

李俊刚,姜立春,马家俊. 高效烟碱降解菌 A4 发酵条件优化[J]. 江苏农业科学,2016,44(5):431-434.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.05.124

高效烟碱降解菌 A4 发酵条件优化

李俊刚,姜立春,马家俊

(绵阳师范学院生命科学与技术学院,四川绵阳 621006)

摘要:为了提高烟碱降解菌 A4 降解烟碱的能力,采用单因素试验和正交试验法对菌株 A4 发酵条件进行了优化。结果表明,通过单因素试验确定了影响菌株 A4 生长的培养基主要因素为 pH 值、烟碱含量、碳源、氮源;采用 4 个因素 3 个水平进行正交分析,确定了发酵的最佳条件为:在培养温度为 30 ℃、pH 值 7.0、烟碱含量 2.0 g/L、接种量 5.0%、柠檬酸三钠 0.3%、胰蛋白胍 1.5% 条件下,培养 48 h,其烟碱降解率为 72.8% 比优化前提高了 22.5%。结果为采用生物技术降解烟碱废弃物以及改善烟叶品质方面提供了良好的菌种资源。

关键词:烟碱;烟碱降解菌;生物降解;条件优化;正交试验

中图分类号:TS41*4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)05-0431-04

烟碱(nicotine)又名尼古丁,是烟草生物碱的主要成分,占烟草生物碱的 95% 以上,是影响烟叶品质的重要因素之一^[1-2]。一般来讲,烟碱含量高的烟叶,烟劲头大,反之则小。烟碱含量较高的烟叶可利用性比较差,传统物理和化学方法降解烟碱不仅会影响环境,甚至对人类造成危害。利用微生物降解烟碱含量不仅高效,而且具有一定的选择性,可用于降解烟草中烟碱和环境中被烟碱污染的废弃物,对香烟品质不会产生不利的影响,并满足消费群体对低烟碱卷烟的需求^[3-6]。

目前,国内外已有报道筛选分离出一些烟碱降解菌株^[7-8],这些微生物可以在烟草工业和处理烟草废弃物中发

挥重要作用。Tashiro 等从 44 个含有烟碱的土壤和废水取样中获得 57 种细菌,这些细菌都呈短棒状,用烟碱作为唯一碳氮源,在 2 周内能降解浓度为 1.0 g/L 的烟碱^[9]。孔雯等从湖北省襄阳市烟草种植地中分离得到 1 株烟碱降解菌,初步确定为烟碱节杆菌属(*Arthrobacter* sp.),该菌在烟碱质量浓度为 4 g/L 的培养基中培养 48 h 后烟碱降解率达 71% 以上^[10]。2005 年,阮爱东等筛选出 1 株假单胞菌(*Pseudomonas* sp. HF-1),该菌在培养基中培养 25 h,烟碱浓度为 1.3 g/L,测得烟碱降解率为 99.6%^[11]。袁勇军等从福建三明烟区的土壤中分离得到一种菌,经过鉴定属于为中间苍白杆菌,该菌 36 h 降解了 97.56% 的烟碱,当烟碱的浓度低于 2 g/L 时,菌株能完全降解烟碱^[12]。本研究从川渝中烟工业公司四川公司绵阳分厂的垃圾堆废弃烟渣中筛选后获得优良降解烟碱菌株 A4,研究了不同烟碱浓度和不同培养条件下该菌株对烟碱的降解能力,旨在为降低烟叶烟碱含量、提高烟叶可用性 etc 提供理论依据。

收稿日期:2015-04-17

基金项目:四川省教育厅项目(编号:12ZB258)。

作者简介:李俊刚(1964—),男,四川绵阳人,硕士,副教授,从事微生物资源及开发利用研究。E-mail:saientli@sina.com。

通信作者:姜立春,博士,副教授,从事应用微生物方面的研究。

E-mail:jiang_lichun@126.com。

[7] Busscher H J, Belt - Gritter B, Mei H C. Implications of microbial adhesion to hydrocarbons for evaluating cell surface hydrophobicity I. Zeta potentials of hydrocarbon droplets[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 1995, 5: 111 - 116.

[8] Li X Y, Yang S F. Influence of loosely bound extracellular polymeric substances (EPS) on the flocculation, sedimentation and dewaterability of activated sludge[J]. Water Research, 2007, 41 (5): 1022 - 1030.

[9] Gerhardt P, Murray R G E, Wood W A, et al. Methods for general and molecular bacteriology [M]. Washington D C: American Society for Microbiology, 1994.

[10] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72 (1): 248 - 254.

[11] Su K Z, Yu H Q. Formation and characterization of aerobic granules in a sequencing batch reactor treating[J]. Environmental Science & Technology, 2005, 39 (8): 2818 - 2827.

[12] Koehler J, Woetzel N, Staritzbichler R, et al. A unified hydropho-

bicity scale for multispin membrane proteins [J]. Proteins - Structure Function and Bioinformatics, 2009, 76 (1): 13 - 29.

[13] Liu X M, Sheng G P, Luo H W, et al. Contribution of extracellular polymeric substances (EPS) to the sludge aggregation [J]. Environmental Science Technology, 2010, 44 (11): 4355 - 4360.

[14] Li X Y, Yang S F. Influence of loosely bound extracellular polymeric substances (EPS) on the flocculation, sedimentation and dewaterability of activated sludge [J]. Water Research, 2007, 41 (5): 1022 - 1030.

[15] 朱睿, 吴敏, 杨健, 等. 浓缩污泥中胞外聚合物组分与脱水性的关系 [J]. 北京大学学报: 自然科学版, 2010, 46 (3): 385 - 388.

[16] Xie B, Gu J D, Lu J. Surface properties of bacteria from activated sludge in relation to bioflocculation [J]. Journal of Environmental Sciences - China, 2010, 22 (12): 1840 - 1845.

[17] Wang Z P, Liu L L, Yao H, et al. Effects of extracellular polymeric substances on aerobic granulation in sequencing batch reactors [J]. Chemosphere, 2006, 63 (10): 1728 - 1735.

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株 节杆菌属 A4 菌株,本课题组从川渝中烟工业公司四川公司绵阳分厂的垃圾堆废弃烟渣中筛选后获得的优良降解烟碱菌株,经形态鉴定、生理生化特性测定和 16S rRNA 系统分析,初步鉴定为节杆菌属,保存于绵阳师范学院微生物实验室。

1.1.2 烟碱培养基 K_2HPO_4 13.3 g, KH_2PO_4 4.0 g, 酵母提取物 1.0 g, 微量元素溶液 10 mL, 加蒸馏水至 1 000 mL, pH 值 7.0, 培养基经 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min 后, 加入一定量烟碱(用 0.22 μ m 滤膜过滤), 固体烟碱培养基添加 2.0% 琼脂^[4]。

1.1.3 微量元素溶液 $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4 g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.2 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g 使用 0.1 mol/L HCl 定容至 100 mL^[5]。

1.2 主要试剂与仪器

烟碱含量 $\geq 98\%$, 宜阳县天成生化有限责任公司; WFZ - UV - 2000 紫外分光光度仪, SC - 3610 低速离心机, KYC - 100C 恒温气浴式振荡器, Sanyo 高压蒸汽灭菌锅, YT - CJ - 1N 超净工作台等。

1.3 方 法

1.3.1 菌悬液的制备 接种 1 环 A4 菌到装有 10 mL 烟碱液体培养基的试管中, 于 28 °C 下 150 r/min 培养 48 h。再将这 2 mL 菌悬液接种到 100 mL 液体培养基中, 在相同条件下培养 48 h。

1.3.2 烟碱含量测定 将纯化菌株接入烟碱培养基中, 于 30 °C、150 r/min 摇床培养, 以未接菌的烟碱培养基为空白对照。发酵液于 8 000 r/min 离心 20 min, 上清液用 0.05 mol/L HCl 溶液稀释至合适的吸光度范围。以 0.05 mol/L HCl 溶液为参比, 进行全波长扫描, 测得烟碱最大吸收波长为 260 nm, 在此波长下计算烟碱降解率: 烟碱降解率 = (初始培养液中烟碱含量 - 发酵液中烟碱含量) / 初始培养液中烟碱含量 \times 100%。

1.3.3 单因素试验 对 A4 菌株初始 pH 值、培养时间、烟碱浓度、接种量、培养温度等发酵条件进行单因素优化。分别设置发酵培养基中 5、6、7、8、9 的不同初始 pH 值; 20、25、30、35、40 °C 的不同培养温度; 6、12、18、24、48、72 h 不同培养时间; 0.1、0.5、1.0、2.0、3.0 g/L 的不同烟碱浓度; 0.5%、1.0%、2.0%、3.0%、5.0%、8.0% 的不同接种量。120 r/min 摇床培养 48 h 后测定培养液中烟碱的吸光度, 测得不同单因素条件下的烟碱降解率, 每个因素设置 3 个平行, 取平均值。

1.3.4 不同培养基组分对菌株降解烟碱的影响 分别以含量为 2.0 g/L 的葡萄糖、蔗糖、柠檬酸三钠、乳糖、麦芽糖、可溶性淀粉等碳源添加培养基中, 用于筛选最适碳源^[13]; 分别以含量为 10 g/L 的胰蛋白胨、牛肉膏、酵母粉、硝酸铵、氯化铵等氮源添加培养基中, 用于筛选最适氮源。

1.3.5 正交试验 为确定最适合烟碱降解条件, 根据单因素试验结果, 选择对降解烟碱影响较大的 4 个因素, 即 A: pH 值; B: 烟碱浓度; C: 柠檬酸三钠; D: 胰蛋白胨, 设计了 4 个因素 3 个水平的正交试验 $L_9(3^4)$, 以烟碱降解率为指标进行试验(表 1), 确定复合因素对菌株 A4 降解烟碱的影响。

表 1 不同因素对烟碱降解率影响的正交试验设计

水平	因素			
	A: pH 值	B: 烟碱浓度 (g/L)	C: 柠檬酸三钠 (%)	D: 胰蛋白胨 (%)
1	6.5	1.5	0.1	0.5
2	7.0	2.0	0.2	1.0
3	7.5	2.5	0.3	1.5

2 结果与分析

2.1 烟碱标准曲线绘制

分别吸取烟碱质量浓度为 1.0 g/L 的工作液 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 mL, 用浓度为 0.05 mol/L 的盐酸溶液定容到 50 mL, 稀释至 0、0.002、0.004、0.006、0.008、0.010、0.012、0.014 mg/mL。用同浓度的盐酸溶液做参比, 在此波长下测量不同浓度烟碱的吸光度, 以烟碱浓度为横坐标, 吸光度为坐标轴绘制烟碱含量标准曲线(图 1)。吸光度(y)与烟碱含量(x)呈现良好的线性关系, 回归方程为 $y = 38.929x - 0.0082$, 相关系数 $r = 0.9993$ 。

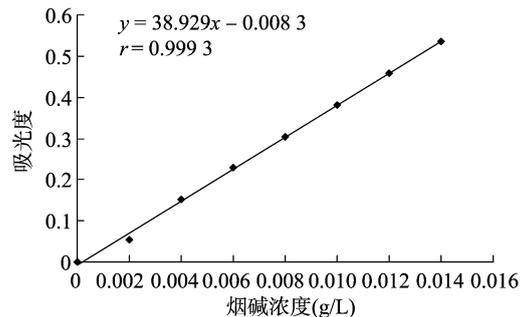


图 1 烟碱含量测定的标准曲线

2.2 单因素培养条件优化

2.2.1 不同 pH 值对菌株降解烟碱的影响 在初始 pH 值不同的条件下, 在 150 r/min、30 °C 下振荡培养 72 h, 试验结果见图 2。结果表明, 在 pH 值为 6.0~7.5 时, 菌株降解烟碱的效果比较好。当 pH 值为 7.0 时, 降解效果最好, 其降解率达 27.5%; 而 pH 值 < 6.0 或 > 8.0 时菌株降解烟碱的能力下降较快。通常认为培养基中的氢离子和氢氧根离子间接的对微生物产生影响, 起初作用于胞外可解离的弱酸或弱碱, 容易形成透过细胞膜的游离态进入胞内, 再作用于参与代谢的各种酶类, 从而影响菌体的生长和酶的合成, 进而影响菌株 A4 对烟碱的降解率^[14]。因此, 烟碱降解菌 A4 的最适降解 pH 值为 7.0。

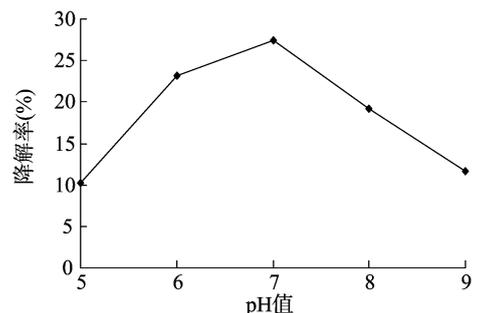


图 2 pH 值对 A4 菌降解烟碱的影响

2.2.2 不同培养时间对菌株降解烟碱的影响 在培养时间不同的条件下,在 150 r/min、pH 值为 7.0、温度为 30 ℃ 条件下振荡培养 72 h,每隔 6 h 取样测烟碱浓度 1 次,试验结果见图 3。结果表明,烟碱浓度随菌株培养时间的延长而降低,其降解率逐渐升高;在 48 h 时,培养液中烟碱浓度仅为 1.27 g/L,其降解率达 36.5%,此后随着培养时间的延长,其烟碱降解率变化不大。因此,选择 48 h 为菌株最适培养时间。

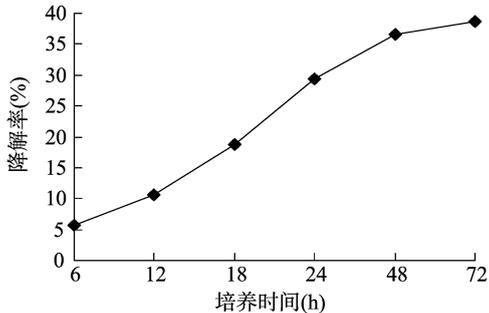


图3 培养时间对 A4 菌降解烟碱的影响

2.2.3 不同烟碱浓度对菌株降解烟碱的影响 在培养基中烟碱浓度不同的条件下,在 150 r/min、pH 值为 7.0、温度为 30 ℃ 条件下振荡培养 48 h,结果表明,当烟碱质量浓度为 0.1~2.0 g/L 时,随着浓度的升高,烟碱降解效率逐渐升高;在浓度为 2.0 g/L 时,其降解率最高,为 35.8%。当浓度高于 2.0 g/L 时,烟碱降解率迅速下降,当浓度达到 3.0 g/L 时,其降解率最低,为 13.3% (图 4),这可能由于高浓度烟碱对细胞具有毒害作用,抑制了其生长从而影响了烟碱的降解。因此,烟碱降解菌 A4 最适初始烟碱浓度为 2.0 g/L。

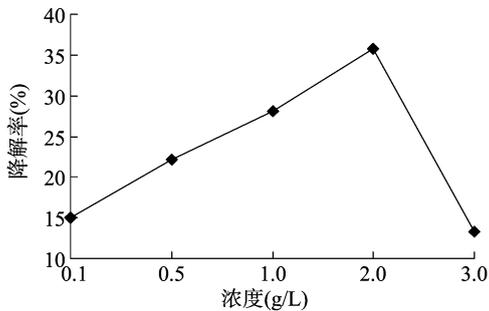


图4 烟碱浓度对 A4 菌降解烟碱的影响

2.2.4 不同接种量对菌株降解烟碱的影响 在培养基中接种量不同的条件下,在 150 r/min、pH 值为 7.0、温度为 30 ℃ 条件下振荡培养 48 h,结果表明,随着接种量的升高,其烟碱降解率也逐渐增高,当接入量为 0.5%~5.0% 时,随接入量的增加,降解率上升较快,但接入量高于 5.0% 时降解率趋于平稳 (图 5)。因此,选择 5.0% 作为最适接种量。

2.2.5 不同培养温度对菌株降解烟碱的影响 在培养基中培养温度不同的条件下,在 150 r/min、pH 值为 7.0、接种量为 5.0% 条件下振荡培养 48 h,结果表明,温度过低或过高对烟碱的降解都有较大影响,在温度为 25~35 ℃,菌株降解效果较好,在 30 ℃ 时降解率达到最高,为 54.2% (图 6)。因此,选择 30 ℃ 作为最适培养温度。

2.3 培养基成分优化

2.3.1 不同碳源对菌株降解烟碱的影响 在基础培养基中

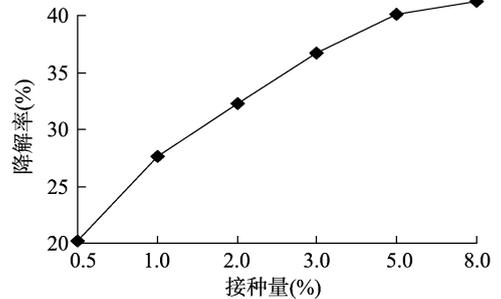


图5 不同接种量对 A4 菌降解烟碱的影响

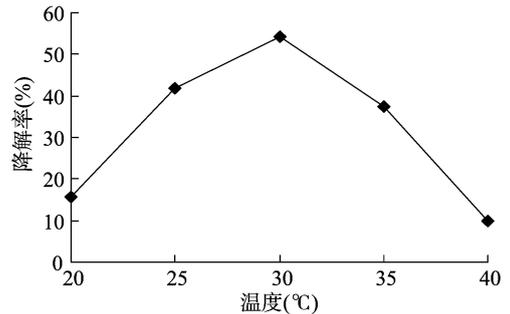


图6 不同温度对 A4 菌降解烟碱的影响

改用了不同碳源,考察不同碳源对菌株 A4 降解烟碱的影响,碳源是不可缺少的重要元素之一,不同的碳源会影响微生物的生长和降解酶的合成。从图 7 可以看出,A4 菌株降解率随着培养液中添加的碳源不同其降解率也随之改变。当培养液中添加柠檬酸三钠为碳源时,菌株的降解率最大,为 46.1%,且对烟碱降解影响较大。当培养液中分别添加乳糖、麦芽糖、蔗糖和淀粉作为碳源时,A4 菌株的降解率依次为 23.3%、30.2%、26.5% 和 26.3%,其中以葡萄糖作为碳源时的降解率最低,为 21.5%。因此,选择柠檬酸三钠作为最适碳源。

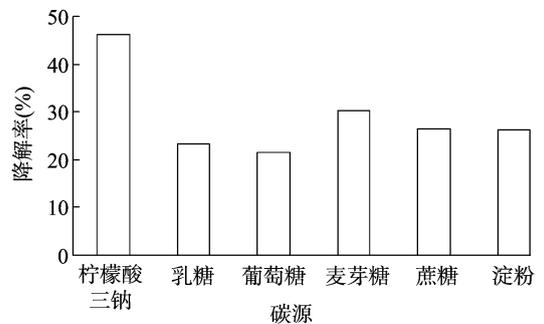


图7 不同碳源对烟碱降解菌降解烟碱的影响

2.3.2 不同氮源对菌株降解烟碱的影响 在基础培养基中改用了不同氮源,考察不同氮源对菌株 A4 降解烟碱的影响。从图 8 可以看出,A4 菌株降解率随着培养液中添加的氮源不同其降解率也随之改变。当培养液中添加胰蛋白胨作为氮源时,菌株的降解率最大,为 50.3%,当培养液中分别添加牛肉膏、酵母粉和氯化铵作为氮源时,A4 菌株的降解率依次为 40.3%、48.8%、31.2%,其中以硝酸铵作为氮源时的降解率最低,为 23.2%,表明该菌株不能很好地利用无机氮源。因此,选择胰蛋白胨作为最适碳源。

2.4 正交试验

为了更好地提高烟碱降解率,本研究选择了影响烟碱降

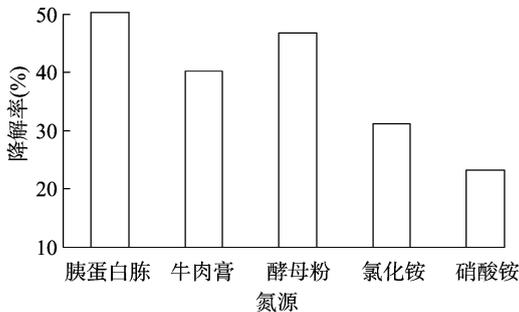


图8 不同氮源对烟碱降解菌降解烟碱的影响

解较大的4个因素,即pH值、烟碱浓度、柠檬酸三钠和胰蛋白胨含量,进行3个水平的正交试验,以进一步提高烟碱降解率。在不同条件下,以降解率为指标分析烟碱降解条件,结果见表2。由极值 R 值可知,不同因素对试验结果的影响依次为: $B > A > C > D$;从方差分析可看出,因素B的主效应很显著,即烟碱浓度对菌株降解效率有较大影响,其次是pH值和柠檬酸三钠,最后为胰蛋白胨(表3)。综合各种因素得出,4个因素正交试验降解烟碱适宜条件最优水平组合为 $A_2B_2C_3D_3$,即:pH值为7.0,烟碱浓度为2.0 g/L,柠檬酸三钠浓度为0.3%,胰蛋白胨含量为1.5%(表2)。

表2 不同因素对烟碱降解率影响的正交试验结果

试验号	A:pH值	B:烟碱浓度	C:柠檬酸三钠	D:胰蛋白胨	降解率(%)
1	1	1	1	1	48.5
2	1	2	2	2	52.6
3	1	3	3	3	28.3
4	2	1	2	3	58.1
5	2	2	3	1	72.3
6	2	3	1	2	36.8
7	3	1	3	2	50.3
8	3	2	1	3	60.1
9	3	3	2	1	25.6
k_1	39.8	49.0	45.1	45.5	
k_2	55.7	61.7	45.4	46.6	
k_3	45.3	30.2	50.3	48.8	
R	15.9	31.5	5.2	3.3	
最优水平	A_2	B_2	C_3	D_3	

表3 方差分析

变异来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
A	392.65	2	196.32	22.2	0.043*
B	150.028	2	75.014	84.8	0.012*
C	50.47	2	25.23	2.9	0.259
误差	17.68	2	8.84		

2.5 验证试验

为了验证试验结果的准确性,依据正交试验优化得到的最适培养基组成进行试验。3个平行试验结果表明,经过正交优化培养基后烟碱降解率为72.8%,比优化前50.3%提高了44.7%,可见优化后的培养基能明显提高菌株A4对烟碱的降解能力。

3 结论

通过以烟碱降解率为指标的单因素和正交试验,确定A4菌株的最优烟碱降解方案:即pH值7.0、接种量5.0%、柠檬酸三钠含量0.3%、胰蛋白胨含量1.5%、烟碱含量2.0 g/L,温度30℃、150 r/min摇床培养,以上述优化组合培养48 h后测定培养液中烟碱的吸光度,其烟碱降解率达到72.8%,同单因素培养条件下的降解率50.3%相比,提高了44.7%,优化后的组合有明显的降解优势。该试验结果表明,烟碱降解菌A4对烟碱具有较强的代谢降解能力,这将为利用生物技术降解烟碱废弃物和降低烟叶中烟碱含量提供良好的菌种资源。

参考文献:

- [1]周淑平,肖强,陈叶君,等.不同生态地区初烤烟叶中重要致香物质的分析[J].中国烟草学报,2004,10(1):9-16.
- [2]Davis D L, Nielsen M T.烟草——生产,化学和技术[M].北京:化学工业出版社,2003:7-11.
- [3]唐岭岭,刘惠民,李荣,等.固相微萃取/气相色谱/质谱法定性定量分析烟叶中香味物质的研究[J].中国烟草学报,2002,8(3):1-10.
- [4]Wang S N, Liu Z, Xu P. Biodegradation of nicotine by a newly isolated *Agrobacterium* sp. strain S33[J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 107(3): 838-847.
- [5]Treiber N, Schulz G E. Structure of 2, 6 - dihydroxypyridine 3 - hydroxylase from a nicotine - degrading pathway[J]. Journal of Molecular Biology, 2008, 379(1): 94-104.
- [6]Wang H H, Yin B, Peng X X, et al. Biodegradation of nicotine by newly isolated *Pseudomonas* sp. CS3 and its metabolites[J]. Journal of Applied Microbiology, 2012, 112(2): 258-268.
- [7]唐远驹,张建平.上海主要烤烟生产基地质量生态类型的初步划分[J].中国烟草科学,2006,27(3):1-5.
- [8]万虎,赵海刚,宋纪真,等.高浓度烟碱降解菌的筛选、鉴定及降解特性[J].烟草科技,2009(4):50-53,64.
- [9]Tashiro A, Yuji K, Yonemura C, et al. Pure isolation of nicotine - degrading microbes[J]. Kyushu Kyoritsu Daigaku Kenkyu Hokoku, 1996, 20: 147-155.
- [10]孔雯,先锋,李长影,等.1株烟碱降解菌的筛选、鉴定及其降解性能的初步研究[J].华中农业大学学报,2011,30(1):30-33.
- [11]Ruan A D, Min H, Peng X H, et al. Isolation and characterization of *Pseudomonas* sp. strain HF-1, capable of degrading nicotine[J]. Research in Microbiology, 2005, 156(5/6): 700-706.
- [12]袁勇军,陆兆新,黄丽金,等.烟碱降解细菌的分离、鉴定及其降解性能的初步研究[J].微生物学报,2005,45(2):181-184.
- [13]Yuan Y J, Lu Z X, Huang L J, et al. Biodegradation of nicotine from tobacco waste extract by *Ochrobactrum intermedium* DN2[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2007, 34(8): 567-570.
- [14]司静,崔宝凯,戴玉成.栓孔菌属漆酶高产菌株的初步筛选及其产酶条件的优化[J].微生物学通报,2011,38(3):405-416.