

doi:10.3969/j.issn.1674-7100.2013.04.008

# 类产碱假单胞菌对不同型号PVA的降解特性研究

罗洁, 郝喜海, 李贞, 衣潇鹏

(湖南工业大学 包装与材料工程学院, 湖南 株洲 412007)

**摘要:** 对类产碱假单胞菌降解不同型号PVA(0588, 1788, 2088, 1750, 1799)的降解效果及降解特性进行了研究。采用UV2900紫外分光光度计测吸光度法测定了各型号PVA的降解率, 同时研究了PVA的分子量和醇解度、PVA浓度、接种菌种浓度、摇瓶转速等对PVA降解率的影响。结果表明: 醇解度一定时, 高聚合度PVA的降解效率远低于低聚合度PVA; 而聚合度一定时, 醇解度对降解率的影响不明显。在培养温度为30℃, 培养时间为72h, 摇瓶转速为180rad/min, PVA的质量浓度为0.5g/L, 接种菌的体积分数为4.0%时, PVA的降解率可达90.15%。

**关键词:** 类产碱假单胞菌; PVA; 降解率; 吸光度

中图分类号: X522

文献标志码: A

文章编号: 1674-7100(2013)04-0034-05

## Studies on Degradation Characters of Pseudomonas Pseudoalcaligenes with Different Types of PVA

Luo Jie, Hao Xihai, Li Zhen, Yi Xiaopeng

(School of Packaging and Material Engineering, Hunan University of Technology, Zhuzhou Hunan 412007, China)

**Abstract:** The degradation effects and characters of Pseudomonas Pseudoalcaligenes with PVA(0588, 1788, 2088, 1750, 1799) were studied. The degradation rates of different types of PVA were measured with UV2900 ultraviolet spectrophotometer. The molecular weight and degree of alcoholysis, PVA concentration, concentration of inoculated strains, rotary speed effects on PVA degradation rate were researched as well. The optimal conditions were determined as: when the culture temperature was 30℃, with the treating time of 72 h, rotary speed of 180rad/min, the concentration of PVA as 0.5 g/L and the concentration of pseudomonas pseudoalcaligenes as 4.0%, the ratio of degradation could reach as high as 90.15%.

**Key words:** pseudomonas pseudoalcaligenes; PVA; degradation rate; absorbance

## 0 引言

聚乙烯醇 (polyvinyl alcohol, 简称PVA) 是一种符合生态包装材料定义的水溶性可降解聚合物<sup>[1]</sup>, 其品种繁多, 用途广泛。PVA可作为纤维原料用于生产涂料、黏合剂、水溶性包装薄膜等产品, 应用

范围遍及纺织业、食品及清洁用品包装、医药、造纸工业、农业、高分子化工等行业<sup>[2]</sup>。就我国而言, PVA的年使用量在2001年约为35.2万t, 到2007年达51.2万t; 2009—2015年, 每年呈6.4%的速率递增, 预计在2015年将达73万t左右<sup>[3]</sup>。PVA因具有水溶性特点, 其废弃物无法回收利用, 这就意味着每年有

收稿日期: 2013-09-10

作者简介: 罗洁(1987-), 女, 湖南株洲人, 湖南工业大学硕士生, 主要研究方向为微生物降解水溶性包装薄膜及其对重金属污染的修复作用, E-mail: 631109443@qq.com

几十万吨的PVA废弃物被直接排放到环境中。PVA本身虽然无毒,对人体及其他生物不造成毒害,但是由于PVA溶于水后具有较大的表面活性,能在水中形成大量泡沫,影响水体的复氧,从而抑制甚至破坏水生生物的正常活动,造成水生生态失衡<sup>[4]</sup>。因此,20世纪70年代就有国内外学者对PVA降解进行研究。经过长期研究,科研工作者们发现,PVA能作为微生物生长代谢的碳源和能源:在PVA胁迫环境下,微生物可以PVA为唯一碳源产生使PVA黏度下降的仲醇氧化酶(secondary alcohol oxidase, SAO),SAO将PVA氧化为 $\beta$ -羟基酮或 $\beta$ -二酮后,经水解酶水解断键成羧酸和甲基等中间降解物,经重复断裂,最终降解成 $H_2O$ 和 $CO_2$ ,完成整个降解过程<sup>[5-11]</sup>。PVA的降解机理可表示如下:



市场上使用的PVA的型号很多,但是科研工作者们常选用PVA1788(聚合度为1700,醇解度为88%)和PVA1799(聚合度为1700,醇解度为99%)2种型号的PVA进行降解研究,而对于其他型号PVA的降解研究报道较少。本文拟主要研究类产碱假单胞菌对5种型号PVA(0588, 1788, 2088, 1750, 1799)的降解特性,以期为生物降解PVA研究性工作提供一定的理论依据。

## 1 试验部分

### 1.1 材料及试剂

类产碱假单胞菌,北京北纳创联生物研究所提供,已知其最适生长温度为30℃、pH值为7.5,为好氧细菌;PVA(0588, 1788, 2088, 1750, 1799)(AR),国药集团化学试剂有限公司生产;硫酸镁(AR),天津市科密欧化学试剂有限公司生产;氯化钠(AR)、琼脂粉、碘(AR)、碘化钾(AR)、硼酸(AR),湖南汇虹试剂有限公司生产;蛋白胨(AR),杭州微生物试剂有限公司生产;牛肉膏(BR),北京奥博星生物科技有限责任公司生产;蒸馏水(自制)。

### 1.2 仪器

CP214电子天平,奥豪斯仪器(上海)有限公司生产;SW-CJ-2FD超净工作台,苏州苏洁净化设备有限公司生产;UV2900舜宇恒平紫外可见分光光度计,上海舜宇恒平科学仪器有限公司生产;HZQ-211

落地振荡器,上海一恒科学仪器有限公司生产;TGL20M台式高速冷冻离心机,长沙英泰仪器有限公司生产;LDZM-40KCS智能型不锈钢立式压力蒸汽灭菌器,上海申安医疗器械厂生产;250 HL恒温恒湿培养箱,金坛市医疗仪器厂生产;W-O电热恒温水浴锅,广州市星恒科学仪器有限公司生产。

## 1.3 试验方法

### 1.3.1 培养基的配置

PVA发酵培养基的配备如下:  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2 g, NaCl 0.1 g, PVA 1.0 g, 蛋白胨3.0 g, 蒸馏水1 000 mL, pH值为7.5, 固体培养基添加2%琼脂<sup>[12]</sup>。将以上材料加热溶解,并经121℃高温灭菌20 min后待用。

### 1.3.2 绘制标准曲线及PVA含量的测定

#### 1) PVA标准溶液的配制

取一定量的PVA,于110℃烘箱内干燥2 h后,准确称取0.10 g,加热溶解,然后用蒸馏水定容至1 000 mL,即得质量浓度为0.10 g/L的PVA标准溶液。再依次取1, 2, 3, ..., 10 mL PVA标准溶液,移入10只50 mL的容量瓶中,并相应编号。

#### 2) 硼酸、碘-碘化钾溶液的配制

准确称取硼酸20.00 g,碘化钾12.50 g,碘6.35 g,并且将硼酸溶解于500 mL的蒸馏水中,在恒温水浴锅中加热至50℃,直至硼酸完全溶解;将碘和碘化钾溶于500 mL蒸馏水中,配置好后保存于棕色广口瓶中。

在梯度浓度的PVA标准溶液中,各加入配置好的硼酸溶液10 mL和碘-碘化钾溶液2 mL,然后加蒸馏水定容至刻度,摇匀静置。同时,以不加PVA的标准溶液,加入等量硼酸-碘-碘化钾溶液及蒸馏水稀释至刻度的溶液为空白对照。利用石英比色皿,在20℃条件下于676 nm处测定其吸光度值,绘制成标准曲线,换算公式为:  $\omega = 0.0314A + 0.001$ , 相关系数  $R^2 = 0.9928$ , 其中 $\omega$ 为PVA的质量分数,  $A$ 为溶液的吸光度。

### 1.3.3 透明圈试验

在硼酸存在的条件下,PVA会与硼酸产生凝胶化反应,增强PVA溶液的凝聚性;遇碘会发生络合反应,生成稳定的蓝绿色PVA- $H_2BO_3-I_2$ 络合物<sup>[13]</sup>。利用这一原理,于无菌条件下,在以PVA为唯一碳源配置的平板培养基上接种一环类产碱假单胞菌,于30℃条件下恒温培养。3 d后取出,在每个平板中加入3 mL硼酸-碘-碘化钾溶液,于遮光处反应20 min后拿出,根据产生的透明圈大小,可得知菌落周围PVA的降解量。每个PVA型号做3个平行试样,结果取其平均值。

### 1.3.4 不同型号 PVA 降解率的测定

以不同型号 PVA 为碳源, 配置发酵培养基, 各取 100 mL 发酵液于 250 mL 锥形瓶中, 于 121 °C 条件下灭菌 20 min。10 倍稀释类产碱假单胞菌斜面培养试管 3 次, 此时菌液浓度大概为  $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$  cfu/mL。在每个冷却后的锥形瓶中, 接种 1 mL 类产碱假单胞菌稀释液, 并于 30 °C 温度下和 180 rad/min 转速下, 恒温振荡培养。分别培养 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 h 后取样, 于 6 000 rad/min 转速, 5 °C 条件下冷冻离心 5 min, 取上清液用硼酸-碘-碘化钾溶液进行检测。在 676 nm 处测得其吸光度值, 并与标准曲线进行换算, 得数乘以稀释度即得 PVA 的残余浓度。降解率计算公式为:

$$B\% = [(A_0 - A_1) / A_0] * 100,$$

式中:  $A_0$  为未接种菌种的空白样吸光值;

$A_1$  为测试样品的吸光度值。

每个处理条件做 3 个平行试样, 取平均值, 同时以不接种类产碱假单胞菌的发酵液为空白对照。

### 1.3.5 菌种浓度对 PVA 降解率的影响

从透明圈实验及 PVA 降解率实验已得知, 在培养条件相同的情况下, PVA 降解主要受其分子量大小的影响, 醇解度对 PVA 降解影响不明显。因此, 在测试菌种浓度对 PVA 降解的影响时, 选取分子量为 1 700 系列的 PVA (1788, 1799, 1750) 与 PVA2088 进行对比试验, 一方面可以避免分子量对降解率造成的影响, 另一方面可进一步研究分子量及醇解度对 PVA 降解的影响程度 (下同)。

具体操作为: 无菌操作下, 10 倍稀释类产碱假单胞菌斜面培养试管 3 次后, 各取 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0 mL 类产碱假单胞菌菌液, 注入装有不同型号 PVA 发酵培养基的 250 mL 锥形瓶中 (已于 121 °C 条件下高压灭菌 20 min), 液体总量定容为 100 mL, 并于 30 °C 温度下及 180 rad/min 的转速下, 恒温振荡培养。3 d 后取样, 测试不同菌种浓度对 PVA 的降解程度。每个型号、每个浓度做 3 个平行试样, 结果取平均值。同时, 以不接种类产碱假单胞菌的发酵液为空白对照。

### 1.3.6 PVA 浓度对 PVA 降解率的影响

配置 PVA (1750, 1788, 1799, 2088) 质量浓度分别为 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0 g/L 的发酵培养基, 各取 100 mL 发酵液于 250 mL 锥形瓶中 (已于 121 °C 条件下高压灭菌 20 min), 在每个发酵培养基里注入 3 mL 浓度为  $5.0 \times 10^5 \sim 5.0 \times 10^6$  cfu/mL 的类产碱假单胞菌菌液。然后于 30 °C 温度下及 180 rad/min 转速下恒温培养。培养 3 d 后取样, 测试 PVA 的降解情

况。每个型号每个浓度分别做 3 个平行试样, 结果取平均值。同时以不接种类产碱假单胞菌的发酵液为空白对照。

### 1.3.7 振荡频率对 PVA 降解率的影响

准备 60 个洁净干燥的锥形瓶, 在每个锥形瓶中各加入 100 mL 发酵培养基 (已于 121 °C 条件下高压灭菌 20 min), 且以同样的方法稀释后, 在每个发酵培养基中各注入 1 mL 类产碱假单胞菌菌液, 在恒温振荡培养箱中以不同振荡速度下分别培养。摇瓶转速分别设置为 120, 140, 160, 180, 200 rad/min, 培养温度均为 30 °C。震荡培养 3 d 后, 检测 PVA (1750, 1788, 1799, 2088) 的降解率, 每个振荡频率做 3 个平行试样, 结果取平均值; 同时以不接种类产碱假单胞菌的发酵液为空白对照。

## 2 结果与分析

### 2.1 透明圈试验

图 1 所示为透明圈试验图示例, 表 1 是不同型号 PVA (0588, 1788, 2088, 1750, 1799) 平板培养类产碱假单胞菌在硼酸-碘-碘化钾溶液下产生的透明圈大小实测结果。

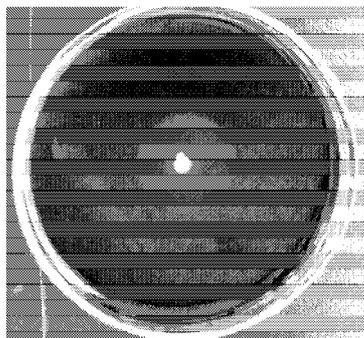


图 1 透明圈示例图

Fig. 1 Illustration of transparent zone

表 1 不同型号 PVA 产生的透明圈直径

Table 1 The transparent zone diameter by different types of PVA

PVA (聚合度)	0588 (500)	2088 (2 000)	1788 (1 700)	1750 (1 700)	1799 (1 700)
直径/mm	30	20	29	28	29

从表 1 中可以看出, 在 PVA (1788, 1799, 1750) 聚合度都为 1 700 的时候, 3 种型号的 PVA 产生的透明圈大小没太大差别, 分别为 29.0, 28.0, 29.5 mm。而当 PVA (0588, 1788, 2088) 醇解度一定、聚合度不同时, 产生的透明圈大小差异明显, 分别为 30, 29, 20 mm。由此可知, 醇解度对 PVA 生物降解性能影响不大, 其降解效果主要受 PVA 的分子量影响, 分子量越高, PVA 越难以被降解。

## 2.2 不同型号PVA降解率的测定

图2所示为不同型号PVA的降解率。

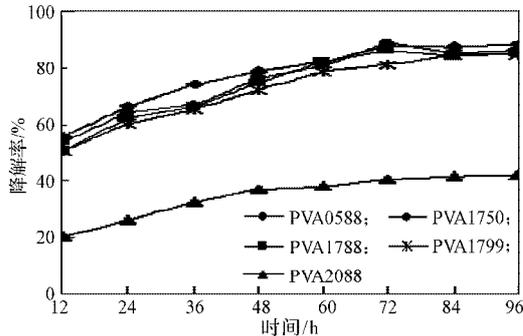


图2 不同型号PVA降解率

Fig. 2 Degradation rate of different types of PVA

由图2可知,除PVA2088外,其他型号PVA均在48 h左右降解率达到75%以上;在72 h,各PVA的降解率平均值最高,达88.94%;72 h后,PVA的降解率不再明显增加。这可能是因PVA被大量降解,类产碱假单胞菌生长所需碳源供应不足,生长处于停滞阶段。而PVA2088在前48 h内降解缓慢,而在60 h后,其降解速度显著增加,在96 h后达到42.33%;且从降解曲线来看,其降解率有一直增大的趋势,因此在108, 120, 132, 144 h后对PVA2088单独进行取样分析。结果发现该型号PVA在120 h后,降解率可达50.31%,且之后其降解率趋于平稳,不再显著增加。这可能是因在相同浓度下,聚合度增大,PVA溶液的黏度增大,发酵液中氧气含量减少。因此,高分子量PVA降解所需时间较长,且降解彻底度远不如分子量低的PVA。

## 2.3 菌种浓度对PVA降解率的影响

图3所示为菌种浓度对PVA降解率的影响结果。

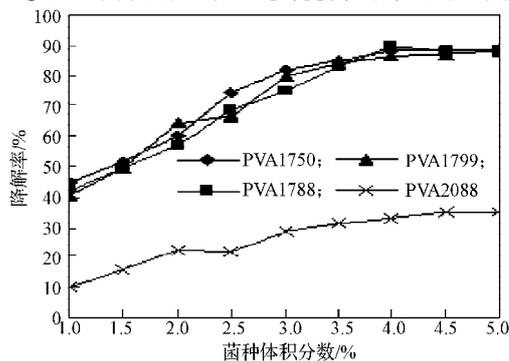


图3 菌种浓度对PVA降解率的影响

Fig. 3 Effect of concentration of pseudomonas pseudoalcaligenes on the ratio of degradation

由图3可看出,随着菌种浓度的增加,各型号PVA的降解率均呈现出逐渐增加的趋势。在菌种接种体积分数为4.0%时,PVA1700系列降解率达较大值,为90.04%,以后趋于平稳。而PVA2088的降解率在接种菌的体积分数为5.0%时,其降解率还不及

1700系列的一半。这一结果再次说明PVA降解受其分子量的影响较大,聚合度越高越难被降解。

## 2.4 PVA浓度对PVA降解率的影响

图4所示为PVA浓度对PVA降解率的影响结果。

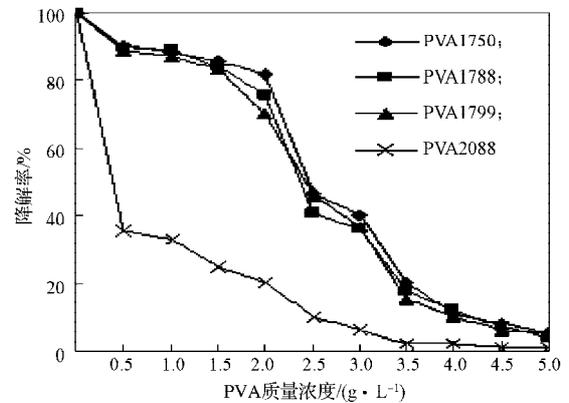


图4 PVA浓度对降解率的影响

Fig. 4 Effect of PVA concentration on the ratio of degradation

由图4可知,PVA的质量浓度和降解率成反比例关系,降解率随PVA质量浓度的增加而呈现出降低的趋势,可知PVA降解受其浓度的影响较大。在PVA质量浓度小于2.0 g/L时,PVA的降解率均在70%以上,当其质量浓度大于2.0 g/L时,PVA的降解率急剧下降。这是因为PVA浓度越高,发酵液黏度越大,再加上溶于水后的PVA表面活性较大,导致发酵液中氧气不足,抑制了类产碱假单胞菌的生长。

## 2.5 振荡频率对PVA降解率的影响

图5所示为振荡频率对PVA降解率的影响结果。

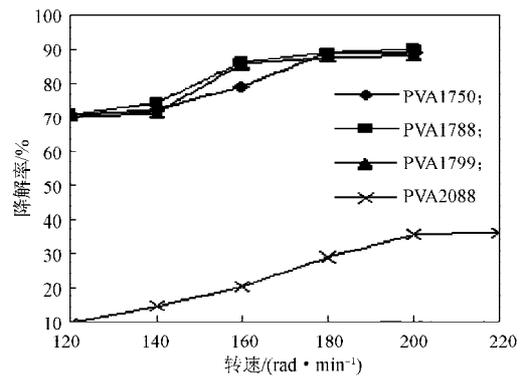


图5 振荡频率对PVA降解率的影响

Fig. 5 Effect of rotary speed on the ratio of degradation

如图5所示,各型号PVA的降解率随振荡频率的加快而上升。振荡频率为120 rad/min时,PVA降解不明显,这可能是低频振荡,溶液中氧气传递不足,抑制了菌体生长。随着振荡频率的增加,PVA的降解率逐渐升高,当振荡频率达180 rad/min时,PVA的降解率达89.04%;继续增加振荡频率,至200 rad/min时,测得PVA的降解率为89.17%,说明在菌体体积

分数为发酵液的1%时,选择振荡频率在180 rad/min,可保证PVA降解所需氧气,这也说明充足的氧气是PVA降解的关键因素之一。

### 3 结论

通过对几种不同型号的一类产碱假单胞菌降解PVA(0588, 1788, 2088, 1750, 1799)的降解特性进行研究,可得出如下结论:

1) 在醇解度相同的情况下, PVA降解受自身聚合度的影响较大,聚合度达2 000的PVA较1 700的PVA降解时间长,降解率低。聚合度一定时,降解率受醇解度影响不明显。

2) PVA降解过程需要溶液的溶氧量较大, PVA浓度及摇瓶转速等影响PVA溶液中氧气含量的因素,对PVA降解率的影响也较大,这也再一次印证了水溶性PVA排放在环境中会影响水体复氧,影响水生生物正常生长的说法。

3) PVA的最佳降解条件为:培养温度为30℃,振荡频率为180 rad/min, PVA质量浓度为0.5 g/L,一类产碱假单胞菌接种体积分数为4.0%。在此条件下,可达实验条件下的PVA最高降解率,为90.15%。

#### 参考文献:

- [1] 肖良建. 生物活性剂-聚乙烯醇在可环境消纳塑料中的应用[D]. 福州: 福建师范大学, 2006: 1-3.  
Xiao Liangjian. Application of Bioactive Reagent-PVA in the Environmental Friendly Plastics[D]. Fuzhou: Fujian Normal University, 2006: 1-3.
- [2] 崔小明. 聚乙烯醇生产技术进展及市场分析[J]. 塑料制造, 2011(5): 15-18.  
Cui Xiaoming. The PVA Produce Technology Development and Market Analysis[J]. Plastics Manufacture, 2011(5): 15-18.
- [3] 杨卫兰, 王旭辉. 聚乙烯醇市场现状分析[J]. 化学工业, 2011, 29(8): 27-31.  
Yang Weilan, Wang Xuhui. Status Quo Analysis of Polyvinyl Alcohol[J]. Chemical Industry, 2011, 29(8): 27-31.
- [4] 厉成宣, 范雪荣, 王强, 等. 退浆废水中PVA对环境的影响及其降解性能[J]. 印染助剂, 2007, 24(6): 7-10.  
Li Chengxuan, Fan Xuerong, Wang Qiang, et al. Effects of Poly(Vinyl Alcohol) in Desizing Wastewater and Its Degradation of Performance[J]. Textile Auxiliaries, 2007, 24(6): 7-10.
- [5] 吴强. 聚乙烯醇高效降解菌的筛选及降解性能研究[D].

杭州: 浙江工业大学, 2008: 8-16.

Wu Qiang. Study on Screening and Degrading Characteristics of Highly Efficient Degrading Bacteria for Polyvinyl Alcohol[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2008: 8-16.

- [6] 李旭, 樊金红, 马鲁铭. 聚乙烯醇降解微生物研究进展[J]. 环境科学与技术, 2009, 32(3): 74-77, 125.  
Li Xu, Fan Jinhong, Ma Luming. Progress on Degradation of Microorganism by PVA[J]. Environmental Science & Technology, 2009, 32(3): 74-77, 125.
- [7] 宋朝霞. 聚乙烯醇降解酶产生菌的筛选、发酵条件优化及酶的初步应用研究[D]. 无锡: 江南大学, 2005: 3-6.  
Song Zhaoxia. Screening of PVA-Degrading Enzymes Producing Microorganism, Fermentation Optimization and the Enzymatic Application in Desizing[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2005: 3-6.
- [8] 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: 747-756.
- [9] Lee J A, Kim M N. Isolation of New and Potent Poly(Vinyl Alcohol) Degrading Strains and Their Degradation Activity[J]. Polymer Degradation and Stability, 2003, 81(2): 303-308.
- [10] Hu Xiaoping, Mamoto Rie, Shimomura Yumi, et al. Cell Surface Structure Enhancing Uptake of Polyvinyl Alcohol (PVA) is Induced by PVA in the PVA-Utilizing *Sphingopyxis* sp Strain 113P3[J]. Archives Microbiology, 2007, 188(3): 235-241.
- [11] Shimao M, Tamogami T, Harayama S. The Gene PVA Encodes Oxidized Polyvinyl Alcohol Hydrolyses of *Pseudomonas* sp Strain VMI5C and Forms an Operon with the Polyvinyl Alcohol Dehydrogenase Gene PVA[J]. Microbiology, 2000, 146: 649-657.
- [12] 陈欣, 陈婷, 郭玲玲, 等. 一株聚乙烯醇降解细菌的筛选及培养条件的优化[J]. 江苏科技大学学报: 自然科学版, 2011, 25(2): 183-186.  
Chen Xin, Chen Ting, Guo Lingling, et al. Screening of PVA Degradation Bacteria and Optimization of Culture Conditions[J]. Journal of Jiangsu University of Science and Technology: Natural Science Edition, 2011, 25(2): 183-186.
- [13] 李桂春, 郭建生. PVA检测中干扰因素的确定与排除[J]. 广西纺织科技, 2007, 36(1): 28-30, 10.  
Li Guichun, Guo Jiansheng. Determining and Eliminating the Interference Factors in PVA determination[J]. Guangxi Textile Science & Technology, 2007, 36(1): 28-30, 10.

(责任编辑: 廖友媛)