

# 响应面法优化节杆菌 Z3 菌液降解白肋烟烟碱条件

帖金鑫<sup>1</sup>, 张相辉<sup>2</sup>, 余翔<sup>1</sup>, 余梦灵<sup>1</sup>, 马林<sup>1\*</sup>

(1. 郑州轻工业学院 食品与生物工程学院, 河南 郑州 450002; 2. 黑龙江烟草工业公司, 黑龙江 哈尔滨 150001)

**摘要:** 为确定节杆菌 Z3 菌液降解白肋烟烟碱的最优条件, 采用响应面分析法, 以发酵时间、菌液添加量和发酵温度为独立变量进行中心组合设计, 以烟碱降解率为响应值进行发酵条件的优化。结果表明: 节杆菌 Z3 菌液降解白肋烟烟碱的最佳条件为发酵时间 68.2 h、菌液添加量 61.42%、发酵温度 30.2 °C, 在此条件下白肋烟烟碱降解率为 31.06%。将经节杆菌 Z3 菌液发酵后的白肋烟以 4% 的比例掺配到林海灵芝(硬红)产品中, 评吸结果显示, 香味浓郁协调, 醇厚丰满, 烟气丰富性增强, 香气质量提升, 烟气浓度增大, 品质有所改善。

**关键词:** 节杆菌 Z3; 白肋烟; 发酵条件; 响应面

中图分类号: TS45 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2014)12-0160-05

## Condition Optimization of *Arthrobacter* Z3 Degrading Burley Nicotine by Response Surface Methodology

TIE Jin-xin<sup>1</sup>, ZHANG Xiang-hui<sup>2</sup>, YU Xiang<sup>1</sup>, YU Meng-ling<sup>1</sup>, MA Lin<sup>1\*</sup>

(1. School of Food and Biological Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450002, China;  
2. Heilongjiang Tobacco Industry Co., Ltd., Harbin 150001, China)

**Abstract:** Fermentation conditions for nicotine degradation in burley tobacco by *Arthrobacter* Z3 were optimized by response surface methodology(RSM). Fermentation time, inoculation amount and temperature were chosen as independent factors in RSM. The results showed that the optimum fermentation conditions for nicotine degradation were as follows: time = 68.2 h, inoculation amount = 61.42%, and temperature = 30.2 °C, under which the nicotine degradation rate was up to 31.06%. The burley tobacco fermented by *Arthrobacter* Z3 was mixed into Linhai Lingzhi(Yinghong) product with the ratio of 4%. Sensory assessment results showed that the smoke fragrant was mellow and coordinated. Furthermore, there was a significant improvement in the quality and richness of the smoke aroma.

**Key words:** *Arthrobacter* Z3; burley; fermentation conditions; response surface

自然界存在大量的微生物, 利用微生物和酶降解技术降低烟草中不利化学成分的含量不仅高效而且具有选择性, 不会对烟草的品质产生不利影响。目前, 国内一些烟厂存有大量的高烟碱烟叶, 利用生物降解技术对其进行处理, 使其得到有效利用, 可以变废为宝, 更好地实现其经济价值。节杆菌 Z3 是以烟碱为唯一碳源从土壤中分离得到的菌株, 具有

高效代谢烟碱的能力, 发酵 36 h 可将约 95% 的烟碱降解。与自然陈化相比, 人工发酵能够在可控条件下将微生物应用于烟草发酵过程, 进而缩短烟叶发酵时间<sup>[1]</sup>、降解不利于烟草感官品质的大分子物质<sup>[2]</sup>、增加香气含量等, 提高烟草品质<sup>[3-6]</sup>。近年来, 关于生物降解烟碱的研究有很多<sup>[7-9]</sup>, 但主要集中在烤烟上, 而关于白肋烟的研究鲜见报道。白肋烟主

收稿日期: 2014-07-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(20976169)

作者简介: 帖金鑫(1988-), 男, 山西应县人, 在读硕士研究生, 研究方向: 烟草生物技术。E-mail: tiejinxin@163.com

\* 通讯作者: 马林(1964-), 男, 河南信阳人, 教授, 博士, 主要从事烟草生物技术方面的研究。E-mail: malindf@vip.sina.com

要用作混合型卷烟的原料,由于其含有大量的含氮化合物,特征香气过于明显,在实际生产工业中,对其使用较为谨慎。开展利用微生物转化白肋烟特征香气研究,消耗白肋烟中氨气和过高含量的碱性化合物,去除辛辣刺激性,使其接近烤烟香气,增加与烤烟烟气协调性,进而增加烤烟型卷烟的香气浓度,从而有效弥补“降焦减害”导致的“中式卷烟”香气不足具有重要意义。鉴于此,本试验在明确节杆菌 Z3 发酵条件、酶学特性和代谢烟碱途径的基础上<sup>[10-12]</sup>,设计并试验确立响应面法优化节杆菌 Z3 处理白肋烟的动态发酵条件,旨在为今后工业化利用微生物降解烟碱提供理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与仪器

供试白肋烟烟叶(恩施 B2F,2009 年)和林海灵芝(硬红)配方烟丝均由哈尔滨卷烟厂提供;节杆菌 Z3 菌株由郑州轻工业学院烟草工业生物技术重点实验室分离并保存;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  均为分析纯,购自天津大茂化学试剂厂;牛肉膏、琼脂粉、蛋白胨、酵母粉均为生化试剂,购自北京奥博星生物技术责任有限公司。

烟草生物技术动态发酵舱自制;SW-CJ-1F 净化工作台购自苏州净化设备有限公司;LDZX-30KBS 立式压力蒸汽灭菌器购自上海申安医疗器械厂;HZQ-F160 全温振荡培养箱购自太仓市实验设备厂;JY92-2 超声波细胞破碎机购自宁波新芝科器研究所;T6 新世纪型紫外可见分光光度计购自北京普析仪器有限公司;分析天平(感量 0.000 1 g)购自北京赛多利斯天平有限公司;6890 气相色谱仪(带 FID 检测器)和 6890GC/5973MS 气质联用仪购自美国安捷伦公司。

### 1.2 液体发酵培养基的配制

液体发酵培养基:  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  1.3 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.1 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.4 g,豆粉 0.1 g,烟末提取液 0.4 g,微量元素 1 mL(2 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.4 g  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、0.2 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,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 值为 7.0,0.1 MPa、121 °C 灭菌 30 min。

### 1.3 节杆菌 Z3 菌液发酵白肋烟的单因素试验

将节杆菌 Z3 接种到上述发酵培养基中,发酵 18 h,此时菌液中节杆菌 Z3 菌种数量大约为  $3 \times 10^8$  cfu/mL,  $\text{OD}_{600} = 1.2$ (以未接种节杆菌 Z3 的发酵液

为对照)。将菌液均匀喷洒到烟叶表面,每 100 g 烟叶表面喷洒 60 mL 的菌液。在自制的烟草生物技术动态发酵舱内进行发酵,通过单因素试验研究不同发酵温度、菌液添加量、发酵时间对白肋烟烟碱降解率的影响。

1.3.1 发酵时间 在发酵温度为 30 °C、菌液添加量为 60%、转速 10 r/min 条件下,分别设置发酵时间 48 h、60 h、72 h、84 h、96 h,测定发酵前后白肋烟中烟碱的含量,计算烟碱降解率。

1.3.2 菌液添加量 分别设置菌液添加量为白肋烟质量的 50%、55%、60%、65%、70%,在发酵温度为 30 °C、转速 10 r/min、发酵时间为 72 h 条件下发酵,计算发酵后白肋烟的烟碱降解率。

1.3.3 发酵温度 设置发酵时间为 72 h、菌液添加量为 60%、转速为 10 r/min,分别在温度为 26 °C、28 °C、30 °C、32 °C、34 °C 条件下发酵,计算发酵后白肋烟的烟碱降解率。

### 1.4 节杆菌 Z3 菌液降解白肋烟中烟碱的响应面试验

在单因素试验结果的基础上,根据 Box-Behnken 中心组合试验设计原理,以发酵时间(A)、菌液添加量(B)、发酵温度(C)3 个因素为自变量,进行三因素三水平的响应面分析试验,响应面分析因素和水平见表 1。

表 1 节杆菌 Z3 菌液降解白肋烟中烟碱的 Box-Behnken 试验因素和水平

水平	发酵时间 (A)/h	菌液添加量 (B)/%	发酵温度 (C)/°C
-1	60	55	28
0	72	60	30
1	84	65	32

### 1.5 发酵白肋烟在卷烟中的应用研究

在林海灵芝(硬红)配方烟丝中分别添加 0(CK)、3%、4%、5%节杆菌 Z3 菌液发酵后的白肋烟,评吸前置于相对湿度为 60%、温度为  $(22 \pm 2)$  °C 的环境中平衡 48 h 以上,使烟支含水量达到 12%左右,按 GB 5606.4-2005 评吸,确定发酵白肋烟的最佳掺配比例。

### 1.6 烟碱含量的测定方法

准确称量 1 g 样品(精确到 0.000 1 g)置于 150 mL 锥形瓶中,加入 10 mL 8 mol/L 的 NaOH 溶液、20 mL 蒸馏水、40 mL 萃取溶液(准确称取 0.5000 g 正十七烷至 1000 mL 容量瓶中,用正己烷稀释定容),置于振荡器上,振荡萃取  $(60 \pm 2)$  min,以确保萃取完全。静置后取上层有机相,立即进行气相色谱分析。

气相色谱条件:色谱柱为 DB-5 石英毛细管柱,流速为 1.0 mL/min;进样口温度为 250 ℃;程序升温为 100 ℃ (2 min)  $\xrightarrow{10\text{ }^{\circ}\text{C/min}}$  200 ℃ (5 min)  $\xrightarrow{20\text{ }^{\circ}\text{C/min}}$  280 ℃ (5 min),进样量为 1.0  $\mu\text{L}$ 。质谱条件:电离源为 EI,电离能量为 70 eV;离子源温度为 250 ℃;分流进样,分流比为 10:1,溶剂延迟时间为 4 min,采用选择离子扫描。

## 2 结果与分析

### 2.1 发酵时间对白肋烟烟碱降解率的影响

由图 1 可见,随着发酵时间的增加,烟碱降解率逐渐增加,当发酵时间为 72 h 时,烟碱降解率为 29.7%,随着发酵时间的继续增加,烟碱降解率增加不明显。

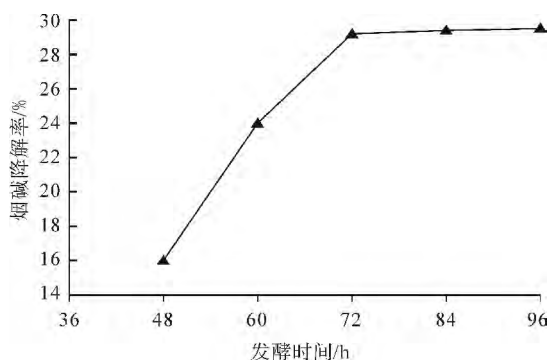


图 1 发酵时间对烟碱降解率的影响

### 2.2 菌液添加量对白肋烟烟碱降解率的影响

由图 2 可知,随着菌液添加量的增加,烟碱降解率先升高后降低,当菌液添加量为 60% 时,烟碱降解率达到最高(30.9%),菌液添加量继续增加对烟碱降解不明显。

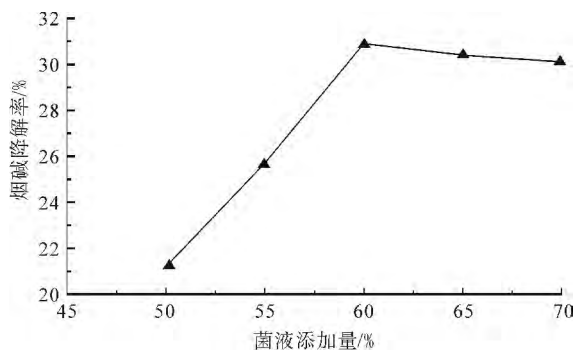


图 2 菌液添加量对烟碱降解率的影响

### 2.3 发酵温度对白肋烟烟碱降解率的影响

由图 3 可知,随着发酵温度的增加,节杆菌 Z3 代谢烟碱的能力先增强后减弱,发酵温度为 28~32 ℃ 时,节杆菌 Z3 具有较强的活性,其中发酵温度为

30 ℃ 时,烟碱降解率最高,达 30.7%,因此选择 28~32 ℃ 作为响应面试验的温度设计水平。

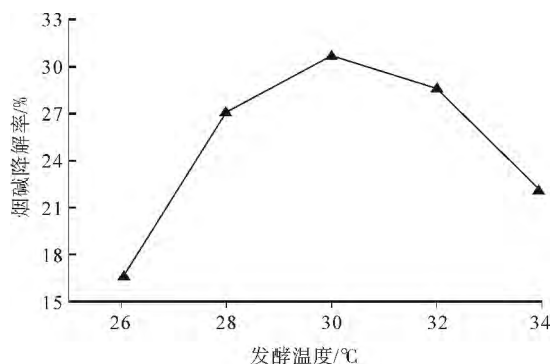


图 3 发酵温度对烟碱降解率的影响

### 2.4 节杆菌 Z3 降解白肋烟烟碱的响应面试验结果分析

对表 2 试验数据进行多元回归拟合,得到烟碱降解率对发酵时间(A)、菌液添加量(B)和发酵温度(C)的二次多项回归方程模型为:烟碱降解率 =  $-650.43 + 0.79A + 11.19B + 20.60C + 0.002AB + 0.015AC + 0.082BC - 0.01A^2 - 0.018B^2 - 0.44C^2$ 。

表 2 节杆菌 Z3 降解白肋烟烟碱响应面试验结果

序号	发酵时间 (A)/h	菌液添加量 (B)/%	发酵温度 (C)/℃	烟碱降 解率/%
1	72	55	32	23.86
2	72	60	30	30.42
3	84	55	30	23.34
4	72	60	30	30.46
5	72	60	30	30.58
6	72	60	30	30.34
7	84	65	30	27.12
8	60	60	28	28.91
9	84	60	28	25.52
10	84	60	32	26.49
11	60	55	30	25.73
12	72	65	32	28.69
13	60	60	32	28.45
14	72	65	28	26.50
15	72	55	28	24.94
16	60	65	30	29.03
17	72	60	30	31.02

由表 3 可知,模型显著,失拟项不显著,建模成功。模型的决定系数  $R^2 = 0.9946$ ,说明模型能解释烟碱降解率响应值的变化。该模型与实际情况拟合较好,可用于分析和预测节杆菌 Z3 处理白肋烟烟碱降解率的实际情况。

$F$  值的大小反映其对试验指标的影响程度,由表 3 可知,各因素对节杆菌 Z3 菌液降解白肋烟烟碱的影响程度大小为:菌液添加量(298.29)>发酵时间(153.09)>发酵温度(4.31)。在水平设置范围内,菌液添加量和发酵时间对烟碱降解的影响极显著,发酵温度对烟碱降解效果的影响不显著,间接反映了菌种能够适应较大的温度变化,说明节杆菌 Z3 稳定性和传代效果较好,不容易变异,对于今后将节杆菌 Z3 应用于工业生产和作为出发菌株的研究具有重要意义。

表 3 回归方程模型方差分析结果

方差来源	总和	自由度	均方	$F$ 值	$P$ 值
模型	98.78	9	10.98	144.35	<0.000 1
A	11.64	1	11.64	153.09	<0.000 1
B	22.68	1	22.68	298.29	<0.000 1
C	0.33	1	0.33	4.31	0.076 4
AB	0.06	1	0.06	0.76	0.412 9
AC	0.51	1	0.51	6.72	0.035 8
BC	2.67	1	2.67	35.16	0.000 6
A <sup>2</sup>	8.94	1	8.94	117.56	<0.000 1
B <sup>2</sup>	33.06	1	33.06	434.77	<0.000 1
C <sup>2</sup>	13.11	1	13.11	172.41	<0.000 1
残差	0.53	7	0.08		
失拟项	0.24	3	0.08	1.11	0.441 8
纯误差	0.29	4	0.07		
$R^2=0.994\ 6$					$R^2_{adj}=0.987\ 7$
总和	99.31	16			

从图 4—6 可以看出,随着每个因素的增大,响应值先增大,达到极值后逐渐减小,其中发酵温度和菌液添加量交互作用极显著,发酵温度和发酵时间交互作用显著(表 3)。响应面分析结果显示,优化后的最佳条件为发酵时间 68.2 h,菌液添加量 61.42%,发酵温度 30.2℃,此条件下白肋烟的烟碱降解率为 31.06%。

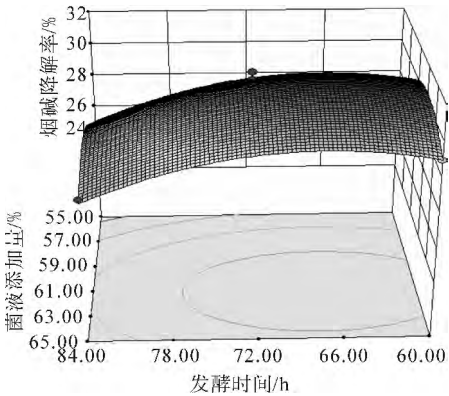


图 4 发酵时间和菌液添加量对烟碱降解率的影响

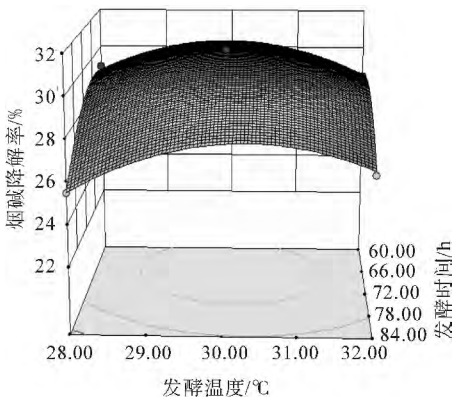


图 5 发酵时间和发酵温度对烟碱降解率的影响

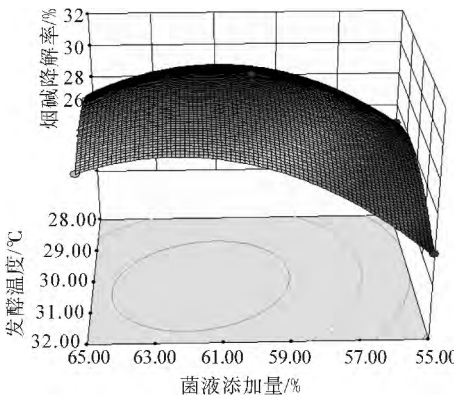


图 6 发酵温度和菌液添加量对烟碱降解率的影响

2.5 掺配不同比例发酵白肋烟的卷烟感官评吸结果

由表 4 可见,与 CK 相比,发酵白肋烟添加量为 4%时,卷烟香气和余味得分增加,刺激性得分无变化。评吸结果显示:白肋烟经节杆菌 Z3 菌液发酵后应用于林海灵芝(硬红)产品中,掺配比例为 4%时,林海灵芝(硬红)浓郁协调,香味醇厚丰满,烟气丰富性增强,香气质量有所提升,烟气浓度增大,品质有所改善。

表 4 掺配不同比例发酵白肋烟的卷烟感官评吸评分结果

发酵白肋烟掺配比 例/%	光泽 (5)	香气 (32)	谐调 (6)	杂气 (12)	刺激性 (20)	余味 (25)	总分 (100)
0(CK)	4.5	27	4.5	10	17	21	84
3	4.5	27	4.5	10	17	21	84
4	4.5	27.5	4.5	10	17	21.5	84.5
5	4.5	27	4.0	10	17	21	83.5

注:各项指标后括号内数字为该项的满分值。

3 结论与讨论

通过响应面法得到发酵时间(A)、发酵温度(C)和节杆菌 Z3 菌液添加量(B)对烟碱降解率的二次多项回归方程模型:烟碱降解率 = - 650.43 +

$0.79A + 11.19B + 20.60C + 0.002AB + 0.015AC + 0.082BC - 0.01A^2 - 0.018B^2 - 0.44C^2$ , 方差分析说明, 建立的数学模型达极显著水平 ( $P < 0.01$ ), 能很好地解释烟碱降解率随各参数变化的规律, 适用于节杆菌 Z3 降解白肋烟烟碱预测, 有助于设计节杆菌 Z3 菌液降解白肋烟烟碱最佳工艺。优化后节杆菌 Z3 菌液降解白肋烟烟碱的最佳条件为: 发酵时间 68.2 h, 菌液添加量 61.42%, 发酵温度 30.2 °C, 此时白肋烟的烟碱降解率为 31.06%。

利用生物技术处理烟叶是提高烟叶品质的一个重要手段<sup>[13-14]</sup>。在利用生物技术处理烟叶过程中, 有害物质或不利成分降解率的大小及增香成分含量的变化, 是衡量该技术是否合理、设备是否配套的关键要素。生物技术处理烟叶的过程受到内外因素的共同影响。一方面, 微生物对烟草中不利成分的降解能力不同; 另一方面, 生物技术处理烟叶还受到外界因素如温度、时间、pH 值、烟叶含水率、设备性能的影响。总之, 烟叶生物技术处理工艺是一项系统的工程, 需要从工厂设计、烟叶工艺要求、烟叶处理工序等方面进行系统研究, 才能使烟叶生物技术处理工艺广泛运用到实际生产中。

#### 参考文献:

- [1] Su C, Gu W, Zhe W, *et al.* Diversity and phylogeny of bacteria on Zimbabwe tobacco leaves estimated by 16S rRNA sequence analysis[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 92(5): 1033-1044.
- [2] Layten Davis D, Nielsen M T. Tobacco: Production, chemistry and technology[M]. Malden: Wiley-Blackwell, 1999.
- [3] 马林. 利用生物技术改变烟叶化学组分提高其吸食品质和安全性的研究[J]. 郑州工程学院学报, 2001, 22(3): 40-42.
- [4] 赵铭钦, 李芳芳. 微生物和酶学技术在烟草发酵中的应用及展望[J]. 中国农学通报, 2007, 23(1): 314-318.
- [5] 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[J]. 微生物学报, 2007, 47(6): 1095-1097.
- [6] 郑小嘎, 张修国, 张天宇, 等. 真菌菌剂改善烟叶品质的初步研究[J]. 微生物学通报, 2003, 30(6): 10-13.
- [7] Yuan Y J, Lu Z X, Huang L J, *et al.* Biodegradation of nicotine from tobacco waste extract by *Ochrobactrum intermedium* DN<sub>2</sub>[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2007, 34(8): 567-570.
- [8] Raman G, Mohan K N, Manohar V, *et al.* Erratum to: Biodegradation of nicotine by a novel nicotine-degrading bacterium, TND35 and its new biotransformation intermediates[J]. Biodegradation, 2014, 25(1): 109-110.
- [9] 刘新源, 刘国顺, 刘宏恩, 等. 生物炭施用量对烟叶生长、产量和品质的影响[J]. 河南农业科学, 2014, 43(2): 58-62.
- [10] 马林, 武怡, 曾晓鹰, 等. 降解尼古丁微生物的筛选及其在烟草中应用[J]. 烟草科技, 2005(9): 6-8.
- [11] 马林, 张峻松, 曾晓鹰, 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(10): 60-63.
- [12] 马林, 崔成哲, 袁有贵, 等. 烟碱脱氢酶的纯化及性质研究[J]. 工业微生物, 2007, 37(4): 41-44.
- [13] Brandsch R. Microbiology and biochemistry of nicotine degradation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 69(5): 493-498.
- [14] 张勃, 贾玉红, 端李祥, 等. 微生物发酵烟梗水提物的制备及其在再造烟叶中的应用[J]. 河南农业科学, 2012, 41(3): 56-60.