

工业生物技术

代谢工程改造大肠杆菌生产辅酶 Q₁₀

戴冠苹^{1,2,3}, 苗良田^{1,2,3}, 孙涛^{1,2,3}, 李清艳^{2,3}, 肖冬光¹, 张学礼^{2,3}

1 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457

2 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308

3 中国科学院系统微生物工程重点实验室, 天津 300308

戴冠苹, 苗良田, 孙涛, 等. 代谢工程改造大肠杆菌生产辅酶 Q₁₀. 生物工程学报, 2015, 31(2): 206–219.

Dai GP, Miao LT, Sun T, et al. Production of coenzyme Q₁₀ by metabolically engineered *Escherichia coli*. Chin J Biotech, 2015, 31(2): 206–219.

摘要: 辅酶 Q₁₀ (CoQ₁₀) 是一种脂溶性抗氧化剂, 具有提高人体免疫力、延缓衰老和增强人体活力等功能, 广泛应用于制药行业和化妆品行业。微生物发酵法能可持续性生产辅酶 Q₁₀, 具有越来越多的商业价值。本研究首先将来自类球红细菌的十聚异戊二烯焦磷酸合成酶基因 (*dps*) 整合到大肠杆菌 ATCC 8739 染色体上, 敲除内源的八聚异戊二烯焦磷酸合成酶基因 (*ispB*), 使内源的辅酶 Q₈ 合成途径被辅酶 Q₁₀ 合成途径取代, 得到稳定生产辅酶 Q₁₀ 的菌株 GD-14, 其辅酶 Q₁₀ 产量达 0.68 mg/L, 单位细胞含量达 0.54 mg/g DCW。随后用多个固定强度调控元件在染色体上对 MEP 途径的关键基因 *dxs* 和 *idi* 基因以及 *ubiCA* 基因进行组合调控, 将辅酶 Q₁₀ 单位细胞含量提高 2.46 倍 (从 0.54 到 1.87 mg/g)。进一步引入运动发酵单胞菌 *Zymomonas mobilis* 的 Glf 转运蛋白代替自身的磷酸烯醇式丙酮酸: 碳水化合物磷酸转移酶系统 (PTS), 使辅酶 Q₁₀ 产量进一步提高 16%。最后, 对高产菌株 GD-51 进行分批补料发酵, 辅酶 Q₁₀ 产量达 433 mg/L, 单位细胞含量达 11.7 mg/g DCW。这是目前为止文献报道的大肠杆菌产辅酶 Q₁₀ 最高菌株。

关键词: 辅酶 Q₁₀, 同源重组, 基因表达调控, 大肠杆菌

Received: April 8, 2014; **Accepted:** May 12, 2014

Supported by: Tianjin Key Technology R&D Program of Tianjin Municipal Science and Technology Commission (No. 12ZCZDSY14700), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2012AA02A704), National Natural Science Foundation of China (No. 31100047), the Hundred Talent Program of the Chinese Academy of Sciences.

Corresponding author: Xueli Zhang. Tel/Fax: 86-22-84861983; E-mail: zhang_xl@tib.cas.cn

Qingyan Li. Tel/Fax: 86-22-84861946; E-mail: li_qy@tib.cas.cn

天津市科技支撑计划重点项目 (No. 12ZCZDSY14700), 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2012AA02A704), 国家自然科学基金 (No. 31100047), 中国科学院百人计划资助。

Production of coenzyme Q₁₀ by metabolically engineered *Escherichia coli*

Guanping Dai^{1,2,3}, Liangtian Miao^{1,2,3}, Tao Sun^{1,2,3}, Qingyan Li^{2,3}, Dongguang Xiao¹, and Xueli Zhang^{2,3}

¹ College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

² Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

³ Key Laboratory of Systems Microbial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

Abstract: Coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀) is a lipophilic antioxidant that improves human immunity, delays senility and enhances the vitality of the human body and has wide applications in pharmaceutical and cosmetic industries. Microbial fermentation is a sustainable way to produce CoQ₁₀, and attracts increased interest. In this work, the native CoQ₈ synthetic pathway of *Escherichia coli* was replaced by the CoQ₁₀ synthetic pathway through integrating decaprenyl diphosphate synthase gene (*dps*) from *Rhodobacter sphaeroides* into chromosome of *E. coli* ATCC 8739, followed by deletion of the native octaprenyl diphosphate synthase gene (*ispB*). The resulting strain GD-14 produced 0.68 mg/L CoQ₁₀ with a yield of 0.54 mg/g DCW. Modulation of *dxs* and *idi* genes of the MEP pathway and *ubiCA* genes in combination led to 2.46-fold increase of CoQ₁₀ production (from 0.54 to 1.87 mg/g DCW). Recruiting glucose facilitator protein of *Zymomonas mobilis* to replace the native phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems (PTS) further led to a 16% increase of CoQ₁₀ yield. Finally, fed-batch fermentation of the best strain GD-51 was performed, which produced 433 mg/L CoQ₁₀ with a yield of 11.7 mg/g DCW. To the best of our knowledge, this was the highest CoQ₁₀ titer and yield obtained for engineered *E. coli*.

Keywords: CoQ₁₀, homologous recombination, modulation of gene expression, *Escherichia coli*

辅酶 Q (CoQ), 即 2,3-二甲氧基-5-甲基-6-聚异戊二烯醌, 又称泛醌 (Ubiquinone, UQ) 是一种脂溶性醌类化合物, 含有一个苯醌环和不同长度异戊二烯构成的侧链^[1], 其中侧链的异戊二烯单位数决定着辅酶 Q 的种类。辅酶 Q 存在于众多微生物中, 如流感嗜血杆菌 *Haemophilus influenzae* 主要合成 CoQ₇^[2]、大肠杆菌 *Escherichia coli* 主要合成 CoQ₈^[3]、藤黄微球菌 *Micrococcus luteus* 主要合成 CoQ₉^[4]。人类主要合成辅酶 Q₁₀, 含有 10 个异戊二烯单位。辅酶

Q₁₀ 在人体有氧呼吸电子传递链中起重要作用, 也是人体重要的抗氧化剂, 可以通过清除自由基和再生生育酚类, 保护细胞膜和蛋白质不被氧化^[5-7]。辅酶 Q₁₀ 也可以保护心脏^[8], 它是人体产生能量的要素, 有助于为心肌提供充足的氧气, 改进心肌的代谢, 加强心脏的功能。口服辅酶 Q₁₀ 可以预防和治疗心血管疾病、糖尿病、神经性疾病和脑病^[9-12]。辅酶 Q₁₀ 另一个重要应用是作为皮肤软膏的成分, 可以减少皱纹^[13]。这些重要的生理功能使关于辅酶 Q₁₀ 的研究不断增多。

大肠杆菌具有遗传背景清晰、技术操作简单、适合大规模发酵等优点,通常作为基因工程宿主菌,用于次级代谢产物生产^[3];并且大肠杆菌可以合成辅酶 Q₈,其泛醌合成途径和基础代谢研究透彻,因此,多个研究组利用基因工程手段改造大肠杆菌生产辅酶 Q₁₀。如将根瘤农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens*^[14]、脱氮副球菌 *Paracoccus denitrificans*^[15]和鞘氨醇单胞菌 *Sphingomonas baekryungensis*^[16]等的十聚异戊二烯焦磷酸合成酶基因 (*dps*),在大肠杆菌中表达,构建产辅酶 Q₁₀的工程菌株。

对羟基苯甲酸 (pHBA) 和十聚异戊二烯焦磷酸 (DPP) 是辅酶 Q₁₀ 合成的两个重要前体物质。所有的类异戊二烯侧链由共同的合成单位类异戊二烯焦磷酸 (IPP) 和它的异构体二甲丙烯基焦磷酸 (DMAPP) 合成。目前已知有两种合成 IPP 和 DMAPP 的途径:一种是甲羟戊酸 (Mevalonate, MVA) 途径,另一种是 2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸 (MEP) 途径。MVA 途径主要存在于古生菌、真菌和植物的胞液或内质网上。细菌和绿色藻类,主要利用 MEP 途径来合成 IPP 和 DMAPP。Zhao 等用多个不同强度人工调控元件对 MEP 途径的基因进行系统调控,发现 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合酶基因 (*dxs*) 和异戊二烯焦磷酸异构酶基因 (*idi*) 是限速基因,提高这两个基因的表达强度,β-胡萝卜素产量显著提高^[17]。Kim 等^[18]为了提高重组大肠杆菌的辅酶 Q₁₀ 产量,将来自绿脓假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* 的 *dxs* 基因以质粒的形式过表达,发现辅酶 Q₁₀ 产量提高 2 倍。

在大肠杆菌中,由分支酸-丙酮酸裂解酶基因 (*ubiC*) 编码的分支酸-丙酮酸裂解酶催化分支酸转化为 pHBA,为辅酶 Q₁₀ 的合成提供核心结构苯醌环;对羟基苯甲酸-聚异戊二烯转移酶基因 (*ubiA*) 编码的对羟基苯甲酸-聚异戊二烯转移酶催化 pHBA 与聚异戊二烯焦磷酸的缩合是整个辅酶 Q 合成的限速酶。Zhang 等^[19]以质粒形式过表达 *ubiCA* 基因使辅酶 Q₁₀ 产量提高 5 倍。强化表达 *ubiCA* 基因可以显著提高辅酶 Q₁₀ 的产量。

研究表明用非磷酸烯醇式丙酮酸:碳水化合物磷酸转移酶系统 (PTS) 代替大肠杆菌自身的 PTS 系统,可以减少磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 的消耗,从而增加丁二酸等以 PEP 作为前体的代谢产物的合成^[20-21]。Tang 等分别用半乳糖透性酶 (GalP) 和运动发酵单胞菌 *Zymomonas mobilis* 的 Glf 转运蛋白 (由 *glf* 基因编码) 代替大肠杆菌的 PTS 系统使丁二酸产量分别提高 20% 和 41%^[22]。PEP 是辅酶 Q 合成必需的前体物质,当大肠杆菌在以葡萄糖作为唯一碳源的无机盐培养基中生长时,PTS 系统会消耗 50% 可用的 PEP。

本研究通过在大肠杆菌中引入外源 *dps* 基因,敲除内源八聚异戊二烯焦磷酸合成酶基因 (*ispB*),初步构建稳定生产辅酶 Q₁₀ 的工程菌株。然后,在染色体水平用不同强度的人工调控元件对辅酶 Q₁₀ 合成途径的一系列关键基因进行调控 (图 1),且尝试用 *Z. mobilis* 的 Glf 转运蛋白代替大肠杆菌自身的 PTS 系统来增加辅酶 Q₁₀ 的产量,探索提高工程菌株中辅酶 Q₁₀ 产量的方法,为构建高产辅酶 Q₁₀ 的基因工程菌奠定基础。

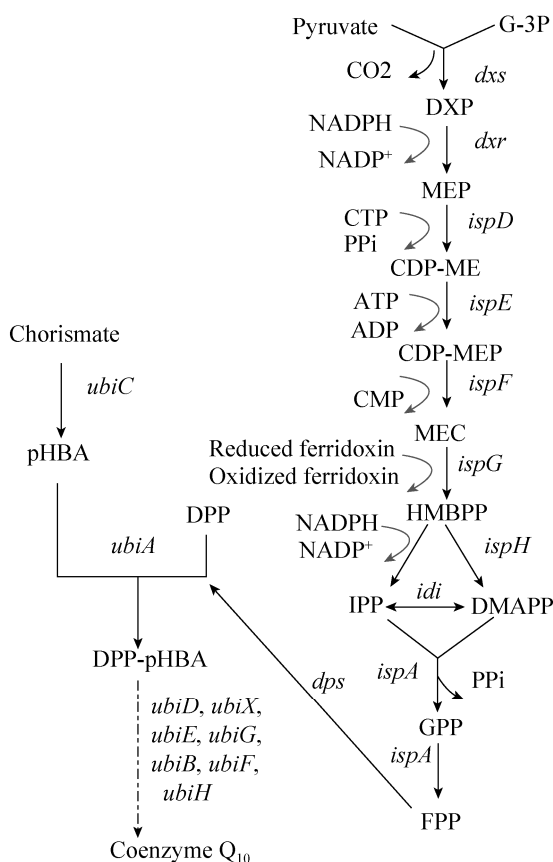


图 1 通过引入外源 *dps* 基因在大肠杆菌中构建辅酶 Q₁₀ 的合成途径

Fig. 1 Construction of CoQ₁₀ synthetic pathway in *E. coli* by integrating heterologous *dps* gene.

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂

氨苄青霉素、氯霉素、硫酸卡那霉素购自上海生工生物工程有限公司；质粒小量快速提取试剂盒购自美国 Axygen 公司；DNA 回收试剂盒购自美国 Biomiga 公司；PrimeSTAR HS DNA 聚合酶，DNA marker trans2K plus 购自大连宝生物工程公司；限制性内切酶 *Sac* I、*Sma* I、*Dpn* I、

Pme I、*Pac* I、T4 DNA 连接酶、快连酶、T4 多聚核苷酸激酶购自 NEB 公司；辅酶 Q₁₀ 标品购自美国 Sigma 公司 (Cat. No. C9538)；其他试剂均为分析纯。

1.1.2 仪器与设备

紫外可见分光光度计，Shimadzu UV-2550 spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan)；PCR 扩增仪，Eppendorf Mastercycler gradient；全自动凝胶成像系统，AlphaImager HP；电转仪 MicroPulser；台式高速离心机，Eppendorf 5415D；高速冷冻离心机，Thermo Sorvall Evolution RC；高效液相色谱，Agilent Technologies Series 1200；离心浓缩仪，Labconco CentriVap 79840-11；7 L 发酵罐，Labfors 4 (Infors Bio-technology Co. Ltd)。

1.1.3 菌株和质粒

本研究所用菌株见表 1，本研究所用的质粒见表 2。

1.2 方法

1.2.1 培养基及培养方法

LB 培养基：1 L 培养基包含 10 g 胰蛋白胨、5 g 酵母提取物、5 g 氯化钠；氨苄青霉素、氯霉素、硫酸卡那霉素终浓度分别为 100、34、50 μg/mL。LB 固体培养基含 1.5% 的琼脂。

无盐蔗糖培养基：1 L 培养基包含 10 g 胰蛋白胨、5 g 酵母提取物和 10% 的蔗糖。无盐蔗糖固体培养基含 1.5% 的琼脂。

分批补料发酵培养基：1 L 培养基中含 10 g 甘油、1.7 g 柠檬酸、10.5 g KH₂PO₄·3H₂O、6 g (NH₄)₂HPO₄、3.44 g MgSO₄·7H₂O、10 mL 微量元素溶液。微量元素溶液的成分：1 L 溶液中含 10 g FeSO₄·7H₂O、5.25 g ZnSO₄·7H₂O、3.0 g CuSO₄·5H₂O、0.5 g MnSO₄·4H₂O、0.23 g

表 1 本研究所用的菌株

Table 1 Strains used in this study

Strains	Relative characteristics	Sources
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	ATCC 17023	DSMZ
<i>E. coli</i> ATCC 8739	Wild type	Lab collection
<i>Z. mobilis</i> ZM4	ATCC 31821	Lab collection
Glf12	ATCC 8739, $\Delta ptsI::FRT::M1-12-glf$, $\Delta galp$	[22]
M1-12	ATCC 8739, FRT- <i>Km</i> -FRT::M1-12::lacZ	[23]
M1-46	ATCC 8739, FRT- <i>Km</i> -FRT::M1-46::lacZ	[23]
M1-37	ATCC 8739, FRT- <i>Km</i> -FRT::M1-37::lacZ	[23]
M1-93	ATCC 8739, FRT- <i>Km</i> -FRT::M1-93::lacZ	[23]
GD-13	ATCC 8739, $\Delta pflB::M1-12::rsdps$	This work
GD-14	ATCC 8739, $\Delta pflB::M1-12::rsdps$, $\Delta ispB$	This work
DXS-37	GD-14, M1-37::dxs	This work
GD-21	GD-14, M1-37::dxs, M1-46::idi	This work
GD-22	GD-14, M1-46::ubiC	This work
GD-23	GD-14, M1-37::ubiC	This work
GD-24	GD-14, M1-93::ubiC	This work
GD-31	GD-21, M1-46::ubiC	This work
GD-32	GD-21, M1-37::ubiC	This work
GD-33	GD-21, M1-93::ubiC	This work
GD-43	GD-32, $\Delta pflB::M1-37::rsdps$	This work
GD-44	GD-32, $\Delta pflB::M1-93::rsdps$	This work
GD-51	GD-44, $\Delta ptsI::M1-12::glf$	This work

表 2 本研究所用的质粒

Table 2 Plasmids used in this study

Plasmids	Relative characteristics	Sources
pXZ-CS	<i>bla</i> ; <i>cat-sacB</i> cassette	[24]
pAYCA184-M2-P12	Replace <i>lacI</i> and <i>P_{trc}</i> of pAYCA184-M2 with FRT- <i>Km</i> -FRT::M1-12	Lab collection
pACYC184-rsdps-P12	<i>Dps</i> from <i>R. sphaeroides</i> cloned into pAYCA184-M2-P12 at <i>Pme</i> I and <i>Sac</i> I site	This work
pXZ901	<i>IspB</i> from ATCC 8739(<i>IspB</i> -up/ <i>IspB</i> -down) cloned into pEasy-Blunt	This work
pXZ902	<i>Cat-sacB</i> cassette(<i>Sma</i> I- <i>Sfo</i> I fragment of pLOI4162) cloned into <i>ispB</i> site of pXZ901(<i>IspB</i> -1/ <i>IspB</i> -2)	This work
pXZ903	Delete <i>ispB</i> of pXZ901(<i>IspB</i> -1/ <i>IspB</i> -2) and self-ligated	This work

Na₂B₄O₇·10H₂O、2.0 g CaCl₂、0.1 g (NH₄)₆Mo₇O₂₄。补料培养基：1 L 培养基中含 500 g 甘油、15 g 蛋白胨、30 g 酵母提取物、30 g MgSO₄·7H₂O。

好氧培养：将保存于-80 °C 的菌种在 LB 平板上划线活化，挑取单菌落接种到 15 mm×100 mm 试管 (含 4 mL LB 培养基) 中，37 °C、250 r/min 过夜培养，1%的接种量转接到 100 mL 三角瓶 (10 mL LB 培养基) 中，37 °C、250 r/min 培养 24 h。收集菌液用于测定辅酶 Q₁₀ 含量。

1.2.2 表达外源 *dps* 基因的质粒构建

以类球红细菌 *R. sphaeroides* 的总 DNA 为模板，使用引物 Rsdps-*Sma* I-up 和 Rsdps-*Sac* I-down (表 3) 扩增 *R. sphaeroides* 的 *dps* 基因片段 (*rsdps*)。将纯化后的 *rsdps* 基因片段用 *Sma* I 和 *Sac* I 双酶切，质粒 pACYC184-M2-P12 用 *Pme* I 和 *Sac* I 双酶切，纯化后用 Quick ligase DNA 连接酶连接，转化 trans10 感受态细胞，在含有硫酸卡那霉素的 LB 平板上过夜培养。挑选单克隆，使用引物 Km-F 和 Rsdps-349-r (表 3) 进行 PCR 验证，验证正确的克隆提取质粒测序，将测序正确的质粒命名为 pACYC184-rsdps-P12。

1.2.3 外源 *dps* 基因和 *glf* 基因的染色体整合

用一步同源重组法^[23]，将 *R. sphaeroides* 的 *dps* 基因整合到大杆菌 ATCC 8739 的 *pflB* 位点。使用引物 *pflB*-up-FRT 和 *pflB*-down-ter，以质粒 pACYC184-rsdps-P12 为模板，扩增 DNA 片段 (包括与插入位点同源的 50 bp 同源臂、*dps* 基因和 FRT-*Km*-FRT::M1-12 片段)，将纯化后的片段电转入含有 pKD46 的 ATCC 8739 的感受态细胞中。在含有硫酸卡那霉素的 LB 平板过夜培养后，

挑选单克隆，用引物 Km-F 和 Rsdps-349-r 进行 PCR 验证，验证正确的克隆命名为 GD-13-Km。根据 Datsenko 描述的方法^[25]去除 GD-13-Km 中的 FRT-*Km*-FRT，得到重组菌株 GD-13。

来自 *Z. mobilis* 的带有 M1-12 人工调控元件的 *glf* 基因的整合采用两步同源重组的方法。首先，使用引物 ptsI-catsacB-up 和 ptsI-catsacB-down 扩增出 *cat-sacB* 基因片段 I，进行第一步同源重组，将重组菌株 GD-44 的 *ptsI* 基因替换为 *cat-sacB* 基因簇。然后，以重组菌株 Glf12^[22]的 DNA 为模板，使用引物 ptsI-up 和 ptsI-down (表 3) 扩增 DNA 片段 II (包括插入位点同源片段和带有 M1-12 人工调控元件的 *glf* 基因) 进行第二步同源重组，将 *cat-sacB* 基因簇替换为带有 M1-12 人工调控元件的 *glf* 基因，得到菌株 GD-51。

1.2.4 无痕基因敲除及基因调控

采用两步同源重组法，对基因进行敲除和调控，获得的重组菌株中无抗生素基因和 FRT 序列残留^[26-27]。

采用两步同源重组的方法敲除重组菌株 GD-13 的 *ispB* 基因^[27]，得到重组菌株 GD-14。

使用不同强度的人工调控元件，采用两步同源重组的方法，对基因进行染色体水平调控。调控元件 M1-12、M1-46、M1-37 和 M1-93 的强度，分别是大肠杆菌诱导后 *lacZ* 启动子的 0.1、1.7、2.5 和 5 倍^[23]。

对 *dxs* 基因的调控，使用引物 *dxs*-cat-up 和 *dxs*-sacB-down，以 pXZ-CS^[24]为模板，PCR 扩增出 *cat-sacB* 基因片段 I，纯化后进行第一步同源重组，将菌株 GD-14 的 *dxs* 基因的原始启动子替

表 3 本研究所用的引物

Table 3 Primers used in this work

Primer name	Primer sequence (5'-3')
Rsdps- <i>Sma</i> I -up	GCATCCCGGAAGGAGATATAACC ATGGGATTGGACGAGGTTTC
Rsdps- <i>Sac</i> I -down	GCATGAGCTCTCAGGCGATGCGTTCGACCA
pflB-up-FRT	AAACGACCACCATTAATGGTTGTGCGAAGTACGCAGTAAATAAAAAATCCAGTGTAGGCTGGAG CTGCTTC
pflB-down-ter	CGGTCCGAACGGCGCGCCAGCACGACGACCGTCTGGGGTGTACCCGTTAAGCTTGCATGCC TGCAG
Km-F	CCGTGATATTGCTGAAGAG
Rsdps-349-r	AGGATTTGTTGTCCCACAG
IspB-up	GACCGTGAGCAACAACCTTC
IspB-down	CGGTTTAGTGTAGCTACGCA
IspB-1	TCAAGGATTG CCGCATTA
IspB-2	CGCACATCGCTGTTCAAC
P-up	TTATCTCTGGCGGTGTTGAC
Cat-up	ATGAAACCGCTGATTGCATCTA
dxs-cat-up	ACTACATCATCCAGCGTAATAAATAAACAATAAGTATTAATAGGCCCTG TGTGACGGAAGATCACTTCGCA
dxs-sacB-down	GTGGAGTCGACCAGTGCCAGGGTTCGGTATTTGGCAATATCAAAACTCATTATTTGTAACTG TTAATTGCCTT
dxs -381-down	GATGGAGTTGATGAATGC
dxs-up-P	ACTACATCATCCAGCGTAATAAATAAACAATAAGTATTAATAGGCCCTGTTATCTCTGGCGGTG TTGAC
dxs-RBS-down	GTGGAGTCGACCAGTGCCAGGGTTCGGTATTTGGCAATATCAAAACTCATAGCTGTTTCCTGGTT
idi-cat-up	TCACTTGGTTAATCATTTCACTCTTCAATTATCTATAATGATGAGTGATCTGTGACGGAAGATCA CTTCGCA
idi-sacB-down	CCCGTGGGAACCTCCCTGTGCATTCAATAAAATGACGTGTTCCGTTTGCATTATTTGTAACTGT TAATTGCCTTG
idi-483-down	CGTGGCATCAATACCGTGTA
idi-up-P	TCACTTGGTTAATCATTTCACTCTTCAATTATCTATAATGATGATGATCTTATCTCTGGCGGTGTT GAC
idi-RBS-down	CCCGTGGGAACCTCCCTGTGCATTCAATAAAATGACGTGTTCCGTTTGCATAGCTGTTTCCTGGTT
ubiC-cat-up	GCCCTACGGTTGCCCTCGCCAGCACGGGCATCGGTAAGCGTAAGGTTCTGTGACGGAAGAT CACTTCGCA
ubiC-sacB-down	TCTTTAAATAGCGCAGCGCACGAGTTGCGTTAACGCGGGGTGTGACATTATTTGTAACTG TTAATTGCCTT
ubiC-p-up	GCCCTACGGTTGCCCTCGCCAGCACGGGCATCGGTAAGCGTAAGGTTCTTATCTCTGGCGGTG TTGAC
ubiC-RBS-down	TCTTTAAATAGCGCAGCGCACGAGTTGCGTTAACGCGGGGTGTGACATAGCTGTTTCCTGGTT

续表 3

ubiC-365-r	GATGTGAACAGATAGCGTCC
pflB-up-cat	AAAACGACCACCATTAATGGTTGTCGAAGTACGCAGTAAATAAAAAATCCATGTGACGGAAGA TCACTTCGCA
p-down-sacB	GGCTCAATTATATCAACGTTGTTATCTCTTGTCAACACCGCCAGAGATAATTATTTGTAACTGTT AATTGTCCT
pflB-up-P	AAACGACCACCATTAATGGTTGTCGAAGTACGCAGTAAATAAAAAATCCATTATCTCTGGCGGT GTTGAC
Rsdps-RBS-down	TCGGCCGACAGCCGGTCGAGCGGCTTGGAGACGTTTTTCGTTTCATGCCCATAGCTGTTTCCTGGTT TGTGGTGAGCTTGCTGGCGATGAACGTGCTACACTTCTGTTGCTGGGGATTGTGACGGAAGAT CACTTCGCA
ptsI-catsacB-up	ATGATCTTCTCCTAAGCAGTAAATTGGGCCGATCTCGTGGATTAGCAGA
ptsI-catsacB-down	TTATTTGTAACTGTTAATTGTCCT
ptsI-up	CGCATTATGTTCCCGATGAT
ptsI-down	GCCTTTCAGTTCAACGGTGT

换为 *cat-sacB* 基因簇。使用引物 *dxs-up-p* 和 *dxs-RBS-down*, 以 M1-37 菌株的基因组 DNA 为模板^[23], PCR 扩增出含 M1-37 人工调控元件的 DNA 片段 II, 进行第二步同源重组, 将 *cat-sacB* 基因簇替换为人工调控元件 M1-37, 得到重组菌株 DXS-37。

采用上述同样的方法对 *idi*、*ubiCA* 和 *dps* 基因进行调控。

上述调控所用引物序列见表3, 构建菌株见表1。

1.2.5 菌株 GD-51 的分批补料发酵

参照 Zhao 等的研究^[17], 将辅酶 Q₁₀ 产量最高的重组大肠杆菌 GD-51 在 7 L 发酵罐中进行分批补料发酵。发酵温度 37 °C, 空气流量 4 L/min, 溶氧控制在 30%。在批次发酵阶段, 为了使溶氧控制在 30%, 转速需与溶氧偶联, 转速在 400–1 200 r/min 之间变化。在溶氧反弹点 (初始碳源消耗完) 之后转速一直保持在 1 200 r/min, 采用模拟指数流加补料方式进行补料^[28]。通过控制补料量使整个发酵过程甘油浓度保持在 0.5 g/L 以下, 使用 5 mol/L 氨水将 pH 控制在 7.0。

1.2.6 辅酶 Q₁₀ 产量的检测方法

参照 Park 等的研究^[29], 对菌体中的辅酶 Q₁₀ 进行提取和 HPLC 检测。每次取 4 mL 菌液, 离心收菌, 破碎细胞, 用正己烷和正丙醇的混合液 (体积比 5 : 3) 萃取两次, 用真空离心浓缩仪真空干燥, 得到少量固体, 加入无水乙醇溶解, 使用 HPLC 检测辅酶 Q₁₀ 产量。因为辅酶 Q₁₀ 不能被完全萃取, 用上述方法, 在菌体中加不同浓度标准品, 进行加标回收实验, 得到的辅酶 Q₁₀ 回收率是 60.4%, 用来矫正辅酶 Q₁₀ 产量^[29]。烘干菌体测得每升每 OD₆₀₀ 的培养物中含 0.343 g 干细胞, 用以换算单位干细胞中辅酶 Q₁₀ 产量。

用高效液相色谱检测辅酶 Q₁₀ 产量。检测条件: DAD 检测器, Symmetry C18 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为无水乙醇, 流速 0.8 mL/min, 柱温 30 °C, 进样量 20 μL, 检测时间 20 min, 检测波长 275 nm。每个待测样品分别有 3 个平行样, 实验结果取自 3 个平行的平均值。用购自 Sigma 公司的辅酶 Q₁₀ 标准品构建辅酶 Q₁₀ 的标准曲线。

2 结果与分析

2.1 外源 *dps* 基因的表达

大肠杆菌本身没有合成辅酶 Q₁₀ 的能力,但是引入外源 *dps* 基因后,大肠杆菌就可以生产辅酶 Q₁₀。克隆 *R. sphaeroides* 的 *dps* 基因,构建质粒 pACYC184-rsdps-P12,并将其转入大肠杆菌 ATCC 8739 中,来合成辅酶 Q₁₀。

在转入质粒 pACYC184-rsdps-P12 的大肠杆菌中,检测到辅酶 Q₁₀ 的合成,辅酶 Q₁₀ 产量达到 1.24 mg/L,单位细胞含量为 0.68 mg/g DCW (表 4),说明质粒 pACYC184-rsdps-P12 中 *R. sphaeroides* 的 *dps* 基因可以表达、具有催化合成辅酶 Q₁₀ 的能力。

2.2 染色体整合外源 *dps* 基因并敲除内源 *ispB* 基因

由于质粒表达不稳定,并且发酵时需要添加

抗生素,因此将外源 *dps* 基因整合到大肠杆菌染色体上。同时,将大肠杆菌自身的 *ispB* 基因敲除,以减少代谢副产物辅酶 Q₈ 的积累,同时达到提高辅酶 Q₁₀ 产量的目的。

将 *R. sphaeroides* 的 *dps* 基因整合到 ATCC 8739 染色体上,得到重组菌株 GD-13。然后,敲除内源 *ispB* 基因,得到重组菌株 GD-14。对菌株 GD-13 和 GD-14 进行发酵,并对辅酶 Q₁₀ 进行提取和 HPLC 检测。

分析 HPLC 检测色谱图 (图 2),重组大肠杆菌 GD-13 既有辅酶 Q₁₀ 合成,又有辅酶 Q₈ 合成;敲除了内源 *ispB* 基因后,只有辅酶 Q₁₀ 合成,与预期结果一致。

分析辅酶 Q₁₀ 产量 (表 4),敲除 *ispB* 基因,辅酶 Q₁₀ 产量有显著提高,GD-14 的单位细胞含量与 GD-13 相比提高 135%。说明敲除 *ispB* 基因,可以阻止辅酶 Q₈ 的合成,从而提高辅酶 Q₁₀ 的产

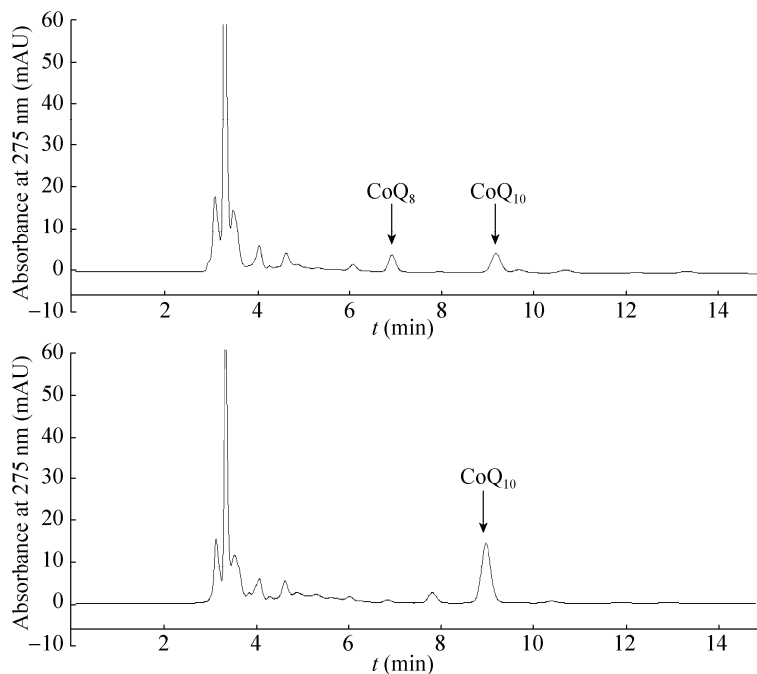


图 2 辅酶 Q₁₀ 的 HPLC 检测色谱图

Fig. 2 HPLC analysis of CoQ₁₀. (A) Recombinant *E. coli* GD-13. (B) Recombinant *E. coli* GD-14.

表 4 染色体整合外源 *dps* 基因及敲除内源 *ispB* 基因后辅酶 Q₁₀ 的产量Table 4 Production of CoQ₁₀ by recombinant *E. coli* after expression of heterologous *dps* gene and deletion of endogenous *ispB* gene

Strains ^a	OD ₆₀₀	Dry cell weight (g/L)	CoQ ₁₀ titer (mg/L)	CoQ ₁₀ yield (mg/g DCW)
ATCC8739	5.63±0.11	1.93±0.09	0	0
ATCC8739(pACYC184-rsdps-P12)	5.28±0.13	1.81±0.05	1.24±0.07	0.68±0.06
GD-13	4.20±0.08	1.44±0.05	0.33±0.06	0.23±0.07
GD-14	3.61±0.01	1.24±0.09	0.68±0.03	0.54±0.01

^a Three repeats were performed for each strain, and the error bars represented standard deviation.

量, 这与 Choi 等的研究结果一致^[30]。

2.3 调控 MEP 途径的关键基因

DPP 是辅酶 Q₁₀ 合成的一个重要前体, 调控 MEP 途径, 可以增加 IPP、DMAPP 的供给, 从而增加碳流向 DPP 的合成。Zhao 等^[17]的研究表明, 调控 MEP 途径的关键基因 *dxs* 和 *idi*, 可以显著提高 β-胡萝卜素产量, 而辅酶 Q₁₀ 侧链与 β-胡萝卜素的合成有相同的前体, 因此认为采用同样方法对 *dxs* 和 *idi* 基因进行调控, 可以有效提高辅酶 Q₁₀ 产量。

对 MEP 途径的 *dxs* 和 *idi* 基因调控后得到重组菌株 GD-21, 其辅酶 Q₁₀ 产量为 0.68 mg/L, 单位细胞含量为 0.53 mg/g DCW, 与 GD-14 几乎一样 (图 3)。这与 Zhao 等的研究不一致^[17], 推测可能另一前体物质 pHBA 供给不足限制了辅酶 Q₁₀ 的合成, 或者 *dps* 基因表达量不足, 即使细胞内有足够的前体物质 IPP 和 DMAPP 存在, 也不能合成足够多的 DPP, 从而限制辅酶 Q₁₀ 的合成。

2.4 调控 *ubiCA* 基因

pHBA 是辅酶 Q₁₀ 合成的另一前体, 在大肠杆菌中, 由 *ubiC* 基因编码的分支酸-丙酮酸裂解酶催化合成。*ubiA* 基因编码的对羟基苯甲酸-聚

异戊二烯转移酶催化 pHBA 与聚异戊二烯焦磷酸的缩合是整个辅酶 Q 合成的限速酶。并且 *ubiC* 和 *ubiA* 处于同一个操纵子下, 过表达 *ubiCA* 可以显著增加辅酶 Q₁₀ 产量^[19]。因此从 GD-14 出发, 用 3 个强度的人工调控元件 (M1-46、M1-37 和 M1-93) 对 *ubiCA* 基因进行调控, 得到菌株 GD-22、GD-23 和 GD-24。

ubiCA 基因调控后, 辅酶 Q₁₀ 产量均有提高, 单位细胞含量与 GD-14 相比, 分别提高 105%、91%和 117%, 其中调控为 M1-93 的菌株 GD-24 辅酶 Q₁₀ 产量最高, 达到 1.41 mg/L, 单位细胞含量为 1.17 mg/g DCW (图 3)。调控 *ubiCA* 基因, 可以有效提高 Q₁₀ 产量, 说明大肠杆菌辅酶 Q₁₀ 的整个合成途径中对羟基苯甲酸的供给以及其与 DPP 的缩合是关键的限制步骤。

2.5 组合调控 MEP 途径和 *ubiCA* 基因

ubiCA 调控后, MEP 途径的 IPP 和 DMAPP 供给可能成为辅酶 Q₁₀ 合成的限速步骤。为了验证这一点, 对 MEP 途径和 *ubiCA* 基因进行组合调控。将菌株 GD-21 的 *ubiCA* 基因的原始启动子调控为人工调控元件 M1-46、M1-37 和 M1-93, 得到重组菌株 GD-31、GD-32 和 GD-33。

MEP 途经和 *ubiCA* 基因组合调控后, 辅酶 Q₁₀ 产量均有显著提高, 单位细胞含量与 GD-21 相比分别提高 210%、217%和 174%, 与 GD-22、GD-23 和 GD-24 相比分别提高 50%、64%和 25% (图 3)。菌株 GD-32 的产量最高, 其辅酶 Q₁₀ 产量为 1.94 mg/L, 1.70 mg/g DCW。说明 *ubiCA* 调控后, IPP 和 DMAPP 前体供应成了另一个限制因素, 只有同时充分供给两个前体物质, 才能使辅酶 Q₁₀ 产量更高。

2.6 调控 *dps* 基因

由于在大肠杆菌染色体上只整合了一个拷贝且带有相对低强度调控元件 (M1-12) 的 *dps* 基因, 十聚异戊二烯焦磷酸合成酶表达不足可能限制辅酶 Q₁₀ 的合成。为了进一步提高辅酶 Q₁₀ 的产量, 分别用人工调控元件 M1-37 和 M1-93 组合调控菌株 GD-32 的 *dps* 基因, 得到菌株 GD-43 和 GD-44。

dps 基因调控为 M1-93 的菌株 GD-44 辅酶 Q₁₀ 产量最高, 产量达 2.21 mg/L, 单位细胞含量达 1.87 mg/g DCW, 与 GD-32 相比增加 10% (表

5)。*dps* 基因调控后产量增加不明显, 然而据 Zhao 等的研究^[17], 调控 *dxs* 和 *idi* 基因后, β -胡萝卜素产量达 18.40 mg/g DCW, 如果合成 β -胡萝卜素的前体 IPP 和 DMAPP 全部用来合成辅酶 Q₁₀, 理论上应该达到约 23.67 mg/g DCW, 可能目前 DPP 并不是辅酶 Q₁₀ 合成的限制因素, pHBA 的供给不足或者下游醌环修饰途径的酶表达不够等限制了辅酶 Q₁₀ 的合成。

2.7 引入 *Z. mobilis* 的 *glf* 基因

为了增加 PEP 的供给从而提高辅酶 Q₁₀ 的产量, 将来自 *Z. mobilis* 的带有 M1-12 人工调控元件的 *glf* 基因插入重组大肠杆菌 GD-44 的 *pts I* 位点, 敲除大肠杆菌自身的 PTS 系统, 既减少 PEP 的消耗, 又保证葡萄糖转运。

引入 *Z. mobilis* 的带有 M1-12 人工调控元件的 *glf* 基因, 得到菌株 GD-51, 其辅酶 Q₁₀ 单位细胞含量与 GD-44 相比增加 16% (表 5)。说明通过引入 *Z. mobilis* 的 Glf 转运蛋白, 可以进一步增加辅酶 Q₁₀ 的产量。

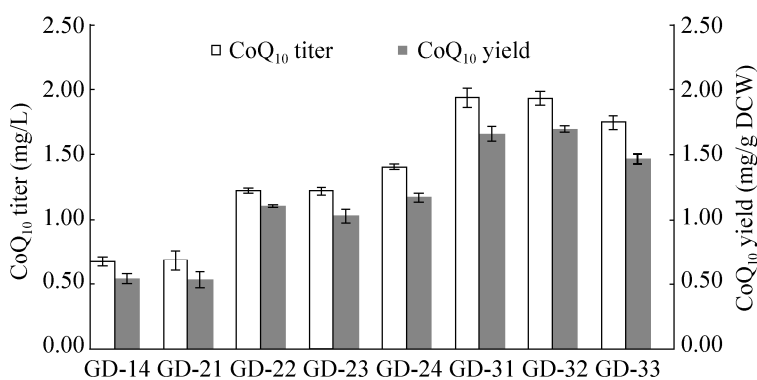


图 3 调控 MEP 途径和 *ubiCA* 基因后重组大肠杆菌的辅酶 Q₁₀ 产量

Fig. 3 CoQ₁₀ production by recombinant *E. coli* strains after modulation of *dxs*, *idi* and *ubiCA* genes. Open bar represents CoQ₁₀ titer; filled bar represents CoQ₁₀ yield.

表 5 调控 *dps* 基因和引入外源 *glf* 基因后重组大肠杆菌的辅酶 Q₁₀ 产量Table 5 Production of CoQ₁₀ in recombinant *E. coli* after modulation of *dps* gene and expression of heterologous *glf* gene

Strains ^a	OD ₆₀₀	Dry cell weight (g/L)	CoQ ₁₀ titer (mg/L)	CoQ ₁₀ yield (mg/g DCW)
GD-32	3.35±0.09	1.15±0.03	1.94±0.06	1.70±0.02
GD-43	3.33±0.07	1.14±0.02	1.75±0.13	1.54±0.10
GD-44	3.47±0.05	1.19±0.02	2.21±0.10	1.87±0.02
GD-51	3.58±0.06	1.16±0.02	2.52±0.09	2.18±0.05

^a Three repeats were performed for each strain, and the error bars represented standard deviation.

2.8 菌株 GD-51 的分批补料发酵

对高产辅酶 Q₁₀ 的重组菌株 GD-51 在 7 L 发酵罐中, 进行分批补料发酵。在批次发酵阶段, 转速与溶氧偶联, 溶氧稳定在 30% 左右。第 10 h, 初始碳源消耗完, 溶氧反弹, 开始补料发酵。首先, 采用模拟指数流加的补料策略, 补料 3.5 h, 补料量指数增加 (15.7–26.1 mL/h)。如果持续指数流加策略, 则会营养过剩, 产生过量乙酸从而影响细胞生长。因此, 13.5 h 之后采用 26.1 mL/h 的速度恒速补料。细胞在 47 h 进入稳定期, 为了

减少副产物乙酸的积累, 发酵后期从 60 h 至 78 h, 阶段性的降低补料速度 (图 4)。

发酵周期是 78 h, 最高的 OD₆₀₀ 是 118, 干重为 41.6 g/L, 辅酶 Q₁₀ 产量最高达 433 mg/L, 单位细胞辅酶 Q₁₀ 含量达 11.7 mg/g DCW (图 5)。与摇瓶发酵相比, 分批补料发酵使重组菌株 GD-51 的 OD₆₀₀ 增加约 31 倍, 辅酶 Q₁₀ 单位细胞含量提高约 4.4 倍, 这说明分批补料发酵, 既可以增加细胞量还可以提高辅酶 Q₁₀ 产量。推测认为, 与摇瓶实验相比, 分批补料发酵能很好地限

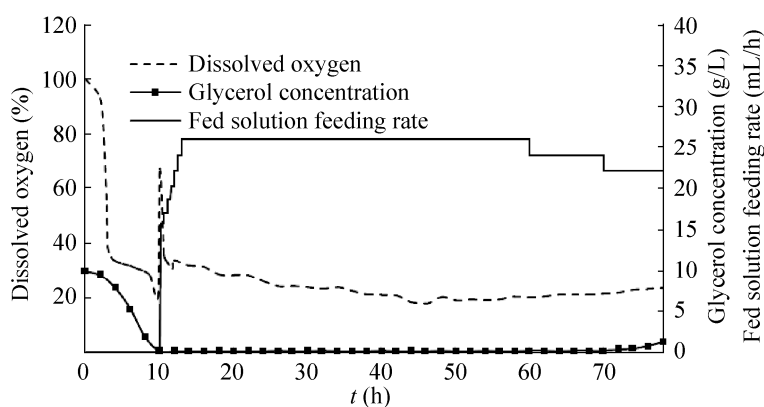


图 4 分批补料发酵 GD-51 菌株过程中甘油浓度、溶氧和补料速度的变化

Fig. 4 Dissolved oxygen, fed solution feeding rate and glycerol concentration during fed-batch fermentation of strain GD-51. Dotted line represents dissolved oxygen; square represents glycerol concentration; full line represents fed solution feeding rate.

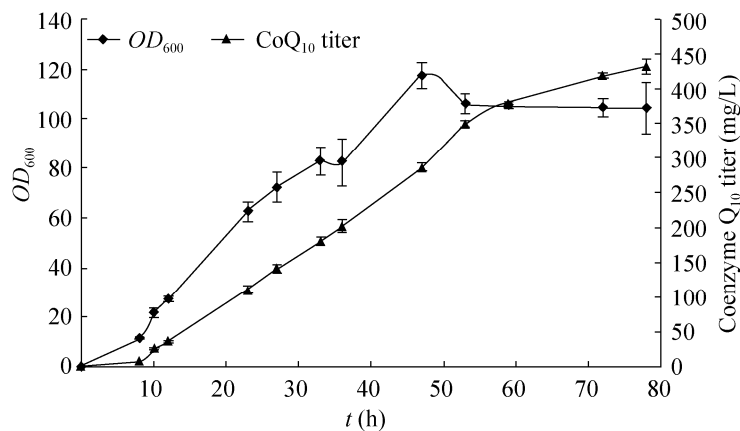


图5 分批补料发酵GD-51菌株, 生物量以及辅酶Q₁₀产量的变化

Fig. 5 Biomass and CoQ₁₀ production of strain GD-51 by Fed-batch fermentation. Diamond represents OD₆₀₀; triangle represents CoQ₁₀ titer.

制碳源的供给, 降低代谢副产物乙酸的积累。另外, 发酵过程中控制 pH 在 7.0, 搅拌增加溶氧等为细胞提供了合适的生长条件。这些因素导致分批补料发酵时辅酶 Q₁₀ 的单位细胞产量大于摇瓶实验。

3 结论

本研究在大肠杆菌中引入外源 *dps* 基因, 敲除内源 *ispB* 基因, 然后分别对 MEP 途径的 *dxs* 和 *idi* 基因以及 *ubiCA* 基因进行调控, 发现只有辅酶 Q₁₀ 的两个前体 DPP 和 pHBA 同时供给充足, 才能使辅酶 Q₁₀ 产量更高。另外, 首次用 *Z. mobilis* 的 Glf 转运蛋白代替大肠杆菌自身的 PTS 系统, 使辅酶 Q₁₀ 产量进一步提高, 证明构建非 PTS 葡萄糖转运系统这一策略可用于提高 PEP 供给从而提高辅酶 Q₁₀ 的生产。

REFERENCES

- [1] Meganathan R. Ubiquinone biosynthesis in microorganisms. FEMS Microbiol Lett, 2001, 203(2): 131-139.
- [2] Fleischmann RD, Adams MD, White O, et al. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. Science, 1995, 269(5223): 496-512.
- [3] Jeya M, Moon HJ, Lee JL, et al. Current state of coenzyme Q₁₀ production and its applications. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 85(6): 1653-1663.
- [4] Ohnuma S, Koyama T, Ogura K. Purification of solanesyl-diphosphate synthase from *Micrococcus luteus*. J Biol Chem, 1991, 266(35): 23706-23713.
- [5] Lass A, Sohal RS. Electron transport-linked ubiquinone-dependent recycling of α -tocopherol inhibits autooxidation of mitochondrial membranes. Arch Biochem Biophys, 1998, 352(2): 229-236.
- [6] Yoshida Y, Hayakawa M, Habuchi Y, et al. Evaluation of the dietary effects of coenzyme Q *in vivo* by the oxidative stress marker, hydroxyoctadecadienoic acid and its stereoisomer ratio. BBA-Gen Subjects, 2006, 1760(10): 1558-1568.
- [7] Martin SF, Bur NI, Espinosa JC, et al. Coenzyme Q and protein/lipid oxidation in a BSE-infected transgenic mouse model. Free Radical Bio Med, 2007, 42(11): 1723-1729.
- [8] Littarru GP, Tiano L. Clinical aspects of coenzyme Q₁₀: an update. Curr Opin Clin Nutr, 2005, 8(6): 641-646.
- [9] Singh RB, Wander GS, Rastogi A, et al. Randomized, double-blind placebo-controlled trial of coenzyme Q₁₀ in patients with acute myocardial infarction. Cardiovasc Drug Ther, 1998, 12(4):

- 347–353.
- [10] Hodgson JM, Watts GF, Playford DA, et al. Original Communication Coenzyme Q₁₀ improves blood pressure and glycaemic control: a controlled trial in subjects with type 2 diabetes. *Eur J Clin Nutr*, 2002, 56(11): 1137–1142.
- [11] Shults CW, Oakes D, Kieburtz K, et al. Effects of coenzyme Q₁₀ in early Parkinson disease: evidence of slowing of the functional decline. *Arch Neurol*, 2002, 59(10): 1541–1550.
- [12] Yang X, Dai G, Li G, et al. Coenzyme Q₁₀ reduces β -amyloid plaque in an APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci*, 2010, 41(1): 110–113.
- [13] Inui M, Ooe M, Fujii K, et al. Mechanisms of inhibitory effects of CoQ₁₀ on UVB-induced wrinkle formation *in vitro* and *in vivo*. *Biofactors*, 2008, 32(1): 237–243.
- [14] Zahiri HS, Yoon SH, Keasling JD, et al. Coenzyme Q₁₀ production in recombinant *Escherichia coli* strains engineered with a heterologous decaprenyl diphosphate synthase gene and foreign mevalonate pathway. *Metab Eng*, 2006, 8(5): 406–416.
- [15] Takahashi S, Nishino T, Koyama T. Isolation and expression of *Paracoccus denitrificans* decaprenyl diphosphate synthase gene for production of ubiquinone-10 in *Escherichia coli*. *Biochem Eng J*, 2003, 16(2): 183–190.
- [16] Cluis CP, Ekins A, Narcross L, et al. Identification of bottlenecks in *Escherichia coli* engineered for the production of CoQ₁₀. *Metab Eng*, 2011, 13(6): 733–744.
- [17] Zhao J, Li Q, Sun T, et al. Engineering central metabolic modules of *Escherichia coli* for improving β -carotene production. *Metab Eng*, 2013, 17: 42–50.
- [18] Kim SJ, Kim MD, Choi JH, et al. Amplification of 1-deoxy-D-xylucose-5-phosphate (DXP) synthase level increases coenzyme Q₁₀ production in recombinant *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 72(5): 982–985.
- [19] Zhang D, Shrestha B, Li Z, et al. Ubiquinone-10 production using *Agrobacterium tumefaciens dps* gene in *Escherichia coli* by coexpression system. *Mol Biotechnol*, 2007, 35(1): 1–14.
- [20] Yi J, Draths KM, Li K, et al. Altered glucose transport and shikimate pathway product yields in *E. coli*. *Biotechnol Prog*, 2003, 19(5): 1450–1459.
- [21] Zhang X, Jantama K, Shanmugam KT, et al. Reengineering *Escherichia coli* for succinate production in mineral salts medium. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(24): 7807–7813.
- [22] Tang J, Zhu X, Lu J, et al. Recruiting alternative glucose utilization pathways for improving succinate production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(6): 2513–2520.
- [23] Lu J, Tang J, Liu Y, et al. Combinatorial modulation of *galP* and *glk* gene expression for improved alternative glucose utilization. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 93(6): 2455–2462.
- [24] Tan Z, Zhu X, Chen J, et al. Activating phosphoenolpyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in combination for improvement of succinate production. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79(16): 4838–4844.
- [25] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(12): 6640–6645.
- [26] Shi A, Zhu X, Lu J, et al. Activating transhydrogenase and NAD kinase in combination for improving isobutanol production. *Metab Eng*, 2013, 16: 1–10.
- [27] Zhang X, Jantama K, Moore JC, et al. Production of L-alanine by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 77(2): 355–366.
- [28] Li L. Enhanced production of recombinant formate dehydrogenase with pseudo-exponential Fed-batch cultivation [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2010 (in Chinese).
李丽. 拟指数流加补料高密度培养重组 *E. coli* 产甲酸脱氢酶 [D]. 杭州: 浙江大学, 2010.
- [29] Park YC, Kim SJ, Choi JH, et al. Batch and fed-batch production of coenzyme Q₁₀ in recombinant *Escherichia coli* containing the decaprenyl diphosphate synthase gene from *Gluconobacter suboxydans*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 67(2): 192–196.
- [30] Choi JH, Ryu YW, Seo JH. Biotechnological production and applications of coenzyme Q₁₀. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 68(1): 9–15.

(本文责编 陈宏宇)