

## 营养条件和流加发酵对放射型根瘤菌 (*Rhizobium radiobacter*)产辅酶 Q<sub>10</sub>的影响

吴祖芳<sup>1,2</sup> 堵国成<sup>1</sup> 陈 坚<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>(江南大学教育部工业生物技术重点实验室,无锡 214036)

<sup>2</sup>(宁波大学生命科学与生物工程学院,宁波 315211)

**摘 要** 利用放射型根瘤菌 WSH2601(*Rhizobium radiobacter* WSH2601)重点考察了葡萄糖、蔗糖、玉米浆和蛋白胨、添加物以及流加发酵对细胞生长和产辅酶 Q<sub>10</sub>的影响。结果表明,葡萄糖和蔗糖适合于生产辅酶 Q<sub>10</sub>的最佳浓度分别为 30 g/L 和 40 g/L,辅酶 Q<sub>10</sub>发酵时玉米浆和蛋白胨的最适浓度分别为 11 g/L 和 16 g/L;添加蕃茄汁、玉米浆能提高发酵液生物量,玉米浆、异戊醇、L-甲硫氨酸等能促进辅酶 Q<sub>10</sub>的积累;与分批发酵相比,在 7L 罐上流加蔗糖其细胞生物量(DCW)和辅酶 Q<sub>10</sub>积累量增加,若在流加蔗糖的同时流加适当浓度的玉米浆能显著提高辅酶 Q<sub>10</sub>的产量,最大产量达到 52.4 mg/L,最大生物量(DCW)和胞内辅酶 Q<sub>10</sub>含量(C/B 值)分别达到 26.4 g/L 和 2.38 mg/g-DCW,比不流加的分批发酵分别提高 53% 和 33%,比只流加蔗糖分别提高 24% 和 26%。

**关键词** 辅酶 Q<sub>10</sub> 放射型根瘤菌 营养条件 流加发酵

中图分类号 Q935 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)02-0212-05

辅酶 Q<sub>10</sub> 结构上属于醌式并带有异戊烯基侧链的醌类化合物,在动植物、微生物细胞内与线粒体内膜相结合,是生物细胞能量代谢的重要物质之一,又类似于脂溶性维生素的功能;关于辅酶 Q<sub>10</sub> 的许多重要功能已有较多文献报道<sup>[1,2]</sup>。作为药物的辅酶 Q<sub>10</sub> 由微生物发酵法生产其性能优于化学合成法,酵母菌、假单胞菌和土壤杆菌属等多种微生物可生产辅酶 Q<sub>10</sub><sup>[3,4]</sup>;本试验利用研究室保藏的一株放射型根瘤菌 WSH2601 作为生产菌株,在实验室摇瓶发酵条件研究的基础上,进一步在 7L 发酵罐上对辅酶 Q<sub>10</sub> 发酵生产的营养条件、流加策略进行优化,提出在分批发酵初期采用葡萄糖作碳源来提高细胞生长量,然后混合流加蔗糖和玉米浆提高辅酶 Q<sub>10</sub> 产率的流加策略,同类研究国内外未见文献报道。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材 料

1.1.1 菌种 放射型根瘤菌 WSH2601(*Rhizobium radiobacter* WSH2601),江南大学生物工程学院环境生

物技术研究室保存。

1.1.2 培养基 斜面 and 种子培养基:葡萄糖 2%,蛋白胨 1%,酵母膏 1%,氯化钠 0.5%,斜面培养基另加琼脂 2%,pH 7.2;发酵基本培养基:葡萄糖 2%,蛋白胨 1%,酵母膏 1%,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05%,Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.15%,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%,pH 7.0,121℃ 15min 灭菌。

#### 1.2 主要仪器设备

Agilent 1100 高压液相色谱仪(USA)(Zorbax SB-C18 柱 5 μm 250 mm×4.6 mm),7L 全自动控制发酵罐,配温度、pH 自动调节与溶氧显示系统,韩国产 HYG-II 回转式恒温调速摇瓶柜,上海产。

#### 1.3 方 法

1.3.1 菌种活化及液体种子的制备 将试验菌用接种环接入斜面培养基,30℃ 下静置培养 24 h,然后移接至种子培养基(装液量 50mL/250mL 锥形瓶),30℃ 培养 24 h 后得种子液,摇床转速 200 r/min。

1.3.2 摇瓶培养和流加发酵 按上述种子液以 6% 接种量,接入不同发酵培养基(装液量摇瓶 50mL/500mL,7L 发酵罐装液量 5L),30℃ 培养(摇床转速

200 r/min), 发酵终了时间如无特别说明为 54 h。发酵液 pH 通过 3 mol/L NaOH 或 HCl 自动调节在 6.90 ~ 7.10, 通风量为 6 L/min, 搅拌转速 350 r/min。流加发酵为第 22 h 开始流加, 流加 10 h; 蔗糖流加速度以每升每小时克蔗糖表示, 记 g/(L·h), 蔗糖配成 250 g/L 的溶液流加。

#### 1.4 分析方法

葡萄糖和蔗糖的测定: 蒽酮法。细胞干重(DCW)的测定: 一定量的发酵液(20 mL)经 6000 r/min 离心 15 min 后倾去上清液, 去离子水洗 2 次, 菌泥经 80 °C 干燥至恒重后称重。辅酶 Q<sub>10</sub> 提取及含量的测定按文献<sup>[5]</sup>报道的方法进行, 细胞中辅酶 Q<sub>10</sub> 含量大小由 C/B 值(单位: mg CoQ<sub>10</sub>/g-DCW, 简写: mg/g)表示。

## 2 实验结果

### 2.1 初始葡萄糖和蔗糖浓度对辅酶 Q<sub>10</sub> 发酵的影响

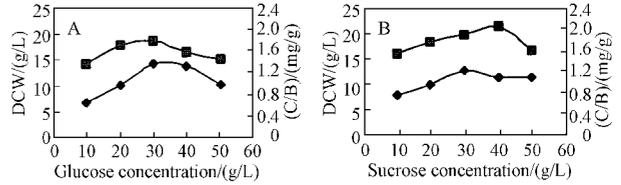
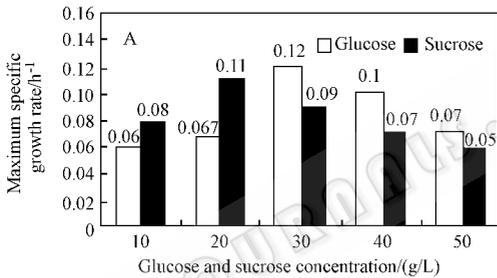


图 1 摇瓶条件下初始葡萄糖和蔗糖浓度对细胞生长与辅酶 Q<sub>10</sub> 合成的影响

Fig. 1 Effects of initial glucose and sucrose concentration on cell growth and CoQ<sub>10</sub> production (A: glucose, B: sucrose) during shaking-flask incubation

◆ DCW; ■ C/B

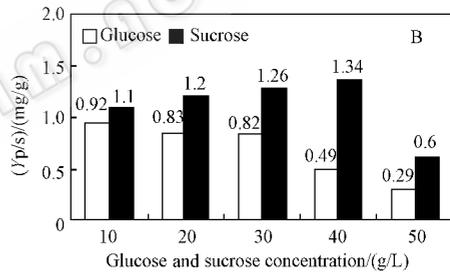


图 2 初始葡萄糖和蔗糖浓度对最大比生长速率( $\mu_{max}$ /h<sup>-1</sup>) (A) 和底物对产物的产率系数( $Y_{p/s}$ /mg/g) (B) 的影响

Fig. 2 Effects of initial glucose and sucrose concentration on  $\mu_{max}$  (A) and  $Y_{p/s}$  (B) during shaking-flask incubation

试验结果表明, 随着初始葡萄糖浓度的增大, 细胞生物量和辅酶 Q<sub>10</sub> 合成量增大, 当葡萄糖浓度为 30 g/L 时, 产量达 25.9 mg/L, 细胞干重最大达 14.4 g/L (图 1A), 且有最大的比生长速率( $\mu_{max}$ ) 为 0.12 h<sup>-1</sup> (图 2A), 底物对产物的产率系数( $Y_{p/s}$ ) 为 0.82 mg/g (图 2B); 蔗糖浓度为 30 g/L 时辅酶 Q<sub>10</sub> 产量达 23.9 mg/L, 辅酶 Q<sub>10</sub> 最高含量为 2.05 mg/g (DCW), 蔗糖浓度过高 (> 40 g/L) 对辅酶 Q<sub>10</sub> 合成的抑制作用明显,  $Y_{p/s}$  下降幅度较大, 蔗糖浓度在 20 g/L 时有较高的比生长速率。比较两种碳源的实验结果, 分别在最佳浓度条件下, 葡萄糖(30 g/L) 更适合于细胞生长而蔗糖(40 g/L) 有利于辅酶 Q<sub>10</sub> 的生物合成。

### 2.2 玉米浆(CSL) 蛋白胨对辅酶 Q<sub>10</sub> 发酵的影响

玉米浆含有嘌呤类、硫氮素、苯丙氨酸、缬氨酸等多种成分; 由碳氮源初步试验结果有机氮源好于

无机氮源, 于是在 30 g/L 葡萄糖下试验了起始玉米浆和蛋白胨浓度对辅酶 Q<sub>10</sub> 发酵的影响(图 3)。

试验结果表明, 玉米浆浓度在 11 g/L 时具最大的生物量和辅酶 Q<sub>10</sub> 合成量, 分别达 16.7 g/L 和 1.8 mg/g DCW, 分别比对照提高 60% 和 89% (图 3A); 在低浓度范围内, 随着蛋白胨浓度的提高, 细胞干重和辅酶 Q<sub>10</sub> 的合成总量增大, 其最适浓度为 16 g/L, 当蛋白胨浓度 (> 16 g/L) 对其辅酶 Q<sub>10</sub> 的生物合成总量下降(图 3B), 这与作者在研究氮源对碳源代谢的影响实验结果一致。

### 2.3 添加物及补加时间对辅酶 Q<sub>10</sub> 发酵的影响

玉米浆含有多种氨基酸(前已述)、维生素及矿物质等多种营养成分<sup>[6]</sup>, Han (2002) 等报道蕃茄汁对胡萝卜素(异戊烯类化合物) 的生物合成具明显的促进作用<sup>[7]</sup>, 按表 1 设计添加物及补入时间(分别为 0 h 和 36 h) 进行实验, 加量玉米浆(10 g/L), 蕃茄汁

(新鲜蕃茄榨汁,加 2 mL/100mL 发酵培养基),异戊醇(700 mg/L),L-甲硫氨酸和酪蛋白水解物(500 mg/

L),VB<sub>2</sub>(100 ug/L)和甲醇(5 g/L),比较对细胞生长与辅酶 Q<sub>10</sub> 合成的影响。

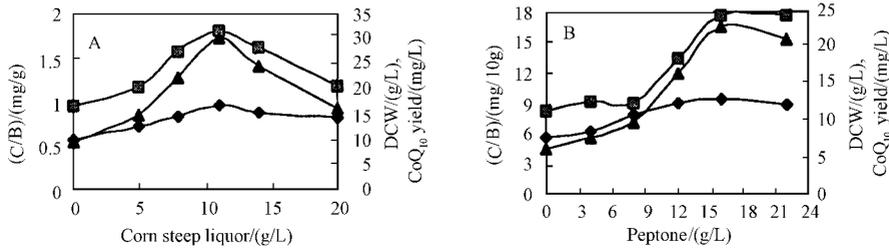


图 3 摇瓶条件下玉米浆(CSL)和蛋白胨浓度对放射型根瘤菌 WSH2601 生长与辅酶 Q<sub>10</sub> 合成的影响

Fig. 3 Effects of CSL and peptone concentrations on cell growth and CoQ<sub>10</sub> production during shaking-flask incubation (A) CSL, (B) peptone  
◆ DCW; ■ C/B; ▲ CoQ<sub>10</sub> yield

表 1 几种添加物及补入时间对放射型根瘤菌 WSH2601 细胞生长和产辅酶 Q<sub>10</sub> 的影响

Table 1 Effect of additives and time of addition on cell growth and CoQ<sub>10</sub> production

Additives	None	Isopentyl alcohol		Tomato juice		L-methionine		VB <sub>2</sub>		CSL		Casein hydrolysate		Methyl alcohol	
		0	28	0	28	0	28	0	28	0	28	0	28	0	28
DCW(g/L)	9.6	10.8	9.5	14.2	12.9	10.2	9.7	10.5	9.2	12.8	12.3	10.5	10.0	9.6	9.8
(C/B)(mg/g)	1.34	1.37	1.58	1.65	1.73	1.36	1.62	1.5	1.63	1.82	1.89	1.39	1.37	1.35	1.5
CoQ <sub>10</sub> yield(mg/L)	12.8	14.8	15.0	23.4	22.3	13.8	15.7	15.7	15.0	23.3	23.2	14.6	13.7	13.0	14.7

如表 1 所示,蕃茄汁对细胞生长促进作用最强;添加玉米浆能显著提高辅酶 Q<sub>10</sub> 的生物合成,其次为蕃茄汁、L-甲硫氨酸和 VB<sub>2</sub>;其中 L-甲硫氨酸、异戊醇、VB<sub>2</sub> 和甲醇的添加时间对辅酶 Q<sub>10</sub> 的合成量影响较大,酪蛋白水解物、甲醇对本试验菌的细胞生长与辅酶 Q<sub>10</sub> 的生物合成促进作用不明显。

2.4 以葡萄糖为碳源的间歇发酵过程曲线

为得到发酵残糖等参数的变化与细胞生长、辅酶 Q<sub>10</sub> 生物合成的关系,以决定流加发酵的操作方式,作者试验了以葡萄糖(30 g/L)作为发酵的起始碳源,测定 7L 罐间歇发酵过程曲线各参数的变化规律。

由图 4 结果,经发酵 20 h 后,其残糖已处于较低水平约 5 g/L,至 30 h 后残糖量基本不变,此时生长已进入稳定期,而辅酶 Q<sub>10</sub> 合成量保持增加趋势,至第 65 h 后,辅酶 Q<sub>10</sub> 合成量呈下降趋势;这是由于细胞生长环境的变化,其代谢产物形成所需营养物质的消耗,细胞代谢趋缓,辅酶 Q<sub>10</sub> 包括中间产物等的形成随之减少,所以间歇发酵至 70 h 前必须使发酵结束。

2.5 蔗糖-玉米浆混合流加发酵

葡萄糖和蔗糖对发酵影响的结果,葡萄糖能得

到更多的生物量,而蔗糖作碳源细胞内辅酶 Q<sub>10</sub> 的含量较高;于是笔者设计前期细胞培养采用葡萄糖作碳源,流加蔗糖来提高辅酶 Q<sub>10</sub> 产率的补料策略;考虑到细胞生长及代谢的需要必将消耗氮源,在流加蔗糖时同时补加不同比例的玉米浆,玉米浆一方面作为氮源提供细胞生长所需的氮,另一方面作为辅酶 Q<sub>10</sub> 合成的促进剂提高辅酶 Q<sub>10</sub> 生成量。通过蠕动泵控制蔗糖和玉米浆的流加速度,由 7L 罐发酵过程曲线残糖、DCW 和辅酶 Q<sub>10</sub> 积累的变化规律,决定由第 22 h 流加开始至第 32 h 结束,共流加 10 h,分别比较细胞生物量(DCW)和 C/B 值的变化规律。

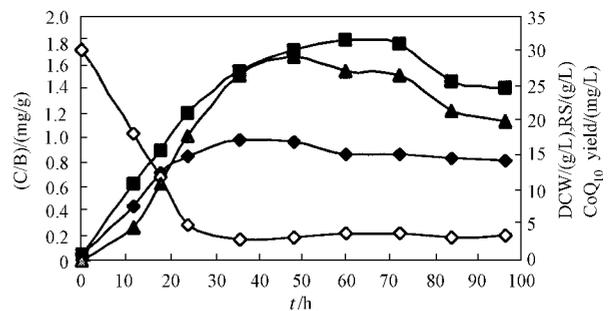


图 4 以葡萄糖为碳源在 7L 罐上的分批发酵过程曲线

Fig. 4 A batch culture curve of glucose as carbon source in 7 L fermentor

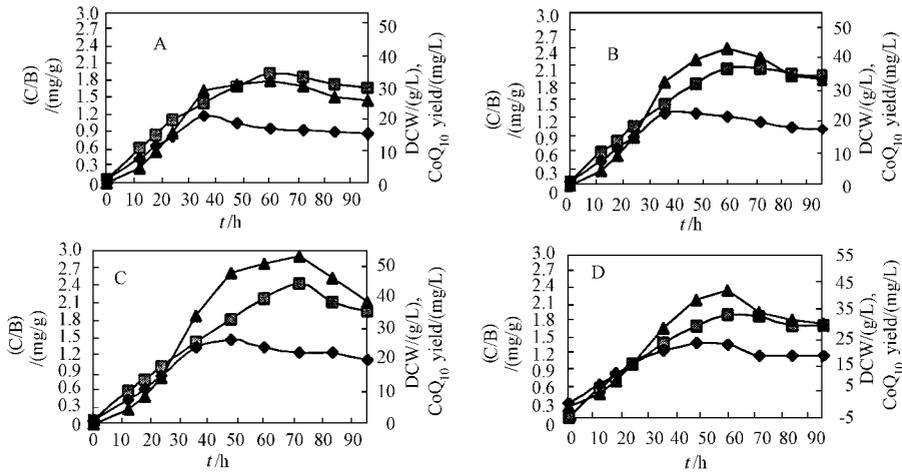


图5 蔗糖和玉米浆混合流加对辅酶 Q<sub>10</sub> 发酵 DCW 和 C/B 值的影响

Fig. 5 Effects of mixed feed of sucrose and CSL on DCW, C/B and CoQ<sub>10</sub> production

A. Sucrose only, 1.6 g (L/h) sucrose; B. 1.6 g (L/h) sucrose and 0.5 g (L/h) corn steep liquor; C. 1.6 g (L/h) sucrose and 0.5 g (L/h) corn steep liquor; D. 1.6 g (L/h) sucrose and 1.5 g (L/h) respectively. ◆ DCW; ■ C/B; ▲ CoQ<sub>10</sub> production

采用流加操作后(图5),在同一发酵时间内细胞生长量增加明显,只流加蔗糖至第36 h后DCW达21.3 g/L(图5A)比不流加蔗糖(DCW 17.2 g/L)提高23.8%,细胞生长持续时间延长,而达到最大辅酶 Q<sub>10</sub> 含量(C/B)时间差别不大,混合流加蔗糖与不同比例玉米浆(图5B、C和D)与只流加蔗糖相比,其细胞生长量及辅酶 Q<sub>10</sub> 的积累都有不同程度的提高,但过高的玉米浆加入量对辅酶 Q<sub>10</sub> 的积累不利(图5D),当玉米浆流加速率为1.0 g(L·h)具有最大的DCW和C/B值(图5C),两者分别为26.4 g/L和2.38 mg/g(DCW),比只流加蔗糖(图5A)分别提高24%和26%,但总的发酵时间延长,至第72 h后辅酶 Q<sub>10</sub> 积累量才达到最大值,该时产量为最高达52.4 mg/L。

### 3 讨论

在最适浓度下,葡萄糖与蔗糖对试验菌生长速度与辅酶 Q<sub>10</sub> 生物合成的差异,可能是不同碳源进入细胞的利用速度及不同碳源引起代谢途径流量变化的差别,从而对细胞生长与产物合成的影响不同<sup>[8]</sup>;两种碳源试验结果表明,起始葡萄糖或蔗糖浓度提高到一定值时都存在细胞生长及产物合成的阻遏效应,实验结果还表明,在一定起始糖浓度下最大比生长速率较高时并非能得到较高的产物积累量,这可能是细胞生长与产物合成阶段细胞内代谢调控机制不同。

添加物试验结果表明,L-甲硫氨酸、异戊醇、VB<sub>2</sub>等添加时间影响到辅酶 Q<sub>10</sub> 的生物合成量,这主要是

在辅酶 Q<sub>10</sub> 的生物合成代谢过程中起到前体物的作用<sup>[7,9]</sup>,而基质或代谢中间物(前体物等)浓度变化时可能引起细胞代谢流的变化,因此,终产物的形成受其添加物种类及补入时间的影响;另一方面,添加蕃茄汁、VB<sub>2</sub>、L-甲硫氨酸提高辅酶 Q<sub>10</sub> 生物合成量,又与异戊二烯化合物如胡萝卜素、聚异戊烯焦磷酸等生物合成紧密相关<sup>[9,10]</sup>,添加物试验表明,微生物在形成代谢产物特别是次级代谢产物的过程中,加入适量的代谢中间产物或产物直接前体物有利于提高目的产物量,酪氨酸与辅酶 Q<sub>10</sub> 中的芳香环及对羟基苯甲酸的合成途径有关,但本试验用酪蛋白水解物加入结果,对辅酶 Q<sub>10</sub> 的合成促进作用不明显;因玉米浆含有多种有效成分,对试验菌生长及辅酶 Q<sub>10</sub> 合成的影响机理有待深入研究。

分批发酵过程曲线证明,细胞生长对数期后辅酶 Q<sub>10</sub> 生物合成量继续增大,细胞生长与产物合成部分相偶联,由于细胞生长量达到较高值时(约22~24 h)其辅酶 Q<sub>10</sub> 的形成量继续增加,因此该时期也是流加碳源或辅酶 Q<sub>10</sub> 合成促进物质等的较好时期;流加量大小应根据糖浓度与产物等形成的关系来确定<sup>[11]</sup>。

图5的实验结果证实,蔗糖和适宜量玉米浆混合流加可使细胞生长和辅酶 Q<sub>10</sub> 的合成量达到最佳值(图5C),从而大大提高了辅酶 Q<sub>10</sub> 的发酵产量。而玉米浆流加过量虽细胞生长时间维持较长,但产物合成量并未增加(图5D),即流加蔗糖时同时流加玉米浆的量并非越多越好,可能是辅酶 Q<sub>10</sub> 合成期间

氮源过量对产物合成不利,即辅酶 Q<sub>10</sub> 发酵后期与氮源的利用无很大的相关特性,这一点与作者在前摇瓶条件下试验结果相一致;因此,适宜的流加策略(如控制比生长速率等参数)对提高生物量和辅酶 Q<sub>10</sub> 产量具有重要意义;由于流加操作使发酵时间延长,采用在发酵早期缩短细胞生长延滞期等各种措施很有必要;另外,由于溶氧对细胞生长与辅酶 Q<sub>10</sub> 的生物合成有较大的影响<sup>[3]</sup>,因此,在发酵罐上进行流加优化的同时结合溶氧控制策略有待下一步研究。

## REFERENCES (参考文献)

- [ 1 ] Gaby A R. part II . Cardiovascular disease , hypertension , diabetes mellitus and infertility . *Alt Med Rev* , 1996 , **1** :168 - 175
- [ 2 ] WU Z F (吴祖芳) , WENG P F (翁佩芳) , CHEN J (陈坚) . Advances of Coenzyme Q<sub>10</sub> function studies . *Journal of Ningbo university* (宁波大学学报) , 2001 , **14** ( 2 ) : 85 - 88
- [ 3 ] Kuratsu Y , Sakurai M , Hagino H *et al.* . Aeration-agitation effect on Coenzyme Q<sub>10</sub> production by *Agrobacterium* species . *J Ferment Technol* , 1984 , **62** ( 3 ) : 305 - 309
- [ 4 ] Natori Y , Nagasaki T , Kobayashi A *et al.* . Production of Coenzyme Q<sub>10</sub> by *Pseudomonas* N842 . *Agric Biol Chem* , 1978 , **42** ( 9 ) : 1799 - 1800
- [ 5 ] WU Z F (吴祖芳) , DU G C (堵国成) , CHEN J (陈坚) . Studies on purification and quantitative analysis of Coenzyme Q<sub>10</sub> in culture . *Journal of WUXI University of Light Industry* (无锡轻工大学学报) , 2002 , **4** : 420 - 423
- [ 6 ] Natori Y , Nagasaki T . Enhancement of Coenzyme Q<sub>10</sub> accumulation by mutation and effects of medium components on the formation of Coenzyme Q Homologs by *Pseudomonas* N842 and mutants . *Agric Biol Chem* , 1981 , **45** ( 10 ) : 2175 - 2182
- [ 7 ] Han Y S , van der Heijden R , Verpoorte R . Improved anthraquinone in cell cultures of *Cinchona* Robusta by feeding of biosynthetic precursors and inhibitors . *Biotechnology Letters* , 2002 , **24** : 705 - 710
- [ 8 ] Li K , Frost J W . Microbial synthesis of 3 - dehydroshikimic acid : a comparative analysis of D-xylose , L-arabinose , and D-glucose carbon sources . *Biotech Prog* , 1999 , **15** : 876 - 883
- [ 9 ] WU Z F (吴祖芳) , WENG P F (翁佩芳) , LI Y (李寅) *et al.* . The breeding ideas of CoQ<sub>10</sub> production by industrial fermentation and optimizing strategies of fermentation conditions . *Food and Fermentation Industries* (食品与发酵工业) , 2001 , **27** ( 7 ) : 49 - 53
- [ 10 ] Winrow M J , Rudney H . The biosynthesis of ubiquinone . In : McCormick D B and Wright L D . *Methods in Enzymology* , Academic press , New York , 1971 , **18** : 214 - 226
- [ 11 ] Oh D K , Cho C H , Kim S Y . Increased erythritol production in fed-batch cultures of by controlling glucose concentration . *J Industrial Microbiology and Biotechnology* , 2001 , **26** : 248 - 252

## Effects of Nutrient Conditions and Fed-batch Culture on CoQ<sub>10</sub> Production by *Rhizobium radiobacter* WSH2601

WU Zu-Fang<sup>1, 2</sup> DU Guo-Cheng<sup>1</sup> CHEN Jian<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

<sup>2</sup>(Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

**Abstract** The effects of the variables, including the concentrations of glucose, sucrose, corn steep liquor (CSL) and peptone, and the conditions of fed-batch culture, on CoQ<sub>10</sub> fermentation by *Rhizobium radiobacter* WSH2601 were assessed. The results showed that the optimum concentrations of glucose, sucrose, CSL and peptone were 30 g/L, 40 g/L, 11 g/L and 16 g/L respectively. Addition of CSL and tomato juice stimulated the cell growth. CSL, L-methionine and isopentyl alcohol efficiently increased the biosynthesis of CoQ<sub>10</sub>. In a 7L fermentor, the fed-batch culture improved both cell growth and CoQ<sub>10</sub> production compared to a batch culture; and suitable mixed feeding of CSL and sucrose enhanced CoQ<sub>10</sub> yield to 52.4mg/L. The DCW reached 26.4g/L, an increase of 53% in comparison to that without feeding, and an increase of 24% to that feeding with sucrose only. The C/B value reached 2.38mg/(g DCW), representing an increase of 33% to that of without feeding, and an increase of 26% to that of feeding with sucrose only.

**Key words** CoQ<sub>10</sub>, *Rhizobium radiobacter*, nutrient conditions, fed-fermentation

Received : 09-23-2002

This work was partially supported by Zhenjiang Quzhou Chemical Co. Ltd.

\* Corresponding author. Tel : 86-510-5888310 ; Fax : 86-510-5888310 ; E-mail : jchen@sytu.edu.cn