

辅酶 Q₁₀ 高产酵母菌 SY-3 发酵工艺的研究

许激扬, 岳小飞, 肖海蓉 (中国药科大学生化教研室, 南京 210009)

摘要:目的 为了获得比较高的辅酶 Q₁₀ 产量, 以一株酵母菌 SY-3 作为辅酶 Q₁₀ 的生产菌, 研究不同的发酵条件对辅酶 Q₁₀ 产量的影响。方法 用皂化法提取, 用高效液相检测。结果与结论 蔗糖是较好的碳源, 蛋白胨是较好的氮源, 通过均匀设计初步确定的发酵培养基为: 蔗糖 4.2%, 蛋白胨 2.8%, KH₂PO₄ 0.13%。接种量 2%, 500mL 三角瓶中装液量 40mL, pH 值 4.0, 温度 26℃, 转速 240r/min, 在此发酵条件下, 发酵液中菌体生长量达到 10g/100mL, 辅酶 Q₁₀ 产量达到 84.6mg/L。

关键词:辅酶 Q₁₀; 发酵; 酵母菌 SY-3; 均匀设计

中图分类号: TQ460.38 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2006)07-0610-03

Studies on the fermentation conditions of CoenzymeQ₁₀ by Yeast SY-3

XU Ji-yang, YUE Xiao-fei, XIAO Hai-rong (Department of Biochemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE In order to achieve higher yield of CoQ₁₀, Different fermentation factors influencing CoQ₁₀ production with yeast SY-3 were studied. **METHODS** Extracted by saponification and measured by HPLC. **RESULTS and CONCLUSION** Sucrose and peptone were favourite for cell growth and CoQ₁₀ accumulation. The culture conditions were primarily optimized by uniform design: Sucrose 4.2%, peptone 2.8%, KH₂PO₄ 0.13%. Inoculum size 2%, volume of medium 40mL / 500mL, pH4.0, temperature 26℃, revolutions 240r/min. Under the condition, the biomass reached 100g/L, and CoQ₁₀ concentration reached 84.6mg/L.

KEY WORDS: CoenzymeQ₁₀; fermentation; uniform design

辅酶 Q₁₀ (CoQ₁₀) 又称泛醌 (Ubiquinone), 是一种类维生素类物质, 为脂溶性苯的衍生物^[1]。广泛存在于人、动物、植物以及除革兰氏阳性细菌和蓝细菌以外的微生物中^[2]。它在真核细胞内于线粒体内膜相结合, 在原核细胞内则存在于细胞质膜中, 是呼吸链的重要递氢体^[3]。它具有抗氧化性、消除自由基、提高机体免疫力等功能, 近年来已广泛应用于各类心脏病、糖尿病、癌症、急慢性肝炎、帕金森症等疾病的治疗。最近, 研究者发现 CoQ₁₀ 还具有抗衰老作用, 从而将其应用扩展到化妆品和保健品领域, 使其在国内外需求进一步扩大^[4,5]。

CoQ₁₀ 的制备方法有动植物组织提取法、化学法、发酵法。国内生产 CoQ₁₀ 多采用前两种方法, 相比之下, 微生物发酵生产 CoQ₁₀ 具有不受原料限制, 分离过程相对简单、生物活性好等优点, 值得推广。

目前国内发酵法生产 CoQ₁₀ 的产量远远不能满足市场需求。优良的 CoQ₁₀ 生产菌种和良好的发酵工艺是实现 CoQ₁₀ 产品产业化的前提。虽然目前国内研究报道中能生产 CoQ₁₀ 的菌种很多, 但产量大多集中在 20mg/L 左右^[6], 个别的能达到 87mg/L^[7]。鉴于此, 本文以一株筛选得到的国内外尚未报道过的高产酵母菌 SY-3 为生产菌, 并进一步用均匀设计法优化了培养基和发酵条件, 较大幅度地提高了 CoQ₁₀ 的产量, 为以后的生产应用奠定了基础。

1 材料和试剂

1.1 试剂

CoQ₁₀ 标准品, 购于 sigma 公司。酵母粉, 英国牛津有限公司, 其余试剂均为市售国产分析纯。

1.2 菌种

由中国药科大学生化教研室保存。

2 实验方法

2.1 种子培养基及培养条件

2.1.1 种子培养基 葡萄糖 2%、蛋白胨 1%、酵母粉 1%, 自然 pH。121℃ 灭菌 15min。

2.1.2 培养条件 摇床振荡培养, 摇床转速为 220r/min, 28℃, 培养 24h。

2.2 发酵培养基及培养条件

2.2.1 发酵培养基 葡萄糖 4%、蛋白胨 1%、KH₂PO₄ 0.02%、(NH₄)₂SO₄ 0.005%、MgSO₄ 0.005%、NaCl 0.03%, 自然 pH。121℃ 灭菌 15min。

2.2.2 培养条件 取种子培养液以 5% 的接种量, 接入到发酵培养基中, 28℃ 振荡培养, 摇床转速为 220r/min, 培养 72h。

2.3 菌体湿重的测量 取发酵液经 3500 r/min 离心 10min 后倾去上清液, 去离子水洗两次, 3500r/min 离心 10min, 彻底弃去上清液, 称菌体重量。

2.4 CoQ₁₀ 的提取 称量后的菌体放入蒸馏瓶中, 加入焦性没食子酸, 氢氧化钠, 甲醇, 去离子水, 90℃ 回流 30min, 在自来水下迅速冷却, 加入 7.5 倍菌体重量的去离子水。然后加入石油醚, 萃取, 静置分层, 取上清液, 将下层棕黑色物再萃取一次, 合并上清液, 用去离子水洗至中性, 45℃ 真空干燥, 得黄色油状物, 即为 CoQ₁₀ 粗品^[4]。

2.5 检测方法 用高效液相色谱进行检测, C₁₈ 柱, 流动相: 无水乙醇, 流速: 1mL/min, 紫外检测器, 检测波长 275nm^[4]。

3 结果与分析

3.1 不同碳源对 CoQ₁₀ 发酵的影响

选用常见易得的碳源:葡萄糖、蔗糖、可溶性淀粉、乙酸钠、麦芽汁,进行对比,确定较合适的碳源。由表 1 可知,不同的碳源对菌生长量和 CoQ₁₀产量有很大影响。相对而言,蔗糖较好,乙酸钠次之,故选定蔗糖为碳源。发酵结果如表 1 所示。

表 1 不同碳源对菌体产量和 CoQ₁₀ 发酵的影响

Tab 1 Effect of carbon source on cell growth and CoQ₁₀ production

碳源	菌体产量 (g/100mL)	CoQ ₁₀ 产量 (mg/L)
葡萄糖	6.7	36.3
蔗糖	7.0	42.0
可溶性淀粉	2.4	10.0
乙酸钠	2.3	25.0
麦芽汁	3.1	10.2

3.2 不同氮源对 CoQ₁₀ 发酵的影响

氮源分无机氮源和有机氮源,从无机氮源中选硫酸铵、硝酸钠,从有机氮源中选蛋白胨、酵母膏、黄豆粉做比较,由表 2 可见,在 CoQ₁₀产量上蛋白胨较好,故选用蛋白胨为氮源。发酵结果如表 2 所示。

表 3 均匀设计试验 U₁₃(13⁶) 结果分析表

Tab 3 The experiment results of the uniform design U₁₃(13⁶)

水平	蔗糖 (%)	蛋白胨 (%)	KH ₂ PO ₄ (%)	MgSO ₄ (%)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (%)	NaCl (%)	CoQ ₁₀ 产量 (mg/L)
1	1(0.6)	2(2.6)	6(0.06)	8(0.025)	9(0.040)	10(0.060)	25.5
2	2(0.9)	4(2.2)	12(0.12)	3(0.050)	5(0.020)	7(0.105)	42.9
3	3(1.2)	6(1.8)	5(0.05)	11(0.010)	1(0.000)	4(0.150)	26.8
4	4(1.5)	8(1.4)	11(0.11)	6(0.035)	10(0.045)	1(0.195)	7.8
5	5(1.8)	10(1.0)	4(0.04)	1(0.060)	6(0.025)	11(0.045)	6.8
6	6(2.1)	12(0.6)	10(0.10)	9(0.020)	2(0.005)	8(0.090)	22.4
7	7(2.4)	1(2.8)	3(0.03)	4(0.045)	11(0.050)	5(0.135)	54.6
8	8(2.7)	3(2.4)	9(0.09)	12(0.005)	7(0.030)	2(0.180)	43.2
9	9(3.0)	5(2.0)	2(0.02)	7(0.030)	3(0.010)	12(0.030)	29.1
10	10(3.3)	7(1.6)	8(0.08)	2(0.055)	12(0.055)	9(0.075)	57.5
11	11(3.6)	9(1.2)	1(0.01)	10(0.015)	8(0.035)	6(0.012)	16.9
12	12(3.9)	11(0.8)	7(0.07)	5(0.04)	4(0.015)	3(0.165)	12.2
13	13(4.2)	13(0.4)	13(0.13)	13(0.000)	13(0.060)	13(0.015)	34.1

3.4 接种量对 CoQ₁₀ 发酵的影响

在发酵培养基中分别按 2%、4%、6%、8% 的比例接入种子培养液,研究接种量对菌体生长和 CoQ₁₀产量的影响,试验结果如图 1 所示。由图可知,在接种量为 2% 时,CoQ₁₀的产量最高,接种量越大,CoQ₁₀的产量反而下降,可能是接种量较大,造成菌体在发酵初期迅速生长,从而使营养基质缺乏,不利于发酵。发酵结果如图 1 所示。

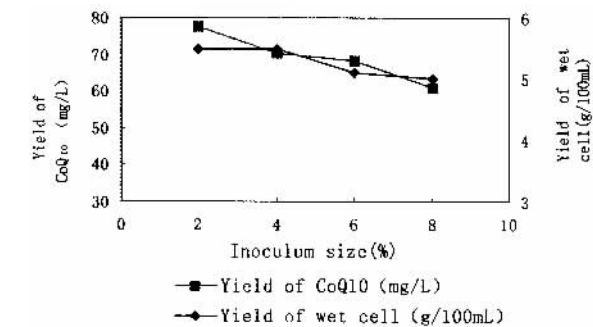


图 1 接种量对菌体产量和 CoQ₁₀ 发酵的影响

Fig 1 Effect of inoculum amounts on cell growth and CoQ₁₀ production

表 2 不同氮源对菌体产量和 CoQ₁₀ 发酵的影响

Tab 2 Effect of carbon source on cell growth and CoQ₁₀ production

氮源	菌体产量 (g/100mL)	CoQ ₁₀ 产量 (mg/L)
蛋白胨	7.0	42.0
酵母粉	7.7	39.2
酵母膏	8.5	28.8
黄豆粉	9.3	18.7
硫酸铵	4.3	21.8
硝酸钠	1.3	19.0

3.3 培养基优化

以蔗糖为碳源,以蛋白胨为氮源,其他组分不变,对培养基进行均匀设计优化^[8]。优化结果如表 3 所示。

将表 3 的试验结果利用计算机进行优化处理得回归方程: $Y = -30.9 + 7.5x_1 + 17.0x_2 + 155.6x_3$, 经 F 检验合格。根据回归方程,蔗糖 4.2%,蛋白胨 2.8%,KH₂PO₄ 0.13% 时, Y 值达最大 68.4mg/L,和试验结果相符,与用原培养基配方进行发酵的产量 42.0mg/L 相比,大幅度地提高了 CoQ₁₀的产量。

3.5 装液量对 CoQ₁₀ 发酵的影响

500mL 三角摇瓶中分别装入 20、40、60、80mL 发酵培养基,研究接种量对菌体生长和 CoQ₁₀产量的影响。装液量的多少反应出溶氧水平的高低。如图 2 所示,装液量为 40mL 时,CoQ₁₀产量较高,超过 40mL,菌体总量和 CoQ₁₀产量都有下降的趋势,这说明溶氧水平越高,菌体呼吸越旺盛,越有利于 CoQ₁₀合成。发酵结果如图 2 所示。

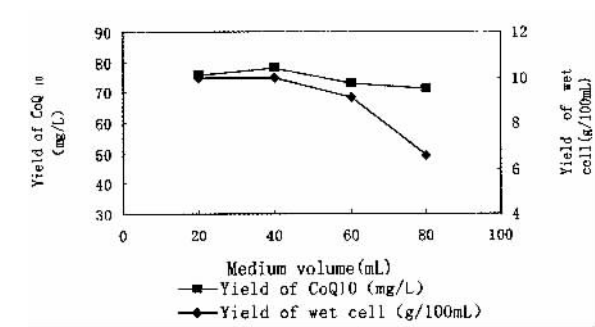


图 2 装液量对菌体产量和 CoQ₁₀ 发酵的影响

Fig 2 Effect of various medium volume on cell growth and CoQ₁₀ production

3.6 培养温度对 CoQ₁₀ 发酵的影响

在 26℃、28℃、30℃、32℃ 条件下,研究温度对菌体生长和 CoQ₁₀ 产量的影响。由图 3 可知,随着温度的升高,菌体总量不断上升,但 CoQ₁₀ 产量却有所下降,在最低温度 26℃ 时,CoQ₁₀ 产量最高。可能是因为较低的温度提高了溶氧量造成的。发酵结果如图 3 所示。

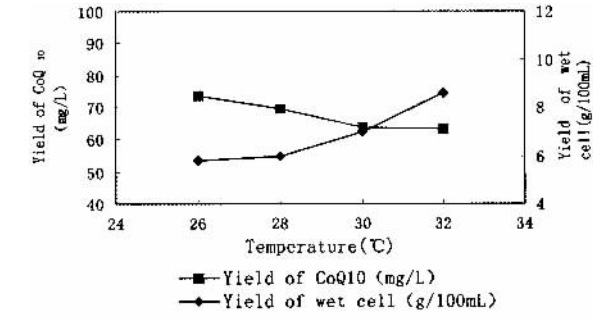


图 3 温度对菌体产量和 CoQ₁₀ 发酵的影响

Fig 3 Effect of culture temperature on cell growth and CoQ₁₀ production

3.7 初始 pH 对 CoQ₁₀ 发酵的影响

根据酵母菌一般生长对 pH 值的要求,调节发酵培养基的初始 pH 分别为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0。如图 4 所示,pH 值 4.0 时,CoQ₁₀ 产量较高,说明酸性条件更有利于 CoQ₁₀ 的生成。发酵结果如图 4 所示。

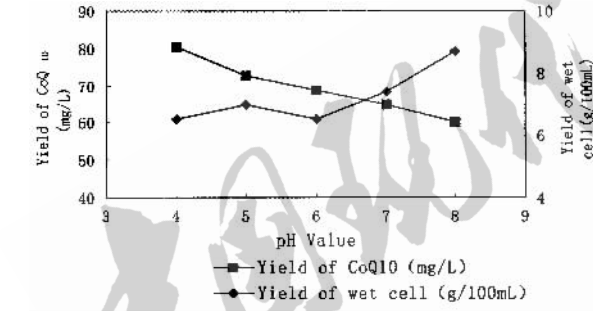


图 4 pH 对菌体产量和 CoQ₁₀ 发酵的影响

Fig 4 Effect of various pH Value on cell growth and CoQ₁₀ production

3.8 转速对 CoQ₁₀ 发酵的影响

调节摇床的转速为 120、150、180、210、240 r/min,研究转速对菌体生长和 CoQ₁₀ 产量的影响,转速越高,溶氧量越大。试验结果如表 5 所示,最大转速为 240 r/min 时 CoQ₁₀ 产量较高。发酵结果如图 5 所示。

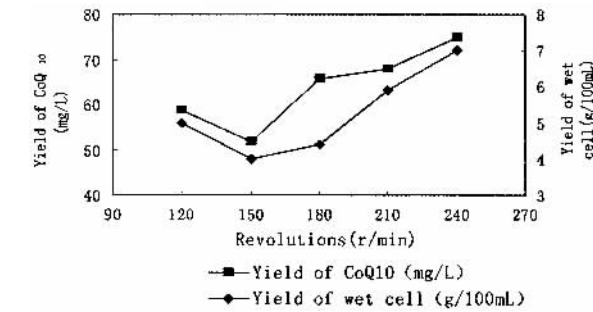


图 5 转速对菌体产量和 CoQ₁₀ 发酵的影响

Fig 5 Effect of revolutions per minute on cell growth and CoQ₁₀ production

3.9 最佳条件验证

500mL 三角瓶中装液量 40mL,2% 的接种量,pH 值 4.0,温度 26℃,转速 240r/min 的发酵条件下,以蔗糖 4.2%,蛋白胨 2.8%,KH₂PO₄0.13% 为培养基,进行最佳条件验证实验,结果显示,优化后酵母菌 SY-3 菌体产量均为 10g/100mL,CoQ₁₀ 的平均产量达到 84.6mg/L。

4 讨论

本实验室保存的产辅酶 Q₁₀ 的酵母菌 SY-3 利用的碳源、氮源较广泛,其中碳源中以蔗糖最好,氮源中以蛋白胨最佳。经过对培养基成分优化设计,CoQ₁₀ 的产量可达到 68.4mg/L。由装液量和摇床转速的试验比较可以看出,溶氧量是 CoQ₁₀ 生产的重要因素。pH 值对 CoQ₁₀ 的生产也有影响,酸性条件更适于合成 CoQ₁₀,可能是培养基中的 H⁺ 进入细胞,影响了酶的结构和活性,改变了细胞呼吸的强度和途径^[9]。接种量和温度都不宜太高,太高的接种量会使营养物质供不应求,使菌体迅速进入衰亡期。过高的温度对菌体生长有利,却不利于 CoQ₁₀ 的生产,说明菌体的产量和 CoQ₁₀ 的产量之间没有什么相关性。以优化后的培养基为培养基,以最佳的试验条件为发酵条件,菌体产量达到 10g/100mL,CoQ₁₀ 的产量达到 84.6mg/L,高于国内的一般水平(20mg/L 左右),但与国外水平相比还有一定的差距^[10]。还需要从诱变育种、代谢调控等方面做进一步的深入研究^[11]。

参考文献

[1] 王根华,钱和,肖刚. 发酵菌体中辅酶 Q₁₀ 的提取及其测定方法[J]. 无锡轻工大学学报,2003,22(2):59.
[2] 朱旭芬,曾云中,吴雪昌. 生物体内泛醌的种类及合成条件的探讨[J]. 浙江大学学报(理学版),2000,27(3):324.
[3] 张惠展. 途径工程[M]. 北京:轻工业出版社,2002,132.
[4] 张延静,袁其朋,梁浩. 产辅酶 Q₁₀ 酵母的发酵条件研究[J]. 微生物学通报,2003,30(2):65.
[5] Gingold EB, Kopsidas G, Lmmane AW. Coenzyme Q₁₀ and Its Putative Role in the Ageing Process[J]. Protoplasma,2002,214(1-2):24.
[6] 袁静,魏泓. 微生物发酵生产辅酶 Q₁₀ 的研究进展[J]. 氨基酸和生物资源,2004,26(1):55.
[7] 李梅,吕炜锋,高向东. 产辅酶 Q₁₀ 细菌 CPU0402 的初步研究[J]. 药物生物技术,2005,12(3):162.
[8] 王鹏,王玉柱,沈建民. 均匀设计及其在药学中的应用[J]. 沈阳药学院学报,1989,6(4):297.
[9] 熊宗贵. 发酵工艺原理[M]. 北京:中国医药科技出版社,2001,140.
[10] Kuniaki S, Hisao T, Susumu S, et al. Agitation-Aeration Studies on Coenzyme Q₁₀ Production Using Rhodopseudomonas spheroids[J]. Biotechnology And Applied Biochemistry, 1992,16:20.
[11] Poon WW, Barkovich RJ, Hsu AY, et al. Yeast and rat coq3 and E. coli ubiG polypeptides catalyze both O-methyltransferase steps in coenzyme Q biosynthesis[J]. J Biochem, 1999, 274(31):21665.