

文章编号:1673-1689(2007)06-0058-06

Ochrobactrum intermedium DN2 烟碱降解酶 发酵培养基优化研究

李颖, 袁勇军, 陆兆新, 别小妹, 吕凤霞

(南京农业大学 食品科技学院, 南京 210095)

摘要: 研究工作中筛选得到一株有较强烟碱降解能力的新型烟碱降解细菌 *Ochrobactrum intermedium* DN2, 对其产烟碱降解酶的发酵培养基进行了优化。采用 Plackett-Burman 设计法, 对影响 *Ochrobactrum intermedium* DN2 产烟碱降解酶的 15 个因子进行了筛选。结果表明, 影响该菌发酵产酶的显著因子为: 烟碱、酵母膏、葡萄糖、Tween-80 的质量浓度和培养基初始 pH。在此基础上, 采用响应曲面法对以上 5 个显著因子进行了优化。得到各因子最佳水平为: 烟碱 2.183 g/L, 葡萄糖 0.823 g/L, 酵母膏 0.844 g/L, Tween-80 0.976 g/L, 初始 pH 6.9。在此优化条件下获得实际酶活为 7943 U/L, 与预测值 8 060 U/L 相近, 比优化前提高了 52%。

关键词: 烟碱降解酶; 优化; Plackett-Burman 设计法; 响应曲面法

中图分类号: Q 815

文献标识码: A

Media Optimization of *Ochrobactrum intermedium* DN2 for Nicotine-Degrading Enzyme

LI Ying, YUAN Yong-jun, LU Zhao-xin, BIE Xiao-mei, LU Feng-xia

(College of Food Science and Technology, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China)

Abstract: In previous study, it was found that *Ochrobactrum intermedium* DN2 was a kind of bacteria which can degrade nicotine. Plackett-Burman design was used to evaluate the importance of the fifteen factors which may affect the production of nicotine-degrading enzyme of DN2. The significant factors were listed as follows: nicotine, glucose, yeast extract, Tween-80 and initial pH. Then the central composite design and response surface analysis were used to determine the optimal levels of the five significant factors. The optimized conditions were listed as follows: nicotine 2.183g/L, glucose 0.823 g/L, yeast extract 0.844 g/L, Tween-80 0.976 g/L, initial pH 6.9. With the optimum conditions, a highest enzyme activity was achieved to (8 010 U/L), which was close to the predicated value 7943U/L and was high 52% than that of the control.

Key words: nicotine-degrading enzyme; optimization; Plackett-Burman design; response surface methodology

收稿日期: 2006-12-20.

基金项目: 2005 年江苏省研究生创新计划项目.

作者简介: 李颖(1982-), 女, 江苏南京人, 发酵工程硕士研究生.

通讯作者: 陆兆新(1957-), 男, 江苏无锡人, 教授, 博导, 主要从事食品微生物研究. Email: yudgu@njau.edu.cn

烟碱是普通烟草中的植物碱,俗称尼古丁(nicotine)^[1]。我国部分地区所产烟叶,尤其是上部烟叶,因其烟碱含量过高而不能应用于叶组配方中,从而造成每年上千万元的资金损失。另外,在烟草和烟草制品生产过程中会产生大量的废弃物,其中烟碱的平均含量高达 18 g/kg。如果这些废弃物不经处理就直接排放,将会给环境带来巨大的危害。因此寻求一种高效的降解烟碱的方法正逐步成为人们关注的热点。

实践证明,利用微生物及其酶来降解烟碱,可以高效地降低烟叶或烟草废弃物中的烟碱。目前国外已报道的能降解烟碱的微生物较多,例如: *Arthrobacter nicotinovorans*^[2]、*Pseudomonas putida*^[3]和 *Saccharomyces*^[4]等。在国内,对降烟碱微生物的分离鉴定也逐步成为一个新的研究热点^[5-7]。但是,通过优化培养基提高这些微生物产烟碱降解酶能力的研究还未见报道。因此,虽然酶法降解烟碱相比微生物降解更快也更安全^[6-8],但由于酶产量的限制,还未能将其运用于实际生产。

作者所在实验室在前期的研究工作中筛选到一株有较强烟碱降解能力的新型烟碱降解细菌 *Ochrobactrum intermedium* DN2^[5]。对 DN2 产烟碱降解酶的发酵培养基进行优化,提高该菌的发酵产酶能力,以使该酶能够被进一步应用于实际生产中。

1 材料与方法

1.1 供试菌种

烟碱降解细菌 *Ochrobactrum intermedium* DN2 由作者所在实验室分离保藏。

1.2 培养基和培养条件

种子液培养基:酵母膏 3.0 g,蛋白胨 10 g, NaCl 5.0 g, MgSO₄ · 7H₂O 3.0 g,蒸馏水 1 L, pH 7.0。

初始发酵培养基:酵母膏 1.0 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.50 g, (NH₄)₂SO₄ 0.50 g, Fe(SO₄) 0.02 g, KH₂PO₄ 0.50 g, NaCl 0.50 g, K₂HPO₄ 1.50 g, 蒸馏水 1 L, pH 7.0。优化时按试验设计对其中相应组分做替换。

培养条件:接种量 5%, 1 L 容积三角瓶装液量 500 mL, 30 ℃, 160 r/min 培养 36 h。

1.3 粗酶液制备

菌体培养至稳定期,离心(5 000×g, 20 min)收集菌体,所得菌体用 0.05 mol/L、pH 6.5 磷酸缓冲液润洗 3 次,并重悬于该缓冲液。将此菌悬液于冰

浴中进行超声波破碎。超声时间 5 s, 间歇时间 10 s, 破碎 120 次, 功率 500 W。将超声破碎后的细胞匀浆离心(15 557×g, 25 min)后取上清液,得粗酶液,用于酶活的测定。

1.4 酶活测定方法

烟碱降解酶活力的测定原理是:在烟碱降解酶的催化下,烟碱被氧化,同时 2,6-二氯酚靛酚作为一种电子受体被还原,检测 2,6-二氯酚靛酚在 600 nm 处的吸光度值的变化,即可以反映酶活力的大小。

酶活力测定参照 K. Decker^[9]的方法,并稍作修改:粗酶液 0.5 mL;缓冲液(0.05 mol/L, pH 6.5 磷酸缓冲)1.5 mL; 2,6-二氯酚靛酚溶液 100 μL; 烟碱(1 g/mL)165 μL。50 ℃反应 1 min。酶活的定义:以 600 nm 处吸光度每分钟减少 0.001 个单位所需要的酶量定义为一个酶活力单位。

1.5 试验设计

1.5.1 Plackett-Burman 试验设计 根据影响微生物发酵产酶的因素的一般规律,结合笔者的前期试验,选择了可能影响 DN2 产烟碱降解酶的 15 个营养因子进行 Plackett-Burman 试验。试验设 2 个重复,以酶活力的平均值为响应值。研究中的试验设计、数据分析及模型建立皆采用 JMP 软件(version 4.0.5, SAS Institute Inc.)来进行。自变量及其代号、编码和水平见表 1。

表 1 Plackett-Burman 试验因素水平及编码

Tab. 1 Level and code of variables chosen for Plackett-Burman design

变量/(g/L)	代码		编码水平	
	未编码	编码	-1	1
烟碱	X ₁	x ₁	1.0	1.5
葡萄糖	X ₂	x ₂	0.1	0.3
蔗糖	X ₃	x ₃	0.1	0.3
麦芽糖	X ₄	x ₄	0.1	0.3
酵母膏	X ₅	x ₅	0.1	0.3
牛肉膏	X ₆	x ₆	0.1	0.3
硫酸铵	X ₇	x ₇	0.1	0.3
钼酸钠	X ₈	x ₈	0.1	0.3
硫酸镁	X ₉	x ₉	0.3	0.5
氯化钠	X ₁₀	x ₁₀	0.3	0.5
硫酸亚铁	X ₁₁	x ₁₁	0.3	0.5
磷酸氢钾	X ₁₂	x ₁₂	0.3	0.5
磷酸氢二钾	X ₁₃	x ₁₃	1.0	1.5
Tween-80	X ₁₄	x ₁₄	0.2	0.4
初始 pH	X ₁₅	x ₁₅	5	7

注:上表中自变量编码方程为: $x_i = (X_i - X_0)/\Delta X_i$, 式中 x_i 为自变量的编码值, X_i 为自变量的实际实验水平值, X_0 为实验水平中心点的实际值, ΔX_i 为单变量增量。

1.5.2 响应曲面(RSM)实验设计 基于 Plackett-Burman 试验结果,采用旋转中心组合设计(Central Composite Rotatable Design, CCRD)法,对影响菌株 DN2 发酵产酶的关键营养因子进行研究和探索,以获得最佳培养基组成。试验设 2 个重复,以酶活力平均值为响应值。实验因素水平及其编码见表 2。实验辅助软件为 Design Expert(version 6.0.5, Stat-Ease Inc, Mnnneapolis, MN, USA)。

表 2 试验因素水平及其编码表
Tab. 2 Level and code of chosen variables

变量/ (g/L)	代码		编码水平				
	未编码	编码	-2.38	-1	0	1	2.38
烟碱	X ₁	A	1.29	1.70	2.00	2.30	2.71
葡萄糖	X ₂	B	0.29	0.70	1.00	1.30	1.71
酵母膏	X ₃	C	0.29	0.70	1.00	1.30	1.71
Tween-80	X ₁₄	D	0.32	0.60	0.80	1.00	1.28
初始 pH	X ₁₅	E	5.81	6.50	7.00	7.50	8.19

注: A = (X₁ - 2)/0.3; B = (X₂ - 1)/0.3; C = (X₃ - 1)/0.3; D = (X₁₄ - 0.8)/0.2; E = (X₁₅ - 7)/0.5

2 结果与讨论

2.1 影响 *Ochrobactrum intermedium* DN2 产酶的关键因素

利用 JMP 软件对 Plackett Burman 试验结果进行方差分析可知,该模型显著(P<0.000 1)。通过回归系数显著性检验可知,对菌体发酵产酶影响较大的营养因子为:烟碱(P=0.003 5),葡萄糖(P<0.000 1),酵母膏(P<0.000 1),Tween-80(P=0.000 1)和初始 pH(P=0.046)。它们都在 95%的概率水平上差异显著,其它因子在 95%概率

水平上差异不显著。因此选择这 5 个因子进行进一步的优化。

2.2 响应面优化 DN2 产烟碱降解酶培养基

2.2.1 DN2 产烟碱降解酶多元二次模型方程的建立及检验 在对 Plackett Burman 试验结果分析的基础上,对影响产酶的 5 个关键因子进行了 50 组试验,结果如表 3。

通过 Design expert 软件对表 3 实验数据进行二次多项回归拟合,获得 DN2 产烟碱降解酶对烟碱、葡萄糖、酵母膏、Tween-80 的质量浓度,以及培养基初始 pH 的多元回归方程:

$$Y = 7\,586.38 + 162.81 \times A + 93.17 \times B - 86.89 \times C + 587.51 \times D - 77.97 \times E - 307.30 \times A^2 - 286.17 \times B^2 - 500.96 \times C^2 - 501.84 \times D^2 - 433.43 \times E^2 - 247.34 \times A \times B - 65.53 \times A \times C + 138.47 \times A \times D - 229.09 \times A \times E + 38.84 \times B \times C - 324.03 \times B \times D - 273.72 \times B \times E - 483.59 \times C \times D + 143.97 \times C \times E - 69.41 \times D \times E$$

式中 Y 为烟碱降解酶活(U/L),A、B、C、D、E 分别为烟碱、葡萄糖、酵母膏、Tween-80、初始 pH 的编码值。

该方程的方差分析表明(表 4),该模型极显著(P<0.000 1),失拟项不显著(P=0.878 1)。预测值与实测值之间具有高度的相关性(R²=0.980 7),模型与实际情况拟合良好,可以用该模型来预测 DN2 的实际产酶情况。

回归方程各项的方差分析表明,各因素对 DN2 产酶的线性效应皆显著;各因素的曲面效应也显著;除 AC、BC、DE 交互作用不显著外,其他因素两两交互作用显著。

表 3 旋转中心组合试验结果

Tab. 3 CCD matrix of the five variables with the experimental and predicted value of enzyme activity of DN2

试验号	烟碱	葡萄糖	酵母膏	Tween-80	初始 pH	酶活/(U/L)	
						实测值	预测值
1	-1	-1	-1	-1	-1	3 666	3 507
2	1	-1	-1	-1	-1	4 694	4 639
3	-1	1	-1	-1	-1	5 432	5 305
4	1	1	-1	-1	-1	5 382	5 449
5	-1	-1	1	-1	-1	3 801	4 065
6	1	-1	1	-1	-1	4 961	4 936
7	-1	1	1	-1	-1	5 994	6 020
8	1	1	1	-1	-1	5 966	5 901
9	-1	-1	-1	1	-1	6 240	6 159
10	1	-1	-1	1	-1	8 040	7 845

续表 3

试验号	烟碱	葡萄糖	酵母膏	Tween-80	初始 pH	酶活/(U/L)	
						实测值	预测值
11	-1	1	-1	1	-1	6 412	6 661
12	1	1	-1	1	-1	7 508	7 359
13	-1	-1	1	1	-1	4 860	4 783
14	1	-1	1	1	-1	6 275	6 208
15	-1	1	1	1	-1	5 531	5 441
16	1	1	1	1	-1	5 890	5 876
17	-1	-1	-1	-1	1	4 035	4 207
18	1	-1	-1	-1	1	4 423	4 423
19	-1	1	-1	-1	1	4 913	4 911
20	1	1	-1	-1	1	4 115	4 138
21	-1	-1	1	-1	1	5 268	5 341
22	1	-1	1	-1	1	5 593	5 296
23	-1	1	1	-1	1	6 074	6 201
24	1	1	1	-1	1	4 948	5 166
25	-1	-1	-1	1	1	6 685	6 582
26	1	-1	-1	1	1	7 332	7 352
27	-1	1	-1	1	1	5 939	5 990
28	1	1	-1	1	1	5 991	5 770
29	-1	-1	1	1	1	5 817	5 782
30	1	-1	1	1	1	6 126	6 290
31	-1	1	1	1	1	5 233	5 345
32	1	1	1	1	1	4 885	4 864
33	-2.38	0	0	0	0	5 656	5 461
34	2.38	0	0	0	0	6 002	6 235
35	0	-2.38	0	0	0	5 604	5 746
36	0	2.38	0	0	0	6 293	6 189
37	0	0	-2.38	0	0	4 771	4 959
38	0	0	2.38	0	0	4 696	4 545
39	0	0	0	-2.38	0	3 478	3 350
40	0	0	0	2.38	0	5 979	6 145
41	0	0	0	0	-2.38	5 137	5 320
42	0	0	0	0	2.38	5 094	4 949
43	0	0	0	0	0	8 030	7 586
44	0	0	0	0	0	7 245	7 586
45	0	0	0	0	0	7 893	7 586
46	0	0	0	0	0	7 630	7 586
47	0	0	0	0	0	7 398	7 586
48	0	0	0	0	0	7 369	7 586
49	0	0	0	0	0	7 481	7 586
50	0	0	0	0	0	7 620	7 586

表 4 DN2 产酶的回归方程方差分析
Tab. 4 ANOVA for the regression equation of enzyme activity

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	6.830E+007	20	3.415E+006	73.516 7	< 0.000 1
失拟项	8.430E+005	22	38 316.48	0.532 009	0.878 1
误差	5.042E+005	7	72 022.21		
和	6.965E+007	49			
			R=0.990 3	R ² =0.9807	R _{adj} ² =0.967 3

2.2.2 DN2产烟碱降解酶响应面交互作用分析及优化 根据模型方程所作的响应曲面图及其等高线图(见图1~图3),各因素及其交互作用对酶活的影响可直观反映出来。

图1显示了当酵母膏、Tween-80和初始pH位于中心水平时,烟碱和葡萄糖对DN2产酶的交互作用。由图可见,两因素的交互作用显著。在一定范围内,当烟碱含量增高时,要保持较高的酶活就应当适当降低葡萄糖含量;而当葡萄糖含量增高时也应降低烟碱的含量,才能获得较高酶活。这是由于烟碱不仅是DN2产烟碱降解酶的诱导物,也是其可利用的碳源^[10],因而与同为碳源的葡萄糖存在一定的拮抗作用。

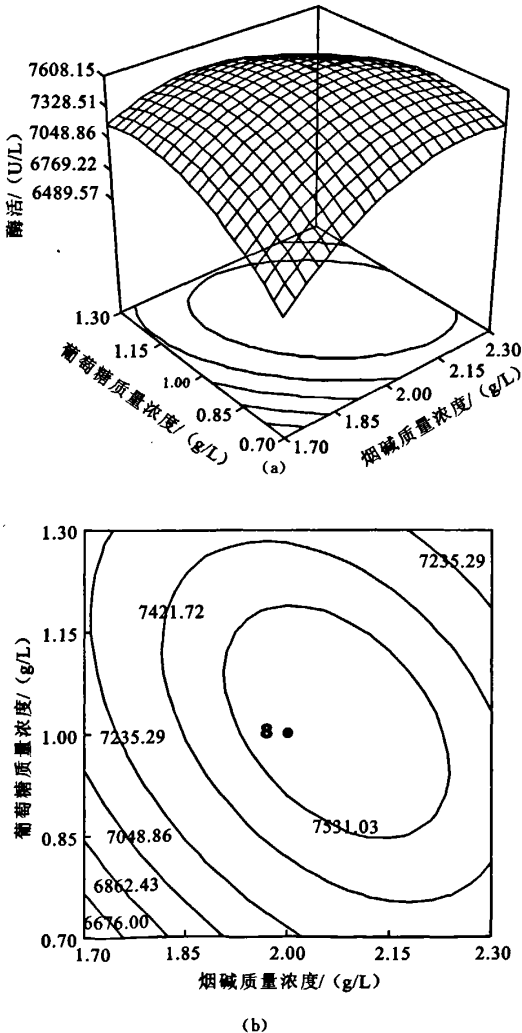


图1 烟碱与葡萄糖交互影响DN2产酶的响应面及等高线图
Fig.1 Response surface and contour plots of nicotin vs glucose on enzyme activity of DN2

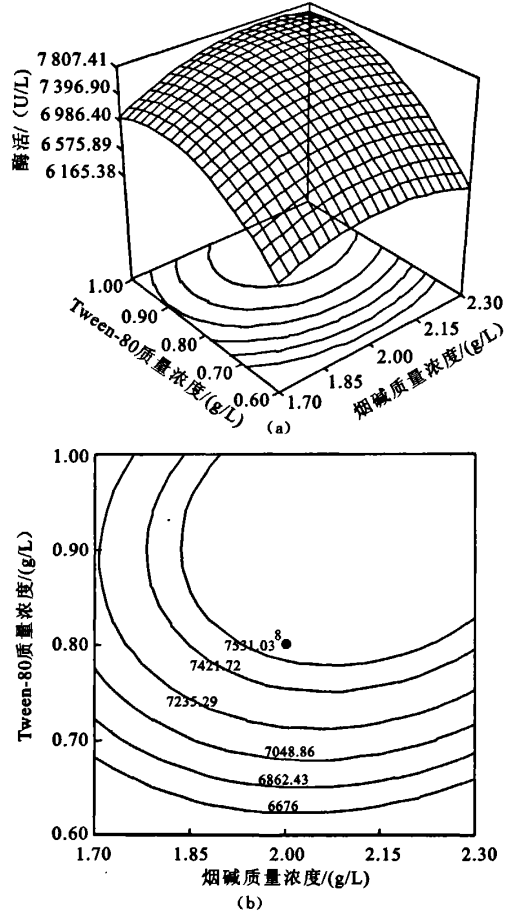


图2 烟碱与Tween-80交互影响DN2产酶的响应面及等高线图
Fig.2 Response surface and contour plots of nicotin vs Tween-80 on enzyme activity of DN2

图2显示了当葡萄糖、酵母膏和初始pH位于中心水平时,烟碱和Tween-80对DN2产酶的交互作用。由图可见,Tween-80对DN2产酶影响显著。尤其在烟碱含量较高时,酶活力随Tween-80的增加而显著增加。这是由于Tween-80作为一种对菌体生长代谢无毒的表面活性剂,既能改变细胞膜的透性又可改善氧在气液界面的传递速度^[11],因而能够提高酶的发酵产率。当Tween-80含量较低时,酶活力基本不随烟碱变化而变化,只有当Tween-80处于较高水平时,酶活力才随着烟碱的增加而增加。这也可能是由于只有当Tween-80达到一定水平,保证了较好的细胞膜透性和溶氧之后菌体才能很好地利用烟碱发酵产酶。

图3显示了当烟碱、葡萄糖、Tween-80的质量浓度位于中心水平时,酵母膏质量浓度和培养基初始pH对DN2产酶的交互作用。由图可见,酵母膏

和初始 pH 交互作用显著,这可能与 pH 值会影响酵母膏的解离状态从而影响菌体对氮源的利用有关。只有当两因子都位于中心点附近时才能获得较高的酶活力,增加或减少任一因子都会使酶活偏离最佳值。

通过对 DN2 产烟碱降解酶模型进行求导和解逆矩阵,可以得到模型的极值点。当培养基中烟碱 2.183 g/L、葡萄糖 0.823 g/L、酵母膏 0.844 g/L、Tween-80 0.976 g/L、初始 pH 6.9 时,可获得最大酶活 8060 U/L。为了验证预测结果,在上述优化条件下进行验证试验,得出实际酶活为 7943 U/L(3 次试验平均值),与预测值相近,说明模型可以较好的预测 DN2 的产酶情况。

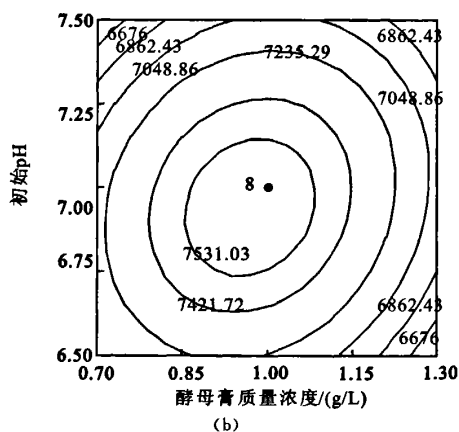
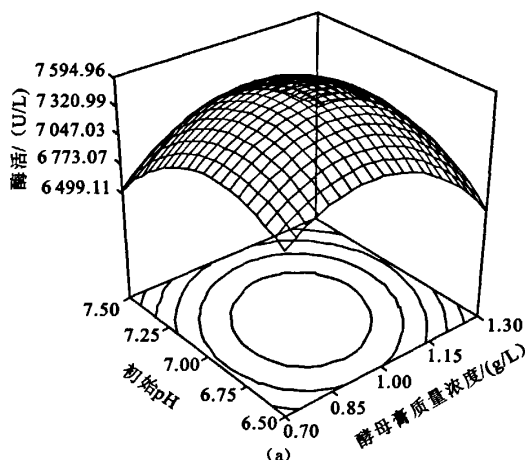


图3 酵母膏与初始 pH 交互影响 DN2 产酶的响应面及等高线图

Fig. 3 Response surface and contour plots of yeast extract vs pH on enzyme activity of DN2

3 结语

通过 Plackett-Butman 实验筛选出影响 DN2 菌株发酵产烟碱降解酶的显著因子为烟碱、葡萄糖、酵母膏、Tween-80 的质量浓度和培养基初始 pH。在此基础上,采用响应面法对上述因子进行进一步优化,得到各因子的最佳水平为烟碱 2.183 g/L、葡萄糖 0.823 g/L、酵母膏 0.844 g/L、Tween-80 0.976 g/L、初始 pH 6.9。在上述优化条件下进行试验,得到实际酶活为 7943 U/L,与预测值相近,此结果比优化前的 5228 U/L 提高了 52%。

参考文献(References):

- [1] Jin W B, Dai Y. Tobacco Chemistry[M]. Beijing: Press of Qinghua University, 1994.
- [2] Brandsch R, Decher K. Isolation and partial characterization of plasmid DNA from *Arthrobacter oxydans*[J]. *Arch Microbial*, 1984, 138: 15-17.
- [3] Civilini M, Domenis C, Sebastianutto N, et al. Nicotine decontamination of tobacco agro-industrial waste and its degradation by micro-organisms [J]. *Waste Manage Res*, 1997, 15(4): 349-358.
- [4] Enders C, Windisch S. The decomposition of nicotine by yeast[J]. *Biochem*, 1947, 318: 54-62.
- [5] Yuan Y J, Lu Z X, Wu N, et al. Isolation and preliminary characterization of a novel nicotine-degrading bacterium, *Ochrobactrum intermedium* DN2[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2005, 56: 45-50.
- [6] Ma L, Wu Y, Zeng X Y, et al. Screening of nicotine degrading microorganism and application of its enzyme in tobacco [J]. *Tobacco science and technology*, 2005, 9(218): 6-8.
- [7] Aidong Ruan, Hang Min, Xiaohui Peng, 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.
- [8] Chen H, Xu P, Ma Q Y, et al. Experiment on degradation of nicotine in tobacco leaves with microorganism enzymes Isolated from tobaccos [J]. *Tobacco science and technology*, 2004, 4: 12-16.
- [9] Decker K, Bleee H. Induction and purification of stereospecific nicotine oxidizine enzyme from *Arthrobacter Oxidans*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1965, 105: 313-324.
- [10] Yuan Y J, Lu Z X, Huang L J, et al. Isolation and identification of a strain DN2 degrading nicotine [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2005, 45(2): 181-184.
- [11] 李建洲, 李江华, 许正宏, 等. 嗜盐嗜碱菌 *Alkalibacterium* sp. F26 产碱性果胶酶发酵条件的优化[J]. *食品与生物技术学报*, 2005, 24(6): 43-48.

LI Jian-zhou, LI Jiang-hua, XU Zhen-hong, et al. Optimizing fermentation of alkaliphilic and halophilic *Alkalibacterium* sp. F26 for producing alkaline pectinase [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2005, 24(6): 43-48. (in Chinese)

(责任编辑:杨萌)