

施 磊,扶教龙,吴晨奇,等. 产辅酶 Q₁₀根瘤土壤杆菌的紫外诱变选育及其发酵培养基优化[J]. 江苏农业科学,2017,45(10):224-228.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.10.062

产辅酶 Q₁₀ 根瘤土壤杆菌的紫外诱变选育 及其发酵培养基优化

施 磊,扶教龙,吴晨奇,钱大伟,徐敏强,鞠 鑫,李良智

(苏州科技学院化学生物与材料工程学院,江苏苏州 215009)

摘要:以根瘤土壤杆菌作为出发菌株,经过紫外诱变、平板初筛、摇瓶发酵复筛,最终获得 1 株辅酶 Q₁₀ 高产菌株 Q-6,其辅酶 Q₁₀ 产量为 11.92 mg/L,较出发菌株提高 92.57%,且其遗传性稳定,可用于进一步研究。然后在单因素试验的基础上,应用响应面分析方法,对其发酵培养基进行优化,得到生产辅酶 Q₁₀ 的最佳发酵培养基配方(葡萄糖 35.46 g/L、酵母浸膏 12.33 g/L、Na₂HPO₄ 1.58 g/L、MgSO₄ · 7H₂O 0.39 g/L),在此培养基下辅酶 Q₁₀ 产量最高,为 11.32 mg/L,较单因素试验最高值提高 8.53%。

关键词:根瘤土壤杆菌;辅酶 Q₁₀;紫外诱变;响应面分析法;发酵培养基

中图分类号: Q935 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)10-0224-05

辅酶 Q₁₀ (coenzyme Q₁₀, CoQ₁₀) 别称癸烯醌、泛醌,它是人类生命不可缺少的重要元素之一,能激活人体细胞,同时还能提高人体免疫力并增强人体活力,现在医学上广泛用于心血管系统疾病的治疗^[1],除此之外,辅酶 Q₁₀ 还具有抗氧化性、延缓衰老和增强人体活力等功能,所以现在它已经在食品和化妆品领域得到大量应用。辅酶 Q₁₀ 的制备有化学法、动植物组织提取法和微生物发酵法 3 种方法^[2-4]。因为使用前 2 种方法合成辅酶 Q₁₀ 时的成本较高,并且会产生光学异构体,生物学活性也不是很高,所以现在微生物发酵法被认为是最具有前途的一种生产方式。本试验选择根瘤土壤杆菌为出发菌株,该菌是目前研究 CoQ₁₀ 生物发酵法较常用的菌种^[5-7]。通过紫外照射诱导变异和平板初筛、摇瓶发酵复筛相结合的方法,以期获得 CoQ₁₀ 高产菌,为提高 CoQ₁₀ 工业生产效率打下基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌种与试剂 根瘤土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens* 1.1701) 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心 (CGM-CC), 保藏于笔者所在试验室。辅酶 Q₁₀ 标准品 (美国 Sigma 公司), 分析纯。其他药品和试剂, 均为分析纯或化学纯。

1.1.2 培养基 (1) 平板培养基。葡萄糖 5 g/L, 酵母膏 5 g/L, 蛋白胨 10 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 2 g/L, 琼脂 20 g/L, pH 值 7.2, 121 ℃ 灭菌 20 min。(2) 斜面培养基。葡萄糖 10 g/L,

酵母膏 5 g/L, 蛋白胨 5 g/L, 氯化钠 5 g/L, 琼脂 20 g/L, pH 值 7.2, 121 ℃ 灭菌 20 min。(3) 种子培养基。葡萄糖 10 g/L, 酵母膏 5 g/L, 蛋白胨 5 g/L, 氯化钠 5 g/L, pH 值 7.2, 121 ℃ 灭菌 20 min。(4) 发酵培养基。葡萄糖 20 g/L, 酵母膏 10 g/L, 蛋白胨 10 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g/L, Na₂HPO₄ 1.5 g/L, KH₂PO₄ 0.5 g/L, pH 值 7.2, 121 ℃ 灭菌 20 min。

1.1.3 试验设备 紫外分光光度计 (UV-2450, 日本岛津); 可见分光光度计 (上海欣茂仪器有限公司); 离心机 (上海安亭科学仪器厂); 旋转蒸发器 (日本东京理化器械株式会社); 恒温调速回转式摇床 (上海跃进医疗器械厂); 数显 pH 计 (上海天达仪器有限公司); 生物传感分析仪等。

1.2 方法

1.2.1 菌种活化 将保存的原始菌株接种于斜面培养基上, 将接种后的斜面试管置于恒温培养箱中, 30 ℃ 下培养 48 h, 之后再进行第 2、第 3 次传代培养, 放入冰箱冷藏待用。

1.2.2 种子液培养 用接种环从斜面培养基中接 1 环菌种于种子培养基中, 将接好种的三角瓶放入摇床中, 在 30 ℃、200 r/min 条件下培养 24 h, 种子培养基为 250 mL 锥形三角瓶中装入 50 mL 培养基。

1.2.3 摇瓶发酵培养 摇瓶发酵培养是将培养好种子培养液按 10% (体积分数) 接种量的接入装有 50 mL 发酵液的 250 mL 三角瓶中, 在 30 ℃、200 r/min 条件下摇床培养 72 h, 发酵结束后进行相关参数测定。

1.2.4 皂化法提取辅酶 Q₁₀ 将菌体移入 250 mL 磨口锥形瓶内, 在锥形瓶中加入 2.5 g KOH、0.7 g 焦性没食子酸、19 mL 甲醇、7 mL 蒸馏水, 然后混匀, 在 90 ℃ 水浴锅中回流 30 min, 用自来水迅速冷却到常温, 倒入分液漏斗中, 在分液漏斗中加入 40 mL 石油醚, 剧烈振荡 5 min, 进行辅酶 Q₁₀ 的萃取, 连续萃取 2 次, 最后把萃取液合并, 用蒸馏水洗涤到中性; 然后加入 5 g 无水硫酸钠, 干燥并使液体澄清; 再用 50 ℃ 的旋转蒸发器浓缩至干, 并且完全挥发, 再加入 5 mL 无水乙醇,

收稿日期: 2016-01-24

基金项目: 江苏省苏州市科技计划 (编号: SYN201317); 苏州科技学院科研基金 (编号: XKZ201411)。

作者简介: 施 磊 (1991—), 男, 江苏海门人, 硕士研究生, 研究方向为生物化工、食品微生物。E-mail: 864617846@qq.com。

通讯作者: 扶教龙, 副教授, 研究方向为生物化工、发酵工程。E-mail: jlfu999@126.com。

放入冰箱中冷冻,使胆固醇等杂质析出,过滤,滤液定容至 10 mL,进行测量。

1.2.5 辅酶 Q_{10} 产量的测定 参照紫外分光光度法^[8]。

1.2.6 菌株生长曲线的绘制 进行紫外诱变时,通常在细胞对数期进行紫外照射导致发生突变的概率较大,因此须要确定出发菌株的生长曲线。吸取 5 mL 生理盐水注入活化好的根瘤土壤杆菌斜面种子中,用竹签或接种针将菌落刮下,将菌悬液转移至空试管中用振荡器混匀,从中吸取 1 mL 菌悬液(按 2% 接种量)接种到 50 mL 种子培养基中,于 30 ℃、200 r/min 条件下摇床培养,每间隔 2 h 取 9 mL 种子液于事先已称好的 10 mL 离心管中,于 4 000 r/min 下离心 15 min。洗涤后离心,重复 2 次,烘干测干质量,并且计算菌体浓度。将各时段的菌体浓度作为纵坐标,培养时间作为横坐标,绘制出发菌株的生长曲线。

1.2.7 紫外诱变方法

1.2.7.1 菌悬液的制备 取 10 mL 处于对数生长期(培养 12 h)的发酵液,加入进无菌离心管中,10 000 r/min 下离心 20 min,去除上清液,收集菌体,菌体用 10 mL 生理盐水洗涤离心 3 次,然后重新悬于 10 mL 无菌生理盐水中,备用。使用血球计数板,在显微镜下直接计数,将细胞浓度调整为“亿个/mL”。

1.2.7.2 紫外诱变 开启 20 W 的紫外线灯预热 10 ~ 15 min,取 3 mL 制备好的菌悬液,置于 1 个直径为 6 cm 的空培养皿中,将培养皿放在离紫外灯 30 cm 的地方,分别振荡照射 0、30、60、90、120、150、180 s,然后在黑暗中分别取 0.1 mL 处理菌液涂布于平板培养基上,用黑纸包好,30 ℃ 下倒置培养 48 h,计数,绘制致死率曲线。同时,作对照试验,对照组菌悬液不进行紫外照射,其他操作相同。致死率^[9]计算公式为:致死率 = (对照菌落数 - 处理菌落数)/对照菌落数 × 100%。在正式试验时,选取致死率为 80% 的处理时间进行诱变,其余操作同上。

1.2.7.3 初筛 根据致死率曲线,将诱变后的菌液涂布于筛选平板培养基上,30 ℃ 下培养 48 h;挑取生长快、菌落大的单菌落,接入斜面,30 ℃ 培养 48 h,置于 4 ℃ 冰箱保藏,以备复筛。

1.2.7.4 复筛 将初筛得到的突变株菌株逐个接入种子培养基中,于 30 ℃、200 r/min 摇床中培养 24 h,然后按 10% 接种量转接到发酵培养基中,30 ℃、200 r/min 培养 72 h,离心收集菌体,利用醇碱皂化法提取辅酶 Q_{10} ,测定菌体生物量及辅酶 Q_{10} 产量。

1.2.7.5 突变株稳定性试验 利用斜面培划线接种进行传代试验,30 ℃ 下培养 48 h;分别测定第 2、第 4、第 6 代的辅酶 Q_{10} 产量,比较其产辅酶 Q_{10} 的稳定性。

1.2.8 发酵培养基优化

1.2.8.1 发酵培养基的单因素试验 本试验选择培养基中对发酵影响最大的葡萄糖、酵母膏、 Na_2HPO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 等 4 种成分,分别考察其不同浓度对诱变菌株发酵产辅酶 Q_{10} 的影响。其中,葡萄糖浓度为 10、20、30、40、50 g/L,酵母膏浓度为 5、7.5、10、12.5、15 g/L, Na_2HPO_4 浓度为 1.3、1.4、1.5、1.6、1.7 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 浓度为 0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 g/L。

1.2.8.2 发酵培养基优化的响应面分析试验 根据单因素

试验结果,选用葡萄糖、酵母膏、 Na_2HPO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 为考察因素,采用 Design - Expert 软件^[10] 中的中心组合设计 (central composite design, CCD),设计 4 因素 5 水平的响应面分析^[11] 试验,其试验因子和编码水平见表 1。

表 1 发酵培养基优化的中心组合设计方案

水平	A:葡萄糖浓度 (g/L)	B:酵母膏浓度 (g/L)	C: Na_2HPO_4 浓度 (g/L)	D: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 浓度 (g/L)
-2	10.0	7.5	1.10	0.10
-1	22.5	10.0	1.35	0.25
0	35.0	12.5	1.60	0.40
1	47.5	15.0	1.85	0.55
2	60.0	17.5	2.10	0.70

2 结果与分析

2.1 生长曲线

从图 1 可以看出,出发菌株在 4 h 后开始进入对数期,18 h 后进入稳定期。处于对数期的细胞中 DNA 复制较为活跃,对各种理化刺激较为敏感,出现突变的概率较大,因此选取 4 ~ 18 h 的细菌培养液进行紫外诱变出现变异的概率较大。

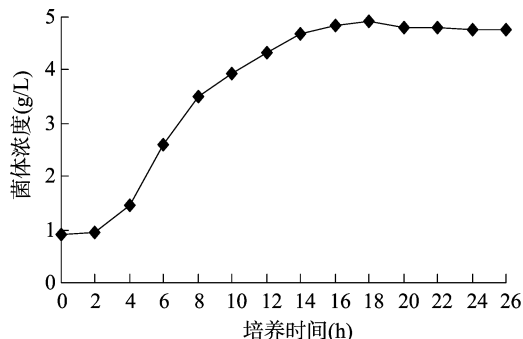


图1 根瘤土壤杆菌生长曲线

2.2 紫外照射致死率曲线

从图 2 可以看出,当辐照时间为 120 s 时,约 97% 的根瘤土壤杆菌致死。这几年通过对紫外线诱变效应的研究发现,提高产量的正向突变较多地出现在偏低的剂量中,而负突变则较多地出现在偏高的剂量中^[12]。因此,本研究选取的诱变剂量为紫外线照射 60 ~ 90 s,致死率约为 70% ~ 83%,此时发生正向突变的概率较大。

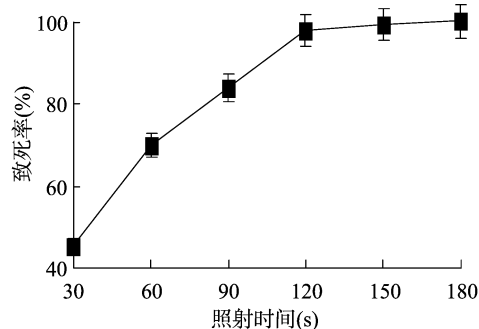


图2 紫外线照射致死率曲线

2.3 紫外诱变菌株筛选结果

将经过紫外诱变^[13] 处理后的菌悬液直接涂布于平板上,在 30 ℃ 培养箱中培养 48 h,从平板上挑取 27 株生长良好的

单菌落,对这 27 株菌株进行摇瓶复筛,测定辅酶 Q₁₀ 产量,筛选结果见图 3。从图 3 可以看出,有 7 株突变株辅酶 Q₁₀ 的产量有所提高,正突变率约为 26%。其中,6 号突变株 Q-6 表

现最突出,辅酶 Q₁₀ 的产量达到 11.92 mg/L,较出发菌株提高了 92.51%,诱变结果最好,所以选择突变株 Q-6 进行遗传稳定性研究。

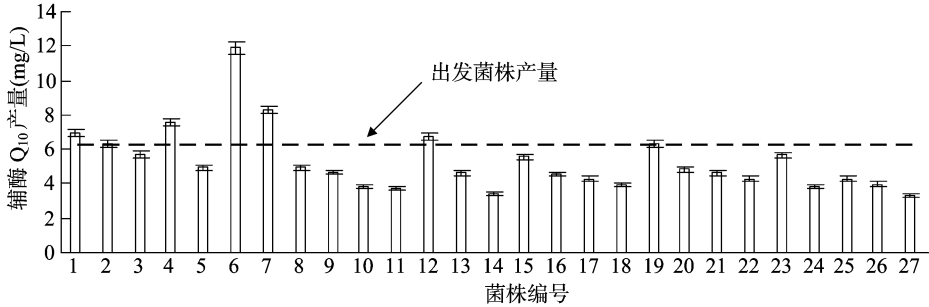


图3 紫外诱变筛选结果

2.4 遗传稳定性结果

从表 2 可知,突变菌株 Q-6 经过 6 次传代培养,辅酶 Q₁₀ 产量维持在 10.09 ~ 10.85 mg/L 之间,无明显下降,表明突变株 Q-6 产辅酶 Q₁₀ 的能力稳定,可用于进一步研究。

表 2 突变株 Q-6 遗传稳定性

遗传代数	辅酶 Q ₁₀ 产量 (mg/L)
2	10.57
4	10.85
6	10.09

2.5 发酵培养基的优化

2.5.1 葡萄糖浓度对辅酶 Q₁₀ 产量的影响 从图 4 可以看出,随葡萄糖浓度的增加,辅酶 Q₁₀ 产量增大,当葡萄糖浓度达到 30 g/L 时,辅酶 Q₁₀ 产量达到最大,为 (10.05 ± 0.301 5) g/L;当葡萄糖浓度继续加大时,辅酶 Q₁₀ 产量反而下降,这可能是由于在发酵过程中添加过多葡萄糖而引起的“葡萄糖效应”,进而影响菌体生长和代谢产物的形成。因

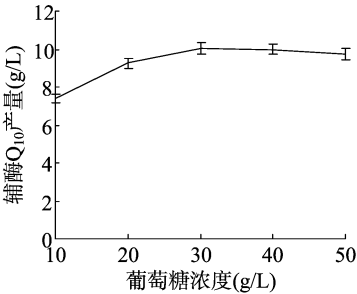


图4 葡萄糖浓度对辅酶 Q₁₀ 产量的影响

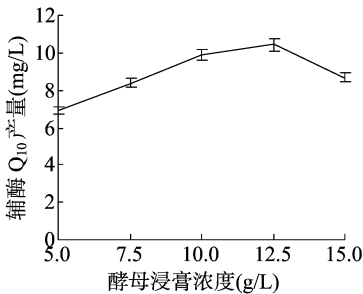


图5 酵母浸膏浓度对辅酶 Q₁₀ 产量的影响

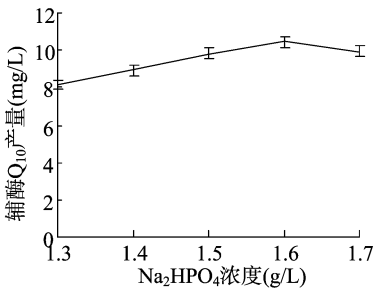


图6 Na₂HPO₄ 浓度对辅酶 Q₁₀ 产量的影响

2.5.4 MgSO₄ · 7H₂O 浓度对辅酶 Q₁₀ 产量的影响 从图 7 可以看出,辅酶 Q₁₀ 产量随 MgSO₄ · 7H₂O 浓度的升高,先升高后降低,并当 MgSO₄ · 7H₂O 浓度达到 0.4 g/L 时,辅酶 Q₁₀ 产量达到最大,此时产量为 (10.23 ± 0.306 9) g/L。这可能是由于较低浓度的 Mg²⁺ 能够促进辅酶 Q₁₀ 的形成,而当浓度达到一定高度时,又会抑制辅酶 Q₁₀ 的形成。所以,本试验可把 MgSO₄ · 7H₂O 浓度定为 0.4 g/L。

2.5.5 响应面设计优化发酵培养基组成

2.5.5.1 模型的建立及显著性检验 根据单因素结果,采用 Design - Expert 软件对葡萄糖、酵母膏、Na₂HPO₄、MgSO₄ · 7H₂O 的浓度进行优化,试验结果如表 3 所示。用 Design - Expert 软件对表 3 数据进行多元回归拟合,可以得到辅酶 Q₁₀

此,确定本试验葡萄糖浓度为 30 g/L。

2.5.2 酵母膏浓度对辅酶 Q₁₀ 产量的影响 从图 5 可以看出,当酵母膏浓度低于 12.5 g/L 时,辅酶 Q₁₀ 产量不断增大;当酵母膏浓度达到 12.5 g/L 时,辅酶 Q₁₀ 产量达到最大,产量为 (10.42 ± 0.312 6) g/L;当葡萄糖浓度继续加大时,辅酶 Q₁₀ 产量反而下降,这可能是由于酵母膏成分复杂,在发酵后期底物消耗不完,某些成分抑制菌体生长及产物的合成。所以,酵母膏浓度定为 12.5 g/L。

2.5.3 Na₂HPO₄ 浓度对辅酶 Q₁₀ 产量的影响 从图 6 可以看出,当 Na₂HPO₄ 浓度为 1.6 g/L 时,产量达到最大,此时辅酶 Q₁₀ 产量为 (10.43 ± 0.312 9) g/L;但继续加大 Na₂HPO₄ 浓度时,辅酶 Q₁₀ 产量逐渐下降,这表明过多的 Na₂HPO₄ 并不利于提高辅酶 Q₁₀ 产量,只有适宜的 Na₂HPO₄ 浓度才有利于辅酶 Q₁₀ 的形成。所以,在本试验考察范围内,Na₂HPO₄ 最佳浓度为 1.6 g/L。

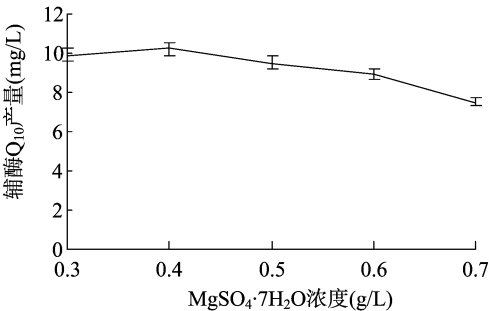


图7 MgSO₄ · 7H₂O 浓度对辅酶 Q₁₀ 产量的影响

产量 (Y) 对葡萄糖浓度 (A)、酵母膏浓度 (B)、Na₂HPO₄ 浓度 (C)、MgSO₄ · 7H₂O 浓度 (D) 的回归方程为: Y = - 49.20 +

表 3 发酵培养基相应面设计优化方案

试验号	因素水平				辅酶 Q ₁₀ 产量 (mg/L)
	A	B	C	D	
1	-1	-1	-1	-1	7.82
2	1	-1	-1	-1	8.47
3	-1	1	-1	-1	7.52
4	1	1	-1	-1	7.76
5	-1	-1	1	-1	8.08
6	1	-1	1	-1	7.33
7	-1	1	1	-1	8.13
8	1	1	1	-1	8.47
9	-1	-1	-1	1	7.64
10	1	-1	-1	1	8.24
11	-1	1	-1	1	7.35
12	1	1	-1	1	7.56
13	-1	-1	1	1	7.77
14	1	-1	1	1	7.16
15	-1	1	1	1	7.67
16	1	1	1	1	7.03
17	-2	0	0	0	7.67
18	2	0	0	0	8.21
19	0	-2	0	0	8.65
20	0	2	0	0	8.03
21	0	0	-2	0	9.03
22	0	0	2	0	8.51
23	0	0	0	-2	7.02
24	0	0	0	2	6.22
25	0	0	0	0	11.75
26	0	0	0	0	10.97
27	0	0	0	0	11.04
28	0	0	0	0	10.88
29	0	0	0	0	11.20
30	0	0	0	0	11.75

0.50A + 2.60B + 32.82C + 49.17D + 5.20AB - 0.07AC - 0.03AD + 0.29BC - 0.23BD - 2.67CD - 5.50A² - 0.12B² - 10.43C² - 52.85D², 对试验结果进行显著性检验及方差分析, 结果如表 4 所示。对模型进行回归方程系数显著性检验可知, 一次项 D(MgSO₄ · 7H₂O 浓度), 交互项 AC、BC 对辅酶 Q₁₀ 产量影响显著, 平方项 A²、B²、C²、D² 对辅酶 Q₁₀ 产量影响极显著。模型 P 值 < 0.000 1, 是极显著的, 而失拟项的 P 值 = 0.789 2, 是不显著的, 说明该方程的拟合度较好; 模型的决定系数 R² = 0.976 1, 表明该模型能较好地预测发酵培养基组分与辅酶 Q₁₀ 产量的关系; 模型的调整决定系数 R²_{Adj} = 0.953 7, 表明方程模型可信度较高, 能够较好地描述试验结果。

2.5.5.2 响应面优化及分析 根据 CCD 试验设计结果作出三维响应面(图 8 至图 13), 它们分别反映了葡萄糖浓度(A)、酵母膏浓度(B)、Na₂HPO₄ 浓度(C)、MgSO₄ · 7H₂O 浓度(D)这 4 个因素的两两交互作用对产量的影响。

2.5.5.3 优化培养基的验证 根据所得的模型, 由响应面分析法求得优化后 4 种成分的最佳浓度为: 葡萄糖 35.46 g/L、酵母膏 12.33 g/L、Na₂HPO₄ 1.58 g/L、MgSO₄ · 7H₂O 0.39 g/L, 预测得到辅酶 Q₁₀ 最高产量为 11.28 mg/L。为了证实试验结果的可靠性, 按上述最终培养基参数进行验证试验, 3 次重复试验的辅酶 Q₁₀ 产量的平均值为 11.32 mg/L, 与预测值接近, 表明模型是可行有效的, 具有一定的实践价值。

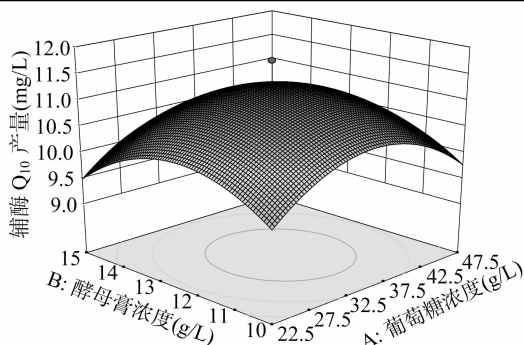
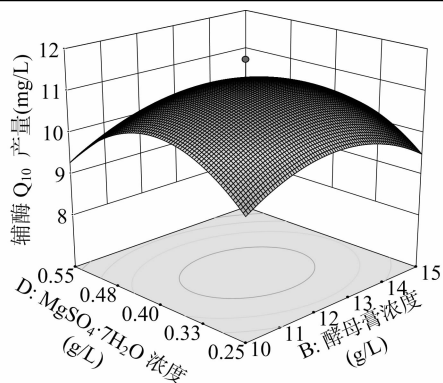
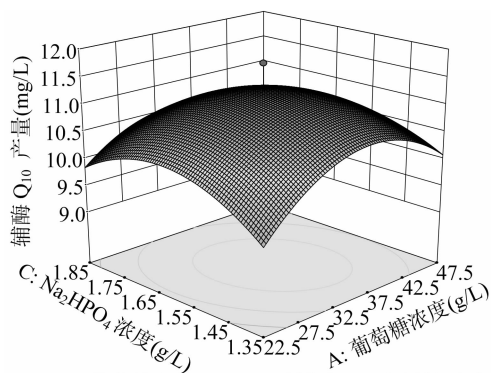
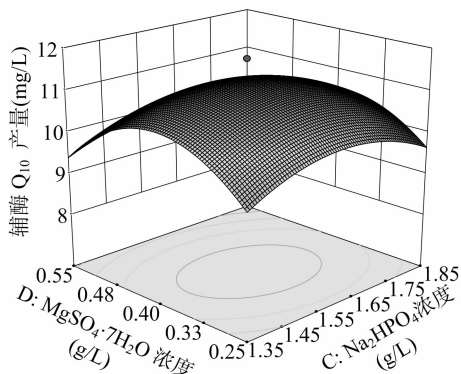
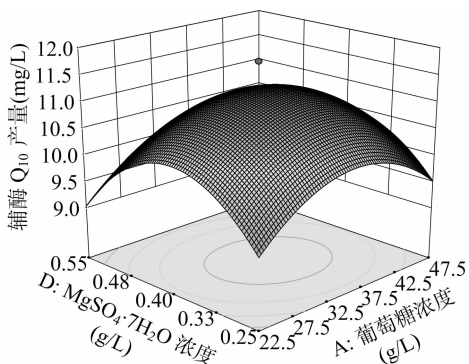
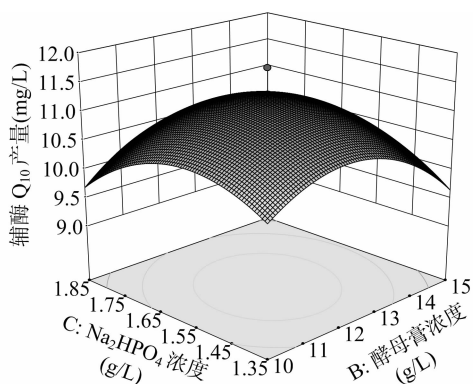
3 结论

采用紫外诱变, 经过平板初筛和摇瓶发酵复筛, 最终获得 1 株辅酶 Q₁₀ 高产菌株 Q-6, 其辅酶 Q₁₀ 产量为 11.92 mg/L, 较出发菌株提高 92.57%, 且其遗传性稳定。在单因素试验的基础上, 应用响应面分析, 对其发酵培养基进行优化, 得到生产辅酶 Q₁₀ 的最佳发酵培养基配方为: 葡萄糖 35.46 g/L、酵

表 4 发酵培养基优化方案结果多元回归系数检验表

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	65.534 750	14	4.681 053	43.098 550 **	<0.000 1
A	0.052 267	1	0.052 267	0.481 220	0.498 5
B	0.212 817	1	0.212 817	1.959 407	0.181 9
C	0.129 067	1	0.129 067	1.188 319	0.292 9
D	0.944 067	1	0.944 067	8.692 041 *	0.010 0
AB	0.004 225	1	0.004 225	0.038 900	0.846 3
AC	0.705 600	1	0.705 600	6.496 473 *	0.022 3
AD	0.052 900	1	0.052 900	0.487 051	0.495 9
BC	0.540 225	1	0.540 225	4.973 862 *	0.041 4
BD	0.119 025	1	0.119 025	1.095 866	0.311 8
CD	0.160 000	1	0.160 000	1.473 123	0.243 6
A ²	20.246 880	1	20.246 880	186.413 391 **	<0.000 1
B ²	15.808 020	1	15.808 020	145.544 745 **	<0.000 1
C ²	11.648 080	1	11.648 080	107.244 069 **	<0.000 1
D ²	38.787 220	1	38.787 220	357.114 695 **	<0.000 1
残差	1.629 192	15	0.108 613		
失拟项	0.868 642	10	0.086 864	0.571 062	0.789 2
纯误差	0.760 550	5	0.152 110		
总和	67.163 940	29			

注: **、* 分别表示差异极显著(P < 0.01)、差异显著(P < 0.05)。R² = 0.975 7、R²_{Adj} = 0.953 1。

图8 葡萄糖和酵母膏浓度对辅酶 Q₁₀ 产量的影响图12 酵母膏和 MgSO₄ 浓度对辅酶 Q₁₀ 产量的影响图9 葡萄糖和 Na₂HPO₄ 对辅酶 Q₁₀ 产量的影响图13 Na₂HPO₄ 和 MgSO₄ 浓度对辅酶 Q₁₀ 产量的影响图10 葡萄糖和 MgSO₄ 对辅酶 Q₁₀ 产量的影响图11 酵母膏和 Na₂HPO₄ 浓度对辅酶 Q₁₀ 产量的影响

母膏 12.33 g/L、Na₂HPO₄ 1.58 g/L、MgSO₄ · 7H₂O 0.39 g/L,在此条件下,重复验证得到辅酶 Q₁₀ 产量为 11.32 mg/L,与预测值接近。因此,采用响应面法优化根瘤土壤杆菌培养基组成稳定可行。

参考文献:

- [1] Lenaz G, Fato R, Formigini G, et al. The role of Coenzyme Q in mitochondrial electron transport [J]. Mitochondrion, 2007, 7 (Suppl): 28-33.
- [2] 邵晓峰, 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(5): 858-862, 872.
- [3] 史立康, 徐尔尼, 汪金萍, 等. 微生物发酵生产辅酶 Q₁₀ 的研究进展 [J]. 中国酿造, 2006, 165(12): 4-8.
- [4] 郑毅, 王娅, 朱志春, 等. 发酵法生产辅酶 Q₁₀ 研究进展 [J]. 海峡科学, 2012, 68(8): 128-130.
- [5] 田玉庭, 岳田利, 袁亚宏. 根瘤土壤杆菌 DK-24 生产辅酶 Q₁₀ 发酵培养基的优化 [J]. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2010, 38(8): 182-188.
- [6] 姜剑文, 陈光, 王立梅, 等. 根瘤杆菌发酵生产辅酶 Q₁₀ 的培养条件优化 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(12): 6128-6130.
- [7] 田宝静, 李剑, 聂立影, 等. 土壤杆菌中辅酶 Q₁₀ 的提取工艺 [J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(6): 858-861.
- [8] 王根华, 钱和, 肖刚. 发酵菌体中辅酶的提取及其测定方法 [J]. 无锡轻工大学学报, 2003, 22(2): 59-62.
- [9] 朱俊丰, 郑方亮, 艾海新, 等. 微波结合紫外诱变选育辅酶 Q₁₀ 高产菌株 [J]. 微生物学杂志, 2010, 30(2): 57-62.
- [10] 高晗, 南海娟, 孔瑾, 等. 响应面法优化苦杏仁中黄酮提取工艺 [J]. 江苏农业科学, 2013, 41(10): 231-233.
- [11] 王莹, 王华, 丁宁, 等. 响应面法优化水溶性银杏叶多糖提取工艺 [J]. 江苏农业科学, 2015, 43(5): 268-270.
- [12] 郭小兵, 徐惠娟, 支小鹏, 等. 利用甲硝唑及外加氧方法筛选耐氧产氢 *Klebsiella oxytoca* HP1 突变菌株 [J]. 微生物学通报, 2008, 35(3): 327-331.
- [13] 高启禹, 徐光翠, 张文博, 等. 褐黄孢链霉菌高产纳他霉素的诱变选育 [J]. 江苏农业科学, 2013, 41(8): 360-362.