

# 聚乙烯醇降解菌的筛选与降解条件优化

李 坤<sup>1</sup>, 李江华<sup>\*1,3</sup>, 刘 龙<sup>1,3</sup>, 堵国成<sup>1,2,3</sup>, 陈 坚<sup>1,2,3</sup>

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122; 3. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 为了实现纺织工业废水中 PVA1799 的生物降解, 从纺织印染厂区筛选到一个能快速降解培养基中 PVA1799 的混合菌系, 命名为 SH-TD。从中分离出 3 株纯培养菌株, 分别命名鉴定为 SH1 (*Aeromonas* sp.), TD5 (*Pseudomonas* sp.), TD33 (*Acinetobacter* sp.)。通过对含 PVA1799 出发培养基进行单因素及 Plackett-Burman 实验筛选出三个对 PVA1799 降解有显著影响的因素分别为 Yeast-Extract、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 。然后进行最陡爬坡实验逼近最佳响应面区域, 最后通过 Box-Behnken 设计, 利用 Design-Expert 软件进行回归分析, 得到各因素的最佳质量浓度组成为 (g/L): Yeast-Extract 0.04、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  48.42、 $\text{BaCl}_2$  0.06。在最优条件下, 24 h PVA 降解率从原先的 30% 提高到 80%。

**关键词:** 聚乙烯醇; 混合菌系; 生物降解; 响应面法

**中图分类号:** TQ 92 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2015)08—0835—07

## Screening of PVA-Degrading Strains and Optimization of Degradation Conditions

LI Kun<sup>1</sup>, LI Jianghua<sup>\*1,3</sup>, LIU Long<sup>1,3</sup>, DU Guocheng<sup>1,2,3</sup>, CHEN Jian<sup>1,2,3</sup>

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** In order to achieve the biodegradation of PVA1799 in the textile industrial waste water, an bacteria mixture with efficient degradation was screened and named as SH-TD. Three strains with PVA-degrading ability were isolated from the mixed culture SH-TD and named as SH1 (*Aeromonas* sp.), TD5 (*Pseudomonas* sp.), and TD33 (*Acinetobacter* sp.), respectively. The results from the single factor and Plackett-Burman experiments showed that Yeast-Extract,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  and  $\text{BaCl}_2$  constituents have the significant influence on PVA degrading rate. Through ascent and Box-Behnken experiments, a response surface methodology (RSM) model was constructed. Data were analyzed by use of Design-Expert software. The optimal concentrations (g/L) of the variables were determined as (g/L): Yeast-Extract 0.04,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  48.42,  $\text{BaCl}_2$  0.06. Under the optimal

收稿日期: 2014-02-19

基金项目: 国家 863 计划项目(2012 AA022202)。

\* 通信作者: 李江华(1966—), 男, 江西九江人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事酶技术、发酵过程优化与控制方面的研究。

E-mail: lijiaohua@jiangnan.edu.cn

conditions, the PVA degradation rate after 24 h increased from 30% to 80%.

**Keywords:** polyvinyl alcohol, mixed bacteria, biodegradation, response surface methodology

聚乙烯醇(Polyvinyl alcohol, 简称 PVA), 是目前已发现的惟一具有水溶性且无毒的高聚物<sup>[1]</sup>, 具有很多优良的物理性质, 如高粘度、成膜性、乳化性、拉伸性、对水、油脂和有机溶剂均有抵抗性等。基于以上特性, PVA 广泛应用于粘合剂、涂料、乳化剂、造纸和纺织等行业, 工业上通常通过聚醋酸乙烯酯经过皂化反应制取<sup>[2]</sup>。PVA 的生化性较差 ( $BOD / COD = 0.07$ ), 在许多工业废水中含有大量的 PVA, 直接排放会对环境带来了极大的污染<sup>[3]</sup>。1973 年日本科学家 Suzuki 首次分离到可以单独降解 PVA 的 *Pseudomonas* O-3<sup>[4]</sup>, 随后几十年里国内外进行了大量的 PVA 降解微生物的筛选、酶基因的克隆等工作<sup>[5-9]</sup>。目前已正式报道的 PVA 降解酶包含三个种类<sup>[10]</sup>: PVA 氧化酶 (仲醇氧化酶) (EC 1.1.3.30)、PVA 脱氢酶 (EC 1.1.99.23) 和氧化型 PVA 水解酶 ( $\beta$ -双酮水解酶) (EC 3.7.1.7)。近年还发现了专一性比较强的降解低醇解度 PVA 长链上残存乙酸酯键的 PVA 酯酶<sup>[11]</sup>。然而大部分报道菌种都存在培养周期长, 酶活低等缺点。所克隆出来的 PVA 脱氢酶更是由于其在作用时需要昂贵的吡咯喹啉醌(PQQ)作为电子受体而在工业生产中具有很大的局限性, 而 PVA 氧化酶则由于难以纯化而至今未能被克隆。因此分离筛选新的 PVA 降解微生物尤其是具有 PVA 氧化酶活性的菌株具有十分重要的意义。

作者从纺织厂、印染厂等废水、土壤及活性污泥中筛选出 1 株高效降解 PVA1799 的混合菌系, 并从中分离出 3 种纯培养物, 通过对所得混菌体系降解 PVA 的培养基设计响应面优化实验, 大大提高了 PVA 降解酶的产率, 缩短了降解时间, 为进一步深入研究该混合菌中的 PVA 降解酶的种类及降解机理提供了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品来源** 取自无锡太平洋和军达纺织厂等地的废水、土壤及活性污泥。PVA1799 (聚合度

1 700, 醇解度 99%): 由江南大学纺织服装学院提供。

#### 1.1.2 培养基

1) 富集培养基 P-Y (g/L): PVA1799 1, Yeast-Extract 0.1,  $(NH_4)_2SO_4$  0.5,  $KH_2PO_4$  0.02,  $K_2HPO_4$  1.6,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.02,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.01, NaCl 0.02; pH 7.5。

2) 鉴定培养基 P-Y (g/L): PVA1799 1, Yeast-Extract 0.1,  $(NH_4)_2SO_4$  0.5,  $KH_2PO_4$  0.02,  $K_2HPO_4$  1.6,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.02,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.01, NaCl 0.02, 琼脂粉 20; pH 7.5。待平板长出菌落后倾入 15 mL 碘-硼酸试剂, 避光反应 10 min, 观察菌落周围透明圈的产生情况。

3) 种子培养基 P-TY: 20% LB, P-Y。

4) 起始发酵培养基 P-Y: 同富集培养基。

### 1.2 筛选及培养方法

**1.2.1 菌株筛选与鉴定** 将样品用无菌生理盐水悬浮, 取上清液用富集培养基过夜培养, 梯度稀释至合适浓度, 涂布于鉴定培养基平板, 30 °C 培养 3 d。显色后, 挑取有透明圈菌落在鉴定培养基平板上进行多次划线分离, 直至得到纯培养菌株即为初筛菌株。接种初筛菌株于种子培养基中培养 18 h, 取 3 OD<sub>600</sub> 种子液离心无菌重悬接种发酵培养基 P-Y 中传代驯化并测定 PVA 含量。

观察目的菌株菌落形态、镜检并进行革兰氏染色实验, 提取其 16S rDNA 并测序, 在 NCBI 上比对所得测序结果将纯菌鉴定到属 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。

**1.2.2 种子培养** 从甘油管中取 50  $\mu$ L 菌液于接入装有 20 mL P-TY 培养基的 250 mL 三角瓶, 并在 30 °C、200 r/min 下培养 18 h。

**1.2.3 发酵培养** 250 mL 三角瓶装液量 20 mL, 接种量 3 OD, 30 °C、200 r/min 培养测定 PVA 降解率及 PVA 降解酶总酶活。

**1.2.4 粗酶液制备** 取发酵培养液, 10 000 r/min 离心 8 min, 所得上清液即为粗酶液组分 1。去上清菌体, 加等体积的 20 mmol/L、pH 7.5 PBS 缓冲液重

悬后超声波(400 W)处理 20 min,其中破碎 3 s 暂停 1 s,破壁后 10 000 r/min 离心 8 min,所得上清液即为粗酶液组分 2。混合组分 1、2 即为粗酶液。

### 1.3 分析方法

**1.3.1 菌浓测定** 取发酵液稀释至合适的吸光度范围在 600 nm 处测定其吸光度。

**1.3.2 PVA 浓度的测定** 改良的 Finley 法<sup>[12]</sup>。取 400  $\mu$ L 发酵上清液加入 10 mL 具塞比色管,加入 3 mL、25 g/L 硼酸溶液,最后加 300  $\mu$ L 0.1 mol/L I<sub>2</sub>-KI 溶液,用去离子水定容至 10 mL,避光反应 10 min,以水替换发酵上清液作为空白对照,以发酵前培养基作为标准对照,1 cm 光程 690 nm 波长下测定吸光度。

$$\text{PVA 降解率}(\%) = \frac{\text{PVA}_{\text{发酵前 OD690}} - \text{PVA}_{\text{发酵后 OD690}}}{\text{PVA}_{\text{发酵前 OD690}}} \times 100\%$$

**1.3.3 PVA 降解酶总酶活** 取粗酶液 2 mL,加入 15 mL 离心管中,与溶解在 pH 7.5、20 mmol/L PBS 缓冲液中的 2 g/L PVA 溶液均匀混合,于 30  $^{\circ}$ C 下振荡保温 5 h。分别测定反应前后混合液在 690 nm 下的吸光度,每分钟吸光度下降 0.001 定义为一个酶活单位(U)<sup>[8]</sup>。

### 1.4 培养基优化<sup>[13]</sup>

摇瓶培养基优化策略选用响应面优化,以单因素实验确定最优氮源,通过 Plackett-Burman 实验找出对 PVA 降解有显著影响的因素,挑选具有显著效应的因素进行最陡爬坡实验,然后通过爬坡实验确定中心组合实验的中心点,最后进行中心组合实验。使用 Design-Expert 软件对实验结果进行统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌种筛选与鉴定

将从纺织印染厂采集来的土样、活性污泥样等用生理盐水重悬、静置后取上层清液用富集培养基 P-Y 培养基于 200 r/min、30  $^{\circ}$ C 培养,期间间断取样测定 PVA 浓度的变化,每次富集时间 6 d。经过 3 次循环富集驯化,得到一个能在 4 d 内降解 P-Y 培养基中全部 PVA 的混合菌体系,命名为 SH-TD,这也是本研究后期工作的研究对象。对混合菌系稀释合适的梯度涂布分离鉴定平板,经 Finley 法显色后,挑取有透明圈的菌落多次在鉴定培养基上反复划线纯化,得到了 3 个菌落形态不同的纯菌落,分别命名为 SH1、TD5、TD33,图 1 为 TD5 透明圈图。以三株菌的基因组为模板,以 27F、1492R 通用引物 PCR 分别得到其 16S rDNA 序列,测序后分别在 NCBI 上进行比对,三株纯菌分别鉴定为 *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., 对 3 株菌构建系统发育树,见图 2。

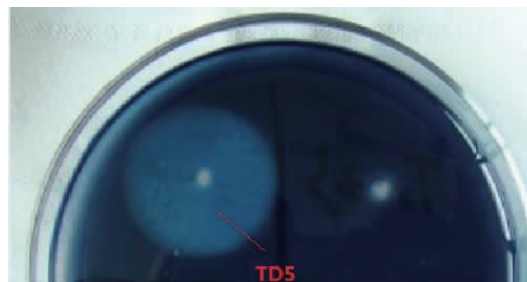


图 1 TD5 菌落形态及透明圈

Fig. 1 Colonial morphology and transparent circle of TD5

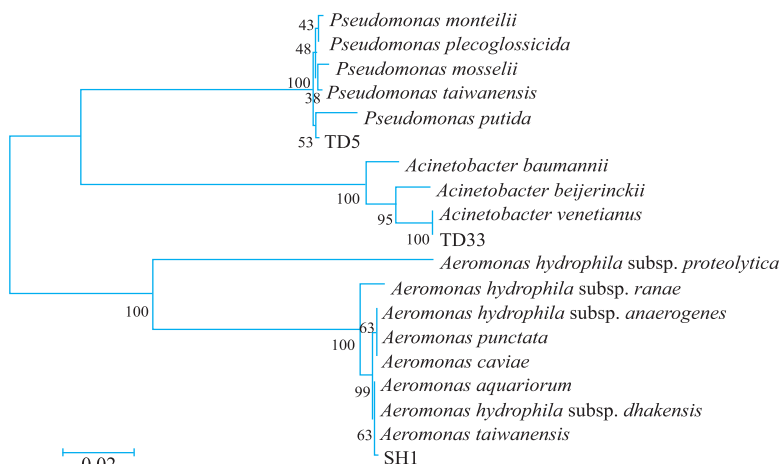


图 2 3 株 PVA 降解菌的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of three isolated PVA-degrading bacterium

2.2 单因素实验

在去除氮源的 P-Y 中,添加不同的氮源 (有机氮源和无机氮源, 控制每种氮源的含氮量均为 0.2 g/L),探究不同氮源对 PVA 降解及产酶的影响。添加的有机氮源分别为 Yeast-Extract、蛋白胨和牛肉膏; 添加的无机氮种类分别为 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>、柠檬酸三铵、NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>。每种氮源做三个平行,培养 48 h,测定各处理中 PVA 的浓度。由图 3 可见, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 为最优氮源。

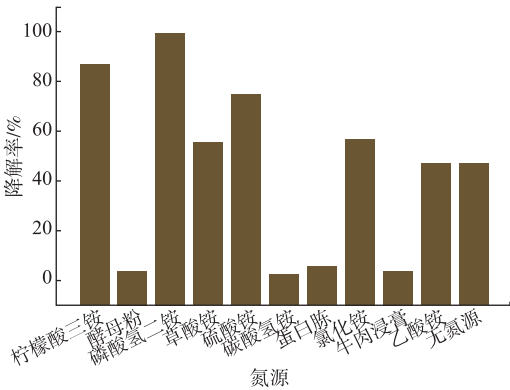


图 3 不同种类氮源对 PVA 降解率的影响 (48 h)  
Fig. 3 Effects of different nitrogen sources on enzyme activity (48 h)

2.3 Plackett-Burman 实验

作者选用实验次数 N=12 的 Plackett-Burman 实验设计, 对 8 个因素进行考察, 分别为 Yeast-Extract, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, NaCl。每个因素分两个水平, 高水平取低水平的 1.5 倍, 响应值为培养 12 h 后培养基中 PVA 的降解率(%). 实验设计及结果见表 1, 利用 Design-Expert 软件对 Plackett-Burman 实验各因素主效应分析的结果见表 2。由表 2 可知, Yeast-Extract、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 和 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 这四个因素的可信度都在 95% 以上, 其余四个因素的可信度均低于 95%, 同时考虑到在进行响应面分析时, 因素超过 3 个会使实验次数显著增加, 而在以上 4 个显著因素中, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 的影响相对差一些, 而且 CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 可能与 PVA 降解的吸附降解机理有关。因此确定 Yeast-Extract、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 为主要影响因素进行下一步实验。

2.4 爬坡实验

根据 Plackett-Burman 的结果确定下一步实验的最陡爬坡路径。通过 PB 实验分析可知, Yeast-Extract 有负效应, 应减少; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 有显著正效应, 应增加。根据这三个因素效应大小

表 1 Plackett-Burman 实验设计和响应值  
Table 1 Plackett-Burman experiment design and its response

| 序号 | X <sub>1</sub> | X <sub>2</sub> | X <sub>3</sub> | X <sub>4</sub> | X <sub>5</sub> | X <sub>6</sub> | X <sub>7</sub> | X <sub>8</sub> | X <sub>9</sub> | X <sub>10</sub> | X <sub>11</sub> | Y d/% |
|----|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|-------|
| 1  | -1             | 1              | -1             | 1              | 1              | -1             | 1              | 1              | 1              | -1              | -1              | 27.20 |
| 2  | -1             | -1             | -1             | 1              | -1             | 1              | 1              | -1             | 1              | 1               | 1               | 25.01 |
| 3  | 1              | -1             | 1              | 1              | 1              | -1             | -1             | -1             | 1              | -1              | 1               | 20.50 |
| 4  | 1              | 1              | 1              | -1             | -1             | -1             | 1              | -1             | 1              | 1               | -1              | 25.09 |
| 5  | 1              | 1              | -1             | -1             | -1             | 1              | -1             | 1              | 1              | -1              | 1               | 26.36 |
| 6  | -1             | 1              | 1              | 1              | -1             | -1             | -1             | 1              | -1             | 1               | 1               | 26.18 |
| 7  | 1              | -1             | -1             | -1             | 1              | -1             | 1              | 1              | -1             | 1               | 1               | 25.67 |
| 8  | -1             | -1             | -1             | -1             | -1             | -1             | -1             | -1             | -1             | -1              | -1              | 26.26 |
| 9  | 1              | -1             | 1              | 1              | -1             | 1              | 1              | 1              | -1             | -1              | -1              | 21.50 |
| 10 | 1              | 1              | -1             | 1              | 1              | 1              | -1             | -1             | -1             | 1               | -1              | 25.58 |
| 11 | -1             | 1              | 1              | -1             | 1              | 1              | 1              | -1             | -1             | -1              | 1               | 27.58 |
| 12 | -1             | -1             | 1              | -1             | 1              | 1              | -1             | 1              | 1              | 1               | -1              | 25.06 |

表 2 Plackett-Burman 实验因素水平及其主效应分析

Table 2 Levels of variable and analysis of the main effect for Plackett-Burman

| 符号    | 变量<br>因素                                  | 水平   |       | $p\text{-value}>F$ | 显著性顺序 |
|-------|-------------------------------------------|------|-------|--------------------|-------|
|       |                                           | -1   | 1     |                    |       |
| $X_1$ | Yeast-Extract                             | 0.1  | 0.15  | 0.020 0            | 2     |
| $X_2$ | $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$             | 10   | 15    | 0.015 0            | 1     |
| $X_3$ | $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.01 | 0.015 | 0.035 3            | 3     |
| $X_4$ | $\text{K}_2\text{HPO}_4$                  | 1    | 1.5   | 0.036 4            | 4     |
| $X_5$ | $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.1  | 0.15  | 0.696 6            | 7     |
| $X_6$ | $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.01 | 0.015 | 0.946 3            | 8     |
| $X_7$ | $\text{KH}_2\text{PO}_4$                  | 0.01 | 0.015 | 0.502 0            | 5     |
| $X_8$ | NaCl                                      | 0.1  | 0.15  | 0.533 0            | 6     |

的比例设定它们的变化方向以及步长,其他五个因素分别取各自的低水平进行实验,实验设计及结果见表 3。从结果来看,最佳因素的质量浓度处于第 8 组和第 9 组之间,故以第 8 组条件为后续实验的中心点进行响应面分析。

表 3 爬坡实验设计及结果

Table 3 Experimental design and result of ascent

| 实验<br>序号 | Yeast-Extract<br>质量浓度/(g/L) | $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$<br>质量浓度/(g/L) | $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 质<br>量浓度/(g/L) | $Y_d/\%$ |
|----------|-----------------------------|---------------------------------------------|----------------------------------------------------------|----------|
| 1        | 0.10                        | 10                                          | 0.010                                                    | 35.54    |
| 2        | 0.09                        | 15                                          | 0.015                                                    | 37.29    |
| 3        | 0.08                        | 20                                          | 0.020                                                    | 38.43    |
| 4        | 0.07                        | 25                                          | 0.025                                                    | 39.12    |
| 5        | 0.06                        | 30                                          | 0.030                                                    | 41.61    |
| 6        | 0.05                        | 35                                          | 0.035                                                    | 43.25    |
| 7        | 0.04                        | 40                                          | 0.040                                                    | 47.34    |
| 8        | 0.03                        | 45                                          | 0.045                                                    | 53.23    |
| 9        | 0.02                        | 50                                          | 0.050                                                    | 51.21    |
| 10       | 0.01                        | 55                                          | 0.055                                                    | 45.24    |

## 2.5 响应面分析重要因素的最优质量浓度水平

**2.5.1 二次回归模型拟合及方差分析** 根据 Plackett-Burman 实验确定了影响 PVA 降解速率即产酶的主要因素,Box-Behnken 实验各因素水平见表 4,实验设计及结果见表 5。

表 4 Box-Behnken 实验因素水平

Table 4 Experimental variables and levels for BB design

| 变量名称                                                 | 符号    | 水平   |       |      |
|------------------------------------------------------|-------|------|-------|------|
|                                                      |       | -1   | 0     | 1    |
| Yeast-Extract 质量浓度/(g/L)                             | $X_1$ | 0.01 | 0.03  | 0.05 |
| $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 质量浓度/(g/L)             | $X_2$ | 10   | 45    | 80   |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 质量浓度/(g/L) | $X_3$ | 0.01 | 0.045 | 0.08 |

表 5 BB 实验设计与结果

Table 5 Design and results of BB experiment

| 实验<br>序号 | Yeast-Extract<br>质量浓度/(g/L) | $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$<br>质量浓度/(g/L) | $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$<br>质量浓度/(g/L) | $Y_d/\%$ |
|----------|-----------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------------------|----------|
| 1        | 0.03                        | 10                                          | 0.01                                                    | 0.525 0  |
| 2        | 0.05                        | 45                                          | 0.01                                                    | 0.630 4  |
| 3        | 0.03                        | 45                                          | 0.04                                                    | 0.797 1  |
| 4        | 0.01                        | 80                                          | 0.04                                                    | 0.563 0  |
| 5        | 0.01                        | 45                                          | 0.01                                                    | 0.674 5  |
| 6        | 0.03                        | 45                                          | 0.04                                                    | 0.798 9  |
| 7        | 0.01                        | 10                                          | 0.04                                                    | 0.570 5  |
| 8        | 0.03                        | 45                                          | 0.04                                                    | 0.789 7  |
| 9        | 0.05                        | 45                                          | 0.08                                                    | 0.630 9  |
| 10       | 0.05                        | 10                                          | 0.04                                                    | 0.515 8  |
| 11       | 0.05                        | 80                                          | 0.04                                                    | 0.515 5  |
| 12       | 0.03                        | 80                                          | 0.01                                                    | 0.550 2  |
| 13       | 0.03                        | 10                                          | 0.08                                                    | 0.513 7  |
| 14       | 0.03                        | 45                                          | 0.04                                                    | 0.799 2  |
| 15       | 0.03                        | 80                                          | 0.08                                                    | 0.540 2  |
| 16       | 0.03                        | 45                                          | 0.04                                                    | 0.785 0  |
| 17       | 0.01                        | 45                                          | 0.08                                                    | 0.592 9  |

以  $Y_d$  为响应值,根据表 5 中 Box-Behnken 设计的实验结果,利用 Design-Expert 软件对其结果进行二次回归分析,得到回归方程为:

$$Y_d = 0.263\ 25 + 9.336\ 51X_1 + 0.013\ 011X_2 + 5.004\ 58X_3 + 2.602\ 86 \times 10^{-3}X_1X_2 + 29.327\ 86X_1X_3 + 2.681\ 63 \times 10^{-4}X_2X_3 - 190.829\ 50X_1^2 - 1.438\ 32 \times 10^{-4}X_2^2 - 69.583\ 9X_3^2$$

从方差分析表 6 中可以看出,模型在  $\alpha=0.01$  水平上回归显著;同时,一次项、平方项、交叉项均对响应值有显著性影响。模型可信度分析见表 7,其中

复相关系数的平方  $R^2 = 0.9895$ , 说明模型可以解释 98.95% 实验所得 PVA 降解率的变化, 表明方程拟合较好。本设计实验中  $CV = 2.79\%$ , 较低, 说明实验操作可信。综上说明回归方程给 PVA 降解率的变化提供了一个合适的模型。

表 6 模型方差分析

Table 6 NOVA for the full quadratic model

| 变量       | 平方和                   | 自由度 | F-Value               | p-value<br>prob> F |
|----------|-----------------------|-----|-----------------------|--------------------|
| 模型       | 0.21                  | 9   | 73.48                 | <0.000 1           |
| $X_1$    | $1.46 \times 10^{-3}$ | 1   | 4.65                  | 0.067 9            |
| $X_2$    | $2.40 \times 10^{-4}$ | 1   | 0.76                  | 0.411 1            |
| $X_3$    | $1.31 \times 10^{-3}$ | 1   | 4.17                  | 0.080 4            |
| $X_1X_2$ | $1.33 \times 10^{-5}$ | 1   | 0.042                 | 0.843 1            |
| $X_1X_3$ | $1.69 \times 10^{-3}$ | 1   | 5.36                  | 0.053 8            |
| $X_2X_3$ | $4.32 \times 10^{-7}$ | 1   | $1.37 \times 10^{-3}$ | 0.971 5            |
| $X_1X_1$ | 0.025                 | 1   | 77.96                 | <0.000 1           |
| $X_2X_2$ | 0.13                  | 1   | 415.38                | <0.000 1           |
| $X_3X_3$ | 0.031                 | 1   | 97.22                 | <0.000 1           |

表 7 模型的可信度分析

Table 7 Fit statistics for the model

| 指标                  | 数值      |
|---------------------|---------|
| 复相关系数 $R^2$         | 0.989 5 |
| 校正后的 $R^2$          | 0.976 1 |
| 模型误差的平方根            | 0.018   |
| $Y_d$ 的变异系数 $CV/\%$ | 2.79    |

**2.5.2 响应面分析及最优浓度的确定** 通过回归方程分析得到极大值所对应主要因素  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ , 即 Yeast-Extract、 $(NH_4)_2HPO_4$  和  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  的质量浓度分别为 0.04、48.42、0.06 g/L, 此时 24 h 后的 PVA 降解率最高, 为 80.84%。以确定的主要因素质量浓度配制培养基, 分三批次, 24 h PVA 降解率平均为 79.76%, 与预测值基本相符。PVA 降解酶酶活大大提高, 降解周期缩短至 36 h 内。

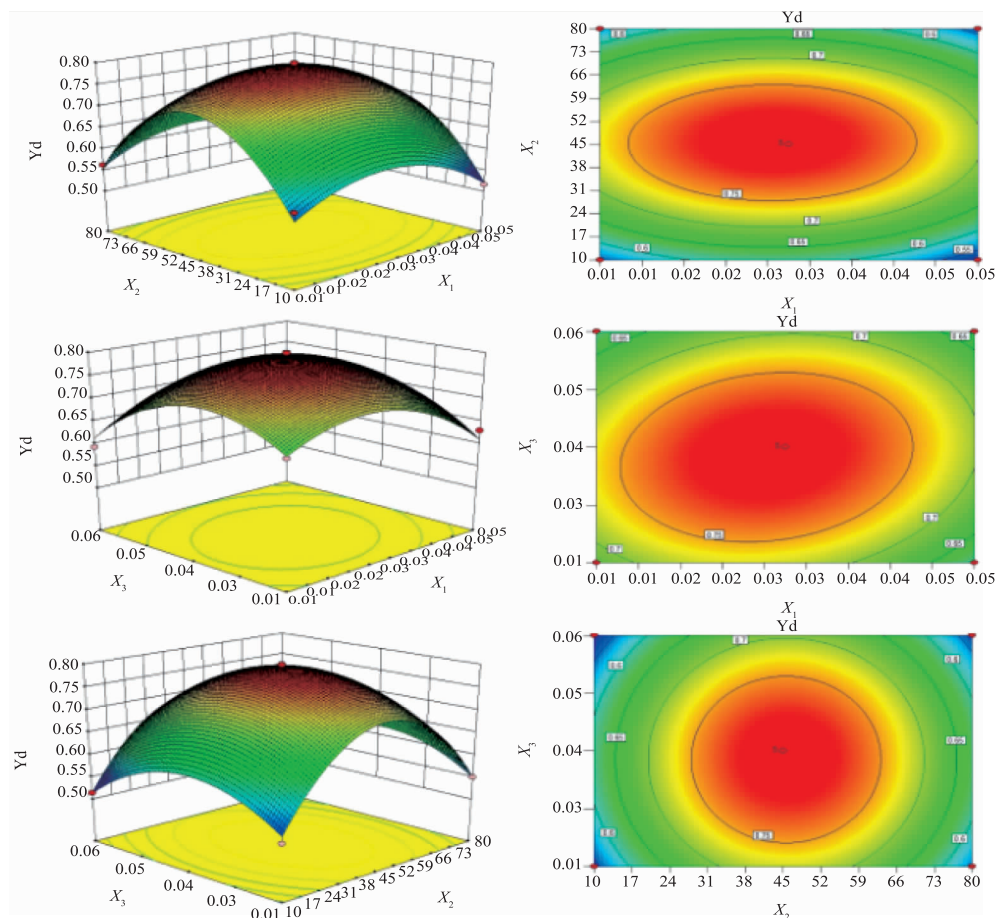


图 4 响应面立体分析图及对应等高线图

Fig. 4 Response surface plot and contour plot of central composite experiment

### 3 结 语

通过富集驯化,得到一个快速降解培养基中 PVA1799 组分的混合菌系 SH-TD,从中分离出三种纯菌,它们分别是 SH1 (*Aeromonas* sp.),TD5 (*Acinetobacter* sp.)和 TD33 (*Pseudomonas* sp.)。

采用响应面分析法对 PVA 降解菌降解 PVA 的发酵培养基进行优化,首先运用 Plackett-Burman 法确定出 Yeast-Extract、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  和  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  为重要影响因素;然后通过最陡爬坡实验逐步改变

三者的质量浓度,逼近中心点;最后采用 Box-Behnken 设计和 Design-Expert 软件分析确定出主要因素的最优质量浓度,得到最佳发酵培养基组分(g/L)为:PVA1799 1,Yeast-Extract 0.04,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  48.42,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.02,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.6,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.02,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.06, NaCl 0.02;pH 7.5。此时 24 h 后的 PVA 降解率最高,为 80.0%。降解效率与原初始发酵培养基相比提高了 1.7 倍。PVA 降解酶总酶活大大提高,为进一步研究打下了坚实的基础。

### 参考文献:

- [1] Larking D M, Crawford R J, Christie G B Y, et al. Enhanced degradation of polyvinyl alcohol by *Pycnoporus cinnabarinus* after pretreatment with fenton's reagent[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 1999, 65(4):1798-1800.
- [2] Chiellini E, Corti A, D'Antone S, et al. Biodegradation of poly(vinyl alcohol) based materials[J]. **Progress in Polymer Science**, 2003, 28(6):963-1014.
- [3] 鞠喜, 堵国成, 陈坚. 金属离子和醇类对混合菌产聚乙烯醇降解酶的影响[J]. **工业微生物**, 2008, 38(2):15-19.  
JU Xi, DU Guocheng, CHEN Jian. Effect of metal ions and alcohols on PVA-degrading enzyme produced by mixed bacteria[J]. **Industrial Microbiology**, 2008, 38(2):15-19.(in Chinese)
- [4] Suzuki T, Ichihara Y, Yamada M, et al. Some characteristics of *Pseudomonas* O-3 which utilizes polyvinyl alcohol [J]. **Agricultural and Biological Chemistry**, 1973, 37(4):747-756.
- [5] Sakazawa C, Shimao M, Taniguchi Y, et al. Symbiotic utilization of polyvinyl alcohol by mixed cultures [J]. **Appl Environ Microbiol**, 1981, 41(1):261-267.
- [6] Risse W, Grubbs R H. A novel route to block copolymers by changing the mechanism from living ring-opening metathesis polymerization of cyclic olefins to aldol condensation polymerization of silyl vinyl ethers [J]. **Macromolecules**, 1989, 22(4):1558-1562.
- [7] 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 and Biochemistry**, 1996, 60(2):330-332.
- [8] 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.
- [9] Kim M N, Yoon M G. Isolation of strains degrading poly(vinyl alcohol) at high temperatures and their biodegradation ability[J]. **Polymer Degradation and Stability**, 2010, 95(1):89-93.
- [10] Sakai K, Fukuba M, Hasui Y, et al. Purification and characterization of an esterase involved in poly(vinyl alcohol) degradation by *Pseudomonas vesicularis* PD[J]. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, 1998, 62(10):2000-2007.
- [11] Finley J H. Spectrophotometric determination of polyvinyl alcohol in paper coatings [J]. **Analytical Chemistry**, 1961, 33(13):1925-1927.
- [12] 曹小红, 蔡萍, 李凡, 等. 利用响应面法优化 *Bacillus natto* TK-1 产脂肽发酵培养基 [J]. **中国生物工程杂志**, 2007, 27(4):59-65.  
CAO Xiaohong, CAI Ping, LI Fan, et al. Medium optimization for lipopeptide produced by *Bacillus natto* TK-1 using response surface methodology[J]. **China Biotechnology**, 2007, 27(4):59-65.(in Chinese)