

# 利用基因组改组技术提高辅酶 Q<sub>10</sub> 产量

宋丽雅<sup>1</sup>, 乔志新<sup>2</sup>, 李伟静<sup>2</sup>, 贺敏<sup>2</sup>, 于群<sup>2</sup>

1. 北京工商大学理学院, 北京市植物资源研究开发重点实验室, 北京 100048
2. 军事医学科学院野战输血研究所, 北京 100850

**摘要** 辅酶 Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>) 是生物细胞呼吸链中的重要递氢体, 已广泛应用于心脏病、肝炎、帕金森症等多种疾病的治疗中。为了提高微生物法生产 CoQ<sub>10</sub> 的产量, 本文利用基因组改组技术选育类球红细菌辅酶 Q<sub>10</sub> 高产菌株。根据 CoQ<sub>10</sub> 的合成途径及作用机理, 确定了不同的抗性筛选标记物: 罗红霉素、卡那霉素、对羟基苯甲酸、维生素 K3 和硫化钠。根据类球红细菌对标记物的耐受性确定了抗性筛选浓度。通过紫外线、紫外线/氯化锂、硫酸二乙酯、微波及钴 60 5 种诱变方式以及抗性培养基筛选获得了 9 株改良的突变株作为出发菌株。通过一轮基因组改组得到了几株高产菌株, 其中 PN13 产 CoQ<sub>10</sub> 的量可达到 2.39mg/g, 是原菌的 2.52 倍。

**关键词** 基因组改组; 类球红细菌; 辅酶 Q<sub>10</sub>

中图分类号 Q939.9

文献标识码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2012.24.011

## Genome Shuffling of *Rhodobacter Sphaeroides* to Improve Coenzyme Q<sub>10</sub> Production

SONG Liya<sup>1</sup>, QIAO Zhixin<sup>2</sup>, LI Weijing<sup>2</sup>, HE Min<sup>2</sup>, YU Qun<sup>2</sup>

1. Beijing Key Laboratory of Plant Resources Research and Development, School of Science, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China
2. Beijing Institute of Transfusion Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

**Abstract** Coenzyme Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>) is an important electron transfer molecule in the respiratory chain and the indispensable coenzyme in the production of ATP, and it is widely used in therapeutic applications for several diseases such as heart diseases, hepatitis, Parkinson and so on. In order to improve the production of CoQ<sub>10</sub>, this paper studies the screening of the mutant *Rhodobacter sphaeroides* aiming for a higher CoQ<sub>10</sub> production by genome shuffling. According to the biosynthetic pathway and its mechanism, various resistance markers are selected, including the roxithromycin, the kanamycin, the p-hydroxy benzoic acid, the vitamin K3 and sodium sulfide (Na<sub>2</sub>S). Their concentrations are determined according to the tolerance experiments on *Rhodobacter sphaeroides*. The improved starting population including nine mutant strains is generated by different resistance markers and different mutagenesis ways, such as the ultraviolet irradiation, the ultraviolet/lithium chloride, the diethyl sulfate, the microwave radiation and the  $\gamma$  Co60. Several high CoQ<sub>10</sub>-producing colonies, including PN13, are selected from the first shuffled library. The CoQ<sub>10</sub> content of the PN13 reaches 2.39mg/g, 2.52 times of that of the wild-type strain.

**Keywords** genome shuffling; *Rhodobacter sphaeroides*; coenzyme Q<sub>10</sub>

### 0 引言

辅酶 Q (CoQ) 是生物体内广泛存在的脂溶性醌类化合物, 该分子是以 2,3-二甲氧基-5-甲基苯醌为核心, 连接聚异戊烯侧链<sup>[1]</sup>。不同来源的辅酶 Q, 侧链异戊烯单位的数目不同, 人类和哺乳动物体内的辅酶 Q 是 10 个异戊烯单位, 故称

CoQ<sub>10</sub>。其分子式为 C<sub>59</sub>H<sub>90</sub>O<sub>4</sub>, 分子量为 863, 结构式如图 1 所示。CoQ<sub>10</sub> 是人体内天然的抗氧化剂和细胞代谢激活剂, 具有较强的抗氧化作用, 可以增加 ATP 的合成, 保护生物膜结构并且能增强机体免疫反应<sup>[2-5]</sup>。目前, CoQ<sub>10</sub> 已广泛应用于医药、食品和化妆品领域, 可用于治疗心力衰竭、冠心病、高血压

收稿日期: 2012-07-13; 修回日期: 2012-08-03

基金项目: 北京市科技计划项目 (Z0005190043421); 北京工商大学学科与研究生教育-化妆品科学与技术学科建设项目 (PXM2012-014213-000068)

作者简介: 宋丽雅, 讲师, 研究方向为生物育种与酶工程, 电子信箱: songly@th.btbu.edu.cn

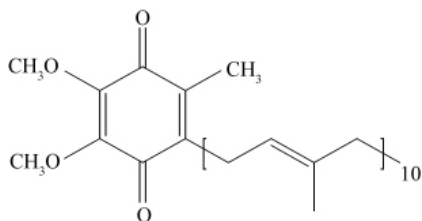


图 1 CoQ<sub>10</sub> 的结构式  
Fig. 1 Structure of CoQ<sub>10</sub>

病、糖尿病、癌症、艾滋病、急慢性肝炎、帕金森症等多种疾病。人体中,CoQ<sub>10</sub>在肝、心、肾、胰脏等组织器官中浓度较高。

CoQ 的生物合成步骤非常复杂,涉及到多种酶类,并且原核和真核生物中的合成途径也有所不同,但是均包括 3 部分:对羟基苯甲酸的合成、聚异戊烯侧链的合成以及芳香环的修饰<sup>[1]</sup>,对羟基苯甲酸是其合成的重要前体。目前,CoQ<sub>10</sub>原料的制备方法主要有 3 种:动植物提取法、化学合成法和微生物发酵法。动植物提取法主要是以猪心或者大豆为原料提取,成本较高,并受原料限制;化学合成法包括全合成和半合成两种方法,都存在副产物多、收率低和分离困难等不足;微生物生产法,1977 年首先于日本实现,该方法利用微生物发酵生产 CoQ<sub>10</sub>,不受原材料限制,易于扩大生产,产物分离相对容易,活性好,是目前被认为最有前途的生产方式。高产菌株的选育是微生物生产 CoQ<sub>10</sub>的核心,国内外学者已就此进行了一系列相关研究,并根据 CoQ<sub>10</sub>的特性和合成途径,利用维生素 K3(又称萘醌)、放线菌素 D、L-乙基硫氨酸等多种抗性平板进行高产菌株的筛选<sup>[6-9]</sup>。

基因组改组技术通过多个正突变体递进融合进行基因组随机重组,快速筛选所需表型有重大改进的菌株<sup>[10]</sup>。进行基因组改组首先需要有一个含有各种不同正突变的基因组库,继而通过原生质体融合将这些正突变菌株的全基因组进行随机重组,并筛选目的性状得到进一步改进的菌株来进行下一轮基因组改组,这样,通过多轮随机重组可以快速、高效地选育出融合了多种正向突变基因的表型得到改进的杂交菌株。该技术一经问世就吸引了生物工业界的广泛关注,并成功应用于工业生产菌种育种研究<sup>[11-14]</sup>,尤其是产物合成较为复杂的微生物育种。2002 年,Patnaik 等<sup>[15]</sup>利用该技术使调控机理极其复杂的乳杆菌的耐酸性大幅提高,乳酸产量也高于野生菌 3 倍;Zhang 等<sup>[16]</sup>等利用物理化学方法对棒状杆菌诱变处理,筛选到 5 株耐高温的突变株作为正向突变库,通过 3 轮基因组改组技术,获得了耐热的 L-谷氨酸高产突变株 F343,在 5L 发酵罐中比原始出发菌株产量提高 1.8 倍。

本研究旨在利用基因组改组技术选育类球红细菌 *Rhodobacter sphaeroides* 辅酶 Q<sub>10</sub> 高产菌株。根据 CoQ<sub>10</sub>的合成途径及作用机理,确定了不同的抗性筛选标记物:罗红霉素、卡那霉素、对羟基苯甲酸、维生素 K3 和硫化钠。通过紫外线、紫外线/氯化锂、硫酸二乙酯、微波及钴 60 5 种诱变方式以及抗性培养基筛选获得改良的出发菌株(正向突变库),进而进

行基因组改组,以期获得 CoQ<sub>10</sub>的高产菌株。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种

类球红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*),兼性厌氧菌,购自中国普通微生物保藏管理中心。

#### 1.1.2 试剂与溶液

罗红霉素(北京市第一生物化学药业公司),硫化钠(北京化学试剂公司),卡那霉素(华北制药集团),对羟基苯甲酸(国药集团化学试剂公司),维生素 K3(北京市第一生物化学药业公司),溶菌酶(Amresco),聚乙二醇 6000(PEG 6000)(FLUKA)。

SMM 缓冲液:蔗糖 0.5mol/L, MgCl<sub>2</sub> 0.02mol/L。调 pH 为 7.0。121℃, 20min 高压灭菌,于 4℃保存备用。

#### 1.1.3 培养基

基础培养基(低渗培养基):牛肉膏 1.5g/L,葡萄糖 1.0g/L,酵母提取物 1.5g/L,胰蛋白酶 5.0g/L, NaCl 3.5g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 6.08g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.32g/L, pH 7.0。以上培养基 121℃, 20min 高压灭菌。固体培养基中加入 1.5%—2.0%的琼脂粉。

再生培养基(高渗培养基):在基础培养基的基础上,添加 10%的蔗糖。

抗性培养基:分别称取不同浓度的罗红霉素、对羟基苯甲酸、卡那霉素、硫化钠和维生素 K3 溶于去离子水或无水乙醇中,过滤除菌。将不同抗性化合物分添加到基础培养基或再生培养基中,配制成不同浓度的抗性培养基。

## 1.2 方法

### 1.2.1 抗性标记物的耐受性

挑取单菌落,接种于 5mL 液体培养基中,震荡培养 20h 后以 10%接种量转接于 10mL 液体培养基,培养 10h,将菌液稀释涂布于含有不同浓度的罗红霉素、卡那霉素、对羟基苯甲酸、硫化钠和维生素 K3 的抗性培养基平板中和基础培养基平板中,放置于 30℃培养箱中,培养 72h 后进行菌落计数,确定不同抗性标记物筛选时的浓度。

### 1.2.2 物理化学方法对 *R.sphaeroides* 菌的诱变及抗性筛选

挑取单菌落,接种于 5mL 液体培养基中,震荡培养 20h 后以 10%接种量转接于 10mL 液体培养基,培养 10h, 3000r/m 离心 5min,弃去上清液,生理盐水洗涤 3 次,重悬于生理盐水中,稀释细胞浓度至 10<sup>6</sup>/mL。

紫外诱变:取 5mL 菌悬液置于 6cm 无菌平皿中,在功率 15W, 距离 30cm 的紫外线灯下分别搅拌照射 30, 60, 90, 120, 150, 180s, 红灯下稀释涂板。于黑暗条件下培养 72h, 菌落计数,绘制致死率曲线。

紫外/LiCl 诱变:设置了几组紫外线与 LiCl 的不同组别的组合。组别 1:LiCl 200mg;组别 2:LiCl 200mg+UV 30s;组别 3:LiCl 200mg+UV 60s;组别 4:LiCl 200mg+UV 90s;组别 5:LiCl 200mg+UV 120s;组别 6:LiCl 200mg+UV 150s。

硫酸二乙酯 (DES) 诱变: 取菌悬液 1mL, 加入 DES 0.01mL, 于 100r/min 摇床中分别处理, 5, 10, 20, 30 和 40min, 加入 0.025mL 25% 的硫代硫酸钠溶液中中止反应, 稀释、涂板, 绘制致死率曲线。

微波诱变: 取菌悬液 5mL 置于 6cm 无菌平皿中, 放入微波炉, 功率选择“4”档。分别加热 20, 40, 60, 80 和 100s。其中, 每 10s 取出平皿置于冰浴中降温, 稀释、涂板, 绘制致死曲线。根据致死率曲线, 确定不同方法的诱变条件。

钴 60 (Co60 $\gamma$ ) 诱变: 将在基础培养基生长 72h 的 *R.sphaeroides* 菌落和生长 24h 的菌液, 进行 Co60 $\gamma$  的照射, 照射强度为 5GY。

利用紫外、紫外/LiCl、DES 钴 60 (5GY) 及微波对 *R.sphaeroides* 菌进行诱变处理, 将诱变后的菌液倍比稀释, 涂布不同浓度的抗性标记物平板, 置 30 $^{\circ}$ C 培养 72h 后, 挑取单菌落接种于加入了抗性筛选标记物的液体基础培养基中, 于 30 $^{\circ}$ C 恒温振荡培养 36h 后收集菌体, 利用超声破碎法破碎菌体<sup>[17]</sup>, 利用 CoQ<sub>10</sub> 在碱性条件下与氰乙酸乙酯反应, 中间产物显蓝色的分光光度法 (craven test 法) 测定 CoQ<sub>10</sub> 含量<sup>[18]</sup>。

1.2.3 原生质体的制备与融合

将带有不同抗性标记的菌株进行液体培养, 取对数生长期菌液, 6000r/min, 10min 离心收集菌体, 以 SMM 缓冲液洗涤菌体 2 次, 收集菌体沉淀, 加入等体积的 1.0mg/mL 的溶菌酶

溶液, 于 37 $^{\circ}$ C 的恒温摇床中 85r/min 震荡 1h, 离心, 收集沉淀, 以 SMM 缓冲液洗涤 2 次。以 SMM 缓冲液重悬菌体, 6000r/min, 离心 10 min, 收集沉淀, 加入 0.1mol/L 氯化钙溶液 4mL, 重悬菌体后, 于室温下放置 30min。将重悬后的菌液离心, 6000r/min, 10min。弃去上清, 加入 35% PEG6000 的 SMM 溶液 1mL, 使不同抗性突变株融合 5min。将融合后的菌悬液离心, 8000r/min, 15min, 收集菌体, SMM 缓冲液洗涤 2 次, 以 SMM 缓冲液混匀以一定稀释度涂布于 10% 蔗糖的再生抗性平板中。将平板置于 30 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养, 72h 后观察再生平板中融合子的生长情况。挑选融合子进行发酵培养, 进行 CoQ<sub>10</sub> 含量的测量。

2 结果与分析

2.1 抗性标记物的耐受性

通过 *R.sphaeroides* 菌耐受性实验, 得到了不同抗性标记物的耐受浓度, 从而确定了后续试验抗性突变株的筛选浓度分别为: 罗红霉素: 7—10mg/L; 卡那霉素: 9—10mg/L; 对羟基苯甲酸: 0.1%—0.15% (质量体积比); 硫化钠: 10—15mg/mL; 维生素 K3: 10—15mg/L (表 1)。

2.2 诱变突变株及出发菌株的获得

根据不同诱变条件的致死曲线 (图 2—图 5), 确定了诱变条件, 使之致死率达到 80%—90%。

表 1 *R.sphaeroides* 菌耐受性实验  
Table 1 Tolerance of *Rhodobacter sphaeroides*

| 抗性化合物                         | 罗红霉素浓度<br>/(mg·L <sup>-1</sup> ) |      |       |   | 卡那霉素浓度<br>/(mg·L <sup>-1</sup> ) |      |       |   | 对羟基苯甲酸浓度<br>/% |     |     |     | Na <sub>2</sub> S 浓度<br>/(mg·mL <sup>-1</sup> ) |     |    |    | VK <sub>3</sub> 浓度<br>/(mg·L <sup>-1</sup> ) |       |       |    |
|-------------------------------|----------------------------------|------|-------|---|----------------------------------|------|-------|---|----------------|-----|-----|-----|---|-----|----|----|--|-------|-------|----|
|                               | 1                                | 3    | 5     | 7 | 3                                | 5    | 7     | 9 | 0.05           | 0.1 | 0.2 | 0.4 | 1   | 5   | 10 | 15 | 0.5  | 1     | 5     | 10 |
| <i>R.sphaeroides</i><br>存活率/% | 1.0                              | 0.06 | 0.003 | 0 | 0.29                             | 0.05 | 0.003 | 0 | 0.22           | 0   | 0   | 0   | 3   | 0.4 | 0  | 0  | 0.04   | 0.007 | 0.001 | 0  |

利用物理化学方法对 *R.sphaeroides* 菌进行诱变处理, 初步筛选得到了一系列高产突变株 (表 2), 其中, 罗红霉素抗性平板筛选得到的 LH13 CoQ<sub>10</sub> 含量可达到 2.01mg/g, 较原菌提高了 1.11 倍; 对羟基苯甲酸抗性平板筛选得到的 PHB31,

CoQ<sub>10</sub> 含量可达到 1.81mg/g, 较原菌提高了 0.91 倍。

另外, 硫化钠抗性筛选得到的 1 株 Na<sub>2</sub>S16, 与氰乙酸乙酯反应, 中间产物呈黄色, 与正常的蓝色反应不同, 而该反应为醌环类物质特有反应, 因此推测 Na<sub>2</sub>S16 样品中可能含有醌

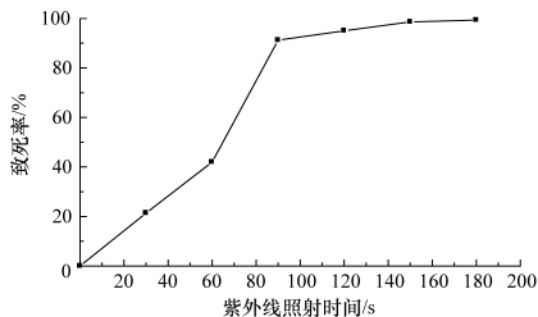


图 2 紫外线诱变致死率

Fig. 2 Fatality rate of *Rhodobacter sphaeroides* under ultraviolet

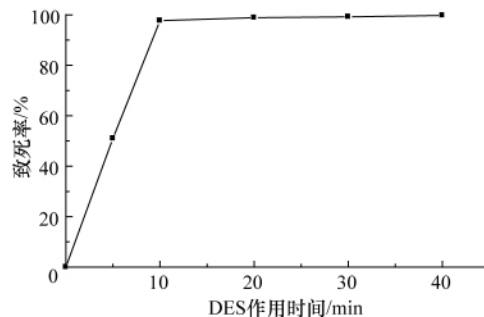


图 3 硫酸二乙酯诱变致死率

Fig. 3 Fatality rate of *Rhodobacter sphaeroides* under diethyl sulfate

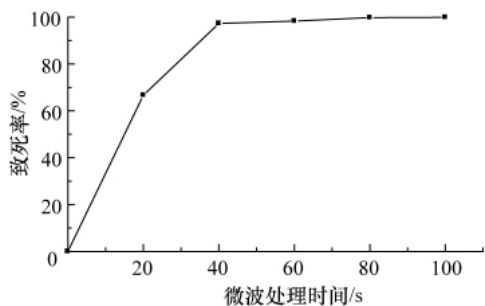


图 4 微波诱变致死率

Fig. 4 Fatality rate of *Rhodobacter sphaeroides* under microwave radiation

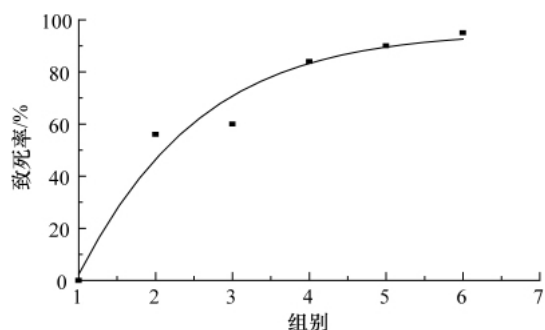


图 5 UV/LiCl 诱变致死曲线

Fig. 5 Fatality rate of *Rhodobacter sphaeroides* under ultraviolet/lithium chloride

环的类似物;由于硫化钠对呼吸链产生的阻断抑制,可提高菌体内 CoQ<sub>10</sub> 的积累,Na<sub>2</sub>S16 样品中可能含有 CoQ<sub>10</sub> 的前体物质,因而将 Na<sub>2</sub>S16 菌株也作为基因组改组的出发菌株,进行下面的基因组改组研究。

表 2 抗性筛选获得的突变株

Table 2 Mutant strains screened by resistance markers

| 筛选抗性   | 菌株编号                 | CoQ <sub>10</sub> 含量/(mg·g <sup>-1</sup> ) | 提高倍数 |
|--------|----------------------|--|------|
| 罗红霉素   | LH11                 | 1.67                                       | 0.76 |
|        | LH13                 | 2.01                                       | 1.11 |
|        | LH15                 | 1.56                                       | 0.64 |
|        | LH30                 | 1.74                                       | 0.84 |
| 卡那霉素   | KM5                  | 1.62                                       | 0.70 |
| 对羟基苯甲酸 | PHB31                | 1.81                                       | 0.91 |
|        | Na <sub>2</sub> S    | —  | —    |
| 维生素 K3 | VK7                  | 1.56                                       | 0.64 |
|        | VK12                 | 1.45                                       | 0.52 |
| —      | <i>R.sphaeroides</i> | 0.95                                       | —    |

### 2.3 基因组改组

将前面筛选到的带有不同抗性标记物的高产突变菌株

两两间进行原生质体融合、筛选。经过一轮融合,初步筛到 9 株高产突变株(表 3),其中,利用菌株 PHB31 作为出发菌株的融合菌株产量较高,由 PHB31 和 Na<sub>2</sub>S16 融合而来的 PN13 菌株生产 CoQ<sub>10</sub> 的量可达到 2.39mg/g,是原菌的 2.52 倍。究其原因可能包括两方面:(1) 出发菌株 PHB31 的产量较高;(2) 对羟基苯甲酸作为抗性筛选物可以增加菌株对于 CoQ<sub>10</sub> 合成前体的耐受性,其积累的优势基因能够与其他几种抗性筛选物积累的优势基因互补以提高 CoQ<sub>10</sub> 产量。而利用罗红霉素、卡那霉素作为出发菌株进行融合的融合菌株产量均不理想,所以在后面的融合过程中应进一步根据 CoQ<sub>10</sub> 的特性选择融合亲本菌株。

表 3 基因组改组获得的突变菌株  
Table 3 Mutant strains screened by genome shuffling

| 菌株编号                 | 来源                         | CoQ <sub>10</sub> 含量/(mg·g <sup>-1</sup> ) | 提高倍数 |
|----------------------|----------------------------|--|------|
| <i>R.sphaeroides</i> | —                          | 0.95                                       | —    |
| KP2                  | KM5, PHB31                 | 1.17                                       | 0.23 |
| PVK3                 | PHB31, VK7                 | 1.78                                       | 0.85 |
| PVK4                 | PHB31, VK7                 | 1.32                                       | 0.39 |
| PVK9                 | PHB31, VK12                | 1.57                                       | 0.66 |
| PKM3                 | PHB31, KM5                 | 1.65                                       | 0.73 |
| PKM5                 | PHB31, KM5                 | 1.53                                       | 0.61 |
| PN13                 | PHB31, Na <sub>2</sub> S16 | 2.39                                       | 1.52 |
| PN2                  | PHB31, Na <sub>2</sub> S16 | 1.19                                       | 0.26 |
| PN16                 | PHB31, Na <sub>2</sub> S16 | 1.50                                       | 0.58 |
| PN17                 | PHB31, Na <sub>2</sub> S16 | 1.42                                       | 0.49 |

### 3 讨论

利用基因组改组技术获得高产突变株的关键是获得多种正向突变基因构成的大容量突变库,本研究采用了多种诱变方法结合多种筛选平板来富集不同类型的正向突变株,从而得到大容量正向突变库。

基因组改组技术的核心是原生质体融合,确定原生质体融合的抗性筛选标记物是原生质体融合效率的重要保证,因而本研究根据 CoQ<sub>10</sub> 的作用机理及合成途径选取了几种不同的抗性筛选标记物:罗红霉素、对羟基苯甲酸、卡那霉素、硫化钠和维生素 K3,原因如下:罗红霉素为大环内酯类抗生素,可与溶液中的溶解氧分子结合后经电荷转移生成超氧阴离子,由于 CoQ<sub>10</sub> 具有抗氧化作用,所以选取罗红霉素作为筛选标记物;对羟基苯甲酸是 CoQ<sub>10</sub> 生物合成的前体物质,维生素 K3,是与 CoQ<sub>10</sub> 结构类似的醌类化合物,所以对羟基苯甲酸和维生素 K3 作为底物、产物或其结构类似物被选定为筛选标记物;CoQ<sub>10</sub> 是呼吸链中重要的递氢体,而硫化钠则为一种呼吸链抑制剂,因而被选定为筛选标记物,其抗性筛选可能会

导致突变株中 CoQ<sub>10</sub> 得到大量积累;卡那霉素作为 CoQ<sub>10</sub> 还原反应的抑制剂也被确定为抗性筛选标记物。上述几种标记物既可以帮助传统诱变处理后 CoQ<sub>10</sub> 高产菌株的高效筛选,又可以获取 CoQ<sub>10</sub> 合成中不同阶段、不同层次合成调控发生改变突变体,扩大了正向抗性突变库的容量,还可以保证融合子的有效筛选,维持融合子的稳定性。

戚薇等<sup>[9]</sup>利用维生素 K3 进行抗性筛选,筛选到的突变株 CoQ<sub>10</sub> 产量分别为 57.3mg/L 和 59.9mg/L, 较出发菌株提高了 35.7%和 41.6%。Yoshida 等<sup>[6]</sup>从 34 株野生菌株中挑选了 CoQ<sub>10</sub> 产量较高的根瘤农杆菌 KY-3085、脱氮副球菌 KY-3940 和球形红杆菌 KY-4113, 以化学诱变剂等传统方法进行诱变处理,并利用 L-乙硫氨酸、柔红霉素、维生素 K3 等进行抗性筛选,经过 5 轮诱变,4 轮抗性筛选,得到了 1 株绿色突变株,CoQ<sub>10</sub> 产量可高达 346.8mg/L 和 8.7mg/g 干细胞,分别是野生菌株的 2.8 倍和 3.6 倍。本文将抗性筛选与基因组改组结合起来,积累优势基因,经过一轮基因组改组,抗性突变株 PN13 产量即提高至原菌的 2.52 倍,大大缩短了筛选时间,显现出了将二者结合的优势,充分说明了基因组改组技术筛选 CoQ<sub>10</sub> 高产突变株的快速有效。但是,目前本研究所构建的正向抗性突变库容量仍然有限,正向突变基因的种类还不够丰富,限制了基因组改组技术的应用,因而需要进一步丰富正向突变库。本研究下一步将继续扩大正向抗性突变库进行基因组改组育种,将现有的通过基因组改组技术获得的高产突变株与其亲本株融合,以期获得更高产的突变株。

#### 4 结论

根据 CoQ<sub>10</sub> 的合成途径及作用机理,确定了罗红霉素、卡那霉素、对羟基苯甲酸、维生素 K3 和硫化钠作为抗性筛选标记物;通过紫外线、紫外线/氯化锂、硫酸二乙酯、微波及钴 60 5 种方式对 *R.sphaeroides* 进行诱变处理,利用抗性标记物筛选出 9 株突变株作为出发菌株构建正突变库;通过一轮基因组改组获得了高产菌株,其中 PN13 产 CoQ<sub>10</sub> 的量可达 2.39mg/g,是原菌的 2.52 倍。

#### 参考文献 (References)

- [1] Choi J, Ryu Y, Seo J. Biotechnological production and applications of coenzyme Q<sub>10</sub>[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 68(1): 9-15.
- [2] Klingen A R. Redox-linked protonation state changes in Cytochrome bc1 identified by Poisson-Boltzmann electrostatics calculations [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1767(3): 204-221.
- [3] Zhu J. Simultaneous reduction of iron-sulfur protein and Cytochrome b (L) during ubiquinol oxidation in Cytochrome bc1 complex [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2007, 104(12): 4864-4869.
- [4] Ingledew W J, Poole R K. The respiratory chains of *Escherichia coli*[J]. *Microbiol Rev*, 1984, 48(3): 222-271.
- [5] Larijani V N, Ahmadi N, Zeb I, et al. Beneficial effects of aged garlic extract and coenzyme Q<sub>10</sub> on vascular elasticity and endothelial function: The FAITH randomized clinical trial [J/OL]. *Nutrition*. [2012-08-01]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22858191>.

- [6] Yoshida H, Kotani Y, Ochiai K, et al. Production of ubiquinone-10 using bacteria[J]. *J Gen Appl Microbiol*, 1998, 44(1): 19-26.
- [7] Sakato K, Tanaka H, Shibata S, et al. Agitation-aeration studies on coenzyme Q<sub>10</sub> production using *Rhodospseudomonas spheroids* [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 1992, 16(1): 19-28.
- [8] 李焱生, 方建军, 钟卫鸿. 微生物法高产辅酶 Q<sub>10</sub> 的研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2009, 20(2): 59-62.  
Li Yansheng, Fang Jianjun, Zhong Weihong. *Biotechnology Bulletin*, 2009, 20(2): 59-62.
- [9] 戚薇, 李静, 李剑, 等. 高产辅酶 Q<sub>10</sub> 结构类似物抗性突变株的选育[J]. *工业微生物*, 2007, 37(6): 12-15.  
Qi Wei, Li Jing, Li Jian, et al. *Industrial Microbiology*, 2007, 37(6): 12-15.
- [10] 陈涛, 陈洵, 王靖宇, 等. DNA 及基因组改组在代谢工程中的应用[J]. *化工学报*, 2004, 55(11): 1753-1758.  
Chen Tao, Chen Xun, Wang Jingyu, et al. *Journal of Chemical Industry and Engineering*, 2004, 55(11): 1753-1758.
- [11] Zhang Y X, Perry K, Vinci V A, et al. Genome Shuffling Leads to Rapid Phenotypic Improvement in Bacteria[J]. *Nature*, 2002, 415(6872): 644-646.
- [12] Zhang W, Geng A. Improved ethanol production by a xylose-fermenting recombinant yeast strain constructed through a modified genome shuffling method[J]. *Biotechnol Biofuels*, 2012, 5(1): 46.
- [13] Cao X, Song Q, Wang C, et al. Genome shuffling of *Hansenula anomala* to improve flavour formation of soy sauce [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2012, 28(5): 1857-1862.
- [14] Luo J M, Li J S, Liu D, et al. Genome shuffling of streptomyces gilvosporeus for improving natamycin production[J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(23): 6026-6036.
- [15] Patnaik R, Louie S, Gavrilovic V, et al. Genome shuffling of *Lactobacillus* for improved acid tolerance [J]. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(7): 707-712.
- [16] Zheng P, Liu M, Liu X D, et al. Genome shuffling improves thermotolerance and glutamic acid production of *Corynebacteria glutamicum*[J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2012, 28(3): 1035-1043.
- [17] 李伟静, 乔志新, 贺敏, 等. 快速提取类球红细菌中辅酶 Q<sub>10</sub> 的方法研究[J]. *生物技术通讯*, 2009, 20(2): 221-223.  
Li Weijing, Qiao Zhixin, He Min, et al. *Letters in Biotechnology*, 2009, 20(2): 221-223.
- [18] 陈瑜. 发酵法生产辅酶 Q<sub>10</sub> 的含量分析及工艺优化 [J]. *科技通报*, 2002, 18(4): 334-336.  
Chen Yu. *Buttletin of Science and Technology*, 2002, 18(4): 334-336.

(责任编辑 吴晓丽)

#### 《科技导报》“综述文章”栏目征稿

“综述文章”栏目发表对当前自然科学有关学科领域的研究热点、前沿分支发展现状及动向的评述性文章。要求在所属学科领域从事比较深入研究的一线科研人员在研读相当数量文献资料的基础上,全面、深入、系统地论述该领域的问题,并对所综述的内容进行归纳、分析、评价,以反映作者的观点和见解。在线投稿: [www.kjdb.org](http://www.kjdb.org)。