

利用 DN2 菌株对烟草工业废弃物中的烟碱降解的工艺参数优化

袁勇军^{*}, 陆兆新^{*}, 别小妹, 吕凤霞, 李颖, 黄现青, 滕雅琴
(南京农业大学食品科技学院, 农业部农畜产品加工与质量控制重点开放实验室, 南京 210095)

摘要: 利用 *Ochrobactrum intermedium* DN2 对烟草废弃物中烟碱进行降解。采用 Box-Behnken 法研究和探讨初始 pH 值、接种量和温度对菌株 DN2 降解烟碱的影响, 获得了二次模型。结果表明, 该模型极显著。在 $\alpha = 0.05$ 水平下, 各因素对烟碱降解率的线性效应和曲面效应皆显著; 初始 pH 值与接种量, 接种量与温度的交互作用显著, 而初始 pH 值与温度的交互作用不显著。通过对二次方程求解得知, pH 值为 7.27, 接种量为 14.93 g/L, 培养温度为 31.85℃ 时, 烟碱降解率的最大预测值为 66.13%, 而实测值为 64.82%, 证明模型合适有效。在上述最适培养条件下, 考察了菌株 DN2 对烟草废弃物中烟碱的降解过程。结果表明, 36 h 烟碱降解率为 83.83%, 其降解过程符合 Monod 模型的零级反应, 动力学方程为: $C(t) = -46.977t + 2244.7, r = 0.9595$ 。本试验结果证明 *O. intermedium* DN2 具有实际应用价值。

关键词: 烟草废弃物; 烟碱; 生物降解; *O. intermedium* DN2; Box-Behnken 设计

中图分类号: S38; S572; S182

文献标识码: A

文章编号: 1002-6819(2006)12-0185-04

袁勇军, 陆兆新, 别小妹, 等. 利用 DN2 菌株对烟草工业废弃物中的烟碱降解的工艺参数优化[J]. 农业工程学报, 2006, 22(12): 185-188.

Yuan Yongjun, Lu Zhaoxin, Bie Xiaomei, et al. Degradation of nicotine in tobacco waste extract by *O. intermedium* DN2 [J]. Transactions of the CSAE, 2006, 22(12): 185-188. (in Chinese with English abstract)

0 引言

烟碱是多数烟草中主要的生物碱, 既是成瘾物质又是烟碱和有毒物质^[1]。在烟叶种植、运输和加工过程中会产生大量的固体、液体和气体废弃物, 其中烟碱的平均含量高达 18 g 烟碱/kg 干重^[2]。据报道^[3], 中国烟草的种植面积和产量均居世界首位, 每年烟叶产量为 450 ~ 500 万 t, 其中 25% 的烟叶、烟末等下脚料被废弃。这些废弃物若不加处理直接丢弃到环境中, 会破坏生态环境, 危害人类的健康。欧盟和美国对这类废弃物的排放进行了严格控制^[2, 4]。目前, 国外研究者已从环境中分离了多种烟碱降解菌^[5-8], 尤其对节杆菌属细菌代谢烟碱的机理研究较多, 而应用研究较少且多见于专利文献^[2, 5, 9-11]。而中国在这方面的研究才刚刚起步^[12-14]。实践证明, 生物降解法是去除或减少烟草废弃物中烟碱的有效途径。

Box-Behnken 法不仅是进行生物过程优化的设计法, 也是建立连续变量模型的有力工具。该法综合试验设计和数学建模, 通过局部试验回归拟合因素与结果间的全局函数关系, 对影响生物产量的各因子水平及其交互作用进行优化与评价。与传统优化方法相比, Box-Behnken 法所需的试验组数相对较少, 可节省人力物力^[15]。该法已经广泛地应用于各类培养基以及发酵条件的优化^[16, 17]。

本实验室从土壤中分离到一株新的烟碱降解细菌, 鉴定为 *Ochrobactrum intermedium* DN2^[12, 18]。本研究通过 Box-Behnken 法对其降解废弃烟叶中烟碱的外界条件进行优化, 为其实际应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

菌株 DN2, 本实验室从土壤中分离并保存。

1.2 培养基配制

种子培养基参照文献[19]进行; 基础培养基参照文献[12]进行。

1.3 菌悬液的制备

将 32℃、120 r/min 条件下培养 36 h 的种子液以 5% 的比例接入盛有 100 mL 基础培养基(含 500 mg/L 烟碱)的 250 mL 三角瓶中, 30℃、120 r/min 摇床培养 36 h, 然后将培养液 10000 r/min 离心 10 min, 洗涤, 最后配制成一定浓度的菌悬液。

1.4 烟草废弃物水提液的制备

1) 烟草废弃物: 取自安徽蚌埠卷烟厂。

2) 水提液的制备: 取烟草废弃物 100 g, 加入 1000 mL 蒸馏水, 过夜, 水提液用蒸馏水定容至 1000 mL, 121℃ 高压蒸汽灭菌 30 min, 待水提液冷却后用灭过菌的 4N NaOH 或 1N HCl 将 pH 值调到试验要求的值, 备用。烟碱的初始浓度为 2252.32 mg/L。

1.5 烟碱的测定

高效液相色谱法, 参照文献[20]进行。

1.6 试验设计

先前的 Plackett-Burman 试验表明(另文发表), 培养基初始 pH 值、接种量以及培养温度对烟碱降解具有重要的影响。为获得上述 3 个因子的最佳水平范围, 采

收稿日期: 2005-09-22 修订日期: 2006-04-28

作者简介: 袁勇军(1976-), 博士, 研究方向为食品微生物及其生物技术。南京 南京农业大学食品科技学院, 210095

*通讯作者: 陆兆新(1957-), 博士, 教授, 南京 南京农业大学食品科学院, 210095。Email: fmb@njau.edu.cn

用 Box-Behnken 设计进行了 17 组试验。对于不显著的其它外界因子,如装液量、摇床转速等,皆选择在原先的合适水平,即装液量为 100 mL/250 mL 三角瓶,摇床转速为 120 r/min。

实际考察的变量及其实验水平编码见表 1, Box-Behnken 设计见表 2。

表 1 试验因素水平及其编码表

Table 1 Levels and codes of factors chosen for Box-Behnken

变 量	代码*		编码水平		
	未编码	编码	- 1	0	1
初始 pH 值	X_1	x_1	6	7.5	9
接种量/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	X_2	x_2	5	12.5	20
温度/ $^{\circ}\text{C}$	X_3	x_3	28	32.5	37

注: * $x_1 = (X_1 - 7.5)/0.5$; $x_2 = (X_2 - 12.5)/7.5$;
 $x_3 = (X_3 - 32.5)/4.5$ 。

表 2 Box-Behnken 设计及其试验结果表

Table 2 Box-Behnken experimental design matrix with experimental and predicted values of nicotine degradation rate

实验编号	x_1	x_2	x_3	烟碱降解率/%	
				实测值	预测值
1	- 1	- 1	0	41.61	41.56
2	1	- 1	0	40.32	42.32
3	- 1	1	0	58.32	56.32
4	1	1	0	47.67	47.72
5	- 1	0	- 1	44.82	46.34
6	1	0	- 1	43.87	43.35
7	- 1	0	1	41.03	41.55
8	1	0	1	38.23	36.70
9	0	- 1	- 1	36.65	35.17
10	0	1	- 1	53.07	53.54
11	0	- 1	1	38.23	37.76
12	0	1	1	38.06	39.53
13	0	0	0	64.52	64.96
14	0	0	0	63.65	64.96
15	0	0	0	64.71	64.96
16	0	0	0	66.74	64.96
17	0	0	0	65.18	64.96

2 结果与分析

2.1 烟碱降解率多元二次模型方程的建立及检验

Box-Behnken 试验结果见表 2。通过 Design expert 软件对表 2 试验数据进行二次多项回归拟合,获得烟碱降解率对培养基初始 pH 值、接种量以及培养温度二次多项式回归方程为

$$y = 64.96 - 1.96x_1 + 5.04x_2 - 2.86x_3 - 8.75x_1^2 - 9.23x_2^2 - 14.23x_3^2 - 2.34x_1x_2 - 0.46x_1x_3 - 4.15x_2x_3 \quad (1)$$

式中 y ——烟碱降解率的预测值; x_1 、 x_2 、 x_3 ——分别

为初始 pH 值、接种量以及培养温度编码值。

由方程(1)的方差分析(表 3)可见,该模型极显著($P < 0.0001$),失拟项在 $\alpha = 0.05$ 水平上不显著($P = 0.0865 > 0.05$)。该模型的相关系数 $R = 0.9945$,表明模型与实际情况拟合很好,因此该模型可用于预测烟碱的实际降解情况。

回归方程各项系数的方差分析表明(表 3),各因素对烟碱降解率的线性效应和曲面效应皆显著;初始 pH 值与接种量,接种量与温度的交互作用显著,而初始 pH 值与温度的交互作用不显著。

表 3 烟碱降解率二次多项模型及其各项的方差分析表

Table 3 Analysis of variance(ANOVA) for the fitted quadratic polynomial model

变异源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	2091.26	9.00	232.36	70.11	< 0.0001
X_1	30.74	1.00	30.74	9.28	0.0187
X_2	202.99	1.00	202.99	61.25	0.0001
X_3	65.31	1.00	65.31	19.71	0.0030
X_1^2	322.23	1.00	322.23	97.23	< 0.0001
X_2^2	358.89	1.00	358.89	108.29	< 0.0001
X_3^2	852.08	1.00	852.08	257.10	< 0.0001
X_1X_2	21.91	1.00	21.91	6.61	0.0370
X_1X_3	0.86	1	0.86	0.26	0.6261
X_2X_3	68.84	1	68.84	20.77	0.0026
失拟项	18.01	3	6.00	4.63	0.0865
误差项	5.19	4	1.30		
总和	2114.46	16			

$R = 0.9945$ $R^2 = 0.9890$ $R_{adj}^2 = 0.9749$

2.2 烟碱降解率响应面交互作用与优化

由方程(2)所作的响应曲面图见图 1-3。各因素及其交互作用对响应值的影响结果可通过该组图直观反映出来。当初始 pH 值为 6.72~7.83、接种量为 12.26~17.63 g/L、温度 30.57~33.14 $^{\circ}\text{C}$ 时,可使烟碱降解率大于 64.96%(本试验中心点预测值)。通过对模型进行求导和解逆矩阵,可以得到模型的极值点:初始 pH 值为 7.27,接种量为 14.93 g/L,温度为 31.85 $^{\circ}\text{C}$,此时模型预测的烟碱降解率为 66.13%。

2.3 菌株 DN2 对烟碱降解的时间过程曲线

在上述优化的条件下,菌株 DN2 对烟草废弃物中烟碱(烟碱浓度为 2252.32 mg/L)的降解过程曲线见图 4。从图中可以看出,在烟碱降解过程中,由于菌株经过烟碱的诱导,几乎没有延滞期,0~12 h 烟碱降解相对缓慢,12~36 h 降解速度快,36 h 时的烟碱降解率为 83.83%。对试验数据进行模拟,发现该降解曲线符合 Monod 方程的零级反应,其动力学方程为: $C(t) = -46.977t + 2244.7$ ($r = 0.9595$)。此外,24 h 时烟碱降解率为 64.82%,与模型(2)的预测值 66.13%接近,证明模型合适有效,并具有实际指导意义。

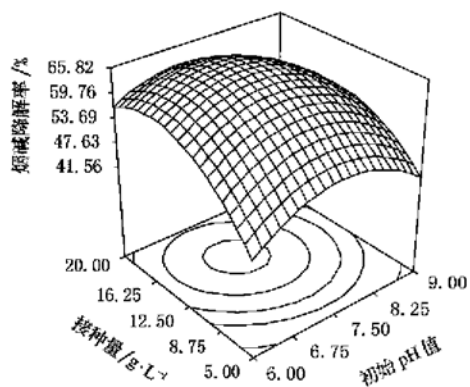


图 1 初始 pH 值和接种量交互影响烟碱降解率的响应面图 ($X_3 = 31.85^\circ\text{C}$)

Fig. 1 Response surface plot of initial pH value vs. inoculum level on nicotine degradation rate ($X_3 = 31.85^\circ\text{C}$)

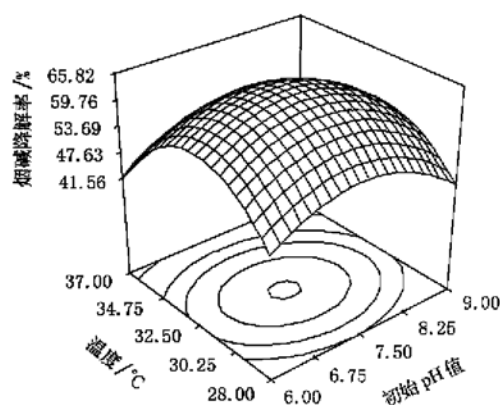


图 2 初始 pH 值和温度交互影响烟碱降解率的响应面图 ($X_2 = 14.93 \text{ g/L}$)

Fig. 2 Response surface plot of initial pH value vs. temperature on nicotine degradation rate ($X_2 = 14.93 \text{ g/L}$)

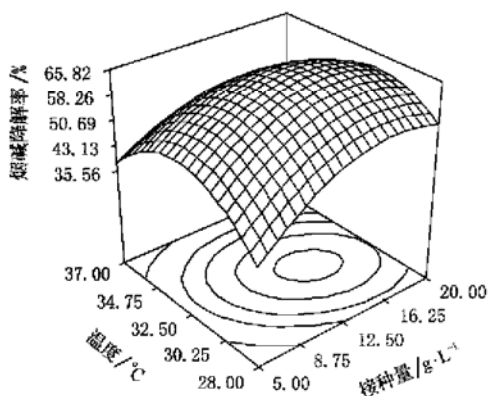


图 3 接种量和温度交互影响烟碱降解率的响应面图 ($X_1 = 7.27$)

Fig. 3 Response surface plot of inoculum level value vs. temperature on nicotine degradation rate ($X_1 = 7.27$)

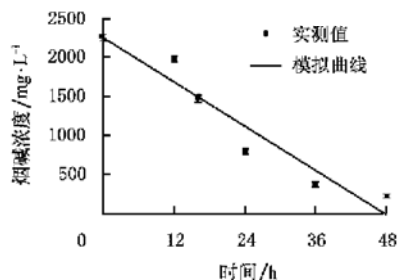


图 4 最适培养条件下菌株 DN2 对烟草废弃物水提液中烟碱的降解

Fig. 4 Degradation of nicotine in extract of tobacco waste by strain DN2 under optimal conditions

3 结 论

1) 通过 Box-Behnken 试验法建立了初始 pH 值、接种量和培养温度对烟碱降解率的二次多项数学模型。该模型极显著 ($P < 0.0001$), 失拟项在 $\alpha = 0.05$ 水平上不显著 ($P = 0.0865 > 0.05$)。模型各项系数的方差分析表明, 各因素对烟碱降解率的线性效应和曲面效应皆显著; 初始 pH 值与接种量, 接种量与温度的交互作用显著, 而初始 pH 值与温度的交互作用不显著。模型的相关系数 $R = 0.9945$, 表明模型与实际情况具有较好的拟合度, 该模型可用于预测烟碱的实际降解情况。

2) 通过对模型 (1) 进行求导和解逆矩阵, 可以得到模型的极值点为初始 pH 值为 7.27、接种量为 14.93 g/L、温度为 31.85°C, 此时模型预测的烟碱降解率为 66.13%, 而实测值为 64.82% (图 4), 证明模型有效。

3) 菌株 DN2 能够降解烟草水提液中的烟碱 (图 4), 36 h 时的烟碱降解率为 83.83% (图 4), 证明该菌具有实际应用价值。在最适培养条件下, 经过烟碱诱导的菌株 DN2 对烟草水提液中烟碱 (初始浓度为 2252.32 mg/L) 的降解过程符合 Monod 方程的零级反应, 其动

力学方程为: $C(t) = - 46.977t + 2244.7, r = 0.9595$ 。

[参 考 文 献]

[1] Benowitz N J. Cigarette smoking and nicotine addiction [J]. Medical Clinics of North America, 1992, 76: 415-437.

[2] Civilini M, Domenis C, Sebastianutto N, et al. Nicotine decontamination agro-industrial waste and its degradation by microorganisms [J]. Waste Manage Research, 1997, 15: 349-358.

[3] 杨 华. 从烟草废弃物中提取天然烟碱技术的研究 [J]. 环境导报, 1994, (5): 14-15.

[4] US Environmental Protection Agency. Emergency planning and community right-to-know section 313: list of toxic chemicals [R]. Washington D C. Environmental Protection Agency, 1996.

[5] Gravely L E, Lawrence E, Geiss V L, et al. Process for reduction of nitrate and nicotine content of tobacco by microbial treatment [P]. US: 4557280, 1978-07-15.

[6] Giovannozzi S G. *Arthrobacter nicotianae*, a new type of *Arthrobacter* causing nicotine degradation [J]. Cerosta,

- 1959, 3: 2595.
- [7] Uchida S, Maeda S, Masubuchi T, et al. Isolation of nicotine-degrading bacteria and degradation of nicotine in shredded tobacco and tobacco extract[J]. Nippon Sembai Kosha Chou Kenkyusho Kenkyu Hokoku, 1976, 118: 197–201.
- [8] Schenk S, Hoelz A, Krauß B, et al. Gene structures and properties of enzymes of the plasmid-encoded catabolism of *Arthrobacter nicotinovorans* [J]. Journal of Molecular Biology, 1998, 284: 1323–1339.
- [9] Ireland M S, Larson T M, Moring T M. Nicotine transfer process[P]. US Patent: 4215706, 1980-08-05.
- [10] Lenkey A A. Nicotine removed process and product produced thereby: mixing with alkaline agent in aerobic environment[P]. US Patent: 4848373, 1989-07-18.
- [11] Meher K K, Panchwagh A M, Rangrass S, et al. Biomethanation of Tobacco Waste [J]. Environmental Pollution, 1995, 90(2): 199–202.
- [12] 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[J]. 微生物学报, 2005, 45(2): 181–184.
- [13] Ruan A D, Min H, Peng X H, et al. Isolation and characterization of *Pseudomonas* sp. Strain HF-1, capable of degrading nicotine[J]. Research in Microbiology, 2005, 265: 700–706.
- [14] Wang S N, Xu P, Tang H Z, et al. Biodegradation and detoxification of nicotine in tobacco solid waste by a *Pseudomonas* sp. [J]. 2004, 26: 1493–1496.
- [15] Ambati P, Ayyanna C. Optimizing medium constituents and fermentation conditions for citric acid production from palmyra jaggery using response surface method[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2001, 17: 331–335.
- [16] Lai L S T, Pa C C, Tzeng B K. The influence of medium design on lovastatin production and pellet formation with a high-producing mutant of *Aspergillus terreus* in submerged cultures[J]. Process Biochemistry, 2003, 38: 1317–1326.
- [17] Rigas F, Dritsa V, Marchant R, et al. Biodegradation of lindane by *Pleurotus ostreatus* via central composite design [J]. Environment International, 2005, 31: 191–196.
- [18] 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.
- [19] 袁勇军, 黄丽金, 陆兆新, 等. 烟碱降解细菌 *Ochrobactrum intermedium* DN2 培养基及培养条件的优化研究[J]. 中国生物工程杂志, 2005, 25(1): 41–45.
- [20] 杨娟, 张迪清, 何照范, 等. 高效液相色谱法测定烟草中的烟碱含量[J]. 烟草科技, 1999, (1): 27–28.

Degradation of nicotine in tobacco waste extract by *O. intermedium* DN2

Yuan Yongjun, Lu Zhaoxin^{*}, Bie Xiaomei, Lü Fengxia, Li Ying, Huang Xianqing, Teng Yaqin

(College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Key Laboratory of Food Processing and Quality Control of Ministry of Agriculture, Nanjing 210095, China)

Abstract: In this study, the effects of the initial pH value, the levels of inoculum and culture temperature on nicotine degradation were investigated in flasks using a novel nicotine-degrading bacterium, *Ochrobactrum intermedium* DN2. A Box-Behnken experimental design was applied in the design of experiments and in the analysis of the experimental data. When $\alpha = 0.05$, three linear coefficients and all quadratic coefficients were significant. Among the interaction effects, the interaction coefficients of the initial pH value *vs.* levels of inoculum, levels of inoculum *vs.* culture temperature were significant, while the interaction coefficient of the initial pH value *vs.* culture temperature was not significant. The experimental data also allowed the development of an empirical model describing the interrelationship between independent and dependent variables. By solving the regression equation, the optimal values of the variables were determined as follows: the initial pH value of 7.27, level of inoculum of 14.93 g/L, temperature 31.85°C, with the corresponding $Y = 66.13\%$, while actual value was 64.82%, indicating that the model is satisfactory and practicable. Under these conditions, process of nicotine degradation in tobacco waste extract was also carried out. The results showed that 83.83% of nicotine was degraded in 36 h, the degradation process of nicotine followed zero-order reaction of Monod model. These results indicate that strain DN2 is of application value in nicotine pollution treatment.

Key words: tobacco waste; nicotine; biodegradation; strain DN2; Box-Behnken design