

# *Methylopila* sp. YHT-1 鉴定及其发酵产吡咯喹啉醌

姚红涛, 郑璞\*

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 以甲醇为唯一碳源, 从土壤中筛选分离出一株分泌吡咯喹啉醌(PQQ)菌株 YHT-1。通过形态学特征、生理生化特征和 16S rRNA 基因序列分析, 鉴定为 *Methylopila* sp. 菌。经摇瓶发酵初步优化后, YHT-1 在 3 L 发酵罐中发酵 4 d, PQQ 产量达 113.6 mg/L。发酵产物经 DEAE 阴离子交换初步纯化、低温结晶, 得到 PQQ 粗品, 并经 HPLC 和紫外光谱分析, 证实为 PQQ。

**关键词:** 吡咯喹啉醌; *Methylopila* sp.; 筛选; 鉴定; 发酵

中图分类号: Q 93 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2016)07—0778—06

## Production of Pyrroloquinoline Quinone by *Methylopila* sp. YHT-1

YAO Hongtao, ZHENG Pu\*

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** A pyrroloquinoline quinone-producing strain YHT-1 was isolated from the soil using methanol as a single carbon source in the screening medium. Based on morphological, physiological and biochemical characteristics, as well as 16S rRNA sequences, YHT-1 was classified as a novel strain of the genus *Methylopila*. After the preliminary optimization of fermentation conditions, it could produce 113.6 mg/L PQQ in a 3 L fermenter after 4 days fermentation. Separation and purification of PQQ by the anion-exchange chromatography on DEAE Sepharose F.F., the crude crystal was identified as PQQ according to HPLC and UV spectral analyses.

**Keywords:** pyrroloquinoline quinone, *Methylopila* sp., screening, identification, fermentation

吡咯喹啉醌(Pyrroloquinoline quinone, PQQ), 化学名称为 4,5-二氢-4,5-二氧化-1-氢吡咯(2,3f)醌-2,7,9-三羧酸, 别名 Methaxatin, 是一种新型辅酶。1979 年 Salisbury 等人首次从甲基营养菌中分离, 并确定其为在细菌细胞中作为膜结合脱氢酶的氧化还原辅因子<sup>[1]</sup>。目前, 在许多不同生物体内都发现存在 PQQ, 它具有参与哺乳动物细胞的生长和分化, 防止活细胞被体内或体外的氧损伤, 增强细胞

对极端环境的耐受性, 增加不溶性磷酸盐的可利用性等多种生理功能, 新近一些研究发现 PQQ 具有异常高的氧化还原循环能力, 在抗神经细胞衰老和抗癌等方面有很大应用潜力<sup>[2]</sup>。同时, 2008 年, 美国食品和药物管理局(FDA)批准了以 PQQ 为主要成分的促进认知功能食品。因此, PQQ 作为药物或功能食品具有很好的应用前景<sup>[3]</sup>。

PQQ 的生产方法主要是化学合成法和发酵法<sup>[4]</sup>,

收稿日期: 2014-06-18

\* 通信作者: 郑璞(1966—), 女, 浙江金华人, 工学博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事发酵工程研究。

E-mail: zhengpu@jiangnan.edu.cn

化学法合成步骤多、副产物多且难以去除<sup>[5]</sup>,在2007年公开的美国专利中<sup>[6]</sup>,一种新的PQQ合成方法仍需要9步反应。目前微生物发酵生产PQQ受到越来越多的关注,生物合成PQQ的微生物多为革兰氏阴性菌,其中以甲基营养菌的合成水平最高,已报道的有生丝微菌属(*Hyphomicrobium*)、甲烷单胞菌属(*Methanomonas*)、甲基菌属(*Methylobacillus*)、甲基单胞菌属(*Methylomonas*)、嗜甲基菌属(*Methylophilus*)、甲基杆菌属(*Methylobacterium*)等<sup>[7]</sup>。一般野生菌产PQQ在2~3 mg/L<sup>[8]</sup>,国内外发酵法产PQQ的报道多数产量在每升几毫克到几十毫克<sup>[9-10]</sup>之间。Urakami等人优化培养基成分后,利用生丝微菌TK0441在30 L发酵罐中发酵14 d,PQQ产量接近1 mg/mL<sup>[11]</sup>;在国内,尹芳等在10 L发酵罐中培养生丝微菌TH205,11 d后PQQ质量浓度达26.6 mg/L<sup>[4]</sup>;熊向华等人在3 L发酵罐中利用食甲基菌MP688发酵6 d产量达到125 mg/L<sup>[5]</sup>;徐文等筛选到一株芽孢杆菌083114,可产PQQ 64.34 mg/L<sup>[12]</sup>。

作者从土壤中筛选到一株能利用甲醇产吡咯喹啉醌的菌株YHT-1,进行了菌种鉴定、初步发酵条件优化和发酵产物鉴定,确定YHT-1属于*Methylophila*属(1998年由Doronina等<sup>[13]</sup>发现)菌株,发酵液分离纯化后得到PQQ粗品。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株** *Methylophila* sp. YHT-1由本实验室筛选获得,已保藏于中国典型培养物保藏中心,编号CCTCC NO:M 2014016。

### 1.1.2 培养基

1) K培养基<sup>[13]</sup>:硫酸铵 2.0 g/L,磷酸二氢钾 2.0 g/L,氯化钠 0.5 g/L,七水硫酸镁 0.125 g/L,七水硫酸亚铁 0.002 g/L,甲醇 4 g/L,pH 7.2,固体培养基加质量分数2%的琼脂粉。

2) B培养基<sup>[14]</sup>:硫酸铵 3.0 g/L,磷酸二氢钾 1.4 g/L,磷酸氢二钠 3.0 g/L,硫酸镁 0.2 g/L,柠檬酸铁 30 mg/L,氯化钙 30 mg/L,氯化锰 5.0 mg/L,硫酸锌 5.0 mg/L,硫酸铜 0.5 mg/L,甲醇 6 g/L,pH 7.0,固体培养基加2%的琼脂粉。

3) 种子培养基:氯化铵 1 g/L,酵母膏 5 g/L,硫酸镁 0.4 g/L,磷酸二氢钾 1.4 g/L,磷酸氢二钠 3 g/L,甲醇 7 g/L;pH 7.5。

4) 发酵培养基:氯化铵 5 g/L,酵母膏 1 g/L,硫酸镁 2.1 g/L,磷酸二氢钾 1.4 g/L,磷酸氢二钠 3 g/L,氯化锰 5 mg/L,叶酸 0.1 mg/L,甲醇 12 g/L;pH 7.0。

**1.1.3 主要仪器和试剂** 酶标仪:BIOTEK公司产品;3k15冷冻离心机:Sigma公司产品;AKTA avant蛋白纯化仪:GE公司产品;HPLC:HITACHI公司产品;色谱柱,Waters SunFire™C18反向柱(5 μm,4.6 mm × 250 mm):Waters公司产品;PQQ标准品:武汉诺辉医药化工有限公司产品。

### 1.2 菌株的分离

从无锡锡南农药厂附近采集土样并制成适当浓度的稀释液,涂布于K培养基筛选平板,30℃静置培养3~5 d,分别挑取不同形态的单菌落接种于装有B培养基的试管,30℃、200 r/min震荡培养3~5 d,离心取发酵上清液。利用NBT-Gly化学法<sup>[14]</sup>快速检测PQQ含量,再经复筛并结合HPLC分析,最终确定一株PQQ产量较高的菌株YHT-1。

### 1.3 菌种鉴定

将菌株YHT-1在K培养基平板上划线,置于30℃好氧培养2~3 d获得单菌落,菌体形态特征利用普通光学显微镜和扫描电子显微镜进行观察。底物利用实验主要参考《Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology》<sup>[15]</sup>和Doronina等<sup>[13,16-18]</sup>方法。至于16S rRNA序列分析,按照细菌基因组DNA提取试剂盒(TIANGEN公司)提取YHT-1的DNA,利用细菌通用引物27F:5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG -3';1492R:5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3',通过PCR反应扩增该菌株的16S rDNA序列,PCR程序为:94℃预变性4 min,然后94℃变性30 s,52℃退火30 s,72℃延伸2 min,共30个循环,最后72℃充分延伸10 min。将PCR产物委托上海生工测序,测序结果在GenBank中进行BLAST比对,用软件ClustalX 1.81和MEGA 5.05进行同源性比较,并利用邻接法(Neighbor-Joining)绘制系统发育树。

### 1.4 利用YHT-1发酵产吡咯喹啉醌

将菌株YHT-1接种于B培养基斜面,30℃活化培养2 d,然后接种于种子培养基,35℃、200 r/min培养20 h,按体积分数4%接种到三角瓶或装有2 L发酵培养基的3 L发酵罐中,35℃发酵3~5 d。发酵罐转速为300 r/min,通气量为120 L/h,发酵过

程用氨水控制 pH 在 5.5 左右。

### 1.5 发酵产物的纯化和提取

将发酵液于 8 000 r/min 离心 15 min,再用微孔滤膜(如孔径 0.45  $\mu\text{m}$ )过滤上清液,之后以 2 mL/min 的流量通过 20 mL 的 DEAE 阴离子交换柱,用 5 倍柱体积的 20 mmol/L 柠檬酸钠缓冲液洗涤平衡,再以含有 1 mol/L NaCl 的柠檬酸钠缓冲液梯度洗脱,洗脱体积为 10 倍柱体积。将初步纯化后的浓缩液调 pH 为 2.75,4  $^{\circ}\text{C}$  结晶。

### 1.6 产物分析方法

**1.6.1 HPLC 条件** 流动相:12.5 mmol/L  $v$ (磷酸二氢钾溶液): $v$ (甲醇)=85:15;进样量 20  $\mu\text{L}$ ;流量 1 mL/min;检测波长 254 nm;柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ 。

**1.6.2 紫外吸收光谱** 利用 BIOTEK 酶标仪测定纯化产物在 200~400 nm 的紫外光谱图。

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌株的分离和鉴定

从多个土样中筛选到 30 株菌株可产 PQQ,再经摇瓶复筛,HPLC 测定得到菌株 YHT-1 产 PQQ 较高,可达 30 mg/L。

YHT-1 的菌落在 K 培养基平板上为乳白色,粘稠的,边缘整齐,直径 1~2 mm。菌体细胞为(椭)球状或杆状(0.5~0.7  $\mu\text{m}$   $\times$  0.9~1.4  $\mu\text{m}$ )(图 1),革兰氏阴性,不产芽孢,有荚膜,无鞭毛,不运动。该菌株在以甲醇和甲胺为碳源的培养基中能够良好生长,微利用 D-葡萄糖、醋酸盐、丙酮酸盐。在以铵盐、硝酸盐、牛肉膏、蛋白胨和酵母膏为氮源的培养基以及 LB 培养基中均能良好生长,甚至在不添加任何氮源的液体培养基中也能微生长。YHT-1 对链霉素和卡那霉素是敏感的,对氨苄西林具有抗性。过氧化氢酶和脲酶试验呈阳性,硝酸盐还原、氧化酶试验、吡啶产生、硫化氢的产生、明胶液化试验、淀粉水解试验、M-R 和 V-P 试验均呈阴性。YHT-1 与 *Methylopila jiangsuensis* strain JZL-4、*Methylopila* sp. MUSA 两菌株相比,在革兰氏染色、过氧化氢酶、产 H<sub>2</sub>S、MR、VP、碳源利用(如甲醇、甲胺、二氯甲烷等)、氨苄西林抗性等方面完全相同,其它方面三者各不相同。

按照 1.3 方法得到 1 391 bp 长度的核苷酸序列,在 GenBank(GenBank KJ017968)上进行 BLAST 分析,选取 16S rRNA 基因序列相似性较高的菌株

及典型 PQQ 产生菌构建系统进化树(图 2)。菌株 YHT-1 与 *Methylopila jiangsuensis* strain JZL-4 和 *Methylopila* sp. MUSA 两株菌具有最高的相似性,均达 99.5%,与同属的另两株菌 *Methylopila capsulata* strain IM1 和 *Methylopila helvetica* strain DM9(T)的相似性分别为 96%、87%。综合菌落及菌体形态特征、生理生化特征、16S rRNA 基因序列分析,鉴定 YHT-1 为 *Methylopila* sp. 菌株。该菌属于 1998 年由 Doronina 等<sup>[13]</sup>发现,目前,只有第二版的《Bergey's Manual<sup>®</sup> of Systematic Bacteriology》<sup>[15]</sup>(2005, Springer)Part C 部分对该菌属有所描述,其它分类专著未收录该属相关资料。该属目前已有 4 个模式种,YHT-1 与其主要的生理生化特征相符,最显著的特征是 YHT-1 没有鞭毛。

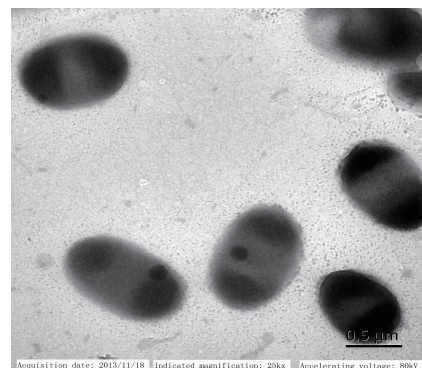


图 1 菌株 YHT-1 的扫描电镜图 (SEM:Quanta-200; 25000 $\times$ )

Fig. 1 Cell morphology of strain YHT-1 (SEM:Quanta-200;25000 $\times$ ;bar,0.5 $\mu\text{m}$ )

### 2.2 不同氮源对发酵产 PQQ 的影响

发酵培养基以甲醇为唯一碳源,分别以牛肉膏、蛋白胨、酵母膏、硝酸钾、硝酸铵、氯化铵、硫酸铵作为氮源,空白为不加任何氮源,发酵产 PQQ。由图 3 可以看出,当氮源为酵母膏时 PQQ 产量最高;无机氮源中以氯化铵为氮源时 PQQ 产量最高,其次是硝酸铵和硫酸铵。其中有机氮源牛肉膏和酵母膏更有利于菌体细胞的生长。

### 2.3 初始甲醇体积分数对发酵产 PQQ 的影响

发酵培养基中甲醇的添加体积分数为 0.3%~3%,间隔 0.3%。发酵 3 d 后结果见图 4,当甲醇体积分数为 0.9%~2.4%时均适宜该菌株发酵产生 PQQ,最适的初始甲醇体积分数为 1.5%;同时可以看出菌株在较广甲醇体积分数范围可以较好生长。

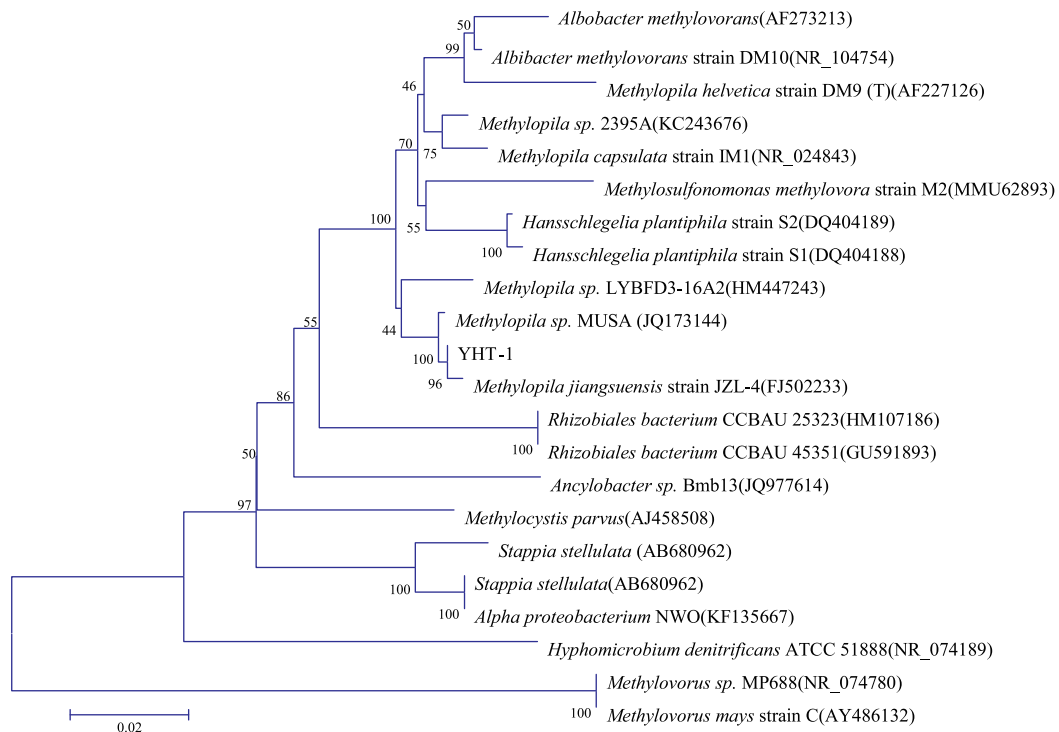


图 2 以 16S rRNA 基因序列为基础的菌株 *Methylophil* sp. YHT-1 的系统发育树  
Fig. 2 Phylogenetic tree of *Methylophil* sp. YHT-1 based on 16S rRNA sequences

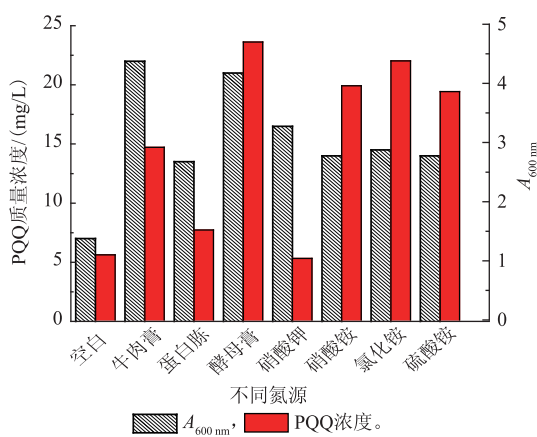


图 3 不同氮源对 PQQ 产量和生物量的影响  
Fig. 3 Effect of different nitrogen sources on the production of PQQ and biomass

#### 2.4 镁元素对发酵的影响

发酵培养基中硫酸镁的添加质量浓度为 0~3.0 g/L, 间隔 0.3 g/L。发酵 3 d 结果见图 5, 不加硫酸镁几乎不会合成 PQQ, 添加过多的话也会抑制其合成, 适宜添加质量浓度范围是 0.3~2.4 g/L, 最适为 2.1 g/L; 适当增大硫酸镁质量浓度会促进菌体生长, 同时对 pH 维持也有一定作用。

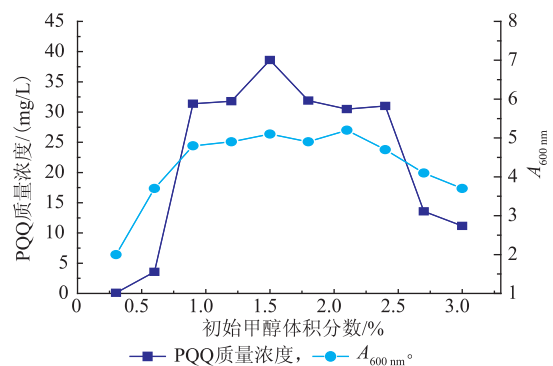


图 4 不同初始甲醇体积分数对 PQQ 产量和生物量的影响  
Fig. 4 Effect of different initial concentrations of methanol

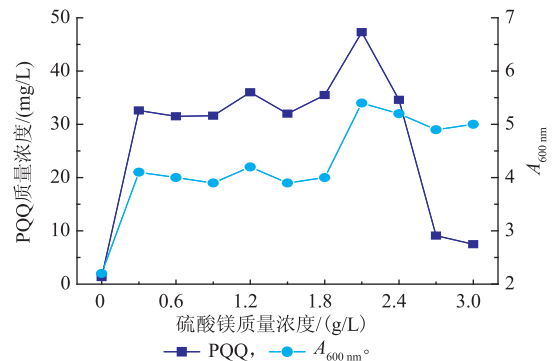


图 5 不同硫酸镁质量浓度对 PQQ 产量和生物量的影响  
Fig. 5 Effect of different initial concentrations of  $\text{MgSO}_4$

### 2.5 初始 pH 值对产 PQQ 产量和生物量的影响

将发酵培养基初始 pH 值分别调为 6.0、6.5、7.0、7.2、7.5、8.0, 30 °C 发酵 5 d。由图 6 可以看出, 菌株 YHT-1 具有较广泛的生长 pH, 最适为 7.5; 最利于 PQQ 合成的初始 pH 为 7.0, 大于 7.5 时其合成量迅速下降。

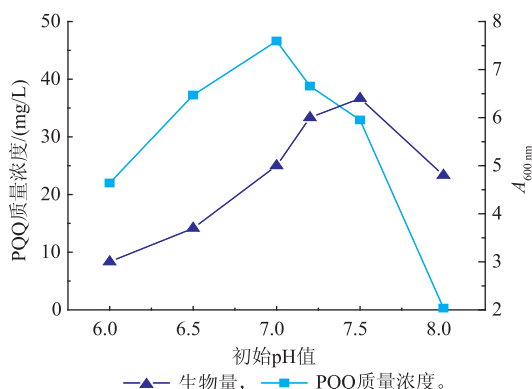


图 6 不同初始 pH 值对发酵产 PQQ 的影响

Fig. 6 Effect of initial pH on the production of PQQ

### 2.6 不同温度对发酵产 PQQ 的影响

分别在 25、30、35、37 °C 温度下进行实验, 发酵 5 d, 结果见图 7。在 35 °C 下, 菌体更快更多的产生 PQQ, 最高质量浓度达 49 mg/L, 此温度下细胞生长也最快; 在 25 °C 条件下, 72 h 以后 PQQ 的合成速率突然变快, 原因可能是 PQQ 在较低温度下更容易得到积累。

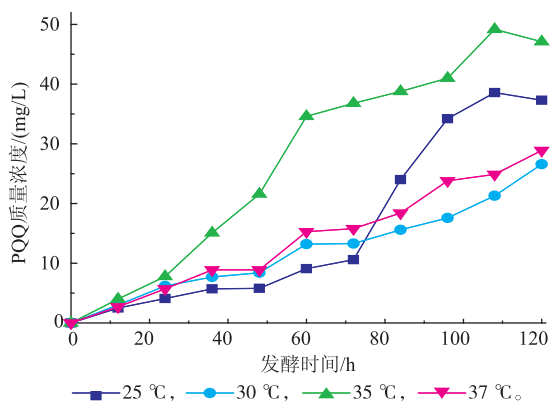


图 7 不同温度对发酵产 PQQ 产量的影响

Fig. 7 Effect of temperature on the production of PQQ

### 2.7 YHT-1 在 3 L 发酵产吡咯喹啉醌曲线

经摇瓶发酵条件初步优化后, 利用菌株 YHT-1 在 3 L 发酵罐进行发酵实验。发酵过程中, 用氨水控制 pH 在 5.5 左右。结果见图 8, 好氧发酵 4 d, 前期 PQQ 合成和菌体生长基本保持同步调, 但到发酵后

期细胞停止生长时仍在继续产生 PQQ, 终质量浓度可达 113.6 mg/L, 菌体浓度 ( $A_{600\text{nm}}$ ) 在 72 h 之后便维持在 14 左右。由 PQQ 合成曲线看出, 若延长发酵时间, 其浓度可能还会增加。

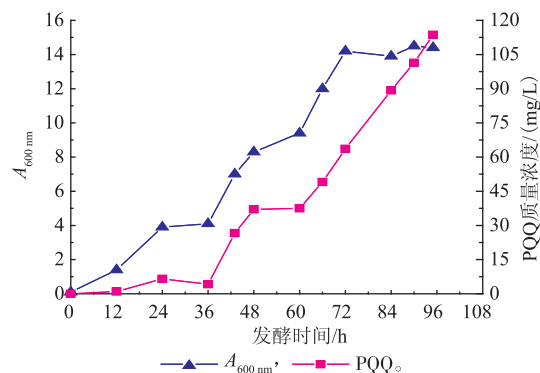


图 8 发酵过程 PQQ 质量浓度变化及菌体生长曲线

Fig. 8 Time Courses of PQQ concentration and  $OD_{600}$  during the fermentation in a 3-L fermentor

### 2.8 发酵产物的提取与分析

按照 1.5 方法, 最后得到呈棕红色的 PQQ 粉末。将其溶解于蒸馏水, HPLC 分析, 产物和标品的保留时间同为 3.3 min; 进而测定紫外吸收光谱 (图 9), 产品和标样的峰形一致: 在 249 nm 和 326 nm 处左右都有特征吸收峰, 两种分析方法都证实两者为同一物质。因而, 纯化产物即为吡咯喹啉醌, 菌株 YHT-1 为 PQQ 产生菌。

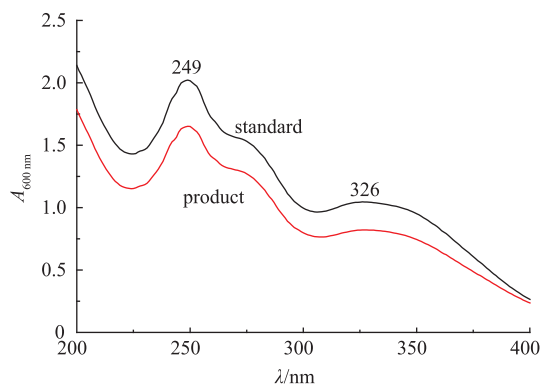


图 9 PQQ 粗品的紫外吸收光谱 (上: PQQ 标样; 下: 产物)

Fig. 9 UV spectra of PQQ product and standard sample

## 3 结语

吡咯喹啉醌是 20 世纪 70 年代末发现的继吡啶核苷酸 (NAD、NADP) 和核黄素 (FMN、FAD) 的第三类辅酶, 30 多年的研究中, 发现它具有多种重要生理功能, 其研究价值已毋庸置疑。但关于发酵法

生产 PQQ 的报道还是偏少,主要限制因素是发酵产量偏低,难以实现工业化,化学合成法又与当今绿色环保的观念相悖。基于此,作者从土壤中筛选 PQQ 高产菌株,筛选到的 YHT-1 被鉴定为 *Methylophil* sp.新菌株,作者首次报道了 *Methylophil* sp. 中存在能向胞外分泌 PQQ 的菌株,不仅为

*Methylophil* 属新菌种的发现及该属分类提供一些参考数据,同时经初步优化摇瓶条件后,YHT-1 发酵产 PQQ 质量浓度有所提高,在 3 L 发酵罐中发酵 4 d,产物质量浓度达 113 mg/L,属于较高产量。通过优化发酵工艺和采用诱变或基因工程手段改良菌种将有望进一步提高其产量。

## 参考文献:

- [1] SALISBURY S A, FORREST H S, CRUSE W B T, et al. A novel coenzyme from bacterial primary alcohol dehydrogenases[J]. *Nature*, 1979, 280: 843-844.
- [2] 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.
- [3] 杜宝华,葛欣,王文溪,等. 甲基营养菌 MP688 中启动子探针载体的构建[J]. 生物技术通讯, 2012, 23(5): 644-647.  
DU Baohua, GE Xin, WANG Wenxi, et al. Development of a promoter probe vector for *Methylophil* sp. MP688 [J]. *Letters in Biotechnology*, 2012, 23(5): 644-647. (in Chinese)
- [4] 尹芳,陆兵,陈国豪,等. 甲醇利用型细菌发酵生产吡咯喹啉醌的培养条件[J]. 华东理工大学学报:自然科学版, 2004, 30(2): 227-229.  
YIN Fang, LU Bing, CHEN Guohao, et al. Study on the production of pyrroloquinoline quinone by using methanol-utilizing bacteria[J]. *Journal of East China University of Science and Technology*, 2004, 30(2): 227-229. (in Chinese)
- [5] XIONG X H, ZHAO Y, GE X, et al. Production and radioprotective effects of pyrroloquinoline quinone [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2011, 12(12): 8913-8923.
- [6] GOPAL D, KEMPF J, STALZER W. Synthesis of pyrroloquinoline quinone(PQQ):USA, US 2007/0072894 A1[P]. 2007-03-29.
- [7] 杨璐,熊向华,汪建华,等. 吡咯喹啉醌研究进展[J]. 生物技术通讯, 2009, 20(6): 874-879.  
YANG Lu, XIONG Xianghua, WANG Jianhua, et al. Advances on the research of pyrroloquinoline quinone [J]. *Letters in Biotechnology*, 2009, 20(6): 874-879. (in Chinese)
- [8] VAN Kleef M A, DUINE J A. Factors relevant in bacterial pyrroloquinoline quinone production[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, 55(5): 1209-1213.
- [9] ADACHI O, AMEYAMA M. Process for production of pyrrolo-quinoline quinone:USA, US4994382 A[P]. 1991-02-19.
- [10] URAKAMI T. Process for the preparation of pyrrolo-quinoline quinone:USA, US 5344768[P]. 1994-9-6.
- [11] URAKAMI T, YASHIMA K, KOBAYASHI H, et al. Production of pyrroloquinoline quinone by using methanol-utilizing bacteria [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58(12): 3970-3976.
- [12] 徐文,许然,张利平. 甲醇利用型吡咯喹啉醌产生菌的筛选及鉴定[J]. 生物技术通报, 2013, 1: 162-165.  
XU Wen, XU Ran, ZHANG Liping. Isolation and identification of PQQ producing strains using methanol-utilizing bacteria[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2013, 1: 162-165. (in Chinese)
- [13] DORONINA N V, TROTSSENKO Y A, KRAUSOVA V I, et al. *Methylophil capsulata* gen. nov., sp. nov., a novel non-pigmented aerobic facultatively methylotrophic bacterium[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1998, 48(4): 1313-1321.
- [14] 杨延新,熊向华,游松,等. 3种检测吡咯喹啉醌的方法比较[J]. 生物技术通讯, 2011, 22(4): 544-547.  
YANG Yanxin, XIONG Xianghua, YOU Song, et al. Comparing three kinds of pyrroloquinoline quinone detection methods[J]. *Letters in Biotechnology*, 2011, 22(4): 544-547. (in Chinese)
- [15] GARRITY G M, Bergey's Manual<sup>®</sup> of Systematic Bacteriology. Volume 2 (Part C)[M]. New York: Springer, 2005: 420-422.
- [16] DORONINA N V, TROTSSENKO Y A, TOUROVA T P, et al. *Methylophil helvetica* sp. nov. and *Methylobacterium dichloromethanicum* sp. nov. - Novel Aerobic Facultatively Methylotrophic Bacteria Utilizing Dichloromethane [J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2000, 23(2): 210-218.
- [17] LI L, ZHENG J W, HANG B J, et al. *Methylophil jiangsuensis* sp. nov., an aerobic, facultatively methylotrophic bacterium[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2011, 61(7): 1561-1566.
- [18] DORONINA N V, KAPARULLINA E N, BYKOVA T V, et al. *Methylophil musalis* sp. nov., an aerobic, facultatively methylotrophic bacterium isolated from banana fruit[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2013, 63(Pt 5): 1847-1852.