

酿酒酵母菌体中辅酶 Q₁₀ 的提取及测定方法

赵树全¹, 刘悦才², 江国托³

(1.大连工业大学 生物与食品工程学院, 辽宁 大连 116034; 2.黑龙江八一农垦大学 生命科学技术学院, 黑龙江 大庆 163319; 3.大连三仪动物药品有限公司, 辽宁 大连 116036)

摘要: 研究用盐酸-丙酮萃取法提取酿酒酵母菌体中辅酶 Q₁₀; 用薄层析法和高效液相色谱检测酵母菌体提取液中辅酶 Q₁₀ 的纯度; 并用高效液相色谱法对其提取含量进行测定。结果表明, 乙酸-丙酮萃取液中辅酶 Q₁₀ 的含量可达 5.785 mg/L。

关键词: 微生物; 酿酒酵母; 辅酶 Q₁₀; 提取

中图分类号: Q93-3; TS261.1 Q55

文献标识码: B

文章编号: 1001-9286(2008)11-0114-03

Extraction and Measurement Methods of Coenzyme Q₁₀ from Biomass of *Saccharomyces Cerevisiae*

ZHAO Shu-quan¹, LIU Yue-cai² and JIANG Guo-tuo³

(1.School of Biological & Food Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian, Liaoning 116034; 2. Life Science and Technology College, Heilongjiang August 1st Land Reclamation University, Daqing, Heilongjiang 163319; 3.Sanyi Animal Medicine Co. Ltd, Dalian, Liaoning 116036, China)

Abstract: The extraction of coenzyme Q₁₀ from the biomass of *Saccharomyces cerevisiae* by acetate-acetone extraction method was studied. The Q₁₀ purity of the extracted solution was detected by thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC) methods. Besides, Q₁₀ content of the extracted solution was measured by HPLC method. The results showed that the concentration of Q₁₀ in acetate-acetone extraction solution was up to 5.785 mg/L.

Key words: microbe; *Saccharomyces cerevisiae*; coenzyme Q₁₀(CoQ₁₀); extraction

辅酶 Q₁₀(Coenzyme Q₁₀)又称泛醌、癸烯醌,是一种广泛存在于动植物及微生物线粒体中的脂溶性醌类化合物^[1~2]。它能与线粒体内膜相结合,是呼吸链中重要的电子传递体,能可逆地进行氧化还原反应,是细胞代谢激活剂^[3]。因此,它能作为一种良好的生化药物和天然的抗氧化剂,主要用于治疗心脏病、肝病,能改善心脏代谢障碍。控制异丙肾上腺素引起的心肌损伤,对心脏充血性病人有较好的疗效,并可用于病毒性肝炎、亚急性肝坏死的综合治疗^[4]。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^[5~6]。

辅酶 Q₁₀的生产方法主要有动植物组织提取法、微生物发酵法和化学合成法。化学合成法具有合成条件苛刻、步骤繁多、副产物含量高、提纯成本高等缺点。动植物组织提取法主要是从猪心中提取,由于受原材料和来源的限制,规模化生产受到制约。相比之下,利用微生物

发酵法生产辅酶 Q₁₀具有生物活性好、易被人体吸收、不受原材料的制约、可规模化生产等诸多优点。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^[7~8]。目前报道的能产生辅酶 Q₁₀的菌种有酵母属菌(如假丝酵母、掷孢酵母、隐球酵母等)、假单胞菌属、杆菌、黑粉菌、浑球红细菌、烟曲霉、脱氮副球菌、光合菌等。本试验以德国果酒酵母为出发菌株研究辅酶 Q₁₀的提取检测。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂与药品

辅酶 Q₁₀标准品,日本同仁化学实验中心;其他试剂均为市售分析纯。

1.1.2 仪器

3500G 高效液相色谱仪,美国科学系统公司/SSI; RE-52AA 旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;DL-6M 大容量低速冷冻离心机,赛特湘仪离心机仪器有限公司

收稿日期:2008-09-08

作者简介:赵树全(1978-),男,辽宁省大连市人,大学本科,生物与食品工程学院在读研究生,研究方向:食品分析。

通讯作者:江国托,教授,博士生导师,E-mail:jgt600@sina.com。

司; JY92-2D 超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技公司; HZQ-C 空气浴振荡器, 哈尔滨东联电子技术开发有限公司; 硅胶 G 可剪裁型薄层层析板, 天津思利达色谱技术开发公司;

1.1.3 菌种

德国果酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*): 大连工业大学生物实验室保藏。

1.1.4 培养基

种子培养基: 酵母粉 0.1%; 大豆蛋白胨 0.5%; 葡萄糖 2%; 磷酸二氢钾 0.2%, 自然 pH 值, 装液量 250 mL 三角瓶装液 100 mL, 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。

发酵培养基: 酵母粉 0.1%; 大豆蛋白胨 0.5%; 葡萄糖 2%; 磷酸二氢钾 0.2%; 乙酸钠 0.5%; 柠檬酸铵为 0.2%; 硫酸镁 0.02%; 硫酸蒙 0.005%, pH6.0, 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。

1.2 方法

1.2.1 菌液的制备

无菌条件下从斜面试管中挑取酿酒酵母接入种子培养基, 摇床振荡培养, 摇床转速 220 r/min, 30 °C, 培养 12 h^[10]。

把经培养 12 h 后的种子接入发酵培养基中, 接种量为 5%, 摇床振荡培养, 摇床转速 145 r/min, 培养温度 30 °C, 培养 36 h, 5000 r/min 冷冻离心 20 min(4 °C), 倾去上清液, 生理盐水洗涤菌体 2 次, 离心 20 min, 弃去上清液, 收集菌体冷冻干燥。

1.2.2 提取方法

1.2.2.1 醇碱皂化法

称取菌体 10 g, 置蒸馏瓶中, 分别加入 1 g 焦性没食子酸, 50 mL 甲醇, 5 g 氢氧化钾, 40 mL 石油醚, 充分混匀后在 80 °C 水浴中皂化 30 min, 迅速冷却至室温, 静置分层, 取上清液。再用石油醚萃取皂化液 2 次, 每次加 30 mL 石油醚, 剧烈振荡 5 min, 合并萃取液, 用去离子水洗至中性, 以无水硫酸钠脱水至澄清, 用旋转蒸发仪(45 °C)浓缩至干, 挥发完全, 加入无水乙醇 10 mL 溶解, 放入冰箱冷冻, 析出胆固醇等杂质, 过滤, 用无水乙醇定容至 100 mL, 待测^[11]。

1.2.2.2 超声波破碎法

称取收集菌体 10 g 至烧杯中, 加入 20 mL 丙酮配制成菌悬液。在冰浴中超声波破碎频率为 20 kHz, 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。然后 5000 r/min 冷冻离心 15 min(4 °C)。取上清液, 45 °C 旋转蒸发浓缩, 再加入 50 mL 石油醚萃取。萃取液用去离子水洗至中性, 以无水硫酸钠脱水至澄清, 旋转蒸发仪(45 °C)浓缩至干, 挥发完全, 加入无水乙醇 10 mL 溶解, 放入冰箱冷冻, 析出胆固醇等杂质, 过滤, 用无水乙醇定容至 100 mL, 待测。

1.2.2.3 盐酸-丙酮萃取法

准确称取收集菌体 10 g, 放入烧杯中, 加入 3 mol/L 的盐酸 100 mL 混匀, 于 80 °C 水浴中搅拌 80 min, 迅速用水冷却, 用 3 mol/L 的氢氧化钾将细胞悬液的 pH 值调至中性, 离心, 收集细胞。再加入 100 mL 的丙酮, 用搅拌器室温下搅拌 2.5 h, 对细胞进行抽提。抽提后过滤, 除去细胞残渣, 取抽提液减压蒸馏浓缩, 再加入 200 mL 石油醚进行萃取。萃取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(45 °C)浓缩至干, 挥发完全, 加入无水乙醇 10 mL, 放入冰箱冷冻, 析出胆固醇等杂质, 过滤, 用无水乙醇定容至 100 mL, 待测^[11]。

1.2.3 辅酶 Q₁₀ 的鉴定方法

1.2.3.1 薄层层析鉴定^[2]

110 °C 下, 硅胶板活化 1 h, 将提取液与辅酶 Q₁₀ 标准品用毛细管分别在同一薄层层析板上点样, 晾干后放入展层剂中展层 40 min, 用碘蒸汽熏蒸显色。展层剂为: 石油醚(沸程 60~90 °C): 乙醚 = 20:3。

1.2.3.2 高效液相色谱分离鉴定

将酿酒酵母菌体的提取液与标准品进行高效液相色谱分离。色谱柱: 4.6 mm×250 mm, 5 μm C₁₈ 柱。流动相: 无水甲醇: 无水乙醇(体积比)=1:1, 流速为 1.0 mL/min, 柱温 35 °C, 检测波长 275 nm, 进样量 20 μL, 标样质量浓度为 50 μg/mL^[9]。

1.2.4 辅酶 Q₁₀ 含量的测定方法

高效液相标准曲线的绘制: 称取辅酶 Q₁₀ 标准品 10 mg, 用无水乙醇定容至 10 mL, 将此溶液分别稀释至 62.5 μL/mL、125 μL/mL、250 μL/mL、500 μL/mL、1000 μg/mL 等不同梯度质量浓度, 高效液相紫外检测器在 275 nm 下进行测定, 测量条件与 1.2.3.2 的相同。

标准曲线的绘制: 根据不同质量浓度的辅酶 Q₁₀ 标准溶液在高效液相下测得的峰面积绘制标准峰面积曲线(见图 1)。由图 2 可知: ①线性度很好($R^2=0.9994$); ②辅酶 Q₁₀ 标准峰面积曲线的回归方程为: $y=253.9x+25905$, x 为辅酶 Q₁₀ 的质量浓度, y 为峰面积。

发酵菌体中辅酶 Q₁₀ 含量的测定: 在 275 nm 下进行高效液相测定辅酶 Q₁₀ 提取液的峰面积, 根据标准曲线计算辅酶 Q₁₀ 含量。

2 结果与分析

2.1 鉴定结果

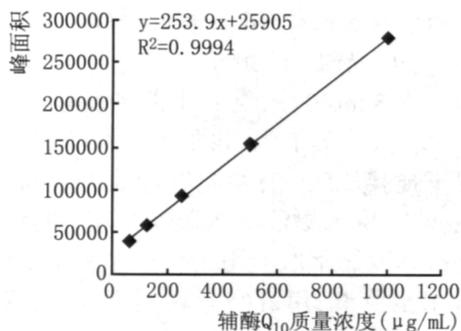
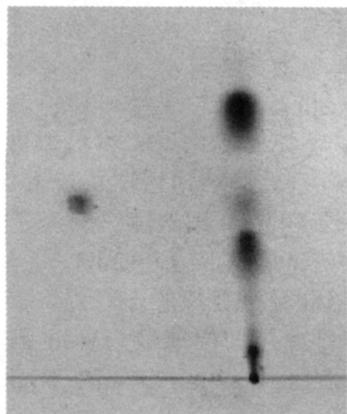
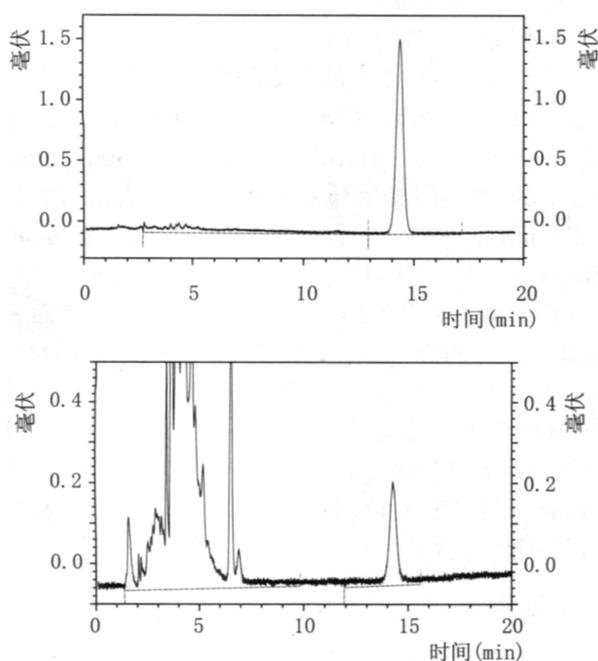
2.1.1 薄层层析鉴定结果

以酸-丙酮萃取法提取得到的辅酶 Q₁₀ 进行鉴定, 结果见图 2。

由图 2 可知, 提取液中含有与标准品保留值相同的物质, 说明提取液中含有辅酶 Q₁₀。

2.1.2 HPLC 法鉴定结果(图 3)

从图 3 可以看出, 辅酶 Q₁₀ 标准品和提取物样品色

图1 高效液相法测定辅酶 Q₁₀ 的标准曲线图2 盐酸-丙酮萃取法提取辅酶 Q₁₀ 薄层层析结果图3 辅酶 Q₁₀ 标准品与提取样品高效液相色谱比较

谱峰图中保留时间均为 14.3 min。证明该酵母提取液中含有辅酶 Q₁₀。

2.2 HPLC 法测定辅酶 Q₁₀ 的含量

在 275 nm 下测定 3 种提取方法辅酶 Q₁₀ 提取物峰

面积分别为：醇碱皂化法 $y_1=30363$ ；超声波破碎法 $y_2=30125$ ；酸-丙酮萃取法 $y_3=30801$ 。根据高效液相回归方程计算出发酵液中辅酶 Q₁₀ 含量(见表 1)。

表 1 不同提取方法辅酶 Q₁₀ 的高效液相色谱含量测定结果

提取方法	醇碱皂化法	超声波破碎法	酸-丙酮萃取法
提取量(g/L)	5.268	4.986	5.785

3 结论

3.1 盐酸-丙酮萃取法提取的辅酶 Q₁₀ 的含量达到 5.785 mg/L, 较其他两种方法的高。原因是酵母细胞的细胞壁较厚, 在用有机溶剂抽提时, 胞内产物不易溶出。而将酵母细胞用盐酸预处理后能有效地提高胞内产物的释放率。而此法设备简单、能耗小、成本低, 对辅酶破坏性也很小, 是值得深入探讨实现大规模生产的方法。

3.2 提取过程中要避免辅酶 Q₁₀ 的氧化破坏, 尤其在碱性条件下, 应加抗氧化剂, 如焦性没食子酸。超声波破碎细胞时在冰浴中进行, 可适当加保护剂; 待测样品不宜放置太久或经适当低温保存。通过 HPLC 分析方法鉴定证实本实验菌种产辅酶 Q₁₀。确定了较理想的辅酶 Q₁₀ 提取方法。

参考文献:

- [1] 安银岭.植物化学[M].哈尔滨:东北林业大学出版社,1996. 137-145.
- [2] 云南省动物研究所.从制备细胞色素 C 的猪心残渣中分离出辅酶 Q₁₀[J].医药工业,1976,(2):22-25.
- [3] Emster L,Dallner G.Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function[J].Biochem Biophys Acta, 1995,1271:195-204.
- [4] Greenber S,Frishman WH.Coenzyme Q₁₀.New drug for cardiovascular Disease[J].Clin Pharmacol,1990,30:596-608.
- [5] 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.
- [6] 韩少英,窦洁,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.
- [7] 邹祥.发酵法生产辅酶 Q₁₀ 的研究进展[J].山东食品发酵,2004,(2):26-28.
- [8] 黄伟,徐建忠,冯晓亮.辅酶 Q₁₀ 研究进展[J].河南化工,2003,2:12-14.
- [9] 白逢彦,梁慧燕,贾建华.酵母菌辅酶 Q₁₀ 提取方法的改进及在假丝酵母属分类学研究中的应用[J].菌物系统,2000,19(2):217-222.
- [10] 俞志敏,栾静,徐鹏,等.耐高糖酿酒酵母原生质体制备与再生过程研究[J].酿酒科技,2008,166(4):45-48
- [11] 郝苏丽,吴越,徐康.HPLC 法测定辅酶 Q₁₀ 方法的研究[J].中国生化药物杂志,1998,(4):167-171.