大肠杆菌中吡咯喹啉醌合成途径的构建

杨蒙雅， 张春月， 伊进行， 王怡明， 卓明洋， 马 倩*， 谢希贤
（天津科技大学 生物工程学院，天津 300457）

摘要： 目前吡咯喹啉醌（Pyrroloquinoline quinone，PQQ）在大肠杆菌中的异源合成主要以质粒为表达载体进行，但是质粒载体难以进行合成途径多基因表达的系统优化，并且容易造成发酵不稳定。作者以大肠杆菌为底盘生物，利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术，在基因组水平系统优化 PQQ 的合成。将来源于 *Gluconobacter oxydans* 621H 的操纵子 *pqqABCDE* 引入底盘大肠杆菌，并进一步通过优化合成途径基因表达强度，敲除大肠杆菌自身抑制基因及强化 PQQ 的胞内需求与胞外转运等，获得了一株能够高效合成 PQQ 的工程菌，摇瓶发酵 72 h 时产量达到 86.3 mg/L。以大肠杆菌为底盘构建 PQQ 高效合成途径的工作能够为后续以其他底盘生物生产 PQQ 及相关代谢产物提供借鉴。

关键词： 大肠杆菌；吡咯喹啉醌；基因编辑；CRISPR/Cas9
中图分类号：Q 815　**文章编号：**1673-1689(2022)08-0075-11　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2022.08.008

Construction of Pyrroloquinoline Quinone Synthesis Pathway in *Escherichia coli*

YANG Mengya， *ZHANG Chunyue*， *YI Jinhang*， *WANG Yiming*，
ZHUO Mingyang， *MA Qian**， *XIE Xixian*
（College of Biotechnology，Tianjin University of Science & Technology，Tianjin 300457，China）

Abstract： Currently, the heterologous synthesis of pyrroloquinoline quinone (PQQ) in *Escherichia coli* is mainly achieved via plasmid vector, which is difficult to systematically optimize the synthesis pathway of multiple gene expression, and easy to cause fermentation instability. In this study, *E. coli* was used as the chassis organism to systematically optimize the PQQ synthesis at the genome-scale using CRISPR/Cas9 gene editing technology. The operon *pqqABCDE* from *Gluconobacter oxydans* 621H was introduced into the chassis *E. coli*. An engineered strain for highly-efficient synthesis of PQQ was obtained by further optimizing the gene expression strength in the synthesis pathway, knocking out the native inhibitor gene in *E. coli*, and enhancing the intracellular demand and extracellular transport of PQQ. A total of 86.3 mg/L PQQ was produced after 72 h fermentation in shake-flask. In this study, the construction of efficient PQQ synthesis pathway in the chassis *E. coli* could provide a reference for future production of PQQ or related metabolites in other chassis.

Keywords: *Escherichia coli*, pyrroloquinoline quinone, gene editing, CRISPR/Cas9

收稿日期： 2022-03-03
基金项目： 国家自然科学基金青年基金项目(21808168)。
* **通信作者：** 马 倩(1987—)，女，博士，副教授，硕士研究生导师，主要从事大肠杆菌代谢工程方面的研究。E-mail：qianma1987@tust.edu.cn

吡咯喹啉醌（Pyrroloquinoline quinone，PQQ），4,5-二羰基-1-吡咯-2,3-f-喹啉-2,7,9-三羧酸，具有抗氧化[1]、维持线粒体功能[2]、介导电子传递等作用，在食品、农业[3]、医疗保健[4]、经济动物养殖[5-6]、传感器制造[7-8]等行业应用广泛，市场前景广阔。目前，PQQ 的生产方法主要为化学合成法、提取法和生物发酵法。早在 1993 年，Martin 等人[9]就已经能够通过 9 步反应将 PQQ 的产量提升至千克。目前 PQQ 的生产仍主要依靠化学法合成，但是利用化学法合成 PQQ 存在步骤多、得率低[10]、对环境污染较大、反应能耗大等问题；提取法主要是从天然产物中提取，但是天然产品中 PQQ 含量极低，一般在 ng/g 或 ng/mL 的范围内[11]，且成本较高、利润较低。虽然目前有少量以纳豆为原料经提取法生产的 PQQ，但是相关文献报道较少；目前生物发酵法在一些高附加值产品的生产中已经有了成功应用。发酵法合成 PQQ 能够减少对环境的污染，具有生产过程安全、能耗低、利润大的优势，更加符合产业发展前景。

PQQ 生产菌株主要是一些革兰氏阴性菌。其生物合成过程主要由 *pqq* 基因簇编码的多个蛋白质催化，不同来源的 *pqq* 基因簇存在一些差异，如肺炎克雷伯氏菌[12]（*Klebsiella pneumoniae*）含有一个单独的 *pqqABCDEF* 基因簇，而氧化葡萄糖酸杆菌[13]（*Gluconobacter oxydans*）和醋酸钙不动杆菌[14]（*Acinetobacter calcoaceticus*）均含有一个单独的 *pqqABCDE* 基因簇，但是还有一些菌株的 PQQ 合成较为复杂，如 *Methylovorus* sp. MP688[15]，除了含有一个单独的 *pqqABCDE* 和 *pqqFG* 基因簇外，还含有 4 个单独的 *pqqA* 基因；*Hyphomicrobium denitrificans* FJNU-R8[16]含有 3 个独立的 *pqqA* 基因，一个 *pqqADE* 基因簇和一个 *pqqABCDE* 基因簇。目前研究的比较多的是氧化葡萄糖酸杆菌，相较其他来源的 *pqq* 基因，除 *pqqA* 与 *pqqB* 之间有一个较短的保守序列外，其余的 *pqqB*、*pqqC*、*pqqD*、*pqqE* 之间紧密相连，代谢途径清晰，便于研究。在 *G. oxydans* 中，*pqqA* 的作用在于生成一段含有 Glu 和 Tyr 的多肽，PqqD 则是作为分子伴侣与 PqqA 形成一定的空间结构，保障 PqqA 能够在 PqqE 的作用下完成谷氨酸和酪氨酸残基的连接，PqqC 进行 PQQ 合成最后一步的催化作用，PqqB 则与 PQQ 中间产物在细胞周质空间当中的转运有关[17]。除 *pqqABCDE* 基因簇外，氧化葡糖酸杆菌中的 *tldD* 基因也与 PQQ 生物合成有关，可能与其他 PQQ 合成细菌中的 *pqqF* 基因具有类似的功能[18]。

PQQ 天然生产菌株都能够产生利用 PQQ 的蛋白质，与这些菌株类似，大肠杆菌本身含有的 *D*-葡萄糖脱氢酶（GDH）也以 PQQ 为辅酶，在合成全酶之后能够氧化葡萄糖为葡萄糖酸，由于大肠杆菌自身缺少 PQQ 合成通路[19]，只能依靠摄取外源 PQQ 使醌蛋白表达功能[20]，但是在外源引入 *pqq* 基因簇后能够合成 PQQ[21]，这使得工程化大肠杆菌高产 PQQ 成为可能。

如表 1 所示，目前 PQQ 高产菌株的选育主要集中在菌种筛选和分子改造两个方向，其中诱变筛选[22]、定向进化[23]的效果相比基因改造更加明显，但是定点筛选、定向进化存在周期长、工作量大、遗传背景不清晰、筛选难度大、后续改造困难等一系列问题；以模式微生物为底盘进行分子改造具有周期短、遗传背景清晰、能够精准改造的优点，其中以大肠杆菌为底盘生物进行改造不仅在代谢合成内源性化合物领域具有强大的工业潜力，其在重构异源合成途径代谢生产化学品领域也具有极大的应用前景。

表 1 总结了部分前人的研究结果，目前对于 *pqq* 基因簇的过表达实验研究较少，形式单一，一般是以质粒为表达载体进行单个基因的过表达，虽然改造周期短，效果明显，但是质粒和基因组上过表达的结果有一定差异。除此之外，虽然此前的研究从不同的角度进行了尝试，但是在大肠杆菌中异源表达 *pqq* 基因簇还没有系统的研究。作者利用 CRISPR/Cas9 技术将 *G. oxydans* 621H 来源的 *pqqABCDE* 基因簇以及相关的基因在大肠杆菌基因组上进行构建与优化，构建的菌株 72 h 摇瓶发酵最高产量达到 86.3 mg/L，是目前以大肠杆菌为底盘生物进行基因组编辑生产 PQQ 的最高产量。已报道的以大肠杆菌为底盘生物进行改造的 PQQ 工程菌最高产量为王朝绚[24]构建的以质粒为载体的 PQQ 生产菌，产量达到 119.8 mg/L。与其相比，本研究的基因组改造表达更稳定，能够为后续以大肠杆菌为底盘生物改造生产 PQQ 及相关代谢产物提供思路。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

本研究所用的菌株与质粒信息见表 2，基因克隆与基因组编辑所用的引物信息见表 3，利用 *E. coli*

表 1　不同微生物中 PQQ 提升策略及产量

Table 1　Strategies and yields of PQQ production improvement in different microorganisms

菌株	PQQ 产量提升策略	产量/(mg/L)	参考文献
Hyphomicrobium denitrificans	紫外线诱变筛选,高浓度甲醇定向进化	158.53	[25]
Hyphomicrobium denitrificans	UV 和 NTG 诱变,高浓度甲醇定向进化	1 087	[23]
Methylobacterium sp.	随机诱变	19.33	[26]
Methylovorus sp. MP688	筛选菌株,优化培养条件和培养基	2 000	[15-27]
Pseudomonas 0813	优化培养条件和培养基	695	[28]
G. oxydans	质粒过表达,*G. oxydans* 621H(pBBR1MCS-5- *pqqABCDE)*	1.5	[18]
E. coli	质粒过表达,*E. coli* BL21(PET-28a-*pqq*,*pqq* 基因簇来源为 *G. oxydans* 621H)	2.0	[29]
K. pneumoniae	利用双质粒系统分别表达信号肽 *pelb* 和脱辅基蛋白 sGDH 以及表达 dCas9 蛋白干扰 PTS	7.3	[30]
G. oxydans	切除乙酸代谢路径，以内源启动子 P0169 融合表达 *pqqABCDE* 基因簇及 *tlDd*	3.058	[31]
E. coli	质粒过表达,*E. coli* BL21(PET-PKAN-PQQ)	约 2.0	[32]
K. pneumoniae	质粒过表达,*K. pneumoniae* DSM2026(PET-PKAN-PQQ)	约 5.6	[32]
E. coli	质粒过表达,*E. coli* BL21(PET-28a-*pelb-pqq*,*pqq* 基因簇来源于 *K. pneumoniae*)	40.7	[24]
E. coli	质粒过表达,*E. coli* BL21(PET-28a-*pqq*,PET-22b-*gcd*)	119.8	[24]
K. pneumoniae	质粒过表达,*K. pneumoniae*(PET-kan-*pqq*,PET-kan-*phoE-Cm*)	224.8	[24]
Methylovorus sp.	优化谷氨酸、谷氨酰胺和脯氨酸添加量,过表达 *glyA* 与 *hps1* 以及 *Δhps2* 基因,对 *Δhps2* 发酵罐培养	812.64	[33]

DH5α 进行常规的基因克隆工作。以作者所在实验室构建的 *E. coli* W3110、Δ*lacIZ*::P_{xylF}-T7RNAP、*mlc*::*mlc** 即 PQQ-0 菌株为出发菌株;限制性内切酶、STAR HS DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶:均购自 TaKaRa;引物、*G. oxydans* 621H 来源的 *pqq* 基因簇及 *tlDd* 基因:均由苏州金唯智科技有限公司合成;PQQ 标品:购自大连美仑生物技术有限公司;KOH 和 NBT(氯化硝基四氮唑蓝):购自 aladdin。

表 2　菌株信息

Table 2　Strains used in this study

菌株	特征	来源
E. coli DH5α	克隆宿主	作者所在实验室
E. coli W3110	野生型出发菌	作者所在实验室
E. coli PQQ-0	*E. coli* W3110, Δ*lacIZ*::P_{xylF}-T7RNAP, *mlc*::*mlc**	作者所在实验室
E. coli PQQ-1	*E. coli* PQQ-0, *mbha*::PT7-*pqqA*, *ygay*:: PT7-*pqqBCDE*	本研究
E. coli PQQ-2	*E. coli* PQQ-1, *yjgx*:: PT7-*pqqA*	本研究
E. coli PQQ-3	*E. coli* PQQ-2, *yeep*::Ptrc-*pqqB*	本研究
E. coli PQQ-4	*E. coli* PQQ-2, *yeep*:: PT7-*pqqB*	本研究
E. coli PQQ-5	*E. coli* PQQ-3,*rph*::P_{trc}-*pqqC*	本研究
E. coli PQQ-6	*E. coli* PQQ-3,*rph*:: P_{trc}-*pqqD*	本研究
E. coli PQQ-7	*E. coli* PQQ-3,*rph*:: P_{trc}-*pqqE*	本研究
E. coli PQQ-8	*E. coli* PQQ-5,*ilvG*:: P_{trc}-*pqqC*	本研究
E. coli PQQ-9	*E. coli* PQQ-6, *ilvG*:: P_{trc}-*pqqD*	本研究
E. coli PQQ-10	*E. coli* PQQ-7, *ilvG*::P_{trc}-*pqqE*	本研究
E. coli PQQ-11	*E. coli* PQQ-7, *yjiT*::P_{trc}-E-*tlDd*	本研究
E. coli PQQ-12	*E. coli* PQQ-7, *yjiT*::P_{trc}-G-*tlDd*	本研究

续表 2

菌株	特征	来源
E. coli PQQ-13	*E. coli* PQQ-11, *yeeI*::P_{trc}-E-*tIDd*	本研究
E. coli PQQ-14	*E. coli* PQQ-12, *yeeI*::P_{trc}-G-*tIDd*	本研究
E. coli PQQ-15	*E. coli* PQQ-11, Δ*iscR*	本研究
E. coli PQQ-16	*E. coli* PQQ-15, *yghE*::P_{trc}-*gcd*	本研究
E. coli PQQ-17	*E. coli*PQQ-16, *ilvG*::P_{trc}-*ompA*	本研究
质粒		
pREDCas9	Spe^R, Cas9 and λ-Red recombinase expression vector	天津大学[34]
pGRB	Amp^R, gRNA expression vector	天津大学[34]

表 3 本研究所用引物

Table 3 Primers used in this study

引物名称	引物序列(5′-3′)	长度/ bp
pqqA-P_{T7}-UF	TAGGGTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGCCTGGAATACCCCG	64
pqqA-P_{T7}-DR	AGACCCGTTTAGAGGCCCCAAGGGGTTATGCTAGTTATTTTTTTTCGCCGCAAAC	55
pqqB-P_{T7}-UF	TAGGGTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGATTGATGTCATCGTGCTTG	68
pqqB-P_{T7}-DR	AGACCCGTTTAGAGGCCCCAAGGGGTTATGCTAGTCATGGTGTGTCCAGTCTGAAA	56
pqqB-P_{trc}-UF	TCCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGACCATGATTGATGTCATCGTGCTTG	82
pqqB-P_{trc}-DR	CACCGACAAACAACAGATAAAACGAAAGGCCCAGTCTTTCGACTGAGCCTTTCGTTTTATTTGTCATGGTGTGTCCAGTCTGAAA	85
pqqC-P_{trc}-UF	TCCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGACCATGACGCTCCTCACACCTGAC	81
p*pqqC*-P_{trc}-DR	CACCGACAAACAACAGATAAAACGAAAGGCCCAGTCTTTCGACTGAGCCTTTCGTTTTATTTGTCATGGAACGAAAGCCCC	81
pqqD-P_{trc}-UF	TCCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGACCATGACGGAGGCCCCGC	76
pqqD-P_{trc}-DR	CACCGACAAACAACAGATAAAACGAAAGGCCCAGTCTTTCGACTGAGCCTTTCGTTTTATTTGTCATGTGTGCAGGACGTTCTTT	85
pqqE-P_{trc}-UF	TCCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGACCATGACACTCCCTTCGCCG	78
pqqE-P_{trc}-DR	CACCGACAAACAACAGATAAAACGAAAGGCCCAGTCTTTCGACTGAGCCTTTCGTTTTATTTGTTACGTATAACGCCTGTAGAACAAC	88
E-*tIDd*-P_{trc}-UF	TCCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGACCATGAGTCTTAACCTGGTAAGTGAACAA	87
E-*tIDd*-P_{trc}-DR	CACCGACAAACAACAGATAAAACGAAAGGCCCAGTCTTTCGACTGAGCCTTTCGTTTTATTTGTTACGCAGTACCGCCAACAG	83
G-*tIDd*-P_{trc}-UF	TCCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGACCATGAGCGTGGCGGCG	75
G-*tIDd*-P_{trc}-DR	CACCGACAAACAACAGATAAAACGAAAGGCCCAGTCTTTCGACTGAGCCTTTCGTTTTATTTGTTACGCGGTGCCGCC	78
Δ*iscR*-UF	CAGCAGAATAAAGGTAACAAGGC	23
Δ*iscR*-UR	ACTTCCTGGTTATTAACCAGTTCGCCTAAAGTAATGTTGTTGCGTCAAGCATTGCGGTCA	60
Δ*iscR*-DF	TAAAGGGCGCTATGCCGTGACCGCAATGCTTGACGCAACAACATTACTTTAGGCGAACTG	60
Δ*iscR*-DR	CCGTCCATCGTCATAAACTGC	21
gcd-P_{trc}-UF	TCCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGACCATGGCAATTAACAATACAGGCTC	83
gcd-P_{trc}-DR	CACCGACAAACAACAGATAAAACGAAAGGCCCAGTCTTTCGACTGAGCCTTTCGTTTTATTTGTTACTTCACATCATCCGGCAG	84

续表 3

引物名称	引物序列(5′–3′)	长度/ bp
ompA–P_{trc}–UF	TCCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGACCATGAAAAAGACAGCTATCGCGAT	83
ompA–P_{trc}–UF	CACCGACAAACAACAGATAAAACGAAAGGCCCAGTCTTTCGACTGAGCCTTTCGTTTTATTTGTTAAGCCTGCGGCTGAGTTAC	84
mbha–UF	GCCAGCACGAACATAATCCC[35]	20
mbha–P_{T7}–UR	TAAAGTTAAACAAAATTATTTCTAGACCCTATAGTGAGTCGTATTACACGGTGGCAGGTTTTGG[35]	64
mbha–P_{T7}–DF	TGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGGACCAAAAGTGCGTCCGATAC[35]	55
mbha–DR	CGGCGTAATCACAAACTGGC[35]	20
ygay–UF	CCTACAAACCACATCGCACATT[36]	22
ygay–P_{T7}–UR	TAAAGTTAAACAAAATTATTTCTAGACCCTATAGTGAGTCGTATTAACACCGAAGCAACCCAAAAG	66
ygay–P_{T7}–DF	TGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGTTGCTTGCCGCTCCACC	51
ygay–DR	GGAGTAGGGCTTTCCATAGAGTGT	24
yjgx–UF	GGAAGTCAACGGGTTATGCG	20
yjgx–P_{T7}–UR	TAAAGTTAAACAAAATTATTTCTAGACCCTATAGTGAGTCGTATTAAAAATCACCACGAATACCAGAATC[36]	70
yjgx–P_{T7}–DF	TGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGACAGTGTCTTCCCTGAGCCG	54
yjgx–DR	GGCGAAGGATACCATCAAGC	20
yeep–UF	GGTCAGGAGGTAACTTATCAGCG[35]	23
yeep–P_{T7}–UR	TAAAGTTAAACAAAATTATTTCTAGACCCTATAGTGAGTCGTATTAATGGCAGGGCTCCGTTTT[35]	64
yeep–P_{T7}–DF	CTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTGAACTGGATTTTCTTCTGAACCTGT	59
yeep–DR	ACGATGTCAGCAGCCAGCA	19
yeep–P_{trc}–UR	AATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACATTATACGAGCCGGATGATTAATTGTCAAATGGCAGGGCTCCGTTTT[35]	74
yeep–P_{trc}–DF	AAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATGAACTGGATTTTCTTCTGAACCTGT[35]	88
ilvG–UF	ACCGAGGAGCAGACAATGAATAA[35]	23
ilvG–P_{trc}–UR	AATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACATTATACGAGCCGGATGATTAATTGTCAAGGTGATGGCAACAACAGGGATGGA[35]	80
ilvG–P_{trc}–DF	AAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCTATCTACGCGCCGTTGTTGT[35]	84
ilvG–P_{trc}–DR	GCGCTGGCTAACATGAGGAA[35]	20
yjit–UF	CGGGTTACGCAGGGAGG[37]	17
yjit–P_{trc}–UR	AATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACATTATACGAGCCGGATGATTAATTGTCAAAAAACAGGCAGCAAAGTCCC[37]	76
yjit–P_{trc}–DF	AAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATAAGCACTACCTGTGAAGGGATGT[37]	86
yjit–P_{trc}–DR	CTGCTCACGGGCTTGCTT[37]	18
yghe–P_{trc}–UF	GTCAGGCACTGGCGAAAGAT[37]	20
yghe–P_{trc}–UR	AATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACATTATACGAGCCGGATGATTAATTGTCAACGCAAGCCATAAACCCACA[37]	75
yghe–P_{trc}–DF	CTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATTTCCGACATCGAAATGCGT	77
yghe–P_{trc}–DR	AGGCGTTGTTGTGGCAGATT	20
rph–UF	ATAGCGCAGGGTACATTCCACT[35]	22
rph–P_{trc}–UR	AATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACATTATACGAGCCGGATGATTAATTGTCAACCTTCTTCAATAGAGGCGGTACA[35]	79

续表 3

引物名称	引物序列(5′–3′)	长度/ bp
rph–P_{trc}–DF	AAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATTGCCGCAGAGACCGACAT[35]	81
rph–DR	ACAGCGGTTGTGGTGGCA[35]	18
yeeI–UF	GGCGGTGATGCCATAGAGTAA	21
yeeI–P_{trc}–UR	AATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACATTATACGAGCCGGATGATTAATTGTCAACGCCCGAATAACAGGAAAGA[37]	76
yeeI–P_{trc}–DF	AAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATACCCAAAGGTGAAGATAAAGCC[38]	85
yeeI–DR	CATTCCCTCTACAGAACTAGCCCT[38]	24

1.2 大肠杆菌 CRISPR/Cas9 基因编辑

1.2.1 重组 DNA 片段构建 根据已知的目的基因序列，利用 Primer Primier 5 进行引物设计，通过 PCR 获得目的基因片段。在待敲除或待整合位点分别设计引物，通过 PCR 扩增 500 bp 左右的上下游同源臂。进行基因整合时，对上游同源臂、目的基因、下游同源臂进行重叠 PCR，获得一段完整的重组 DNA 片段。进行基因敲除时，对上游同源臂和下游同源臂进行重叠 PCR。

1.2.2 pGRB 质粒的构建 利用 CRISPR RGEN Tools (http://www.rgenome.net/cas-designer/) 选择待整合/敲除位点附近的 PAM 序列(5′–NGG–3′)，并通过合成线性化引物将相应的 20 bp 的 gRNA 序列引入单链 DNA 中，之后通过 PCR 退火形成双链片段。将双链片段与线性化 pGRB 载体按照同源重组连接反应体系（4 μL 5×CE Ⅱ Buffer，50~200 ng pGRB 载体，50~200 ng 双链目的片段，2 μL Exnase® Ⅱ 重组酶，20 μL ddH_2O），化学法转化至 *E. coli* DH5α 感受态中，筛选阳性克隆并提取质粒。

1.2.3 基因整合与敲除过程 根据文献[34]报道的 CRISPR/Cas9 基因编辑技术进行 *E. coli* 基因组 DNA 的整合和敲除。操作体系由目标重组 DNA 片段、提供 gRNA 片段的 pGRB 质粒和提供 Cas9 蛋白及 RED 重组酶的 pREDCas9 质粒构成。具体方法为：先将 pREDCas9 质粒转化至待改造的 *E. coli* 感受态细胞中，然后将上述重组 pGRB 质粒和重组 DNA 片段电转至含有 pREDCas9 质粒的感受态细胞中，电转后加入 SOC 复苏液于 32 ℃培养 2 h，取 100 μL 菌液涂布于 AmpR 和 SpeR 抗性的培养皿，32 ℃培养，筛选阳性克隆。将筛选到的阳性菌株在含 0.2 g/dL 阿拉伯糖的 LB 培养基中培养，诱导 pREDCas9 中的 pGRB 消除系统，对 pGRB 质粒进行消除，筛选在奇霉素抗性平板生长但在氨苄霉素抗性平板不生长的阳性克隆，即为丢失了 pGRB 质粒的克隆。利用 pREDCas9 的温敏特性，可以在 42 ℃培养过夜消除，筛选在无抗平板生长而在 SpeR 平板不生长的单克隆菌株，即为相应改造的无质粒工程菌株[34]。

1.3 摇瓶发酵

首先在 5 mL LB 液体培养基（蛋白胨 10 g/L，NaCl 10 g/L，酵母粉 5 g/L）中进行菌种活化，其次在固体斜面培养基（蛋白胨 10 g/L，酵母粉 5 g/L，NaCl 10 g/L，牛肉膏 10 g/L，蔗糖 1 g/L，琼脂粉 20 g/L）进行菌种二代活化，置于 37 ℃培养箱中培养 12 h 后转移至新的固体斜面进一步培养 12 h。用接种环刮取菌体，接种于 500 mL 三角瓶中（含有 30 mL 培养基），用九层纱布封口，在 37 ℃、220 r/min 条件下培养 10~12 h 至 OD_{600} 为 8.0 左右。种子培养基成分为：葡萄糖 20 g/L，蛋白胨 10 g/L，NaCl 10 g/L，酵母粉 5 g/L，体积分数 2%苯酚红溶液，消泡剂 1 滴，pH 7.0~7.2。

将培养好的种子培养液按照 10%的接种体积分数接种于 30 mL 发酵培养基，在 37 ℃、220 r/min 条件下培养至发酵结束。发酵培养基成分为：葡萄糖 20 g/L，$Na_2HPO_4·12H_2O$ 17.12 g/L，KH_2PO_4 3 g/L，NaCl 0.5 g/L，NH_4Cl 1 g/L，$CaCl_2$ $6H_2O$ 0.219 g/L，$MgSO_4·7H_2O$ 0.492 g/L，木糖 10 g/L，2%苯酚红溶液，pH 7.0，消泡剂 1 滴。在发酵过程中，根据苯酚红指示剂的颜色变化，及时以氨水调整 pH 至 7.0 左右，以 60 g/dL 的葡萄糖溶液补充碳源。

1.4 PQQ 检测方法

1.4.1 几种检测方法的比较 目前检测 PQQ 的方法有高效液相色谱法、液质联用法、酶法检测、质谱检测、非酶法检测等。PQQ 极易溶于水，且携带 3 个羧基，显酸性，液相检测法在 15.625~500 mg/L 范围

内线性关系良好,但是检测时易拖尾且峰宽,导致检测结果不准确[39-40]。比高效液相色谱法更精确的检测方法如液质联用[41]等检测限也都远高于实际产量,且检测前需要对发酵液进行预处理,由于在预处理过程中可能导致一部分 PQQ 损失,造成结果不准确。酶法检测比较灵敏,能够检测到 20×10^{-12} g 的 PQQ[42],但是由于 PQQ 易与亲核的氨基酸和蛋白质反应[43],因此目前在大肠杆菌中构建 PQQ 代谢通路选择的培养基均为细菌基本培养基,该培养基中仅有的碳源为葡萄糖,而发酵液中含有 Mg^{2+}、Ca^{2+},酶法检测的原理是预先混合 PQQ 和纯化后的 *D*-GDH(或粗酶液)反应一段时间后形成有活性的 *D*-GDH,随后加入反应液[44](含 DCIP、PMS、葡萄糖、$MgSO_4$ 的混合溶液),形成了氧化还原反应完整的反应链,通过计算 DCIP 的褪色速率与标准品比较可以计算得到发酵液中 PQQ 的浓度。但是发酵液中浓度不等的残留葡萄糖会对检测结果产生较大的影响,尤其对于补料分批培养。非酶法检测 PQQ[45]应用广泛,主要利用 PQQ 在碱性条件下氧化甘氨酸,将电子传递给 NBT,使得 NBT 生成蓝紫色的甲臜类化合物,该物质在 OD_{530} 有最大吸光度,非酶法检测不仅能够同时处理多个样品,检测限可以低至 3.906 ng/mL,而且发酵液中的残糖对其无影响[24,28,32-51]。基于以上比较,本实验选择的检测方法为非酶法。

1.4.2 PQQ 的非酶法检测　将待测样品于 13 000 r/min 离心 3 min,取上清液。依次在 96 孔板中加入 180 μL Gly-KOH 溶液(2 mol/L Glycine,用 KOH 将 pH 调至 10),80 μL PB 溶液($NaH_2PO_4\cdot2H_2O$ 1.911 g/L,$Na_2HPO_4\cdot12H_2O$ 2.776 g/L),20 μL 样品,20 μL NBT 母液(NBT 固体 2.943 g/L,用 20 mmoL PB 溶液溶解,现配现用),混匀后于 30 ℃避光孵育 1 h,用酶标仪检测 OD_{530} 条件下的吸光度。

1.5 菌体量的计算

使用分光光度计测量菌液稀释后的 OD_{600},并且对烘干后的菌体进行称重,得到细胞干质量与 OD_{600} 之间的对应关系。

DCW(g/L)=0.382×OD_{600}×稀释倍数。

2 结果与讨论

2.1 过表达 *pqqA* 和 *pqqB* 对 PQQ 产量及生物量的影响

在 PQQ 的合成中,PqqA 作为其前体物质,在分子伴侣 PqqD 的保护下经过 PqqE 的作用完成谷氨酸和酪氨酸残基的连接,PqqB 负责中间产物在周质空间当中的转运,PqqC 负责合成最后的催化,TlDd 可能起到切割作用。PqqA 作为前体物提升其表达量能够促进 PQQ 的产生。以作者所在实验室构建的 *E. coli* W3110,Δ*lacIZ*::P_{xylF}-T7RNAP,*mlc*::*mlc** 即 PQQ-0 为出发菌,该菌株基因组上已经整合了 T7RNA 聚合酶,可以通过添加木糖控制 T7RNA 聚合酶的表达。由于基因距离启动子的位置不同会导致表达量不同,柯崇榕等[16]以双质粒系统分别过表达了脱氮生丝微菌来源的 *pqqA* 和 *pqqBCDEF*,与单质粒系统相比,产量有所提升。杨雪鹏等[29]比较了 *G. oxydans* 621H 来源的 *pqq* 基因簇在不同质粒中的表达情况,发现以 PET-28a 为表达载体产量最高,能够达到约 2 mg/L,说明 PT7 启动子也适合于 PQQ 的合成。因此,在 PQQ-0 的基础上,我们在 *mbha* 和 *ygay* 这两个假基因位点以 PT7 为启动子整合了 *pqqA* 和 *pqqBCDE* 基因簇,打通了 PQQ 合成通路,构建了 PQQ-1 菌株。

G. oxydans 621H 中 *pqqABCDE* 共用一个启动子,Li 等[46]的研究表明,*pqqA* 的表达强度远高于其余几个 *pqq* 基因,这也符合 PqqA 作为 PQQ 合成前体物的特征。李盼盼[47]的研究也表明,外源添加 PqqA 就能够提升 PQQ 产量。PQQ 的结构中有谷氨酸和酪氨酸,虽然谷氨酸和酪氨酸不是其直接的前体物,但已有实验证明了外源添加谷氨酸和酪氨酸能够提升 PQQ 的产量[31-32]。增强 *pqqA* 的表达可以为 PQQ 的合成提供直接前体物,因此,本研究在菌株 PQQ-1 中利用 PT7 启动子强化了 *pqqA* 的表达,得到了 PQQ-2 菌株,摇瓶发酵 72 h 的结果见图 1。PQQ-1 产量为 62.6 mg/L,强化了 PqqA 合成的 PQQ-2 菌株产量为 67.8 mg/L,较 PQQ-1 提升 8.3%,且生物量提升 4.3%。可见,强化 *pqqA* 的表达对 PQQ 的合成与菌体生长均有促进作用。

在 PQQ-2 的基础上,进一步强化 *pqqB* 的表达,分别以 Ptrc 和 PT7 为启动子,在 PQQ-2 中同一假基因位点过表达了 *pqqB*,构建了菌株 PQQ-3 和 PQQ-4。PQQ-3 菌株与 PQQ-4 菌株 72 h PQQ 产量较 PQQ-2 均上升,产量分别为 68.8 mg/L 和 82.3 mg/L。从生物量的角度考虑,PQQ-3 的生物量较 PQQ-2 下降了 3.6%,下降的幅度较小,而 PQQ-4 的生物量较 PQQ-2 下降了 9.3%,也低于 PQQ-1 的

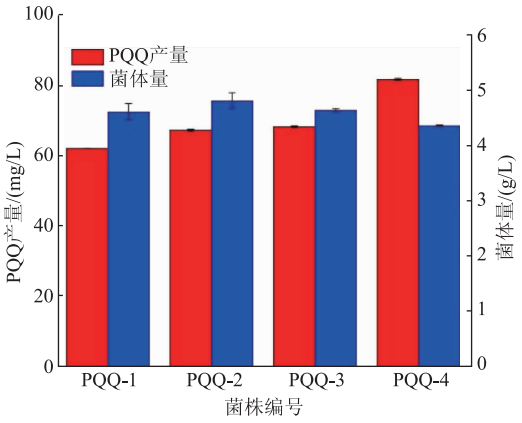


图 1　过表达 *pqqA* 和 *pqqB* 对 PQQ 合成及菌体量的影响

Fig. 1　Effects of over-expression of *pqqA* and *pqqB* on PQQ synthesis and biomass

菌体量。PQQ-4 在摇管活化培养中也出现了菌体早衰的现象,结合后续改造的需要考虑,我们选择了 PQQ-3 作为下一步改造的出发菌。PQQ-3 和 PQQ-4 的产量和菌体量的差异可能是由于 PT7 的启动强度较 Ptrc 更强,PQQ-4 在表达更多 PqqB 蛋白的同时对菌体的生长影响更大。Wang 等[48]在 *G.oxydans* WSH003 中以 *pqqA* 的启动子和 *tufB* 启动子分别过表达 *pqq* 单个基因时也印证了强启动子能够更大程度促进 PQQ 的生产。

2.2　过表达 *pqqC*、*pqqD* 及 *pqqE* 对 PQQ 产量及菌体量的影响

选择筛选出的 PQQ-3 作为出发菌,探索过表达 *pqqC*、*pqqD*、*pqqE* 对产量提升以及对菌体生长的影响。由于 P_{T7} 启动子过强,在 PQQ-4 的培养和发酵过程中发现对菌体生长影响较大,因此后续改造均选择 P_{trc} 启动子进行相关基因表达控制。分别在 PQQ-3 菌株中引入 P_{trc} 控制的 *pqqC*、*pqqD*、*pqqE* 基因,得到 PQQ-5、PQQ-6、PQQ-7 菌株;在 PQQ-5 菌株中引入 P_{trc} 控制的 *pqqC*,构建了 PQQ-8;在 PQQ-6 中引入 P_{trc} 控制的 *pqqD*,得到 PQQ-9;在 PQQ-7 中引入 P_{trc} 控制的 *pqqE*,得到 PQQ-10,发酵结果见图 2。改造后只有 PQQ-7 产量较 PQQ-3 有所上升,72 h 产量能够达到 74.8 mg/L,较改造前上升了 8.7%,其余的菌株 PQQ 产量在改造后均出现了下降。

本研究的结果表明,*pqqA*、*pqqB* 和 *pqqE* 在大肠杆菌基因组上的过表达对 PQQ 产量的提升有正向作用,且在 *pqqA* 的过表达中强启动子 P_{T7} 的效果优于 P_{trc}。但是对于 *pqqC* 和 *pqqD* 的表达后出现了产量下降,推测原因可能是在 PQQ 的合成过程中,PqqC 蛋白行使的是 PQQ 生成最后一步的催化功能,PqqD 蛋白作为 *pqqA* 的分子伴侣,其参与的反应可能不是 PQQ 合成的限速步骤,因此在 *pqqC* 和 *pqqD* 过表达以后,降低了其他关键酶的表达量,导致 PQQ-5 和 PQQ-6 较 PQQ-3 产量下降,因此选择 PQQ-7 作为下一步改造的出发菌株。

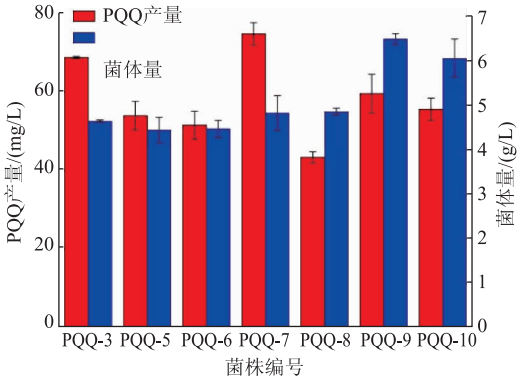


图 2　过表达 *pqqC*、*pqqD* 及 *pqqE* 对 PQQ 产量及菌体量的影响

Fig. 2　Effects of over-expression of *pqqC*, *pqqD* and *pqqE* on PQQ yield and biomass

2.3　过表达不同来源的 *tlDd* 基因对 PQQ 产量及生物量的影响

G. oxydans 621H 中对 PQQ 合成有影响的除了 *pqqABCDE* 以外,还有距离该基因簇较远的 *tlDd* 基因,该基因编码 TlDd 蛋白,TlDd 蛋白可能执行 PqqF 的剪切功能[18]。对 *G. oxydans* 621H 中 *tlDd* 进行密码子优化后,序列比对显示,*G. oxydans* 621H 与 *E.coli* K-12 W3110 中的 *tlDd* 基因同源性高达 56%。大肠杆菌自身含有的 *tlDd* 可能在 PQQ 合成中发挥作用,这也是只在 *E. coli* 中过表达 *pqqABCDE* 基因簇就能合成 PQQ 的原因之一。为了比较两个来源的 *tlDd* 基因过表达对 PQQ 产量的影响,我们在 PQQ-7 菌株的基础上构建了 4 个菌株,均选择对生长影响较小的 P_{trc} 启动子进行过表达。

为了探究不同来源的 *tlDd* 基因对 PQQ 产量提升的影响,在 PQQ-7 菌株上以 P_{trc} 启动子过表达 *E. coli* 来源的 *tlDd* 基因,分别得到了 *tlDd* 双拷贝菌株 PQQ-11 和三拷贝菌株 PQQ-13。在 PQQ-7 菌株上以 P_{trc} 启动子过表达 *G. oxydans* 621H 来源的 *tlDd* 基因,分别得到了 *tlDd* 双拷贝菌株 PQQ-12 和三拷贝菌株 PQQ-14。发酵 72 h 后产量和菌体量见

图 3。在不同批次的发酵中,由于摇瓶发酵过程中补氨和补糖的差异，导致 PQQ-7 产量和菌体量的差异。PQQ-11、PQQ-12、PQQ-13、PQQ-14 这 4 株菌较 PQQ-7 产量均有所上升，说明本研究选择的 *E. coli* 和 *G. oxydans* 两种不同来源的 *tlDd* 基因对于 PQQ 的产量提升都有促进作用，而 PQQ-11 较 PQQ-12 的产量更高，原因可能为大肠杆菌对自身来源的基因适配性更好。对于同一来源的 *tlDd* 基因过表达,PQQ-11 较 PQQ-7 产量和菌体量分别提高 25.1%和 5.2%;PQQ-12 较 PQQ-7 产量提高 9.8%，菌体量几乎一样，但是两个参数的提升量均低于 PQQ-11，说明在 PQQ-11 中进一步强化表达 *tlDd* 基因会对菌体量和产量均产生不利影响。综合 PQQ 产量和生物量两个参数的结果,选择 PQQ-11 作为下一步改造的出发菌株。

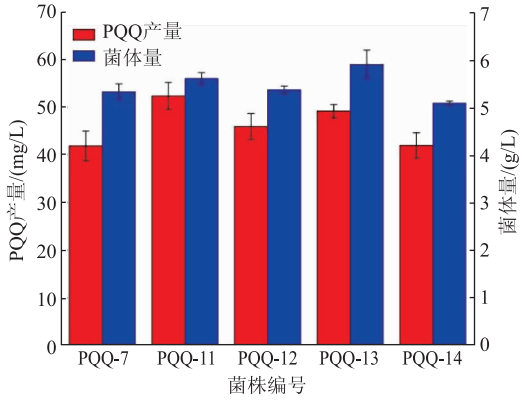


图 3　过表达不同来源的 *tlDd* 基因对 PQQ 产量及生物量的影响

Fig. 3　Effects of over-expression of *tlDd* from different source on PQQ yield and biomass

2.4　敲除 *iscR*、过表达 *gcd* 和 *ompA* 对 PQQ 产量及菌体量的影响

大肠杆菌中存在铁-硫簇抑制[49],柯崇榕的研究表明,在培养基中加入 Fe^{2+}或敲除大肠杆菌中 Fe-S 簇的转录抑制子 *iscR* 均能提高 PqqE 的表达量,但是通过添加 Fe^{2+}的方法需要实验确定添加量，过量反而会抑制 PQQ 的生产[16],因此尝试通过敲除 *iscR* 解除铁-硫簇抑制。在 PQQ-11 菌株中敲除*iscR* 基因,获得 PQQ-15 菌株,PQQ 产量由 52.4 mg/L 提升为 69.2 mg/L,提升了 32.1%,菌体量由 5.6 g/L 提升为 6.4 g/L,提升了 14.3%,见图 4。*iscR* 的敲除在本研究中对 PQQ 提升的作用最大,表明 *E. coli* 中可能还存在一些内源基因对 PQQ 的合成有抑制作用。

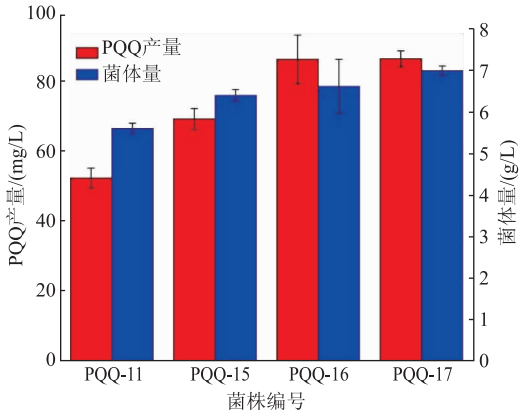


图 4　敲除 *iscR*、过表达 *gcd* 和 *ompA* 对 PQQ 产量及生物量的影响

Fig. 4　Effects of knockout of *iscR*, and over-expression of *gcd* and *ompA* on PQQ yield and biomass

目前报道的 PQQ 的高产菌株仍然以甲基营养菌居多,经过分析发现,这类菌株的细胞膜上有多种能够利用 PQQ 的蛋白质[50]。由于 GDH 的合成并不依赖于 PQQ,但是 PQQ 的合成却在 GDH 合成之后才开始[43]。韩增叶[51]的研究表明,在大肠杆菌中引入外源 PQQ 合成途径后，在高浓度葡萄糖的刺激下,GDH 的表达量有明显提升。由于 GDH 本身是脱辅基蛋白质,只有在和 PQQ 以及 Mg^{2+}或 Ca^{2+}形成全酶后才有活性。随着 PQQ 产量的增加,势必要提升离子的浓度来适配高产量的 PQQ,因此优化 Mg^{2+}添加量[51]后能够通过提升 GDH 的表达量间接促进 PQQ 的生产。在 PQQ-15 菌株的基础上,以 P_{trc} 启动子过表达 *E. coli* K-12 W3110 自身来源的 *gcd* 基因,得到了菌株 PQQ-16,与 PQQ-15 相比,PQQ-16 产量由 69.2 mg/L 提升至 86.2 mg/L,提升了 24.6%,菌体量也由改造前的 6.4 g/L 提升至 6.6 g/L。

ompA 是大肠杆菌孔蛋白基因,文献[24]在肺炎克雷伯氏菌中过表达 *ompA*，发现促进了胞内 PQQ 向胞外转运[24]。因此在 PQQ-16 的菌株基础上以 P_{trc} 强启动子过表达了 *ompA* 孔蛋白基因，试图将胞内产生的 PQQ 及时转运出胞外，避免其在胞内的消耗,解除可能存在的反馈抑制。结果表明,与PQQ-16 相比,PQQ-17 产量略有上升,为 86.3 mg/L,菌体量有一定上升,为 7.0 g/L。结果表明,以强启动子 P_{trc} 过表达 *E. coli* 自身来源的 *ompA* 孔蛋白基因能够有限提升胞外 PQQ 浓度，但是产量提升幅度非常小，说明在 PQQ-16 菌株中,PQQ 从胞内向胞外的转运并没有受到孔蛋白 OmpA 表达量的限制。

作者系统研究了异源表达 *G. oxydans* 621H 操纵子 *pqqABCDE* 以及优化底盘相关基因对 PQQ 合成的影响，获得了一株能够高效合成 PQQ 的工程菌，摇瓶发酵 72 h 产量达到 86.3 mg/L。

3 结 语

作者成功构建了 PQQ 生产工程菌，为了进一步提升 PQQ 的产量，后续改造思路为对发酵培养基及发酵条件进行优化[24,47-52]，如培养基中的酪氨酸和谷氨酸添加量、金属离子添加量、发酵过程中的溶氧等；阻断部分非必要的碳源代谢降低副产物乙酸的产生[31]。

参考文献：

[1] 马科，吴贞贞，杨雪鹏. 还原态吡咯喹啉醌清除氮自由基能力研究[J]. 食品与机械，2021，37(5)：6-9.
[2] LIU L，ZHANG Y，LIU T，et al. Pyrroloquinoline quinone protects against exercise-induced fatigue and oxidative damage via improving mitochondrial function in mice[J]. **FASEB Journal**，2021，35(4)：e21394.
[3] 欧阳茹，李巳夫，鲁湘，等. PQQ 诱导水稻对纹枯病的抗性研究[J]. 杂交水稻，2021，36(3)：79-86.
[4] WU Y，ZHAO M，LIN Z. Pyrroloquinoline quinone (PQQ) alleviated sepsis-induced acute liver injury，inflammation，oxidative stress and cell apoptosis by downregulating CUL3 expression[J]. **Bioengineered**，2021，12(1)：2459-2468.
[5] LIU G，SUN G，LIAO X，et al. Effect of dietary supplementation of pyrroloquinoline quinone disodium on growth performance，meat quality and antioxidative ability of broilers[J]. **Journal of Integrative Agriculture**，2020，19(7)：1850-1856.
[6] HUANG C，FAN Z，HAN D，et al. Pyrroloquinoline quinone regulates the redox status *in vitro* and *in vivo* of weaned pigs via the Nrf2/HO-1 pathway[J]. **Journal of Animal Science and Biotechnology**，2021，12(1)：1-17.
[7] SCHACHINGER F，Chang H，SCHEIBLBRANDNER S，et al. Amperometric biosensors based on direct electron transfer enzymes[J]. **Molecules**，2021，26(15)：1-32.
[8] GUO Z，SMUTOK O，JOHNSTON W A，et al. Circular permutated PQQ-glucose dehydrogenase as an ultrasensitive electrochemical biosensor[J]. **Angewandte Chemie–International Edition**，2022，61(6)：e202109005.
[9] MARTIN P，STEINER E，AUER K，et al. Preparation of PQQ in the kg scale[J]. **Helvetica Chimica Acta**，1993，76(4)：1667-1673.
[10] 冯超. 吡咯喹啉醌全合成工艺优化及齐墩果酸衍生物的合成[D]. 威海：山东大学，2020.
[11] KUMAZAWA T，SATO K，SENO H，et al. Levels of pyrroloquinoline quinone in various foods[J]. **Biochemical Journal**，1995，307(2)：331-333.
[12] MEULENBERG J J M，SELLINK E，RIEGMAN N H，et al. Nucleotide sequence and structure of the *Klebsiella pneumoniae pqq* operon[J]. **Molecular and General Genetics**，1992，232(2)：284-294.
[13] 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.
[14] 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.
[15] XIONG X，ZHI J，YANG L，et al. Complete genome sequence of the bacterium *Methylovorus* sp. strain MP688，a high-level producer of pyrroloquinolone quinone[J]. **Journal of Bacteriology**，2011，193(4)：1012-1013.
[16] 柯崇榕. 吡咯喹啉醌的高产菌株选育、发酵制备及生物合成途径的研究[D]. 福州：福建师范大学，2016.
[17] ZHU W，KLINMAN J P. Biogenesis of the peptide-derived redox cofactor pyrroloquinoline quinone[J]. **Current Opinion in Chemical Biology**，2020，59：93-103.
[18] 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.
[19] MATSUSHITA K，ARENTS J C，BADER R，et al. *Escherichia coli* is unable to produce pyrroloquinoline quinone (PQQ)[J]. **Microbiology**，1997，143(10)：3149-3156.
[20] HOMMERS R W J，POSTMA P W，NEIJSSEL O M，et al. Evidence of a quinoprotein glucose dehydrogenase apoenzyme in several strains of *Escherichia coli*[J]. **FEMS Microbiology Letters**，1984，24(2-3)：329-333.
[21] MEULENBERG J J M，SELLINK E，LOENEN W A M，et al. Cloning of *Klebsiella pneumoniae pqq* genes and PQQ biosynthesis in *Escherichia coli*[J]. **FEMS Microbiology Letters**，1990，71(3)：337-343.

[22] 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[J]. 生物工程学报,2018,34(5):794-802.
[23] 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[J]. 生物工程学报,2020,36(1):152-161.
[24] 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.
[25] 杨诗颖. 吡咯喹啉醌高产菌株的选育[D]. 福州:福建师范大学,2015.
[26] ZHAO C,WAN Y,CAO X,et al. Comparative genomics and analysis of the mechanism of PQQ overproduction in *Methylobacterium*[J]. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**,2021,37(6):1-10.
[27] 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[P]. 中国专利:CN103224965 A[P],2013- 07-31.
[28] 钟杉杉. 吡咯喹啉醌高产菌的筛选、诱变、发酵及基因克隆[D]. 北京:北京化工大学,2013.
[29] YANG X,ZHONG G,LIN J,et al. Pyrroloquinoline quinone biosynthesis in *Escherichia coli* through expression of the *Gluconobacter oxydans pqqABCDE* gene cluster[J]. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**,2010,37(6):575-580.
[30] MI Z,SUN Z,HUANG Z,et al. Engineering CRISPR interference system to enhance the production of pyrroloquinoline quinone in *Klebsiella pneumoniae*[J]. **Letters in Applied Microbiology**,2020,71(3):242-250.
[31] 叶润乐,李沣,丁凡,等. 基于重组氧化葡萄糖酸杆菌生物合成吡咯喹啉醌[J]. 生物工程学报,2020,36(6):1138-1149.
[32] 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.
[33] 寇航,王艳梅,李彤,等. 基于 *Methylovorus* sp.J1-1 基因组尺度代谢网络优化吡咯喹啉醌合成[J]. 生物技术通报,2022,38(2):173-183.
[34] LI Y,LIN Z,HUANG C,et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* using CRISPR-Cas9 meditated genome editing[J]. **Metabolic Engineering**,2015,31:13-21.
[35] 侯正杰. 大肠杆菌 N- 乙酰神经氨酸合成途径的构建与优化[D]. 天津:天津科技大学,2020.
[36] 张宇. L- 高丝氨酸高产大肠杆菌的代谢工程构建[D]. 天津:天津科技大学,2021.
[37] 蒋帅. 系统代谢工程改造大肠杆菌生产 L- 精氨酸[D]. 天津:天津科技大学,2020.
[38] 夏利. 大肠杆菌中羟基四氢嘧啶可控合成体系的构建与调控[D]. 天津:天津科技大学,2021.
[39] DUINE J A,FRANK J J,JONGEJAN J A. Detection and determination of pyrroloquinoline quinone,the coenzyme of quinoproteins[J]. **Analytical Biochemistry**,1983,133(1):239-243.
[40] 朱道洋,魏春雨,余晓斌. 吡咯喹啉醌产生菌的筛选和菌种鉴定[J]. 食品与发酵工业,2021,47(10):159-163.
[41] YANG X,LI P,HU X,et al. UPLC-DAD-MS/MS method for analysis of PQQ in fermentation broth[J]. **Chromatographia**,2015,78(17/18):1185-1189.
[42] GEIGER O,GORISCH H. Enzymatic determination of pyrroloquinoline quinone using crude membranes from *Escherichia coli*[J]. **Analytical Biochemistry**,1987,164(2):418-423.
[43] VAN KLEEF M A,DUINE J A. Factors relevant in bacterial pyrroloquinoline quinone production[J]. **Applied and Environmental Microbiology**,1989,55(5):1209-1213.
[44] 夏雨,周景文,陈坚. 吡咯喹啉醌高通量检测方法的建立与优化[J]. 食品与生物技术学报,2017,36(2):122-128.
[45] PAZ M A,GALLOP P M,TORRELIO B M,et al. The amplefied detection of free and bound methoxatin (PQQ) with nitroblue tetrazolium redox reactions:Insights into the PQQ-locus[J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**,1988,154(3):1330-1337.
[46] LI L,JIAO Z,HALE L,et al. Disruption of gene *pqqA* or *pqqB* reduces plant growth promotion activity and biocontrol of crown gall disease by *Rahnella aquatilis* HX2[J]. **PLoS One**,2014,9(12):e115010.
[47] 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.
[48] WANG P,XIA Y,LI J,et al. Overexpression of pyrroloquinoline quinone biosynthetic genes affects l-sorbose production in *Gluconobacter oxydans* WSH-003[J]. **Biochemical Engineering Journal**,2016,112:70-77.
[49] MANDIN P,CHAREYRE S,BARRAS F. A regulatory circuit composed of a transcription factor,IscR,and a regulatory RNA,RyhB,controls Fe-S cluster delivery[J]. **mBio**,2016,7(5):e00966.
[50] PRUST C,HOFFMEISTER M,LIESEGANG H ,et al. Complete genome sequence of the acetic acid bacterium *Gluconobacter oxydans*[J]. **Nature Biotechnology**,2005,23(2):195-200.
[51] 韩增叶. 吡咯喹啉醌及其酶蛋白葡萄糖脱氢酶基因的克隆与原核表达[D]. 北京:北京化工大学,2011.
[52] LIU M,YANG X,REN Y,et al. Two-stage oxygen supply strategy for enhancing fed-batch production of pyrroloquinoline quinone in *Hyphomicrobium denitrificans* FJNU-6[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2020,104(15):6615-6622.