

热带假丝酵母 辅酶 Q₁₀ 高产菌的选育研究

曲涛, 徐尔尼, 幸锋

(南昌大学食品科学教育部重点实验室, 江西南昌 330047)

摘要: 以热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) AS 2.1387 为出发菌株, 研究紫外线、硫酸二乙酯单因素及复合诱变对出发菌株的诱变效应, 并根据辅酶 Q₁₀ 合成的反馈调节途径, 建立了高产突变菌株的快速筛选方法, 通过放线菌素 D 对突变菌进行广谱抗性初筛, 并以高浓度前体物质对羟基苯甲酸以及终产物结构类似物维生素 K₃ 进行特异性筛选, 选育得到了遗传稳定性良好的辅酶 Q₁₀ 高产突变株 APV.12, 使得 APV.12 菌株辅酶 Q₁₀ 的发酵产量达到 23.958mg/L, 比出发菌株提高了 1.76 倍。

关键词: 热带假丝酵母, 辅酶 Q₁₀, 诱变, 选育

Abstract: *Candida tropicalis* AS 2.1387 was used as the starting strain and subjected to UV- radiation, DES mutagen or composite mutagenesis. On the basis of feedback regulation mechanism for coenzyme Q₁₀ synthesis pathway, a convenient high productivity coenzyme Q₁₀ mutant screening method was set up. Mutants highly resistant to actinomycin - D were screened out in the first round of screening, and a high productivity coenzyme Q₁₀ mutant APV.12 with good genetic stability the mutants were further identified by specific screening with high - concentration coenzyme Q₁₀ precursor p - hydrobenzoic acid and structure analog of end product vitamin K₃, in the second run, and the final coenzyme Q₁₀ yield of the APV.12 reached 23.958mg/L, which was 1.76 times higher than the original strain.

Key words: *Candida tropicalis*; coenzyme Q₁₀; mutation; breeding

中图分类号: TS201.3 文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2007)04-0060-05

辅酶 Q₁₀, 又称泛醌、癸烯醌 (Coenzyme Q₁₀, Ubiquinone-10, 简称 CoQ₁₀), 是一类脂溶性醌类化合物, 化学名称 2,3-二甲氧基-5-甲基-6-癸异戊烯基苯醌^[1]。作为细胞代谢的激活剂和天然抗氧化剂, 辅酶 Q₁₀ 在临床中有着广泛的用途^[2], 日本最早将其做

为心脏病治疗的药物使用, 随后扩展到糖尿病、癌症、急慢性肝炎等疾病的治疗中。近年来逐步应用到食品、保健品和化妆品领域, 展现出了广阔的市场前景^[3]。采用微生物发酵法生产辅酶 Q₁₀ 得到的产品为天然品, 生物活性好, 易被人体吸收; 而且没有原材料的制约, 反应条件温和, 可通过规模放大提高生产能力, 是辅酶 Q₁₀ 生产最具潜力的生产方法^[4]。目前制约发酵法工业发展的主要因素是菌体发酵产量较低, 使得产品产率低, 生产成本较高。由于辅酶 Q₁₀ 合成途径复杂, 受多基因调控, 构建辅酶 Q₁₀ 基因工程高产菌至今未取得突破性进展^[5]。本课题以菌体内辅酶 Q₁₀ 含量较高^[6]的热带假丝酵母为出发菌株, 研究了紫外线和硫酸二乙酯对出发菌株的诱变育种效应, 并建立了辅酶 Q₁₀ 高产突变菌株高效筛选模式, 该法能较大幅度地提高辅酶 Q₁₀ 的发酵产量, 从而解决微生物发酵法生产辅酶 Q₁₀ 菌种发酵产量低的工业化难题。

1 材料与方法

1.1 实验材料

热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) AS 2.1387 购于中国科学院微生物菌种室; 辅酶 Q₁₀ 标准品 购于 Sigma 公司; 斜面培养基 PDA 培养基; 种子培养基 7 Bx 麦芽汁, 葡萄糖 2%, 酵母膏 0.5%, pH 自然; 发酵培养基 葡萄糖 3%, 酵母膏 0.5%, 蛋白胨 0.2%, (NH₄)₂SO₄ 0.1%, 玉米粉 0.1%, MgSO₄ 0.05%, K₂HPO₄ 0.05%, KH₂PO₄ 0.1%, pH 自然。

1.2 实验方法

1.2.1 菌悬液的制备 将热带假丝酵母斜面种接入种子培养液中, 30 振荡培养 24h, 使其处于对数生长期, 离心收集菌体, 用 0.1mol/L pH7.0 的磷酸缓冲液洗涤 3 次^[7], 并制备成细胞浓度为 10⁶ 个/mL 的菌悬液, 另取 1mL 稀释至 10³ 个/mL, 作为计算致死率的空白对照。

收稿日期: 2006-09-20

作者简介: 曲涛(1983-), 男, 硕士研究生, 主要从事工业微生物方面的研究。

基金项目: 江西省教育厅科技项目(赣新技字[2006]51号)。

1.2.2 单因素诱变处理

1.2.2.1 硫酸二乙酯 (DES) 诱变方法 各取细胞浓度为 10^6 个/mL 的菌悬液 1mL, 加入 DES 使其终浓度为 1%, 分别置 30 处理 20、30、40、50、60、70min (磁力搅拌), 25% 的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 终止反应, 各取 0.3mL 涂布 PDA 平板, 30 培养, 参照空白对照计算致死率。

1.2.2.2 紫外 (UV) 诱变方法^[9] 分别取细胞浓度为 10^6 个/mL 的菌悬液 2mL 至平皿中, 在功率为 20W 的紫外灯下, 距离 30cm 处进行紫外照射, 分别处理 30、45、60、75、90、120s (磁力搅拌), 各取 0.3mL 涂布于 PDA 平板中, 避光操作, 30 培养, 参照空白对照计算致死率。

1.2.3 硫酸二乙酯-紫外复合诱变 分别取细胞浓度为 10^6 个/mL 的菌悬液 1mL, 加入 DES 使其终浓度为 1%, 分别处理 20、30、40、50、60min; 转至平皿中, 再置紫外灯下分别照射 30、45、60、75、90s, 各取 0.3mL 涂布于 PDA 平板中, 30 避光培养, 参照空白对照计算致死率。

1.2.4 辅酶 Q_{10} 高产突变菌的筛选方法

1.2.4.1 放线菌素 D (Act.D) 抗性突变株的筛选 分别以浓度 1.0%、1.5%、2.0% 的 Act.D 为稀释液, 制备突变菌菌悬液, 使细胞浓度为 10^3 个/mL, 涂布 PDA 平板上, 30 培养, 观察 Act.D 对突变菌株的生长抑制情况, 筛选出 Act.D 抗性突变株。

1.2.4.2 高浓度对羟基苯甲酸 (PHB) 抗性突变株的筛选^[9] 在 PDA 平板中分别添加浓度为 0.4%、0.5%、0.6%、0.7% 的 PHB, 接入 Act.D 抗性突变株, 30 培养, 观察 PHB 对其生长抑制情况, 筛选出 Act.D-PHB 双抗突变株。

1.2.4.3 终产物结构类似物抗性突变株的筛选^[10] 在 PDA 平板中分别添加浓度为 0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9% 的维生素 K_3 , 接入 Act.D-PHB 双抗突变株, 30 培养, 观察不同浓度维生素 K_3 对其生长抑制情况, 筛选 Act.D-PHB-维生素 K_3 三抗突变菌株, 最后进行发酵产量鉴定。

1.2.5 辅酶 Q_{10} 突变菌株的发酵产量鉴定

1.2.5.1 辅酶 Q_{10} 标准曲线的制作 称取 5mg 辅酶 Q_{10} 标准品, 无水乙醇溶解后准确稀释成 0、4、8、12、16、20、24、28、32、36、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 梯度浓度的溶液, 以无水乙醇作对照, 在 275nm 下分别测其吸光度, 作标准曲线。

1.2.5.2 突变菌的发酵培养 取 Act.D-PHB-维生素 K_3 三抗突变菌斜面种接入种子培养基中, 30 摇床培养 24h, 以 7% 的接种量转接至发酵培养基中, 30 摇床培养 48h。

1.2.5.3 辅酶 Q_{10} 的分离提取 采用碱皂化提取^[11], 将抽提液溶于 1mL 无水乙醇中, 4 冰箱保存。

1.2.5.4 辅酶 Q_{10} 的检测

TLC-UV 检测 抽提液通过荧光薄层层析 (TLC)

分离, 以辅酶 Q_{10} 标准品为对照, 氯仿/苯 (v v/1 1) 为展层剂层析 50min, 风干后从层析板上刮下与标准品平齐的黄色条带^[12], 溶于 1mL 无水乙醇, 在 275nm 处测吸光度, 通过辅酶 Q_{10} 标准曲线计算含量。

HPLC 检测^[13] 抽提液经 TLC 层析纯化分离, 以 HPLC 检测其纯度。HPLC 色谱分析条件如下: 色谱柱: C_{18} 柱; 流动相: 甲醇/无水乙醇 (体积比为 1 1); 进样量: 20 μL ; 柱温: 35 ; 流速: 1mL/min; 监测方法: 紫外 275nm 波长下检测。

1.2.6 辅酶 Q_{10} 高产菌的遗传稳定性实验 将 Act.D-PHB-维生素 K_3 三抗突变菌连续传代 5 次, 并通过发酵检测菌体生物量及辅酶 Q_{10} 的发酵产量, 观察其遗传稳定性。

2 结果与分析

2.1 硫酸二乙酯 (DES)、紫外线 (UV) 单因素诱变结果

诱变的最适剂量应该使突变株在存活群体中占有最大的比例, 从而减少筛选的工作量, 从表 1、表 2 结果可以看出, 以 1% 的 DES 诱变处理 40min 时, 致死率为 86.1%, 突变率为 1.7%, 达到最大; 随着时间的延长, 致死率不断增大, 突变率减小, 60min 时突变率为 0。紫外诱变处理也呈现同样的规律, 在紫外作用 75s 时, 致死率为 95.3%, 突变率达到最大 1.2%, 随着时间的再延长, 致死率迅速增大, 突变率趋近于 0。因此, 我们将单因素的最佳诱变剂量选择为 1% 的 DES 处理 40min, 紫外诱变处理 75s。

表 1 1%DES 诱变剂量对致死率与突变率的影响

时间 (min)	20	30	40	50	60	70
致死率 (%)	66.3	78.2	86.1	95.3	99.4	100
突变率 (%)	-	0.9	1.7	0.76	-	-

表 2 UV 诱变剂量对致死率与突变率的影响

时间 (s)	30	45	60	75	90	120
致死率 (%)	75.6	80.7	88.4	95.3	99.6	100
突变率 (%)	0.72	0.63	0.86	1.2	-	-

2.2 硫酸二乙酯-紫外复合诱变结果

通过 DES-UV 复合诱变, 在不同诱变剂量作用下, 出发菌株的致死率与突变率如表 3、表 4 所示。从结果可以看出, 在复合诱变作用下, 致死率基本上都在 80% 以上, 但从突变率上我们可以看到, 复合诱变效果要明显好于单因素诱变, 其中以 1% 的 DES 处理 40min, 再经紫外处理 60s 后, 突变率达到了 2.71%。因此, 我们将复合诱变作为高产菌筛选的最佳处理方式, 以 1% 的 DES 处理 40min, 再经紫外处理 60s 的复合剂量作为诱变的最佳剂量。

2.3 辅酶 Q_{10} 高产菌的筛选

2.3.1 放线菌素 D 抗性突变株筛选结果 经复合诱

表3 不同复合诱变剂量对出发菌致死率的影响(%)

UV(s)	DES(min)				
	20	30	40	50	60
30	79.3	82.5	87.6	95.7	98.2
45	83.7	86.3	89.4	97.1	99.5
60	89.2	90.5	91.5	96.9	99.3
75	94.2	95.1	95.7	98.2	99.7
90	99.3	99.5	99.2	99.8	100.0

表4 不同复合诱变剂量对出发菌突变率的影响

UV(s)	DES(min)				
	20	30	40	50	60
30	1.10	0.97	1.42	1.53	0.82
45	1.47	1.50	1.91	1.36	-
60	1.73	2.12	2.71	1.89	-
75	1.29	1.52	2.08	-	-
90	0.65	-	-	-	-

变我们得到 2192 株突变菌, 从中挑选出 200 株菌落形态生长良好的菌株进行 Act.D 抗性实验, 结果见表 5。从结果中可以看出, 浓度为 1.5% 的 Act.D 适合抗性突变菌的筛选, 对突变菌的抑制作用比较适中, 我们在此浓度下得到了 67 株生长良好的 Act.D 抗性突变株。

表5 不同浓度 Act.D 对突变菌株的抑制作用

质量浓度(%)	1	1.5	2.0
抑制率(%)	23.3	75.2	98.3

2.3.2 高浓度对羟基苯甲酸(PHB)抗性突变株的筛选结果 将获得的 67 株 Act.D 抗性突变株进行第二次 PHB 抗性突变筛选, 结果见表 6。从 PHB 不同浓度的抑制情况来看, 0.6% 的浓度比较适合, 抑制率为 82.5%, 我们在此浓度筛到了 12 株 Act.D-PHB 双抗性突变菌, 并进行了第三次维生素 K₃ 抗性突变筛选。

表6 不同浓度 PHB 对突变菌株的抑制作用

浓度(%)	0.4	0.5	0.6	0.7
抑制率(%)	51.0	57.9	82.5	99.2

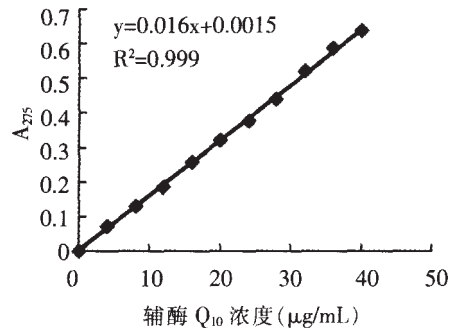
2.3.3 终产物结构类似物抗性突变株的筛选 将 12 株 Act.D-PHB 双抗性突变菌在不同维生素 K₃ 浓度下进行维生素 K₃ 抗性突变筛选, 当浓度为 0.8% 时抑制率为 84.3%, 对突变菌的抑制作用比较适中, 在这一浓度下我们最后筛选得到 3 株 Act.D-PHB-维生素 K₃ 三抗突变菌株, 编号为 APV.03、APV.10、APV.12, 将这三株菌分别进行摇瓶发酵实验, 确定其辅酶 Q₁₀ 发酵产量, 结果见表 7。

表7 不同浓度维生素 K₃ 对突变菌株的抑制作用

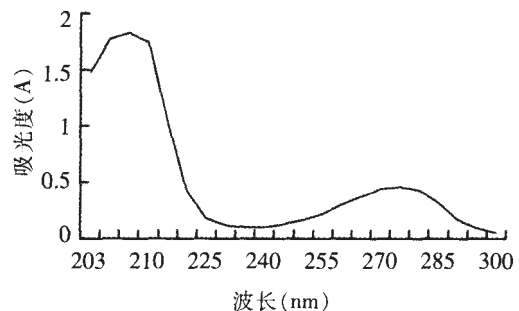
浓度(%)	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
抑制率(%)	0	28.2	67.5	84.3	98.7	100

2.4 抽提液中辅酶 Q₁₀ 的检测

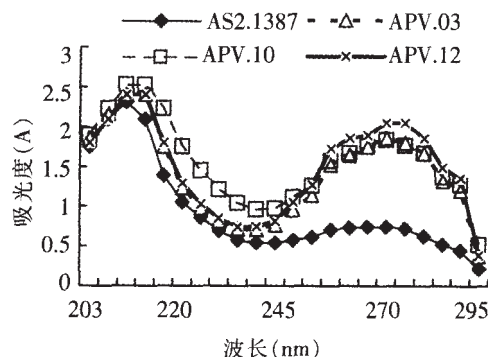
2.4.1 辅酶 Q₁₀ 标准曲线 结果见图 1, 从线性系数可以看出, 在实验取值范围内, 线性关系很好, 可以通过此标准曲线计算辅酶 Q₁₀ 提取样品的含量。

图1 辅酶 Q₁₀ 标准曲线

2.4.2 辅酶 Q₁₀ 抽提液 UV 检测结果 根据辅酶 Q₁₀ 标准品的紫外吸收光谱可知, 辅酶 Q₁₀ 在 209、275nm 处各有一吸收峰, 在 235nm 处出现波谷, 其中 275nm 处为辅酶 Q₁₀ 的特征吸收峰, 可以用作辅酶 Q₁₀ 的定量检测, 结果见图 2。

图2 辅酶 Q₁₀ 标准品紫外检测图谱

取 APV.03、APV.10、APV.12 突变菌株及出发菌株的辅酶 Q₁₀ 抽提液, 分别进行紫外检测, 结果如图 3。图中 AS2.1387 为出发菌株, 从样品的紫外吸收图谱可以看出, 抽提液中的主要成分为辅酶 Q₁₀, 虽含有一些微量的脂溶性杂质, 我们仍可以根据 275nm 处的光吸收值作为辅酶 Q₁₀ 的定量快速检测, 并通过标准曲线计算出发菌株与高产菌的发酵产量。

图3 突变菌辅酶 Q₁₀ 抽提液紫外检测结果

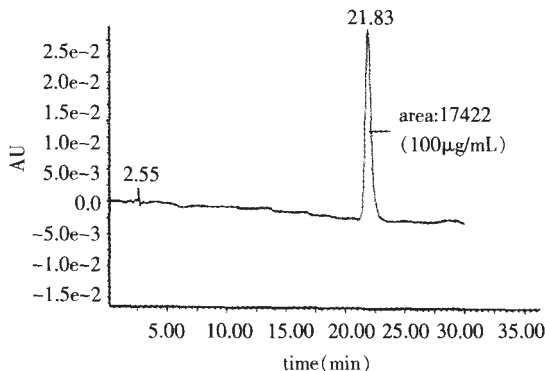
2.4.3 辅酶 Q₁₀ 突变菌株与出发菌株发酵产量比较结果 辅酶 Q₁₀ 高产菌与出发菌株发酵产量比较结果如

表 8 所示, 从表中可以看出, 3 株突变菌在菌体生物量上略低于出发菌株, 但在辅酶 Q_{10} 的发酵产量上均高于出发菌株, 其中以 APV.12 突变株的发酵产量最高, 达到了 23.958mg/L, 是出发菌株的 1.76 倍。

表 8 突变菌发酵产量鉴定

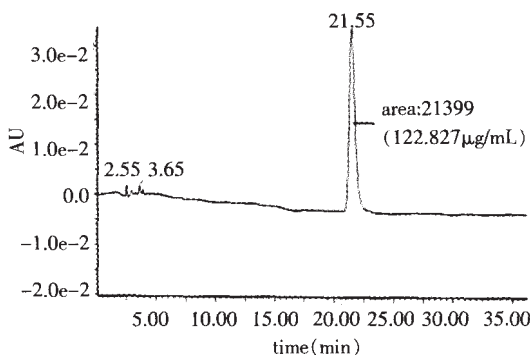
项目	出发菌株		突变菌	
	AS2.1387	APV.03	APV.10	APV.12
菌体生物量(g/L)	20.49	19.66	19.71	19.37
辅酶 Q_{10} (mg/L)	8.678	21.709	21.357	23.958

2.4.4 抽提液中辅酶 Q_{10} 的 HPLC 检测结果 为了进一步确定抽提液中辅酶 Q_{10} 的含量及纯度, 我们对抽提液经 TLC 层析纯化分离到的辅酶 Q_{10} , 与辅酶 Q_{10} 标准品同时采用 HPLC 进行检测比较, 检测结果如图 4、图 5 所示。从结果中可以看出, 辅酶 Q_{10} 标准品的出峰时间在 21.83min, 抽提液中的辅酶 Q_{10} 经过 TLC 薄层层析纯化后, 基本上得到了辅酶 Q_{10} 纯品, 样品出峰时间为 21.55min, 波峰清晰, 与标准品相对应, 在进样 5min 内, 虽有一些小的杂质峰, 但是从峰面积来看, 已经非常少了, 根据峰面积积分计算, 得出样品中辅酶 Q_{10} 的含量为 98.16%。

图 4 辅酶 Q_{10} 标准品 HPLC 检测结果

2.5 辅酶 Q_{10} 高产突变菌的遗传稳定性实验

将辅酶 Q_{10} 高产突变菌株 APV.12 在斜面上连续传代 5 次, 并分别进行发酵实验, 结果见表 9。在传代过程中, 菌体的生物量以及辅酶 Q_{10} 的发酵产量均比较稳定, 具备良好的遗传稳定性。

图 5 辅酶 Q_{10} 纯化样品 HPLC 检测结果

3 讨论

表 9 APV.12 的遗传稳定性实验结果

传代次数(次)	1	2	3	4	5
菌体生物量(g/L)	19.58	19.12	21.26	20.43	20.86
辅酶 Q_{10} (mg/L)	23.762	22.906	24.118	23.942	23.357

3.1 本课题以热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) AS 2.1387 为出发菌株, 研究了紫外线、硫酸二乙酯单因子, 以及复合因子诱变对出发菌株的诱变效应。结果表明, 硫酸二乙酯-紫外复合诱变是最佳的诱变方式, 其最适剂量为 1% 的 DES 处理 40min, 再经紫外处理 60s。

3.2 本实验利用放线菌素 D (Act.D) 抗性突变株广谱抗毒害筛选途径, 筛选得到 67 株 Act.D 抗性突变株, 再进行 Act.D- PHB 双抗突变株特异性筛选, 得到 12 株双抗突变株, 最后根据辅酶 Q_{10} 合成的反馈调节途径, 特异性筛选到 3 株 Act.D- PHB- 维生素 K_3 三抗突变株。其最佳筛选浓度为: Act.D: 1.5%; PHB: 0.6%; 维生素 K_3 : 0.8%。通过发酵实验, 最终选育得到了一株遗传稳定性良好的辅酶 Q_{10} 高产突变株 APV.12, 其发酵产量达到了 23.958mg/L, 比出发菌株提高了 1.76 倍。

3.3 辅酶 Q_{10} 高产突变株 APV.12 的发酵产量是在尚未进行发酵条件优化的基础上获得的, 为满足突变株辅酶 Q_{10} 合成对营养条件、培养温度、最适发酵时间和溶氧等条件的需求^[14], 尚需进一步进行发酵条件的优化及代谢调控的研究, 使其辅酶 Q_{10} 发酵产量再度提高。

参考文献:

- [1] Yoshida H, Kotani Y, Ochiai K, et al. Production of ubiquinone-10 using bacteria[J]. J Gen Appl Microbiol, 1998, 44: 19-26.
- [2] Jin-Ho Choi, Yeon-Woo Ryu, Jin-Ho Seo. Biotechnological production and applications of coenzyme Q_{10} [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2005, 68: 9-15.
- [3] Clarke CF, Williams W, Teruya JH. Ubiquinone biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. J Biol Chem, 1991, 266 (25): 16636-16644.
- [4] Natori Y, Nagasaki T. Formation of coenzyme Q_{10} by *Pseudomonas* M16 - a mutant [J]. Agric Biol Chem, 1979, 43 (4): 797-801.
- [5] Poon WW, Barkovich RJ, Hsu AY, et al. Yeast and rat coq3 and *E. coli* ubiG polypeptides catalyze both omethyltransferase steps in coenzyme Q_{10} biosynthesis[J]. J Biol Chem, 1999, 274 (31): 21665-21672.
- [6] 顾觉奋, 陈光明, 李淑珍. 微生物转化法合成辅酶 Q_{10} [J]. 药学进展, 2001, 25(6): 339-343.
- [7] 潘春梅, 堵国成, 陈坚. 辅酶 Q_{10} 高产菌 *Rhizobium radiobacter* 的选育及发酵条件优化 [J]. (下转第 66 页)

膜在浸入酶反应系统前后它们各自的紫外-可见吸收光谱。可以看出,没有经过甲醛处理的壳聚糖膜在浸入酶反应系统后,在波长 350nm 附近,膜的吸光度比经过甲醛处理的壳聚糖膜在浸入酶反应系统后的吸光度要大得多,而经过甲醛处理的壳聚糖膜在浸入酶反应系统后的吸光度与没有放入酶反应系统的吸收曲线差别很小。Yamamoto^[6]等人提出,这可能是由于酶催化 L-DOPA 产生的中间物-多巴醌与剩余氨基发生了交联反应,而使该膜在 350nm 附近出现吸收峰。另有一些研究者通过实验发现,多巴醌很快就能被有氨基的壳聚糖吸附上去^[7,8]。

2.4.2 SEM 分析 见图 5。

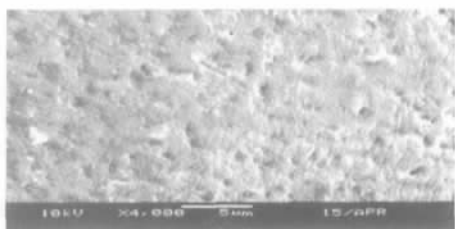


图 5 壳聚糖未固定酶的表面形态

对固定酶前后的壳聚糖进行电镜扫描,如图 5 所示,壳聚糖在未固定酶以前,颗粒直径在 0.45~0.56mm 之间,颗粒上面无大孔,这说明酶只能固定在颗粒表面。而从图 6 看,固定化酶表面呈现多孔性的形态特征,这预示着在酶催化反应期间,物质的大规模转移对反应速度起着非常重要的作用。多巴醌吸附在壳聚糖表面,反应期间,物质的传质阻力将大大增加。因此,未经甲醛遮蔽的壳聚糖固定化酪氨酸

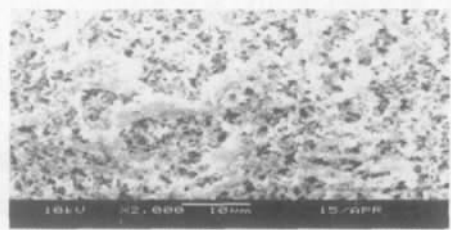


图 6 壳聚糖固定酶后的表面形态

(上接第 63 页) 过程工程学报, 2004,4(5):451-456.

- [8] Natori Y, Nagasaki T. Enhancement of coenzyme Q_{10} accumulation by mutation and effects of medium components on the formation of coenzyme Q_{10} homologs by *Pseudomonas* N842 and mutants[J]. *Agric Biol Chem*, 1981,45(10):2175-2182.
- [9] Sakato K, et al. Agitation-Aeration studies on coenzyme Q_{10} production using *Rhodospseudomonas* phaeiodes[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 1992, 16: 19-28.
- [10] Kawada I, Uchida K, Aida K. Effects of isopentenyl alcohol and its homologues on the ubiquinone production by various microorganisms[J]. *Agric Biol Chem*, 1980,44(2):407-411.
- [11] Hirayama O, Kobayashi T, Mochida K. Ubiquinone

production by *Rhodospseudomonas*[P]. JP:7207954, 1972-03-07.

3 结论

3.1 当载体与戊二醛交联后,是否再经甲醛处理,对固定化酶的稳定性影响较大:如果载体经甲醛处理后,再进行酶的固定化,得到的固定化酶显示出很高的使用稳定性。

3.2 未经甲醛处理的壳聚糖固定化酶,由于上面剩余的氨基会吸附酶催化底物时产生的中间产物-多巴醌而增大传质阻力,导致酶的催化活性降低。经过甲醛处理后,可大大减少对多巴醌的吸附,因而酶的稳定性大大提高。

参考文献:

- [1] 蒋挺大.壳聚糖[M].化学工业出版社,2001.44-47.
- [2] Robb D A. Tyrosinase in Copper Proteins and Copper Enzymes[J].1984(2):207-204
- [3] Streffer K,Kaatz H,et al.Tyrosinase reaction adsorption for Removal of phenols from wastewater[J]. *Chim Acta*,1998,362:81-90.
- [4] Yin -Hui Chen,et al. Solid -state tyrosinase stability as affected by water activity and glass transition[J].*Food Research International*,1999,32:463.
- [5] Schulz G E,et al. Principles of Protein Structure[M].Springer-Verlag, Berlin and New York,1979,Chap.3.
- [6] Yamamoto H,Kuno S,et al. Nsolubilizing and adhesive studies of water -soluble synthetic model proteins [J].*Biol Macromol*,1990(12) :305-310.
- [7] Payne G F,Chaubal M. Enzyme -catalysed polymer modification reaction of phenolic compounds with chitosan films [J].*Polymer*,1996,37:4643-4648.
- [8] Kumar G,Smith P J,et al. Enzymatic grafting of a natural product onto chitosan to confer water solubility under basic conditions[J].*Biotechnol Bioeng*, 1999,63:154-163.
- [9] production by *Rhodospseudomonas*[P]. JP:7207954, 1972-03-07.
- [12] Voigt B,Worbs M,Gabsch G. Recovery of ubiquinones from lipid extracts[P].DDP: 215091,1984- 10- 31.
- [13] Krivankova L,Dadak V. Semimicro extraction of ubiquinone and menaquinone from bacteria [J]. *Methods Enzymol*,1980, 67: 111-114.
- [14] Yong-Cheol Park, Soo-Jung Kim, Jin-Ho Choi, Won-Heong Lee, Kyung-Moon Park, Yeon-Woo Ryu, Jin-Ho Seo. Batch and fed-batch production of Coenzyme Q_{10} in recombinant *Escherichia coli* containing the decaprenyl diphosphate synthase gene from *Gluconobacter suboxydans* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005,67:192-196.