

一株产辅酶 Q_{10} 的光合细菌菌株的分离及鉴定

李 迅, 张静蕾

(南京林业大学化学工程学院, 江苏 南京 210037)

[摘要] 从水塘污泥中富集分离到一株产 CoQ_{10} 含量较高的光合细菌菌株, 并对其进行系统鉴定. 采用了丙酮作为 CoQ_{10} 的提取溶剂, 样品经超声波破碎后, 用紫外分光光度法 (UV) 作为 CoQ_{10} 的定性定量方法, 成本低且快速, 可以作为筛选 CoQ_{10} 含量较高菌株的方法. 以此方法筛选得到菌株 LZC, 其 CoQ_{10} 产量为 $9.49 \mu\text{g}/\text{mL}$ 菌液. 16S rDNA 序列系统发育分析表明, 菌株 LZC 在系统进化树上与 GenBank 中序列号为 AB251407.1、AB251408.1、AB017799.1、DQ342322.1 的红假单胞菌 (红细菌) 聚为一族, 初步确定菌株 LZC 为芽生红假单胞菌 (*Rhodobacter blasticus*). 菌株 LZC 至少能稳定传代 15 次.

[关键词] 光合细菌, 分离, 菌株鉴定, 16S rDNA

[中图分类号] Q939.97 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2008)03-0104-05

Isolation and Identification of a Photosynthetic Bacteria Producing Coenzyme Q_{10}

Li Xun Zhang Jinglei

(School of Chemistry Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract The isolates producing Coenzyme Q_{10} (CoQ_{10}) of purple non sulfur photosynthetic bacteria were enriched out of pond sludge, one isolate named LZC was selected based on its high CoQ_{10} content and identified systematically. The strain LZC grows anaerobically in the light and aerobically in the dark. Optimal growth occurs at $30 \sim 35^\circ\text{C}$ and at pH 7.0~8.0. Various organic compounds are used as photosynthetic electron donors and carbon sources. The CoQ_{10} was extracted from the sample with organic solvent by ultrasonic extraction and determined by the UV method. The way cheap and faster was the proper selectway of PSB strain with high CoQ_{10} concentration. The CoQ_{10} concentration determined by UV way of strain c reached $9.49 \mu\text{g}/\text{mL}$. A phylogenetic analysis based on 16S rDNA gene sequences reveals that strain LZC gathers a cluster with 4 strains of *Rhodobacter* sp. whose accession number in GenBank are AB251407.1, AB251408.1, AB017799.1, DQ342322.1, respectively. The strain LZC subcultures stably at least 15 generations. The results presented here demonstrated strain LZC is *Rhodobacter blasticus*.

Key words photosynthetic bacteria, isolation, strain identification, 16S rDNA

光合细菌 (Photosynthetic bacteria, 简称 PSB) 是地球上最早出现的一类能进行光合作用而不产氧的特殊生理类群的原核生物的总称. 光合细菌作为一种营养丰富的光能自养菌, 含有多种生物活性物质, 在人类生活的多方面都具有重要作用, 光合细菌已经在世界上许多国家得到广泛应用. 光合细菌菌体中辅酶 Q_{10} (CoQ_{10}) 的含量普遍较高, 尤其是红螺菌科细菌亦称红色无硫细菌, Yoshida^[1] 等报道了用 *Rhodobacter sphaeroides* KY-4113 生产 CoQ_{10} . 目前日本已实现利用光合细菌工业化发酵生产 CoQ_{10} , 而国内应用光合细菌发酵的生产技术还未成熟, 主要还是用来作为净化水体和动物饲料添加剂^[2-4].

CoQ_{10} 作为一种新兴的药物或者说保健品正被各国积极关注. CoQ_{10} 是类维生素物质, 又叫泛醌, 癸烯醌, 为脂溶性醌类化合物, 主要存在植物、动物和微生物体内, 在细胞体内与线粒体内膜相结合, 是细胞呼

收稿日期: 2007-07-12

基金项目: 南京林业大学高学历人才基金 (163030024) 资助项目.

通讯联系人: 李 迅, 讲师, 研究方向: 微生物转化. E-mail: xunle@njfu.com.cn

吸链上的一种氢递体^[5]. 它在生物体中有着许多重要生理功能性质, 是生物体细胞能量生成要素和具抗氧化、可控制细胞内氧气的流动等性能^[6,7]. CoQ₁₀除了在某些替代治疗中起重要治疗作用外, 还是医药领域中一种具有广泛用途的辅助药, 目前还没有被其他药物所取代的趋势, 也不存在被淘汰的风险. 因此筛选高产 CoQ₁₀的光合细菌具有积极的现实意义, 我们利用光合细菌的富集培养基从鱼池污泥中富集和分离光合细菌, 同时探索简便的 CoQ₁₀的提取和定量方法来筛选高产 CoQ₁₀的光合细菌, 以此方法筛选出 6 株产生 CoQ₁₀的光合细菌, 并对其中 CoQ₁₀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, 为以后提高 CoQ₁₀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

DNA Marker和 PCR扩增试剂盒 (TaKaRa 公司); PCR 产物纯化试剂盒 (碧云天生物工程有限公司); 细菌通用引物 (上海生工生物技术有限公司); 琼脂糖 (英国 OXO ID); CoQ₁₀标准品 (Sigma). Agilent 1200 Series 高效液相色谱仪 (美国), Shimadzu UV-2410 型紫外-可见光分光光度计 (日本); Eppendorf PTC-150 型 PCR 仪 (德国); 六一 DYC-31B 型水平电泳槽 (北京); Bio-Rad Gel Doc 2000 型凝胶成像系统 (美国).

1.1.2 培养基

PSB 富集培养基: NH₄Cl 1 g MgCl₂ 0.2 g 酵母浸膏 0.1 g K₂HPO₄ 0.5 g NaCl 2 g ddH₂O 900 mL, 高压灭菌后加入 50 mL 过滤灭菌 4% 的丙氨酸, 调 pH 至 7.0

PSB 分离培养基 I: 在富集培养基里添加 1.5% 琼脂.

PSB 分离培养基 II: NH₄Cl 1 g MgCl₂ 0.2 g 酵母浸膏 2 g K₂HPO₄ 0.5 g NaCl 2 g 琼脂 15 g ddH₂O 900 mL, Na₂S·9H₂O 1.0 g/50 mL ddH₂O. 高压灭菌后加入 50 mL 过滤灭菌 4% 的丙氨酸.

1.2 菌株富集分离和培养

用富集培养基对采自鱼池底表层的污泥进行光照厌氧培养, 光照保证 2 000 lx, 白炽灯 40 W, 距离 30 ~ 40 cm 亦可. 10 d 后, 培养基呈桃红色至棕红色, 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 PSB 分离培养基在一系列无菌试管中进行多次稀释分离, 用半固体琼脂培养基待冷凝后覆盖无菌液体石蜡, 光照厌氧培养.

1.3 筛选菌种 CoQ₁₀含量的测定

将分离获得的光合细菌, 在 PSB 富集液体培养基中光照厌氧培养 10 d 待培养液颜色变红, 用丙酮法和超声波破壁法^[8,9]提取 CoQ₁₀. 从每个纯种菌培养液中各取出 100 mL 菌液各自分装在离心管, 以 8 000 r/min 离心 20 min, 倾去上清液, 菌体加入丙酮至 100 mL; 以超声波清洗机破壁 30 min 后, 以 8 000 r/min 离心 10 min 分离得到上清液, 旋转蒸发使之干燥, 用 3 mL 丙酮或无水乙醇溶下, 避光 4℃ 保存待用.

用 CoQ₁₀标准品进行紫外法^[10]和高效液相色谱法^[9]进行 CoQ₁₀定性定量测定. 紫外测定方法为: 精确配制 200 μg/mL CoQ₁₀的标准溶液, 取适量标液稀释成不同浓度, 在 275 nm 处测定吸光度, 根据 CoQ₁₀标准溶液的浓度和 275 nm 处的吸光度数值绘制标准吸收曲线, 将样品得到的 A₂₇₅ 根据标准曲线计算其浓度. 高效液相色谱柱为 XDB-C18 型, 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 作为流动相. 柱温为 35℃, 检测波长 275 nm, 进样量为 20 μL. 以 200 μg/mL CoQ₁₀的标准溶液配制成不同浓度, 根据 CoQ₁₀标准溶液的浓度和峰高响应值制作标准曲线, 由丙酮法初提得到的适宜稀释倍数 CoQ₁₀样品进行 HPLC 测定, 根据标准曲线算出样品的浓度. 比较得到的各组数据, 筛选出 CoQ₁₀含量最高的一个样.

1.4 菌株的形态结构特征鉴定

记录固体分离培养基上的菌落形态, 通过革兰氏染色和倒置显微镜观察筛选菌株的个体形态. 活细胞吸收光谱的测定方法为将培养液经离心洗涤后, 悬浮于 60% 的蔗糖溶液中, 在 190~900 nm 做波长连续扫描, 记录特征吸收峰处波长.

1.5 菌株 16S rDNA 序列测定

以上海生工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'-ACGGTTACCTGTGTTAGGACTT-3'进行 PCR 扩增. PCR 反应体系 (50 μ L): 包括筛选出的 CoQ₁₀含量最高的菌液 1.5 μ L; 16S rDNA 引物 1和 2各 1 μ L, 10 \times Ex Taq buffer 5 μ L, 4 \times dNTP 4 μ L, MgCl₂ 4 μ L, ddH₂O 33 μ L, 最后加入 Ex Taq 0.5 μ L. PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 2min, 94 $^{\circ}$ C 30s, 56 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1min, 循环 30次, 72 $^{\circ}$ C 10min. PCR 产物纯化按碧云天试剂盒说明书操作步骤进行, 测序由上海生工生物技术有限公司完成.

1.6 系统发育分析

将获得的序列递交 GenBank, 获得登录号为 EU0225857, 首先用 Blast的方式将测得的序列与 GenBank 中公布的细菌 16S rDNA 序列进行相似性比较分析. 从中选出相似性最高的 3个和其他序列共 22个 16S rDNA 序列. 用 CLUSTER 程序对这 22个序列进行多序列联配并构建进化树, 重复次数选用 1000, 用 BOOTSTRAP 分析评估树的稳定性.

2 结果

2.1 CoQ₁₀含量较高菌株的筛选

CoQ₁₀较难分离, 在提取分离过程中容易损失, 特别是在碱性条件下, 即使加抗氧化剂也难以避免部分 CoQ₁₀被氧化破坏, 而且通过多次溶剂的抽提和萃取, 损失量也较大, 因此我们采用超声波破壁和 1次丙酮法提取菌体中的 CoQ₁₀, 以使实验结果比较接近菌株中 CoQ₁₀的真实含量, 使筛选结果更为可靠. 图 1和图 2分别是 CoQ₁₀标准品和丙酮法初提样品的紫外扫描吸收曲线图, 在 275 nm 的吸收峰都很特异. 图 3和图 4分别是 CoQ₁₀标准品和丙酮法初提样品的 HPLC 分析图谱, 可以看到 CoQ₁₀的峰出现在进样 22min 左右. 用紫外法和 HPLC法测定含量, 比较结果发现, 紫外法和 HPLC法测定结果一致, 但紫外法相对更简单易行, 因此选择紫外法作为筛菌或发酵条件优化等比较实验的定量方法. 通过测定发现 6株光合细菌发酵液均含有 CoQ₁₀, 紫外法测定 CoQ₁₀含量 (μ g/mL 菌液) 分别为 4.01、4.59、9.49、7.36、5.56、6.01, 我们选择 CoQ₁₀含量最高的菌株 (9.49 μ g/mL 菌液), 将其命名为菌株 LZC.

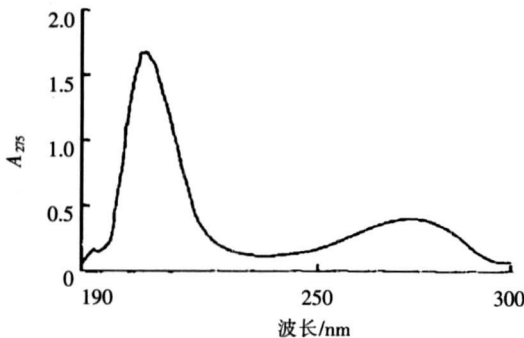


图 1 标准品紫外扫描吸收曲线图

Fig.1 Absorbent curve of UV scan with the standard CoQ₁₀

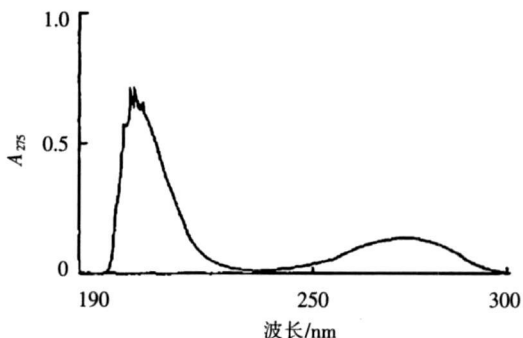


图 2 样品紫外扫描吸收曲线图

Fig.2 Absorbent curve of UV scan with the sample

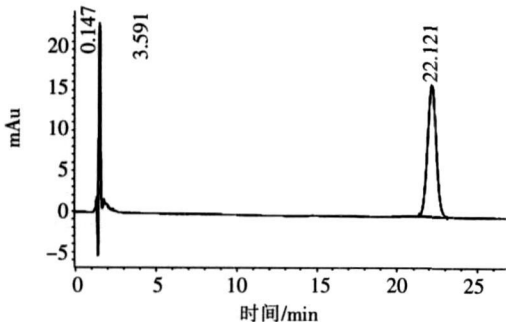


图 3 CoQ₁₀标准品高效液相色谱分析图谱

Fig.3 HPLC analysis graph of the standard CoQ₁₀

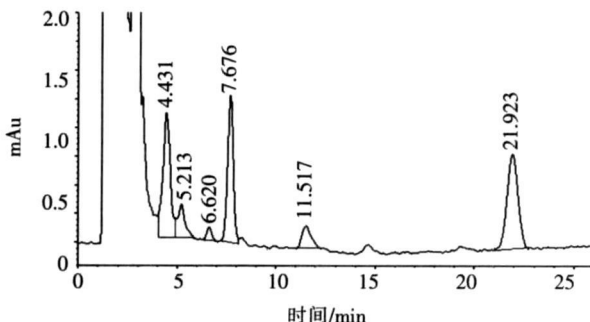


图 4 试样(粗提品)高效液相色谱分析图谱

Fig.4 HPLC analysis graph of the sample

2.2 菌株的形态结构特征

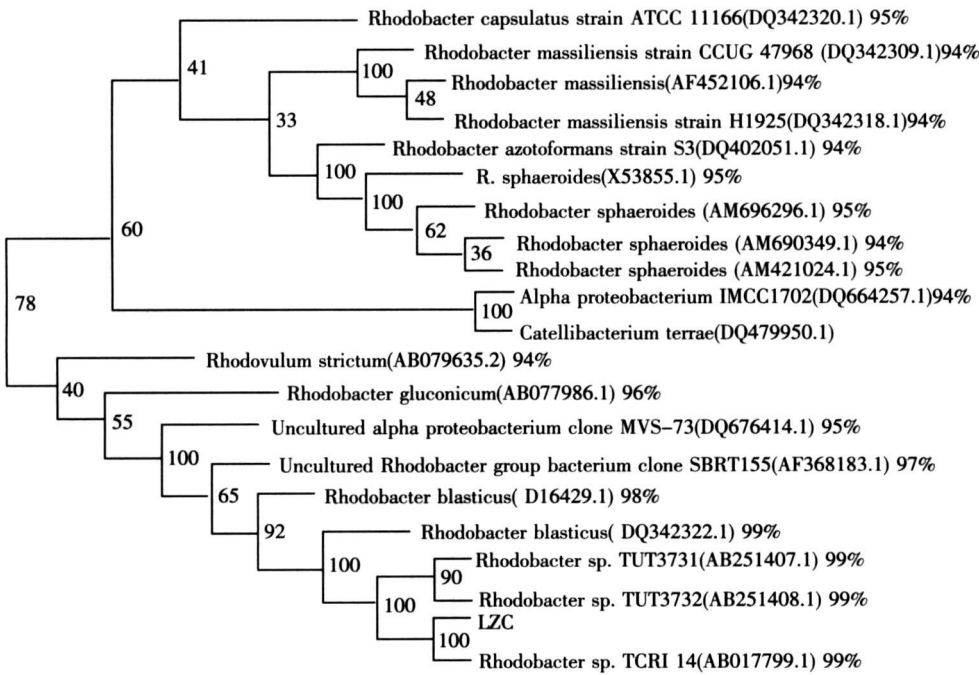
具体见表 1. 菌体观察菌落涂片, 菌株 LZC 革兰氏染色阴性. 显微镜油镜 1 000 倍观察, 菌体大部分为球状, 略扁. 单菌落在固体培养基上厌氧光照培养呈深红色, 周边颜色稍浅些, 菌落圆形, 光滑, 稍突起, 边缘齐整, 有光泽. 直径 0.5~ 1.5 mm, 适合光照厌氧培养, 培养物为深红色. 适宜生长温度为 25~ 35℃, 适宜生长 pH 为 7.0~ 7.5

菌株活细胞的特征吸收峰为 378、591、806、863 nm, 因叶绿素 a 在 390、810、860 nm 处有特征吸收峰, 在 471、500、530 nm 附近均出现 3 个特征吸收峰, 表明有正常螺菌黄质系的类胡萝卜素存在. 因此菌株 LZC 含有叶绿素 a 和类胡萝卜素.

表 1 分离株 LZC 的培养特征及形态结构特征

Table 1 Cultural and morphological characteristics of the strain LZC

鉴定项目 Characteristics	菌株 Strain LZC
厌氧液体培养物颜色	深红色
菌落颜色	深红色
黑暗好氧生长	不长
个体形态状及排列	球状, 略扁
菌体大小 /mm	0.5~ 1.5
适宜生长温度 /℃	25℃ ~ 35℃
适宜生长 pH	7.0~ 7.5
菌体表面	光滑, 稍突起, 边缘齐整, 有光泽
革兰氏染色	阴性
光吸收峰 /nm	378、591、806、863
光合色素	叶绿素 a 和螺菌黄素



分枝数值为 bootstrap 计算出的相似率, 括号内是各个菌株的 16S rDNA GenBank 的序列号.

图 5 以 16S rDNA 序列为基础的系统发育树

Fig.5 Phylogenetic tree based on 1 430 bp fragment of 16S rDNA sequences

2.3 16S rDNA 序列分析

菌株 LZC 扩增出的 DNA 片段条带单一, 大小约为 1 430 bp. 该序列在 GenBank 中的登录号为 EU 0 225857 (bank it 928591), 将菌株 LZC 的 16S rDNA 基因序列与 GenBank 数据库中的序列进行同源性比对, 发现菌株 LZC 与红假单胞菌属的 16S rDNA 序列自然聚类, 与登录号为 AB017799.1 的 Rhodospirillum sp. TCRI 14 菌株的 16S rDNA 片段大小相符, 相似性达到 99%, 表明菌株 LZC 与 Rhodospirillum sp. TCRI 14 的亲缘关系最近. 在系统发育树上与序列号为 AB017799.1、AB251408.1、AB251407.1、DQ 342322.1 的相似性

都达到 99%, 而其中 DQ342322.1 为生芽红假单胞菌 (*Rhodobacter blasticus*), 因此初步确定菌株 LZC 与生芽红假单胞菌聚为一族 (图 5).

2.4 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 LZC 能进行稳定传代, 符合一般生产菌种需要.

3 讨论

C₆₀ 的提取方法主要有丙酮或沸腾酒精破碎法、醇碱皂化法和碱皂化法等^[11], 其中不经皂化的丙酮或沸腾酒精破碎法, 然后经有机溶剂提取得到的是包括 C₆₀ 的未皂化的总脂类提取物. 而皂化法中碱皂化法较醇碱皂化法更为有效, 取得 C₆₀ 杂质少, 含量高, 但这两种方法都要经过高温, 步骤繁琐, 易产生副产物, 考虑到筛选要以简单高效为原则, 因此本实验选择丙酮初提法.

从上述实验分析, 菌株 LZC 为革兰氏阴性菌, 菌体球状, 略扁. 单菌落在固体培养基上厌氧光照培养呈深红色, 直径 0.5~1.5 mm, 适合光照厌氧培养, 培养物为深红色. 适宜生长温度为 25~35℃, pH 为 7.0~7.5. 细胞含有特征性叶绿素 a 和类胡萝卜素, 酵母膏对其生长有刺激作用, 以上特征是红假单胞菌所特有. 根据上述形态和生理生化特征, 认为菌株 LZC 为红假单胞菌. 又据 16S rDNA 基因序列系统发育分析可见 LZC 与在系统发育树上与序列号为 AB017799.1, AB251408.1, AB251407.1, DQ342322.1 的生芽红假单胞菌 (生芽红细菌) 聚为一族, 而其中 DQ342322.1 确定为生芽红假单胞菌 (*Rhodobacter blasticus*), 因此初步确定菌株 LZC 为 1 株未从 16S rDNA 水平上鉴定过的生芽红假单胞菌 (*Rhodobacter blasticus*). 综上生芽红假单胞菌菌株 LZC C₆₀ 含量较高, 其产量在 9.49 μg/mL 菌液, 并传代稳定, 值得对其 C₆₀ 含量进一步提高进行深入研究.

[参考文献]

- [1] Yoshida H, Kotani Y, Ochiai K, Araki K. Production of ubiquinone-10 using bacteria[J]. Journal of General and Applied Microbiology, 1998, 44(1): 19-26.
- [2] 钱为, 王肇颖, 韩波, 等. 光合细菌中番茄红素的研究[J]. 山东大学学报: 理学版, 2004, 39(3): 111-115.
- [3] 吴向华, 杨启银, 刘五星, 等. 光合细菌的研究进展及其应用[J]. 中国农业科技导报, 2004, 6(2): 35-38.
- [4] 周洪茂, 赵肖为, 吴雪昌. 光合细菌沼泽红假单胞菌同化磷能力的研究[J]. 科技通报, 2002, 18(2): 142-146.
- [5] 钱雪, 王祖巧, 韩国平, 等. 辅酶 Q₁₀ 的药理与应用[J]. 食品与药品, 2006, 8(01A): 16-19.
- [6] 吴祖芳, 翁佩芳, 陈坚. 辅酶 Q₁₀ 的功能研究进展[J]. 宁波大学学报: 理学版, 2001, 14(2): 85-88.
- [8] 欧阳平凯, 胡永红. 辅酶 Q₁₀ 的生产及其应用[J]. 化工进展, 1994, 13(4): 9-11.
- [9] 吴祖芳, 堵国成, 陈坚. 发酵液中辅酶 Q₁₀ 的分离纯化和定量分析[J]. 无锡轻工大学学报, 2002, 21(4): 420-423.
- [10] 王春林. 中国大豆辅酶 Q₁₀ 的提取、分离和鉴定[J]. 中国医药工业杂志, 1996, 27(3): 102-104.
- [11] 邱卫华, 刘萍, 钟桂芳, 等. 粟酒裂殖酵母中辅酶 Q₁₀ 的提取和测定方法[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(11): 31-35.

[责任编辑: 孙德泉]