

## 研究报告

## 废烟叶提取液源尼古丁降解菌分离鉴定和特性

舒明<sup>1</sup> 樊虎<sup>1</sup> 杨洋<sup>1</sup> 刘金莉<sup>1</sup> 熊烈<sup>2</sup> 焦洋<sup>2</sup> 何厚龙<sup>2</sup> 钟卫鸿<sup>2\*</sup>

(1. 浙江中烟工业有限责任公司技术中心 浙江 杭州 310024)

(2. 浙江工业大学生物工程学院 浙江 杭州 310032)

**摘要:**【目的】目前造纸法再造烟叶工艺已经成为我国重要的废烟叶处理和利用方式,该工艺中尼古丁的调控是很重要的待解决问题。从废烟叶提取液(Tobacco waste extract, TWE)中筛选高耐受高活性降解尼古丁微生物用来直接处理烟梗或烟末提取液中的尼古丁,可实现对尼古丁指标的调控。【方法】以尼古丁为唯一碳氮源的基本培养基为筛选平板,从废烟叶提取液中筛选降解尼古丁菌株;对分离获得的菌株进行形态、生理生化和 16S rRNA 基因序列分析比对,鉴定其种属;获得的菌株分别在基本培养基和废烟叶提取液中考察其生长和尼古丁降解效果。【结果】从废烟叶提取液中获得了一株尼古丁降解活性和耐受力较好的降解菌株 *Pseudomonas* sp. JY-Q,且在 TWE 中也有较强的降解能力。【结论】*Pseudomonas* sp. JY-Q 可用于水体和 TWE 环境尼古丁的降解,但共存的葡萄糖对其有抑制作用,有待深入研究。

**关键词:** 废烟叶提取液, *Pseudomonas* sp. JY-Q, 尼古丁降解

## Isolation, identification and characteristics of nicotine degrading strain from tobacco waste extract

SHU Ming<sup>1</sup> FAN Hu<sup>1</sup> YANG Yang<sup>1</sup> LIU Jin-Li<sup>1</sup> XIONG Lie<sup>2</sup> JIAO Yang<sup>2</sup>  
HE Hou-Long<sup>2</sup> ZHONG Wei-Hong<sup>2\*</sup>

(1. Technology Center, China Tobacco Zhejiang Industrial Co. Ltd., Hangzhou, Zhejiang 310024, China)

(2. College of Biological Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou, Zhejiang 310032, China)

**Abstract:** [Objective] Reconstituted tobacco technology has been one important method to treat and reuse the tobacco waste, in which nicotine control is a key problem to resolve. To realize the flexible control of nicotine, tobacco waste extract (TWE) was selected to screen high activity nicotine degrading strains for potential utilization in reconstituted tobacco process. [Methods] BSM containing nicotine as sole carbon and nitrogen source was used to screen nicotine degrading strains from TWE. Isolated strain identification includes morphology, physiology, and 16S rRNA gene sequence analysis. The activity of nicotine degradation of the isolate was evaluated in BSM and

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 31670115); Key Science and Technology Project of China Tobacco Zhejiang Industrial Co. Ltd. (No. ZJZY2013C002)

\*Corresponding author: Tel: 86-571-88320739; E-mail: whzhong@zjut.edu.cn

**Received:** August 18, 2016; **Accepted:** September 12, 2016; **Published online** (www.cnki.net): October 10, 2016

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31670115); 浙江中烟工业有限公司重点科技项目(No. ZJZY2013C002)

\*通讯作者: Tel: 86-571-88320739; E-mail: whzhong@zjut.edu.cn

收稿日期: 2016-08-18; 接受日期: 2016-09-12; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-10-10

TWE respectively. **[Results]** The isolate *Pseudomonas* sp. JY-Q showed high degrading activity and tolerance of nicotine both in BSM and TWE. **[Conclusion]** *Pseudomonas* sp. JY-Q is a potential strain for nicotine degradation in aqueous environment and TWE. However, coexisting glucose inhibits its activity, which requires further research to resolve.

**Keywords:** Tobacco waste extract, *Pseudomonas* sp. JY-Q, Nicotine degradation

目前造纸法再造烟叶工艺已经成为我国重要的废烟叶处理和利用方式,迄今国内已经建有多家相关企业,但其产品的质量稳定性有待加强,其中尼古丁的调控是很重要的一个方面。目前烟叶再造主要靠低尼古丁梗提取液与高尼古丁含量烟末提取液的比配来实现,但这种调配对产品品质的影响较大,因而需要研究和利用其他技术(如降解尼古丁微生物的应用)来直接处理烟梗或烟末提取液中的尼古丁,实现对尼古丁指标的调控。此外,由于尼古丁具有环境毒害作用,烟草及其加工行业排放的含尼古丁废水也需进行有效的降解尼古丁处理。

微生物降解尼古丁的报道主要集中在降解菌种的筛选和降解途径的研究方面<sup>[1-7]</sup>。迄今发现的能有效降解尼古丁的微生物主要为恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)和烟草节杆菌(*Arthrobacter nicotianae*)等菌种<sup>[1]</sup>,这些微生物分别通过吡啶途径、吡咯途径代谢尼古丁<sup>[1-7]</sup>。假单胞菌是报道最多的尼古丁降解菌属,如 *Pseudomonas putida* S16<sup>[8]</sup>、*Pseudomonas putida* ZUTSKD<sup>[9]</sup>、*Pseudomonas* sp. No.41<sup>[10]</sup>、*Pseudomonas convexa* Pc1<sup>[11]</sup>、*Pseudomonas* sp. HF-1<sup>[12]</sup>、*Pseudomonas* sp. Nic22<sup>[13]</sup>、*Pseudomonas putida* ZB-16A<sup>[14]</sup>、*Pseudomonas* sp. CS3<sup>[15]</sup>、*Pseudomonas* sp. HZN6<sup>[16]</sup>等,其中 S16 降解能力最强,13 h 内即可将培养基中含量为 4 g/L 的尼古丁完全降解<sup>[8]</sup>。ZB-16A 和 S16 对尼古丁的耐受能力达 6 g/L,是已报道的微生物中耐受能力最高的<sup>[8,14]</sup>。我们前期筛选的 ZUTSKD 菌株的耐受浓度也达到 5.8 g/L,并尝试应用于废烟叶提取液(Tobacco waste extract, TWE)中尼古丁降解,效果依然不理想<sup>[9]</sup>。由于再造烟叶工艺中的废烟叶提取液是一种高尼古丁(可达 20 g/L)和高渗透压水提液,迫切需要能耐受更高尼古丁和高渗透压的尼

古丁降解菌株。因此,筛选高尼古丁耐受和高降解活性的菌种,选择合适的生物反应条件来实现尼古丁的有效降解,是烟草行业及其环境保护方面的一个热门研究课题和研究方向。本文直接从再造烟叶生产工艺的烟梗、烟末提取液中分离本土、高效和高耐受的尼古丁降解微生物菌种,并考察菌株在 TWE 环境的降解条件和特性。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品

废烟叶提取液(TWE):即再造烟叶生产线上的水提液浓缩样品(样品含有高浓度的尼古丁 20 g/L),由杭州利群环保纸业有限公司提供。尼古丁标样(纯度>99%)购自 Sigma 公司。

### 1.2 培养基和主要试剂

LB 培养基(g/L):蛋白胨 10.0,酵母提取物 5.0, NaCl 10.0。

BSM 培养基(g/L):Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5.57, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.44, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.00, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.20, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.000 4, FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.001, CaCl<sub>2</sub> 0.001, 尼古丁(根据需要含量添加)。

上述培养基均用 1 mol/L NaOH 调节 pH 为 7.0,分装至 250 mL 三角瓶,8 层纱布封口,0.07 MPa 灭菌 30 min 后使用。

基因组提取试剂盒(E.Z.N.A.<sup>TM</sup> Bacterial DNA Kit),OMEGA 公司。

### 1.3 样品中尼古丁降解菌的筛选和分离

考虑到 TWE 环境中可培养的高耐受尼古丁降解菌数量可能不高,如果直接用尼古丁平板筛选会得到假阴性结果。因而,首先用 LB 培养基进行可培养微生物的富集。取 2 mL 样品分别接种到装有 100 mL LB 培养基的摇瓶,30 °C、180 r/min 富集培

养 2–3 d, 待培养液明显浑浊, 将富集菌液涂布于筛选平板(2 g/L 尼古丁的 BSM 培养基, 尼古丁为唯一碳氮源), 30 °C 培养 3–5 d, 筛选到的目的菌进行多次转接纯化, 将纯化出的目的菌从平板上挑取单菌落接种到液体筛选培养基中, 30 °C、180 r/min 摇床培养 2–3 d, 考察其生长状况, 筛选同样条件下生长最好的菌株, 也就是尼古丁降解活性较好的菌株。

#### 1.4 菌种鉴定

**1.4.1 形态观察:** 将纯化后的菌株接种于新鲜固体 LB 培养基上, 培养 18–24 h 后观察菌落形态; 再通过革兰氏染色以及光学显微镜下观察菌体个体的基本形态; 通过透射电子显微镜来观察菌株的具体形态及其鞭毛。

**1.4.2 生理生化实验:** 生理生化实验的选取及操作参考《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[17]</sup>。

**1.4.3 菌株基因组的提取:** 将保藏的菌株接于 BSM 液体培养基, 30 °C、180 r/min 培养 24 h 作为种子液, 然后再取 1 mL 转接于新鲜的 BSM 液体培养基培养 24 h。取大于 3 mL 培养液, 4 000×g、4 °C 离心 10 min。完全弃去上清, 将细胞重悬于 180 μL TE buffer。用基因组提取试剂盒快速提取基因组 DNA, 提取好的基因组 DNA 在–20 °C 保藏。

**1.4.4 菌株 16S rRNA 基因序列 PCR 扩增及测序:** 以提取的基因组 DNA 为模板, 16S rRNA 基因通用引物(正向引物 27F : 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 反向引物 1492R : 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')进行 PCR 扩增。PCR 体系(50 μL) : 0.05 U/μL TaKaRa Taq 聚合酶 0.6 μL, 10×PCR buffer (Mg<sup>2+</sup>) 5 μL, 40 mmol/L dNTPs 4 μL, 基因组 DNA 模板 2 μL, 10 μmol/L 正/反向引物各 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 36.4 μL。PCR 条件 : 94 °C 4 min ; 94 °C 50 s, 52 °C 1 min, 72 °C 2 min, 29 个循环 ; 72 °C 10 min ; 16 °C 恒温。PCR 产物纯化和测序由上海 Invitrogen 公司完成。将菌株 16S rRNA 基因的测序结果在 NCBI 的 GenBank 利用 BLAST 进行序列比对及同源性分析。

#### 1.5 JY-Q 在基本培养基 BSM 中的尼古丁降解特性研究

在 250 mL 三角瓶中, 将 1 mL 种子液(细胞干重 0.36 mg)接种到 50 mL BSM 培养基中, 不同温度(25、30、37 °C)、不同 pH(5.0、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、9.0)和不同尼古丁含量(1–10 g/L)、180 r/min 摇床培养, 连续测定尼古丁的降解及菌体的生长状况, 考察温度、pH 和尼古丁浓度对 JY-Q 在 BSM 中的尼古丁降解和生长的影响。每个实验组均设 3 个平行实验。

#### 1.6 JY-Q 在废次烟草提取液(TWE)中的降解尼古丁研究

**1.6.1 TWE 起始 pH 对 JY-Q 降解 TWE 中尼古丁的影响:** 由于 TWE 中尼古丁和还原糖的浓度较高, 尼古丁浓度可达 18–20 g/L, 还原糖浓度可达 50–60 g/L, 所以需将 TWE 进行适当稀释才可进行微生物降解。首先将 TWE 浓缩液用蒸馏水稀释到浓度分别为 5%和 10%, 检测其起始 pH, 然后分别设置实验组(Experimental group, EG。将稀释后 TWE 的 pH 调到 7.0)和对照组(Control group, CG。不调整稀释后 TWE 的 pH), 每组设立 3 个平行实验, 分别以相同的接种量(0.8 mg/100 mL)接种 JY-Q 菌种子液于 50 mL 稀释至 5%和 10%的 TWE, 37 °C、180 r/min 摇床培养, 定时取样检测样品中尼古丁的浓度。

**1.6.2 JY-Q 在不同稀释浓度 TWE 中的降解尼古丁研究:** 将种子液分别以相同接种量(1.5 mg/100 mL)接种于 50 mL 稀释至 5%、10%、20%的 TWE 中, 37 °C、180 r/min 摇床培养, 连续取样, 检测尼古丁及 β-D-Glu 浓度。

**1.6.3 接种量对 JY-Q 降解 TWE 中尼古丁的影响:** 随着 TWE 浓度的提高, TWE 样品中尼古丁浓度也会逐渐升高, 为了提高菌体对样品中尼古丁的降解, 分别设置更高的接种量(3、5、10 mg/100 mL)的实验组来降解 10% TWE 和 20% TWE 中尼古丁, 每组设立 3 个平行实验, 定时取样检测样品中尼古丁的浓度。

**1.6.4 搅拌转速对 JY-Q 降解 TWE 中尼古丁的影响:** 根据已报道的微生物代谢尼古丁的途径<sup>[1-7]</sup>, 可知尼古丁降解过程是好氧过程。然而随着 TWE 浓度的升高, 样品中糖度、粘度都会大幅度提高, 搅拌转速将会直接影响发酵过程中 TWE 稀释液中的溶氧量。因此, 分别设置实验组: 将培养的恒温摇床的转速分别设置为 180 r/min 和 90 r/min 降解 10% 和 20% TWE 中的尼古丁, 每组设立 3 个平行实验, 均以 10 mg/100 mL 的接种量接种 JY-Q 菌种子液, 定时取样检测样品中尼古丁的浓度。

**1.6.5 葡萄糖的存在对 JY-Q 降解尼古丁的影响:** 根据 TWE 样品糖浓度高的特点, 糖物质的存在有可能会对菌株 JY-Q 降解尼古丁产生重要的影响。因此, 模拟 10% 和 20% 的 TWE 中尼古丁与葡萄糖浓度比例分别设置实验组和对照组: 实验组 1 (EG1): 在 100 mL BSM 培养基中分别添加 2 g/L 尼古丁和 4 g/L 葡萄糖; 对照组 1 (CG1): 在 100 mL BSM 培养基中只加入 2 g/L 尼古丁; 实验组 2 (EG2): 在 100 mL BSM 培养基中分别添加 4 g/L 尼古丁和 8 g/L 葡萄糖; 对照组 2 (CG2): 在 100 mL BSM 培养基中只加入 4 g/L 尼古丁; 以 10 mg/100 mL 的接种量接种 JY-Q 菌种子液, 定时取样检测样品中菌体生物量、尼古丁浓度以及糖浓度。

## 1.7 分析检测方法

**1.7.1 尼古丁含量检测:** 摇瓶培养液离心 (14 800 r/min, 10 min, 4 °C), 取上清液采用高效液相色谱 (HPLC) 测定尼古丁浓度。色谱条件: 色谱柱型号为 Agilent SB-C18 (4.6 mm×150 mm); 流动相采用双流动相: 甲醇 (色谱纯) 和 0.1 mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 3.0), 体积比为 10:90; 流速 1 mL/min, 检测波长 254 nm。

**1.7.2 生物量检测:** 培养液离心 (12 000 r/min, 10 min, 4 °C) 获得菌体, 用相同体积磷酸缓冲液 (0.05 mol/L, pH 7.0) 洗涤 3 次, 最后用相同体积的磷酸缓冲液悬浮菌体, 测定其 OD<sub>600</sub>, 通过 OD<sub>600</sub> 与菌体干重的数量关系换算成细胞干重。

**1.7.3 β-D-Glu 含量检测:** 摇瓶培养液先经离心 (14 800 r/min, 10 min, 4 °C) 处理, 上清液用生物

传感仪 (SBA-40C, 山东省科学院生物研究所) 测定 β-D-Glu 浓度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 样品中尼古丁降解菌的筛选和分离

从再造烟叶生产线上的水提液浓缩样品 (样品含有高浓度的尼古丁) 中进行微生物的培养和筛选, 经过对烟厂提供的再造烟叶生产工艺线的烟梗、烟末提取液 (母液、浓缩液) 4 种样品 (M1、M2、M3 和 M6) 进行富集、培养、纯化, 最后在以尼古丁为唯一碳氮源的 BSM 筛选平板上初筛获得 6 株尼古丁降解菌。然后在以尼古丁为唯一碳氮源的 BSM 液体培养基复筛, 在同样条件下, JY-Q 菌生长快而且菌浓度高, 是 6 株菌中降解效果最好的菌株, 因而选择 JY-Q 菌株进行后续的研究。

### 2.2 JY-Q 菌株鉴定

JY-Q 菌株在 LB 平板上的菌落呈浅黄色, 有金属光泽, 圆形, 凸起, 润泽, 边缘整齐, 无芽孢; 电镜观察菌体呈杆状, 大小为 (0.6–0.8) μm×(2.0–2.2) μm, 端生 1–2 根鞭毛 (图 1)。菌株能以尼古丁为唯一碳氮源和能源生长, 好氧, 革兰氏染色呈阴性, 4 °C 生长, 42 °C 不生长, 可以利用葡萄糖、果糖, 接触酶试验阳性, 甲基红试验阳性。JY-Q 的 16S rRNA 基因序列长度为 1 412 bp, 将测序结果提交至 GenBank, 获得登录号 KC963965。通过 BLAST 序列同源性分析, 菌株 JY-Q 与 *Pseudomonas* 一些菌株序列相似性高达 99% 以上。根据 16S rRNA 基因序列构建系统发育树 (图 2)。将菌株保存至中国典型培养物保藏中心, 保藏号为 CCTCC M 2013236。经形态学、部分生理生化特征测定和 16S rRNA 基因测序与系统树构建, 初步确定该菌株归属于假单胞菌, 命名为 *Pseudomonas* sp. JY-Q。

### 2.3 JY-Q 在基本培养基 BSM 中的尼古丁降解条件研究

**2.3.1 不同温度对 JY-Q 降解尼古丁和菌体生长的影响:** JY-Q 在 3 个培养温度 (25、30、37 °C) 中, 37 °C 时降解速率最快, 12 h 可将尼古丁含量为 2 g/L 的

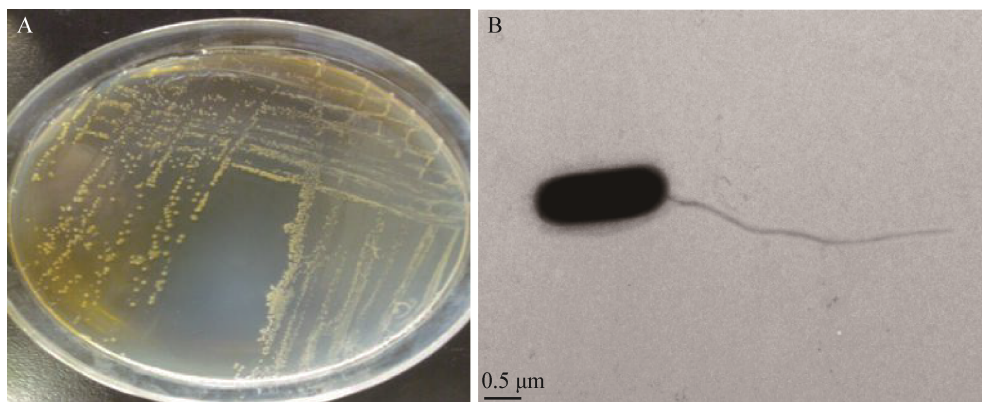


图1 JY-Q 菌落(A)和细胞电镜照片(B, 25 000×)

Figure 1 Colony (A) and cell electron micrograph of JY-Q (B, 25 000×)

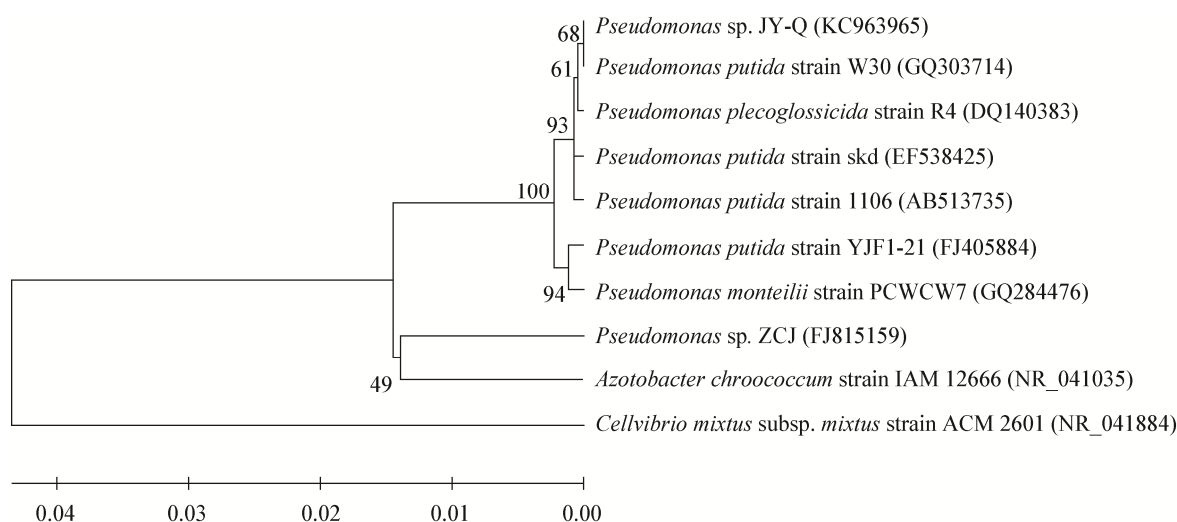


图2 基于 16S rRNA 基因序列分析构建的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of JY-Q

基本培养基完全降解(图 3)。但温度对 JY-Q 菌株降解尼古丁的影响并不显著。在 0–12 h, 温度越高, 细胞干重越大, 37 °C 培养 12 h 时达到最大值 0.612 g/L。37 °C 培养至 24 h 时, 由于尼古丁降解完全, 菌体生长缺乏碳氮源, 所以细胞干重出现下降。大部分假单胞菌降解尼古丁最适温度为 30 °C<sup>[8-9]</sup>, 而 JY-Q 最适温度为 37 °C, 这可能和它来源于 TWE 有关, 因为生产车间的 TWE 的醇化过程为 50 °C 左右储放一周。

**2.3.2 不同 pH 对 JY-Q 降解尼古丁和菌体生长的影响:** JY-Q 接种到不同起始 pH (5.0、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、9.0) 的含 2 g/L 尼古丁的 BSM 中, 37 °C、

180 r/min 摇床培养至 12 h 后检测培养基中尼古丁降解率和菌体生长量(图 4)。结果显示在 pH 为 6.5 和 7.0 的培养基中尼古丁降解率均达 100%; pH 为 7.5 和 8.0 的培养基中尼古丁降解率只有 54.11% 和 54.62%; pH 为 6.0 的培养基中尼古丁降解率为 83.22%; 可见, 培养基过酸和过碱不利于 JY-Q 菌株对尼古丁的降解, pH 为 5.0 和 9.0 的培养基中尼古丁降解率分别只有 6.25% 和 26.57%。但是, 菌体生长量却是 pH 为 7.0 的培养基最高。因此, JY-Q 菌株降解尼古丁的最适 pH 为 6.5–7.0, 而生长最适 pH 应为 7.0。这与大部分假单胞菌降解尼古丁最适 pH 7.0 是一致的<sup>[8-9]</sup>。

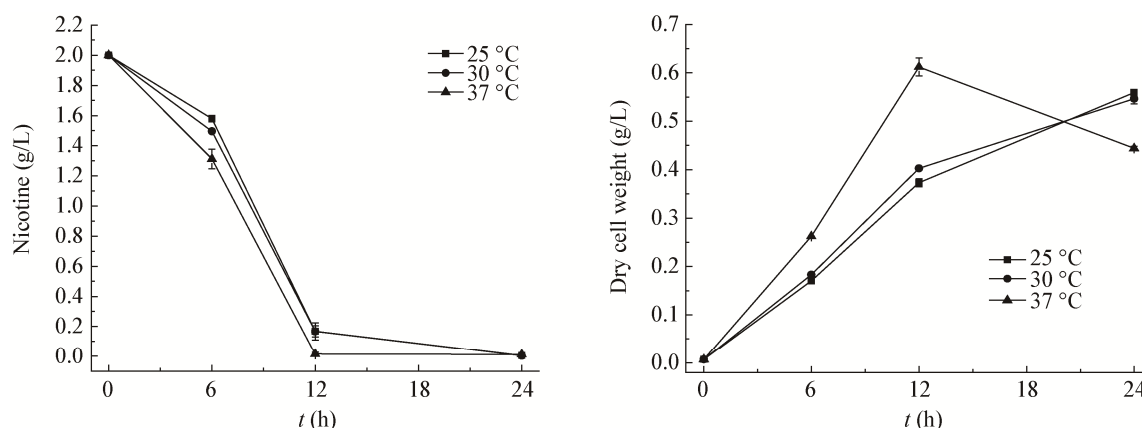


图3 温度对 JY-Q 降解尼古丁和菌体生长影响(尼古丁起始浓度 2 g/L)

Figure 3 Effect of culture temperature on nicotine degradation and growth of JY-Q (nicotine 2 g/L)

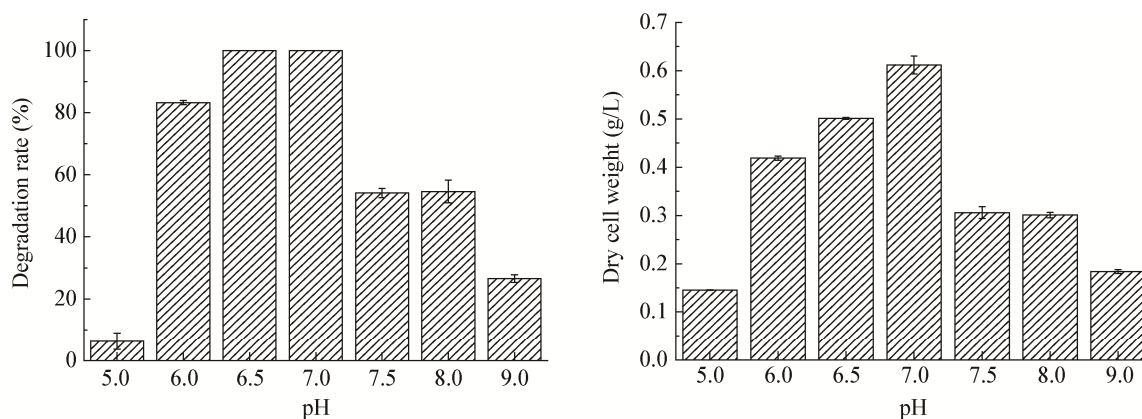


图4 pH 对 JY-Q 降解尼古丁和菌体生长影响(尼古丁浓度 2 g/L, 12 h)

Figure 4 Effect of pH on nicotine degradation and growth of JY-Q (nicotine 2 g/L, 12 h)

**2.3.3 不同尼古丁浓度对 JY-Q 降解和菌体生长的影响:** JY-Q 对低浓度的尼古丁降解效果很好, 12 h 可完全降解 3 g/L 尼古丁, 24 h 可完全降解 5 g/L 尼古丁, 相应菌体生长也较快(图 5)。JY-Q 对高浓度尼古丁的降解效果减弱, 但与已报道的可降解尼古丁的假单胞菌比较<sup>[10-16]</sup>, 其尼古丁耐受性要高出不少。JY-Q 在 10 g/L 尼古丁为唯一碳源和氮源的 BSM 中依然能够降解尼古丁和生长。而且, JY-Q 是直接来自再造烟叶生产工艺的烟梗、烟末提取液中分离获得的一种本土、高效和高耐受的尼古丁降解菌, 因此, JY-Q 会是最适合回用到再造烟叶生产工艺的菌株, 选择该菌株进行以下的 TWE 环境的降解条件

和特性研究。

## 2.4 JY-Q 在废次烟草提取液中尼古丁降解条件研究

**2.4.1 稀释后 TWE 起始 pH 对 JY-Q 降解 TWE 中尼古丁的影响:** 由于 TWE 中尼古丁和还原糖的浓度较高, 需将 TWE 进行适当稀释才可进行生物降解。但发现 TWE 浓缩液经蒸馏水稀释后, 其 pH 降低, 呈强酸性(表 1), 而 pH 对 JY-Q 降解尼古丁及其生长有重要的影响(图 4), 因此, 进行了稀释后 TWE 的 pH 调控, 考察其对尼古丁降解的影响。结果(图 6)显示, 在 5% 和 10% TWE 中, 若 pH 不调整, JY-Q 对尼古丁的降解率不高或不降解; 而调节 pH



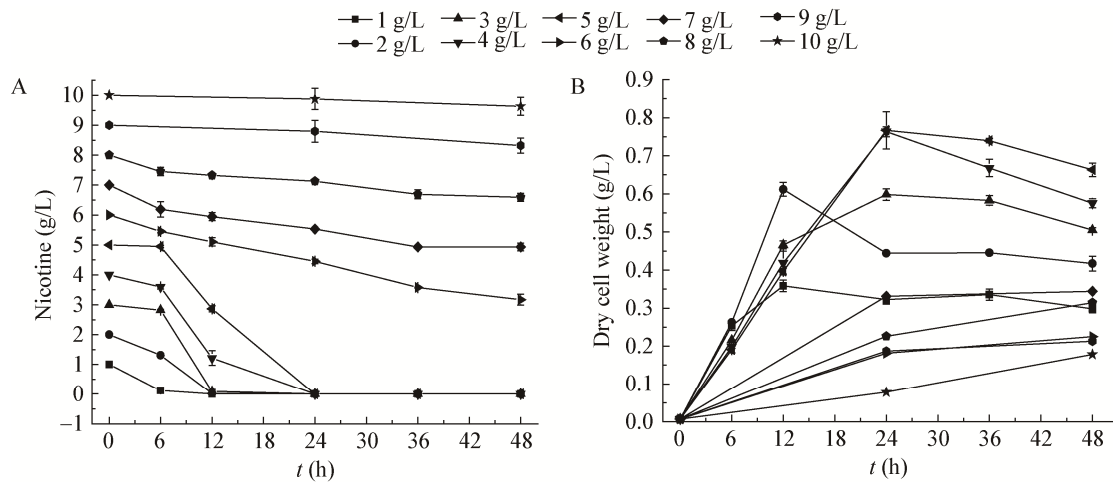


图 5 不同尼古丁浓度对 JY-Q 降解尼古丁(A)和菌体生长(B)影响

Figure 5 Effect of concentration of nicotine on nicotine degradation (A) and growth (B) of JY-Q

表 1 不同稀释度 TWE 的起始 pH  
Table 1 Initial pH of different diluted TWE

样品 Sample	起始 pH Initial pH
5% TWE	5.93
10% TWE	5.35
15% TWE	5.03
20% TWE	4.91

到 7.0 后, JY-Q 能加快对 TWE 中尼古丁的降解, 36 h 尼古丁降解率分别达到 100% (5% TWE) 和 33.4% (10% TWE)。

**2.4.2 JY-Q 在不同稀释浓度 TWE 中降解尼古丁和  $\beta$ -D-Glu 情况:** 考察了在 5%、10%、20% TWE 中尼古丁和  $\beta$ -D-Glu 的同步降解利用情况(图 7)。发

现 JY-Q 对尼古丁和  $\beta$ -D-Glu 的降解利用主要发生在 12 h 内。各稀释度的 TWE 中  $\beta$ -D-Glu 含量下降明显, 但是 12 h 内尼古丁降解率随 TWE 浓度提高而降低, 分别为 100% (5% TWE)、30.68% (10% TWE) 和 7.02% (20% TWE)。在高浓度的 TWE 中, 尼古丁和  $\beta$ -D-Glu 及其它成分浓度均会升高, 这些显然对尼古丁的降解产生了抑制作用。

**2.4.3 接种量对 JY-Q 降解 TWE 中尼古丁的影响:** 随着 TWE 浓度的提高, 样品中尼古丁和糖的浓度都等比例升高, 这些可能抑制了 JY-Q 菌对 TWE 中尼古丁的降解。提高接种量也许能提高 JY-Q 对高浓度 TWE 的尼古丁降解效果。因此, 考察了 JY-Q 菌的接种量对 JY-Q 菌尼古丁降解的影响。结果(图 8)

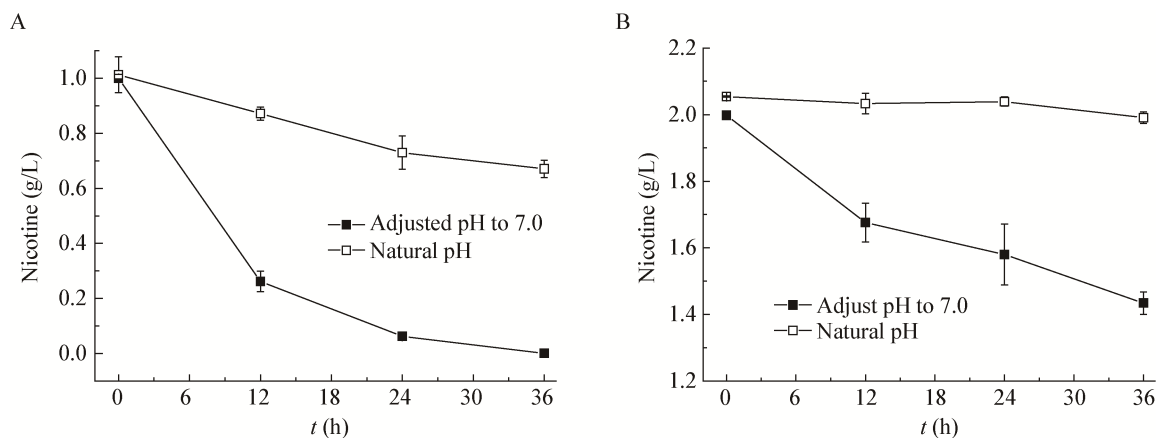


图 6 起始 pH 的调节对 JY-Q 降解 5% (A) 和 10% (B) TWE 中尼古丁的影响

Figure 6 Effect of initiative pH on nicotine degradation of 5% (A) and 10% (B) TWE by JY-Q

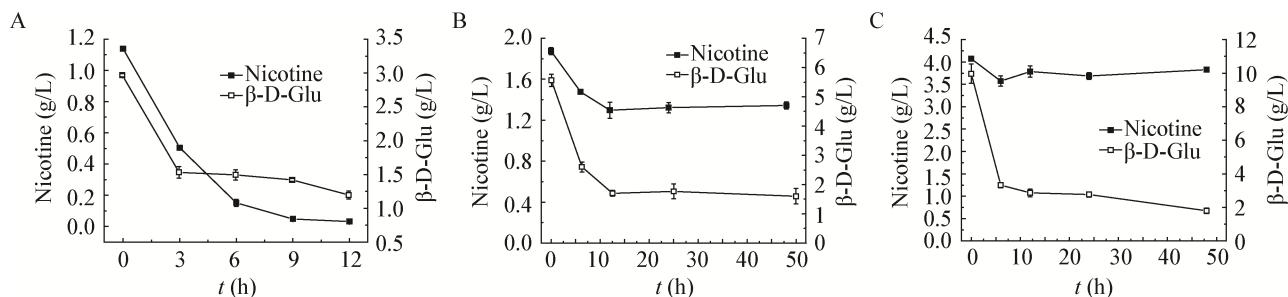
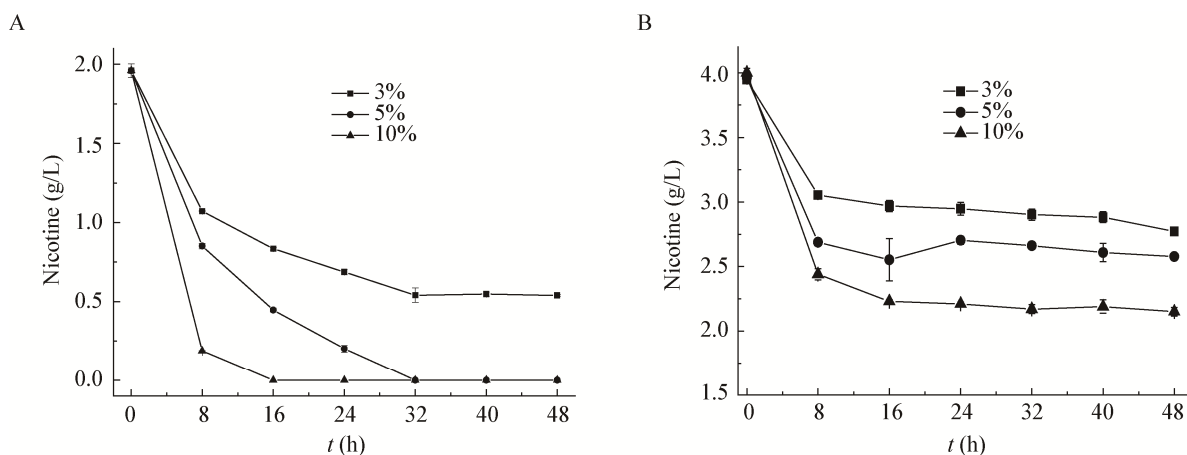
图7 JY-Q 在 5% (A)、10% (B)、20% (C) TWE 中对尼古丁和  $\beta$ -D-Glu 的降解Figure 7 Nicotine and  $\beta$ -D-Glu degradation in 5% (A), 10% (B), and 20% (C) TWE by JY-Q

图8 接种量对 JY-Q 降解 10% (A)和 20% (B) TWE 中尼古丁的影响

Figure 8 Effect of inoculum size on nicotine degradation of 10% (A) and 20% (B) TWE by JY-Q

显示随着接种量的增加, JY-Q 菌对在 10%和 20% TWE 中尼古丁降解速率均大幅度提高。前者由 72% (48 h)提高到了 100% (16 h);后者由 24% (48 h)提高到 46% (48 h);同时发现 20% TWE 中尼古丁的降解主要发生在前 16 h,此后对尼古丁降解明显变缓慢直至不再降解。继续增加接种量可能会提高 JY-Q 菌对高浓度 TWE 中尼古丁的降解,但会大幅度增加种子液培养的工作量,从而对后期发酵罐放大发酵试验的实施带来更多问题,所以选择 10%的接种量为合适的 JY-Q 接种量。

**2.4.4 搅拌转速对 JY-Q 降解 TWE 中尼古丁的影响:** 尼古丁降解过程是耗氧过程,摇瓶转速的高低直接影响着培养液中的溶氧量,从而影响降解效果。因而考察了搅拌转速对 JY-Q 降解 TWE 中尼古丁的影响。结果(图 9)显示, 24 h 内, 高转速组的尼古丁降解率均比低转速组要高。在 10% TWE 中, 高转速

组达到 100%,而低转速组只有 77.5%;在 20% TWE 中, 高转速组达到了 32%,而低转速组的只有 25.3%。另外, 20% TWE 中的尼古丁降解率都比 10% TWE 低,可能是高浓度 TWE 中粘度影响了溶氧量。适当的提高转速有利于其溶氧,但高浓度 TWE 中的溶氧量仍然不足,从而限制了尼古丁的降解。

**2.4.5 葡萄糖的存在对 JY-Q 降解尼古丁的影响:** 从图 7 可以看出, TWE 中葡萄糖可以同时被菌株 JY-Q 利用,而且可能影响了 JY-Q 对尼古丁的降解效果。为了考证葡萄糖对 JY-Q 的这种影响,模拟 TWE 中尼古丁与葡萄糖浓度比例设计 BSM 培养基进行对比实验。首先,模拟了 10% TWE 的葡萄糖和尼古丁比例(4:2),在 2 g/L 尼古丁 BSM 中加入 4 g/L 葡萄糖为实验组(EG1),不加葡萄糖为对照组(CG1)。结果(图 10A、B)显示,实验组(EG1) JY-Q 的生长明显比对照组(CG1)好,但尼古丁降解



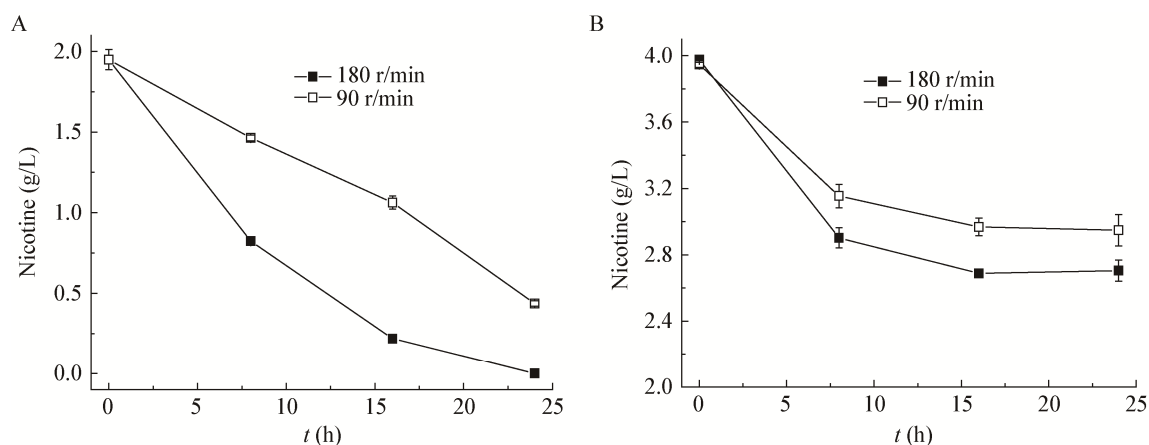


图9 搅拌转速对JY-Q降解10% (A)和20% (B) TWE中尼古丁的影响

Figure 9 Effect of stirring speed on nicotine degradation of 10% (A) and 20% (B) TWE by JY-Q

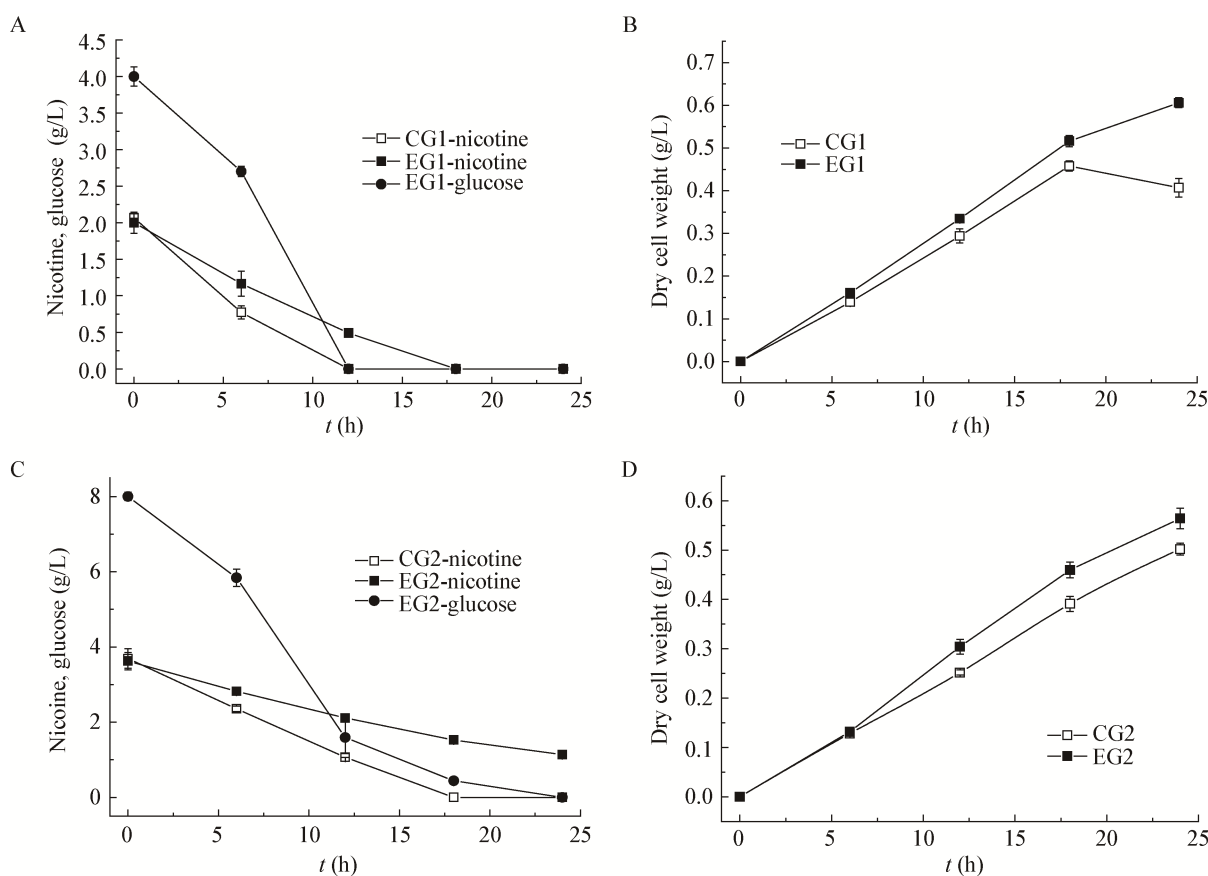


图10 含2 g/L尼古丁BSM中加入4 g/L葡萄糖(A、B)和含4 g/L尼古丁BSM中加入8 g/L葡萄糖(C、D)对JY-Q降解尼古丁及其生长的影响

Figure 10 Effect of added 4 g/L (A, B) and 8 g/L (C, D) glucose on nicotine degradation and its growth of JY-Q in BSM containing 2 g/L and 4 g/L nicotine respectively

速率明显降低。对照组 CG1 到 12 h 时尼古丁降解率就达到 100%，而添加葡萄糖的 EG1 到 12 h 时葡萄糖利用率为 100%，但尼古丁降解率在 18 h 时才达到 100%。当葡萄糖和尼古丁同时存在时，JY-Q 可以在利用尼古丁的同时利用葡萄糖，使菌体的生物量快速增加，但是尼古丁的降解会受到影响。同时，模拟了 20% TWE 的葡萄糖和尼古丁比例(8:4)，在 4 g/L 尼古丁 BSM 中加入 8 g/L 葡萄糖为实验组(EG2)，不加葡萄糖为对照组(CG2)。结果(图 10C、D)同样显示实验组(EG2) JY-Q 菌的生长比对照组(CG2)好，但尼古丁降解速率明显降低了。对照组(CG2)在 18 h 时尼古丁降解率即达到 100%，而添加葡萄糖组(EG2)在 24 h 时葡萄糖利用率达到了 100%，但尼古丁降解率还只有 68.7%，发酵液中残留约 1.14 g/L 尼古丁。因此，葡萄糖的存在会对尼古丁的降解速率产生影响，葡萄糖的存在对 JY-Q 降解 TWE 中尼古丁有抑制作用。葡萄糖可能竞争性抑制尼古丁代谢途径，也可能通过转录调节因子(NicR2)与降解关键基因簇结合，从而抑制尼古丁的降解，这些有待进一步研究<sup>[18]</sup>。

### 3 结论

本研究从 TWE 样品中筛选分离并获得了一株尼古丁降解菌，经鉴定可初步确定为假单胞菌属，并命名为 *Pseudomonas* sp. JY-Q。与已有文献报道的尼古丁降解菌相比较，JY-Q 具有更强的尼古丁耐受能力，可耐受 10 g/L 尼古丁，而已报道的菌株最高耐受浓度为 6 g/L 尼古丁<sup>[8,14]</sup>。此外，JY-Q 还具有很强的尼古丁降解能力，可在 24 h 内完全降解 5 g/L 的尼古丁。因此 *Pseudomonas* sp. JY-Q 在 TWE 和水体环境尼古丁的降解方面有很好的应用前景，但共存的葡萄糖对 JY-Q 降解尼古丁有抑制作用，其机制和解除有待深入研究。

### 参 考 文 献

- [1] Brandsch R. Microbiology and biochemistry of nicotine degradation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 69(5): 493-498
- [2] Baitsch D, Sandu C, Brandsch R, et al. Gene cluster on pAO1 of *Arthrobacter nicotinovorans* involved in degradation of the plant alkaloid nicotine: cloning, purification, and characterization of 2,6-dihydroxypyridine 3-hydroxylase[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(18): 5262-5267
- [3] Holmes PE, Rittenberg SC. The bacterial oxidation of nicotine. VII. Partial purification and properties of 2,6-dihydroxypyridine oxidase[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1972, 247(23): 7622-7627
- [4] Knackmuss HJ, Beckmann W. The structure of nicotine blue from *Arthrobacter oxidans*[J]. Archiv für Mikrobiologie, 1973, 90(2): 167-169
- [5] Sindelar RD, Rosazza JP, Barfknecht CF. N-Demethylation of nicotine and reduction of nicotine-1'-N-oxide by *Microsporium gypseum*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1979, 38(5): 836-839
- [6] Uchida S, Maeda S, Kasaki T. Conversion of nicotine into norm nicotine and N-methylmyosmine by fungi[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1983, 47(9): 1949-1953
- [7] Tang H, Wang L, Wang W, et al. Systematic unraveling of the unsolved pathway of nicotine degradation in *Pseudomonas*[J]. PLoS Genetics, 2013, 9(10): e1003923
- [8] Wang SN, Xu P, Tang HZ, et al. Biodegradation and detoxification of nicotine in tobacco solid waste by a *Pseudomonas* sp.[J]. Biotechnology Letters, 2004, 26(19): 1493-1496
- [9] Zhong WH, Zhu CJ, Shu M, et al. Degradation of nicotine in tobacco waste extract by newly isolated *Pseudomonas* sp. ZUTSKD[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(18): 6935-6941
- [10] Wada E, Yamasaki K. Degradation of nicotine by soil bacteria[J]. Journal of the American Chemical Society, 1954, 76(1): 155-157
- [11] Thacker R, Rørvig O, Kahlon P, et al. NIC, a conjugative nicotine-nicotinate degradative plasmid in *Pseudomonas convexa*[J]. Journal of Bacteriology, 1978, 135(1): 289-290
- [12] Ruan AD, Min H, Peng XH, 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
- [13] Chen CM, Li XM, Yang JK, et al. Isolation of nicotine-degrading bacterium *Pseudomonas* sp. Nic22, and its potential application in tobacco processing[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2008, 62(3): 226-231
- [14] Wan H, Zhao HG, Song JZ, et al. Screening, identification and degradation characteristics of high concentration nicotine degradation bacterium strain[J]. Tobacco Science & Technology, 2009(4): 50-53, 64 (in Chinese)  
万虎, 赵海刚, 宋纪真, 等. 高浓度烟碱降解菌的筛选、鉴定及降解特性[J]. 烟草科技, 2009(4): 50-53, 64
- [15] Wang HH, Yin B, Peng XX, et al. Biodegradation of nicotine by newly isolated *Pseudomonas* sp. CS3 and its metabolites[J]. Journal of Applied Microbiology, 2012, 112(2): 258-268
- [16] Qiu JG, Ma Y, Chen LS, et al. A *sirA*-like gene, *sirA2*, is essential for 3-succinoyl-pyridine metabolism in the newly isolated nicotine-degrading *Pseudomonas* sp. HZN6 strain[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 92(5): 1023-1032
- [17] Dong XZ, Cai MY. System Identification Manual of Common Bacteria[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese)  
东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001
- [18] Wang LJ, Tang HZ, Yu H, et al. An unusual repressor controls the expression of a crucial nicotine-degrading gene cluster in *Pseudomonas putida* S16[J]. Molecular Microbiology, 2014, 91(6): 1252-1269