

文章编号: 1673-1689(2010)02-0302-05

酵母转化茄尼醇生成辅酶 Q₁₀ 的超临界 CO₂ 体系条件

肖霄, 倪元颖, 李淑燕, 胡锦涛, 张京声, 孙君社, 刘萍^{*}

(中国农业大学 食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要: 超临界 CO₂ 作为非水相介质对酵母转化茄尼醇生成辅酶 Q₁₀ 的底物和产物具有良好的溶解作用, 但对微生物的存在会产生一定影响, 选择合适的超临界 CO₂ 体系条件有利于辅酶 Q₁₀ 产量的提高。通过研究超临界 CO₂ 流体的压强、酵母细胞在超临界 CO₂ 流体中的反应时间、添加介质种类以及添加量等条件对粟酒裂殖酵母细胞活性和辅酶 Q₁₀ 产量的影响, 确定对酵母细胞生存影响较小并显著促进辅酶 Q₁₀ 生产的超临界 CO₂ 体系条件为: 超临界 CO₂ 压强为 10.5 MPa, 反应时间为 16 h, 向菌体中添加菌体湿重 3 倍的培养基, 超临界 CO₂ 流体中辅酶 Q₁₀ 的产量达到 55.71 μg/mL。比液体深层发酵培养辅酶 Q₁₀ 产量提高 97.5%。研究表明, 通过优化酵母转化茄尼醇生成辅酶 Q₁₀ 的超临界 CO₂ 体系条件, 可以显著提高酵母细胞生成辅酶 Q₁₀ 的能力。

关键词: 超临界 CO₂ 流体; 菌体活性; 辅酶 Q₁₀; 茄尼醇; 体系条件

中图分类号: TQ 464.8

文献标识码: A

Supercritical CO₂ Conditions of CoQ₁₀ Biotransformation from Solanesol by *Schizosaccharomyces pombe*

XIAO Xiao, NI Yuan-ying, LI Shu-yan, HU Jin-rong, ZHANG Jing-sheng,
SUN Jun-she, LIU Ping^{*}

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: Supercritical CO₂ (scCO₂) as non-aqueous media could well dissolve substrates and products of coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀) biotransformation reaction from solanesol, but it also had effects on microbial activity, so appropriate scCO₂ conditions could improve CoQ₁₀ yield. The effects of scCO₂ on the catalytic activity of *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) and CoQ₁₀ yield in different conditions were studied. The appropriate scCO₂ conditions which could significantly promote the production of CoQ₁₀ and could have little negative effects on the cells survival was; triple of cells' wet weight of culture medium was added into the reaction system., kept the pressure at 10.5 MPa for 16 h, the production of CoQ₁₀ is 55.71 μg/mL, improved 97.5%. The results showed that optimization of scCO₂ reaction system conditions could significantly improve the production of CoQ₁₀.

Key words: supercritical carbon dioxide, cells activity, CoQ₁₀, solanesol, conditions

收稿日期: 2009-03-15

基金项目: 北京市自然科学基金项目(5062022)。

^{*}通信作者: 刘萍(1970-), 女, 吉林省吉林市人, 工学博士, 副教授, 主要研究方向为发酵工程和生物制药。

Email: liuping@cau.edu.cn

©1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

辅酶 Q₁₀ (CoQ₁₀) 是呼吸链上一个脂溶性的辅酶, 参与呼吸链中的电子和质子传递, 且其还原型醌环结构可以有效地清除自由基, 被广泛地应用于医药、食品添加剂等领域^[1]。茄尼醇与辅酶 Q₁₀ 的侧链——异戊二烯焦磷酸在结构上有一定的相似性, 这为茄尼醇作为前体物质实现 CoQ₁₀ 的微生物转化提供了理论基础^[2-3]。作者所在的研究组前期研究发现, 利用生物转化法可以将茄尼醇直接转化为 CoQ₁₀, 但由于茄尼醇不溶于水, 限制了其进入酵母细胞, 显著影响该物质的转化率, 而生成的产物辅酶 Q₁₀ 也微溶于水, 产物在细胞内的积累显著地抑制其产量的进一步提高。超临界 CO₂ 流体具有良好的溶解能力和传质特性, Compton 等^[4] 在超临界流体中进行了皱褶假丝酵母 (*Candidarugosa*) 脂肪酶催化胆甾醇和乙烯乙酸酯的转酯化反应研究, 胆甾醇在超临界乙烷中的溶解度提高了 600 多倍。因此超临界 CO₂ 流体可以一定程度上缓解反应的产物抑制作用, 但超临界 CO₂ 流体对微生物的发酵过程产生的影响说法不一^[5-9]。有关粟酒裂殖酵母在超临界体系中的存活及其转化茄尼醇生产辅酶 Q₁₀ 的情况在国内外未见报道, 本研究结果可为辅酶 Q₁₀ 的生产提供新的方法。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyce spomb*) 2·1794, 原菌种购自中科院微生物所, 经作者所在研究室紫外联合亚硝基胍诱变获得能够转化茄尼醇生成 CoQ₁₀ 的菌株 *S. promb* B₂·1794-23。HA121-50-02 超临界设备购自江苏南通华安超临界萃取公司, 反应釜体积为 5 L。CO₂ (纯度 99.99%) 购自北京京城气体。Agilent A1200 液相色谱系统购自安捷伦公司, 配有 SPD 紫外检测器。

1.2 主要培养基

种子活化培养基 (组分 g/dL): 葡萄糖 2, 蛋白胨 2, 酵母浸提物 1; pH 6.0。

发酵培养基 (组分 g/dL): 葡萄糖 1.5, 蔗糖 1.5, 蛋白胨 1.0, 酵母膏 1.0, MgSO₄ 0.01, K₂HPO₄ 0.01, KH₂PO₄ 0.01; pH 5.0。

1.3 菌体培养物的制备

将粟酒裂殖酵母 *S. promb* B₂·1794-23 接于种子培养基中, 在 28℃ 下, 以 160 r/min 振荡培养 18 h 至对数生长期, 以体积分数 10% 的接种量将种子接入 100 mL 发酵培养基 (装于 250 mL 三角瓶), 28℃ 条件下以 160 r/min 振荡培养 18 h 至对数生长期。

将上述所得发酵液分别装入编好序号的 50 mL 离心管中, 每管 30 mL, 以 4 000 r/min 离心收集菌体, 用生理盐水洗涤 2 次, 滤纸上倒置 10 s, 称重。

1.4 细胞存活率的测定方法

血球计数板结合美兰染色法。

1.5 辅酶 Q₁₀ 的提取及检测方法

从超临界 CO₂ 体系中取出的细胞, 用生理盐水洗涤一次, 以 4 000 r/min 离心收集菌体, 每管中加入 10 mL pH 6.0、0.1 mol/L 的磷酸缓冲液, 加入 15 μL β-巯基乙醇, 37℃ 下置于 220 r/min 摇床反应 1 h; 然后每管中加入质量分数 2% 的蜗牛酶, 相同条件摇床中反应 3 h。将每管离心收集菌体, 加入 10 mL 丙酮, 涡旋混匀后冰浴超声破碎细胞, 超声功率 300 W, 超声 5 s, 间歇 6 s, 超声 60 次。破碎后以 4 000 r/min 离心, 将上清液倒入圆底烧瓶中真空旋转蒸发, 用 5 mL 无水乙醇定容待测。HPLC 检测条件: 色谱柱为 150 mm×4.6 mm, 直径为 5 μm 的 Agilent C₁₈ 柱, 流动相为无水 V_{乙醇}: V_水 = 98:2, 流速 1 mL/min, 检测波长 275 nm, 进样量 20 μL, 柱温 28℃。

2 结果与讨论

2.1 超临界 CO₂ 条件下反应时间对辅酶 Q₁₀ 产生菌活性以及辅酶 Q₁₀ 产量的影响

在超临界设备反应釜内放入收集到的菌体, 在温度为 31℃、压强为 7.5 MPa 条件下, 分别保压 1、3、5、8、16、19 h 后, 按 0.25 MPa/min 的速度卸压 (以此速度卸压可能导致细胞破裂, 但由于卸压时预期转化过程已结束, 因此不影响所考察过程的结果), 测得菌体细胞存活率和辅酶 Q₁₀ 产量。结果表明, 在 19 h 内, 细胞存活率变化不大, 仅在 1~3 h 及 16~19 h 时存活率略低于 5~16 h, 这可能由于前 3 个小时是细胞适应高压厌氧环境的过程, 16~19 h 由于长时间处于超临界 CO₂ 高压厌氧环境中, 细胞中积累的营养物质被迅速消耗, 一些代谢酶活性降低, 导致部分细胞死亡, 且活细胞的繁殖能力有所下降, 因此导致细胞存活率降低。1~16 h 辅酶 Q₁₀ 产量一直呈上升趋势, 前 5 小时上升速率较快, 可能由于 1~3 h 细胞处于适应高压厌氧环境的阶段, 在胁迫环境中会生成大量辅酶 Q₁₀ 用于保护线粒体呼吸链^[7-8]。3 h 后, 细胞度过适应期并大量繁殖, 因此辅酶 Q₁₀ 迅速积累, 在 16 h 时达到 42.36 μg/mL。16 h 后辅酶 Q₁₀ 产量开始下降, 可能由于细胞总数、细胞存活率及部分代谢酶活性都在下降而导致, 见图 1。

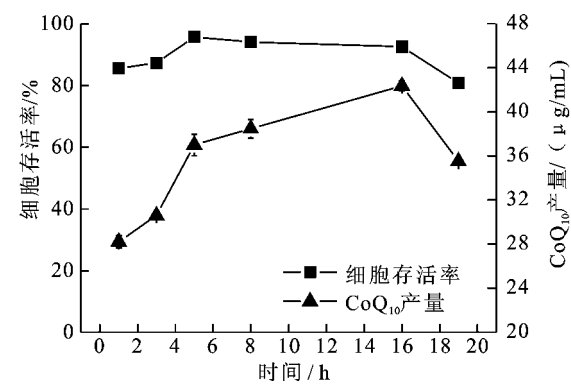


图 1 反应时间对细胞存活率及辅酶 Q₁₀ 产量的影响
Fig.1 Effects of reaction time in scCO₂ on cells survival and CoQ₁₀ yield

2.2 超临界 CO₂ 压强对辅酶 Q₁₀ 产生菌活性以及辅酶 Q₁₀ 产量的影响

将收集到的细胞放入 31℃超临界 CO₂ 体系下,分别在压强为 7.5、9、10.5、13.5 MPa 时保压反应 8 h,按 0.25 MPa/min 的速度卸压,然后测定菌体细胞存活率和辅酶 Q₁₀ 产量。结果见图 2。

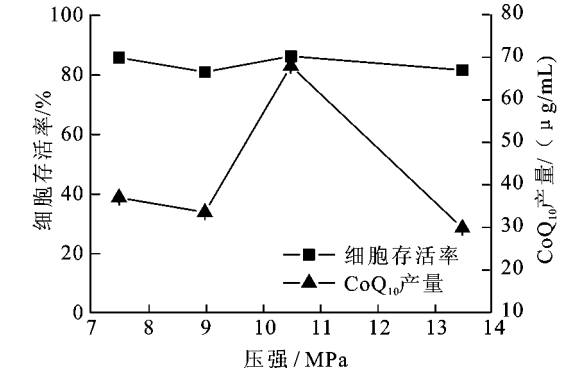


图 2 超临界 CO₂ 压强对细胞存活率及辅酶 Q₁₀ 产量的影响
Fig.2 Effects of reaction pressure in scCO₂ on cells survival and CoQ₁₀ yield

细胞存活率随压强没有明显变化,可能是在 31℃条件下,压强达到 7.5 MPa 以上,CO₂ 都以超临界流体的形式存在,对细胞存活影响的差异不大。Debs-Louka 等人^[9]以粪链球菌、啤酒酵母、埃希氏大肠杆菌 3 种微生物为研究对象,发现 3 种微生物的失活速度在 3.5 MPa 以下对压强的变化不敏感。Lin H-M 等人发现不同微生物细胞对 CO₂ 作用的抵抗力不同,这可能由于不同微生物的细胞壁、细胞膜特性不同,对 CO₂ 分子的透过性不同。在压强低于 13.5 MPa 时,栗酒裂殖酵母细胞对压强变化不敏感,细胞存活率维持在 80%~86%。辅酶 Q₁₀ 产量在压强为 10.5 MPa 时达到最大,可能由于在 10.5 MPa 条件下,超临界 CO₂ 流体对辅酶 Q₁₀ 的溶解性较好,能更好的消除产物抑制作用,利于辅酶

Q₁₀ 的生成,且在此压强下细胞存活率为 86%,说明大部分细胞可以保持良好的生理活性,因此选择超临界 CO₂ 体系的压强为 10.5 MPa 时进行反应。

2.3 超临界 CO₂ 体系中反应介质种类及添加量对辅酶 Q₁₀ 产生菌活性以及辅酶 Q₁₀ 产量的影响

在收集的菌体中分别加入每管菌体湿重 1~4 倍的蒸馏水、生理盐水、培养基作为反应介质,将其放在超临界设备反应釜内,在温度 31℃、压强 7.5 MPa 条件下保持不同时间后,按 0.25 MPa/min 的速度卸压,测得菌体细胞存活率和辅酶 Q₁₀ 产量,结果见图 3。

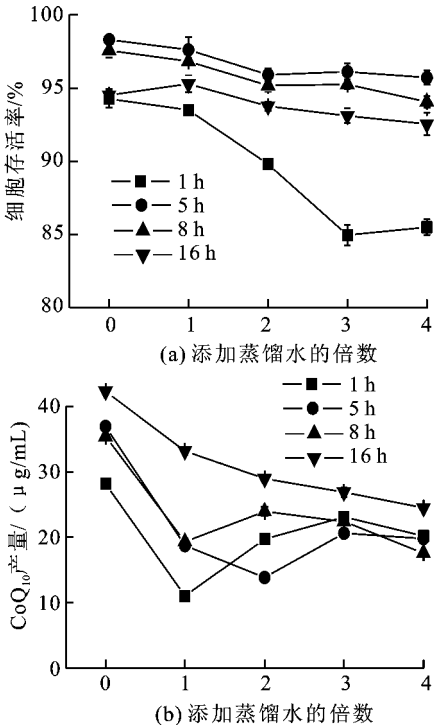


图 3 不同反应时间下蒸馏水添加量对细胞存活率及辅酶 Q₁₀ 产量的影响
Fig.3 Effects of distilled water in scCO₂ on cells survival and CoQ₁₀ yield

随着蒸馏水添加量的增加,细胞存活率与辅酶 Q₁₀ 产量都大致呈下降趋势,在 1、5、8 h 时,辅酶 Q₁₀ 产量虽有波动,但总体都低于未添加蒸馏水的样品。由此说明,在该超临界 CO₂ 体系下,添加蒸馏水不利于菌体保持活性,并相应使辅酶 Q₁₀ 产量减少。原因可能是在超临界状态下含水量增大对细胞膜透性有一定影响,CO₂ 较容易通过细胞膜,进入菌体内,导致细胞内的 pH 值下降和酶失活。

在 1 h 和 16 h 条件下,细胞存活率随着生理盐水添加量的增加呈略微下降趋势;在 5 h 和 8 h 条件下,分别在添加 3 倍和 1 倍质量的生理盐水时,细胞存活率略有升高。在辅酶 Q₁₀ 产量方面,与对照未添加生理盐水的样品相比,8 h 添加 2 倍生理盐

水时, 辅酶 Q₁₀ 产量有较大幅度提高, 1 h 和 5 h 影响不明显, 16 h 虽然在添加 3 倍生理盐水时与其他添加量有明显提高, 但比对照未添加生理盐水时作用不明显。出现上述结果的原因可能是在超临界条件下, 生理盐水中的钠离子和氯离子在细胞生命代谢中起重要作用, Na⁺ 影响细胞内外的渗透压和电化学梯度平衡, 刺激代谢产物 H⁺ 释放到胞液中, 改变细胞内外局部的 pH 值, 影响相关酶活, 见图 4。

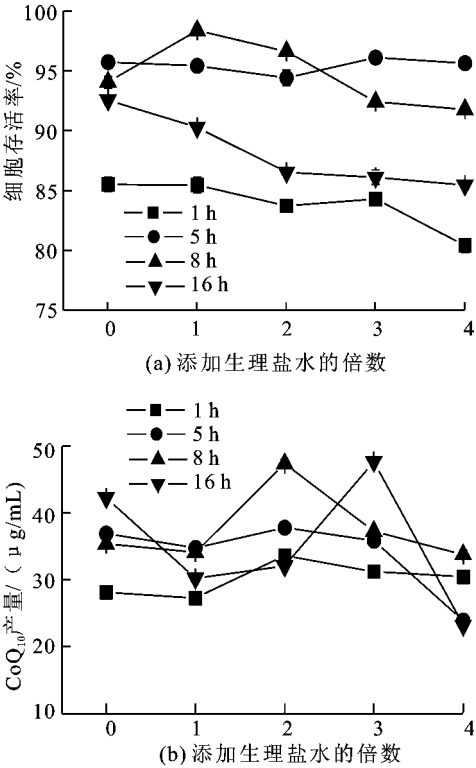


图 4 不同反应时间下生理盐水添加量对细胞存活率及辅酶 Q₁₀ 产量的影响

Fig. 4 Effects of normal saline in scCO₂ on cells survival and CoQ₁₀ yield

在 1 h 条件下, 细胞存活率随着培养基添加量的增加缓慢降低, 辅酶 Q₁₀ 产量基本保持平稳; 5 h 和 8 h 条件下添加 1 倍培养基, 细胞存活率略高于其他培养基添加量条件, 辅酶 Q₁₀ 产量都随培养基添加量升高呈下降趋势后又明显升高。16 h 添加 1 倍培养基时, 细胞存活率明显下降, 之后随添加量增加变化不大, 辅酶 Q₁₀ 产量在添加 1 倍培养基时亦明显下降, 添加 3 倍培养基时达到最高, 为 55.71 μg/mL。图 5 可能由于细胞在放入超临界 CO₂ 体系较短时间内, 未能适应环境变化, 另外细胞培养过程中贮存的营养物质还未被消耗掉, 所以培养基中营养物质对保持其活性的作用不大。随着反应时间的增长, 细胞体内原有的营养物质被消耗, 需要培养基补充保持活性和生产辅酶 Q₁₀ 所需营养物质。

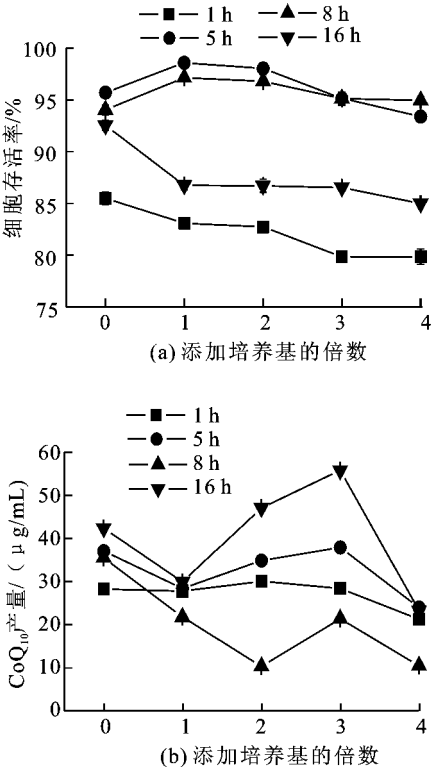
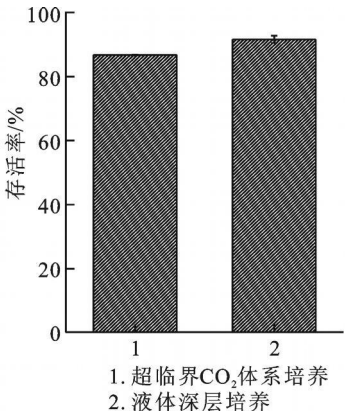


图 5 不同反应时间下培养基添加量对细胞存活率及辅酶 Q₁₀ 产量的影响

Fig. 5 Effects of culture medium in scCO₂ on cells survival and CoQ₁₀ yield

2.4 超临界 CO₂ 体系与液体深层培养对辅酶 Q₁₀ 产生菌活性以及辅酶 Q₁₀ 产量的影响

将收集到的菌体中加入菌体湿重 3 倍的培养基, 一组放入摇床中于 28 °C 条件下, 以 160 r/min 振荡培养 16 h; 另外一组放入超临界设备反应釜内, 在 31 °C、压强 7.5 MPa 条件下保持 16 h。将两组取出后测定细胞存活率和辅酶 Q₁₀ 产量, 结果见图 6。液体深层培养的酵母细胞存活率略高于超临界 CO₂ 体系, 差异不明显, 但超临界 CO₂ 体系中的辅酶 Q₁₀ 产量比液体培养高出 97.5%, 证明经过优化后的超临界 CO₂ 体系条件可以明显地促进辅酶 Q₁₀ 产量的提高。



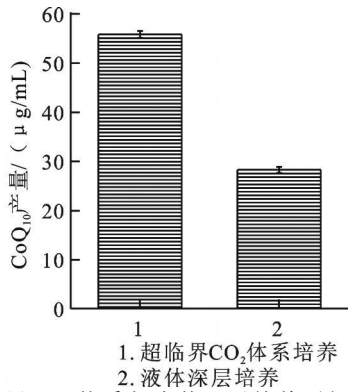


图 6 超临界 CO₂ 体系与液体深层培养对细胞存活率及辅酶 Q₁₀ 产量的影响

Fig. 6 Effects of scCO₂ and liquid submerged culture on cells survival and CoQ₁₀ yield

3 结 语

超临界 CO₂ 条件下, 添加合适的介质如生理盐水和培养基将有利于细胞的存活和辅酶 Q₁₀ 的生成。有利于粟酒裂殖酵母转化茄尼醇生成辅酶 Q₁₀ 的超临界 CO₂ 条件是: 压强 10.5 MPa、反应时间 16 h, 添加湿菌体质量 3 倍的培养基, 辅酶 Q₁₀ 产量比液体深层培养提高了 97.5 %。

参考文献(References):

[1] 廖满媛, 闫红, 李佩衍. 辅酶 Q₁₀ 的合成研究进展[J]. 北京工业大学学报, 2002, 28(2): 155—159.
LIAO Man-yuan, YAN Hong, LI Pei-yan. Progress of research on CoQ₁₀ synthesis[J]. **Journal of Beijing Polytechnic University**, 2002, 28(2): 155—159. (in Chinese)

[2] Compton D L, King J W. Lipase-catalyzed synthesis of triolein-based sunscreens in supercritical CO₂[J]. **J Am Oil Chem Soc**, 2001, 78 (1): 43—48.

[3] Wei C L, Balaban M O, Fernando S Y et al. Bacterial effect of high pressure CO₂ treatment on foods spiked with *Listeria* or *Salmonella*[J]. **J Food Prot**, 1991, 54(3): 189—193.

[4] 叶盛英, 丁德坤, 宋贤良, 等. 不同参数超临界 CO₂ 对乳酸菌活性的影响[J]. 农业工程学报, 2007, 23(2): 218—222.
YE Sheng-ying, DING De-kun, SONG Xian-liang, et al. Effects of different parameters of supercritical CO₂ treatment on the microbial activity of *Lactobacillus*[J]. **Transactions of the CSAE**, 2007, 23(2): 218—222. (in Chinese)

[5] LIN Ho-mu, YANG Zhi-ying, CHEN Li-fu. Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* by supercritical and subcritical carbon dioxide[J]. **Biotechnol Prog**, 1992, 8 : 458—461.

[6] 陈坚, 堵国成, 卫功元, 等. 微生物重要代谢产物[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 149—150.

[7] 黄建华, 邱然, 杨文洲, 等. 金属离子对啤酒酵母发酵中生成乳酸的影响[J]. 食品科技, 2007, 7: 122—124.
HUANG Jian-hua, QIU Ran, YANG Wen-zhou, et al. Effect of metal ions on lactic acid during yeast metabolism[J]. **Food Science and Technology**, 2007, 7: 122—124. (in Chinese)

[8] 管敦仪. 啤酒工业手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998: 144.

[9] 袁静, 魏泓. 微生物发酵生产 CoQ₁₀ 的研究进展[J]. 氨基酸和生物资源, 2004, 26(1): 53—56.
YUAN Jing, WEI Hong. Recent progress of ubiquinone-10 production by microbial fermentation[J]. **Amino Acids and Biotic Resources**, 2004, 26(1): 53—56. (in Chinese)

(责任编辑: 李春丽)