

## 通过耐受前体或结构类似物筛选提高辅酶 Q<sub>10</sub> 产量

李继扬 丁妍 周珮<sup>△</sup>

(复旦大学药学院生物合成教研室 上海 200032)

**【摘要】** 目的 提高热带假丝酵母生产辅酶 Q<sub>10</sub> 的能力。方法 将热带假丝酵母通过紫外诱变后耐受生物合成前体物质或结构类似物的实验,从抗性菌株中筛选获得辅酶 Q<sub>10</sub> 的高产菌株。结果 通过苯甲酸和对羟基苯甲酸的耐受试验,获得辅酶 Q<sub>10</sub> 产量比出发株分别提高 84.11% 和 184% 的高产菌株 A 和 B,最高可达 120 μg/mL。结论 通过发酵产物前体结构类似物的耐受实验,可以提高产物的产量。

**【关键词】** 辅酶 Q<sub>10</sub>; 热带假丝酵母; 苯甲酸; 对羟基苯甲酸; 菌种选育

**【中图分类号】** TS 201.3 **【文献标识码】** A

### Promotion of coenzyme Q<sub>10</sub> productivity through tolerating high concentration of precursor and structure analogy

LI Ji-yang, DING Yan, ZHOU Pei<sup>△</sup>

(Department of Biosynthesis Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 200032, China)

**【Abstract】** **Objective** To promote the coenzyme Q<sub>10</sub> productivity of candida tropicalis. **Methods** candida tropicalis was used as the starting strain and subjected to UV-radiation. On the basis of feedback regulation mechanism for coenzyme Q<sub>10</sub> synthesis pathway, a high productivity coenzyme Q<sub>10</sub> mutant screening method was set up. Mutants were specifically screened with high concentration coenzyme Q<sub>10</sub> precursor p-hydrobenzoic acid and benzoic acid. **Results** The final coenzyme Q<sub>10</sub> yield of the mutant reached 120 μg/mL, which was 2.84 times higher than that of the original strain. **Conclusions** The high concentration biosynthetic precursor can promote the coenzyme Q<sub>10</sub> productivity.

**【Key words】** coenzyme Q<sub>10</sub>; candida tropicalis; benzoic acid; p-hydrobenzoic acid; breeding

辅酶 Q<sub>10</sub> 又名泛醌、癸烯醌 (Coenzyme Q<sub>10</sub>、Ubiquinone-10, 简称辅酶 Q<sub>10</sub>), 是一类脂溶性醌类化合物, 化学名称 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<sup>[1]</sup>, 也是人体不可缺少的重要辅酶, 能作为代谢活性剂激活细胞呼吸, 加速呼吸链的产能过程; 它还是某些细胞自身产生的天然抗氧化剂, 能抑制线粒体的过氧化, 保护生物膜的结构完整。在医学上主要用于心脏病、胃肠系统和抗衰老及外科等疾病的治疗, 对心脏、肝脏和肾有良好的保健作用, 可预防动脉硬化、中风和高血压, 保持牙龈健康和防治癌症<sup>[1-3]</sup>。辅酶 Q<sub>10</sub> 的一个重要特点是无毒副作用, 因此在医学上可作为一种多功能性的生化药物, 在临床中有着广泛的用

途, 日益受到重视。

辅酶 Q<sub>10</sub> 的制备方法主要有以下 3 种: 动植物组织提取法、化学合成法和微生物发酵法。我国于 20 世纪 80 年代初开始对微生物发酵生产辅酶 Q<sub>10</sub> 进行研究和开发, 但目前国内发酵法生产辅酶 Q<sub>10</sub> 的产量远远不能满足市场需求。虽然目前国内研究报告中能生产辅酶 Q<sub>10</sub> 的菌种很多, 但产量大多集中在 20 μg/mL 左右<sup>[4]</sup>, 个别达到 80 μg/mL<sup>[5]</sup>。由于辅酶 Q<sub>10</sub> 合成途径复杂, 受多基因调控, 构建辅酶 Q<sub>10</sub> 基因工程高产菌至今未见具有突破性进展的报道<sup>[6]</sup>。本实验以辅酶 Q<sub>10</sub> 含量较高的热带假丝酵母为出发菌株, 建立了辅酶 Q<sub>10</sub> 高产突变菌株高效筛选模式, 该法能较大幅度地提高辅酶 Q<sub>10</sub> 的发酵产量, 从而解决微生物发酵法生产辅酶 Q<sub>10</sub> 菌种发酵

<sup>△</sup>Corresponding author E-mail: pz19444@yahoo.com.cn

产量低的工业化难题。

## 材料和方法

**试剂** 辅酶 Q<sub>10</sub> 标准品(上海 Amadis 生物技术公司赠送,纯度为 99.2%);苯甲酸(上海化学试剂公司);对羟基苯甲酸(上海化学试剂公司),其他为化学纯。

**菌种** 热带假丝酵母 *Candida tropicalis* (原种购于中国科学院微生物菌种保藏中心,经过本室选育)。

**仪器** 紫外分光光度(UNICO UV 2000)。

### 培养基

斜面培养基 PDA 培养基。

种子培养基 葡萄糖 2.0%、蛋白胨 1.0%、酵母粉 0.5%,自然 pH,121 °C 灭菌 25 min。

发酵培养基 葡萄糖、蛋白胨、酵母粉、无机盐, pH 8.0, 121 °C 灭菌 25 min。

**标准曲线的绘制** 精密称取辅酶 Q<sub>10</sub> 标准品,用无水乙醇配成 0.62 mg/mL 的母液,再稀释成 0.006 2、0.012 4、0.018 6、0.024 8、0.031 0 和 0.0372 mg/mL 不同质量浓度的辅酶 Q<sub>10</sub> 标准溶液。据不同质量浓度辅酶 Q<sub>10</sub> 标准溶液在 275 nm 处的吸光度绘制标准吸收曲线。

**菌悬液的制备** 将热带假丝酵母斜面种接入种子培养液中,30 °C 振荡培养 24 h,使其处于对数生长期,离心收集菌体,用 0.1 mol/L 的 pH7.0 的磷酸缓冲液洗涤 3 次,并制备成细胞浓度为 10<sup>6</sup> 个/mL 的菌悬液,另取 1 mL 稀释至 10<sup>3</sup> 个/mL,作为计算致死率的空白对照。

**紫外(UV)诱变方法** 分别取细胞浓度为 10<sup>6</sup> 个/mL 的菌悬液 2 mL 至平皿中,在功率为 20 W 的紫外灯下,距离 30 cm 处进行紫外照射,分别处理 30、45、60、75、90、120 s(磁力搅拌),各取 0.3 mL 涂布于 PDA 平板中,避光操作,30 °C 培养,参照空白对照计算致死率。

**抗性菌株的选育** 取紫外诱变后辅酶 Q<sub>10</sub> 产量最高的微生物进行斜面培养后,用 0.1 mol/L 的 pH 7.0 的磷酸缓冲液稀释成细胞浓度为 10<sup>6</sup> 个/mL 的菌液,取 1 mL 接种于 3 mL 2 倍浓度的液体培养基中,分别加入无菌过滤的 10% 苯甲酸 0.1、0.3、0.5、0.7、0.9、1.1、1.3 mL,用无菌水定容至 6 mL,同时做不加 10% 苯甲酸和菌液的对照组。28 °C 150 r/min 振荡培养 3 d。取能耐受高浓度的苯甲酸的培养液 1 mL 涂平板,培养所获菌株,做摇瓶发酵试验,筛选获得高产菌株命名为 A。

高产菌株 A 培养斜面,用 0.1 mol/L 的 pH 7.0 的磷酸缓冲液稀释成细胞浓度为 10<sup>6</sup> 个/mL 的菌液,取 1 mL 菌液接种于 3 mL 2 倍浓度的液体培养基中,分别加入无菌过滤的 20% 对羟基苯甲酸 1.0、1.5、2.0、2.5 和 3.0 mL,无菌水定容至 6 mL,同时做不加 20% 对羟基苯甲酸和菌液的对照,28 °C 培养 3 d。取能耐受高浓度对羟基苯甲酸的培养液 1 mL 涂平板,培养所获菌株,做摇瓶发酵试验,筛选获得高产菌株命名为 B<sup>[7]</sup>。

**突变菌的发酵培养** 取突变菌 A、B 的斜面种接入种子培养基中,30 °C 摇床培养 24 h,以 4% 的接种量转接至发酵培养基中,28 °C 摇床培养 72 h<sup>[8,9]</sup>。

**辅酶 Q<sub>10</sub> 的分离提取及含量测定** 采用碱皂化提取<sup>[10]</sup>,将抽提液溶于 1 mL 无水乙醇中,4 °C 冰箱保存。抽提液通过荧光薄层层析(TLC)分离,以辅酶 Q<sub>10</sub> 标准品为对照,氯仿/苯(V:V/1:1)为展开剂,风干后从层析板上刮下与标准品平齐的黄色条带,溶于 1 mL 无水乙醇,在 275 nm 处测吸光度,通过辅酶 Q<sub>10</sub> 标准曲线计算含量<sup>[7]</sup>。

## 结果

**辅酶 Q<sub>10</sub> 标准曲线的绘制** 根据不同质量浓度辅酶 Q<sub>10</sub> 标准溶液在 275 nm 处的吸光度绘制标准吸收曲线(图 1)。

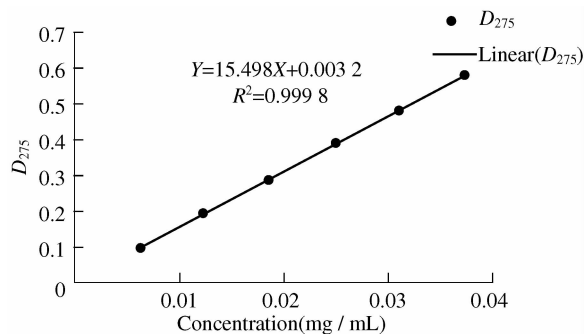


图 1 辅酶 Q<sub>10</sub> 紫外吸收标准曲线

Fig 1 The absorbance standard curve of coenzyme Q<sub>10</sub>

标准曲线  $Y = 15.498X + 0.0032$  ( $r = 0.9999$ ),因此可以利用紫外分光光度法测定辅酶 Q<sub>10</sub> 的含量。

**紫外诱变** 诱变的最适剂量应该使突变株在存活群体中占有最大的比例,从而减少筛选的工作量,从表 1 可以看出,UV 诱变处理 75 s 时,致死率为 96.1%,突变率为 1.16%,达到最大;随着时间的延长,致死率迅速增大,突变率趋近于 0。因此,我们将单因素的最佳诱变剂量选择紫外诱变处理 75 s。

表 1 紫外诱变剂量对致死率及突变率的影响

Tab 1 The effect of the dose of UV on fatality rate and mutation rate

Time (s)	30	45	60	75	90	105
Fatality rate (%)	62.5	84.2	86.3	96.1	99.7	100
Mutation rate (%)	0.51	0.62	0.85	1.16	-	-

耐受高浓度苯甲酸菌株的选育 通过苯甲酸的耐受实验(表 2),从浓度 15 mg/mL 的苯甲酸溶液

表 2 耐受苯甲酸菌株的选育

Tab 2 The screening of strain tolerating benzoic acid

10% Benzoic acid (mL)	0.0	0.0	0.1	0.3	0.5	0.7	0.9	1.1
10 <sup>6</sup> /mL Suspension of strain (mL)	0.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Cell growth conditions	-	+++	+++	+++	++	+	+	-
Colonies on the plate	/	/	/	/	/	28	3	0

- : Growth without strain; + : Growth strains not obvious; +++ : Strains grow well

表 3 耐受对羟基苯甲酸菌株的选育

Tab 3 The screening of strain tolerating p-hydrobenzoic acid

20% p-hydroxybenzoic acid (mL)	0.0	0.0	1.2	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5
Filtering suspension of strain A(mL)	0.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Cell growth conditions	-	+++	+++	++	+	+	+	-
Colonies on the plate	/	/	/	/	/	35	5	0

- :Growth without strain; + : Growth strains not obvious; +++ :Strains grow well

表 4 耐受菌株辅酶 Q<sub>10</sub>产量的测定Tab 4 The determination of CoQ<sub>10</sub> yield of mutant

Strain	CoQ <sub>10</sub> output(μg/mL)	Raise output (%)
Original strain	42.25	/
Strain A	77.79	84.11
Strain B	120.00	184.00

耐受菌株辅酶 Q<sub>10</sub>产量的测定 与原始菌种比较,筛选得到的菌株 A、B,在同等发酵条件下,测定辅酶 Q<sub>10</sub>的含量,结果见表 4。与出发菌株比较,发酵单位高的耐受菌株辅酶 Q<sub>10</sub>的产量提高了 1.84 倍。

## 讨 论

辅酶 Q<sub>10</sub>生物合成的途径中,4-羟基苯甲酸是生物合成辅酶 Q<sub>10</sub>的前体物质<sup>[11]</sup>。4-羟基苯甲酸的多少影响辅酶 Q<sub>10</sub>的产量,成为影响辅酶 Q<sub>10</sub>产量的制约因素。所以在辅酶 Q<sub>10</sub>的生物合成中应尽可能提高 4-羟甲基苯甲酸的量以提高目的产物的产量。但在生物合成体系中,有很多因素制约 4-羟基苯甲酸的生成,其中 4-羟基苯甲酸自身对发酵菌株的影响成为关键的因素,如能提高热带假丝

中(相当于 10%的苯甲酸溶液取 0.9 mL 加入到诱变体系中)筛选出能耐受高浓度苯甲酸的菌株,通过摇瓶发酵,选出辅酶 Q<sub>10</sub>产量最高的 A 菌株。

耐受高浓度对羟基苯甲酸菌株的选育 通过对对羟基苯甲酸的耐受实验(表 3),从浓度为 100 mg/mL 的对羟基苯甲酸溶液中(相当于 20%的对羟基苯甲酸溶液 3.0 mL 加到诱变体系中),筛选出能耐受高浓度对羟基苯甲酸的菌株,通过摇瓶发酵,选出辅酶 Q<sub>10</sub>产量最高的菌株 B。

酵母对 4-羟基苯甲酸或其结构类似物的耐受性,则有可能提高辅酶 Q<sub>10</sub>的产量。

本实验通过热带假丝酵母对苯甲酸和对羟基苯甲酸高浓度的耐受选育,筛选获得的菌株 A、B 产生辅酶 Q<sub>10</sub>的能力比出发菌株分别提高了 84.11%和 184%。菌株 B 的发酵单位为 120 μg/mL,远高于目前国内文献报道 84.6 μg/mL 的水平<sup>[5]</sup>。为以后工业化的生产奠定了基础。

## 参 考 文 献

- [1] Florkin MM, Stotz EH. Comprehensive biochemistry [M]. Amsterdam: Elsevier, 1996.
- [2] Kakamukai M. Biosynthesis bioproduction and novel roles of ubiquinone[J]. *J Biosci Bioeng*, 2002, 94: 511-517.
- [3] Greenberg S, Frishman WH. Coenzyme Q<sub>10</sub>: New drug for disease[J]. *Clin Pharm*, 1990, 30: 596-608.
- [4] 袁静,魏泓. 光合细菌产辅酶 Q<sub>10</sub>发酵条件的研究[J]. 氨基酸和生物资源, 2003, 25(2): 24-26.
- [5] 许激扬,岳小飞,肖海蓉. 辅酶 Q<sub>10</sub>高产酵母菌 SY23 发酵工艺的研究[J]. 中国现代应用药学杂志, 2006, 23(7): 601-603.

(下转第 400 页)