

根癌土壤杆菌 DK-24 生产辅酶 Q₁₀ 发酵培养基的优化

田玉庭, 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 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】对根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)DK-24 发酵生产辅酶 Q₁₀ 的培养基进行优化, 为辅酶 Q₁₀ 的生产提供技术支持。【方法】用 Plackett-Burman 设计法(Plackett-Burman design, P-B)筛选对辅酶 Q₁₀ 产量影响较大的主要因子, 采用最陡爬坡试验逼近主要因子的最优水平, 通过 Box-Behnken 设计, 利用 Design-Expert 软件进行回归分析, 优化确定各主要因子的最佳质量浓度。【结果】根癌土壤杆菌生产辅酶 Q₁₀ 的 4 个主要影响因子为蔗糖、玉米浆干粉(CSP)、酵母膏和对羟基苯甲酸(PHB); 最陡爬坡试验、Box-Behnken 设计及响应面分析表明, 根癌土壤杆菌 DK-24 发酵生产辅酶 Q₁₀ 的发酵培养基中, 蔗糖、CSP、酵母膏和 PHB 的最优质量浓度分别为 46.56, 22.30, 13.46 g/L 和 52.38 mg/L。【结论】在优化培养基条件下, 辅酶 Q₁₀ 产量可达 24.97 mg/L, 较优化前提高了 76.18%。

【关键词】 根癌土壤杆菌; 辅酶 Q₁₀; 发酵培养基; 发酵条件优化

【中图分类号】 TQ925⁺.9; TQ464.8

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)08-0182-07

Optimization of nutrient composition for enhanced production of coenzyme Q₁₀ using *Agrobacterium tumefaciens* DK-24

TIAN Yu-ting, YUE Tian-li, YUAN Ya-hong

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

Abstract: 【Objective】 This research optimized the culture components for coenzyme Q₁₀ production by *Agrobacterium tumefaciens* DK-24, in order to provide technical support for industrial-scale production of coenzyme Q₁₀. 【Method】 In the first step, Plackett-Burman Design was used to evaluate the influence of twenty related factors. The path of steepest ascent was used to approach the optimal region of the fermentation conditions subsequently. In the third step, the concentrations of those main factors were further optimized by using Box-Behnken Design and Response Surface Analysis. 【Result】 Sucrose, corn-steep powder (CSP), yeast extract and PHB with great influence on coenzyme Q₁₀ fermentation were chosen. By solving the quadratic regression model equation, the optimal concentrations of the variables were determined. The optimal medium for coenzyme Q₁₀ production consisted sucrose, 46.56 g/L; CSP, 22.30 g/L; yeast extract, 13.46 g/L; PHB, 52.38 mg/L. 【Conclusion】 Under the optimal culture conditions, the coenzyme Q₁₀ yield reached 24.97 mg/L, which was 76.18% higher than that achieved in the original medium.

Key words: *Agrobacterium tumefaciens*; coenzyme Q₁₀; nutrient composition; optimization of fermentation condition

* [收稿日期] 2010-03-29

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAK02A18, 2006BAK02A48, 2006BAK02A05); 农业部跨越计划项目(2005-4); 陕西省重大科技专项(2006KZ09-G1, 2008ZDKG-04)

[作者简介] 田玉庭(1979—), 男, 湖北宜昌人, 在读博士, 主要从事农产品深加工和食品生物技术研究。
E-mail: etingtian@gmail.com

[通信作者] 岳田利(1965—), 男, 陕西宝鸡人, 教授, 博士生导师, 主要从事食品生物工程和食品安全控制研究。
E-mail: yuetl@nwsuaf.edu.cn

辅酶 Q₁₀ (Coenzyme Q₁₀, CoQ₁₀) 别名癸烯醌、泛醌(Ubiquinone),是一种类维生素物质,为脂溶性醌类化合物。CoQ₁₀ 广泛存在于动、植物和微生物细胞等生物体内,其与线粒体内膜相结合,是呼吸链中的重要递氢体^[1]。作为生物体内细胞产生能量的重要酶以及重要代谢反应底物,辅酶 Q₁₀ 具有抗肿瘤和抗氧化性;作为细胞代谢激活剂,其可提高人体免疫力,治疗人体免疫系统疾病,特别在心血管疾病治疗中有重要作用^[2-4]。此外,研究者还发现辅酶 Q₁₀ 具有抗衰老作用,从而将其应用扩展到化妆品和保健品领域^[5]。

辅酶 Q₁₀ 的制备方法有动植物组织提取法、化学法和发酵法。其中微生物发酵法合成辅酶 Q₁₀ 的成本低,无光学异构体,生物学活性高,临床应用效果好,被认为是最有前途的生产方式,近几年成为全球辅酶 Q₁₀ 开发的热点技术^[6]。

目前,国内采用发酵法生产辅酶 Q₁₀ 的企业并不多,其原因在于缺乏高产辅酶 Q₁₀ 的工程菌和优良的发 酵工艺。笔者所在实验室通过选育得到了 1 株高产辅酶 Q₁₀ 的根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*)1.255 4 的突变株 DK-24,本研究拟以此突变株为生产菌,利用 Plackett-Burman 法对影响辅酶 Q₁₀ 液体发酵的诸多因素进行考察,对筛选得到的重要因素采用 Box-Behnken 法进行试验,应用响应面分析法 (Response surface methodology, RSM) 得到各因素间的交互影响规律,确定最优试验点,以期 为用根癌杆菌 DK-24 生产辅酶 Q₁₀ 的生产工艺研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 根癌土壤杆菌 DK-24,由根癌

土壤杆菌 (*A. tumefaciens*) 1.2554 诱变筛选获得。

1.1.2 培养基 (1)斜面菌种培养基。采用甘露糖琼脂培养基。(2)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 0.5 g/L,pH 值 7.2。(3)发酵培养基^[7]。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,磷酸氢二钠 1.5 g/L,MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g/L,pH 值 7.2。(4)P-B 试验发酵培养基。按照试验设计配制。(5)RSM 试验发酵培养基。需要考察的关键因子如蔗糖、酵母膏、玉米浆干粉和对羟基苯甲酸的用量,按试验设计配制,用基础发酵液补齐,调 pH 值至 7.2。(6)RSM 试验基础发酵液。含磷酸二氢钾 0.5 g/L,磷酸氢二钠 1.5 g/L,MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g/L。

1.1.3 辅酶 Q₁₀ 购自美国 Sigma 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种培养 将斜面菌种接入种子培养基,再以 50 mL 装液量接入 250 mL 锥形瓶中,30 ℃、200 r/min 往复摇床培养 24 h,然后以 5%接种量接入装有 100 mL 发酵液的 250 mL 锥形瓶中,于 30 ℃、200 r/min 往复摇床培养 56 h。

1.2.2 辅酶 Q₁₀ 的提取 采用超声波提取法^[8]提取。

1.2.3 辅酶 Q₁₀ 含量的测定 采用反向高效液相色谱法^[9]测定。色谱柱为 Hypersil ODS(5 m,4.6 mm×250 mm,Germany),流动相为无水乙醇-甲醇(体积比为 9:1),流速为 1.0 mL/min,柱温 30 ℃,检测波长 275 nm,进样量为 10 μL。

1.3 试验设计方法

1.3.1 Plackett-Burman 试验^[10-11] 试验选取的因素(变量)共 20 个,选用 N=24 的 P-B 试验设计表,其中安排 3 个空项进行误差分析。各参数及其水平参考文献[12-15]和笔者前期试验结果,评价指标(响应值)为辅酶 Q₁₀。具体的试验设计见表 1。

表 1 Plackett-Burman 试验设计因素水平及其编码

Table 1 Level and code of variables for Plackett-Burman design

因子 Variable	编码 Code		编码水平 Coded level	
	非编码 Uncoded	编码 Coded	低 Low	高 High
葡萄糖/(g · L ⁻¹) Glucose	X ₁	x ₁	10	20
麦芽糖/(g · L ⁻¹) Maltose	X ₂	x ₂	10	20
蔗糖/(g · L ⁻¹) Sucrose	X ₃	x ₃	10	20
果糖/(g · L ⁻¹) Fructose	X ₄	x ₄	10	20
空值 1 Dummy 1	X ₅	x ₅		
蛋白胨/(g · L ⁻¹) Peptone	X ₆	x ₆	2.5	5
玉米浆干粉/(g · L ⁻¹) CSP	X ₇	x ₇	5	10
大豆蛋白胨/(g · L ⁻¹) Soya peptone	X ₈	x ₈	4	8
酵母膏/(g · L ⁻¹) Yeast extract	X ₉	x ₉	5	10
空值 2 Dummy 2	X ₁₀	x ₁₀		

续表 1 Continued table 1

因子 Variable	编码 Code		编码水平 Coded level	
	非编码 Uncoded	编码 Coded	低 Low	高 High
MgSO ₄ /(mg·L ⁻¹)	X ₁₁	<i>x</i> ₁₁	200	500
FeSO ₄ /(mg·L ⁻¹)	X ₁₂	<i>x</i> ₁₂	20	50
MnCl ₂ /(mg·L ⁻¹)	X ₁₃	<i>x</i> ₁₃	5	10
ZnCl ₂ /(mg·L ⁻¹)	X ₁₄	<i>x</i> ₁₄	100	200
K ₂ HPO ₄ /(g·L ⁻¹)	X ₁₅	<i>x</i> ₁₅	0.5	1.5
KH ₂ PO ₄ /(g·L ⁻¹)	X ₁₆	<i>x</i> ₁₆	0.5	1.5
FeCl ₃ /(mg·L ⁻¹)	X ₁₇	<i>x</i> ₁₇	20	50
CuSO ₄ ·5H ₂ O/(μg·L ⁻¹)	X ₁₈	<i>x</i> ₁₈	200	500
CaCO ₃ /(g·L ⁻¹)	X ₁₉	<i>x</i> ₁₉	0.5	1
空值 3 Dummy 3	X ₂₀	<i>x</i> ₂₀		
PHB/(mg·L ⁻¹)	X ₂₁	<i>x</i> ₂₁	20	40
Vitamin B ₁ /(mg·L ⁻¹)	X ₂₂	<i>x</i> ₂₂	10	50
Met/(g·L ⁻¹)	X ₂₃	<i>x</i> ₂₃	1	5

注:为了统计计算,自变量编码值依据公式 $x_i=(X_i-X_0)/\Delta X_i$ 计算。式中, x_i 为自变量的编码值, X_i 为自变量试验水平的实际值, X_0 为自变量的中心值, ΔX_i 为步长。

Note:For statistical calculations,the independent variables were coded according to the transformation Eq: $x_i=(X_i-X_0)/\Delta X_i$,where x_i is dimensionless coded value of the variable; X_i , X_0 is the real value of the X_i at the center point;and ΔX_i is the step change of variable.

1.3.2 最陡爬坡试验(Steepest ascent design)^[16]

根据 Plackett-Burman 试验结果拟合的一阶模型回归系数的符号和大小,设计显著因子的最陡上升路径和步长,找出峰值,从而逼近最大响应区域。

1.3.3 响应面分析法(Response surface methodology)^[17-18] 逼近最大响应区域后采用 Box-Behnken 法进行试验设计。对试验数据进行拟合分析,得到一个多项式回归模型,该模型可描述为:

$$Y=\beta_0+\sum\beta_ix_i+\sum\beta_{ii}x_i^2+\sum\beta_{ij}x_ix_j。$$
 (1)
式中: Y 为预测响应值; β_0 、 β_i 、 β_{ii} 分别为偏移项、线性偏移和二阶偏移; β_{ij} 为交互作用系数; x_i 、 x_j 为自变量的编码值,其同自变量试验水平实际值 X_i 的换算公式为:

$$x_i=\frac{X_i-X_0}{\Delta X_i}。$$
 (2)

式中: X_0 为自变量的中心值, ΔX_i 为步长。

上述每个试验均进行 3 次,对应的响应值取 3

次试验结果的平均值。试验辅助软件为 Design-Expert[®] 7. 0 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN. USA)。

2 结果与分析

2.1 辅酶 Q₁₀ 产量主要影响因子的确定

利用 Design-Expert 软件对 PB 试验结果(表 2)进行方差分析,结果表明,对辅酶 Q₁₀ 产量影响显著的因子有蔗糖、酵母膏、玉米浆干粉和 PHB。通过逐步回归分析,获得该菌发酵生产辅酶 Q₁₀ 的最优多元线性方程为:

$$Y=11.24+1.42\ x_3+1.01\ x_7+0.33\ x_9+0.84\ x_{21}。$$
 (3)

式中: Y 为辅酶 Q₁₀ 的预测值, x_3 、 x_7 、 x_9 和 x_{21} 分别为上述 4 个重要因子的编码值。模型的校正决定系数 $R^2_{Adj}=0.963\ 8$,相关性良好。

表 2 Plackett-Burman 试验结果

Table 2 Results for Plackett-Burman design

试验号 Run No.	CoQ ₁₀ / (mg·L ⁻¹)	试验号 Run No.	CoQ ₁₀ / (mg·L ⁻¹)	试验号 Run No.	CoQ ₁₀ / (mg·L ⁻¹)	试验号 Run No.	CoQ ₁₀ / (mg·L ⁻¹)
1	12.57	7	10.45	13	11.94	19	9.73
2	10.44	8	13.03	14	12.40	20	13.03
3	15.25	9	9.71	15	9.43	21	11.69
4	9.73	10	10.37	16	8.81	22	13.32
5	12.04	11	7.61	17	14.15	23	11.42
6	10.44	12	10.94	18	14.11	24	7.26

2.2 最陡爬坡试验结果

根据 Plackett-Burman 试验分析结果确定最陡爬坡路径,按上述 4 个因子效应大小的比例设定其

变化方向及步长,所得结果见表 3。由表 3 可知,最佳因素的质量浓度条件处于试验 3 附近,故选择试验 3 为后续试验的中心点进行响应面分析。

表 3 最陡爬坡试验结果

Table 3 Experimental design and the results of steepest ascent

试验号 Run No.	$X_3/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	$X_7/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	$X_9/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	$X_{21}/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	$\text{CoQ}_{10}/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$
1	20	10	10	40	13.52
2	30	15	12	45	16.43
3	40	20	14	50	24.26
4	50	25	16	55	22.14
5	60	30	18	60	21.83

2.3 主要影响因子最优质量浓度水平的响应面分析
析时的主要因子及其水平和编码见表 4。Box-Behnken 的试验结果如表 5 所示。

2.3.1 二次回归模型拟合及方差分析 响应面分

表 4 Box-Behnken 试验因素水平及其编码

Table 4 Level and code of variables for Box-Behnken design

变量 Variable	编码 Code		编码水平 Coded level		
	非编码 Uncoded	编码 Coded	-1	0	1
蔗糖/ $(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$ Sucrose	X_1	A	30	40	50
酵母膏/ $(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$ Yeast extract	X_2	B	12	14	16
玉米浆干粉/ $(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$ CSP	X_3	C	15	20	25
对羟基苯甲酸/ $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$ PHB	X_4	D	45	50	55

注: $A=(X_1-40)/10$, $B=(X_2-20)/5$, $C=(X_3-14)/2$, $D=(X_4-50)/5$ 。
Note: $A=(X_1-40)/10$, $B=(X_2-20)/5$, $C=(X_3-14)/2$, $D=(X_4-50)/5$ 。

表 5 Box-Behnken 试验设计及辅酶 Q₁₀ 产量的实测值与预测值

Table 5 Box-Behnken matrix of the four variables and the actual and predicted values of CoQ₁₀

试验组别 Run No.	$A/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	$B/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	$C/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	$D/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	$\text{CoQ}_{10}/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	
					实测值 Experimental	预测值 Predicted
1	-1	-1	0	0	19.95	19.95
2	1	-1	0	0	23.79	23.62
3	-1	1	0	0	21.97	21.99
4	1	1	0	0	22.71	22.56
5	0	0	-1	-1	20.92	20.36
6	0	0	1	-1	20.87	20.74
7	0	0	-1	1	18.89	18.87
8	0	0	1	1	22.89	23.29
9	-1	0	0	-1	20.54	20.97
10	1	0	0	-1	22.78	23.20
11	-1	0	0	1	21.61	21.61
12	1	0	0	1	23.62	23.61
13	0	-1	-1	0	18.23	18.39
14	0	1	-1	0	19.65	20.19
15	0	-1	1	0	22.23	22.11
16	0	1	1	0	21.02	21.28
17	-1	0	-1	0	19.29	19.14
18	1	0	-1	0	18.73	18.75
19	-1	0	1	0	19.32	19.03
20	1	0	1	0	23.78	23.66
21	0	-1	0	-1	22.09	22.21
22	0	1	0	-1	22.93	22.65
23	0	-1	0	1	22.67	22.69
24	0	1	0	1	23.61	23.23
25	0	0	0	0	24.52	24.45
26	0	0	0	0	24.52	24.45
27	0	0	0	0	24.51	24.45
28	0	0	0	0	24.68	24.45
29	0	0	0	0	24.31	24.45

以辅酶 Q₁₀ 产量 Y 为响应值,利用 Design-Expert 软件对试验结果(表 5)进行多元回归拟合,得到辅酶 Q₁₀ 产量 Y 对蔗糖、酵母膏、玉米浆干粉和 PHB 的二次多项式回归模型为:

$$Y=24.45+1.06A+0.24B+1.20C+0.26D-0.77AB+1.25AC-0.058AD-0.66BC+0.025BD+1.01CD-1.29A^2-0.95B^2-2.82C^2-0.62D^2。$$
(4)

式中: Y 为辅酶 Q₁₀ 产量的预测值, A 、 B 、 C 、 D 分别为蔗糖、酵母膏、玉米浆干粉和对羟基苯甲酸(PHB)的编码值。

对上述回归模型进行方差分析,并对模型系数

进行显著性检验。由该模型的方差分析结果(表 6)可见, $F_{\text{Model}}=59.90$, $P<0.0001$,表明本试验所选用的二次多项式模型具有高度的显著性;失拟项 $P=0.0640>0.05$,不显著;模型的 $R^2=0.9836$,模型的校正决定系数 $R^2_{\text{Adj}}=0.9672$,表明仅有不到 4%的辅酶 Q₁₀ 的总变异不能由此模型来解释。由表 7 可见,4 个试验因子对辅酶 Q₁₀ 的曲面效应均达显著水平;酵母膏和 PHB 对辅酶 Q₁₀ 的线性效应不显著;除了蔗糖与 PHB、酵母膏与 PHB 的交互作用对辅酶 Q₁₀ 的影响不显著外,其他两两交互效应均达显著水平。

表 6 回归模型的方差分析

Table 6 Analysis of variance (ANOVA) for regression equation

变异来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value
模型 Model	107.64	14	7.69	59.90	<0.0001
残差 Residual	2.76	14	0.20		
失拟项 Lack of fit	1.77	10	0.17	5.15	0.0640
误差 Pure error	0.13	4	0.032		
总和 Cor Total	109.43	28			

$R=0.9918, R^2=0.9836, R^2_{\text{Adj}}=0.9672$

表 7 回归方程系数的显著性检验

Table 7 Test of significance for regression coefficient

模型项 Model term	回归系数 Coefficient estimate	自由度 df	标准误差 Std. error	95%置信限 95% CI		F 值 F value	P 值 P value
				低 Low	高 High		
常数项 Constant	24.45	1	0.16	24.11	24.79	—	—
A 蔗糖 Sucrose	1.06	1	0.10	0.84	1.28	105.21	<0.0001
B 酵母膏 Yeast extract	0.24	1	0.10	0.02	0.47	5.57	0.0333
C 玉米浆干粉 CSP	1.20	1	0.10	0.98	1.42	134.63	<0.0001
D 对羟基苯甲酸 PHB	0.26	1	0.10	0.04	0.49	6.48	0.0233
AB	-0.78	1	0.18	-1.16	-0.39	18.72	0.0007
AC	1.26	1	0.18	0.87	1.64	49.08	<0.0001
AD	-0.06	1	0.18	-0.44	0.33	0.10	0.7530
BC	-0.66	1	0.18	-1.04	-0.27	13.47	0.0025
BD	0.023	1	0.18	-0.36	0.41	0.023	0.8910
CD	1.01	1	0.18	0.63	1.40	31.95	<0.0001
A^2	-1.38	1	0.14	-1.69	-1.08	96.82	<0.0001
B^2	-1.04	1	0.14	-1.34	-0.74	54.57	<0.0001
C^2	-2.92	1	0.14	-3.22	-2.62	430.27	<0.0001
D^2	-0.72	1	0.14	-1.02	-0.42	26.05	0.0002

2.3.2 最佳培养基成分的确定 对回归方程(4)绘制分析图,考察所拟合的响应曲面的形状,所得响应面的立体分析图和相应等高线图如图 1、2 所示。其中图 1 显示了玉浆干粉(CSP)和对羟基苯甲酸(PHB)位于最佳值,即 CSP 和 PHB 分别为 21.89 g/L 和 49.40 mg/L 时,蔗糖和酵母膏对辅酶 Q₁₀ 的交互影响效应。由图 1-a 可以看出,发酵液中的蔗糖质量浓度对辅酶 Q₁₀ 的产量有显著影响,在蔗糖

质量浓度较低时(30.00~33.93 g/L),辅酶 Q₁₀ 产量随酵母膏用量的增加而有所增加;当蔗糖质量浓度高于 36.17 g/L 时,酵母膏质量浓度对辅酶 Q₁₀ 产量的影响较小;当蔗糖质量浓度为 37.84~50.00 g/L,酵母膏质量浓度为 12.00~15.43 g/L 时,辅酶 Q₁₀ 的产量有极大值。等高线的形状可反映出交互效应的强弱大小,椭圆形表示两因子交互作用显著,而圆形则与之相反^[17],由图 1-b 可直观地看出,蔗

糖与酵母膏两营养因子具有显著的交互作用。

图 2 显示了蔗糖和酵母膏位于最佳值,即蔗糖和酵母膏分别为 47.57 和 13.96 g/L 时,CSP 和 PHB 对辅酶 Q₁₀ 的交互影响效应。由图 2-a 可以看出,发酵液中 CSP 的质量浓度对辅酶 Q₁₀ 产量有显著影响,其质量浓度过低或过高均不利于辅酶 Q₁₀ 的合成;CSP 质量浓度较低时(12.00~15.63 g/L),辅酶 Q₁₀ 的产量随 PHB 用量的增加而减小;当 CSP 质量浓度较高时(21.12~25.00 g/L),辅酶 Q₁₀ 产量随 PHB 用量的增加而增加;当 CSP 质量浓度高

于 36.18 g/L 时,PHB 质量浓度对辅酶 Q₁₀ 产量的影响较小;当 CSP 质量浓度为 18.85~25.00 g/L,PHB 质量浓度为 45.49~55.00 mg/L 时,辅酶 Q₁₀ 产量有极大值。由图 2-b 可直观地看出,PHB 与 CSP 两营养因子有显著的交互作用效应。

通过对上述二次多项式模型进行求导和解逆矩阵,得出 4 个影响因子的最佳组合为:蔗糖 46.56 g/L,CSP 22.30 g/L,酵母膏 13.46 g/L,PHB 52.38 mg/L,此时模型预测的最大响应值为 25.10 mg/L。

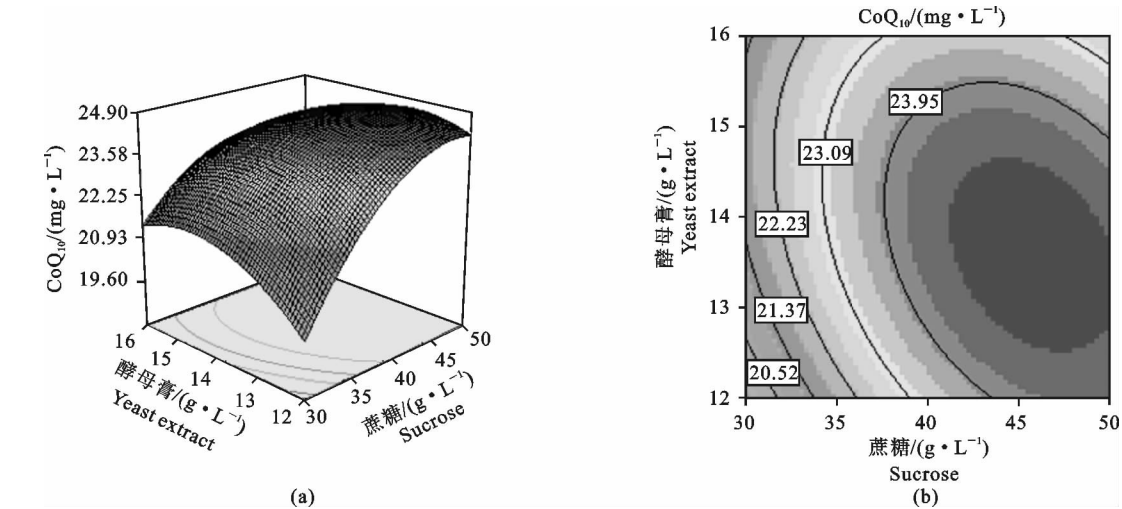


图 1 蔗糖与酵母膏对辅酶 Q₁₀ 交互影响的曲面图(a)及等高线图(b)
Fig. 1 Response surface plot (a) and its contour plot (b) of CoQ₁₀ production showing the interaction between sucrose and yeast extract

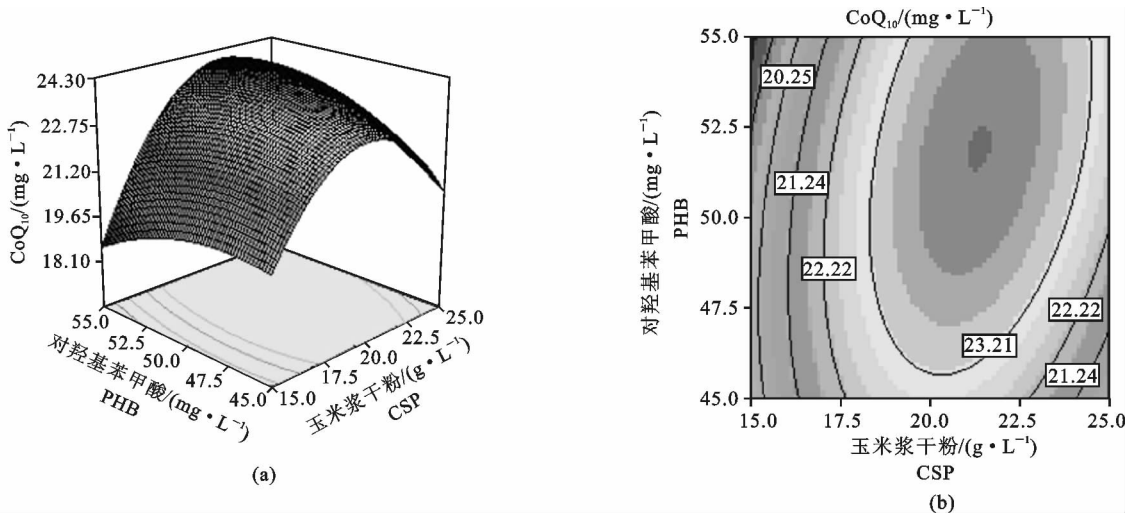


图 2 对羟基苯甲酸与玉米浆干粉对辅酶 Q₁₀ 交互影响的曲面图(a)及等高线图(b)
Fig. 2 Response surface plot (a) and its contour plot (b) of CoQ₁₀ production showing the interaction between PHB and CSP

2.3.3 试验验证 为了检验模型预测的准确性,以 2.3.2 确定的 4 个主要影响因子的最佳质量浓度配

制发酵培养基,分批次(3 次)发酵,得到辅酶 Q₁₀ 的产量为(24.97±0.16) mg/L,与预测值较为接近,

说明回归方程能够比较真实地反映各筛选因素对发酵生产辅酶 Q₁₀ 的影响。

3 结 论

本研究采用响应面分析法对根癌土壤杆菌 DK-24 生产辅酶 Q₁₀ 的发酵培养基进行了优化,首先运用 Plackett-Burman 法确定出蔗糖、酵母膏、玉米浆干粉和 PHB 为主要影响因子;然后通过最陡爬坡试验逐步改变其质量浓度,逼近最佳响应面区域;最后采用 Box-Behnken 设计和 Design-Expert 软件分析确定了 4 个主要影响因子的最优质量浓度,通过对二次多项式数学模型求极值可知,当控制蔗糖、玉米浆干粉、酵母膏和 PHB 的质量浓度分别为 46.56, 22.30, 13.46 g/L 和 52.38 mg/L 时,能获得最大的辅酶 Q₁₀ 产量。在最优发酵培养基条件下,经培养发酵后,辅酶 Q₁₀ 产量可达到 24.97 mg/L,较优化前提高了 76.18%。

[参考文献]

[1] Lenaz G, Fato R, Formiggini G. The role of coenzyme Q in mitochondrial electron transport [J]. Mitochondrion, 2007, 7: 8-33.

[2] Ernster L, Dallner G. Biomedical, physiological and medical aspects of ubiquinone function [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1995, 1271: 195-204.

[3] Yalcin A, Kilinc E, Sagcan A, et al. Coenzyme Q₁₀ concentrations in coronary artery disease [J]. Clinical Biochemistry, 2004, 37: 706-709.

[4] Pepe S, Marasco S F, Haas S J. Coenzyme Q₁₀ in cardiovascular disease [J]. Mitochondrion, 2007, 7: 154-167.

[5] Lupo M P. Antioxidants and vitamins in cosmetics [J]. Clinics in Dermatology, 2001, 19: 470.

[6] 王青云, 王发祥, 钟士清. 微生物发酵法生产辅酶 Q₁₀ 的研究进展 [J]. 化学与生物工程, 2006, 23(8): 11.

Wang Q Y, Wang F X, Zhong S Q. The research advances of production of coenzyme Q₁₀ by microbial fermentation [J]. Chemistry & Bioengineering, 2006, 23(8): 11. (in Chinese)

[7] 吴祖芳, 堵国成, 陈 坚. 营养条件和流加发酵对放射型根瘤菌 (*Rhizobium radiobacter*) 产辅酶 Q₁₀ 的影响 [J]. 生物工程学报, 2003, 19(2): 212-216.

Wu Z F, Du G C, Chen J. Effects of nutrient conditions and fed-batch culture on CoQ₁₀ production by *Rhizobium radiobacter* [J]. Chinese J Biotechnology, 2003, 19(2): 212-216. (in Chinese)

[8] 李聚海, 岳田利, 袁亚宏. 辅酶 Q₁₀ 超声波破碎法提取工艺条件研究 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2007, 35(5): 207-211.

Li J H, Yue T L, Yuan Y H. Study on the technology of the coenzyme Q₁₀ extraction with ultrasonic cell-break method [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2007, 35(5): 207-211. (in Chinese)

[9] Rybak M E, Pfeiffer C M. Clinical analysis of vitamin B₆: Determination of pyridoxal 5'-phosphate and 4-pyridoxic acid in human serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography with chlorite postcolumn derivatization [J]. Analytical Biochemistry, 2004, 333: 336-344.

[10] Vatanara A, Najafabadi A R, Gilani K. A Plackett-Burman design for screening of the operation variables in the formation of salbutamol sulphate particles by supercritical antisolvent [J]. Journal of Supercritical Fluids, 2007, 40: 111-116.

[11] 王能强, 吴坚平, 邹小明, 等. α -氯丙酸脱卤酶发酵培养基的响应面法优化 [J]. 化工学报, 2007, 58(1): 177-178.

Wang N Q, Wu J P, Zou X M, et al. Optimization of fermentation conditions for α -chloropropionic acid dehalogenases production based on response surface analysis [J]. Journal of Chemical Industry and Engineering, 2007, 58(1): 177-178. (in Chinese)

[12] Yoshida H, Kotani Y, Ochiai K, et al. Production of ubiquinone-10 using bacteria [J]. Journal of General and Applied Microbiology, 1998, 44: 19-26.

[13] Gu S B, Yao J M, Yuan Q P. Kinetics of *Agrobacterium tumefaciens* ubiquinone-10 batch production [J]. Process Biochemistry, 2006, 41: 1908-1912.

[14] Choi G S, Kim Y S, Seo J H. Restricted electron flux increases coenzyme Q₁₀ production in *Agrobacterium tumefaciens* ATCC4452 [J]. Process Biochemistry, 2005, 40: 3225-3229.

[15] Ha S J, Kim S Y, Seo J H. Optimization of culture conditions and scale-up to pilot and plant scales for coenzyme Q₁₀ production by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 74: 974-980.

[16] Zhang Y P, Chen B, Chu J. Medium optimization for meilingmycin production by streptomyces nanchangensis using response surface methodology [J]. Process Biochemistry, 2006, 41: 405-409.

[17] Muralidhar R V, Chirumamila R R, Marchant R. A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources [J]. Biochemical Engineering Journal, 2001, 9: 17-23.

[18] Dash S S, Gummadi S N. Enhanced biodegradation of caffeine by *Pseudomonas sp.* using response surface methodology [J]. Biochemical Engineering Journal, 2007, 36(3): 288-293.