

节杆菌 Z3 粗酶液降解白肋烟烟碱条件优化

张文龙^{1,2}, 张相辉³, 寇霄腾¹, 王广超¹, 帖金鑫¹, 马林¹

(1. 郑州轻工业学院 食品与生物工程学院, 河南 郑州 450001;

2. 吉林烟草工业有限责任公司, 吉林 延吉 133000;

3. 黑龙江烟草工业有限公司, 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要:以节杆菌 Z3 (*Arthrobacter* Z3) 为产酶菌株, 通过正交实验, 对烟碱脱氢酶降解白肋烟烟碱条件进行了研究. 实验结果表明, 最佳发酵条件为: 酶液添加量 50%, 发酵温度 33 °C, 发酵时间 9 h, 烟丝含水率 70%. 此条件下烟碱降解率为 49.32%, 使白肋烟烟碱含量达到了烤烟水平. 这表明, 粗酶液能显著降低白肋烟中的烟碱.

关键词:白肋烟; 烟碱降解; 发酵条件; 节杆菌 Z3

中图分类号:TS44⁺4 **文献标志码:**A **DOI:**10.3969/j.issn.2095-476X.2013.03.005

Conditions optimization of *Arthrobacter* Z3 crude enzyme solution degradate nicotine in the Burley tobacco

ZHANG Weng-long^{1,2}, ZHANG Xiang-hui³, KOU Xiao-teng¹,

WANG Guang-chao¹, TIE Jin-xin¹, MA Lin¹

(1. College of Food and Bioengineering Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;

2. Jilin Tobacco Industry Co., Ltd., Yanji 133000, China;

3. Heilongjiang Tobacco Industry Co., Ltd., Harbin 150001, China)

Abstract: Using the *Arthrobacter* Z3 as enzyme production strains, the conditions of nicotine dehydrogenase degradation Burley nicotine was studied by orthogonal experiment. The results showed that the best fermentation conditions were: 50% of the added amount of the enzyme solution, fermentation temperature 33 °C, fermentation time 9 h, tobacco shreds moisture content 70%. Under these conditions nicotine degradation rate was 49.32% and Burley nicotine content reached the same level of flue-cured tobacco. The crude enzyme fluid can significantly reduce nicotine in Burley tobacco.

Key words: Burley tobacco; nicotine degradation; fermentation condition; *Arthrobacter* Z3

0 引言

国产白肋烟烟碱含量高、劲头大, 上部烟表现

尤为明显, 这给白肋烟在中式卷烟中的应用带来了很大困难. 近年来, 国内外开展了应用微生物及其酶降解烟草中烟碱的相关研究. R. Gutierrez 等^[1]从

收稿日期: 2013-01-31

作者简介: 张文龙(1984—), 男, 河南省许昌市人, 郑州轻工业学院硕士, 吉林烟草工业有限责任公司助理工程师, 主要研究方向为烟草工艺.

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工业生物技术和卷烟工艺.

干烟叶表面分离出一种能够降解烟碱的菌株,经鉴定为阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*) E-150。在含烟碱(<5 g/L)的培养基中(34 ℃, pH=7 条件下)进行发酵的过程中,该菌降解烟碱的能力得到诱导。A. Tashiro 等^[2]从 44 个含有烟碱的土壤和废水中获得了 57 种细菌,这些菌在 2 周内能降解浓度为 1.0×10^{-3} g/mL 的烟碱。F. Mesnard 等^[3]在 *Nicotiana plumbaginifolia* 细胞悬浮培养液中加入等量(R)-烟碱和(S)-烟碱,发现前者比后者降解更迅速。王革等^[4]从烟叶上分离获得了 3 株降解烟碱和蛋白质能力较强的菌株。马林等^[5]已经成功将尼古丁脱氢酶基因(ndh)构建到 PET-17B 质粒载体中,并在大肠杆菌中实现高活性表达,该工程菌产酶能力是野生菌的 25 倍,这为开展工业化使用尼古丁脱氢酶降解尼古丁提供了可能。本文拟对节杆菌 Z3 粗酶液降解白肋烟烟碱条件进行优化,旨在提高白肋烟在卷烟叶组配方中的有效利用。

1 实验

1.1 材料与设备

节杆菌 Z3 菌株,郑州轻工业学院烟草工业生物技术重点实验室分离;白肋烟原料,黑龙江卷烟厂提供;CaCl₂·2H₂O, K₂HPO₄·3H₂O, (NH₄)₂SO₄, MnSO₄·H₂O, MgSO₄·7H₂O, KH₂PO₄ 等(AR),天津大茂化学试剂厂产;牛肉膏、琼脂粉、蛋白胨等(生化试剂),北京奥博星生物技术责任有限公司产;豆粉(食品级),完达山乳业股份有限公司产。

SW-CJ-1FD 净化工作台,苏州净化设备有限公司产;LDZX-30KBS 型立式压力蒸汽灭菌器,上海申安医疗器械厂产;GL-22M 型高速冷冻离心机,赛特湘仪离心机仪器有限公司产;HZQ-F160 型全温振荡培养箱,太仓市实验设备厂产;JY92-2 型超声波细胞破碎机,宁波新芝科器研究所产;T6 新世纪型紫外可见分光光度计,北京普析仪器有限公司产;感量 0.000 1 g 分析天平,北京赛多利斯天平有限公司产;直径 1 cm 石英比色皿。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基配制^[6] 活化培养基:牛肉膏 5 g,琼脂粉 20 g,蛋白胨 10 g, NaCl 5 g,用蒸馏水定容至 1 L, pH 值为 7.2~7.4, 0.1 MPa, 121 ℃ 灭菌 25 min。

斜面培养基:营养肉汤 18 g(牛肉膏 5 g,蛋白胨

10 g,氯化钠 5 g),琼脂粉 20 g,烟碱 2 mL,调节 pH=7.0, 121 ℃ 灭菌 20 min。

液体发酵培养基: K₂HPO₄·3H₂O 1.3 g, (NH₄)₂SO₄ 0.1 g, KH₂PO₄ 0.4 g, 酵母粉 0.1 g, 烟碱 0.4 g, 微量元素 1 mL(2 g MgSO₄·7H₂O, 0.4 g MnSO₄·H₂O, 0.2 g CaCl₂·2H₂O, 用 0.1 mol/L HCl 溶解并定容至 100 mL),用蒸馏水定容至 100 mL, 摇匀,调节 pH=7.0, 0.1 MPa, 121 ℃ 灭菌 25 min。

1.2.2 粗酶液提取 斜面培养基接入液体种子培养基活化后,将新鲜培养的种子液以 6% 的接种量接入发酵培养基中, 30 ℃, 220 r/min 振荡培养 9 h。培养结束后,发酵液于 4 ℃, 8 500 r/min 冷冻离心 18 min, pH=6.85 的磷酸盐缓冲液清洗 3 次,离心得菌体细胞沉淀, 4 ℃ 保存备用。

1 000 mL 上述所得细胞加 120 mL K₂HPO₄-KH₂PO₄ 缓冲液(50 mmol/L, pH=6.85)超声波破碎,超声波条件为功率 45%, 超声 5 s, 间歇 8 s, 总时间 120 s。在 4 ℃, 8 500 r/min 条件下冷冻离心 18 min, 上清液即为粗酶液。

1.2.3 烟末制备方法 在 80 ℃ 条件下对发酵过的烟丝进行烘烤除酶,将除酶后的烟丝粉碎,过 40 目筛,取筛网下部分。

1.2.4 白肋烟烟丝烟碱含量的测定 烟碱测定采用紫外分光光度法^[7]。

2 结果与讨论

2.1 不同粗酶液添加量对白肋烟烟碱降解的影响

粗酶液添加量(以烟丝质量计)分别为:30%, 40%, 50%, 60%, 70% 对白肋烟烟丝进行发酵,测量其烟碱降解率,结果如图 1 所示。

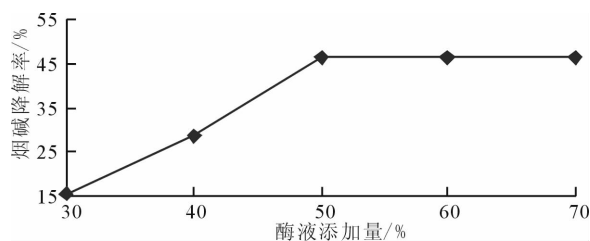


图 1 不同酶液添加量白肋烟烟碱的降解率

由图 1 可以看出,酶液添加量达到 50% 时,白肋烟烟碱降解率为 46.51%, 50% 以后基本稳定,烟碱降解率提高较少,出于成本考虑,取 50% 份为较优单因素酶液添加量。

2.2 不同发酵时间对白肋烟烟碱降解的影响

分别在3 h,6 h,9 h,12 h,18 h的发酵时间下对白肋烟烟丝进行发酵,测量其烟碱降解率,结果如图2所示。

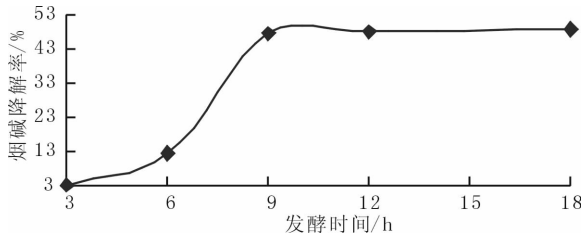


图2 不同发酵时间的白肋烟烟碱降解率

由图2可以看出,用节杆菌Z3对白肋烟进行发酵达到12 h时,烟碱降解率为48.30%,12 h以后烟碱降解得很少.从各方面考虑,发酵时间12 h为较优单因素发酵时间。

2.3 不同发酵温度对白肋烟烟碱降解的影响

分别在27℃,30℃,33℃,36℃,39℃条件下,对白肋烟烟丝进行发酵,测量其烟碱降解率,结果如图3所示。

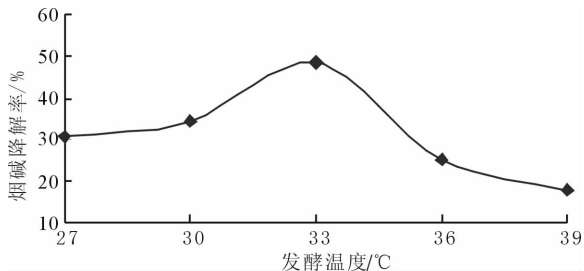


图3 不同发酵温度白肋烟烟碱的降解率

由3可以看出,33℃是最好的发酵温度,白肋烟烟碱降解率为48.62%,温度过低或过高都会导致烟碱脱氢酶失活,从而影响烟碱降解.因此33℃为较优单因素发酵温度。

2.4 烟丝水分对白肋烟烟碱降解的影响

分别在20%,30%,40%,50%,60%,70%的烟丝水分下,对白肋烟进行发酵处理,测量其烟碱降解率,结果如图4所示。

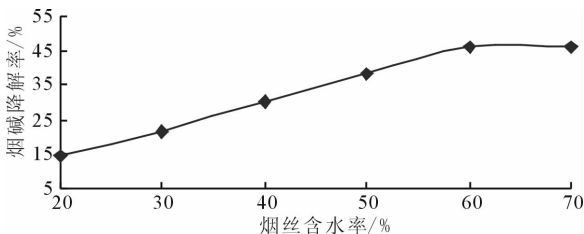


图4 烟丝不同水分条件下白肋烟烟碱的降解率

由图4可以看出,烟碱降解率随着烟丝含水率的增加而增加,造成这种现象的原因可能是,水分越大,烟碱脱氢酶越容易对烟碱发生作用:当烟丝含水率达到70%时,白肋烟烟碱降解率为46.1%;烟丝含水率达到70%以后,白肋烟烟碱降解率基本稳定.烟丝含水率过高会影响烟丝的质量,因此选烟丝含水率70%为较优单因素。

2.5 发酵条件各因素优化正交实验

根据不同酶液添加量(A)、不同发酵时间(B)、不同温度(C)和不同烟丝含水率(D)对白肋烟烟碱降解率的影响,进一步确定白肋烟烟碱降解率的最优条件.选用 $L_9(3^4)$ 正交设计方案对各因素的实施水平进行实验,结果见表1,正交实验方差分析见表2。

表1 *Arthrobacter* sp. 发酵条件优化正交实验结果

实验序号	A/%	B/h	C/℃	D/%	烟碱降解率/%
1	40	9	30	50	30.41
2	40	12	33	60	28.65
3	40	18	36	70	25.11
4	50	9	33	70	49.32
5	50	12	36	50	33.75
6	50	18	30	60	45.11
7	60	9	36	60	36.65
8	60	12	30	70	40.06
9	60	18	33	50	42.51
K_1	28.057	38.793	38.527	35.557	
K_2	42.393	34.153	39.827	36.470	
K_3	39.407	37.557	31.503	37.830	
R	14.336	4.640	8.324	2.273	
较优水平	A_2	B_1	C_2	D_3	

由表1和表2可知,各因素较优组合为 $A_2B_1C_2D_3$,此条件下降解率达49.32%,即酶液添加量为50%,发酵时间9 h,发酵温度33℃,烟丝含水率为70%.方差分析表明酶液添加量对烟碱降解率影响较大,达到显著水平。

表2 *Arthrobacter* sp. 发酵条件优化正交实验方差分析

方差来源	偏差平方和	自由度	F比
A	422.023	2	20.327*
B	20.762	2	1.000
C	99.468	2	4.791
D	20.718	2	0.998
误差	20.720	2	

2.6 对不同等级白肋烟进行发酵

按 2.5 优化条件对白肋烟鹤峰 B₃F, C₃F, 阿根廷 C₁, 恩施 C₂F 烟丝进行发酵处理, 测其烟碱降解情况, 结果见表 3.

表 3 优化发酵条件下不同品种白肋烟烟碱降解率

产地	等级	烟碱初始含量/%	烟碱降解率/%
湖北鹤峰	B ₃ F	4.2	47.36
湖北鹤峰	C ₃ F	3.1	48.03
阿根廷	C ₁	3.3	47.44
湖北恩施	C ₂ F	3.5	47.83

由表 3 可以看出, 白肋烟烟碱降解率最高达到 48.03%, 使白肋烟烟碱含量达到了烤烟水平, 说明烟碱脱氢酶对白肋烟的烟碱有良好的降解效果.

3 结论

以节杆菌 Z3 (*Arthrobacter* Z3) 为产酶菌株, 通过正交实验, 对烟碱脱氢酶降解白肋烟烟碱条件进行研究, 应用烟碱脱氢酶降解白肋烟烟碱的最佳条件为: 酶液添加量为 50%, 发酵温度 33 ℃, 发酵时间为 9 h, 烟丝含水率 70%, 烟碱降解率高达 49.32%. 本实验表明, 烟碱脱氢酶对白肋烟烟碱的降解效果明显, 改变了白肋烟烟碱含量高、劲头大、

难以在中式卷烟中应用在的特点, 为白肋烟在中式卷烟中更好地应用提供了参考.

参考文献:

- [1] Gutierrez R. Nicotine degradation by bacteria *Enterobacter cloacae* as nicotine Degradation (Spain) [J]. *Anales de Instituto Nacional Investigaciones Agrarias Serie Agricola*, 1983, 22:85.
- [2] Tashiro A, Yuji K, Yonemura C, et al. Pure isolation of nicotine-degradin microbes [J]. *Kyushu Kyoritsu Daigaku Kenkyu Hokoku Kogakubu*, 1996, 20:147.
- [3] Mesnard F, Girard S, Fliniaux O, et al. Chiral specificity of the degradation of nicotine by *Nicotiana glauca* cell suspension cultures [J]. *Plant Science*, 2001, 161:1011.
- [4] 王革, 王颖琦, 李松, 等. 微生物发酵烟叶降解尼古丁、蛋白质 [J]. *烟草科学研究*, 2001 (2):66.
- [5] 马林, 曾晓鹰, 张峻松, 等. 烟碱脱氢酶基因的原核表达及酶学特性研究 [J]. *中国烟草学报*, 2007, 13 (4):60.
- [6] 马林, 张峻松, 张文龙, 等. 产烟碱脱氢酶菌株节杆菌 Z3 的发酵条件研究 [J]. *烟草科技*, 2007, 51 (10):60.
- [7] 闫克玉. *烟草化学* [M]. 郑州: 郑州大学出版社, 2002:114.