

链霉菌对烟草中烟碱与绿原酸的降解作用研究

骆跃军¹, 陈育如^{1*}, 李雪梅¹, 唐刚¹, 韦萍²

(¹ 江苏省资源生物技术重点实验室 南京师范大学生物工程重点实验室 南京 210097)

(² 南京工业大学制药与生命科学学院 南京 210009)

摘要: 为了研究对烟草中烟碱与绿原酸的快速生物降解, 筛选了能有效降解烟草中烟碱与绿原酸的链霉菌 Z6 菌株与 Z8 菌株, 考察了 Z6 和 Z8 菌株在不同培养基上的培养特征, 探讨了所选菌株对烟碱与绿原酸的降解特性。实验结果表明, Z8 链霉菌在烟草固体培养基中培养 48h 后, 对培养基中烟碱的降解率达到 83.9%, 培养 72h 后, 对烟碱的降解率可达到 93.7%, 此时烟草中的烟碱含量降低到 0.38mg/g, 达到了欧盟条例的无害化标准。Z6 菌对绿原酸的降解程度较高, 培养 48h 后, 对绿原酸的降解率为 57.1%, 培养 72h 后, 降解率可达到 67.5%。

关键词: 链霉菌; 烟草; 烟碱; 绿原酸; 生物降解

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)06-1095-03

卷烟工业中约有 22% ~ 30% 的残次烟草原料作为废料需处理, 这些烟草中含有大量的具有重要应用价值的物质如烟碱及绿原酸等, 在经有机溶剂等提取烟碱后, 仍有一定的烟碱残留在物料中^[1,2], 由于烟碱的剧毒性, 这些残留有烟碱的废料仍然需特殊处理以降低烟碱等含量。

以往关于烟碱的降解研究多限于从改善烟草内在品质的角度, 降解菌株一般使用细菌或酵母^[3-5]。Brown & Williamson 烟草公司利用假单胞杆菌(*Pseudomonas putid*)对烟草中的烟碱进行降解, 处理 18h 后发现烟碱含量平均从 2.00% 降到了 0.85%, 每支卷烟的烟碱含量从 1.58mg 降到了 0.98mg。Enders 等^[6]在利用酵母对烟碱的降解研究发现酵母不能完全降解烟碱。在使用假单胞杆菌时, 由于存在 pH 值降低的问题, 部分烟碱也不能完全降解^[7]。在针对大量废弃烟草物料中烟碱等的降解中, 最需要做的是如何使微生物直接对这些物料进行降解, 尽量缩短处理时间, 从而降低成本、提高效率。为此, 本工作在选育多种微生物^[8]和利用细菌降解烟碱的基础上^[9], 对利用链霉菌的烟碱降解进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 烟草废料(合作烟厂提供), Z6、Z8、Fg、F2、JB、F33 等放线菌菌株, 本实验室分离保存。菌株分离自放线菌丰富的土壤。其中 Z6 和 Z8 菌株经鉴定为链霉菌属(*Streptomyces*) 的黄色类群(*Flavus*) 和白孢类群(*Albosporus*) (另文发表)。

1.1.2 主要试剂和仪器: 烟碱(Nicotine)标准品: 99.0% (Sigma Co.) 绿原酸标准品(中国药品生物制品检定所); 乙醇、乙醚、丙酮、氯仿等均为国产分析纯试剂。2802S UV/VIS

SPECTROPHOTOMETER 分光光度计(尤尼柯-上海仪器有限公司); PYX-DHS-50X65-S 型隔水式电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂); FA1004 型电子分析天平(上海天平仪器厂); CA-1390-1 超净工作台(上海上净净化设备有限公司)。

1.1.3 试剂的配制: 0.05mol mL⁻¹ HCl (pH 5.0 柠檬酸-磷酸缓冲液); 甲基橙溶液: 1.6g 甲基橙用蒸馏水溶解定容到 100mL, 静置半天后过滤, 取滤液备用。

1.2 样品前处理

按照中国烟草行业标准 YC/T31-1996 测定样品含水率。以 40% 乙醇作为浸提剂(料液比 1:9), 经微波处理 90 秒提取烟碱和绿原酸, 浸提后样品中的残留的烟碱和绿原酸量经测定分别为 6.04mg/g 和 10.57mg/g。

1.3 菌株的培养和降解实验

经 40% 乙醇浸提后过滤的烟草晾干, 使乙醇完全挥发。取晾干后的物料根据需要加入适量的水至含水量达到 60%, 100kPa 灭菌, 分别将放线菌 Z6、Fg、F2、JB、Z8、F33 孢子接入, 28℃ 培养, 定时取样测定。

接入(1%) 的放线菌菌剂到烟草培养基中, 28℃ 培养后定时取样测定烟碱与绿原酸含量。

1.4 测定方法

烟碱测定采用甲基橙显色法^[10], 使用改进的侧臂瓶进行^[11]。

绿原酸测定采用紫外分光光度法^[12]。

2 结果和讨论

2.1 放线菌在烟草培养基中的生长状况

在烟草培养基中接入各菌株孢子后, 培养基中菌体生长情况显示(表 1), 60h 后, 接有 Z6、F2、JB、Z8、F33 菌种的物料

基金项目: 国家 973 项目(2003CB716004); 江苏省高技术研究重大项目(BG2007049)

* 通讯作者。Tel: 86-25-85424367; Fax: 86-25-83598250; E-mail: chenyruru@njnu.edu.cn

作者简介: 骆跃军(1981-), 男, 江西于都人, 硕士研究生, 主要从事微生物的学习与研究。

收稿日期: 2007-03-22; 接受日期: 2007-06-13; 修回日期: 2007-07-14

上布有部分菌丝,说明这几株菌能较快地适应烟草培养基的环境。128h后这几株菌株的菌丝布满整个物料,说明这几株菌在实验条件能利用培养基中的养分,生长充分的物料作为进一步实验的菌剂。所用菌株中,F_g菌株生长较慢,培养128h后在培养基中仍只能见到部分菌丝。

表1 放线菌在烟草培养基中的生长

Table 1 Growth state of *actinomycetes* in tobacco media

kinds of <i>actinomycetes</i>	Z6	F _g	F2	JB	Z8	F33
60h	+	-	+	+	+	+
128h	+++	++	++++	++++	++++	++++

- :No hypha; + :Sporadic hypha; ++ :A spot of hypha; +++ :Bestride hypha.

表2 Z6菌株和Z8菌株在不同培养基上的培养特征

Table 2 Characteristics of Z6 strain and Z8 strain on different culture media

Culture media	Z6 strain			Z8 strain		
	Aerial mycelium	Substrate mycelium	Soluble pigment	Aerial mycelium	Substrate mycelium	Soluble pigment
Gause's Medium	Mussel white or eggshell yellow	Mustard	Nothing	Milky white	Cream yellow or tan	Nothing
Czapek's Medium	Wheat straw Yellow	Almond yellow	Nothing	Cream yellow	Ivory yellow	Nothing
Tyrosine Medium	Mussel white or eggshell yellow	Grey yellow	Nothing	Milky white	Light yellow	Nothing
PDA Medium	Mussel white	Light yellow	Nothing	Cream yellow	Sand yellow	Nothing

2.3 烟碱和绿原酸的测定

称取一定量接入菌剂后培养后的物料,测定其中的烟碱与绿原酸含量,结果显示(图1)所用菌株对烟草中的烟碱和绿原酸都有一定的降解能力。其中Z8菌株对烟碱的降解效果最为显著,降解量为5.66mg/g,降解率达93.7%。此时,废烟草中剩余的烟碱量为0.38mg/g,已经达到了欧盟条例所规定的无害化标准[500mg/(kg·d·w)]^[13],这说明Z8菌株不仅对烟碱有良好的耐受性,并能在实验周期内将烟草中的烟碱大部分降解,从而使高含量烟碱的烟草由有毒废弃物变成一般废弃物。

实验菌株中,以Z6菌株对绿原酸的降解效果最好,与降解前烟草中绿原酸含量相比,降解量为7.12mg,降解率为67.3%,同时该菌株对烟碱也有较强的降解能力。

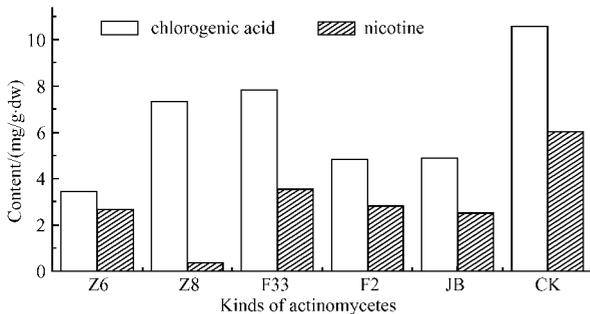


图1 不同放线菌对烟碱和绿原酸的降解

Fig. 1 Comparison of degrading nicotine and chlorogenic acid of different *actinomycetes* (72h)

2.4 Z8和Z6菌剂对烟碱与绿原酸的降解特性

为进一步研究放线菌菌剂对烟碱与绿原酸的降解特性,实验使用Z8菌株,考察培养基中烟碱量在不同时间的变化。用Z6菌株在不同的培养时间对培养基中绿原酸的降解量进

2.2 Z6与Z8菌株在不同培养基上的培养特征

为了观察Z6菌株和Z8菌株在不同培养基上的生长情况,采用了几种常用培养基对其进行培养,结果发现Z6菌株和Z8菌株在所用的高氏培养基、察氏培养基、酪氨酸培养基、马铃薯培养基上均生长良好,但气生菌丝和基内菌丝颜色在不同培养基中有所不同,两株菌都不产生可溶性色素,结果见表2所示。在平板培养基中培养时,Z6与Z8菌株的气生菌丝和基内菌丝都发育良好,气生菌丝直或柔曲,有长短不一的孢子链,无螺旋;Z6菌株孢子长圆形,Z8菌株孢子圆形。

行了分析。

由图2可见,在烟草培养基中接入Z8放线菌菌剂的12h内,培养基中的烟碱已开始缓慢地被降解,12h后,培养基中的烟碱降解速度加快,在36h时,放线菌Z8对烟碱的降解率就达80%,之后,培养基中的烟碱降解速度变缓。实验结果表明Z8菌株对烟碱的降解较为迅速,特别是在前36小时的时间段内。

从图2可知,放线菌Z6菌株对烟草中绿原酸的降解速度相对平缓。在0~12h间,该菌株对绿原酸基本无降解。12h后,基质中绿原酸含量开始持续下降。到48h时,Z6菌株对烟草中绿原酸的降解率为57.1%,培养至72h后,绿原酸的降解率为67.5%。

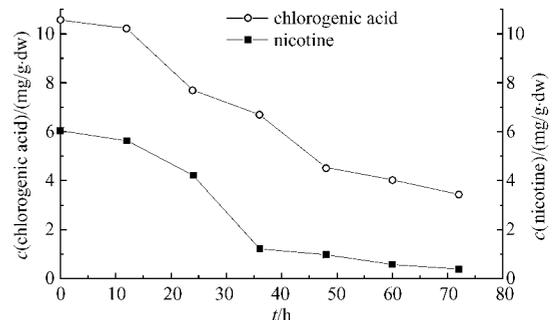


图2 Z8菌株降解烟碱和Z6菌株降解绿原酸随时间的变化曲线

Fig. 2 Time course of degrading nicotine variation with time of Z8 strain, and chlorogenic acid variation with time of Z6 strain.

3 讨论

在烟碱的降解微生物中,节杆菌、细菌和酵母是研究得较多的菌种,雷丽萍等^[14]从烟样和土样中分离到两株节杆菌(*Arthrobacter* sp.),其对烟草中烟碱的降解率分别是36.9%和

37.25% 达到降解高峰的时间分别是 48h 和 56h。袁勇军等^[15]利用细菌对烟碱的降解率达到 97.65% ,使用的是以纯烟碱作为底物^[5]。使用酵母的降解国外早期研究较多^[6] ,近期有 Aidong Ruan 等用假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.) HF-1 菌株在最佳培养条件下 25 h 降解了 99.6% 的烟碱。

本课题组的前期工作中 ,用芽孢杆菌对烟草废料中的烟碱与绿原酸的降解进行了研究 ,结果表明所用菌株培养 36h 可将含烟草物料中的烟碱降解 60.3% , 72h 后降解率可达 87.6% ;另一株芽孢杆菌在 36h 可将烟草物料中的绿原酸降解 50.5% ,72h 可降解 62.2% ,物料中烟碱降解量与欧盟的标准相比还有一定的差距^[9]。

Z8 菌株降解烟碱的能力很强 ,在烟草固体培养基中培养 48h 后 ,对烟碱的降解率就达到 83.9% ,培养至 72h 后 ,烟碱降解率可达 93.7% ,且该菌株对环境适应很快。经处理后物料中的烟碱含量低于欧盟的无害化标准 [500mg(kg. d. w)] ,对微生物有抑制作用的绿原酸含量也大为降低。因此有望直接用作有机肥基质或用于生产微生物肥料的基质^[16] ,具有较强的应用价值。

参 考 文 献

[1] 张鞍灵,马 琼,高锦明,等. 绿原酸及其类似物与生物活性. 中草药,2001,32(2):173-176.
 [2] 陈育如,李雪梅,骆跃军. 烟草作为制备绿原酸原料的应用及用烟草制备绿原酸的方法. 中国专利,ZI200410065240.6,2004.
 [3] Richard PN, Louisville K, Vernon LG, et al. Process for reduction of nicotine content of tobacco by microbial treatment. US Patent: 4037609, 1975.

[4] 张彦东,罗昌荣,王辉龙,等. 微生物降解烟碱研究应用进展. 烟草科技/烟草工艺,2003,12(3):3-7.
 [5] 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(2):181-184.
 [6] Enders C, Windisch S. The decomposition of nicotine by yeast. *Biochem*, 1947, 318:54-62.
 [7] Ward E. Microbial degradation of the tobacco alkaloids and some related compounds. *Arch Biochem Biophys*, 1958, 72(1):145-162.
 [8] 陈育如,骆跃军,李雪梅,等. 微生物发酵剂. 中国专利,ZI200410065178.0,2004.
 [9] 李雪梅,陈育如,骆跃军,等. 两株芽孢菌对烟草废料烟碱与绿原酸降解的研究. 生物加工过程,2005,3(4):58-61.
 [10] 张立杰. 烟碱的快速分析. 湖南化工,1999,29(3):43-44.
 [11] 陈育如,李雪梅,骆跃军,等. 侧臂瓶. 中国专利,ZI200420080794.9,2004.
 [12] 易昌华,贺建华. 紫外分光光度法测定中草药提取物中绿原酸的含量. 兽药与饲料添加剂,2004,9(1):24-25.
 [13] Civilini M, Domenis C, Sebastiautto N, et al. Nicotine decontamination of tobacco agro-industrial waste and its degradation microorganisms. *Waste management & research*, 1997, 15:349-358.
 [14] 雷丽萍,夏振远,郭荣君,等. 降烟碱杆菌发酵条件研究. 中国烟草科学,2006(3):45-47.
 [15] Ruan A, Min H, Peng X, et al. Isolation and characterization of *Pseudomonas* sp. strain HF-1, capable of degrading nicotine. *Research in Microbiology*, 2005, 156(5-6):700-706.
 [16] 陈育如,骆跃军,李雪梅. 纸浆污泥和烟草废料的联合堆肥处理研究. 江苏农业科学,2005,1:92-94.

Study on *Streptomyces* degradation of nicotine and chlorogenic acid in tobacco

LUO Yue-jun¹, CHEN Yu-ru^{1*}, LI Xue-mei¹, TANG Gang¹, WEI Ping²

(¹ Jiangsu Key Lab for Bioresource Technology, Key Lab for Microbial Technology in College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

(² College of Pharmacy and Life Science, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

Abstract: To study the fast bio-degradation of nicotine and chlorogenic acid in tobacco residues, the effective *streptomyces* on degradation of nicotine and chlorogenic acid were screened. The cultural characteristics of Z6 and Z8 strains on different media were inspected. The bio-degradation characters of two strains were discussed. The results showed that the nicotine degradation rate of *streptomyces* Z8 reached to 83.9% after cultured for 48h in tobacco solid media and reached to 93.7% after cultured for 72h, when the nicotine content of tobacco reduce to 0.38mg/g, which is lower than the innocuity standard (European Union Regulations and Italian law classify them as "toxic and hazardous wastes" when the nicotine content exceeds 500 mg/kg d. w.). Z6 is a good strain for chlorogenic acid bio-degradation. The chlorogenic acid degradation rate of Z6 is 57.1% for 48h and 67.5% for 72h respectively after cultured.

Keywords: *streptomyces*; tobacco; nicotine; chlorogenic acid; bio-degradation