

聚乙烯醇降解酶研究进展

张 兴^{1,2} 堵国成¹ 陈 坚^{1*}

(1 江南大学生物工程学院环境生物技术研究室 江苏无锡 214036 2 中国矿业大学化工学院生物工程系 徐州 221008)

摘要 聚乙烯醇是一种广泛应用的水溶性聚合物,尤其作为纺织浆料。由于其生物难降解性,对水体造成较大的污染,因此得到较多的关注。对聚乙烯醇生物处理的研究主要集中在生物降解酶和生物降解机理上,特别是随着对环境友好的酶加工纤维技术的不断发展,利用聚乙烯醇降解酶进行纺织脱浆已引起较大的兴趣。已发现的聚乙烯醇降解酶主要包括:聚乙烯醇氧化酶(仲醇氧化酶)、聚乙烯醇脱氢酶、 β -双酮水解酶(氧化型聚乙烯醇水解酶)。聚乙烯醇降解酶催化聚乙烯醇的生物降解主要分为两步进行。聚乙烯醇酶脱浆技术不仅节省了脱浆能耗,而且提高了脱浆废水的生物可降解性。

关键词 聚乙烯醇 降解酶 脱浆

聚乙烯醇(以下简称 PVA)作为一种水溶性高分子聚合物,由于它具有较好的黏附性、浆膜强韧性、耐磨性,被广泛地应用在纺织、印染、化纤等行业上,使得这些企业所排放的废水中含有大量的这类聚合物。采用常规污水生物处理工艺时,由于 PVA 降解菌的生长速率较低,在传统的活性污泥法处理中容易被洗出,从而使得对含 PVA 废水的处理较为困难^[1],因此 PVA 废水的治理已引起愈来愈多的关注。其中较为突出的是纺织废水,据统计,我国每年仅纺织浆料耗用量在 25 万 t 以上,浆料已成为纺织企业的第二大耗用原材料,而 PVA 退浆废水的难生物降解性,会对环境产生较大的污染,这已引起了许多国家的重视。

就 PVA 废水的物理和化学处理方法而言,主要有泡沫分离、超滤、盐析、氧化剂氧化以及微波辐射、光催化等技术,虽然它们有一定的处理效果,但这些技术投资费用和运行费用较高,操作复杂,工业化应用尚有较多的困难。而采用生物方法降解聚乙烯醇具有运行费用低、二次污染少等优点,因此显示出了良好的发展前途。

目前围绕着 PVA 生物降解开展了不少有意义的研究工作,这将使得 PVA 生化处理有着运用于实际的可能。首先,要想利用生物处理工艺高效率

地降解聚乙烯醇,就需要弄清楚聚乙烯醇的生物降解酶和生物降解机理。其次,随着对环境友好的酶加工纤维技术(如淀粉酶、过氧化氢酶、果胶酶等)的不断发展,利用聚乙烯醇降解酶进行纺织脱浆已引起人们的较大兴趣,其原因主要是考虑到酶作为一种天然物质,其生物分解性好,没有二次污染,而且可以节省较多的热能,并减轻下游污水的生物处理难度。因此对聚乙烯醇降解酶的研究与应用得到了较多的重视^[2,3]。

本文主要介绍 PVA 降解酶的分离纯化研究状况,已发现的 PVA 降解酶的主要理化性质, PVA 酶生物降解机理的研究进展,并展望 PVA 降解酶的应用前景。

1 PVA 降解酶特性、纯化方法和酶活测定

到目前为止,对 PVA 降解菌的筛选和 PVA 降解酶的纯化分离已开展了不少工作。就目前正式报道的 PVA 降解酶主要包含三个种类^[4]: 聚乙烯醇氧化酶(仲醇氧化酶)(EC1.1.3.30)、聚乙烯醇脱氢酶(EC1.1.99.23)、 β -双酮水解酶(氧化型聚乙烯醇水解酶)(EC3.7.1.7)。在此介绍这几种酶的主要理化特性和分离纯化方法。

1.1 PVA 氧化酶(仲醇氧化酶)

迄今,以 PVA 为惟一碳源已培养分离出好几株可氧化 PVA 的降解菌,主要是假单胞菌类,相应地从各菌株发酵液中纯化出了几种 PVA 氧化酶。

最初的 PVA 氧化酶是从 PVA 降解菌 *Pseudomonas* O-3 菌株的发酵液中分离纯化出来的^[5-7]。该酶呈淡粉红色,分子量大约是 26 000,每个酶分子含一个铁原子,酶溶液最大吸收峰分别在 280nm、365nm 和 470nm;酶活可受到 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、EDTA、羟胺和水杨基羟肟的轻微抑制。

Morita^[8]从另一株 PVA 降解菌 *Pseudomonas* 的发酵液中也分离到 PVA 氧化酶,该酶除大部分特性与前一种 PVA 氧化酶相似以外,还发现是单肽链,分子量 50 000,等电点为 pH10.3,每个酶分子含一个非血红素铁原子。该酶酶活最佳 pH7.0,最佳温度 50℃,酶活受到 Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 、邻菲啉和 EDTA 的轻微抑制。Sakai 后来在该菌发酵液吸附于离子交换色谱柱上的另一活性组分中又提纯了一种 PVA 氧化酶^[9],该酶的主要特性是等电点 pH4.5,分子量约 40 000,由免疫扩散反应实验发现,该酶与前者属共同抗原,由此推断该酶可能是 PVA 降解菌在培养过程中产生的前者的衍生物。

从 PVA 降解菌 *Pseudomonas vesicularis* var. *povdolyticus* PH 菌株培养液中分离纯化的 PVA 氧化酶^[10],其主要特点是无色,分子量约 75 000~85 000,等电点 pH5.7;该酶酶活的最佳 pH 较宽,约在 6.0~10.0 之间,且在 45℃ 条件下可稳定 24h。尤为突出的是,该酶比其他已报道的 PVA 氧化酶有较宽的底物作用专一性,其他 PVA 氧化酶当催化碳链大于 4 庚醇的仲醇时,显示出较低的活性,而该 PVA 氧化酶却显示出较高的酶活性,且该酶对环己醇和苯基醇的作用活性也比较高。因此该酶又叫做宽底物范围的 PVA 氧化酶^[11]。

上述发现的大部分 PVA 氧化酶都是胞外酶,但膜结合的 PVA 氧化酶也被提纯出来^[12],而且细菌细胞产生的这种 PVA 氧化酶 95% 以上分布于细胞的外周质空间,认为 PVA 氧化酶的这种分布可能与菌体更容易吸收利用 PVA 降解产物有关,而且也可能有利于和细胞膜上的电子传递链相耦合。

综上所述,就所报道的 PVA 氧化酶来看,尽管理化特性不是完全一致,但它们都具有相同的催化特性:对 PVA 的催化要求碳链要长(分子量约大于 300Da),且有暴露的羟基基团,在分子氧的参与下,羟基基团被氧化成酮基基团,并产生 H_2O_2 。更为有意义的是,当所作用的底物为 PVA 以外的羟基化合物时,该酶就具有较高的底物选择性(见表

1),表中可见该酶主要对五碳以上的仲醇有催化活性,产物主要是酮和 H_2O_2 ,因此 PVA 氧化酶又叫做仲醇氧化酶。

表 1 PVA 氧化酶对底物的专一性^[10]

底物	相对活性(%)
PVA	100
伯醇类(甲醇 癸醇)	0
仲醇类	
2- 丙醇	3.5
2- 丁醇	47.3
2- 戊醇	36.3
3- 戊醇	14.6
2- 己醇	65.4
3- 己醇	47.3
2- 庚醇	75.1
3- 庚醇	68.8
4- 庚醇	96.6
2- 辛醇	82.9
4- 癸醇	100
1,2- 丙二醇	3.2
1,3- 丁二醇	1.5
2,2- 戊二醇	19.3
2,5- 己二醇	3.8
1,2,3- 丙三醇	0
叔醇类	
叔丁醇	0.9
频哪醇	0
环烷醇类	
环己醇	41.8
1,4- 环己醇	0
芳香族化合物	
苯甲醇	13.7
儿茶酚	4.4
其他	
甘露糖醇	0
山梨糖醇	0
乳酸	0
苹果酸	0
柠檬酸	0
乙二酸	0
葡萄糖	0
蔗糖	0
果糖	0

PVA 氧化酶的纯化方法与一般酶的纯化步骤较为相似,但由于该类酶的分子量较为接近,分离过程比较困难,因此具有自己的分离特点:发酵液→固体 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级沉淀→离子交换层析纯化→反复凝胶层析纯化→染料亲和层析→聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定

进行酶活测定时,鉴于已经发现的PVA氧化酶当催化聚乙烯醇氧化时,每消耗1mol的 O_2 ,会产生1mol的 H_2O_2 ,因此目前主要是以单位时间 H_2O_2 浓度的生成量来表示PVA氧化酶的酶活。

1.2 β -双酮水解酶

β -双酮水解酶又叫氧化型PVA水解酶,最初是从可利用PVA做惟一碳源的 *Pseudomonas* 菌株发酵液中分离出来的^[13]。该酶的主要分离过程是:发酵液先经硫酸铵分级沉淀,再分别经过两种离子交换色谱柱纯化,即DEAE-Sephadex和SP-Sephadex,然后通过三次Sephadex G-75凝胶过滤色谱分离纯化,最终得到纯化酶。该酶酶溶液是无色,属单肽链酶,分子量大约38000,其N末端和C末端氨基酸分别是丙氨酸和苏氨酸,等电点pH10.0;酶活最佳pH6.5,最佳温度45℃;酶活可受到 Hg^{2+} 的抑制,但经过还原型谷胱甘肽处理可恢复活性;从该酶作用底物来看,由于该酶仅对氧化型PVA有催化活性,而对许多低分子量酮类化合物并无催化活性,因此又叫做氧化型PVA降解酶。

进一步的测试发现^[14],该酶能催化水解分子量较大的酮类化合物,尤其是4,6-壬二酮作为模式化合物,可被酶水解成丁酸和戊酮。因此起初对该酶的酶活测定主要是以聚乙烯醇溶液的黏度降低来表示,但现在也有人通过测定酶催化二酮化合物的产物来表示该类酶的酶活^[15]。

1.3 PVA脱氢酶

到目前为止所发现的PVA脱氢酶主要是一类需要吡咯并喹啉醌(PQQ)作为辅酶的PVA脱氢酶^[16-17]。产生这类酶的 *Pseudomonas* sp. Strain VM15C 需要以吡咯并喹啉醌作为生长因子,因此该菌需要与另一产生并分泌吡咯并喹啉醌的菌株共生时,才能进行PVA的降解反应。该酶属膜结合酶类,主要催化PVA脱氢反应;同时在膜上还存在膜结合PVA氧化酶,其催化活性也是催化PVA脱氢反应,但该酶并不以吡咯并喹啉醌作为辅酶。因此认为聚乙烯醇脱氢酶可能是寡聚酶类,膜结合PVA氧化酶是其亚基,吡咯并喹啉醌可能参与构成另一亚基。就所催化的底物而言,PVA脱氢酶主要催化仲醇和PVA脱氢反应,对伯醇则无催化活性,因此该酶与乙醇脱氢酶的醌类酶不同。

已克隆出编码PVA脱氢酶的基因^[18,19],根据对该基因的核苷酸序列分析,推断出该酶的结构确

实不同于其他醌类脱氢酶,例如以大肠杆菌克隆子表达的PVA脱氢酶也需要吡咯并喹啉醌,由此表明所编码的PVA脱氢酶可能就是全酶中的一个酶蛋白组分;此外,从PVA脱氢酶基因中还推断出原血红素c的结合位点,说明原血红素c参与了PVA的脱氢反应。在编码PVA脱氢酶基因的上游还发现有编码PVA水解酶的基因,两者共同构成了一个操纵子,由此可见该细菌编码的两种酶对于聚合物的降解是必需的。

2 PVA酶催化降解的反应机理

自从PVA降解菌种中分离出PVA降解酶以来,引起对PVA降解酶及其作用机理的较大兴趣。

如前所述,迄今已发现的PVA降解酶主要包含三个种类:聚乙烯醇氧化酶(仲醇氧化酶)、聚乙烯醇脱氢酶、 β -双酮水解酶(氧化型聚乙烯醇水解酶),而且对这三类酶的催化反应机理已了解得较为深入。但由于采用的菌种不同,菌种中所含有的PVA降解酶的种类组合也不相同,一种组合是菌体中含有聚乙烯醇氧化酶(仲醇氧化酶)与 β -双酮水解酶(氧化型聚乙烯醇水解酶),另一种组合是菌体中含有聚乙烯醇脱氢酶与 β -双酮水解酶(氧化型聚乙烯醇水解酶),因此对PVA酶催化降解机理似乎也存在不同的观点。较为一致的看法是:聚乙烯醇须经两步酶催化过程才得以降解,第一步由PVA氧化酶(仲醇氧化酶)在有氧的条件下,或由PVA脱氢酶参与下,聚乙烯醇氧化脱氢为酮基化合物。对第二步的反应,一种观点认为聚乙烯醇的羟基基团被PVA仲醇氧化酶催化氧化为酮基型PVA以后,再被PVA水解酶催化裂解;而另一种观点则认为酮基型PVA的水解反应是自发进行的。Fujita等^[11]通过单独或联合使用PVA仲醇氧化酶和PVA水解酶,对PVA降解进行实验研究,认为氧化型PVA的自发水解主要是由于酮基型PVA分子结构的不稳定性所造成的,但PVA水解酶可能加速了氧化型PVA的裂解反应。图1为作者提出的酶催化PVA降解的可能途径。

为了进一步搞清PVA降解酶的作用机制和分泌机制,Shimao等^[19]在克隆出PVA氧化酶的结构基因 *pvaA* 的基础上,又克隆出编码PVA水解酶的基因 *pvaB*,并通过 *Escherichia coli* 表达出其基因产物,研究认为,两种基因编码的蛋白质氨基酸顺序与脂蛋白的信号顺序较为相近,表明PVA降解酶

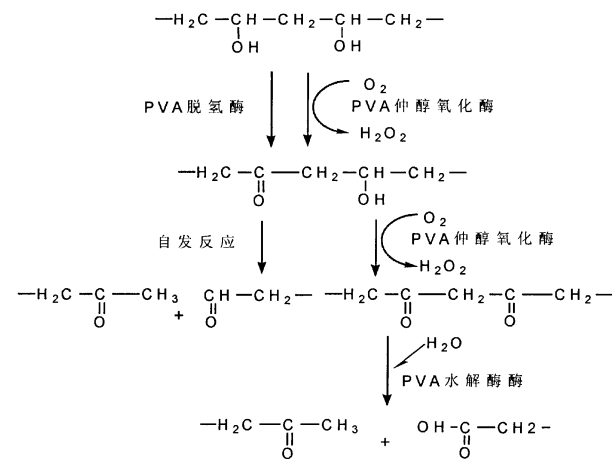


图 1 聚乙烯醇酶降解可能反应途径

可能主要附着在细胞膜上,而这种酶的分泌方式对聚合大分子的降解是必须的;*pvaA* 基因和*pvaB* 基因构成了一个操纵子,启动子在*pvaB* 基因的上游,终止子在*pvaA* 基因的下游;PVA 仲醇氧化酶可能的功能是优先氧化聚乙烯醇分子中的两两相邻羟基基团,PVA 氧化性产物的化学结构很不稳定,容易自发水解,而 PVA 水解酶可加速该水解反应。

3 PVA 降解酶的应用前景

鉴于 PVA 集中使用较多的场合主要是在纺织厂用作上浆剂,使用 PVA 上浆的棉织物必须经过脱浆来增加水的吸收性。通常的脱浆方法是使用 70~ 90℃ 的热水来进行,有时使用氧化剂如 NaBrO_2 等,由此从纺织厂排出的废水中含有大量的 PVA 和氧化剂,造成了较严重的水污染,所以选择酶脱浆方法就成为有利于环境的清洁生产途径之一^[2]。

采用酶法进行 PVA 脱浆会产生许多有利于环境的效果。Mori 等选用酶处理温度为 30℃ 和常规热水脱浆(80℃)进行比较,酶处理时间为 30min 的脱浆效果就已经与常规处理的效果相同;如果同时延长两种处理的时间,常规处理的棉织物上的 PVA 残留量几乎未得到进一步的降低,而酶处理的棉织物上的 PVA 残留量有较明显的减少,该结果说明常规脱浆工艺由于缺乏对 PVA 的进一步降解,PVA 残留量仍保持较高水平,且能耗较高。此外,通过比较两种脱浆过程的废水中 PVA 的性质和含量,发现常规脱浆处理的废水中 PVA 仍成为未氧化的状态,而酶脱浆处理 1h 后的废水中未氧化状态的 PVA 已大量减少;如果酶处理时间延长 4h,则废水

中的残余未氧化状态的 PVA 已非常低了;研究还发现,当 0.8% 的 PVA 溶液经 PVA 降解酶处理 4h 后,该溶液中的生化需氧量(BOD)与化学耗氧量(COD)之比由 4.3% 增加为 32.2%。由此说明,酶法脱浆工艺不仅大大降低了脱浆的能耗,而且酶脱浆处理后的废水中 PVA 已得到部分氧化,变得易于生物降解,这样就为 PVA 废水的后续生物处理提供了便利的条件,同时也大大减少了常规脱浆工艺中氧化剂的使用量。

4 结语

考虑到 PVA 退浆废水对环境会产生较大污染,一度曾提出变性淀粉浆料作为一种新型环保浆料将作为全棉等天然或混纺纤维的主体浆料;但其一由于要达到少用或不用 PVA,除了开发辅助新浆料外,还要在提高变性淀粉的特性质量上狠下功夫,努力降低接枝变性淀粉的成本,其二尤其是开发变性淀粉必然与人类所需求的粮食相竞争,如果粮食减产将会导致用于纺织浆料的粮食淀粉成本增高,因此 PVA 在纺织浆料中仍将长时期得到广泛应用。这样,PVA 的生物降解就具有更为重要的研究价值。

此外,作为一种对环境有利的酶加工纤维技术,其生物分解性好,没有二次污染,而且可以节省较多的热能,并减轻下游污水的生物处理难度,已逐渐受到纺织企业欢迎,因此,对 PVA 生物降解的研究重点逐渐转移到对 PVA 降解菌和 PVA 降解酶的研究开发上。相信,随着对 PVA 降解性高效新菌种的不断发现,PVA 降解酶作用机理和分泌机制的深入了解,利用特种微生物或特种酶治理聚乙烯醇这类高聚物污染将具有较大的应用潜力。

参考文献

- [1] Schonberger H, Baumann A, Keller W. Study of microbial degradation of polyvinyl alcohol (PVA) in wastewater treatment plants. American Dyestuff Reporter, 1997, 86(8): 9~ 18
- [2] Mori T, Sakimoto M, Kagi T. Enzymatic desizing of polyvinyl alcohol from cotton fabrics. J. Chem. Tech. Biotechnol, 1997, 68: 151 ~ 156
- [3] 陈明洁, 王银善. 共生细菌 SBI 降解聚乙烯醇的研究. 环境科学学报, 1995, 15(2): 208~ 216
- [4] Edwin C. Webb. Enzyme nomenclature. California: San Diego Academic Press, 1992
- [5] 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
- [6] Suzuki T. Purification and some properties of polyvinyl alcohol degrading enzyme produced by *Pseudomonas* O-3. *Agric. Biol. Chem.*, 1976, 40(3): 497~ 504
- [7] Suzuki T. Oxidation of secondary alcohol degrading enzyme produced by *Pseudomonas* O-3. *Agric. Biol. Chem.*, 1978, 42(6): 1187~ 1194
- [8] Morita M, Hamada N, Sakai K, et al. Purification and properties of secondary alcohol oxidase from a strain of *Pseudomonas*. *Agric. Biol. Chem.*, 1979, 43(6): 1225~ 1235
- [9] 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
- [10] Kawagoshi Y, Fujita M. Purification and properties of polyvinyl alcohol oxidase with broad substrate range obtained from *Pseudomonas vesicularis* var. *povalolyticus* PH. *World J. Microbial. Biotechnol.*, 1997, 13: 273~ 277
- [11] Fujita M, Ike M, Kawagoshi Y, et al. Biotreatment of persistent substances using effective microorganisms. *Water Science & Technology*, 2000, 42(12): 93~ 106
- [12] Shimao M, Nishimura Y, Kato N, et al. Localization of polyvinyl alcohol oxidase produced by a bacterial symbiont, *Pseudomonas* sp. Strain VM15C. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1985, 49(1): 8~ 10
- [13] Sakai K, Morita M, Hamada N, et al. Purification and properties of oxidized polyvinyl alcohol degrading enzyme. *Agric. Biol. Chem.*, 1981, 45(1): 63~ 71
- [14] Sakai K, Hamada N, Watanabe Y. A new enzyme, β -diketone hydrolase: a component of a polyvinyl alcohol degrading enzyme preparation. *Agric. Biol. Chem.*, 1985, 49(6): 1901~ 1902
- [15] Kawagoshi Y, Fujita M. Purification and properties of the polyvinyl alcohol degrading enzyme 2, 4-pentanedione hydrolase obtained from *Pseudomonas vesicularis* var. *povalolyticus* PH. *World J. Microbial. Biotech.*, 1998, 14: 95~ 100
- [16] Shimao M, Ninomiya K, Kuno O, et al. Existence of a novel enzyme, pyrroloquinoline quinone dependent polyvinyl alcohol dehydrogenase, in a bacterial symbiont, *Pseudomonas* sp. Strain VM15C. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1986, 51(2): 268~ 275
- [17] Shimao M, Onishi S, Kato N, et al. Pyrroloquinoline quinone dependent cytochrome reduction in polyvinyl alcohol degrading *Pseudomonas* sp. Strain VM15C. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1989, 55(2): 275~ 278
- [18] Shimao M, Tamogami T, Nishi K, et al. Cloning and characterization of the gene encoding pyrroloquinoline quinone dependent polyvinyl alcohol dehydrogenase of *Pseudomonas* sp. Strain VM15C. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1996, 60(7): 1056~ 1062
- [19] Shimao M, Tamogami T, Kishida S, et al. The gene *pvaB* encodes oxidized polyvinyl alcohol hydrolase of *Pseudomonas* sp. Strain VM15C and forms an operon with the polyvinyl alcohol dehydrogenase gene *pvaA*. *Microbiology*, 2000, 146: 649~ 657

Developments in Study of Poly (vinyl alcohol) Degrading Enzyme

Zhang Xing^{1,2} Du Guocheng¹ Chen Jian^{1*}

(1 Lab of Environmental Biotechnology School of Biotechnology Southern Yangtze University Wuxi 214036)

(2 Department of Biotechnology China University of Mining and Technology Xuzhou 221008)

Abstract Poly (vinyl) alcohol (PVA) is a water soluble synthetic polymer and is used widely, especially in fabric sizing material. Because of its difficulty in biodegradation and causing pollution to water environment, PVA has been concerned about and must be treated by efficient ways. The study on biodegradation of water soluble PVA mainly included PVA degrading enzyme and mechanism of PVA biodegradation. With advances in enzyme processing technology, which is friendly to our environment, there are increasing interests in fabric desizing by PVA degrading enzyme. Three kinds of PVA degrading enzymes have been found which include PVA oxidase (secondary alcohol oxidase), PVA dehydrogenase and β -diketone hydrolase (oxidized-type PVA hydrolase). The pathways in which PVA degrading is catalyzed by enzymes have been found to involve two-step reaction processes. PVA enzyme desizing technology not only saves energy, but also increases the biodegradability of PVA.

Key words Poly (vinyl) alcohol Degrading enzyme Desizing