

茄尼醇转化高产辅酶 Q₁₀ 菌株的分离鉴定与发酵条件的研究

柳华贵¹, 方建军¹, 金陵¹, 钟卫鸿^{1*}, 叶紫娟²

(¹ 浙江工业大学生物与环境工程学院, 杭州 310032)

(² 杭州利群环保纸业, 杭州 310018)

摘要: 采用以异戊二烯为唯一碳源的选择性平板筛选模型, 从钱塘江沿岸杭州市九堡段土壤中筛选到一株产辅酶 Q₁₀ 的细菌菌株 E03, 经形态、生理生化、Biolog 碳源利用试验和 16S rDNA 序列分析, 确定 E03 属于鞘氨醇属(*Sphingomonas* sp.), 命名为 *Sphingomonas* sp. ZUTE03。摇瓶试验确定了该菌发酵生产辅酶 Q₁₀ 的最佳碳源为葡萄糖 15 g/L, 氮源为硫酸铵 10 g/L, 初始 pH8.0, 发酵温度 25℃, 并考察了该菌转化茄尼醇产辅酶 Q₁₀ 的发酵工艺, 以合适溶剂为溶解体系, 于发酵培养基中摇床培养 12 h 后, 加入终浓度为 0.75 g/L 的茄尼醇粗品, 转化 12 h, 辅酶 Q₁₀ 产值可达 96.88 mg/L。

关键词: 辅酶 Q₁₀, 16S rDNA, 鞘氨醇菌, 发酵

中图分类号: Q939.9 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 02-0157-07

辅酶 Q₁₀(Coenzyme Q₁₀, CoQ₁₀)广泛存在于动物、植物及微生物体内, 是生物细胞呼吸链中重要的递氢体, 也是一种良好的生化药物^[1,2]。它具有抗氧化性、消除自由基、提高机体免疫力等功能^[17], 已广泛应用于各类心脏病、糖尿病、癌症、急慢性肝炎、帕金森症等疾病的治疗^[16]。最近, 研究者发现辅酶 Q₁₀ 具有抗衰老作用, 从而将其应用扩展到化妆品和保健品领域, 使其在国内外的需求进一步扩大^[3]。另外, 近年来研究表明, 辅酶 Q₁₀ 对感染 HIV 的病人亦有辅助治疗的功效, 目前这方面的应用正处于 II 期临床阶段^[4]。

制备辅酶 Q₁₀ 的方法主要有动物细胞提取法、茄尼醇半合成法、完全合成法、微生物发酵法和植物细胞培养法^[5]。与其他方法相比, 微生物发酵法具有产物活性高、原料成本低、易控制及可实现大规模生产等特点^[17]。而获得优良发酵菌株是微生物发酵法生产辅酶 Q₁₀ 的关键之一^[6]。目前已报道的辅酶 Q₁₀ 发酵菌株主要有假单胞菌属、酵母菌属、光合细菌属以及副球菌属等^[7,8,19,21]。

本文以异戊二烯为唯一碳源的选择性平板筛选模型, 新筛选到一株辅酶 Q₁₀ 产量较佳菌株 E03, 经形态学、生理生化、Biolog GN 鉴定和基于 16S rDNA 序列的系统发育分析, 确定该菌株属于鞘氨醇单胞菌属, 命名为 *Sphingomonas* sp. ZUTE03, 并进行了该菌株的发酵条件和前体物质转化的研究。目前国内外尚未见到有关鞘氨醇单胞菌应用于辅酶 Q₁₀ 生产的研究报道。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 自行分离获得。现保藏于中国典型培养物保藏中心, 保藏编号为 CCTCC M 207084。

1.1.2 培养基和培养条件: 选择性培养基(g/L): 异戊二烯 0.5, (NH₄)₂SO₄ 1.0, KH₂PO₄ 4.5, Na₂HPO₄·12H₂O 21.6, 琼脂 15~20, pH7.0。种子培养基(g/L): 葡萄糖 20, 蛋白胨 10, 酵母膏 10, NaCl 5, pH7.0。发酵培养基(g/L): 葡萄糖 20, 蛋白胨 10, 酵母膏 10, KH₂PO₄ 0.5, Na₂HPO₄ 1.5, MgSO₄·7H₂O 0.5, pH7.0。以上均 115℃灭菌

基金项目: 浙江省科技厅重点项目(2007C23035); 浙江省生物化工重中之重学科开放基金(200601)

*通讯作者。+86-571-88320658; Fax: +86-571-88320057; E-mail: whzhong@zjut.edu.cn

作者简介: 柳华贵(1981-), 男, 浙江临海人, 硕士研究生, 专业方向为应用微生物与基因工程。E-mail: liuhuagui1111@163.com

收稿日期: 2007-06-22; 修回日期: 2007-11-07

30 min。培养温度 28 ℃，摇床转速 200 r/min。

1.1.3 试剂和仪器：辅酶 Q₁₀(纯度 > 99.9 %)为日本和光纯药“WAKO”工业株式会社产品，茄尼醇粗品为实验室自行从废次烟叶中提取的粗品浸膏(纯度 15%)；Biolog 自动微生物鉴定系统(Biolog Microstation, USA)，SPD-10AVP 高效液相色谱仪(日本岛津 SHIMADZU)。

1.2 菌株的分类鉴定

1.2.1 形态学分析：平板培养 24h，观察菌落形态；芽孢染色、革兰氏染色后于高倍镜下观察菌体形态^[9]；利用 JEM1230 透射电镜进一步观察菌体形态。

1.2.2 生理生化特征分析：按文献[10]与 [11]进行生理生化特征的观察。用 Biolog GN 系统对筛选所得菌株作进一步的碳源利用鉴定分析。

1.2.3 16S rDNA 序列测定与系统发育分析：平板 28℃培养 24 h，以水煮法^[12]提取 DNA，16S rDNA 序列的扩增反应在 PTC0200 型 PCR 仪中进行，引物采用细菌通用引物 Forward Primer(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')，Reverse Primer(5'-CGGCTACCTGTGTTACGACTTC-3')^[13]。引物的合成(PAG 纯)和 PCR 产物的测序工作由上海英骏生物技术有限公司完成。PCR 条件为：94 ℃ 4min，94 ℃ 50s，52℃ 1 min，72 ℃ 2 min，30 个循环；72 ℃ 5 min。

通过 NCBI 网站利用 Blast 程序，将所测序列与 GenBank 中核酸序列数据库进行比对分析，并基于相关属菌株的 16S rDNA 序列，利用软件 MEGA2.0 构建系统发育树，进行系统发育分析。

1.3 发酵生产辅酶 Q₁₀的工艺研究

1.3.1 辅酶 Q₁₀的提取和检测：醇碱皂化法提取辅酶 Q₁₀^[14]，HPLC 法检测辅酶 Q₁₀(色谱条件：Shim-pack C₁₈SB 色谱柱 (150mm×4.6mm)，V(正己烷)：V(甲醇)=17：83，混合液为流动相，进样量为 20 μL，流速 0.6 mL/min，紫外检测波长 275 nm)。

1.3.2 发酵培养基成分的研究：碳源的单因素研究：以硫酸铵为氮源，以葡萄糖、蔗糖、麦芽糖这几种常用碳源作为发酵的碳源，考察其对细胞生长总量和辅酶 Q₁₀ 总量的影响。氮源的单因素研究：以最佳碳源为唯一碳源，以硫酸铵、玉米浆、蛋白胨、酵母膏作为发酵的氮源，考察其对细胞生长总量和辅酶 Q₁₀ 总量的影响。

1.3.3 培养条件的单因素研究：初始 pH 值的研究：配制不同 pH 值的最佳发酵培养基，考察其对细

胞生长总量和辅酶 Q₁₀ 总量的影响。发酵温度的研究：配制最佳 pH 值和最佳碳氮源的培养基，在不同温度的摇床上培养，考察其对细胞生长总量和辅酶 Q₁₀ 总量的影响。

1.3.4 前体物质茄尼醇添加对转化产辅酶 Q₁₀ 的影响^[15]：选择合适的溶解体系，将粗品茄尼醇加入发酵液中，并根据菌种的发酵过程曲线，选择不同添加浓度(0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 g/L)，不同添加时间(0, 12, 24 h)和添加后不同转化时间(12, 24, 36, 48 h)，考察茄尼醇添加对 E03 的生长和辅酶 Q₁₀ 产量的影响。

2 结果和分析

2.1 菌种筛选结果

2.1.1 平板初筛结果：分别取雁荡山、黄山、钱塘江九堡段采集的土样 10 g，加无菌水 90 mL，然后取土壤悬浮液 1 mL，稀释 10⁵ 倍，涂布在选择性平板上，28℃放置 2~3 d。挑取多个单菌落，发酵后选取辅酶 Q₁₀ 产量较高的菌株进行后续研究。

2.1.2 摇瓶复筛结果：将平板初筛得到的菌种进行摇瓶复筛，比较发酵产物中辅酶 Q₁₀ 产量，E03 菌辅酶 Q₁₀ 产量最高，培养基优化前产量达 6.19 mg/L，因此选择菌株 E03 作后续研究。

2.2 E03 菌株的鉴定

2.2.1 E03 菌株的细胞形态：细胞为杆状，大小为 (0.20~0.36) μm×(0.40~0.80) μm，具端生单鞭毛(图 1)。革兰氏阴性，无芽孢。菌落呈亮黄润泽，较小，圆形，边缘齐整，表面光滑，易挑起。

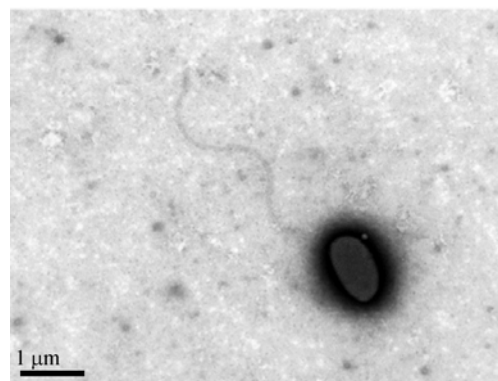


图 1 E03 菌电镜照片

Fig. 1 TEM photo of strain E03 (20000×)

2.2.2 E03 菌株的生理生化特性：菌种常规生理生化反应结果如表 1 所示。以 Biolog MicroStation 数据库平台分析 95 种碳源的利用情况(表 2)，机读结果显示

表1 E03 菌的生理生化反应结果

Table 1 Characters of physiology and biochemistry for strain E03

Characteristics	Results	Characteristics	Results
Aerobic growth	+	Growth at pH7.2	+
Anaerobic growth	-	Growth with 5% NaCl	-
V.P.	+	Starch hydrolysis	-
V.P>pH6	-	Glutin liquefaction	-
Glucose fermentation	+	Glucose oxidation	-
Lactose fermentation	+	Lactose oxidation	-
Catalase	+	Indole	-
Methyl Red	-	Nitrate reduction	-

+ . Positive ; - . Negative.

表2 E03菌对95种碳源的利用

Table 2 Utilization of 95 carbon substrates by strain E03 using Biolog microplate

Carbon substrate	OD ₅₉₀	Carbon substrate	OD ₅₉₀	Carbon substrate	OD ₅₉₀
Water	0.386	Turanose	0.805	D-Alanine	0.376
α -Cyclodextrin	0.67	Xylitol	0.484	L-Alanine	0.566
Dextrin	0.753	Methyl Pyruvate	0.627	L-Alanyl-glycine	0.738
Glycogen	0.544	Mono-Methyl-Succinae	0.631	L-Asparagine	0.640
Tween 40	0.598	Acetic Acid	0.867	L-Aspartic Acid	0.567
Tween 80	0.451	Cis-Aconitic Acid	0.420	L-Glutamic Acid	0.838
N-Acetyl-D-Galactosamine	0.368	Citric Acid	0.544	Glycyl-L-Glutamic Acid	0.458
N-Acetyl-D-Glucosamine	0.745	Formic Acid	0.421	Glycyl-L-Aspartic Acid	0.475
Adonitol	0.426	D-Galactonic Acid Lactone	0.384	L-Histidine	0.357
L-Arabinose	0.731	D-Galacturonic Acid	0.441	Hydroxy-L-Proline	0.534
D - Arabitol	0.441	D-Gluconic	0.444	L-Leucine	0.397
D-Cellobiose	1.025	D-Glucosaminic Acid	0.528	L-Ornithine	0.504
L-Erythritol	0.481	D-Glucuronic Acid	0.546	L-Phenylalanine	0.362
D-Fructose	0.738	α -Hydroxy Butyric Acid	0.532	L-proline	0.529
L-Fucose	0.432	β -Hydroxy Butyric Acid	0.611	L-Pyroglutamic Acid	0.468
D-Galactose	0.712	γ -Hydroxy Butyric Acid	1.278	D-Serine	0.354
Gentiobiose	0.964	p-Hydroxy Phenylacetic Acid	0.462	L-Serine	0.665
α -D-Glucose	0.783	Itaconic Acid	0.368	L-Threonine	0.482
m-Inositol	0.411	α -Keto Butyric Acid	0.491	D,L-Carnitine	0.403
α -D-Lactose	0.847	α -Keto Glutaric Acid	0.745	γ -Amino Butyric Acid	0.484
Lactulose	0.820	α -Keto Valeric Acid	0.432	Urocanic Acid	0.370
Maltose	0.966	D,L-Lactic Acid	0.469	Inosine	0.393
D-Mannitol	0.482	Malonic Acid	0.441	Uridine	0.453
D-Mannose	0.820	Propionic Acid	0.524	Thymidine	0.306
D-Melibiose	0.664	Quinic Acid	0.630	Phenyethylamine	0.304
β -Methyl-D-Glucoside	0.580	D-Saccharic Acid	0.479	Putrescine	0.360
D-Psicose	0.681	Sebacic Acid	0.431	2-Aminoethanol	0.418
D-Raffinose	0.611	Succinic Acid	0.790	2,3-Butanediol	0.360
L-Rhamnose	0.402	Bromo Succinic Acid	0.692	Glycerol	0.300
D-Sorbitol	0.462	Succinamic Acid	0.471	D,L- α -glycerol Phosphate	0.350
Sucrose	0.780	Glucuronamide	0.403	Glucose-1-Phosphate	0.540
D-Trehalose	0.965	L-Alaninamide	0.595	Glucose-6-Phosphate	0.508

E03 菌株属于 *Sphingomonas* sp.(鞘氨醇单胞菌属), 相似值达 0.93。

2.2.3 16S rDNA 序列测定与系统发育分析：E03 菌

的 16S rDNA PCR 产物分子量在 1.5kb 左右,符合预期产物长度, 该 16S rDNA 序列在 GenBank 中登录号为 EF540853。测序结果通过 NCBI BLAST 数据库

与已知序列(同源性 97%)比较,结果显示 E03 菌株与 *Sphingomonas* sp. (鞘氨醇单胞菌属)同源性可达 98%。通过 MEGA2.0 软件计算分析,得 E03 菌的系统发育树(图 2)。

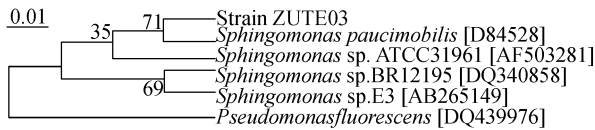


图 2 根据 16S rRNA 序列同源性构建的系统发育树
Fig 2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequences homology

Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 1% sequence divergence.

综合上述 E03 菌的鉴定结果,16S rDNA 同源性 与 Biolog 系统分析均显示该菌与鞘氨醇单胞菌 (*Sphingomonas* sp.)的相似值最高,根据文献[21]对该菌种的特性进行进一步的对比,初步确定菌株 E03 属于鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas* sp.),命名为 *Sphingomonas* sp. ZUTE03。

表 3 葡萄糖浓度和组合氮源对 E03 辅酶 Q₁₀ 产量的影响

Table 3 Effect of glucose concentration and combined nitrogen source on CoQ₁₀ production by *Sphingomonas* sp. ZUTE03

	Carbon or Nitrogen source	Biomass /(g/L)	Yield of CoQ ₁₀ to broth /(mg/L)	Yield of CoQ ₁₀ to biomass /(mg/g)
Glucose /(g/L)	10	1.37	1.31	0.96
	15	2.39	7.04	2.95
	20	1.39	1.82	1.32
Nitrogen source /(g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ 10	2.89	1.10	0.40
	Peptone 10	8.12	1.79	0.22
	(NH ₄) ₂ SO ₄ 5+Peptone 5	4.26	1.07	0.25
	(NH ₄) ₂ SO ₄ 5+Peptone 5 + Yeast extract 0.5	5.20	1.54	0.30
	(NH ₄) ₂ SO ₄ 5+Peptone 5 + Yeast extract 1	4.37	1.10	0.25

根据上述结果,初步确定培养基中碳氮源组成为:葡萄糖 15g/L,硫酸铵 10g/L。

2.3.2 培养条件对发酵生产辅酶 Q₁₀ 的影响:初始 pH 对菌体生长和发酵产物的合成有明显影响,因而需正确选择初始 pH 和维持适当的 pH 值。考察了初始 pH 对菌体生长和辅酶 Q₁₀ 产量的影响,结果(表 4)显示,在初始 pH6.0 时,菌的生长量最高,在初始 pH8.0 时,辅酶 Q₁₀ 的单位菌体产量最高。综合考虑,发酵生产辅酶 Q₁₀ 的最佳初始 pH 应选择 8.0。

温度既能影响反应速率和发酵液的物理性质,也能改变代谢产物的合成方向,进而影响发酵动力学特性。考察了培养温度对菌体生长和产物形成的影响,结果(表 4)显示,随着培养温度的升高,菌体生长

2.3 *Sphingomonas* sp. ZUTE03 发酵产辅酶 Q₁₀ 的工艺条件研究

2.3.1 培养基中碳源和氮源对发酵生产辅酶 Q₁₀ 的影响:单因子试验显示,菌株 *Sphingomonas* sp. ZUTE03 以葡萄糖为碳源时,菌生长量最小,但辅酶 Q₁₀ 产量最高,麦芽糖次之,蔗糖最差。有机氮源中以蛋白胨为最佳,虽然无机氮源不利于菌株生长,但单位菌体的辅酶 Q₁₀ 产量可以达到有机氮源的水平。

在确定以上结果的基础上考察了葡萄糖添加浓度对菌体产辅酶 Q₁₀ 的影响以及硫酸铵和蛋白胨等组合氮源的对菌体产辅酶 Q₁₀ 的影响(表 3)。

从表 3 中可知,培养基中加入较低的葡萄糖浓度时菌体的生长和辅酶 Q₁₀ 产量均处于较低水平,而较高的葡萄糖也会抑制菌体生长,降低辅酶 Q₁₀ 的产量,因此,15g/L 为葡萄糖的较合适添加浓度。

从氮源试验结果看,有机氮源有利于菌体生长和辅酶 Q₁₀ 的总产量,但作为无机氮源的代表,硫酸铵却有利于辅酶 Q₁₀ 的单位菌体产量,从经济成本来看,硫酸铵为较佳氮源。

量有所提高,但是辅酶 Q₁₀ 的总产量却相差不大,两者并没有很大的相关性,因此,从单位产值考虑,选

表 4 不同发酵条件对产菌量和辅酶 Q₁₀ 产量的影响

Table 4 Effect of different fermentation condition on growth and CoQ₁₀ production

	Biomass /(g/L)	Yield of CoQ ₁₀ To broth/ (mg/L)	Yield of CoQ ₁₀ to biomass / (mg/g)
Original pH	5.0	9.94	3.65
	6.0	13.10	17.75
	7.0	11.02	10.55
	8.0	10.43	14.86
	25	8.167	36.09
T/°C	30	12.67	31.92
	37	12.67	30.06

择发酵温度为 25℃。

2.4 茄尼醇生物转化产辅酶 Q₁₀ 的工艺条件研究

2.4.1 前体茄尼醇添加时间及浓度对转化的影响:

以合适的溶剂溶解一定量的茄尼醇,待发酵进行到第 0, 12, 24h 时添加到 150mL 发酵培养基中,进行转化反应,总发酵时间定为 36h,测定辅酶 Q₁₀ 产量和细胞生物量,结果(图 3-A)显示茄尼醇的添加时间对胞内和发酵液中辅酶 Q₁₀ 的产量以及细胞生长都有较大的影响。在 0h 添加,茄尼醇对细胞的生长有明显的抑制作用;12h 后添加,对细胞生物量几乎没有影响。这可能是因为 E03 菌在 12h 前处于对数生长期前期,茄尼醇是一种大分子物质,可能由于它的添加而抑制了细胞的生长。而在 12h 左右添加茄尼醇,辅酶 Q₁₀ 的产量达到最高,为 79.88 mg/L;24h 左右添加茄尼醇,由于 E03 菌已开始进入稳定期,茄尼醇的加入并没有对菌体生长量有太多影响,但辅酶 Q₁₀ 产量亦明显高于未加茄尼醇的发酵液,达到 51.73mg/L。因此,无论从菌体生长量还是辅酶 Q₁₀ 产量考虑,12h 后添加的结果较为理想,确定添加时间为 12h。

在确定以上结果的基础上,以合适的溶剂溶解一定量的茄尼醇,待发酵进行到 12h 时,添加到 150 mL 发酵培养基中进行转化反应,茄尼醇终浓度分别为 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0g/L。其中 0 g/L 用合适溶剂代替。总发酵时间定为 36h,测定辅酶 Q₁₀ 产量和细胞

生物量,结果(图 3-B)显示,茄尼醇的浓度对细胞生长和辅酶 Q₁₀ 的合成都有较大的影响。当茄尼醇的添加浓度为 0.75g/L 时,辅酶 Q₁₀ 的产量达到最高,为 72.46mg/L,单位细胞辅酶 Q₁₀ 产量也达到最大值 13.11mg/g。而与对照组比较,无论是茄尼醇溶解用的合适溶剂的加入,还是以合适溶剂溶解的茄尼醇溶液的加入,都对细胞生物量有所影响。当茄尼醇加入达到 0.75 g/L 时,细胞生物量与对照组持平,辅酶 Q₁₀ 的总产量和单位细胞辅酶 Q₁₀ 产量比对照组分别增加了 378.6%和 375.8 %。此后细胞生物量有所降低,而辅酶 Q₁₀ 的总产量和单位细胞辅酶 Q₁₀ 产量的变化较小。

2.4.2 前体物质茄尼醇转化反应时间的影响:以合适的溶剂溶解一定量的茄尼醇,待发酵进行到 12h 后,添加到 150mL 发酵培养基中(茄尼醇终浓度为 0.75g/L)进行微生物转化,后续转化反应时间设为 12h, 24 h, 36h, 48h,测定辅酶 Q₁₀ 产量和细胞生物量,结果(图 4)显示,随着转化反应时间的延长,细菌的生长量没有显著的变化,含量均在 5g/L 左右;而发酵液中辅酶 Q₁₀ 的产量随着时间的延长而变化,在 12h 时达到最大,以后随着时间的延长辅酶 Q₁₀ 产量反而减少。这可能是因为细胞内的酶系在发酵过程中不断转化茄尼醇产生一定量的辅酶 Q₁₀,达到一定量时,细胞体内酶系转化茄尼醇的能力达到最大值,细胞内的辅酶 Q₁₀ 也不再具有显著变化,甚至有所减少。

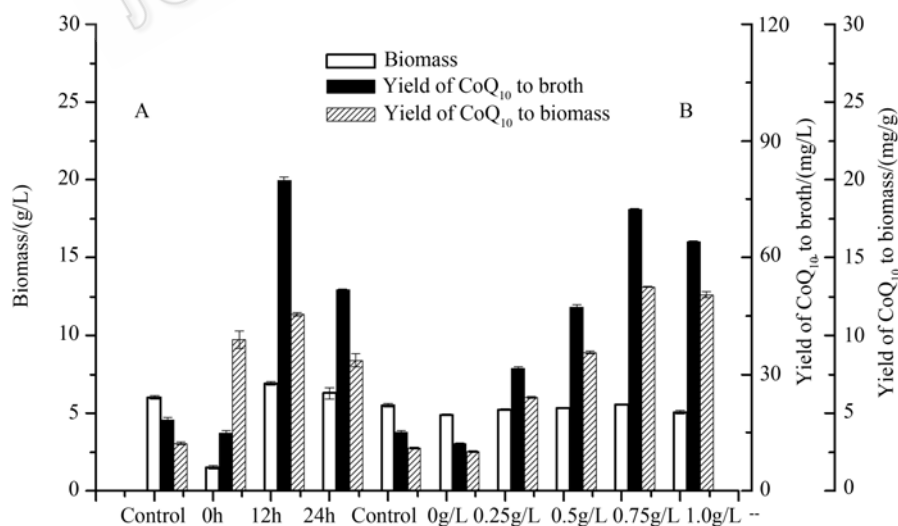


图 3 茄尼醇添加对转化的影响

Fig. 3 Effect of solanesol addition time (A) and addition concentration (B) on CoQ₁₀ bioconversion.

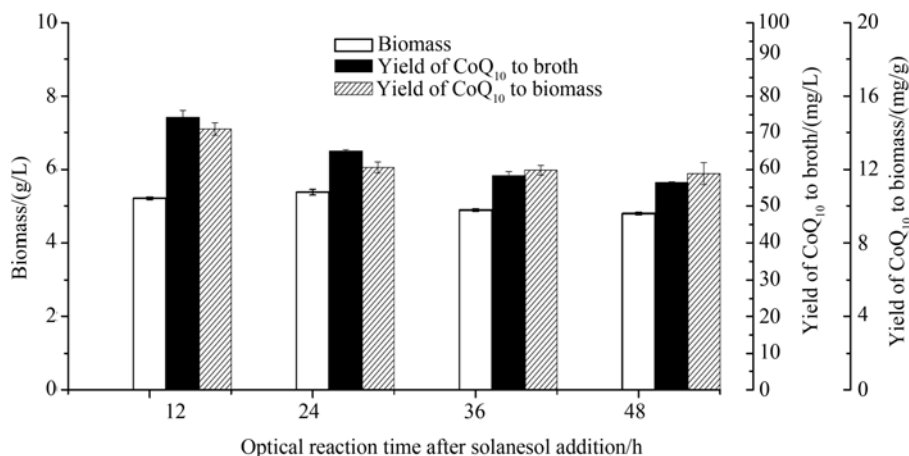


图4 茄尼醇添加后转化反应时间对*Sphingomonas sp.* ZUTE03产辅酶Q₁₀的影响

Fig. 4 Effect of reaction time after solanesol addition on the yield of CoQ₁₀ by *Sphingomonas sp.* ZUTE03.

3 讨论

由于辅酶 Q₁₀ 在医学领域的广泛应用, 国内外市场对辅酶 Q₁₀ 的需求量的进一步扩大, 而微生物发酵法制备辅酶 Q₁₀ 是近几年国内外开发的热点, 被认为是最有前途的工艺。诸多学者积极筛选辅酶 Q₁₀ 的高产菌株, 以期实现发酵法生产辅酶 Q₁₀ 的工业化。

本文通过以辅酶 Q₁₀ 侧链单体(异戊二烯)为唯一碳源的筛选平板筛选辅酶 Q₁₀ 的生产菌株, 因异戊二烯具有毒性, 能在此平板上生长良好, 并能通过摇床复筛稳定高产辅酶 Q₁₀ 的菌株较少。因而, 这种新颖的初筛平板模型有较好的选择性。获得的菌株中, E03 菌能稳定传代, 辅酶 Q₁₀ 产量亦较稳定, 初始产量亦较高, 在 6.19 mg/L 左右。因而选择该菌株进行本文的研究工作。该菌株经 16S rDNA 同源性与 Biolog 分析, 与少动鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas paucimobilis*) 具有 98% 的相似性, 且与文献[10]编录的少动鞘氨醇单胞菌种的生理生化性状相吻合, 可以确定该菌株属于鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas sp.*), 并命名为 *Sphingomonas sp.* ZUTE03。该属菌株用于辅酶 Q₁₀ 的生产的研究报道极少。对 *Sphingomonas sp.* ZUTE03 的发酵产辅酶 Q₁₀ 培养基组分和生长条件亦进行了研究, 得出最佳的实验条件。确定了以 15 g/L 的葡萄糖作为碳源, 以 10 g/L (NH₄)₂SO₄ 作为氮源, 初始 pH 为 8.0, 培养温度为 25℃ 时, 产量最高, 达到了 36.09 mg/L, 比优化前提高了 483%, 且无需破壁进行皂化提取辅酶 Q₁₀。

茄尼醇是辅酶 Q₁₀ 重要的侧链中间体, 在烟叶中含量最高, 从废弃烟草中提取和精制是目前主要的

茄尼醇生产方法。我国是世界上茄尼醇生产能力较大的国家, 微生物转化茄尼醇生产辅酶 Q₁₀ 可以充分利用我国的茄尼醇资源, 同时也可以实现辅酶 Q₁₀ 的快速转化生产。因而利用废次烟叶中提取的茄尼醇进行辅酶 Q₁₀ 的生物转化生产具有较好的社会经济和环保意义。本文以 *Sphingomonas sp.* ZUTE03 菌株和自行提取获得的茄尼醇样品, 进行了前体物质添加转化工艺的研究。确定了最适于 *Sphingomonas sp.* ZUTE03 菌株生长和高转化前体合成辅酶 Q₁₀ 的条件: 以合适溶剂为溶解体系, 于发酵培养基中摇床培养 12h 后, 加入茄尼醇粗品, 终浓度为 0.75 g/L, 继续发酵培养 12h, 进行前体转化反应。实验结果能达到最高产值 96.88 mg/L。因此, 此菌株是一株颇具发展潜力的茄尼醇转化产辅酶 Q₁₀ 的生产菌株。通过对辅酶 Q₁₀ 的代谢调控机制研究, 构建高产基因工程菌株^[18], 优化培养条件以及对辅酶 Q₁₀ 的提取、纯化、精制等研究, 将是我们促进该技术产业化的工作重点。

参 考 文 献

- [1] Nazzal S, Nutan M, Palamakulaa, et al. Optimization of a self-nanoemulsified tablet dosage form of Ubiquinone using response surface methodology. *International Journal of Pharmaceutics*, 2002, 240: 103-114.
- [2] Meganathan R. Ubiquinone biosynthesis in microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 203: 131-139.
- [3] 张延静, 袁其朋, 梁浩, 等. 产辅酶 Q₁₀ 酵母的发酵条件研究. *微生物学通报(Microbiology)*, 2003, 30(2): 65-69.
- [4] 姜传福. 辅酶 Q₁₀ 的制备及其药物功能. 石油化工高等学校学

- 报(*Journal of Petrochemical Universities*), 2005, 18(4): 52–81.
- [5] 王青云, 王发祥, 钟士清, 等. 微生物发酵生产辅酶 Q₁₀ 的研究进展. *化学与生物工程(Chemistry & Bioengineering)*, 2006, 23(8): 11–13.
- [6] 王普, 张晓军, 沈佳佳, 等. 发酵法产辅酶 Q₁₀ 的季也蒙假丝酵母的选育. *浙江工业大学学报(Journal of Zhejiang University of Technology)*, 2006, 34(3): 281–285.
- [7] Krivankoval, Dadak V. Semimicro extraction of ubiquinone and menaquinone from bacteria. *Methods Enzymol*, 1980, 67: 111–114.
- [8] Kuratsu Y, Sakuraim, Hagino H. Productivity and colony morphology associated with coenzyme Q₁₀ production by *Agrobacterium* species. *Agric Biol Chem*, 1984, 48(8): 1997–2002.
- [9] 沈萍, 范秀容, 李广武, 等. 微生物学实验, 第三版. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [10] 东秀珠, 蔡妙英, 等. 常见细菌鉴定手册. 科学出版社, 2001.
- [11] 宋大新, 范长胜, 徐德强, 等. 微生物学实验技术教程. 上海: 复旦大学出版社, 1993: 209–253.
- [12] 沈德新, 封志纯, 杜江, 等. 细菌 DNA 提取方法比较. *中原医刊(Central Plains Medical Journal)*, 2004, 31(10): 20–22.
- [13] Weisburg WG, Barns M S, Pelletier AD, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Bacteriol*, 1991(173): 697–703.
- [14] 王根华, 钱和. 发酵菌体中辅酶 Q₁₀ 的提取和测定方法. *无锡轻工大学学报(Journal of Wuxi University of Light Industry)*, 2003, 22(2): 59–62.
- [15] 刘萍, 邱卫华, 郑亚安, 等. 前体物质对辅酶 Q₁₀ 生物合成的影响. *食品与发酵工业(Food and Fermentation Industries)*, 2005, 31(4): 1–5.
- [16] Jin-Ho Choi, Yeon-Woo Ryu, Jin-Ho Seo, et al. Biotechnological production and applications of coenzyme Q₁₀. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 68: 9–15.
- [17] Ernster L. Facts and ideas about the function of coenzyme Q₁₀ in the Mitochondria. *Elsevier Amsterdam*, 1977, 23: 15–18.
- [18] Park YC, Kim SJ, Choi JH. Batch and fed-batch production of coenzyme Q₁₀ in recombinant *Escherichia coli* containing the decaprenyl diphosphate synthase gene from *Gluconobacter suboxydans*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 192–196.
- [19] Yoshida H, Kotani Y, Ochiai K, et al. Production of ubiquinone-10 using bacteria. *Gen Appl Microbiol*, 1998, 44: 19–26.
- [20] Cheong SR, Kim SY, Lee JK, et al. Fermentation process for preparing coenzyme Q₁₀ by the recombinant *Agrobacterium tumefaciens*. *US 20050181490*, 200528218.
- [21] Buchanan RE, Gibbons NE, et al. 伯杰氏细菌鉴定手册. 王惠君, 等译. 第八版. 北京: 科学出版社, 1984.

Isolation, Characterization and Fermentation Condition of Coenzyme Q₁₀ Producing Strain with Solanesol as Precursor

Huagui Liu¹, Jianjun Fang¹, Ling Jin¹, Weihong Zhong^{1*}, Zijuan Ye²

¹ College of Biological and Environmental Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032, China

² Hangzhou Liqun Environmental Protection Paper Co. Ltd, Hangzhou 310018, China

Abstract: A bacterium capable of producing Coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀) was isolated from soil. Based on analysis of the 16S rDNA sequence, traditional physiological characteristics, and Biolog-GN, the strain was belonging to the genus *Sphingomonas* and named as *Sphingomonas* sp. ZUTEO3. The optimum fermentation condition of CoQ₁₀ production was as following: glucose 15 g/L, (NH₄)₂SO₄ 10 g/L, original pH 8.0 and at 25°C. The addition of solanesol could improve CoQ₁₀ production. The optimal condition for the bioconservation from solanesol to CoQ₁₀ was as following: adding 0.75 g/L of raw solanesol after the first 12 h fermentation and continued for another 12 h fermentation. The maximal yield of CoQ₁₀ reached 96.88 mg/L.

Keywords: coenzyme Q₁₀; 16S rDNA; *Sphingomonas* sp.; fermentation; solanesol

Supported by the Key Program of Science and Technology Department of Zhejiang Province (2007C23035) and the Open Foundation of Zhejiang Provincial Key Discipline of Biochemical Engineering (200601)

*Corresponding author. Tel: +86-571-88320658; Fax: +86-571-88320057; E-mail: whzhong@zjut.edu.cn

Received: 22 June 2007 / Received: 7 November 2007