

文章编号:1004-1478(2011)04-0027-05

# 烟碱的微生物代谢研究进展

王春利, 罗昭标, 寇霄腾, 马林

(郑州轻工业学院烟草科学与工程学院, 河南 郑州 450002)

**摘要:**综述了代谢烟碱微生物的种类、微生物代谢烟碱的途径、分子生物学机理和酶学研究及微生物代谢烟碱应用研究的进展情况,揭示出微生物在降低烟草和环境中的烟碱含量的潜力。

**关键词:**微生物;烟碱;代谢

**中图分类号:**TS411

**文献标志码:**A

## Advancements of research on nicotine catabolism of microorganisms

WANG Chun-li, LUO Zhao-biao, KOU Xiao-teng, MA Lin

(College of Tobacco Sci. and Eng., Zhengzhou Univ. of Light Ind., Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** The advancements of research on nicotine catabolism of microorganisms in the past decades were reviewed. The advancements mainly include classification and diversity of nicotine-degrading microbes, catabolism pathways, molecular biology and enzymes about nicotine degradation, and the application of these nicotine-degrading microbes is also overviewed. It is suggested that nicotine-degrading microbes play important roles in depressing nicotine of tobacco leaves and environment.

**Key words:** nicotine; microorganisms; catabolism

## 0 引言

烟碱即尼古丁(nicotine),化学名称1-甲基-2(3-吡啶基)-吡咯烷,是烟草生物碱中的主要成分,占烟草生物碱总量的95%以上。它属于吡啶族生物碱,是一种精神药品,对中枢神经有强烈的刺激和麻痹作用,过量吸入后会有生命危险<sup>[1]</sup>。此外,在吸食过程中,烟碱还会被亚硝化生成强致癌剂TSNA(tobacco-specific nitrosamines)<sup>[2]</sup>,同时烟碱还是一种环境有毒物质。因此,有效地控制卷烟和环境中的烟碱含量是烟草工作者和环保工作者要解决的重要课题,对于维护人类的健康意义重大。利用某些微生物能够代

谢烟碱这一特性,可以降低卷烟和环境中的烟碱含量,科研工作者们对此已经进行了大量的研究。本文拟对代谢烟碱微生物的种类及代谢途径、微生物代谢烟碱的分子生物学和酶学研究以及微生物代谢烟碱的应用研究等方面的进展进行综述。

## 1 代谢烟碱的微生物

烟碱作为烟草中主要的生物碱,在干烟叶中平均含量为1.7%~3.3%<sup>[3]</sup>。微生物是种类多、分布广、适应性和代谢能力很强的生物体,自然界中存在很多能够代谢这种杂环化合物的微生物,特别是节杆菌属和假单胞杆菌属,它们能够以烟碱作为碳

收稿日期:2011-03-15

基金项目:国家自然科学基金项目(20976169)

作者简介:王春利(1986—),男,河南省泌阳县人,郑州轻工业学院硕士研究生,主要研究方向为卷烟工艺学。

通信作者:马林(1964—),男,河南省信阳市人,郑州轻工业学院教授,博士,主要研究方向为烟草生物技术和卷烟工艺。

源和氮源. 迄今为止人们发现的能够代谢烟碱的细菌主要有节杆菌属(如 *Arthrobacter nicotinovorans*<sup>[4]</sup>)、假单胞菌属(如 *P. convexa* PC1<sup>[5]</sup>, *P. putida*<sup>[6]</sup>)、纤维单胞菌属<sup>[7]</sup> (*Cellulomonas* sp.)、诺卡氏菌<sup>[8]</sup> (*Nocardioides* sp. JS614)、土壤杆菌<sup>[9]</sup> (*Agrobacterium radiobacter*)、摩根氏菌属亚种<sup>[10]</sup> (*Morganella fulton morganella morgani subsp.*); 除了细菌之外, 如 *Microsporium gypseum*<sup>[11]</sup> 和 *Cunninghamella echimulata*<sup>[12]</sup> 等一些真菌也具有代谢烟碱的能力.

## 2 微生物代谢烟碱的途径

微生物代谢烟碱是一个复杂的生理、生化过程. 经过科研工作者对烟碱代谢途径和烟碱代谢中间体的研究, 现已确定微生物主要通过4种途径代谢烟碱: 一是节杆菌属细菌中存在的吡啶途径(pyridine pathway), 该途径由7种酶催化, 从烟碱吡啶环C6羟基化开始, 吡咯烷氧化脱氢并自发水解打开, 然后吡啶环通过羟基化打开, 代谢过程以生成蓝色素为标志; 二是以假单胞菌属细菌为代表的吡咯途径(pyrrolidine pathway), 先是烟碱吡咯烷脱氢生成假氧化烟碱和N-甲基麦思明等中间产物, 然后通过羟基化吡啶环被打开; 三是存在于真菌中的脱甲基化途径(Me pathway), 烟碱吡咯烷脱甲基生成脱甲基烟碱, 紧接着转化为羧酸和氨基酸; 四是第1种和第2种的混合途径, 主要表现为 *Achromobacter nicotinophagum* 代谢烟碱的过程, *A. nicotinophagum* 以2种不同途径代谢烟碱<sup>[13]</sup>.

微生物的种类不同, 其代谢烟碱的途径和代谢产物也不相同. 李钰等<sup>[9]</sup>利用筛选到的土壤杆菌Z7代谢烟碱时, 发酵液的颜色变化为淡黄色—绿色—墨绿色—深棕色, 张娟等<sup>[10]</sup>筛选到的摩根氏菌亚种F4的发酵液颜色变化为无色—浅黄色—灰褐色. 由此可以初步推测这些菌株通过其他的未知途径来代谢烟碱, 产生了不同的代谢产物. 除了已发现的代谢途径外, 是否还有其他烟碱代谢途径尚待进一步探究.

## 3 微生物代谢烟碱的分子生物学研究

近年来, 国内外学者对微生物代谢烟碱的分子生物学机理进行了深入的研究, 这些研究主要围绕以嗜烟碱节杆菌为代表的吡啶途径和以假单胞杆

菌为代表的吡咯途径展开, 而对真菌脱甲基化途径的研究却未见报道.

### 3.1 节杆菌属细菌代谢烟碱分子生物学的研究

对节杆菌属细菌代谢烟碱的分子生物学研究是从发现巨型质粒pAO1开始的. 1982年, R. Brandsch等<sup>[14]</sup>通过质粒消除和接合转移方法证明了pAO1介导节杆菌代谢烟碱, 编码烟碱代谢各种酶的基因都位于该质粒上. 1986年, R. Brandsch等<sup>[15]</sup>对pAO1亚克隆获得了6hdno基因片段, 并成功在大肠杆菌中实现了表达. 1994年, S. Grether-Beck等<sup>[16]</sup>对嗜烟碱节杆菌ndh进行了克隆、测序和表达, 发现其与6hlno形成一个转录单元, 表达依赖于钼, 表达产物NDH是由3个不同的亚基组成的寡聚酶. 2003年, G. L. Igoli等<sup>[17]</sup>将pAO1进行了全序列测定(序列号为AJ507836), 其准确大小为165 137 bp, G+C含量为59.7%, 包含有165个开放阅读框架, 包括烟碱转运和代谢, 钼二核苷酸辅因子合成, 糖类、肌氨酸和氨基酸的吸收和代谢必需酶的开放阅读框架. pAO1的全基因测序显示出参与烟碱代谢过程的各种酶编码基因排序, 同时也发现了与代谢途径中酶关系紧密的开放阅读框架ORFs. 基因组内的一些ORFs可以编码酰胺酶、聚酮环化酶、蛋白激酶C, 这些酶在分解羟基化的吡啶环中发挥作用. 2009年, P. Ganas等<sup>[18]</sup>利用同位素标记的方法发现 *Arthrobacter nicotinovorans* 和具有烟碱代谢功能的工程菌 *Escherichia coli* 代谢烟碱时, 烟碱和6-羟基烟碱的吸收既不是通过自由扩散, 也不是主动运输, 而是以促进扩散的方式穿透细胞膜屏障的.

### 3.2 假单胞杆菌属细菌代谢烟碱分子生物学的研究

1978年, R. Thacker等<sup>[5]</sup>利用丝裂霉素消除质粒和接合转移的方法证明了菌株 *P. convexa* strain1 (Pc1)对烟碱和烟酸的代谢是由NIC质粒介导的, 并通过接合转移证明该质粒与 *P. putida* 中的其他代谢质粒如CAM, OCT, NAH, SAL和TOL有很好的相容性. 1979年, R. Thacker<sup>[19]</sup>又发现NIC质粒从菌株 *P. convexa* strain 1 (Pc1)接合转移到 *P. putida* PpG1中时会解离为能够带动染色体基因转移的独立育性因子T和非转移性的NIC结构基因质粒. 2008年, H. Z. Tang等<sup>[20]</sup>对恶臭假单胞菌(*P. putida*)进行了进一步的研究, 对 *P. putida* strain S16细菌基因组上代谢烟碱的长度为4 879 bp的基因簇进

行了克隆、测序和细胞融合表达,结果发现重组体产生了5种中间代谢产物,它们分别是N甲基麦思明、假氧化烟碱、3-琥珀酰吡啶、6-羟基-3-琥珀酰吡啶和2,5-二羟基吡啶.研究者又对6-羟基-3-琥珀酰吡啶羟化酶(HSP羟化酶)基因进行了克隆、测序,并且在大肠杆菌中实现了高效表达.这些研究为研究假单胞杆菌代谢烟碱的生理机制提供了更好的依据.

#### 4 嗜烟碱节杆菌代谢烟碱酶学研究

在微生物代谢烟碱的途径中,嗜烟碱节杆菌(*A. nicotinovorans*)代谢烟碱的吡啶途径研究的比较清楚,该途径代谢烟碱是通过微生物产生的几种酶来催化逐步完成的.

由巨型质粒 pAO1 介导的烟碱代谢的吡啶途径主要涉及6个反应步骤,分别由7种酶来催化完成,其催化机理已经明确. 1) 烟碱脱氢酶(nicotine dehydrogenase, NDH, EC 1.5.99.4), 催化烟碱生成6-羟基烟碱的反应,该酶由3个亚基组成,分子量分别为30 011 Da, 14 924 Da 和 87 677 Da, 并分别以 Fe-S 簇、FAD 和 钼蝶呤二核苷酸为辅因子<sup>[16,21]</sup>. 该酶可被 D-烟碱和 L-烟碱同时诱导,没有光学选择性,会被葡萄糖和铵盐的同时存在阻遏<sup>[4]</sup>. 2) L-6-羟基烟碱氧化酶(L-6-Hydroxynicotine oxidase, 6-HLNO, EC 1.5.3.5) 和 D-6-羟基烟碱氧化酶(D-6-hydroxynicotine oxidase, 6-HDNO, EC 1.5.3.6) 分别作用于 L-6-羟基烟碱和 D-6-羟基烟碱<sup>[22]</sup>, 是一对严格光学特异的酶,共同催化烟碱代谢的第二步反应,催化产物均为假氧化烟碱. L-6-羟基烟碱氧化酶是一个同源二聚体,分子量为 93 kDa, 每个亚基以非共价键方式结合 1 个 FAD 分子<sup>[23]</sup>. D-6-羟基烟碱氧化酶是一个分子量为 53 kDa 仅由 1 个多肽链组成的单体酶,每分子酶共价结合 1 个 FAD 分子<sup>[24]</sup>. 3) 酮脱氢酶(Ketone dehydrogenase, KDH, EC 1.5.99), 催化 6-羟基假氧化烟碱生成 2,6-二羟基假氧化烟碱,该酶为异源三聚体,3个亚基大小分别为 89 021.71 Da, 26 778.65 Da 和 17 638.88 Da, 辅因子分别是钼蝶呤(MoCo)、FAD 和 Fe-S 簇<sup>[25]</sup>. 4) 2,6-二羟基假烟碱水解酶(2,6-dihydroxypseudoxynicotine hydrolase, DHPONH)<sup>[26]</sup>, 由 *ponh* 编码,催化 2,6-二羟基假氧化烟碱生成 2,6-二羟基

吡啶和  $\gamma$ -N-甲基氨基丁酸,该酶属于抑制 C—C 键的  $\alpha/\beta$  折叠水解酶家族<sup>[27]</sup>. 5) 2,6-二羟基吡啶-3-羟化酶(2,6-dihydroxypyridine-3-hydroxylase, 2,6-DHPH), 催化 2,6-二羟基吡啶产生 2,3,5-三羟基吡啶,它是一个 90 kDa 的同源二聚体,紧密结合 2 个 FAD 分子,酶活对 NADH 严格依赖,当 2,6-二羟基吡啶、NADH、氧量为 1:1:1 时,反应终产物为一种蓝色素<sup>[28]</sup>.

6) N-甲基氨基丁酸氧化酶(N-methylaminobutyrate oxidase, MABO), 该酶催化  $\gamma$ -N-甲基氨基丁酸生成  $\gamma$ -氨基丁酸. MABO 由位于 NIC 基因簇上游的 *mabo* 基因编码,与二甲基甘氨酸脱氢酶有关<sup>[29-30]</sup>.

#### 5 微生物代谢烟碱的应用研究

微生物代谢烟碱的潜能可用于烟叶的醇化过程,降低烟叶中烟碱的含量,减少刺激性,同时还能增加香气,提高吸烟的安全性<sup>[31]</sup>.

国外一些大的烟草企业(如 Brown & Williamson 烟草公司和英美烟草公司)很早就已开始利用微生物的这种潜能来降低烟草中的烟碱含量以满足消费者对低烟碱卷烟的需求. 1975 年, Brown & Williamson 烟草公司利用假单胞杆菌(*Pseudomonas putida*)对烟草中的烟碱进行降解,发现用假单胞杆菌液对白肋烟和烤烟的混合烟丝(1:1)进行处理 18 h 后,烟碱含量平均从 2.00% 降到了 0.85%, 通过烟气分析发现,每支卷烟的烟碱含量从 1.58 mg 降到了 0.98 mg. 1977 年, Brown & Williamson 烟草公司还筛选出纤维单胞菌和假单胞菌,并用培养达到最佳生长状态的菌液处理去梗的烟叶,处理后烟叶的烟碱含量从 3.5% 降至 1.65%<sup>[32]</sup>. 1978 年,该公司用纤维单胞菌来降低烟草中的烟碱和硝酸盐含量,发现利用诱导处理后的菌液发酵白肋烟烟片,白肋烟烟碱和硝酸盐含量分别从 3.54% 和 1.42% 降至 0.22% 和 0.32%. 处理后的白肋烟和其他烟丝混合制成烟支后进行烟气分析,硝酸盐、氰化氢和烟碱含量分别降低了 38.8%, 19.7% 和 15.3%.

我国从 2001 年开始涉及微生物代谢烟碱方面的研究,主要集中在微生物的筛选、鉴定和应用等方面. 2005 年,马林等<sup>[33]</sup>筛选到高效代谢烟碱的节杆菌 Z3,利用该菌的发酵液处理烟丝 2 d 和 7 d 后,烟碱含量分别降低了 15.2% 和 22.1%;用该菌和角质酶协同处理晒红烟,处理后刺激性显著降低,杂

气也基本消除,劲头降低,基本上消除了晒烟特征,为晒烟在烤烟型卷烟配方中的应用提供了支持.李梅云等<sup>[34]</sup>用代谢尼古丁菌株的酶液处理采收的中、上部烟叶,发现烟碱含量降低了30%以上,减轻了烟刺激性和呛咳性,显著提高了抽吸品质.2008年,雷丽萍等<sup>[35]</sup>利用节杆菌 *Arthrobacter spp.* K7 和 K3 菌株菌悬液处理采收后的 K326 烟叶,烟碱含量降低了26.1%~39.7%;对处理后的烟叶进行单料烟评吸,结果显示烟叶香气质、香气量均有增加,且烟气细腻,刺激性减轻,劲头下降,余味有所改善.

## 6 结语

环境和健康是人类生存与发展面临的2大问题,利用微生物代谢烟碱的特性,不仅可以降低卷烟中烟碱的含量,而且可以降解环境中与烟碱有关的污染物,具有很大的经济效益和社会效益.微生物代谢烟碱的途径十分复杂,虽然嗜烟碱节杆菌代谢烟碱的机理的研究已经比较深入,但是研究人员对其他代谢烟碱的微生物,尤其是假单胞杆菌和真菌的代谢机理还了解得较少,相信随着技术的进步和研究方法的不断改进,微生物代谢烟碱之谜将被人们破解.

微生物不仅能够代谢烟碱,还能够降低烟叶中的其他成分,如蛋白质、TSNA、木质素等.另外,利用微生物处理,可以缩短烟叶的醇化周期、改善烟叶的内在品质、制备天然香料等.可以预料,随着社会和烟草行业的不断发展,烟草生物技术将是一个热门的研究课题和方向.

### 参考文献:

- [1] 张槐苓,葛翠英,穆怀静,等.烟草分析与检验[M].郑州:河南科学技术出版社,1994:158-170.
- [2] David M, Peele, Marvin G, et al. Formation of tobacco-specific nitrosamines in flue-cured tobacco [J]. *Recent Advances in Tobacco Sci*, 1999, 27:3.
- [3] Armstrong D W, Wang X D, Nuran Ercal. Enantiomeric composition of nicotine in smokeless tobacco, medicinal products, and commercial reagents [J]. *Chirality*, 1998, 10(7):587.
- [4] Kodama Y, Yamamoto H, Amano N, et al. Reclassification of two strains of *Arthrobacter oxydans* and proposal of *Arthrobacter nicotinovorans* sp. Nov [J]. *Int J Syst Bacteriol*, 1992, 42:234.
- [5] Thacker R, Rorvig O, Kahlon P, et al. NIC, a conjugative nicotine-nicotinate degradative plasmid in *Pseudomonas convexa* [J]. *J Bacteriol*, 1978, 135(1):289.
- [6] Newton, Richard P, Geiss, et al. Process for reduction of nicotine content of tobacco by microbial treatment US, 4037609 [P]. 1977-07-26.
- [7] Lawrence E, Gavelly, Geiss, et al. Process for reduction of nitrate and nicotine content of tobacco by microbial treatment US, 4557280 [P]. 1985-12-10.
- [8] Petra Ganas, Paula Sachelaru, Marius Mihasan. Two closely related pathways of nicotine catabolism in *Arthrobacter nicotinovorans* and *Nocardioideis sp. strain JS614* [J]. *Arch Microbiol*, 2008, 189:511.
- [9] 李钰,赵建新,田丰伟,等.一株降烟碱细菌的筛选、鉴定及降解特性研究[J]. *中国生物工程杂志*, 2007, 27(11):82.
- [10] 张娟,张丽丽,扈麟,等.烟碱降解菌的筛选和初步鉴定[J]. *中国烟草学报*, 2011, 12(6):89.
- [11] Sindelar R D, Rosasza J P, Barfknecht C F. N-demethylation of nicotine and reduction of nicotine-1'-N-oxide by *Microsporium gypseum* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1979, 38(5):836.
- [12] Uchida S, Maeda S, Kasaki T. Conversion of nicotine into nornicotine and N-methylmyosmine by fungi [J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1983, 47(9):1949.
- [13] Hylin J W. The microbial degradation of nicotine. II. The mode of action of *Achromobacter nicotinophagum* [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1959, 83(2):528.
- [14] Brandsch R, Hinkkanen Ari E, Decker K. Plasmid-mediated nicotine degradation in *Arthrobacter oxidans* [J]. *Arch Microbiol*, 1982, 132:26.
- [15] Brandsch R, Faller W, Schneider K. Plasmid pAO1 of *Arthrobacter oxidans* encodes 6-hydroxy-D-nicotine oxidase: cloning and expression of the gene in *Escherichia coli* [J]. *Mol Gen Genet*, 1986, 202(1):96.
- [16] Grether-Beck S, Igloi G L, Pust S, et al. Structural analysis and molybdenum-dependent expression of the pAO1-encoded nicotine dehydrogenase genes of *Arthrobacter nicotinovorans* [J]. *Mol Microbiol*, 1994, 13(5):929.
- [17] Igloi G L, Brandsch R. Sequence of the 165-kilobase catabolic plasmid pAO1 from *Arthrobacter nicotinovorans* and identification of a pAO1-dependent nicotine uptake system [J]. *J Bacteriol*, 2003, 185(6):1976.
- [18] Ganas P, Brandsch R. Uptake of L-nicotine and of 6-hydroxy-L-nicotine by *Arthrobacter nicotinovorans* and by *Escherichia coli* is mediated by facilitated diffusion and not by

- passive diffusion or active transport [ J ]. *Microbiology*, 2009, 155: 1866.
- [ 19 ] Thacker R, Gunsalus I C. Dissociation of the NIC plasmid aggregate in *Pseudomonas putida* [ J ]. *J Bacteriol*, 1979, 137(1): 697.
- [ 20 ] Tang H Z, Wang S N, Ma L Y, et al. A novel gene, encoding 6-Hydroxy-3-succinoyl-pyridine hydroxylase, involve in nicotine degradation by *Pseudomonas putida* strain S16 [ J ]. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74(5): 1567.
- [ 21 ] Freudenberg W, Koenig K, Andreesen J R. Nicotine dehydrogenase from *Arthrobacter oxidans*: A molybdenum-containing hydroxylase [ J ]. *FEMS Microbiol Lett*, 1988, 52(1): 13.
- [ 22 ] Hinkkanen A, Lilius E M, Nowack J, et al. Purification of the flavoproteins 6-hydroxy-D-and 6-hydroxy-L-nicotine oxidase using hydrophobic affinity chromatography [ J ]. *Anal Biochem*, 1983, 364(2): 801.
- [ 23 ] Dai V D, Deck K, Sund H. Purification and propensity of L-6-hydroxynicotine oxidase [ J ]. *Eur J Biochem*, 1968(4): 95.
- [ 24 ] Bruhmuller M, Mohler H, Decker K. Covalently bound flavin in D-6-hydroxynicotine oxidase from *Arthrobacter oxidans*: Purification and properties of D-6-hydroxynicotine oxidase [ J ]. *Eur J Biochem*, 1972, 29(1): 143.
- [ 25 ] Schenk S, Hoelz A, Deck K, et al. Gene structure and properties of enzymes of the plasmid-encoded nicotine catabolism of *Arthrobacter nicotinovorans* [ J ]. *J Mol Biol*, 1998, 284(5): 1323.
- [ 26 ] Sachelaru P, Schiltz E, Igloi G L, et al. An  $\alpha/\beta$ -fold C-C bond hydrolase is involved in a central step of nicotine catabolism by *Arthrobacter nicotinovorans* [ J ]. *J Bacteriol*, 2005, 187(24): 8516.
- [ 27 ] Dunn G, Montgomery M G, Mohammed F, et al. The structure of the C-C bond hydrolase MhpC provides insights into its catalytic mechanism [ J ]. *J Mol Biol*, 2005, 346(1): 253.
- [ 28 ] Treiber N, Schulz G E. Structure of 2,6-dihydroxypyridine 3-hydroxylase from a nicotine-degrading pathway [ J ]. *J Mol Biol*, 2008, 379(1): 94.
- [ 29 ] Meskys R, Harris R J, Casaite V. Organization of the genes involved in dimethylglycine and sarcosine degradation in *Arthrobacter spp*: implications for glycine betaine catabolism [ J ]. *Eur J Biochem*, 2001, 268(12): 3390.
- [ 30 ] Chiribau C B, Sandu C, Fraaije M, et al. A novel  $\gamma$ -N-methylaminobutyrate demethylating oxidase involved in catabolism of the tobacco alkaloid nicotine by *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1 [ J ]. *Eur J Biochem*, 2004, 271(31): 4677.
- [ 31 ] 张彦东, 罗昌荣, 王辉龙, 等. 微生物降解烟碱研究应用进展 [ J ]. *烟草科技*, 2003(12): 3.
- [ 32 ] Richard P, Newton, Vernon L, et al. Lowering the nicotine content of tobacco by microbial treatment *Gre*, 2634186, [ P ]. 1977-03-08.
- [ 33 ] 马林, 武怡, 曾晓鹰, 等. 降解尼古丁微生物的筛选及其在烟草中的应用 [ J ]. *烟草科技*, 2005(9): 6.
- [ 34 ] 李梅云, 雷丽萍, 郭荣君, 等. 微生物对烤烟叶片烟碱含量的影响 [ J ]. *中国农学通报*, 2006, 22(9): 94.
- [ 35 ] 雷丽萍, 夏振远, 郭荣君, 等. 节杆菌对烟叶的降烟碱作用 [ J ]. *烟草科技*, 2006(3): 56.