

烟叶叶黄素降解菌发酵条件研究

杨雪鹏,赵越,胡仙妹,马科,毛多斌  
(郑州轻工业学院 食品与生物工程学院,河南 郑州 450001)

**摘要:**为探讨烟叶中叶黄素生物降解的方法,利用单因素试验和响应面分析法对叶黄素降解酶高产菌株 *Ewingella americana* (Y32) 的液体发酵工艺条件进行优化。结果表明,最适的碳源、氮源和无机盐分别为葡萄糖、酵母膏和  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 。在单因素试验的基础上,采用 Box - Behnken 试验设计进行回归分析得到最优培养基组成为:葡萄糖 1.38%、酵母膏 0.48%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.19%,在该条件下叶黄素降解率为 90.02%,与理论预测值(89.55%)基本吻合,比优化前的基础发酵培养基提高 45.07%。

**关键词:** 响应面法; Box - Behnken 设计; 叶黄素; 生物降解

**中图分类号:** TS45      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1004 - 3268(2015)05 - 0151 - 06

Research on Fermentation Condition of Lutein Degradation  
Bacterium from Tobacco

YANG Xuepeng,ZHAO Yue,HU Xianmei,MA Ke,MAO Duobin  
(Food and Bioengineering College,Zhengzhou University of Light Industry,Zhengzhou 450001,China)

**Abstract:** Optimization of lutein degradation enzyme production by *Ewingella americana* (Y32) was investigated by response surface analysis methodology. First,the one-factor-at-a-time method was adopted to investigate the effects of variable of medium components( *i. e.* ,carbon, nitrogen,and mineral sources) on the enzyme production. Among these variables, glucose,yeast extract and  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  were identified to be the most suitable carbon,nitrogen and inorganic salt,respectively. Subsequently,the concentration of glucose,yeast extract and  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  were optimized using Box-Behnken regression analysis method. The optimal composition was found to be glucose 1.38%,yeast extract 0.48%, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.19%. Under optimal culture conditions,the maximum degradation rate of lutein was 90.02%,which was increased by 45.07% compared with that before optimization. The experimental value was in according with that of predicting.

**Key words:** response surface methodology; Box-Behnken design; lutein; biodegradation

叶黄素是一类含氧类胡萝卜素的总称,是重要的香料前体物,其降解物种类、含量直接决定着烟叶的品质。因此,对叶黄素及相关影响因素的研究在国内外烟草行业是一个热点。新鲜烟叶中叶黄素的构成为叶黄质 60%、新黄质 22%、紫黄质 18%<sup>[1-3]</sup>。Weeks<sup>[4]</sup>发现,叶黄素的降解产物能显著提高烟叶品质。根据双键断裂的部位不同,叶黄素能降解产生很多致香物质,如大马酮、紫罗兰酮等。这些香味

物质阈值相对较低、刺激性较小、香气质较好、对烟叶香气贡献率大,是影响烟叶香气质和香气量的重要组分<sup>[5-6]</sup>。侯英等<sup>[7]</sup>在烟丝中加入 0.02% 叶黄素后,其香气、杂气、刺激性都有所增加,余味变差。香气增加可能是由于叶黄素热裂解产生了氧化异佛尔酮、巨豆三烯酮等物质,而杂气、刺激性明显增加可能与叶黄素热解时产生的大量苯及其同系物有关。因此,若能在加工期间通过某种技术降解烟叶中的

收稿日期:2014 - 11 - 13  
基金项目:国家自然科学基金项目(21276084);烟草工业生物技术重点实验室课题[(2014)334]  
作者简介:杨雪鹏(1973 - ),男,河南商丘人,副教授,博士,主要从事烟草工程与酶工程研究。  
E - mail:yangxuepeng@zzuli.edu.cn

叶黄素,将有利于卷烟减害及其抽吸品质的提高。

国内关于叶黄素降解的研究主要集中于物理降解(热裂解)、化学降解、氧化降解,对其生物降解研究尚少<sup>[8-14]</sup>。与传统物理降解、化学降解相比较,生物降解叶黄素有以下 2 个方面的显著优点:首先生物降解利用了酶催化的专一性,可得到成分相对单一的香味物质;其次,生物降解得到的香味物质被认定为“天然成分”<sup>[15]</sup>。因此,利用生物法降解叶黄素受到研究人员越来越多的关注。河南省烟草工业生物技术重点实验室从烟叶中筛选到叶黄素降解酶高产菌 *Ewingella americana* (Y32),本研究综合考虑碳源、氮源、无机盐的影响,采用单因素试验和响应面法对该叶黄素降解菌的发酵培养基进行优化,以期为其在卷烟加工和调香方面的应用提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与仪器

供试菌株:美洲爱文氏菌(*Ewingella americana*)由河南省烟草工业生物技术重点实验室筛选得到并保存。

培养基:液体种子培养基(葡萄糖 1%、蛋白胨 1%、酵母膏 0.5%、NaCl 0.1%, pH 值 6.0)、基础发酵培养基(葡萄糖 1%、蛋白胨 5%、酵母膏 5%、MgSO<sub>4</sub> 0.01%、叶黄素 0.01 g、Tween-80 1.0 mL、蒸馏水 1 L, pH 值 6.0)。

主要仪器:LC-MS 联用仪(美国赛默飞世尔公司)、HF Mega BE-C18 柱(美国安捷伦科技公司)、高速冷冻离心机(德国 Herolab 公司)、单人双面净化工作台(苏州净化设备有限公司)、精密电子天平(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司)、溶剂微孔过滤膜有机系(天津津腾实验设备有限公司)、50 L 立式圆形压力蒸汽灭菌锅(上海医用核子仪器厂)、pH 酸度计(上海市实验仪器总厂)。

### 1.2 试验方法

1.2.1 培养方法 种子培养:挑取单菌落,接种于液体种子培养基中,28 ℃、150 r/min 避光培养 24 h,即为种子液。发酵培养:按 2% 的接种量将种子液接种于基础发酵培养基中,28 ℃、150 r/min 避光培养 96 h。

#### 1.2.2 叶黄素降解率的测定

1.2.2.1 发酵液预处理 将发酵液在避光条件下 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,加入等体积二氯甲烷反复萃取 3 次,得叶黄素的提取物,加无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥过夜,过 0.45 μm 的有机系膜,以备 LC-MS 分析,并以等体积不接菌培养基作为对照。

1.2.2.2 LC-MS 分析条件 液相条件:选择 Thermo C<sub>18</sub> 柱,常温,进样压力化学电离源(APCI)作为离子源;毛细管加热温度:350 ℃;电喷雾电压:5 kV;离子源鞘气(N<sub>2</sub>):30 L/min;离子源辅助气(N<sub>2</sub>):10 L/min;碰撞气体为高纯氦气(>99.999%);扫描范围:200 ~ 2 000 m/z 全扫描;扫描速率:1 scan/s。

1.2.2.3 内标配制 用苏丹红 I 号作为内标。准确称取 0.020 96 g 的苏丹红 I 号,用二氯甲烷定容至 500 mL 作为内标液备用。

1.2.2.4 叶黄素标准曲线的绘制 准确称取 0.010 15 g 的叶黄素标准样品,用上述内标液定容至 30 mL。再分别用移液管准确量取 0.1、0.5、1.0、3.0、5.0、7.0、10.0 mL 的标准样品溶液,用内标液定容至 10 mL。根据建立的色谱条件进行 LC-MS 分析后,以标样峰面积( $A_i$ )/内标峰面积( $A_s$ )为纵坐标( $Y$ )、质量浓度为横坐标( $X$ ),绘制标准曲线。

1.2.2.5 叶黄素降解率计算 计算公式:叶黄素降解率 =  $(c_{\text{试验}} \times V_{\text{试验}}) / (c_{\text{对照}} \times V_{\text{对照}}) \times 100\%$ ,式中, $c$ —叶黄素质量浓度(mg/mL), $V$ —发酵液体积(L)。

### 1.3 叶黄素降解条件的单因素试验

1.3.1 培养基中碳源的优化 在每 100 mL 基础发酵培养基中接种 2% 的种子液,分别以 1% 的葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖、糊精、壳聚糖作为碳源,在 28 ℃、150 r/min 条件下发酵培养 96 h,通过 LC-MS 法测定叶黄素含量,计算叶黄素降解率,优选出合适的碳源。再设置碳源添加量分别为 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、3.0%、4.0%、5.0% 进行发酵,对其添加量进行优化。

1.3.2 培养基中氮源的优化 在每 100 mL 基础发酵培养基中接种 2% 的种子液,分别以 1% 的蛋白胨、酵母膏、NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>、KNO<sub>3</sub>、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、天门冬酰胺作为氮源进行发酵,优选出合适的氮源。再设置氮源添加量分别为 0.1%、0.25%、0.5%、0.75%、1%、1.5%、2% 进行发酵,对其添加量进行优化。

1.3.3 培养基中无机盐的优化 在每 100 mL 基础发酵培养基中接种 2% 的种子液,在以上最优条件确定的情况下,分别添加 0.1% 的 CaCl<sub>2</sub>、KCl、MgSO<sub>4</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、NaCl、FeSO<sub>4</sub>、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 进行发酵,优选出合适的无机盐。再设置添加量分别为 0.01%、0.05%、0.10%、0.15%、0.20%、0.25%、0.30% 进行发酵,对其添加量进行优化。

### 1.4 响应面法确定最佳培养降解条件

通过 1.3 单因素试验,确定 Box-Behnken 试验各因素的水平,设葡萄糖、酵母膏、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 添加量 3 个因素,每个因素设 3 个水平,进行摇瓶发酵试

验,寻找最佳发酵培养基成分。响应面因素水平设计见表 1。应用 Design – Expert 软件对试验数据进行多项式拟合回归得到回归方程,进而绘制三维响应面图。

表 1 Box – Behnken 设计各因素及水平 %			
水平	因素		
	葡萄糖	酵母膏	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	添加量(A)	添加量(B)	添加量(C)
-1	1.0	0.25	0.15
0	1.5	0.50	0.20
1	2.0	0.75	0.25

1.5 验证试验

用 Design – Expert 软件求解方程,得到叶黄素降解最优培养基组成。进行摇瓶验证试验,平行试验 3 次,计算优化后叶黄素降解率,并与优化前基础发酵培养基进行比较。

2 结果与分析

2.1 叶黄素标准曲线的绘制结果

按照 1.2.2.4 方法进行检测,结果如图 1 所示,得出线性回归方程  $Y = 0.060\ 2 + 11.275X$ ,  $R^2 = 0.999\ 7$ ,表明叶黄素质量浓度在 3.383 ~ 338.3 μg/mL 时与标样峰面积和内标峰面积比呈良好的线性关系。

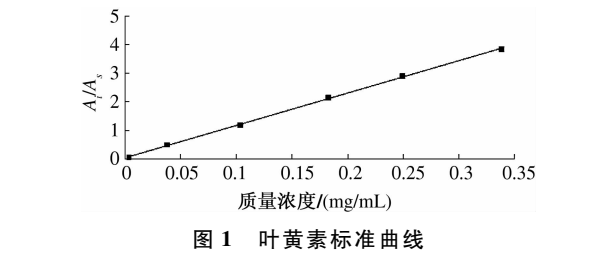


图 1 叶黄素标准曲线

2.2 叶黄素降解条件的单因素试验结果

2.2.1 培养基碳源种类 从图 2 可以看出,以葡萄糖为碳源时,叶黄素降解率为 68.56%,高于蔗糖和糊精的降解率(分别为 53.45%、58.22%),可能是由于葡萄糖为单糖,更利于菌株的利用,故选用葡萄糖作碳源。

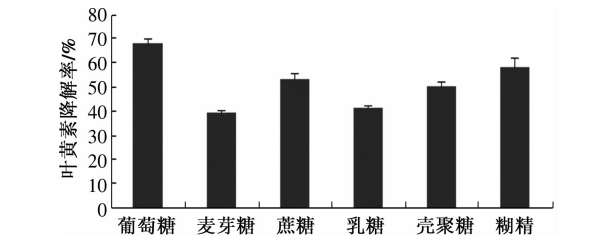


图 2 不同碳源对叶黄素降解率的影响

2.2.2 葡萄糖添加量 如图 3 所示,当葡萄糖添加量为 1.5% 时,叶黄素降解率最高。葡萄糖添加量

继续增加反而不利于叶黄素降解,其原因可能是葡萄糖添加量较大时产生底物抑制现象,从而导致叶黄素降解率下降。

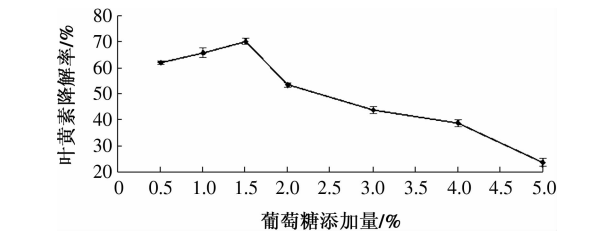


图 3 葡萄糖添加量对叶黄素降解率的影响

2.2.3 培养基氮源种类 从图 4 可见,不同氮源对叶黄素的降解均有一定的影响,其中有机氮源酵母膏、天门冬酰胺对叶黄素降解具有明显的促进作用,叶黄素降解率分别为 60.97% 和 48.50%;无机氮源中的 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>、KNO<sub>3</sub>、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 对产酶也有一定促进作用,但效果不如有机氮源明显。可见,酵母膏为最佳氮源,这可能是因为该氮源中含有丰富的氨基酸种类,更能促进叶黄素的降解。

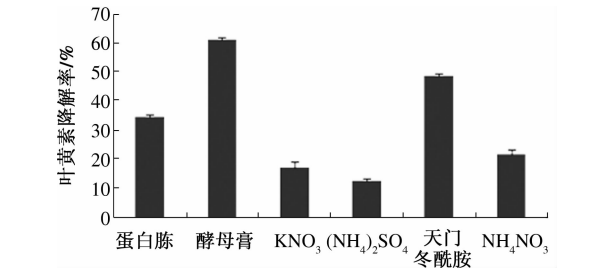


图 4 不同氮源种类对叶黄素降解率的影响

2.2.4 酵母膏添加量 图 5 表明,氮源添加量过高或不足均会影响叶黄素降解率,当添加量过低时,很可能是造成营养物质不充足而不能给菌体提供有利的降解条件,而过高则又会抑制叶黄素降解酶的产生。试验结果表明,当氮源添加量为 0.5% 时叶黄素降解率最高,达到 76.31%。

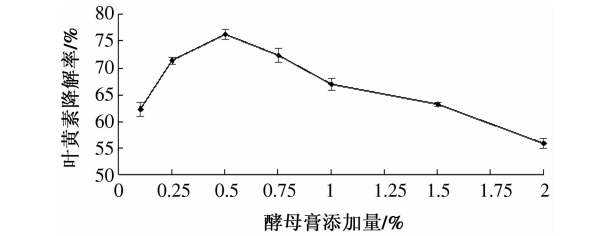


图 5 酵母膏添加量对叶黄素降解率的影响

2.2.5 无机盐种类 从图 6 可知,添加 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 时叶黄素降解率最高,可达 80.12%,而添加 FeSO<sub>4</sub> 时叶黄素降解率最低,仅为 33.21%。这可能是 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 能有效减小 H<sup>+</sup> 梯度对细胞的毒害作用,使菌体更好地生长。

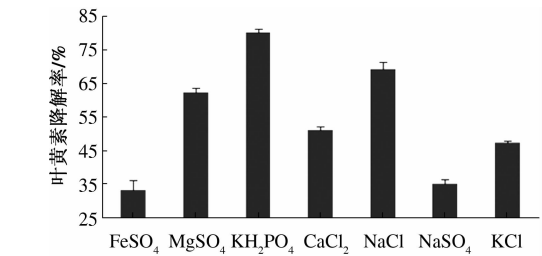


图 6 不同无机盐对叶黄素降解率的影响

2.2.6  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  添加量 由图 7 可知,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  添加量为 0.01% ~ 0.20% 时, 叶黄素降解率随  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  添加量增加逐渐升高, 添加量为 0.20% 时叶黄素降解率最高, 为 87.04%。  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  添加量继续增加, 叶黄素降解率反而下降。其原因可能是高浓度的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  对菌体生长有一定抑制作用, 从而影响叶黄素的降解。

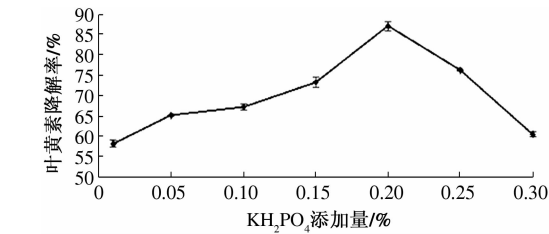


图 7  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  添加量对叶黄素降解率的影响

2.3 响应面法优化结果

响应面分析法是一种寻找多因素系统中最优条件的数理统计方法, 其中最常见的是采用 Box - Behnken 设计原理, 据此原理, 以叶黄素降解率为响应值, 设计了 3 因素 3 水平的响应面分析试验, 其具体试验方案及结果见表 2。应用 Design - Expert 软件对试验数据进行多项式拟合回归后, 得到回归方程:  $Y = 89.06 - 4.08A + 0.28B + 0.0075C + 3.21AB + 0.078AC + 0.81BC - 8.62A^2 - 4.43B^2 - 4.60C^2$ 。

表 2 Box - Behnken 试验设计与结果

试验编号	A	B	C	叶黄素降解率/%
1	1	1	0	76.21
2	0	0	0	88.71
3	1	0	1	72.18
4	-1	0	1	80.55
5	0	0	0	88.68
6	0	0	0	90.29
7	0	1	-1	79.40
8	0	0	0	89.68
9	1	0	-1	70.96
10	-1	0	-1	79.64
11	0	0	0	87.93
12	0	1	1	79.99
13	0	-1	1	79.03
14	1	-1	0	68.01
15	0	-1	-1	81.69
16	-1	-1	0	82.22
17	-1	1	0	77.58

回归方程的方差分析结果见表 3, 该方程表达了叶黄素降解率与所选的 3 个因素之间的关系。  $P$  小于 0.01、0.05, 分别表示该项指标极显著、显著。因此, 葡萄糖对菌株降解叶黄素的影响极显著, 但酵母膏、  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  对其影响不显著, 葡萄糖与酵母膏交互作用影响极显著。回归方程的决定系数 ( $R^2$ ) 为 0.987 6, 信噪比为 23.837, 表明方程的拟合度与可信度均很高, 试验误差较小, 能够对叶黄素降解过程进行预测与分析。模型的  $P < 0.01$ , 表明该二次方程模型极显著。

表 3 回归模型方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P
模型	711.58	9	79.06	62.14	<0.000 1
A	133.09	1	133.08	104.61	<0.000 1
B	0.62	1	0.62	0.49	0.507 1
C	0.000 45	1	0.000 045	0.000 34	0.872 6
AB	41.22	1	41.22	32.39	0.000 7
AC	0.024	1	0.024	0.018	0.783 9
BC	2.64	1	2.46	2.07	0.192 9
A <sup>2</sup>	313.15	1	313.15	246.15	<0.000 1
B <sup>2</sup>	82.59	1	82.59	64.92	<0.000 1
C <sup>2</sup>	89.15	1	89.15	70.07	<0.000 1
残差	8.90	7	1.27		
失拟项	5.46	3	1.82	2.11	0.240 8
纯误差	3.44	4	0.86		
总变异	720.49	16			

注:  $R^2 = 0.987\ 6$ ,  $R^2_{\text{Adj}} = 0.971\ 7$ , 信噪比 = 23.837。

采用 Design - Expert 软件绘制三维响应曲面图, 其直观地反映了各因素交互作用对响应值的影响, 其中葡萄糖与酵母膏交互作用显著, 葡萄糖、酵母膏与  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  交互作用均不显著(图 8)。

2.4 最优培养条件的预测和试验验证

通过图 8 可以看出, 响应值存在最大值, 应用 Design - Expert 软件求解方程, 得到叶黄素降解最优培养基组成为葡萄糖 1.375%、酵母膏 0.48%、  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.19%, 在此条件下, 叶黄素降解率理论上可达 89.55%。

为验证该法的可行性, 采用上述预测条件进行发酵试验, 为方便操作, 将培养基组分调整为葡萄糖 1.38%、酵母膏 0.48%、  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.19%, 平行进行 3 次试验, 测得叶黄素降解率平均为 90.02%, 与理论预测值基本吻合。与优化前的基础发酵培养基(叶黄素降解率为 62.05%)相比, 叶黄素降解率提高了 45.07%, 可见, 采用响应面法对数据进行回归分析和参数优化能很好地优化叶黄素降解培养基, 提高叶黄素降解率, 具有可行性和参考价值。

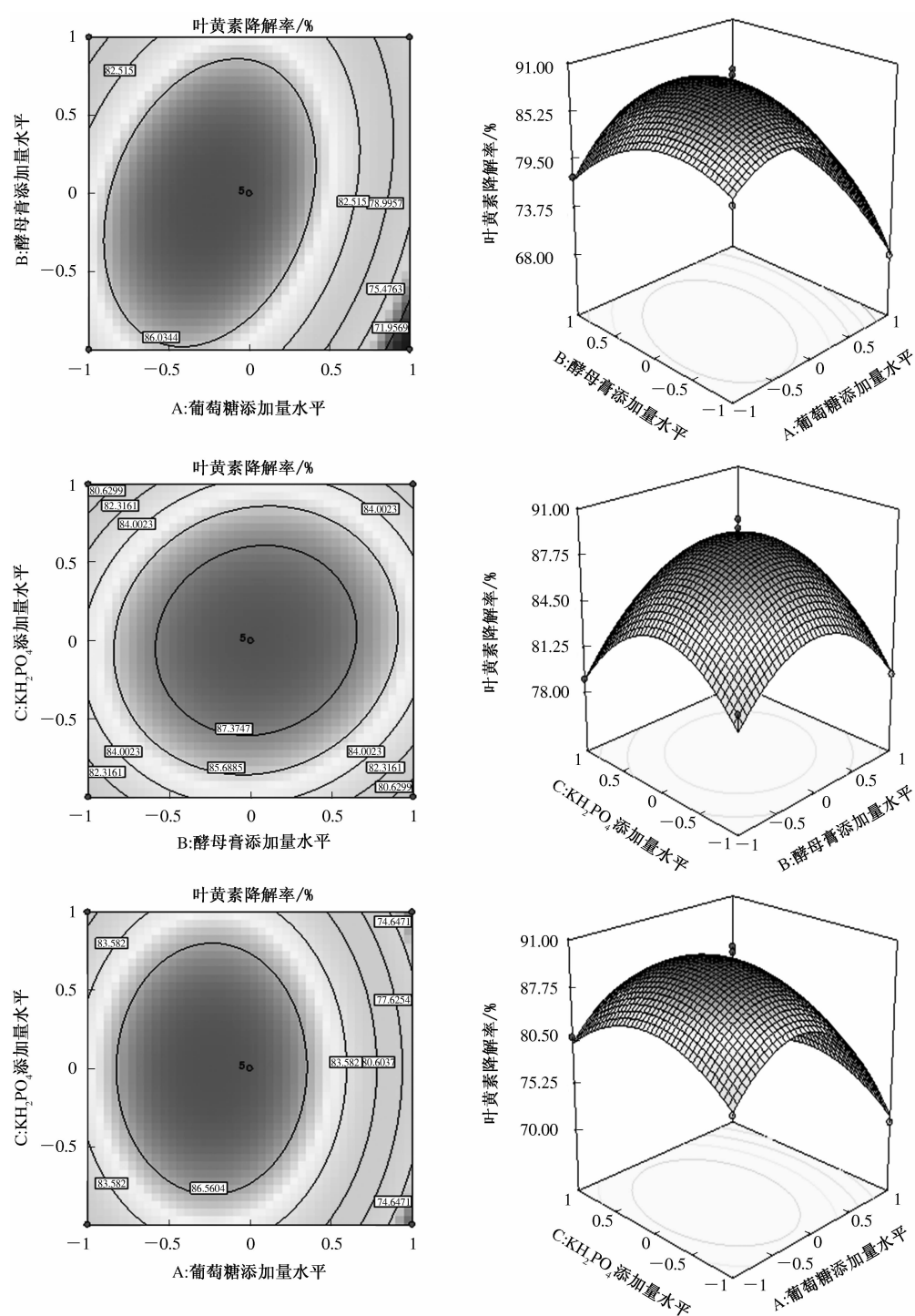


图 8 各因素交互作用影响叶黄素降解率的响应曲面图

3 结论与讨论

本研究以叶黄素降解酶高产菌株 *Ewingella americana* (Y32) 为出发菌株,通过单因素试验与响应面分析法,确定叶黄素降解菌的最佳发酵培养基配方为葡萄糖 1.38%、酵母膏 0.48%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.19%。在此条件下,叶黄素降解率平均为 90.02%,达到预期效果,且叶黄素降解率较优化前的基础发酵培养基提高 45.07%。

现阶段,随着卷烟降焦减害研究的不断深入,烟叶香气损失严重。本试验优化了叶黄素降解酶高产菌株的培养基组成,显著提高了酶活性,但能否将叶黄素降解酶应用于烟叶陈化阶段,以加速烟叶中叶黄素降解,改善卷烟香气,减少杂气和刺激性,仍需进一步研究。另外,利用 *Ewingella americana* 降解价格便宜的叶黄素,生产烟用香料也是开发烟用香料的新途径,且制得的烟用香料是天然组分,对于降低经济成本、提高商品价值具有重要意义。(下转第 160 页)

193-196.

[6] 田文君,申长军,郑文刚,等.农产品价格信息采集与预警系统设计与实现[J].计算机工程与设计,2012(5):1816-1821.

[7] 许金普,诸叶平.一种基于语音识别的农产品信息采集设备和方法[J].农机化研究,2015(1):9-12, 17.

[8] 韩勇,须德,戴国忠.语音用户界面研究进展[J].计算机科学,2004(6):1-4,39.

[9] 倪崇嘉,刘文举,徐波.汉语大词汇量连续语音识别系统研究进展[J].中文信息学报,2009,23(1):112-123,128.

[10] 雷建军,杨震,刘刚,等.噪声鲁棒语音识别研究综述[J].计算机应用研究,2009,26(4):1210-1216.

[11] 雷建军,杨震,刘刚,等.基于短时谱估计的语音增强研究[J].计算机工程与应用,2008,44(32):6-9.

[12] Ephraim Y, Malah D. Speech enhancement using a minimum-mean square error short-time spectral amplitude estimator[J]. Acoustics, Speech and Signal Processing, IEEE Transactions on, 1984, 32(6):1109-1121.

[13] 齐耀辉,潘复平,葛凤培,等.汉语连续语音识别系统中三音子模型的优化[J].计算机应用研究,2013,30(10):2920-2922.

[14] Boll S. Suppression of acoustic noise in speech using spectral subtraction [J]. Acoustics, Speech and Signal Processing, IEEE Transactions on, 1979, 27(2):113-120.

[15] Kamath S, Loizou P. A multi-band spectral subtraction method for enhancing speech corrupted by colored noise [C]. International conference on acoustics, speech and signal processing, 2002:4164.

[16] 刘放军,王仁华.语音识别前端鲁棒性问题综述[J].计算机科学,2006(4):168-173.

\*\*\*\*\*

(上接第 155 页)

参考文献:

[1] Granado F, Olmedilla B, Blanco I. Serum depletion and bioavailability of lutein in type I diabetic patients[J]. European Journal of Nutrition, 2002, 41(2):47-53.

[2] 蒋水萍,张拯研,郑仕方,等.优化烟叶结构后不同采收成熟度对烤烟品质的影响[J].河南农业科学, 2013, 42(11):40-45.

[3] 黄彬城,季静,郑阳霞,等.植物类胡萝卜素的研究进展[J].天津农业科学,2006,12(2):13-17.

[4] Weeks W W. Chemistry of tobacco constituents influencing flavor and aroma [J]. Recent Advance of Tobacco Science, 1985, 11:175-200.

[5] 史宏志,刘国顺.烟草香味学[M].北京:中国农业出版社,1998:212-214.

[6] 周冀衡,杨虹琦,林桂华,等.不同烤烟产区烟叶中主要挥发性香气物质的研究[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2004,30(1):20-23.

[7] 侯英,徐济仓,王保兴,等.叶黄素的热解产物分析[J].烟草科技,2007(12):27-32.

[8] 缪明明,王昆文,李鲜,等.叶黄素的化学降解产物及机理研究[J].烟草科技,1998(2):30-31.

[9] 刘金霞,李元实,姬小明,等.叶黄素氧化降解产物 GC-MS 分析及在卷烟加香中的应用[J].郑州轻工业学院学报:自然科学版,2011,26(2):24-27.

[10] 孟凡来,赵昶灵,段丽斌,等.高等植物类胡萝卜素的生物降解途径研究进展[J].中国农学通报,2013,29(24):143-150.

[11] 张永涛,刘惠芳,张东豫,等.类胡萝卜素的热裂解研究[C]//中国烟草学会工业专业委员会 2005 烟草化学学术研讨会论文集.海口:中国烟草学会,2005:335-339.

[12] 杨伟祖,谢刚,王保兴,等.烟草中  $\beta$ -胡萝卜素的裂解产物的研究[J].色谱,2006,24(6):611-614.

[13] 周芳芳,周丽娟,詹军,等.烟草功能菌的研究进展[J].河南农业科学,2013,42(12):6-10.

[14] Sanchez-Contreras A, Jimenez M, Sanchez S. Bioconversion of lutein to products with aroma[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2000, 54:528-534.

[15] Uenojo M, Marostica M R, Pastore G M. Carotenoids: Properties, applications and biotransformation in flavor compounds[J]. Química Nova, 2007, 30(2):616-622.