

聚乙烯醇降解酶产生菌的分离和发酵条件

肖长生 张 武 谢壮奎 曹静雯 李小玲

(广州市第三技术研究所, 广州)

从工厂废水中分离到一株高效降解聚乙烯醇 (PVA) 的细菌 D₃ 株, 四天能将培养基中 0.5% 的 PVA (500, 1700) 完全降解, 经鉴定为假单胞菌属类产碱假单胞菌 (*Pseudomonas pseudoalcaligenes*)。对菌株的发酵条件进行了研究, 结果表明, 最适培养基成份为 (%): PVA 1.5, (NH₄)₂SO₄ 0.1, K₂HPO₄ 0.24, KH₂PO₄ 0.04, MgSO₄·7H₂O 0.035, NaCl 0.01, FeSO₄ 0.001, 酵母膏 0.15; 起始 pH 7.5; 通气量在 250ml 三角瓶装 30ml 培养基为最适, 于 30℃, 160r/min 的旋转摇床振荡培养 72h 产酶活力最高。

关键词 聚乙烯醇; 聚乙烯醇降解酶; 二级醇氧化酶; 假单胞菌属类产碱假单胞菌

PVA (Polyvinyl Alcohol) 是近三十年发展起来的一种合成高分子化合物, 在纺织、造纸、化工等行业有广泛的用途。从六十年代起, 国外陆续报道了 PVA 的微生物降解^[1,2]、菌种筛选以及由 PVA 降解酶制备二级醇氧化酶^[3]。日本还报道用分离到的微生物处理染整废水和织物退浆的专利^[4]。国内则尚未见有关报道。本文报道高效降解 PVA 细菌的分离和发酵条件。

材 料 和 方 法

(一) 样品

样品来自维尼纶厂、纺织印染厂、有机化工厂排放的工业废水及受 PVA 污染的土壤。

(二) 培养基

1. 分离培养基 (%): PVA 0.5, NaNO₃ 0.2, K₂HPO₄ 0.1, KCl 0.05, MgSO₄·7H₂O 0.05, FeSO₄ 0.001, 琼脂 2.0。

2. 发酵培养基 (%): PVA 0.5, (NH₄)₂SO₄ 0.1, K₂HPO₄ 0.32, KH₂PO₄ 0.04, MgSO₄·7H₂O 0.02, NaCl 0.01, FeSO₄ 0.001, 酵母膏 0.1; pH 7.5。

(三) 菌种培养

1. 平皿培养: 30℃, 7 至 12 天。

2. 摇瓶培养: 30℃, 旋转摇床转速 160r/min 250ml 三角瓶装培养基 30ml。

3. 14L 发酵罐培养: 30℃, 罐定容 8L, 通风比 1: 0.5, 搅拌速度 150r/min。

(四) 分析与测定

1. 生物量的测定: 取培养液适当稀释后于 660nm 测菌体的光密度。

2. 聚乙烯醇含量的测定: 测定方法按照 Finley 法^[5], 即在有硼酸存在时, 聚乙烯醇与碘形成兰绿色络合物, 在 721 分光光度计上根据 660nm、光程 1cm 时读出的吸光度值进行比色测定, 以吸光度 A₆₆₀ 表示样品中聚乙烯醇含量。

3. 酶活测定: 将发酵液于 0℃, 12000r/min 离心 20min, 弃去菌体, 所得上清液即聚乙烯醇降解酶粗酶液。在 20×200mm 试管中依次加入 0.2mol/L、pH 7.5 的磷酸缓冲液 2.0ml, 4% 的 PVA 溶液 2.0ml 以及粗酶液 4.0ml, 反应液总体积 8.0ml, 混匀后即取样按照上述方法 2 测定反应混和液中聚乙烯醇含量, 以吸光度 [A₆₆₀] 表示; 再将试管中剩余反应液于 30℃

本文于 1988 年 1 月 18 日收到。

中国科学院微生物研究所蔡妙英副研究员鉴定菌种, 广东省微生物研究所郭楚盛副研究员指导部分工作, 特此致谢。

160r/min 保温振荡 24h,用相同方法测聚乙烯醇含量,以吸光度 $[A_{660}]_{24}$ 表示,振荡(反应)前后反应混和液吸光度的差值即 $\Delta A_{660} = [A_{660}]_0 - [A_{660}]_{24}$ 表示酶活。

结 果

(一) 菌株的分离和筛选

将采集到的样品用分离培养基培养后涂布平皿,挑出单菌落 1011 株接入斜面,经反复纯化和摇瓶筛选后获得一株高效降解聚乙烯醇的细菌 D₈ 株,经鉴定为假单胞菌属类产碱假单胞菌 (*Pseudomonas pseudoalcaligenes*)。菌株降解 PVA 的效率见图 1。

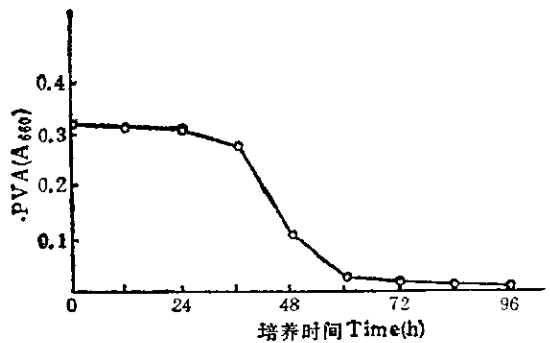


图 1 假单胞菌 D₈ 株降解 PVA 的效率

Fig. 1 Efficiency of *Pseudomonas* D₈ for degrading PVA (5g/L PVA)

(二) 不同规格 PVA 对产酶的影响

使用不同规格 PVA 作发酵培养基中的碳源和产酶诱导物,培养 72h 各取粗酶

表 1 各种 PVA 对产酶的影响

Table 1 Effect of various PVA on enzyme production

商品名 Trade name	醇解度 Degree of alcoholysis (mol%)	酶活 Enzyme activity (ΔA_{660})	来源 Sources
浆纱树脂 Sizing Resin	99	0.224	北京有机化工厂 The Beijing Organic Chemical Works
PVA ₁₇₋₈₈	88	0.173	同上
PVA ₀₁₋₈₈	88	0.150	同上
PVA ₁₂₄	99	0.151	日本 Japan
肉汤(对照)Broth (control)		0	

测定活力,结果见表 1。各种 PVA 都可以作为假单胞菌 D₈ 的产酶诱导物,而以 PVA₁₇₋₉₉ (浆纱树脂)作碳源的效果最好。

(三) 氮源对产酶的影响

分别用表 2 中各物质作发酵培养基的氮源,培养后测菌体生物量、酶活(表 2)。

(四) 培养基组成对产酶的影响

采用 L₁₆(4)⁵ 正交表进行多因素正交试验,结果见表 3,其中第 10 号培养基组合产酶活力最高,故最适组成应为 (%): PVA1.5, (NH₄)₂SO₄ 0.1, KH₂PO₄ 0.24, K₂HPO₄ 0.04, MgSO₄ · 7H₂O 0.035, 酵

母膏 0.15, NaCl 0.01, FeSO₄ 0.001 (其中 NaCl 和 FeSO₄ 按原用量不变)。用最适培养基配方培养 D₈ 菌株结果为: 生物量 0.559, 酶活 ΔA_{660} 为 0.363。

(五) 培养条件对产酶的影响

采用 L₉(3)⁴ 正交表设计正交试验综合考察起始 pH、温度、通气量(装瓶量)、培养时间对产酶的影响,用最适培养基培养 D₈ 菌株,结果见表 4,以起始 pH 7.5, 温度 30℃, 250ml 三角瓶装 30ml 培养基的 1 号组合条件最佳,在此条件下培养菌株 72h 产酶活性为 ΔA_{660} 0.339。

表 2 氮源对菌株生长及产酶的影响

Table 2 Effect of various nitrogen sources on bacteria growth and enzyme production

氮源 Nitrogen sources	用量 Conc'n (g/L)	生物量 Biomass (A_{660})	酶活 enzyme activity (ΔA_{660})
NaNO ₃	1.0	0.140	0.043
尿素 Urea	1.0	0.126	0.095
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0	0.300	0.170
牛肉膏 Beef extract	1.0	0.260	0.170
蛋白胨 Proteose	1.0	0.365	0.170
酵母膏 Yeast extract	1.0	0.545	0.155
(NH ₄) ₂ SO ₄ + 酵母膏 + yeast extract	1.0+1.0	0.576	0.215
无 No	0	0	0

表 3 L₁₆(4)³ 正交试验结果

Table 3 Results of orthogonal design of experiment L₁₆(4)³

		A	B	C	D	E	结果 Results	
		PVA (g/L)	酵母膏 Yeast extrat (g/L)	K ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ (g/L)	MgSO ₄ · 7H ₂ O (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	生物量 Biomass (A_{660})	酶活 Activity (ΔA_{660})
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16		5.0	1.0	3.2/0.4	0.20	1.0	0.377	0.210
		15	2.0	3.0/0.5	0.20	1.5	0.418	0.320
		10	2.0	3.2/0.4	0.35	0.5	0.437	0.184
		20	1.0	3.0/0.5	0.35	2.0	0.398	0.272
		5.0	1.5	3.0/0.5	0.30	0.5	0.507	0.213
		15	0.5	3.2/0.4	0.30	2.0	0.368	0.245
		10	0.5	3.0/0.5	0.25	1.0	0.459	0.254
		20	1.5	3.2/0.4	0.25	1.5	0.338	0.271
		5.0	0.5	2.4/0.6	0.35	1.5	0.290	0.233
		15	1.5	2.4/0.4	0.35	1.0	0.559	0.363
		10	1.5	2.4/0.6	0.20	2.0	0.398	0.298
		20	0.5	2.4/0.4	0.20	0.5	0.288	0.211
		5.0	2.0	2.4/0.4	0.25	2.0	0.413	0.286
		15	1.0	2.4/0.6	0.25	0.5	0.437	0.225
		10	1.0	2.4/0.4	0.30	1.5	0.433	0.267
		20	2.0	2.4/0.6	0.30	1.0	0.432	0.270
生物量 (A_{660}) Biomass	K ₁	0.397	0.351	0.446	0.411	0.394		
	K ₂	0.432	0.411	0.423	0.370	0.370		
	K ₃	0.446	0.451	0.380	0.421	0.457		
	K ₄	0.364	0.425	0.389	0.435	0.281		
酶活 (ΔA_{660}) Enzyme activity	K ₁	0.236	0.236	0.265	0.259	0.275		
	K ₂	0.251	0.244	0.282	0.260	0.274		
	K ₃	0.288	0.286	0.228	0.263	0.274		
	K ₄	0.256	0.265	0.257	0.249	0.208		

表 4 L₉(3)⁴ 正交试验结果
Table 4 Results of orthogonal design of experiment L₉(3)⁴

		A pH	B 温度 Temperature (°C)	C 通气量 Volume of medium (ml)	D 时间 Time (h)	结果 Results	
						生物量 Biomass (A ₆₆₀)	酶活 Activity (ΔA ₆₆₀)
1		7.5	30	30	72	0.480	0.339
2		7.7	30	70	48	0.348	0.294
3		7.0	30	50	96	0.527	0.284
4		7.5	34	50	48	0.235	0.216
5		7.7	34	30	96	0.488	0.262
6		7.0	34	70	72	0.498	0.285
7		7.5	37	70	96	0.286	0.053
8		7.7	37	50	72	0.059	0.009
9		7.0	37	30	48	0.089	0.016
生物量 (A ₆₆₀) Biomass	K ₁	0.332	0.452	0.375	0.223		
	K ₂	0.298	0.407	0.274	0.346		
	K ₃	0.371	0.142	0.352	0.432		
酶活 (ΔA ₆₆₀) Enzyme activity	K ₁	0.203	0.305	0.211	0.175		
	K ₂	0.188	0.254	0.169	0.211		
	K ₃	0.194	0.026	0.206	0.199		

(六) 14L 发酵罐扩大培养试验

上罐培养采用摇瓶试验确定的最适培养基配方和最佳培养条件（其中通气条件预先经试验确定），共培养 11 批，其结果（取平均值）为：生物量（A₆₆₀）0.762、最高

酶活（ΔA₆₆₀）0.256。本试验不同于摇瓶试验结果的是培养 48h 酶活最高。D₈ 菌株在 14L 罐内的发酵过程如图 2 所示。

讨 论

本文报道的假单胞菌 D₈ 株分泌诱导酶降解聚乙烯醇（PVA）的特性与国外报道的菌株相似^[1]。国外分离得到的某些菌株在降解聚乙烯醇时必须加入三种特殊氨基酸，否则不降解^[2]。D₈ 菌株无论在合成培养基或半合成培养基中都能很好地降解聚乙烯醇，而且根据试验证明，适量选择培养基中聚乙烯醇和酵母膏的浓度能较大幅度地提高 PVA 降解酶的活力。估计这项研究对有效处理纺织染整废水、退浆以及开发新酶种具有较大意义。

参 考 文 献

[1] Suzuki, T. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 37(4): 747—756, 1973.
[2] Susumu, H. et al.: *Ferment. Technol.*, 63(5):

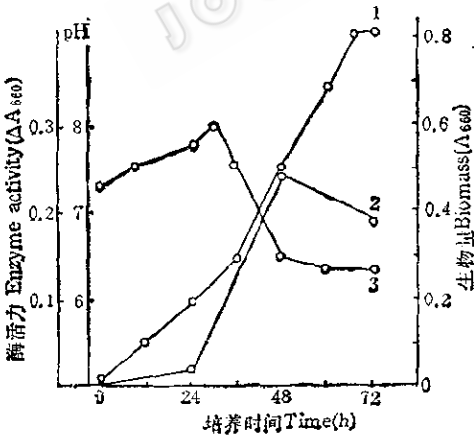


图2 假单胞菌 D₈ 于 14L 罐内发酵过程

1. 生物量; 2. 酶活; 3. pH

Fig. 2 Time course of fermentation with *Pseudomonas* D₈ in 14 liter fermentor

1. Biomass; 2. Enzyme activity; 3. pH

- 471—474, 1985.
- [3] Makoto, M. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 41(8): 1535—1537, 1977.
- [4] 铃木智雄等: 发酵工学杂志, 51: 692—698, 1973.
- [5] Finley, J. H.: *Anal. Chem.*, 33(13): 1925—1927, 1961.

ISOLATION AND FERMENTATION CONDITIONS OF POLYVINYL ALCOHOL-DEGRADING ENZYME PRODUCING STRAIN

Xiao Changsheng Zhang Wu

Xie Zhuangkui Cao Jingwen Li Xiaoling

(Guang Zhou Third Technology Institute, Guang Zhou)

A bacterium D₈ strain which high efficiently degrading PVA was isolated from waste water of factory. The strain possesses the abilities of completely degrading 0.5 per cent of PVA (500, 1700) included in the culture medium for four days. It was identified *Pseudomonas pseudoalcaligenes*.

Fermentation conditions of the strain have been investigated. The suitable medium consisted of PVA 1.5%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%, K_2HPO_4 0.24%, KH_2PO_4 0.04%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.035%, NaCl 0.01%, FeSO_4 0.001%, yeast

extract 0.15%, pH 7.5. The optimal condition for enzyme production are as follows: 250ml shake filled with 30ml medium, 30°C, 160n/min incubation period 72h. Under such conditions enzyme activity is highest.

Key words

Polyvinyl Alcohol; Polyvinyl alcohol-degrading enzyme; Secondary alcohol oxidase; *Pseudomonas pseudoalcaligenes*