

利用空间诱变选育辅酶 Q₁₀ 高产菌

党磊, 田菁, 印红, 王玮, 王小雪, 庞欣

中国空间技术研究院空间生物实验室, 北京 100190

摘要 以空间搭载为诱变手段, 筛选可用于工业化生产的辅酶 Q₁₀ 高产菌株。以类球红细菌 (*Rhodobacter sphaeroides*) 为出发菌株进行空间搭载, 根据菌落形态进行初筛, 摇瓶发酵进行复筛, HPLC 检测含量等方法筛选辅酶 Q₁₀ 高产菌株。最终得到名为 Shenzhou6 的突变株产量比对照菌株提高 30%, 产量可达 (0.8±0.02)g/L, 经过优化培养可满足工业生产需要。同时也说明空间诱变因其复杂的空间环境条件, 可以作为一种诱变手段进行工业化菌样的筛选。

关键词 类球红细菌; 辅酶 Q₁₀; 空间诱变

中图分类号 Q691, TQ924

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2010)14-0040-04

Screening of CoQ₁₀ Highly Productive Mutant Strains by Spaceflight Mutation

DANG Lei, TIAN Jing, YIN Hong, WANG Wei, WANG Xiaoxue, PANG Xin

Space Biology R&D Center, China Academy of Space Technology, Beijing 100190, China

Abstract Spaceflight mutation was carried out to improve Coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀) yield to be utilized in industrial microbial fermentation. CoQ₁₀ high yield mutants were screened from *Rhodobacter sphaeroides* that was collected from a recoverable satellite after a 15-day flight in space. High yield mutant strains were selected based on colony morphology, including colony size and color, and then screened using the method of shake flask fermentation. The CoQ₁₀ production was measured using HPLC. The CoQ₁₀ production of the mutant strain named "Shenzhou 6" reached (0.8±0.02)g/L, 33% higher than the control group. The production could be increased with the optimization of fermentation conditions and the strain could be utilized in the industrial microbial fermentation. Meanwhile, the result revealed that spaceflight showed multi-factor mutagenic effect on *Rhodobacter sphaeroides* compared to the traditional single-factor mutagenesis methods. It could increased CoQ₁₀ production of isolated strains, and could be utilized in industrial microbial mutagenesis and breeding in the future.

Keywords *Rhodobacter sphaeroides*; CoQ₁₀; spaceflight mutation

0 引言

辅酶 Q₁₀ (Coenzyme Q₁₀, CoQ₁₀) 又称泛醌, 是一类维生素物质, 以极低的含量存在于动物、植物、微生物等细胞内, 并能在所有的有机体组织中合成。由于辅酶 Q₁₀ 是细胞自身合成的天然抗氧化剂和细胞代谢激活剂, 能保护蛋白、DNA 分子等免受由自由基诱导的氧化作用的侵害而被广泛应用于药物、化妆品、食品等行业^[1-4]。

生产辅酶 Q₁₀ 原料的方法主要有生物提取法、茄呢醇半合成法和微生物发酵法 3 种, 其中微生物发酵法生物活性高、原料成本低并可通过规模放大提高生产能力, 被公认为

是最具优势和潜力的一种技术工艺^[5-6]。目前获得辅酶 Q₁₀ 高产菌株的主要方法还是利用传统的物理或化学方法进行诱变育种, 仅有日本学者报道过用于生产的辅酶 Q₁₀ 高产菌株的选育, 在国内也有进行选育辅酶 Q₁₀ 高产菌株的研究报道, 但得到的菌株辅酶 Q₁₀ 产量较低, 不能用于工业生产^[7-8]。

近些年来空间诱变育种被广泛应用于微生物育种, 并取得了一定的成果^[9-10], 但将空间诱变技术应用于类球红细菌筛选辅酶 Q₁₀ 高产菌株还没有报道。本实验利用空间搭载技术对类球红细菌进行空间诱变选育, 通过筛选, 得到能用于工业化生产的辅酶 Q₁₀ 高产菌株。

收稿日期: 2010-05-18

基金项目: 国防基础科研项目 (A0320061236); 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 项目 (2008AA12A218-14)

作者简介: 党磊, 工程师, 研究方向为空间生物学, 电子信箱: danglei1981@163.com; 庞欣 (通信作者), 研究员, 研究方向为空间生物学, 电子信箱: xinpangli@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 菌株

类球红细菌 (*Rhodobacter Sphaeroides*), 中国空间技术研究院空间生物实验室自有。

1.2 搭载条件

1.2.1 搭载样品准备

取生长良好菌株的新鲜固体培养物, 在无菌条件下转移到搭载专用管中, 拧紧管盖, 接口处用封口膜封口后装入搭载用大管, 送交搭载前于 4℃ 保存。此搭载管放入“实践”8 号航天育种卫星的实验装置中, 在太空中随飞船飞行 15d 后回收。

1.2.2 搭载的空间环境

育种卫星飞行过程中, 空间环境的相关数据为: 卫星姿态控制为三轴稳定姿态, 其中卫星的 I 象限指向地面, 卫星回收舱小头为飞行方向。育种卫星轨道为椭圆形倾斜轨道, 卫星运行在近地点高度 180km、远地点高度 460km 的轨道上, 轨道倾角 63°, 近地点位置在北纬 35° 附近, 卫星飞行 15d, 共飞行 236 圈, 236 圈后通过回收区中心。测试结果表明, 本次飞行试验期间空间辐射剂量最大为 5.893mGy, 最小为 2.484mGy。卫星在轨期间种子测温点的最高温度为 20.72℃, 最低温度为 7.21℃。

1.3 类球红细菌突变株的地面筛选、分离和提取

1.3.1 菌株培养

1) 固体培养基质量百分比 (%): 葡萄糖 2.0, 牛肉膏 0.3, 鱼蛋白胨 1.0, 酵母膏 0.5, 氯化钠 0.5, 琼脂粉 0.5~2.0, pH 值 7.0。

2) 种子液质量百分比 (%): 葡萄糖 2.0, 鱼蛋白胨 1.0, 酵母粉 1.0, 氯化钠 0.5, 碳酸钙 0.5, pH 值 6.2; 500mL 三角瓶装, 8 层纱布封口灭菌。

3) 发酵液质量百分比 (%): 葡萄糖 2.7, 白砂糖 2.0, 玉米浆 4.0, 硫酸铵 0.8, 磷酸二氢钾 0.05, 磷酸氢二钾 0.05, 硫酸镁 0.025; 500mL 三角瓶分装, 8 层纱布封口灭菌。

4) 固体培养条件: 菌种接种到带有固体培养基的培养皿或试管中, 于 30℃ 培养 2~7d。

5) 种子液培养条件: 用无菌接种环从培养皿或斜面中取菌体适量, 接种到已灭菌的种子液中, 30℃, 120~300r/min 摇床培养 24~48h。

6) 发酵培养条件: 按照 2%~10% 接种比例, 将培养好种子液接种到发酵培养基中, 30℃, 150~300r/min 摇床培养 7d。

1.3.2 菌株地面筛选

在无菌条件下取搭载回收样品, 用无菌水洗脱菌体到无菌离心管中, 用移液器吸打均匀菌体洗脱液, 进行倍比稀释。取稀释 10⁴ 和 10⁵ 倍的稀释液涂布到平板培养基, 待菌液被培养基吸收后于培养箱中 30℃ 倒置培养 2~7d。

待平板上长出菌落后, 挑选颜色变深或呈粉色、菌落较大的用小量摇瓶发酵, 进行初筛。初筛菌株的发酵液于 8000 r/min 条件下离心 8min, 取沉淀 60~80℃ 烘干, 研磨后按质量体积比 (1:100) 加入无水乙醇, 超声处理 1~2h, 处理液 8000r/min

条件下离心 10min, 取上清液, 利用高效液相色谱进行检测。挑选辅酶 Q₁₀ 含量比对照菌株高的深颜色菌落进行复筛。复筛后菌株进行多次传代培养, 获得遗传稳定的菌株进行检测和菌株保存。

1.4 发酵产物 CoQ₁₀ 的检测

1.4.1 提取

向各发酵液中加入 6mol/L 盐酸, 调 pH 值到 2.0~4.0, 之后加入 6mol/L 氢氧化钠溶液, 使 pH 值恢复到 6.0~8.0, 将菌液于 8000r/min 条件下离心 10min, 取菌体, 按照固液比例 (1:100) 加入石油醚, 打散菌体, 使之与提取溶剂混合均匀。45℃ 摇床, 180r/min 条件下提取 2h。提取液 8000r/min 条件下离心 10min, 取上清液在旋转蒸发仪上进行旋转蒸发。

1.4.2 检测

将蒸发后的干物质用无水乙醇溶解, 检测方法参见《中华人民共和国药典》中辅酶 Q₁₀ 的检测方法进行。以甲醇-无水乙醇 (1:1) 为流动相, 柱温 35℃, 检测波长为 275nm。辅酶 Q₁₀ 标准品购自 Sigma 公司。

1.5 菌株鉴定

利用 16S rDNA 测序方法进行菌株鉴定。提取出发菌株和高产菌株的总 DNA, 具体实验过程参见试剂盒 (天根生化科技有限公司) 说明书。利用细菌 16S 通用引物对待测细菌 16S 进行 PCR 扩增, 引物序列为: F27: 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3', R1492: 5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'。PCR 扩增。50μL 的 PCR 反应体系组分为: dNTPs, 4μL; buffer, 5μL; F27, 4μL; R1492, 4μL; DNA 模板, 2μL; Taq 酶, 0.25μL; ddH₂O, 30.75μL。

PCR 反应程序: 95℃ 5min, 94℃ 1min, 56℃ 1min, 72℃ 2min, 30 个循环, 72℃ 10min。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳进行检测。样品送生工生物工程 (上海) 有限公司进行测序。

2 结果与分析

2.1 菌株筛选

搭载后的菌株经倍比稀释处理培养后, 在平板培养物中共得到 328 个单菌落, 根据文献 [2], 以色深突变表型为 CoQ₁₀ 高产菌株重要的筛选标志, 以菌落大小和颜色为筛选标准, 在这 328 个单菌落中筛选菌落较大且颜色较深的菌落, 共获得 73 个菌落。对这 73 个单菌落进行发酵培养, HPLC 检测发酵含量, 从这 73 株菌株中筛选辅酶 Q₁₀ 含量高产菌株。

为保证菌株的遗传稳定性, 对高产菌株进行稳定性实验。采用 4℃ 冰箱保存和传代实验, 经过多次传代后, 对高产菌株进行摇瓶发酵, HPLC 检测辅酶 Q₁₀ 含量。

2.2 菌株 CoQ₁₀ 含量

经初筛和多次复筛, 以及稳定性实验后, 得到一株辅酶 Q₁₀ 的高产菌株, 命名为 Shenzhou6, 其辅酶 Q₁₀ 的发酵单位能够达到 (0.8±0.02)g/L, 较出发菌株的 (0.6±0.01)g/L 提高了 33% (图 1)。目前已对 CoQ₁₀ 产生菌进行了大量实验, 期望获得高产菌株, 但效果均不理想, 离工业化生产还有很大差距 (表 1)。

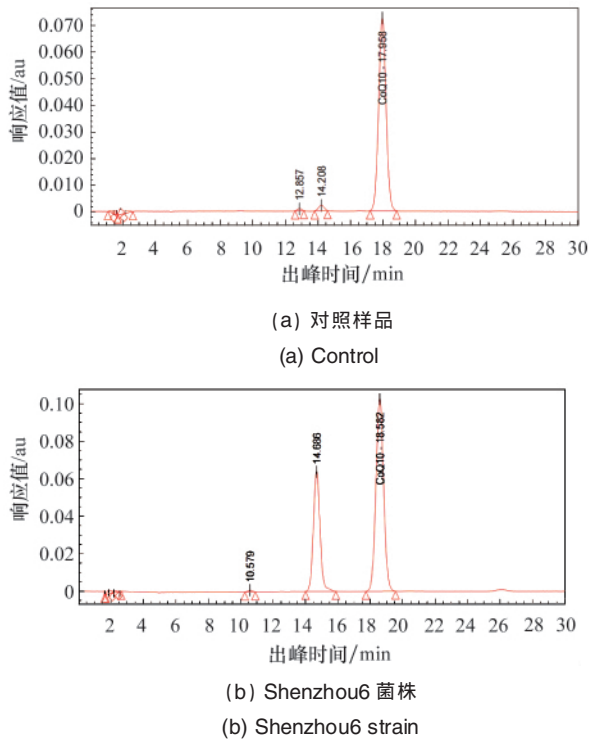


图1 对照菌株与 Shenzhou6 菌株 HPLC 自动标尺色谱图
Fig. 1 HPLC chromatograms of CoQ₁₀

表 1 辅酶 Q₁₀ 产生菌及其产量
Table 1 CoQ₁₀-producing microorganisms and CoQ₁₀ content

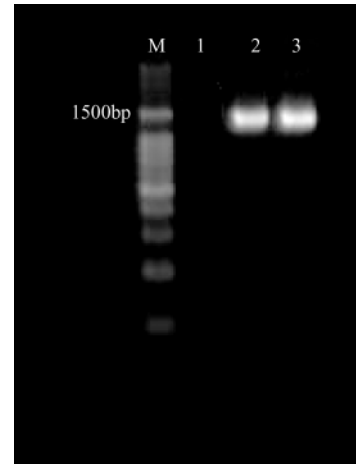
CoQ ₁₀ 产生菌	CoQ ₁₀ 产量 (g·L ⁻¹)
根癌土壤杆菌 (<i>Grobacterium tumefaciens</i>)	0.031
放射型根瘤菌 (<i>Rhizobium radiobacte</i>)	0.041
球形红假单胞菌 (<i>Rhodopseudoraonas sphaeroide</i>)	0.050
土壤杆菌 (<i>A grobacterium sp.</i>)	0.059

从表 1 可以看出,本实验得到的类球红细菌,辅酶 Q₁₀ 含量与目前国内已有的报道^[5,7-8,11]相比高出 10 倍以上,进行工业化生产有较大的优势。目前该菌株已送中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心进行保藏,菌株保藏号为 CGMCC No. 2458。

2.3 菌株鉴定

为鉴定筛选到的菌株是否由出发菌株经诱变而得到的,对出发菌株和筛选到的高产菌株进行细菌 16S rDNA 鉴定。利用 16S rDNA 进行菌株分类与鉴定是目前常用的一种高效准确的菌株鉴定方法,基本原理是利用 16S rDNA 两端的引物 PCR 扩增未知菌株的 16S rRNA 基因,并进行 DNA 测序,与 GenBank 中的已知序列进行同源性比较后,判定细菌种类。图 2 为出发菌株和筛选到的高产菌株 Shenzhou6 的 PCR 电泳结果,与 Marker 比较可知目标扩增产物的片段长度大约为 1500bp。将得到的 Shenzhou6 菌株测序结果和出发菌株进

行比对,序列相似性为 99%,可以确定为同一种菌株。该高产菌株的 16S rDNA 序列已在 GenBank 上注册,登录号是 EU649703。



M—标准分子量;1—空白对照;2—对照菌株;3—高产菌株

图 2 16S rDNA 的 PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR of 16S rDNA

3 讨论

利用微生物发酵原理实现辅酶 Q₁₀ 工业化生产,不仅需要高精度分离仪器和技术,更重要的是要有满足规模化生产的稳定高产菌种。

辅酶 Q₁₀ 是一种具有重大经济价值的基本药物和原料,研究人员已对其做了大量研究,其生物合成途径与代谢过程已经较为清楚。在这些研究基础上,研究人员构建了多种基因工程菌如光合细菌或大肠杆菌^[12-15],将带目的基因的质粒转化至产辅酶 Q₁₀ 的菌株中,构建基因工程菌或通过单独或同时表达辅酶 Q₁₀ 前体合成途径中的关键酶基因提高辅酶 Q₁₀ 生物合成途径等,由于微生物体内辅酶 Q₁₀ 生物合成途径非常复杂,参与基因比较分散,构建出高效、稳定的基因工程菌还需进一步的研究^[16]。同时利用地面单一物理诱变因素对产 CoQ₁₀ 的微生物也进行了大量的诱变选育工作,但获得的菌株生产 CoQ₁₀ 的能力不高,并不能达到产业化要求。

本实验以已有的类球红细菌为出发菌株,经空间搭载筛选出 CoQ₁₀ 高产菌株 Shenzhou6,其发酵产量可达 0.8g/L。分析原因认为,除出发菌株辅酶 Q₁₀ 含量较高外,还可能与选用的诱变方式有关。空间诱变育种是近年来被广泛应用的一种新型育种方式。与常规的单因素诱变条件相比,空间诱变是空间辐照、微重力、粒子撞击等因素综合作用的结果,能引起生物体的染色体畸变,进而导致生物体遗传变异,经地面选育试验后,能快速而有效地育成生物新品种^[9]。但是空间诱变的机制目前还不清楚,空间诱变是引起菌株合成辅酶 Q₁₀ 合成相关基因的突变还是相关调控基因的变异还有待深入研究。

对于该高产菌株,还可根据菌株特性,进一步筛选合理

的培养方法和发酵工艺,引入先进的培养模式和控制方式,同时利用生物信息、生化工程控制、在线检测等技术进行发酵过程动力学及代谢流量分析,提高发酵产量^[7]。同时可根据 CoQ₁₀ 的合成与代谢途径,加入前体物质和生长因子,进一步提高菌株的 CoQ₁₀ 产量,用于工业生产。

4 结论

利用空间诱变手段对类球红细菌进行诱变选育,得到一株 CoQ₁₀ 高产菌株,该菌株 CoQ₁₀ 含量比出发菌株提高了 33%,达(0.8±0.02)g/L,是已有文献报道 CoQ₁₀ 含量的 10 倍以上,可用于工业生产,同时也揭示空间诱变作为一种新型诱变手段,可用于工业化菌株的选育。

参考文献 (References)

- [1] Park Y C, Kim S J, Choi J H, et al. Batch and fedbatch production of coenzyme Q₁₀ in recombinant Escherichia coli containing the decaprenyl disphosphate synthase gene from Gluconobacter suboxydans [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 67(1): 192-196.
- [2] 武标, 张千, 李辉, 等. 氦离子激光照射对类球红细菌的诱变效应及对辅酶 Q₁₀ 产生量的影响[J]. *激光生物学报*, 2007, 16(3): 364-368. Wu Biao, Zhang Qian, Li Hui, et al. *Acta Laser Biology Sinica*, 2007, 16(3): 364-368.
- [3] Hans N, Katrin S, Lars G. Review the multiple functions of coenzyme[J]. *Q Bioorg Chem*, 2001, 29(1): 1-13.
- [4] Turunen M, Olsson J, Dallwer G. Metabolism and function of coenzyme Q[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1660(1-2): 171-199.
- [5] 李焱生, 方建军, 钟卫鸿. 微生物法高产辅酶 Q₁₀ 的研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2009(2): 59-62. Li Yansheng, Fang Jianjun, Zhong Weihong. *Biotechnology Bulletin*, 2009(2): 59-62.
- [6] 潘春梅, 堵国成, 陈坚. 辅酶 Q₁₀ 高产菌 *Rhizobium radiobacter* 的选育及发酵条件优化[J]. *过程工程学报*, 2004, 4(5): 451-456. Pan Chunmei, Du Guocheng, Chen Jian. *The Chinese Journal of Process Engineering*, 2004, 4(5): 451-456.
- [7] 潘春梅, 李寅, 堵国成, 等. 利用广谱性和特异性组合诱变技术选育辅酶 Q₁₀ 高产菌[J]. *应用与环境生物学报*, 2005, 11(3): 363-367. Pan Chunmei, Li Yin, Du Guocheng, et al. *Chin J Appl Environ*, 2005, 11(3): 363-367.
- [8] 刘克杉, 吴文芳, 韩斯琴, 等. 辅酶 Q₁₀ 高产菌株的选育[J]. *沈阳农业大学学报*, 2005, 36(1): 89-92. Liu Keshan, Wu Wenfang, Han Siqin, et al. *Journal of Shenyang Agriculture University*, 2005, 36(1): 89-92.
- [9] 田兴山, 张玲华, 郭勇, 等. 空间诱变在微生物菌种选育上的研究进展 [J]. *生物技术通讯*, 2005, 16(1): 105-108. Tian Xingshan, Zhang Linghua, Guo Yong, et al. *Letters in Biotechnology*, 2005, 16(1): 105-108.
- [10] 张艳芬, 王红霞, 张根发, 等. 空间诱变育种及遗传变异研究方法综述[J]. *河南科技学院学报: 自然科学版*, 2008, 36(1): 10-13. Zhang Yanfen, Wang Hongxia, Zhang Genfa, et al. *Journal of Henan Institute of Science and Technology: Natural Sciences Edition*, 2008, 36(1): 10-13.
- [11] 郑君, 管斌, 孔青, 等. 高产辅酶 Q₁₀ 光合细菌的选育 [J]. *中国酿造*, 2008, 186(9): 83-86. Zheng Jun, Guan Bin, Kong Qing, et al. *China Brewing*, 2008, 186(9): 83-86.
- [12] 郝晓峰, 罗应刚, 官家发. 微生物发酵法生产辅酶 Q₁₀ 研究进展[J]. *天然产物研究与开发*, 2006, 18: 858-862. Gao Xiaofeng, Luo Yinggang, Guan Jiafa. *Nat Prod Res Dev*, 2006, 18: 858-862.
- [13] Makoto K B. Biosynthesis, bioproduction and novel roles of ubiquinone [J]. *J Biosci Bioeng*, 2002, 94(6): 511-517.
- [14] Zhou X F, Wu H H Z, Fan Y. Cloning and identification of *E. coli ispB* gene[J]. *Indus Microbio*, 2001, 31(3): 25-28.
- [15] Fan Y, Liu X Y, Chen G H. Production of ubiquinone in various *Escherichia coli* hosts by expression of *ddsA* gene from *Gluconobacter suboxydans*[J]. *Indus Microbiol*, 2002, 32(4): 39-41.
- [16] 王青云, 王发祥, 钟士清. 微生物发酵法生产辅酶 Q₁₀ 的研究进展[J]. *化学与生物工程*, 2006, 23(8): 11-13. Wang Qingyun, Wang Faxiang, Zhong Shiqing. *Chemistry & Bioengineering*, 2006, 23(8): 11-13.

(责任编辑 吴晓丽)

· 学术动态 ·

首届“全国科学、技术与公共政策论坛”征文

中国自然辩证法研究会将于 2010 年 12 月 1 日在江苏省苏州市召开首届“全国科学、技术与公共政策论坛”。论坛主题: 低碳经济背景下的科学、技术与决策。

征文内容: ① 低碳经济的内涵、定义及特征; ② 中国低碳经济发展战略; ③ 低碳经济、中国城镇化与产业结构调整; ④ 低碳经济背景下的科学、技术选择; ⑤ 面向低碳经济的中国科技发展战略及路线图; ⑥ 中国低碳经济科技创新支撑体系研究; ⑦ 其他相关议题。

征文截止时间: 2010 年 10 月 15 日。

联系方式: 林萍(苏州大学), 电话: 0512-67507027, 电子信箱: linping@suda.edu.cn; 肖显静(中国科学院研究生院), 电话: 010-88256519, 电子信箱: xxjing@gucas.ac.cn。

会议网址: <http://www.chinasdn.org.cn/n1249550/n1249729/11978904.html>。

