

## 环糊精葡萄糖基转移酶工业发酵染菌 (*Bacillus cohnii* strain PGRS7) 的鉴定及防治

李 皎, 杨国武, 段梦露, 邓 媛, 毛 勇, 刘清利

(陕西省微生物研究所, 陕西 西安 710043)

**摘 要** 环糊精生产厂家 $\beta$ -环糊精葡萄糖基转移酶( $\beta$ -cyclodextrin glycosyltransferase,  $\beta$ -CGTase)发酵过程中频繁染菌,为解决这一问题,从发酵异常的发酵液中分离得到1株不产酶的杂菌H03S。研究杂菌发酵过程中的菌体密度、pH值、酶活等指标,发现杂菌生长速度明显低于正常菌,发酵液pH值下降速度也慢于正常菌。结合厂家实际生产情况分析:若发酵过程规范操作,则正常菌会优先形成生长优势,抑制杂菌生长;如果发酵罐实消后放置时间过长或者突发停电导致发酵终止后重新启动,杂菌会形成优势菌群,降低发酵液pH值,不利于正常菌的增殖。16S rDNA鉴定杂菌序列与正常菌不同,应归属于*Bacillus cohnii* strain PGRS7。因此,发酵前应预先采用16S rDNA分析鉴定菌种,排除杂菌,避免发酵中断和延迟,防止发酵染菌。

**关键词**  $\beta$ -环糊精葡萄糖基转移酶; $\beta$ -环糊精;16S rDNA;发酵;染菌

中图分类号 Q939.97

文献标识码 A

文章编号 1005-7021(2020)04-0040-05

doi:10.3969/j.issn.1005-7021.2020.04.006

## Classification and Prevention of Industrial Fermentation Contaminant (*Bacillus cohnii* strain PGRS7) on Cyclodextrin Glycosyltransferase

LI Jiao, YANG Guo-wu, DUAN Meng-lu, DENG Yuan, MAO Yong, LIU Qing-li

(Microbiology Inst. of Shaanxi, Xi'an 710043)

**Abstract** Bacteria contamination occurs frequently during the fermentation of  $\beta$ -cyclodextrin glycosyltransferase ( $\beta$ -CGTase) in production factories. To solve this problem, the authors isolated a sundry bacterial strain H03S from aberrant fermentation broth of  $\beta$ -CGTase that did not produce the enzyme. The bacteria OD, pH value and enzyme activity of H03S in fermentation process were studied. It was found that the growth rate and pH of H03S was significantly lower than that of the normal bacteria. Analysis combined with the actual production situation, if the fermentation process was under normal operation, the normal bacteria will primarily form growth dominance and inhibit the growth of sundry bacteria, however, if the fermentation tank were placed for a long time after sterilization or the fermentation were re-started after a period of termination due to sudden power failure, H03S might form dominant population and reduce the pH of fermentation broth, and make against the proliferation of normal strain. 16S rDNA identification of H03S was knowable that it was different from normal strain in sequence and it should belong to *Bacillus cohnii* strain PGRS7. Therefore, before starting the fermentation, analysis and identification of production strain could anticipate adopting 16S rDNA to preclude the contamination of sundry strain, at the same time, avoid the abort and retardation of the fermentation, to prevent the fermentation of sundry strain.

**Keywords**  $\beta$ -cyclodextrin glycosyltransferase ( $\beta$ -CGTase);  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD); 16S rDNA; fermentation; strain contamination

基金项目:陕西省科技厅重点项目(2018ZDXM-SF-084)

作者简介:李皎 男,副研究员,硕士。主要从事环糊精生产工艺的研究。E-mail:leejiao1971@163.com

收稿日期:2020-01-19

环糊精(cyclodextrin, CD)是由若干个 D-吡喃葡萄糖单元通过  $\alpha$ -1,4 糖苷键连接而成的环状低聚糖,由于其具有内疏水外亲水的中空筒状结构,可通过主客体识别作用包合疏水性分子,使客体分子的性质,如水溶性、挥发性、参与化学反应的性能等均发生有利的改变<sup>[1-3]</sup>。常见的天然环糊精有  $\alpha$ -CD、 $\beta$ -CD 及  $\gamma$ -CD,分别由 6、7 和 8 个葡萄糖残基组成<sup>[4,5]</sup>。 $\beta$ -环糊精( $\beta$ -cyclodextrin,  $\beta$ -CD)由于相对容易析出、易于分离的特性使得其在 3 种环糊精中最易实现工业化生产,所以在食品、制药、化妆品、农业、环保等方面有着非常广泛的应用<sup>[6-11]</sup>。 $\beta$ -CD 由  $\beta$ -cyclodextrin glycosyltransferase,  $\beta$ -CGTase 作用于淀粉后使葡萄糖基发生转移反应而获得<sup>[12-13]</sup>,是具有高附加值的淀粉深加工产物。目前, $\beta$ -CGTase 的工业化发酵生产菌种主要为芽胞杆菌<sup>[14-17]</sup>,其培养条件为强碱性( $\text{pH} > 9$ ),因此发酵过程中染菌的概率非常低。近几年来,发酵车间长时间连续生产导致环境中出现嗜碱性菌群,因此生产厂家发酵染菌的现象越来越多,发酵液酶活降低, $\beta$ -CD 产量下降,直接影响生产效益,增加了企业的生产成本和负担,如何防控  $\beta$ -CGTase 发酵过程中的杂菌污染已经引起研究者的极大重视<sup>[18-19]</sup>。笔者所在的团队多年来致力于环糊精的工业化生产工艺研究,对  $\beta$ -环糊精、羟丙基环糊精、磺丁基环糊精发酵生产建立了成熟完整的工业化生产工艺,并为全国多个环糊精生产厂家提供技术服务。在对  $\beta$ -CD 生产厂家进行技术服务过程中发现,如果发酵罐实消后放置时间过长或者突发停电导致发酵终止后重新启动,则容易发生染菌。取染菌的发酵液进行分离筛选,得到 1 株在碱性条件下可以和正常菌共生的杂菌 H03S,经鉴定该菌归属于菌株 *Bacillus cohnii* strain PGRS7。由于  $\beta$ -CGTase 生产属于正压发酵,发酵污染的来源可能是空气过滤系统或菌种污染。因此在工业发酵过程中,应预先采用 16S rDNA 分析排除污染杂菌,定期净化空气过滤系统,避免发酵中断和延迟,可以防止染菌,降低企业生产成本。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌种 菌株 H03S 自生产厂家发酵异常的发酵液中分离得到;嗜碱性蜡样芽胞杆菌为陕西省微生物研究所保藏  $\beta$ -CGTase 生产菌种 *Bacillus* sp. JSM 081004。

1.1.2 培养基(g/L) ①分离培养基:玉米浆 60,七水硫酸镁 0.2,磷酸氢二钾 1,马铃薯淀粉 15,琼脂 20,  $\text{pH}$  7.0,加入无水碳酸钠 10。②筛选培养基:以分离培养基为基础,加入酚酞 0.3。

1.1.3 仪器与设备 全自动立式电热压力蒸汽消毒器(YX-400ZN,上海三申医疗器械有限公司);生物发酵智能控制系统及 GUJS-10 发酵罐(镇江东方生物工程设备公司);电热恒温培养箱(GH-600ASB,上海博讯实业有限公司);恒温培养摇床(ZHWY-2012,上海智诚分析仪器制造有限公司);聚合酶链式反应仪(S1000,美国 bio-rad 公司);水平式核酸电泳槽(DYCP-31E,北京六一仪器制造厂);紫外仪(WD-9430F,北京六一仪器制造厂);小型震荡仪(QL-901 Vortex,海门其林贝尔仪器制造有限公司);精密台式数显  $\text{pH}$  计(PB-10,北京赛多利斯仪器系统有限公司);分光光度计(722N 型,上海精密科学仪器有限公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 发酵液酶活测定 采用碘液法测定  $\beta$ -CGTase 水解活性<sup>[20]</sup>。取 2.5 g/L 马铃薯淀粉溶液 0.2 mL,与等体积 Tris-HCl 缓冲液(50 mmol/L,  $\text{pH}$  8.0)混合,于 40  $^{\circ}\text{C}$  水浴预热 5 min,加入 10  $\mu\text{L}$  发酵液反应 10 min,反应结束后立即置于冰水浴中并加入 3% (体积分数)醋酸溶液 0.5 mL 终止反应,加入 3 mL 0.05 g/L 碘液显色,蒸馏水定容至 10 mL。以蒸馏水为空白,不加酶液为对照,在单色波长 700 nm 处比色。1 个酶活力单位定义为每分钟减低 10% 吸光度所需酶量。

酶活力(U/mL)

$$= \frac{(a-b)}{a} \times 1000 \times \text{酶液稀释倍数}$$

式中  $a$  为对照组的吸光度; $b$  为样品的吸光度。

1.2.2 发酵液光密度测定 将菌液稀释至线性范围内,分光光度计测定其在波长 600 nm 下的光密度值。

1.2.3 杂菌的筛选和分离 发酵液按 10 的倍数逐级梯度稀释,并分别在分离培养基和筛选培养基上进行培养。

#### 1.2.4 采用 16S rDNA 技术进行菌种分析与鉴定

采用酚-氯仿沉淀法提取菌种基因组 DNA。根据细菌 16S rDNA 的保守性,设计通用引物 27F: 5'-AGAGTTTATCATGGCTCAG-3'; 1492R: 5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3',以基因组 DNA 为模板,模板 DNA 量为 50~200 ng,PCR 扩增程序:95℃热变性 3 min;94℃变性 1 min,55℃退火 40 s,72℃延伸 2 min,40 个循环;72℃延伸 10 min,10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。目的片段经胶回收和纯化后,连接于 pGM-T 载体上,转化至感受态细胞 *E. coli* DH 5 $\alpha$  中,37℃培养过夜。挑取单菌落培养并进行 PCR 验证,验证后的阳性克隆子菌液送至杨凌天润奥科生物科技有限公司测序。使用 BLAST 搜索软件在 NCBI 网站 GenBank 基因库中对测序结果进行同源性分析和检索,筛选出与目的菌种相似度匹配最高的种属。

## 2 结果与分析

### 2.1 杂菌 H03S 的分离筛选

取环糊精生产车间发酵异常的发酵液进行分离筛选。由于正常菌产生的  $\beta$ -CGTase 可将培养基中的淀粉转化为  $\beta$ -CD, $\beta$ -CD 包埋培养基中的酚酞在菌落周围产生褪色圈,而杂菌不产酶,因此菌落周围无褪色圈。从图 1 中可以看出,菌落 1 可在碱性培养基上(pH 试纸显色为碱性)生长,且周围产生褪色圈,为正常菌菌落;菌落 2 虽然可在强碱性培养基上生长(pH 试纸显色为碱性),但周围无褪色圈,为杂菌,命名为 H03S;3 为置于培养基上的盖玻片,将 pH 试纸置于盖玻片之上,使培养基和试纸分离,结果试纸不变色,这进一步证实了试纸的显色是由碱性培养基引起的,与其他因素无关。

### 2.2 菌株 H03S 发酵生长曲线

将正常菌和菌株 H03S 分别接入 10 L 全自动发酵罐,以相同培养条件进行发酵,并记录两种菌的发酵生长曲线,见图 2。0~8 h 时,两种菌几乎不增长,8~20 h 时,H03S 生长速度明显低于正常菌,直至发酵终点其菌体密度一直远低于正常菌。由此分析,在工业发酵过程中,只要规范操作,则

正常菌会优先形成生长优势,抑制杂菌生长;但如果发酵罐实消后放置时间过长或者突发停电导致发酵终止一段时间后重新启动,则杂菌可能会形成优势菌群,从而抑制正常菌的增长,导致发酵失败。

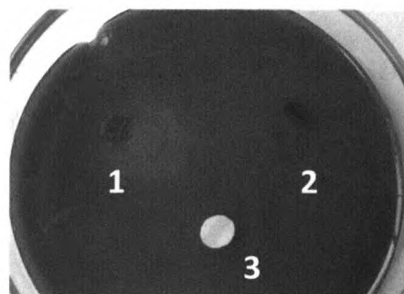


图 1 正常菌和菌株 H03S 在筛选培养基上的生长情况

Fig. 1 Growth of normal bacterium and H03S on the selection medium

1:正常菌菌落;2:菌株 H03S 菌落;3:对照

1:The colony of normal bacterium; 2:The colony of H03S; 3:control

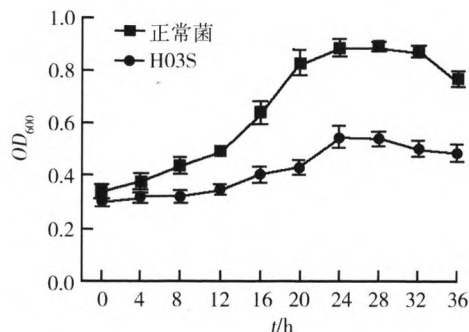


图 2 菌株 H03S 和正常菌的发酵生长曲线

Fig. 2 Growth curves of H03S and normal bacteria

### 2.3 菌株 H03S 发酵 pH 值变化曲线

将正常菌和菌株 H03S 分别接入 10 L 全自动发酵罐,以相同培养条件进行发酵,并记录两种菌发酵过程中的 pH 值变化。如图 3 所示,两种菌在发酵过程中,pH 值均呈现先下降后略有上升的趋势,正常菌培养 12 h 时,pH 值降至最低,而菌株 H03S 在 20 h 降至最低,且正常菌发酵过程中,pH 值下降速度高于菌株 H03S pH 值下降速度。因此 pH 值下降速度可作为判断发酵异常的指标之一,对生产实践具有指导意义。

### 2.4 菌株 H03S 发酵过程中的酶活变化

将正常菌和菌株 H03S 分别接入 10 L 全自动发酵罐,以相同培养条件进行发酵,并记录两种菌发酵过程中的酶活变化。如图 4 所示,正常菌的酶活在 28 h 时达到峰值 4 026. 44 U/mL,而菌株 H03S 则不产酶。

### 2.5 菌株 H03S 的 16S rDNA 分析

对菌株 H03S 进行 16S rDNA 克隆和测序,

使用 BLAST 在 GenBank 基因库中进行同源性搜索和多序列比对,如图 5 所示,经比对菌株 H03S 应归属于 *Bacillus cohnii* strain PGRS7。而笔者之前的研究表明,正常菌是嗜碱性蜡样芽胞杆菌,归属于 *Bacillus* sp. JSM 081004<sup>[18-19]</sup>。因此,在发酵前可预先采用 16S rDNA 基因序列分析鉴定菌种,排除染杂菌的菌种,防止发酵染菌的发生。

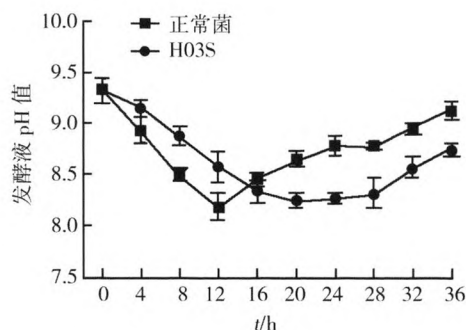


图3 菌株 H03S 和正常菌发酵过程中 pH 变化曲线

Fig. 3 pH curves of H03S and normal bacteria

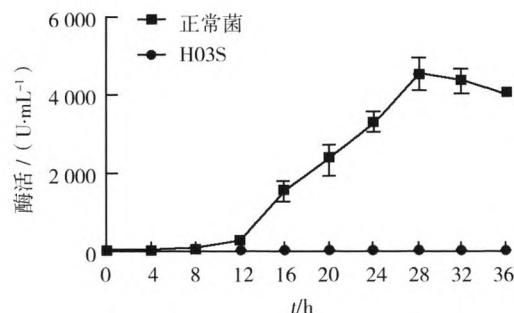


图4 菌株 H03S 和正常菌发酵过程中酶活的变化

Fig. 4 Enzyme activity curves of H03S and normal bacteria

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

|                                     | Description  | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Accession                  |
|-------------------------------------|--|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | <a href="#">Bacillus cohnii strain PGRS7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>      | 2 148     | 2 148       | 99%         | 0.0     | 98.37%     | <a href="#">MH489034.1</a> |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <a href="#">Bacillus cohnii strain DSM 6307, complete genome</a>                           | 2 148     | 32 080      | 99%         | 0.0     | 98.37%     | <a href="#">CP018866.1</a> |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <a href="#">Bacillus sp. 6C partial 16S rRNA gene, strain 6C</a>                           | 2 148     | 2 148       | 99%         | 0.0     | 98.37%     | <a href="#">LT837689.1</a> |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <a href="#">Bacillus cohnii gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: M2-5</a> | 2 148     | 2 148       | 99%         | 0.0     | 98.37%     | <a href="#">LC197825.1</a> |

图5 菌株 H03S 16S rDNA 分析比对结果

Fig. 5 16S rDNA analysis of H03S

## 3 讨论

通过特异性酚酞筛选培养基,从环糊精生产厂家  $\beta$ -CGTase 发酵异常的发酵液中分离得到 1 株杂菌菌株 H03S,该杂菌在碱性(pH 值 > 9)条件下可以和正常菌共生,但并不产酶。通过对 H03S 在发酵过程中的光密度、pH 值、酶活等指标的研究,发现该菌生长速度明显低于正常菌,发酵液 pH 值下降速度也慢于正常菌。结合厂家实际生产情况分析可知,在工业生产中,只要规范操作,正常菌就会优先形成生长优势,降低发酵液

pH 值,抑制杂菌生长;如果发酵罐实消后放置时间过长或者突发停电导致发酵终止一段时间后重新启动,则杂菌可能会形成优势菌群,降低发酵液 pH 值,从而不利于正常生产菌的增殖,并且增加了环境中污染其他杂菌的可能性。对菌株 H03S 进行 16S rDNA 基因序列分析,可知该菌归属于 *Bacillus cohnii* strain PGRS7,与正常菌序列不同。由于  $\beta$ -CGTase 生产属于正压发酵,发酵污染的来源可能是空气过滤系统或菌种污染,因此应预先采用 16S rDNA 分析排除染杂菌的菌种,同时定期净化空气过滤系统,避免发酵的中断和延迟,从

而防止发酵染菌,提高企业生产效率。

### 参考文献:

- [1] Crini G. Review: a history of cyclodextrins[J]. Chem Rev, 2014, 114(21):10940-10975.
- [2] Oliveri V, Bellia F, Pietropaolo A, et al. Unusual cyclodextrin derivatives as a new avenue to modulate self- and metal- induced abeta aggregation[J]. Chemistry (Easton), 2015, 21(40):14047-14059.
- [3] 张严, 苏志桂, 张灿.  $\beta$ -环糊精及衍生物作为生物活性分子研究进展[J]. 药学研究, 2018, 37(10):589-592.
- [4] Del Valle EM. Cyclodextrins and their uses: a review[J]. Process Biochemistry, 2004, 39(9):1033-1046.
- [5] Astray G, Gonzalez BC, Mejuto JC, et al. A review on the use of cyclodextrins in foods[J]. Food Hydrocolloids, 2009, 23(7):1631-1640.
- [6] 任爽, 马麟莉, 孟昭福, 等. BS-12 和  $\beta$ -环糊精复配修饰膨润土及其对苯酚吸附性能的初步研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2015, 43(4):135-140.
- [7] Marangoci N, Timpu D, Corciova A, et al.  $\beta$ -Cyclodextrin as a functional excipient used for enhancing the diminazene aceturate bioavailability[J]. Pharmaceutics, 2019, 11(6):295.
- [8] 杜慧玲, 于晓英, 董彭旭, 等.  $\beta$ -环糊精在活性污泥调理中的应用[J]. 环境保护科学, 2019, 45(4):36-40.
- [9] 晋文, 李飞杨, 黄宇蓉, 等. 雷公藤内酯酮与 2,6-二甲基- $\beta$ -环糊精包合物的制备及性能研究[J]. 分析化学, 2019, 47(8):1235-1242.
- [10] 魏蒙月, 张赞彬, 吴西芝, 等. 香辛料精油- $\beta$ -环糊精微胶囊的物理特征及对酱牛肉熏蒸保鲜的效果研究[J]. 中国食品添加剂, 2019, 4:127-133.
- [11] 姜遥, 李青, 徐朋飞, 等. 天冬氨酸- $\beta$ -环糊精强化  $\text{TiO}_2$ -石墨烯光催化降解酸性红 R 的研究[J]. 环境污染与防治, 2018, 40(5):497-507.
- [12] Jin ZY, Bai YX, Wang JP. Screen and modification of cyclodextrin glycosyltransferase[J]. Journal of Food Science & Biotechnology, 2012, 31(2):113-123.
- [13] 李兆丰, 顾正彪, 堵国成, 等. 环糊精葡萄糖基转移酶的结构特征与催化机理[J]. 中国生物工程杂志, 2010, 30(6):144-150.
- [14] Rodríguez Gastón JA, Costa H, Ferrarotti SA. Continuous production of cyclodextrins in an ultrafiltration membrane reactor, catalyzed by cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* DF 9R[J]. Biotechnology Progress, 2015, 31(3):695-699.
- [15] Li Z, Ban X, Gu Z, et al. Mutations enhance  $\beta$ -cyclodextrin specificity of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans*[J]. Carbohydr Polym, 2014, 108:112-117.
- [16] 许波, 黄遵锡, 陈宝英, 等. 环状糊精葡萄糖基转移酶的研究进展[J]. 食品科学, 2007, 28(11):600-604.
- [17] Huang M, Li C, Gu Z, et al. Mutations in cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* enhance  $\beta$ -cyclization activity and  $\beta$ -cyclodextrin production[J]. J Agric Food Chem, 2014, 62(46):11209-11214.
- [18] 李皎, 杨国武, 汪大敏, 等.  $\beta$ -环状糊精葡萄糖基转移酶发酵染菌的分离和 16S rDNA 分析[J]. 中国食品添加剂, 2011, 3:65-68.
- [19] 李皎, 杨国武, 汪大敏, 等. 发酵生产  $\beta$ -环状糊精葡萄糖基转移酶的气球菌(*Aerococcus* sp. P3-2)污染及防治[J]. 中国食品添加剂, 2012, 6:147-150.
- [20] 淡家林, 徐纯锡, 任永娥. 软腐芽孢杆菌 D20 产 CGTase 的条件和酶性质[J]. 微生物学报, 1988, 28(2):136-142.