

# 放射型根瘤菌辅酶 Q<sub>10</sub> 发酵助剂的研究

潘春梅<sup>1</sup> 刘畅<sup>1</sup> 堵国成<sup>2</sup>

1(郑州牧业工程高等专科学校生物工程系, 郑州, 450011)

2(江南大学生物工程学院, 无锡, 214036)

**摘要** 研究了儿种促进剂和前体对放射型根瘤菌细胞生长及其辅酶 Q<sub>10</sub> 发酵的影响, 结果表明, 在培养基中适量添加番茄汁、胡萝卜汁、蛋氨酸、V<sub>B1</sub> 和对羟基苯甲酸均可明显提高辅酶 Q<sub>10</sub> 的产量。在所试浓度范围内, V<sub>B1</sub>、胡萝卜汁和蛋氨酸 3 种添加物最高可使辅酶 Q<sub>10</sub> 产量比对照组分别提高 25%、18% 和 13%。

**关键词** 放射型根瘤菌, 辅酶 Q<sub>10</sub>, 促进剂, 发酵

采用微生物发酵法生产辅酶 Q<sub>10</sub>, 具有原料来源丰富、反应条件温和、分离纯化过程相对简单和产品生物活性高等特点, 因而是最具发展潜力的生产方法<sup>[1]</sup>。目前制约发酵法工业化生产辅酶 Q<sub>10</sub> 的主要因素是发酵产率较低, 导致生产成本较高。因此应从多方面着手提高辅酶 Q<sub>10</sub> 发酵产率, 包括对产物生物合成途径的探讨、高产菌株的选育、发酵条件的优化、前体物质和促进生物合成物质的添加等<sup>[2-4]</sup>。

本文在前期选育辅酶 Q<sub>10</sub> 高产突变株及其发酵条件优化的基础上, 根据辅酶 Q<sub>10</sub> 生物合成机制和代谢途径, 在发酵过程中选择性添加营养物质和一些有可能对辅酶 Q<sub>10</sub> 合成有促进作用的物质, 研究其对辅酶 Q<sub>10</sub> 合成的影响, 以期提高辅酶 Q<sub>10</sub> 的产量。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌 种

放射型根瘤菌放线菌素 D 和 L-乙基硫氨酸双抗性突变株 *Rhizobium radiobacter* (ActD<sup>r</sup> Eth<sup>r</sup>) WSH-E25, 江南大学生物工程学院环境生物技术研究室保存。

### 1.2 培养基

(1) 斜面和种子培养基(g/L): 葡萄糖 20, 蛋白胨 10, 酵母膏 10, NaCl 5, pH 7.2, 121 °C 灭菌 15 min。斜面培养基另加琼脂 20 g/L。

(2) 发酵培养基(g/L): 葡萄糖 30, 糖蜜 60, 酵母膏 5, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7, 玉米浆 30, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.4, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 1.5, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.4, pH 7.2, 121 °C 灭菌 15 min。

### 1.3 菌种培养方 法

#### 1.3.1 斜面活化和种子培养

将冰箱中保藏的斜面菌种接种到活化斜面上, 30 °C 静置培养 24 h; 将活化后的斜面菌种接入种子培养基, 30 °C, 200 r/min 振荡培养 24 h。摇瓶装液量为 50 mL/250 mL 三角瓶。

#### 1.3.2 发酵培养

取种子培养液以 7% (v/v) 接种量接入发酵培养基, 装液量为 50 mL/500 mL 三角瓶, 30 °C、200 r/min 振荡培养 80 h, 促进剂的添加方式及浓度见文章中。每组试验做 3 个平行样。

### 1.4 辅酶 Q<sub>10</sub> 提取

15 mL 发酵液 → 离心分离 (3 000 r/min, 20 min) → 倾去上清液 → 菌体加入 15 mL 丙酮, 超声波振荡 0.5 h → 离心 (3 000 r/min, 10 min) → 上清液 → HPLC 分析。

### 1.5 细胞干重测定

取发酵液 4 mL, 于 10 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体, 用蒸馏水洗 2 次, 105 °C 烘干至恒重后称重。

### 1.6 辅酶 Q<sub>10</sub> 含量测定<sup>[5]</sup>

高压液相色谱 (HPLC) 法。柱子: SB-C<sub>18</sub> 反向柱, 100 × 4.6 mm, 直径为 3.5 μm; 流动相为 V(甲醇): V(无水乙醇) = 1:1, 流速 1.0 mL/min, 检测器 275 nm, 柱温 30 °C, 进样量 20 μL, 洗脱时间 15 min。

## 2 结果与讨论

### 2.1 添加番茄汁对 *R. radiobacter* WSH-E25 辅酶 Q<sub>10</sub> 发酵的影响

从市场上购得番茄, 按照 1:1 的质量比加入水, 榨汁过滤备用。分别取 5、10、20、30 mL 番茄汁加入到 100 mL 发酵培养基中, 接种后发酵培养 80 h, 结

第一作者: 硕士研究生, 讲师。

收稿日期: 2005-03-15, 改回日期: 2005-07-22

果如图 1 所示。

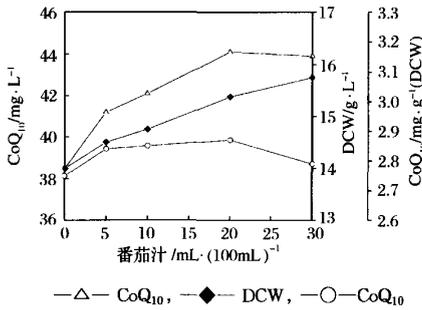


图 1 添加番茄汁对辅酶 Q<sub>10</sub> 发酵的影响

随着番茄汁添加量的增加,细胞干重不断增加,但胞内辅酶 Q<sub>10</sub> 含量变化不大,由于番茄汁对细胞生长有较强的促进作用,因而有效地提高了辅酶 Q<sub>10</sub> 的产量。当番茄汁添加量为 20 mL 时,辅酶 Q<sub>10</sub> 产量达到 44.1 mg/L,比不添加番茄汁时的产量提高了 15%。Han 等<sup>[6]</sup>报道,番茄汁对类胡萝卜素(异戊烯类化合物)的生物合成具明显的促进作用,添加有利于胡萝卜素合成的物质有可能对辅酶 Q<sub>10</sub> 的生物合成有利。添加番茄汁对细胞生长与辅酶 Q<sub>10</sub> 合成的促进作用可能与此有关。

## 2.2 添加胡萝卜汁对 R. radiobacter WSH-E25 辅酶 Q<sub>10</sub> 发酵的影响

从市场上购得胡萝卜,按照 1:1 的质量比加入水,榨汁过滤备用。分别取 5、10、20、30 mL 胡萝卜汁加入到 100 mL 发酵培养基中,接种后发酵培养 80 h,结果如图 2 所示。

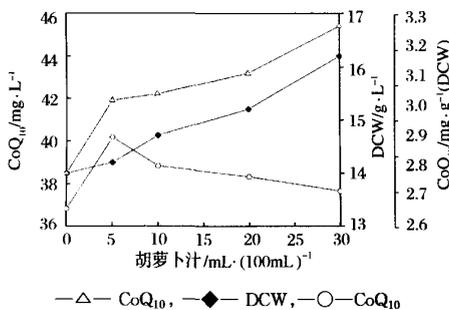


图 2 添加胡萝卜汁对辅酶 Q<sub>10</sub> 发酵的影响

随着胡萝卜汁的加入,菌体干重显著增加,辅酶 Q<sub>10</sub> 产量也呈上升趋势,其对细胞干重和辅酶 Q<sub>10</sub> 合成的促进作用强于番茄汁所起的作用。在添加胡萝卜汁 30 mL 时,辅酶 Q<sub>10</sub> 产量达到 45.4 mg/L,比不添加时提高了 18%。添加胡萝卜汁 5 mL 时细胞内辅酶 Q<sub>10</sub> 含量最高,为 2.95 mg/g(干细胞),比不添加时提高了 7%,但随着添加量的增加,胞内辅酶 Q<sub>10</sub> 含

量反而不断下降,即细胞合成辅酶 Q<sub>10</sub> 的能力呈下降趋势。

辅酶 Q<sub>10</sub> 和类胡萝卜素的合成途径中聚异物二烯长链的合成有相似之处,辅酶 Q<sub>10</sub> 的合成和类胡萝卜素的合成密切相关<sup>[6]</sup>。添加适量富含类胡萝卜素的胡萝卜汁,对合成类胡萝卜素的关键步骤起反馈作用,抑制了胞内类胡萝卜素的合成,从而使合成辅酶 Q<sub>10</sub> 代谢流增大。同时胡萝卜汁和番茄汁中还富含一些易被微生物吸收利用的辅酶 Q<sub>10</sub> 合成途径中的小分子前体物质,都有可能有利于辅酶 Q<sub>10</sub> 的合成。

## 2.3 添加氨基酸对 R. radiobacter WSH-E25 辅酶 Q<sub>10</sub> 发酵的影响

### 2.3.1 不同氨基酸对辅酶 Q<sub>10</sub> 发酵的影响

氨基酸是参与细胞代谢必不可少的营养物质之一,根据辅酶 Q<sub>10</sub> 生物合成途径和代谢调控机制,选择蛋氨酸、酪氨酸、缬氨酸、丙氨酸、异亮氨酸分别加入发酵培养基中(各种氨基酸添加量为 1 g/L),考察各种氨基酸的添加对 R. radiobacter WSH-E25 细胞生长和辅酶 Q<sub>10</sub> 合成的影响。

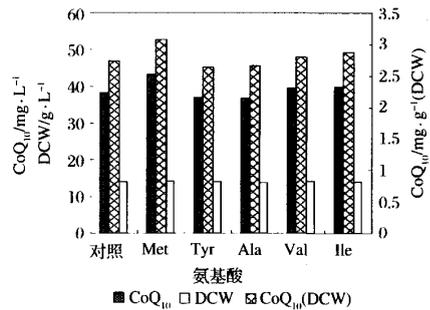


图 3 不同氨基酸对辅酶 Q<sub>10</sub> 发酵的影响

由图 3 可以看出,与对照相比,添加所选择的氨基酸对细胞生长没有明显的促进作用。除蛋氨酸对辅酶 Q<sub>10</sub> 的合成有明显的促进作用外,其他氨基酸对辅酶 Q<sub>10</sub> 合成的促进作用不明显。

### 2.3.2 蛋氨酸及添加方式对辅酶 Q<sub>10</sub> 发酵的影响

在辅酶 Q<sub>10</sub> 生物合成过程中,其苯环上的甲基基团是由 S-腺苷蛋氨酸(SAM)提供的,而 S-腺苷蛋氨酸的形成需要有足够量的蛋氨酸的存在,蛋氨酸是辅酶 Q<sub>10</sub> 甲基基团的供体<sup>[1]</sup>,因而增加前体蛋氨酸的供应量可能会促进辅酶 Q<sub>10</sub> 的合成。故考察了不同的蛋氨酸添加量和不同添加方式对辅酶 Q<sub>10</sub> 发酵的影响,蛋氨酸是通过过滤除菌后加入到发酵培养基中,结果如表 1 所示。

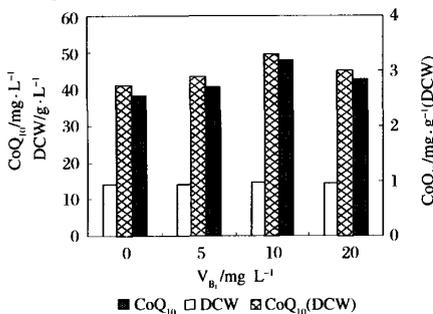
表1 不同蛋氨酸添加量和添加方式对辅酶 Q<sub>10</sub> 发酵的影响

| 添加时间/h | $\rho(\text{Met})$<br>/mg·L <sup>-1</sup> | DCW<br>/g·L <sup>-1</sup> | CoQ <sub>10</sub><br>/mg·g <sup>-1</sup> (DCW) | CoQ <sub>10</sub><br>/mg·L <sup>-1</sup> |
|--------|---|---------------------------|--|--|
| 0      | 0   | 13.9                      | 2.77   | 38.5                                     |
| 0      | 500                                       | 14.2                      | 2.77   | 39.4                                     |
| 0      | 1000                                      | 14.3                      | 2.78   | 39.8                                     |
| 0      | 1500                                      | 13.9                      | 2.79   | 38.8                                     |
| 24     | 500                                       | 13.9                      | 2.87   | 39.9                                     |
| 24     | 1000                                      | 14.1                      | 3.09   | 43.6                                     |
| 24     | 1500                                      | 14.1                      | 2.93   | 41.3                                     |

由表1结果可知,在发酵过程中添加蛋氨酸对辅酶 Q<sub>10</sub> 的合成有促进作用,在发酵过程(24 h)中添加蛋氨酸比发酵初期(0 h)添加的效果好。发酵初期添加,菌体干重稍有增加,但细胞内辅酶 Q<sub>10</sub> 含量基本保持不变。在第24 h添加1 g/L 蛋氨酸时,菌体干重基本不变,辅酶 Q<sub>10</sub> 产量和细胞内辅酶 Q<sub>10</sub> 含量分别达到 43.6 mg/L 和 3.09 mg/g(DCW),比对照组分别提高了 13% 和 11%。

#### 2.4 添加维生素 B<sub>1</sub> 对 *R. radiobacter* WSH-E25 辅酶 Q<sub>10</sub> 发酵的影响

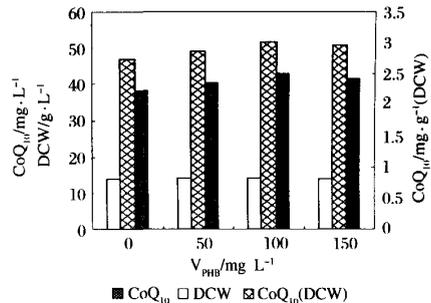
V<sub>B<sub>1</sub></sub> 是影响细胞生长、葡萄糖消耗的最重要因素。V<sub>B<sub>1</sub></sub> 是转酮酶(transketolase)的辅因子,因而也会影响磷酸戊糖途径。当 V<sub>B<sub>1</sub></sub> 处于限制性浓度范围时,糖酵解速度变慢,而增加 V<sub>B<sub>1</sub></sub> 的浓度,磷酸戊糖途径渐被激活,细胞生长和葡萄糖消耗速度加快,可能会间接影响到辅酶 Q<sub>10</sub> 的合成。因此研究了在发酵培养基中添加不同浓度的 V<sub>B<sub>1</sub></sub> 对细胞生长和辅酶 Q<sub>10</sub> 积累的影响,V<sub>B<sub>1</sub></sub> 通过过滤除菌后被加入到发酵培养基中。

图4 添加 V<sub>B<sub>1</sub></sub> 对辅酶 Q<sub>10</sub> 发酵的影响

从图4可以看出,当添加不同量的 V<sub>B<sub>1</sub></sub> 时,与对照组相比,细胞干重略有增加。不同 V<sub>B<sub>1</sub></sub> 的添加量都可以促进辅酶 Q<sub>10</sub> 的合成,当 V<sub>B<sub>1</sub></sub> 添加量为 10 mg/L,对辅酶 Q<sub>10</sub> 合成的影响最为显著,辅酶 Q<sub>10</sub> 产量和细胞内辅酶 Q<sub>10</sub> 含量分别达到 47.8 mg/L 和 3.30 mg/g(DCW),比对照组分别提高了 25% 和 20%。

#### 2.5 添加对羟基苯甲酸对 *R. radiobacter* WSH-E25 辅酶 Q<sub>10</sub> 发酵的影响

辅酶 Q<sub>10</sub> 的生物合成反应前期的一条主要路径是辅酶 Q<sub>10</sub> 苯醌环合成途径,即通过莽草酸途径合成对羟基苯甲酸(*p*-hydroxybenzoate, 简称 PHB)<sup>[17]</sup>。增加前体对羟基苯甲酸的供应量可能会促进辅酶 Q<sub>10</sub> 的合成。因此,考察了不同的对羟基苯甲酸添加量对辅酶 Q<sub>10</sub> 发酵的影响,如图5所示。

图5 添加对羟基苯甲酸对辅酶 Q<sub>10</sub> 发酵的影响

由图5可知,不同浓度 PHB 的添加对细胞生长影响不大,但对辅酶 Q<sub>10</sub> 的合成却有较为明显的促进作用,当 PHB 的添加量为 100 mg/L 时,辅酶 Q<sub>10</sub> 产量和细胞内辅酶 Q<sub>10</sub> 含量分别达到 42.9 mg/L 和 3.02 mg/g(DCW),比对照组分别提高了 12% 和 10%。

### 3 讨论

在放射型根瘤菌 WSH-E25 辅酶 Q<sub>10</sub> 发酵过程中分别添加番茄汁、胡萝卜汁、蛋氨酸、V<sub>B<sub>1</sub></sub> 和对羟基苯甲酸均可明显提高辅酶 Q<sub>10</sub> 的产量。在所试浓度范围内,V<sub>B<sub>1</sub></sub>、胡萝卜汁和蛋氨酸3种添加物最高可使辅酶 Q<sub>10</sub> 产量比对照组分别提高 25%、18% 和 13%。

不同的促进剂对发酵的影响不同,其作用原理可能是影响酶活力,或者促进生长,或者抗氧化或者抗金属离子作用及协同作用等;向培养基中添加前体物质,利用微生物所特有的酶系和特殊的代谢方式,可促进产物的生物转化。不同的前体也具有不同的增产效果。因此对于发酵助剂的选用必须反复探索,包括促进剂或前体种类的选择及适宜用量的确定、添加时间和次数等均需通过试验确定,以提高产量、降低生产成本。

#### 参考文献

- 1 张惠展. 途径工程[M]. 北京:中国轻工业出版社, 2002
- 2 Natori Y, Nagasaki T. Enhancement of Coenzyme Q<sub>10</sub> accu-

- mulation by mutation and effects of medium components on the formation of Coenzyme Q homologs by *Pseudomonas* N842 and mutants[J]. *Agric Biol Chem*, 1981, 45(10): 2 175~2 182
- 3 张延静,袁其朋,梁浩. 酵母细胞中辅酶 Q<sub>10</sub>生物合成途径的研究[C]. 第十届全国生物化学学术会议论文集, 2002. 111~116
- 4 Yoshida H, Kotani Y, Ochiai K. Production of ubiquinone-10 using bacteria[J]. *J Gen Appl Microbiol*, 1998, 44: 19~26
- 5 吴祖芳, 堵国成, 陈坚. 发酵液中辅酶 Q<sub>10</sub>的分离纯化和定量分析[J]. 无锡轻工大学学报, 2002, 21(4): 420~423
- 6 Han YS, van der Heijden R, Verpoorte R. Improved anthraquinone in cell cultures of *Cinchona Robusta* by feeding of biosynthetic precursors and inhibitors [J]. *Biotech Lett*, 2002, 24: 705~710
- 7 欧阳平凯, 胡永红. 辅酶 Q<sub>10</sub>的生产及其应用[J]. 化工进展, 1994(4): 9~11

## Studies on the Promotor of CoQ<sub>10</sub> Fermentation with *Rhizobium radiobacter*

Pan Chunmei<sup>1</sup> Liu Chang<sup>1</sup> Du Guocheng<sup>2</sup>

1(Biotechnology Department, Zhengzhou College of Animal Husbandry Engineering, Zhengzhou, 450011, China)

2(School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi, 214036, China)

**ABSTRACT** The effects of some additives on the growth, the CoQ<sub>10</sub> content and fermentation yield of *Rhizobium radiobacter* were investigated. The results showed that the optimal concentration of tomato juice, carrot juice, methionine, V<sub>B1</sub> and *p*-hydroxybenzoate could obviously enhanced the CoQ<sub>10</sub> accumulation. The CoQ<sub>10</sub> yield was increased by 25% due to 10 mg/L V<sub>B1</sub> in the medium, and 18% due to 30 mL carrot juice added into the 100 mL medium, 13% due to 1 g/L methionine added at 24 h.

**Key words** *Rhizobium radiobacter*, Coenzyme Q<sub>10</sub>, promotor, fermentation

### 仪器信息网“人才频道”全新推出

仪器信息网“人才频道”自 2005 年 4 月改版完成以来, 以全新的页面出现在广大用人单位和求职人员的面前, 更以其全新的服务功能和模式赢得了业界人士的青睐。短短的半年时间里, 在本频道发布的招聘信息和上传的简历均大幅增加, 取得了令人满意的效果。我们相信在大家的共同努力下, 人才频道将真正成为仪器行业最受欢迎的人才交流平台!

现阶段主要服务和功能

| 免费服务                                |                 | 收费服务                 |
|-------------------------------------|-----------------|----------------------|
| 专业人才(免费 VIP 会员)                     | 招聘单位(测试机构)      | 招聘单位(注册厂商)           |
| 1) 可查看所有单位的招聘信息和联系方式                | 在本网免费注册后,       | 成为本网的“协议用户”后, 在招聘期内, |
| 2) 可以上传详细简历, 并随时修改                  | 1) 可任意发布招聘信息    | 1) 可任意发布招聘信息         |
| 3) 上传简历后, 可进行在线应聘                   | 2) 可随时更新、更改招聘信息 | 2) 可随时更新、更改招聘信息      |
| 4) 把感兴趣的职位添加到收藏夹                    | 3) 查看应聘人的简历     | 3) 任意查看仪器信息网简历库      |
| 5) 可定期收到符合自己要求的含有最新职位和用人单位信息的 Email | 4) 收藏满意的简历      | 4) 可以根据具体要求搜索相应的人才   |
|                                     |                 | 5) 收藏满意的简历           |
|                                     |                 | 6) 发布的职位免费收录到《人才快讯》  |

如果您有什么意见和建议, 欢迎随时与我们联系。

☎ 010-51654077-13    ✉ JOB@instrument.com.cn