



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101307338 B

(45) 授权公告日 2012. 04. 25

(21) 申请号 200810063121. 5

化合物的研究. 《有机化学》. 1998, 第 18 卷 (第 5 期), 442 — 446.

(22) 申请日 2008. 07. 17

审查员 毛颖

(73) 专利权人 任雷

地址 312500 浙江省新昌县城关镇南明花园
9 幢 111 室

专利权人 任乔

(72) 发明人 任雷 任乔

(74) 专利代理机构 杭州丰禾专利事务所有限公
司 33214

代理人 王鹏举

(51) Int. Cl.

C12P 7/26 (2006. 01)

C12R 1/645 (2006. 01)

C12R 1/01 (2006. 01)

(56) 对比文件

许桂等. 应用固定化 Baker's 酵母还原醌类

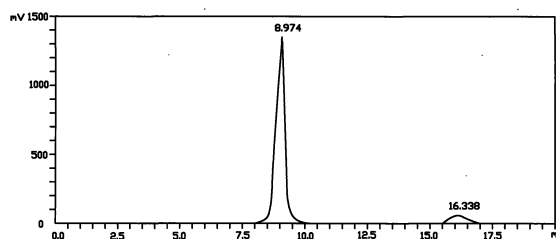
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

还原型辅酶 Q10 的制备方法

(57) 摘要

本发明涉及还原型辅酶 Q10 的制备方法, 尤其涉及使用酶转化法制备还原型辅酶 Q10 的方法. 还原型辅酶 Q10 的制备方法, 该方法包括以下的步骤: ①氧化型辅酶 Q10 原料进行磷酸化; ②通过生物还原酶还原磷酸化的氧化型辅酶 Q10; ③提取还原反应物中的还原型辅酶 Q10. 本发明以天然生物酶转化氧化型辅酶 Q10 来生产还原型辅酶 Q10, 不需要特定保护环境下就可以大规模生产还原型辅酶 Q10. 所生产的还原型辅酶 Q10 具有稳定, 纯天然产品, 安全可靠、可用作于针剂的特点。



1. 还原型辅酶 Q10 的制备方法,其特征在于该方法包括以下的步骤:

一、氧化型辅酶 Q10 原料进行磷酸化

在 37℃的条件下,将 250 克氧化型辅酶 Q10 溶解在 1000 毫升 pH7.4 的磷酸缓冲液中,按照氧化型辅酶 Q10 重量的 5%加 12.5 克磷酸酯,搅拌 30 分钟;

二、生物还原酶的制备

(1) 选择含有辅酶 Q10 的细菌或真菌放置在光照培养箱中培养 72 小时,所述的细菌为红假单胞菌,所述真菌为粟酒裂殖酵母;

(2) 收集培养液,用 6000 转 / 分钟的离心机离心 20 分钟,离心后的菌体用超声波细胞破碎机破碎,加入 200 毫升 3%重量百分比浓度的盐水静置 1 小时;取上清液,加入 500 毫升的 50%重量百分比浓度的硫酸铵沉淀;

(3) 沉淀后在 40℃水浴 1.5 小时,用冷冻离心机在 1 ~ 3℃,12000 转 / 分钟条件下离心 20 分钟;弃上清,加入 300 毫升磷酸缓冲液透析,透析后加入 100 毫升 Sepharose 4B 搅拌,用 200 毫升磷酸缓冲液分三次清洗,加氢氧化钠调 pH8.5,解离;过滤后的液体用冷冻干燥机冻干,得所述的生物还原酶;

三、通过生物还原酶还原磷酸化的氧化型辅酶 Q10

在 37℃~ 60℃的条件下,将制备好的磷酸化氧化型辅酶 Q10,加入反应器中,加入 80mg 制备的生物还原酶,搅拌 10 ~ 30 分钟;

四、提取还原反应物中的还原型辅酶 Q10

采用 0.5MPa,30℃条件下,膜压过滤前述还原反应物,提取生成物,滤液放置 2℃中 5 小时以上;滤过液在 35℃,200Pa 的真空度条件下进行真空浓缩,浓缩物加入 1000ml 水洗 3 次,在 2℃条件下结晶,冷冻干燥结晶物,即得到所述还原型辅酶 Q10。

还原型辅酶 Q10 的制备方法

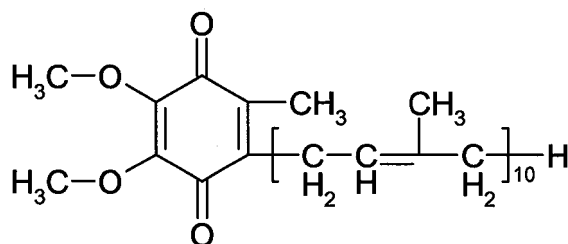
技术领域

[0001] 本发明涉及还原型辅酶 Q10 的制备方法,尤其涉及使用酶转化法制备还原型辅酶 Q10 的方法。

背景技术

[0002] 辅酶 Q10 又名泛醌 10, 是一种脂溶性醌, 在室温下是橙黄色结晶物, 熔点 48℃, 无臭无味, 其结构类似于维生素 K, 因其母核六位上的侧链 (聚异戊二烯基的聚合度为 10 而得名), 是一种醌类化合物, 结构式如下:

[0003]



[0004] 它的另一种形式为还原型辅酶 Q10 生理功能主要来源于醌基的氧化还原特性和类异戊二烯侧链的物理特性,其在人体主要有两个作用,一是有明显的抗脂质过氧化作用,二是营养物质在线粒体内转化为能量的过程中起重要的作用。其醌环在氧化呼吸链中起传递电子和质子的作用,这种作用不仅是所有生命形式必不可少的,而且还是形成 ATP 的关键。它是细胞自身的天然抗氧化剂和细胞代谢激活剂,具有保护和恢复生物膜结构的完整性,稳定膜电位作用,是肌体的非特异性免疫增强剂。目前临床应用于心脏病,肝炎等疾病的辅助治疗。

[0005] 在肌体内起上述 2 个主要作用的是辅酶 Q10 的还原型,所以生产还原型辅酶 Q10 是直接的作用,特别是天然的还原型辅酶 Q10。但是还原型辅酶 Q10 容易被分子氧氧化,在工业规模生产还不能达成。此外还原型辅酶 Q10 是氧化型辅酶 Q10 的二电子还原体,为白色结晶。已知用还原剂将氧化型辅酶 Q10 还原方法生成还原型辅酶 Q10 的方法(如 W001/52822A1)。但是使用这种化学还原剂所生产的还原型辅酶 Q10 在用于保健食品,饮料,化妆品,药品等时存在着分子氧氧化的问题。至今还没有商业化还原型辅酶 Q10。同时,怎么保护和稳定还原型辅酶 Q10,还没有一个真正的解决办法。

[0006] 另外,现有的生产还原型辅酶 Q10 的方法上存在着大量使用化学还原剂或者添加保护剂添加剂,有机溶剂等。用于药品食品化妆品等组合,无疑首先是对环境的污染,其次用于人体是否安全,可靠显然存在有大量问题。特别是这些还原剂,保护剂等的组合对人体的危害远大于辅酶 Q10 的正性作用。

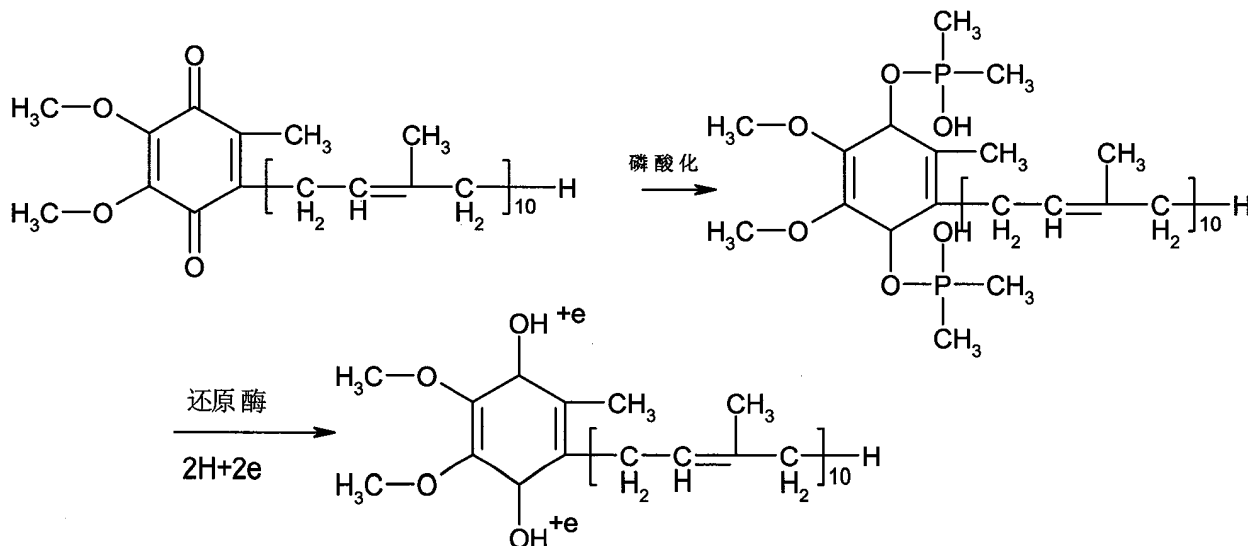
发明内容

[0007] 为了解决上述的还原型辅酶 Q10 制备存在的技术问题,本发明的目的是提供一种使用酶转化法制备还原型辅酶 Q10 的方法,该方法制备得到的产品为纯天然品,安全可靠。

[0008] 为了实现上述的目的,本发明采用了以下的技术方案:

[0009] 还原型辅酶 Q10 的制备方法,该方法包括以下的步骤:①氧化型辅酶 Q10 原料进行磷酸化;②通过生物还原酶还原磷酸化的氧化型辅酶 Q10;③提取还原反应物中的还原型辅酶 Q10。上述步骤的反应方程式如下:

[0010]



[0011] 作为优选,上述的步骤②中的生物还原酶的制备方法如下:

[0012] (1) 选择含有辅酶 Q10 的细菌、酵母菌或真菌进行培养;

[0013] (2) 破碎细胞体,用 30%~70%重量百分比浓度的硫酸铵沉淀;

[0014] (3) 分离沉淀物、透析得到所述生物还原酶。

[0015] 采用上述的方法制备得到的生物还原酶与磷酸化的氧化型辅酶 Q10 具有良好的还原性能,提高了还原型辅酶 Q10 的得率。

[0016] 作为优选,上述的步骤 (1) 选用光合菌或红极毛杆菌。

[0017] 作为优选,上述的步骤 (2) 破碎细胞体采用超声波细胞破碎机。

[0018] 作为优选,上述的步骤 (3) 的方法如下:沉淀后在 35℃~45℃水浴 1~2 小时,用冷冻离心机在 1℃~3℃,10000~15000 转/分钟的条件下离心 10~30 分钟,弃上清,加入磷酸缓冲液透析。

[0019] 作为再优选,透析后加入 Sepharose 4B 搅拌,用磷酸缓冲液分三次清洗,加氢氧化钠调 PH8.5,解离;过滤后的液体用冷冻干燥机冻干,得所述的生物还原酶。上述的方法提供生物还原酶的精制方法,提高生物还原酶的纯度。

[0020] 作为优选,上述的步骤①中氧化型辅酶 Q10 进行磷酸化的步骤是:在 28℃~45℃的条件下,将氧化型辅酶 Q10 溶解在磷酸缓冲液中,按照氧化型辅酶 Q10 重量的 2~10%加入磷酸酯或者任何一种磷酸酯盐类,搅拌 10~120 分钟。上述的技术方案提供了一种氧化型辅酶 Q10 磷酸化的方法,该方法具有操作简便的特点。

[0021] 作为再优选,上述的磷酸缓冲液的 PH 值为 6.0~8.2。

[0022] 作为优选,上述的步骤③的提取方法如下:膜压过滤反应物提取生成物,对生成物进行真空浓缩,浓缩液中加入水,在 2℃~10℃温度条件下结晶,冷冻干燥结晶物,即得到所述的还原型辅酶 Q10。上述的技术方案提供了提取还原型辅酶 Q10 的方法,通过上述的方

法提取,提高了还原型辅酶 Q10 的得率。

[0023] 作为再优选,上述的膜压过滤的膜压为 0.1MP ~ 0.8MP。

[0024] 本发明是由于采用了以上的技术方案,以天然生物酶转化氧化型辅酶 Q10 来生产还原型辅酶 Q10,不需要特定保护环境下就可以大规模生产还原型辅酶 Q10。所生产的还原型辅酶 Q10 具有以下的特点:

[0025] ①稳定,不被空气中的分子氧以及化合物中的氧分子氧化。还原型辅酶 Q10 原料在 PH6.0 ~ 8.2 的磷酸缓冲液中保持原有的性质,也可在 50℃ 以下的条件下保存 2 年以上。

[0026] ②纯天然产品,没有还原剂的残留物,也没有任何抗氧化剂,保护剂等化学制品。用于食品,药品,化妆品,安全可靠。

[0027] ③原料磷酸化后既得辅酶 Q10 是一种真正意义上的水溶性物质,可用作于针剂。

附图说明

[0028] 图 1 为本发明制备得到的还原型辅酶 Q10 的 HPLC 图谱。

具体实施方式

[0029] 实施例 1

[0030] 利用细菌制备生物还原酶的方法:

[0031] 一、选种:显微镜下红假单胞光合菌,菌体形态,为短杆或圆卵形,宽为 0.5-0.9 微米,长 1.2-2.0 微米。芽孢,无荚膜,单极鞭毛,可运动的健康菌种。

[0032] 二、配制发酵液:5.5 克磷酸二氢钠,1.5 克 DL 苹果酸,2.0 克乙酸钠,2.0 克氢氧化钠,1.0 克氯化铵,0.25 克氯化镁,0.05 克氯化钙,3.5 克葡萄糖溶于 1.0 升蒸馏水,搅拌均匀。测定 PH 应于 6.5-7.0 间。

[0033] 三、取 250 毫升三角瓶 10 只,每只灭菌后注入 100 毫升培养液,接种后密封。放置在 32℃ 的光照培养箱中培养 72 小时,取出。

[0034] 四、收集培养液,用 6000 转 / 分钟的离心机离心 20 分钟。离心后的菌体用超声波细胞破碎机破碎,加入 3% 重量百分比浓度的盐水 200 毫升静置 1 小时。取上清液,加入 500 毫升的 50% 重量百分比浓度的硫酸铵,40℃ 水浴 1.5 小时,用冷冻离心机在 4℃,12000 转 / 分钟条件下离心 20 分钟。弃上清,加入 300 毫升磷酸缓冲液透析。加入 100 毫升 Sepharose 4B 搅拌,用 200 毫升磷酸缓冲液分三次清洗,加氢氧化钠调 PH8.5,解离。过滤后的液体用冷冻干燥机冻干,得 80 毫克生物还原酶。

[0035] 实施例 2

[0036] 利用酵母菌制备生物还原酶的方法

[0037] 一、选种:Schizosaccharomyces Promb(粟酒裂殖酵母)

[0038] 二、配制发酵液:牛肉膏 0.3 克、蛋白胨 1.0 克、NaCl 0.5 克、水 100 毫升,调 pH 7.0 ~ 7.2 在烧杯中加水,称取牛肉膏、蛋白胨和 NaCl,加热溶化后,调节 pH 值至 7.0 ~ 7.2。分装,加棉塞,高压蒸汽灭菌即成。

[0039] 三、取 250 毫升三角瓶 10 只,每只灭菌后注入 100 毫升培养液,接种后密封。放置在 35℃ 的光照培养箱中培养 72 小时,取出。

[0040] 四、收集培养液,用 6000 转 / 分钟的离心机离心 20 分钟。离心后的菌体用超声波

细胞破碎机破碎,加入 3%重量百分比浓度的盐水 200 毫升静置 1 小时。取上清液,加入 500 毫升的 50%重量百分比浓度的硫酸铵,40℃水浴 1.5 小时,用冷冻离心机在 5℃,12000 转/分钟条件下离心 20 分钟。弃上清,加入 300 毫升磷酸缓冲液透析。加入 100 毫升 Sepharos 4B 搅拌,用 200 毫升磷酸缓冲液分三次清洗,加氢氧化钠调 PH8.5,解离。过滤后的液体用冷冻干燥机冻干,得 80 毫克生物还原酶。

[0041] 实施例 3

[0042] 利用真菌制备生物还原酶的方法

[0043] 一、选种 :Enophytic(内生多节胞菌)

[0044] 二、配制发酵液 :牛肉膏 0.3 克,蛋白胨 1.0 克,氯化钠 0.5 克,琼脂 1.5 克,水 100 毫升。

[0045] 三、取 250 毫升三角瓶 10 只,每只灭菌后注入 100 毫升培养液,接种后密封。放置在 36℃的光照培养箱中培养 72 小时,取出。

[0046] 四、收集培养液,用 6000 转/分钟的离心机离心 20 分钟。离心后的菌体用超声波细胞破碎机破碎,加入 3%重量百分比浓度的盐水 200 毫升静置 1 小时。取上清液,加入 500 毫升 50%重量百分比浓度的硫酸铵,40℃水浴 1.5 小时,用冷冻离心机在 2℃,12000 转/分钟条件下离心 20 分钟。弃上清,加入 300 毫升磷酸缓冲液透析。加入 100 毫升 Sepharos 4B 搅拌,用 200 毫升磷酸缓冲液分三次清洗,加氢氧化钠调 PH8.5,解离。过滤后的液体用冷冻干燥机冻干,得 80 毫克生物还原酶。

[0047] 实施例 4

[0048] 使用氧化型辅酶 Q10 为原料,在生物还原酶的作用下,转化成纯天然(即天然品)还原型辅酶 Q10。

[0049] 一、氧化型辅酶 Q10 磷酸化,在 37℃的条件下,将 250 克氧化型辅酶 Q10 溶解在 1000 毫升磷酸缓冲液中(PH7.4)。按照氧化型辅酶 Q10 重量的 5%加 12.5 克磷酸酯,搅拌 30 分钟。

[0050] 二、按照上述的实施例 1~3 的方法制备生物还原酶待用。

[0051] 三、在 37℃~60℃的条件下,将制备好的磷酸化氧化型辅酶 Q10,加入反应器中,加入 80mg 制备的生物还原酶,搅拌 10~30 分钟;

[0052] 四、膜压过滤:采用 0.5μm,在 30℃条件下过滤,滤液放置 2℃中 5 小时以上;

[0053] 五、滤过液放在 35℃,200Pa 的真空度条件下浓缩;

[0054] 六、浓缩物加入 1000ml 水洗 3 次,在 2℃条件下结晶;

[0055] 七、结晶体在冷冻干燥机中干燥得 248.2g,成品纯度 99.4%;经检测,无氧化型辅酶 Q10 的存在。

[0056] 测试例 1

[0057] 取实施例 4 制备得到的还原型辅酶 Q10,采用 HPLC 方法测定。

[0058] 设备:岛津 S-10Avp 波长:275nm

[0059] 流动相:乙醇:甲醇=1:1(v:V)

[0060] 柱子:十八烷基硅胶柱;长:180mm 内经:3.2mm

[0061] 称取还原型辅酶 Q10

[0062] 20mg,溶于乙醇至 100ml,进样量 20μl,外标三点法计算含量。出峰时间 8.974min。

测定的图谱如图 1 所示。

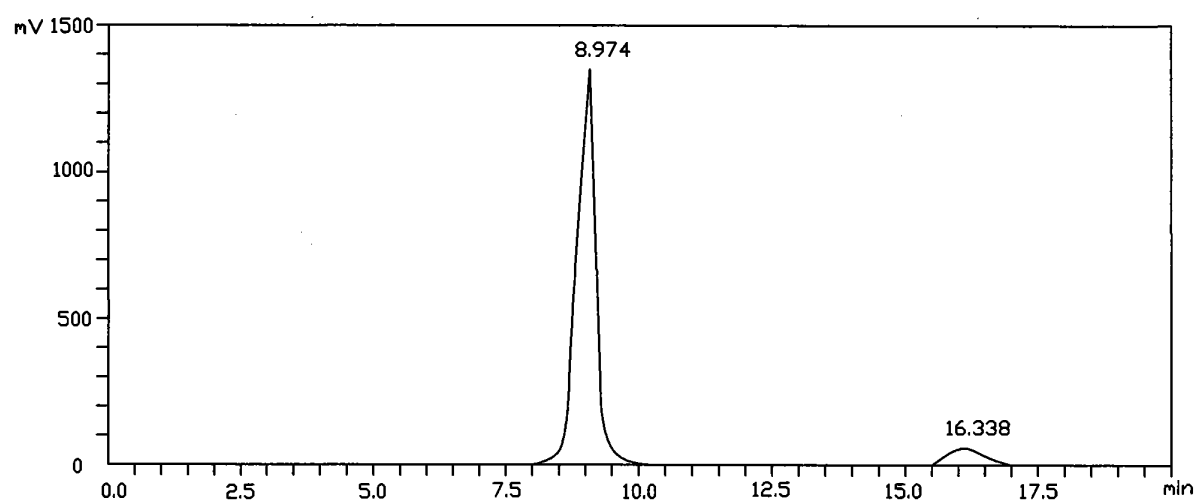


图 1