

文章编号 :1009 - 038X(2003)01 - 0065 - 05

放射型根瘤菌 WSH2601 生产辅酶 Q₁₀ 的摇瓶发酵条件

吴祖芳^{1,2}, 堵国成¹, 陈 坚¹

(1. 江南大学 生物工程学院 江苏 无锡 214036 ; 2. 宁波大学 生命科学与生物工程学院 浙江 宁波 315211)

摘 要 :以放射型根瘤菌(*Rhizobus radiobacterium* ,WSH2601)作为辅酶 Q₁₀的生产菌株 ,研究了氮源、碳源、接种量、溶氧、初始 pH、发酵温度及添加物等因素对细胞生长与产物辅酶 Q₁₀合成的影响 .结果表明 :玉米浆和酵母膏是较好的氮源 ,葡萄糖与蔗糖是辅酶 Q₁₀发酵的较好的碳源 ,接种量对辅酶 Q₁₀发酵的影响不大 ,为 4% .适宜的初始 pH 值为 7 ,番茄汁能较好地促进细胞的生长 ,添加玉米浆、L-甲硫氨酸、番茄汁和异戊醇有利于产辅酶 Q₁₀ .溶氧对细胞生长与产物辅酶 Q₁₀合成的影响较显著 .通过正交试验初步确定了发酵条件 :碳源为 1.5 g/dL 葡萄糖和 2.5 g/dL 蔗糖混合物 ,酵母膏 0.8 g/dL ,初始 pH 7 ,每 500 mL 装液量为 50 mL .最后经综合优化条件 ,在摇瓶发酵条件下 ,菌体生长量(以干重计)为 13.8 g/L ,发酵液中辅酶 Q₁₀产量达到 22.7 mg/L ,比优化前分别提高 34 %和 53% .

关键词 :辅酶 Q₁₀ 放射型根瘤菌 ;发酵条件

中图分类号 :TQ 929

文献标识码 :A

Coenzyme Q₁₀ Shaking-flask Culture Conditions by *Rhizobus radiobacterium* WSH2601

WU Zu-fang^{1,2}, DU Guo-cheng¹, CHEN Jian¹

(1. School of Biotechnology , Southern Yangtze University , Wuxi 214036 , China ; 2. Faculty of Life Science and Biotechnology , Ningbo University , Ningbo 315211 , China)

Abstract :Several factors influencing CoQ₁₀ production with *Rhizobium radiobacter* WSH2601 were investigated. The results showed that yeast extract and corn steep liquor are suitable nitrogen sources , and the carbon sources such as glucose and sucrose are favourable for cell growth and CoQ₁₀ accumulation. The inoculum size had no great effect on CoQ₁₀ fermentation. The optimum initial pH for CoQ₁₀ fermentation was 7.0. Dissolved oxygen was an important factor influencing the cell growth and the CoQ₁₀ fermentation. Tomato juice was favourable for the cell growth and addition of corn syrups , L-methionine , isoprenol and tomato juice can enhance the CoQ₁₀ accumulation in the cells. The optimized combination of important fermentation conditions was carried out by orthogonal experiment : carbon sources of glucose 1.5% , sucrose 2.5% , and yeast extract 0.8% . Initial pH was 7 and the volume of medium(medium volume vs flask volume) was 50 mL/500 mL. Under the optimized shaking-flask conditions , the biomass and the CoQ₁₀ concentration reached 13.8 g/L and 22.7 mg/L , respectively , which were 34% and 53% higher than those under original conditions.

收稿日期 2002 - 06 - 07 ; 修回日期 2002 - 09 - 07.

作者简介 :吴祖芳(1963 -)男 ,浙江奉化人 ,副教授 ,发酵工程专业博士研究生.

万方数据

Key words : coenzyme Q₁₀ ; *Rhizobium radiobacter* WSH2601 ; culture conditions

辅酶 Q₁₀又名泛醌,癸烯醌,化学名称是 2,3-二甲氧基-5-甲基-6-癸异戊烯基苯醌,广泛存在于动物、植物及微生物体内,是生物细胞呼吸链中的重要递氢体,也是一种良好的生化药物.在医学上主要用于心脏病、胃肠系统和抗衰老及外科等许多方面疾病的治疗^[1-3].辅酶 Q₁₀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.目前国内辅酶 Q₁₀的生产大多采用提取法或有机合成法.提取法生产受原料来源的限制,有机合成法反应步骤多,产品得率低,并产生许多副产物,且生产成本低,不能满足市场的需求;与其它方法相比,利用微生物发酵法生产辅酶 Q₁₀,具有原料来源丰富、成本低、反应条件温和、易控制等许多优点,可实现工业规模生产.目前国际上利用发酵方法生产辅酶 Q₁₀的国家主要在日本,我国于 20 世纪 80 年代初开始对生物合成辅酶 Q₁₀进行研究和开发,但未见相关文献报道^[3].作者利用放射型根瘤菌 WSH2601 作为生产菌株,对其产生辅酶 Q₁₀的发酵条件进行初步研究,并通过对发酵条件的优化,得到较佳的辅酶 Q₁₀发酵生产条件.

1 材料与方法

1.1 菌种

放射型根瘤菌 (*Rhizobium radiobacter* WSH2601),由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

1.2.1 斜面 and 种子培养基 组分(g/dL):葡萄糖 2,蛋白胨 1,酵母膏 0.5,氯化钠 0.5,斜面培养基另加琼脂 2. pH 7.2,121 ℃灭菌 15 min.

1.2.2 发酵培养基 组分(g/dL):葡萄糖 2,蛋白胨 1,酵母膏 1,KH₂PO₄ 0.05,Na₂HPO₄ 0.15,MgSO₄·7H₂O 0.05. pH 7.0.

1.3 主要仪器设备

U-3000 紫外分光光度计;HP1100 高压液相色谱仪;Zorbax 柱 SB-C18,5 μm,250 mm×4.6 mm;HYG-II 回转式恒温调速摇瓶柜.

1.4 菌种培养方法

1.4.1 菌种活化和种子的制备 试验菌接入斜面培养基活化,30 ℃静置培养 1 d.将活化后斜面菌种接入种子培养基(250 mL 锥形瓶装液量 30 mL),30 ℃培养,摇床转速 200 r/min,24 h 后得到种子

液.

1.4.2 摇瓶培养 取种子培养液以 5%接种量,接入不同发酵培养基(装液量为 500 mL 锥形瓶 50 mL),30 ℃振荡培养(摇床转速 200 r/min),初糖质量浓度和发酵终了时间如无特别说明分别为 2 g/dL和 54 h.

1.5 分析方法

1.5.1 细胞干重的测定 取发酵液(5 mL)经 6 000 r/min 离心 15 min 后倾去上清液,去离子水洗 2 次,菌泥经 80 ℃干燥至恒重后称重.

1.5.2 辅酶 Q₁₀粗提品的制备 发酵液→高速离心分离(转速 6 000 r/min)→冷冻干燥→加入丙酮常温搅拌抽提→离心去除菌体→收集液用旋转蒸发仪浓缩干燥→石油醚萃取→水洗涤,取石油醚层→挥发石油醚→粗品→加少量酒精溶解→待分析^[4].

1.5.3 辅酶 Q₁₀含量的测定 采用高压液相色谱(HPLC)分析法,色谱条件为用甲醇与无水乙醇(体积比为 1:1)作流动相,体积流量为 1.0 mL/min,柱温 30 ℃,在 275 nm 下用 SPD-6A 分光光度计测定吸光值.辅酶 Q₁₀含量($W_{c/B}$)由单位细胞干重(g)所含的辅酶 Q₁₀的质量(mg)表示.

2 结果与分析

2.1 氮源对辅酶 Q₁₀发酵的影响

试验采用的氮源有酵母膏、蛋白胨、玉米浆、氯化铵、硫酸铵和硝酸铵等,用量为有机氮源添加量为 1 g/dL,无机氮源添加量为 0.5 g/dL,培养基中加入不同氮源对菌种生长(生物量)与细胞内辅酶 Q₁₀含量的影响见图 1.

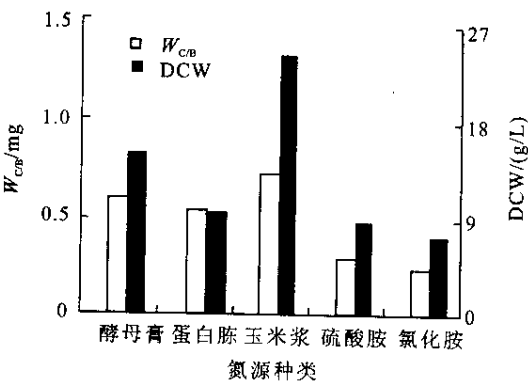


图 1 氮源对细胞生物量和辅酶 Q₁₀合成的影响

Fig.1 Effects of various nitrogen sources on biomass and the CoQ₁₀ production

试验结果表明,在所用氮源中,有机氮源比无机氮源效果好.有机氮源中,玉米浆对细胞生长和产辅酶 Q₁₀效果最好,其次为酵母膏,蛋白胨相对较差;单一的无机氮源对试验菌生长与产辅酶 Q₁₀效果都较差;单一因素有机氮源的不同质量浓度对发酵的影响及无机有机氮源复配对辅酶 Q₁₀发酵效果的影响有待进一步研究.

2.2 碳源对辅酶 Q₁₀发酵的影响

在基础培养基上分别加入葡萄糖、麦芽糖、甲醇、D-果糖、蔗糖、糖蜜、无水乙醇等碳源,添加量均为 1 g/dL,结果见图 2.试验菌种利用碳源广、对菌种生长有较好作用的是葡萄糖、蔗糖和糖蜜;蔗糖具有较好的辅酶 Q₁₀合成量,其次为葡萄糖和糖蜜.

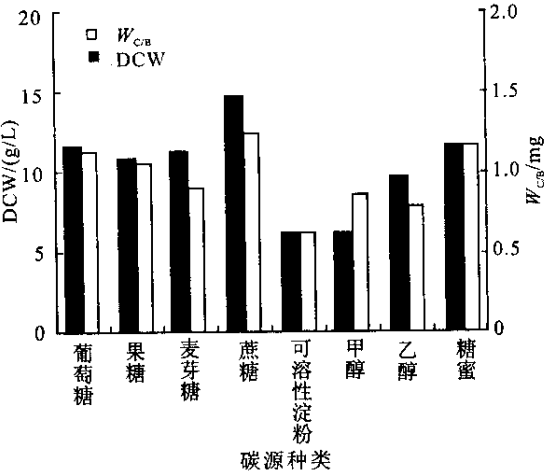


图 2 碳源对细胞生物量和辅酶 Q₁₀合成的影响

Fig.2 Effects of various carbon sources on biomass and the CoQ₁₀ production

2.3 接种量对辅酶 Q₁₀发酵的影响

接种量大小影响试验菌种在发酵培养基中的生长繁殖速度,在 pH 7.0 的发酵培养基中接入种子液,接种量分别为 2%、4%、6% 和 8%,研究接种量对菌体生长和产物形成的影响,结果见图 3.

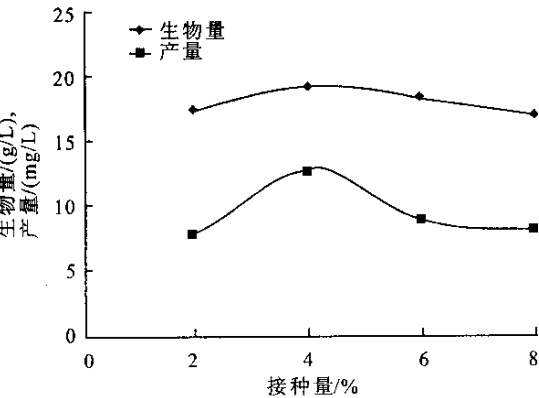


图 3 接种量对细胞生长与辅酶 Q₁₀产量的影响

Fig.3 Effects of various inoculum size on cell growth and the CoQ₁₀ production

在试验的接种量范围内,随着接种量的增加,细胞增加速率随之增大,细胞倍增时间缩短,采用较大的接种量,可缩短发酵延滞期,加快菌体生长;接种量变化在试验误差范围内($P = 0.05$)对菌体生长影响不大,在 3% ~ 5% 接种量范围内,辅酶 Q₁₀产生量差别较大,经综合比较,4% 接种量为最好.

2.4 装液量对辅酶 Q₁₀发酵的影响

摇瓶的不同装液量反映发酵介质的溶氧水平,设计 500 mL 三角瓶发酵培养基装液量分别为 35、45、60、75、90 mL,研究不同溶氧水平下菌体生长与发酵产辅酶 Q₁₀的变化,结果见图 4.在发酵 72 h 内,装液量为 50 mL 时生长速度最快,辅酶 Q₁₀产生量也最大.

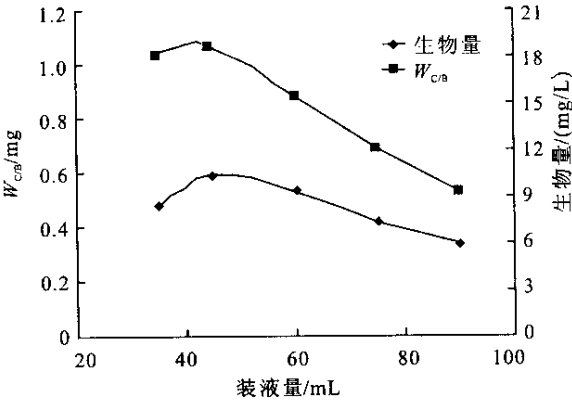


图 4 装液量对细胞生长和辅酶 Q₁₀合成的影响

Fig.4 Effects of various medium volume(medium volume vs flask volume)- dissolved oxygen on cell growth and the CoQ₁₀ production

2.5 初始 pH 值对发酵的影响

初始 pH 值影响菌体对基质的利用速度和细胞的结构状态,以致影响菌体生长速度和代谢产物的变化.调节发酵培养基初始 pH 值分别为 6.0、6.5、7.0、7.5 和 8.5,结果见图 5.初始 pH 值在 7.0 左右时菌体生长最好,此时细胞内辅酶 Q₁₀含量最高.

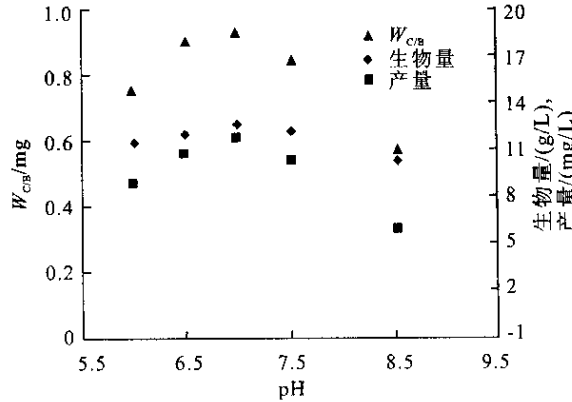


图 5 发酵培养基初始 pH 值对辅酶 Q₁₀发酵的影响

Fig.5 Effects of initial pH on CoQ₁₀ fermentation

2.6 添加物对辅酶 Q₁₀发酵的影响

在发酵培养基中加入适当浓度的营养物质或产物合成的前体物质,如玉米浆(1.0%),番茄汁(新鲜番茄榨汁,按每 100 mL 加量为 2 mL 加入发酵培养基灭菌而成),异戊醇(700 mg/L),L-甲硫氨酸(500 mg/L),VB₂(100 μg/L)和甲醇(5 g/L)等,试验结果见图 6。玉米浆和番茄汁对细胞生长具明显的促进作用,玉米浆、番茄汁、异戊醇、L-甲硫氨酸、VB₂对细胞合成辅酶 Q₁₀具有促进作用,其中玉米浆、L-甲硫氨酸促进作用较明显。

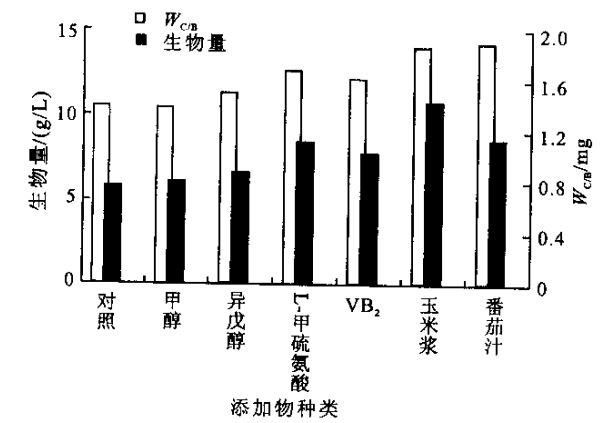


图 6 添加物对辅酶 Q₁₀发酵的影响

Fig.6 Effects of additives on CoQ₁₀ fermentation

2.7 培养温度对辅酶 Q₁₀发酵影响

在 25、30、37℃下分别培养 72 h,测定各培养温度下细胞干重、辅酶 Q₁₀含量(W_{c/B})和产量(见表 1)。结果表明,在试验温度范围内,随着温度的升高,细胞干重明显下降,但辅酶 Q₁₀含量略有提高。综合比较,30℃效果较好,故采用 30℃为辅酶 Q₁₀的发酵温度。

表 1 培养温度对辅酶 Q₁₀发酵的影响
Tab.1 Effect of culture temperature on cell growth and the CoQ₁₀ production

温度/℃	细胞干重/(g/L)	W _{c/B}	CoQ ₁₀ 产量/(mg/L)
25	10.1	988	9.98
30	13.2	1192	15.7
37	7.8	1248	9.7

2.8 正交试验

根据影响发酵效果重要性的因素及它们之间的相互关系,确定以碳源(葡萄糖、蔗糖及复配)、酵母膏、初始 pH 值和装液量进行 L₁₆(4⁴)正交试验,试验因素水平表和方差分析结果见表 2、3,由极差较小的 B 因素作误差项。

表 2 正交试验因素水平
Tab.2 Factors and level by orthogonal experiment

碳源 质量浓度/ (g/dL) A	酵母膏 质量浓度/ (g/dL) B	初始 pH 值 C	装液量/ mL D
葡萄糖 3(1)	0.5(1)	6(1)	35(1)
蔗糖 3(2)	0.8(2)	7(2)	50(2)
葡萄糖与蔗糖各 1.5(3)	1.1(3)	8(3)	65(3)

表 3 正交发酵试验方差分析结果
Tab.3 A result of analysis of variance by orthogonal experiment

方差来源	自由度 DF	平方和 SS	均方 S	F 值	显著性
A	2	76.6	38.3	34.8	**
C	2	2.6	1.3	1.2	
D	2	28.5	14.2	12.9	*
B(误差)	2	2.2	1.1		
Total	8	110			

注: F_{0.1}(2,2)=9.0。

试验结果表明,碳源对生长量及产物合成影响最大,其次为装液量,酵母膏及初始 pH 值在试验条件范围内相对影响较小;由极差(表略)和方差分析结果,最后确定的试验条件为 A₃B₂C₂D₂。对优化条件组合后,经重复发酵试验,得到细胞干重为 13.8 g/L,产量为 22.7 mg/L。

3 结 论

放射型根瘤菌 WSH2601 利用的碳源较广泛,葡萄糖和蔗糖的利用效果较好,其中蔗糖是合成辅酶 Q₁₀较好的碳源,氮源以有机氮源为主,单一无机氮源利用性较差。发酵接种量对菌体生长与产物形成影响不显著。由摇瓶不同装液量试验研究得出,摇瓶装液量对发酵影响较显著。在底物质量浓度满足的条件下,细胞快速生长需一定的溶氧要求,由于细胞生长与辅酶 Q₁₀形成的不同步性,即次级代谢产物的形成在细胞亚生长状态时最大^[5,6],因此在细胞生长稳定期后适当降低溶氧对后期辅酶 Q₁₀的产生有利^[7,8],即溶氧是辅酶 Q₁₀发酵的重要因素。试验菌对 pH 适应性较广,可在 pH 6.4~7.6 范围内较好地生长,细胞内辅酶 Q₁₀的合成量变化不大。辅酶 Q₁₀发酵最适宜 pH 为 7。加适当浓度的辅酶 Q₁₀生物合成途径中的中间产物或辅酶 Q₁₀的直接前体物质,对提高辅酶 Q₁₀含量有一定作用,对比

胡萝卜素代谢途径中聚异二烯长链合成的相似性 , 添加有利于胡萝卜素合成的物质对合成有利^[7]. 实验证明 , 添加番茄汁(含有其中的有效成分)对细胞生长与辅酶 Q₁₀合成的促进作用可能与此有关. 添加物等对辅酶 Q₁₀发酵的影响机理以及从代谢网络分析角度如何调节辅酶 Q₁₀合成的代谢通量是今后研究的重点. 由正交试验结果 , 放射型根瘤菌

WSH2601 采用葡萄糖和蔗糖作复合碳源时 , 细胞生长和产物辅酶 Q₁₀的合成优于单一碳源 ; 在试验质量浓度范围内 , 酵母膏质量浓度增大对菌体生长有利 , 但超过一定质量浓度(0.8 g/dL)后 , 产辅酶 Q₁₀能力下降. 由辅酶 Q₁₀发酵的最佳条件 , 通过几批发酵重复试验 , 细胞干重和辅酶 Q₁₀含量比优化前分别提高了 31% 和 53% .

参考文献 :

[1] 吴祖芳 , 翁佩芳 , 陈坚. 辅酶 Q₁₀的功能研究进展[J]. 宁波大学学报 , 2001 (2) 35 – 88.

[2] Winrow M J , Rudney H. Methods in Enzymology[M]. New York : Academic Press , 1971.

[3] 吴祖芳 , 翁佩芳 , 李寅 , 等. 辅酶 Q₁₀发酵生产的育种思路及发酵条件优化策略[J]. 食品与发酵工业 , 2001 (7) 49 – 53.

[4] 相田浩. 辅酵素 Q₁₀的制造法 , 日本特许公报[P]. 日本专利 昭 57-18869 , 1982-04-19.

[5] Kuratsu Y , Sakurai M , Hagino , *et al.* Aeration-agitation effect on coenzyme Q₁₀ production by *Agrobacterium species*[J]. **J Ferment Technol** , 1984 , 62 : 305 – 308.

[6] Lee M T , Chen W C , Chou C C. Optimization and kinetic analysis of cholesterol oxidase production by *Rhodococcus equi* no.23 in submerged culture[J]. **Enzyme and Microbial Tech** , 1999 , 25 : 598 – 604.

[7] Natori Y , Nagasaki T. Enhancement of coenzyme Q₁₀ accumulation by mutation and effects of medium components on the formation of coenzyme Q homologs by *Pseudomonas* N842 and mutant[J]. **Agric Biol Chem** , 1981 45 : 2175 – 2182.

[8] Yamada Y , Haneda K. Application of fuzzy control system to coenzyme Q₁₀ fermentation[J]. **J Chemical Engineering Japan** , 1991 , 24 94 – 99.

(责任编辑 : 李春丽)

(上接第 55 页)

3 结 论

从大豆胚芽中初步分离到 10 个化合物 , 8 个为异黄酮类化合物 , 分别是黄豆素糖苷、大豆苷元糖

苷、染料木素糖苷、丙二酰黄豆素糖苷、黄豆黄素、大豆苷元、染料木素、染料木素葡萄糖苷 – 6'' – 阿拉伯糖 , 其中化合物 E 为大豆皂苷(另文待发) , 化合物 J 暂不能确定其结构. 通过检索天然产物词典 , 确定化合物 C 在大豆中为首次发现.

参考文献 :

[1] 谷利伟. 大豆胚芽异黄酮与皂苷的研究[D]. 无锡 : 无锡轻工业大学 , 2000.

[2] 宣利江. 植物水溶性成分的研究[D]. 上海 : 中科院上海药物研究所 , 1995.

[3] Efi Farmakalidis , Patricia A Murphy. Isolation of 6''-O-acetylgenistin and 6''-O-acetyl daidzin from toasted defatted soyflak[J]. **J Agric Food Chem** , 1985 33 385 – 389.

[4] Pawan K Agrawal. NMR Spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycoside[J]. **Phytochemistry** , 1992 , 313 3307 – 3330.

[5] 徐德平. 丹贝异黄酮的提取分离与结构鉴定[J]. 食品与发酵工业 , 2001 27(3) : 1 – 3.

[6] Hem Chandra Jha , Fritz Zilliken. Carbon-13-chemical shift assignments of chromones and isoflavones[J]. **CAN CHEM** , 1980 , 58 : 1211 – 1219.