

聚乙烯醇双酶降解工艺条件优化

赵一凡^{1,2}, 刘松^{1,2}, 李江华^{*1,2}, 堵国成^{1,2}, 陈坚^{1,2}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 作为纺织和造纸工业中的重要污染物,聚乙烯醇(PVA)的高效降解广受关注。为提高PVA的降解效率,本研究中对PVA脱氢酶(PVADH)和氧化型PVA水解酶(OPH)降解PVA的工艺条件进行了优化。通过Box-Behnken实验和响应面分析,确定PVA双酶降解的反应条件为:PVA 1 g/L,PVADH 123 U/mL,OPH 12 U/mL,pH 7.7,酶解温度 41 °C,Ca²⁺浓度 1 mmol/L,PQQ 浓度 6 μmol/L。在该条件下PVADH和OPH共同催化4 h,PVA降解率达到95%以上。上述结果表明,PVADH和OPH双酶能有效降解PVA。研究结果将促进酶法降解PVA的工业化应用。

关键词: 聚乙烯醇;PVA脱氢酶;氧化型PVA水解酶;Box-Behnken实验;响应面法

中图分类号:Q 814.9 文章编号:1673-1689(2019)06-0034-07 DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.06.005

Optimization of Two-Step Enzymatic Degradation of Polyvinyl Alcohol

ZHAO Yifan^{1,2}, LIU Song^{1,2}, LI Jianghua^{*1,2}, DU Guocheng^{1,2}, CHEN Jian^{1,2}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: As one of the most important pollutants in textile and paper industries, polyvinyl alcohol (PVA) has caused much attention. To improve the degradation efficiency, the reaction conditions of PVA degradation by using polyvinyl alcohol dehydrogenase (PVADH) and oxidized polyvinyl alcohol hydrolase (OPH) were optimized. Based on the Box-Behnken design and response surface strategy, optimal conditions were set as follows: PVA 1 g/L, PVADH 123 U/mL, OPH 12 U/mL, pH 7.7, reaction temperature at 41 °C, Ca²⁺ 1 mmol/L, PQQ 6 μmol/L. Under these conditions, the degradation efficiency can reach over 95% after PVADH and OPH 4 h reaction. These results indicated that PVADH and OPH can co-degrade PVA efficiently, which will promote industrial applications of enzymatic degradation of PVA.

Keywords: polyvinyl alcohol, polyvinyl alcohol dehydrogenase, oxidized polyvinyl alcohol hydrolase, Box-Behnken, response surface methodology

收稿日期: 2016-11-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(31171639);江苏省重点研发计划社会发展项目(BE2016629)。

* 通信作者: 李江华(1966—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事酶工程、发酵过程优化与控制等领域的研究。

E-mail: lijiahua@jiangnan.edu.cn

引用本文: 赵一凡,刘松,李江华,等. 聚乙烯醇双酶降解工艺条件优化[J]. 食品与生物技术学报,2019,38(06):34-40.

聚乙烯醇(Polyvinyl alcohol,简称PVA)是一种主要以1,3-二醇键的化学结构存在的、人工合成的高分子化合物,一般无味且呈粉末状。由于PVA具有许多优良特性,如乳化性、成膜性、高粘度、热稳定性等,被广泛应用于纺织、造纸等行业^[1-5]。PVA作为纺织工业中织物上浆的浆料,能够使织物不易发生腐蚀和化学变化,同时可以增强织物的韧性。但为了加强棉织物对水的吸收^[6],经过上浆工艺的织物在成品前必须经过退浆处理以去除PVA。此外,退浆废水中的PVA亦对环境造成严重的污染^[7]。因此,开发PVA高效降解技术成为研究热点。

目前PVA的降解方法主要包括:物理法、化学法和生物法^[8]。物理法有泡沫分离、超滤、光催化、微波辐射等技术。尽管这些技术会产生一定的处理效果,但它们操作起来较复杂,投资费用和运行费用都较高,因此工业化应用难度较大^[8]。化学法是采用酸、碱或氧化剂在高温条件下破坏PVA的长链结构使其降解,但易对棉纤维造成较大损伤,且能耗高。PVA是为数不多的生物可降解的水溶性材料^[9],采用生物方法降解PVA具有运行费用低、二次污染少等优点,具有良好的发展前景。

PVA生物降解包括微生物法和酶法^[3]。目前,研究者们得到的可以降解PVA的微生物包括单菌^[10-12]、共生菌^[13-15]和混合菌^[16-17]。一般情况下,对于0.1%~0.5%质量分数的PVA,大多数细菌将其降解90%以上需要3~12 d^[9],降解速率较低。就PVA的降解过程而言,其本质上是酶的作用。主要有以下3种已报道的PVA降解酶:PVA氧化酶(SAO, EC1.1.3.30)、PVA脱氢酶(PVADH, EC1.1.99.23)和氧化型PVA水解酶(OPH, EC3.7.1.7)。生物降解PVA过程如下(图1)。第一步:PVA在SAO(以O₂作为电子受体)或PVADH(以PQQ作为电子受体)的作用下,脱氢氧化生成对应的酮基化合物;第二步:酮基化合物被OPH水解^[18]。其中,对SAO的研究还没有深入到基因水平^[19],只停留在野生酶的纯化和性质研究等方面。

在前期工作中,研究室实现了*Sphingopyxis* sp. 113P3 PVADH基因^[20]和OPH基因^[21]的异源高效表达。在此基础上,研究对PVADH和OPH双酶降解PVA的工艺条件进行了优化,实现PVA酶法高效降解。

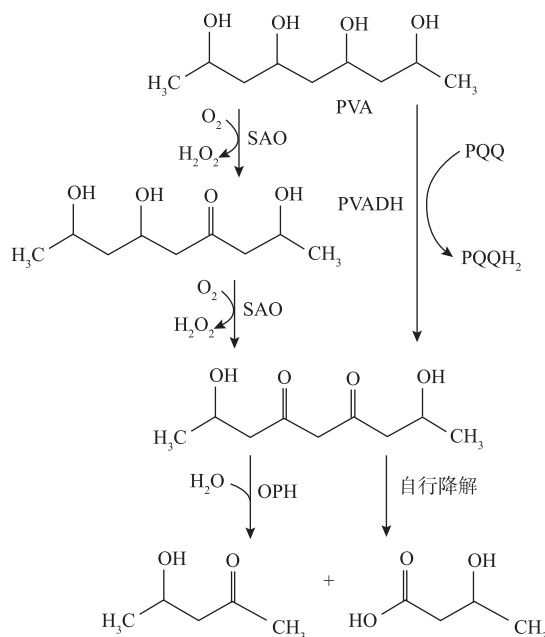


图1 推测的PVA降解途径

Fig. 1 Conjectural PVA degradation pathways

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 PVA脱氢酶(PVADH)产生菌*P. pastoris* GS115/pPIC9K/tPVADH^[20]及氧化型PVA水解酶(OPH)产生菌*E. coli* BL21(DE3)/pET20b(+)/soph^[21]为本实验室构建所得。

1.1.2 培养基 YPD液体培养基:葡萄糖20 g/L,蛋白胨20 g/L,酵母提取物10 g/L;

YPD固体培养基:葡萄糖20 g/L,蛋白胨20 g/L,酵母提取物10 g/L,琼脂20 g/L;

BMGY液体培养基:甘油10 g/L,蛋白胨20 g/L,酵母粉10 g/L,YNB 13.4 g/L,100 mmol/L磷酸钾缓冲液pH 6.0,生物素4×10⁻³ g/L;

BMMY液体培养基:蛋白胨20 g/L,酵母粉10 g/L,YNB 13.4 g/L,100 mmol/L磷酸钾缓冲液pH 6.0,生物素4×10⁻³ g/L,甲醇体积分数1%;

LB培养基:酵母粉5 g/L,蛋白胨10 g/L,NaCl 10 g/L;

固体LB培养基:酵母粉5 g/L,蛋白胨10 g/L,NaCl 10 g/L,琼脂20 g/L;

TB培养基:酵母粉24 g/L,蛋白胨12 g/L,磷酸二氢钾2.3 g/L,磷酸氢二钾12.5 g/L,甘油5 g/L。

1.2 方法

1.2.1 培养方法 将 *P. pastoris* GS115/pPIC9K/tPVADH 活化培养后,以体积分数 3%的接种量接入 BMGY 培养基中,于 30 ℃、200 r/min 转速下进行培养。在培养 24 h 后收集菌体并重悬到 BMMY 培养基中,以体积分数 1%甲醇为唯一碳源,于 28 ℃、200 r/min 转速下进行诱导表达。甲醇每 24 h 补加体积分数 1%,在上述条件下诱导 120 h。

将重组菌 *E. coli* BL21 (DE3)/pET20b(+)/soph 接种在 LB 培养基(含 100 μg/mL 氨苄青霉素)中,于 37 ℃、200 r/min 转速下进行种子发酵。在培养 12 h 后菌液的 OD₆₀₀ 达到 4.5~5,以体积分数 3%的接种量接种入 TB 培养基(含 100 μg/mL 氨苄青霉素),进行诱导,于 25 ℃、200 r/min 转速下恒温发酵 108 h。

1.2.2 响应面实验设计 根据单因素实验和爬坡实验,选择 PVADH 酶量(100~150 U/mL)、pH(7~8)、温度(39~43 ℃)为自变量,PVA 降解率为响应值,应用 Design-Expert V 8.0.6 软件设计三因素三水平 Box-Behnken 试验(表 1)。

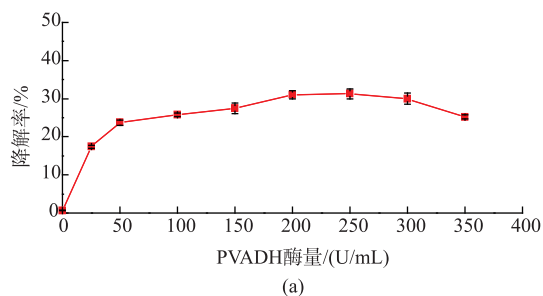
表 1 响应面实验因素水平表

Table 1 Factors and levels of response surface experiments

水平	因素		
	A PVADH 酶量/ (U/mL)	B pH	C 温度/℃
-1	100	7	39
0	125	7.5	41
1	150	8	43

自变量与响应变量之间的关系可由一个拟合的二阶多项式方程描述^[23]:

$$R = \beta_0 + \beta_1 A + \beta_2 B + \beta_3 C + \beta_{12} AB + \beta_{13} AC + \beta_{23} BC + \beta_{11} A^2 + \beta_{22} B^2 + \beta_{33} C^2$$



(a)

式中, R 为 PVA 降解率(%); A 为 PVADH 酶量的编码值; B 为 pH 的编码值; C 为酶反应温度的编码值; β_0 为常数项系数; $\beta_1, \beta_2, \beta_3$ 为线性系数; $\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}$ 为二次项系数; $\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{23}$ 为交互系数。

1.2.3 PVA 浓度检测方法 PVA 浓度的测定(用改良的 Finley 法^[22]):在 10 mL 比色管中分别加入待测样品 400 μL, 25 g/L 的硼酸 3 mL 和 0.1 mol/L I₂-KI 0.3 mL,用去离子水定容到 10 mL,混匀后放于室温下避光静置 10 min,在 690 nm 处测定其吸光值。PVA 降解率计算如下式(1):

$$\beta/\% = [(\alpha_0 - \alpha_1)]/\alpha_0 \times 100\% \quad (1)$$

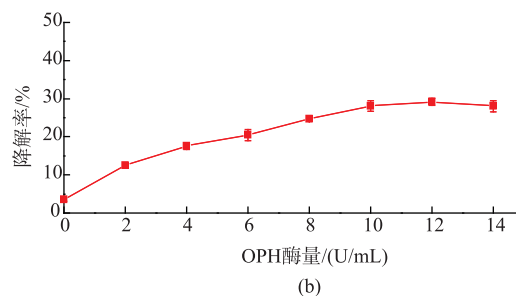
式(1)中, β 为 PVA 降解率, α_0 为反应前的 PVA 质量浓度(g/L), α_1 为反应后的 PVA 质量浓度(g/L)。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

为优化 PVA 的降解条件,研究了 PVADH 酶量、OPH 酶量、酶反应温度、pH、Ca²⁺浓度和底物质量浓度对 PVA 降解率的影响。单因素实验的初始条件为:PVADH 150 U/mL、OPH 10 U/mL、酶反应温度 37 ℃、pH 7、Ca²⁺浓度 1 mmol/L、底物 PVA 质量浓度 1 g/L、PQQ 浓度 6 μmol/L,反应 1 h。

初始条件下,研究 PVADH 酶量和 OPH 酶量对 PVA 降解的影响。结果显示,PVADH 酶量在 0~200 U/mL 的范围时,PVA 的降解率随着 PVADH 酶量的增加而提高;进一步提高 PVADH 酶量,PVA 降解率略有降低;故确定 PVADH 酶量为 200 U/mL(图 2(a))。在 0~8 U/mL 的范围内,PVA 降解率随着 OPH 酶量的增加而增加;当 OPH 酶量在 8~14 U/mL 的范围时,降解率变化不显著(图 2(b))。由于 OPH 催化的底物是 PVADH 的产物,OPH 对降解率的影响依赖于 PVADH 的催化速率。基于此,选择 OPH 酶量为 12 U/mL。



(b)

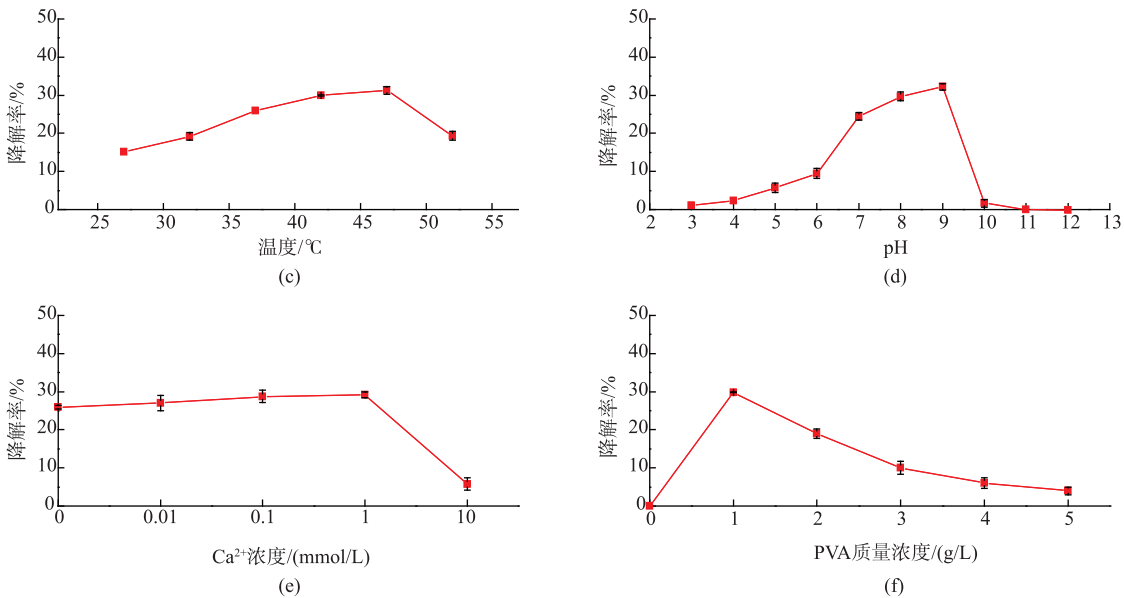


图2 PVADH酶量、OPH酶量、酶反应温度、pH、Ca²⁺浓度和底物质量浓度对PVA降解率的影响

Fig. 2 Effect of PVADH concentration, OPH concentration, enzymatic temperature, pH, Ca²⁺ concentration and substrate concentration on PVA degradation efficiency

如图2(c)所示,当温度升高至47℃时PVA降解率达到了最大值,更高的温度可能使PVA降解率下降。由图2(d)可知,PVA最适酶解pH为9。Ca²⁺可以作为酶促反应的激活剂和稳定剂,0~1 mmol/L的Ca²⁺提高了PVA的酶促降解率,进一步提高Ca²⁺使PVA降解率明显下降(图2(e)),故最适Ca²⁺浓度为1 mmol/L。在以上初始酶反应条件下,PVADH和OPH能有效降解1 g/L PVA,提高PVA质量浓度导致降解率下降(图2(f))。

2.2 爬坡实验

基于以上单因素实验,选择PVADH酶量、pH、酶反应温度3个影响显著的因素进行最陡爬坡实验,从表2来看,爬坡实验第3组PVA降解率最高,因此响应面的中心点应该在其附近产生。故以第3组条件为后续实验的中心点进行分析。

2.3 响应面优化

通过爬坡实验确定了Box-Behnken实验的中心点为PVADH酶量125 U/mL、pH 7.5、酶反应温度41℃。根据中心点,Box-Behnken试验设计及结果见表3。利用Design-Expert V 8.0.6软件对表3的试验数据进行多元回归拟合,PVA降解率(R)对PVADH酶量(A)、pH(B)、酶反应温度(C)的二次多项回归方程为:

$$R = 33.30 - 0.091A + 3.88B - 1.59C - 1.68AB - 0.58AC + 0.46BC - 3.42A^2 - 5.13B^2 - 5.77C^2 \quad (\text{编码值})$$

表2 爬坡实验安排表

Table 2 Design and results of path of steepest ascent experiment

序号	A PVADH 酶量/ (U/mL)	B pH	C 温度/℃	PVA 降解 率/%
1	75	6.5	37	15.36
2	100	7	39	26.68
3	125	7.5	41	33.26
4	150	8	43	30.84
5	175	8.5	45	24.48
6	200	9	47	4.42
7	225	9.5	49	3.21
8	250	10	51	2.42

对模型进行方差分析。由表4可得出,试验设计模型 $P < 0.0001$,即该模型具有高度的显著性;模型中,单个因素中的 B 、 C 对PVA降解率的影响显著,交互项 AB 对PVA降解率的影响较显著,二次项 A^2 、 B^2 及 C^2 对PVA降解率的影响显著。由 F 值可知,单因素对PVA降解率的影响顺序为 $B(\text{pH}) > C(\text{温度}) > A(\text{PVADH酶量})$ 。模型的失拟概率仅为0.0711,说明拟合的回归方程符合实际情况。相关系数 $R^2 = 0.9841$,校正系数 $R_{\text{Adj}} = 0.9638$,即不能由

表 3 Box-Behnken 设计试验方案及响应值

Table 3 Box-Behnken design and the corresponding results

序号	A PVADH 酶量/ (U/mL)	B pH	C 温度/℃	PVA 降解 率/%
1	-1	-1	0	18.82
2	1	-1	0	21.3
3	-1	1	0	31.54
4	1	1	0	27.32
5	-1	0	-1	24.77
6	1	0	-1	26.44
7	-1	0	1	22.95
8	1	0	1	22.29
9	0	-1	-1	21.48
10	0	1	-1	26.68
11	0	-1	1	17.19
12	0	1	1	24.25
13	0	0	0	33.26
14	0	0	0	34.03
15	0	0	0	32.85
16	0	0	0	33.82
17	0	0	0	32.54

表 4 回归模型的方差分析

Table 4 Analysis of variance results for response surface quadratic model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	
Model	487.264 1	9	54.140 45	48.281 65	< 0.000 1	显著
A	0.06661 3	1	0.066 613	0.059 404	0.814 4	
B	120.125	1	120.125	107.125 7	< 0.000 1	
C	20.129 51	1	20.129 51	17.951 2	0.003 9	
AB	11.222 5	1	11.222 5	10.008 06	0.015 8	
AC	1.357 225	1	1.357 225	1.210 353	0.307 7	
BC	0.864 9	1	0.864 9	0.771 305	0.408 9	
A ²	49.284 01	1	49.284 01	43.950 74	0.000 3	
B ²	110.970 1	1	110.970 1	98.961 44	< 0.000 1	
C ²	139.998 5	1	139.998 5	124.848 6	< 0.000 1	
残差	7.849 425	7	1.121 346			
失拟项	6.264 425	3	2.088 142	5.269 758	0.0711	不显著
纯误差	1.585	4	0.396 25			
总和	495.113 5	16				

注: 相关系数 $R^2=0.984 1$, 校正系数 $R_{Adj}=0.963 8$

此模型进行解释的降解率总变异只有 3.62%, 这表明模型与实际情况拟和较好, 可用此模型对 PVA 降解率进行分析和预测。

为更直观地理解实验因素对 PVA 降解率的影响, 利用 Design-Expert V 8.0.6 软件得到了二次方程的三维响应面图, 如图 3 所示。呈马鞍形或椭圆形的等高线表示参数与参数之间交互作用显著, 呈圆形的等高线则表示参数与参数之间交互作用不显著。由此, 交互项 AB 影响较显著, AC、BC 次之。

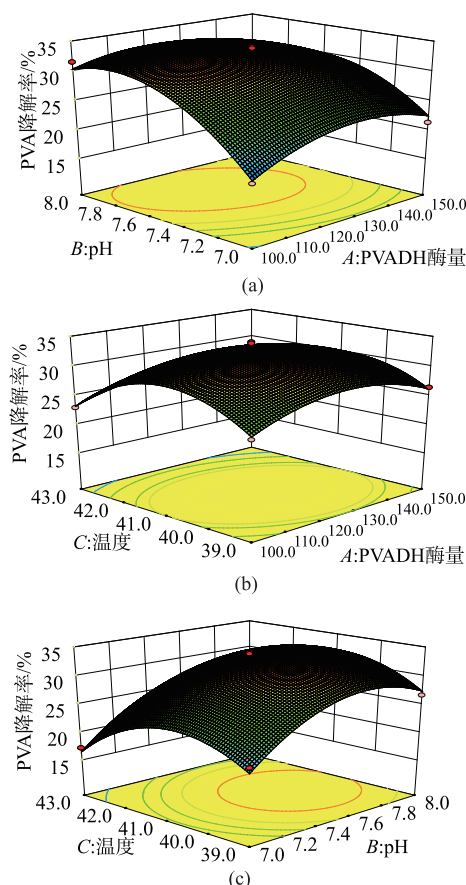


图 3 PVADH 酶量与 pH、PVADH 酶量与温度及 pH 与温度交互作用的响应面图

Fig. 3 Response surface showing the effects of AB, AC and BC on PVA degradation efficiency

利用 Design-Expert V 8.0.6 软件预测出双酶酶法降解 PVA 的最佳降解工艺: PVADH 122.54 U/mL, pH 7.69, 酶反应温度 40.77 ℃。在此条件下, PVA 的降解率为 34.15%。根据实际情况, 对该预测的工艺条件进行修正: PVADH 123 U/mL, pH 7.7, 酶解温度 41 ℃。在此条件下, 独立进行 3 次实验, 反应 1 h, 得到的 PVA 降解率的平均值为 34.07%, 与理论值相符, 说明该工艺可靠。

2.4 PVA 酶促降解机制分析

目前, 大多数研究者大都采用自己筛选的菌

种,不同的菌种涉及到的 PVA 降解酶组合也都不尽相同。一般认为 PVA 酶促降解经由 PVADH 脱氢得到酮基化合物(氧化型 PVA),OPH 再将氧化型 PVA 水解为小分子。但也有学者认为氧化型 PVA 的结构并不稳定,它的降解也可以自发进行^[7]。基于此,有必要对 PVA 酶促降解过程进一步验证。结果分析显示,PAVDH 和 OPH 双酶共同降解 PVA 4 h 后,PVA 接近完全降解;而 PVADH 单独降解 PVA 时,PVA 质量浓度总体上在下降,但经过大约 12 h, PVA 才基本降解完全。上述结果表明,PVADH 可以单独降解 PVA,但降解速率较慢,而 OPH 可以加速氧化型 PVA 这种不稳定结构的进一步降解,从而提高降解速率。

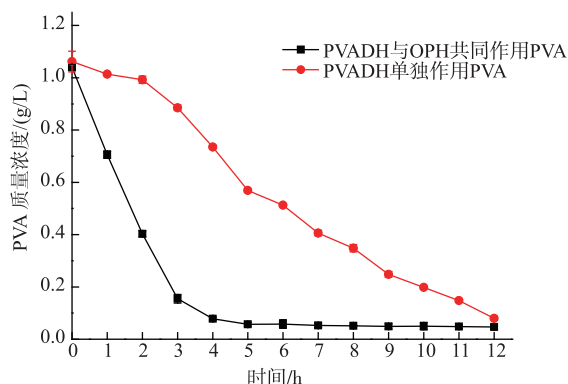


图4 降解效果对比

Fig. 4 Comparison of degradation effects

3 结 语

生物法是一种“绿色环保”的处理技术,它将微生物或 PVA 降解酶应用于纺织退浆工艺或下游的废水处理中,具有对织物损伤小、排污少、废水处理简单、处理能耗低、对设备要求低等优势。本研究应用响应面法和多项式数学模型对 PVADH 和 OPH 双酶降解 PVA 的工艺条件进行优化。得到的优化条件为:PVADH 123 U/mL,OPH 12 U/mL,pH 7.7,酶解温度 41 ℃,Ca²⁺浓度 1 mmol/L,PQQ 浓度 6 μmol/L,反应 1 h,对 1 g/L PVA 降解率的平均值为 34.07%,与响应面的预测值(34.15%)基本一致。当酶解反应经过 4 h,降解率达到了 95 %以上。大多数细菌将 0.1%~0.5%质量分数的 PVA 降解 90%以上,一般情况下需要 3~12 d^[9],与微生物法相比该双酶降解工艺可实现 PVA 的快速降解。研究结果为进一步酶法生物降解 PVA 的放大和应用奠定了基础。

但该双酶降解工艺需要外加微量 PQQ,PVADH 只有结合辅助因子 PQQ 才具有催化活性,而 PQQ 的添加提高了使用成本。因此为尽快实现酶法降解 PVA 的应用,提高酶法降解 PVA 的竞争力,今后应积极开展对可替代 PQQ 的廉价辅因子的研究以及对 PQQ 体外再生系统的探索。

参考文献:

- [1] KLOMMLANG W, TANI A, KIMBARA K, et al. Biochemical and molecular characterization of a periplasmic hydrolase for oxidized polyvinyl alcohol from *Sphingomonas* sp. strain 113P3[J]. *Microbiology*, 2005, 151(4): 1255-1262.
- [2] KAWAI F, KITAJIMA S, ODA K, et al. Polyvinyl alcohol and polyethylene glycol form polymer bodies in the periplasm of *Sphingomonads* that are able to assimilate them[J]. *Archives of Microbiology*, 2013, 195(2): 131-140.
- [3] HU X P, MAMOTO R, SHIMOMURA Y, et al. Cell surface structure enhancing uptake of polyvinyl alcohol(PVA) is induced by PVA in the PVA-utilizing *Sphingopyxis* sp. strain 113P3[J]. *Archives of Microbiology*, 2007, 188(3): 235-241.
- [4] HU X P, MAMOTO R, FUJIOKA Y, et al. The pva operon is located on the megaplasmid of *Sphingopyxis* sp. strain 113P3 and is constitutively expressed, although expression is enhanced by PVA[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2008, 78(4): 685-693.
- [5] MAMOTO R H. Cloning and expression of the gene for periplasmic poly (vinyl alcohol) dehydrogenase from *Sphingomonas* sp. strain 113P3, a novel-type quinoxaloprotein alcohol dehydrogenase[J]. *Microbiology*, 2006, 152(7): 1941-1949.
- [6] LI Min, DU Guocheng, CHEN Jian. Biodegradation of polyvinyl alcohol[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2008, 5(27): 8-14. (in Chinese)
- [7] ZHANG Ying, DU Guocheng, FAN Xuerong. Progress in research of PVA biodegradation[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2007, 6(23): 51-54. (in Chinese)

- [8] XIAO Liangjian, CHEN Qinghua. The progress of research on PVA's modification and bio-degrading[J]. **Full Degradable Materials**, 2009, 8(1): 62-65. (in Chinese)
- [9] LI Xu, FAN Jinhong, MA Luming. Progress on degradation of microorganism by PVA[J]. **Environmental Science & Technology**, 2009, 32(3): 74-77. (in Chinese)
- [10] MORI T, SAKIMOTO M, KAGI T, et al. Isolation and characterization of a strain of *Bacillus megaterium* that degrades Poly (vinyl alcohol)[J]. **Bioscience Biotechnology & Biochemistry**, 1996, 60(2): 330-332.
- [11] HATANAKA T, ASAH I N, TSUJI M. Purification and characterization of poly(vinyl alcohol) dehydrogenase from *Pseudomonas* sp. 113P3[J]. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 1995, 59(10): 1813-1816.
- [12] ATOMI H, IMANAKA T. Isolation and characterization of a novel poly (vinyl alcohol)-degrading bacterium, *Sphingopyxis* sp. PVA3[J]. **Febs Letters**, 2006, 535(1): 171-174.
- [13] VACLAVKOVA T, RUZICKA J, JULINOVA M, et al. Novel aspects of symbiotic (polyvinyl alcohol) biodegradation [J]. **Applied Microbiology & Biotechnology**, 2007, 76(4): 911-917.
- [14] SAKAZAWA C, SHIMAO M, TANIGUCHI Y, et al. Symbiotic utilization of polyvinyl alcohol by mixed cultures[J]. **Applied & Environmental Microbiology**, 1981, 41(1): 261-267.
- [15] KIM B C, SOHN C K, LIM S K, et al. Degradation of polyvinyl alcohol by *Sphingomonas* sp. SA3 and its symbiote[J]. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 2003, 30(1): 70-74.
- [16] GUO Y, ZHOU M, CUI SK, et al. Biodegradation of PVA by the new mixed strains isolated from a de-sizing process [J]. **Journal of Environmental Science & Health Part A Toxic/hazardous Substances & Environmental Engineering**, 2013, 48(5): 518-525.
- [17] CHEN J, ZHANG Y, DU G C, et al. Biodegradation of polyvinyl alcohol by a mixed microbial culture[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2007, 40(7): 1686-1691.
- [18] KAWAI F, HU X P. Biochemistry of microbial polyvinyl alcohol degradation[J]. **Applied Microbiology & Biotechnology**, 2009, 84(2): 227-237.
- [19] GOSWAMI P, CHINADAYYALA S S R, CHAKRABORTY M, et al. An overview on alcohol oxidases and their potential applications[J]. **Applied Microbiology & Biotechnology**, 2013, 97(10): 4259-4275.
- [20] JIA D X, LI J H, LIU L, et al. High-level expression, purification, and enzymatic characterization of truncated poly(vinyl alcohol) dehydrogenase in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. **Applied Microbiology & Biotechnology**, 2013, 97(3): 1113-1120.
- [21] YANG Y, ZHANG D X, LIU S, et al. Expression and fermentation optimization of oxidized polyvinyl alcohol hydrolase in *E. coli* [J]. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 2011, 39(1): 99-104.
- [22] FINLEY J H. Spectrophotometric determination of polyvinyl alcohol in paper coatings[J]. **Analytical Chemistry**, 1961, 33(13): 1925-1927.
- [23] WU J, WANG J L, LI M H, et al. Optimization of immobilization for selective oxidation of benzyl alcohol by *Gluconobacter oxydans* using response surface methodology[J]. **Bioresource Technology**, 2010, 101(23): 8936-8941.