

维生素 B₁₂ 的生物合成、发酵生产与应用

马蕙, 王丽丽, 张春晓, 仪宏

河北科技大学生物科学与工程学院, 石家庄 050018

摘要: 维生素 B₁₂(VB₁₂)是一种重要的动物和人类营养因子, 广泛应用于饲料、食品和医药卫生领域。中国已成为全球 VB₁₂ 的主要产地, 2007 年产量为 27 t, 占全球总产量的 77%。VB₁₂ 是目前已发现的最大、最复杂的维生素分子, 化学合成极其困难, 所有 VB₁₂ 产品均采用生物发酵制备其主体结构。VB₁₂ 主要由古生菌和一些真细菌通过有氧或厌氧两种途径合成, 工业上主要采用费式丙酸菌(*Propionibacterium freudenreichii*)和脱氮假单胞菌(*Pseudomonas denitrificans*)进行发酵生产。综述了 VB₁₂ 的基本性质, 生物合成途径, 以及发酵生产工艺, 并对 VB₁₂ 的应用与市场前景作了分析。

关键词: 维生素 B₁₂, 生物合成, 发酵, 应用

Biosynthesis, Fermentation and Application of Vitamin B₁₂ – a Review

Hui Ma, Lili Wang, Chunxiao Zhang, and Hong Yi

College of Bioscience and Bioengineering, Hebei University of Science & Technology, Shijiazhuang 050018, China

Abstract: Vitamin B₁₂ is an important nutrient widely used in feed, food and medicine field. China is the primary producing area and the VB₁₂ production is 27 t in 2007, 77% of total production in the world. VB₁₂ is the most complex small molecule difficult to chemosynthesize. It is manufactured by bacteria and archaea via two alternative routes, aerobic or anaerobic pathway. The main strains used in industry fermentation are *Propionibacterium freudenreichii* and *Pseudomonas denitrificans*. The basic characteristics, biosynthesis and fermentation of vitamin B₁₂ are reviewed. The vitamin B₁₂ application and market are also summarized.

Keywords: vitamin B₁₂, biosynthesis, fermentation, application

1 维生素 B₁₂ 简介

维生素 B₁₂, 简称 VB₁₂, 又称为钴胺素(cobalamin), 是一类含有钴的咕啉类化合物总称。它是目前已发现的最大、最复杂的维生素分子, 也是唯一含有金属离子的维生素; 其结晶为红色, 故又称红色维生素。VB₁₂ 最初是由 Minot 和 Murphy 于

1926 年用肝浸膏治疗恶性贫血时发现^[1], 1948 年由 Rickes 和 Smith 分别从肝脏中纯化和结晶^[2,3], 1956 年由 Hodgkin 等用 X-射线法证明了其晶体结构^[4], 如图 1 所示, 即中心咕啉环、中心环轴向 Coβ 配基部分及 1 个含有核苷酸环的 Coα 配基。中心咕啉环由相连的 4 个吡咯和 1 个钴原子组成, 钴螯合在 4 个吡咯中心。咕啉环轴向上方的配基不同(即 Coβ 配基

Received: March 13, 2008; Accepted: April 7, 2008

Supported by: the National Project of Scientific and Technical(No. 2007BAI46B06).

Corresponding author: Hong Yi. Tel: +86-311-88632172; E-mail: yihonglaoshi@163.com

“十一五”国家科技支撑计划项目(No. 2007BAI46B06)资助。

不同), 则会产生不同形式的钴胺素类物质, 如腺苷钴胺素 (Adenosylcobalamin) 或甲基钴胺素 (Methylcobalamin)。由于其结构复杂, 所以它也是自然界中生物合成途径最繁琐的小分子生物物质^[5]。1972 年美国科学家伍德沃德 (Woodward, R.B) 领导 100 多个合作者历时 11 年, 共同完成了全化学合成工作^[6]。

2 维生素 B₁₂ 的生物合成

作为最复杂的和十分重要的小分子, VB₁₂ 的生物合成已有详尽研究。VB₁₂ 主要由古生菌和一些真细菌通过有氧或厌氧两种途径合成, 涉及到相关合成基因 30 余个^[5], Battersby、Blanche、Scott、Warren、Escalante-Semerena 等通过对脱氮假单胞菌

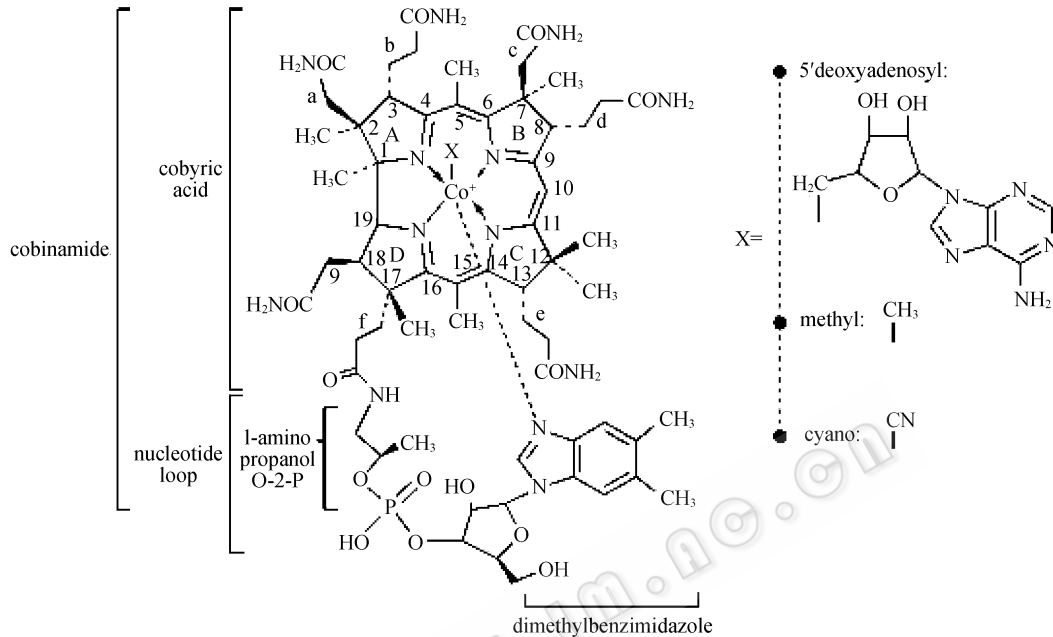


图 1 维生素 B₁₂ 及其衍生物的结构^[5]

Fig. 1 Structure of vitamin B₁₂ and some of its derivatives

The numbering and labeling of the molecule are shown together with the names used to refer to incomplete derivatives of the compound

(*Pseudomonas denitrificans*) 的研究, 阐明了 VB₁₂ 好氧合成路径^[5,7-11]。对厌氧合成路径的研究主要源于以下 3 种菌: 鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)^[12]、巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)^[13] 和费氏丙酸杆菌 (*Propionibacterium freudenreichii*)^[14], Roessner 和 Scott 对 VB₁₂ 的厌氧合成路径做了专门综述^[15]。

2.1 ALA 的生物合成

VB₁₂ 的生物合成从五碳前体 5-氨基乙酞丙酸 (5-aminolaevulinic acid, ALA) 开始^[11]。ALA 可通过 C4 或 C5 两条途径合成。C4 途径中, 由琥珀酰 CoA 和甘氨酸在 ALA 合成酶的催化下合成 ALA。C5 途径从谷氨酸开始, 在谷胺酰-tRNA 合成酶的催化下, 谷氨酸转移到 tRNA 分子上, 形成谷胺酰-tRNA, 谷胺酰-tRNA 在谷胺酰-tRNA 脱氢酶的作用下, 合成谷胺醛 (glutamate 1-semialdehyde, GSA), 再经谷胺

醛氨基转移酶的催化合成 ALA^[11]。

2.2 从 ALA 到尿卟啉原 III 的生物合成

这是好氧途径和厌氧途径共同的步骤, 该过程由 ALA 脱水酶 (HemB) 催化 2 个 ALA 分子形成胆色素原 (Porphobilinogen), 再经胆色素原脱氨酶 (HemC) 催化形成含 4 个吡咯的分子前尿卟啉原 (preuroporphyrinogen), 再由尿卟啉原 III 合成酶 (HemD) 催化 4 个吡咯分子环化形成尿卟啉原 III (uroporphyrinogen III)^[10]。

2.3 由尿卟啉原 III 到前咕啉 6 (precorrin 6) 或钴前咕啉 6 (Co-precorrin 6) 的生物合成

该过程涉及环缩合和去乙酰基, 是好氧过程和厌氧过程主要不同的环节。在好氧合成途径中形成前咕啉 6, 催化这一过程需要 5 个依赖于 SAM (S-腺苷-L-甲硫氨酸) 的甲基转移酶 (CobA, CobG, CobJ, CobM 和 CobF) 逐步转移 6 个甲基基团, 并以单加氧

酶催化氧原子的结合而著称^[10]。

在厌氧合成途径中则将尿卟啉原 III 转化成钴-前咕啉 6。该过程也需要 5 个甲基转移酶(CysG 或 CbiK, CbiL, CbiH, CbiF), 但不同的是早期将钴原子并入到大环中。合成前咕啉 2 之后, 即将钴原子螯合到大环中, 形成钴-前咕啉 2, 具有螯合钴原子的酶在不同生物中所催化的酶不同, 如 *S. typhimurium* 的 CysG、CbiK 和 *P. freudenreichii*、*B. megaterium* 的 CbiX 酶都有相同的酶活性。

2.4 将前咕啉 6/钴-前咕啉 6 转化成腺苷钴胺素

好氧途径中, 前咕啉 6 经还原、甲基化、脱羧、甲基重排及酰胺化反应生成钴(II)啉酸 *a, c*-二酰胺(Cob(II)yrinic acid *a, c*-diamide)。CobK 还原生成二氢前咕啉 6(Dihydro-precorrin 6), 再经 CobL 催化的 C-5 和 C-15 位的甲基化及脱羧, 合成前咕啉 8, 前咕啉 8 在 CobH 催化下, 经甲基重排形成氢咕啉酸(Hydrogenobyric acid), 氢咕啉酸在 CobB 催化下酰胺化形成氢咕啉酸 *a, c*-二酰胺(Hydrogenobyric acid *a, c*-diamide), 好氧菌利用依赖于 ATP 的钴螯合酶(CobNST)催化钴元素插入到氢咕啉酸 *a, c*-二酰胺的咕啉环中心, 从而得到具有钴元素的中间体, 钴(II)啉酸 *a, c*-二酰胺(Cob(II)yrinic acid *a, c*-diamide)。在厌氧途径中没有发现 CobNST 复合物。

厌氧途径中, 钴前咕啉 6 在 CbiJ、CbiE(CbiEGH)、CbiT、CbiC 和 CbiA 等酶的作用下, 也经过还原、甲基化、脱羧、甲基重排及酰胺化反应生成钴(II)啉酸 *a, c*-二酰胺(Cob(II)yrinic acid *a, c*-diamide)。除了厌氧途径中二氢前咕啉 6、前咕啉 8 和氢咕啉酸由相应的钴化合物替代外, 好氧和厌氧途径中将前咕啉 6 或钴-前咕啉 6 转化成腺苷钴胺素过程中的中间产物结构可看作是相同的^[10]。

从钴(II)啉酸 *a, c*-二酰胺之后, 好氧和厌氧合成路径又重新趋于一致。钴(II)啉酸 *a, c*-二酰胺经过还原、腺苷化、酰胺化等步骤, 最终合成腺苷钴胺素, 好氧与厌氧途径中的中间产物完全一致, 只是利用的催化酶有所差异^[10]。

目前 VB₁₂ 合成路径中的大部分中间产物结构都已阐明, 但仍有少量中间产物如钴-前咕啉 6A, 6B, 7 等的结构尚未阐明^[15], 仍在继续研究之中。

3 VB₁₂ 的工业生产

由于 VB₁₂ 的结构极为复杂, 其化学合成高度繁琐昂贵, 从肝脏等动物组织提取的效率和效益也十分低下, 所以只能通过微生物发酵法来实现商业化生产^[16,17]。较早期采用链霉素发酵废液提取, 上个世纪 70 年代被专门发酵取代。

3.1 菌株

只有原核微生物才能合成 VB₁₂, 可用于生产的菌株及其报道产率见表 1^[18]。

其中, *P. shermanii* 和 *P. denitrificans* 是目前工业生产 VB₁₂ 的主要生产菌种, *P. shermanii* 的生产水平达到 30~40 mg/L, *P. denitrificans* 的生产水平达到 100~160 mg/L。

表 1 生产 VB₁₂ 的各种细菌及其产率

Table 1 Bacteria producing VB₁₂ and the corresponding yield

Strain	Yield/(mg/L)
Bacteria FM-02T	2.6
<i>Rhodopseudomonas</i> sp.	2.3
<i>Methanobacillus omelianskii</i>	8.8
<i>Methanobacillus</i> mixture	35
<i>Micromonospora</i> sp.	11.5
<i>Nocardia gadneri</i>	4.5
<i>N. rugosa</i>	14
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	25
<i>Propionibacterium shermanii</i>	23~39
<i>Propionibacterium vannielli</i>	25
<i>Protoaminobacter ruber</i>	2.5
<i>Pseudomonas denitrificans</i>	59
<i>Streptomyces olivaceus</i>	8.5

3.2 发酵工艺

3.2.1 厌氧发酵工艺

菌株采用 *P. shermanii*。该菌从葡萄糖降解产生丙酸(PA)、乙酸(AA)的 Wood-Werkman 途径中, 涉及一个关键酶——甲基丙二酰 CoA 异构酶, 该酶需要 VB₁₂ 作为辅酶, 所以 *P. shermanii* 含有一条从头合成 VB₁₂ 的完整途径。在实验室研究方面, 已经有许多针对丙酸杆菌的基本生理特性进行工艺优化的报道。例如: 日本学者 Ye 等^[19,20]报道了一种由厌氧、好氧周期交替循环的新型操作工艺。Ye 的工作发现氧是改变细胞代谢途径的一个关键参数。在厌氧阶段, 葡萄糖降解产生丙酸、乙酸及 CO₂, 同时胞内合

成 VB₁₂; 在微好氧阶段, 可以降低丙酸的抑制。因此适当的厌氧和好氧交替, 可以充分促进菌体生长, 提高 VB₁₂ 产量。为了解除胞外丙乙酸的抑制, Hatanaka 等^[21]曾建立了一套由中空纤维滤膜器和 VB₁₂ 发酵罐组成的膜反应系统, 滤膜器可有效去除发酵过程中产生的丙酸。使用这套膜反应器进行 *P. shermanii* 发酵, VB₁₂ 产量比普通发酵罐发酵产量提高 24 倍。德国 GBF 的研究人员采用糖蜜原料和两阶段发酵工艺, 在第一阶段以获得丙酸为主, 第二阶段获得 VB₁₂ 为主^[22]。Shimizu 报道, 采用细胞循环技术(膜反应器)可以有效解除 PA 和 AA 的抑制作用, 或者采用与 *Ralstonia eutropha* H16 混合培养技术, 利用 *R. eutropha* 降解 PA 和 AA, 也可以提高发酵效率^[23]。在实际工业生产方面, 经过近几年的市场竞争, 只剩下石药集团保留一条百吨罐的生产线, 它以 *P. shermanii* 为生产菌株, 该工艺主要流程如下: 冷冻管菌种; 软营养琼脂穿刺培养 30°C, 4 d; 母瓶 30°C 液体培养 3 d; 一级种子罐 30°C 培养 2 d; 二级种罐 30°C 培养 2 d、用氨水维持 pH 6.5; 发酵罐 30°C 培养 90 h、缓慢间歇搅拌、用氨水维持 pH 6.5。

培养基以葡萄糖为主要碳源, 玉米浆为主要氮源, 补加钴离子及前体 5,6-二甲基苯丙咪唑(DBI)。该工艺 VB₁₂ 产物中 80% 以上为腺苷钴胺素(Ado-VB₁₂), 并且杂质相关物含量低, 在生产腺苷钴胺素时比采用 *P. denitrificans* 的好氧工艺具有明显优势。

由于 *Propionibacterium* 属于经典安全菌(GRAS), 人们更喜欢用丙酸菌生产 VB₁₂, 对其研究也越来越深入, 拟从基因工程的角度提高 VB₁₂ 的合成量。如 Sattler 等^[24]从 *P. freudenreichii* (*shermanii*) 中克隆了 Urogen III 甲基转移酶 *cobA* 基因, Roessner 等^[14]也从该菌中克隆了 Urogen III 到 VB₁₂ 合成过程中的 14 个基因。为了有效的利用 VB₁₂ 生物合成基因, 科研人员建立了 *P. freudenreichii* (*shermanii*) 的遗传转化系统^[25-27]。Piao 等^[28]将 VB₁₂ 合成过程中 *hemB* 和 *cobA* 基因导入 *P. freudenreichii*, 使得其 VB₁₂ 的合成量提高到原来的 2.2 倍。

3.2.2 好氧发酵工艺

好氧发酵工艺是目前工业化生产 VB₁₂ 的主要工艺, 全球 80% 以上的产量来自该工艺, 以 *P. denitrificans* 为生产菌株, 培养基采用甜菜糖蜜或麦

芽糖为主要碳源, 玉米浆或酵母膏为氮源, 补加无机盐、钴离子以及 DBI。在实验室研究方面, Marwaha 等^[29]报道甜菜碱对发酵的促进作用, 张嗣良等^[30]报道了基于过程参数相关的发酵过程优化与放大技术。在实际工业生产方面, 除了 DSM 在欧洲保留一条好氧生产线之外, 国内的石药集团、华药集团和玉峰生物工程公司也采用好氧工艺, 发酵装置采用 120 m³ 的标准好氧发酵罐, 一般采用流加碳源的分批补料工艺, 发酵最适温度 28°C, pH 7.0, 发酵过程添加甜菜碱 1.5%~2%, 发酵周期 180 h 左右, 发酵结束时细胞内和细胞外均含 VB₁₂, 最终含量约 100~160 mg/L。该工艺的发酵单位超过了厌氧工艺的三倍, 所以在生产氰钴胺素(CN-Ado)时具有很大优势, 而氰钴胺素因为其化学性质稳定, 而成为 VB₁₂ 在饲料等领域的主要应用形式。

3.3 维生素 B₁₂ 的提取工艺

发酵结束时, *P. shermanii* 所产生的 VB₁₂ 集中在胞内, *P. denitrificans* 产生的 VB₁₂ 胞内和胞外都有, 因此两种微生物的提取工艺略有差异。*P. shermanii* 厌氧发酵结束后, 过滤收集菌体, 加热水解使 VB₁₂ 释放到胞外, 再次过滤收集滤液, 经吸附、解吸、氰化钠转化、再吸附、再解吸、层析、结晶、干燥得到成品^[16]。目前厌氧工艺的总收率为 50%~70%。*P. denitrificans* 好氧发酵结束后, 发酵液直接加热水解, 释放出胞内 VB₁₂, 液固分离后, 滤液交由树脂吸附, 开始后续分离纯化操作。一般采用树脂原位氧化, 目前好氧工艺的总收率达到 80% 左右。

4 应用与市场

4.1 VB₁₂ 的应用

4.1.1 医疗与保健方面的应用

主要用于治疗各种 VB₁₂ 缺乏症, 例如: 可以治疗巨幼红细胞性贫血、药物中毒引起的贫血、再生障碍性贫血和白细胞减少症等^[31,32]; 与泛酸搭配使用, 可以预防恶性贫血症, 有助于 Fe²⁺ 的吸收和胃酸的分泌; 也被用于治疗关节炎、面部神经麻痹、三叉神经痛、肝炎、疱疹、哮喘和其它过敏症、过敏性皮炎、寻麻疹、湿疹和滑囊炎; VB₁₂ 还可以用于神经质、烦躁、失眠、记忆减退、抑郁病症的治疗^[33]。新的研究表明, VB₁₂ 缺乏还会造成抑郁症等精神疾病。VB₁₂ 作为治疗剂或保健品是十分安全的, 超过

RDA 几千倍以上的 VB₁₂ 被静脉或肌肉注射没有发现中毒现象。

4.1.2 在饲料方面的应用

VB₁₂ 能够促进家禽、家畜特别是幼禽、幼畜生长发育、提高饲料蛋白质的利用率, 从而可用作饲料添加剂^[16]。用 VB₁₂ 水溶液处理鱼卵或鱼苗, 能够提高鱼对水中有毒物质如苯和重金属的耐受力, 降低死亡率。自从欧洲“疯牛病”事件后, 采用维生素等化学结构明确的营养强化剂来替代“肉骨粉”有了更大的发展空间。目前世界上生产的 VB₁₂ 大部分用于饲料工业。

4.1.3 在其它方面的应用

在发达国家, VB₁₂ 与其他物质复配用于化妆品; 在食品工业上, VB₁₂ 可作为火腿、香肠、冰淇淋、鱼肉酱等食品的着色剂。在家庭生活中, 将 VB₁₂ 溶液吸附在活性炭、沸石、无纺纤维或纸上, 或制成肥皂、牙膏等; 可用于厕所、冰箱等的防臭, 消除硫化物和醛的气味; VB₁₂ 也可用于环保中土壤和地表水常见污染物——有机卤化物的脱卤。

4.2 VB₁₂ 的国内外市场分析

自 1949 年美国施贵宝公司、礼莱公司、普强公司和雅培公司等进行工业化生产开始, 在以后的几十年里, VB₁₂ 需求量增长缓慢。自上世纪 90 年代起, 其市场容量有了较快增长, 到 2002 年达到 20 多吨, 美国、德国、印度和中国为主要生产国。其中, 美国市场上 VB₁₂ 药用约占 40%, 饲料用约占 36%, 食品用约占 24%。在 2003 年之前的较长一段时期, VB₁₂ 价格比较昂贵和稳定, 1990 年以前, 国际市场价格为每千克 5000~5500 美元, 90 年代中期, 上升到 6500~7000 美元, 2002 年, 我国出口报价 7200~7500 美元^[33]。2003 年, VB₁₂ 产量迅速增加, 供求关系发生变化, 国际价格下跌迅速, 目前已经不足每千克 3000 美元。

国内, 1966 年华北制药厂率先生产 VB₁₂。20 世纪 60~70 年代, VB₁₂ 在全国年产量仅有几十千克。到 80 年代末, 年产量达到 150 kg。自 90 年代中期起, 进入高速增长期, 1999、2000、2001 年其年产量分别为 3.4 t、4.3 t 和 6.2 t, 2003 年上升到 10 t 以上。2003 年以来出口价格下降, VB₁₂ 产量增幅已不如前几年, 但产量仍不断增加^[33], 到 2007 年 VB₁₂ 及其衍生物生产总量为 27 t, 占全球总产量的 77%, 中国成

为 VB₁₂ 主要生产国。国内生产企业有华北制药集团、石药集团、河北玉峰集团、宁夏多维药业等。2007 年, 我国 VB₁₂(含衍生物) 出口数量为 21 t, 占国内产量的 78%, 出口市场主要是美国、印度、德国、日本和荷兰。

就消费与市场区域来讲, 由于欧、美、日各国经济发达, 他们是 VB₁₂ 消费的最主要市场, 目前基本保持在 3%~5% 的需求增长速度; 亚洲对包括 VB₁₂ 在内的维生素的需求也不断增加, 年增长率保持在 10%~15%。目前, 无论是作为动物饲料, 还是用于药品、食品添加剂, 维生素预混剂使用已超过了单一应用, 这一趋势还在不断增加。

就国内市场而言, 随着我国经济的发展和居民生活水平的提高, VB₁₂ 需求将持续扩展。主要来自三个方面的推动力: 其一是饮食结构变化, 对肉类、家禽、蛋类等食物的消耗将持续增长, 这将导致动物养殖业和饲料产业的发展, 饲料工业对 VB₁₂ 的需求将持续增加; 其二是健康意识的提高, 导致普通健康人群对维生素类以及添加维生素的营养食品、保健食品的需求日益增大; 其三是老龄化社会的到来, 对 VB₁₂ 缺乏症的医疗保健和食品强化的需求将会稳步增加。

REFERENCES

- [1] Minot GR, Murphy WP. Treatment of pernicious anaemia by a special diet *JAMA. J Am Med Assoc*, 1926, **87**: 470.
- [2] Rickes EL, Brink NG, Koniuszy FR, Wood TR, Folkers K. Crystalline vitamin B₁₂. *Science*, 1948, **107**: 396.
- [3] Smith EL. Presence of cobalt in the antipernicious anemia factor. *Nature*, 1948, **161**: 638.
- [4] Hodgkin DC, Pickworth J, Robertson JH, Trueblood KN, Prosen RJ, White J. Structure of vitamin B₁₂. *Nature*, 1956, **178**: 64-66.
- [5] Warren WJ, Raux E, Schubert HL, Escalante-Semerena JC. The biosynthesis of adenosylcobalamin (vitamin B₁₂). *Nat Prod Rep*, 2002, **19**: 390-412.
- [6] Khan AG, Eswaran SV. Woodward's synthesis of vitamin B₁₂. *Resonance*, 2003, **8**: 8-16.
- [7] Battersby AR. How nature builds the pigments of life: the conquest of vitamin B₁₂. *Science*, 1994, **264**: 1551-1557.
- [8] Blanche F, Cameron B, Crouzet J, Debussche L, Thibaut D, Vuilhorgne M, Leeper FJ, Battersby AR. Vitamin B₁₂: how the problem of its biosynthesis was solved. *Chem Int Ed Engl*, 1995, **34**: 383-411.
- [9] Blanche F, Famechon A, Thibaut D, Debussche L, Cameron B, Crouzet J. Biosynthesis of vitamin B₁₂ in

- Pseudomonas denitrificans*: the biosynthetic sequence from precorrin-6y to precorrin-8x is catalyzed by the cobL gene product. *J Bacteriol*, 1992, **174**(3): 1050–1052.
- [10] Scott AI, Roessner CA. Biosynthesis of cobalamin (vitamin B₁₂). *Biochemical Society Transactions*, 2002, **30**(4): 613–620.
- [11] Raux E, Schubert HL, Warren MJ. Biosynthesis of cobalamin (vitamin B₁₂): a bacterial conundrum. *Cell Mol Life Sci*, 2000, **57**: 1880–1893.
- [12] Roth JR, Lawrence GJ, Rubenfield M, Kieffer-Higgins S, Church GMJ. Characterization of the cobalamin (vitamin B₁₂) biosynthesis genes of *Salmonella typhimurium*. *Bacteriol*, 1993, **175**: 3303–3316.
- [13] Raux E, Lanois A, Warren MJ, Rambach A, Thermes C. Cobalamin (vitamin B₁₂) biosynthesis: identification and characterization of a *Bacillus megaterium* cobI operon. *Biochem J*, 1998, **335**: 159–166.
- [14] Roessner CA, Huang K, Warren M, Raux E, Scott AI. Isolation and characterization of 14 additional genes specifying the anaerobic biosynthesis of cobalamin (vitamin B₁₂) in *Propionibacterium freudenreichii* (*P. shermanii*). *Microbiology*, 2002, **148**: 1845–1853.
- [15] Roessner CA, Scott AI. Fine-tuning our knowledge of the anaerobic route to cobalamin (vitamin B₁₂). *Journal of Bacteriology*, 2006, **188**(21): 7331–7334.
- [16] Luo Y, Hao CM. Rerearch advance in vitamin B₁₂ and its application. *China Food Additives*, 2002, (3): 15–18.
罗祎, 郝常明. 维生素 B₁₂ 的研究及其进展. 中国食品添加剂, 2002, (3):15–18.
- [17] Bi R, He XM, Xia HP. Rerearch advance in production technology of vitamin B₁₂. *Chinese Journal of Pharmaceuticals*, 2003, **34**(8): 421–424.
碧榕, 何旭敏, 夏海平. 维生素 B₁₂ 工业生产技术的进展. 中国医药工业杂志, 2003, **34**(8): 421–424.
- [18] Atkinson B, Mavituna F. *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*. New York: The Nature Press, 1983.
- [19] Ye KM, Miyako S, Sha J, et al. Efficient production of vitamin B₁₂ from propionic acid bacteria under periodic variation of dissolved oxygen concentration. *Journal of Fermentations and Bioengineering*, 1996, **82**: 484–491.
- [20] Quesada-Chanto A, Silveira MM, Schmid-Meyer AC. Effect of the oxygen supply on pattern of growth and corrinoid and organic acid production of *Propionibacteria shermanii*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1998, **49**: 732–736.
- [21] Hatanaka H, Wang E, Taniguchi M, et al. Production of vitamin B₁₂ by a fermentor with a hollow-fiber module. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1998, **27**: 470–473.
- [22] Quesada-Chanto A, Afschar AS, Wagner F. Microbial production of propionic acid and vitamin B₁₂ using molasses or sugar. *Appl Mivrobiol Biotechnol*, 1994, **41**(4): 378–383.
- [23] Miyano KI, Ye KM, Shimizu K. Improvement of vitamin B₁₂ fermentation by reducing the inhibitory metabolites by cell recycle system and a mixed culture. *Biochemical Engineering Journal*, 2000, **6**(3): 207–214.
- [24] Sattler I, Roessner CA, Stolowich NJ, Hardin SH, Harris-haller LW, Yokubaitis NT, Murooka Y, Hashimoto Y, Scott AI. Cloning, sequencing, and expression of the uroporphyrinogen III methyltransferase *cobA* gene of *Propionibacterium freudenreichii* (*shermanii*). *Journal of Bacteriology*, 1995, **177**(6): 1564–1569.
- [25] Kiatpapan P, Hashimoto Y, Nakamura H, Piao YZ, Ono H, Yamashita M, Murooka Y. Characterization of pRGO1, a plasmid from *Propionibacterium acidipropionici*, and its use for development of a host-vector system in propionibacteria. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**(11): 4688–4695.
- [26] Jore JPM, Luijk NV, Luiten RGM, Werf MJ, Pouwels PH. Efficient transformation system for *Propionibacterium freudenreichii* based on a novel vector. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, **67**(2): 499–503.
- [27] Kiatpapan P, Murooka Y. Genetic manipulation system in propionibacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2002, **93**(1): 1–8.
- [28] Piao Y, Yamashita M, Kawaraichi N, Asegawa R, Ona H, Murooka Y. Production of vitamin B₁₂ in genetically engineered *Propionibacterium fredenreichii*. *J Biosci Bioengineering*, 2004, **98**(3): 167–173.
- [29] Marwaha SS, Sethi RP, Kennedy JF. Role of amino acids, betaine and choline in vitamin B₁₂ biosynthesis by strains of propionibacterium. *Enzyme-Microb-Tech*, 1983, **5**(6): 454–456.
- [30] Zhang SL. Study on the fermentation processes at multi-levels in bioreactor and its application for special purposes-optimization and scaling up of the fermentation process based on the parameter correlation method. *China Engineering Science*, 2001, **3**(8): 37–45.
张嗣良. 发酵过程多水平问题及其生物反应器装置技术研究. 中国工程科学, 2001, **3**(8): 37–45.
- [31] Xu QM. *Medical Care Function of Vitamin B₁₂*. Foreign Medicine-Synthetic Medicine, Biochemical Medicine, Preparation Fascicule, 1998, **19**(2): 97–100.
徐亲民. 维生素 B₁₂ 的医疗保健作用. 国外医药—合成药生化药制剂分册, 1998, **19**(2): 97–100.
- [32] Zheng JX. *Functional Food Biotechnology*. Beijing: China Light Industry Press, 2004.
邓建仙. 功能性食品生物技术, 北京: 中国轻工业出版社, 2004.
- [33] Zhang L. Analysis of the market of vitamin B₁₂. *China Pharmacy*, 2004, **15**(3): 142–145.
张伦. 维生素 B₁₂ 市场透析. 中国药房, 2004, **15**(3): 142–145.