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(22): 6389-6390.
- [12] JIA N, DING MZ, GAO F, YUAN YJ. Comparative genomics analysis of the companion mechanisms of *Bacillus thuringiensis* Bc601 and *Bacillus endophyticus* Hbe603 in bacterial consortium[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 28794.
- [13] EPPINGER M, BUNK B, JOHNS MA, EDIRISINGHE JN, KUTUMBAKA KK, KOENIG SSK, CREASY HH, ROSOVITZ MJ, RILEY DR, DAUGHERTY S, MARTIN M, ELBOURNE LDH, PAULSEN I, BIEDENDIECK R, BRAUN C, GRAYBURN S, DHINGRA S, LUKYANCHUK V, BALL B, UL-QAMAR R, et al. Genome sequences of the biotechnologically important *Bacillus megaterium* strains QM B1551 and DSM319[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(16): 4199-4213.
- [14] LIU LM, CHEN KJ, ZHANG J, LIU J, CHEN J. Gelatin enhances 2-keto-L-gulonic acid production based on *Ketogulonigenium vulgare* genome annotation[J]. Journal of Biotechnology, 2011, 156(3): 182-187.
- [15] JIA N, DU J, DING MZ, GAO F, YUAN YJ. Genome Sequence of *Bacillus endophyticus* and analysis of its companion mechanism in the *Ketogulonigenium vulgare*-*Bacillus* strain consortium[J]. PLoS One, 2015, 10(8): e0135104.
- [16] 朱益波. 巨大芽孢杆菌与普通生酮基古龙酸菌互生作用研究[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2012.
- ZHU YB. Mechanisms in the mutualism between *Bacillus megaterium* and *Ketogulonigenium vulgare*[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2012 (in Chinese).
- [17] 张静. 基于生化策略与组学技术的维生素 C 生产菌株间生理关系解析[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2010.
- ZHANG J. Analysis of physiological relationship between vitamin C producing stains based on biochemical strategy and omics techniques[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2010 (in Chinese).
- [18] MA Q, BI YH, WANG EX, ZHAI BB, DONG XT, QIAO B, DING MZ, YUAN YJ. Integrated proteomic and metabolomic analysis of a reconstructed three-species microbial consortium for one-step fermentation of 2-keto-L-gulonic acid, the precursor of vitamin C[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2019, 46(1): 21-31.
- [19] MA Q, ZHOU J, ZHANG WW, MENG XX, SUN JW, YUAN YJ. Integrated proteomic and metabolomic analysis of an artificial microbial community for two-step production of vitamin C[J]. PLoS One, 2011, 6(10): e26108.
- [20] ZHU YB, LIU J, DU GC, ZHOU JW, CHEN J.

- Sporulation and spore stability of *Bacillus megaterium* enhance *Ketogulonigenium vulgare* propagation and 2-keto-L-gulonic acid biosynthesis[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 107: 399-404.
- [21] HUANG Z, ZOU W, LIU J, LIU LM. Glutathione enhances 2-keto-L-gulonic acid production based on *Ketogulonigenium vulgare* model iWZ663[J]. *Journal of Biotechnology*, 2013, 164(4): 454-460.
- [22] YE C, ZOU W, XU N, LIU LM. Metabolic model reconstruction and analysis of an artificial microbial ecosystem for vitamin C production[J]. *Journal of Biotechnology*, 2014, 182/183: 61-67.
- [23] 贾楠. 比较基因组及代谢组对酮古龙酸杆菌及其伴生菌的解析[D]. 天津: 天津大学硕士学位论文, 2016.
- JIA N. Comparative genomics and metabolomics analysis of *Ketogulonigenium vulgare* and companion *Bacillus* strain[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University, 2016 (in Chinese).
- [24] ZHOU J, MA Q, YI H, WANG LL, SONG H, YUAN YJ. Metabolome profiling reveals metabolic cooperation between *Bacillus megaterium* and *Ketogulonigenium vulgare* during induced swarm motility[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(19): 7023-7030.
- [25] DING MZ, ZOU Y, SONG H, YUAN YJ. Metabolomic analysis of cooperative adaptation between co-cultured *Bacillus cereus* and *Ketogulonigenium vulgare*[J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e94889.
- [26] 麻浩, 李野, 张磊, 张海宏, 蔺新峰, 周凯, 易绍琼, 李冠霖, 陈薇, 张怡轩. 混菌发酵中与普通生酮基古龙酸菌产 2-酮基-L-古龙酸相关功能蛋白的研究[J]. *生物技术通讯*, 2012, 23(5): 658-661.
- MA H, LI Y, ZHANG L, ZHANG HH, LIN XF, ZHOU K, YI SQ, LI GL, CHEN W, ZHANG YX. Research of the proteins relevant to 2-keto-L-gulonic acid produced during the mix culture fermentation[J]. *Letters in Biotechnology*, 2012, 23(5): 658-661 (in Chinese).
- [27] HALLIWELL B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life[J]. *Plant Physiology*, 2006, 141(2): 312-322.
- [28] SCHIEBER M, CHANDEL NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress[J]. *Current Biology*, 2014, 24(10): R453-R462.
- [29] 杨宇. 维生素 C 二步发酵中两株不同伴生菌作用机制研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学博士学位论文, 2015.
- YANG Y. Study on mechanism of different companion strains in vitamin C two-step fermentation[D]. Shenyang: Doctoral Dissertation of Shenyang Agricultural University, 2015 (in Chinese).
- [30] 吕淑霞, 廖林, 张云鹤. Vc 混菌发酵中伴生菌解除产酸菌氧化胁迫的研究进展[J]. *沈阳农业大学学报*, 2017, 48(6): 641-646.
- LÜ SX, LIAO L, ZHANG YH. Research progress on the oxidative stress relieving of acid-producing strain by companion strain in vitamin C mixed cultures fermentation[J]. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2017, 48(6): 641-646 (in Chinese).
- [31] ZHANG YH, LIN JY, BAI L, HUANG M, CHEN HQ, YAO S, LÜ SX. Antioxidant capacities of *Bacillus endophyticus* ST-1 and *Ketogulonigenium vulgare* 25B-1 in vitamin C fermentation[J]. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2018, 32(3): 628-637.
- [32] HUANG M, ZHANG YH, YAO S, MA D, YU XD, ZHANG Q, LÜ SX. Antioxidant effect of glutathione on promoting 2-keto-L-gulonic acid production in vitamin C fermentation system[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2018, 125(5): 1383-1395.
- [33] 冯树, 孙传宝, 张忠泽, 朱可丽, 张海宏, 高永涛. 维生素 C 二步发酵中巨大芽孢杆菌对氧化葡萄糖酸杆菌生长和产酸的影响[J]. *微生物学杂志*, 1998, 18(1): 6-9.
- FENG S, SUN CB, ZHANG ZZ, ZHU KL, ZHANG HH, GAO YT. Effects of *Bacillus megaterium* on growth and acid production of *Gluconobacter oxydans* in two-step vitamin C fermentation process[J]. *Journal of Microbiology*, 1998, 18(1): 6-9 (in Chinese).
- [34] 冯树, 张舟, 张成刚, 张忠泽. 混合培养中巨大芽孢杆菌对氧化葡萄糖酸杆菌的作用[J]. *应用生态学报*, 2000, 11(1): 119-122.
- FENG S, ZHANG Z, ZHANG CG, ZHANG ZZ. Effect of *Bacillus megaterium* on *Gluconobacter oxydans* in mixed culture[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2000, 11(1): 119-122 (in Chinese).
- [35] 吕淑霞, 牛建双, 马镒, 张良, 陈宏权, 张忠泽. VC 混菌发酵中大菌不同胞外组分对小菌的影响[J]. *食品与生物技术学报*, 2011, 30(5): 700-704.
- LÜ SX, NIU JS, MA D, ZHANG L, CHEN HQ, ZHANG ZZ. Effect of different components of *Bacillus megaterium* on *Gluconobacter oxydans* in mix-cultured of vitamin C fermentation[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2011, 30(5): 700-704 (in Chinese).
- [36] 宫晓丽, 郭智勇, 吕淑霞, 于晓丹, 马镒, 张良, 张忠泽, 陈宏权. 巨大芽孢杆菌 *B. m* 2980 产孢对氧化葡萄糖酸杆菌产酸的影响[J]. *工业微生物*, 2013, 43(6): 49-53.
- GONG XL, GUO ZY, LÜ SX, YU XD, MA D,

- ZHANG L, ZHANG ZZ, CHEN HQ. Effects of *Bacillus megaterium* 2980's spore formation on 2 KGA production of *Gluconobacter oxydans*[J]. Industrial Microbiology, 2013, 43(6): 49-53 (in Chinese).
- [37] 国陶红, 宋馨宇, 陈磊, 张卫文. 人工微生物混菌系统机制解析中的组学应用及进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(2): 460-477.
- GUO TH, SONG XY, CHEN L, ZHANG WW. Using OMICS technologies to analyze the mechanisms of synthetic microbial co-culture systems: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(2): 460-477 (in Chinese).
- [38] 常晶, 史国萃, 曾名湧, 刘尊英. 细菌群体感应淬灭酶及其应用研究进展[J]. 生物加工过程, 2019, 17(3): 244-250.
- CHANG J, SHI GC, ZENG MY, LIU ZY. Quorum quenching enzymes—a review[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2019, 17(3): 244-250 (in Chinese).
- [39] DONG YH, XU JL, LI XZ, ZHANG LH. AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(7): 3526-3531.
- [40] SCHNEIDER J, YEPES A, GARCIA-BETANCUR JC, WESTEDT I, MIELICH B, LÓPEZ D. Streptomycin-induced expression in *Bacillus subtilis* of YtnP, a lactonase-homologous protein that inhibits development and streptomycin production in *Streptomyces griseus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(2): 599-603.
- [41] 崔天琦, 白凤翎, 励建荣. 基于 AHLs 介导的革兰氏阴性菌群体感应调控及淬灭机制研究进展[J]. 中国食品学报, 2020, 20(8): 308-320.
- CUI TQ, BAI FL, LI JR. Advance on quorum-sensing regulation and quenching mechanism of Gram-negative bacteria mediated by AHLs[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(8): 308-320 (in Chinese).
- [42] 邱健, 贾振华, 李承光, 马宏, 宋水山, 张霞, 冀营光. 细菌群体感应淬灭酶的研究进展[J]. 微生物学通报, 2006, 33(4): 139-143.
- QIU J, JIA ZH, LI CG, MA H, SONG SS, ZHANG X, JI YG. Advance on bacterial quorum-quenching enzymes[J]. Microbiology, 2006, 33(4): 139-143 (in Chinese).
- [43] FUQUA C, GREENBERG EP. Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2002, 3(9): 685-695.
- [44] CHUN H, CHOI O, GOO E, KIM N, KIM H, KANG Y, KIM J, MOON JS, HWANG I. The quorum sensing-dependent gene *katG* of *Burkholderia glumae* is important for protection from visible light[J]. Journal of Bacteriology, 2009, 191(13): 4152-4157.
- [45] HASSETT DJ, MA JF, ELKINS JG, MCDERMOTT TR, OCHSNER UA, WEST SE, HUANG CT, FREDERICKS J, BURNETT S, STEWART PS, MCFETERS G, PASSADOR L, IGLEWSKI BH. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* controls expression of catalase and superoxide dismutase genes and mediates biofilm susceptibility to hydrogen peroxide[J]. Molecular Microbiology, 1999, 34(5): 1082-1093.
- [46] GOO E, MAJERCZYK CD, AN JH, CHANDLER JR, SEO YS, HAM H, LIM JY, KIM H, LEE B, JANG MS, GREENBERG EP, HWANG I. Bacterial quorum sensing, cooperativity, and anticipation of stationary-phase stress[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(48): 19775-19780.
- [47] AN JH, GOO E, KIM H, SEO YS, HWANG I. Bacterial quorum sensing and metabolic slowing in a cooperative population[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(41): 14912-14917.
- [48] LING J, ZHOU L, WU GC, ZHAO YC, JIANG TP, LIU FQ. The AHL quorum-sensing system negatively regulates growth and autolysis in *Lysobacter brunescens*[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 2748.
- [49] ZHOU J, YI H, WANG LL, ZHANG WW, YUAN YJ. Metabolomic analysis of the positive effects on *Ketogulonigenium vulgare* growth and 2-keto-L-gulonic acid production by reduced glutathione[J]. Omics: A Journal of Integrative Biology, 2012, 16(7/8): 387-396.
- [50] MA Q, ZHANG WW, ZHANG L, QIAO B, PAN CS, YI H, WANG LL, YUAN YJ. Proteomic analysis of *Ketogulonigenium vulgare* under glutathione reveals high demand for thiamin transport and antioxidant protection[J]. PLoS One, 2012, 7(2): e32156.
- [51] 吕淑霞, 赵朔, 马镛, 林英, 张良, 陈宏权, 张忠泽. 几种外源物质对氧化葡萄糖酸杆菌生长及产 2-酮基-L-古龙酸的影响[J]. 沈阳农业大学学报, 2011, 42(2): 184-189.
- LÜ SX, ZHAO S, MA D, LIN Y, ZHANG L, CHEN HQ, ZHANG ZZ. Effect of several exogenous

- substances on growth and 2-keto-L-gulonic acid accumulation of *Gluconobacter oxydans*[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2011, 42(2): 184-189 (in Chinese).
- [52] 樊世存. 维生素 C 生产菌株生理功能解析与发酵优化[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2014.
FAN SC. Analysis of physiological characteristics of vitamin C producing strains and optimization[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2014 (in Chinese).
- [53] 张倩. Vc 混菌发酵中短小芽孢杆菌铁载体促产酸作用机制的研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学硕士学位论文, 2020.
ZHANG Q. Mechanism on the promoting 2-keto-L-gulonic acid production of *Ketogulonigenium vulgare* by the siderophores from *Bacillus pumilus* in Vc co-culture fermentation[D]. Shenyang: Master's Thesis of Shenyang Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [54] 张倩, 黄茂, 张玮丹, 李颖, 吕淑霞. 芽孢杆菌促普通生酮基古龙酸菌产酸机制研究进展[J]. 微生物学通报, 2019, 46(12): 3469-3474.
ZHANG Q, HUANG M, ZHANG WD, LI Y, LÜ SX. Research progress on the companion mechanism in *Ketogulonigenium vulgare* and *Bacillus* strain consortium[J]. Microbiology China, 2019, 46(12): 3469-3474 (in Chinese).
- [55] LÜ SX, GUO Z, PAN J, YANG Y, YANG W, CHEN H, ZHANG Z. Effect of rare earth elements on vitamin C fermentation by mixed cultures[J]. International Journal of Agriculture and Biology, 2014, 16(6): 1135-1140.
- [56] CAI L, YUAN MQ, LI ZJ, CHEN JC, CHEN GQ. Genetic engineering of *Ketogulonigenium vulgare* for enhanced production of 2-keto-L[J]. Journal of Biotechnology, 2012, 157(2): 320-325.
- [57] PAN CH, WANG EX, JIA N, DONG XT, LIU Y, DING MZ, YUAN YJ. Reconstruction of amino acid biosynthetic pathways increases the productivity of 2-keto-L-gulonic acid in *Ketogulonigenium vulgare*-*Bacillus endophyticus* consortium via genes screening[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2017, 44(7): 1031-1040.
- [58] 王威勋, 李燕, 李野, 张天园, 张怡轩. 山梨糖脱氢酶基因在酮古龙酸菌中的过表达[J]. 沈阳药科大学学报, 2016, 33(10): 821-825.
WANG WX, LI Y, LI Y, ZHANG TY, ZHANG YX. Clone and overexpression of sorbose dehydrogenase in *Ketogulonigenium vulgare*[J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University, 2016, 33(10): 821-825 (in Chinese).