

香料化合物广谱降解菌的分离、鉴定与降解性能分析

刘会会^{1, 2}, 古静燕², 李新², 卫洁², 韩文君¹

(1. 山东大学国家糖工程技术研究中心, 济南 250100;
2. 济南悟通生物科技有限公司, 济南 250102)

摘要: 从香料厂的污水处理池样品中分离微生物, 采用唯一碳源法检测菌株对香料化合物的利用能力, 基于16S rRNA基因的克隆与测序进行分子鉴定, 监测化学需氧量(chemical oxygen demand, COD)值和氨氮含量的变化, 从而分析混合使用广谱降解菌对香料厂污水的处理能力。结果表明, 获得5株广谱降解菌分别鉴定至节杆菌属(*Arthrobacter* sp.)、假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)、颇陌菌属(*Advenella* sp.)和变形杆菌属(*Proteus* sp.), 能高效降解利用多种香料化合物, 混合菌株处理污水可使COD值降到100 mg/L以下, 氨氮含量降到15 mg/L以下, 半衰期为5 d, 污水达到排放标准。

关键词: 微生物学; 香料化合物降解菌; 16S rRNA基因; 降解性能

中图分类号: Q939.9 文献标识码: A 文章编号: 1674-2850(2017)09-0948-06

Isolation, identification and degradation ability of extensive flavor-degrading strains

LIU Huihui^{1, 2}, GU Jingyan², LI Xin², WEI Jie², HAN Wenjun¹

(1. National Glycoengineering Research Center, Shandong University, Jinan 250100, China;
2. Jinan Enlighten Biotechnology Co., Ltd., Jinan 250102, China)

Abstract: Extensive flavor-degrading strains were isolated from the activated sludge tank of a spice factory. Various flavor products were used as the sole carbon source to screen the flavor-degrading microorganisms. The 16S rRNA genes were cloned, sequenced and analyzed to identify the taxonomic position of strains. The sewage treatment effects were analyzed by monitoring the change of chemical oxygen demand (COD), and ammonia nitrogen contents. As a result, five flavor-degrading strains have been identified as members that belong to the *Arthrobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Advenella* sp., and *Proteus* sp. genera respectively. These strains can degrade a variety of flavor compounds and the bacterial mixture can drop COD below 100 mg/L and the ammonia nitrogen below 15 mg/L. The half-life is 5 d. Wastewater discharge can meet up its standard.

Key words: microbiology; flavor-degrading strains; 16S rRNA gene; degradation ability

0 引言

杂环香料主要包括呋喃、吡咯、吡啶、噻吩、噻唑、吡嗪等, 它们广泛存在于自然界中, 是组成食品香味的微量化学成分。目前, 已从各种食品中鉴定出了上万种杂环香味化合物。其中, 获得美国食品香料和萃取物制造者协会(Flavor and Extract Manufacturers' Association)批准, 可安全使用的香味物质

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金(20130131120079)

作者简介: 刘会会(1991—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 香料生物学与基因工程

通信联系人: 韩文君, 讲师, 主要研究方向: 资源微生物学与分子酶学工程. E-mail: hanwenjun_79@sdu.edu.cn

有二千余种, 含氧、硫、氮的杂环化合物占有突出地位。大多数杂环化合物具有极高的气味强度和极低的察觉阈值, 用量很少也能取得良好的增香效果, 被认为是特效化合物, 在食品化学中是理想的配料成分^[1]。杂环香料香气特征突出, 它们表现为强烈的肉香、咖啡香、坚果香、焙烤香和蔬菜香, 可以调制成具有特殊风味的食品香精, 也可以作为食品增香剂直接使用。

香料根据其来源与组成, 可分为天然香料和合成香料。天然香料又分为植物性天然香料和动物性天然香料两大类。在配制日用品香精时, 可供使用的动物性天然香料较少, 常见的品种主要有麝香、灵猫香、海狸香、龙涎香和鼠香五种, 由于动物香料种类少、产量低, 所以市场价格极高^[2]。植物性天然香料是以各种芳香植物的花、果、叶、茎、根、皮、籽或树脂为原料, 依靠物理方法分离或提炼出来的有机物的混合物。因此, 天然香料常因为含量低、产量少、价格高等原因难以满足人们的需求。随着化工产业的高速发展, 利用化学合成法生产香料的公司越来越多, 合成香料逐渐占据了香料市场的主要份额。但化学合成生产工艺复杂, 在生产过程中包括回流、蒸馏、冷冻、酸化、碱化、压滤等过程, 常需要高温、高压、负压等条件, 并大量使用易燃易爆的有机试剂。因此, 化学合成中常会产生大量有机污染物, 造成生产污水排放不达标和治理困难的问题。

活性污泥法是目前处理有机废水的主要方法之一^[3]。它是一种好氧生物处理方法, 废水中的有机物被活性污泥中的微生物摄取代谢而被去除, 污水得以净化, 从而使出水水质达到排放标准^[4]。利用微生物处理工业废水, 具有反应条件简单、容易控制、成本较低、不会引起二次污染等优点, 是目前最为经济有效的方法。

香料厂产生的污水含有大量杂环化合物, 污水处理池中的微生物菌群经过香料厂污水的长期驯化, 形成了特有的优势菌群和菌群结构。通过研究香料厂污水处理池样品中的微生物群落, 利用优势功能菌群, 进行菌落结构优化, 这对于提高污水处理池的处理效果具有重要意义^[5]。因此, 本研究以香料厂的污水处理池样品为实验材料, 从中分离出对香料化合物具有较高降解能力的微生物, 进而研究其分类、降解性能及对工厂污水的处理能力。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

样品 I, 香料厂污水处理系统曝气池水样; 样品 II, 香料厂污水处理系统曝气池污泥; 样品 III, 香料厂污水处理系统曝气池污泥沉降 7 d 后。

1.1.2 培养基

LB 培养基: 蛋白胨 1.0%、酵母浸粉 0.5%、NaCl 1.0%, pH=7.2 (固体加入 2.0%琼脂);

TSB 培养基: 胰蛋白胨 17 g/L, 植物蛋白胨 3 g/L, NaCl 5 g/L, KH₂PO₄ 2.5 g/L, 葡萄糖 2.5 g/L, 琼脂 20 g/L, 余量水, pH=7.2 (固体加入 2.0%琼脂);

离子培养基: K₂HPO₄ 0.8 g, KH₂PO₄ 0.2 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, NH₄Cl 0.5 g, CaCl₂·2H₂O 0.05 g, FeSO₄·7H₂O 0.01 g, MnSO₄ 0.001 g, ddH₂O 1 L, pH=7.2.

1.1.3 11 种香料化合物

2-乙酰基吡咯、2-乙酰基噻唑、4-甲基-5-羟乙基噻唑、2-乙酰基吡嗪、2,5-二甲基吡嗪、2,6-二甲基吡嗪、2,3,5-三甲基吡嗪、丁二酮、对叔丁基苯乙酸甲酯、异香兰素、藜芦醛, 均为滕州市悟通香料有限责任公司提供。

1.1.4 试剂

PrimeSTAR HS DNA Polymerase (TaKaRa)、pEASY-Blunt Simple Cloning Vector (全式金)、细菌基因组提取试剂盒(天根)、琼脂糖凝胶回收试剂盒(天根)。

1.1.5 仪器

恒温生化培养箱；无菌工作台；pH 检测器；全自动高压灭菌锅；酶标仪；PCR 扩增仪；凝胶电泳仪；紫外凝胶成像仪；低温水浴锅。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株的分离与纯化

称取样品 I、II、III 各 1 g，分别加入 10 mL 无菌生理盐水混匀，得 10^{-1} cells/mL 菌悬液，继续稀释成 10^{-2} ， 10^{-3} ， 10^{-4} ， 10^{-5} ， 10^{-6} cells/mL 等 6 个浓度；稀释后的菌悬液涂布于 TSB 固体平板，每个浓度做两个平行，30℃ 培养 24 h；分别选取样品 I、II、III 菌落数为 100~200 的平板，挑取单菌落，划线于新的 TSB 固体平板上，经 2~3 次划线，获得纯化后的单一菌株。

1.2.2 菌株对 11 种香料化合物的利用能力分析

将上述纯化的单一菌株，分别接种于 5 mL 的 TSB 液体培养基上，30℃、200 r/min 培养 24 h，得种子培养基；取种子培养基 1.0 mL，12 000g、4℃ 离心 2 min，弃上清，得菌体；用无菌离子培养基洗涤菌体 2 次，最后定容为 1.0 mL；在无菌条件下，用离子培养基分别将 11 种香料化合物配制成质量体积比为 0.2% 的唯一碳源培养基；将唯一碳源培养基按 500 μ L/孔分装至 96 孔板中，以 20 μ L/孔的接种量加入菌液，每株菌做 3 个平行，30℃ 培养 60~72 h；用酶标仪测定 600 nm 下的吸光值。

1.2.3 香料化合物广谱降解菌的形态学鉴定

将广谱降解菌划线于 TSB 固体培养基上，30℃ 恒温培养 24 h 后观察菌落形态，进行革兰氏染色后用普通光学显微镜观察菌体形态。

1.2.4 香料化合物广谱降解菌的分子生物学鉴定

用细菌基因组提取试剂盒(天根)制备菌株的基因组 DNA，以菌株的基因组 DNA 为模板，使用细菌 16S rRNA 基因的通用引物^[6]进行扩增，扩增体系为：每 30 μ L 反应体系中加入浓度为 10 mmol/L 的 27 f 和 1 492 r 各 1.0 μ L，2 mmol/L 的 dNTP 2.4 μ L，5×PrimeSTAR Buffer 6.0 μ L，2.5 U/ μ L 的 PrimeSTAR HS DNA Polymerase 0.2 μ L，模板 3 μ L，18.2 M Ω ·cm 超纯水 17.0 μ L。扩增条件为：94℃ 预变性 5 min；94℃ 变性 30 s，55℃ 退火 30 s，72℃ 延伸 90 s，共 35 个循环；72℃ 延伸 15 min；降温至 4℃ 并保温 15 min。用胶回收试剂盒(天根)纯化 PCR 扩增产物，电泳验证后，连接到 pEASY-Blunt Simple Cloning Vector，转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。经氨苄抗性筛选，获得阳性克隆。16S rRNA 基因测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成，将所得序列与美国国家生物信息中心(National Center of Biotechnology Information, NCBI)收录的标准菌株的 16S rRNA 基因序列进行比对。

1.2.5 广谱降解菌处理污水能力分析

将 5 株广谱降解菌分别划线于 TSB 固体平板上，30℃ 培养 24 h；分别挑取单菌落到 50 mL TSB 液体培养基中，30℃、220 r/min 培养 24 h，得种子培养液；各按 1% (质量体积比) 的接种量同时接种于 TSB 液体培养基中，30℃、220 r/min 混合培养 72 h；将培养后的混合菌株加入 10 L 公司废水中，室温条件下曝气。每 24 h 测定废水 COD 值、氨氮含量和 pH 值。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离与纯化

本研究从香料厂污水处理池来源的3个样品(样品I、II、III)中分离纯化得到20株细菌。其中,9株分离自香料厂污水处理系统曝气池水样(样品I),2株分离自香料厂污水处理系统曝气池污泥(样品II),9株分离自香料厂污水处理系统曝气池污泥沉降7d后(样品III),如表1所示。

表1 香料厂污水处理池中分离纯化的菌株

Tab. 1 Strains isolated and purified in a sewage treatment tank of a spice factory

| 样品编号 | 菌株数/株 | 菌株编号 |
|-------|-------|---|
| 样品I | 9 | WTB09, WTB10, WTB11-1, WTB11-2, WTB12, WTB13-1, WTB13-2, WTB14, WTB15 |
| 样品II | 2 | WTC01, WTC06 |
| 样品III | 9 | WTD01, WTD02, WTD03, WTD04, WTD05, WTD06, WTD07, WTD08-1, WTD08-2 |

2.2 菌株对11种香料化合物的利用能力分析

利用唯一碳源法,通过检测菌体浓度(OD_{600}),分析香料厂污水处理池来源的20株细菌对11种香料化合物的利用能力。菌体浓度越高,说明菌株生长旺盛、碳源利用率高、降解能力强。由表2可以得出以下结论:

1) 通过纵向比较,降解谱最广的菌为WTD03、WTD04、WTD05,能够降解所检测的11种香料化合物,且对多种香料化合物的利用能力较强;降解谱次之的为WTB11-1、WTB11-2。因此,本研究获得5株广谱香料化合物降解菌,分别为WTB11-1、WTB11-2、WTD03、WTD04和WTD05。

2) 通过横向比较,较容易被细菌利用的碳源为2-乙酰基噻唑、2-乙酰基吡嗪、2,6-二甲基吡嗪、对叔丁基苯乙酸甲酯和丁二酮,均能被10种以上的细菌降解利用;比较难被细菌利用的碳源为2-乙酰基吡咯、4-甲基-5-羟乙基噻唑、2,5-二甲基吡嗪、2,3,5-三甲基吡嗪、异香兰素和藜芦醛。

表2 菌株对11种香料化合物的利用能力分析

Tab. 2 Utilization ability analysis of bacterial strains on 11 kinds of spice compounds

| 化合物 菌株编号 | 2-乙酰 基吡咯 | 2-乙酰 基噻唑 | 4-甲基-5-羟 乙基噻唑 | 2-乙酰 基吡嗪 | 2,5-二甲 基吡嗪 | 2,6-二甲 基吡嗪 | 2,3,5-三 甲基吡嗪 | 丁二酮 | 对叔丁基苯 乙酸甲酯 | 异香 兰素 | 藜芦醛 |
|-------------|-------------|-------------|------------------|-------------|---------------|---------------|-----------------|-----|---------------|----------|-----|
| WTB09 | | + | | + | | | | | | | |
| WTB10 | | | | + | | | | | | | |
| WTB11-1 | | ++ | +++ | + | ++ | ++ | ++ | +++ | ++++ | | |
| WTB11-2 | + | ++ | ++ | + | ++ | ++ | ++ | +++ | +++ | | |
| WTB12 | | | | | | | | | | | |
| WTB13-1 | | + | | | | + | | + | ++ | + | |
| WTB13-2 | | | | | | | | + | ++ | | |
| WTB14 | | | | | | | | + | | | |
| WTB15 | | | | | | | | | | | |
| WTC01 | + | + | | ++ | | + | | + | ++ | + | + |
| WTC06 | + | | | + | | + | | | | + | + |
| WTD01 | + | | | + | | + | | + | | | |
| WTD02 | + | + | + | + | | + | | ++ | ++ | | |
| WTD03 | + | ++ | ++ | + | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ | ++ | + |
| WTD04 | ++ | + | ++ | ++ | ++ | +++ | ++ | +++ | +++ | + | + |
| WTD05 | + | ++ | ++ | ++ | + | ++ | ++ | ++ | +++ | + | ++ |
| WTD06 | | + | + | + | | + | + | + | +++ | | |
| WTD07 | + | | | + | | ++ | | | +++ | + | + |
| WTD08-1 | | + | + | | + | | ++ | ++ | +++ | | |
| WTD08-2 | | | | + | | | | | ++ | | |

注: +代表 $0.20 > OD_{600} > 0.10$, OD_{600} 每增加0.1,增加1个+

2.3 香料化合物广谱降解菌的形态学鉴定结果

本研究对分离纯化的5株广谱降解菌在TSB固体培养基上的菌落形态进行了观察,并通过革兰氏染色后用普通光学显微镜观察菌体形态,结果如表3所示。

表3 香料化合物广谱降解菌的形态学特征

Tab. 3 Morphological characteristics of broad spectrum flavor-degrading strains from spice compounds

| 菌株编号 | 菌落形态 | 革兰氏染色 | 细胞形状 |
|---------|-----------------|-------|-------|
| WTB11-1 | 白色,不透明,低凸起,表面光滑 | 阳性 | 杆状-球状 |
| WTB11-2 | 乳白色,黏液状,凸起,表面光滑 | 阴性 | 杆状 |
| WTD03 | 乳白色,表面光滑湿润 | 阴性 | 短杆状 |
| WTD04 | 黄色,不透明,低凸起,表面光滑 | 阳性 | 杆状-球状 |
| WTD05 | 无色,半透明,菌落圆形,扁平 | 阴性 | 杆状 |

2.4 香料化合物广谱降解菌的分子生物学鉴定结果

将5株广谱降解菌的16S rRNA基因序列上传至NCBI网站,获得GenBank收录号,并进行BLAST比对,结果如表4所示。菌株WTB11-1和WTD04与标准菌株*Arthrobacter ureafaciens*的序列相似度分别为98.80%和99.10%,因此,将WTB11-1和WTD04鉴定至节杆菌属(*Arthrobacter* sp.);菌株WTB11-2与标准菌株*Pseudomonas aeruginosa*的序列相似度为98.76%,将WTB11-2鉴定至假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.);菌株WTD03与标准菌株*Advenella faeciporci*的序列相似度为98.93%,将WTD03鉴定至颇陌菌属(*Advenella* sp.);菌株WTD05与标准菌株*Proteus vulgaris*的序列相似度为97.82%,将WTD05鉴定至变形杆菌属(*Proteus* sp.)。

表4 5株广谱降解菌16S rRNA基因序列的BLAST比对结果

Tab. 4 BLAST contrast results of 16S rRNA sequences of 5 strains of degrading bacteria

| 菌株编号 | GenBank 收录号 | 最相近标准菌株名称 | GenBank 序列号 | 相似度/% |
|---------|-------------|---------------------------------|-------------|-------|
| WTB11-1 | KY327831 | <i>Arthrobacter ureafaciens</i> | X80744.1 | 98.80 |
| WTB11-2 | KY327832 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | HE978271.1 | 98.76 |
| WTD03 | KY327834 | <i>Advenella faeciporci</i> | AB567741.1 | 98.93 |
| WTD04 | KY327835 | <i>Arthrobacter ureafaciens</i> | X80744.1 | 99.10 |
| WTD05 | KY327833 | <i>Proteus vulgaris</i> | DQ885262.1 | 97.82 |

2.5 广谱降解菌处理污水能力的分析

混合培养的广谱降解菌群添加到污水处理池后,能够将高浓度污水降解到COD值300 mg/L以下。但广谱降解菌群稳定性低于原生菌群,需要持续补加菌种,最终将COD值降到100 mg/L以下,氨氮含量降到15 mg/L以下,广谱降解菌的半衰期为5 d,达到污水排放标准,如表5所示。

表5 污水监测结果及相应排放标准

Tab. 5 Sewage monitoring results and corresponding emission standards

| 项目 | pH 值 | | COD 值/(mg/L) | | 氨氮含量/(mg/L) | |
|------|------------|-----------|--------------|-------|-------------|-------|
| | 添加前 | 添加后 | 添加前 | 添加后 | 添加前 | 添加后 |
| 监测数据 | 4.80~10.75 | 7.23~8.57 | 355~1 486 | 39~78 | 330~483 | 10~13 |
| 排放标准 | 6~9 | | ≤100 | | ≤15 | |

半衰期内广谱降解菌为生态菌群的优势种, 半衰期后随着 COD 值和有机物浓度的降低, 单细胞藻类和原生动物出现, 原始生态中微生物逐渐占主导地位。

3 结论

研究从香料厂污水处理池样品中, 分离得到 5 株能够对香料化合物进行高效降解的菌株。这 5 株菌不仅能降解和利用丁二酮、对叔丁基苯乙酸甲酯等结构简单的香料化合物, 还能降解吡咯、噻唑、吡嗪等结构复杂的杂环类香料化合物。通过对形态学特征的观察, 基于 16S rRNA 基因的分子鉴定, 最终将菌株 WTB11-1 和 WTD04 鉴定至节杆菌属(*Arthrobacter* sp.), WTB11-2 鉴定至假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.), WTD03 鉴定至颇陌菌属(*Advenella* sp.), WTD05 鉴定至变形杆菌属(*Proteus* sp.)。将 5 株菌混合培养后, 加入 10 L 香料厂污水, 最终将 COD 值降到 100 mg/L 以下, 氨氮含量降到 15 mg/L 以下, 半衰期为 5 d。本研究所得 5 株广谱、高效的香料降解菌, 在提高香料厂活性污泥处理能力方面具有显著效果, 这对于人工定向改良活性污泥的菌群组成及其污水处理能力具有一定参考价值。

[参考文献] (References)

- [1] 黄小凤, 李晓东. 杂环类香料的现状与展望[J]. 化学通报, 1995 (8): 1-16.
HUANG X F, LI X D. The present situation and outlook of heterocyclic spice[J]. Chemistry Bulletin, 1995(8): 1-16. (in Chinese)
- [2] 黄文, 蒋予箭. 食品添加剂[M]. 北京: 中国计量出版社, 2006.
HUANG W, JIANG Y J. Food additives[M]. Beijing: China Metrology Publishing House, 2006. (in Chinese)
- [3] 杨宝林. 污水处理厂技术概况和发展动向[J]. 中国给水排水, 1991, 7 (4): 27-30.
YANG B L. Technical situation and development trend of sewage plant[J]. China Water and Wastewater, 1991, 7(4): 27-30. (in Chinese)
- [4] 周群英. 环境工程微生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002.
ZHOU Q Y. Environmental engineering microbiology[M]. Beijing: Higher Education Press, 2002. (in Chinese)
- [5] 李媛, 岳秀萍, 韩钰洁, 等. 产甲烷厌氧污泥降解含氮杂环化合物动力学与微生物种群的分析[J]. 环境工程学报, 2016, 10 (7): 3884-3890.
LI Y, YUE X P, HAN Y J, et al. Degradation kinetics of refractory heterocyclic compound by methanogenic anaerobic sludge and analysis of microbial population[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2016, 10(7): 3884-3890. (in Chinese)
- [6] DEVEREUX R, WILLIS S G. Amplification of ribosomal RNA sequences[M]//Molecular Microbial Ecology Manual. Berlin: Springer, 1995: 277-287.