

热带假丝酵母产辅酶 Q₁₀ 发酵条件的研究

李继扬, 丁妍, 周珮* (复旦大学药学院生物合成教研室, 上海 200032)

摘要:目的 以热带假丝酵母作为辅酶 Q₁₀ 的生产菌, 研究不同的发酵条件对辅酶 Q₁₀ 产量的影响, 以获得比较高的辅酶 Q₁₀ 产量。方法 用酒精提取, 用紫外分光光度法检测。结果 葡萄糖是较好的碳源, 大豆蛋白胨是较好的氮源, 磷酸盐不同的比例对细胞生长及辅酶 Q₁₀ 合成的影响较显著, 添加硫酸锰对辅酶 Q₁₀ 的合成有一定的促进作用。发酵初始 pH 8.0, 接种量为 4.0%, 250 mL 三角瓶装液量为 40 mL, 发酵时间为 72 h, 葡萄糖 4.0%, 大豆蛋白胨 5.0%, 辅酶 Q₁₀ 产量达到 70 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。
结论 热带假丝酵母作为高产辅酶 Q₁₀ 菌种具有较好的实用性以及进一步提高产量的潜力和广阔的应用前景。

关键词: 辅酶 Q₁₀; 发酵; 热带假丝酵母

中图分类号: TQ460.38

文献标识码: A

文章编号: 1007-7693(2009)02-0103-04

Study on the Fermentation Condition of Coenzyme Q₁₀ by *Candida Tropicalis*

LI Jiyang, DING Yan, ZHOU Pei* (School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 200032, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE In order to achieve higher yield of CoQ₁₀, Different fermentation factors influencing CoQ₁₀ production with yeast *Candida Tropicalis* were studied. **METHODS** CoQ₁₀ was extracted by alcohol and measured by UV spectrophotometry. **RESULTS** Glucose and bean peptone were favourite for cell growth and CoQ₁₀ accumulation. Phosphorus sources of KH₂PO₄ and K₂HPO₄ were important factors influencing the cell growth and CoQ₁₀ accumulation. Meanwhile, MnSO₄ can enhance the CoQ₁₀ accumulation in the cells. The culture conditions were primarilay optimized: initial pH 8.0, inoculum size 4.0%, volume of medium 40 mL/250 mL shake flask, 72 h, glucose 4.0%, bean peptone 5.0%. Under the condition, CoQ₁₀ accumulation reached 70 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. **CONCLUSION** *Candida Tropicalis* at the CoQ₁₀ straina of high yield was practicable and marketable.

KEY WORDS: coenzyme Q₁₀; fermentation; *Candida Tropicalis*

辅酶 Q₁₀ (CoQ₁₀) 又名泛醌, 广泛存在于动物、植物及微生物体内, 是生物细胞呼吸链中重要递氢体, 也是人体不可缺少的重要辅酶, 能作为代谢活性

剂激活细胞呼吸, 加速呼吸链的产能过程; 它还是某些细胞自身产生的天然抗氧化剂, 能抑制线粒体的过氧化, 保护生物膜的结构完整。在医学上主要用

基金项目: 复旦大学药学院青年基金资助。

作者简介: 李继扬, 男, 博士 Tel: (021) 54237220
Tel: (021) 54237431

E-mail: ljj4886@yahoo.com.cn

E-mail: pz19444@yahoo.com.cn

* 通信作者: 周珮, 女, 博士, 教授

于心脏病、胃肠系统和抗衰老及外科等诸多疾病的治疗,对心脏、肝脏和肾有良好的保健作用,可预防动脉硬化、中风和高血压,保持牙龈健康和防治癌症^[1]。CoQ₁₀的一个重要特点是无毒副作用。因此在医学上可作为一种多功能性的生化药物,在临床中有着广泛的用途,并日益受到重视。

CoQ₁₀的制备方法主要有动植物组织提取法、化学合成法和微生物发酵法。我国于20世纪80年代初开始对微生物发酵生产CoQ₁₀进行研究和开发,优良的CoQ₁₀生产菌种和良好的发酵工艺是实现CoQ₁₀产业化的前提,但目前国内发酵法生产CoQ₁₀的产量远远不能满足市场需求。虽然目前国内报道中能生产CoQ₁₀的菌种很多,但产量大多集中在20 μg·mL⁻¹左右^[2],个别达到80 μg·mL⁻¹^[3]。本实验以热带假丝酵母(*Candida Tropicalis*)为出发菌株,通过发酵条件的优化探索CoQ₁₀的最适发酵条件,为以后生产应用奠定基础。

1 材料和试剂

1.1 菌种

热带假丝酵母原种购自中国科学院微生物菌种室,经本课题组育种处理。

1.2 培养基

1.2.1 种子培养基 葡萄糖2.0%,蛋白胨1.0%,酵母粉0.5%,自然pH,121℃灭菌25 min。

1.2.2 发酵培养基 葡萄糖、蛋白胨、酵母粉、无机盐,一定pH,121℃灭菌25 min。

1.3 试剂

辅酶Q₁₀标准品(上海阿法迪斯生物技术公司生产纯化并赠送,纯度为99.2%),蛋白胨(上海康润生物科技优先公司),所用其他试剂均为化学纯。

1.4 仪器

紫外分光光度(UNICO UV 2000)。

2 实验方法

2.1 标准曲线的绘制

精密称取CoQ₁₀标准品用无水乙醇配成0.62 mg·mL⁻¹的母液,进一步用无水乙醇稀释成0.006 2,0.012 4,0.018 6,0.024 8,0.031 0,0.037 2 mg·mL⁻¹不同质量浓度的CoQ₁₀标准溶液。根据不同质量浓度CoQ₁₀标准溶液在275 nm处吸光度绘制标准吸收曲线^[4]。

2.2 培养条件

2.2.1 种子培养条件 摇床振荡培养,摇床转速为200 r·min⁻¹,28℃,培养48 h。

2.2.2 发酵培养条件 种子培养液以一定接种量

接入发酵培养基中,28℃振荡培养,摇床转速为150 r·min⁻¹,培养72 h。

2.3 菌体重量的测定

混匀后取发酵液5 mL,经3 500 r·min⁻¹离心10 min后倾去上清液,去离子水洗涤2次,3 500 r·min⁻¹离心10 min,弃去上清液,称菌体重量。

2.4 CoQ₁₀的提取及检测

在“2.3”项下离心后的菌体中加入5 mL无水乙醇,超声提取,以2 500 r·min⁻¹离心10 min,过滤并取一定量上清液,275 nm处测定CoQ₁₀的含量^[4]。

3 结果与分析

3.1 CoQ₁₀标准曲线的绘制

根据不同质量浓度CoQ₁₀标准溶液275 nm处的吸光度绘制标准吸收曲线, $Y = 15.498X + 0.0032$ ($r = 0.9999$)。因此可以利用紫外分光光度法测定CoQ₁₀的含量。

3.2 培养条件的选择

3.2.1 发酵时间对细胞生长及合成CoQ₁₀能力的影响^[5] 在发酵的24、48、72、96 h时取样分析,分别测定菌体重量和CoQ₁₀的含量。发酵时间对细胞生长及CoQ₁₀合成的影响较大,并且菌体生长与CoQ₁₀的产生有一定的相关。菌体数量和CoQ₁₀的产量在72 h时达到最大。

3.2.2 装液量对细胞生长及CoQ₁₀合成能力的影响^[6] 摇瓶的不同装液量反映发酵介质的溶氧水平。250 mL发酵瓶装液量分别为25,30,35,40,45,50 mL,4.0%接种量,28℃150 r·min⁻¹振荡培养72 h。观察不同溶氧水平下菌体生长与CoQ₁₀的变化。当装液量50 mL时,菌体总量的下降明显增加,CoQ₁₀的产量下降。而在装液量为30~40 mL之间时,CoQ₁₀合成较多,且含量较为稳定。综合考虑选择装液量40 mL。

3.2.3 初始pH值对细胞生长及合成CoQ₁₀的影响^[7] 初始pH值影响菌体生长速度和代谢产物的变化。调节初始培养基pH值分别为5.0,5.5,6.0,6.5,7.0,7.5,8.0,8.5,9.0,装液量为40 mL,4.0%接种量,28℃150 r·min⁻¹转速振荡培养72 h,测定菌体重量和CoQ₁₀的含量,结果见表1。

3.2.4 接种量对细胞生长及CoQ₁₀合成能力的影响 发酵培养基初始pH 8.0,装液量为40 mL(250 mL)三角瓶,按3.0%,4.0%,5.0%,6.0%和7.0%的接种量加入发酵培养基中,28℃150 r·min⁻¹培养72 h,观察不同接种量对菌体重量和CoQ₁₀合成的影响。

表1 初始 pH 对 CoQ₁₀ 产量及菌体重量的影响

Tab 1 Effect of various pH Value on cell growth and CoQ₁₀ production

初始 pH	菌体重量/g · (5 mL) ⁻¹	CoQ ₁₀ 产量/μg · mL ⁻¹
5.0	0.300 ± 0.035	30.57 ± 4.78
5.5	0.933 ± 0.105	30.22 ± 5.43
6.0	0.926 ± 0.087	30.68 ± 3.23
6.5	0.936 ± 0.110	31.96 ± 4.18
7.0	0.909 ± 0.105	35.19 ± 4.23
7.5	0.916 ± 0.082	35.23 ± 3.56
8.0	0.998 ± 0.097	36.62 ± 4.67
8.5	0.900 ± 0.101	31.90 ± 3.42
9.0	0.900 ± 0.098	31.38 ± 3.14

当接种量为 4.0 % 时,菌体体积和 CoQ₁₀ 产量均达到最大值。在接种量为 6.0 % 时菌体重量出现最低。可能系较大的接种量改变了发酵培养基营养物质的组成和酶的组成,影响了菌体的生长。而 7.0 % 的接种量菌体重量的增加可能系接种量大所致。

弱碱性条件有利于菌体生长和 CoQ₁₀ 的合成,故选择初始 pH 为 8.0。

3.2.5 碳源对细胞生长及 CoQ₁₀ 合成能力的影响^[7] 本实验采用的碳源有葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和可溶性淀粉,添加量均为 3%,其他组分及发酵条件不变,分别测定菌体重量和 CoQ₁₀ 的产量。

结果表明葡萄糖为较合适的碳源。在此基础上,采用 2.5%、3.0%、3.5%、4.0% 和 4.5% 的不同葡萄糖浓度,其他组分一致,不同葡萄糖浓度对菌种生长与 CoQ₁₀ 产量的影响较大,结果显示比较合适的葡萄糖浓度为 4.0%。

3.2.6 氮源对细胞生长及 CoQ₁₀ 合成能力的影响^[8] 分别采用 2.0% 的大豆蛋白胨、胰蛋白胨和鱼蛋白胨作为氮源,其他培养基组分及发酵条件均相同,采用大豆蛋白胨比使用胰蛋白胨和鱼蛋白胨 CoQ₁₀ 发酵单位提高 18.18% 和 22.89%。在此基础上,采用不同浓度的大豆蛋白胨(分别为 2.0%、3.0%、4.0% 和 5.0%),其他条件相同,发现 5% 的蛋白胨浓度比较适合目的产物的生成,大豆蛋白胨浓度 5.0% 比 3.0% 提高 CoQ₁₀ 产量 21.0%。

3.2.7 无机盐对 CoQ₁₀ 合成能力的影响 无机盐是药物产生菌生长繁殖和代谢所必需的物质,结合文献^[5,6] 本试验采用的无机盐及浓度分别为: MgSO₄ 0.64 mg · L⁻¹, FeSO₄ · 7H₂O 16.0 mg · L⁻¹,

ZnSO₄ · 7H₂O 45.20 mg · L⁻¹, MnSO₄ · 5H₂O 18.0 mg · L⁻¹, 其他条件相同。结果表明 MnSO₄ 促进 CoQ₁₀ 合成的能力最强,进一步研究发现当 MnSO₄ · 5H₂O 添加量为 9 mg · L⁻¹ 时,热带假丝酵母菌体生长和 CoQ₁₀ 产量均达到最大值。

40 mL 发酵培养基中加入不同比例的磷酸二氢钾(0.1%) 和磷酸氢二钾(0.1%),其他条件同,测定不同磷酸盐浓度对菌体生长及 CoQ₁₀ 合成的影响。结果显示磷酸盐对菌体的生长和 CoQ₁₀ 的合成有较大的促进作用。其中磷酸二氢钾: 磷酸氢二钾为 2:1 的配比较佳。

4 讨论

目前国内虽有以热带假丝酵母生产 CoQ₁₀ 的报道,但发酵产量不高^[9]。本实验利用育种得到的热带假丝酵母发酵生产 CoQ₁₀,发现葡萄糖是较适碳源,大豆蛋白胨是较好的氮源,硫酸锰和磷酸盐对细胞生长与产物 CoQ₁₀ 合成的影响较显著,适宜的初始 pH 值为 8.0,最佳接种量为 4.0%,发酵时间为 72 h。通过以上发酵条件的筛选,采用最佳配比培养基配方和发酵工艺热带假丝酵母发酵产生 CoQ₁₀ 的生产能力可达 70 μg · mL⁻¹ 左右,与目前国内文献报道其它菌种的微生物发酵水平相当^[3],远高于同类菌种的发酵单位,但与国外水平相比还有一定差距^[10]。

高产菌株的选育和分离提取工艺的探讨进一步研究中,通过以上工作的进行相信能为 CoQ₁₀ 的工业化生产奠定良好的基础。

REFERENCES

[1] KAKAMUKAI M. Biosynthesis bioproduction and novel roles of ubiquinone[J]. J Biosci Bioeng,2002,94(6):511-517.

[2] YUAN J, WEI H. Recent progress of ubiquinone-10 production by microbial fermentation[J]. Amino Acids Biotic Resources(氨基酸和生物资源),2004,26(1):55-56.

[3] XU J Y, YUE X F, XIAO H R. Studies on the fermentation condition of Coenzyme-Q₁₀ by yeast SY-3[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学杂志),2006,23(7):601-603.

[4] WU Z F, DU G C, CHEN J. Studies on the purification and quantitation analysis of Coenzyme Q₁₀ in culture[J]. J Wuxi Univ light ind(无锡轻工大学学报),2002,21(4):420-423.

[5] LIU L, LI G. Optimization of fermentation conditions of coenzyme Q₁₀ production by *Cryptococcus luteolus* [J]. J microbiology(微生物学杂志),2005,25(4):60-63.

[6] WU Z F, DU G C, CHEN J. Coenzyme Q₁₀ shaking-flask culture

conditions by *Rhizobium radiobacter* WSH 2001 [J]. J Wuxi Univ light ind(无锡轻工大学学报),2003,22(1):65-69.

[7] LI M, LU W F, GAO X D. Primary investigation on coenzyme Q₁₀ producing bacteria CPU 0402 [J]. Pharm Biotechnol(药物生物技术),2005,12 (3):162-166.

[8] ZHANG X Y, LIU D R, DU G C, et al. Screening of CoQ₁₀—producing strain *Agrobacterium tumefaciens* WSH AT12 and optimization of fermentation conditions for mutant WSH—E01 [J]. Ind Microbiol(工业微生物),2007,37(3):5-9.

[9] OU T, XU E N, XIN F. Studies on the mutation breeding of CoQ₁₀ high yield of *Candida Tropicalis* [J]. Sci Technol Food Ind (食品工业科技),2007,28(4):60-66.

[10] YONG C P, SOO J K, JIN H C, et al. Batch and fed-batch production of coenzyme Q₁₀ in recombinant *Escherichia coli* containing the decaprenyl diphosphate synthase gene from *Glutobacter suboxydans* [J]. Appl Microbial Biotechnol,2005,67(2):192-196.

收稿日期:2007-11-26