

辅酶 Q₁₀ 产生菌的原生质体制备 与再生条件研究

王飞飞, 岳田利, 袁亚宏, 高振鹏

(西北农林科技大学 食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 【目的】选用辅酶 Q₁₀ 产生菌深红红螺菌和根癌土壤杆菌为出发菌株, 系统研究其原生质体制备和再生条件, 为辅酶 Q₁₀ 的工业化生产提供技术支持。【方法】从菌龄、溶菌酶质量浓度、酶解时间、酶解温度、高渗溶液的选择等, 对深红红螺菌和根癌土壤杆菌 2 株菌进行了原生质体制备和再生条件的研究。【结果】①根癌土壤杆菌原生质体制备和再生的适宜条件为: 菌龄 13.5 h, 高渗溶液为 0.8 mol/L NaCl, 溶菌酶质量浓度为 0.2 mg/mL, 酶解时间 75 min, 酶解温度 35 ℃; ②深红红螺菌原生质体制备和再生的适宜条件为: 菌龄 45 h, 高渗溶液为 0.5 mol/L 蔗糖 + 0.02 mol/L 的 MgCl₂ · 6H₂O, 溶菌酶质量浓度为 3 mg/L, 酶解时间 60 min, 酶解温度 37 ℃。【结论】得到了根癌土壤杆菌 AT-N10 和深红红螺菌 Rh1.5005 适宜的原生质体制备和再生条件。

[关键词] CoQ₁₀/辅酶 Q₁₀; 根癌土壤杆菌; 深红红螺菌; 原生质体制备; 再生条件

[中图分类号] Q813.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2009)03-0208-05

Study on preparation and regeneration of protoplasts from CoQ₁₀-yield strains

WANG Fei-fei, YUE Tian-li, YUAN Ya-hong, GAO Zhen-peng

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

Abstract: 【Objective】 Using *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhodospirillum rubrum* as original strains, the research studied the proper protoplast preparation and regeneration conditions for providing CoQ₁₀ scale-up process with technical support. 【Method】 The protoplast preparation and regeneration conditions of *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhodospirillum rubrum* were studied from strain age, enzyme concentration, enzymatic time, enzymatic temperature and the certain of hypertonic solution. 【Result】 ①The proper conditions of protoplast preparation and regeneration for *Agrobacterium tumefaciens*: 13.5 h aged, hypertonic solution 0.8 mol/L NaCl, enzymatic time 75 min, enzymatic temperature 35 ℃, enzymatic concentration 0.2 mg/mL; ②The proper conditions of protoplast preparation and regeneration for *Rhodospirillum rubrum*: 45 h aged, hypertonic solution 0.5 mol/L sucrose and 0.02 mol/L MgCl₂ · 6H₂O, enzymatic time 60 min, enzymatic temperature 37 ℃, enzymatic concentration 3 mg/L. 【Conclusion】 The proper conditions were obtained for protoplast preparation and regeneration of *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhodospirillum rubrum*. This would be the basis of protoplast fusion of these two strains.

Key words: CoQ₁₀/coenzyme Q₁₀; *Agrobacterium tumefaciens*; *Rhodospirillum rubrum*; protoplast preparation; regeneration of protoplast

* [收稿日期] 2008-04-10

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAK02A18, 2006BAK02A24, 2006BAK02A05); 农业科技跨越计划项目(2005-4); 教育部新世纪优秀人才支持计划项目(2005); 陕西省重大科技专项(2006KZ09-G1)

[作者简介] 王飞飞(1984—), 女, 河南焦作人, 在读硕士, 主要从事食品生物工程与食品安全控制研究。E-mail: wff12@126.com

[通信作者] 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与食品安全控制研究。

E-mail: yuetl@nwsuaf.edu.cn

辅酶 Q₁₀ 也称泛醌,是一种脂溶性的维生素或维生素类物质,也是一种有效的抗氧化物质和细胞代谢激活剂。其能防止细胞氧化衰老,增强心脏能量代谢,对免疫有特殊的增强作用,化工上常用于化妆品的生产,医学上常用于各种心血管疾病、脑血管障碍、急性肝炎等的治疗^[1-2]。辅酶 Q₁₀的常用制备方法有:动植物细胞提取法^[3]、植物细胞培养法^[4]、化学合成法^[5]和微生物发酵法^[6]。从提取材料来源和提取成本来看,生物组织提取法存在原料价格高、来源有限、辅酶 Q₁₀含量低等缺点,故不利于大规模工业化生产。化学合成法目前主要有侧链直接引入法、侧链延长法等,但都是用母核化合物与聚异戊二烯基化合物反应生成辅酶 Q₁₀,均具有反应步骤多、最终转化率低、副产品多、分离过程复杂、手性物质分离困难、产品活性低等缺点,另外,随着生活水平的提高,人们对纯天然产品的崇尚日益增加,化学合成药物已越来越不受欢迎。微生物发酵法中微生物细胞易于大规模培养生长,产品完全为天然的全反式构型,生物利用度高,较化学合成法安全、高效,产品中几乎无毒害化学物质残留,易于分离纯化,临床疗效较好,因此,近几年来微生物发酵法生产辅酶 Q₁₀一直是国内外研究的热点。迄今为止,国内外报道的只有 34 个属的微生物含有辅酶 Q₁₀,主要有光合细菌、酵母菌属(假丝酵母、尚德爾酒香酵母、隐球酵母等)和细菌属(主要有假单胞属、土壤杆菌属、红极毛杆菌、脱氮极毛杆菌、氢极毛杆菌等)等^[7-10]。在辅酶 Q₁₀的产生菌中,以光和细菌的产量最高,而土壤杆菌属的生物量非常大。为了获得生物量大又高产辅酶 Q₁₀的优良菌株,本研究选用深红红螺菌和根癌土壤杆菌为出发菌株,对其原生质体制备和再生条件进行了系统研究,以期为辅酶 Q₁₀的工业化生产提供技术支持。

1 材料和方法

1.1 菌种

根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*, AT)AT-N10,由西北农林科技大学食品科学与工程学院食品发酵动力学实验室保存;深红红螺菌 (*Rhodospirillum rubrum*, Rh)Rh1.5005,购自中国普通微生物菌种保藏中心。

1.2 培养基

1.2.1 根癌土壤杆菌 (1)活化培养基:甘露醇琼脂培养基^[11]。(2)种子培养基:葡萄糖 10 g,蛋白胨 5 g,酵母膏 5 g,NaCl 5 g,蒸馏水 1 L,pH 7.2。

(3)发酵完全培养基:葡萄糖 20 g,蛋白胨 10 g,酵母膏 10 g,KH₂PO₄ 0.5 g,K₂HPO₄ 0.5 g,MgSO₄·7H₂O 0.5 g,蒸馏水 1 L。(4)再生培养基:在发酵完全培养基的基础上加入一定浓度的高渗物质。

1.2.2 深红红螺菌 (1)活化培养基:胰蛋白胨 10 g,酵母粉 5 g,NaCl 10 g,蒸馏水 1 L,pH 7.4。(2)种子和发酵完全培养基^[12]:醋酸钠 1 g,琥珀酸钠 1 g,KH₂PO₄ 0.5 g,K₂HPO₄ 0.6 g,(NH₄)₂SO₄ 1 g,酵母膏 0.1 g,MgSO₄·7H₂O 0.2 g,NaCl 0.2 g,CaCl₂·2H₂O 0.05 g,Na₂S₂O₃·5H₂O 0.1 g,维生素混合物 1 mL,微量元素液 1 mL,蒸馏水 1 L,pH 6.7。(3)再生培养基:在种子和发酵完全培养基的基础上加入一定浓度的高渗物质。

1.3 试剂

1.3.1 高渗溶液以及预处理液 (1)预处理液:0.8 g/L 的 EDTA。(2)高渗溶液:0.6 mol/L 的 KCl,0.8 mol/L 的 NaCl,0.5 mol/L 的蔗糖 + 0.02 mol/L MgCl₂·6H₂O,0.6 mol/L 的 D-甘露醇以及 0.6 mol/L 的 D-山梨醇。

1.3.2 溶菌酶的配制 溶菌酶为美国 Amresco 公司生产,活力单位为 20 000 U/mg,由高渗溶液配制。溶菌酶配制后,超滤除菌,滤膜孔径为 0.45 μm。

1.4 原生质体的制备与再生

1.4.1 原生质体的制备 分别挑取 1 环根癌土壤杆菌和深红红螺菌斜面琼脂培养物,接种于活化培养基上,培养 2 d 后,从各自的活化培养基上取 1 环接种于装有液体种子培养基的 250 mL 三角瓶中,摇瓶装量为 100 mL,根癌土壤杆菌在 28 ℃、180 r/min,深红红螺菌在 30 ℃、180 r/min 条件下培养到细菌的对数生长前期后,将发酵液均分倒入离心管内,高速冷冻离心机 10 000 r/min 离心 15 min,倒掉上清液,无菌水洗涤 3 次,加入 EDTA 预处理液,一段时间后离心,无菌水再洗涤 3 次,加入酶液酶解,酶解后离心除酶,随即加入一定的高渗溶液,并将沉淀吸打均匀。放入 4 ℃冰箱中备用。

(1)生长曲线的测定。根癌土壤杆菌每隔 1 h 测量 600 nm 处的吸光度,培养 0~19 h;深红红螺菌每隔 4 h 测量 560 nm 处的吸光度,培养 0~48 h。

(2)高渗溶液。分别用 0.6 mol/L 的 KCl,0.8 mol/L 的 NaCl,0.5 mol/L 的蔗糖 + 0.02 mol/L MgCl₂·6H₂O,0.6 mol/L 的 D-甘露醇以及 0.6 mol/L 的 D-山梨醇作为 2 株菌的高渗溶液。

(3)菌龄。定期选取不同生长时期的 2 株菌进行制备率和再生率的比较。

(4)酶解时间。固定酶解温度和溶菌酶质量浓度,进行酶解时间试验。根癌土壤杆菌在 37 ℃、溶菌酶质量浓度为 2 mg/mL 的条件下进行,深红红螺菌在 37 ℃、溶菌酶质量浓度为 2 mg/L 的条件下进行。对于根癌土壤杆菌,在酶解进行到 30,60,120 和 180 min 时,对其原生质体制备率和再生率进行统计分析;对于深红红螺菌,在酶解进行到 20,30,50,70,120,150 和 180 min 时,对其原生质体制备率和再生率进行统计分析。

(5)酶解温度。固定酶解时间和溶菌酶质量浓度,进行酶解温度试验。酶解时间均参照酶解时间预试验结果,而溶菌酶质量浓度均固定为 2 mg/mL。对于根癌土壤杆菌,在 31,33,35,37 和 39 ℃时,对其原生质体制备率和再生率进行统计分析;对于深红红螺菌,在 32,34,36,38 和 40 ℃时,对其原生质体制备率和再生率进行统计分析。

(6)溶菌酶质量浓度。固定酶解时间和酶解温度,进行溶菌酶质量浓度试验。酶解时间和酶解温度分别参照酶解时间和酶解温度的预试验结果。细菌一般采用溶菌酶去壁,质量浓度为 0.02~0.5 mg/mL^[13]。对于根癌土壤杆菌,在酶解进行到 0.01,0.1,0.2 和 0.3 mg/mL 时,对其原生质体制

备率和再生率进行统计分析;对于深红红螺菌,在酶解进行到 1,2,3,4 和 5 mg/L 时,对其原生质体制备率和再生率进行统计分析。

1.4.2 原生质体的再生 再生培养采用双层平板培养法。已经形成的原生质体非常脆弱,在单层培养基上长势不佳。如果在平板下面先铺 1 层固体培养基,将原生质体(酶解后的菌体)溶解到半固体培养基中,然后再倒入固体培养基上,则比较容易生长。

1.5 原生质体制备率和再生率的测定

等量吸取菌株发酵液,用无菌水稀释后涂布于完全培养基上,48 h 后观察菌落数,记为 A;取酶解后的菌液,稀释到和酶解前菌液相同的倍数,分别涂布于完全培养基和再生培养基上,48 h 后观察菌落数,记为 B 和 C(A、B、C 菌落计数均做 3 个平行)。

$$\text{制备率}/\%=(A-B)/A\times 100\%;$$

$$\text{再生率}/\%=(C-B)/(A-B)\times 100\%。$$

2 结果与分析

2.1 菌株的生长曲线

由图 1 可知,根癌土壤杆菌在培养 7 h 后进入对数生长期,深红红螺菌在培养 18 h 后进入对数生长期。

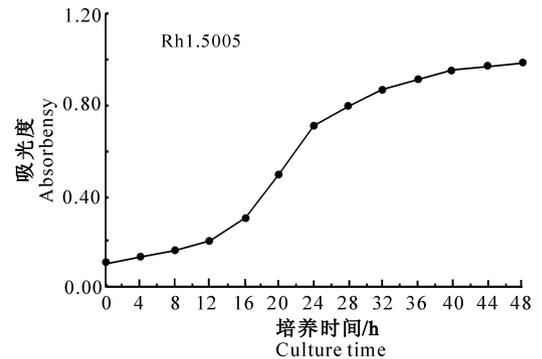
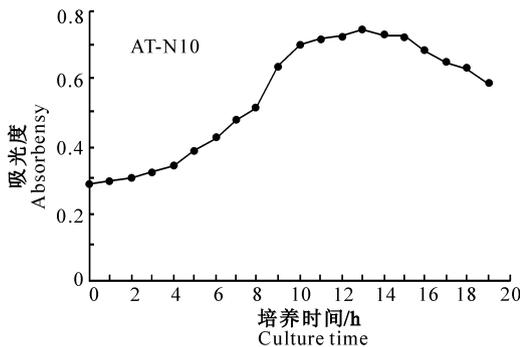


图 1 根癌土壤杆菌 AT-N10 和深红红螺菌 Rh1.5005 的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of AT-N10 and Rh1.5005

2.2 高渗溶液对原生质体制备的影响

稳定剂类型和渗透压是原生质体制备的重要因素^[14]。表 1 结果显示,对于根癌土壤杆菌,以 0.8

mol/L NaCl 为高渗溶液更利于原生质体的制备和再生;对于深红红螺菌,0.5 mol/L 蔗糖+0.02 mol/L MgCl₂·6H₂O 对原生质体的制备更有利。

表 1 高渗溶液对原生质体制备和再生的影响

Table 1 Effects of hypertonic solution on the rates of protoplast preparation and regeneration

高渗溶液 Hypertonic Solution	AT-N10		Rh1.5005	
	制备率 Preparation rate	再生率 Regeneration rate	制备率 Preparation rate	再生率 Regeneration rate
0.6 mol/L KCl	90.98	80.57	81.52	82.61
0.8 mol/L NaCl	92.54	83.17	83.04	79.21
0.5 mol/L 蔗糖+0.02 mol/L MgCl ₂ ·6H ₂ O	85.36	79.21	85.61	80.94
0.5 mol/L Sucrose+0.02 mol/L MgCl ₂ ·6H ₂ O				
0.6 mol/L D-甘露醇 0.6 mol/L D-mannitol	79.34	75.29	81.27	79.38
0.6 mol/L D-山梨醇 0.6 mol/L D-sorbierite	81.25	76.32	83.91	75.27

2.3 菌龄对原生质体制备的影响

微生物生理状态是原生质体制备的重要影响因素之一。以 0.8 mol/L 的 NaCl 为稳定剂对 2 株菌进行酶解试验,并对其原生质体制备率和再生率进

行测定,结果如图 2 所示。由图 2 可见,根癌土壤杆菌在 13.5 h 时的制备率和再生率均较高,而深红红螺菌在 45 h 时的制备率和再生率也达到最佳点,表明此时不仅原生质体制备率高,其再生能力也较强。

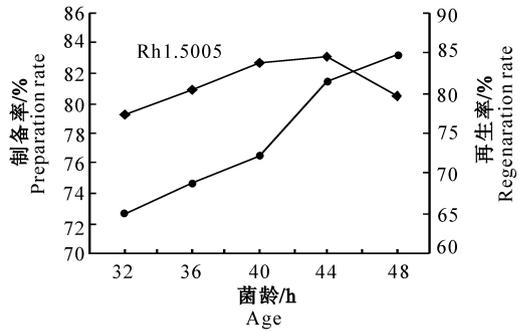
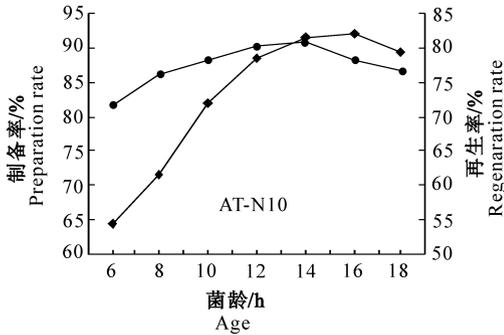


图 2 菌龄对根癌土壤杆菌 AT-N10 和深红红螺菌 Rh1.5005 原生质体制备的影响

—●—, 制备率; —◆—, 再生率; 图 3~图 8 同

Fig. 2 Effects of generation age on the preparation of AT-N10 and Rh1.5005

—●—, Preparation rate; —◆—, Regeneration rate; The fig. 3~fig. 5 are the same

2.4 酶解时间对原生质体制备的影响

酶解时间的长短直接影响原生质体的制备和再生效果,酶解时间过短,脱壁不完全;酶解时间过长,会导致原生质体脱水皱缩,再生率显著降低。由图

3 可知,根癌土壤杆菌适宜的酶解时间为 75 min 左右;深红红螺菌酶解 60 min,对原生质体制备和再生较为有利。

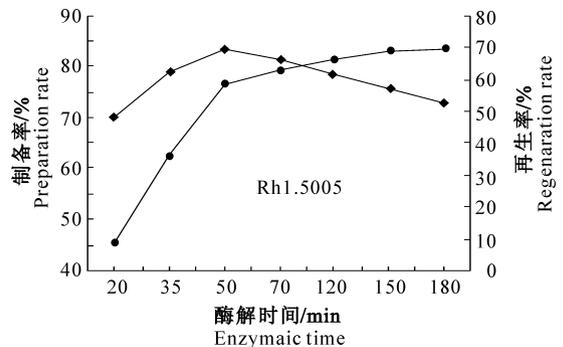
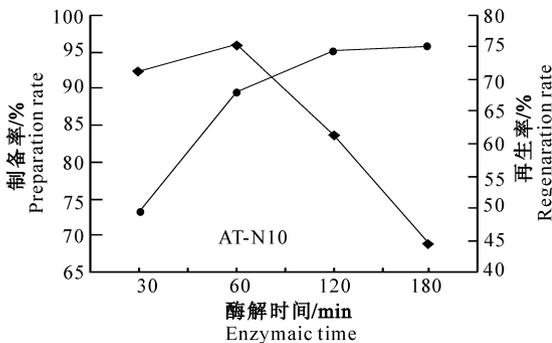


图 3 酶解时间对根癌土壤杆菌 AT-N10 和深红红螺菌 Rh1.5005 原生质体制备的影响

Fig. 3 Effects of enzymatic time on the preparation of AT-N10 and Rh1.5005 protoplast generation

2.5 酶解温度对原生质体制备的影响

不同的酶均有各自的最适酶解温度。由图 4 可

知,根癌土壤杆菌选择的适宜酶解温度为 35 °C,深红红螺菌选择的适宜酶解温度为 37 °C。

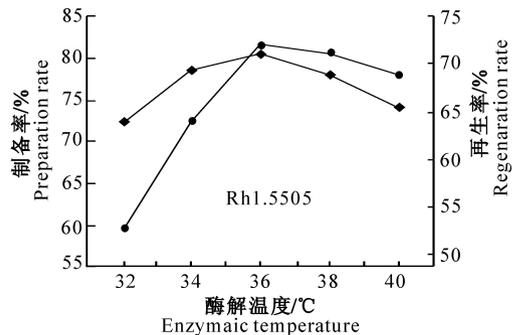
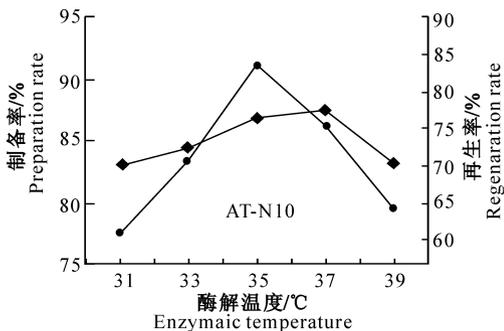
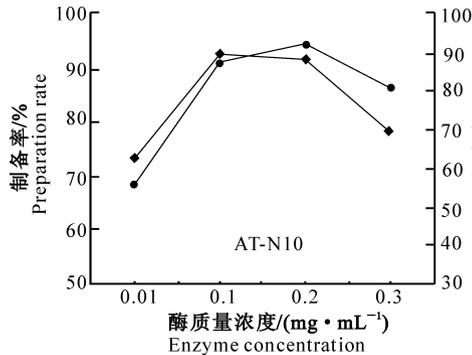


图 4 酶解温度对根癌土壤杆菌 AT-N10 和深红红螺菌 Rh1.5005 原生质体制备的影响

Fig. 4 Effects of enzymatic temperature on the preparation of AT-N10 and Rh1.5005 protoplast generation

2.6 溶菌酶质量浓度对原生质体制备的影响

酶的种类、质量浓度是制备原生质体最关键的因素。酶质量浓度对 2 菌株原生质体制备的影响如图 5 所示,根癌土壤杆菌在 0.2 mg/mL 溶菌酶作用



下,原生质体形成较多,再生率较高;深红红螺菌在 3 mg/L 溶菌酶作用下形成的原生质体较多,再生率也较高。

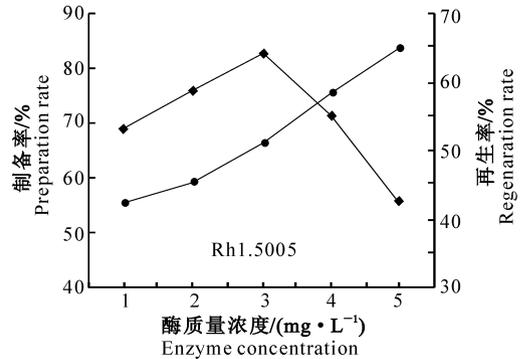


图 5 溶菌酶质量浓度对根癌土壤杆菌 AT-N10 和深红红螺菌 Rh1.5005 原生质体制备的影响

Fig. 5 Effects of enzymatic concentration on the preparation of Rh1.5005 protoplast generation

3 结 论

本研究从菌龄、高渗溶液、溶菌酶质量浓度、酶解时间、酶解温度等方面,对辅酶 Q₁₀ 产生菌根癌土壤杆菌 AT-N10 和深红红螺菌 Rh1.5005 的原生质体制备和再生条件进行了研究,得出了 2 株菌适宜的原生质体制备和再生条件,其中对深红红螺菌原生质体制备和再生适宜的溶菌酶质量浓度、酶解时间和温度研究结果与刘勇等^[15]的结果相近。

[参考文献]

- [1] 耿洪业,王少华.实用治疗药理学[M].北京:人民卫生出版社,1997.
Geng H Y, Wang S H. Practical treatment pharmacology [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1997. (in Chinese)
- [2] 吴祖芳,翁佩芳,陈坚.辅酶 Q₁₀ 的功能研究进展[J].宁波大学学报:理工版,2001,1(2):85-88.
Wu Z F, Weng P F, Chen J. Advances of coenzyme Q₁₀ function studies [J]. Journal of Ningbo University: Natural Science & Engineering Edition, 2001, 1(2): 85-88. (in Chinese)
- [3] 王宗德,曾卫明.辅酶 Q₁₀ 提取分离和测定的研究现状[J].江西林业科技,1999(4):21-24.
Wang Z D, Zeng W M. Current study of coenzyme Q₁₀ extraction, separation and measurement [J]. Jiangxi Forestry Science and Technology, 1999(4): 21-24. (in Chinese)
- [4] 康起亮,穆红,徐凤彩.从烟草悬浮细胞制备辅酶 Q₁₀ 的初步研究[J].华南农业大学学报,1999,20(4):59-64.
Kang Q L, Mu H, Xu F C. Studies on the preparation of coenzyme Q₁₀ from tobacco (*Nicotiana glauca* L.) cells in suspension culture [J]. Journal of South China Agricultural University, 1999, 20(4): 59-64. (in Chinese)

- [5] 段文贵,岑波.辅酶 Q₁₀ 的合成方法[J].林产化工通讯,2004,38(3):25-32.
Duan W G, Cen B. Synthetic methods of CoQ₁₀ [J]. Journal of Chemical Industry of Forest Products, 2004, 38(3): 25-32. (in Chinese)
- [6] 邹祥.发酵法生产辅酶 Q₁₀ 的研究进展[J].山东食品发酵,2004(2):25-27.
Zou X. Advances of producing CoQ₁₀ studies by fermentation [J]. Shandong Food Fermentation, 2004(2): 25-27. (in Chinese)
- [7] Kuratsu Y, Sakkurai M, Hagino, et al. Productivity and colony morphology associated with coenzyme Q₁₀ production by *Agrobacterium* species [J]. Agric Biol Chem, 1984, 48(8): 1997-2002.
- [8] Yoshida H, Kotani Y, Ochiai K, et al. Production of ubiquinone-10 using bacteria [J]. J Gen Appl Microbiol, 1998, 44: 19-26.
- [9] 张加春,杨爱明.一株产 CoQ₁₀ 的红假单胞菌的研究[J].云南师范大学学报,2003,23(1):48-50.
Zhang J C, Yang A M. The study of a rhodospseudomonas strain which could produce coenzyme Q₁₀ [J]. Journal of Yunnan Normal University, 2003, 23(1): 48-50. (in Chinese)
- [10] 赵乐辉,李颖,吕淑霞.木霉 T21 和 T22 原生质体制备和再生研究初报[J].沈阳农业大学学报,2005,36(1):96-98.
Zhao L H, Li Y, Lv S X. Studies on protoplast preparation and regeneration of *Trichoderma* spp. T21, T22 [J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2005, 36(1): 96-98. (in Chinese)
- [11] 周德庆.微生物学教程[M].北京:高等教育出版社,2000.
Zhou D Q. Tutorial of microbiology [M]. Beijing: Higher Education Press, 2000. (in Chinese)
- [12] ATCC medium; 550R8AH medium [EB/OL]. <http://www.atcc.org/Attachments/3815.pdf>.