

紫罗酮和麦角固醇对酵母生长及产辅酶 Q₁₀ 的影响*

左智洁¹ 袁其朋^{1**}

(北京化工大学生命科学与技术学院 北京 100029)¹

摘要: 研究了 β-紫罗酮和麦角固醇对酵母生长及产辅酶 Q₁₀ 的影响。研究发现, β-紫罗酮能促进菌体积累辅酶 Q₁₀, 当培养基中 β-紫罗酮的添加量为 0.208×10^{-3} mol/L 时, 菌体中 CoQ₁₀ 的含量提高了 28.3%; 少量麦角固醇能促进菌体产辅酶 Q₁₀, 当麦角固醇的添加量为 0.15×10^{-4} mol/L 时, 菌体中 CoQ₁₀ 的含量提高了 31.8%, 而增加麦角固醇的添加量为 0.60×10^{-4} mol/L 时则会抑制菌体产辅酶 Q₁₀; 同时添加 β-紫罗酮和麦角固醇时, 菌体中 CoQ₁₀ 的含量提高了 36.1%。研究结果表明, β-紫罗酮和麦角固醇能有效地促进菌体产辅酶 Q₁₀, 这为发酵法生产辅酶 Q₁₀ 提供了一条新的研究思路。

关键词: 辅酶 Q₁₀, β-紫罗酮, 麦角固醇

中图分类号: TS202.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 05-0089-06

The Influence of Ionone and Ergosterol on the Growth and the Yield of CoQ₁₀ in Yeast*

ZUO Zhi-Jie YUAN Qi-Peng**

(College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029)

Abstract: The influence of β-ionone and ergosterol on the growth and the yield of CoQ₁₀ in yeast was investigated. The results indicated that β-ionone had the stimulative effect on the biosynthesis of CoQ₁₀ in yeast, and 28.3% increase of the CoQ₁₀ content in the cell was observed when the concentration of β-ionone in the medium was 0.208×10^{-3} mol/L. Little ergosterol also had the same effect with β-ionone, while 31.3% increase of the CoQ₁₀ content in the cell was observed when the concentration of ergosterol in the medium was 0.15×10^{-4} mol/L. However, the biosynthesis of CoQ₁₀ was inhibited when the concentration of ergosterol was 0.60×10^{-4} mol/L. Addition of β-ionone and ergosterol to the medium resulted in 36.1% increase over the control. The results showed that the cell could effectively accumulate more CoQ₁₀ with the addition of β-ionone and ergosterol to the medium.

Key words: Coenzyme Q₁₀, β-ionone, Ergosterol

辅酶 Q (Coenzyme Q, CoQ) 是一类脂溶性醌类化合物, 是细胞自身产生的天然抗氧化剂和细胞代谢激活剂, 主要存在于细胞的线粒体中, 在氧化磷酸化和氧化还原反应的酶系中起着重要的作用。人体中所含的为 CoQ₁₀, 近年来的研究表明, CoQ₁₀ 在医学上具有许多重要功能^[1], 目前 CoQ₁₀ 正被研究用于心脏、肌肉和肝脏等方面的疾病的治疗。

从化学结构^[2]上看, CoQ 以醌环为核心, 连上一个聚异戊烯侧链。因此, CoQ 的合成分成两部分, 即醌环的合成及异戊烯侧链的合成^[2-5]。酵母中, 合成异戊烯侧链的前体物是通过甲羟戊酸途径^[2, 3]合成的, 因此, 甲羟戊酸途径代谢通量的变化将直接

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 20576010)

** 通讯作者 Tel (Fax): 010-64437610, E-mail: yuanqp@mail.buct.edu.cn

收稿日期: 2006-01-05, 修回日期: 2006-02-20

影响 CoQ₁₀ 的生物合成。β-胡萝卜素和 CoQ₁₀ 具有类似的甲羟戊酸途径^[6]，Dandekar 等^[7]的研究显示，紫罗酮能促进甲羟戊酸激酶的活性，有效提高菌体中 β-胡萝卜素的含量；另外，Weinberger 等^[8]发现在酵母细胞中，固醇类对甲羟戊酸途径具有调控作用。在生物合成 CoQ₁₀ 中，尚未见到有通过调控甲羟戊酸途径代谢通量以增加 CoQ₁₀ 含量的报道，本文以粟酒裂殖酵母为研究对象，通过添加 β-紫罗酮和麦角固醇，考察了其对于酵母菌生长及产辅酶 Q₁₀ 的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种：粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe* Linder)。

1.1.2 试剂：CoQ₁₀ 标准品由 Sigma 公司提供，其它为分析纯试剂或商业用产品。

1.1.3 斜面培养基：麦芽汁琼脂培养基；种子培养基：葡萄糖 20g，蛋白胨 3g，酵母浸粉 3g，定容至 1L，自然 pH 值；发酵培养基：葡萄糖 40g，蛋白胨 12.5g，酵母浸粉 12.5g，K₂HPO₄ 0.5g，KH₂PO₄ 0.5g，MgSO₄·7H₂O 0.3g，定容至 1L，自然 pH 值。在 250mL 锥形瓶中倒入 50mL 培养基，于 0.7 × 10⁵ Pa 条件下灭菌 30min。

1.1.4 培养条件：从斜面上挑取菌落接入种子培养基中，培养 24h，然后接入基本培养基中，接种率为 5%。放入恒温摇床中，30°C、180r/min 条件下发酵培养 96h。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞生物量的测定：发酵液稀释后以空白培养基为参比液，用分光光度计在 550nm 下测定 OD 值，查标准曲线，即得细胞生物量。

1.2.2 CoQ₁₀ 的提取^[9,10]：摇床培养结束后，取 300mL 发酵液在 4,000r/min 条件下离心 10min 后，收集菌体，用去离子水洗涤两次，放入蒸馏瓶中，加入 2.0g 联苯三酚，1.6g 氢氧化钠，19mL 甲醇，7mL 去离子水，90°C 下回流 1h，在自来水下迅速冷却，然后加入 50mL 正己烷萃取，静置分层，取上清液，将剩余部分再萃取一次，合并上清液，用去离子水洗涤两次，45°C 真空干燥，得橙黄色油状物，即是 CoQ₁₀ 粗品。

1.2.3 CoQ₁₀ 的检测：用高效液相色谱进行检测，C18 柱，紫外检测器，检测波长 275nm，流动相为：正己烷：甲醇 (V:V) = 20:80，流速：1.5mL/min。

2 结果与讨论

2.1 β-紫罗酮对酵母菌生长及产 CoQ₁₀ 的影响

2.1.1 β-紫罗酮的添加量的影响：发酵开始前将 β-紫罗酮按以下浓度添加到发酵培养基中：0.208 × 10⁻³ mol/L、0.416 × 10⁻³ mol/L、0.624 × 10⁻³ mol/L、0.832 × 10⁻³ mol/L 和 1.040 × 10⁻³ mol/L。

如图 1 A 所示，添加 β-紫罗酮后，细胞生物量显著降低，这说明 β-紫罗酮对菌体生长有明显的抑制作用。β-紫罗酮的添加量对菌体产 CoQ₁₀ 的影响不同，当 β-紫罗酮的添加量为 0.208 × 10⁻³ mol/L 时，菌体生物量及菌体中 CoQ₁₀ 的含量最高。与空白（即 β-紫罗酮的添加量为 0）相比，细胞生物量降低了 37.6%，而菌体中 CoQ₁₀ 的含量则提高了 28.3%。因此，可以确定 β-紫罗酮的最佳添加量为 0.208 × 10⁻³ mol/L，这时细胞中 CoQ₁₀ 的含量为 0.212mg/g。

2.1.2 紫罗酮的添加时间对菌体生长及产 CoQ_{10} 的影响: 根据酵母的生长特点, 选取了0h、12h、24h、36h、48h 5个时间点来研究紫罗酮的添加时间对菌体生长及菌体产 CoQ_{10} 的影响。

如图1 B所示, 菌体进入稳定生长期(发酵培养进行到24h后, 细胞逐渐进入稳定生长期)后, 添加 β -紫罗酮对菌体生长影响较小或几乎没有影响; 在菌体的对数生长期(发酵培养的前24h为细胞的对数生长期)添加 β -紫罗酮则对菌体生长产生显著的抑制作用。比较菌体中 CoQ_{10} 的含量, 在所考察的时间点, 添加 β -紫罗酮均能刺激菌体积累 CoQ_{10} , 特别是 β -紫罗酮的添加时间为12h时对促进菌体积累 CoQ_{10} 最有效, 这时细胞中 CoQ_{10} 的含量达到了0.276mg/g。

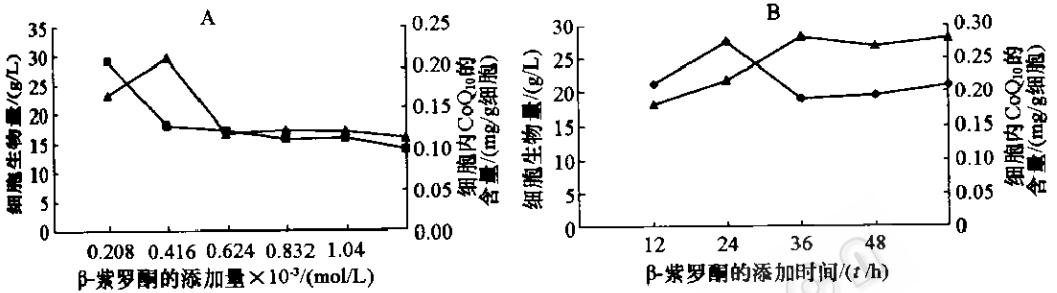


图1 β -紫罗酮对酵母生长及 CoQ_{10} 含量的影响

A β -紫罗酮的添加量的影响, B β -紫罗酮的添加时间的影响

—■— 细胞生物量, —▲— 细胞内 CoQ_{10} 的含量, —▲— 细胞生物量, —■— 细胞内 CoQ_{10} 的含量

2.1.3 讨论: 三孢布拉氏霉菌 (*Blakeslea trispora*) 和粟酒裂殖酵母在甲羟戊酸途径的代谢方面遵循相同的规律^[6]。Dandekar 等^[7] 研究发现, 培养基中添加 β -紫罗酮后, β -胡萝卜素的含量比空白 (即不添加 β -紫罗酮) 提高了250%; 从本文的实验结果可知, 添加 β -紫罗酮后, CoQ_{10} 的含量仅提高了28.3%。 β -紫罗酮对粟酒裂殖酵母合成 CoQ_{10} 的促进作用远低于对三孢布拉氏霉菌合成 β -胡萝卜素的促进作用, 其中的原因可能是: 由于种属的差异, 甲羟戊酸途径中的甲羟戊酸激酶存在一定差异, 使得 β -紫罗酮对甲羟戊酸激酶的作用程度不同; 在三孢布拉氏霉菌中, β -紫罗酮除了能有效提高甲羟戊酸激酶的活性外, 对合成 β -胡萝卜素的其它酶类也有一定的作用, 从而提高了整个 β -胡萝卜素生物合成途径的代谢效率, 因此, β -胡萝卜素的含量有大幅度提高, 而在粟酒裂殖酵母中, β -紫罗酮除了对甲羟戊酸激酶有促进作用外, 对合成 CoQ_{10} 的其它酶类作用较小或没有作用, 因此, 不能有效地提高 CoQ_{10} 生物合成途径的代谢效率, 因而, CoQ_{10} 含量的增加幅度不如 β -胡萝卜素高。上述所分析的原因缺乏相应的实验结果, 粟酒裂殖酵母的全基因序列已被公布, 在今后的研究工作中可根据其基因组的相关分析, 研究 CoQ_{10} 生物合成途径的中间代谢产物及其关键酶, 深入分析 β -紫罗酮和麦角固醇对促进粟酒裂殖酵母产 CoQ_{10} 的作用机制。

2.2 麦角固醇对酵母菌生长及产 CoQ_{10} 的影响

Goldstein 等^[11] 认为, 以甲羟戊酸为原料合成的固醇类化合物通过反馈抑制来实现对甲羟戊酸途径的调控。Weinberger 等^[8] 在酵母这样的单细胞中也发现了类似的固醇类对甲羟戊酸途径的反馈抑制调控, Hampton 等^[12, 13] 提出了酵母细胞调控甲羟戊酸途径中 HMG-CoA 还原酶的模型和机制。

2.2.1 麦角固醇的添加量对菌体生长及产 CoQ₁₀的影响: 培养基中添加麦角固醇后, 细胞生物量变化不大, 说明麦角固醇对菌体生长几乎没有影响 (图 2A)。麦角固醇的添加量分别为 0.15×10^{-4} mol/L、 0.30×10^{-4} mol/L、 0.45×10^{-4} mol/L、和 0.60×10^{-4} mol/L 时, 菌体中 CoQ₁₀ 的含量呈下降趋势, 在添加量为 0.15×10^{-4} mol/L 时, CoQ₁₀ 含量最高, 达到了 0.230 mg/g, 与空白 (即不添加麦角固醇) 相比, 菌体中 CoQ₁₀ 的含量提高了 31.8%; 而添加量为 0.60×10^{-4} mol/L 时 CoQ₁₀ 含量最低, 仅为 0.144 mg/g, 与空白相比, 菌体中 CoQ₁₀ 的含量降低了 17.6%。这说明在培养基中添加少量的麦角固醇能促进菌体积累 CoQ₁₀, 而增加麦角固醇的添加量则抑制了菌体产 CoQ₁₀, 降低了菌体中 CoQ₁₀ 的含量。

2.2.2 麦角固醇的添加时间对菌体生长及产 CoQ₁₀的影响: 选取了 0h、12h、24h、36h、48h 5 个时间点来研究麦角固醇的添加时间对菌体生长及产 CoQ₁₀ 的影响。

如图 2 B 所示, 在菌体的对数生长期, 添加麦角固醇, 菌体中 CoQ₁₀ 的含量降低; 而在菌体进入稳定生长期后, 添加麦角固醇, 菌体中 CoQ₁₀ 的含量呈上升趋势, 当麦角固醇的添加时间为 48h 时, CoQ₁₀ 含量最高, 达到了 0.247 mg/g, 这说明在菌体的稳定生长期添加麦角固醇能改善菌体的发酵特性, 使菌体有效地积累 CoQ₁₀。

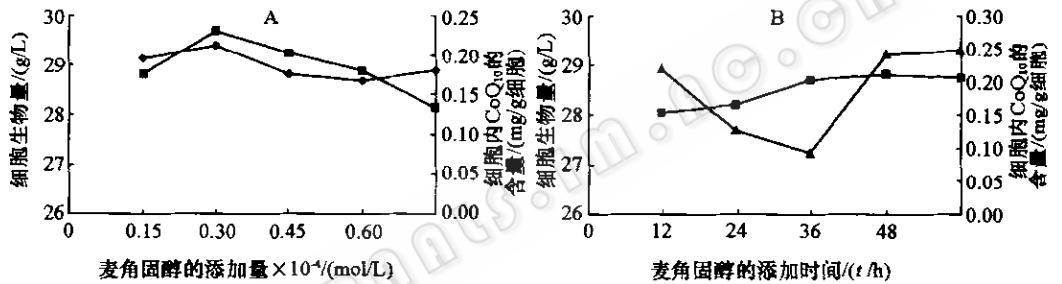


图 2 麦角固醇对酵母生长及 CoQ₁₀ 含量的影响

A 麦角固醇的添加量的影响, B 麦角固醇的添加时间的影响

◆ 细胞生物量, ■ 细胞内 CoQ₁₀ 的含量, ▲ 细胞生物量, ▲ 细胞内 CoQ₁₀ 的含量

2.3 β-紫罗酮和麦角固醇协同作用对酵母生长及产 CoQ₁₀的影响

上述实验结果表明, β-紫罗酮能有效地促进菌体积累 CoQ₁₀, 但会抑制菌体生长, 而麦角固醇能改善菌体的发酵特性。因此, 考察了 β-紫罗酮和麦角固醇的协同作用对酵母生长及产 CoQ₁₀ 的影响

2.3.1 β-紫罗酮和麦角固醇协同作用: β-紫罗酮和麦角固醇的添加条件如表 1 所示。

表 1 β-紫罗酮和麦角固醇的添加条件

实验组号	Y ₁	Y ₂	Y ₃	空白	
添加 β-紫罗酮	添加量 $\times 10^{-3}$ / (mol/L)	0.208	0.208	—	—
	添加时间 / (t/h)	12	12	—	—
添加麦角固醇	添加量 $\times 10^{-4}$ / (mol/L)	—	0.15	0.15	—
	添加时间 / (t/h)	—	48	48	—

如图 3 A 所示, Y₁、Y₂ 两组的细胞生物量与空白相比, 分别降低了 17.6% 和 8.1%, 而 Y₃ 组的细胞生物量与空白相比, 则提高了 2.9%, 该实验结果再次验证了 β-紫罗酮会抑制菌体生长, 而麦角固醇对菌体生长几乎没有影响; Y₁ 和 Y₂ 两组比较发现,

后者的细胞生物量比前者的提高了11.6%，这说明培养基中同时添加 β -紫罗酮和麦角固醇时，能有效地改善菌体生长。如图3B所示，Y₁、Y₂、Y₃三组CoQ₁₀的含量与空白相比，分别提高了72.7%、36.1%、30.5%；Y₁和Y₂两组比较发现，Y₂组CoQ₁₀的含量比Y₁组降低了21.2%；Y₁和Y₃两组比较发现，Y₃组CoQ₁₀的含量比Y₁组降低了24.4%；Y₂和Y₃两组比较发现，Y₃组的CoQ₁₀的含量比Y₂组降低了4.1%；从该组实验数据来看，对于提高菌体中CoQ₁₀的含量，添加 β -紫罗酮最有效，其含量达到了0.290mg/g，其次是同时添加 β -紫罗酮和麦角固醇，其含量能达到0.228 mg/g，而添加麦角固醇时，尽管含量达到了0.219 mg/g，但其作用不如前两者对促进菌体积累CoQ₁₀的作用好；由于 β -紫罗酮会抑制菌体生长，而麦角固醇则能有效地改善菌体的生长，提高细胞生物量，因此，采用同时添加 β -紫罗酮和麦角固醇来提高菌体中CoQ₁₀的含量。

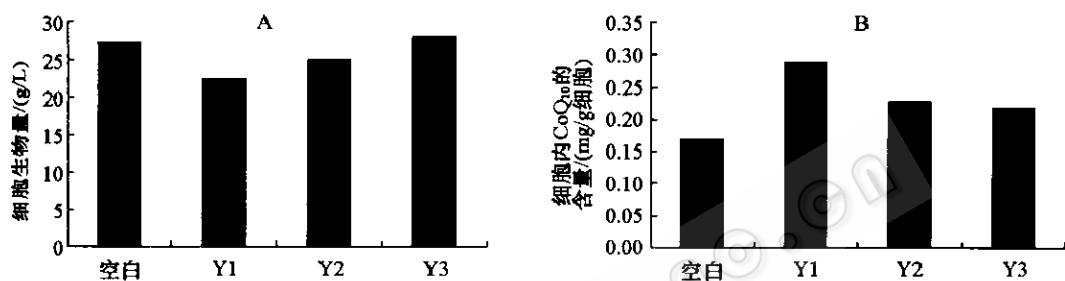


图3 添加物对菌体生长及CoQ₁₀含量的影响

A 细胞生物量的比较, B CoQ₁₀含量的比较

2.3.2 β -紫罗酮和麦角固醇添加条件的优化: 在菌体对数生长期, 将 β -紫罗酮添加到培养基中更有利于菌体积累CoQ₁₀, 提高细胞中CoQ₁₀的含量, 但会抑制菌体生长。因此, 进一步考察了对数生长期中, β -紫罗酮对菌体生长及产CoQ₁₀的影响。在生长时间分别为6h、12h、18h、24h添加 β -紫罗酮, β -紫罗酮添加量均为 0.208×10^{-3} mol/L, 麦角固醇的添加量为 0.15×10^{-4} mol/L, 麦角固醇的添加时间均为48h。

如图4A所示, 在生长时间分别为6h、12h、18h、24h时添加 β -紫罗酮后, 细胞生物量呈上升趋势, 这说明在发酵过程中添加 β -紫罗酮的时间越早对菌体生长的抑制作用越大。比较细胞中CoQ₁₀的含量可知, 当 β -紫罗酮的添加时间为18h时, CoQ₁₀含量比其它时间点的高, 含量达到了0.241 mg/g, 而细胞生物量仅比添加时间为24h时降低了2.6%。因此, β -紫罗酮的最佳添加条件为: 发酵培养到18h时添加 β -紫罗酮, 其添加量为 0.208×10^{-3} mol/L。

实验中还进一步考察了培养基中添加 β -紫罗酮后, 麦角固醇不同添加时间对菌体生长及产CoQ₁₀的影响。在生长时间分别为24h、36h、48h、60h添加麦角固醇, 麦角固醇的添加量均为 0.15×10^{-4} mol/L, β -紫罗酮的添加量均为 0.208×10^{-3} mol/L, β -紫罗酮的添加时间均为18h。

实验结果如图4B所示。培养基中添加麦角固醇后能有效地改善菌体生长, 且麦角固醇添加时间越早对菌体生长越有利。比较细胞中CoQ₁₀的含量可知, 当麦角固醇的添加时间为48h时, CoQ₁₀含量比其它时间点的高, 含量达到了0.237 mg/g。因此, 麦角固醇的最佳添加条件为: 发酵培养到48h时添加麦角固醇, 其添加量为 0.15×10^{-4} mol/L。

优化后 β -紫罗酮和麦角固醇的最佳添加条件见表2。

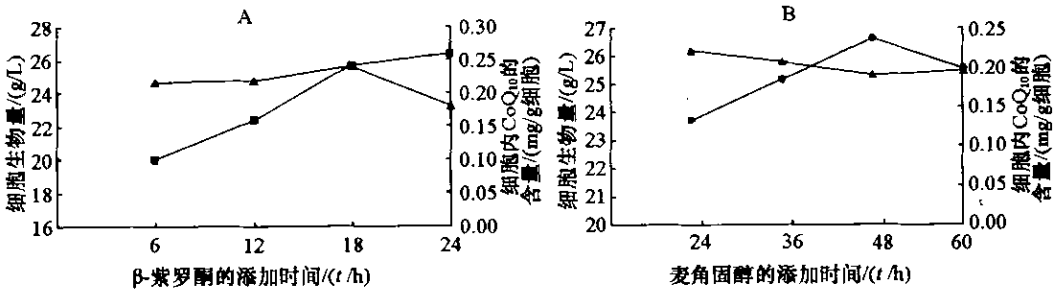


图4 紫罗酮和麦角固醇协同作用对酵母生长及 CoQ₁₀含量的影响

A β-紫罗酮的添加时间的影响, B 麦角固醇的添加时间的影响

—■— 细胞生物量, —▲— 细胞内 CoQ₁₀的含量, —▲— 细胞生物量, —●— 细胞内 CoQ₁₀的含量

表2 β-紫罗酮和麦角固醇的最佳添加条件

β-紫罗酮		麦角固醇	
添加时间/(t/h)	添加量/(mol/L)	添加时间/(t/h)	添加量/(mol/L)
18	0.208 × 10 ⁻³	48	0.15 × 10 ⁻⁴

3 结束语

研究了β-紫罗酮和麦角固醇对酵母菌生长及产CoQ₁₀的影响。结果表明,麦角固醇对菌体生长几乎没有影响,而β-紫罗酮则会抑制菌体生长;β-紫罗酮和麦角固醇均能有效地促进菌体积累CoQ₁₀,提高菌体中CoQ₁₀的含量,当培养基中分别添加β-紫罗酮、麦角固醇时,菌体中CoQ₁₀的含量分别为0.290 mg/g、0.219 mg/g,而同时添加β-紫罗酮和麦角固醇时,菌体中CoQ₁₀的含量为0.228 mg/g,这说明β-紫罗酮能有效地促进菌体积累CoQ₁₀,添加少量麦角固醇也可以促进菌体积累CoQ₁₀,而增加麦角固醇的添加量后则对菌体积累CoQ₁₀产生抑制作用,但添加麦角固醇后能有效地改善菌体生长,因此,发酵培养中采用同时添加β-紫罗酮和麦角固醇来提高菌体中CoQ₁₀的含量。

参考文献

- [1] 张 鸿, 吴玉荷. 医学卫生学分册, 2002, 29 (6): 370~373.
- [2] Catherine F. Clarke Protoplasma, 2000, 213: 134~147.
- [3] Meganathan R. FEMS Microbiology Letters, 2001, 203: 131~139.
- [4] Gustav D, Pavel J S. Free Radical Biology & Medicine, 2000, 29: 285~294.
- [5] Jin-Ho Choi, Yeon-Woo Ryu, Jin-Ho Seo. Appl Microbiol Biotechnol, 2005, 68, 9~15.
- [6] 罗健东, 管锦霞. 生命科学, 1999, 11 (5): 212~215.
- [7] Dandekar S, Modi V V, Jani U K. Biochemistry, 1980, 19: 795~798.
- [8] Weinberger C. TEM, 1996, 7 (1): 1~6.
- [9] 张延静, 袁其朋, 梁 浩. 微生物学通报, 2003, 30 (2): 65~69.
- [10] 欧阳平凯, 胡永红. 化工进展, 1994, 7 (4): 9~11.
- [11] Goldstein J L, Brown M S. Nature, 1990, 343: 425~430.
- [12] Hampton R, Dago D D, Rine J. TIBS, 1996, 21: 140~145.
- [13] Grabinska K, Palamarczyk G. FEMS Yeast Research, 2002, 2: 259~265.