

辅酶 Q₁₀ 超声波破碎法提取工艺条件研究*

李聚海, 岳田利, 袁亚宏

(西北农林科技大学 食品科学与工程学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘要] 为了获得超声波提取辅酶 Q₁₀ 的最佳工艺条件, 系统研究了利用超声波法提取时输出功率、每次辐射时间、工作总时间、水添加量等因素对细胞破碎和辅酶 Q₁₀ 提取效果的影响。结果表明, 超声波提取辅酶 Q₁₀ 的最佳工艺条件为: 输出功率 500 W, 每次辐射/ 间歇时间 12 s/ 10 s, 工作总时间 12 min, 水添加量 45 mL/ g; 采用优化的超声波提取工艺, 辅酶 Q₁₀ 提取量可达到 1.196 mg/ g。证明超声波破碎法提取辅酶 Q₁₀ 是可行的, 与未破壁提取、研磨法及反复冻融法提取效果相比, 辅酶 Q₁₀ 提取效果良好。

[关键词] 辅酶 Q₁₀; 超声波法; 细胞破碎; 提取工艺

[中图分类号] TS201.2+5

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)05-0207-05

Study on the technology of the coenzyme Q₁₀ extraction with ultrasonic cell-break method

LI J u-hai, YUE Tian-li, YUAN Ya-hong

(College of Food Science and Engineering, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: In order to obtain the optimal condition of ultrasonic cell-break method for coenzyme Q₁₀ extraction, the effect of output power, duration of radiation each time, total working time and amount of water on cell-wall disruption and coenzyme Q₁₀ extraction were systematically studied in this paper. The results showed that the optimal condition for coenzyme Q₁₀ extraction was as follows output power 500 W, radiation/intermission time 12 s/ 10 s, total working time 12 min, and amount of water 45 mL/ g; the quantity of coenzyme Q₁₀ extracted by ultrasonic cell-break method could reach 1.196 mg/ g under the optimal condition. It's proved that the method of the ultrasonic cell-break for extracting coenzyme Q₁₀ was feasible and more effective than the method of non-broken, grinding, freezing and melting repeatedly.

Key words: coenzyme Q₁₀; ultrasonic method; cell break; extraction technology

辅酶 Q₁₀ (Coenzyme Q₁₀, CoQ₁₀) 又称癸烯醌、泛醌, 广泛存在于动物、植物和微生物细胞内, 主要结合在线粒体内膜上, 构成呼吸链环节中的一个重要的递氢体。目前, 辅酶 Q₁₀ 作为多功能生化药物在临床上已有很多应用, 如用于心血管疾病、急慢性病毒性肝炎、亚急性肝坏死、坏血病、十二指肠溃疡、坏死性牙周炎、癌症、帕金森症等的治疗, 均取得了

一定的疗效^[1]。此外, 由于辅酶 Q₁₀ 还能大幅度改善人体细胞的用氧功能、营养功能和免疫增强功能, 能有效地深入皮肤, 激发细胞活性, 改善肤质, 滋润肌肤, 具有抗皮肤皱纹和延缓皮肤衰老的功效, 因而也被广泛应用于食品添加剂、化妆品等领域^[2-3]。

目前, 制备辅酶 Q₁₀ 多采用动植物组织提取法、微生物发酵法及化学合成法等^[4], 其中微生物发酵

* [收稿日期] 2006-12-22

[基金项目] “十一五”国家科技支撑计划项目(2006BA K02A24); 农业部科技跨越计划项目(2005-4.1); 2005 年教育部新世纪优秀人才支持计划项目; 陕西省科技重大专项(2006 KZ09- G1)

[作者简介] 李聚海(1982-), 男, 陕西凤翔人, 在读硕士, 主要从事食品生物工程技术研究。

[通讯作者] 岳田利(1966-), 男, 陕西宝鸡人, 教授, 博士生导师, 主要从事食品生物工程技术及食品安全学研究。

法在近几年发展较快,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,是最具发展潜力的生产方法^[5]。但由于辅酶 Q₁₀是微生物发酵所得的细胞内产物,故其提取过程中首先需要进行细胞破壁,因此细胞破碎是提取辅酶 Q₁₀的关键步骤之一,直接影响着辅酶 Q₁₀的生物活性、收率和成本。细胞破壁的方法很多,目前常用的有物理研磨法、化学溶解法等^[6],但其效果均不是十分理想,提取率低而成本太高。因此,寻找合适的细胞破碎方法具有十分重要的实际意义。本试验以此为出发点,对超声波的破壁效果及其影响因素进行了研究,分析了各因素对 Q₁₀提取效果的影响,优化了最佳破壁条件,旨为辅酶 Q₁₀的开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料与仪器

1.1.1 试验菌株 根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 1.2554,购自中国普通微生物菌种保藏中心。

1.1.2 培养基 斜面菌种培养基。即为甘露醇琼脂培养基; 种子培养基。含葡萄糖 10 g/L,蛋白胨 5 g/L,酵母膏 5 g/L,NaCl 5 g/L,pH 值 7.2; 发酵培养基。含葡萄糖 20 g/L,蛋白胨 10 g/L,酵母膏 10 g/L,磷酸二氢钾 0.5 g/L,磷酸氢二钾 0.5 g/L,MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L,pH 值 7.2。

1.1.3 试验试剂 石油醚等提取试剂均为分析纯,辅酶 Q₁₀标准品购自于美国 Serva 公司。

1.1.4 试验仪器 JY92-DN 超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司产品;真空冷冻干燥机,美国 SIM 公司产品;HWY-112 双层全温度培养摇床,上海智城分析仪器制造有限公司产品;PM180R 高速冷冻离心机,美国 SIM 公司产品;490 旋转蒸发器,BUCHI 公司产品;UV-2550 紫外可见分光光度计和 LC-2010A 高效液相色谱仪,均为日

本岛津公司产品。

1.2 试验方法

1.2.1 培养菌体 将 1 环生长良好的试管斜面种子,接入装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 锥形瓶中,30、180 r/min 往复摇床培养 24 h,然后取 5 mL 种子液加入装有 100 mL 发酵培养基的 250 mL 锥形瓶中,于 30、180 r/min 往复摇床培养 56 h。6 000 r/min 离心 20 min 收集菌体,真空冷冻干燥。

1.2.2 单因素试验 准确称取 0.5 g 干菌,在不同试验条件下进行细胞破碎,分别以破碎后上清液中的蛋白质含量和辅酶 Q₁₀提取量为测定指标,进行单因素试验以确定超声波输出功率、超声波每次辐射时间、超声波工作总时间、水添加量等因素对细胞破碎率和辅酶 Q₁₀提取量的影响。(1) 超声波输出功率。试验固定超声波每次辐射/间歇时间为 15 s/10 s,超声波工作总时间为 10 min,水添加量为 45 mL/g,分别以 100,200,300,400,500,600,700 W 输出功率进行细胞破碎;(2) 超声波每次辐射时间。试验固定超声波每次间歇时间为 10 s,在超声波输出功率为 500 W,超声波工作总时间为 10 min,水添加量为 45 mL/g 的条件下,超声波每次辐射时间分别为 5,10,15,20,25,30 s 进行细胞破碎;(3) 超声波工作总时间。在超声波输出功率为 500 W,超声波每次辐射/间歇时间为 15 s/10 s,水添加量为 45 mL/g 的条件下,分别设定超声波工作总时间为 5,10,15,20,25,30 min 进行细胞破碎;(4) 水添加量。选择超声波输出功率为 500 W,超声波每次辐射/间隙时间为 15 s/10 s,超声波工作总时间为 10 min,称取的干菌分别按 15,30,45,60,75,90 mL/g,添加蒸馏水进行超声波细胞破碎。

1.2.3 正交试验 在单因素试验的基础上,进行 4 因素 3 水平正交试验,采用 L₉(3⁴) 正交表,以辅酶 Q₁₀的提取量为考察指标。试验设计见表 1。

表 1 正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment

水平 Level	因素 Factors			
	输出功率/W Output power of ultrasonic	每次辐射时间/s Duration of radiation each time	工作总时间/min Total working time	水添加量/(mL·g ⁻¹) Amount of water
	A	B	C	D
1	450	12	8	35
2	500	15	10	45
3	550	18	12	55

1.2.4 超声波法破壁与常规破壁法的比较 在正交试验优化条件下,采用超声波法进行细胞破碎,并与研磨法和反复冻融法比较辅酶 Q₁₀的提取效果。

1.2.5 辅酶 Q₁₀的提取 将不同破壁条件下所获得的细胞碎片移入圆底烧瓶中,加入 2 mL 15 g/L 的焦性没食子酸溶液和 5 mL 100 g/L 的氢氧化钠

甲醇溶液,90 回流 30 min,迅速冷却,用 20 mL 石油醚萃取 3 次,静置分层,合并上清液用去离子水洗至中性,以无水硫酸钠脱水至澄清,用真空旋转蒸发仪(50)浓缩至干,挥发完后,加入无水乙醇 10 mL。放入冰箱冷冻,析出胆固醇,过滤,无水乙醇定容至 50 mL。待测。

1.2.6 细胞破碎率的测定 细胞破碎后,以 9 000 r/min 离心 15 min,取上清液,测定细胞破碎前后上清液中的蛋白质含量,通过其变化来估算细胞破碎率,并结合镜检选择最佳破碎条件。蛋白质浓度的测定采用考马斯亮蓝 G-250 法^[7],以牛血清蛋白为标准品。蛋白质含量用单位体积(mL)上清液中所含的蛋白质质量(mg)表示。

1.2.7 辅酶 Q₁₀ 含量的测定 单因素试验采用紫外分光光度法^[8]测定,正交试验采用 HPLC 法测定,色谱条件为:用甲醇与无水乙醇(体积比为 1 : 1)作流动相,体积流量为 1.0 mL/min,柱温 30 ,检测波长 275 nm。辅酶 Q₁₀ 含量由单位细胞干重(g)所含的辅酶 Q₁₀ 的质量(mg)表示。

2 结果与分析

2.1 超声波输出功率对细胞破碎率与辅酶 Q₁₀ 提取量的影响

由图 1 可见,超声波的输出功率对细胞破碎率及辅酶 Q₁₀ 提取效果有很大影响。输出功率过小,

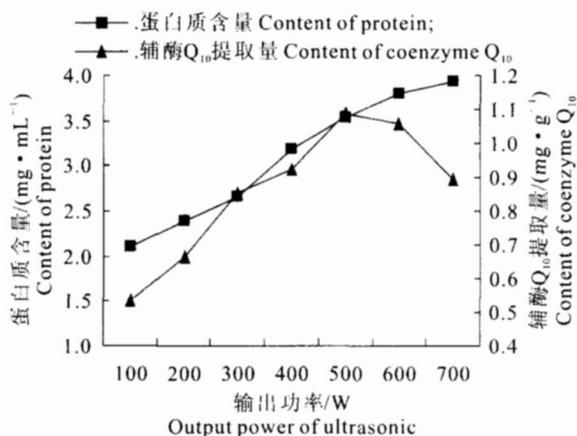


图 1 超声波输出功率对细胞破壁效果及辅酶 Q₁₀ 提取的影响

Fig. 1 Effect of output power of ultrasonic on the cell disruption and coenzyme Q₁₀ extraction

2.3 超声波工作总时间对细胞破碎率与辅酶 Q₁₀ 提取量的影响

由图 3 可见,随超声波工作总时间的增加,细胞破碎率随之提高,说明延长超声波工作总时间有利

细胞破碎不完全,辅酶 Q₁₀ 释放不充分;输出功率的增加有利于液体中空穴的形成,从而产生更多的空化泡,使破碎作用增强,但输出功率超过 500 W 后,由于超声波处理的空化作用引起细胞液局部的高温高压,使溶液产生了 H· 和 OH· 等自由基^[9],这些强氧化性的自由基使部分辅酶 Q₁₀ 发生氧化降解,从而导致辅酶 Q₁₀ 的提取量降低。因此,确定超声波破壁的最佳输出功率为 500 W。

2.2 超声波每次辐射时间对细胞破碎率与辅酶 Q₁₀ 提取量的影响

由图 2 可以看出,在其他几个因素水平均相同的情况下,每次辐射时间为 10 s 时,超声波破碎的效果最好。超声波通过空化效应破碎细胞的过程实际就是空化泡形成、振动、膨胀、压缩和崩溃闭合的过程,这一过程需要一段短暂的时间来完成,短时多次的工作方式能使超声波产生的空化泡,有足够的时间和更多机会完成膨胀和爆炸过程,因此有利于细胞的破碎^[10]。不过,每次辐射时间低于 10 s 时,破碎率反而会下降。这可能是由于辐射时间太短,超声波空化效应起不到爆裂破壁作用所致。辅酶 Q₁₀ 提取量在每次辐射时间为 15 s 时达到最大,而不是在细胞破碎程度最大时的 10 s 处,这是因为超声波空化效应越强,产生的活性氧也就越多,引起辅酶 Q₁₀ 氧化降解。因此,本试验选择 15 s/10 s 作为超声波的最佳辐射/间歇时间。

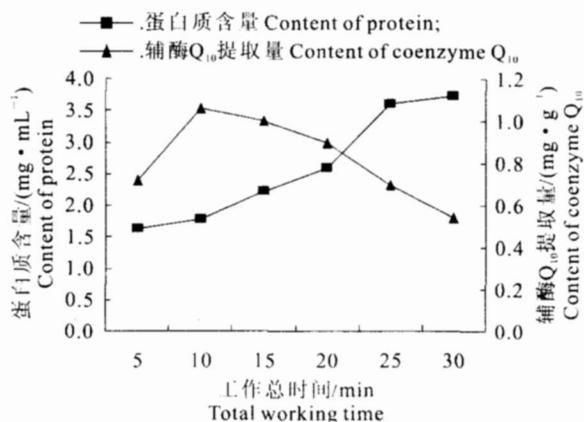


图 2 超声波每次辐射时间对细胞破壁及辅酶 Q₁₀ 提取的影响

Fig. 2 Effect of duration of radiation each time of ultrasonic on the disruption and coenzyme Q₁₀ extraction

于细胞破碎,但辅酶 Q₁₀ 的提取量并不随工作总时间的延长而持续增大。利用超声波法在 500 W 输出功率下,作用 10 min 基本达到了最大提取量,为 1.058 mg/g。而工作总时间超过 10 min 后,辅酶

Q_{10} 提取量随工作总时间的延长而急剧下降,这主要是由于破碎时间过长延长了辅酶 Q_{10} 与氧气、光的接触时间,导致辅酶 Q_{10} 降解。并且由于作用时间过长使细胞过于粉碎,导致大量蛋白和其他杂质被提取出来,增加了后续提取分离的难度,影响产品的纯度。因此,选用 10 min 作为最佳工作总时间。

2.4 水添加量对细胞破碎率与辅酶 Q_{10} 提取量的影响

由图 4 可以看出,当水添加量为 15 ~ 45 mL/g

时,随水添加量的增大,细胞浓度降低而有利于细胞破碎,这是因为细胞浓度越高,液体的粘稠度越大,可能不利于空化泡的形成及其膨胀和爆炸,导致破碎效果较差^[11]。但细胞浓度也不能太低,如水添加量超过 45 mL/g 时,破碎率降低,这可能是由于水添加量越大,超声波在水中传递的损失也就越大,破碎效果相应也就越差。因此,确定水的添加量为 45 mL/g,此时辅酶 Q_{10} 的提取量最大,为 1.057 mg/g。

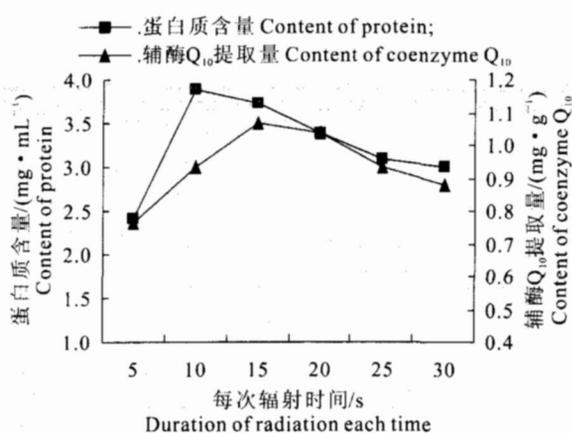


图 3 超声波工作总时间对细胞破壁及辅酶 Q_{10} 提取量的影响

Fig. 3 Effect of total working time of ultrasonic on the cell disruption and coenzyme Q_{10} extraction

2.5 辅酶 Q_{10} 提取工艺优化

超声波破碎法提取辅酶 Q_{10} 的正交试验结果见

表 2 超声波破碎法提取辅酶 Q_{10} 的正交试验结果

Table 2 Results of orthogonal experiment

试验号 Number of experiment	输出功率/W Output power of ultrasonic A	每次辐射时间/s Duration of radiation each time B	工作总时间/min Total working time C	水添加量/(mL·g ⁻¹) Amount of water D	辅酶 Q_{10} 提取量/ (mg·g ⁻¹) Content of coenzyme Q_{10}
1	1	1	1	1	0.962
2	1	2	2	2	0.831
3	1	3	3	3	0.936
4	2	1	2	3	1.000
5	2	2	3	1	1.187
6	2	3	1	2	0.983
7	3	1	3	2	1.001
8	3	2	1	3	0.830
9	3	3	2	1	0.607
K_1	2.729	2.963	2.776	2.756	
K_2	3.170	2.848	2.438	2.815	
K_3	2.438	2.526	3.124	2.766	
R	0.244	0.146	0.229	0.020	

由表 3 可见,输出功率、工作总时间对辅酶 Q_{10} 的提取效果均有极显著的影响,每次辐射时间与辅酶 Q_{10} 的提取效果间关系显著,而水添加量对辅酶

图 4 水添加量对细胞破壁及辅酶 Q_{10} 提取量的影响

Fig. 4 Effect of amount of water on the cell disruption and coenzyme Q_{10} extraction

表 2,试验结果的方差分析结果见表 3。

Q_{10} 提取效果的影响极小。各因素对辅酶 Q_{10} 提取效果的影响程度依次为输出功率 > 工作总时间 > 每次辐射时间 > 水添加量,综合各因素的 K 值并直接

比较可知, A₂B₁C₃D₂ 为最佳破碎条件, 即输出功率为 500 W, 每次辐射/ 间歇时间为 12 s/ 10 s, 工作总

时间为 12 min, 水添加量为 45 mL/ g。在此条件下, 辅酶 Q₁₀的提取量为 1.196 mg/ g。

表3 超声波破碎提取辅酶 Q₁₀的正交试验方差分析结果

Table 3 Results of variance analysis of the orthogonal experiment

变异来源 Origin of variance	平方和 Sum of square	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	显著性 Significant examination
输出功率 Output power of ultrasonic	0.090 55	2	0.045 28	136.239 7	**
每次辐射时间 Duration of radiation each time	0.034 21	2	0.017 10	51.467 4	*
工作总时间 Total working time	0.078 44	2	0.039 22	118.015 1	**
水添加量 Amount of water	0.000 66	2	0.000 33		
误差 Error	0.000 7	2	0.000 33		
总和 Sum	0.203 87				

注: $F_{0.01}(2,2) = 99.0$, $F_{0.05}(2,2) = 19.00$; *表示差异显著, **表示差异极显著。

Note: $F_{0.01}(2,2) = 99.0$, $F_{0.05}(2,2) = 19.00$; *is significant difference, **is greatly significant difference.

2.6 超声波破壁与常规破壁法的比较

超声法、研磨法和反复冻融 3 种方法对辅酶 Q₁₀的提取效果如图 5 所示。由图 5 可以看出, 超声波的提取效果最好, 达到 1.196 mg/ g, 较未破壁提高了 1.5 倍。其次为反复冻融法, 而研磨破碎法由于研磨时间相对较长, 在空气中接触氧气面积较大, 提取出来的辅酶 Q₁₀被氧化分解, 所以提取效果最差。

Q₁₀的提取量为 1.196 mg/ g。

2) 超声波破壁提取法与其他破壁方法相比, 具有提取效果好、实用性高、成本低、省时等特点。

3) 为了提高辅酶 Q₁₀的产量, 后续的研究工作可以在超声波与其他破壁手段结合方面展开深入、系统的研究。

[参考文献]

- [1] 张继忠, 迟莉丽, 沈亚领. 辅酶 Q₁₀的生产及其在医学领域中的应用[J]. 上海应用技术学院学报, 2004, 4(4): 301-305.
- [2] 吴祖芳, 翁佩芳. 辅酶 Q₁₀的功能研究进展[J]. 宁波大学学报: 理工版, 2001, 14(2): 85-88.
- [3] 韩少英, 奚洁, 周长林. 发酵法生产辅酶 Q₁₀的研究进展[J]. 药物生物技术, 2006, 13(3): 227-232.
- [4] 陈坚, 堵国成, 卫功元, 等. 微生物重要代谢产物——发酵生产与过程解析[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 128-130.
- [5] Yoshida H, Kotani Y, Ochiai K, et al. Production of ubiquinone-10 using bacteria [J]. J Gen Appl Microbiol, 1998, 44: 19-26.
- [6] 刘国途. 生物工程下游技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 65-73.
- [7] 李娟, 张耀庭, 曾伟. 应用考马斯亮蓝法测定总蛋白含量[J]. 中国生物制品学杂志, 2000, 13(2): 118-120.
- [8] 王根华, 钱和, 肖刚. 发酵菌体中辅酶 Q₁₀的提取及其测定方法[J]. 无锡轻工大学学报, 2003, 22(2): 59-63.
- [9] 欧阳琴, 陈兴才, 黄亚治. 雨生红球藻提取虾青素不同机械破壁方法的研究[J]. 福州大学学报: 自然科学版, 2005, 33(1): 111-115.
- [10] 吴克刚, 杨连生, 黄通旺. 超声波破碎 Thraustochytrium 提取脂质的研究[J]. 郑州工程学院学报, 2001, 22(4): 31-34.
- [11] 傅绍军, 李微, 朱利民. 瑞士乳酸杆菌摇瓶发酵条件及产酶条件优化[J]. 药物生物技术, 2005, 12(6): 361-365.

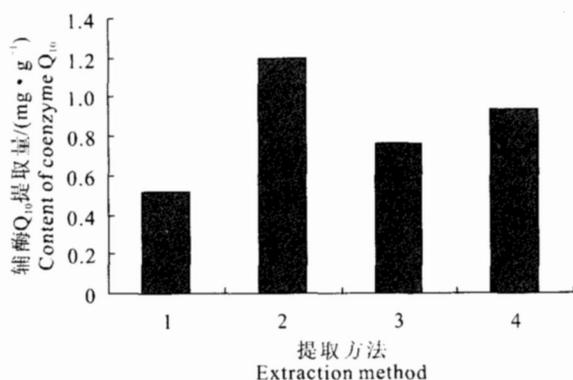


图5 不同提取方法辅酶 Q₁₀提取量的比较

1. 未破壁; 2. 超声波法; 3. 研磨法; 4. 反复冻融法

Fig. 5 Comparison of the extracted amount of coenzyme Q₁₀ between different extraction methods

1. Nonbroken; 2. Ultrasonic method; 3. Grinding method
4. Repeatedly freezing and melting method

3 结论与讨论

1) 通过正交试验确定超声波破壁法提取辅酶 Q₁₀的最佳工艺条件为: 输出功率为 500 W, 工作总时间为 12 min, 每次辐射/ 间歇时间为 12 s/ 10 s, 水添加量 45 mL/ g。在此条件下, 破壁后菌体中辅酶