

研究报告

蜡样芽孢杆菌聚乙烯醇脱氢酶的表达及酶学特性

张晓东, 王鑫钰, 张毅*

华南理工大学生物科学与工程学院, 广东 广州 510006

张晓东, 王鑫钰, 张毅. 蜡样芽孢杆菌聚乙烯醇脱氢酶的表达及酶学特性[J]. 微生物学通报, 2023, 50(5): 1840-1852.

ZHANG Xiaodong, WANG Xinyu, ZHANG Yi. Expression and properties of polyvinyl alcohol dehydrogenase from *Bacillus cereus*[J]. Microbiology China, 2023, 50(5): 1840-1852.

摘要:【背景】聚乙烯醇脱氢酶(polyvinyl alcohol dehydrogenase, PVADH)能够使聚乙烯醇(polyvinyl alcohol, PVA)氧化脱氢, 在PVA的生物降解过程中起到重要作用。【目的】从PVA降解菌株蜡样芽孢杆菌DG01中获取基因, 实现PVADH在毕赤酵母中的异源表达并探究其对不同型号PVA的降解特异性, 为PVADH在PVA实际降解中的应用提供指导。【方法】通过反转录扩增技术获得长度为1 965 bp的基因片段, 构建pPIC9K-*cpvadh*重组表达质粒并在毕赤酵母GS115中实现异源表达, 甲醇诱导表达蛋白, 进行分离纯化后对其酶学性质及降解特异性进行研究。【结果】最佳发酵条件下PVADH粗酶液酶活达到54.55 U/mL。经分离纯化后表达蛋白PVADH的比酶活为173.42 U/mg, 分子量为67.1 kDa, 等电点为6.06, 该酶最适作用温度为41 °C, 最适作用pH值为7.5, 在27–32 °C、pH 7.0–8.0条件下酶的半衰期超过4 h, 1 mmol/L的Ca²⁺对酶活力有激活作用。PVADH分别作用于PVA1788、PVA1799及PVA2488, K_m值分别为1.17、1.49、1.21 mg/mL。【结论】毕赤酵母表达的PVADH产酶及纯化方便, 酶学性质稳定, 对醇解度小的PVA具有更好的降解能力。

关键词: 聚乙烯醇; 聚乙烯醇脱氢酶; 异源表达; 降解特异性

Expression and properties of polyvinyl alcohol dehydrogenase from *Bacillus cereus*

ZHANG Xiaodong, WANG Xinyu, ZHANG Yi*

School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, Guangdong, China

Abstract: [Background] Via oxydehydrogenation of polyvinyl alcohol (PVA), polyvinyl

资助项目: 国家自然科学基金联合基金项目(U1301231)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (U1301231).

*Corresponding author. E-mail: btyzhang@mail.scut.edu.cn

Received: 2022-07-25; Accepted: 2022-09-27; Published online: 2022-11-14

alcohol dehydrogenase (PVADH) plays an important role in the biodegradation of PVA. **[Objective]** *pvadh* gene was extracted from the PVA-degrading *Bacillus cereus* sp. DG01 for the expression of PVADH in *Pichia pastoris* and specificity of the enzyme for degrading different PVA species was explored. The findings are expected to guide the application of PVADH in PVA degradation. **[Methods]** The 1 965 bp *pvadh* as obtained by reverse-transcription PCR amplification. pPIC9K-*cpvadh* plasmid was constructed for expression in *P. pastoris* GS115. Methanol was employed to induce the expression of the protein which was then isolated and purified. The enzymatic properties and degradation specificity were investigated. **[Results]** The activity of crude PVADH solution yielded under optimal fermentation conditions reached 54.55 U/mL. The purified PVADH had the specific activity of 173.42 U/mg, molecular weight of 67.1 kDa, and isoelectric point of 6.06, and the optimum temperature and pH for PVADH were 41 °C and pH 7.5, respectively. The half-life of PVADH was more than 4 h at 27–32 °C and pH 7.0–8.0, and 1 mmol/L Ca^{2+} can activate the enzyme. K_m values of PVADH for the three substrates PVA1799, PVA1788, and PVA2488, were 1.49 mg/mL, 1.17 mg/mL, and 1.21 mg/mL, separately. **[Conclusion]** Heterogeneous expression in *P. pastoris* is a simple method to obtain PVADH and the purification features ease of implementation. The yielded PVADH has stable enzymatic properties and high efficiency in degrading the PVA with low alcoholysis degree.

Keywords: polyvinyl alcohol; polyvinyl alcohol dehydrogenase; heterologous expression; enzymatic properties

聚乙烯醇(polyvinyl alcohol, PVA)是一种可生物降解的水溶性高分子材料, 由于其具有优良的黏合性、机械性、抗电性等特点而被广泛应用于农业、医疗、食品包装等领域^[1]。但由于其在自然条件下降解缓慢且容易在水体中聚集, 造成了严重的环境污染问题^[2]。微生物法降解聚乙烯醇是一种低成本、简单高效且不易造成二次污染的方法, 目前对 PVA 降解一般采用好氧厌氧结合的方法, 这一方面可以对 PVA 进行彻底降解, 另一方面又降低了能量损失^[3-4]。为提高 PVA 生物降解的效果, 许多研究者对 PVA 降解菌株、降解机理及降解酶进行了多方面的研究。

PVA 降解酶的相关研究一直是近年来 PVA 生物降解的重点领域之一。目前报道的 PVA 的细菌降解酶有 3 种, 分别为仲醇氧化酶(secondary alcohol oxidases, SAO)、聚乙烯醇脱

氢酶(polyvinyl alcohol dehydrogenase, PVADH)以及氧化型聚乙烯醇水解酶(oxidized PVA hydrolase, OPH/BDH)^[5]。其中研究比较深入的是 PVADH 和 OPH, 这两种酶最早从菌株 *Pseudomonas* sp. VM15C 和 *Sphingopyxis* sp. 113P3 中发现^[6-7]。Hatanaka 等^[6]筛选得到一株 *Sphingopyxis* sp. 113P3, 纯化出需要吡咯喹啉醌(methoxatin, PQQ)为辅酶完成降解的 PVADH 及 OPH, 并发现起电子传递作用的细胞色素 c 基因。Masayuki 等^[7]分离得到两株协同降解 PVA 的假单胞菌(*Pseudomonas* sp. VM15C)和恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida* VM15A), 并发现其作用机理是降解过程中 VM15A 产生的辅酶 PQQ, 被 VM15C 利用从而实现 PVA 的降解。

PVADH 是 PVA 降解的关键酶, 也是研究最深入的 PVA 降解酶。该酶属于醌血色素蛋白醇脱氢酶, 能使聚乙烯醇发生脱氢反应, 从而

实现生物降解。Masayuki 等^[7]从 *Pseudomonas* sp. VM15C 中克隆出聚乙烯醇脱氢酶基因, 发现在其氨基酸序列中存在辅助因子吡咯喹啉醌 (PQQ) 的结合位点, 并在 *Sphingopyxis* sp. 113P3 发现了细胞色素 c 基因, 细胞色素 c 在 PVA 的氧化过程中的作用是电子传递^[8]。PVADH、OPH 及细胞色素 c 的基因共同组成降解 PVA 的操纵子 (No. AB190288.4) 并被组成型表达^[9-10]。李敏等^[11]从混合菌群中分离得到 PVADH, 纯化后 PVADH 的比酶活仅为 25.7 U/mg, 回收率 7.2%, 得率较低, 而且所得酶以 2-辛醇为底物时相对酶活达 87.5%, 但不能氧化伯醇。Jia 等^[12-13]通过人工合成密码子优化的 *pvadh* 基因, 实现其在毕赤酵母中的异源表达, 并发现在毕赤酵母中会表达出截短 PVADH, 摇瓶降解条件下发酵液酶活最高达到 546 U/mg, 但由于截短 PVADH 缺少前 81 个氨基酸编码的血红素结构域, 该酶的热稳

定性及 pH 稳定性变差, 37 °C 时半衰期仅为 3 h。

聚乙烯醇的细菌降解是一个复杂的过程, 并不能由单一酶实现完全降解, 而是多种酶共同作用的结果。如图 1 所示, 聚乙烯醇的细菌降解主要分两步进行, 即聚乙烯醇主链断裂和小分子水解^[14], 其反应机理是: 第 1 步是氧化反应, 在 SAO 或 PVADH 的作用下, PVA 分子上的羟基氧化成为 β -羟基酮或 β -双酮, 当 SAO 催化时, O_2 为电子受体, 并有 H_2O_2 的产生^[15]; 当 PVADH 催化时需要伴以 PQQ 的辅助, 电子由底物流动到 PVADH, 再流向细胞色素 c, 最后流向 O_2 。第 2 步是水解反应, 在 OPH 的作用下, β -羟基酮或 β -双酮发生水解反应, 进一步水解为甲基酮、醛类及羧酸类物质^[16], 其中 β -羟基酮、 β -双酮结构不稳定, 因此有研究认为水解反应可以自发进行, 而 OPH 的作用只是加速这一水解过程^[17]。

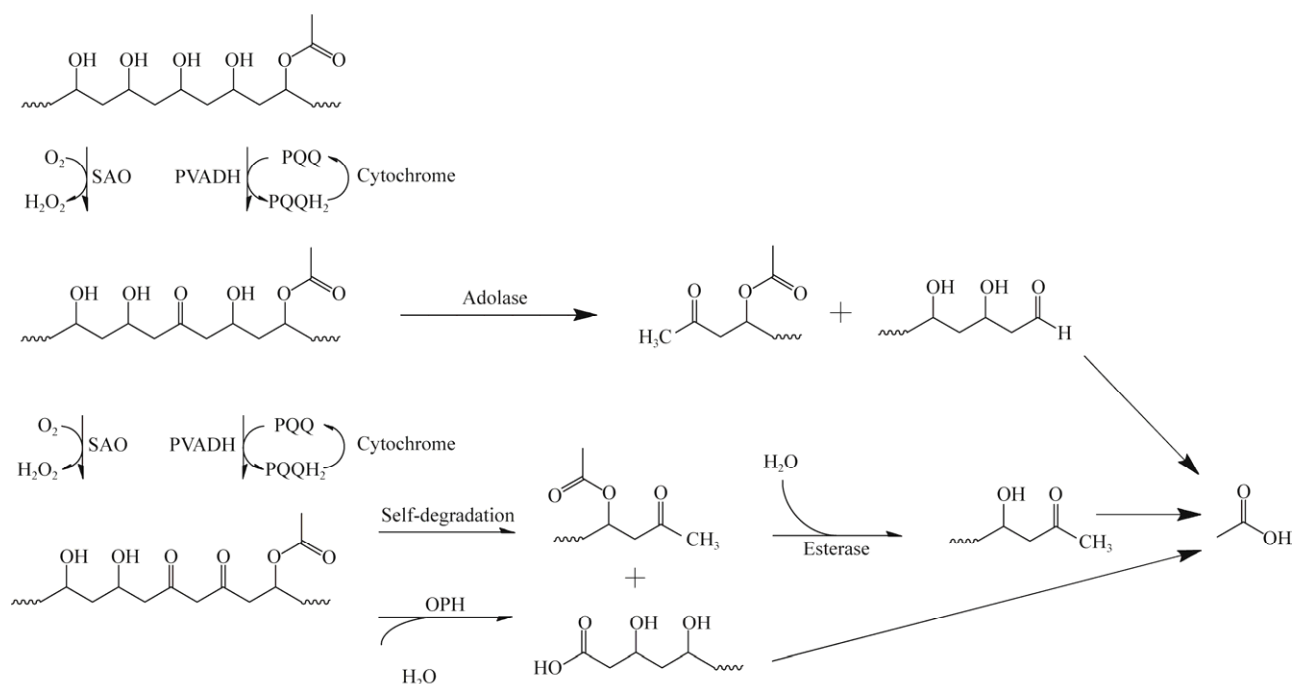


图 1 聚乙烯醇的酶促降解

Figure 1 Enzymatic degradation of PVA.

本实验室已筛选出多种聚乙烯醇降解菌株, 包括苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)、类芽孢杆菌(*Paenibacillus validus*)^[18]、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)^[19]等。这些菌株在特定条件下能够对 PVA 实现一定降解, 但也存在许多弊端。本实验室所筛选的类芽孢杆菌 DG03、DG04 对 PVA1788 的 8 d 降解率分别为 56.74% 和 67.27%; 蜡样芽孢杆菌 DG01 对 PVA2488 的 24 h 降解率仅为 46.73%, 且该菌株需要在 41 °C、pH 7.0 条件下进行培养, 还要添加硝酸铵、氯化钠等 7 种无机盐化合物并严格控制用量^[18-19]。这些数据说明 PVA 降解菌株存在培养及降解条件苛刻、培养周期长、降解效率低等问题。因此, 本实验探究从蛋白水平上实现 PVA 的高效降解, 即从已有 PVA 降解菌中获取 PVA 降解关键酶 *pvadh* 的基因片段并实现 PVADH 在毕赤酵母表达系统中的异源表达。

前期工作中, 本研究依据 NCBI 公开的 *pvadh* 基因序列比对^[12], 设计特异性引物, 通过 RT-PCR 技术, 从筛选的 PVA 降解菌株 *Bacillus cereus* sp. DG01 中扩增 *pvadh* 基因片段, 并通过 T-A 克隆的方法构建稳定且易于提取质粒的重组克隆菌株, 作为本实验的基础生物材料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和载体

大肠杆菌 *E. coli* JM109 感受态细胞, 北京擎科生物科技有限公司; 毕赤酵母 *Pichia pastoris* GS115 及 pPIC9K 质粒载体, 本实验室保存; 重组质粒 pUCM-T-*pvadh*, 本实验室制备并保存。

1.1.2 主要试剂和仪器

Speedy Cut *EcoR* I/*Not* I 快切酶、*Sal* I 内切

酶、T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶、G418 抗生素, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、BCA 蛋白质定量试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; DNA Marker、Protein Marker, 北京擎科生物科技有限公司; 所用引物及测序服务均由北京擎科生物科技有限公司完成; 其他常规试剂均为分析纯产品。

台式恒温培养摇床, 杭州艾普仪器设备有限公司; 紫外分光光度计, 尤尼柯(上海)仪器有限公司; 多功能酶标仪, 帝肯公司; 蛋白分离纯化色谱, GE 公司; 数显 pH 计, 仪电科学仪器股份有限公司; PCR 扩增仪, 赛默飞世尔科技公司。

1.1.3 培养基

LB 液体培养基(g/L): 氯化钠 10.0, 蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0 (固体培养基添加琼脂粉 20.0); YPD 液体培养基(g/L): 蛋白胨 20.0, 酵母提取物 10.0, 葡萄糖 20.0 (固体培养基添加琼脂粉 20.0); MD 固体培养基(g/L): 无氨基酸酵母氮源(YNB) 13.4, 葡萄糖 20.0, 琼脂 20.0, 生物素 0.000 4; BMGY 液体培养基: 蛋白胨 20.0 g/L, 酵母粉 10.0 g/L, YNB 13.4 g/L, 磷酸盐缓冲液 10.0% (体积分数, 下同), 甘油 10.0%, 生物素 0.4 mg/L (BMMY 液体培养基将甘油 10.0% 改为甲醇 1.0%)。

1.2 方法

1.2.1 引物设计

研究所用实验引物见表 1。

1.2.2 pPIC9K-*cpvadh* 质粒的构建及线性化

使用软件 Signal P-6.0 预测基因片的信号肽位点后, 以重组质粒 pUCM-T-*pvadh* 为 DNA 模板、*cpvadh*-F/R 为特异性引物进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: 10×PCR buffer 5 μL, Mg²⁺

表 1 主要引物

Table 1 Primary primer

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Product length (bp)
<i>cpvadh</i> -F	CCGGAATTCTCCGGCACCGTGGCCGAA	1 890
<i>cpvadh</i> -R	AAGGAAAAAAGCGGCCGCTCATTTCCATCGACCGAGAAGGCC	1 890
<i>AOX1</i> -F	GACTGGTTCCAATTGACAAGC	2 382
<i>AOX1</i> -R	GCAAATGGCATTCTGACATCC	2 382

下划线分别为 *EcoR* I 与 *Not* I 酶切位点

Underlined are *EcoR* I and *Not* I digestion sites respectively.

(25 mmol/L) 3 μ L, dNTPs (10 mmol/L) 1 μ L, *Taq* DNA polymerase (5 U/ μ L) 1 μ L, *cpvadh*-F/R (10 mmol/L)各 2 μ L, DNA 模板 50 ng, 加 ddH₂O 至 50 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 59 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。纯化后得到不含信号肽的剪切 *pvadh* 基因片段, 命名为 *cpvadh*。

使用 *EcoR* I 与 *Not* I 快切酶将 *cpvadh* 与 pPIC9K 质粒分别进行双酶切后用 T4 DNA 连接酶连接过夜, 用 *E. coli* JM109 感受态转化得到重组菌株 *E. coli* JM109-pPIC9K-*cpvadh*, 提取 pPIC9K-*cpvadh* 重组质粒后使用 *Sal* I 内切酶酶切线性化。

1.2.3 重组菌株 *Pichia pastoris* GS115-pPIC9K-*cpvadh* 的构建

制备 *P. pastoris* GS115 感受态细胞^[20]。通过电击法分别将 5–10 μ L (2 μ g/ μ L)线性化的 pPIC9K-*cpvadh* 重组质粒及 pPIC9K 空质粒转入 80 μ L *P. pastoris* GS115 感受态细胞中, 菌体涂布于 MD 平板, 30 $^{\circ}$ C 培养 3–5 d 直到出现单菌落。

1.2.4 多拷贝子筛选及菌落 PCR 验证

将重组转化子及空质粒转化子分别接种到含有 0–3 mg/mL G418 抗生素的 YPD 平板上, 30 $^{\circ}$ C 培养箱培养 3–5 d, 于高浓度抗性平板中挑选高拷贝数转化子, 用 *AOX1* 通用引物进行菌落 PCR 验证。PCR 反应体系: 10 \times PCR buffer

5 μ L, Mg²⁺ (25 mmol/L) 6 μ L, dNTPs (10 mmol/L) 2 μ L, *Taq* DNA polymerase (5 U/ μ L) 1 μ L, *AOX1*-F/R (10 mmol/L)各 2 μ L, 模板 DNA 200 μ g, 加超纯水至总反应体系 50 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.2.5 *Pichia pastoris* GS115-pPIC9K-*cpvadh* 的诱导表达

在 100 mL BMGY 培养基中培养重组菌株至 OD₆₀₀ 为 2.0–6.0, 收集全部菌液于 4 $^{\circ}$ C、8 500 r/min 离心 10 min 去上清, 将适量菌体转入含 100 mL BMMY 培养基的 250 mL 三角瓶中, 使转入后的培养基中重组菌液 OD₆₀₀ 为 1.85, 于 25.5 $^{\circ}$ C、200 r/min 条件下诱导。在诱导开始前及诱导 24、48 h 时向培养基中添加体积分数为 1.1% 的甲醇, 并于诱导 24–96 h 时取相当于 OD₆₀₀ 为 1.0 菌体量的菌液进行 SDS-PAGE 分析, 同时设置空白对照。

1.2.6 硫酸铵沉淀法纯化 PVADH

于发酵上清液中缓慢加入 (NH₄)₂SO₄ 至终浓度为 70% (质量体积分数), 于 4 $^{\circ}$ C、8 500 r/min 离心 10 min 去上清。所得沉淀物用含有 1 mol/L (NH₄)₂SO₄ 的 50 mmol/L、pH 7.0 的磷酸盐缓冲液复溶后, 用 0.22 μ m 的滤膜过滤制取上柱样品。将 10 mm \times 400 mm 的层析柱用上述缓冲液平衡后上样, 分别用 0–1 mol/L 的氯化钠溶液线性洗脱, 流速为 1 mL/min, 检测波长为 280 nm,

检测有酶活的部分保存备用。

1.2.7 聚乙烯醇脱氢酶的酶活测定方法

酶活测定方法: PVADH 酶液 300 μL , PVA1799 30 mg, 2,6-二氯酚钠(DCIP) 3 μmol , KCN 3 μmol , CaCl_2 3 μmol , PQQ 18 nmol, 加入 50 mmol/L pH 7.2 的磷酸盐缓冲液至总反应体系为 3 mL。反应于 37 $^{\circ}\text{C}$ 进行。定义酶活力单位 (U): 每 1 min 减少 1 nmol DCIP [摩尔消光系数 $\varepsilon_{600}=19.1 (\mu\text{mol}\cdot\text{mL})/\text{cm}$] 所消耗酶量。

1.3 聚乙烯醇脱氢酶的酶学性质分析

1.3.1 酶的最适反应温度及温度稳定性

原始体系下将酶反应温度改变为 27–52 $^{\circ}\text{C}$ (每 5 $^{\circ}\text{C}$ 设定 1 个梯度), 其他条件不变, 以原始体系下的相对酶活为 100%, 测定不同温度下的相对酶活力, 并在最适温度峰值附近将温度间隔缩小为 1–2 $^{\circ}\text{C}$ 后再次进行精确测定, 以确定酶的最适反应温度; 将酶液分别置于不同温度下保温 2–6 h, 以当前温度下未保温的酶活力为 100%, 测定保温不同时间下的相对酶活力, 以确定酶的温度稳定性。

1.3.2 酶的最适反应 pH 及 pH 稳定性

原始体系下将酶反应体系的 pH 值改变为 5.0–10.0, 其他条件不变, 同理确定酶的最适反应 pH; 37 $^{\circ}\text{C}$ 时, 将酶液置于不同 pH 缓冲液中, 以当前 pH 下未保温时的酶活力为 100%, 确定酶的 pH 稳定性。

1.3.3 不同金属离子对酶反应的影响

原始体系下, 分别将酶液中加入 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Hg^{2+} 及 EDTA, 测定不同金属离子对酶的影响。

1.3.4 聚乙烯醇脱氢酶对不同型号 PVA 的反应亲和力

原始体系下, 分别测定反应底物为不同浓度 PVA1799、PVA1788、PVA2488 时的酶活力, 根据 Michaelis-Menten 方程及 Michaelis-Menten 作图法计算出不同作用底物的米氏常数 K_m 以

及最大反应速率 V_{\max} , 并分析 PVADH 对不同底物的降解亲和性。

2 结果与分析

2.1 pPIC9K-PVADH 质粒的构建及线性化

通过 Signal P-6.0 预测发现 *pvadh* 基因片段前 75 bp 编码信号肽序列, 因此实际表达时需将其切除以提高蛋白的胞外表达量。以重组质粒 pUCM-T-*pvadh* 为模板 PCR 扩增出长度为 1 890 bp 的剪切基因 *cpvadh*, 用 *EcoRI* 与 *NotI* 双酶切, 酶切产物选择 1 890 bp 处胶回收纯化并测序确定, 将其与双酶切纯化后的 pPIC9K 空质粒通过 T4 DNA 连接酶连接, 转入 *E. coli* JM109 感受态细胞, 获得阳性菌株 *E. coli* JM109-pPIC9K-*cpvadh*。

由于 *P. pastoris* 内无天然质粒, 表达载体与宿主染色体发生同源重组, 将外源基因表达框架整合于染色体中实现外源表达, 要实现这一过程, 就需要将表达载体进行酶切线性化以产生稳定的重组转化子, 本研究的重组转化为单交换, 即将载体质粒线性化后插入染色体, 并保留 *AOX1* 基因。提取重组质粒 pPIC9K-*cpvadh*, 用 *SalI* 酶切线性化, 重组质粒长度为 11.16 kb, 纯化回收。

2.2 *Pichia pastoris* 阳性转化子筛选及菌落 PCR 验证

将线性化的质粒 pPIC9K-*cpvadh* 和空质粒 pPIC9K 电转化 *P. pastoris* GS115, 转化菌涂布 MD 平板培养, 将转化有 *cpvadh* 基因的重组 *P. pastoris* 分别接种在浓度为 0–3.0 mg/mL 的 G418 抗生素的 YPD 平板上, 发现在 G418 浓度为 2.5 mg/mL 的平板上长出菌体, 挑选最佳单菌落保存, 同时挑选空质粒转化子。分别将重组转化菌株及空质粒转化菌株进行菌落 PCR 验证(图 2), 发现转化子在 2 382 bp 处出现条带, 对照组在 492 bp 处有条带, 与理论值相符, 证明转化菌株已转入目的基因 *cpvadh*。

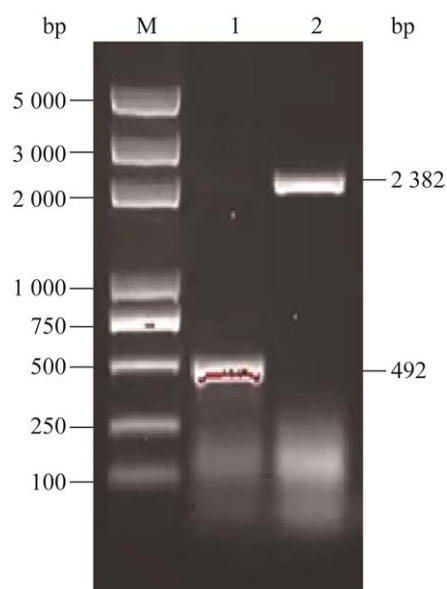


图 2 *Pichia pastoris* GS115-pPIC9K-*cpvadh* 的菌落 PCR 结果

Figure 2 Colony PCR of *Pichia pastoris* GS115-pPIC9K-*cpvadh*. M: DNA Marker; 1: Contrast; 2: Recombinant.

2.3 *Pichia pastoris* GS115-pPIC9K-*cpvadh* 的诱导表达

分别将空质粒菌液、未诱导菌液以及诱导菌液处理后进行 SDS-PAGE 电泳分析蛋白表达情况。如图 3 所示,在 67.1 kDa 处未诱导菌体(泳道 2)与诱导菌体(泳道 3-6)均出现统一一条带,理论上目的蛋白分子量应为 67.1 kDa,此处即为所需目的蛋白,而空质粒菌株(泳道 1)表达出的蛋白与其他泳道有明显差别。

将重组菌接种至 BMGY 培养基培养至 OD_{600} 为 2.0-6.0 后,重悬于 BMMY 培养基,经过发酵工艺条件优化,以甲醇为唯一碳源诱

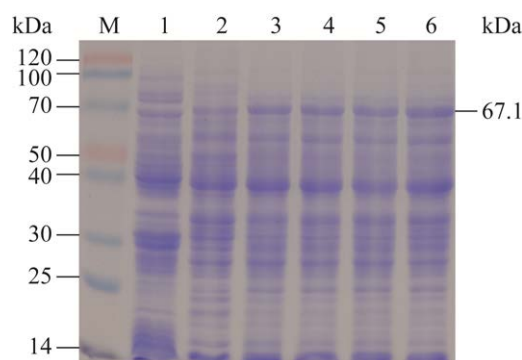


图 3 重组 *Pichia pastoris* GS115-pPIC9K-*cpvadh* 中蛋白表达的 SDS-PAGE

Figure 3 SDS-PAGE of expressed protein in recombinant *Pichia pastoris* GS115-pPIC9K-*cpvadh*. M: Protein Marker; 1: Contrast; 2: Recombinant (-); 3-6: Recombinant (+) 24-96 h.

导,在 25.5 °C 200 r/min 初始菌体 OD_{600} 为 1.85 的条件下,每 24 h 添加体积分数为 1.1% 的甲醇至终浓度为 3.3%,当诱导 120 h 时,酶活达到最大值 54.55 U/mL。

2.4 聚乙烯醇脱氢酶的纯化

P. pastoris 表达外源蛋白不仅高效,且外源基因表达产物既可存在于胞内,又能通过 α -因子或天然蛋白本身信号肽分泌至细胞外;同时,该系统自身分泌蛋白少,纯化简单且回收率高。PVADH 表达蛋白的纯化参数及纯化倍数如表 2 所示,经过两步纯化之后,PVADH 蛋白的总酶活 2 612 U,比酶活达到 173.42 U/mg,纯化倍数 2.7,回收率 47.88%。进行 SDS-PAGE 电泳分析(图 4),在 67.1 kDa 处出现清晰条带(第 2 泳道),对比未纯化蛋白(第 1 泳道),确定纯化酶为 PVADH。

表 2 重组 PVADH 纯化过程参数

Table 2 Summary of recombinant PVADH purification

Purification steps	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purified fold	Recovery rate (%)
Supernatant	86.33	5 455	64.23	1.0	100.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	40.25	4 653	115.61	1.8	84.9
Chromatography	15.06	2 612	173.42	2.7	47.8

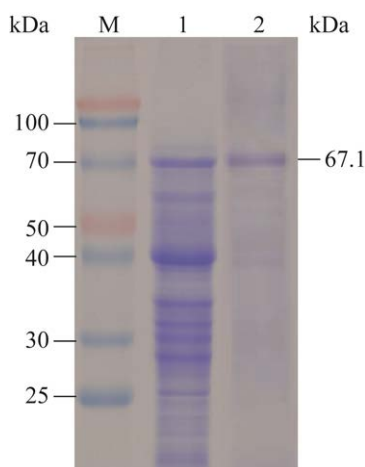


图4 纯化PVADH的SDS-PAGE分析

Figure 4 SDS-PAGE of PVADH. M: Protein Marker; 1: Contrast; 2: Purified PVADH.

2.5 聚乙醇脱氢酶的酶学性质探究

2.5.1 酶的最适作用温度及温度稳定性结果

由图5可知,反应温度为27–37℃时,酶活力随温度上升而迅速升高。在37–42℃的温度区间内酶活差别较小,并在41℃时酶活力达到最大值,为37℃时酶活的109%,温度超过43℃后酶活力迅速下降。表明纯化PVADH的最适作用温度为41℃。温度达到57℃时,PVADH酶活力完全丧失。这是因为高温会改变蛋白结构,使酶发生不可逆的变性失活。

将PVADH分别在27–47℃保温2–6 h后检测酶活。以相同温度下未保温的酶活为100%,测定不同时间后酶的相对酶活,确定其温度稳定性。27℃保存6 h,酶活仍存留90%以上。32℃保温6 h,酶活存留73.1%。37℃保温2 h,酶活力为原始酶活的92.0%,此温度下酶的半衰期超过4 h。而42℃保温2 h后酶活力也达到原始酶活的89.3%,半衰期超过3 h。47℃酶的稳定性迅速下降,保温2 h酶活力已经仅为61.2%。当保温超过6 h,保温温度超过37℃时,酶的稳定性显著降低,47℃时酶活已不足原始

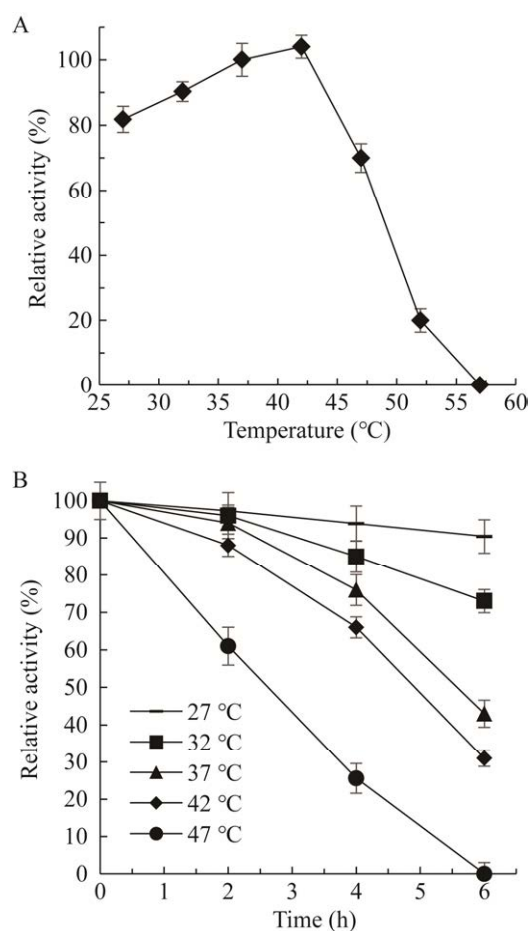


图5 PVADH的最适反应温度(A)及温度稳定性(B)

Figure 5 Optimum operating temperature (A) and temperature stability (B) of PVADH.

酶活的20%。重组PVADH的温度稳定性较为广泛,42℃以下酶的热稳定性良好,而超过42℃后热稳定性较差。

2.5.2 酶的最适作用pH及pH稳定性结果

由图6A可知,当pH 7.5时酶活性最高,当pH小于7.0或大于8.0时酶活下降均比较明显。pH 7.0–8.0为PVADH的最适反应pH区间。分别在pH 6.0–9.0的缓冲体系内将酶保温2–6 h测定酶的pH稳定性,结果如图6B所示,pH值为7.0–8.0时酶的稳定性最佳,半衰期超过4 h。而当pH值为6.0或9.0时半衰期皆为2 h左右。说明PVADH的最适反应pH及pH稳定性均在

7.0–8.0 区间内,过酸或过碱条件下均会使 PVADH 迅速失活。

2.5.3 常见金属离子诱导剂对酶催化作用的影响

如图 7 所示,当反应体系中添加 Ca^{2+} 时, PVADH 的酶活性为不加任何金属离子的 178%;此外, Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Hg^{2+} 及 EDTA 对酶活性均表现出抑制作用。并且当体系中不添加 PQQ 时,酶促反应完全不能进行。

根据 Toyama 等^[21]的研究,确定 PVADH 是一种可以分泌到周质空间的 II 型乙醇脱氢酶,

PVADH 蛋白 C 端为醌蛋白结构域,存在 PQQ 与 Ca^{2+} 共价结合位点,在 Ca^{2+} 的催化作用下, PQQ 与脱氢酶非共价键结合,促进伯仲醇的氧化脱氢。该酶中还包含特殊的血红素 c 结构域,起到电子传递的功能。改变体系中 Ca^{2+} 的浓度,发现 1 mmol/L 的 Ca^{2+} 对酶活的促进作用最大,这一结论与 Toyama 等所报道的最适 Ca^{2+} 浓度相一致^[21]。

2.6 PVADH 对不同型号 PVA 底物的催化特性

PVA 型号的不同是由其聚合度和醇解度决

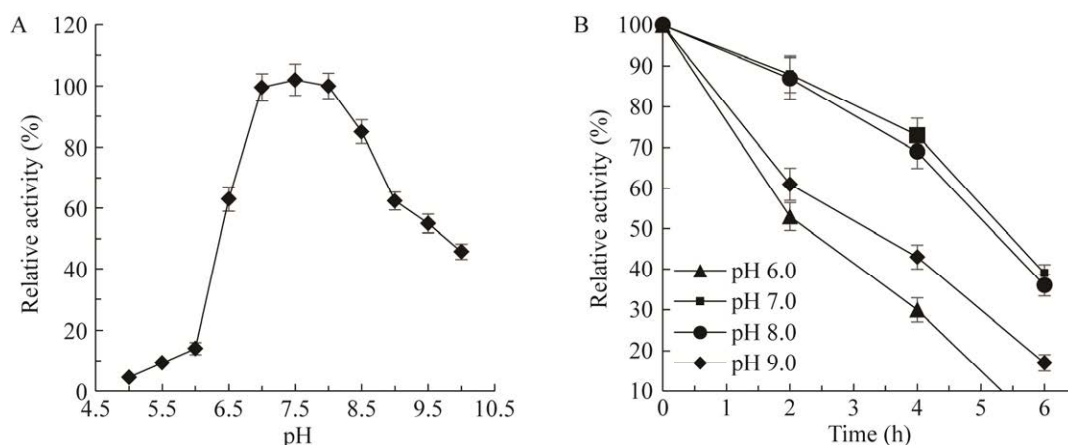


图 6 PVADH 最适 pH (A) 及 pH 稳定性 (B)

Figure 6 Optimum pH (A) and pH stability (B) of PVADH.

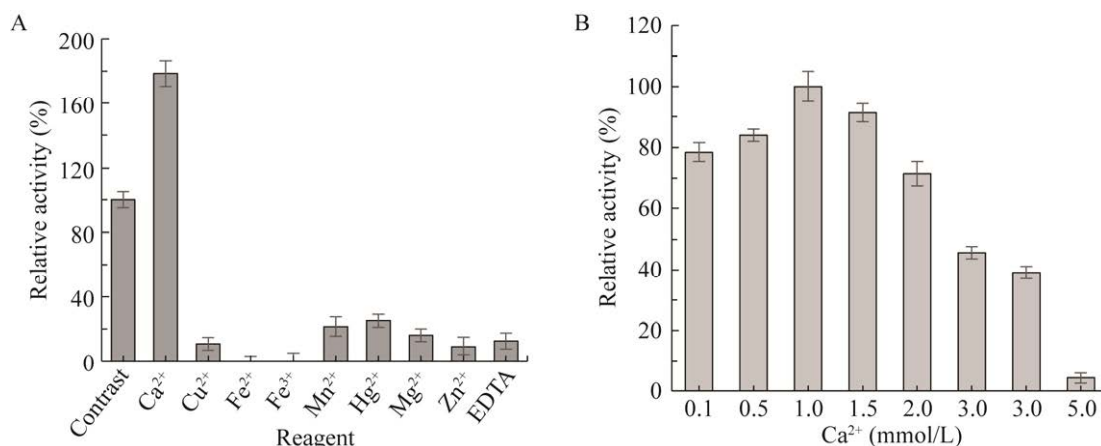


图 7 金属离子 (A) 及不同浓度 Ca^{2+} (B) 对 PVADH 酶活力的影响

Figure 7 Effect of metal ions (A) and different concentrations of Ca^{2+} (B) on the enzyme activity of PVADH.

定的。聚合度是指高分子材料中结构单元的重复数, 而醇解度是指 PVA 中羟基取代的比例。根据 PVA 不同的醇解度可将其分为完全醇解型与部分醇解型 PVA。根据 PVA 不同的聚合度和醇解度可将其进行命名。例如, PVA1799 是指聚合度为 1 700、醇解度为 99% 的完全醇解型 PVA, 而 PVA2488 则是指聚合度为 2 400、醇解度为 88% 的部分醇解型 PVA。而在本实验中探讨 PVADH 对不同型号 PVA 底物的催化特性。

2.6.1 PVADH 对 PVA1799 的反应动力学

首先研究 PVADH 以 PVA1799 为底物时的 K_m 值。分别改变酶反应体系中的 PVA1799 浓度为 1–40 mg/mL, 发现当 PVA1799 浓度小于 20 mg/mL 时, 随着底物浓度的增加酶催化速率增加, 此时符合一级反应动力学; 而当浓度超过 20 mg/mL 时, 反应速率保持恒定, 符合零级反应动力学。

如图 8A 所示, 当 PVA1799 为 1–20 mg/mL 时通过双倒数曲线方程(Lineweaver-Burk 方程), 方程为 $y=0.0052x+0.0035$, $R^2=0.9986$ 。计算得出 K_m 值为 1.49 mg/mL、 V_{max} 值为 285.71 nmol/(mg·min)。

2.6.2 PVADH 对 PVA1788 的反应动力学

将反应体系中反应底物改为 PVA1788。当底物浓度超过 5 mg/mL 时酶促反应速率不再增加。如图 8B 所示, 将反应体系中 PVA1788 的浓度改变为 1–5 mg/mL, 绘制双倒数曲线, 得方程为 $y=0.0027x+0.0023$, $R^2=0.9996$, 计算得出 K_m 值为 1.17 mg/mL、 V_{max} 值为 434.78 nmol/(mg·min)。

2.6.3 PVADH 对 PVA2488 的反应动力学

将反应底物改为 PVA2488。如图 8C 所示, 将 PVA2488 浓度改为 1–5 mg/mL, 并绘制双倒数曲线, 得方程为 $y=0.0029x+0.0024$, $R^2=0.9988$, 得出 K_m 值为 1.21 mg/mL、 V_{max} 值为 416.67 nmol/(mg·min)。

实验结果表明, 分别以 PVA1799、PVA1788、PVA2488 为作用底物时, PVADH 的 K_m 值分别

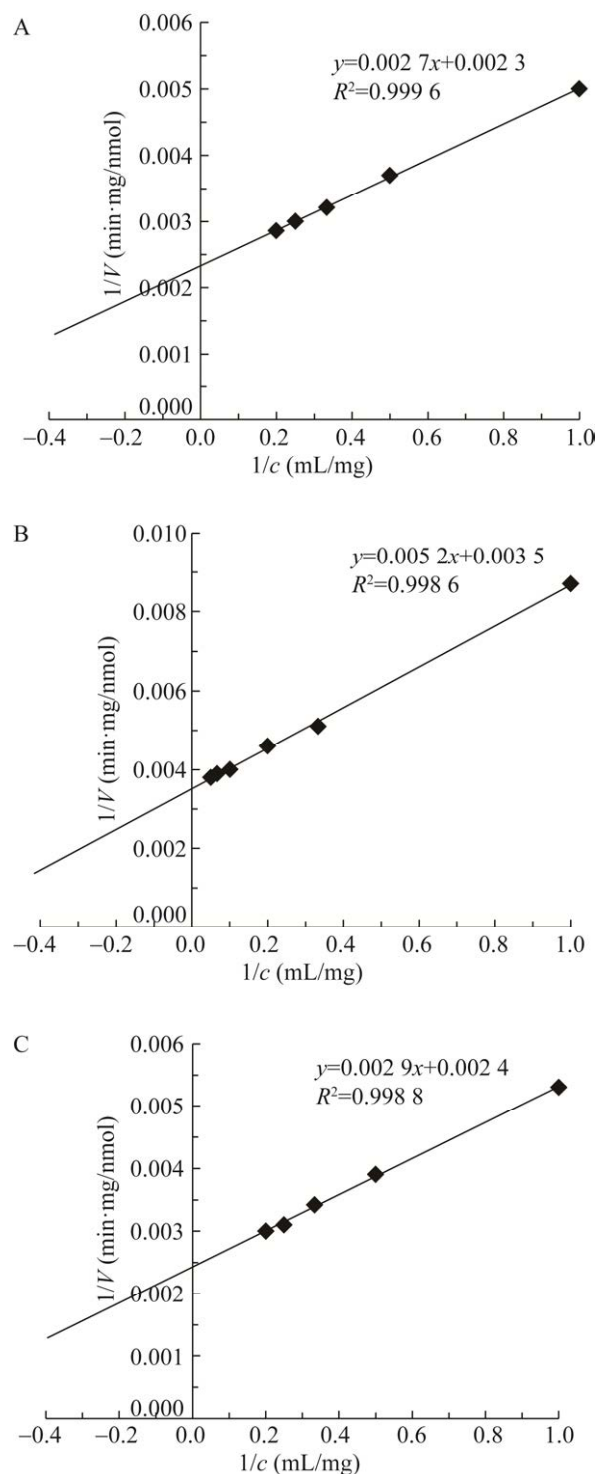


图 8 降解 PVA1799 (A)、PVA1788 (B) 及 PVA2488 (C) 的 Lineweaver-Burk 图

Figure 8 The Lineweaver-Burk plot of degradation in PVA1799 (A), PVA1788 (B) and PVA2488 (C).

为 1.49、1.17、1.21 mg/mL, 表明 PVADH 对 PVA1788 的亲合程度最高, 对 PVA1799 最低。

3 讨论与结论

聚乙烯醇作为一种生物可降解材料, 代替传统聚合物成为解决环境污染的重要手段, 聚乙烯醇脱氢酶是聚乙烯醇降解菌的关键作用酶, 其以 PQQ 为电子受体, 能够将 PVA 氧化脱氢, 以便进一步分解成小分子物质。

本实验以 PVA 降解菌 *Bacillus cereus* sp. DG01 为出发菌株, 通过 RT-PCR 技术成功扩增出长度为 1 965 bp 的 *pvadh* 基因片段。通过信号肽预测, PCR 扩增出长度为 1 890 bp 的 *cpvadh* 剪切基因, 实现 PVADH 在毕赤酵母表达系统中的异源表达。所获得的 PVADH 蛋白分子量为 67.1 kDa, 等电点 6.06。分析 PVADH 的酶学性质, 其最适反应温度为 41 °C、最适 pH 值为 7.5, 37 °C 及 pH 7.0–8.0 条件下稳定性较好, 半衰期超过 4 h。此外, 1 mmol/L 的 Ca^{2+} 能有效促进酶活力。根据文献[6]报道, 野生菌株 *Pseudomonas* sp. 113P3 表达的 PVADH 最适作用温度为 37 °C, 最适 pH 值为 7.5, 当 pH 值高于或低于 7.5 时酶活力迅速下降, 因此本研究获得 PVADH 耐高温性更佳, 且最适 pH 范围更宽泛, 较野生菌表达的 PVADH 均具有明显优势。

比较 PVADH 对不同型号 PVA 的降解能力, 结果表明 PVADH 以 PVA1799、PVA1788 与 PVA2488 为作用底物时的 K_m 分别为 1.49、1.17、1.21 mg/mL。 K_m 越小代表酶与底物的亲合程度越高, 表明 PVADH 对醇解度小的 PVA 明显具有更高的亲合度。推测原因可能有以下几点: (1) PVA188、PVA2488 为部分醇解型 PVA, 其在水溶液中的溶解性要明显高于完全醇解型的 PVA1799, 而 PVADH 属于亲水性蛋白, 因此在

水溶液中, PVADH 更容易与低醇解度 PVA 结合, 有利于酶催化反应的进行^[22]; (2) PVA88、PVA99 均为两性偏酸材料, 但 PVA99 的酸性更强, 而 PVADH 在弱碱性环境下的催化速率及稳定性更高, 因此 PVA99 在一定程度上抑制了 PVADH 的催化进行^[23]; (3) 由于完全醇解型 PVA 含羟基数量更多, 这些羟基会在水溶液中形成更多的分子内及分子间的氢键, 一定程度上阻遏了 PVADH 的催化反应进行。

另一方面, PVADH 对 PVA1788 的亲合程度略高于 PVA2488, 但二者差别较小, 表明 PVA 聚合度不是影响 PVADH 酶促反应进行的主要因素。理论上说, 高聚合度的 PVA 分子量更大、分子链更长, PVADH 的酶促反应速率也必然会减慢, 但在 PVADH 中这种现象并不明显。对于菌株降解 PVA 来说, 张兴等^[24]、Chiellini 等^[25]均认为相较于聚合度, 微生物降解 PVA 更容易受醇解度的影响。

综上所述, 本研究获得异源表达的 PVADH 在温度耐受性及 pH 耐受性方面均明显优于野生菌所表达的 PVADH, 而且对低醇解度的 PVADH 具有更高效的降解能力, 为 PVA 的实际降解提供了阶段性理论指导。

REFERENCES

- [1] HUSAIN MSB, GUPTA A, ALASHWAL BY, SHARMA S. Synthesis of PVA/PVP based hydrogel for biomedical applications: a review[J]. Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects, 2018, 40(20): 1-6.
- [2] YALAN L, YILING D, PING C, MENGJIE D, XIAOSHAN L, YI Z. Biodegradation analysis of polyvinyl alcohol during the compost burial course[J]. Journal of Basic Microbiology, 2019, 59(4): 368-374.
- [3] WU HF, YUE LZ, JIANG SL, LU YQ, WU YX, WAN ZY. Biodegradation of polyvinyl alcohol by different dominant degrading bacterial strains in a baffled anaerobic bioreactor[J]. Water Science and Technology:

- a Journal of the International Association on Water Pollution Research, 2019, 79(10): 2005-2012.
- [4] YU H, GU G, SONG L. Degradation of polyvinyl alcohol in sequencing batch reactors[J]. Environmental Technology, 1996, 17(11): 1261-1267.
- [5] DU GC. Polyvinyl alcohol (PVA)-degrading enzyme: Structure analysis, heterologous overexpression, and applications[J]. New Biotechnology, 2016, 33: S20.
- [6] HATANAKA T, ASAHI N, TSUJI M. Purification and characterization of poly (vinyl alcohol) dehydrogenase from *Pseudomonas* sp. 113P3[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1995, 59(10): 1813-1816.
- [7] MASAYUKI S, TSUYOSHI T, KOICHI N, SHIGEAKI H. Cloning and characterization of the gene encoding pyrroloquinoline quinone-dependent poly (vinyl alcohol) dehydrogenase of *Pseudomonas* sp. strain VM15C[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1996, 60(7): 1056-1062.
- [8] MAMOTO R, HU XP, CHIUE H, FUJIOKA Y, KAWAI F. Cloning and expression of soluble cytochrome c and its role in polyvinyl alcohol degradation by polyvinyl alcohol-utilizing *Sphingopyxis* sp. strain 113P3[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2008, 105(2): 147-151.
- [9] HU XP, MAMOTO R, FUJIOKA Y, TANI A, KIMBARA K, KAWAI F. The *pva* operon is located on the megaplasmid of *Sphingopyxis* sp. strain 113P3 and is constitutively expressed, although expression is enhanced by PVA[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 78(4): 685-693.
- [10] SHIMAO M, TAMOGAMI T, KISHIDA S, HARAYAMA S. The gene *pvaB* encodes oxidized polyvinyl alcohol hydrolase of *Pseudomonas* sp. strain VM15C and forms an operon with the polyvinyl alcohol dehydrogenase gene *pvaA*[J]. Microbiology: Reading, England, 2000, 146 (Pt 3): 649-657.
- [11] 李敏, 堵国成. 聚乙烯醇脱氢酶的分离纯化及其酶学性质[J]. 过程工程学报, 2014, 14(6): 1015-1019.
- LI M, DU GC. Purification and enzymatic properties of polyvinyl alcohol dehydrogenase[J]. The Chinese Journal of Process Engineering, 2014, 14(6): 1015-1019 (in Chinese).
- [12] JIA DX, LI JH, LIU L, ZHANG DX, YANG Y, DU GC, Chen J. High-level expression, purification, and enzymatic characterization of truncated poly (vinyl alcohol) dehydrogenase in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(3): 1113-1120.
- [13] JIA DX, LIU L, WANG HL, ZHANG DX, LI JH, DU GC, CHEN J. Overproduction of a truncated poly (vinyl alcohol) dehydrogenase in recombinant *Pichia pastoris* by low-temperature induction strategy and related mechanism analysis[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2013, 36(8): 1095-1103.
- [14] 王海波. 聚乙烯醇纤维(维纶)增强砂浆性能的研究[D]. 北京: 北京工业大学硕士学位论文, 2003.
- WANG HB. Research on properties of polyvinyl alcohol fiber (vinylon) reinforced mortar[D]. Beijing: Master's Thesis of Beijing University of Technology, 2003 (in Chinese).
- [15] WATANABE Y, MORITA M, HAMADA N, TSUJISAKA Y. Formation of hydrogen peroxide by a polyvinyl alcohol degrading enzyme[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1975, 39(12): 2447-2448.
- [16] MATSUMURA S, TOMIZAWA N, TOKI A, NISHIKAWA K, TOSHIMA K. Novel poly (vinyl alcohol)-degrading enzyme and the degradation mechanism[J]. Macromolecules, 1999, 32(23): 7753-7761.
- [17] HIROTA-MAMOTO R, NAGAI R, TACHIBANA S, YASUDA M, TANI A, KIMBARA K, KAWAI F. Cloning and expression of the gene for periplasmic poly (vinyl alcohol) dehydrogenase from *Sphingomonas* sp. strain 113P3, a novel-type quinoxalene alcohol dehydrogenase[J]. Microbiology: Reading, England, 2006, 152(Pt 7): 1941-1949.
- [18] 段梦洁. 聚乙烯醇材料降解微生物的菌群结构分析及其作用菌株分离[D]. 广州: 华南理工大学硕士学位论文, 2018.
- DUAN MJ. Analysis of microbial structure during the compost burial course of polyvinyl alcohol based material and isolation of polyvinyl alcohol degrading strains[D]. Guangzhou: Master's Thesis of South China University of Technology, 2018 (in Chinese).
- [19] 陈萍. 聚乙烯醇降解菌 *Bacillus cereus* sp. 的筛选及其降解过程研究[D]. 广州: 华南理工大学硕士学位论文, 2020.
- CHEN P. The screening of polyvinyl alcohol-degrading strains *Bacillus cereus* sp. and study on its mechanism of biodegradation process[D]. Guangzhou: Master's Thesis of South China University of Technology, 2020 (in Chinese).
- [20] 朱旭芬. 基因工程实验指导[M]. 北京: 高等教育出

- 版社, 2006.
- ZHU XF. The Experimental Guide for Gene Engineering[M]. Beijing: Higher Education Press, 2006 (in Chinese).
- [21] TOYAMA H, MATHEWS FS, ADACHI O, MATSUSHITA K. Quinohemoprotein alcohol dehydrogenases: structure, function, and physiology[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2004, 428(1): 10-21.
- [22] 谢明珠, 杨亮. 变性淀粉/聚乙烯醇复合膜的研究进展[J]. 染整技术, 2020, 42(2): 14-19.
- XIE MZ, YANG L. Research progress of modified starch/poly (vinyl alcohol) composite film[J]. Textile Dyeing and Finishing Journal, 2020, 42(2): 14-19 (in Chinese).
- [23] CHEN SQ, YANG H, HUANG K, GE XL, YAO HP, TANG JX, REN JX, REN SX, MA YL. Quantitative study on solubility parameters and related thermodynamic parameters of PVA with different alcoholysis degrees[J]. Polymers, 2021, 13(21): 3778.
- [24] 张兴, 堵国成, 陈坚. 聚乙烯醇降解酶研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(2): 69-73.
- ZHANG X, DU GC, CHEN J. Developments in study of poly (vinyl alcohol) degrading enzyme[J]. Progress in Biotechnology, 2003, 23(2): 69-73 (in Chinese).
- [25] CHIELLINI E, CORTI A, del SARTO G, D'ANTONE S. Oxo-biodegradable polymers - effect of hydrolysis degree on biodegradation behaviour of poly (vinyl alcohol)[J]. Polymer Degradation and Stability, 2006, 91(12): 3397-3406.