

# 影响青霉产聚乙烯醇降解酶营养因素的研究

张 颖 李 寅 陈 坚\*

(江南大学工业生物技术教育部重点实验室 江南大学生物工程学院环境生物技术研究室 无锡 214036)

**摘 要** 在培养基中没有聚乙烯醇(PVA)及有PVA存在的情况下,考察了酵母粉、20种氨基酸和部分维生素对一株青霉WSH02-21产PVA降解酶的影响。当培养基中无PVA时,以酵母粉为氮源时,该菌株可产生38.9 U/L的PVA降解酶,加入PVA后,酶活提高了3.3倍,表明该菌株所产的PVA降解酶是可诱导的。进一步研究发现,不管培养基中是否存在PVA,若没有苏氨酸存在,该菌株正常生长,但不能产生PVA降解酶,表明苏氨酸是该菌株产生PVA降解酶所必需的,而非生长所必需。在苏氨酸添加浓度为10mg/L到20mg/L的范围内,该菌株所产PVA降解酶的酶活随着培养基中苏氨酸浓度的增大而呈现上升趋势。

**关键词** 青霉,聚乙烯醇,降解酶,酵母粉,苏氨酸,影响

中图分类号:Q939.9 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2004)05-0650-04

聚乙烯醇(PVA)是一种人工合成的水溶性高分子化合物,在纺织、造纸、化工等行业有广泛的用途,但是在自然环境中它很难被降解,是水体中的主要污染物之一,特别是在纺织工业废水中。PVA降解酶对PVA有良好的生物降解性,可以应用于纺织工业中的PVA退浆工艺,实现在织物表面直接对PVA的降解从而减少PVA废水的排放。从上个世纪70年代开始,国内外学者就致力于筛选出可以产生PVA降解酶的微生物,研究PVA降解酶的性质和它们降解PVA的机理。到目前为止,研究所涉及的微生物均为细菌,并且所有研究都是在以PVA为唯一碳源兼诱导物的情况下进行的<sup>[1-9]</sup>,至于不加PVA时微生物是否产酶,迄今为止未有报道。

在前期研究中本研究室筛选到一株能产生PVA降解酶的青霉,这是由真菌产生PVA降解酶的首次报道<sup>[10]</sup>。进一步研究发现,当培养基中没有PVA时,以酵母粉为氮源时这株青霉也可以产生PVA降解酶。而以其它有机或无机氮化合物为氮源时,或根本不产酶,或酶活远低于以酵母粉为氮源时的情况。以酵母粉为氮源,外加PVA为唯一碳源兼诱导物后,该菌株产生的PVA降解酶酶活有了大幅度提高。而只供给无机氮源 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 时,细胞生长不好并且没有PVA降解酶的产生。由于酵母粉中维生素和氨基酸含量较高,为研究酵母粉对PVA降解酶产生的影响,作者进一步考察了20种氨基酸及部分维

生素对该菌株产PVA降解酶的影响。结果发现,无论PVA存在与否,苏氨酸均是影响该菌株产PVA降解酶的关键氨基酸。本文研究结果对进一步比较青霉和细菌产生的PVA降解酶的异同、阐明青霉产PVA降解酶及降解PVA的机理奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种和培养基

**1.1.1 菌种** 青霉菌(*Penicillium* sp.),前期工作中筛选得到<sup>[10]</sup>,实验室编号WSH02-21。

**1.1.2 培养基** 斜面培养基:每升含马铃薯200g,葡萄糖20g,琼脂16g,自然pH。种子培养基:每升含可溶性淀粉20g, $\text{NH}_4\text{Cl}$  8g, $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.6g, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.02g,无水 $\text{CaCl}_2$  0.1g, $\text{NaCl}$  0.02g,pH6.0。发酵基本培养基:每升含 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.02g,无水 $\text{CaCl}_2$  0.1g, $\text{NaCl}$  0.02g,pH6.4。

培养基中无PVA时,以1g/L可溶性淀粉为碳源,培养基中有PVA时,PVA浓度为5g/L。氮源根据实验需要添加。氨基酸单独添加时,浓度均为20mg/L<sup>[11]</sup>。

氨基酸混合液<sup>[12]</sup>:每升含丙氨酸10mg,精氨酸5.9mg,天门冬氨酸13.2mg,胱氨酸1.3mg,甘氨酸6.8mg,谷氨酸19.7mg,组氨酸3.5mg,异亮氨酸

基金项目 国家 863 计划(2003AA322050)

\* 通讯作者。Tel:86-510-5877592; Fax:86-510-5888301; E-mail:jchen@sytu.edu.cn

作者简介 张 颖(1974-),女,贵州贵阳人,博士研究生,研究方向为发酵工程。E-mail:coral-zhangying@hotmail.com

收稿日期 2004-01-02,修回日期 2004-03-17

6.7mg,亮氨酸 8.8mg,赖氨酸 10.3mg,蛋氨酸 2.1mg,苯丙氨酸 5.0mg,脯氨酸 5.0mg,丝氨酸 6.8mg,色氨酸 1.5mg,酪氨酸 4.7mg,缬氨酸 7.4mg。氨基酸混合液中若包括苏氨酸时,其浓度为 20mg/L。

维生素混合液:每升含生物素 0.4mg,硫酸素 0.0015mg,烟酸 8.0mg,吡哆醇 0.4mg。

氨基酸混合液和维生素混合液浓度均为使用时终浓度。

**1.1.3 试剂:**酵母粉购自英国 OXOID 公司,含 N9.8%(W/W)(含 N 量由凯氏定氮法测定,以下同)。玉米浆由无锡第二制药厂提供,含 N6.0%。豆饼粉购自丹阳市榨油厂,含 N6.0%。蛋白胨购自中国医药集团上海化学试剂公司,含 N14.0%。牛肉膏购自中国医药集团上海化学试剂公司,含 N7.9%。棉籽粉购自北京中棉紫光生物有限公司,含 N5.9%。PVA1799 由江南大学纺织学院提供。除特别提及外,实验中所用试剂均为分析纯。

## 1.2 培养方法

**1.2.1 种子培养:**用无菌水将斜面上的孢子洗下制成孢悬液,接至装有 150mL 种子培养基的 500mL 三角瓶中,30℃,200r/min 振荡培养 24h。

**1.2.2 摇瓶培养:**按 10%(V/V)接种量,将培养 24h 的种子接入装有 30mL 发酵培养基的 250mL 三角瓶中,30℃,200r/min 振荡培养 72h。每个条件设 3 个平行样,实验结果以平均值±方差表示。

## 1.3 测定方法

**1.3.1 PVA 含量测定:**Finley 法<sup>[13]</sup>。

**1.3.2 PVA 降解酶酶活测定方法:**将发酵液过滤,收集滤液。在 5×15 试管中加入 0.5mL 发酵液和 0.5mL 底物(1g/L PVA 溶液,pH8.0),将此混合体系于 35℃反应 6h,分别测定反应前后反应混合液所对应 PVA 含量的吸光度。每分钟吸光度下降 0.001 定义为一个酶活单位<sup>[8]</sup>。

**1.3.3 细胞干重测定方法:**将每个三角瓶中的发酵液过滤,收集菌体于滤纸上,在 105℃烘箱中烘至恒重,称重即为菌体干重。

## 2 结果

### 2.1 培养基中无 PVA 时,不同氮源对青霉 WSH02-21 产 PVA 降解酶的影响

在研究中发现,以单、双糖(葡萄糖、蔗糖等)为碳源时,青霉 WSH02-21 不产生 PVA 降解酶;以多糖(可溶性淀粉、糊精)为碳源时,该菌株能产生 PVA

降解酶,但碳源浓度超过一定范围后产酶受到抑制。经实验确定发酵培养基中碳源为可溶性淀粉 1g/L,此浓度下 PVA 降解酶的产生不会受到抑制。在此条件下考察了不同氮源对青霉 WSH02-21 产 PVA 降解酶的影响(表 1)。表 1 显示,培养基中无 PVA 时,青霉 WSH02-21 不能利用无机氮源产生 PVA 降解酶,但可以利用一些有机氮源产生 PVA 降解酶,其中以酵母粉为氮源时酶活最高,选择酵母粉继续进行研究。

表 1 培养基中没有 PVA 时不同氮源对于产酶的影响

Table 1 Effect of different nitrogen sources on the production of PVA degrading enzyme in media free of PVA

Nitrogen source <sup>1</sup>	DCW(g/L)	Enzyme activity (U/L)	Specific enzyme activity (U/g)
None (control)	1.0±0.03	ND <sup>2</sup>	ND
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.1±0.05	ND	ND
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.2±0.03	ND	ND
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0±0.06	ND	ND
NH <sub>4</sub> Cl	1.3±0.08	ND	ND
Urea	1.2±0.02	ND	ND
Peptone	2.2±0.02	5.6±0.00	2.6
Corn steep liquor	2.4±0.15	ND	ND
Bean cake powder	4.6±0.07	5.6±0.00	1.2
Cotton seed powder	2.2±0.2	ND	ND
Beef extract	2.2±0.2	5.6±0.00	2.7
Yeast extract	2.1±0.13	38.9±2.78	17.9

<sup>1</sup> Nitrogen content 0.294 g/L; <sup>2</sup> ND: None detection.

### 2.2 培养基中无 PVA 及有 PVA 存在时,不同氮源、氨基酸、维生素对 PVA 降解酶产生的影响

酵母粉中含有许多氨基酸、嘌呤、B 族维生素<sup>[12]</sup>。要分析酵母粉中到底是哪种物质促进了 PVA 降解酶的产生,需要在一个合成培养基中进行研究。由表 1 可知,青霉 WSH02-21 利用 NH<sub>4</sub>Cl 进行生长的情况稍强于其它无机氮源,并且不产生 PVA 降解酶,故在研究中选择 NH<sub>4</sub>Cl 作为氮源,与可溶性淀粉或 PVA 等物质共同组成全合成培养基,研究 20 种氨基酸和部分维生素对 PVA 降解酶产生的影响(表 2)。由表 2 可看出苏氨酸的添加对于青霉 WSH02-21 的菌体生长并无明显促进作用。但是不论是以可溶性淀粉还是以 PVA 为碳源,在以 NH<sub>4</sub>Cl 为氮源的全合成培养基中只有加入苏氨酸时青霉 WSH02-21 才产生少量 PVA 降解酶;以氨基酸混合物为氮源时也必须要有苏氨酸的存在,青霉 WSH02-21 才会产 PVA 降解酶。在有苏氨酸存在的情况下,维生素对 PVA 降解酶的产生也具有一定的促进作用。

表 2 不同氮源、氨基酸、维生素对于产酶的影响

Table 2 Effect of different nitrogen sources, amino acids and vitamins on the production of PVA degrading enzyme

Carbon source	Nitrogen source	AA <sup>1</sup> improves enzyme activity	DCW (g/L)	Enzyme activity (U/L)	Specific enzyme activity (U/g)
Soluble starch <sup>2</sup>	Control (None)		1.0 ± 0.03	ND	ND
	Yeast extract <sup>3</sup>	2.1 ± 0.13	38.9 ± 2.78	17.9	
	NH <sub>4</sub> Cl <sup>4</sup>		1.3 ± 0.08	ND	ND
	Single AA <sup>5</sup> + NH <sub>4</sub> Cl	Thr	1.4 ± 0.07	11.1 ± 0.00	8.1
	AA mixture <sup>6</sup>		1.8 ± 0.02	22.2 ± 2.78	12.5
	AA mixture (Thr <sup>-</sup> ) <sup>7</sup>		1.7 ± 0.00	ND	ND
PVA <sup>9</sup>	AA mixture + NH <sub>4</sub> Cl + vitamins <sup>8</sup>		1.7 ± 0.07	22.5 ± 2.78	11.8
	Control (None)		1.2 ± 0.02	ND	ND
	Yeast extract	4.0 ± 0.16	166 ± 2.78	41.5	
	NH <sub>4</sub> Cl		1.4 ± 0.02	ND	ND
	Single AA + NH <sub>4</sub> Cl	Thr	1.6 ± 0.1	27.8 ± 0.00	17.4
	AA mixture		2.7 ± 0.13	88.9 ± 2.78	32.6
	AA mixture (Thr <sup>-</sup> )		2.9 ± 0.08	ND	ND
	AA mixture + NH <sub>4</sub> Cl + vitamins	2.9 ± 0.1	94.4 ± 2.78	32.9	

<sup>1</sup> AA: amino acid; <sup>2</sup> Soluble starch 1g/L; <sup>3</sup> Yeast extract 3g/L; <sup>4</sup> NH<sub>4</sub>Cl 1.1g/L; <sup>5</sup> 20 amino acids were tested individually; <sup>6</sup> Amino acids mixture contains 20 amino acids including Thr; <sup>7</sup> Amino acids mixture contains 19 amino acids, free of Thr; <sup>8</sup> mixture of vitamins 13mL/L; <sup>9</sup> PVA 5.0g/L.

### 2.3 苏氨酸浓度对于青霉 WSH02-21 产 PVA 降解酶的影响

培养基中外加 PVA 作为唯一碳源兼诱导物,在 0mg/L 到 100mg/L 之间考察苏氨酸添加浓度对于青霉 WSH02-21 产 PVA 降解酶的影响(图 1)。图 1 显示,苏氨酸对于青霉 WSH02-21 在生长方面没有明显促进作用,但对该菌株产 PVA 降解酶确实有促进作用,在 10mg/L 到 20mg/L 之间随着苏氨酸浓度的增加,酶活呈现上升趋势。

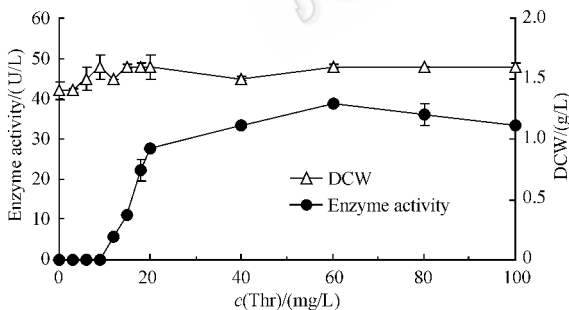


图 1 苏氨酸浓度对产酶的影响

Fig. 1 Effect of Thr concentration on enzyme production

## 3 讨论

在培养基中没有 PVA 存在、以 1g/L 可溶性淀粉为碳源时,以酵母粉作为氮源,青霉 WSH02-21 可以产生少量 PVA 降解酶;在将碳源换作 PVA 后,青霉 WSH02-21 产 PVA 降解酶酶活及单位细胞产酶水平有了明显的提高(表 2),说明该菌株产生的 PVA 降解酶是可诱导的。

为了研究酵母粉对青霉 WSH02-21 产生 PVA 降

解酶的影响,选择 NH<sub>4</sub>Cl 作为全合成培养基的氮源,进一步研究了 20 种氨基酸和部分维生素对青霉 WSH02-21 产 PVA 降解酶的影响。结果发现,不管培养基中是否存在 PVA,苏氨酸均能明显促进 PVA 降解酶的产生(表 2)。但是苏氨酸对青霉 WSH02-21 的生长促进不大,说明苏氨酸是该菌株产生 PVA 降解酶的必需氨基酸而不是生长必需氨基酸。在产 PVA 降解酶的细菌中也存在类似情况,Hashimoto<sup>[11]</sup>等发现:以 PVA 为唯一碳源时,只有添加酵母膏时 *Pseudomonas vesicularis* var. *povalolyticus* PH 才会降解 PVA,并找出了苯丙氨酸、异亮氨酸、胱氨酸是 *P. vesicularis* var. *povalolyticus* PH 产生 PVA 降解酶的必需氨基酸。相同的培养基用于本研究中没有得到同样的实验结果。

以可溶性淀粉为碳源时且总氮含量一致的情况下,青霉 WSH02-21 利用玉米浆、蛋白胨等物质产生的 PVA 降解酶酶活远小于利用酵母粉时的酶活(表 1)。在后面的研究中发现,不管培养基中是否存在 PVA,青霉 WSH02-21 利用氨基酸混合物(包括苏氨酸)产生的 PVA 降解酶活也小于利用酵母粉时的酶活(表 2)。可能在青霉 WSH02-21 产酶过程中,除了要有必需的氨基酸外,还需要一些别的物质作为辅助因子(酵母粉能够提供),它们和苏氨酸的协同效应促进了青霉 WSH02-21 产生 PVA 降解酶。但是实验考察范围内的维生素没有显示出明显的菌体生长及酶活促进作用,因此需要对维生素种类及浓度的影响进行更深入的研究。

目前有关青霉 WSH02-21 产生的 PVA 降解酶的纯化工作正在进行中。对纯化后的酶进行酶学性质研究,会有利于阐明酵母粉中各物质对于青霉 WSH02-21 产 PVA 降解酶的促进作用。

致谢 研究过程中得到本实验室 01 级硕士研究生钱鼎、02 级硕士研究生宋朝霞的帮助 特此致谢。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] 王银善,庞学军,方慈祺,等. 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. 环境科学学报, 1991, **11**(2):236-241.
- [ 2 ] Suzuki T, Ichihara Y, Yamada M, et al. Some characteristics of *Pseudomonas* O-3 which utilizes polyvinyl alcohol. *Agric Biol Chem*, 1973, **37**(4):747-756.
- [ 3 ] Morita M, Watanabe Y. A secondary alcohol oxidase: A component of a polyvinyl alcohol degrading enzyme preparation. *Agric Biol Chem*, 1977, **41**(8):1535-1537.
- [ 4 ] Sakai K, Hamada N, Watanabe Y, et al. Separation of secondary alcohol oxidase and oxidized poly(vinyl alcohol) hydrolase by hydrophobic and dye-ligand chromatographies. *Agric Biol Chem*, 1983, **47**(1):153-155.

- [ 5 ] Sakai K, Hamada N, Watanabe Y. Purification and properties of secondary alcohol oxidase with an acidic isoelectric point. *Agric Biol Chem*, 1985, **49**(3):817-825.
- [ 6 ] Sakai K, Hamada N, Watanabe Y. Purification and properties of oxidized poly(vinyl alcohol) hydrolase with an acidic isoelectric point. *Agric Biol Chem*, 1985, **49**(3):827-833.
- [ 7 ] Sakai K, Hamada N, Watanabe Y. Degradation mechanism of poly(vinyl alcohol) by successive reactions of secondary alcohol oxidase and  $\beta$ -diketone hydrolase from *Pseudomonas* sp.. *Agric Biol Chem*, 1986, **50**(4):989-996.
- [ 8 ] Mori T, Sakimoto M, Kagi T, et al. Isolation and characterization of a strain of *Bacillus megaterium* that degrades poly(vinyl alcohol). *Biosci Biotech Biochem*, 1996, **60**(2):330-332.
- [ 9 ] Kawagoshi Y, Fujita M. Purification and properties of polyvinyl alcohol oxidase with broad substrate range obtained from *Pseudomonas vesicularis* var. *povalolyticus* PH. *World J Microbiol Biotechnol*, 1997, **13**:273-277.
- [ 10 ] 钱 鼎,李 寅,堵国成,等. 培养条件对聚乙烯醇(PVA)降解酶合成的影响. 应用与环境生物学报, 2004, **10**(2):226-230.
- [ 11 ] Hashimoto S, Fujita M. Isolation of a bacterium requiring three amino acid for polyvinyl alcohol degradation. *J Ferment Technol*, 1985, **63**(5):471-474.
- [ 12 ] 无锡轻工业学院. 微生物学. 北京:轻工业出版社, 1990.
- [ 13 ] Jodeph H. Finley spectrophotometric determination of polyvinyl alcohol in paper coating. *Anal Chem*, 1961, **33**(13):1925-1927.

## Effects of Nutrition Condition on Producing Polyvinyl Alcohol (PVA) Degrading Enzyme by *Penicillium* sp.

ZHANG Ying LI Yin CHEN Jian\*

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

**Abstract**: It is well known that some bacteria, particularly *Pseudomonas* sp., are able to produce PVA degrading enzyme. Some PVA degrading enzymes produced by bacteria have been purified. It was reported that the production of PVA degrading enzyme by bacteria occurs only when PVA is present in medium. No report shows whether bacteria are able to produce PVA degrading enzyme under conditions free of PVA. In previous study, a strain of *Penicillium* sp. that produced PVA degrading enzyme had been screened. In present study, the effects of some nutrition conditions on PVA-degrading enzyme production were investigated in media with or without PVA. The strain produced 38.9 $\mu$ L of PVA degrading enzyme with yeast extract as the nitrogen source in the medium free of PVA, and PVA degrading enzyme activity increased 3.3 fold when PVA was present in the medium. This phenomenon indicated PVA degrading enzyme produced by the strain was induced Threonine was proven to be essential for the strain to produce PVA degrading enzyme while unessential for growth. Although threonine was found to be a key amino acid, the production of PVA degrading enzyme using mixture of amino acids (contains threonine) as a nitrogen source was less than that of using yeast extract, indicating that some unknown cofactors were important to improve the production of PVA degrading enzyme by the strain. The effect of threonine mass concentration on producing PVA degrading enzyme by the strain was investigated. The activity of PVA degrading enzyme improved proportionally with increasing the mass concentration of threonine from 10 mg/L to 20 mg/L.

**Key words**: *Penicillium* sp., PVA degrading enzyme, Yeast extract, Threonine, Effect