

甲基营养菌 MB200 中 *mutS* 的缺失及高浓度甲醇和甲醛诱变

杨青山, 黄罗冬, 吴宜婷, 张茜, 申佩弘*

1 广西大学生命科学与技术学院 广西微生物与酶工程技术研究中心, 广西 南宁 530004

2 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广西 南宁 530004

杨青山, 黄罗冬, 吴宜婷, 张茜, 申佩弘. 甲基营养菌 MB200 中 *mutS* 的缺失及高浓度甲醇和甲醛诱变[J]. 微生物学通报, 2022, 49(7): 2730-2740

Yang Qingshan, Huang Luodong, Wu Yiting, Zhang Xi, Shen Peihong. Mutation of *mutS* gene in *Methylobacterium* sp. MB200 and induction of strains resistant to high concentration of methanol and formaldehyde[J]. Microbiology China, 2022, 49(7): 2730-2740

摘要:【背景】甲基营养菌(*Methylobacterium*)是一类能够以单碳或非 C-C 键低碳化合物(如甲烷、甲醇、甲醛等)为底物生长, 并可生产多种代谢产物如氨基酸、工业酶和辅助因子、多羟基烷酸酯(polyhydroxyalkanoates, PHA)、多糖和类胡萝卜素等的革兰氏阴性细菌。【目的】通过突变甲基营养菌 MB200 的 *mutS* 基因, 在胁迫条件下定向诱导, 以获得可以耐受高浓度甲醇和甲醛的生产菌株。【方法】利用三亲本结合构建 *mutS* 基因缺失的高突变菌株 MB200sTB, 逐步提升培养液中甲醇、甲醛的浓度进行定向诱导突变, 对获得的高耐受性突变株进行回补, 分析菌株的生长情况。【结果】构建了 *mutS* 基因的缺失突变体 MB200sTB, 并且得到了高耐受甲醇和甲醛的菌株 MB200sHBc 和 MB200sHBq。MB200sHBc 与野生株 MB200 相比其甲醇耐受性得到了极显著的提高, 甲醇耐受浓度从 8 g/L 提升到 44 g/L, 但生长量不受影响。MB200sHBq 在以甲醛为 0.45 g/L 的碳源条件下, 生长量相较于野生型 MB200 提高了 1.69 倍。【结论】通过定向诱导缺失 *mutS* 基因的突变体, 可获得具有生产应用潜力的高耐甲醇菌株。

关键词: 甲基营养菌; *mutS* 基因; 诱导突变; 耐受性

Mutation of *mutS* gene in *Methylobacterium* sp. MB200 and induction of strains resistant to high concentration of methanol and formaldehyde

YANG Qingshan, HUANG Luodong, WU Yiting, ZHANG Xi, SHEN Peihong*

1 Guangxi Research Center for Microbial and Enzyme Engineering Technology, College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, Guangxi, China

2 State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-Bioresources, Nanning 530004, Guangxi, China

Abstract: [Background] The Gram-negative *Methylobacterium* has the ability to grow in the low-carbon compound (such as methane, methanol, formaldehyde and so on) substrate with one carbon atom or no C-C bond, and synthesizes various metabolites such as amino acids, industrial enzymes, cofactors, polyhydroxyalkanoates (PHAs), polysaccharides, and carotenoids. [Objective] In this study, mutation of *mutS* gene in *Methylobacterium* sp. MB200 was performed, and targeted induction was conducted with stresses to yield mutant strains that can tolerate high concentration of methanol or formaldehyde. [Methods] The *mutS* deletion strain MB200sTB was constructed by triparental mating, and the concentration of methanol and formaldehyde in the culture medium was gradually increased to induce targeted mutations. Electrotransformation was used to yield complementary transformants. [Results] MB200sTB with *mutS* deletion was successfully constructed, and the methanol-tolerant MB200sHBc and formaldehyde-tolerant MB200sHBq were obtained. The methanol tolerance of MB200sHBc was greatly improved compared with that of the wild strain MB200. To be specific, the tolerant methanol concentration raised from 8 g/L to 44 g/L and the growth kept unchanged. In the presence of 0.45g/L formaldehyde as carbon source, the growth of MB200sHBq was 1.69 folds higher than that of MB200. [Conclusion] Through targeted induction of *mutS* deletion mutants, strains with high methanol tolerance and potential application prospect in production can be obtained.

Keywords: *Methylobacterium*; *mutS*; targeted induction; tolerance

甲基营养菌(*Methylobacterium*)是一类具有专门的甲基代谢途径的细菌,可利用单碳或非 C-C 键的低碳化合物(如甲烷、甲醇、甲醛等)进行生长,由于这类细菌多为杆状,也称为甲基杆菌^[1-2]。截至目前,研究最广泛的是 *Methylobacterium extorquens* AM1, 该菌是一种多功能的甲基营养细菌,可利用多种碳基质包括单碳化合物(如甲醇、甲胺和甲酸盐)和多碳化合物(如丙酮酸、琥珀酸、乳酸和醋酸盐等)进行生长^[3]。目前菌株 AM1 已被设计用于生产各种代谢产物,包括衣康酸^[4]、甲戊酸^[5]、甲基延胡

索酸、甲基琥珀酸^[6]和巴豆酸^[7]等。

使用甲醇作为唯一碳源进行发酵可降低实验污染风险,也可以降低下游加工成本,甲醇是一种很有前途的低成本可再生原料,已被用作微生物生产代谢的原料来生产各种增值化合物^[8]。然而以甲醇作为唯一底物也面临许多问题,如甲醇耐受性问题,甲醇浓度低时菌株生长量低下,但甲醇浓度高时会抑制菌株生长甚至会导致菌株死亡^[9],并且随着甲基营养菌以甲醇为底物的生长代谢中会产生抑制细胞生长的甲醛,尤其是在高浓度甲醇条件下会有大量

的甲醛在细胞内积累而使细菌生长停滞^[10]。

DNA 错配修复系统(mismatch repair, MMR)是细胞进化上一种高度保守的分子机制,其能够去除 DNA 复制或者损伤过程中引起的突变,从而维持遗传复制的准确性^[11-13]。该系统包含 MutS、MutL 和 MutH 蛋白^[14-15],错配修复系统 MMR 的启动先利用 MutS 二聚体的 DNA 错配识别功能识别异常碱基对,随后在 ATP 的协助下与 MutL 结合成 MutS-DNA 复合物^[16],激活与 MutH 相关的核酸内切酶,定位在错配处两侧^[17],然后招募 UvrD 解旋酶(DNA 解旋酶 II)从链断裂到错配的有利方向解开异源双链, DNA 聚合酶 III 填补缺口,由 DNA 连接酶连接;最后,甲基化酶 Dam 迅速使子链甲基化完成错配修复^[18]。在只有 DNA 聚合酶的校对能力下,错配依然会发生在 DNA 复制过程中,其细菌的自发突变频率为 10^{-7} ;而在 DNA 错配修复系统的作用下,将保真度提高 50-1 000 倍,进而保持低突变率 1×10^{-9} - 1×10^{-10} 以保持基因组完整性^[19-20]。Kang 等对野生型大肠杆菌 MG1655 和 *mutS* 缺失的大肠杆菌在乳酸或甘油培养基上平行进化了 800 代后进行全基因组测序,结果发现 Δ mutS 中的突变更快,比野生型高出 4 倍以上,并且 Δ mutS 菌株中积累了大量随机突变^[21]。Zhang 等在工业 DNA 合成中开发了一种蛋白酶 eMutS 结合纤维素柱的过程,通过基因工程和蛋白质工程工艺的结合将 eMutS 的全活性保质期从 7 d 延长至 63 d,而且碱基复制准确度提高了 37.6 倍,比野生型 eMutS 更有效、更稳健^[22];Hu 等研究发现,大肠杆菌中的 *mutS* 缺失使菌株产生的突变频率高于 *mutH* 的缺失,并且发现甲基化酶 *dam* 基因和 *mutS* 双缺失比 *dam* 或 *mutS* 单个缺失菌株的突变频率更高^[23];Qiu 在动物研究中发现, MutS 的同源物 MSH2 缺乏会增加遗传性非息肉性结肠直肠癌的易感

性,MSH2 可能在癌症的发生、发展和免疫浸润中起重要作用,MSH2 可以成为癌症诊断和预后的潜在生物标志物^[24]。

本研究对甲基营养菌(*Methylobacterium* sp.) MB200 的 *mutS* 基因进行插入缺失突变,破坏菌株中的错配修复系统,改造该菌株成为高频突变子,在唯一碳源分别为甲醇和甲醛的条件下进行定向诱导突变,以期得到高耐受性甲醇或甲醛的菌株,为甲基营养菌的进一步研究奠定基础并提供具有应用潜力的菌种资源。

1 材料与方法

1.1 菌种与质粒

Methylobacterium sp. MB200 (萘啶酮酸抗性, Nm^r)、大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 、表达载体 pCM80 (四环素抗性, Tc^r)、帮助质粒 pRK2073 (卡那霉素抗性, Km^r)和自杀质粒 pK18mod (卡那霉素抗性, Km^r)均为本实验室保存;克隆载体 pEASY-T1 Cloning Kit (氨苄青霉素抗性, Amp^r),北京全式金生物技术有限公司;限制性内切酶、T4 DNA 连接酶和 DNA 聚合酶, Thermo 公司;DNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒和 DNA 纯化试剂盒, Qiagen 公司。

1.2 培养基

大肠杆菌培养使用 LB 液体培养基:胰蛋白胍 10.0 g, 酵母提取物 5.0 g, NaCl 10.0 g, 加水定容至 1.0 L, pH 7.0。菌株 MB200 基础培养基(MM)^[25]: (NH₄)₂HPO₄ 3.0 g/L, K₂HPO₄ 2.0 g/L, NaCl 1.0 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.2 g/L, FeSO₄·7H₂O 0.010 g/L, MnSO₄·6H₂O 0.005 g/L, 维生素 B1 10 μ g/L, 烟酸 20 μ g/L, 泛酸钙 20 μ g/100 mL, 维生素 B2 20 μ g/L, 生物素 10 μ g/L, 对氨基苯甲酸 10 μ g/L。甲基营养菌在 30 °C 的 MM 基础培养基中生长,并根据需要添加不同浓度的甲醇和甲醛作为唯一碳源,大

肠杆菌 DH5 α 在 37 °C 的 LB 培养基中培养。根据需要向培养基中按以下终浓度添加相应的抗生素: 氨苄青霉素(Amp) 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 卡那霉素(Km) 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 四环素(Tc) 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 萘啶酮酸(Nm) 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.3 方法

1.3.1 DNA 分子操作

按照试剂盒说明书进行分离提取染色体 DNA、质粒和基因组 DNA, 依照酶的说明书进行 DNA 的 PCR、酶切、连接、转化, DNA 的纯化、回收、酶切、连接、转化等其他 DNA 操作通过标准程序完成^[26]。

1.3.2 构建 *mutS* 突变株

根据 MB200 的基因组序列, 借助软件 Vector NTI 设计引物 MutS-F 和 MutS-R, 以 MB200 的基因组 DNA 为模板 PCR 扩增目的基因 *mutS*; 再以扩增出的基因 *mutS* 为模板, 以 MutSps-F 和 MutSps-R 为引物扩增 *mutS* 基因的部分片段 *mutSps*; 以 Km 抗性基因的引物对 (Km-F/Km-R) 和 Tc 抗性基因的引物对 (Tc-F/Tc-R) PCR 扩增筛选缺失和回补菌株。所有引物序列见表 1。

PCR 反应体系(25 μL): DNA (0.50–1.00 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 1 μL 、上、下游引物(10–100 pmol/ μL)各 1 μL 、

酶 12.5 μL 和水 9.5 μL 。*mutS* 的 PCR 反应条件: 95 °C 2 min; 95 °C 30 s, 58 °C 150 s, 72 °C 60 s, 30 次循环; 72 °C 5 min。再以 *mutS* 基因作为模板, 采用引物 MutSps-F 和 MutSps-R 进行 *mutSps* 的 PCR, 将得到的 PCR 产物和 pEASY-T1 连接命名为 pEASY-T1-*mutSps*。导入大肠杆菌 DH5 α , 在含有 Amp 的 LB 平板上进行蓝白斑筛选并提取质粒, 用 *Pst* I 与 *Hind* III 酶切后测序验证。

利用 *Pst* I 与 *Hind* III 对重组质粒 pEASY-T1-*mutSps* 进行双酶切, 回收 *mutSps* 片段, 与同样利用 *Pst* I 与 *Hind* III 双酶切的 pK18mob 载体连接, 得到重组质粒 pK18mod-*mutSps*, 用热激法转化到大肠杆菌 DH5 α 中, 命名为 pK18mod-*mutSps*/DH5 α 。接下来采用三亲本接合方法^[27]将受体菌株 MB200 (Nm, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 30 °C)、供体菌株 pK18mod-*mutSps*/DH5 α (Km, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 37 °C)和帮助菌 pRK2073/DH5 α (Km, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 37 °C)在相应的抗生素和温度条件下培养到对数期(OD_{600} 为 0.8–1.0), 按照 DH5 α /pK18mod-*mutSps*:MB200:DH5 α /pRK2073 的菌体湿重比例为 1:2:1 (以 1 mL 的菌体量为 1), 4 °C、6 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 用生理盐水洗涤 3 次后将混合菌体转移到含 5% LB 的 MM 固体培养基的醋酸纤维薄膜上, 在 32 °C

表 1 本研究中所用的引物

Table 1 Primers used in this study

| Primer name | Sequence (5'→3') | Usage |
|-------------|---------------------------------------|--|
| MutS-F | CAT <u>AAGCTT</u> CAGGCGGCGGATACG | Clone <i>mutS</i> gene |
| MutS-R | CGCCTGCAGATCAGCGACGCTCTATA | |
| MutSps-F | TATA <u>AAGCTT</u> ACGCTCGCCATCGACGCG | Cloning part of the <i>mutS</i> gene |
| MutSps-R | TATCTGCAGGCGATGAAGGCTTCGCC | |
| Km-F | ATGATTGAACAAGATGGATTGCACCGC | Validation of mutant strains of <i>mutS</i> gene |
| Km-R | TCAGAAGAAGCTCGTCAAGAAGGCGAT | |
| Tc-F | TTCCTGACGGGCTGTTTCCTTTTGC | Validation of <i>mutS</i> gene complementation |
| Tc-R | ATGCCACCCGTTCCACGTTGTTAT | |

注: 下划线为酶切位点

Note: Underline indicate the enzyme recognition site.

的培养箱中培养 3–4 d, 然后稀释涂布于含有卡那霉素(Km)的 MM 固体培养基进行筛选、鉴定, 并经(Km-F/Km-R)进行 PCR 扩增检测, 获得的重组突变株命名为 MB200sTB。

1.4 野生菌株 MB200 的甲醇和甲醛耐受

将野生菌株 MB200 划线培养, 得到的对数期(OD_{600} 为 0.8–1.0)的种子液按照 1%的接种量接种至甲醇浓度分别为 4、8、12、16、20 g/L 或甲醛浓度分别为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 g/L 的 MM 培养基中, 在 30 °C、200 r/min 条件下培养, 测量野生菌株的生长曲线及菌体量 OD_{600} 。

1.5 突变株 MB200sTB 的定向诱导

1.5.1 突变株 MB200sTB 的甲醇诱导

根据野生菌在甲醇培养基上的生长曲线, 从最适甲醇浓度开始进行定向诱导突变。将 MB200sTB 菌株划线挑单菌落接入指型瓶中, 于 30 °C、200 r/min 条件下培养, 将培养得到的对数期(OD_{600} 为 0.8–1.0, 下同)种子液以 5%的接种量接入 100 mL 的 MM 培养基中, 继续以 30 °C、200 r/min 培养 36–48 h 达到对数期; 之后依然以 5%的接种量转接到更高甲醇浓度(甲醇浓度增加 4 g/L)的 MM 培养基中, 30 °C、200 r/min 培养 36–48 h, 待生长达到对数期后继续上述操作。当培养到甲醇浓度过高时, 由于菌株受到的甲醇抑制程度增大, 菌株生长受到影响时, 减少甲醇的增加梯度, 降为 2 g/L。每一个浓度保存一次菌株, 当菌株无法生长时, 重新从保存的上一个浓度的菌液接种培养, 最终经过不断地传代诱导、筛选后可获得耐高浓度甲醇的菌株。同时以野生菌 MB200 为对照组进行同样的定向诱导。

1.5.2 突变株 MB200sTB 的甲醛诱导

将 MB200sTB 菌株划线挑单菌落接入指型瓶中, 于 30 °C、200 r/min 条件下培养, 将培养 4–5 d 的稳定期种子液以 5%的接种量接入

100 mL 甲醛浓度为 0.4 g/L 的 MM 培养基中, 于 30 °C、200 r/min 培养 4–5 d 达到稳定期, 每轮培养依次增加 0.05 g/L 的甲醛。同样以野生菌 MB200 为对照组进行同样的定向诱导。

1.6 构建回补菌株 MB200sHBc 和 MB200sHBq

1.6.1 表达载体 pCM80-mutS 的构建

使用 *Pst* I 和 *Hind* III 进行双酶切克隆载体 pEASY-T1-muts, 胶回收 *mutS* 目的片段, 与同样双酶切的 pCM80 连接, 转化至 *E. coli* DH5 α , 在四环素抗性筛选培养基上筛选获得阳性重组子, 测序验证正确后命名为 *E. coli* DH5 α /pCM80-muts。

1.6.2 构建菌株 MB200sHBc 和 MB200sHBq

参考 Faber 等^[28]的电转化方法, 制作菌株 MB200sTBc 和 MB200sTBq 感受态, 利用电转化将表达载体 pCM80-muts 转化到菌株 MB200sTBc 和 MB200sTBq 中, 并在含 Tc 和 Nm 的 MM 固体培养基中筛选, 命名为菌株 MB200sHBc 和 MB200sHBq。

1.7 菌株 MB200sHBc 和 MB200sHBq 的生长情况分析

将菌株 MB200、MB200sHBc 和 MB200sHBq 划线接种于 MM 固体培养基, 30 °C 培养 72 h 后挑单菌落接种至对应的碳源培养液中, 30 °C、200 r/min 培养 36 h。将 MB200、MB200sHBc 菌液按照 1%的接种量接种到 100 mL 含甲醇或甲醛(诱导的最高浓度)的 MM 液体培养基进行培养, 每隔 8 h 检测一次 OD_{600} , 每个组取 3 个平行检测菌株的生长情况。

2 结果与分析

2.1 菌株 MB200 的生长情况

2.1.1 菌株 MB200 在不同甲醇浓度下的生长情况

菌株 MB200 在甲醇浓度分别为 4、8、12、

16、20 g/L 的 MM 液体培养基中的生长状况如图 1 所示, 菌株 MB200 在 8 g/L 的甲醇条件下生长最快, 菌株的生长量也最大; 但随着甲醇浓度的进一步提高, 菌株的生长速度变慢且生长量也减少, 并且当甲醇浓度增加为 16 g/L 时菌株基本不生长, 所以得到菌株 MB200 生长的最适甲醇浓度为 8 g/L。

2.1.2 菌株 MB200 在不同甲醛浓度下的生长情况

菌株 MB200 在甲醛浓度分别为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 g/L 的 MM 液体培养基中的生长状况如图 2 所示, 菌株 MB200 最高可以在 0.4 g/L 的甲醛浓度条件下生长, 而且在甲醛浓度为 0.6 g/L 时菌株就无法生长了, 证明菌株 MB200 的最高甲醛耐受性为 0.4 g/L, 生长的 OD_{600} 最高只有 0.4 左右, 表明在甲醛存在的条件下菌株 MB200 的生长状况差, 以甲醛作为唯一碳源时生长代谢比较困难。

2.2 MB200sTB 突变体的构建

将 *mutSps* 与载体 pK18mob 酶切连接后整体转化至 *E. coli* DH5 α 中, 获得 pK18mod-*mutSps*/*DH5 α* 菌株, 提取质粒进行酶切验证(图 3A)。利

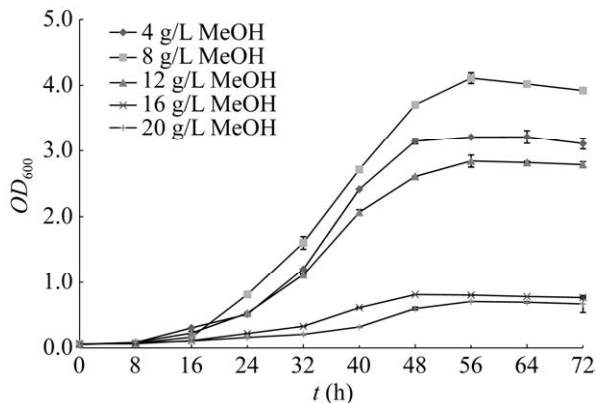


图 1 野生型菌株 MB200 在不同甲醇浓度下的生长曲线

Figure 1 Growth curve of wild-type strain MB200 at different methanol concentrations.

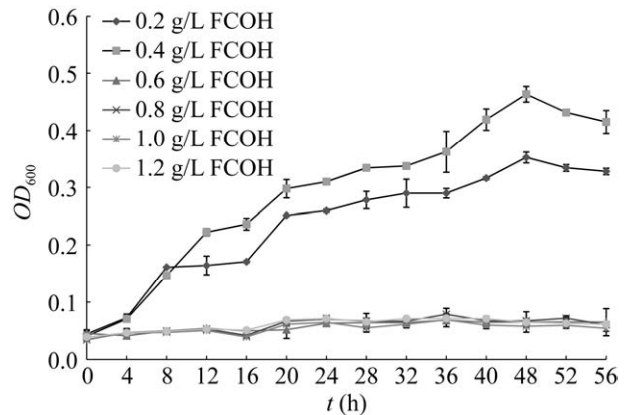


图 2 野生型菌株 MB200 在不同甲醛浓度下的生长曲线

Figure 2 The growth curve of wild-type strain MB200 at different concentrations of formaldehyde.

用三亲本结合方法, 将质粒 pK18mod-*mutSps* 导入菌株 MB200 中, 经抗生素抗性筛选, 并对 Km 基因进行 PCR 扩增验证(图 3B), 获得 *mutS* 基因缺失的突变株, 命名为 MB200sTB。

2.3 突变菌株 MB200sTB 耐甲醇与甲醛诱导

突变菌株 MB200sTB 经过 3 个月的定向诱导, 在以甲醇为碳源时, 其甲醇耐受性提升到 44 g/L, 提高了近 6 倍, 而野生菌 MB200 的最高甲醇耐受性只提升到 24 g/L; 以甲醛为碳源时, 突变菌株 MB200sTB 诱导后的耐受性并不高, 经过 3 个月的诱导, 该菌株最高可以耐受 0.45 g/L 的甲醛浓度, 但生长量比野生型有所增加, 野生菌 MB200 的甲醛耐受性无变化。

2.4 回补菌株 MB200sHBc 和 MB200sHBq 的构建

将 *mutS* 基因片段与表达载体 pCM80 连接, 并转化至大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中, 提取质粒酶切验证(图 4A)后, 通过三亲本结合将 pCM80-*mutS* 导入相应的耐受性菌株 MB200sTB 中, 将耐受高浓度甲醇和甲醛的回补菌株分别命名为 MB200sHBc 和 MB200sHBq, 并通过 Tc 基因的 PCR 扩增进行验证(图 4B)。

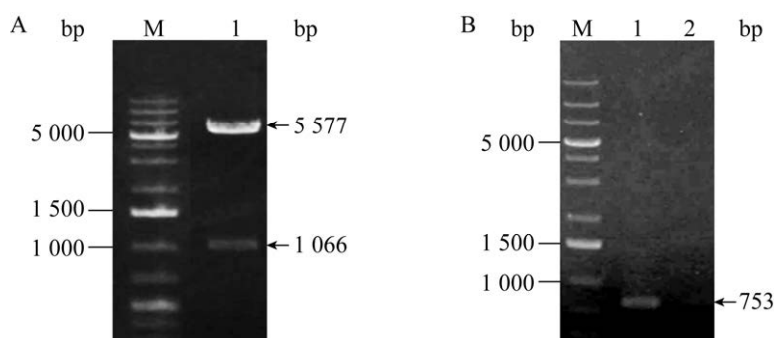


图3 重组质粒 pK18mob-mutspS 酶切验证(A)和 MB200sTB 突变体的 PCR 鉴定(B) M: GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder。A: 1: 为重组质粒 pK18mob-mutspS 的 *Pst* I 与 *Hind* III 双酶切。B: 1: 突变菌株 MB200sTB 中 Km 基因的 PCR 扩增; 2: MB200 的 Km 基因扩增

Figure 3 Recombinant plasmid pK18mob-mutspS restriction digestion (A) and PCR identification results of MB200sTB mutant (B). M: GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. A: 1: Recombinant plasmid pK18mob-mutspS digested by *Pst* I and *Hind* III. B: 1: PCR products of Km resistance gene from mutant strain MB200sTB; 2: PCR products of Km resistance gene from wild strain MB200.

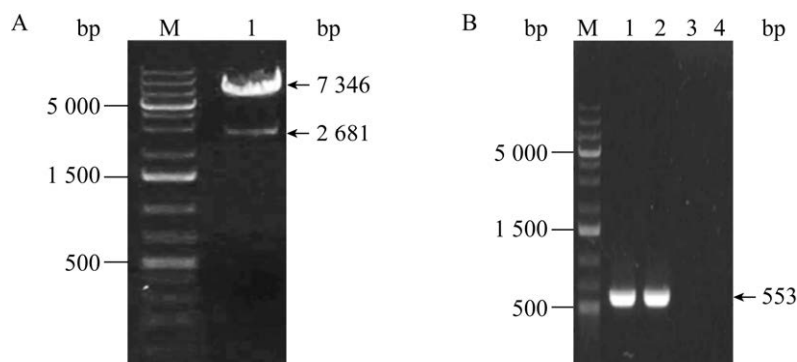


图4 表达载体 pCM80-muts 酶切验证(A)和 MB200sHBc 和 MB200sHBq 回补菌株中 Tc 基因的 PCR 鉴定(B) M: GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder。A: 1: 重组质粒 pCM80-muts 的 *Pst* I 与 *Hind* III 酶切。B: 1: 回补菌株 MB200sHBc 中含有 Tc 抗性基因; 2: 回补菌株 MB200sHBq 中含有 Tc 抗性基因; 3、4: MB200 中未发现 Tc 抗性基因

Figure 4 The expression vector pCM80-muts restriction digestion verification (A) and the PCR identification results of MB200sHBc and MB200sHBq replenishing strains (B). M: GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. A: 1: Restriction digestion verification of recombinant plasmid pCM80-muts digested by *Pst* I and *Hind* III. B: 1: Tc resistance gene was contained in the complementing strain MB200sHBc; 2: Tc resistance gene was contained in the complementing strain MB200sHBq; 3, 4: MB200 was not found Tc resistance gene.

2.5 重组菌株 MB200sHBc 和 MB200sHBq 生长情况分析

2.5.1 菌株 MB200sHBc 的生长情况

将菌株 MB200sHBc 接种到甲醇浓度逐步提高的培养基中进行诱导培养, 经过定向诱导

得到了最高甲醇耐受性为 44 g/L 的菌株, 继续传代培养 8 代验证其稳定性并保存, 对生长状况优异的菌株 MB200sHBc, 在 44 g/L 的甲醇条件下进行生长曲线测定, 由图 5 可以明显看出, 经过甲醇定向诱导得到的菌株 MB200sHBc

在 44 g/L 的条件下生长良好, 结合图 1 可以看出, 菌株 MB200sHBc 在 44 g/L 条件下的最高生长量可以达到野生菌株 MB200 在甲醇浓度为 8 g/L 的水平, 最高的 OD_{600} 可以达到 4.2 左右, MB200sHBc 的甲醇耐受性比野生型提高 5.5 倍。在甲醇低浓度的条件下野生型菌株 MB200 比定向诱导的菌株 MB200sHBc 先达到对数期, MB200 在 40 h 左右达到对数期, MB200sHBc 推迟了 36 h 左右达到对数期, 说明高浓度的甲醇对菌株生长起到了一定的抑制作用。

2.5.2 菌株 MB200sHBq 的生长情况

将菌株 MB200sHBq 接种到逐步提高甲醛浓度的培养基中, 发现菌株最高甲醛耐受性是 0.45 g/L, 对其传代培养 8 代验证其稳定性并保存。菌株 MB200sHBq 在 0.45 g/L 甲醛条件下的生长情况如图 6 所示, 可以看出经过甲醛定向诱导, 得到了最高可耐受 0.45 g/L 甲醛的菌株 MB200sHBq, 并且通过其生长曲线可以看出菌株的生长量得到了较大提高, 达到了野生型菌

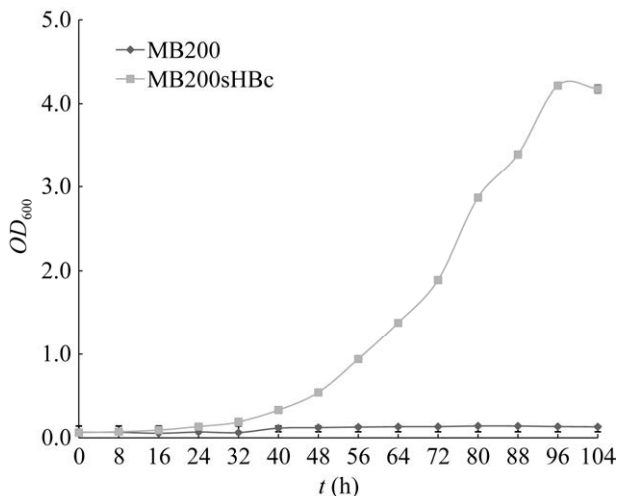


图 5 菌株 MB200sHBc 与 MB200 在 44 g/L 甲醇条件下的生长曲线

Figure 5 Growth curve of strain MB200sHBc and MB200 under 44 g/L methanol condition.

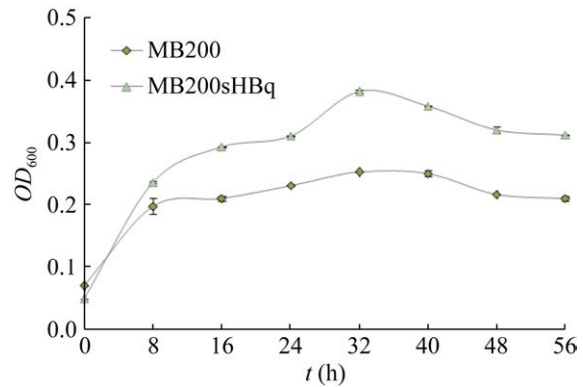


图 6 菌株 MB200sHBq 与 MB200 在 0.45 g/L 的甲醛条件下的生长曲线

Figure 6 Growth curves of strains MB200sHBq and MB200 under 0.45 g/L formaldehyde conditions.

株 MB200 的 1.69 倍, 说明菌株的甲醛耐受性得到了比较好的提升。然而从生长量来看, 以甲醛为单碳源的条件下诱导效果并不理想, 甲醛对菌株生长具有较大的抑制性。

3 讨论与结论

甲基营养菌能以甲基化合物为唯一碳源进行生产和发酵培养, 生产许多有价值的代谢产物。因此, 对甲基营养菌进行改进和改造使其成为具有商业价值的工程菌株具有重要意义。然而随着研究的深入出现了比较明显的瓶颈, 比如在甲醇作为唯一底物时, 甲醇浓度低时不能满足菌株的生长需要, 而当甲醇浓度高时菌株又受甲醇毒性影响, 生长受限; 并且菌株以甲醇为底物的生长代谢过程中会产生毒性极强的甲醛, 对菌株起到毒害作用, 导致菌株无法正常生长而死亡。针对以上问题, 除了从自然界中筛选寻找高耐受性的甲基营养菌菌株, 也可从实验室对现有菌株进行分子改造和定向诱导。国内外已有通过各种方式提高甲基营养菌的甲醇、甲醛耐受能力的报道, 结果如表 2 所示。

表 2 部分甲基营养菌耐受甲醇、甲醛情况

Table 2 Some researches about methanol and formaldehyde tolerance in *Methylobacterium* sp.

| Strain | Method | Trait change | References |
|--|--|---|------------|
| <i>Methylobacterium extorquens</i> AM1 | Plasma mutagenesis combined with laboratory self-evolution breeding | Up to 40 g/L methanol tolerance, significantly improved mevalonate MEV production and cell growth | [29] |
| <i>Methylobacterium extorquens</i> TK 0001 and AM1 | Laboratory continuous culture technology | The highest methanol tolerance is 80 g/L, and the production of lactic acid is significantly improved | [30] |
| <i>Methylobacterium</i> sp. MB200 | Mutation and laboratory-directed mutagenesis of the <i>mutL</i> gene | The highest methanol tolerance is 56 g/L, and the yield of L-serine is improved | [31] |
| <i>Methylobacterium extorquens</i> AM1 | Laboratory basic training | The minimum tolerance level of cells in formaldehyde tolerance is between 0–0.24 g/L | [32] |
| <i>Methylobacterium</i> sp. XJLW | Domestication in the laboratory | The highest formaldehyde tolerance of the strain can be increased to 1.2 g/L | [33] |
| Industrial synthetic methylotrophic host (<i>Escherichia coli</i>) | Adaptive lab evolution | Growth rate and biomass of cloned strains increased by >50% in the presence of high methanol concentrations | [34] |

本研究以 MB200 菌株为出发菌株, 通过插入缺失错配修复基因 *mutS*, 得到了高突变子 MB200sTB 菌株, 在甲醇与甲醛的条件下定向诱导。与野生型相比, 突变体的甲醇耐受性从 8 g/L 的浓度提升到了 44 g/L, 而且最高菌株生长量不受影响。突变体甲醛的定向诱导结果与野生型相比其耐受性和生长量都有所提高, 但与甲醇为碳源的诱导效果相比差距较大, 推测是因为甲醛对菌株的毒性较大, 在应用上可通过结合其他碳源, 如在以丁二酸为碳源的情况下补加甲醛的办法实现甲醛的生物转化。下一步研究将从转录组和代谢组的角度分析菌株在高浓度甲醇条件下对甲醇的代谢情况, 包括代谢途径的分析, 为甲基营养菌的进一步应用奠定基础。

REFERENCES

- [1] Amaratunga K, Goodwin PM, O'Connor CD, Anthony C. The methanol oxidation genes *mxaFJGIR(S)ACKLD* in *Methylobacterium extorquens*[J]. FEMS Microbiology Letters, 1997, 146(1): 31-38
- [2] Arps PJ, Fulton GF, Minnich EC, Lidstrom ME.

- Genetics of serine pathway enzymes in *Methylobacterium extorquens* AM1: phosphoenolpyruvate carboxylase and malyl coenzyme A lyase[J]. Journal of Bacteriology, 1993, 175(12): 3776-3783
- [3] Zhang WM, Song M, Yang Q, Dai ZX, Zhang SJ, Xin FX, Dong WL, Ma JF, Jiang M. Current advance in bioconversion of methanol to chemicals[J]. Biotechnology for Biofuels, 2018, 11: 260
- [4] Orita I, Nishikawa K, Nakamura S, Fukui T. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from methanol by *Methylobacterium extorquens* AM1 and the engineered strains under cobalt-deficient conditions[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2014, 98(8): 3715-3725
- [5] Zhu WL, Cui JY, Cui LY, Liang WF, Yang S, Zhang C, Xing XH. Bioconversion of methanol to value-added mevalonate by engineered *Methylobacterium extorquens* AM1 containing an optimized mevalonate pathway[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(5): 2171-2182
- [6] Sonntag F, Müller JEN, Kiefer P, Vorholt JA, Schrader J, Buchhaupt M. High-level production of ethylmalonyl-CoA pathway-derived dicarboxylic acids by *Methylobacterium extorquens* under cobalt-deficient conditions and by polyhydroxybutyrate negative strains[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(8): 3407-3419
- [7] Von Borzyskowski LS, Sonntag F, Pöschel L, Vorholt JA, Schrader J, Erb TJ, Buchhaupt M. Replacing the

- ethylmalonyl-CoA pathway with the glyoxylate shunt provides metabolic flexibility in the central carbon metabolism of *Methylobacterium extorquens* AM1[J]. ACS Synthetic Biology, 2018, 7(1): 86-97
- [8] Schrader J, Schilling M, Holtmann D, Sell D, Filho MV, Marx A, Vorholt JA. Methanol-based industrial biotechnology: current status and future perspectives of methylotrophic bacteria[J]. Trends in Biotechnology, 2009, 27(2): 107-115
- [9] Delaney NF, Kaczmarek ME, Ward LM, Swanson PK, Lee MC, Marx CJ. Development of an optimized medium, strain and high-throughput culturing methods for *Methylobacterium extorquens*[J]. PLoS One, 2013, 8(4): e62957
- [10] Pluschkell SB, Flickinger MC. Dissimilation of [(13)C]methanol by continuous cultures of *Bacillus methanolicus* MGA3 at 50 degrees C studied by (13)C NMR and isotope-ratio mass spectrometry[J]. Microbiology, 2002, 148(Pt 10):3223-3233
- [11] Schofield MJ, Nayak S, Scott TH, Du CW, Hsieh P. Interaction of *Escherichia coli* MutS and MutL at a DNA mismatch[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(30): 28291-28299
- [12] Marinus MG, Poteete A, Arraj JA. Correlation of DNA adenine methylase activity with spontaneous mutability in *Escherichia coli* K-12[J]. Gene, 1984, 28(1): 123-125
- [13] Lichten M, Goyon C, Schultes NP, Treco D, Szostak JW, Haber JE, Nicolas A. Detection of heteroduplex DNA molecules among the products of *Saccharomyces cerevisiae* meiosis[J]. PNAS, 1990, 87(19): 7653-7657
- [14] Marti TM, Kunz C, Fleck O. DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways[J]. Journal of Cellular Physiology, 2002, 191(1): 28-41
- [15] Štambuk S, Radman M. Mechanism and control of interspecies recombination in *Escherichia coli*. I. mismatch repair, methylation, recombination and replication functions[J]. Genetics, 1998, 150(2): 533-542
- [16] Robertson AB, Pattishall SR, Gibbons EA, Matson SW. MutL-catalyzed ATP hydrolysis is required at a post-UvrD loading step in methyl-directed mismatch repair[J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(29): 19949-19959
- [17] Grilley M, Griffith J, Modrich P. Bidirectional excision in methyl-directed mismatch repair[J]. Journal of Biological Chemistry, 1993, 268(16): 11830-11837
- [18] Burdett V, Baitinger C, Viswanathan M, Lovett ST, Modrich P. *In vivo* requirement for RecJ, ExoVII, ExoI, and ExoX in methyl-directed mismatch repair[J]. PNAS, 2001, 98(12): 6765-6770
- [19] Larrea AA, Lujan SA, Kunkel TA. SnapShot: DNA mismatch repair[J]. Cell, 2010, 141(4): 730-730.e1
- [20] Iyer RR, Pluciennik A, Burdett V, Modrich PL. DNA mismatch repair: functions and mechanisms[J]. Chemical Reviews, 2006, 106(2): 302-323
- [21] Kang M, Kim K, Choe D, Cho S, Kim SC, Palsson B, Cho BK. Inactivation of a mismatch-repair system diversifies genotypic landscape of *Escherichia coli* during adaptive laboratory evolution[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 1845
- [22] Zhang J, Wang YF, Chai BH, Wang JC, Li LL, Liu M, Zhao G, Yao LS, Gao XL, Yin YF, et al. Efficient and low-cost error removal in DNA synthesis by a high-durability MutS[J]. ACS Synthetic Biology, 2020, 9(4): 940-952
- [23] Hu CK, Zhao YQ, Sun HY, Yang YX. Synergism of Dam, MutH, and MutS in methylation-directed mismatch repair in *Escherichia coli*[J]. Mutation Research, 2017, 795: 31-33
- [24] Qiu WL, Ding K, Liao LS, Ling YC, Luo XQ, Wang JL. Analysis of the expression and prognostic value of MSH₂ in Pan-cancer based on bioinformatics[J]. BioMed Research International, 2021, 2021: 9485273
- [25] Marx CJ, Bringel F, Chistoserdova L, Moulin L, Farhan Ul Haque M, Fleischman DE, Gruffaz C, Jourand P, Knief C, Lee MC, et al. Complete genome sequences of six strains of the genus *Methylobacterium*[J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(17): 4746-4748
- [26] Izumi Y, Yoshida T, Miyazaki SS, Mitsunaga T, Ohshiro T, Shimao M, Miyata A, Tanabe T. L-serine production by a methylotroph and its related enzymes[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1993, 39(4/5): 427-432
- [27] Turner P, Barber C, Daniels M. Behaviour of the transposons Tn5 and Tn7 in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*[J]. Molecular and General Genetics MGG, 1984, 195(1/2): 101-107
- [28] Faber KN, Haima P, Harder W, Veenhuis M, Ab G. Highly-efficient electrotransformation of the yeast *Hansenula polymorpha*[J]. Current Genetics, 1994, 25(4): 305-310
- [29] Cui LY, Wang SS, Guan CG, Liang WF, Xue ZL, Zhang C, Xing XH. Breeding of methanol-tolerant *Methylobacterium extorquens* AM1 by atmospheric and room temperature plasma mutagenesis combined with

- adaptive laboratory evolution[J]. *Biotechnology Journal*, 2018, 13(6): e1700679
- [30] Belkhef S, Roche D, Dubois I, Berger A, Delmas VA, Cattolico L, Perret A, Labadie K, Perdereau AC, Darii E, et al. Continuous culture adaptation of *Methylobacterium extorquens* AM1 and TK 0001 to very high methanol concentrations[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1313
- [31] 闻东明, 黄罗冬, 杨青山, 申佩弘. 甲基营养菌 MB200 中 *mutL* 基因的突变及高耐甲醇菌株的筛选[J]. *工业微生物*, 2020, 50(4): 15-20
Wen DM, Huang LD, Yang QS, Shen PH. Mutation of *mutL* gene in methylotrophic bacteria MB200 and screening of highly methanol-tolerant strains[J]. *Industrial Microbiology*, Iyer RR 2020, 50(4): 15-20 (in Chinese)
- [32] Lee JA, Riazi S, Nemati S, Bazurto JV, Vasdekis AE, Ridenhour BJ, Remien CH, Marx CJ. Microbial phenotypic heterogeneity in response to a metabolic toxin: continuous, dynamically shifting distribution of formaldehyde tolerance in *Methylobacterium extorquens* populations[J]. *PLoS Genetics*, 2019, 15(11): e1008458
- [33] Qiu LQ, Chen WW, Zhong L, Wu WX, Wu SJ, Chen JM, Zhang FM, Zhong WH. Formaldehyde biodegradation by immobilized *Methylobacterium* sp. XJLW cells in a three-phase fluidized bed reactor[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2014, 37(7): 1377-1384
- [34] Bennett RK, Gregory GJ, Gonzalez JE, Har JRG, Antoniewicz MR, Papoutsakis ET. Improving the methanol tolerance of an *Escherichia coli* methylotroph via adaptive laboratory evolution enhances synthetic methanol utilization[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 638426