

产辅酶 Q₁₀ 酵母的发酵条件研究

张延静 袁其朋* 梁浩

(北京化工大学制药工程系 北京 100029)

摘要: 研究了豆油、豆粉、胡萝卜汁、西红柿汁、烟叶、 β -胡萝卜素、桔子皮汁等自然物的添加对酵母发酵生产 CoQ₁₀ 的影响, 结果表明它们均能大幅度提高酵母菌中 CoQ₁₀ 的含量。其中豆油、豆粉、西红柿汁、桔子皮汁是富含 CoQ₁₀ 和胡萝卜素合成途径中的前体物质因而提高了 CoQ₁₀ 的产量; 烟叶和 β -胡萝卜素阻断了合成 β -胡萝卜素的途径从而起到提高 CoQ₁₀ 合成的作用; 胡萝卜汁的作用可能两者兼而有之。因此可以得出以下结论, 微生物中 CoQ₁₀ 的合成与 β -胡萝卜素的合成密切相关。

关键词: CoQ₁₀, β -胡萝卜素, 生物合成, 发酵, 生产

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 02-0065-05

THE BIOSYNTHESIS OF COENZYME Q₁₀ IN *BULLERA PSEUDOALBA*

ZHANG Yan-Jing YUAN Qi-Peng LIANG Hao

(Department of Pharmaceutical Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029)

Abstract: The addition of nature substances such as soybean oil, carrot extract, tomato extract, wastes of tobacco industry and citrus molasses to growth medium was shown to strengthen the formation of Coenzyme Q₁₀. Some of these substances act as precursors of Coenzyme Q₁₀ and Beta-Carotene, and others such as wastes of tobacco industry and Beta-Carotene act as inhibitors of Beta-Carotene; they all can strengthen the formation of Coenzyme Q₁₀. Immediately relationship between the biosynthesis of Coenzyme Q₁₀ and Beta-Carotene has been detected.

Key words: Coenzyme Q₁₀, Fermentation, Production, Beta-Carotene.

泛醌或辅酶 Q₁₀ (商品名: Coenzyme Q₁₀, ubiquinone-50, 本文简称 CoQ₁₀) 是存在于动物、植物、微生物等细胞体内的泛醌类化合物 (Ubiquinone)。其化学结构为: 2, 3 二甲氧基-5 甲基-6 聚异戊二稀基苯醌。它是人体血液中必需的一种物质, 在人体细胞内与线粒体内膜结合, 是呼吸链中重要的递氢体。它具有抗氧化性、消除自由基、提高机体免疫力等功能^[1], 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 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, 使其在国内外的需求进一步扩大。

CoQ₁₀ 的生产方法共有 4 种: 动植物组织提取法、化学合成法、植物细胞培养法、微生物发酵法。动植物组织提取法有原料价格高、来源有限、CoQ₁₀ 含量低等缺点, 故不利于工业化生产。植物细胞培养法生产周期长, 培养条件苛刻, 产率低, 技术尚不成熟。工业上广泛使用的化学合成法具有反应步骤多、最终转化率低、副产品多、分离过程复杂、手性物质分离困难以致产品活性低等缺点。另外, 随着生活水平的提高, 人们对纯天然产品的崇尚日益增加, 化学合成药物已越来越不受欢迎。微生物发酵法

* 联系人 北京化工大学 75 信箱

收稿日期: 2002-03-11, 修回日期: 2002-05-10

生产 CoQ₁₀ 成为当前研究的热点,它具有不受原料限制,分离过程相对简单,不存在手性问题等优点,成为最有发展潜力的 CoQ₁₀ 生产方法。目前,日本在发酵法生产 CoQ₁₀ 的研究中处于领先地位,其产量最高达到 770mg/L 发酵液^[10],国内对发酵法生产 CoQ₁₀ 的研究尚未见有报道。

由 CoQ₁₀ 和类胡萝卜素的合成途径^[2,3]可知:两者都存在一个相同的聚异戊二稀长链的合成途径。因此,理论上能促进和阻断胡萝卜素合成的物质均能对 CoQ₁₀ 的合成产生积极的影响。含有对胡萝卜素合成有促进作用的物质有^[4-6]:植物油、柑橘糖蜜、西红柿汁、胡萝卜汁等;烟叶能作为阻断剂抑制胡萝卜素的合成^[7];本文利用一株酵母菌,研究了这些自然添加物对其 CoQ₁₀ 含量的影响,并对 CoQ₁₀ 和胡萝卜素合成之间的关系做了初步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种:假白布勒弹孢酵母 (*Bullera pseudoalba*)。

1.1.2 试剂:CoQ₁₀ 标准品为 Sigma 公司提供,其它为分析纯试剂或商业用产品。自然添加物为北京市售产品。

1.1.3 基本液体培养基:葡萄糖 10g,麦芽汁 3g,蛋白胨 5g,酵母粉 3g, K₂HPO₄ 0.5g, KH₂PO₄ 0.5g, MgSO₄·7H₂O 0.3g,定容至 1L,自然 pH 值。斜面培养基:麦芽琼脂培养基。

1.1.4 培养条件:在 250mL 锥形瓶中倒入 50mL 培养基,于 0.7 × 10⁵ Pa 条件下灭菌 30min,然后从斜面培养基接种到锥形瓶中,在摇床中于 30℃, 200r/min 条件下培养 24h,作为种子培养液。同样装有 50mL 培养基的锥形瓶,高压灭菌后接种,接种率为 5%。放入恒温摇床中,30℃, 200r/min 条件下发酵培养 72h。

1.2 实验方法

1.2.1 菌体生物量的测定:发酵液稀释后以空白培养基为参比液,用分光光度计在 550nm 下测定 OD 值,然后查标准曲线,即得菌体干重,作为菌体生物量指标。

1.2.2 CoQ₁₀ 的提取^[4]:摇床培养结束后,取 300mL 发酵液在 5,000r/min 条件下离心 10min 后,收集菌体,用去离子水洗涤两次。放入蒸馏瓶中,加入 2.0g 联苯三酚, 1.6g 氢氧化钠, 19mL 甲醇, 7mL 去离子水, 90℃ 下回流 1h,在自来水下迅速冷却,然后加入 50mL 正己烷萃取,静置分层,取上清液,将剩余部分再萃取一次,合并上清液,用去离子水洗涤两次, 45℃ 真空干燥,得橙黄色油状物,即为 CoQ₁₀ 粗品。

1.2.3 CoQ₁₀ 的检测^[8]:用高效液相色谱进行检测, C₁₈ 柱,流动相为: 10% 正己烷: 90% 甲醇 (V: V),流速: 1mL/min,紫外检测器,检测波长 275nm。

2 结果与讨论

2.1 豆粉的添加对菌体中所含 CoQ₁₀ 的影响

大豆中富含 CoQ₁₀,因此,豆粉中可能含有合成 CoQ₁₀ 的促进剂或前体物。在基本培养基成分中分别添加 0.5g、1.5g、3g、5g 的豆粉,定容至 100mL,灭菌后进行发酵,结

果如图 1 所示。

由结果可以看出：随着豆粉的加入，菌体干重增加，发酵液中总的 CoQ_{10} 的含量也呈上升趋势，在含 5g 豆粉的培养基中达到最大，为 $2665.6\mu\text{g/L}$ 发酵液；但单位菌体中的 CoQ_{10} 含量却出现波动，在 3g 时达到最大为 $271.7\mu\text{g/g cells}$ 。此组实验结果证明豆粉中确实存在合成 CoQ_{10} 的促进剂或前体物。

2.2 豆油的添加对菌体中所含 CoQ_{10} 的影响

植物油中含有大量的油酸和亚油酸可以改变微生物细胞的通透性^[9]，有利于细胞对营养物质的吸收。结合第一组实验设计如下实验：在基本培养基中加入 0g、1g、3g、5g、7g 豆油，定容至 100mL，灭菌后进行发酵，结果如图 2。

在实验所取的浓度范围内，加入 1g 豆油时菌体生物量明显增加，但随着豆油添加量的增加，菌体生物量逐渐下降； CoQ_{10} 的含量先增大后减小。在培养基中含 5g 豆油时， CoQ_{10} 含量达到最大为 $1584.2\mu\text{g/L}$ 发酵液，为不加豆油时的 8.2 倍。

结合第一组实验，可以得出以下结论：豆油在 CoQ_{10} 的合成过程中有两种作用：(1) 改变微生物细胞的通透性，促进了细胞对营养物质的吸收。(2) 豆油中本身含有能促进 CoQ_{10} 合成的促进剂或前体物。

2.3 胡萝卜汁的添加对菌体中所含 CoQ_{10} 的影响

胡萝卜从北京市场上购得，榨汁，分别取 0mL、25mL、50mL、75mL、100mL 胡萝卜汁按照基本培养基的成分配制培养基。结果如图 3。

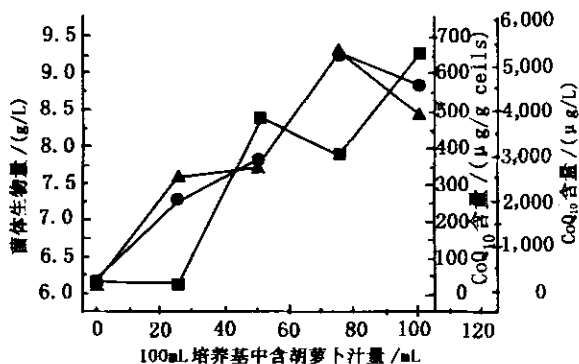


图 1 豆粉的添加对酵母菌生物量和 CoQ_{10} 含量的影响

■ 菌体生物量, ▲ CoQ_{10} 含量 ($\mu\text{g/g cells}$),
● CoQ_{10} 含量 ($\mu\text{g/L}$ 发酵液)

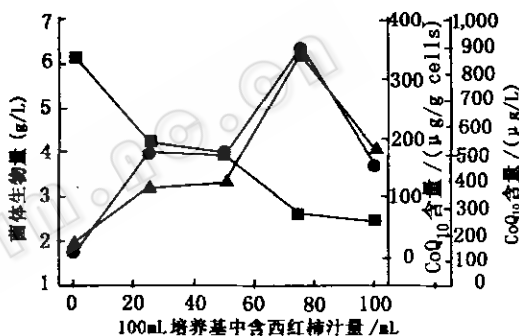


图 2 豆油的添加对酵母菌生物量和 CoQ_{10} 含量的影响

■ 菌体生物量, ▲ CoQ_{10} 含量 ($\mu\text{g/g cells}$),
● CoQ_{10} 含量 ($\mu\text{g/L}$ 发酵液)

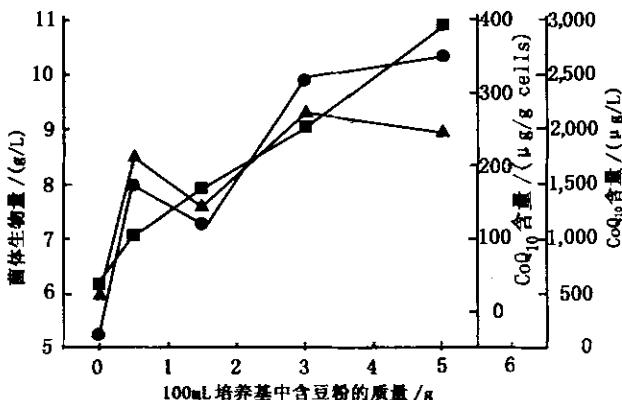


图 3 胡萝卜汁的添加对酵母菌生物量和 CoQ_{10} 含量的影响

■ 菌体生物量, ▲ CoQ_{10} 含量 ($\mu\text{g/g cells}$),
● CoQ_{10} 含量 ($\mu\text{g/L}$ 发酵液)

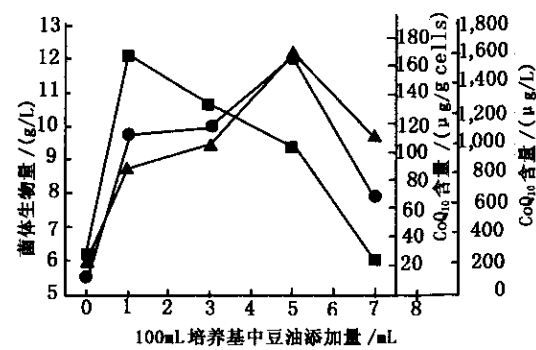


图 4 西红柿汁添加对酵母菌生物量和 CoQ₁₀ 含量影响

■ 菌体生物量, ▲ CoQ₁₀ 含量 (μg/g cells),
● CoQ₁₀ 含量 (μg/L 发酵液)

由结果可以看出, 随着胡萝卜汁的添加, 菌体干重呈上升趋势, 而 CoQ₁₀ 含量先上升后下降, 在加入 75mL 胡萝卜汁时达到最大为 665.7μg/g cells。比不加胡萝卜汁时提高了 32 倍。

2.4 西红柿汁的添加对菌体中所含 CoQ₁₀ 的影响

西红柿从北京市场上购得, 榨汁, 分别取 0mL、25mL、50mL、75mL 按照基本培养基的成分配制培养基, 结果如图 4。

随着西红柿汁的增加, 菌体干重显著减小, 然而单位菌体中的 CoQ₁₀ 含量却呈上升趋势然后下降, 在 75mL 时达到最大为 339.3μg/g cells; 而此时, 发酵液中的总 CoQ₁₀ 的产量也达到最大值为: 895.7μg/L 发酵液。

2.5 其它物质对酵母菌中 CoQ₁₀ 含量的影响

从 CoQ₁₀ 的合成途径中可知, 对羟基苯甲酸是合成 CoQ₁₀ 的前体物^[2], 烟酸作为呼吸链促进剂和维生素 B₁ 也是发酵法生产 CoQ₁₀ 的培养基中常加的微量物质^[3], 柑橘糖蜜作碳源可以提高微生物中胡萝卜素的合成^[6], 烟叶可以阻断微生物中番茄红素到胡萝卜素之间的合成途径从而抑制胡萝卜素的合成^[7]。为了进一步探讨 CoQ₁₀ 和胡萝卜素合成之间的关系, 我们设计了以下几组实验, 结果如表 1 所示。

表 1 前体物及其他物质对 CoQ₁₀ 生物合成的影响

培养基成分	菌体干重 (g/L 发酵液)	CoQ ₁₀ (μg/L 发酵液)	CoQ ₁₀ (μg/g 菌体)
100mL 基本培养基	6.171	128.2	20.8
100mL 基本培养基 + 0.05g 对羟基苯甲酸	5.122	132.8	25.9
100mL 基本培养基 + 1mgVB1 + 1mg 烟酸	3.785	337.5	89.2
100mL 基本培养基 + 0.2g 的烟叶粉	6.267	778.4	124.2
100mL 基本培养基 + 2g 桔子皮汁	4.423	775.1	175.2
100mL 基本培养基 + 0.2g β-胡萝卜素	5.246	784.4	149.5

如表中所示: 这些物质的加入均能或多或少的提高菌体中 CoQ₁₀ 的含量, 其中的对羟基苯甲酸作为合成 CoQ₁₀ 的醌环核心的直接前体而起作用; 烟酸是作为呼吸链促进剂起作用; 烟叶能抑制菌体产生胡萝卜素起作用, 而此时菌体中生成大量的 CoQ₁₀ 的原因可能是由于积累的胡萝卜素合成途径中的代谢中间产物对合成胡萝卜素的关键步骤起反馈抑制, 从而使合成 CoQ₁₀ 的代谢通量变大。同样, 在培养基中加入过量的 β-胡萝卜素能使 CoQ₁₀ 的含量大幅度提高也说明了这个现象。

综合上述实验结果可以得到以下结论, CoQ₁₀ 的合成与 β-胡萝卜素的合成密切相关。在今后的发酵生产 CoQ₁₀ 的工艺过程中, 可以借鉴较为成熟的 β-胡萝卜素的一些控制手段, 先从提高 β-胡萝卜素的产量入手, 使两者共同的代谢通量增大, 再对共同的代谢途径后面的 β-胡萝卜素的合成途径进行阻断, 使合成 CoQ₁₀ 的代谢通量增加。

在菌种的筛选和诱变时也可考虑以 β -胡萝卜素作为一项指标来进行^[10]。

3 结束语

本文选择了一株酵母菌,初步研究了一些天然物对微生物中 CoQ_{10} 含量的影响,在所选的添加物中胡萝卜汁对 CoQ_{10} 的含量的提高最大,为原来的32倍,由原来的 $20.8\mu\text{g/g cells}$ 提高为 $665.7\mu\text{g/g cells}$ 。实验结果表明 CoQ_{10} 的合成与 β -胡萝卜素的合成密切相关:能促进 β -胡萝卜素合成的物质也可以同时促进 CoQ_{10} 的合成,而在同等情况下,阻断 β -胡萝卜素的合成也能增大 CoQ_{10} 的代谢通量,精确的代谢调控机制目前还不清楚,是今后研究的方向。

微生物发酵法生产 CoQ_{10} 具有化学合成法所没有的独特的优点,它以天然产品的面目出现以及产品具有较高的活性而成为最具有发展潜力的生产方法,国外一些著名的大公司如德国BASF公司等对此项研究有很浓厚的兴趣。微生物发酵法生产 CoQ_{10} 的研究刚刚起步,需要做的工作还有很多,如进行菌种的筛选、诱变以得到 CoQ_{10} 的高产菌株;研究 CoQ_{10} 的代谢调控机制,构建高产基因工程菌株;优化培养条件以及对 CoQ_{10} 的下游提取、纯化、精制等进行研究,都是今后工作的重点。

参考文献

- [1] Ernster L. Facts and ideas about the function of coenzyme Q_{10} in the Mitochondria. In: Folkers K, Yamamura Y. (eds) Biomedical and Clinical Aspects of Coenzyme Q. Elsevier, Amsterdam, 1977, 15~18.
- [2] Harry R. The Biosynthesis of Coenzyme Q--Its Relation of Cellular Metabolism and Function. Biomedical Press Biomedical and Clinical of Coenzyme Q. 1977 Elsevier/North-Holland.
- [3] 熊宗贵. 发酵工艺原理(第一版). 北京:中国医药科技出版社, 1995.
- [4] Yohri N, Tomohisa N. Agric Biol Chem, 1981, 45 (10): 2175~2182.
- [5] Anderson R F, Arnold M, Nelson G E N, et al. J Agr Food Chem, 1958, 6 : 543~545.
- [6] Ninet L, Renaut J, Tisseier R. Activation of the Biosynthesis of Carotenoids by *Blakealea trispora*. Biotechnology and Bioengineering. Vol. XI, Issue 6.
- [7] Gavrilov A S, Kiseleva A I, Matushkina S A. Industrial Production of Lycopene by a Microbiological Method. Applied Biochemistry and Microbiology, 1996, 32: (5).
- [8] Surasi V, Naoki S, Nobuyuki A. Analytical Biochemistry, 1984, 142: 155~158.
- [9] 俞俊棠, 唐孝宜. 生物工艺学(第一版). 上海:华东理工大学出版社: 1992.
- [10] Kuniaki S, Hisao T, Susumu S, et al. Biochnology and Applied Biochemistry 1992, 16: 19~28.

·稿件规范化与标准化·

正体与斜体

物种的学名: 菌株的属名、种名(包括亚种、变种)用拉丁文斜体。属的首字母大写, 其余小写, 属以上用正体。病毒一律用正体, 首字母大写。

限制性内切酶: 前三个字母用斜体, 后面的字母和编码正体平排, 例如: *Bam*HI、*Eco*RI、*Msp*I、*Sau*3AI等。

氨基酸和碱基的缩写: 氨基酸缩写用3个字母表示时, 仅第一个字母大写, 其余小写, 正体。碱基缩写为大写正体。