

文章编号:1673-1689(2006)06-0073-06

碳、氮源对 PVA 降解混合体系降解能力的影响 及 PVA 降解机理初探

胡志毅, 堵国成, 华兆哲, 陈坚

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘要:以能完全降解 1 g/L PVA 的一个混合体系为研究对象,研究了碳、氮源对该混合体系降解 PVA 的影响。实验表明,补充有机氮源有利于混合体系菌体的生长,并且能提高混合体系对 PVA 的降解能力。进一步的研究发现,其它碳源的补充有利于菌体的生长,但对混合体系降解 PVA 产生一定的抑制作用。根据初步研究结果推断,该混合体系所产的 PVA 降解酶主要结合在细胞膜上,部分 PVA 进入细胞后被降解。

关键词:混合体系;优化;聚乙烯醇;降解

中图分类号:X 172

文献标识码:A

Effect of Different Carbon and Nitrogen Sources on PVA degradation in a Mixed Culture and PVA Degradation Mechanism

HU Zhi-yi^{1,2}, DU Guo-cheng^{1,2}, HUA Zhao-zhe^{1,2}, CHEN Jian^{1,2*}

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The effect of different concentration of carbon and nitrogen sources was investigated in a mixed system. The results indicated that the addition of organic nitrogen source was not only advantageous to the growth of the mixed culture, but also propitious to PVA degradation. Further results indicated that the presence of other carbon sources, though was also advantageous to cell growth, inhibited PVA degradation. By analyzing the existence of residual PVA in cells, PVA-degrading enzymes was assumed to mostly linked with cell membrane and partial PVA degradation after entering into cells.

Key words: mixed culture; optimization; PVA degrading enzyme; degradation

聚乙烯醇(Polyvinyl alcohol,简称 PVA)是一种人工合成的水溶性高分子化合物,在纺织上作为

一种理想的上浆剂被广泛应用。由于 PVA 的可生化性较差(BOD/COD=0.07),退浆废水中大量难

收稿日期:2006-03-01; 修回日期:2006-04-30.

基金项目:江苏省高技术研究计划项目(BG2005016).

作者简介:胡志毅(1981-),男,江苏无锡人,工学硕士;*为通讯作者.

降解 PVA 的存在会造成严重的水体污染。同时,传统退浆采用的是 70~90℃ 热水冲洗的方式,不仅水耗、能耗大,还会对织物表面造成损伤。面对传统退浆方法的诸多不足,PVA 降解酶的研究成为纺织用酶制剂的一个重要研究方向。

迄今报道过的 PVA 降解酶产生菌只有少数几种,并且主要集中在假单胞菌属^[1-2]。细菌产 PVA 降解酶主要分为两种类型:一种是单一细菌产酶^[3-4];另一种是通过共生菌的协同作用产酶,如 Sakazawa 等人^[5]分离到的假单胞菌 VM15C 必须在其共生菌 VM15A 提供生长因子吡咯喹啉醌(PQQ)的情况下才能产 PVA 降解酶。Kim 等人^[6]分离到的鞘氨醇单胞菌 SA 与上述结果类似,SA₂ 为 SA₃ 产 PVA 降解酶提供生长因子。

作者从 PVA 污染环境中筛选出一个具有 PVA 降解能力的混合菌体系,对该混合体系降解 PVA 的条件进行了优化,并对 PVA 的降解过程作了初步推断。

1 材料与方法

1.1 菌种

一个能降解 PVA 的混合体系,筛选自无锡太平洋纺织厂 PVA 退浆车间下水道口。经过对一些环境因素的初步考察,认为该混合体系较适宜在 30℃ 的弱碱性(pH 7.2)条件下生长。同时,本课题组的另一研究人员在采用分子生态学手段进行研究时发现该混合体系中主要含有 *Pseudomonas* sp.、*Sphingomonas* sp.、*Rhodococcus* sp.、*Bacillus* sp.、*Brevibacterium* sp.、*Flavobacterium* sp.、*Micrococcus* sp.、*Streptococcus* sp.、*Leptothrix* sp. 和 *Paenibacillus* sp. 等细菌。该研究人员亦曾通过稀释分离的方法获得 7 株纯化的细菌,但是这些菌株都不能够单独彻底降解 PVA;将这些分离出的菌株进行混合培养,不能够重现原混合体系所具有的彻底降解 PVA 的能力,说明用常规的驯化后再稀释分离的方法不能够得到在混合体系降解 PVA 过程中起关键作用的全部菌株。

1.2 培养基

初始培养基(g/L):PVA1799 1,NH₄NO₃ 1,酵母粉 0.1,K₂HPO₄ 1.6,KH₂PO₄ 0.25,MgSO₄ 0.06,CaCl₂ 0.05,FeSO₄·7H₂O 0.02,NaCl 0.02;pH 7.2。

优化培养基(g/L):PVA1799 5,酵母粉 2,K₂HPO₄ 2,KH₂PO₄ 0.25,MgSO₄ 0.06,CaCl₂ 0.05,FeSO₄·7H₂O 0.02,NaCl 0.02;pH 7.2。

1.3 菌种的培养方法

1.3.1 传代与培养 摇瓶传代:从培养 48 h 的发酵液中吸取 1 mL 接入装有 30 mL 优化培养基的 250 mL 的三角瓶中,于 30℃,200 r/min 振荡培养。冷藏管接种:冷藏管中的保藏菌株首先用初始培养基培养,转接 1 至 2 次,再接入优化培养基,培养条件和步骤同摇瓶传代。

1.3.2 菌种保藏 吸取培养 48 h 的发酵液 1 mL 至含 0.43 mL 甘油(>99%)的冷藏管中,于 -70℃ 冰箱保藏。

1.4 PVA 含量测定

根据 Finley^[7]报道的碘量法测定 PVA。在 50 mL 的比色管中,依次加入 1 mL 待测 PVA 发酵上清液,15 mL 40 g/L 的硼酸溶液和 1.5 mL 0.1 mol/L 的 I₂-KI 溶液,加水至刻度,摇匀,10~15 min 后,用 1 cm 比色杯,以空白为参比,在 690 nm 处测定吸光度,以吸光度值大小来表示 PVA 含量的多少。

1.5 生物量的测定

取发酵液 1 mL 稀释 5 倍,在 600 nm 处,以蒸馏水作参比,测定其光密度^[8]。

1.6 PVA 在细胞内外分布情况的确定

将发酵 48 h 的发酵液 12 000 r/min 离心 15 min,并采用 0.45 μm 滤膜微滤,收集上清液备用,该部分上清液称为发酵上清液;沉淀物及微滤物溶于磷酸盐缓冲液(pH 7.0, 0.1 mol/L),体积比约为 1:3,用超声破碎(4℃,400 W,工作 1 s,停 2 s,工作时间为 15 min)并离心收集上清液备用,该部分上清液称为破碎上清液;沉淀物置于 30 mL 水中 90℃ 水浴 6 h 后,离心收集上清液备用,该部分上清液称为水浴上清液。分别测定这三部分上清液中 PVA 的含量。

1.7 待测粗酶液的制备

发酵上清液制备同 1.6,破碎上清液最终用磷酸缓冲液定容至原发酵液体积,分别测定 PVA 降解酶酶活。另将超声破碎离心后的沉淀物用磷酸缓冲液复溶至原体积,称之为碎片复溶液,测定细胞膜上的酶活。

1.8 PVA 降解酶酶活的测定

由于 PVA 的降解过程是整个酶系共同作用的结果,因此研究中测定的酶活为 PVA 降解酶系的总酶活,反映该酶系对 PVA 总的降解能力。在 50 mL 的比色管中先加入 100 μL 1 g/L 溶于上述磷酸盐缓冲液的 PVA,然后加入 100 μL 待测粗酶液(如待测物为两者混合物则按体积比 1:1 混合,总体

积不变)。将反应体系置于 30 ℃, 150 r/min 水浴振荡器中反应 6 h, 参照 Finley 法测定反应前后反应体系的吸光度的变化: $\Delta A_{690} = \Delta A_{690\text{前}} - A_{690\text{后}}$ 。酶活单位定义同文献[9]。

1.9 试剂

实验用 PVA1799, 聚合度 1 700, 醇解度 99.0%, 购于四川维尼纶厂。其它试验药品均为分析纯。

2 结果与讨论

2.1 最佳氮源的确定

2.1.1 不同氮源种类对 PVA 降解的影响 初步研究表明, 该混合体系在初始培养基中降解 1 g/L PVA 需要 36 h 左右, 而当 PVA 为 3 g/L 时, 达到 85% 以上的降解率需要 4 d 左右。为了提高 PVA 的降解速率, 以 3 g/L PVA 为碳源, 考察分别以 NH_4NO_3 (1.56 g/L)、 NaNO_3 (3.31 g/L)、 NH_4Cl (2.08 g/L)、酵母粉 (5.57 g/L) 和蛋白胨 (4.55 g/L) 为氮源(其总氮含量与初始培养基中的氮含量相等)时, 对该混合体系降解 PVA 的影响。结果如图 1 所示。

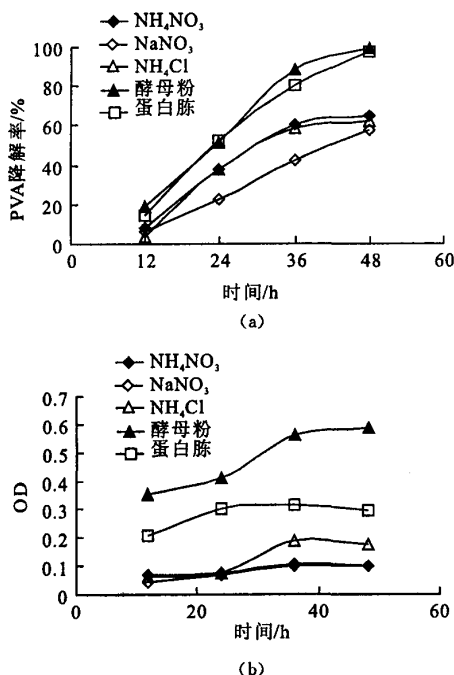


图 1 不同氮源对发酵的影响

Fig. 1 Effect of different nitrogen sources on fermentation

从图 1a 可以看出, 用有机氮源时混合体系能在 48 h 彻底降解 3 g/L PVA, 而单独以相同含氮量的无机氮源为氮源时, PVA 的降解率远不如用有机氮

源时的情况, 也低于初始培养基中存在少量有机氮源时的情况。因此可以认为, 有机氮源的存在比无机氮源有利于提高该混合体系降解 PVA 的能力。同时, 由图 1b 可以看到, 有机氮源对菌体生长更为有利。由于以酵母粉为唯一氮源时, 混合体系对 PVA 的降解率最高, 菌体生长量也较高。因此进一步考察了以酵母粉为氮源时, 酵母粉不同质量浓度对 PVA 降解的影响。

2.1.2 不同酵母粉添加量对 PVA 降解的影响

分别以 1、2、3、5 g/L 和 7 g/L 的酵母粉为唯一氮源, 考察了其对 PVA 降解的影响。结果如图 2 所示。

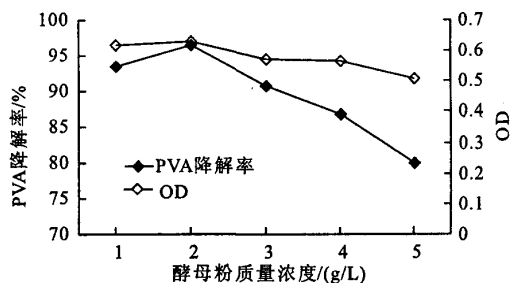


图 2 不同酵母粉质量浓度对发酵的影响

Fig. 2 Effect of different yeast extract concentration on fermentation

结果表明, 不同质量浓度的酵母粉对 PVA 降解率的影响较大。在 36 h 左右以 2 g/L 的酵母粉为氮源的体系对 3 g/L 的 PVA 降解率可达 96% 以上, 比原先采取 5.6 g/L 酵母粉的效果为好。同时, 继续提高酵母粉的质量浓度并不能进一步促进混合体系中微生物细胞的生长。在确定了较佳有机氮源的基础上, 进一步考察了复合氮源是否更有利于该混合体系对 PVA 的降解。由上述研究结果可知, 以无机氮源中的硝酸铵为氮源时混合体系对 PVA 的降解率较高。为此, 在酵母粉添加量为 2 g/L 的基础上, 硝酸铵添加量分别为 1、2 g/L 和 3 g/L, 考察混合体系菌体生长和对 PVA 降解率的影响, 以只添加酵母粉为对照。结果发现添加无机氮源不管是对混合体系的生长还是降解能力并没有起到促进作用, 相反, 随着硝酸铵添加量的增加, 对混合体系的菌体生长和 PVA 降解产生了一定的抑制作用。因此培养基中不添加无机氮源。

2.2 碳源的添加对菌体生长和 PVA 降解的影响

在以 PVA 为唯一碳源时, PVA 既可作为碳源以供菌体生长, 又作为 PVA 降解酶合成的诱导物。由于 PVA 质量浓度较大时, 会导致培养基的粘度增加, 影响氧的传递, 从而可能会限制菌体的生长, 因此考虑添加其他常见碳源来促使菌体的生长, 以

提高混合体系对 PVA 的降解能力。

从图 3a 所示的生物量数据可以看出,添加其他碳源有利于菌体的生长;但对 PVA 的降解没有起到促进作用(图 3b),反而会对 PVA 的降解产生一定的抑制作用。通过进一步比较不同碳源情况下单位菌体的 PVA 降解能力(见图 4),发现不添加其它碳源时,单位菌体的 PVA 降解能力最大,因此可以认为其它碳源的补充在提高菌体生长的同时抑制了 PVA 降解酶的产生,导致 PVA 降解率下降。

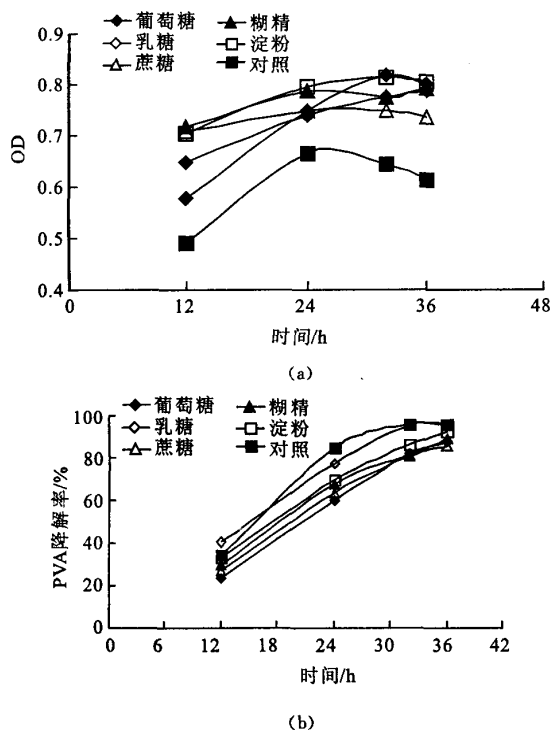


图3 不同的补充碳源对发酵的影响

Fig. 3 Effect of different carbon sources on fermentation

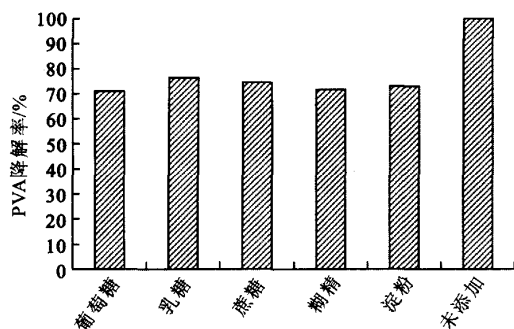


图4 补充不同碳源时混合体系中单位菌体 PVA 降解能力的比较

Fig. 4 Comparing with PVA-degradation capacity of unit strain in mixed culture by adding different carbon sources

2.3 PVA 质量浓度对混合体系降解 PVA 的影响

在优化了氮源添加量的基础上,进一步考察了不同 PVA 质量浓度对混合体系降解 PVA 的影响。

从图 5 可以看出,随着 PVA 质量浓度的提高,菌体生长量也随之提高。同时,在以 2 g/L 酵母粉为氮源的情况下,该体系的降解能力有了显著的提高,PVA 质量浓度为 3~9 g/L 时,培养 60 h 左右, PVA 的降解率均达到 96% 以上。

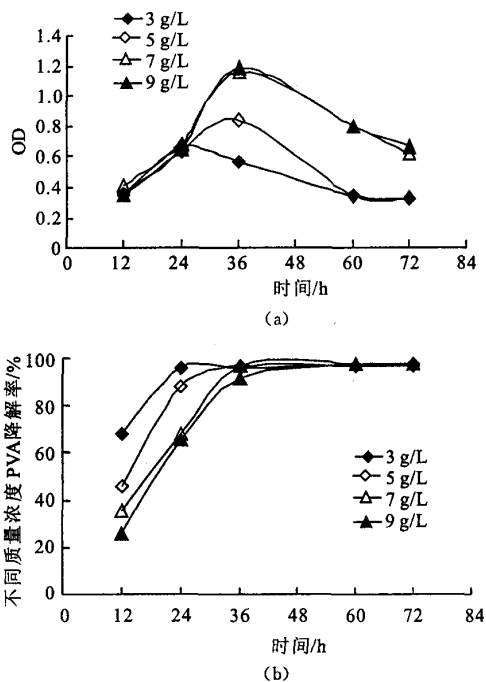


图5 不同质量浓度 PVA 的降解过程

Fig. 5 The degradation process of PVA with different concentration

进一步比较了不同 PVA 质量浓度情况下,混合体系单位菌体对 PVA 的降解能力,由图 6 可以看出,随着 PVA 质量浓度的提高,单位菌体的比降解能力也随之提高。PVA 质量浓度为 9 g/L 时,混合体系单位菌体对 PVA 的比降解能力比 PVA 质量浓度为 3 g/L 时提高了 37% 左右。

2.4 PVA 降解机理初探

以 5 g/L PVA 为碳源、2 g/L 酵母粉为唯一氮源的体系,对混合体系培养 36 h,期间 PVA 含量不断下降,至 36 h 时发酵上清液中 PVA 质量分数约为 3.44%。但同时测定细胞破碎上清液中 PVA 含量时却发现其中仍残余 PVA 质量分数约 14.13%。进一步研究残余 PVA 在细胞内的降解情况,如图 7 所示,可以发现随着培养时间的延长, PVA 在细胞内的含量不断减少。这表明部分 PVA 会进入细胞,然后在胞内 PVA 降解酶的作用下被不断降解。

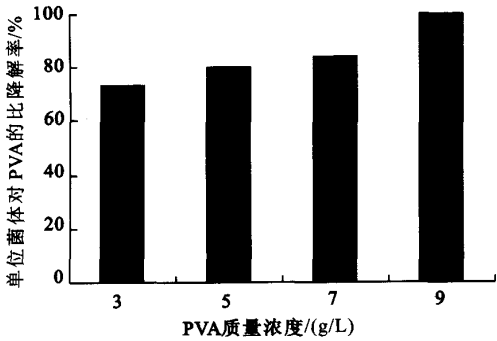


图 6 不同质量浓度 PVA 对混合体系单位菌株比降解 PVA 能力的影响

Fig. 6 Effect of different PVA concentration on PVA-degradation capacity of unit strain in mixed culture

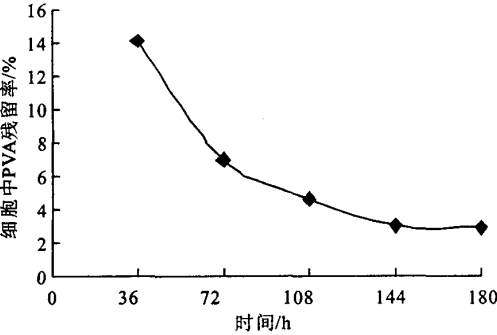
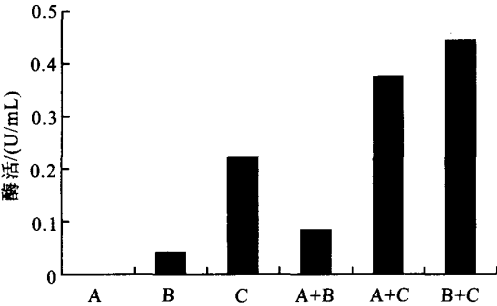


图 7 胞内 PVA 的降解曲线

Fig. 7 Course of degradation of intracellular PVA

另外,分别取样测定 PVA 在胞内外的分布情况及细胞内、外及细胞膜上的 PVA 降解酶酶活。结果如图 8 所示。



A. 发酵上清液; B. 破碎上清液; C. 碎片复溶液

图 8 PVA 降解酶酶活在胞内外的分布情况

Fig. 8 Distribution of PVA-degrading enzyme in intra- and extra-cell

可以看出,在发酵上清液中检测不到 PVA 降解酶酶活,表明该混合体系不产胞外 PVA 降解酶,而在细胞破碎上清液和细胞碎片复溶液中可以检测到 PVA 降解酶酶活,且胞内(破碎上清液)PVA 降解酶酶活(0.042 U/mL)低于细胞膜上(碎片复

溶液)的 PVA 降解酶酶活(0.22 U/mL)。

有趣的是,当向细胞破碎上清液(B)及细胞碎片复溶液(C)中添加等体积的发酵上清液(A)时,其 PVA 降解酶酶活比原来都有了较大的提高,而将细胞破碎上清液(B)和细胞碎片复溶液(C)等体积混和时,其总酶活(0.444 U/mL)高于两者单独之和。从以上事实初步推断,该体系所产的 PVA 降解酶主要结合在细胞膜上,而发酵上清液或胞内提取物中可能存在某些能够提高 PVA 降解酶活性的因子。Sakazawa 等^[5]研究发现,假单胞菌 VM15C 必须在其共生菌 VM15A 提供生长因子吡咯喹啉醌(PQQ)的情况下才能产生 PVA 降解酶,而本研究中所采用的混合体系可能也有类似情况。

同时,本课题组的一研究人员曾通过稀释分离该混合体系的方法获得 7 株纯化的细菌,但是这些菌株都不能够单独彻底降解 PVA;将这些分离出的菌株再混合进行培养,不能够重现原混合体系所具有的彻底降解 PVA 的能力。这说明用常规的驯化后再稀释分离的方法不能够得到在混合体系降解 PVA 过程中起关键作用的全部菌株,同样也说明在混合体系中是由几种菌协同作用降解 PVA 的。

综合上述研究结果可以初步推断,该混合体系是由其中几种关键菌协同降解 PVA。部分 PVA 在细胞膜上 PVA 降解酶的作用下降解为较小分子的聚合物,然后透过细胞膜进入细胞内,在胞内酶的作用下被进一步降解。

3 结 论

1)研究中对混合体系进行了氮源优化,与优化前相比,PVA 的降解能力显著提高,原先 36 h 降解 1 g/L PVA,优化后 60 h 左右 3~9 g/L PVA 的降解率大于 96%。

2)从不同氮源对体系降解能力的影响来看,有机氮源明显优于无机氮源。而添加了无机氮源对体系的生长及降解能力有一定的抑制作用。

3)补充碳源能够促进菌体的生长,但体系的降解能力反而有所下降。认为其它碳源的补充在提高混合体系生长能力的同时抑制了 PVA 降解酶的产生。

4)与之前所报道过的两类产 PVA 降解酶的菌相比较,不管是单一菌还是共生菌,该混合体系对 PVA 的降解能力远优于前两者^[3,5,9],3~9 g/L PVA 能在较短时间内被基本降解完全,这是之前报道的能降解 PVA 的菌所不能比的。而其降解机理则类同于协同作用降解 PVA 的共生菌。并且从

PVA 的分布实验及酶活测定结果看,认为该混合体系所产生的 PVA 降解酶系主要结合在细胞膜上; PVA 可能是先在细胞膜上 PVA 降解酶的作用下降解为小分子聚合物,然后进入细胞被进一步降解利用。

参考文献:

- [1] 王银善, 庞学军, 方慈祺. 共生细菌 SB1 降解聚乙烯醇的研究 I. 共生细菌 SB1 的分离及某些性质[J]. 环境科学学报, 1991, 11(2): 236—241.
- [2] Mori T, Sakimoto M, Kagi T, et al. Isolation and characterization of a strain of *Bacillus megaterium* that degrades poly(vinyl alcohol)[J]. *Biosci Biotech Biochem*, 1996, 60(2): 330—332.
- [3] Suzuki T, Ichihara Y, Yamada M. Some characteristics of *Pseudomonas* O-3 which utilizes polyvinyl alcohol[J]. *Agric Biol Chem*, 1975, 37(4): 747—756.
- [4] Hashimoto S, Fujita M. Isolation of a bacterium requiring three amino acids for polyvinyl alcohol degradation[J]. *J Ferment Technol*, 1985, 63(5): 471—474.
- [5] Sakazawa C, Shimao M, Taniguchi Y. Symbiotic utilization of polyvinyl alcohol by mixed culture[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1981, 41: 261—267.
- [6] Kim B C, Sohn C K, Lim S K. Degradation of polyvinyl alcohol by *Sphingomonas* sp. SA3 and its symbiote[J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2003, 30: 70—74.
- [7] Finley J H. Spectrophotometric determination of polyvinyl alcohol in paper coating[J]. *Anal Chem*, 1961, 33(13): 1925—1927.
- [8] 肖长生, 张武, 谢壮奎. 聚乙烯醇降解酶产生菌的分离和发酵条件[J]. 微生物学报, 1989, 20(5): 343—347.
- [9] 钱鼎, 李寅, 堵国成. 培养条件对聚乙烯醇(PVA)降解酶合成的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2004, 10(2): 226—230.

(责任编辑: 秦和平, 李春丽)

(上接第 72 页)

参考文献:

- [1] 信维平. 天然自由基清除剂的综述及开发[J]. 食品研究与开发, 2003, 24(1): 80—812.
- [2] 庄毅. 应用药用真菌新型固体发酵工程技术研制中药一类新药的建议[J]. 中药新药与临床药理, 1995, 6(4): 41.
- [3] 吴炳新, 牛纪江, 孙技林, 等. 中药发酵制药技术[J]. 山东中医杂志, 2001, 90(3): 179—180.
- [4] 李雁群, 张莲芬, 张志斌, 等. 普参灵芝发酵液在 2.2.15 细胞中抗 HBV 作用[J]. 无锡轻工大学学报: 食品与生物技术, 2004, 2: 98—100.
- [5] 王锋. 添加中药的鸡腿蘑发酵[D]. 无锡: 江南大学, 2005.
- [6] 杨海龙. 灵芝发酵新型抗肿瘤制剂的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2004.
- [7] 沈齐英, 沈秋英. 北虫草抗氧自由基和羟自由基作用的研究[J]. 广西植物, 21(3): 252—254.
- [8] 熊辉岩, 张晓峰, 谭大风, 等. 大黄属三种植物不同部分提取物清除羟基自由基的体外实验研究[J]. 食品科学, 2003, 24(1): 128—130.
- [9] 曾小玲. 马齿苋水提物对氧自由基清除作用的研究[J]. 湖南医科大学学报, 1999, 24(2): 133—135.
- [10] 邹国林. 一种 SOD 测定方法邻苯三酚自氧化法的改进[J]. 生物化学与生物物理进展, 1986, 15(4): 71273.
- [11] Marklund S. Involvement of superoxide anion radicals in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase[J]. *Eur J Biochem*, 1974, 47: 469.

(责任编辑: 杨萌)