一株产 CoQ_{10} 的类球红细菌分离鉴定及诱变选育

姚丽莉[1,2]，许齐纯[2]，刘晓萌[3]，李鸿鑫[1]，
高鑫誉[1]，徐梧皓[1]，吕常江[*2,4]，曹宏伟[1]
(1. 黑龙江八一农垦大学 生命科学技术学院，黑龙江 大庆 163000；2. 浙江科技学院 生物与化学工程学院，浙江 杭州 310023；3. 南京市产品质量监督检验院，江苏 南京 210029；4. 江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122)

摘要： 辅酶 Q_{10}(CoQ_{10})是天然存在的抗氧化剂和细胞代谢激活剂，具有消除自由基、维持细胞膜通透性、提高机体免疫功能等多种生理作用。选育 CoQ_{10} 高产菌株并通过发酵法实现该功能化合物的高效合成具有重要价值。作者从污水处理厂的淤泥中分离纯化获得了一株 CoQ_{10} 高产菌株 YLL-13，通过形态观察、生化特性分析及 16S rDNA 序列比对，鉴定为类球红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)，命名为 *R. sphaeroides* YLL-13。随后，以 *R. sphaeroides* YLL-13 为出发菌株，以维生素 K3 和 4-羟基苯甲酸(p-hydroxybenzoic acid，pHBA)为复合筛选标记，通过亚硝基胍化学诱变，筛选高产突变菌株，并初步研究了其生产 CoQ_{10} 特性。结果显示，经诱变选育获取了一株遗传稳定的 CoQ_{10} 高产突变株 *R.sphaeroides* YLL-13-T，其具有相对低类胡萝卜素合成、高生长速率和高 CoQ_{10} 积累特性。在所考察的发酵体系中，发酵 120 h 后突变菌株 YLL-13-T 的生物量、CoQ_{10} 产量和 CoQ_{10} 产率达到 83.5、1.04 g/L 和 12.46 mg/g，比出发菌株分别提高了 12.3%、42.5%和 23.6%，展现出良好的工业化应用前景。

关键词： 类球红细菌；亚硝基胍；化学诱变；辅酶 Q10；类胡萝卜素
中图分类号： Q 815　**文章编号：** 1673-1689(2021)02-0032-09　**DOI：** 10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.02.005

Isolation, Identification and Mutation of a *Rhodobacter sphaeroides* with High Yield of Coenzyme Q_{10}

YAO Lili[1,2], *XU Qichun*[2], *LIU Xiaomeng*[3], *LI Hongxin*[1], *GAO Xinyu*[1],
XU Wuhao[1], *LYU Changjiang*[*2,4], *CAO Hongwei*[1]
(1. College of Life Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163000, China; 2. School of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310023, China; 3. Nanjing Product Quality Supervision and Inspection Institute, Nanjing 210029, China; 4. School of Bioengineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

收稿日期： 2020-07-07
基金项目： 国家自然科学基金项目(31670804，31971372)；江苏省博士后基金资助项目(2020Z074)；浙江省自然科学基金青年基金项目(LQ18B060002)。
* **通信作者：** 吕常江(1985—)，男，博士，讲师，主要从事微生物代谢工程改造方面的研究。E-mail：yangtzelv@zju.edu.cn

Abstract: Coenzyme Q_{10} (CoQ_{10}) is a natural antioxidant and cell metabolic activator, possessing several important biological properties, such as eliminating free radicals, maintaining cell membrane permeability, and improving immune function. It is of great value to develop high-yield CoQ_{10} strain and realize high-efficient synthesis of functional compounds by fermentation. In this work, a potent CoQ_{10}-producing strain YLL-13 was isolated from the silt of a sewage treatment plant. Based on the morphological observation, biochemical characteristics analysis and 16S rDNA sequence alignment, the strain was identified as *Rhodobacter sphaeroides* and named as *R. sphaeroides* YLL-13. In further, a high-yield mutant strain was screened by nitrosoguanidine chemical mutagenesisusing *R. sphaeroides* Yll-13 as the starting strainand Vitamin K3 and p-hydroxybenzoic acid(pHBA) as the compound screening markers. A genetically stable CoQ_{10} mutant with high yield of CoQ_{10}, *R. sphaeroides* YLL-13-T,was achieved by mutagenesis. This strain had relatively low carotenoid synthesis, high growth rate and high CoQ_{10} accumulation characteristics. In the studied fermentation system, the biomass, CoQ_{10} concentration and specific CoQ_{10} content of the mutant strain YLL-13-T after 120 h fermentation were 83.5 g/L, 1.04 g/L and 12.46 mg/g (DCW) respectively, which were 12.3%, 42.5% and 23.6% higher than those of original wild-type strain, showing a good prospect of industrial application.

Keywords: *Rhodobacter sphaeroides*, nitrosoguanidine, mutant, CoQ_{10}, carotenoids

辅酶 Q_{10}(Coenzyme Q_{10}, CoQ_{10})化学名称为 2,3-二甲氧基-5-甲基-6-癸异戊烯基苯醌,广泛存在于高等动物线粒体内膜中,是细胞呼吸链中重要的电子受体，也是合成三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)所必须的重要辅酶之一[1]。作为天然的抗氧化剂和细胞代谢激活剂[2], CoQ_{10} 具有抗氧化、抗衰老、清除体内自由基、维持细胞膜通透性及提高机体免疫力等多种生理功能，广泛应用于医药、食品和化妆品等行业[3-4]。近年来, CoQ_{10} 作为一种辅助药物,在治疗冠心病、急慢性肝炎、阿尔茨海默症、糖尿病、帕金森症及弱精子症等疾病方面使用比例逐年增加[5-7]。因而,实现 CoQ_{10} 高效合成具有重要经济价值。

CoQ_{10} 的制备方法主要有动植物组织提取法、植物细胞培养法、化学合成法及微生物发酵法[8]。相较于前三者,微生物发酵法具有原材料丰富、成本低、可规模放大、分离过程相对简单、环境污染物较少、产品活性好、不存在手性问题等优点,已成为 CoQ_{10} 生产的首选途径[9]。迄今为止,已有多株产 CoQ_{10} 菌株被发掘,分布于假丝酵母、掷孢酵母、隐球酵母、裂殖酵母、烟曲霉、链霉菌、黑粉菌、假单胞菌、土壤杆菌、日本葡萄糖酸杆菌、脱氮极毛杆菌、脱氮副球菌、红极毛杆菌、荚膜红细菌、浑球红细菌及类球红细菌等多个种属[10-11]。其中,类球红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)是一种紫色非硫光合细菌,可通过循环光合磷酸化获取能量(ATP)用于自身生长繁殖[12]。*R. sphaeroides* 细胞内需积累较多的 CoQ_{10} 以消除光合作用产生的大量自由基；同时, *R. sphaeroides* 细胞内膜系统较发达，在发酵后期,细胞膜发生形变并向内褶皱，为 CoQ_{10} 提供附着位点[13],因而成为发酵制备 CoQ_{10} 的主要菌种之一。但野生型 *R. sphaeroides* 的 CoQ_{10} 产量较低,发酵生产过程中存在收率偏低和成本较高等问题,制约了产品进一步市场化。

近年来,随着 *R. sphaeroides* 生理代谢机制研究的深入,其 CoQ_{10} 合成途径被逐渐解析,见图 1。主要涉及 3 个模块:莽草酸途径(SKP)、甲基赤藓糖醇磷酸盐(MEP)途径和泛醌(QMP)途径。除通过发酵调控策略[14-15]提升 CoQ_{10} 产率外,利用诱变育种或代谢工程改造获取高产菌株已成为研究的主要方向。如图 1 所示,4-羟基苯甲酸(p-hydroxybenzoic acid, pHBA)是 CoQ_{10} 合成的前体,但其积累对细胞有毒害作用。基于这一现象,扶教龙[16]和柯崇榕[17]等分别通过亚硝基胍(NTG)或紫外线对 *R. sphaeroides* 进

行诱变，并以 pHBA、CoQ_{10} 结构类似物维生素 K3、叠氮化钠等复合物作为抗性筛选标记，所获得的高产突变株 R.sp3-7 与 EIM-4 的 CoQ_{10} 产量分别达到 93.63 mg/L 和 185.71 mg/L，较出发菌株分别提高了 116.8%和 29.31%。UbiG 是 QMP 途径中的关键蛋白，Lu[18]等通过代谢工程手段过表达该蛋白质促使 CoQ_{10} 产量由 47.6 mg/L 提升至 65.8 mg/L；而在此基础上进一步组合优化 MEP 途径中 DXS、DXR、IDI 和 IspD 的表达，使得 CoQ_{10} 产量提高至 93.34 mg/L。

类胡萝卜素与 CoQ_{10} 合成途径竞争前体物质香叶基香叶基焦磷酸（Geranylgeranyl pyrophosphate，GGPP）。Zhu[19]等通过调控光氧调控因子 *ppsR* 表达，适当抑制类胡萝卜素的合成，促使 CoQ_{10} 的产量提高了约 28%；而后将 GGPP 合成关键酶 CrtE 和 PpsR 串联，从而解除了 PpsR 对 *crtE* 表达的抑制，进一步提高 CoQ_{10} 的产量至 73.2 mg/L，比野生型提高了 47%。

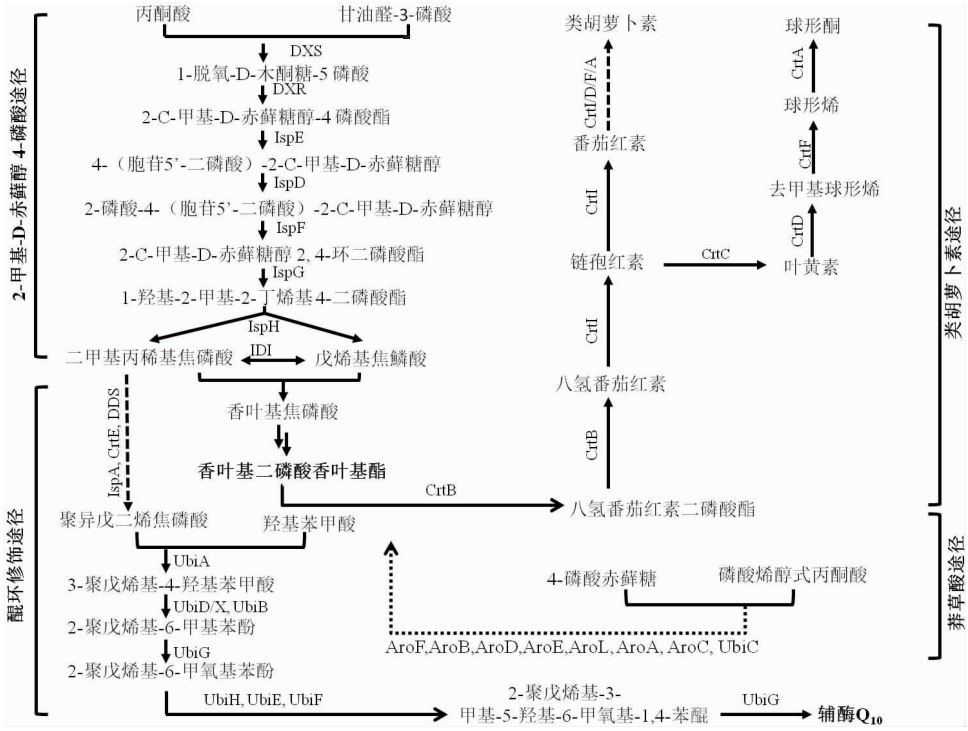


图 1 类球红细菌中类胡萝卜素和 CoQ_{10} 的合成途径

Fig. 1 Synthesis pathways of carotenoids and CoQ_{10} in *R. sphaeroides*

为获取 CoQ_{10} 高产菌株，作者首先从污水处理厂的淤泥中富集、分离了 15 株产 CoQ_{10} 光合细菌。随后，对 CoQ_{10} 产率最高的菌株（YLL-13）进行了生理生化特性及 16S rDNA 系统发育分析。进一步以该菌株为出发菌株，采用亚硝基胍进行化学诱变，以维生素 K3 和 PHBA 为筛选标记，获取了一株具有低类胡萝卜素合成、高生长速率和高 CoQ_{10} 积累的突变菌株（YLL-13-T），并初步研究了该突变菌株发酵合成 CoQ_{10} 的特性。

1 材料与试剂

1.1 实验材料

1.1.1 培养基

1）富集培养基（组分 g/L）[20]：NaCl 1.5，$NaHCO_3$ 1.0，K_2HPO_4 0.2，CH_3COONa 3.0，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2，NH_4Cl 1.0；生长素辅助因子贮液 1 mL，微量金属元素贮液 10 mL，pH 7.0。

生长素辅助因子贮液（组分 mg/L）：硫胺素5.0，

烟酸10.0，4-氨基苯甲酸 15.0，生物素 15.0。

微量金属元素贮液（组分 mg/L）：$FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 5.0，$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.05，H_3BO_3 1.0，$MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.05，$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0，$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ 0.5；pH 7.0。

2）种子培养基：葡萄糖 3.0 g/L，酵母粉 8.0 g/L，玉米浆干粉 1.0 g/L，NaCl 2.0 g/L，KH_2PO_4 1.3 g/L，$MgSO_4$ 125 mg/L，$FeSO_4$ 100 mg/L，$MnSO_4$ 1.0 mg/L，生物素 15.0 mg/L，烟酸 1.0 mg/L，硫胺素 1.0 mg/L，pH 7.2。

3）发酵培养基：葡萄糖 40.0 g/L，玉米浆干粉 5.5 g/L，谷氨酸钠 3.0 g/L，NaCl 2.0 g/L，$CaCl_2$ 0.1 g/L，KH_2PO_4 2.5 g/L，$MgSO_4$ 6.3 g/L，$(NH_4)_2SO_4$ 2.5 g/L，$FeSO_4$ 100 mg/L，$MnSO_4$ 1.0 mg/L，$CoCl_2$ 20.0 mg/L，生物素 15.0 mg/L，烟酸 1.0 mg/L，硫胺素 1.0 mg/L，pH 7.2。

1.1.2 主要试剂 细菌基因组 DNA 抽提试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒：购自生工生物工程（上海）股份有限公司；PrimerSTAR® Max DNA Polymerase、DNA Marker：购自 Takara 公司；硫胺素、生物素、烟酸、pHBA、亚硝基胍、维生素 K3、CoQ_{10} 标准品，甲醇、乙醇（色谱纯）：购自阿拉丁试剂（上海）有限公司；谷氨酸钠、NaOH、$(NH_4)_2SO_4$、$CaCO_3$、$FeSO_4$、$MnSO_4$、$CoCl_2$、无水乙醇、乙酸乙酯：购自国药集团化学试剂有限公司；玉米浆干粉：购自上海缘肽生物有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 CoQ_{10} 产生菌的筛选 将 1 g 采自黑龙江省大庆市林甸县林甸镇污水处理厂的底泥样品溶在 100 mL 无菌水中，32 ℃、150 r/min 摇床振荡孵育 30 min。随后，取 1 mL 悬液接种于富集培养基中，32 ℃下光照厌氧（1 500 Lx）培养 2 d。取 100 μL 上述微红培养物转接至第二瓶富集培养基中继续培养，重复 3~4 次后于固体培养基上进行多次划线分离，获取单菌落。挑取形态、大小及颜色差异的菌落，接种至种子培养基中，32 ℃、200 r/min 摇床振荡培养 4 d，离心收集菌体细胞并测定 CoQ_{10} 含量。

1.2.2 生理生化特征实验 选取 CoQ_{10} 含量较高的菌株，参照《伯杰氏系统细菌学手册》（第 9 版）及东秀珠等编著的《常见细菌系统鉴定手册》（第 1 版）中相应属、种鉴定的有关内容选择生理生化试验性状，包含惟一碳源、氮源、电子供体及生长因子生长试验、触酶试验，采用扫描电子显微镜进行细菌形态观察。

1.2.3 菌株 16S rDNA 序列分析 取 0.5 mL 菌悬液，离心收获菌体细胞并采用细菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取基因组 DNA，以细菌鉴定通用引物（27F：5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′，1492R：5′-GGTTACCTTGTTACGACTT-3′）进行序列 PCR 扩增。PCR 扩增条件：98 ℃ 5 min；98 ℃ 20 s，55 ℃ 15 s，72 ℃ 25 s，进行 30 个循环；72 ℃延伸 6 min。PCR 产物经 1.0 g/dL 琼脂糖凝胶电泳检测后送至哈尔滨中科赛恩斯生物技术有限公司进行测序。测序结果递交至 GenBank 核酸数据库中，获取登录号。采用 Clustal W 进行序列比对，利用 MEGA 5.1 软件的 Neighbour Joining 法构建系统发育树，进行系统发育分析。

1.2.4 色素的提取及 TLC 指纹图谱获取 离心收集好氧培养条件下的菌体细胞，经 0.2 mol/L 的 PBS（pH 7.2）洗涤 3 次后，采用超声辅助的丙酮-甲醇提取法[23]（甲醇、丙酮-甲醇（体积比 7:2）和丙酮作为提取剂各提取一次）进行色素抽提。超声波处理条件：功率 400 W，超声 3 s，间歇 6 s，循环 200 次。4 ℃、8 000 r/min 离心 15 min，收集上清液并合并。色素粗提液经减压旋转蒸发干燥后采用乙醚溶解并定容，于硅胶 G 板上进行点样，点样量为 10~20 μL；然后选择不同极性的展层剂（石油醚∶正己烷∶异丙醇∶丙酮的体积比为 10∶0.95∶0.25∶0.40）进行避光展层，展层结束后将展层板拍照，获取色素的 TLC 指纹图谱。

1.2.5 吸收光谱测定及类胡萝卜素质量分数分析 活细胞吸收光谱测定：菌体细胞经 pH 7.5 的 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液洗涤 2 次，悬浮于质量分数 60%的蔗糖溶液中，选用光程为 1 cm 的 96 孔石英酶标板于光吸收酶标仪（SPECTRA MAX 190）中进行全波长光谱扫描，加样量为 200 μL，扫描波长范围为 190~800 nm。色素吸收光谱测定也采用石英酶标板，扫描波长范围相同。根据 Jessen 公式：$C=DVf\times 10/2\ 500$，计算细胞类胡萝卜素含量。式中，C 为胡萝卜素总质量（mg）；V 为抽提液总体积（mL）；f 为稀释倍数；D 为离体类胡萝卜素最大吸收峰（λ=480 nm）的光密度；2 500 为类胡萝卜素的平均消光系数。

1.2.6 菌株诱变方法 取 1 mL 原始菌株菌悬液，5 000 r/min 离心 5 min 获取菌体，生理盐水离心洗

涤两次，重悬于质量浓度为 0.6 mg/mL 亚硝基胍的生理盐水中,室温静置 45 min。5 000 r/min 离心 5 min 获取菌体，生理盐水重悬后涂布于含有 12 mg/L 维生素 K3 和 0.6 g/L pHBA 的固体平板上,32 ℃静置培养4~5 d。挑取平板上菌落较大、颜色较浅、菌落粘性相对较低的突变菌株,于种子培养基中 32 ℃、200 r/min 条件下培养 120 h,HPLC 法测定细胞中 CoQ_{10} 产量。

1.2.7 CoQ_{10} 发酵条件 采用 10 L 发酵罐对出发菌和突变株进行发酵，并测定发酵液中 CoQ_{10} 的质量浓度。发酵控制工艺:装液量为 4.5 L,发酵温度为 32 ℃,通气比 2.0 vvm,初始搅拌速率为 500 r/min;48 h 后调节搅拌速率至 400 r/min，通气比 0.75 vvm。发酵时长 120 h,氨水调控 pH 在 7.2 左右。当发酵体系葡萄糖质量浓度低于 10 g/L 时,采用指数流加补料方式维持葡萄糖在 10 g/L。离心收获菌体,超声辅助提取 CoQ_{10}。

1.2.8 CoQ_{10} 的提取 取上述菌悬液于 8 000 r/min 离心 15 min，所得菌体再用无菌生理盐水洗涤两次。取 1 mL 发酵菌悬液,加入 200 μL 20 mmol/L 的 HCl 并充分混匀,75 ℃条件下水浴 15 min,5 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,加入 5 mL 提取液($V_{乙酸乙酯}$:$V_{乙醇}$=5:3)并充分混匀,而后置于超声波清洗仪中,超声辅助(功率 400 W)提取 15 min,避光抽提 10 min。将抽提液于 8 000 r/min 条件下离心 15 min,获得 CoQ_{10} 提取液。

1.2.9 CoQ_{10} 定性及定量分析 CoQ_{10} 定性分析采用液相色谱-质谱法（HPLC-MS)。色谱条件:Hypersil ODS(C_{18})色谱柱(4.6 mm×150 mm,5 μm);流动相为纯甲醇;柱温 40 ℃;检测波长 275 nm;流量 0.5 mL/min;进样量 20 μL;离子源为电喷雾离子源(ESI),采用正离子模式检测;扫面范围为 100~1 800 *m/z*;干燥气流为 6 L/min;雾化气压 20 psi;毛细管电压 4 000 V。

CoQ_{10} 定量分析采用高效液相色谱（HPLC)法测。色谱条件:Hypersil ODS(C_{18})色谱柱(4.6 mm×150 mm,5 μm);流动相为 $V_{甲醇}$:$V_{异丙醇}$=3:1;柱温 40 ℃;检测波长 275 nm;流量 1 mL/min;进样量 10 μL。

2 结果与分析

2.1 产 CoQ_{10} 光合细菌的分离与筛选

振荡孵育处理的底泥样品接种于富集培养基中,光照厌氧(1 500 Lx、32 ℃)静置培养 2 d 后传代培养 3~4 次。选取深红色的菌悬液,梯度稀释后涂布固体平板并获取单菌落。随后挑取颜色、形态与大小差异的 15 个菌落，于液体试管中活化后进行划线分离,以获取纯菌株。将上述菌株接种于种子培养基中,32 ℃、200 r/min 摇床振荡培养 4 d 后离心收集菌体细胞，并采用 HPLC-MS 及 HPLC 法分别对细胞中 CoQ_{10} 进行定性及定量分析,见图 2(a)。结果显示，筛选获取的 15 株光合细菌细胞中均含有 CoQ_{10}，但其产量差异较大；其中,13 号菌株(YLL-13)CoQ_{10} 产量最高,为 0.23 g/L,见图 2(b)。因此,选取该菌株为目的菌株,进行生理生化特性分析。

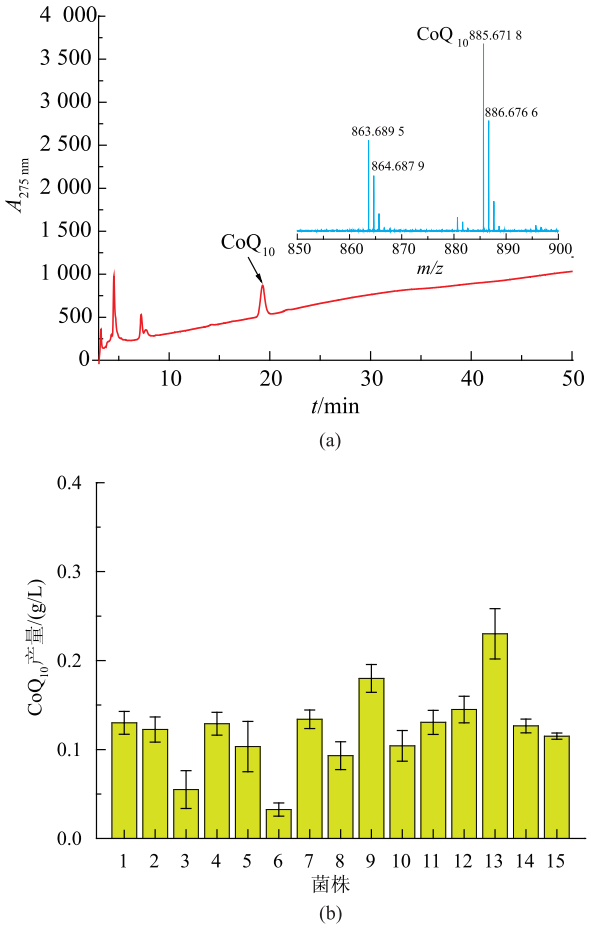


图 2 CoQ_{10} 的 HPLC-MS/MS 图谱及各菌株CoQ_{10} 产量分析

Fig. 2 HPLC-MS/MS chromatogram of CoQ_{10} and the CoQ_{10} concentration of selected strains

2.2 产 CoQ_{10} 菌株生理生化特性分析

参照《伯杰氏系统细菌学手册》及《常见细菌系统鉴定手册》中相应属、种鉴定的有关内容对菌株 YLL-13 进行生理生化试验。结果显示:该菌株为微

好氧菌，菌落圆形凸起、边缘整齐、表面湿润有粘性、呈深红色，能利用苹果酸、葡萄糖、阿拉伯糖、乳糖、D-半乳糖、D-麦芽糖、蔗糖、乙醇、谷氨酸盐、甘油及硫代硫酸钠，不能利用柠檬酸、精氨酸、D-甘露糖、L-鼠李糖、D-木糖、蜜二糖与鸟氨酸。该菌株能水解淀粉和液化明胶，接触酶、氧化酶、磷酸酶及乙醇脱氢酶均为阳性，尿酶阴性，不能还原硝酸盐，不产 H_2S，无生长因子，生物素为其生长刺激因子。菌株 YLL-13 的生理生化特征与类球红细菌基本一致。

2.3 菌株 16S rDNA 序列分析

提取菌株 YLL-13 基因组 DNA，以细菌鉴定通用引物对其 16S rDNA 进行 PCR 扩增。随后，将特异性条带切胶回收、纯化并测序，结果上传至 Genbank，获取登录号 MN625849.1。采用 Clustal W 软件进行同源序列比对，并利用 MEGA 5.1 软件中的 Neighbour Joining 法构建系统发育树，见图 3。系统进化分析显示，菌株 YLL-13 与 *R. sphaeroides* 2.4.1 及 *R. sphaeroides* ATCC17029 聚为一族，相似性达 100%。由此，依据菌株生理生化及系统进化分析，将菌株 YLL-13 鉴定为类球红细菌（*Rhodobacter sphaeroides*），并命名为 *R. sphaeroides* YLL-13。

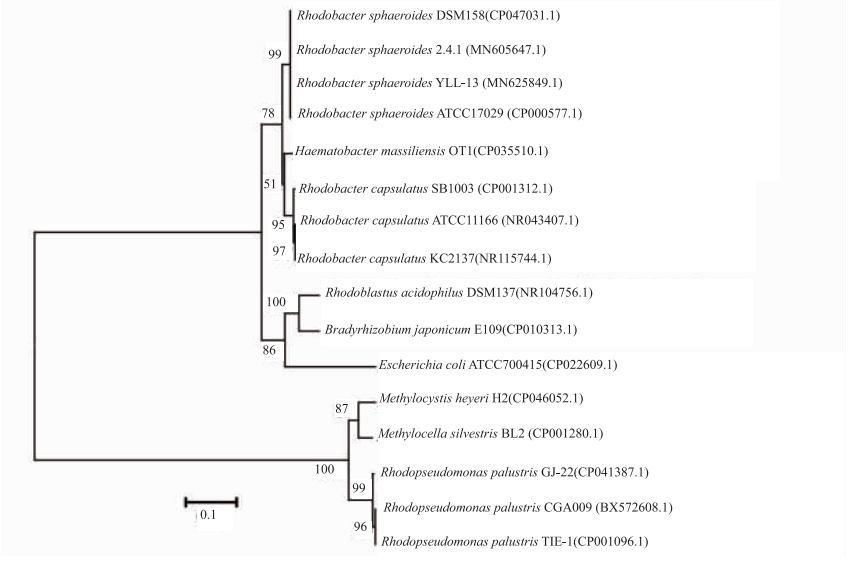


图 3 菌株 16S rRNA 基因系统进化分析

Fig. 3 Phylogenetic relationships of the strains drived from 16S rDNA sequences

2.4 化学诱变选育高产 CoQ_{10} 突变株

为进一步提升 *R. sphaeroides* YLL-13 的 CoQ_{10} 合成效率，选取 NTG 为诱变剂、以维生素 K3 和 pHBA 为复合筛选标记，对菌株 YLL-13 进行诱变选育。在含有 12 mg/L 维生素 K_3 和 0.6 g/L pHBA 的平板上，共获取了约 200 余个单菌落；随机挑选 10 个直径较大的菌落接种至种子培养基中，32 ℃、200 r/min 下振荡培养 120 h，测定细胞中 CoQ_{10} 产量，结果见图 4。除 M2 与 M6 外，其它菌株合成 CoQ_{10} 的能力较野生型菌株均有所提升；其中，M9 菌株最为明显，达到 0.47 g/L；且传代培养 15 代后 CoQ_{10} 产量仍保持在 92%左右，表明该突变株具有良好的遗传稳定性。此外，突变株 M9 菌落形态与野生菌株相似，细胞形态呈短杆状，未发生明显变化，见图 5。

值得关注的是，尽管突变株 M9 活细胞吸收光谱（图 6(a)）及色素提取液吸收光谱（图 6(b)）均未发生蓝移或红移，色素的 TLC 指纹图谱亦相似（图 6(c)），但该突变株液体培养物颜色相对较浅，呈粉红色，且类胡萝卜素质量分数为 1.47 mg/g(DCW)，较野生菌株降低了 36.3%，表明突变株类胡萝卜素合成速率发生明显改变。基于此，将该突变株命名为 *R. sphaeroides* YLL-13-T，并保藏至中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏编号为 CGMCC No.1883。

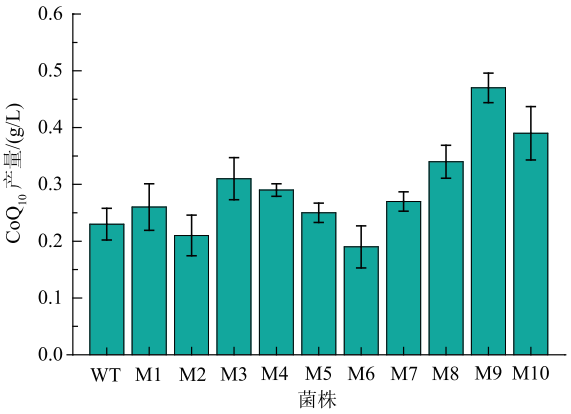


图 4 化学诱变筛选结果

Fig. 4 Screening results of chemical mutagenesis

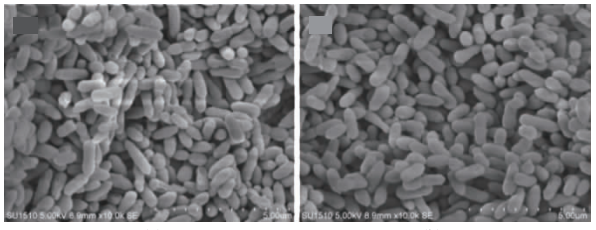


图 5 *R. sphaeroides* YLL-13 及其突变株 M9的扫描电镜图

Fig. 5 Scanning electron microscopy of *R. sphaeroides* YLL-13 and its mutant M9

2.5 高产突变株批次发酵产 CoQ_{10} 性能分析

将 *R. sphaeroides* YLL-13 和 *R. sphaeroides* YLL-13-T 接种于含有 50 mL 种子培养基的 250 mL 锥形瓶中,于 32 ℃、200 r/min 培养 24 h,作为一级种子液。随后,将菌悬液全部转接至含有 450 mL 种子培养基的 1 L 锥形瓶中,32 ℃、200 r/min 下继续培养 20~22 h,作为二级种子液。而后,将上述 500 mL 二级种子液进一步转接至 10 L 发酵罐中,装液量为 4.5 L,发酵温度为 32 ℃,通气比2.0 vvm,初始搅拌速率为 500 r/min;48 h 后调节搅拌速率至 400 r/min,通气比 0.75 vvm,氨水调控 pH 在 7.2 左右;当发酵体系葡萄糖质量浓度低于 10 g/L 时,采用指数流加补料方式维持葡萄糖在 10 g/L, 发酵时长 120 h。

上述条件下,*R. sphaeroides* YLL-13 与 *R. sphaeroides* YLL-13-T 的细胞生长及 CoQ_{10} 合成见图 7。研究显示,随着发酵的进行,野生菌 YLL-13 和突变株 YLL-13-T 生物量逐渐增加,至 60 h 左右进入平衡期,但突变株呈现出更高的生长速率。与细胞生长相类似,YLL-13 和突变株 YLL-13-T 细胞中 CoQ_{10} 的积累也呈现相似的趋势。与之相对,两菌株 CoQ_{10} 产率在对数期较为接近, 但当细胞生长进入平衡期(60 h),突变株 YLL-13-T 的 CoQ_{10} 产率则逐渐高于野生菌株。发酵结束时 (120 h), 突变株 YLL-13-T 的生物量、CoQ_{10} 产量和 CoQ_{10} 产率分别为 83.5 g/L、1.04 g/L 和 12.46 mg/g(DCW),较出发菌株提高了 12.3%、42.5%和 23.6%, 呈现出更好的工业化应用前景。此外,能否通过代谢工程手段对 *R. sphaeroides* YLL-13-T 的 CoQ_{10} 生物合成途径进行遗传修饰或改造以进一步提高其 CoQ_{10} 产量,值得进一步探索。

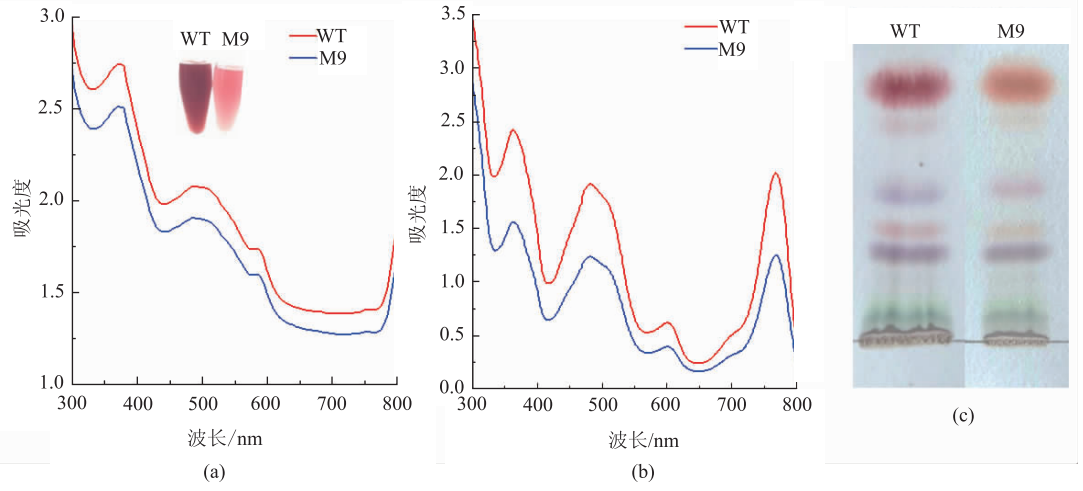


图 6 活细胞吸收光谱、色素提取液吸收光谱及色素的 TLC 指纹图谱

Fig. 6 Absorption spectra of living cells of YLL-13 and its mutant M9, pigment extracts and profile of pigment fingerprints on TLC

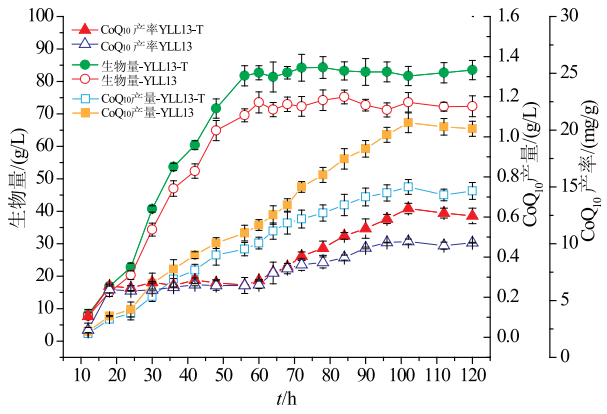


图 7　菌株 YLL–13 及突变菌株 YLL–13–T 批次发酵产 CoQ_{10} 性能分析

Fig. 7　Fed–batch fermentation process of CoQ_{10} produced by wild –type strain YLL –13 and mutant strain YLL–13–T

3 结　语

从污水处理厂的淤泥中筛选到一株CoQ_{10} 高产菌株 YLL–13，通过其形态观察、生理生化特性分析及 16S rDNA 序列比对，鉴定为类球红细菌，并命名为 *R. sphaeroides* YLL–13。为进一步提升该菌株 COQ_{10} 合成效率，选取 NTG 为诱变剂，以维生素 K3 和 pHBA 为复合筛选标记，对其进行诱变选育，并筛选获取了一株具有相对低类胡萝卜素合成、高生长速率和高 CoQ_{10} 积累特性且遗传稳定的突变菌株（*R. sphaeroides* YLL–13–T）。在所考察的发酵体系中，发酵 120 h 后突变株 YLL–13–T 的 CoQ_{10} 产量和产率达到 1.04 g/L 和 12.46 mg/g(DCW)，比出发菌株分别提高了 42.5%和 23.6%，展现出更好的应用前景。

参考文献：

[1] CRANE F L. Biochemical functions of coenzyme Q_{10}[J]. **Journal of the American College of Nutrition**, 2002, 20(6): 591- 598.

[2] JEAN D D N, LEE B H. Enhanced production techniques, properties and uses of coenzyme Q_{10}[J]. **Biotechnology Letters**, 2014, 36(10): 1917-1926.

[3] JEYA M, MOON H J, LEE J L, et al. Current state of coenzyme Q_{10} production and its applications[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2010, 85(6): 1653-1663.

[4] SHUKLA S, DUBEY K K. CoQ_{10} a super-vitamin: review on application and biosynthesis[J]. **Biotech**, 2018, 8(5): 249.

[5] BRANDMEYER E A, SHEN Q, THIMMESCH A R, et al. Using coenzyme Q_{10} in clinical practice[J]. **Nursing**, 2014, 44(3): 63-66.

[6] LORENZO A D, IANNUZZO G, PARLATO A, et al. Clinical medicine clinical evidence for Q_{10} coenzyme supplementation in heart failure: from energetics to functional improvement[J]. **Journal of Clinical Medicine**, 2020, 9(5): 1266.

[7] MANCINI A, BALERCIA G. Coenzyme Q_{10} in male infertility: physiopathology and therapy[J]. **Biofactors**, 2011, 37(5): 374-380.

[8] 朱永强. 代谢工程改造类球红细菌促进辅酶 Q_{10} 合成的研究[D]. 浙江：浙江大学，2017.

[9] LEE S Q, TAN T S, KAWAMUKAI M, et al. Cellular factories for coenzyme Q_{10} production[J]. **Microbial Cell Factories**, 2017, 16(1): 39.

[10] CLUIS C P, PINEL D, MARTIN V J. The production of coenzyme Q_{10} in microorganisms[J]. **Sub Cellular Biochemistry**, 2012, 64: 303-326.

[11] MOGHADAMI F, FOOLADI J, HOSSEINI R. Introducing a thermotolerant *Gluconobacter japonicus* strain, potentially useful for coenzyme Q_{10} production[J]. **Folia Microbiologica**, 2019, 64: 471-479.

[12] 陈琳，李祖明. 类球红细菌应用进展[J]. 微生物学杂志，2016，36(3)：105-108.

[13] 许明双，生吉萍，申琳. 不产氧光合细菌抗氧化作用研究进展[J]. 食品科学，2010，31(3)：267-270.

[14] ZHANG L, LIU L S, WANG K F, et al. Phosphate limitation increases coenzyme Q_{10} production in industrial *Rhodobacter sphaeroides* HY01[J]. **Synthetic and Systems Biotechnology**, 2019, 4(4): 212-219.

[15] SAKATO K, TANAKA H, SHIBATA S, et al. Agitation-aeration studies on coenzyme Q_{10} production using *Rhodopseudomonas spheroides*[J]. **Biotechnology & Applied Biochemistry**, 1992, 16(1): 19-28.

[16] 扶教龙，钱大伟，吴晨奇，等. 高产辅酶 Q_{10} 类球红细菌的化学诱变筛选及其发酵培养基优化[J]. 中国酿造,2016,35(6):90-95.
[17] 柯崇榕,陈鲁芳,钟璐芳,等. 诱变选育高产辅酶 Q_{10} 的类球红细菌[J]. 药物生物技术,2015,22(6):502-504.
[18] LU W Q,YEL D,XU H M,et al. Enhanced production of coenzyme Q_{10} by self-regulating the engineered MEP pathway in *Rhodobacter sphaeroides*[J]. **Biotechnology and Bioengineering**,2014,111(4):761-769.
[19] ZHU Y Q,LU W Q,YE L D,et al. Enhanced synthesis of coenzyme Q_{10} by reducing the competitive production of carotenoids in *Rhodobacter sphaeroides*[J]. **Biochemical Engineering Journal**,2017,125:50-55.
[20] 沈锦玉,刘问,尹文林,等. 光合细菌 HZPSB 菌株的分离鉴定及其生长特性的测定[J]. 科技通报,2005(1):71-75.
[21] 张晓蓉,赵春贵,杨素萍. 产氢红杆菌类胡萝卜素含量和组分分析[J]. 微生物学通报,2007,34(5):863-866.
[22] 蔡妙英,东秀珠. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001:9-42.
[23] HOLT J H,KRIEG N R,SNEATH P H A,et al. Bergey's manual of determinative bacteriology ninth edition[M]. London: Williams & Wilkins Co,1994:353-376.

科　技　信　息

欧盟评估维生素 B12 作为所有动物营养添加剂的安全性

2020 年 12 月 14 日,据欧盟食品安全局(EFSA)消息,应欧盟委员会要求,欧盟动物饲料添加剂和产品(FEEDAP)研究小组就维生素 B12(Vitamin B12)作为所有动物营养添加剂的安全性发表科学意见。

据了解,该维生素 B12 是由 Ensifer adhaerensCNCM - I 5541 生产的。经过评估,专家小组得出结论,该维生素 B12 对所有动物物种、消费者和环境都是安全的。申请人没有提供新的证据来促使研究小组重新考虑先前关于用户安全的结论。

［信息来源］食品伙伴网. 欧盟评估维生素 B12 作为所有动物营养添加剂的安全性 [EB/OL]. (2020-12-15). http://news.foodmate.net/2020/12/579887.html