

放射型根瘤菌辅酶 Q₁₀ 发酵助剂的研究

潘春梅¹ 刘畅¹ 堵国成²

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 研究了几种促进剂和前体对放射型根瘤菌细胞生长及其辅酶 Q₁₀ 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_{B₁} 和对羟基苯甲酸均可明显提高辅酶 Q₁₀ 的产量。在所试浓度范围内, V_{B₁}、胡萝卜汁和蛋氨酸 3 种添加物最高可使辅酶 Q₁₀ 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 Q₁₀, 促进剂, 发酵

采用微生物发酵法生产辅酶 Q₁₀, 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^[1]。目前制约发酵法工业化生产辅酶 Q₁₀ 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 Q₁₀ 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^[2~4]。

本文在前期选育辅酶 Q₁₀ 高产突变株及其发酵条件优化的基础上, 根据辅酶 Q₁₀ 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 Q₁₀ 合成有促进作用的物质, 研究其对辅酶 Q₁₀ 合成的影响, 以期提高辅酶 Q₁₀ 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^r Eth^r) 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 ℃ 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, (NH₄)₂SO₄ 7, 玉米浆 30, KH₂PO₄ 0.4, Na₂HPO₄·12H₂O 1.5, MgSO₄·7H₂O 0.4, pH 7.2, 121 ℃ 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 ℃ 静置培养 24 h; 将活化后的斜面菌种接入种子培养基, 30 ℃, 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 ℃、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 Q₁₀ 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, 用蒸馏水洗涤 2 次, 105 ℃ 烘干至恒重后称重。

1.6 辅酶 Q₁₀ 含量测定^[5]

高压液相色谱(HPLC)法。柱子: SB-C₁₈ 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 ℃, 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 Q₁₀ 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。

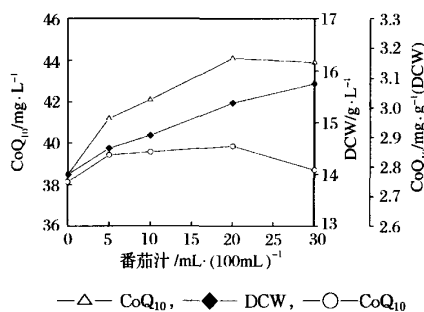


图 1 添加番茄汁对辅酶 Q₁₀ 发酵的影响

随着番茄汁添加量的增加,细胞干重不断增加,但胞内辅酶 Q₁₀ 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 Q₁₀ 的产量。当番茄汁添加量为 20 mL 时,辅酶 Q₁₀ 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^[6]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 Q₁₀ 的生物合成有利。添加番茄汁对细胞生长与辅酶 Q₁₀ 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 Q₁₀ 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。

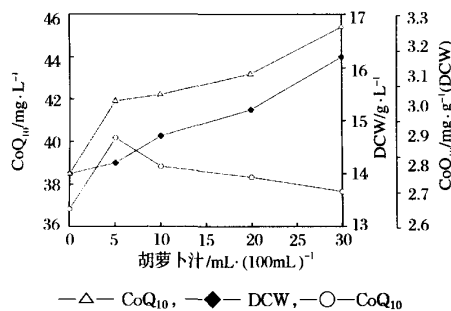


图 2 添加胡萝卜汁对辅酶 Q₁₀ 发酵的影响

随着胡萝卜汁的加入,菌体干重显著增加,辅酶 Q₁₀ 产量也呈上升趋势,其对细胞干重和辅酶 Q₁₀ 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 Q₁₀ 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 Q₁₀ 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 Q₁₀ 含

量反而不断下降,即细胞合成辅酶 Q₁₀ 的能力呈下降趋势。

辅酶 Q₁₀ 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 Q₁₀ 的合成和类胡萝卜素的合成密切相关^[6]。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 Q₁₀ 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 Q₁₀ 合成途径中的小分子前体物质,都有可能有利于辅酶 Q₁₀ 的合成。

2.3 添加氨基酸对 *R. radiobacter* WSH-E25 辅酶 Q₁₀ 发酵的影响

2.3.1 不同氨基酸对辅酶 Q₁₀ 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 Q₁₀ 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 Q₁₀ 合成的影响。

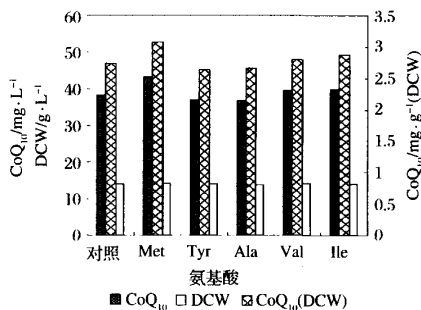


图 3 不同氨基酸对辅酶 Q₁₀ 发酵的影响

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 Q₁₀ 的合成有明显的促进作用外,其他氨基酸对辅酶 Q₁₀ 合成的促进作用不明显。

2.3.2 蛋氨酸及添加方式对辅酶 Q₁₀ 发酵的影响

在辅酶 Q₁₀ 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 Q₁₀ 甲基基团的供体^[1],因而增加前体蛋氨酸的供应量可能会促进辅酶 Q₁₀ 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 Q₁₀ 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 Q₁₀发酵的影响

添加 时间/h	$\rho(\text{Met})$ /mg·L ⁻¹	DCW /g·L ⁻¹	CoQ ₁₀ /mg·g ⁻¹ (DCW)	CoQ ₁₀ /mg·L ⁻¹
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 Q₁₀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 Q₁₀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 Q₁₀产量和细胞内辅酶 Q₁₀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 B₁ 对 R. radiobacter WSH-E25 辅酶 Q₁₀发酵的影响

V_{B₁}是影响细胞生长、葡萄糖消耗的最重要因素。V_{B₁}是转酮酶(transketolase)的辅因子,因而也会影响磷酸戊糖途径。当 V_{B₁}处于限制性浓度范围时,糖酵解速度变慢,而增加 V_{B₁}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 Q₁₀的合成。因此研究了在发酵培养基中添加不同浓度的 V_{B₁}对细胞生长和辅酶 Q₁₀积累的影响,V_{B₁}通过过滤除菌后被加入到发酵培养基中。

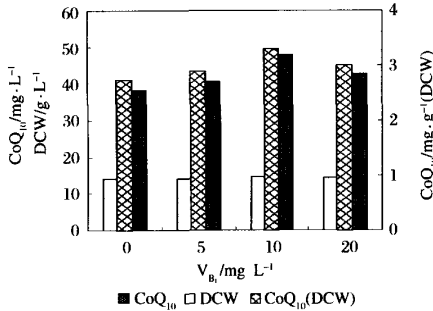


图 4 添加 V_{B₁} 对辅酶 Q₁₀发酵的影响

从图 4 可以看出,当添加不同量的 V_{B₁}时,与对照组相比,细胞干重略有增加。不同 V_{B₁}的添加量都可以促进辅酶 Q₁₀的合成,当 V_{B₁}添加量为 10 mg/L,对辅酶 Q₁₀合成的影响最为显著,辅酶 Q₁₀产量和细胞内辅酶 Q₁₀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 Q₁₀发酵的影响

辅酶 Q₁₀的生物合成反应前期的一条主要途径是辅酶 Q₁₀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)^[17]。增加前体对羟基苯甲酸的供应量可能会促进辅酶 Q₁₀的合成。因此,考察了不同的对羟基苯甲酸添加量对辅酶 Q₁₀发酵的影响,如图 5 所示。

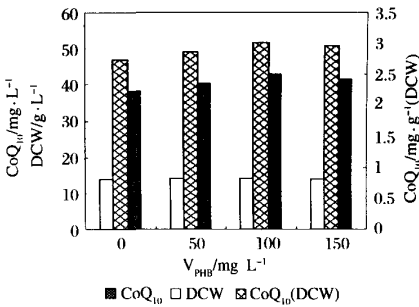


图 5 添加对羟基苯甲酸对辅酶 Q₁₀发酵的影响

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 Q₁₀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 Q₁₀产量和细胞内辅酶 Q₁₀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 Q₁₀发酵过程中分别添加番茄汁、胡萝卜汁、蛋氨酸、V_{B₁}和对羟基苯甲酸均可明显提高辅酶 Q₁₀的产量。在所试浓度范围内,V_{B₁}、胡萝卜汁和蛋氨酸 3 种添加物最高可使辅酶 Q₁₀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 Q₁₀ 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 Q₁₀生物合成途径的研究[C]. 第十届全国生物化工学术会议论文集, 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 Q₁₀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 Q₁₀的生产及其应用[J]. 化工进展, 1994(4): 9~11

Studies on the Promotor of CoQ₁₀ Fermentation with *Rhizobium radiobacter*

Pan Chunmei¹ Liu Chang¹ Du Guocheng²

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 CoQ₁₀ content and fermentation yield of *Rhizobium radiobacter* were investigated. The results showed that the optimal concentration of tomato juice, carrot juice, methionine, V_{B1} and *p*-hydroxybenzoate could obviously enhanced the CoQ₁₀ accumulation. The CoQ₁₀ yield was increased by 25% due to 10 mg/L V_{B1} 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 Q₁₀, 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 2) 可以上传详细简历,并随时修改 3) 上传简历后,可进行在线应聘 4) 把感兴趣的职位添加到收藏夹 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	在本网免费注册后, 1) 可任意发布招聘信息 2) 可随时更新、更改招聘信息 3) 查看应聘人的简历 4) 收藏满意的简历	成为本网的“协议用户”后,在招聘期内, 1) 可任意发布招聘信息 2) 可随时更新、更改招聘信息 3) 任意查看仪器信息网简历库 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