

一株大蒜素降解菌的分离与鉴定

盛多红* 崔飞飞

(山东大学 微生物技术国家重点实验室 山东 济南 250100)

摘要: 【目的】解决大蒜废水难以生化处理的问题, 筛选能够降解大蒜素的细菌, 并对其生化特性进行分析。【方法】通过 16S rRNA 基因测序, 对大蒜废水沉积物进行细菌多样性分析, 发现其中有多种大蒜素耐受菌; 通过富集培养与划线分离大蒜素降解菌, 并进一步分析其最适生长和大蒜素降解条件。【结果】得到一株大蒜素降解菌(JX6-2), 能够以大蒜素为唯一碳源生长(50–300 mg/L), 将大蒜素彻底降解。其最适生长温度和降解大蒜素温度均为 35 °C, 最适 pH 值在中性左右, 添加葡萄糖对大蒜素降解没有明显影响。【结论】分离得到了一株大蒜素降解菌, 分析了其生长和降解特性, 为生化方法处理大蒜素废水提供了新菌种。

关键词: 大蒜素, 降解菌, 菌株分离, 废水处理

Isolation and characterization of an allicin-degrading strain

SHENG Duo-Hong* CUI Fei-Fei

(State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan, Shandong 250100, China)

Abstract: [Objective] The anti-microbial ability of residual allicin in garlic wastewater results in its low bio-degradability. To resolve this problem, this paper tried to isolate the allicin-degrading bacteria and to further analyze its degradation character. [Methods] We inspected the bacterial diversity in the polluted sediment of garlic wastewater by 16S ribosomal RNA gene sequencing, and 16 microbial species were found which suggested allicin degradation bacteria might be included. Next, our research was focused on enrichment, separation and characterization of the allicin-degrading strain. [Results] An allicin-degrading strain JX6-2 was isolated from the sediment of allicin wastewater, and identified as *Weissella*. The strain could use allicin as the only carbon source and grow on the range of allicin concentrations (50 to 300 mg/L). The optimal pH and temperature for allicin degradation were determined to be 7.0 and 35 °C, respectively. The presence of glucose as an additional carbon source (up to 1 000 mg/L) had no adverse effect on bacterial growth and allicin degradation. [Conclusion] We have isolated an allicin-degrading strain and optimized its degradation conditions. It has a potential to be applied in the practical treatment of aniline-containing wastewater.

Keywords: Allicin, Degrading strain, Isolation, Wastewater treatment

*Corresponding author: E-mail: dhsheng@sdu.edu.cn

Received: August 09, 2016; Accepted: November 15, 2016; Published online (www.cnki.net): November 29, 2016

*通讯作者: E-mail: dhsheng@sdu.edu.cn

收稿日期: 2016-08-09; 接受日期: 2016-11-15; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-11-29

大蒜素(Allicin)学名为二烯丙基硫代亚磺酸酯,它是在蒜氨酸酶(Alliinase)作用下,由大蒜中的蒜氨酸(Alliin)转化生成的有机硫化合物(图 1),是大蒜中的主要功能成分之一。大蒜素中的活性硫(硫代基和硫醚基)具有氧化还原特性,既能够清除氧自由基,赋予大蒜素抗氧化活性,又能和细菌细胞内的巯基基团反应,赋予大蒜素广谱抗菌活性^[1-4]。近年来,随着大蒜素的药用及保健功效的研究与发现^[4],大蒜素相关产品风靡全世界,极大地促进了大蒜素的生产与消费。我国是大蒜产品的生产与消费大国,大蒜产量占世界大蒜总产量的三分之二以上,尤其是传统的大蒜之乡山东省,大蒜的生产与加工量居世界前列。在发展大蒜经济的同时,也带来了环境污染,尤其是大蒜产品加工过程中产生的废水,不仅具有刺鼻的蒜臭味,较高的化学需氧量(Chemical oxygen demand, COD),而且废水中的大蒜素能够抑制活性污泥中微生物的生长,成为当前废水治理的难题之一^[5]。

目前,对大蒜素生理活性、杀菌机制、提取分离乃至化学合成研究比较多,但对其生物降解机制的研究却很少,大蒜素降解菌的分离尚未有报道,这直接影响了大蒜素加工废弃物的生物法处理,增加了处理成本。本文对蒜片加工废水中的微生物进行了分析与分离,得到了一株可以完全降解大蒜素的细菌,并对它的降解活性进行了研究。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 水样: 采自金乡城郊蒜片加工厂露天蓄污水池。大蒜经切片后浸泡、清洗和离心过程中产生了大蒜切片废水,其废水中有机物含量高(主要是大蒜

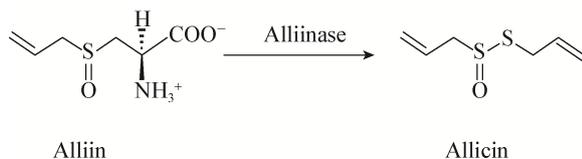


图 1 大蒜素结构式

Figure 1 Structural formula of allicin

多糖、蛋白质和少量大蒜素), COD 浓度高,且含有大蒜素。其基本理化性质为: pH 6.54, COD 2 907.3 mg/L, BOD (Biochemical oxygen demand) 55.2 mg/L, 大蒜素 67.5 mg/L。

活性污泥: 取自济南光大生活污水处理厂的曝气池。

1.1.2 主要试剂和仪器: 实验用色谱纯大蒜素,上海邦景生化试剂有限公司; DNA 标准分子量 Marker、Taq 酶,大连 TaKaRa 公司;其余试剂均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;琼脂糖凝胶片段回收试剂盒,美国 Omega 公司;宏基因组提取试剂盒,美国 Biomiga 公司;引物合成及序列测定由上海派森诺生物科技公司完成。

岛津气相色谱仪,苏州雨泽公司;紫外分光光度计,上海美谱达仪器有限公司;PCR 仪,德国 Eppendorf 公司;COD 测定仪,德国 Lovibond 公司。

1.1.3 培养基: (1) Bushnell-Haas (BH)无机盐培养基(g/L): NH₄NO₃ 1.0, KH₂PO₄ 1.0, K₂HPO₄ 2.0, MgCl₂ 0.2, CaCl₂ 0.02, FeCl₃ 0.05。微量元素溶液(g/L): (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 1.0, ZnCl₂·7H₂O 3.0, CoSO₄·7H₂O 3.0, MnSO₄·2H₂O 2.0, CuSO₄·5H₂O 5.0。无机盐培养基和微量元素溶液添加体积为 200:1。调节 pH 为 7.0,盐浓度为 2% (质量体积比)。

(2) 含大蒜素的无机盐培养基: 以乙醚配制 10 g/L 大蒜素溶液,取适量体积的大蒜素溶液(或不含大蒜素的乙醚溶液作为对照),置于无菌容器中,在无菌通风操作台上让多余乙醚挥发后,加入灭菌的无机盐培养基。

(3) 富集培养基: 无机盐培养基中添加 NaAc 10 g/L 和大蒜素 10 mg/L。

1.2 大蒜废水中微生物收集和宏基因组提取

大蒜废水有机质含量高,水样有一定的粘稠度,并且带有大量的细微悬浮颗粒物,不利于用过滤法或离心法收集废水中微生物。在实际操作中并没有直接分离废水中微生物,而是收集污水池边缘水下自然沉积物,分离分析其中的微生物。参照《环境微生物学实验方法与技术》样品采集与保存方法^[6],使

用无菌吸管从大蒜污水池边取池壁沉积物,用于检测分离可以耐受大蒜素的微生物。收集的样品分为两份,一份置于富集培养基中,30 °C 富集培养,用于分离大蒜素降解菌株;另一份使用宏基因组提取试剂盒提取宏基因组 DNA,用于细菌多样性分析。

1.3 细菌 16S rRNA 基因测序

以基因组 DNA 为模板,PCR 扩增细菌 16S rRNA 基因序列,扩增引物分别为 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')。PCR 反应体系(25 μ L): 10 \times PCR buffer 2.5 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 1.5 μ L, dNTP mixture (2.5 mmol/L) 2 μ L, 上下游引物 (10 μ mol/L)各 1 μ L, 模板 DNA 0.1 μ g, *Taq* 酶 (5 U/ μ L) 0.2 μ L, 补足双蒸水至 25 μ L。PCR 反应条件:94 °C 3 min;94 °C 30 s,50 °C 30 s,72 °C 90 s,30 个循环;72 °C 10 min;4 °C 保存。扩增片段长度为 1 502 bp。对扩增片段测序,并进行数据库搜索比对分析。

1.4 大蒜素的测定

1.4.1 分光光度法测定大蒜素: 培养物离心 (12 000 r/min, 4 °C, 20 min)后上清液或者标准溶液,参照 Han 等的方法采用分光光度法定量测定溶液中大蒜素的含量^[7]。

1.4.2 气相色谱法测定大蒜素: 利用正己烷萃取培养物或者标准溶液中的大蒜素,取上清液 1 μ L 注入气相色谱进行定量分析。具体色谱条件参照文献^[8]。

1.5 水样测定

化学耗氧量(COD)测量采用重铬酸钾氧化法^[6]。

1.6 菌株生化特性分析实验

具体参见《微生物学实验教程》^[9]。

2 结果与分析

2.1 大蒜废水细菌多样性分析

能够耐受废水中大蒜素是微生物降解大蒜素的前提,以样品微生物宏基因组为模板,扩增细菌 16S rRNA 基因,上机测序,得到有效 DNA 序列 12 706 条,采用 BLAST 方法对序列数据库进行比对分析,得到样品中微生物多样性分布图如图 2 所示。

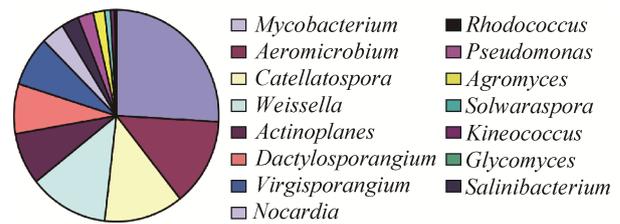


图 2 大蒜废水沉积物中微生物多样性分析

Figure 2 Analysis of microbial diversity in the sediment of garlic wastewater

图 2 结果表明,从大蒜废水池沉积物中共检测出 16 个种属的细菌,其中含量超过 10%的细菌分别为分枝杆菌属(23.4%)、气微菌属(12.1%)、卡泰拉孢囊菌属(11.3%)、魏斯氏菌属(11.3%)。它们能够在含有大蒜素的废水沉积物中存在,对大蒜素具有耐受性。在对分离到的微生物样品进行富集培养过程中,也观察到了微生物在大蒜素培养基中的生长现象,进一步证明了样品中微生物能够耐受大蒜素进行生长,为下一步在其中分离出大蒜素降解菌提供了可行性。

2.2 大蒜素降解菌的分离和菌株鉴定

将富集培养的大蒜素耐受菌在含 100 mg/L 大蒜素的无机盐平板上连续划线分离,得到一株能以大蒜素为唯一碳源生长的菌株(JX6-2)。对 JX6-2 菌株的 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增和测序分析(GenBank 登录号 KX787037)后,通过 BLAST 分析,发现所得序列和融合魏斯氏菌(*Weissella confusa*)的 16S rRNA 基因有 98%的相似度。

将菌株活化后,按 3%接种量,分别接种到添加和不添加大蒜素的无机盐培养基中,进一步确认 JX6-2 能够利用大蒜素为碳源生长,检测结果如图 3 所示。在没有添加大蒜素的对照培养物中, OD_{600} 最大值只有 0.18 左右(接种的菌液及添加大蒜素过程中未挥发完全的乙醚会带入微量碳源,因此对照培养物也出现了不明显的生长迹象)。在添加 100 mg/L 大蒜素的培养基中,JX6-2 明显生长,并在 24 h 左右 OD_{600} 值达到 1.005 1 左右,实验结果证明 JX6-2 能够在无机盐培养基中利用大蒜素为碳源生长。

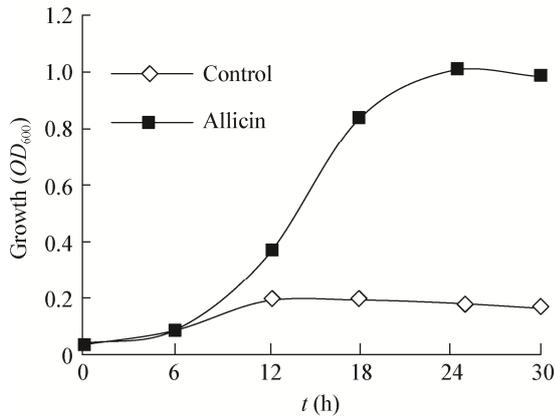


图3 JX6-2 菌株的生长曲线
Figure 3 Growth curve of the strain JX6-2

为了检测 JX6-2 菌对大蒜素的降解特性, 将 JX6-2 接入含有大蒜素的无机盐液体培养基中, 30 °C、200 r/min 培养 24 h 后, 收集培养物上清液, 用正己烷萃取其中的大蒜素, 进行色谱分析(图 4)。在对照培养基中, 萃取物中大蒜素浓度较高(图 4A); 加入降解菌培养 24 h 后(图 4B), 大蒜素含量明显减少, 结果进一步证明 JX6-2 菌能够降解大蒜素, 除了少部分残余的大蒜素没有被彻底降解外, 未发现其他的降解中间产物。

2.3 JX6-2 菌株的降解特性分析

为了进一步检验 JX6-2 降解大蒜素的特性, 将其接入含大蒜素的无机盐液体培养基中, 分别检测大蒜素浓度、温度、pH 和添加葡萄糖对菌株生长 (OD_{600}) 和大蒜素降解能力的影响(图 5)。图 5A 检测不同大蒜素浓度对降解菌生长和降解能力的影

响, 在不含大蒜素的对照培养物中, 由于碳源限制, 菌株生长有限(OD_{600} 约 0.2 左右); 随着大蒜素的添加, 菌株生物量明显提高, 进一步说明了 JX6-2 能够利用大蒜素生长。当大蒜素浓度超过 100 mg/L 时, 菌株生长开始受到抑制, JX6-2 利用大蒜素的最适生长浓度在 100 mg/L 左右。同样, 大蒜素的降解率曲线也说明此菌能够降解大蒜素, 在含有 50 mg/L 大蒜素无机盐培养物中, 经过 24 h 培养后, 大蒜素降解率为 100%。随着大蒜素浓度升高, 24 h 的降解率逐步降低, 降解大蒜素的最高值(大蒜素浓度×降解率)在大蒜素浓度 100–150 mg/L 之间。

图 5B 中, 降解菌在 15–40 °C 范围内均能生长和降解大蒜素, 最适生长温度和降解大蒜素温度在 35 °C 左右。图 5C 数据表明, 降解菌最适 pH 在中性(pH 7.0)左右, 在 pH 6.0–8.0 范围内, 均表现出较好的生长活性和大蒜素降解能力。在图 5D 中, 添加葡萄糖促进了菌体的生长, 同时也促进了其对大蒜素的利用, 没有出现葡萄糖抑制效应(即添加葡萄糖抑制大蒜素降解的现象), 说明大蒜素对降解菌来说也是可以优先利用的碳源。

高浓度的大蒜素降解能力、宽范围的温度和 pH 生长降解特性、对大蒜素有优先降解能力, 这样的实验结果预示着降解菌 JX6-2 具有较好的实际应用价值, 为在废水处理活性污泥中直接添加大蒜素降解菌优先降解大蒜素提供了可行性。

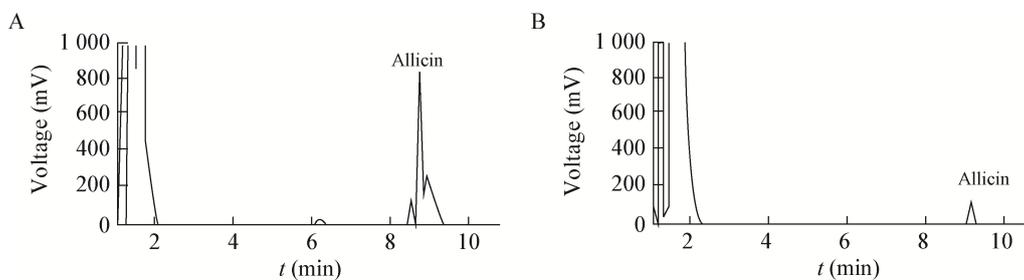


图4 培养 24 h 前(A)后(B)大蒜素降解的色谱图
Figure 4 Chromatogram of allicin degradation in medium before (A) and after (B) incubation for 24 hours

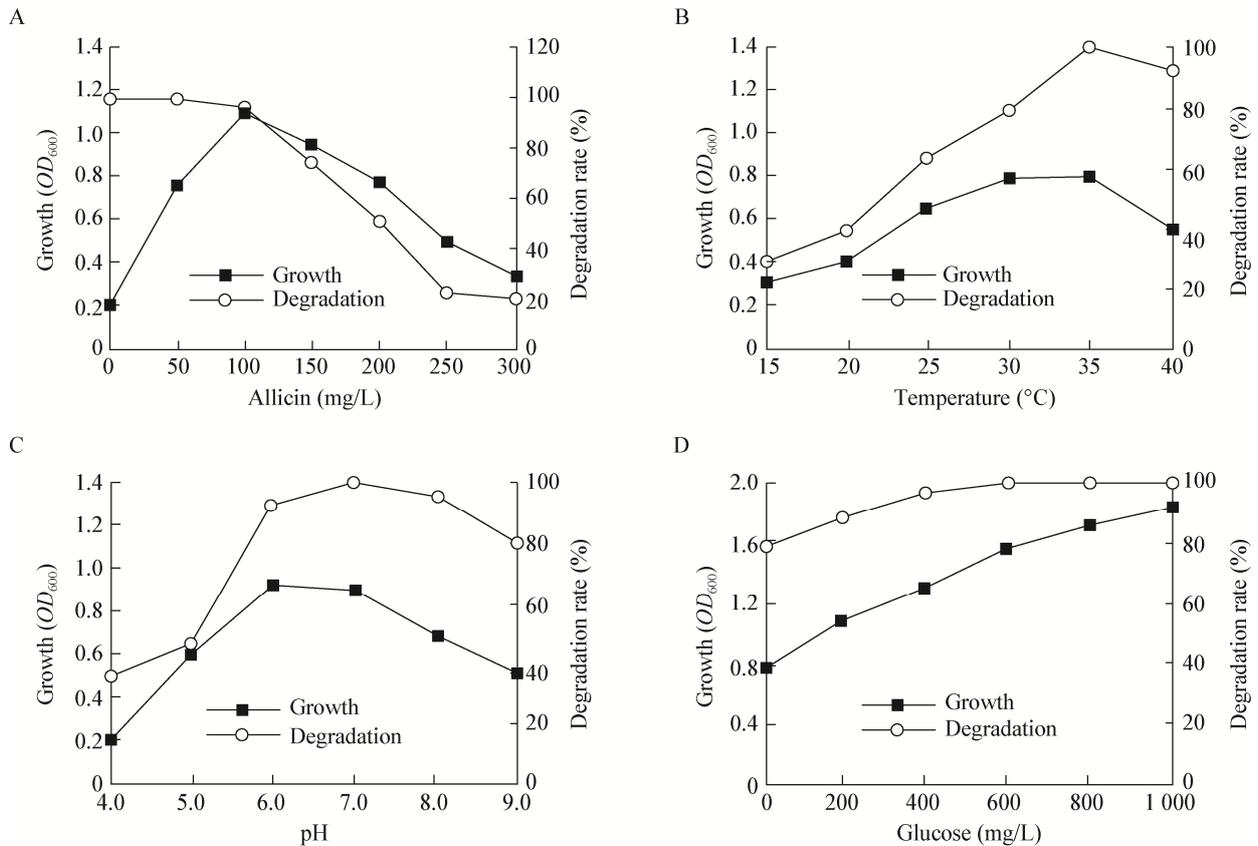


图5 大蒜素浓度、温度、pH 以及添加葡萄糖对降解菌的影响

Figure 5 Effect of allicin concentration, temperature, pH and glucose on degradation strain JX6-2

2.4 利用 JX6-2 降解菌强化的活性污泥模拟处理大蒜废水

将从污水处理厂取回的活性污泥按 1 g/L 加入到大蒜废水中，同时按 0.2 g/L 加入 JX6-2 湿菌体，置于反应装置中进行大蒜污水模拟曝气处理，调节通气量，使溶解氧维持在 2 mg/L 左右，每 4 h 取水样检测一次。对照实验不加 JX6-2 降解菌。模拟运行结果如表 1 所示。在不加大蒜素降解菌的模拟装置中，大蒜素浓度没有明显降低，COD 下降缓慢，24 h 后，COD 浓度仍在 2 000 mg/L 以上。在添加 JX6-2 的模拟装置内，可以明显看到菌体生长现象，大蒜素迅速降解，12 h 左右基本降解完全(残余量仅为 1.1 mg/L)，蒜臭味基本消失，COD 值也是明显降低，24 h 降到 400 mg/L 以下。

表 1 添加大蒜素降解菌的活性污泥处理大蒜废水
Table 1 Treatment of garlic wastewater with active sludge and allicin degradation strain

取样时间 Time (h)	只用活性污泥作为对照 Activated sludge only as control		活性污泥和降解菌 JX6-2 Activated sludge and strain JX6-2	
	大蒜素 Allicin (mg/L)	COD (mg/L)	大蒜素 Allicin (mg/L)	COD (mg/L)
0	66.0	2 900	66.0	2 900
4	61.0	2 345	45.3	2 301
8	60.2	2 139	19.3	1 780
12	60.8	2 186	1.1	1 355
16	59.5	2 055	0	998
20	57.0	1 989	0	820
24	58.3	2 011	0	360

3 结论与讨论

大蒜素具有抑菌作用, 大蒜废水中的大蒜素直接抑制了废水的生物法处理效果, 增加了处理成本。尽管在自然条件或者人工调整 pH 等环境条件下^[10], 大蒜素也可以自发水解, 但是很难彻底降解生成烯丙基硫化物类的中间产物, 仍具有强烈恶臭味及较低的生物可利用性, 阻碍着大蒜废水的彻底处理。JX6-2 菌能够以大蒜素为碳源进行生长, 彻底降解大蒜素; 菌株降解特性分析表明, JX6-2 对环境温度、pH 及大蒜素浓度的变化具有较大范围的适应能力; 在活性污泥中加入 JX6-2, 可以明显改善大蒜废水的生化处理效果; 因此, JX6-2 的分离鉴定为生化方法处理大蒜废水提供了一个新菌株。

另一方面, JX6-2 菌的分离也为将来研究细胞内大蒜素代谢机制提供了一个研究对象。在细胞和分子水平上具体分析大蒜素生化降解机制, 分离相关的大蒜素降解酶, 阐释大蒜素降解途径, 以及分析大蒜素代谢途径与其他细胞内代谢途径之间的关系等。研究成果将不仅有助于促进大蒜素降解菌的分子育种, 改善大蒜加工废弃物的处理效果, 而且有助于开发清除蒜臭味有关的酶制剂; 同时, 也有助于认识大蒜素在细胞内的生理功能, 为开发大蒜素保健产品提供参考数据。

参考文献

- [1] Stoll A, Seebeck E. Allium compounds. I. Alliin, the true mother compound of garlic oil[J]. *Helvetica Chimica Acta*, 1949, 32(1): 197-205
- [2] Ding GL, Zhao JQ, Jiang DM. Allicin inhibits oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis by promoting PI3K/AKT and CREB/ERK signaling in osteoblast cells[J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2016, 11(6): 2553-2560
- [3] Yang XL, Sha KH, Xu GY, et al. Subinhibitory concentrations of allicin decrease uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) biofilm formation, adhesion ability, and swimming motility[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(7): 979
- [4] Martins N, Petropoulos S, Ferreira ICFR. Chemical composition and bioactive compounds of garlic (*Allium sativum* L.) as affected by pre- and post-harvest conditions: a review[J]. *Food Chemistry*, 2016, 211: 41-50
- [5] Tang CL, Chang Q, Yan W. Application of iron-carbon micro-electrolysis integrated process in treatment of garlic wastewater[J]. *Environmental Engineering*, 2012(S2): 59-63 (in Chinese)
汤成莉, 常青, 延卫. 铁炭微电解组合工艺处理大蒜切片废水研究[J]. *环境工程*, 2012(S2): 59-63
- [6] Wang L. *Experimental Technology and Methods of Environmental Microbiology*[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2009: 215 (in Chinese)
王兰. *环境微生物学实验方法与技术*[M]. 北京: 化学工业出版社, 2009: 215
- [7] Han J, Lawson L, Han G, et al. Spectrophotometric method for quantitative determination of allicin and total garlic thiosulfonates[J]. *Analytical Biochemistry*, 1995, 225(1): 157-160
- [8] Zhou H, Sun HY, Cao ZB. Content determination of allicin in health food by GC[J]. *Chinese Journal of Public Health*, 2006, 22(11): 1397 (in Chinese)
周桦, 孙海燕, 曹忠波. 保健食品中大蒜素含量气相色谱法测定[J]. *中国公共卫生*, 2006, 22(11): 1397
- [9] Yang G. *Microbiology Experiment*[M]. 2nd Edition. Beijing: Science Press, 2010: 198 (in Chinese)
杨革. *微生物学实验教程*[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 2010: 198
- [10] Wang HP, Li XX, Liu XY, et al. Influence of pH, concentration and light on stability of allicin in garlic (*Allium sativum* L.) aqueous extract as measured by UPLC[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2015, 95(9): 1838-1844