

文章编号:1009-038X(2003)03-0101-04

发酵条件对豌豆根瘤菌细胞生长和辅酶 Q₁₀ 合成的影响

王根华, 钱和*

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘要:以豌豆根瘤菌(*Rhizobium leguminosarum*)1.172.3为研究对象,对影响细胞生长和辅酶 Q₁₀合成的培养条件:温度、pH值、接种量、装液量、收集时间等进行了研究.结果表明:菌株的最适生长条件为 pH值 5.0,温度 30℃,接种量体积分数 2%,装液量 25 mL,培养时间 24 h,辅酶 Q₁₀的合成量最高.

关键词:培养条件;辅酶 Q₁₀;细胞生长

中图分类号:TQ 460.38

文献标识码:A

Effects of Culture Conditions on *Rhizobium leguminosarum* Cell Growth and CoQ₁₀ Production

WANG Gen-hua, QIAN He*

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The culture conditions effecting *Rhizobium leguminosarum* 1.172.3 cell growth and CoQ₁₀ production were studied in this paper. The optimal pH for the cell growth and the formation of CoQ₁₀ was 5.0, and the optimal temperature was 30℃. The optimal culture media fraction(VS flask volume) and inoculum amount were 25 mL/500 mL and 2%, respectively. The highest CoQ₁₀ formation rate occurred at 24 h of the cultivation.

Key words: culture conditions; CoQ₁₀; cell growth

辅酶 Q₁₀(Coenzyme Q₁₀, CoQ₁₀),又称泛醌,是一种类维生素类物质,为脂溶性苯的衍生物.它在自然界中分布广泛,主要存在于酵母、植物叶子和种子及动物的心脏、肝脏和肾脏中^[1,2].辅酶 Q₁₀是细胞呼吸链上的一种递氢体,是细胞自身产生的天然抗氧化剂、细胞代谢激活剂.各种生物均含有一种特有的辅酶 Q,除鼠(辅酶 Q₉)外,脊椎动物均含有辅酶 Q₁₀,人类也含有辅酶 Q₁₀^[1].

国外一般利用合成法或微生物发酵法生产辅

酶 Q₁₀^[3],作者以豌豆根瘤菌 1.172.3 为研究对象,对影响细胞生长和辅酶 Q₁₀合成的培养条件:温度、pH值、接种量、溶氧量、培养时间等进行了研究,其结果报告于后.

1 材料与方法

1.1 菌种和仪器

豌豆根瘤菌(*Rhizobium leguminosarum*)

1.172.3:中国科学院微生物研究所提供.

收稿日期 2002-12-06; 修回日期 2003-02-21.

作者简介:王根华(1977-)男,江苏盐城人,食品科学与工程硕士研究生;*责任作者.

万方数据

HP-1100 高效液相色谱仪:美国安捷伦公司制造.

1.2 主要试剂和培养基

葡萄糖、酵母膏、蛋白胨、焦性没食子酸、石油醚、甲醇等均为生化试剂或分析纯.

1.2.1 种子培养基 组分(g/L):葡萄糖 20,蛋白胨 10,酵母膏 5, $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5, pH 7.0.

将上述培养基 25 mL 装入 500 mL 三角瓶,于柜式旋转摇床在 $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ 下振荡(200 r/min)培养 18 h.

1.2.2 发酵培养基 组分(g/L):葡萄糖 20,胰蛋白胨 10,酵母膏 5, $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5, pH 5.0.

以上培养基均以 10 g/dL 的 NaOH 调节,在 0.08 MPa 下灭菌 10 min.

1.3 实验方法

1.3.1 pH 值对细胞生长及合成辅酶 Q_{10} 的影响 配置不同 pH 值的发酵液(pH 4.0, 5.0, 6.0, 6.5, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0),接入体积分数 2% 的种子培养液,在 $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ 下振荡(200 r/min)培养 24 h,然后分别测定湿菌体质量、辅酶 Q_{10} 的总量及每克湿菌体中辅酶 Q_{10} 的质量.

1.3.2 温度对细胞生长及合成辅酶 Q_{10} 的影响 在 25 mL 的发酵培养基中接入体积分数 2% 的种子培养液,分别在 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36 $^\circ\text{C}$ 下振荡(200 r/min)培养 24 h,然后分别测定湿菌体质量、辅酶 Q_{10} 的总量及每克湿菌体中辅酶 Q_{10} 的质量.

1.3.3 装液量对细胞生长及合成辅酶 Q_{10} 能力的影响 将 500 mL 的培养基按装液量分别为 15, 20, 25, 30, 35, 50 mL 分装到 500 mL 的三角瓶中,在 $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ 下振荡(200 r/min)培养 24 h,然后分别测定湿菌体质量、辅酶 Q_{10} 的总量及每克湿菌体辅酶 Q_{10} 的质量.

1.3.4 接种量对细胞生长及合成辅酶 Q_{10} 能力的影响 分别按照体积分数为 1%, 2%, 3%, 4% 接入种子培养液于装液量为 25 mL 的 500 mL 三角瓶中,在 $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ 下振荡(200 r/min)培养 24 h,然后分别测定湿菌体质量、辅酶 Q_{10} 的总量及每克湿菌体辅酶 Q_{10} 的质量.

1.3.5 菌体收集时间对细胞生长及合成辅酶 Q_{10} 能力的影响 在 25 mL 的发酵培养基中接入体积分数 2% 的种子培养液,在 $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ 下振荡(200 r/min)培养,分别在 20, 22, 24, 26, 28 h 时收集,然后分别测定湿菌体质量、辅酶 Q_{10} 的总量及每克湿菌体辅酶 Q_{10} 的质量.

1.3.6 细胞生长量的测定 将最终发酵液用去离子水稀释 20 倍,在 420 nm 下测定透光率(OD_{420}).

1.3.7 辅酶 Q_{10} 的提取 采用文献[4]的方法进行.将 500 mL 发酵液,在 4 000 r/min 离心 30 min,倾去上清液,得到菌体,用蒸馏水充分洗涤,离心,称量湿菌体质量.将菌体移入 150 mL 圆底烧瓶内,加入 0.7 g/dL 焦性没食子酸,2.5 g KOH,19 mL 甲醇,7 mL 蒸馏水,混匀.在 90 $^\circ\text{C}$ 水浴锅中回流 30 min,用自来水迅速冷却至室温,倒入分液漏斗,加入石油醚 50 mL,剧烈振荡 5 min,萃取辅酶 Q_{10} ,连续萃取 3 次,合并萃取液,用蒸馏水洗涤至中性,加入 5 g 无水硫酸钠,干燥.用真空旋转蒸发器(50 $^\circ\text{C}$)浓缩至干,挥发完全,加入无水乙醇 5 mL,放入冰箱冷冻,析出胆固醇,过滤,无水乙醇定容至 100 mL,待测.

1.3.8 辅酶 Q_{10} 质量的测定 用高效液相色谱(HPLC)测定辅酶的质量^[5].色谱条件:Hypersil ODS 色谱柱,100 mm \times 4.6 mm 不锈钢色谱柱,填料为十八烷基硅烷键合硅胶,直径为 5 μm ;流动相比为 V(甲醇):V(乙醇)=1:2;体积流量 0.8 mL/min;检测波长 275 nm;温度 37 $^\circ\text{C}$;进样量 20 μL .

2 结果与讨论

2.1 pH 值对细胞生长及合成辅酶 Q_{10} 的影响

图 1 为 pH 值对细胞生长及合成辅酶 Q_{10} 的影响.从图 1 可以看出,在 pH 值 5.0~10.0 范围内该菌株能生长,并且出现了 2 个最适生长 pH 值,分别为 5.0 和 9.0;但在酸性条件下比碱性条件下生成的辅酶 Q_{10} 质量高,这说明酸性条件更有利于辅酶 Q_{10} 的生物合成.因此选择豌豆根瘤菌 1.172.3 的最适发酵 pH 值为 5.0.

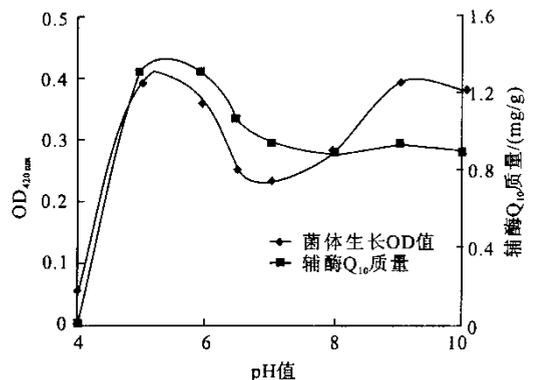


图 1 pH 值对细胞生长及合成辅酶 Q_{10} 的影响

Fig. 1 The effect of pH on the cell growth and the formation of CoQ_{10}

2.2 温度对细胞生长及合成辅酶 Q₁₀ 的影响

图 2 为温度对细胞生长及合成辅酶 Q₁₀ 的影响。从图 2 可以看出, 在 20~30 °C 之间, 随着温度上升, 细胞的生长数量增加, 30 °C 时达到最大, 高于 30 °C 时又逐渐减少, 这说明 30 °C 是该菌株的最适生长温度; 并且在该温度下辅酶 Q₁₀ 的总量也达到了最大, 说明辅酶 Q₁₀ 的合成条件与细胞自身生长是一致的。

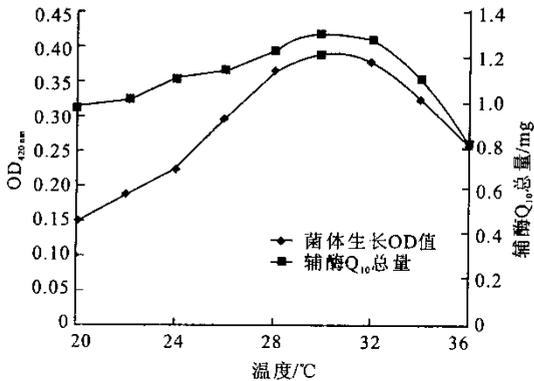


图 2 温度对细胞生长及合成辅酶 Q₁₀ 的影响

Fig.2 The effect of temperature on the cell growth and the formation of CoQ₁₀

2.3 装液量对细胞生长及合成辅酶 Q₁₀ 的影响

图 3 为装液量对细胞生长及合成辅酶 Q₁₀ 的影响。从图 3 可以看出, 随着装液量的增加, 微生物自身生长会变慢, 说明菌株生长是需要氧气的。当装液量大于 25 mL 时, 菌体总量的下降梯度明显增加, 而且辅酶 Q₁₀ 的总量和质量也有同样的趋势。在装液量为 25 mL 时, 每克湿菌体辅酶 Q₁₀ 的质量为 0.133 mg, 而在装液量为 50 mL 时, 辅酶 Q₁₀ 的质量为 0.109 mg。这说明溶氧量不但影响了细胞自身的生长, 同时对辅酶 Q₁₀ 的生物合成影响很大。溶氧量越多, 呼吸系统越发达, 辅酶 Q₁₀ 的含量越多^[6]。

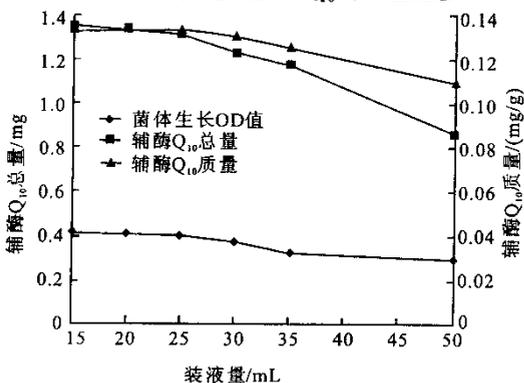


图 3 装液量对细胞生长及合成辅酶 Q₁₀ 的影响

Fig.3 The effect of media amounts on the cell growth and the formation of CoQ₁₀

2.4 接种量对细胞生长及合成辅酶 Q₁₀ 的影响

图 4 为接种量对细胞生长及合成辅酶 Q₁₀ 的影响。从图 4 可以看出, 接种量体积分数在 2% 以内, 随着接种量的增加, 发酵时间在 24 h 以内, 菌体量和辅酶 Q₁₀ 总量会增加。这是因为在接种量体积分数为 1% 微生物发酵 24 h 时还处于对数生长期的后期, 菌体数量还没有达到最大, 此时计算得到辅酶 Q₁₀ 的质量为 1.33 mg/g; 而接种量体积分数为 2% 时, 辅酶 Q₁₀ 的质量为 1.32 mg/g, 而此时菌体数量也达到了最大; 在接种量体积分数为 3% 和 4% 时, 辅酶 Q₁₀ 质量反而下降, 分别为 1.24 mg/g 和 1.18 mg/g。这种现象的原因可能是因为接种量大时, 发酵初期迅速生长, 当发酵 20 h 左右时细胞生长进入了衰败期而造成辅酶 Q₁₀ 质量的下降。另外还对接种量体积分数为 3% 和 4% 的实验进行了进一步研究, 即将发酵时间缩短为 20 h, 此时的菌体生长 OD 值分别为 0.38 和 0.37, 比接种量体积分数为 2% 的 OD 值低。由此可知, 接种量增加的同时还影响到了菌体自身的生长, 因此选择接种量体积分数为 2%。

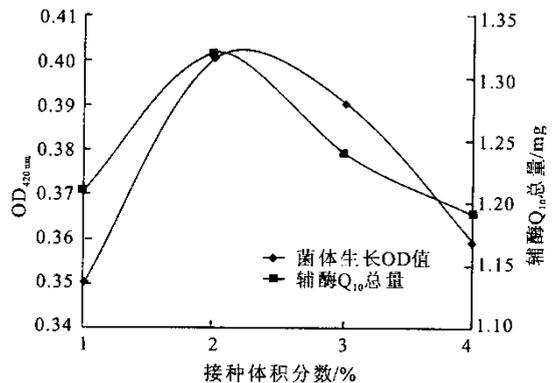


图 4 接种量对细胞生长及合成辅酶 Q₁₀ 的影响

Fig.4 The effect of inoculum amounts on the cell growth and the formation of CoQ₁₀

2.5 菌体收集时间对细胞生长及合成辅酶 Q₁₀ 能力的影响

从图 5 可以看出, 收集时间对细胞生长及合成辅酶 Q₁₀ 的影响很大。菌体数量在 24 h 时达到最大, 并且随着时间的推移而有微量的减少, 但是辅酶 Q₁₀ 的质量变化却很大, 同样在 22 h 达到最大, 并且保持到 24 h, 然后会迅速减少。这可能是因为细胞进入衰败期, 细胞自身的呼吸作用减弱, 从而导致辅酶 Q₁₀ 的质量减少, 这与文献 7 的报道相吻合。

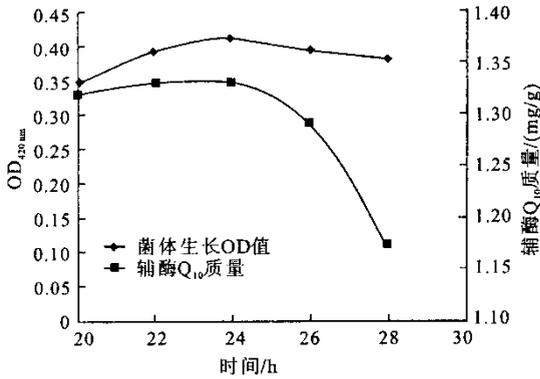


图 5 收集时间对细胞生长及合成辅酶 Q₁₀的影响

Fig.5 The effect of culture time on the cell growth and the formation of CoQ₁₀

3 结 论

豌豆根瘤菌 1.1723 在发酵时, pH 值、温度、装液量、接种量和收集时间均会影响细胞的生长和辅酶 Q₁₀的合成. 研究表明, 酸性条件可以促进微生物合成辅酶 Q₁₀, 这可能是因为酸性条件能够改变细胞膜的通透性, 加强了细胞对物质的吸收, 并且能够改变细胞内呼吸的强度和途径^[8]. 对温度的研究表明, 只有在细胞生长最旺盛时, 辅酶 Q₁₀才能最大限度的合成. 装液量的研究表明, 氧气不但是菌株自身生长所必需的, 而且也是增加辅酶 Q₁₀生物合成的一个有效途径. 接种量与整个发酵进程有着密切的关系. 另外, 发酵时间也是一个不可忽视的重要因素, 当发酵进入衰败期后, 辅酶 Q₁₀的质量会迅速减少.

参考文献:

- [1] Crofts A, Meinhardt S W, Bowyer I R. In Function of Quinones in Energy Conserving Systems[M]. New York: Academic Press, 1982. 477-498.
- [2] Folkers K, Daves G D, Muraca R F. Biomedical and Clinical Aspects of Coenzyme Q[M]. Elsevier Holland, 1977. 316.
- [3] 陈丙治, 赵瑾, 王超杰, 等. 辅酶 Q₁₀的运用和合成进展[J]. 化工进展, 1999(3): 29-33.
- [4] 云南省动植物研究所, 江苏泰州市生物制药厂. 从制备细胞色素 C 的猪心残渣中分离出辅酶 Q₁₀[J]. 医药工业, 1976(2): 22-25.
- [5] 郝苏丽, 吴越, 徐康森. HPLC 法测定辅酶 Q₁₀方法的研究[J]. 中国生化药物杂志, 1998(4): 167-171.
- [6] Sithian Pandian, Goewert C, Jeffrey Sipper, et al. An alternative pathway for the biosynthesis of isopenoid compounds in bacteria[J]. Biochem J, 1981, 194(2): 675-681.
- [7] Lenaz G. Coenzyme Q Biochemistry, Bioenergetics and Clinical Application of Ubiquinone[M]. New York: A Wiley Interscience Publication, 1984. 33-47.
- [8] 陈因良, 陈志红. 细胞培养工程[M]. 上海: 华东化工学院出版社, 1992. 265-367.

(责任编辑 杨 勇)