

文章编号: 1673-1689(2006)05-0061-05

# 三孢布拉氏霉合成辅酶 Q<sub>10</sub> 及其代谢调控

吴品芳<sup>1</sup>, 陆茂林<sup>2</sup>

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214036 2. 江苏省微生物研究所, 江苏 无锡 214063)

**摘要:** 对三孢布拉氏霉代谢产物的分析表明, 该菌能够合成辅酶 Q<sub>10</sub>, 且正株合成辅酶 Q<sub>10</sub> 的能力高于负株。当正负菌株以 5: 1 混合培养时, 辅酶 Q<sub>10</sub> 产量最高。三孢布拉氏霉合成辅酶 Q<sub>10</sub> 是遵循经典的辅酶 Q<sub>10</sub> 生物合成途径的, 本实验选育到具有 L-甲硫氨酸和 D-酪氨酸或对氨基苯丙氨酸双重抗性标记的突变菌各一株, 其辅酶 Q<sub>10</sub> 产量较出发菌株分别提高了 76.7% 及 94.2%。

**关键词:** 三孢布拉氏霉, 辅酶 Q<sub>10</sub>, 代谢调控

中图分类号: Q 552

文献标识码: A

## Synthesizing Coenzyme Q<sub>10</sub> from *Blakeslea trispora* and its Metabolized Regulation

WU Pin-fang<sup>1</sup>, LU Mao-lin<sup>2</sup>

(1. School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China 2. Jiangsu Institute of Microbiology Co. Ltd. Wuxi 214063, China)

**Abstract:** The result from thin-layer chromatograph indicated that CoQ<sub>10</sub> could be synthesis by *Blakeslea trispora*, and a higher concentration of CoQ<sub>10</sub> was observed in the positive strain. A highest concentration of CoQ<sub>10</sub> was detected in the mixture culture of positive strain and negative strain at the ratio of 5: 1. The results of metabolic pathway analysis shown that the CoQ<sub>10</sub> synthesis pathway in *Blakeslea trispora* is followed the classic pathway of CoQ<sub>10</sub> synthesis. Furthermore, two mutants that has dual resistant marker were isolated, and the yield of CoQ<sub>10</sub> produce by these two strains increase 76.7% and 94.2%, respectively.

**Key words:** *Blakeslea trispora*; coenzyme Q<sub>10</sub>; metabolized regulation

辅酶 Q<sub>10</sub> (Coenzyme Q<sub>10</sub>, CoQ<sub>10</sub>) 为 2,3-二甲氧基-5-甲基-6-癸异戊二烯苯醌, 在动、植物和微生物细胞内与线粒体内膜相结合, 是呼吸链中重要的递氢体<sup>[1]</sup>。辅酶 Q<sub>10</sub> 能抑制线粒体的过氧化, 保护生物膜的完整性, 能激活细胞呼吸, 加速产生 ATP, 起到解毒急救作用。辅酶 Q<sub>10</sub> 还能提高机体的免疫力, 因而是一种临床价值很高的生化药物。

辅酶 Q<sub>10</sub> 的制备方法有生物提取法、化学合成法及微生物发酵法。近年来, 微生物发酵法得到了长足的发展, 该法具有原料来源丰富、反应条件温和、产品生物活性好等优点而成为最有发展潜力的生产方法。目前多采用酵母属及细菌发酵制备辅酶 Q<sub>10</sub>。采用三孢布拉氏霉发酵制备辅酶 Q<sub>10</sub> 的研究在国内外还未见报道。本研究对该菌种代谢合成

收稿日期: 2005-10-19; 修回日期: 2005-12-15.

基金项目: 江苏省“十五”科技攻关(工业)项目(BE2004031).

作者简介: 吴品芳(1980-), 女, 江苏苏州人, 微生物与生化药学专业硕士研究生.

辅酶  $Q_{10}$  及其调控进行了初步探索,为进一步提高辅酶  $Q_{10}$  产量打下了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

三孢布拉氏霉 *Blakeslea trispora* JSF4,江苏省微生物研究所提供。

### 1.2 培养基

1.2.1 孢子斜面和平皿分离培养基 PDA 培养基。

1.2.2 抗性培养基 PDA + L-甲硫氨酸或 D-酪氨酸或对氨基苯丙氨酸。

1.2.3 种子培养基(mg/dL) 淀粉 4,葡萄糖 2,玉米浆 5;  $KH_2PO_4$  0.1;  $MgSO_4$  0.01;  $VB_1$  0.001; pH 6.4。

1.2.4 发酵培养基(mg/dL) 淀粉 2,黄豆饼粉 4; 玉米浆 3;  $KH_2PO_4$  0.1;  $MgSO_4$  0.01;  $VB_1$  0.001; 大豆油 2.5; pH 6.7。

### 1.3 抗性菌株的选育

将诱变( $^{60}Co$   $\gamma$  射线、紫外线)处理过的孢子悬液作一定的梯度稀释,涂布于抗性培养基上,27  $^{\circ}C$  培养 4~5 d,挑取单菌落接于斜面。

### 1.4 培养方法

1.4.1 种子 将斜面上的少量菌丝接种于种子培养基(250 mL 烧瓶装量 50 mL),置于 27  $^{\circ}C$ 、210 r/min 的旋转摇床上振荡 42 h。

1.4.2 摇瓶发酵 将培养好的种子以 15 mg/dL 的接种量转入发酵培养基(500 mL 烧瓶装量 40 mL)中,置于 27  $^{\circ}C$ 、220 r/min 的旋转摇床上振荡 72 h。

### 1.5 菌体中辅酶 $Q_{10}$ 的分离测定

从发酵液中过滤出菌丝体,将其移入 250 mL 平底烧瓶中,加抗氧化剂、甲醇、少量蒸馏水混匀,90  $^{\circ}C$  回流 30 min<sup>[2]</sup>,迅速冷却,用石油醚萃取 3 次,合并萃取液进行减压浓缩。采用薄层层析分离浓缩液中的辅酶  $Q_{10}$ ,按文献[3]提供的方法测定辅酶  $Q_{10}$  的含量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 三孢布拉氏霉菌中辅酶 $Q_{10}$ 的合成

三孢布拉氏霉为异宗接合菌,有正、负两种菌株。将正、负菌株分别进行单独培养和混合培养,对其菌体的萃取液进行薄层分离,结果见图 1。

由图 1 可知,样品 1 和样品 2 经 TLC 分离,在与辅酶  $Q_{10}$  标准品色带相同的  $R_f$  值处,分离出了色

带 5。刮下标准品及色带 5,溶于乙醇中,进行紫外扫描,结果见图 2。由图 2 可以看出,色带 5 的氧化型及还原型紫外吸收图谱均与标准品的氧化型及还原型图谱相吻合,说明三孢布拉氏霉能合成辅酶  $Q_{10}$ ,其产量见表 1。

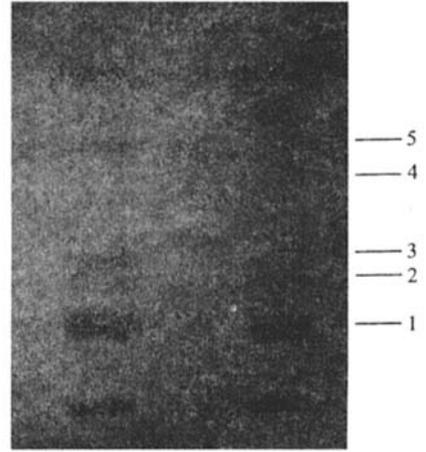


图 1 供试样品与标准品的薄层层析图

Fig. 1 The picture of thin-layer chromatograph for the samples and standard

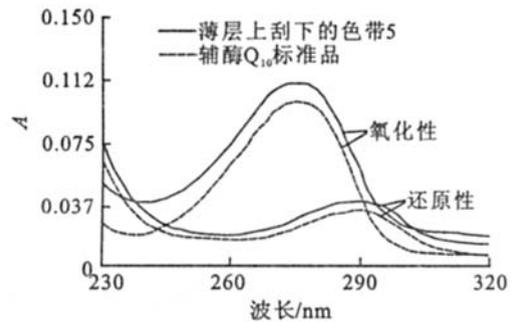


图 2 辅酶  $Q_{10}$  的紫外吸收光谱

Fig. 2 Absorption spectra of coenzyme  $Q_{10}$

表 1 三孢布拉氏霉正、负单菌株及按不同接种比例混合培养后的辅酶  $Q_{10}$  产量

Tab. 1 The production of  $CoQ_{10}$  by *Blakeslea trispora* for separate and mated culture

| 接种比例( + / - ) | 辅酶 $Q_{10}$ 产量(mg/L) |
|---------------|----------------------|
| JSF4( + )     | 14.05                |
| JSF4( - )     | 11.07                |
| 7: 1          | 15.88                |
| 5: 1          | 17.84                |
| 3: 1          | 17.05                |
| 1: 1          | 13.98                |
| 1: 3          | 13.40                |
| 1: 5          | 12.99                |
| 1: 7          | 11.11                |

由表1可以看出,正株产辅酶 Q<sub>10</sub>的能力较负菌高些。将正负菌株以 5:1 比例混合培养时,辅酶 Q<sub>10</sub>的产量最高,达到 17.84 mg/L。这主要是因为混合培养时,正负菌的菌丝体相互接触、融合,菌丝中产生异核体,期间合成一种性激素——三孢酸,它能促进甲羟戊酸焦磷酸转化为二甲烯丙基焦磷酸<sup>[4]</sup>,从而增加了合成辅酶 Q<sub>10</sub>侧链的原料——异戊烯基焦磷酸(IPP)。

### 2.2 三孢布拉氏霉中辅酶 Q<sub>10</sub>的生物合成途径及调控

Rudney 于 1976 年在关于 CoQ<sub>10</sub>的国际会议上提出了 CoQ<sub>10</sub>的微生物合成途径主要为芳香环及异戊二烯基侧链两条生物合成路线<sup>[5]</sup>(图3)。三孢布拉氏霉作为工业化生产 β-胡萝卜素的高产菌<sup>[6]</sup>,能通过 MVA<sup>[7]</sup>途径合成大量 IPP,因此,三孢布拉

氏霉菌内具有辅酶 Q<sub>10</sub>侧链——聚异戊二烯的合成途径(见图3.a)。L-酪氨酸缺陷型试验结果也表明三孢布拉氏霉存在着芳香环生物合成途径(见图3.b)。由此推断,三孢布拉氏霉合成辅酶 Q<sub>10</sub>是遵循经典的辅酶 Q<sub>10</sub>生物合成途径的。

异戊烯基侧链合成途径的关键酶和限速酶是 HMG-CoA 还原酶,它控制着辅酶 Q<sub>10</sub>侧链的基本单位——IPP 的合成数量;芳香环合成途径的关键酶是 DAHP 合成酶和分支酸变位酶<sup>[8]</sup>,这两种酶受终产物酪氨酸和苯丙氨酸的协同反馈抑制。针对这两条代谢途径关键酶的特性,我们对三孢布拉氏霉进行 IPP 结构类似物——L-甲硫氨酸抗性菌株、L-酪氨酸结构类似物——D-酪氨酸及 L-苯丙氨酸结构类似物——对氨基苯丙氨酸抗性突变株的选育,以增加辅酶 Q<sub>10</sub>的产量。

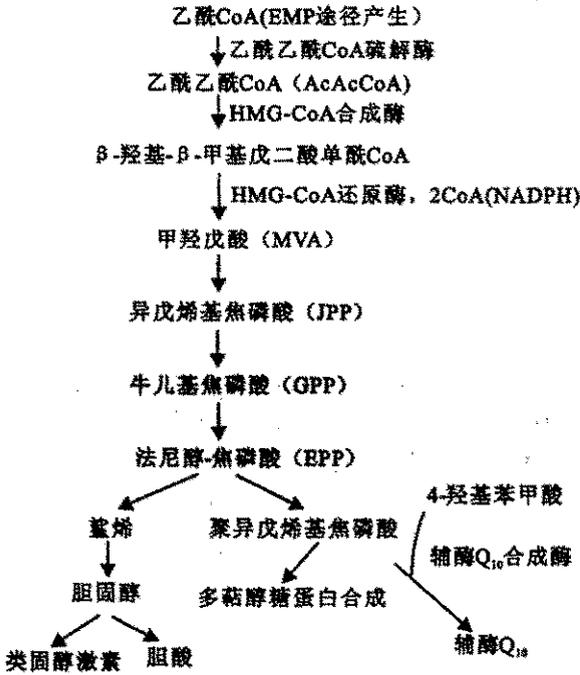


图 a. 异戊烯基侧链的生物合成路线

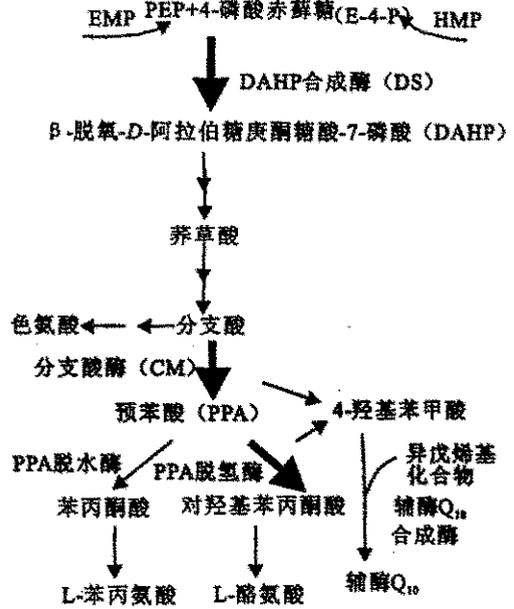


图 b. 芳香环生物合成路线

图3 辅酶 Q<sub>10</sub>的生物合成途径

Fig. 3 Pathway of coenzyme Q<sub>10</sub> biosynthesis

2.2.1 L-甲硫氨酸对三孢布拉氏霉合成辅酶 Q<sub>10</sub>的影响 在平皿分离培养基中分别添加 5、9、12、15、18、20 mg/mL 不同质量浓度的 L-甲硫氨酸,将制备好的单孢子悬液分别涂布在具有不同质量浓度的 L-甲硫氨酸抗性平板上,27℃培养 4~5 d。L-甲硫氨酸对菌体生长的影响见表 2。

由表 2 可确定 L-甲硫氨酸对该菌的致死质量

浓度为 18 mg/mL,以此质量浓度作为致死抗药性突变标志。将诱变过的单孢子悬液涂布含 18 mg/mL L-甲硫氨酸的抗性平板上,27℃培养 4~5 d,挑取单菌落接于 PDA 斜面。经初筛及复筛,得到一株 L-甲硫氨酸抗性菌 JSF4-J8(见表 4),其辅酶 Q<sub>10</sub>产量达 20.51 mg/L,较出发菌株的 14.05 mg/L 提高了 46%。实验结果表明,L-甲硫氨酸作为 IPP 的结构

类似物,选育其抗性菌株,可以解除 IPP 对辅酶  $Q_{10}$  合成的反馈抑制,增加菌株的辅酶  $Q_{10}$  产量。

表2 L-甲硫氨酸对菌体生长的影响

Tab. 2 The influence of L-Methionine on growth of strains

| 质量浓度/(mg/mL) | 生长情况 |
|--------------|------|
| 0            | +++  |
| 5            | +++  |
| 9            | ++   |
| 12           | +    |
| 15           | +    |
| 18           | -    |
| 20           | -    |

注:表中“+”表示生长;“-”表示不生长。

**2.2.2 D-酪氨酸及对氨基苯丙氨酸对三孢布拉氏霉合成辅酶  $Q_{10}$  的影响** 在平皿分离培养基中分别添加 1、3、5、7、9、11 mg/mL 不同质量浓度的 D-酪氨酸和对氨基苯丙氨酸,将诱变过的 JSF4-J8 单孢子悬液分别涂布在不同质量浓度的上述两种抗性平板上,27℃培养 4~5 d。D-酪氨酸及对氨基苯丙氨酸对菌体生长的影响见表 3。

表3 D-酪氨酸及对氨基苯丙氨酸对菌体生长的影响

Tab. 3 Effect of D-Tyrosine and p-amino-phenylalanine on the strains growth

| 质量浓度/(mg/mL) | 生长情况  |         |
|--------------|-------|---------|
|              | D-酪氨酸 | 对氨基苯丙氨酸 |
| 0            | +++   | +++     |
| 1            | ++    | +++     |
| 3            | +     | ++      |
| 5            | +     | +       |
| 7            | -     | +       |
| 9            | -     | -       |
| 11           | -     | -       |

注:表中“+”表示生长;“-”表示不生长。

由表 3 可确定 D-酪氨酸及对氨基苯丙氨酸对该菌的致死质量浓度分别为 7 mg/mL 和 9 mg/mL。将诱变过的 JSF4-J8 单孢子悬液涂布在含 7 mg/mL D-酪氨酸和含 9 mg/mL 对氨基苯丙氨酸两种抗性平板上,27℃培养 4~5 d,挑取单菌落接于 PDA 斜面。经初筛及复筛,得到了 D-酪氨酸抗性菌 JSF4-JD5 及对氨基苯丙氨酸抗性菌 JSF4-JB1(见表 4),其辅酶  $Q_{10}$  产量分别达 24.82 mg/L 及 27.28 mg/L,较 JSF4-J8 菌株分别提高了 21% 和 33%。实验结

果表明,选育 D-酪氨酸和对氨基苯丙氨酸抗性突变株,均有利于解除终产物对 DAHP 合成酶的反馈抑制作用,提高辅酶  $Q_{10}$  产量。其中苯丙氨酸抗性对三孢布拉氏霉辅酶  $Q_{10}$  的产量影响比较大,说明在三孢布拉氏霉的 HMP 途径中,苯丙氨酸支路较强。另外苯丙氨酸是辅酶  $Q_{10}$  中醌环的前体,选育其抗性,不仅可以解除反馈抑制,而且可更多提供辅酶  $Q_{10}$  醌环合成的原料——对羟基苯甲酸,因此我们认为对于三孢布拉氏霉来说,选育苯丙氨酸结构类似物抗性更有利于提高辅酶  $Q_{10}$  的产量。

表4 抗性菌株的辅酶  $Q_{10}$  产量

Tab. 4 The Co $Q_{10}$  production of the resistant mutants

| 菌号       | 抗性标记   |       |         | Co $Q_{10}$ 产量/(mg/L) | 比对照提高的百分率/% |
|----------|--------|-------|---------|-----------------------|-------------|
|          | L-甲硫氨酸 | D-酪氨酸 | 对氨基苯丙氨酸 |                       |             |
| JSF4(对照) | -      | -     | -       | 14.05                 |             |
| JSF4-J8  | +      | -     | -       | 20.51                 | 46          |
| JSF4-JD5 | +      | +     | -       | 24.82                 | 76.7        |
| JSF4-JB1 | +      | -     | +       | 27.28                 | 94.2        |

注:表中“+”表示带抗性标记;“-”表示不带抗性标记。

### 3 结论

1) 三孢布拉氏霉能够合成辅酶  $Q_{10}$ ,其合成途径是遵循辅酶  $Q_{10}$  经典生物合成途径的。

2) 三孢布拉氏霉正株合成辅酶  $Q_{10}$  的能力较负株高,且正负菌株以 5:1 混合培养时,辅酶  $Q_{10}$  产量最高。

3) 以 L-甲硫氨酸作为 IPP 的结构类似物,选育其抗性菌株,可以增加辅酶  $Q_{10}$  的合成原料 IPP 的供给。以 D-酪氨酸和对氨基苯丙氨酸作为 L-酪氨酸及 L-苯丙氨酸的结构类似物,选育其抗性菌株,可以解除三孢布拉氏霉芳香环合成途径中终产物对 DAHP 合成酶的反馈抑制,增加醌环的原料供给,进而提高辅酶  $Q_{10}$  产量。

4) 本实验筛选到了一株 L-甲硫氨酸抗性菌 JSF4-J8,其辅酶  $Q_{10}$  产量达 20.51 mg/L,比出发菌株 JSF4 提高了 46%。在此基础上,又增加了 D-酪氨酸和对氨基苯丙氨酸抗性标记,得到了具双重抗性标记(L-甲硫氨酸和 D-酪氨酸或对氨基苯丙氨酸)的突变株 JSF4-JD5 及 JSF4-JB1,其辅酶  $Q_{10}$  产量分别达 24.82 mg/L 及 27.28 mg/L,较菌株 JSF4-J8 分别提高了 21% 和 33%,而较原始菌株 JSF4 产量分别提高了 76.7% 及 94.2%。

## 参考文献:

- [1] 魏述众. 生物化学[M]. 北京:中国轻工业出版社,1996:208.
- [2] 王根华,钱和,肖刚. 发酵菌体中辅酶 Q<sub>10</sub>的提取及其测定方法[J]. 无锡轻工大学学报,2003,22(2):59-62.
- [3] 柴瑞震,姜仕华. 中国药品检验标准规范与药品质控工作法规全书[M]. 成都:成都科技大学出版社,1995:620.
- [4] Dandedar S, Modi VV, Jani UK. Chemical regulators of carotenogenesis by *Blakeslea trispora*[J]. **Phytochemistry**,1980,19:795-798.
- [5] 吴祖芳,翁佩芳. 辅酶 Q<sub>10</sub>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,2001,27(7):49-53.
- [6] 杨宁. 发酵法生产 $\beta$ -胡萝卜素的研究进展[J]. 食品研究与开发,2004,25(3):19-21.
- [7] Goodwin T W. The biochemistry of the carotenoids[M]. London:Chapman and Hall,1980.
- [8] 张克旭,陈宁. 代谢控制发酵[M]. 北京:中国轻工业出版社,1998:320.

(责任编辑 杨萌)

(上接第60页)

## 参考文献:

- [1] 赵希荣,夏文水. 二元取代壳聚糖季铵盐的制备和表征[J]. 食品与生物技术学报,2005,24(1):36-42.
- [2] 沈萍,范秀容,李广武. 微生物学实验[M]. 北京:高等教育出版社,1999.
- [3] 杨革. 微生物学实验教程[M]. 北京:科学出版社,2004.
- [4] 祖若夫,胡宝龙,周德庆. 微生物学实验教程[M]. 上海:复旦大学出版社,1993.
- [5] 张桂芝. 食品防腐剂的分子结构和抗菌活性的关系[J]. 新疆农业科学,2004(41):42-44.
- [6] Kim Y H, Choi H M, Yoon J H. Synthesis of a quaternary ammonium derivative of chitosan and its application to a cotton antimicrobial finish[J]. **Text Res J**,1998,68(6):428-434.
- [7] 宁正祥,谭龙飞,张德聪,等.  $\alpha$ 、 $\beta$ -不饱和羰基化合物量子化学结构特征与抗菌活性关系研究[J]. 应用化学,1996,13(1):38-42.
- [8] 郭志强. 烷基氯化铵季铵盐的抗菌活性研究[J]. 日用化学品科学,2004,27(2):20-22.

(责任编辑 朱明)