

菌株 DN2 对烟草薄片制备液中烟碱的降解

袁勇军^{1,2}, 陆兆新², 戚向阳¹

1 浙江万里学院生物与环境学院, 宁波 315100

2 南京农业大学食品科技学院, 南京 210095

摘要: 使用 *O. intermedium* DN2 降解烟草薄片制备液中的烟碱。研究了各种工艺参数对烟碱降解的影响, 单因素考察结果表明烟草薄片制备液中烟碱降解的最适条件是: 添加 0.1% 的酵母膏, 使用氨水将 pH 调节到 7.0, 接种 15% 种子液, 培养温度 30°C。在上述条件下, 采用 30L 发酵罐对烟草薄片制备液进行 3 个批次的半连续发酵, 烟碱的平均降解速率为 140.55 mg/L/h, 高于其他烟碱降解菌株。该结果表明菌株 DN2 可以用来降低烟草薄片中的烟碱含量。

关键词: 烟草薄片, *O. intermedium* DN2, 烟碱, 生物降解

Biodegradation of nicotine in tobacco extracts for making reconstituted tobacco by strain DN2

Yongjun Yuan^{1,2}, Zhaoxin Lu², and Xiangyang Qi¹

1 College of Biological & Environmental Science, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China

2 College of Food Science & Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: The purpose of the study is to use *O. intermedium* DN2 to degrade nicotine in tobacco extracts for making reconstituted tobacco. Firstly, we studied the effects of various factors on degradation of nicotine in the extracts by strain DN2. When we added 0.1% yeast extract into the extracts, adjusted its pH value to 7.0 by ammonia solution, inoculated 15% cultures and maintained fermentation temperature of 30°C, the degradation rate of nicotine by strain DN2 was the fastest. Furthermore, under these conditions, we studied the degradation rates of nicotine in three fed batches culture which carried out in a 30-L reactor, the result showed that the average degradation rate of nicotine by strain DN2 was 140.55 mg/L/h, which was much higher than that reported in other studies. These results indicated that strain DN2 may be useful for reducing nicotine content of reconstituted tobacco.

Keywords: reconstituted tobacco, *O. intermedium* DN2, nicotine, biodegradation

烟草薄片(Reconstituted tobacco), 是利用烟末、烟梗、碎烟片等烟草物质为原料制成片状或丝状的再生产品, 用作卷烟填充料^[1]。在卷烟中填加适量的烟草薄片, 既可以节省烟叶原料、降低卷烟成本, 也可以在一定程度上使卷烟的物理性能和化学成分按人们的意愿或要求得到调整和改善, 是减少和改善

烟草不良成分的一项重要技术措施^[2]。

烟碱含量过高制约烟草薄片的发展和应用^[3]。目前, 国外研究者已从环境中分离了多种烟碱降解菌, 对节杆菌属细菌代谢烟碱的机理研究较多^[4], 而应用研究较少^[5-9]; 国内在这方面的研究较晚, 主要集中在烟碱降解菌的分离^[10-14]、烟草废弃物^[15-17]

Received: February 1, 2009; Accepted: May 4, 2009

Corresponding author: Zhaoxin Lu. Tel: +86-25-84396583; Fax: +86-25-84396583; E-mail: fmb@njau.edu.cn

和上部烟叶^[12]中烟碱的降解等方面。实践证明,生物降解法是去除或减少烟草中烟碱的有效途径,目前尚未见采用微生物技术来降低烟草薄片烟碱的报道。

本课题组从种植烟草的土壤中分离到一株高效烟碱降解细菌 DN2^[10],初步报道了该菌在烟草薄片制备液中的应用情况^[18]。本研究利用菌株 DN2 对烟草薄片料液中的烟碱进行降解,研究各种工艺参数对烟碱降解的影响,为其工业化应用提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 主要材料

试验菌株:菌株 *O. intermedium* DN2,由南京农业大学食品科技学院微生物实验室分离并保藏。

烟草薄片制备液:由浙江杭州利群环保纸业业有限公司提供。其中初始烟碱含量为 2.07% (W/V),初始 pH 值为 4.61。

种子培养基(g/L):胰蛋白胨 11.34,牛肉膏 3.0, NaCl 5.0, MgSO₄·7H₂O 3.71。使用 2 mol/L HCl 或 4 mol/L NaOH 调整培养基 pH 值为 7.23。121°C 高压蒸汽灭菌 30 min。

1.2 方法

1.2.1 种子液的制备

从斜面上挑取一环菌体接入含 88 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中,32°C、120 r/min 摇床培养 36 h 的培养液作为种子液($OD_{600}=1.26$)。

1.2.2 菌悬液的制备

将上述种子液于 4°C、10 000 r/min 离心 10 min,弃上清,沉淀用等体积 0.01 mol/L PBS (pH 7.0)洗涤润洗 3 次,最后细胞重悬于上述磷酸缓冲盐中使 $OD_{600}=1.26$ 。

1.2.3 烟草薄片制备液的稀释

用蒸馏水按试验设计将烟草薄片制备液进行稀

释,最终补充如下成分作为发酵培养基并使其终浓度为(g/L): FeSO₄ 0.025, MgSO₄·7H₂O 0.25, KH₂PO₄ 2.0、酵母膏 1.0^[6]。除 pH 值调节方式实验外,其他实验均使用氨水(V/V, 1:3)将发酵培养基 pH 调至设定值后直接使用。

1.2.4 单因素实验条件

实验在盛有 100 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中进行,每 1 L 培养基中含 60 mL 烟草薄片制备液。除在文中说明外,实验条件为: pH 7.0,接入 15%的种子液,30 °C、120 r/min 摇床培养。

1.2.5 30 L 发酵罐半连续发酵试验

实验设计见表 1。将 15%种子液接入发酵培养基中, pH 7.0、30°C、120 r/min 搅拌培养,通气量为 0.25 v/v/min。待第 1 批次发酵基本结束,取出发酵液 6.17 L 后,立即添加 4.2 L 烟草薄片料液;待第 2 批次发酵基本结束,取出发酵液 5.57 L 后,立即添加 5.3 L 烟草薄片料液。定时取样测定相关指标。

1.2.6 分析方法

烟碱的测定:液相色谱法,参照文献[7]进行;还原糖的测定:DNS 方法,参照文献[8]进行;生物量的测定:取发酵样品 100 mL,3000 r/min 离心 10 min,去上清,沉淀用灭菌的蒸馏水润洗 2 次,在 80°C 的烘箱中烘干至衡重。

2 结果与讨论

2.1 pH 值调节方式对烟碱降解的影响

分别用 10 mol/L NaOH 和 NH₃-H₂O 溶液将发酵培养基 pH 值调节到 7.0 后用于生物降解试验(图 1)。由图 1 知,使用氨水调节 pH 时,烟碱的降解速度较快,且发酵液 pH 值保持在 7.13~7.17 之间,这有利于菌株 DN2 的生长和烟碱的降解;而使用 NaOH 调节 pH 时, pH 值从初始的 7.15 增加到 9.13,不利于菌体的生长,其变化的原因有待于进一步研究。在

表 1 30 L 发酵罐中三个批次烟碱降解的试验设计

Table 1 Experiment design for three fed-batches degradation of nicotine in 30 L reactor

Batches	TWE ^(a) (L)	Water(L)	Inoculum solution(L)	Removal of culture(L)	Total volume(L)
The 1st fed-batch(0-42 h)	3.0	16.2	3.0	0.00	22.20
The 2nd fed-batch(42-64 h)	4.2	0.0	0.0	6.17	20.23
The 3rd fed-batch (64-86 h)	5.3	0.0	0.0	5.57	19.96

(a): extracts for making reconstituted tobacco.

烟草薄片的生产过程中会添加氨水以促进某些香味物质的形成^[9], 因此, 使用氨水调节发酵培养基的 pH 值符合生产工艺。

研究发现, 将烟草薄片制备液稀释到烟碱浓度约在 500 mg/L 以下时, 使用磷酸缓冲盐能够将 pH 值稳定。为了考察氨水对烟碱的影响情况, 将烟草薄片制备液稀释(使用 0.5 mol/L PBS, pH 7.0)到烟碱含量约为 100 mg/L 时, 添加不同体积的氨水(1:3, V/V)(表 2)。由表 2 可知, 发酵培养基中含不同量的外加氨水, 对烟碱的降解速率没有影响($P>0.05$)。因此, 以后的试验均使用氨水调节 pH。

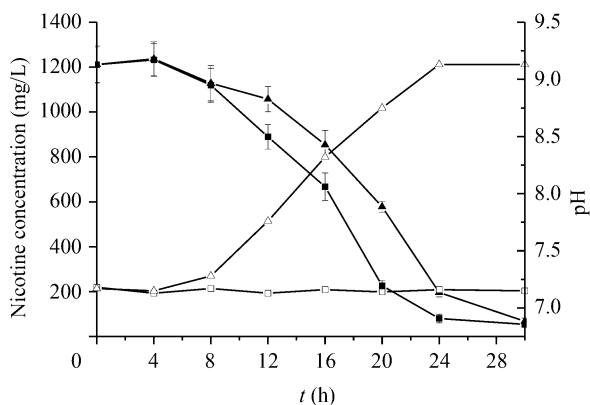


图 1 不同 pH 调节方式对烟碱降解的影响

Fig. 1 Effects of pH adjustment method on nicotine degradation.

▲ and ■, represent curve of nicotine biodegradation in fermentation medium adjusted by 10 mol/L NaOH or $\text{NH}_3\text{-H}_2\text{O}$, respectively; △ and □, represent curve of change of pH value during nicotine degradation in fermentation medium adjusted by 10 mol/L NaOH or $\text{NH}_3\text{-H}_2\text{O}$, respectively.

表 2 氨水对烟碱降解的影响

Table 2 Effect of added $\text{NH}_3\text{-H}_2\text{O}$ on nicotine degradation by strain DN2

Time (h)	Nicotine concentration(mg/L)		
	0% $\text{NH}_3\text{-H}_2\text{O}$	1% $\text{NH}_3\text{-H}_2\text{O}$	5% $\text{NH}_3\text{-H}_2\text{O}$
0	103.48±4.13 ^(b)	102.36±3.95	102.41±4.08
4	102.71±4.32	103.24±4.12	102.09±4.26
8	83.32±2.98	82.79±3.11	83.17±3.93
10	43.27±1.54	42.62±1.68	43.31±1.59
12	7.81±1.13	7.67±1.27	7.59±1.17

Note: (b), standard deviation ($n=3$).

2.2 接种方式对烟碱降解的影响

图 2 表示使用菌悬液和种子液 2 种接种方式对烟碱降解的影响(接种量均为 15%)。从图 2 可知, 采用菌悬液降解烟碱的速度略高于使用种子液, 但差

异不显著($P>0.05$)。使用种子液, 会减少离心工序和水的用量, 降低生产成本。因此, 以后的实验使用种子液作为接种方式。

2.3 酵母膏对烟碱降解的影响

图 3 表示酵母膏对烟碱降解的影响。由图 3 可知, 随着酵母膏浓度的增加, 烟碱的降解速度加快。但是当酵母膏浓度增加至 0.5% 时, 烟碱的降解速度反而降低。酵母膏是一种优良氮源, 含有微生物生长所需要的所有金属离子和微量营养元素。据报道, 利用烟碱作为生长基质, 在 0.50% 存在的情况下, *Arthrobacter oxidans* p-34 降解烟碱的速度明显增加^[10]; 而菌株 DSM 420 在 0.05% 酵母膏存在的情况下才能降解烟碱^[11]。本研究结果表明, 菌株 DN2 只有在添加酵母膏的情况下才能降解烟碱, 其最适浓度为 0.1%。

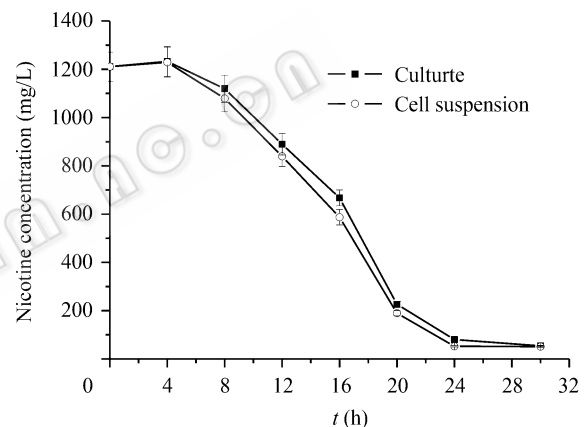


图 2 接种方式对烟碱降解的影响

Fig. 2 Effect of inoculation method on nicotine degradation by strain DN2.

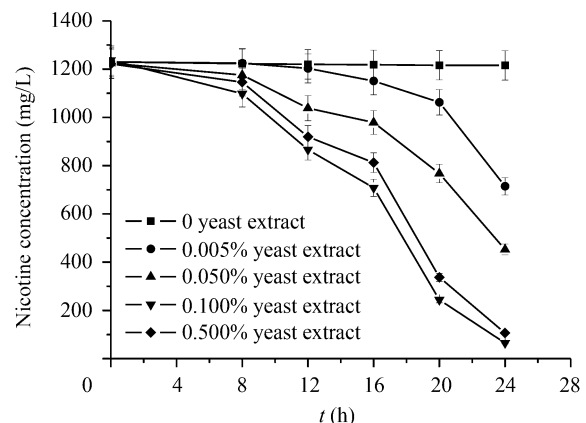


图 3 酵母膏对烟碱降解的影响

Fig. 3 Effect of yeast extract on nicotine degradation by strain DN2.

2.4 初始 pH 和温度对烟碱降解的影响

图 4 表示初始 pH 值对烟碱降解的影响。由图 4 可知, pH 值为 6~9 时, 烟碱均能降解; 而 pH 值为 5 时, 烟碱不发生降解。最适 pH 值为 7.0, 此时烟碱降解速率为 47.13 mg/L/h。

图 5 表示温度对烟碱降解的影响。由图 5 可知, 30°C 和 37°C 时, 烟碱的降解速率分别为 48.83 mg/L、48.29 mg/L; 而温度分别为 25°C 和 40°C 时, 烟碱的降解速度明显降低。因此, 烟碱降解的最适温度为 30°C。

2.5 不同稀释倍数对烟碱降解的影响

表 3 表示不同稀释倍数对烟碱降解的影响。从表 3 可知, 发酵培养基中烟碱含量为 3105 mg/L 时, 烟碱的降解速度最快; 而当烟碱浓度为 5175 mg/L 时, 底物作用抑制明显, 烟碱没有发生降解。

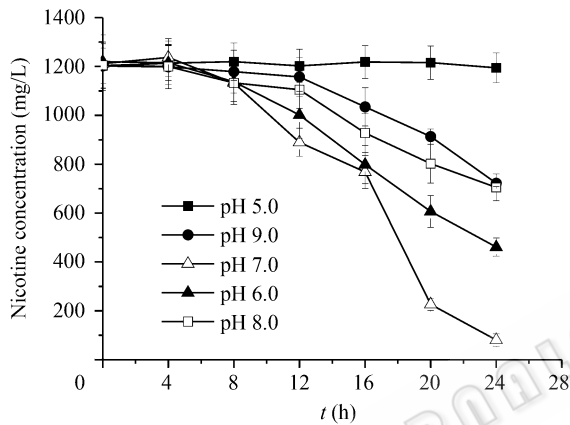


图 4 初始 pH 值对烟碱降解的影响
Fig. 4 Effect of initial pH values on nicotine degradation by strain DN2.

2.6 不同接种量对烟碱降解的影响

综合以上结果, 在 pH 7.0, 30°C, 酵母膏浓度为 0.1%, 烟碱浓度为 3105 mg/L 时, 菌株 DN2 降解烟碱的速率最快。在上述条件下, 考察不同接种量对

烟碱降解的影响(图 6)。从图 6 中可知, 随着接种量的增加, 烟碱的降解速率也随之增加。接种量为 15% 和 20% 时, 烟碱的降解速率分别为 64.04 mg/(L·h) 和 64.00 mg/(L·h), 差异不大。从节约成本考虑, 最适接种量为 15%。

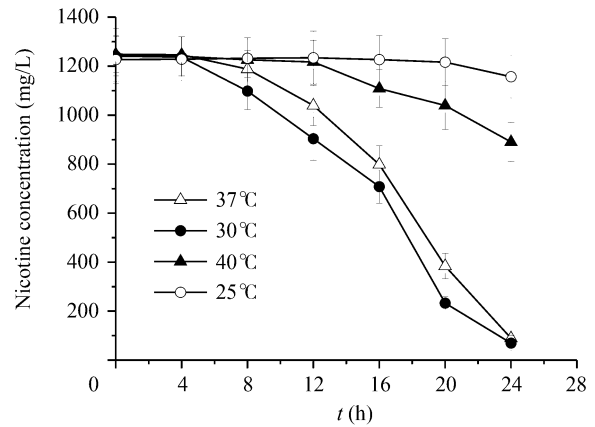


图 5 温度对烟碱降解的影响
Fig. 5 Effect of temperature on nicotine degradation by strain DN2.

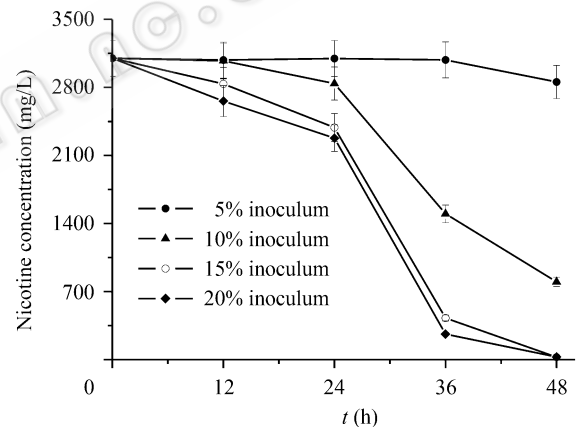


图 6 接种量对烟碱降解的影响
Fig. 6 Effect of inoculation level on nicotine degradation by strain DN2.

表 3 不同稀释倍数对烟碱降解的影响

Table 3 Effect of diluted times of TWE on nicotine degradation by strain DN2

Content of TWE per liter medium (mL)	Initial nicotine content (mg/L)	Final nicotine content (mg/L)	Needed time (h)	Rate of nicotine degradation [mg/(L · h)]
20	414	6.34	10	40.77
60	1242	53.24	24	49.53
100	2070	47.32	38	53.23
150	3105	59.37	46	66.21
200	4140	56.42	86	47.48
250	5175	5175.00	102	0.00

2.7 30 L 发酵罐半连续发酵

通过单因子试验, 确定菌 DN2 降解烟碱的最适条件: 料液稀释到烟碱浓度为 3100 mg/L, 酵母膏浓度为 0.1%, 使用氨水将 pH 调节到 7.0, 30°C、120 r/min 摇床培养。在上述条件下, 在 30 L 发酵罐中利用半连续发酵的方法对烟草薄片制备液中的烟碱进行降解。图 7 为在 30 L 发酵罐中 3 个批次烟碱降解的结果。从图 7 可知, 3 个批次的烟碱降解速率分别为 66.11、193.86、231.82 mg/(L·h), 高于其他烟碱降解菌株[其烟碱降解速率为 3.30~82.38 mg/(L·h)]^[12]。在整个发酵过程中, 62.35% 还原糖被菌株 DN2 利用, pH 保持在 7.19~7.32 之间, 发酵液中的菌体干重从 0.027 mg/L 增加至 1.89 mg/L。本结果表明, 采用半连续发酵来降解烟草薄片中的烟碱工艺是实用有效的。

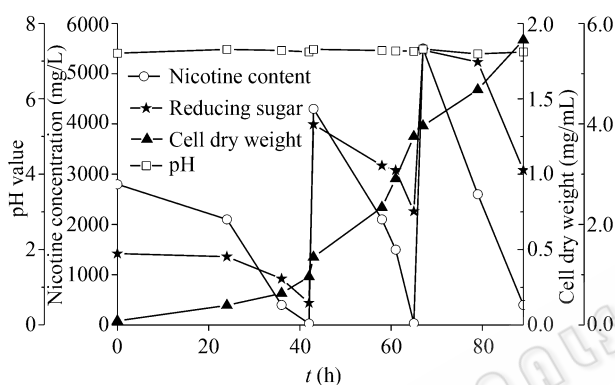


图 7 三个批次发酵液中烟碱的降解

Fig. 7 Fed-batch degradation of nicotine by strain DN2 in 30 L reactor.

致谢 本研究得益于安徽蚌埠卷烟厂技术中心总工程师徐迎波同志提供的思路。杭州利群环保纸业股份有限公司工程师郑勤安同志提供本研究所有的料液样品并测定了所有烟碱指标。在此一并致谢。

REFERENCES

- [1] National center for tobacco-free kids. Agriculture briefing paper 03: Lowering leaf content, boosting profits. <http://tobaccofreekids.org/campaign/global/pdf/ag3.pdf>.
- [2] Chen ZG, Cai B, Wang JX, *et al.* Comparison between domestic and foreign paper-process tobacco sheets. *Tobacco Sci Technol*, 2002, 2: 4-9.
陈祖刚, 蔡冰, 王建新, 等. 国内外造纸法薄片工艺与品质比较. *烟草科技*, 2002, 2: 4-9.
- [3] Zheng QA. Study of the application of microorganism quality-enhancer in manufacturing tobacco slice by papermaking process. *J Zhejiang Univ Technol*, 32(4): 442-446, 458.
- [4] 郑勤安. 造纸法再造烟叶生产过程中微生物增质剂的应用研究. *浙江工业大学学报*, 2004, 32(4): 442-446, 458.
- [5] Brandsch R. Microbiology and biochemistry of nicotine degradation. *App Microbiol Biotechnol*, 2006, 69(5): 493-498.
- [6] Meher KK, Panchwagh AM, Rangrass S, *et al.* Biomethanation of tobacco waste. *Environ Pollut*, 1995, 90(2): 199-202.
- [7] Civilini M, Domenis C, Sebastianutto N, *et al.* Nicotine decontamination agro-industrial waste and its degradation by microorganisms. *Waste Manage Res*, 1997, 15(4): 349-358.
- [8] Gravelly LE, Geiss VL, Gregory CF. Process for reduction of nitrate and nicotine content of tobacco by microbial treatment: US patent, 4557280. 1978-06-15.
- [9] Ireland MS, Larson TM, Moring TM. Nicotine transfer process: US patent, 4215706. 1980-08-05.
- [10] Lenkey AA. Nicotine removed process and product produced thereby: Mixing with alkaline agent in aerobic environment: US patent, 4848373. 1989-07-18.
- [11] Yuan YJ, Lu ZX, Huang LJ, *et al.* Isolation and identification of a strain DN2 degrading nicotine. *Acta Microbiol Sin*, 2005, 45(1): 181-184.
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. *微生物学报*, 2005, 45(1): 181-184.
- [12] Ruan AD, Ming H, Peng XH, *et al.* Isolation and characterization of *Pseudomonas* sp. strain HF-1, capable of degrading nicotine. *Res Microbiol*, 2005, 156(5/6): 700-706.
- [13] Li XM, Yang WZ, Zhu ML, *et al.* Screening and fermentation of nicotine-decomposing microorganisms and improving treatment of upper-tobacco leaves quality. *Indu Microbiol*, 2006, 36(1): 16-22.
李雪梅, 杨伟祖, 祝明亮, 等. 烟碱降解菌的选育及改善上部烟叶品质研究. *工业微生物*, 2006, 36(1): 16-22.
- [14] Chen CM, Li XM, Yang JK, *et al.* Isolation of nicotine-degrading bacterium *Pseudomonas* sp. Nic22, and its potential application in tobacco processing. *Int Biodeter Biodegr*, 2008, 62(3): 226-231.
- [15] Wei HL, Lei LP, Xia ZY, *et al.* Characterization of a novel aerobic nicotine-biodegrading strain of *Pseudomonas putida*. *Ann Microbiol*, 2008, 58(1): 41-45.
- [16] Wang SN, Xu P, Tang HZ, *et al.* Biodegradation and detoxification of nicotine in tobacco solid waste by a *Pseudomonas* sp. *Biotechnol Lett*, 2004, 26(19): 1493-1496.
- [17] Yuan YJ, Lu ZX, Huang LJ, *et al.* Optimization of a medium for enhancing nicotine biodegradation by *O. intermedium* DN2. *J Appl Microbiol*, 2006, 101(3): 69-697.
- [18] Luo YJ, Chen YR, Li XM, *et al.* Study on *Streptomyces*

- degradation of nicotine and chlorogenic acid in tobacco. *Acta Microbiol Sin*, 2007, **47**(6): 1095–1097.
- 骆跃军, 陈育如, 李雪梅, 等. 链霉菌对烟草中烟碱与绿原酸的降解作用研究. *微生物学报*, 2007, **47**(6): 1095–1097.
- [18] Yuan YJ, Lu ZX, Huang LJ, *et al.* Biodegradation of nicotine from tobacco waste extract by *O. intermedium* DN2. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2007, **34**(8): 567–570.
- [19] Sheng LQ, Ding L, Tong HW, *et al.* Determination of nicotine-related alkaloids in tobacco and cigarette smoke by GC-FID. *Chromatographia*, 2005, **62**(1/2): 63–68.
- [20] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*, 1959, **31**(6): 426–427.
- [21] Liu LQ, Wang YX. Advance on study of maillard-reaction in tobacco application. *Tobacco Sci Technol*, 2002, (2): 4–9.
- 刘立全, 王月霞. 梅拉德反应在烟草增香中的应用研究进展. *烟草科技*, 1994, (6): 21–24.
- [22] Hochstein LI, Dalton BP. The hydroxylation of nicotinic acid: The origin of the hydroxyl oxygen. *Biochem Biophys Res Commun*, 1965, **21**: 644–648.
- [23] Gloger M, Decker K. Zum mechanismus der induktion nicotinabbauender enzyme from *Arthrobacter oxydans*. *Z Naturfoschg*, 1969, **24**: 1016–1024.

科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

现代生命科学概论

焦炳华 主编 王梁华 黄才国 副主编

978-7-03-024429-1 ¥68.00 2009年5月出版

本书分三篇共20章,内容包括生命科学导论(生命科学的概念与研究内容、生命科学研究简史、生命科学研究热点与发展趋势、生命伦理学)、生命科学基础(生命的物质基础、生命的基本现象、生物的遗传与变异、生命的起源与进化、生物的多样性、生物与环境)和现代生命科学(生命科学与现代生物技术、生命科学与农业科学、生命科学与环境科学、生命科学与生物能源、生命科学与现代医学、生命科学与药物的研究与开发、生命科学与海洋生物资源、生命科学与军事生物技术、生物信息学与生物芯片、生命组学与系统生物学)。

本书可作为高等院校生物专业学生的教材,也可作为综合性大学、师范院校、农林院校及医学院校有关专业本科生、研究生及教师的参考用书。



昆虫行为学导论

秦玉川 主编

978-7-03-023894-8 ¥85.00 2009年5月出版

本书是从我国研究生教育的实际出发,按“洋为中用”的原则进行编写的,在编写中注意汲取先进国家的昆虫行为学教学与科研精华,同时也尽量搜集了国内与昆虫行为相关的素材。本书的出版有助于昆虫方向的研究生和相关人员系统地掌握昆虫行为知识,有助于在较深的层次上激发学生和读者对昆虫王国的探索精神。教材分为上、下两篇,共十六章,图文并茂。上篇为昆虫行为基础,介绍昆虫行为的基础知识,如昆虫行为发生的遗传、神经、生理、生态等机理;下篇为昆虫行为各论,从不同的领域或侧面介绍昆虫行为的表现、调控、应用,如昆虫的定向、移动、通讯、取食、繁殖、占区、社会生活等。各章分别附有本章中英名词术语对照和本章的实验设计(不包括第一章和第十六章)。

本书适用于高等院校和科研院所昆虫学方向研究生及高年级本科生,相关教学、科研人员及中学生物课教师等参考阅读。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址:北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编:100717

联系人:阮芯 联系电话:010-64034622(带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>