

• 工业生物技术 •

## 基于重组氧化葡萄糖酸杆菌生物合成吡咯喹啉醌

叶润乐<sup>1</sup>, 李泮<sup>1</sup>, 丁凡<sup>1</sup>, 赵振辉<sup>1</sup>, 陈晟<sup>1</sup>, 袁建锋<sup>1,2</sup>

1 浙江师范大学 行知学院, 浙江 兰溪 321100

2 浙江师范大学 浙江省野生动物生物技术与保护利用重点实验室, 浙江 金华 321004

叶润乐, 李泮, 丁凡, 等. 基于重组氧化葡萄糖酸杆菌生物合成吡咯喹啉醌. 生物工程学报, 2020, 36(6): 1138–1149.

Ye RL, Li F, Ding F, et al. Synthesis of pyrroloquinoline quinone by recombinant *Gluconobacter oxydans*. Chin J Biotech, 2020, 36(6): 1138–1149.

**摘要:** 吡咯喹啉醌 (Pyrroloquinoline quinone, PQQ) 是一种重要的氧化还原酶辅基, 具有多种生理生化功能, 在食品、医药卫生及农业等领域具有广泛的应用。文中采用重组氧化葡萄糖酸杆菌生物合成吡咯喹啉醌。首先构建丙酮酸脱羧酶基因 *GOX1081* 敲除的重组菌 *G. oxydans* T1, 减少副产物乙酸的形成。然后利用筛选的内源性组成型启动子  $P_{0169}$  融合表达 *pqqABCDE* 基因簇及 *ildD* 基因, 构建重组菌 *G. oxydans* T2。最后对发酵培养基添加物和发酵条件进行优化。结果显示重组菌 *G. oxydans* T1、*G. oxydans* T2 生物量较野生菌分别提高 43.02% 和 38.76%, 而 PQQ 的产量分别是野生菌的 4.82 倍和 20.5 倍。进一步优化 *G. oxydans* T2 碳源及培养条件, 最终 PQQ 产量达  $(51.324 \pm 0.899 \text{ 7}) \text{ mg/L}$ , 是野生菌的 345.62 倍。通过基因工程手段, 可以有效提高氧化葡萄糖酸杆菌的生物量和合成 PQQ 的产量, 为改善 PQQ 生物合成效率奠定基础。

**关键词:** 氧化葡萄糖酸杆菌, 吡咯喹啉醌, 生物合成, 代谢工程

## Synthesis of pyrroloquinoline quinone by recombinant *Gluconobacter oxydans*

Runle Ye<sup>1</sup>, Feng Li<sup>1</sup>, Fan Ding<sup>1</sup>, Zhenhui Zhao<sup>1</sup>, Sheng Chen<sup>1</sup>, and Jianfeng Yuan<sup>1,2</sup>

1 Xingzhi College, Zhejiang Normal University, Lanxi 321100, Zhejiang, China

2 Key Laboratory of Wildlife Biotechnology and Conservation and Utilization of Zhejiang Province, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, Zhejiang, China

**Abstract:** Pyrroloquinoline quinone (PQQ), an important redox enzyme cofactor, has many physiological and biochemical functions, and is widely used in food, medicine, health and agriculture industry. In this study, PQQ production by recombinant *Gluconobacter oxydans* was investigated. First, to reduce the by-product of acetic acid, the recombinant strain *G. oxydans* T1 was constructed, in which the pyruvate decarboxylase (*GOX1081*) was knocked out. Then the *pqqABCDE* gene cluster and *ildD* gene were fused under the control of endogenous constitutive promoter  $P_{0169}$ , to generate the recombinant strain *G.*

**Received:** October 28, 2019; **Accepted:** February 15, 2020

**Supported by:** General Project of Zhejiang Education Department (No. Y201840796), National Students' Innovation and Entrepreneurship Train Program (No. 201913276014).

**Corresponding author:** Jianfeng Yuan. Tel: +86-579-88321092; E-mail: jf\_yuan@zjnu.edu.cn

浙江省教育厅一般项目 (No. Y201840796), 国家级大学生创新创业训练计划项目 (No. 201913276014) 资助。

*oxydans* T2. Finally, the medium composition and fermentation conditions were optimized. The biomass of *G. oxydans* T1 and *G. oxydans* T2 were increased by 43.02% and 38.76% respectively, and the PQQ production was 4.82 and 20.5 times higher than that of the wild strain, respectively. Furthermore, the carbon sources and culture conditions of *G. oxydans* T2 were optimized, resulting in a final PQQ yield of (51.32±0.899 7 mg/L), 345.6 times higher than that of the wild strain. In all, the biomass of *G. oxydans* and the yield of PQQ can be effectively increased by genetic engineering.

**Keywords:** *Gluconobacter oxydans*, pyrroloquinoline quinone, biosynthesis, metabolic engineering

在大部分细菌中,吡咯喹啉醌 (Pyrroloquinoline quinone, PQQ)是与膜结合脱氢酶相关的非常规氧化还原辅基,并以非共价结合的方式与脱氢酶相结合<sup>[1]</sup>,氧化底物并将电子直接传递给呼吸链。PQQ 在生命活动中起着重要的作用,如调节免疫<sup>[2]</sup>、清除自由基<sup>[3]</sup>、防治神经损伤<sup>[4-5]</sup>、促进农作物生长<sup>[6-7]</sup>、应用于生物电化学<sup>[8]</sup>、参与微生物的信号转导<sup>[9]</sup>等。研究表明,PQQ 在许多生物过程中都参与反应,包括作为营养物质,因此,PQQ 也被认为是第 15 种维生素<sup>[10]</sup>。

PQQ 广泛存在于植物、细菌、动物等生物体内,但仅部分革兰氏阴性细菌可合成 PQQ,如扭脱甲基杆菌 *Methylobacterium extorquens*<sup>[11-12]</sup>、甲基营养菌 *Methylotrophic bacteria*<sup>[13-14]</sup>、成因泛菌 *Pantoea ananatis*<sup>[15]</sup>、氧化葡萄糖酸杆菌 *Gluconobacter oxydans*<sup>[16-17]</sup>、生丝微菌属 *Hyphomicrobium*<sup>[18]</sup>、肺炎克雷伯氏菌 *Klebsiella pneumoniae*<sup>[19]</sup>等。关于 PQQ 生物合成途径的研究已有 30 余年,通过对不同生物 PQQ 合成基因进行标记,发现生物之间存在一定的差异,如 *M. extorquens* AM1 含有一个 *pqqABC/DE* 操纵子单元,其中的 *pqqC* 与 *pqqD* 为嵌套融合基因,而 *pqqFG* 基因与其他 3 个基因形成另外的操纵子<sup>[20-21]</sup>; Goosen 报道<sup>[22]</sup>醋酸钙不动杆菌 *Acinetobacter calcoaceticus* 中只有 *pqqABCDE* 基因簇,而不含有 *pqqF* 基因; Stover 等报道<sup>[23]</sup>铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* 中 *pqqABCDE* 基因簇与 *pqqF* 基因相互分离;而在 *G. oxydans*<sup>[16]</sup> 和 *K. pneumoniae*<sup>[24]</sup> 中均以简单 *pqqABCDE* 基因簇形式存在。然而,PQQ 生物合成途径及其代谢调控机制却仍未完全阐明。Kleef 等<sup>[18]</sup>利用 <sup>13</sup>C 同位

素标记物对培养基进行跟踪,并通过磁共振成像 (Magnetic resonance imaging, MRI) 对 PQQ 合成途径进行深入分析发现, Glu 和 Tyr 是 PQQ 合成所需的重要氨基酸,这与 *pqqA* 基因编码的保守肽段 Glu-X-X-X-Tyr 序列相符合,并提出了 PQQ 生物合成的 Glu 和 Tyr 缩合假说<sup>[25]</sup>。

随着医药、化妆品、保健品、环境和食品行业的发展,PQQ 市场需求量逐年增加。目前,全球市场需求 100 多 t,主要供应商是日本的三菱瓦斯化学,另有部分通过植物提取制备 PQQ,但植物含量低、提取难度高,化学合成则过程复杂、收率低、对环境易造成污染,不适于推广。相比之下,生物法制备 PQQ 具有反应条件温和、合成过程易于控制、对环境无污染等优点,是未来工业化生产 PQQ 的发展方向<sup>[26]</sup>。目前,生物法合成 PQQ 还未见工业化应用的报道,主要存在的问题是 PQQ 产量过低,生产成本过高。据报道<sup>[1]</sup>,一部分细菌能产生极少量 PQQ 供自身代谢所需,如恶臭假单胞菌 *P. putida*; 另外一部分如甲基利用型细菌,能产 PQQ 约 2-3 mg/L,甚至有的能达几十毫克每升。孙继国<sup>[27]</sup>利用不同启动子,分别在大肠杆菌 *Escherichia coli* 和 *K. pneumoniae* 中表达 5.5 kb 的 *pqqABCDEF* 基因簇,并在优化培养基条件基础上,PQQ 产量为 1 700 nmol/L。Meulenberg 等<sup>[28]</sup>在 *E. coli* 中克隆表达来源于 *K. pneumoniae* 的 6.7 kb *pqq* 基因簇,PQQ 产量仅为 280 nmol/L。李盼盼<sup>[29]</sup>以 *G. oxydans* 621H 作为出发菌株,对培养基进行单因素及正交实验优化,并考察前体物对 PQQ 合成影响,最终 PQQ 产量为 0.813 mg/L。王朝绚<sup>[30]</sup>在 *E. coli* BL21(DE3) 中融合表达 PQQ 合成基因簇及信号肽 *pelB* 基因,使得 PQQ 产量

提高 24%，达 40.73 mg/L。

综上，人们已经将目光投向微生物法合成 PQQ，并进行一定尝试性研究，但目前 PQQ 产量仍然较低。本文在前期研究的基础上，以 *G. oxydans* DSM2343 作为研究对象，通过代谢工程手段敲除宿主菌副产物乙酸代谢途径，同时强化宿主菌 PQQ 合成模块，并对发酵培养基添加物和发酵条件进行优化，以提升 PQQ 生物合成产量，为 PQQ 高效生物合成奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 菌株与质粒

本实验相关菌株及使用质粒见表 1。

表 1 本研究相关菌株及质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this work

Strains and plasmids	Relative characteristics	Source
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	$F^-$ , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rk $^-$ , mk $^+$ ), <i>supE44</i> , <i>thi1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA</i> , (Nalr), <i>relA1</i> , D( <i>lacZYAargF</i> ), U169, and F80 <i>lacZ</i> DM15	Lab collection
<i>E. coli</i> HB101	$F^-$ , <i>hsdS20</i> (r-B, m-B), <i>supE44</i> <i>ara-14 galK-2 lacY1 proA2 rpsL20 xyl-5 mtl-1 recA13 KanR oriColE1 RK2-Mob+ RK2-Tra+ mH-1</i> with plasmid pRK2013	Lab collection
<i>E. coli</i> S17-1	$\Delta$ <i>recA endA1 hsdR17 supE44 thi-1 tra</i>	Lab collection
<i>G. oxydans</i> DSM2343	Wild-type, Cef $^R$	DSMZ
<i>G. oxydans</i> T1	Pyruvate decarboxylase deletion strain derived from <i>G. oxydans</i> DSM2343, Cef $^R$	This work
<i>G. oxydans</i> T2	Recombinant strain harboring pUCpr-1 derived from <i>G. oxydans</i> T1, Cef $^R$ , Amp $^R$	This work
pEASY-Blunt simple	Cloning vector, Amp $^R$ Kan $^R$ <i>lacZ</i>	TransGen
pUCpr	Expression vector, ColE1 <i>ori</i> , <i>par-rep</i> , Amp $^R$	Lab collection
pJKM	Mobilized integration vector, <i>SacB</i> , Kan $^R$	Lab collection
p $\Delta$ GOX1081	Deletion vector based on pJKM for deletion of <i>GOX1081</i> , Km $^R$	This work
pUCpr-1	pUCpr-P $_{0169}$ - <i>pqqABCDE</i> -P $_{0169}$ - <i>tldD</i> , Amp $^R$	This work

表 2 本研究相关引物

Table 2 Primers used in this work

Primer name	Primer sequence (5'-3')*	Usage
1081_Hind III_F	CCCAAGCTTctcgtctggcgattcatg	Amplification of downstream homologous arm of <i>GOX1081</i> gene
1081_Fus_R	cctgaggtactgaaatcatgacaaagcgtctgacctcc	
1081_Fus_F	ggaagatcagacgcttctgcatgattcagctacctcagg	Amplification of upstream homologous arm of <i>GOX1081</i> gene
1081_Sal I_R	ACGCGTCGACagcctgagacctactga	
1081_Seq_F	tctggatccggaacatcagg	Colony PCR verification of <i>GOX1081</i> gene deletion
1081_Seq_R	tccggagacacgatgact	
Add_0169_F	acactgtttaaacaccgtgaaagcggctggcgc	Amplification of the first fusion promoter P $_{0169}$
pqq_Fuse0169_R	acatccgcgcggaagcgttatac	
pqq_Fuse0169_F	ccttccgcgcggatgttcagg	Amplification of fused <i>PQQ</i> fragment
0169_Fusepqq_R	ccggctagaagatggcctctc	
0169_Fusepqq_F	gccatctctgaaagcggctggc	Amplification of the Second fusion promoter P $_{0169}$
tldD_Fuse0169_R	cttcagcgcggaagcgttatac	
tldD_Fuse0169_F	tcgcgactagccggtctgttc	Amplification of fused <i>TldD</i> fragment
Add_tldD_R	cggtaccggggatccctggtcttctcatg	

\*: capital letters are restriction site.

### 1.1.2 主要试剂

PrimeSTAR GXL DNA Polymerase 套装、LA *Taq* DNA 聚合酶套装、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶等购自 TaKaRa 公司；无缝定向克隆试剂盒 (pEASY-Uni Seamless Cloning and Assembly Kit) CU101 购自 TansGene Biotech 公司；SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒、SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒、细菌基因组提取试剂盒、质粒提取试剂盒、抗生素 (Cefoxitin、Ampicillin sodium、Kanamycin Sulfate) 及分子级别化学试剂均购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司；酵母抽提物和蛋白胨，购自 Oxoid 公司；PQQ 标准品购自 Sigma-Aldrich 公司；PCR 引物 (表 2) 合成及测序均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成。

### 1.1.3 培养基及培养条件

LB 培养基 (g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母提取物 5, NaCl 10 (固体平板加入 1.5% 琼脂粉), pH 自然。

MP 培养基 (g/L): 胰蛋白胨 3, 酵母提取物 5, 甘露醇 25 (固体平板加入 1.5% 琼脂粉), pH 6.0。

PQQ 发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 5, 酵母粉 2, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5, pH 6.5。

大肠杆菌用 LB 培养基, 37 °C、220 r/min 振荡培养; 氧化葡萄糖酸杆菌选用 MP 培养基, 30 °C、220 r/min 振荡培养。

所有培养基或固体平板, 根据实验需要加入相应的抗生素 (抗生素工作浓度 Amp 100 μg/mL, Cef 50 μg/mL, Kan 50 μg/mL)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 分子生物学操作方法

基本分子生物学操作均参照《分子克隆实验指南 (第四版)》<sup>[31]</sup>进行。

### 1.2.2 敲除质粒 pΔGOX1081 的构建

根据 GenBank 中公布 *G. oxydans* 621H 基因组 (NC\_006677) 信息设计引物, 以 *G. oxydans* DSM2343 基因组为模板, 1081\_Hind III\_F/1081\_Fus\_R 和 1081\_Fus\_F/1081\_Sal I\_R 为引物, 分别 PCR 扩增 *GOX1081* 上游约 1 072 bp、下游约 1 099 bp 的同源臂基因片段。以 PCR 产物纯化试剂盒回收上下游同源臂为模板, 1081\_Hind III\_F/1081\_Sal I\_R 为引物, 重叠 PCR 将上下游片段融合并克隆于 pEASY-Blunt simple 质粒, 测序正确后, Hind III 和 Sal I 双酶切回收 *GOX1081* 上下游融合片段及 pJKM 质粒片段, T4 DNA 酶连接线性同源臂及自杀质粒片段, 构建敲除质粒 pΔGOX1081。

### 1.2.3 GOX1081 基因敲除

敲除质粒 pΔGOX1081 通过热激法转化于 *E. coli* S17-1 感受态细胞。将阳性转化子 *E. coli* S17-1/pΔGOX1081 和辅助菌 *E. coli* HB101 在 LB

培养基 37 °C 下振荡培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.8, *G. oxydans* DSM2343 在 MP 培养基 30 °C 下振荡培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.6, 三菌以 1:1:1 的比例混合, 按三亲本杂交<sup>[32]</sup>的方法将敲除质粒 pΔGOX1081 转化 *G. oxydans* DSM2343。通过在含 Cef 和 Kan (终浓度均为 50 μg/mL) 的 MP 固体培养基上筛选获取一次重组菌。

挑取一次重组阳性菌单菌落, 在无抗 MP 培养基中 30 °C 培养过夜; 取适量菌液, 在含有 10% 蔗糖和 50 μg/mL Cef 抗生素的 MP 平板上划线, 30 °C 培养 3 d 后长出单菌落, 即为二次重组菌。选用 1081\_Seq\_F/1081\_Seq\_R 为引物, 采用菌落 PCR 鉴定筛选 *GOX1081* 基因敲除的阳性重组菌, 并命名为 *G. oxydans* T1。

### 1.2.4 PQQ 合成模块强化重组菌的构建

以 *G. oxydans* DSM2343 基因组为模板, Add\_0169\_F/pqq\_Fuse0169\_R、pqq\_Fuse0169\_F/0169\_Fusepqq\_R、0169\_Fusepqq\_F/tldD\_Fuse0169\_R 及 tldD\_Fuse0169\_F/Add\_tldD\_R 为引物, PCR 分别扩增第 1 个内源性启动子 P<sub>0169</sub>、*pqqABCDE* 基因簇、第 2 个内源启动子 P<sub>0169</sub> 和 *tldD* 基因片段, 并用 PCR 产物纯化试剂盒回收相应基因片段。穿梭表达质粒 pUCpr 经限制性内切酶 *Sal* I 处理后经琼脂糖凝胶电泳并割胶回收 pUCpr 线性质粒片段。所有基因片段按全式金无缝定向克隆试剂盒要求操作, 构建融合表达质粒 pUCpr-1。经测序正确后, pUCpr-1 电穿孔转化 *G. oxydans* T1 感受态细胞。采用 GenePulser Bacteria II 预设程序 (2.5 kV, 200 Ω, 25 μF) 进行电击转化, 时间常数在 4.5–5 ms。电击后经 30 °C、220 r/min 预培养 4–6 h, 并涂布于含有 100 μg/mL Amp 及 50 μg/mL Cef 抗生素的 MP 平板培养基上, 30 °C 恒温培养箱中培养 4 d, 获取阳性重组菌 *G. oxydans* T2。

### 1.2.5 生物量及 PQQ 检测

分光光度法测定培养液浊度 OD<sub>600</sub>, 并通过细胞干重 DCW 建立线性对应关系 DCW=0.353 5×

$OD_{600}+0.1204$ ,  $R^2 = 0.9997$  计算生物量。

发酵培养液经离心、0.22  $\mu\text{m}$  膜过滤等预处理后, 采用课题组建立的 HPLC 测定 PQQ 含量<sup>[33]</sup>。HPLC 检测条件: 流动相为甲醇: 水 (含 0.06 mol/L 磷酸)=7: 3, 流速 0.5 mL/min, 色谱柱 ZORBAX Eclipse Plus C18, 进样量 10  $\mu\text{L}$ , 柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ , 检测波长 254 nm, PQQ 保留时间为 6.8 min。通过标准曲线方程  $Y=77.6777X-841.1664$ ,  $R^2=0.9991$  由峰面积计算 PQQ 浓度。

## 2 结果与分析

### 2.1 *GOX1081* 基因敲除

*G. oxydans* DSM2343 中, *GOX1081* 基因编码丙酮酸脱羧酶 (Pyruvate decarboxylase), 催化丙酮酸脱羧形成乙醛, 进一步通过依赖于  $\text{NADP}^+$  的乙醛脱氢酶作用, 产生乙酸。2013 年, Peters 等<sup>[34]</sup>证实 *G. oxydans* DSM2343 中副产物乙酸的代谢主要与 *GOX1081* 相关。

在 *GOX1081* 无痕敲除过程中, pJKM 含有 RP4 基因<sup>[35]</sup>, 能高效指导同源重组, 使得 p $\Delta$ GOX1081 整合到宿主基因组。同时, pJKM 携带有 *sacB* 基因, 其编码分泌型蔗糖果聚糖酶 (Levansucrase), 催化蔗糖水解成葡萄糖和果糖, 并且将果糖聚合成高分子量的果聚糖。高分子量果聚糖积累对细胞存在潜在的毒性作用, 可造成细胞死亡, 从而引入反向筛选压力。因此, 在含 10% 的蔗糖平板上培养, 可以获取二次同源交换重组菌, 产生目标基因被敲除或者回复为野生型两种表型<sup>[36]</sup>。结果如图 1 所示, 在筛选的 23 株

突变菌株中, 有 7 株产生阳性突变, 即 *GOX1081* 基因被敲除, 而 16 株回复为野生型, 即通过 pJKM 介导的同源臂敲除, 二次重组成功率约为 30.43%。据文献报道<sup>[16]</sup>, 以 *sacB* 基因介导的无痕重组敲除效率较低, 使得二次筛选工作繁琐, 如 pK18mobsacB 和 pK19mobsacB。而 pJKM 中, 在 *sacB* 基因的上游插入  $P_{\text{tac}}$  杂合启动子, 从而增强 *sacB* 基因的表达, 提高宿主反向筛选压力, 增加二次重组发生几率。

### 2.2 PQQ 合成模块融合表达

通过全式金无缝定向克隆试剂盒, 构建  $P_{0169}$  启动子、*pqqABCDE* 基因簇及 *tldD* 基因融合表达质粒 pUCpr-1, 并转化获取重组菌 *G. oxydans* T2。广宿主表达质粒, 如 pBBR1MCS 系列, 以及 *tufB* 基因启动子, 是氧化葡萄糖酸杆菌中常用的表达调控元件。pBBR1MCS 系列属于组成型表达系统, 蛋白表达量较低。本实验用 pUCpr 载体为实验室构建, 具有 pUC19 遗传特性和 *G. oxydans* DSM2343 内源质粒片段 Par-Rep 蛋白基因。Rep 蛋白是质粒复制蛋白, Par 蛋白则与纺锤丝的动力机制有关, 起着调控质粒复制的作用<sup>[25]</sup>, 因此, pUCpr 为大肠杆菌及氧化葡萄糖酸杆菌的穿梭表达质粒, 具有较高的表达量。 $P_{0169}$  启动子大小 104 bp, 其中 -35 (TTGGTA) 及 -10 (TATAAC) 区域为 *E. coli*  $\sigma^{70}$  和枯草芽孢杆菌 *B. subtilis*  $\sigma^{43}$  识别位点, 且其间隔序列为 19 bp, 这与 *E. coli* ((17 $\pm$ 1) bp) 和 *B. subtilis* ((18 $\pm$ 1) bp) 非常相似 (图 2), 说明  $P_{0169}$  启动子在 *Gluconobacter* 中具有强的启动活性<sup>[37]</sup>。

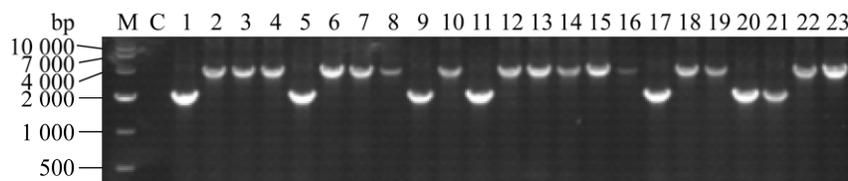


图 1 菌落 PCR 筛选 *GOX1081* 基因敲除

Fig. 1 Screening for *G. oxydans* DSM2343 *GOX1081* deletion mutants. M: 10 000 marker; C: control.

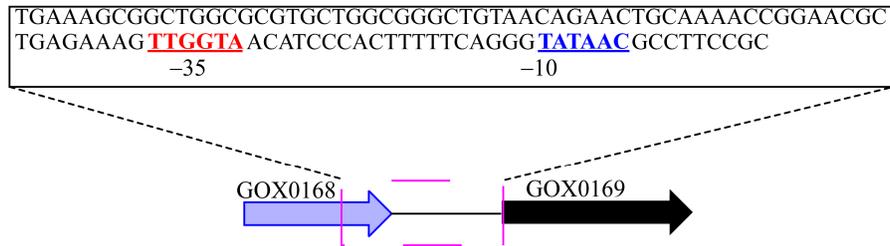
图2 P<sub>0169</sub>启动子序列

Fig. 2 Schematic representation of the P<sub>0169</sub> promoter sequence.

另外,经序列比对发现, *G. oxydans* 中 *tldD* 基因与大肠杆菌中 *tldD* 有 51% 的同源性,实验证实, *tldD* 基因与 PQQ 合成相关,功能类似于其他 PQQ 合成生物中的 *pqqF* 基因<sup>[25]</sup>,可有效提升 PQQ 的合成<sup>[16]</sup>。

### 2.3 不同重组菌生物合成 PQQ

对野生菌、重组菌 *G. oxydans* T1 及 *G. oxydans* T2 进行发酵培养,分别考察发酵过程中不同时间段的生物量和 PQQ 产量,结果如图 3 所示。*GOX1081* 基因的敲除,切除了乙酸代谢途径<sup>[34]</sup>,发酵 48 h 后,重组菌 *G. oxydans* T1 及 *G. oxydans* T2 的生物量达 (3.69±0.01) g/L 和 (3.58±0.01) g/L,较野生菌 ((2.58±0.02) g/L) 提高 43.02% 和 38.76%。*G. oxydans* T2 中表达了 PQQ 合成模块的基因,其生物量较重组菌 *G. oxydans* T1 略有降低。以上结果说明副产物乙酸是影响氧化葡萄糖杆菌的生长的重要因素,与文献报道结果一致<sup>[34]</sup>。而对于 PQQ 的合成,发酵 48 h 后,野生菌产量为(0.148 5±0.001 2) mg/L,重组菌 *G. oxydans* T1 和 T2 的产量为 (0.716 5±0.001 23) mg/L 和 (3.058 0±0.011 2) mg/L,结果显示,融合表达 *pqqABCDE* 及 *tldD* 基因后,可以有效提高氧化葡萄糖杆菌的 PQQ 产量,因此 *G. oxydans* T2 为较理想的 PQQ 生产菌株。

### 2.4 不同添加物对重组菌合成 PQQ 的影响

据文献证实, Glu 和 Tyr 是 PQQ 合成的重要氨基酸,与 *pqqA* 表达肽段的保守氨基酸一致<sup>[16,25]</sup>。因此考察不同浓度 Glu 和 Tyr 的添加对重组菌

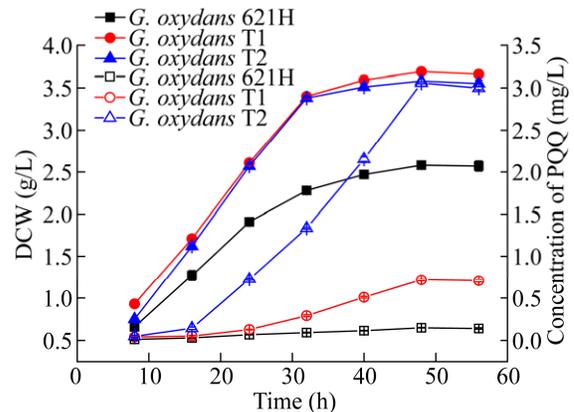


图3 野生菌、重组菌 *G. oxydans* T1 及 T2 生物量和 PQQ 产量

Fig. 3 Biomass and PQQ production of wild strain (■, □), *G. oxydans* T1 (●, ○) and *G. oxydans* T2 (▲, Δ).

*G. oxydans* T2 合成 PQQ 的影响。取配制好的 50 mL 摇瓶 5 个,按 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 g/L 加入 Glu;另取 5 个摇瓶,按 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 g/L 加入 Tyr,在 30 °C、220 r/min 振荡培养 48 h 后测定 PQQ 产量,结果见图 4A。当 Glu 和 Tyr 的添加量都为 4.0 g/L 时, PQQ 的合成量最大,随着添加的增加反而产量又下降,说明 Glu 和 Tyr 作为前体可以促进 PQQ 的合成<sup>[38]</sup>,而过多浓度氨基酸的添加将影响发酵体系的 pH 值和离子强度,从而影响 PQQ 的合成。在添加 Glu 和 Tyr 的基础上,进一步考察 Fe<sup>2+</sup>对 PQQ 合成的影响,即在发酵培养基中分别添加 1.0 mg/L、3.0 mg/L、5.0 mg/L、7.0 mg/L 和 9.0 mg/L FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 30 °C、220 r/min 振荡培养 48 h 后测定 PQQ 产量,结果如图 4B 所示。FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 的添加与重组菌

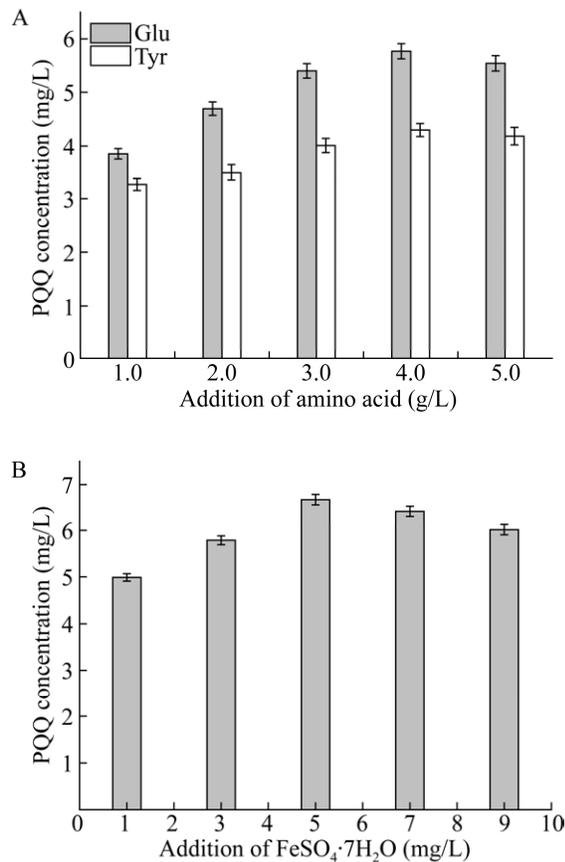


图4 不同浓度添加物 Glu、Tyr (A) 和 Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (B) 对 *G. oxydans* T2 合成 PQQ 的影响

Fig. 4 Effect of different additives on PQQ synthesis by *G. oxydans* T2. (A) Glu and Tyr. (B) Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O.

*G. oxydans* T2 合成 PQQ 的能力具有正相关性, 当添加量为 5.0 mg/L 时 PQQ 合成最高, 达 (6.673 4±0.112 4) mg/L, 而随后 PQQ 产量下降, 说明 Fe<sup>2+</sup>对 PQQ 的合成在一定范围内具有促进作用。

综合以上结果可知, 不同添加物对 PQQ 的合成具有不同程度的影响, 为进一步明确不同添加物之间的显著特性和交互关系, 对 Glu、Tyr 和 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 设计 L<sub>9</sub> (3<sup>4</sup>) 正交实验, 分别考察 A: Glu 添加量 (3.5 g/L, 4.0 g/L, 4.5 g/L)、B: Tyr 添加量 (3.5 g/L, 4.0 g/L, 4.5 g/L) 和 C: FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (4.5 mg/L, 5.0 mg/L, 5.5 mg/L) 的条件下 *G. oxydans*

T2 合成 PQQ 产量。由表 3 结果可知, 从极差 *R* 值的大小可以看出各因素的主要次序是: A (Glu)> B (Tyr)> C (FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O), 其中 Glu 和 Tyr 是影响 PQQ 产量的主要因素, 而 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 的影响较小; 最佳因素水平为 A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>1</sub>, 即当 Glu 添加量为 4.0 g/L、Tyr 添加量为 4.5 g/L、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 添加量为 4.5 mg/L 时, 重组菌 *G. oxydans* T2 的 PQQ 产量可达 18.392 8 mg/L。从方差分析表来看 (表 4), A (Glu) 因素在培养基一致的条件下起最显著作用, B (Tyr) 作用次之, 而 C (FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) 在考察范围内对 PQQ 的合成影响不大。说明 PQQ 的合成与 Glu 和 Tyr 有关, 与 PQQ 缩合假说一致<sup>[25]</sup>。

表 3 不同添加物正交实验结果

Table 3 Orthogonal experiment results of different additives

No.	A	B	C	PQQ production (mg/L)
1	1	1	1	16.311 8
2	1	2	2	16.486 7
3	1	3	3	16.719 7
4	2	1	2	16.774 1
5	2	2	3	17.996 8
6	2	3	1	18.392 8
7	3	1	3	16.988 7
8	3	2	1	17.321 9
9	3	3	2	18.021 4
K1	16.506	16.692	17.342	
K2	17.721	17.268	17.094	
K3	17.444	17.711	17.235	
R	1.215	1.019	0.248	

表 4 方差分析表

Table 4 The analysis of ANOVA

Factors	SS	df	MS	F Statistics	Significant level
A Glu	2.433	2	1.216	1.782	*
B Tyr	1.569	2	0.784	1.149	*
C Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.093	2	0.046	0.068	
Total	4.090	6			

\*=Significance.

## 2.5 *G. oxydans* T2 合成 PQQ 发酵条件优化

### 2.5.1 碳源的选择

碳源对于氧化葡萄糖酸杆菌而言显得比较重要,主要是氧化葡萄糖酸杆菌含有丰富的膜结合蛋白,能高效氧化多种底物,并分泌到发酵液中。比如以葡萄糖为底物,可以产生葡萄糖酸、2-酮基-D-葡萄糖酸和 5-酮基-D-葡萄糖酸,使得发酵液 pH 迅速下降<sup>[39]</sup>,为此选择合适的碳源就至关重要。本实验选用果糖、蔗糖、木糖、山梨醇、甘露醇、甲醇、乙醇及甘油作为唯一碳源,添加量为 0.5%,葡萄糖作为对比,其他无机盐和前体添加物一致,30 °C、220 r/min 振荡培养 48 h,发酵结束后测定重组菌 *G. oxydans* T2 的生物量及 PQQ 产量,结果如图 5A 所示。当以甲醇为唯一碳源时,其细胞干物质和 PQQ 产量为最高,分别是 (4.897 6±0.223 4) g/L 和 (29.765 7±0.687 7) mg/L,较葡萄糖对照组分别提高了 37.41%和 61.83%。据文献报道<sup>[25]</sup>,在 *G. oxydans* 621H 中的甲醇脱氢酶以 PQQ 为辅助因子,同时甲醇又提供良好的能量来源。另外, *G. oxydans* 621H 中还含有山梨醇脱氢酶、甘露醇脱氢酶、葡萄糖脱氢酶,因此山梨醇、甘露醇及葡萄糖作为碳源时,重组菌 *G. oxydans* T2 也能较好地生长。相比之下,以果糖、蔗糖及木糖为碳源时,生长欠佳,推测该菌中相关代谢基因活性不高。因此,甲醇可以作为

较理想的碳源用于合成 PQQ。

以甲醇作为唯一碳源,考察不同浓度的甲醇 (2.0%、2.5%、3.0%、3.5%、4.0%) 对菌体的生长及 PQQ 合成的影响,结果见图 5B,甲醇浓度在 2.0%–3.5% 范围内, *G. oxydans* T2 菌体量和 PQQ 产量均逐步提升,以 3.5% 的添加量为最高,分别为 (5.665 4±0.351 2) g/L 和 (34.001 2±0.732 4) mg/L,而当甲醇浓度增加到 4.0% 时,菌体量和 PQQ 均有所下降,说明高浓度的底物对重组菌具有一定的抑制作用,导致合成 PQQ 的酶活性下降。

### 2.5.2 发酵条件

在优化了前体添加物和碳源的基础上,继续考察接种量 (2%、4%、6%、8%、10%)、起始 pH (5.5、6.0、6.5、7.0、7.5) 和培养温度 (26 °C、28 °C、30 °C、32 °C、34 °C) 对重组菌 *G. oxydans* T2 合成 PQQ 的影响,结果见图 6。接种量对 PQQ 的合成影响较大,当接种量为 6% 时, PQQ 合成量最大,可达 (45.785 6±1.176 9) mg/L; 而 pH 对 PQQ 合成的影响相对小一点,以 pH 6.5 为最佳, PQQ 产量达 (48.789 4±1.223 1) mg/L; 温度对重组菌 *G. oxydans* T2 合成 PQQ 有一定的影响,当培养温度为 28 °C 时, PQQ 合成量最大,可达 (51.324 1±0.899 7) mg/L,说明温度对菌株内酶的活性具有重要影响,进而影响 PQQ 的合成,最终 PQQ 产量是出发菌株的 345.62 倍。

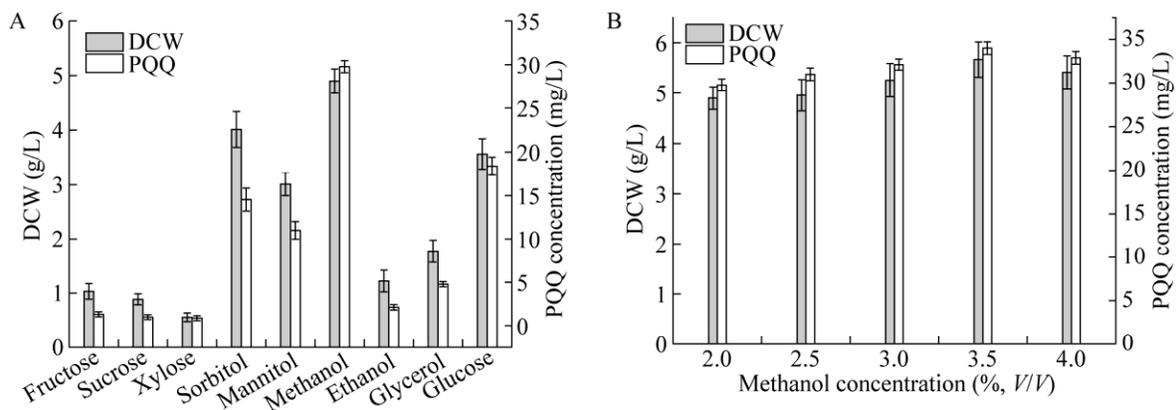


图 5 不同碳源 (A) 和不同甲醇浓度 (B) 对菌体生长及合成 PQQ 的影响

Fig. 5 Effect of different carbon resources (A) and methanol concentration (B) on cell growth and PQQ synthesis.

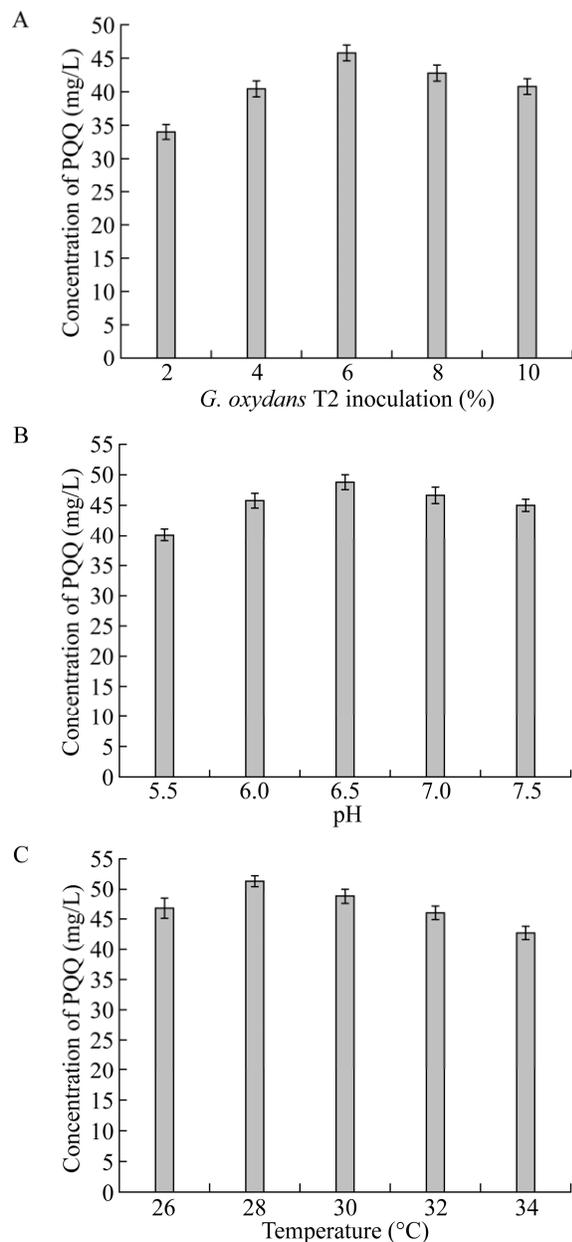


图6 不同接种量 (A)、不同起始 pH (B) 和不同培养温度 (C) 对 *G. oxydans* T2 合成 PQQ 的影响

Fig. 6 Effect of different inoculum (A), initial pH (B) and temperature (C) on PQQ production by *G. oxydans* T2.

### 3 讨论

氧化葡萄糖酸杆菌是典型的工业应用微生物, 本研究以氧化葡萄糖酸杆菌作为研究对象, 通过基因工程手段, 无痕敲除表达丙酮酸脱羧酶

*GOX1081* 基因, 有效提高生物量 43.02%, 同时 PQQ 产量提高 382.49%。说明在 *G. oxydans* DSM2343 中, 经丙酮酸脱羧酶途径产生乙酸对 *G. oxydans* 的生长具有影响<sup>[34]</sup>, 同时也是碳流竞争影响 PQQ 合成的原因。在此基础上, 为进一步提升 PQQ 的合成, 本研究采用强化 PQQ 合成模块的策略在内源性强启动子  $P_{0169}$  下, 融合表达 *pqqABCDE* 基因簇和与之合成相关的 *tldD* 基因<sup>[39]</sup>, 构建重组菌 *G. oxydans* T2。摇瓶发酵结果表明, 在内源性启动子下, PQQ 合成模块的表达得到强化, 同时也说明菌体生物量和 PQQ 基因拷贝数是影响 PQQ 合成的关键因素。2016 年, Wang 等<sup>[40]</sup> 利用广宿主质粒 pBBR1MCS-2、*pqqA* 启动子、*tufB* 启动子以及 *tldD* 基因在 *G. oxydans* WSH-003 中研究单个结构基因的表达对 PQQ 合成的影响, 发现单个基因的作用 *pqqB*>*pqqA*>*pqqD*>*pqqC*>*pqqE*, 这也为 *G. oxydans* 合成 PQQ 提供了一定的借鉴。

目前, 大量的代谢工程研究表明<sup>[41]</sup>, 当目标产物合成途径表达加强时, 产物与底物之间的不匹配往往也是影响最终产量的因素。本研究对重组菌培养基添加物进行优化结果证实了这个结论, 当增加底物 Glu 和 Tyr 时能较大程度地提升 PQQ 产量。进一步对碳源、接种量、起始 pH、培养温度等培养条件进行优化, 最终重组菌 *G. oxydans* T2 的 PQQ 产量为  $(51.324 \pm 0.8997)$  mg/L, 是出发菌株的 345.62 倍。目前, 微生物合成 PQQ 的产量在 100–200 mg/L 左右, 如 *Methylovorus* sp. 和 *K. pneumoniae*<sup>[11,13-14,40]</sup>。氧化葡萄糖酸杆菌具有大量依赖于 PQQ 的膜结合脱氢酶, 内源性合成 PQQ 一直是氧化葡萄糖酸杆菌高效催化氧化的瓶颈, 因此, 还有大量的工作可做, 来提高氧化葡萄糖酸杆菌合成 PQQ 的能力。本研究利用代谢工程手段有效提高了 *G. oxydans* DSM2343 合成 PQQ 的能力, 后期可进一步对补料发酵条件进行考察, 建立 PQQ 的分批补料发酵工艺, 为 PQQ 的工业化生产做铺垫。

## REFERENCES

- [1] Kasahara T, Kato T. Nutritional biochemistry: A new redox-cofactor vitamin for mammals. *Nature*, 2003, 422(6934): 832.
- [2] Wan H, Xia Y, Li JH, et al. Identification of transporter proteins for PQQ-secretion pathways by transcriptomics and proteomics analysis in *Gluconobacter oxydans* WSH-003. *Front Chem Sci Eng*, 2017, 11(1): 72–88.
- [3] Akaike T, Sato K, Maeda H, et al. PQQ as a generator and a scavenger of oxygen radicals: determination with ESR spectroscopy using a spin trap agent//Fukui T, Ed. *Enzymes Dependent on Pyridoxal Phosphate and Other Carbonyl Compounds as Cofactors*. Oxford, New York, Seoul, Tokyo: Pergamon Press, 1991: 511–513.
- [4] Aizenman E, Hartnett KA, Zhong C, et al. Interaction of the putative essential nutrient pyrroloquinoline quinone with the N-methyl-D-aspartate receptor redox modulatory site. *J Neurosci*, 1992, 12(6): 2362–2369.
- [5] Yamaguchi K, Sasano A, Urakami T, et al. Stimulation of nerve growth factor production by pyrroloquinoline quinone and its derivatives *in vitro* and *in vivo*. *Biosci Biotech Bioch*, 1993, 57(7): 1231–1233.
- [6] Naito Y, Kumazawa T, Kino I, et al. Effects of pyrroloquinoline quinone (PQQ) and PQQ-oxazoleon DNA synthesis of cultured human fibroblasts. *Life Sci*, 1993, 52(24): 1909–1915.
- [7] Ameyama M, Shinagawa E, Matsushita K, et al. Growth stimulating activity for microorganisms in naturally occurring substances and partial characterization of the substance for the activity as pyrroloquinoline quinone. *Agrio Biol Chem*, 1985, 49: 699–709.
- [8] Tanne C, Göbel G, Lisdat F. Development of a (PQQ)-GDH-anode based on MWCNT-modified gold and its application in a glucose/O<sub>2</sub>-biofuel cell. *Biosens Bioelectron*, 2010, 26(2): 530–535.
- [9] Kumazawa T, Hiwasa T, Takiguchi M, et al. Activation of ras signaling pathways by pyrroloquinoline quinone in NIH3T3 mouse fibroblasts. *Int J Mol Med*, 2007, 19(5): 765–770.
- [10] Misra HS, Rajpurohit YS, Khairnar NP. Pyrroloquinoline-quinone and its versatile roles in biological processes. *J Biosci*, 2012, 37(2): 313–325.
- [11] 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导扭脱甲基杆菌 AM1 高产吡咯喹啉醌. *生物工程学报*, 2016, 32(8): 1145–1149.
- [12] 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.
- [13] Wang WX, Ge X, Han YM, et al. Isolation and characterization of glucose dehydrogenase gene in *Methylovorus* sp. MP688. *Lett Biotechnol*, 2013, 24(6): 805–809 (in Chinese). 王文溪, 葛欣, 韩月梅, 等. 甲基营养菌 MP688 葡萄糖脱氢酶基因分离鉴定及性质研究. *生物技术通讯*, 2013, 24(6): 805–809.
- [14] Si ZJ, Machaku D, Wei PL, et al. Enhanced fed-batch production of pyrroloquinoline quinone in *Methylobacillus* sp. CCTCC M2016079 with a two-stage pH control strategy. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, 101(12): 4915–4922.
- [15] Andreeva IG, Golubeva LI, Kuvaeva TM, et al. Identification of *Pantoea ananatis* gene encoding membrane pyrroloquinoline quinone (PQQ)-dependent glucose dehydrogenase and *pqqABCDEF* operon essential for PQQ biosynthesis. *FEMS Microbiol Lett*, 2011, 318(1): 55–60.
- [16] Hölscher T, Görisch H. Knockout and overexpression of pyrroloquinoline quinone biosynthetic genes in *Gluconobacter oxydans* 621H. *J Bacteriol*, 2006, 188(21): 7668–7676.
- [17] Ma K, Cui JZ, Ye JB, et al. Pyrroloquinoline

- quinone from *Gluconobacter oxydans* fermentation broth enhances superoxide anion-scavenging capacity of Cu/Zn-SOD. *Food Chem*, 2017, 230: 291–294.
- [18] van Kleef MAG, Duine JA. L-tyrosine is the precursor of PQQ biosynthesis in *Hyphomicrobium* X. *FEBS Lett*, 1988, 237(1/2): 91–97.
- [19] Puehringer S, Metlitzky M, Schwarzenbacher R. The pyrroloquinoline quinone biosynthesis pathway revisited: a structural approach. *BMC Biochem*, 2008, 9: 8.
- [20] Morris CJ, Biville F, Turlin E, et al. Isolation, phenotypic characterization, and complementation analysis of mutants of *Methylobacterium extorquens* AM1 unable to synthesize pyrroloquinoline quinone and sequences of *pqqD*, *pqqG*, and *pqqC*. *J Bacteriol*, 1994, 176(6): 1746–1755.
- [21] Springer AL, Ramamoorthi R, lidstrom ME. Characterization and nucleotide sequence of *pqqE* and *pqqF* in *Methylobacterium extorquens* AM1. *J Bacteriol*, 1996, 178(7): 2154–2157.
- [22] Goosen N, Horsman HP, Huinen RG, et al. *Acinetobacter calcoaceticus* genes involved in biosynthesis of the coenzyme pyrrolo-quinoline-quinone: nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 1989, 171(1): 447–455.
- [23] Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 2000, 406(6799): 959–964.
- [24] Meulenbergg JJM, Sellink E, Riegman NH, et al. Nucleotide sequence and structure of the *Klebsiella pneumoniae pqq* operon. *Mol Gen Genet*, 1992, 232(2): 284–294.
- [25] 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.
- [26] Hu HY, Sun XM, Yuan JF. Research progress in production of pyrroloquinoline quinone by *Gluconobacter oxydans*. *China Brew*, 2019, 38(6): 13–17 (in Chinese).
- 胡鸿雨, 孙晓明, 袁建锋. 氧化葡萄糖酸杆菌生物制造吡咯喹啉醌进展. *中国酿造*, 2019, 38(6): 13–17.
- [27] Sun JG. Research on PQQ synthesis in recombinant *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae* by utilizing different promoters[D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2013 (in Chinese).  
孙继国. 利用不同启动子在大肠杆菌与肺炎克雷伯氏菌中合成PQQ的研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2013.
- [28] Meulenbergg JJM, Sellink E, Loenen WAM, et al. Cloning of *Klebsiella pneumoniae pqq* genes and PQQ biosynthesis in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*, 1990, 59(3): 337–343.
- [29] Li PP. The research on pyrroloquinoline quinone biosynthesis in *Gluconobacter oxydans*[D]. Zhengzhou: Zhengzhou University of Light Industry, 2016 (in Chinese).  
李盼盼. 氧化葡萄糖酸杆菌合成吡咯喹啉醌的研究[D]. 郑州: 郑州轻工业学院, 2016.
- [30] Wang CX. Engineering strains for production of pyrroloquinoline quinone and dissecting key genes[D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2013 (in Chinese).  
王朝绚. 吡咯喹啉醌工程菌构建及关键基因研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2013.
- [31] Green MR, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4th ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.
- [32] Wilson KJ, Sessitsch A, Corbo JC, et al.  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies of *Rhizobia* and other Gram-negative bacteria. *Microbiology*, 1995, 141(7): 1691–1705.
- [33] Si ZJ. Studies on efficient bioproductions of pyrroloquinoline quinone and poly( $\beta$ -L-malic acid)[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2017 (in Chinese).  
司振军. 微生物高效生产吡咯喹啉醌和聚苹果酸的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2017.
- [34] Peters B, Junker A, Brauer K, et al. Deletion of pyruvate decarboxylase by a new method for efficient markerless gene deletions in

- Gluconobacter oxydans*. Appl Microbiol Biotechnol, 2013, 97(6): 2521–2530.
- [35] Katzen F, Becker A, Ielmini MV, et al. New mobilizable vectors suitable for gene replacement in Gram-negative bacteria and their use in mapping of the 3' end of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris gum* operon. Appl Environ Microb, 1999, 65(1): 278–282.
- [36] Guo ML, Zhu Q, Gao DK. Development and optimization of method for generating unmarked *A. tumefaciens* mutants. Prog Biochem Biophys, 2009, 36(5): 556–565.
- [37] Shi LL, Li KF, Zhang H, et al. Identification of a novel promoter gHp0169 for gene expression in *Gluconobacter oxydans*. J Biotechnol, 2014, 175: 69–74.
- [38] Houck DR, Hanners JL, Unkefer CC. Biosynthesis of pyrroloquinoline quinone. Identification of biosynthetic precursors using C-13 labeling and NMR spectroscopy. J Am Chem Soc, 1988, 110(20): 6020–6021.
- [39] Hölscher T, Schleyer U, Merfort M, et al. Glucose oxidation and PQQ-dependent dehydrogenases in *Gluconobacter oxydans*. J Mol Microbiol Biotechnol, 2009, 16(1/2): 6–13.
- [40] Wang PP, Xia Y, Li JH, et al. Overexpression of pyrroloquinoline quinone biosynthetic genes affects L-sorbose production in *Gluconobacter oxydans* WSH-003. Biochem Eng J, 2016, 112: 70–77.
- [41] Lee SY, Kim HU. Systems strategies for developing industrial microbial strains. Nat Biotechnol, 2015, 33(10): 1061–1072.

(本文责编 郝丽芳)