变形假单胞菌吡咯喹啉醌合成基因簇的克隆与分析

王大明[1,2,4]，孙 雷[1,2]，孙文敬[3,4]，崔凤杰[3,4]，龚劲松[1,2]，
张晓梅[1,2]，史劲松[1,2]，许正宏[*1,2]

（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 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室，江苏 无锡 214122；3. 江苏大学 食品与生物工程学院，江苏 镇江 212013；4. 百勤异 VC 钠有限公司，江西 德兴 334221）

摘要：从变形假单胞菌 JUIM01 中克隆到吡咯喹啉醌（PQQ）合成基因簇，阐明了其基因组成和生物学信息。根据已报道的假单胞菌的基因组进行简并引物设计，采用 LA-PCR 技术克隆变形假单胞菌的 PQQ 合成基因簇，对克隆的基因片段进行测序并使用生物信息学方法进行综合分析。结果表明：克隆到的基因片段全长为 11 659 bp，其中包括 *pqqF*、*pqqA*、*pqqB*、*pqqC*、*pqqD*、*pqqE*、*pqqM*、*pqqH* 和 *pqqI* 共 9 个基因，编码 PQQ 生物合成的前体短肽 PqqA 和合成途径的相关酶；这些基因与荧光假单胞菌 Pf0-1 的 PQQ 合成基因簇的基因组成类似，相应基因的序列一致性达 41%~94%。本研究中首次从变形假单胞菌中克隆到 PQQ 合成基因簇，并对其进行生物信息学分析，为变形假单胞菌的 PQQ 生物合成途径和胞内再生机制的研究奠定了基础，进而为提高 2KGA 的生产强度提供了理论支撑。

关键词：变形假单胞菌；吡咯喹啉醌；基因簇；克隆；生物信息学分析

中图分类号：Q933　**文章编号：**1673-1689(2020)06-0047-08　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.06.007

Cloning and Bioinformatics Analysis of the Gene Cluster of Pyrroquinoline Quinone from *Pseudomonas plecoglossicida*

WANG Daming[1,2,4]，*SUN Lei*[1,2]，*SUN Wenjing*[3,4]，*CUI Fengjie*[3,4]，*GONG Jinsong*[1,2]，
ZHANG Xiaomei[1,2]，*SHI Jinsong*[1,2]，*XU Zhenghong*[*1,2]

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; 4. Parchn Sodium Isovitamin C Co., Ltd., Dexing 334221, China)

Abstract: The gene cluster for pyrroquinoline quinone (PQQ) synthesis was cloned from *Pseudomonas plecoglossicida* JUIM01. Its genome composition and biological information were subsequently analyzed. According to the reported genome sequence of *P. plecoglossicida* JUIM01, primers were designed for amplification of the PQQ synthesis gene cluster via LA-PCR. The gene

收稿日期：2018-09-30

基金项目：国家自然科学基金项目(31571885)；国家高技术研究发展计划项目(2012AA022103)；江西省科技计划项目(赣知发[2015]64号)；江西省创新团队建设计划项目(20142BCB24024)；德兴市科技计划项目(德科发[2015]44 号)。

作者简介：王大明(1987—)，男，博士，主要从事发酵工程及食品生物技术研究。E-mail:wdm9987@163.com

*** 通信作者：**许正宏(1971—)，男，博士，教授，博士研究生导师，主要从事发酵工程及食品生物技术研究。E-mail:zhenghxu@jiangnan.edu.cn

fragments were sequenced and analyzed by bioinformatics approaches. The results showed that the total length of the cloned gene fragment was 11 659 bp, which included 9 genes: *pqqF*, *pqqA*, *pqqB*, *pqqC*, *pqqD*, *pqqE*, *pqqM*, *pqqH* and *pqqI*, and encoded the related enzymes in PQQ biosynthesis pathway and precursor peptide PqqA. These encoding genes were similar to the PQQ synthesis gene cluster of *P. fluorescens* Pf0-1 with sequence identifity of 41~94%. This study, for the first time, reported cloning of the PQQ synthesis gene cluster from *P. plecoglossicida* JUIM01, and the bioinformatics analysis laid a foundation for the study of PQQ biosynthesis pathway and intracellular regeneration mechanism of *Pseudomonas* strains. Furthermore, it provided theoretical support for improving the production intensity of 2KGA.

Keywords: *Pseudomonas plecoglossicida*, pyrroliquinoline quinone, gene cluster, cloning, bioinformatics analysis

2-酮基-D-葡萄糖酸(2KGA)在合成杂环化合物、用于立体选择性化学反应等方面具有重要应用价值[1],已经被成功地应用于生产食品抗氧化剂 D-异抗坏血酸及其衍生物[2-4]。目前,发酵法是最经济、高效且环保的 2KGA 工业生产方法[5]。在国际上,具有较高效率和稳定转化性能的假单胞菌通常用于 2KGA 的工业生产[2,6]。变形假单胞菌(*Pseudomonas plecoglossicida*) JUIM01 是一株工业化生产 2KGA 的经典菌株,其糖酸转化率可达理论产率的 90%,但其生产强度依然不能满足节能降耗的要求[7]。

假单胞菌的 2KGA 合成途径即发生在细胞周质空间中的葡萄糖胞外直接氧化途径,该途径首先需通过吡咯喹啉醌(PQQ)依赖性葡萄糖脱氢酶将葡萄糖转化为葡萄糖酸,随后借助黄素腺嘌呤二核苷酸依赖性葡萄糖酸脱氢酶将葡萄糖酸转化为 2KGA[6]。在这个代谢过程中,葡萄糖脱氢酶是 2KGA 代谢合成的限速因素[8]。前期有文献研究表明,恶臭假单胞菌(*P. putida*) KT2440 中较低的辅酶 PQQ 合成水平,成为提高葡萄糖脱氢酶活性的限制因素之一[9];Gao 等在研究提高 2-酮基-L-葡萄糖酸产量时也发现,PQQ 合成水平是 PQQ 依赖性脱氢酶活性的限制因素,而引入 PQQ 合成基因可提高 20%的产物浓度[10-11]。故推测,通过提高 2KGA 工业生产菌株变形假单胞菌 JUIM01 的自身 PQQ 合成水平,有望进一步提高 2KGA 的生产强度。

PQQ 作为氧化还原酶的一种辅酶,在革兰氏 G$^-$ 菌中存在较为广泛[12]。有研究表明,PQQ 来源于短肽 PqqA 内部保守的谷氨酸和酪氨酸,由这 2 个氨基酸侧链交联构成[13]。PQQ 代谢合成的详细机制截至目前尚未解析清楚,但可初步推测该代谢过程是由 5 到 6 个酶促反应所构成。其实在早期研究中已有学者推测:首先充当 PQQ 代谢合成的前体,PqqA 在体内实现成功表达,进而通过 PqqE 识别;随后在 PqqE 的辅助作用下,PqqA 会介导谷氨酸 Glu 与酪氨酸 Tyr 2 种氨基酸之间碳碳键的产生,而这一反应过程则可由 PqqF 所识别,同时 PQQ 骨架还会被从 PqqA 短肽上切割下来;最后,该代谢过程还会继续借助 PqqC 环化及氧化反应促使中间产物合成 PQQ[14]。这个合成途径共包括 4 到 7 个以基因簇形式存在的基因(*pqqABCDEFG*)[14-15]。一些细菌具有连续的 *pqq* 基因,如氧化葡萄糖酸杆菌即由 5 个基因所构成,组成一个完整的基因簇 (*pqqABCDE*)[16];另外,据前期文献报道,还有一些其他不同来源细菌的 *pqq* 基因则包括 2 个基因簇,例如扭脱甲基杆菌中含有 *pqqABCDE* 和 *pqqFG* 共 2 个基因簇[17]。

截止到目前为止,涉及 PQQ 生物合成途径的编码基因已经在多种细菌中被鉴定获得,除扭脱甲基杆菌(*M. extorquens*)[18]外,还有醋酸钙不动杆菌(*A. calcoaceticus*)[19]、肺炎克雷伯氏菌 (*K. pneumoniae*)[13,20]、氧化葡萄糖酸杆菌(*G. oxydans*)[21-22]等多种不同细菌菌株;另外,假单胞菌属来源的菌株还包括荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)[23-25]以及恶臭假单胞菌(*P. putida*)[9]等。但总结已有文献来看,尚未见任何有关变形假单胞菌生物合成 PQQ 的报道。

作者采用 LA-PCR 技术克隆变形假单胞菌 JUIM01 的 PQQ 合成基因簇,在此基础上明确其基因组成与生物学信息,以期从分子水平深入探究 PQQ 的生物合途径与胞内再生机制,在此基础上最

终通过辅酶工程提高 2KGA 的工业化生产强度。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株和质粒 本实验所采用的菌株及质粒如表 1 所示。

表 1 本实验所用菌株及质粒

Table 1 Bacterial strains and vectors in this experiment

菌株质粒	编号	来源
变形假单胞菌	JUIM01	作者所在实验室
大肠杆菌	DH5α	作者所在实验室
pMD19-T	-	Takara Biomedical Technology(Beijing)

1.1.2 培养基 固体活化培养基(g/L):蛋白胨 10.0,牛肉膏 3.0,NaCl 5.0,琼脂粉 20.0;pH 7.2。

液体 LB 培养基(g/L):胰蛋白胨 10.0,酵母提取物 5.0,NaCl 10.0;pH 7.0。

1.1.3 主要工具酶和试剂 作者所采用的工具酶及分子生物学试剂包括 Premix LA Taq 试剂及各种消化实验所用限制性内切酶,均购自 Takara Biomedical Technology(Beijing)公司;用于基因工程操作的各类分子生物学试剂盒则购自 Sangon Biotech(Shanghai)公司。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 将活化好的 JUIM01 种子液接种到 25 mL 的液体 LB 培养基中,30 ℃振荡培养后,低温离心去除上清液,将菌体收集并用无菌水重悬洗涤 2 遍,用于后续基因组 DNA 提取操作,该实验流程参考细菌基因组提取试剂盒操作指南进行。

1.2.2 PCR 引物的设计与合成 作者所用的 PCR 简并引物基于假单胞菌来源的 PQQ 合成基因簇序列及 NCBI 数据库其它具有不同相似度且不同来源的假单胞菌序列,通过 Primer 5.0 软件设计而成。引物序列如下所示:

P1:5′-GCGGTACANACGTNGCTCNACGNCG-3′;P2:5′-AATCTTNCTCACANGGANGTANCGC-3′

1.2.3 目的基因片段的扩增 所述 1.2.1 步骤所得基因组 DNA 用作模板,PCR 反应体系为(50.0 μL):预混合使用 Premix LA Taq 试剂 25.0 μL,引物 P1 1.0 μL,引物 P2 1.0 μL,基因组 DNA 1.0 μL,ddH_2O 22.0 μL。扩增反应程序设置为:在 98 ℃变性 10 s;延伸步骤设置为 66 ℃运行 10 min,循环运行 35 次;最终延伸设置在 72 ℃条件下运行 10 min。

扩增反应所得基因产物采用 1 g/dL 电泳进行验证,同时,所需目的片段借助 DNA 回收试剂盒进行回收,连接 pMD19-T,导入 *E. coli* DH5α 感受态;筛选阳性转化子。

1.2.4 生物信息学分析 借助 ORF Finder 软件分析基因簇中的开放阅读框;使用 DNAMAN 及 BLAST 分别分析序列数据及序列同源性;选择 ProtParam 工具来分析目标序列的基本物理化学性质;选用 PredictProtein 软件来判断蛋白质的二级结构;通过 TMHMM 2.0 服务器研究该酶的跨膜结构;启动子情况则是通过 BPROM 和 BDGP 软件进行分析;终止子是使用 FindTerm 进行预测;使用 NCBI 保守结构域检索软件对目标酶的氨基酸保守序列进行分析;蛋白质的信号肽,则使用 SIGNALP 4.1 分析[26]。

2 结果与分析

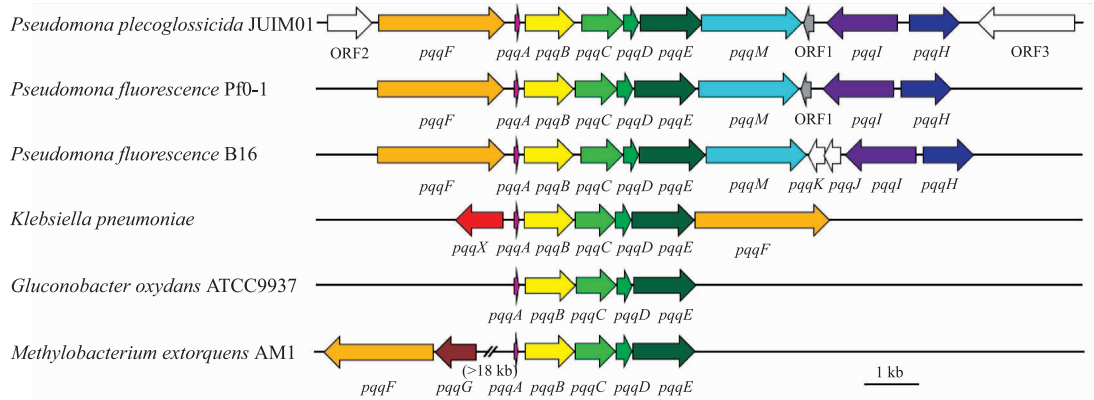
2.1 PQQ 合成基因簇的克隆与重组质粒的构建

作者特异性针对变形假单胞菌 PQQ 合成途径设计引物 P1 和 P2,同时选择 1.2.1 步骤所得基因组作为模板,通过 PCR 扩增目的编码基因。实验结果表明基因片段大小约为 11.6 kb。在此基础上,本实验进一步构建重组质粒 pMD19-T-*pqq*,并进行限制酶消化。1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳分析结果表明,重组质粒经单次消化后获得大小约 14 kb 的单一条带,继续双酶切获得约 11.6 kb 和 2.7 kb 2 个条带,具有预期的大小。上述结果表明重组质粒 pMD19-T-*pqq* 已成功构建。

2.2 PQQ 合成基因簇的基因组成

将重组质粒 pMD19-T-*pqq* 送至 Sangon Biotech(Shanghai)进行测序、拼接,最终获得基因簇的完整序列。测序结果显示目的基因片段为 11 659 bp。分析结果表明,该片段是由 9 个开放阅读框组成的 PQQ 合成基因簇,其中包括 *pqqF*、*pqqA*、*pqqB*、*pqqC*、*pqqD*、*pqqE*、*pqqM*、*pqqH*,以及位于反向互补链上的 *pqqI*,这些基因相应的编码并合成目的蛋白质 PqqF、PqqA、PqqB、PqqC、PqqD、PqqE、PqqM、PqqH、PqqI。将作者所得来源于变形假单胞菌 JUIM01 的 PQQ 合成基因簇的核苷酸序列提交至 Genbank 数据库,获得登录号为 MH919393。

变形假单胞菌 JUIM01 与荧光假单胞菌 Pf0-1 和 B16[23]的 PQQ 合成基因簇的基因组成类似(图 1)。同源性分析结果表明,JUIM01 与 Pf0-1 等菌株的 PqqF、PqqA、PqqB、PqqC、PqqD、PqqE、PqqM、PqqH、PqqI 氨基酸序列一致性分别为 41%、92%、84%、94%、84%、88%、65%、81%、70%(表 3)。



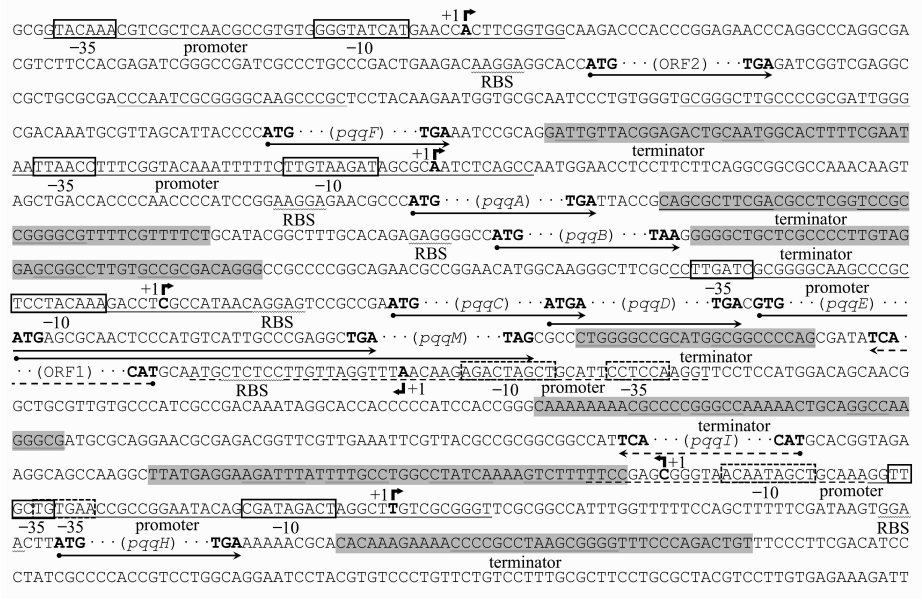
白色和彩色箭头表示 *pqq* 各基因的位置和方向,相同的箭头颜色代表同源蛋白质;基因的顺序和大小是根据 GenBank 中的相关核苷酸序列数据进行等比例绘制。其它菌株分别为荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)Pf0-1 和 B16、肺炎克雷伯氏菌(*K. pneumoniae*)、氧化葡萄糖酸杆菌(*G. oxydans*)ATCC9937、扭脱甲基杆菌(*M. extorquens*)AM1。

图 1　变形假单胞菌 JUIM01 与其它菌株 PQQ 合成基因簇物理图谱的比较

Fig. 1　Comparison of physical map of PQQ synthesis gene clusters from *P. plecoglossicida* JUIM01 with those from other strains

2.3　PQQ 合成基因簇的非编码序列分析

作者对变形假单胞菌 JUIM01 的 PQQ 基因簇的非编码区域进行启动子区和终止子区的在线分析,结果显示其中存在 6 处启动子区(具有典型的-10 区和-35 区)、7 处终止子区(具有典型的反向重复序列)和 6 处核糖体结合位点(RBS)(图 2),这些预测结果将为进一步的实验验证以及将来的分子改造提供理论支撑。



___ 表示启动子区域,□表示启动子的-35 或-10 区,↱表示转录方向,+1 表示转录起始位点;__表示核糖体结合位点;→表示开放阅读框;■表示转录终止区,〰表示反向重复序列。以上标记的虚线形式均表示反向互补链上的对应元件。

图 2　PQQ 合成基因簇的非编码区序列分析

Fig. 2　Sequence analysis of non-coding regions of PQQ synthesis gene clusters

2.4 PQQ 合成基因簇中各基因的生物信息学分析

使用在线分析软件,分析了变形假单胞菌 JUIM01 的 PQQ 合成基因簇中各不同基因的物理化学性质(表 2),这 9 个基因所编码的相应蛋白质没有信号肽、没有跨膜结构域,均属于胞内蛋白质;各基因编码的 Pqq 蛋白质的注释与同源比对结果见表 3。各 Pqq 蛋白质的保守序列分析结果具体如下:

保守序列分析结果表明,*pqqF* 编码的蛋白质属于 PQQ 生物合成蛋白 PqqF 家族,该肽酶存在于 PQQ 生物合成区域中,并且被认为是作用于 PQQ 可能的前体肽 PqqA 的蛋白酶,其分子功能是能够结合锌离子,以及具有金属肽链内切酶活性[24]。同源超家族分析结果显示,第 5~207 和 617~756 位氨基酸属于 "Metalloenzyme,LuxS/M16 peptidase-like";结构域分析结果显示,第 17~142 位氨基酸属于 "Peptidase M16,N-terminal"。

pqqA 编码的蛋白质属于 PQQ 生物合成蛋白 PqqA 家族,这个蛋白质在许多物种中均存在,其大小<25 个氨基酸,可初步推断出 *pqqA* 编码的蛋白质为辅酶 PQQ 的肽前体,此外,PqqA 的保守基序 "Glu-Xxx-Xxx-Xxx-Tyr"中的首尾 2 个氨基酸残基 Glu 和 Tyr 会成为最终产物 PQQ 的一部分[27]。

pqqB 编码的蛋白质属于 PQQ 生物合成蛋白 PqqB 家族,该基因是扭脱甲基杆菌(相当于 *pqqG*)和肺炎克雷伯氏菌的 PQQ 生物合成所必需的,但对于大肠杆菌 PQQ 生物合成的异源表达、醋酸钙不动杆菌(相当于 *pqqV*)来说不是必需的。基于后一发现,表明 PqqB 可能是一个转运蛋白或一个 PQQ 依赖性酶[28],而不是用于 PQQ 生物合成的酶[19]。同源超家族分析结果显示,第 1~303 位氨基酸属于 "Ribonuclease Z/Hydroxyacylglutathione hydrolase -like";结构域分析结果显示,第 50~270 位氨基酸属于 "Metallo-beta-lactamase",这些蛋白质每分子结合 2 个锌离子作为辅助因子;氨基酸残基注释结果显示,含有 9 个推定的活性位点 "88D、90Q、92D、93H、176H、177P、199G、220D",以及 2 个推定的金属结合位点 "92D、220D"。

pqqC 编码的蛋白质属于 PQQ 合成酶类和 PQQ 生物合成蛋白 PqqC 家族,PqqC 是一种氧化酶,其反应涉及底物的一个环闭合和八电子氧化,以产生 PQQ[29]。同源超家族分析结果显示,第 4~251 位氨基酸属于 "Haem oxygenase-like,multi-helical",该超家族具有一个多螺旋结构域,组成 3-螺旋基序的2个结构重复[20];结构域分析结果显示,第 14~223 位氨基酸属于 "Thiaminase-2/PQQC"。

pqqD 编码的蛋白质属于 PQQ 生物合成蛋白 PqqD 家族,它是参与辅酶 PQQ 生物合成最后一步的蛋白质[30],其分子功能是与醌结合。

pqqE 编码的蛋白质属于 PQQ 生物合成蛋白 PqqE 家族。同源超家族分析结果显示,第 13~289 位氨基酸属于 "Aldolase-type TIM barrel",这种 TIM 桶通常覆盖整个蛋白质结构。第 11~214 位氨基酸具有 "Radical SAM"结构域,以及第 244~336 位氨基酸具有 "4Fe4S-binding SPASM"结构域。有证据表明,该类蛋白质通过不寻常的 Fe-S 中心来还原性裂解 S:-腺苷甲硫氨酸(SAM)而产生自由基[31]。尽管 PqqE 具有变体形式,但该家族的 "CxxCxxxxxCxxxC"基序几乎不变。

pqqM 编码的蛋白 PqqM 的第 351~610 位氨基酸是属于 α/β 水解酶家族,含有 8 条通过螺旋连接的链;第 403~609 位氨基酸具有肽酶 S9、脯氨酰寡肽酶活性位点结构域;该蛋白质具有丝氨酸型肽酶活性,可进行蛋白质水解。

pqqH 编码的蛋白 PqqH 属于 LysR 家族转录调控因子,其中第 1~91 位氨基酸属于翼状螺旋 DNA 结合蛋白家族,该家族的共同特征是具有一个翼状螺旋-转角-螺旋 DNA 结合基序,其中 "翅膀"或环状结构是小的 β 折叠。翼状螺旋基序由 2 个翼(W1、W2)、3 个 α 螺旋(H1、H2、H3)和 3 个 β 折叠(S1、S2、S3)按 H1-S1-H2-H3-S2-W1-S3-W2 顺序排列组成[32]。DNA 识别螺旋使序列特异性 DNA 与 DNA 的主要沟槽接触,而 "翅膀"通常是与 DNA 的小沟槽或骨架接触。一些翼状螺旋蛋白具有裸露的疏水残基片段,可介导蛋白质-蛋白质相互作用。第 91~293 位氨基酸具有底物结合结构域,并且类似于周质结合蛋白[33]。氨基酸残基注释结果显示,二聚界面的结合位点是 107P、108Q、110L、111E、114R、118P、120L、121V、122V、123Q、124I、125Y、126E、218E、219A、220E、221M、222N、223N、229D、230S、232A、233H。

pqqI 编码的蛋白 PqqI 属于氨基转移酶类型 III 家族,该氨基转移酶与其它磷酸吡哆醛依赖性酶具有某些相同的机制特征,例如磷酸吡哆醛基团与赖氨酸残基进行共价结合。氨基酸残基注释结果显

示，抑制剂–辅因子结合口袋位点为 129S、130G、131A、162C、163H、165R、213E、246D、248V、249Q、275K；吡哆醛 5′–磷酸结合位点为 130G、131A、162C、163H、213E、246D、249Q、275K；催化残基位点为 275K。

表 2　变形假单胞菌 JUIM01 的 PQQ 合成基因簇中各基因的基本理化性质分析

Table 2　Analysis of basic physical and chemical properties of genes in PQQ synthesis gene clusters of *P. plecoglossicida* JUIM01

基因名称	基因长度/bp	GC占比(个数)/%	起始/终止密码子	氨基酸数目	理论相对分子质量	理论等电点(pI)	不稳定指数	均亲水指数	脂溶指数	分子式	原子总数
pqqF	2 310	65.2	ATG/TGA	769	84.51	7.42	54.72	–0.17	92.93	$C_{3799}H_{5945}N_{1095}O_{1059}S_{19}$	11 917
pqqA	72	52.8	ATG/TGA	23	2.811	8.25	19.41	–0.24	55.22	$C_{130}H_{192}N_{32}O_{34}S_2$	390
pqqB	912	64.7	ATG/TAA	303	33.48	5.23	47.67	–0.29	82.74	$C_{1465}H_{2290}N_{424}O_{439}S_{19}$	4 637
pqqC	756	65.3	ATG/TGA	251	29.10	6.12	62.75	–0.50	79.80	$C_{1305}H_{1982}N_{374}O_{369}S_9$	4 039
pqqD	276	61.6	ATG/TGA	91	10.38	4.88	34.53	–0.22	94.40	$C_{469}H_{724}N_{128}O_{133}S_3$	1 457
pqqE	1 131	64.0	GTG/TGA	376	42.26	5.86	37.13	–0.31	80.29	$C_{1874}H_{2909}N_{527}O_{548}S_{21}$	5 879
pqqM	1 833	67.5	ATG/TAG	610	67.05	6.10	37.53	–0.33	73.25	$C_{3003}H_{4507}N_{871}O_{860}S_{15}$	9 256
pqqH	924	61.8	ATG/TGA	307	34.83	7.19	43.14	–0.24	108.66	$C_{1549}H_{2522}N_{450}O_{441}S_{10}$	4 972
pqqI	1 293	67.4	ATG/TGA	430	45.71	6.71	37.80	0.04	101.95	$C_{2008}H_{3243}N_{595}O_{592}S_{16}$	6 454

表 3　变形假单胞菌 JUIM01 的 Pqq 蛋白编码基因的注释

Table 3　Annotation of *P. plecoglossicida* JUIM01 genes encoding Pqq proteins

基因名称[a]	推定功能 (来源菌株和 GenBank 蛋白登录号)[b]	BLASTP E–值	氨基酸序列一致性/%
pqqF	肽酶 M16A,PQQ 生物合成蛋白 PqqF (*P. fluorescens*, WP_011336226.1)	$1e^{-169}$	41
pqqA	PQQ 前体肽 PqqA (*Pseudomonas*, WP_003444522.1)	$7e^{-21}$	92
pqqB	PQQ 生物合成蛋白 PqqB (*P. fluorescens*, WP_011336227.1)	0	84
pqqC	PQQ 合成酶 PqqC (*Pseudomonas*, WP_011336228.1)	$2e^{-180}$	94
pqqD	PQQ 生物合成肽伴侣 PqqD (*Pseudomonas*, WP_011336229.1)	$2e^{-56}$	84
pqqE	PQQ 生物合成蛋白 PqqE (*P. fluorescens* Pf0–1, ABA76898.1)	0	88
pqqM	肽酶 S9, 脯氨酰寡肽酶活性位点区 (*P. fluorescens*, WP_041475444.1)	0	65
pqqH	LysR 家族转录调控因子 (*P. fluorescens*, WP_011336233.1)	$1e^{-176}$	81
pqqI	天冬氨酸转氨酶 (*P. fluorescens*, WP_011336232.1)	0	70

注：[a] 变形假单胞菌 JUIM01 的 Pqq 蛋白编码基因的统一命名。[b] 根据与其它 PQQ 合成途径中已知功能的蛋白质的同源性，预测单个基因产物的推定功能。

3 结　语

本研究中通过生物信息学手段对数据库中不同来源假单胞菌的 PQQ 生物合成基因簇进行分析，进一步设计引物，并采用 LA–PCR 技术，首次克隆到了含有 2KGA 工业生产菌株变形假单胞菌 JUIM01 的 PQQ 合成操纵子完整序列的基因簇，该 11 659 bp 基因片段含有 9 个开放阅读框 *pqqFABCDEMHI*，编码 PQQ 生物合成的前体短肽 PqqA 和合成途径的相关酶。基因编码区和非编码区的生物信息学分析为 2KGA 工业生产菌株变形假单胞菌 JUIM01 的 PQQ 生物合成途径和胞内再生机制的研究奠定了基础，进而为通过提高该菌株的自身 PQQ 合成水平，来进一步提高 2KGA 的生产强度提供理论支撑。

参考文献:

[1] STOTTMEISTER U,AURICH A,WILDE H,et al. White biotechnology for green chemistry:fermentative 2-oxocarboxylic acids as novel building blocks for subsequent chemical syntheses[J]. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**,2005,32(11-12):651-664.

[2] SUN W J,ZHOU Y Z,ZHOU Q,et al. Semi-continuous production of 2-keto-gluconic acid by *Pseudomonas fluorescens* AR4 from rice starch hydrolysate[J]. **Bioresource Technology**,2012,110(1):546-551.

[3] PAPPENBERGER G,HOHMANN H P. Industrial production of L-ascorbic acid (vitamin C) and D-isoascorbic acid[J]. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**,2013,143(1):143-188.

[4] UMEZAWA K,TAKEDA K,ISHIDA T,et al. A novel pyrroloquinoline quinone-dependent 2-keto-D-glucose dehydrogenase from *Pseudomonas aureofaciens*[J]. **Journal of Bacteriology**,2015,197(8):1322-1329.

[5] 魏转,余泗莲,孙文敬,等. 2- 酮基 -D- 葡萄糖酸发酵生产研究进展[J]. 食品科学,2008,29(8):636-639.

[6] CHIA M,Van NGUYEN T B,CHOI W J. DO-stat fed-batch production of 2-keto-D-gluconic acid from cassava using immobilized *Pseudomonas aeruginosa*[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2008,78(5):759-765.

[7] 孙文敬,栾方,王大明,等. 变形假单胞菌 2- 酮基葡萄糖酸转运蛋白基因的克隆与分析[J]. 现代食品科技,2016,32(6):50-55.

[8] WANG D M,SUN L,SUN W J,et al. Purification,characterization and gene identification of a membrane-bound glucose dehydrogenase from 2-keto-D-gluconic acid industrial producing strain *Pseudomonas plecoglossicida* JUIM01[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**,2018,118(1):534-541.

[9] AN R,MOE L A. Regulation of pyrroloquinoline quinone-dependent glucose dehydrogenase activity in the model rhizosphere-dwelling bacterium *Pseudomonas putida* KT2440[J]. **Applied and Environmental Microbiology**,2016,82(16):4955-4964.

[10] GAO L,DU G,ZHOU J,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[J]. **Biotechnology Progress**,2013,29(6):1398-1404.

[11] GAO L,HU Y,LIU J,et al. Stepwise metabolic engineering of *Gluconobacter oxydans* WSH-003 for the direct production of 2-keto-L-gulonic acid from D-sorbitol[J]. **Metabolic Engineering**,2014,24(1):30-37.

[12] MISRA H S,RAJPUROHIT Y S,KHAIRNAR N P. Pyrroloquinoline-quinone and its versatile roles in biological processes[J]. **Journal of Biosciences**,2012,37(2):313-325.

[13] MEULENBERG J J,SELLINK E,RIEGMAN N H,et al. Nucleotide sequence and structure of the *Klebsiella pneumoniae pqq* operon[J]. **Molecular and General Genetics MGG**,1992,232(2):284-294.

[14] PUEHRINGER S,METLITZKY M,SCHWARZENBACHER R. The pyrroloquinoline quinone biosynthesis pathway revisited:a structural approach[J]. **BMC Biochemistry**,2008,9(1):1-11.

[15] MAGNUSSON O T,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]. **Journal of the American Chemical Society**,2004,126(17):5342-5343.

[16] GAO L,ZHOU J,LIU J,et al. Draft genome sequence of *Gluconobacter oxydans* WSH-003,a strain that is extremely tolerant of saccharides and alditols[J]. **Journal of Bacteriology**,2012,194(16):4455-4456.

[17] SPRINGER A L,RAMAMOORTHI R,LIDSTROM M E. Characterization and nucleotide sequence of *pqqE* and *pqqF* in *Methylobacterium extorquens* AM1[J]. **Journal of Bacteriology**,1996,178(7):2154-2157.

[18] TOYAMA H,CHISTOSERDOVA L,LIDSTROM M E. Sequence analysis of *pqq* genes required for biosynthesis of pyrroloquinoline quinone in *Methylobacterium extorquens* AM1 and the purification of a biosynthetic intermediate [J]. **Microbiology**,1997,143(2):595-602.

[19] GOOSEN N,HORSMAN H P,HUINEN R G,et al. *Acinetobacter calcoaceticus* genes involved in biosynthesis of the coenzyme pyrrolo-quinoline-quinone:nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* K-12[J]. **Journal of Bacteriology**,1989,171(1):447-455.

[20] MAGNUSSON,TOYAMA H,SAEKI M,et al. Quinone biogenesis:Structure and mechanism of PqqC,the final catalyst in the production of pyrroloquinoline quinone[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**,2004,101(21):7913-7918.

[21] FELDER M,GUPTA A,VERMA V,et al. The pyrroloquinoline quinone synthesis genes of *Gluconobacter oxydans*[J]. **FEMS Microbiology Letters**,2000,193(2):231-236.

[22] HOLSCHER T,GORISCH H. Knockout and overexpression of pyrroloquinoline quinone biosynthetic genes in *Gluconobacter oxydans* 621H[J]. **Journal of Bacteriology**,2006,188(21):7668-7676.

[23] CHOI O,KIM J,KIM J G,et al. Pyrroloquinoline quinone is a plant growth promotion factor produced by *Pseudomonas fluorescens* B16[J]. **Plant Physiology**,2008,146(2):657-668.

[24] SCHNIDER U,KEEL C,VOISARD C,et al. Tn5-directed cloning of *pqq* genes from *Pseudomonas fluorescens* CHA0:mutational inactivation of the genes results in overproduction of the antibiotic pyoluteorin[J]. **Applied and Environmental Microbiology**,1995,61(11):3856-3864.

[25] VELTEROP J S,SELLINK E,MEULENBERG J J,et al. Synthesis of pyrroloquinoline quinone in vivo and in vitro and detection of an intermediate in the biosynthetic pathway[J]. **Journal of Bacteriology**,1995,177(17):5088-5098.

[26] 张慧敏,李剑芳,邬敏辰. 圆弧青霉脂肪酶基因序列的生物信息学分析[J]. 食品与生物技术学报,2010,29(4):602-608.

[27] TOYAMA H,LIDSTROM M E. *pqqA* is not required for biosynthesis of pyrroloquinoline quinone in *Methylobacterium extorquens* AM1[J]. **Microbiology**,1998,144(1):183-191.

[28] GOOSEN N,HORSMAN H P,HUINEN R G,et al. Genes involved in the biosynthesis of PQQ from *Acinetobacter calcoaceticus* [J]. **Antonie van Leeuwenhoek**,1989,56(1):85-91.

[29] BONNOT F,IAVARONE A T,KLINMAN J P. Multistep,eight-electron oxidation catalyzed by the cofactorless oxidase,PqqC:identification of chemical intermediates and their dependence on molecular oxygen[J]. **Biochemistry**,2013,52(27):4667-4675.

[30] TOYAMA H,NISHIBAYASHI E,SAEKI M,et al. Factors required for the catalytic reaction of PqqC/D which produces pyrroloquinoline quinone[J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**,2007,354(1):290-295.

[31] SOFIA H J,CHEN G,HETZLER B G,et al. Radical SAM,a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms:functional characterization using new analysis and information visualization methods[J]. **Nucleic Acids Research**,2001,29(5):1097-1106.

[32] GAJIWALA K S,BURLEY S K. Winged helix proteins[J]. **Current Opinion in Structural Biology**,2000,10(1):110-116.

[33] TYRRELL R,VERSCHUEREN K H,DODSON E J,et al. The structure of the cofactor-binding fragment of the LysR family member,CysB:a familiar fold with a surprising subunit arrangement[J]. **Structure**,1997,5(8):1017-1032.

科　技　信　息

欧盟评估一种环糊精葡萄糖基转移酶的安全性

2020 年 5 月 15 日,欧盟食品安全局就一种环糊精葡萄糖基转移酶(Cyclomaltodextrin Glucanotransferase)的安全性评价发布意见。

该食品酶是 Hayashibara Co., Ltd.用伊利诺伊类芽孢杆菌(Paenibacillusillinoisensis)菌株 107 生产的。旨在用于生产海藻糖的淀粉加工中。经过评估,欧盟食品安全局专家组得出结论,这种食品酶在预期使用条件下不会引起安全问题。

[信息来源] 食品伙伴网. 欧盟评估一种环糊精葡萄糖基转移酶的安全性 [EB/OL]. (2020-05-19).http://news.foodmate.net/2020/05/560415.html