产生辅酶 Q_{10} 的光合细菌菌株的分离及鉴定

方立超 黄雪峰 杜珍辉 袁 静 魏 泓*
（第三军医大学基础部实验动物学教研室 重庆 400038）

摘 要 对水塘污泥中富集分离的 13 株光合细菌产生的 CoQ_{10} 进行定性定量分析，筛出 CoQ_{10} 含量较高的菌株 2c 并对其进行系统鉴定。菌株 2c 为革兰氏阴性菌，细胞杆状，菌体大小 0.6μm～0.9μm×1.2μm～2.0μm，单极生鞭毛，片层状光合内膜，位于细胞质膜下并与之平行。光照厌氧或黑暗好氧条件下均可生长，光照下菌体产生红色素，菌体含有细菌叶绿素 a 和类胡萝卜素。最适生长温度 30～35℃，pH7.0～8.0。多种有机化合物均可作为光合作用的电子供体和碳源，蛋白胨和硫酸铵是其生长的较好氮源，酵母膏对其生长有明显刺激作用。16S rDNA 序列系统发育分析表明，菌株 2c 在系统进化树上与 GenBank 中序列号为 AY751758、DQ001155、DQ001158 的沼泽红假单胞菌聚为一族。菌株 2c 至少能稳定传代 15 次。初步确定菌株 2c 为沼泽红假单胞菌。

关键词 光合细菌，分离，菌株鉴定，16S rDNA，稳定性
中图分类号：Q939 **文献标识码**：A **文章编号**：0001-6209（2005）05-0772-04

自然界的辅酶 Q 中只有辅酶 Q_{10}（CoQ_{10}）具有医疗价值。CoQ_{10} 作为生物体内细胞呼吸链上的电子递氢体和能量代谢的激活剂，是人体重要的生化辅酶之一，正常人体内 CoQ_{10} 约 1.5g。由于膳食的不平衡或随着年龄的增长，人体内的 CoQ_{10} 通常达不到需要的水平，当 CoQ_{10} 少于正常水平 20%则可导致各种机能的下降和许多疾病的产生[1]。CoQ_{10} 具有消除自由基、维持细胞膜通透性、提高免疫功能等药理作用，因而其预防保健作用一直为人们所重视[2]。当前认为 CoQ_{10} 的生产方法中微生物发酵法具有原料来源方便、生产不受季节限制、易扩大生产及生产的 CoQ_{10} 生物活性高等诸多优点。微生物发酵提取法生产 CoQ_{10} 的关键在于：要求有稳定的规模化生产高质量 CoQ_{10} 的菌种；要求有高精度分离仪器和技术[3]。当前国外的文献报道主要集中在 CoQ_{10} 对心血管疾病、帕金森氏综合症、糖尿病等疾病的预防和治疗，以及利用色谱等手段检测机体内 CoQ_{10} 的含量和氧化还原状态等研究[4～10]，未见有选育并改造 CoQ_{10} 产生菌株，以提高其含量方面的报道。目前国际市场上 CoQ_{10} 仍然处于供不应求态势，因此积极寻求 CoQ_{10} 含量较高的微生物菌株，具有重要现实意义。

据报道某些紫色非硫光合细菌富含 CoQ_{10}[11]，因此我们利用 Van Niel 紫色非硫光合细菌的富集培养基从鱼池污泥中富集、分离出 13 株光合细菌，同时对这 13 株菌产生的 CoQ_{10} 进行了定性定量分析，并对其中 CoQ_{10} 含量最高的 1 株菌进行了表型特征、生理生化特性及 16S rDNA 的系统发育分析及传代稳定性实验，为以后提高 CoQ_{10} 产量提供菌株材料。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器：细菌基因组 DNA 抽提试剂盒（VIOGENE）、DNA Marker 和 PCR 扩增试剂盒（TaKaRa 公司）；PCR 产物纯化试剂盒（上海华舜生物工程有限公司的小量胶回收试剂盒）；细菌通用引物（上海基康生物技术有限公司合成）；琼脂糖（TBD）和 CoQ_{10} 标准品（Sigma）。Agilent 1100 Series 高效液相色谱仪，Agilent 8453 型紫外/可见分光光度计（美国贝克公司）；PTC-150 型 PCR 仪（美国 MJ RESEARCH 公司）；水平电泳仪（江苏海门市麒麟医用仪器厂）；Bio-Rad GelDoc2000 型凝胶成相系统（美国）；TECNI10 型透射电子显微镜（荷兰）。

1.1.2 培养基：Van Niel 紫色非硫细菌用培养基见文献[11]；RCVBN 培养基见文献[12]；富集培养基：每升含 NaH_2PO_4 5.5mg，苹果酸 1.5mg，乙酸钠 2mg，NaOH 2mg，NH_4Cl 1mg，$MgCl_2$ 0.25mg，$CaCl_2$ 0.05mg，酵母膏 1mg，微量元素 1mL，pH7.0。

1.2 菌株富集分离和培养

用 Van Niel 富集培养基对采自第三军医大学后门附近鱼池底表层光照污泥进行光照厌氧培养，5～10d 后取微红培养物接种于第 2 瓶富集培养基中继续培养，重复 2～3 次后用 Van Niel 分离培养基进行多次划线分离，获得 13 株光合细菌菌株，并从中选出 CoQ_{10} 含量较高的 1 株菌株，命名为 2c，用富集培养基富集培养，然后进行菌株鉴定。

1.3 具有较高 CoQ_{10} 含量菌株的筛选[13]

用本研究分离获得的 13 株光合细菌，在 RCVBN 液体培

* 通讯作者。Tel/Fax：86-23-68752051；E-mail：weihong@mail.tmmu.com.cn
作者简介：方立超（1973－），女，四川泸县人，博士研究生，主要从事应用微生物学研究。E-mail：fanglichao@yahoo.com.cn
其他作者：陈海华，刘 宇

收稿日期：2004-12-20，修回日期：2005-05-13

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

养基中光照厌氧培养 10d，待培养液颜色变红，比浊定量达 10^9 个/mL，菌液于 8000r/min 离心 15min，所得菌体再用无菌生理盐水洗涤两次，用皂化法提取菌体中的辅酶 Q，利用 CoQ_{10} 标准品进行薄层层析、Craven 实验、190～320nm 波长连续扫描、高效液相色谱法（色谱柱为 ODS HypersilC18（25cm × 4.0mm ID），用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂，以甲醇/无水乙醇（体积比为 1∶1）为流动相，柱温 35℃，检测波长 275nm，进样量 20μL）进行 CoQ_{10} 定性定量分析。选出 CoQ_{10} 含量较高的 1 株菌，命名为 2c。

1.4 菌落及菌体形态观察

对 Van Niel 分离固体培养基上的菌落形态进行记述，通过革兰氏染色、透射电镜观察 2c 菌株的个体形态、鞭毛及光合内膜结构。

1.5 培养特性观察

取两支厌氧管，一支装满 RCVBN 液体培养基，另一支装 2/3 体积，接种，分别于 30℃、35℃、40℃、45℃，1500lx 光照培养 72h，观察菌液的颜色和浊度变化情况；分别配制 pH5.0，5.5，6.0，7.0，7.5，8.0，9.0，9.5，10.0，11.0，12.0 的 RCVBN 液体培养基，培养 72h 后各以其培养基为参比，用 751 型分光光度计测定 OD_{660}。

1.6 生理生化特征实验

参照文献[14,15]中相应属、种鉴定的有关内容选择生理生化试验性状。主要进行了唯一碳源、氮源、电子供体及生长因子生长试验、降解活性试验、触酶试验。

1.7 活细胞吸收光谱的测定

培养菌液经离心洗涤后，悬浮于 60% 的蔗糖溶液中，在 190～900nm 波长连续扫描，记录特征吸收峰处波长。

1.8 菌株 16S rDNA 序列测定

菌体 DNA 的提取按 VIOGENE 公司的细菌基因组 DNA 抽提试剂盒操作说明进行；以上海基康生物技术有限公司合成的 16S rDNA 通用引物（F primer：5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′，R primer：5′-GGTTACCTTGTTACGACTT-3′）进行 PCR 扩增，PCR 反应体系（25μL）：包括 10 × Buffer 2.5μL，25mmol/L $MgCl_2$ 1μL，2.5mmol/L dNTP 1μL，F 和 R 引物（20μmol/L）各 0.5μL，1μL 模板 DNA，1.25U *Taq*DNA 聚合酶，去离子水 18.25μL。PCR 反应条件：94℃ 2min；94℃ 30s，56℃ 1min，72℃ 45s，12 个循环，并且每个循环降低 0.5℃；94℃ 30s，50℃ 40s，72℃ 45s，35 个循环；72℃ 7min。扩增产物的纯化按上海华舜生物工程有限公司的小量胶回收 PCR 产物纯化试剂盒说明，测序由上海基康生物技术公司完成，测序引物为：5′-CAGAGTTCCCGAAGGCACC-3′。

1.9 系统发育分析

首先用 BLAST 方式将测定的序列与 GenBank 中已公布的 16S rDNA 序列进行比对，从中选出相似性为 98% 的 3 个序列和紫色非硫细菌属的沼泽红假单胞菌（*Rhodopseudomonas palustris*）、类球红细菌（*Rhodobacter sphaeroides*）、深红红细菌（*Rhodospirillum rubrum*）、荚膜红细菌（*Rhodobacter capsulatus*）4 个种的部分序列共 23 个 16S rDNA 序列。用 CLUSTLX 对这 23 个序列进行多序列联配并构建系统发育树，重复次数选用 1000，用 Bootstrap 分析评估树的稳定性。

1.10 菌株的传代稳定性实验

在 Van Niel 分离固体培养基上连续传代菌株 15 次，观察菌落形态、颜色、大小和革兰氏染色及活菌体的光谱吸收情况。

2 结果

2.1 CoQ_{10} 含量较高菌株的筛选

13 株光合细菌均含有 CoQ_{10}，1～13 号菌株 CoQ_{10} 含量（mg/g 干细胞）高低分别为 26.416、20.948、17.578、15.716、15.108、13.090、11.730、8.336、4.270、3.790、1.089、0.269 和 0.049。我们选择 CoQ_{10} 含量较高的 1 号菌株，将其命名为 2c。

2.2 菌株的形态和培养特征

菌株 2c 革兰氏染色阴性。单个细胞为杆状，菌体大小 0.6μm～0.9μm × 1.2μm～2.0μm，具单极生鞭毛（图 1-A）和片层状光合内膜结构，位于质膜下并与之平行（图 1-B）。单菌落在固体培养基上厌氧光照培养呈棕红色，直径 0.5mm～1.5mm，表面凸起、光滑湿润，边缘整齐。在光照厌氧和黑暗好氧条件下均可生长，但适合光照厌氧培养，培养物为红色。适宜生长的温度为 30℃～40℃，pH 为 7.0～7.5。

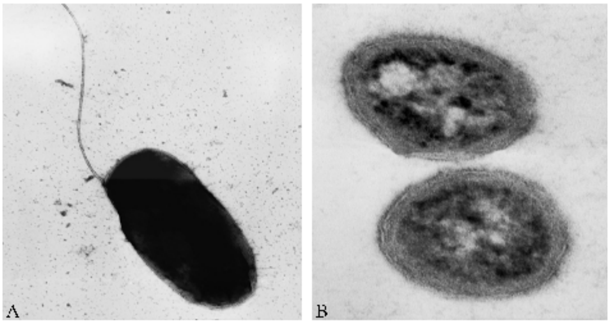

图 1 （A）菌株 2c 负染电镜图（70000 ×）；（B）菌株 2c 光合内膜片层状结构的透射电镜图（90000 ×）

Fig.1 （A）Negative staining transmission-electron micrograph of strain 2c（70000 ×）；（B）Thin section transmission-electron micrograph of strain 2c showing lamellar intracytoplasmic membrane（ICM）（90000 ×）
A：Rod cell with one long flagellum，Bar，800nm；B：Bar，280nm.

2.3 菌株生理生化特征

菌株能利用乙酸盐、丙酮酸、柠檬酸盐、丁酸盐、苹果酸盐、琥珀酸盐、乳酸盐、甲酸盐、果糖、葡萄糖、乙醇和硫代硫酸钠，不能利用甲醇。能利用蛋白胨、硫酸铵、谷氨酸盐、硝酸铵和硝酸钾，不能利用亚硝酸钾。菌株能水解淀粉和液化明胶，触酶实验阳性，生长因子是生物素和对氨基苯甲酸。

2.4 活细胞吸收光谱的测定

菌株活细胞的特征吸收峰为 387、591、806、865nm，因叶绿素 a 在 390、810、860nm 处有特征吸收峰，类胡萝卜素在 500nm 处有特征吸收峰，因此菌株 2c 含有叶绿素 a 和类胡萝

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

卜素。

2.5 16S rDNA 序列分析

菌株 2c 扩增出的 DNA 片段条带单一，大小约为 1.4kb，与红假单胞菌属已知菌株 16S rRNA 片段大小相符。在 GenBank 中的序列号为 AY834756，在系统发育树上与序列号为 AY751758、DQ001155、DQ001158 的沼泽红假单胞菌聚为一族，与序列号为 AF025369、AB114621、AY186083 菌株的相似性为 98%（图 2）。

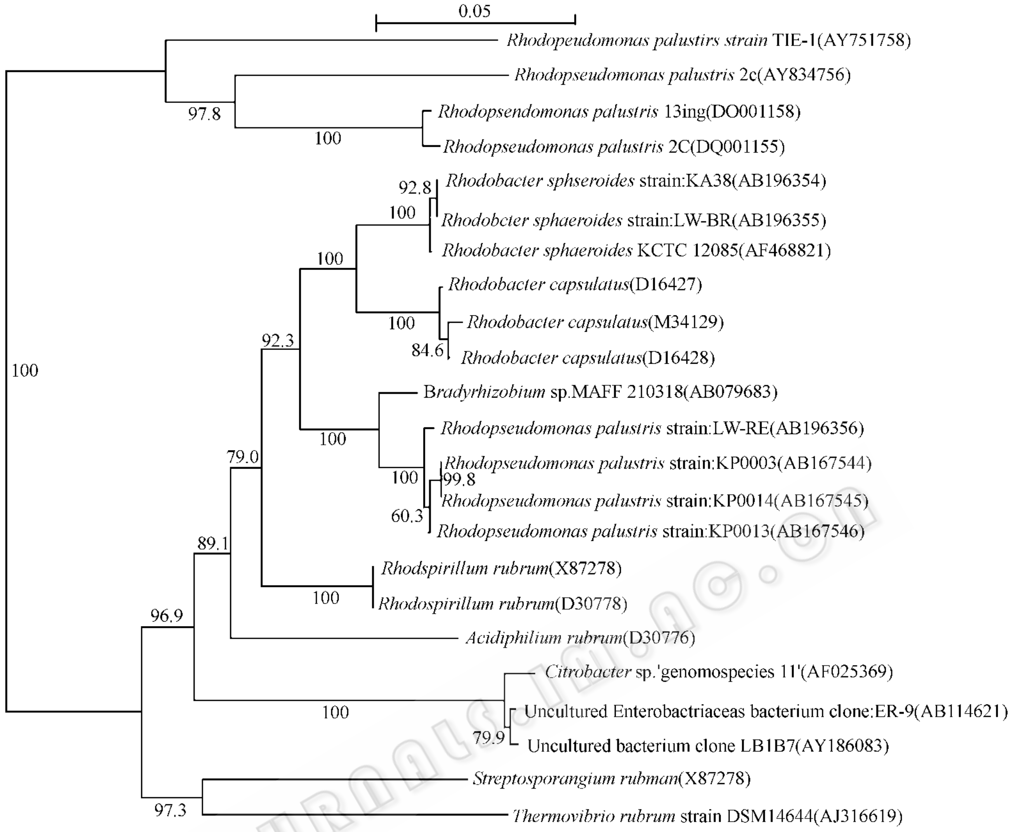

图 2 以 16S rDNA 同源性为基础的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree based on 1419 bp-fragment of 16S rDNA sequences

The numbers at each branch points indicate the percentage supported by bootstrap, and in parentheses after each bacterial name are 16S rDNA accession number in GenBank. Bar, 5% sequence divergence.

2.6 菌株传代稳定性

菌株连续传代 15 次后，其生长速度、革兰氏染色结果、菌体形态大小、活菌体光谱吸收峰都无明显变化。表明菌株 2c 能进行稳定传代，符合一般生产菌种需要。

3 讨论

从上述实验分析，菌株 2c 为革兰氏阴性菌，菌体杆状，以单极生鞭毛运动，光合内膜结构片层状。细胞含有特征性菌绿素 a 和类胡萝卜素，主要醌类是 CoQ_{10}，能利用柠檬酸钠、硫代硫酸钠，生长因子是生物素和对氨基苯甲酸，酵母膏对其生长有刺激作用，以上特征是沼泽红假单胞菌所特有。根据上述形态和生理生化特征，参照《伯杰氏系统细菌学手册》（第 9 版）和东秀珠等编著的《常见细菌系统鉴定手册》（第 1 版），认为菌株 2c 为沼泽红假单胞菌。又据 16S rDNA 基因序列系统发育分析可见 2c 与序列号为 AY751758、DQ001155、DQ001156 和 DQ001158 的沼泽红假单胞菌在系统发育树上聚为一族，因此确定菌株 2c 为 1 株未从 16S rDNA 水平上鉴定过的沼泽红假单胞菌（*Rhodopseudomonas palustris*）。

综上沼泽红假单胞菌菌株 2c CoQ_{10} 含量较高，传代稳定，值得对其 CoQ_{10} 含量进一步提高进行深入研究。

参 考 文 献

[1] 寿伟椿. 中国医药报, 1996.10.24.

[2] 吴祖芳, 翁佩芳, 陈 坚. 辅酶 Q_{10} 的功能研究进展. 宁波大学学报(理工版), 2001, **14**(2): 85 – 88.

[3] 赵美法. 重要的原料药——辅酶 Q_{10}. 精细与专用化学品, 2001, **22**: 6 – 8.

[4] Shults C W, Beal M F, Song D, *et al*. Pilot trial of high dosages of coenzyme Q_{10} in patients with Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, 2004, **188**(2): 491 – 494.

[5] Bliznakov E G. Diabetes and the role of isoprenoid biosynthesis. *FEBS Letters*, 2002, **525**(1 – 3): 169 – 170.

[6] Miles M V, Morrison J A, Horn P S, *et al*. Coenzyme Q_{10} changes are associated with metabolic syndrome. *Clinica Chimica Acta*, 2004, **344**(1 – 2): 173 – 179.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

[7] Hoenjet K M J L F, Dagnelie P C, Delaere K P J, *et al*. Effect of a nutritional supplement containing vitamin E, selenium, vitamin C and coenzyme Q_{10} on serum PSA in patients with hormonally untreated carcinoma of the prostate: A randomised placebo-controlled study. *European Urology*, 2005, **47**(4): 433 - 440.

[8] Galinier A, Carrière A, Fernandez Y, *et al*. Biological validation of coenzyme Q redox state by HPLC-EC measurement: relationship between coenzyme Q redox state and coenzyme Q content in rat tissues. *FEBS Letters*, 2004, **578**(1 - 2): 53 - 57.

[9] Jiang P, Wu M, Zheng Y, *et al*. Analysis of coenzyme Q_{10} in human plasma by column-switching liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 2004, **805**(2): 297 - 301.

[10] Battino M, Leone L, Bompadre S. High-performance liquid chromatography—EC assay of mitochondrial coenzyme Q_9, coenzyme Q_9H2, coenzyme Q_{10}, coenzyme $Q_{10}H2$, and vitamin E with a simplified on-line solid-phase extraction. *Methods in Enzymology*, 2004, **378**: 156 - 162.

[11] 刘如林, 刁虎欣, 梁凤来, 等. 光合细菌及其应用. 北京: 中国农业部科技出版社, 1991.

[12] 焦瑞声, 周德庆. 微生物生理代谢实验技术. 北京: 科学出版社, 1990, 77.

[13] 张加春, 杨爱明, 刘 刚. 一株产 CoQ_{10} 的红假单胞菌的研究. 云南师范大学学报, 2003, **23**(1): 48 - 50.

[14] Hot G J, Krieg R N, Sneath H A P, *et al*. Bergey's Manual of Determininative Bacteriology. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.

[15] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.

Isolation and identification of a photosynthetic bacteria producing coenzyme Q_{10}

FANG Li-chao HUANG Xue-feng DU Zhen-hui YUAN Jing WEI Hong*

(*Department of Laboratory Animal Science, Third Military Medical University, Chongqing* 400038, *China*)

Abstract: 13 isolates producing Coenzyme Q_{10} (CoQ_{10}) of purple non sulfur photosynthetic bacteria were enriched out of pond sludge, one isolate named 2c was selected based on its high CoQ_{10} content and identified systematically. The gram-negative and short-rod shaped strain 2c is 0.6μm ~ 0.9μm × 1.2μm ~ 2.0μm, has one long flagellum on one end of the cell and contains lamellar intracytoplasmic membrane (ICM) system parallel to cytoplasmic membrane. Cultures produce red pigments in the light. Live cells under phototrophic conditions contain bacteriochlorophyll a and carotenoids. 2c grows anaerobically in the light and aerobically in the dark. Optimal growth occurs at 30℃ ~ 35℃ and at pH7.0 ~ pH8.0. Various organic compounds are used as photosynthetic electron donors and carbon sources. Peptone and $(NH_4)_2SO_4$ are its better nitride source, yeast extracts stimulates its growth. A phylogenetic analysis based on 16S rDNA gene sequences reveales that strain 2c gathers a cluster with 3 strains of *Rhodopseudomonas palustris* whose accession number in GenBank are AY751758, DQ001155, DQ001158, respectively. 2c subcultures 15 generations stably at least. The results presented here demonstrated strain 2c is *Rhodopseudomonas palustris*.

Key words: Photosynthetic bacteria, Isolation, Strain identification, 16S rDNA, Stability

* Corresponding author. Tel/Fax: 86-23-68752051; E-mail: weihong@mail.tmmu.com.cn

Other authors: CHENG Hai-hua, LIU Yu

Received date: 12-20-2004

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn