

# 常压室温等离子体诱变扭脱甲基杆菌 AM1 高产吡咯喹啉醌

李慧芝<sup>1,2</sup>, 康振<sup>1,2</sup>, 李江华<sup>1,2</sup>, 周景文<sup>1,2</sup>, 堵国成<sup>1,2</sup>

1 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122

李慧芝, 康振, 李江华, 等. 常压室温等离子体诱变扭脱甲基杆菌 AM1 高产吡咯喹啉醌. 生物工程学报, 2016, 32(8): 1145–1149.

Li HZ, Kang Z, Li JH, et al. Heterologous expression and characterization of *Klebsiella oxytoca* lysine decarboxylase. Chin J Biotech, 2016, 32(8): 1145–1149.

**摘要:** 吡咯喹啉醌 (Pyrroloquinoline quinone, PQQ) 作为一种新型的氧化还原酶辅酶, 在医药和食品等领域有广阔的应用前景。为改善扭脱甲基杆菌 *Methylobacterium extorquens* AM1 PQQ 生产性能, 采用常压室温等离子体 (Atmospheric and room temperature plasma, ARTP) 进行诱变, 结合高通量快速筛选方法, 得到以 PQQ 产量为指标的正向突变株。ARTP 诱变的菌株正突变率为 31.6%, 筛选得到的较优正突变株 *M. extorquens* AM1 (E-F3), PQQ 产量达到 54.0 mg/L, 是出发菌株的近 3 倍。系统的高通量方法筛选 ARTP 诱变菌为后续进一步提高 *M. extorquens* AM1 菌株 PQQ 的产量奠定了基础, 亦为改善菌株生产性能提供了新思路。

**关键词:** 常压室温等离子体, 吡咯喹啉醌, 高通量筛选, 正向突变

## Mutagenesis of *Methylobacterium extorquens* AM1 for increasing pyrroloquinoline quinone production by atmospheric and room temperature plasma

Huizhi Li<sup>1,2</sup>, Zhen Kang<sup>1,2</sup>, Jianghua Li<sup>1,2</sup>, Jingwen Zhou<sup>1,2</sup>, and Guocheng Du<sup>1,2</sup>

1 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

**Abstract:** As a novel cofactor of oxidoreductase, pyrroloquinoline quinone (PQQ) has a great potential of application in medicine, food industries. In order to improve the efficiency of the PQQ production by *Methylobacterium extorquens* AM1, the strain was treated by atmospheric and room temperature plasma (ARTP). Positive mutants with changes in PQQ yield were obtained based on a high-throughput screening approach. After ARTP treatment, analysis data show that the positive

**Received:** December 9, 2015; **Accepted:** March 24, 2016

**Supported by:** National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2012AA022103), National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2014CB745100), Program for New Century Excellent Talents in University (No. NCET-12-0876).

**Corresponding author:** Guocheng Du. Tel: +86-510-85918309; E-mail: gcd@jiangnan.edu.cn

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2012AA022103), 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2014CB745100), 新世纪优秀人才支持计划 (No. NCET-12-0876) 资助。

mutation rate was 31.6%. Furthermore, we obtained an excellent positive mutant *M. extorquens* AM1 (E-F3) with the yield of 54.0 mg/L PQQ, which was approximately 3 times as much compared with that of the wild-type strain. The robust high-throughput screening method for mutagenesis by ARTP improves PQQ production. In addition, this method also provides a new strategy for further strain improvement.

**Keywords:** atmospheric and room temperature plasma, pyrroloquinoline quinone, high-throughput screening, positive mutation

吡咯喹啉醌 (Pyrroloquinoline quinone, PQQ) 是继烟酰胺核苷酸和黄素核苷酸之后发现的第 3 类氧化还原酶的辅酶<sup>[1-2]</sup>, 能通过参与蛋白转运来调节酶的活性<sup>[3]</sup>. PQQ 是高水溶性、热稳定性分子, 具有强大的抗氧化活性<sup>[4]</sup>, 是当今科学界的研究热点。

诱变育种是菌种改良的重要手段<sup>[5]</sup>, 针对传统诱变方法的低突变率和操作安全性不足等问题<sup>[6]</sup>, 研究人员发展了新型常压室温等离子体 (Atmospheric and room temperature plasma, ARTP) 诱变技术<sup>[7]</sup>. 目前 ARTP 诱变技术已成功应用于 40 多种微生物, 包括细菌、真菌及微藻等<sup>[8-9]</sup>.

扭脱甲基杆菌 *M. extorquens* AM1 的 PQQ 合成能力强<sup>[10]</sup>, 且具备已知的全基因组序列信息, 对于菌株 PQQ 合成的代谢工程研究具有重要意义。目前生物发酵法是 PQQ 合成的主要研究方向<sup>[11]</sup>, 因此筛选 PQQ 高产菌株是实现 PQQ 工业化发酵生产的前提。本研究以 *M. extorquens* AM1 为研究对象, 结合高通量筛选手段, 建立快速筛选 PQQ 高产诱变株的方法, 为今后逐步实现发酵法工业化生产 PQQ 奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种

扭脱甲基杆菌 *M. extorquens* AM1 为本研究的出发菌株; *M. extorquens* AM1 (E-F3) 为本研究获得的诱变株。

#### 1.1.2 培养基

Mex 培养基:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2.12 g/L, Methylamine-HCl 6.75 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  10 mg/L,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10 mg/L,  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 mg/L,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.5 mg/L。

改良 LB 培养基: 在 LB 培养基中按照 Mex 培养基添加相同浓度  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 。

#### 1.1.3 主要试剂和仪器

Methylamine-HCl 购自 Sigma Aldrich 公司; 其他化学试剂购自国药集团化学试剂有限公司。

本研究所用仪器主要有: ARTP 诱变育种仪 (无锡源清天木生物科技有限公司); QPix 420 微生物筛选系统 (Molecular Devices 公司); BioTek Cytation 3 酶标仪 (美国 BioTek 公司)。

### 1.2 培养方法

种子培养条件: *M. extorquens* AM1 进行菌种活化后挑取单菌落接种于 Mex 培养基中, 30 °C、220 r/min 培养 72 h。

摇瓶发酵条件: 取种子培养物接种于 Mex 培养基中, 接种量为 10% (V/V), 30 °C、220 r/min 发酵培养 6-7 d。

发酵罐发酵条件: 3 L 发酵罐装液量 1.5 L, 接种量 10% (V/V) 搅拌转速 600 r/min 通气比 1 vvm, 30 °C 发酵 7-8 d。

### 1.3 ARTP 诱变方法

诱变菌液制备和预处理方法见参考文献[5]。

### 1.4 高通量筛选

将诱变单菌落转移到 96 孔深孔板中的 Mex 培养基中, 900 r/min、30 °C 培养 72 h; 再以 10% 接种量转接到 48 孔深孔板中, 900 r/min、30 °C 发酵培养 4-5 d。

### 1.5 分析方法

#### 1.5.1 菌体生长情况测定

取 1 mL 发酵液, 测定吸光值  $OD_{600}$ 。

#### 1.5.2 胞外 PQQ 测定

检测方法见参考文献[12]。

#### 1.5.3 诱变致死率和突变率计算

致死率及突变率计算方法见参考文献[5]和[8]。

#### 1.5.4 遗传稳定性分析

为分析正向突变株的遗传稳定性, 分别进行 4

代和 6 代传代培养, 并分析正突变株的菌体生长情况和 PQQ 产量变化。

## 2 结果与分析

### 2.1 ARTP 诱变致死率曲线测定

如图 1 所示, ARTP 处理 85 s 后致死率趋于稳定达到 100%, 但处理 65 s 出现致死率下降的折点。故本研究在避开折点的前提下选择致死率在 95% 以上的处理时间, 即 80–95 s 处理菌株, 以方便后续的高通量筛选。

### 2.2 高通量快速初筛突变株

初筛结果如图 2 所示, 其中较优正突变株初筛结果见表 1。以 PQQ 产量为指标, 对近 500 株诱变菌的初筛结果进行统计, 得到菌株突变率为

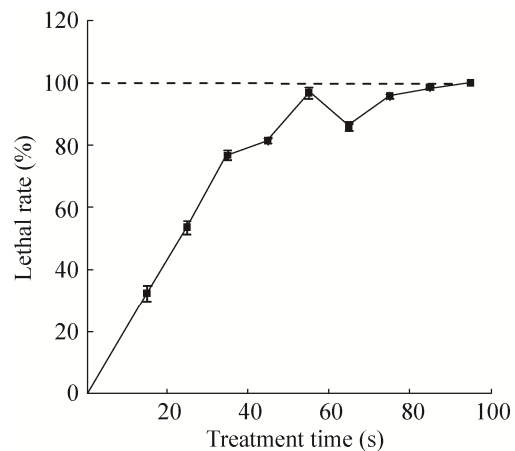


图 1 扭脱甲基杆菌的致死率曲线

Fig. 1 The lethal rate curve of the *M. extorquens* AM1.

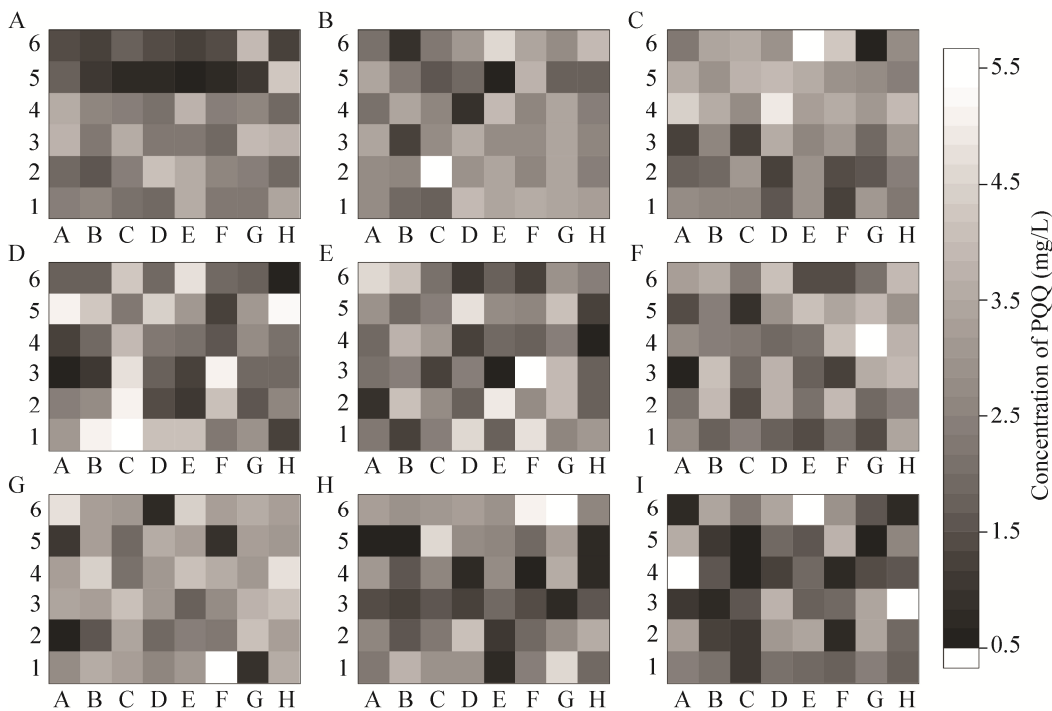


图 2 基于 48 孔板的高通量筛选结果 (\*A1 为野生菌, 图中字母 A-I 分别编码 48 孔深孔板初筛结果的热图, 每个小图中字母 A-H 为孔板竖排编号, 数字 1-6 为孔板横排编号)

Fig. 2 Results of high-throughput preliminary screening.

表 1 较优正突变株初筛结果

Table 1 Preliminary screening results of excellent positive mutant strains

Object	B-C2	C-E6	E-E2	E-F3	F-G4	G-F1	H-G6
Concentration of PQQ (mg/L)	5.4±0.13	5.3±0.07	5.4±0.10	6.0±0.12	5.3±0.08	5.2±0.05	5.5±0.11
The degree of improvement (%)	122.3±3.1	120.8±1.6	131.2±2.4	158.1±3.2	125.6±1.9	123.1±1.2	134.2±2.5

49.8%，其中正突变率为 31.6%。可见 ARTP 诱变方法得到的菌株正突变率较高。由表 1 可知，对 *M. extorquens* AM1 首次尝试 ARTP 诱变初筛效果良好，较优菌株 PQQ 产量提高在 120% 以上。根据图 2 选择 PQQ 产量提高较明显的 7 株突变株进行后续复筛实验验证。

### 2.3 较优正突变株摇瓶复筛

诱变菌株的摇瓶复筛结果如图 3 所示。由图可知，正突变株 PQQ 产量均比出发菌株高，其中 E-F3 的 PQQ 产量提高最明显，PQQ 摇瓶产量达到 6.3 mg/L，比出发菌株提高 142.3%。

### 2.4 遗传稳定性分析

为分析正突变株的遗传稳定性，选择上述得到的较优正突变株 E-E2 和 E-F3 进行传代发酵（表 2）。从表 2 可知，从菌体生长情况看，上述两株诱变菌进入生长对数中期的时间较野生菌长，可能是 ARTP 诱变的不定向性，引起的负面影响。以 PQQ 产量为评价指标，经诱变得到的 *M. extorquens* AM1 突变株 PQQ 产量波动幅度较小，能保持良好的遗传稳定性。

### 2.5 正突变株 E-F3 分批发酵

*M. extorquens* AM1 野生菌和正突变株 E-F3 发

酵结果分别如图 4A 和图 4B 所示。

比较图 4A 和图 4B，发现 *M. extorquens* AM1 出发菌株在发酵 156 h，发酵液中 PQQ 积累量达到最大值，约为 18.0 mg/L；E-F3 发酵 168 h 达到最大值，约为 54.0 mg/L，是出发菌株的 3 倍。可见，经 ARTP 诱变后，PQQ 产量有明显提高。

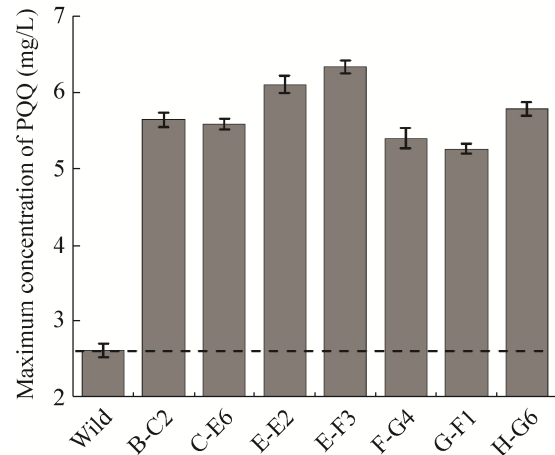


图 3 较优正突变株复筛结果 (\*虚线代表野生菌产量值)  
Fig. 3 PQQ yield of excellent positive mutant strains.

表 2 突变菌的遗传稳定性

Table 2 Genetic stability of mutant strains

Strains	The 4th subculture		The 6th subculture	
	Time to $OD_{600}=3.5$ (h)	Concentration of PQQ (mg/L)	Time to $OD_{600}=3.5$ (h)	Concentration of PQQ (mg/L)
Wild	103±0.9	2.6±0.05	100±0.9	2.6±0.07
E-E2	96±0.6	6.0±0.11	98±0.6	6.1±0.12
E-F3	108±0.8	6.3±0.09	106±0.7	6.2±0.10

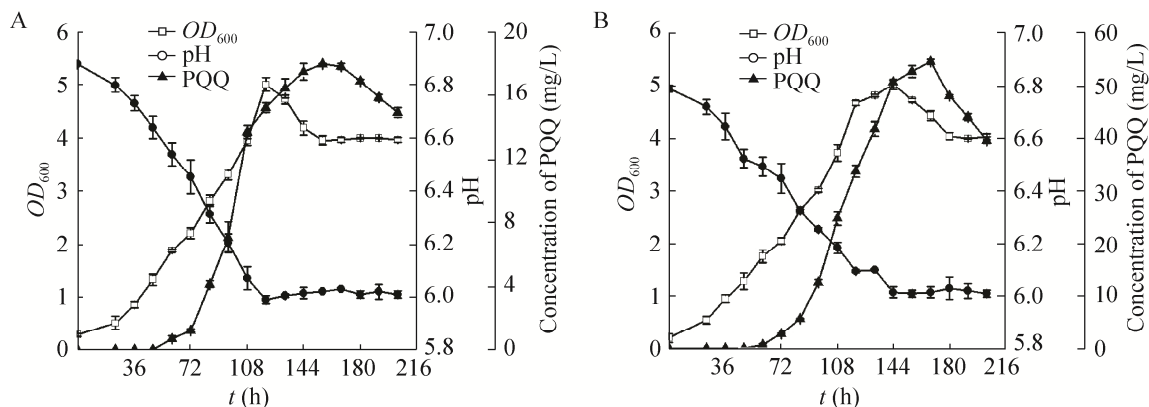


图 4 *M. extorquens* AM1 野生菌 (A) 和正突变株 E-F3 (B) 的分批发酵结果  
Fig. 4 Batch fermentation of *M. extorquens* AM1 (A) and E-F3 (B).

### 3 讨论

据报道食甲基营养菌 *Methylovorus* sp. MP688<sup>[11]</sup>、生丝微菌 TH205<sup>[13]</sup>和假单胞杆菌 *Pseudomonas* sp. 0813<sup>[14]</sup>产 PQQ 最高水平分别可达到 15 mg/L、26.6 mg/L 和 448 mg/L。可见, *M. extorquens* AM1 菌株在 PQQ 产量提升方面还有很大进步空间。首先, 可以尝试从多次累积诱变或者发酵工艺优化方面来进一步提高 PQQ 产量。其次, 研究表明, 在氧化葡萄糖酸杆菌 *Gluconobacter oxydans* 621H 中过量表达 *pqq*ABCDE 基因簇, PQQ 产量提高了近 30 倍<sup>[15]</sup>。由此启发我们, 可以尝试调节 PQQ 基因簇中某个基因的比例或过量表达 PQQ 合成基因簇来进一步提高 PQQ 产量。最后, 结合基因组学和蛋白质组学技术, 可以尝试将 PQQ 高产诱变菌中基因的改变, 与 PQQ 生物合成途径相关联, 以进一步促进 PQQ 的合成。

### REFERENCES

- [1] Duine JA. Cofactor diversity in biological oxidations: implications and applications. *Chem Rec*, 2001, 1(1): 74–83.
- [2] Matsushita K, Toyama H, Yamada M, et al. Quinoproteins: structure, functions and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 58(1): 13–22.
- [3] Kasahara T, Kato T. Nutritional biochemistry: a new redox-cofactor vitamin for mammals. *Nature*, 2003, 422(6934): 832.
- [4] Pandey S, Singh A, Kumar P, et al. Probiotic *Escherichia coli* CFR 16 producing pyrroloquinoline quinone (PQQ) ameliorates 1,2-dimethylhydrazine-induced oxidative damage in colon and liver of rats. *Appl Biochem Biotechnol*, 2014, 173(3): 775–786.
- [5] Wang FF, Sun PY, Yin HJ, et al. Mutation of alcohol-producing yeast using atmospheric room temperature plasma and the mutant strain characteristic. *China Brew*, 2013, 32(10): 117–119 (in Chinese).
- [6] Kurowska M, Labocha-Pawłowska A, Gnizda D, et al. Molecular analysis of point mutations in a barley genome exposed to MNU and gamma rays. *Mutat Res*, 2012, 738–739: 52–70.
- [7] Wang LY, Huang ZL, Li G, et al. Novel mutation breeding method for *Streptomyces avermitilis* using an atmospheric pressure glow discharge plasma. *J Appl Microbiol*, 2010, 108(3): 851–858.
- [8] Jin LH, Fang MY, Zhang C, et al. Operating conditions for the rapid mutation of the oleaginous yeast by atmospheric and room temperature plasmas and the characteristics of the mutants. *Chin J Biotech*, 2011, 27(3): 461–467 (in Chinese).
- [9] 金丽华, 方明月, 张翀, 等. 常压室温等离子体快速诱变产油酵母的条件及其突变株的特性. *生物工程学报*, 2011, 27(3): 461–467.
- [10] Zhang X, Zhang XF, Li HP, et al. Atmospheric and room temperature plasma (ARTP) as a new powerful mutagenesis tool. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(12): 5387–5396.
- [11] Stoddard SF. Bacterial strains for the production of pyrroloquinoline quinone: US, 6511820. 2003-01-28.
- [12] Zhong SS, Liu H, Ge XZ, et al. Optimization of fermentation conditions for pyrroloquinoline quinone expression by *Pseudomonas* 0813. *J Beijing Univ Chem Technol: Nat Sci*, 2013, 40(5): 88–92 (in Chinese).
- [13] 钟杉杉, 刘辉, 葛喜珍, 等. 吡咯喹啉醌生产菌的发酵条件优化. *北京化工大学学报: 自然科学版*, 2013, 40(5): 88–92.
- [14] 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 Progr*, 2013, 29(6): 1398–1404.
- [15] Xiong XH, Zhi JJ, Yang L, et al. Complete genome sequence of the bacterium *Methylovorus* sp. strain MP688, a high-level producer of pyrroloquinoline quinone. *J Bacteriol*, 2011, 193(4): 1012–1013.
- [16] Yin F, Lu B, Chen GH, et al. Study on the production of pyrroloquinoline quinone by using methanol-utilizing bacteria. *J East China Univ Sci Technol*, 2004, 30(2): 227–229, 233 (in Chinese).
- [17] 尹芳, 陆兵, 陈国豪, 等. 甲醇利用型细菌发酵生产吡咯喹啉醌的培养条件. *华东理工大学学报*, 2004, 30(2): 227–229, 233.
- [18] Hoelscher T, Göerisch H. Knockout and overexpression of pyrroloquinoline quinone biosynthetic genes in *Gluconobacter oxydans* 621H. *J Bacteriol*, 2006, 188(21): 7668–7676.

(本文责编 郝丽芳)