

· 生物育种与工艺优化 ·

## 适应性驯化选育高产吡咯喹啉醌的生丝微菌突变株

柯崇榕<sup>1,2</sup>

1 福建师范大学 生命科学学院 工业微生物发酵技术国家地方联合工程研究中心, 福建 福州 350108

2 中国科学院微生物研究所 微生物生理与代谢工程重点实验室, 北京 100101

柯崇榕. 适应性驯化选育高产吡咯喹啉醌的生丝微菌突变株. 生物工程学报, 2020, 36(1): 152-161.

Ke CR. Breeding of *Hyphomicrobium denitrificans* for high production of pyrroloquinoline quinone by adaptive directed domestication. Chin J Biotech, 2020, 36(1): 152-161.

**摘要:** 吡咯喹啉醌 (PQQ) 广泛存在于生物体内, 具有促进机体生长、维护线粒体功能、促进神经生长因子合成和调节机体自由基水平等生理功能, 在医药、食品和化妆品领域具有广阔的应用前景。为提高脱氮生丝微菌 *Hyphomicrobium denitrificans* FJNU-6 的 PQQ 生产性能, 文中以高浓度甲醇为拮抗因子进行实验室适应性定向驯化, 通过光谱法快速筛选体系, 选育 PQQ 高产正突变株。6 轮适应性驯化后, 每轮驯化的正向突变率达到 90% 以上, 产量提高 1 倍的突变株达到 10% 左右。最后, 利用 5 L 发酵罐对突变株 FJNU-R8 进行分批补料培养, 相较于出发菌株, 突变株在不同甲醇浓度下 *pqq* 和 *moxF* 基因簇的表达量较高且差异较小, 甲醇消耗和生长速度较慢, PQQ 产量达到 1 087 mg/L (143 h), 单位细胞产量提高了 1.42 倍, 展现出良好的工业应用潜力。文中所述的适应性定向驯化结合快速筛选体系能简单、快速地获得高产 PQQ 的生丝微菌突变菌株, 对其他甲基营养菌高产 PQQ 突变株的高通量筛选具有借鉴作用。

**关键词:** 生丝微菌, 吡咯喹啉醌, 高通量筛选, 适应性驯化

## Breeding of *Hyphomicrobium denitrificans* for high production of pyrroloquinoline quinone by adaptive directed domestication

Chongrong Ke<sup>1,2</sup>

1 National and Local United Engineering Research Center of Industrial Microbiology and Fermentation Technology, College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, Fujian, China

2 CAS Key Laboratory of Microbial Physiological and Metabolic Engineering, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

**Abstract:** Pyrroloquinoline quinone (PQQ) is widely distributed in organisms and has physiological functions such as boosting body growth, maintaining mitochondrial function, promoting synthesis of nerve growth factor and regulating free radical levels in the body. It has broad application prospects in the fields of medicine, food and cosmetics. In order to improve

**Received:** September 23, 2019; **Accepted:** November 28, 2019

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 21807011), Natural Science Foundation of Fujian Province, China (No. 2018J01673), Foundation of Fujian Educational Committee (No. JK2017012).

**Corresponding authors:** Chongrong Ke. Tel/Fax: +86-591-22868212; E-mail: kechr@fjnu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 21807011), 福建省自然科学基金 (No. 2018J01673), 福建省省属高校科研专项 (No. JK2017012) 资助。

网络出版时间: 2019-12-11

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20191210.1058.003.html>

the PQQ production of *Hyphomicrobium denitrificans* FJNU-6, the high-concentration methanol was used as the antagonistic factor for laboratory adaptive domestication. The PQQ positive mutants were selected using rapid screening system by spectroscopy. After 6 rounds of adaptive domestication, about 10% mutants were acquired with a doubled yield, and over 90% positive mutation rate of each round of domestication was reached. Subsequently, the mutant strain FJNU-R8 was fermented by 5 L fermenter. Compared with the original strain, the expression of *pqq* and *moxF* gene clusters were higher at different methanol concentrations and similar to each other. Meanwhile, the methanol consumption rate and growth rate were slower than the original strain. Finally, the PQQ yield was increased by 1.42 times to 1 087.81 mg/L (143 h), indicating good industrial application potential. The adaptive domestication combined with rapid screening system described in this study can easily and rapidly obtain mutants with high yield of PQQ, which can be used as reference for high-throughput screening of other high-yield PQQ mutants of methylophilic bacteria.

**Keywords:** *Hyphomicrobium denitrificans*, pyrroloquinoline quinone, high-throughput screening, adaptive domestication

吡咯喹啉醌 (Pyrroloquinoline quinone, PQQ) 为红褐色的具有强氧化还原活性的芳香三环邻位醌类化合物, 是继黄素核苷酸 (FMN/FAD) 和吡啶核苷酸(NAD/NADP)之后发现的第 3 种氧化还原酶辅因子<sup>[1-2]</sup>。PQQ 虽然是作为细菌脱氢酶辅因子被发现, 但是广泛存在于植物、动物和人体组织器官中, 人乳中 PQQ 含量高达 140–180  $\mu\text{g/L}$ <sup>[3]</sup>。真核细胞中, PQQ 作为受体协同辅酶  $\text{Q}_{10}$  完成呼吸链的电子传递, 提供生物生长所需的生物能, 具有促进机体生长、线粒体增殖、神经生长因子合成和清除胞内自由基等功能, 在食品、医药及化妆品领域具有重要的应用价值<sup>[4-6]</sup>。需要指出的是, PQQ 虽然是动物正常生长发育和繁殖的必需因子, 但是哺乳动物自身不能合成, 只能从外界摄取<sup>[7-8]</sup>。

PQQ 的生产方法主要是化学合成法和微生物发酵法, 化学法合成步骤繁杂、纯化成本高昂, 微生物发酵法成为 PQQ 产业化的发展方向<sup>[9]</sup>。截止 2019 年 9 月, 6 家向美国 FDA 申请 PQQ $\text{Na}_2$  进行 GRAS 注册的企业中, 只有诸城市浩天药业有限公司采用的是化学合成法。目前, PQQ 的生物合成途径已经解析清楚, 不同于辅酶  $\text{Q}_{10}$  等其他常见的从头合成辅因子, PQQ 是一种仅需通过 5–6 步酶促反应催化合成的翻译后蛋白修饰产物<sup>[10]</sup>。然而 PQQ 的调控机制仍未阐明且遗传操作体系不成熟, 通过理性设计手段改造大幅度提高甲基营养菌的 PQQ 产量相对比较困难, 传统育种方案仍然是主要手段<sup>[11-15]</sup>。因此, 低成本、高通量的高产 PQQ

突变株的筛选方案, 对实现优良菌株大规模选育是迫切需要的。

迄今为止, 能够合成 PQQ 的生物主要是细菌, 其中又以革兰氏阴性细菌为主<sup>[16]</sup>。不同细菌 PQQ 的合成量差异显著, 有些细菌只能合成微量的 PQQ 以满足自身的代谢需求, 如微环菌属、假单胞菌属和枝动杆菌属等; 有的细菌却能产生过量的 PQQ, 如生丝微菌属、嗜甲基菌属和交替假单胞菌属等, 其中甲基营养型细菌的 PQQ 合成水平最高<sup>[17-18]</sup>。甲基营养菌是一类以甲醇等  $\text{C}_1$  化合物为唯一碳源和能量进行生长的革兰氏阴性菌, PQQ 随菌体生长在细胞质中合成, 然后转运至细胞间质与脱氢酶结合氧化碳源为细胞生长提供碳骨架<sup>[19]</sup>。然而, PQQ 与脱氢酶是通过  $\text{Ca}^{2+}$  或  $\text{Mg}^{2+}$  介导的配位键相连, 结合力较弱, 转运过程中容易游离至胞外, PQQ 大量合成<sup>[20-21]</sup>。根据美国 FDA 公布的 GRAS 文件, 日本 Mitsubishi Gas 和海正药业等 5 家微生物发酵法生产 PQQ 的企业均是以 *Hyphomicrobium denitrificans* 作为生产菌株。传统的诱变育种存在正突变率低、遗传稳定性差等问题, 适应性驯化能够在较短的时间内有效地改善菌株的目标表型和生理特征, 而不影响除目的性状以外的其他优良性状<sup>[22]</sup>。本研究以 *H. denitrificans* FJNU-6 为研究对象, 根据生丝微菌能在纯无机盐培养基中以甲醇为唯一碳源和能量来源进行生长的生理特性, 设计出甲醇为拮抗因子进行实验室定向驯化, 建立光谱法快速筛选

方法, 选育获得 PQQ 高产突变株。最后, 对突变株进行了 5 L 发酵罐培养, 相较出发菌株, 不仅甲醇消耗速率和 PQQ 产量提高, 而且单位细胞的 PQQ 产量提高超过 142.2%, 展示出其工业应用潜力。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种

脱氮生丝微菌 *H. denitrificans* FJNU-6 为本课题组从福建省泉州市惠安湄洲湾南岸海域沉积物中筛选获得<sup>[23]</sup>。

#### 1.1.2 培养基

筛选培养基(g/L): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 3, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.5, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1, pH 6.8; 固体培养基添加 2% 的琼脂粉。

发酵培养基: 甲醇 25 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 5 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.4 g/L, 微量元素液 1 mL/L, 维生素辅液 2 mL/L, pH 6.8。

微量元素液<sup>[24]</sup>(mg/L): FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 80, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 22.5, MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 40, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 5, NaCl 15, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.3, KI 0.3, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.03, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 3, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 300。

维生素辅液<sup>[17]</sup>(g/L): 核黄素 0.2, 吡哆素 0.4, 硫胺素 0.4, 泛酸钙 0.4, 烟酸 0.4, 对氨基苯甲酸 0.2, 生物素 0.02, 叶酸 0.02, 肌醇 2。

#### 1.1.3 引物

表 1 为本研究使用的引物, 均采用 AlleleID 6.0 软件设计。

## 1.2 实验室适应性驯化构建突变库

### 1.2.1 紫外诱变

取培养至对数中期的培养液 8 000×g 离心 5 min, 弃上清, 用等体积的无菌生理盐水混匀洗涤 2 次, 然后转移至放有搅拌子的培养皿中, 置于预热 30 min 紫外灯 (功率 15 W) 下 30 cm 处的磁力搅拌器上 (50 r/min) 照射 40 s, 8 000×g 离心 5 min, 弃上清。

表 1 RT-qPCR 中使用的引物

Table 1 Primers used in RT-qPCR

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
<i>recA</i> -F	AGGTCGTCAAGAACAAGG	18
<i>recA</i> -R	CGTTATAGGACATCCAAGC	19
<i>gapdh</i> -F	CGACTTCAACCACGATGC	18
<i>gapdh</i> -R	TCATACCAGGCGAGAACG	18
<i>pqqA</i> -F	ATGGAAAGCAGTTACCG	17
<i>pqqA</i> -R	TCAGATGAGGTTGATCTCAG	20
<i>pqqB</i> -F	ATCGTAAAGCCAGCAAGTC	19
<i>pqqB</i> -R	ATCATCTCGCCGCTTCG	18
<i>pqqC</i> -F	AAGGACGCAGCACTCATC	18
<i>pqqC</i> -R	TCATCAGGAAGCAGACCATC	20
<i>pqqD</i> -F	GCGACGAGTGTTGAGGAAATC	21
<i>pqqD</i> -R	TGTCAGCGAGGATCTCTTGC	20
<i>pqqE</i> -F	TCGGCATTCTCCAAATCC	18
<i>pqqE</i> -R	GATGAGGTTTCGTGTAGAGG	19
<i>moxF<math>\alpha</math></i> -F	ATCGGGATGCGTCAGAAG	18
<i>moxF<math>\alpha</math></i> -R	CAAGATGAAGTTCGGCTACC	20
<i>moxF<math>\beta</math></i> -F	CCTTGCGAGACTCAACCTG	19
<i>moxF<math>\beta</math></i> -R	CAACTGCTGGGAACCGAAG	19

### 1.2.2 NTG 诱变

取培养至对数中期的培养液 8 000×g 离心 5 min, 弃上清, 用等体积的无菌生理盐水混匀洗涤 2 次, 然后加入 5 g/L NTG 母液至终浓度 1.1 g/L, 30 °C、150 r/min 避光培养 60 min。8 000×g 离心 5 min, 取菌体, 用等体积的 PBS 缓冲液 (pH 7.0) 重悬, 重复 1 遍。

### 1.2.3 实验室适应性驯化

按照 UV 和 NTG 诱变方法间隔处理培养至对数生长期的菌体, 每次处理后的菌悬液转移至等体积的筛选发酵培养基中, 30 °C、220 r/min 避光培养。初始甲醇浓度为 2%, 每轮驯化后浓度增加 1%; 初始培养时间为 5 d, 每轮驯化后增加 1 d。

## 1.3 PQQ 高产菌株的高通量筛选

### 1.3.1 高产突变株的快速筛选

按照驯化流程进行 10 轮适应性驯化, 每轮驯化后取培养液测定菌浓、甲醇残留浓度和 PQQ 含量, 并进行梯度稀释涂布于含有 4% 甲醇的固体筛

选培养基平板上培养 7 d。挑取平板上的单菌落转接于装有 1 mL 发酵培养基的白色 96 深孔板中, 30 °C、500 r/min 振荡培养 5 d。8 000×g 离心 5 min, 吸取上清至透明 96 孔板中, 通过光谱法测定上清液中的 PQQ 含量。

### 1.3.2 摇瓶培养复筛

将快速筛选获得的产量较高菌株转接至装有 30 mL 发酵培养基的 250 mL 挡板瓶中, 30 °C、220 r/min 振荡培养 6 d。8 000×g 离心 5 min, 吸取上清, 利用 HPLC 法精确测定培养液中的 PQQ 含量<sup>[20]</sup>。

### 1.3.3 遗传稳定分析

将复筛获得的高产突变株在发酵培养基平板上划线连续传代 9 次, 每代次随机挑取 5 个单菌落进行摇瓶培养, 测定其 PQQ 产量, 验证菌株的遗传稳定性。

## 1.4 分批发酵验证高产菌株产 PQQ 性能

采用二级培养模式分批培养出菌株 FJNU-6 和突变株 FJNU-R8, 按 10% (V/V) 接种量, 将种子液接入初始装有 3 L 发酵培养基的玻璃罐, 30 °C 培养 143 h。初始甲醇浓度为 5 g/L, 然后控制在 0.5 g/L 左右; 通气量: 2.4–3 L/min; 罐压: 0.05 MPa; pH: 对数生长期前 6.2–6.5, 之后调节为 7.0; 搅拌转速关联溶氧, 控制在 40%。

## 1.5 *pqq* 和 *moxF* 基因簇表达差异分析

将出发菌株 FJNU-6 和突变株 FJNU-R8 分别在含有 2%、4%、6%、8%、10% 和 12% 甲醇的培养基中培养 60 h, 离心收集菌体。采用 NcleoSpin RNA 试剂盒提取总 RNA, 反转录获得 cDNA。以获得的 cDNA 为模板, 进行荧光定量 PCR 分析 *pqq* 和 *moxF* 基因簇的表达差异。采用 LightCycler<sup>®</sup> 96 SW 1.1 软件, 以 *recA* 和 *gapdh* 为内参基因。基因表达差异分析通过  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  算法进行计算。

## 2 结果与分析

### 2.1 PQQ 高产菌快速筛选方法的建立

PQQ 是以 *pqqA* 编码的含有谷氨酸和酪氨酸

残基多肽链 PqqA 为前体, 经 PqqB、PqqE 和 PqqD 等酶的缩合、氧化和异构形成中间产物 AHQQ, 然后在 PqqC 的作用下通过 3 分子 O<sub>2</sub> 参与进行 8 个电子的氧化及环化形成 PQQ。因此, AHQQ 是摇瓶培养过程中最主要的代谢副产物<sup>[15, 25]</sup>。全波谱扫描表明, 筛选培养基没有任何明显的吸收峰, AHQQ 在 275 nm 处有较强的吸收峰, FJNU-6 培养液上清含有 AHQQ 和蛋白质多肽等代谢副产物, 但仍具有 254 nm 和 330 nm 两个 PQQ 特征吸收峰 (图 1)。光谱法是一种精密度较高的 PQQ 发酵液快速检测方法, 其准确度受培养基组分干扰<sup>[26]</sup>。分别用 HPLC 法和光谱法 ( $OD_{254}$  与  $OD_{330}$ ) 测定 FJNU-6 培养过程中 PQQ 含量的变化, 培养液中的 PQQ 含量与 254 nm 和 330 nm 处的吸光值呈正相关, 且相关系数均高于  $R^2 > 0.999$ 。培养液在 330 nm 处的吸光值受培养过程中产生的中间代谢产物影响较小, 且组内和组间精度偏差均小于 2%。因此, 选择 330 nm 作为酶标仪的筛选波长 ( $C_{PQQ} = 35.40 \times OD_{330} + 0.844 4$ ,  $R^2 = 0.999 5$ )。

### 2.2 适应性驯化轮次的确定

按照驯化过程进行 10 轮定向驯化, 菌株长势良好, 菌体浓度逐步提高, 甲醇残余浓度均低于 0.8 g/L (图 2A)。当初始甲醇浓度超过 6%, 菌体

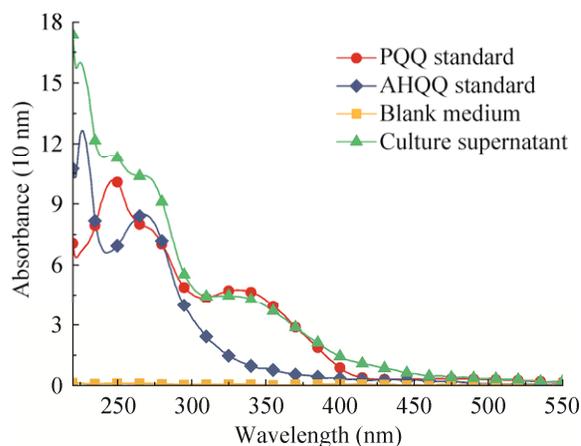


图 1 FJNU-6 培养液上清的全波谱扫描曲线  
Fig. 1 The full-spectrum scanning curve of culture supernatant from *H. denitrificans* FJNU-6.

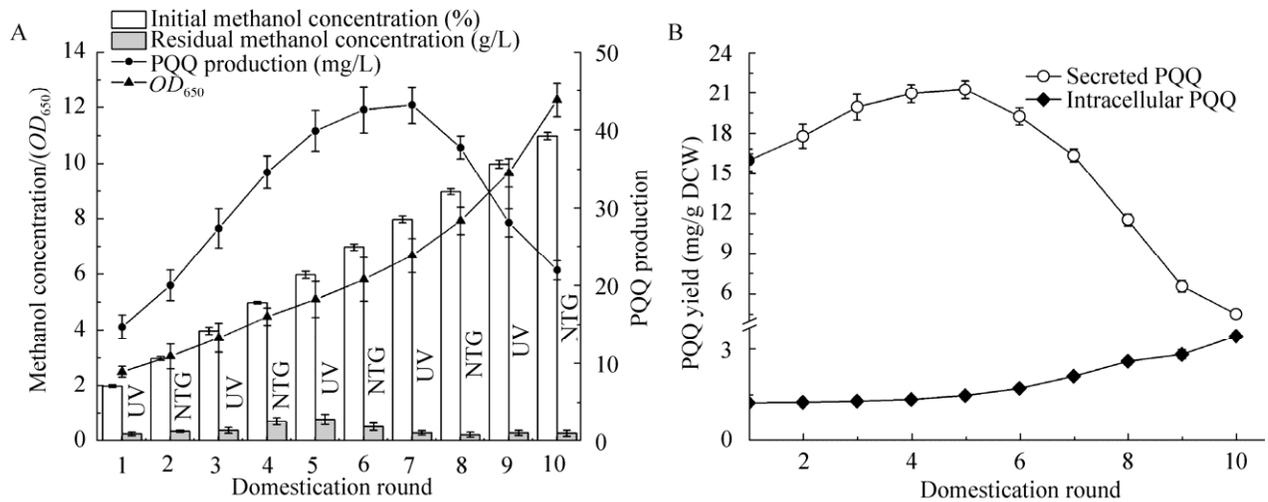


图2 驯化中  $OD_{650}$ 、PQQ 含量和甲醇浓度的变化

Fig. 2 The content of methanol and PQQ,  $OD_{650}$  in the process of domestication.

生长加快,每轮菌液的  $OD_{650}$  增加幅度均大于 1.1, 残余甲醇浓度低于 0.4 g/L; 初始甲醇浓度只有低于 8% 时, 驯化液中 PQQ 的含量才随甲醇浓度增加而提高。单位细胞 PQQ 产率 (图 2B) 分析表明, 随着驯化甲醇浓度的提高, 单位细胞的胞内 PQQ 含量逐步提高; 当甲醇浓度超过 5%, 胞内 PQQ 含量超过 0.2 mg/g DCW, 单位细胞的 PQQ 分泌量开始迅速减少。过高浓度的甲醇不但降低了 PQQ 的合成量, 也抑制了 PQQ 的分泌。因此, 甲醇驯化浓度确定为 6%、7%、8% 和 9%。

### 2.3 高产突变株的筛选

将经过 5、6、7 和 8 轮驯化的菌液稀释涂布于 4% 甲醇平板, 各挑取 100 个单菌落进行快速筛选, 结果如图 3 所示。从图中可以看出, 随着驯化轮次的增加, 突变株的 PQQ 平均含量和最高产量也呈现出先升后降的现象, 进一步表明驯化过程中甲醇的浓度并非越高越好, 高甲醇浓度的确会降低 PQQ 的产量。

4 轮驯化结果统计分析 (表 2) 表明, 适应性驯化是一个正突变株富集过程, 菌株的正突变率从 80% 提高到 98%。随着驯化的进行, 菌株出现了钝化现象, 产量差异越来越小。

### 2.4 高产突变株遗传稳定性分析

挑取 5 株产量最高的突变株分别在 2% 的甲醇平板上连续划线传代 9 次, 每次挑取单菌落进行摇瓶验证 PQQ 产量 (图 4)。结果发现, 经过 8 轮驯化以后筛选获得的突变株具有较高的稳定性, 传代培养的 PQQ 产量差异在 6% 之内波动。突变株 FJNU-R8 的 PQQ 产量最高, 9 轮传代培养的 PQQ 含量在 65 mg/L 上下波动。因此选择突变株 FJNU-R8 进行分批发酵验证。

### 2.5 高产突变株的分批发酵

采用二级发酵培养 FJNU-6 和 FJNU-R8 (图 5)。从图中看出, 甲醇作为唯一碳源和能量来源而迅速被消耗, 菌体快速进入对数生长期, 出发菌株 FJNU-6 的甲醇消耗较快, 31 h 初始甲醇仅剩 0.13 g/L, 而突变菌株在 39 h 初始甲醇还剩 0.10 g/L。下罐 (143 h) 时, 出发菌株 FJNU-6 的生物量 45.41 g/L, 比生长速率最大为  $0.19 \text{ h}^{-1}$ ; 突变株 FJNU-R8 的生物量 41.83 g/L, 比生长速率最大只有  $0.16 \text{ h}^{-1}$ , 略低于出发菌株。PQQ 主要在对数生长期中后期和稳定期合成, 与菌体生长不完全同步。下罐 (143 h) 时, 出发菌株 FJNU-6 的 PQQ 产量为 487.6 mg/L, 比合成速率最大为  $4.22 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1}$ , 单位细胞产量

为 10.74 mg/g DCW; 突变株 FJNU-R8 的 PQQ 产量达到 1 087 mg/L, 比合成速率最高达到了

$5.44 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1}$ , 单位细胞产量达到 26.01 mg/g DCW, 是出发菌株的 1.42 倍。

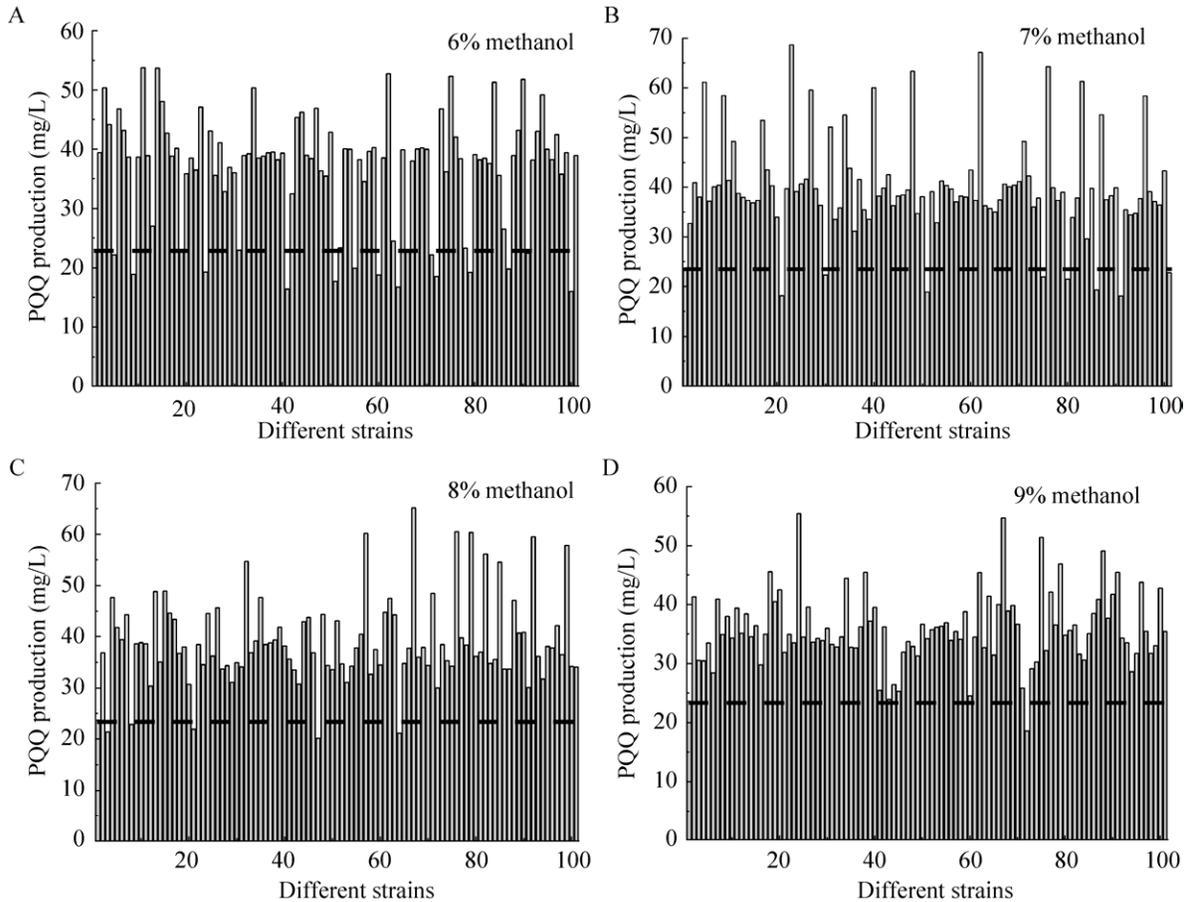


图 3 不同驯化浓度的菌株筛选结果

Fig. 3 Screening results of mutant strain under different methanol concentration.

表 2 筛选菌株的突变率分析表

Table 2 Mutation rate analysis of mutant strains

Methanol concentration (%)	Positive mutation rate (%)	Maximum yield (mg/L)	Minimum yield (mg/L)
6	80	53.85	16.09
7	91	68.74	18.21
8	94	65.31	20.27
9	98	55.56	18.66

## 2.6 甲醇胁迫下 PQQ 合成和甲醇代谢相关基因簇的表达分析

针对突变株 FJNU-R8 甲醇消耗和 PQQ 合成速率的变化, 进一步通过荧光定量 PCR 分析在不同甲醇浓度中 *pqq* 基因簇 (分别编码多肽 PqqA、羟化酶 PqqB、氧化酶 PqqC、分子伴侣 PqqD 和

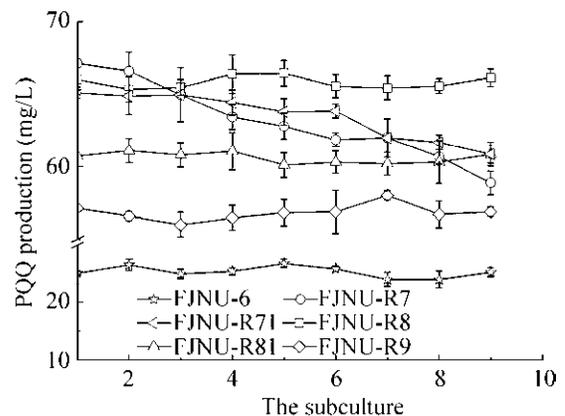


图 4 突变株的遗传稳定性

Fig. 4 Genetic stability of mutant strains.

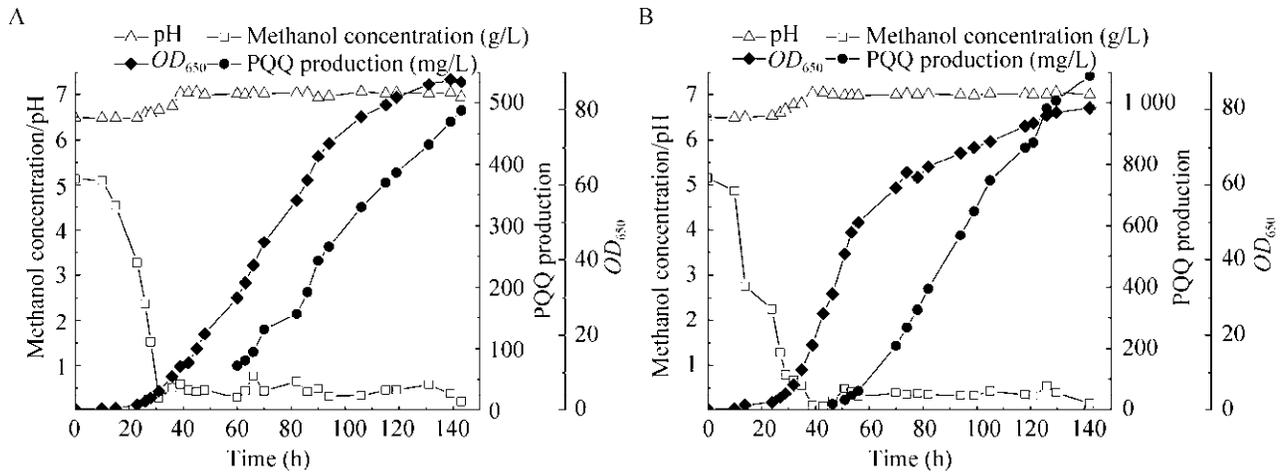


图5 *H. denitrificans* 出发株 FJNU-6 (A) 和突变株 FJNU-R8 (B) 的分批补料培养曲线

Fig. 5 The culture curves of *H. denitrificans* FJNU-6 (A) and FJNU-R8 (B).

SAM 自由基酶 PqqE) 和 *moxF* 基因簇 (编码甲醇脱氢酶的 $\alpha$ 和 $\beta$ 亚基) 的表达差异情况 (图 6)。从图中可以看出, 出发菌株 FJNU-6 和突变株 FJNU-R8 的 *moxF* 和 *pqq* 基因簇表达随甲醇浓度的提高均呈现出先升后降的趋势, 与驯化过程中甲醇残余浓度和 PQQ 含量变化趋势相一致。然而, 突变株 *moxF* 和 *pqq* 基因簇的表达量随甲醇浓度提高而变化的趋势变缓, 从基因水平上证实了突变株对甲醇的刺激出现了钝化。

利用高浓度的甲醇进行拮抗驯化 FJNU-6, 细

胞应激合成大量的甲醇脱氢酶和辅酶 PQQ, 以加快甲醇的氧化消耗, *moxF* 和 *pqq* 基因簇的表达量随之提高。当甲醇浓度超过 5% 时, 单位细胞的 PQQ 产量却迅速降低 (图 2B)。因此, *moxF* 和 *pqq* 基因簇表达随甲醇浓度的提高呈现出先升后降的现象。从图 6 中可以看出, 突变株 FJNU-R8 的 *pqq* 基因簇中各基因的表达量均高于相应浓度下出发株的表达量, 而 *moxF* 基因簇的表达量在 6% 以后就低于出发菌株。由此可以看出, PQQ 分泌量与 *pqq* 基因簇表达量成正相关。

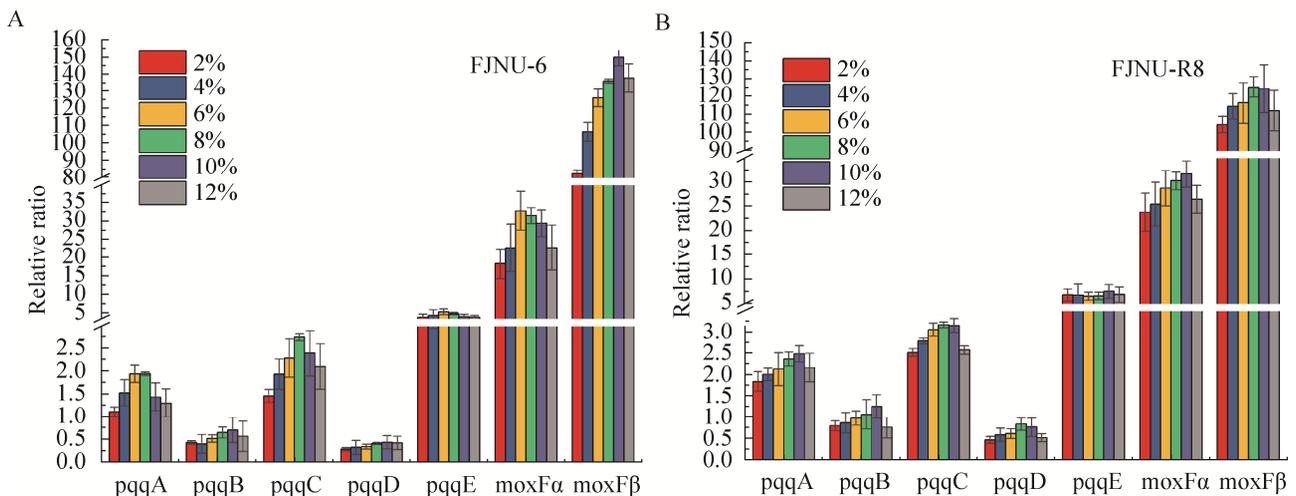


图6 不同甲醇浓度下 *pqq* 和 *moxF* 基因簇的表达

Fig. 6 Gene expression of *moxF* and *pqq* gene cluster under different methanol.

### 3 讨论

PQQ 属于翻译后蛋白修饰产物,其生物合成途径虽然已经解释清楚,但是其调控机制尚未阐明,通过基因工程等理性设计手段过表达一个或几个 *pqq* 基因获得 PQQ 高产菌株相对比较困难。Tina 等<sup>[11]</sup>在氧化葡萄糖酸杆菌 *Gluconobacter oxydans* 621H 中过表达 *pqq* 基因簇, PQQ 产量从 0.04 mg/L 提高至 1.49 mg/L。因此,诱变育种还是高产 PQQ 甲基营养菌的主要选育方法(表 3)。李慧芝等<sup>[27]</sup>和李红月等<sup>[28]</sup>通过 ARTP 技术对扭脱甲基杆菌 *M. extorquens* 进行诱变,利用微生物筛选系统或流式细胞仪最终获得的突变株 E-F3 和 1-C6 在 3 L 发酵罐的产量只有 54 mg/L (168 h) 和 208.7 mg/L (228 h),产量及产率均未达到 PQQ 工业化生产的要求。目前, PQQ 工业化生产的菌株均来源于生丝微菌属 *Hyphomicrobium*。Teizi 等<sup>[17]</sup>在 30 L 发酵罐中培养 *Hyphomicrobium* sp. TK0441 10 d, PQQ 产量达到 1 000 mg/L。郑玲辉等<sup>[29]</sup>对 *Hyphomicrobium* sp. 1112-NTG-1953 (TK0415 的 UV 诱变菌) 进行 NTG 诱变,高产突变株 1112-NTG-2318 在 80 T 发酵罐中培养 240 h, PQQ 产量高达 1 783 mg/L。然而,上述高产 PQQ 的甲基营养菌选育均采用物理或者化学诱变,存在正突变率低、筛选工作量大和耗时长等问题且需要借助昂贵的流式细胞仪等精密仪器。

本研究所采用的出发菌株 *H. denitrificans* FJNU-6 在摇瓶中培养 88 h, PQQ 产量可以达到

121.4 mg/L, 是一株极具工业化应用前景的 PQQ 产生菌株<sup>[23]</sup>。根据 PQQ 的特征吸收光谱以及采用无机盐培养基筛选的特点,建立光谱法结合液相色谱法快速筛选 PQQ 高产突变株的定量方法,提高了菌株的筛选效率。通过设计的甲醇拮抗驯化方案,大大提高了正突变株的比例,缩短了突变株的筛选时间,6 轮驯化后的正突变率达到 80% 以上。本方案不仅能快速筛选出高产 PQQ 突变株,也能筛选出 PQQ 低产突变株,能够为 PQQ 生物合成调控研究提供具有对比意义的资源库,有助于加深 PQQ 合成机制的了解。利用本筛选方案,成功地筛选出系列高产 PQQ 的突变株,并对其中表现最好的突变株 (FJNU-R8) 进行 5 L 发酵罐扩大培养,发现该突变株的单位细胞产率、甲醇转化得率和 PQQ 产量均优于出发菌株,表现出更好的工业应用潜力。本文在选育过程中发现 PQQ 合成和甲醇脱氢酶的合成是一个相互协调的过程,一定浓度的甲醇能够刺激 PQQ 和甲醇脱氢酶的同步增加合成,过高浓度的甲醇反而会增强甲醇脱氢酶与 PQQ 的结合能力,造成 PQQ 产量的急剧减少。实时荧光定量 PCR 检测显示,高浓度的甲醇能够提高 *pqq* 和 *moxF* 基因簇的表达,大幅度提高 PQQ 产量。因此,通过适应性驯化结合光谱法能够简单快速地构建出高正突变率的突变库,并从中迅速获得高产突变株,而不需要流式细胞仪、微生物药物筛选系统等昂贵的仪器设备。本文提供了一种新的快速筛选高产 PQQ 甲基营养菌的方法,为获得适用于工业化生产所需的高产菌奠定了基础。

表 3 甲基营养菌高产突变株的 PQQ 产量

Table 3 Production of pyrroloquinoline quinone using high-yield methylotrophic bacteria

Strain	Positive mutation rate (%)	Titer (mg/L)	Increase rate (%)	Reference
<i>H. denitrificans</i> FJNU-R8	94.00	1 087 (5 L fermenter)	159.70	This work
<i>Hyphomicrobium</i> sp. 1112-0-36	0.27	1 783 (80 T fermenter)	—	[29]
<i>M. extorquens</i> 1-C6	3.04	208.7 (3 L Fermenter)	98.02	[28]
<i>M. extorquens</i> E-F3	31.60	54.00 (3 L Fermenter)	142.30	[27]

## REFERENCES

- [1] Anthony C, Zatman LJ. The microbial oxidation of methanol. Purification and properties of the alcohol dehydrogenase of *Pseudomonas* sp. M27. *Biochem J*, 1967, 104(3): 953–959.
- [2] Hauge JG. Purification and properties of glucose dehydrogenase and cytochrome b from *Bacterium anitratum*. *Biochim Biophys Acta*, 1960, 45: 250–262.
- [3] Felton LM, Anthony C. Role of PQQ as a mammalian enzyme cofactor. *Nature*, 2005, 433(7021): E10.
- [4] Misra HS, Rajpurohit YS, Khairnar NP. Pyrroloquinoline-quinone and its versatile roles in biological processes. *J Biosci*, 2012, 37(2): 313–325.
- [5] Rucker R, Chohanadisai W, Nakano M. Potential physiological importance of pyrroloquinoline quinone. *Altern Med Rev*, 2009, 14(3): 268–277.
- [6] Akagawa M, Nakano M, Ikemoto K. Recent progress in studies on the health benefits of pyrroloquinoline quinone. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2016, 80(1): 13–22.
- [7] Rucker R, Storms D, Sheets A, et al. Is pyrroloquinoline quinone a vitamin? *Nature*, 2005, 433(7025): 10–12.
- [8] Bishop A, Gallop PM, Karnovsky ML. Pyrroloquinoline quinone: a novel vitamin? *Nutr Rev*, 1998, 56(10): 287–293.
- [9] Li HY, Zeng WZ, Zhou JW. High-throughput screening of *Methylobacterium extorquens* for high production of pyrroloquinoline quinone. *Chin J Biotech*, 2018, 34(5): 794–802 (in Chinese).  
李红月, 曾伟主, 周景文. 高产吡咯喹啉醌扭脱甲基杆菌的高通量选育. *生物工程学报*, 2018, 34(5): 794–802.
- [10] Ravikiran B, Mahalakshmi R. Unusual post-translational protein modifications: the benefits of sophistication. *RSC Adv*, 2014, 4(64): 33958–33974.
- [11] Koehn EM, Latham JA, Armand T, et al. Discovery of hydroxylase activity for PqqB provides a missing link in the pyrroloquinoline quinone biosynthetic pathway. *J Am Chem Soc*, 2019, 141(10): 4398–4405.
- [12] Ikemoto K, Mori S, Mukai K. Synthesis and crystal structure of pyrroloquinoline quinol (PQQH<sub>2</sub>) and pyrroloquinoline quinone (PQQ). *Acta Crystallogr Sect B*, 2017, 73(3): 489–497.
- [13] Weckslar SR, Stoll S, Iavarone AT, et al. Interaction of PqqE and PqqD in the pyrroloquinoline quinone (PQQ) biosynthetic pathway links PqqD to the radical SAM superfamily. *Chem Commun*, 2010, 46(37): 7031–7033.
- [14] Magnusson OT, Toyama H, Saeki M, et al. The structure of a biosynthetic intermediate of pyrroloquinoline quinone (PQQ) and elucidation of the final step of PQQ biosynthesis. *J Am Chem Soc*, 2004, 126(17): 5342–5343.
- [15] Magnusson OT, Toyama H, Saeki M, et al. Quinone biogenesis: structure and mechanism of PqqC, the final catalyst in the production of pyrroloquinoline quinone. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(21): 7913–7918.
- [16] Shen YQ, Bonnot F, Imsand EM, et al. Distribution and properties of the genes encoding the biosynthesis of the bacterial cofactor, pyrroloquinoline quinone. *Biochemistry*, 2012, 51(11): 2265–2275.
- [17] Urakami T, Yashima K, Kobayashi H, et al. Production of pyrroloquinoline quinone by using methanol-utilizing bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58(12): 3970–3976.
- [18] Ge X, Zhang WC, Xiong XH, et al. Method for producing pyrroloquinoline quinone through microbial fermentation and fermentation medium used in same: CN, 103224965B. 2013-03-27 (in Chinese).  
葛欣, 张惟材, 熊向华, 等. 一种微生物发酵生产吡咯喹啉醌的方法及所用的发酵培养基: 中国, 103224965B. 2013-03-27.
- [19] Puehringer S, Metlitzky M, Schwarzenbacher R. The pyrroloquinoline quinone biosynthesis pathway revisited: a structural approach. *BMC Biochem*,

- 2008, 9: 8.
- [20] Yang YX, Xiong XH, You S, et al. Comparing three kinds of pyrroloquinoline quinone detection methods. *Lett Biotechnol*, 2011, 22(4): 544–547 (in Chinese). 杨延新, 熊向华, 游松, 等. 3种检测吡咯喹啉醌的方法比较. *生物技术通讯*, 2011, 22(4): 544–547.
- [21] Masaki N, Daisuke H, Yamaguchi K, et al. Preparation and characterization of  $\text{Ca}^{2+}$ -free methanol dehydrogenase from *Hyphomicrobium denitrificans* A3151. *Chem Lett*, 2005, 34(7): 1036–1037.
- [22] Yang CC, Ye LD, Gu JL, et al. Directed evolution of mandelate racemase by a novel high-throughput screening method. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, 101(3): 1063–1072.
- [23] Yang SY, Chen J, Ke CR, et al. Screening and fermentation optimization for a pyrroloquinoline quinone producing strain. *Pharm Biotechnol*, 2014, 21(5): 429–432. 杨诗颖, 陈佳, 柯崇榕, 等. 吡咯喹啉醌产生菌的筛选及其培养基优化. *药物生物技术*, 2014, 21(5): 429–432.
- [24] Stoddard SF. Bacterial strains for the production of pyrroloquinoline quinone: US, 6511820B1, 2000-11-28.
- [25] Bonnot F, Iavarone AT, Klinman JP. Multistep, eight-electron oxidation catalyzed by the cofactorless oxidase, PqqC: identification of chemical intermediates and their dependence on molecular oxygen. *Biochemistry*, 2013, 52(27): 4667–4675.
- [26] Nojiri M, Hira D, Yamaguchi K, et al. Crystal structures of cytochrome  $c_L$  and methanol dehydrogenase from *Hyphomicrobium denitrificans*: structural and mechanistic insights into interactions between the two proteins. *Biochemistry*, 2006, 45(11): 3481–3492.
- [27] Li HZ, Kang Z, Li JH, et al. Mutagenesis of *Methylobacterium extorquens* AM1 for increasing pyrroloquinoline quinone production by atmospheric and room temperature plasma. *Chin J Biotech*, 2016, 32(8): 1145–1149 (in Chinese). 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.
- [28] Li HY. Directive breeding fermentation optimization of *Methylobacterium extorquens* for high pyrroloquinoline quinone production[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2018. 李红月. 高产吡咯喹啉醌扭脱甲基杆菌的定向选育与发酵优化[D]. 无锡: 江南大学, 2018.
- [29] Zheng LH, Du MN, Zhu XR, et al. *Hyphomicrobium* sp. strain and preparation method for pyrroloquinoline quinone: CN, 106282044A. 2015-05-20 (in Chinese). 郑玲辉, 杜敏娜, 朱小容, 等. 一种生丝微菌和吡咯喹啉醌的制备方法: 中国, 106282044A. 2015-05-20.

(本文责编 陈宏宇)