

王 飞, 张 丽. 超声波破碎法提取多食鞘氨醇杆菌中 17β -雌二醇降解酶的优化及酶学性质[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(4): 310-313.

超声波破碎法提取多食鞘氨醇杆菌中 17β -雌二醇降解酶的优化及酶学性质

王 飞, 张 丽

(南京理工大学环境与生物工程学院, 江苏南京 210094)

摘要: 采用超声波破碎多食鞘氨醇杆菌细胞壁的方法提取雌二醇降解酶, 通过单因素条件研究确定各因素对超声波破碎影响的高低, 依据 Box - Benhnken 设计原则对破碎条件进行响应面回归模型分析 (RSA)。研究得到最佳条件为: 菌体浓度 188 mg/mL, 破碎功率 400 W, 总破碎时间 29 min (超声 3 s, 间隔 5 s), 认为破碎功率对超声波破碎的影响最大。预测破碎后得到的粗酶液总酶活力为 1.484 U, 实际测得的粗酶液酶活力为 1.477 U。根据试验结果认为: 采用超声波破碎方法可以较好地提取氨肽酶, 运用响应面分析法优化超声波破碎条件是可行的。

关键词: ED4 菌株; 超声波破碎; E2 降解酶

中图分类号: Q814.1; X172 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)04-0310-04

近年来, 甾体雌激素因其对生物体内分泌系统产生的种种不利影响而引起人们的广泛关注^[1-3]。甾体雌激素是一种环境内分泌干扰物质 (endocrine - disrupting compounds, EDCs), 是指能够进入生物体内的外源性物质, 可干扰生物体内天然激素的产生、释放、代谢、交互作用, 从而对生物体正常的体内激素平衡、代谢生长和行为产生干扰作用^[4]。 17β -雌二醇 (E2) 被认为是最具潜在影响、作用最强烈且在水环境中普遍存在的一种甾体雌激素, 当其质量浓度低至

ng/L 级时仍可对水生生物繁殖、生态安全乃至人类健康造成极大的潜在威胁^[5-6]。目前雌激素污染的生物修复主要通过从被污染的土壤与水质中分离筛选降解菌, 再将其用于雌激素的生物降解、修复^[7-12]。本研究采用超声波破碎 E2 降解菌细胞壁的方法提取 E2 降解酶, 通过单因素条件研究、响应面分析优化超声波破碎的最佳条件, 旨在为 E2 降解酶的研究和 E2 降解途径的建立奠定初步的研究基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验菌株: 多食鞘氨醇杆菌 (*Sphingobacterium multivolum*) ED4, 能高效降解 17β -雌二醇, 由笔者所在实验室分离获得。

试验药品: 17β -雌二醇 (17β -estradiol, E2), 纯度 > 98%, 购自美国 Sigma。

补偿的示范基地, 实施农业生态补偿教育培训项目, 强化农业生态补偿宣传教育, 夯实农业生态补偿实施的社会基础。

参考文献:

- [1] 高尚宾, 张克强, 方 放, 等. 农业可持续发展与生态补偿——中国 - 欧盟农业生态补偿的理论与实践 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2011.
- [2] 中国环境与发展国际合作委员会生态补偿机制课题组. 中国生态补偿机制与政策研究 [M]. 北京: 科学出版社, 2007.
- [3] 刘华周, 亢志华, 陈海霞. 富营养化水体治理生态补偿机制的建立 [J]. 江苏农业学报, 2011, 27(4): 899-902.
- [4] 赵 润, 张克强, 杨 鹏, 等. 我国畜禽废弃物管理的生态补偿研究 [J]. 江苏农业科学, 2011, 39(4): 423-427.
- [5] 朱丽娜, 姜 海, 诸东海, 等. 分散养殖污染治理中政府定位及公共服务供给研究 [J]. 农业环境与发展, 2013(2): 7-10.
- [6] 王子臣, 沈建宁, 管永祥, 等. 小型分散畜禽场粪污综合治理思路探讨——以武进区礼嘉 - 洛阳片区畜禽养殖业为例 [J]. 农业环境与发展, 2013(2): 11-14.

收稿日期: 2013-08-23

基金项目: 江苏省自然科学基金 (编号: SBK201022464)。

作者简介: 王 飞 (1988—), 女, 安徽合肥人, 硕士研究生, 研究方向为微生物学。E-mail: wang576180559@126.com。

通信作者: 张 丽, 女, 硕士, 副教授, 研究方向为生物化工。E-mail: njust_zhangli@163.com。

源、运行机制、绩效评价等关键问题, 为国家和省级层面制定推广农业生态补偿制度提供参考依据。

4.3 建立多元化农业生态补偿途径, 形成高效率的农业生态补偿机制

应区分不同类型农业生态服务功能, 相应地建立政府购买与奖励、市场运作相结合的补偿途径, 建立各级财政资金相结合, 企业、农户与消费者分担, 多渠道融资的投入机制, 建立实物、技术、货币与政策相结合的综合性补偿形式, 拓展财政拨款、转移支付、生态项目建设、生态补偿税费征收等多样化补偿渠道。

4.4 构建农业生态补偿长效保障机制, 强化农业生态补偿宣传教育

首先, 建立农业生态补偿信息公开机制和公众参与机制, 确保农业生态补偿体系高效运作, 并接受公众监督; 其次, 建立农业生态补偿绩效考核机制, 并纳入政府工作绩效考核范畴, 明确农业生态补偿的权、责、利; 第三, 充分发挥社会服务组织作用, 减少农业生态补偿实施成本; 第四, 建立农业生态

试验仪器:超净工作台,上海新苗医疗器械制造有限公司;超声波细胞破碎仪,汕头市科毅仪器设备有限公司;HC-3518 高速冷冻离心机,科大创新股份有限公司中佳分公司;DSX-280A 手提式灭菌锅,上海申仪仪器科技有限公司;752N 分光光度计,上海精密科学仪器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 菌体制备 从 4 ℃ 冰箱中保存的 LB 斜面上挑取 ED4 菌株,连续活化 3 代,按 2% 接种量,在 30 ℃ 条件下扩大培养至对数生长期时取出,离心收集菌体沉淀(4 ℃、5 000 r/min 条件下离心 20 min);用 pH 值为 7 的磷酸缓冲溶液清洗、离心,反复洗涤后用无机盐培养基将菌液稀释到 $D_{600\text{ nm}}$ 为约 0.5 后,便制成菌悬液。

1.2.2 粗酶液的制备 将 ED4 菌种进行产酶培养 72 h 后,冰浴条件下用超声波破碎细胞,300 W 破碎 4 s,间隔 8 s,共破碎 30 min;于 10 000 r/min、4 ℃ 条件下高速离心 30 min,收集上清液即为粗酶液。

1.2.3 17β -雌二醇降解酶活力的测定方法 先向 20 mL 试管中加入 9 mL 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲溶液(含 10 mg/L 17β -雌二醇),再加入 1 mL 粗酶液,30 ℃ 水浴中反应 1 h 后加入 0.5 mL 1 mol/L 的 HCl 溶液终止酶反应。每个处理重复 2 次。在一定温度和 pH 值条件下,1 min 内减少 1 μg 17β -雌二醇所需的酶量为 1 个酶活力单位,用 U 表示^[13]。

1.2.4 超声波破碎条件的确定 首先根据单因素试验确定菌体浓度、破碎功率、破碎时间 3 个条件对超声波破碎的影响,然后按 Box-Behnken 原理设计试验,以菌体浓度、破碎功率、破碎时间为响应变量,根据单因素试验确定上下水平后,用 Design-Expert 8.0.7.1 软件进行响应面优化分析。破碎中用冰水浴冷却样品。

2 结果与分析

2.1 单因素超声波破碎条件

2.1.1 菌体浓度对超声波破碎提取 17β -雌二醇降解酶的影响 在超声波破碎功率为 300 W、超声破碎总时间为 26 min(工作时间 4 s,间隔时间 6 s)的条件下,配置 50 ~ 350 mg/mL 不同浓度的 ED4 降解菌菌体悬液进行细胞破碎。由图 1 可以看出,当菌体浓度为 200 mg/mL 时, 17β -雌二醇降解酶的酶活力最高,但是随着破碎体系中菌体浓度逐渐升高,酶活力随之降低,这可能是当菌体浓度过高时,超声波破碎难以形成空穴效应,产生的多余热量降低了破碎效率并破坏了降解酶活性。

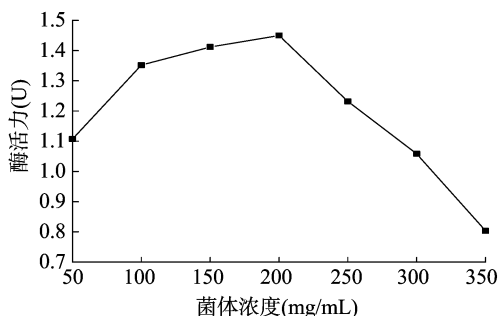


图1 菌体浓度对 17β -雌二醇降解酶活性的影响

2.1.2 破碎功率对超声波破碎提取 17β -雌二醇降解酶的

影响 当菌体悬液浓度为 200 mg/mL 时,在 100 ~ 600 W 的范围内调节超声破碎功率,破碎 26 min(工作 4 s,间隔 6 s)。图 2 结果表明,当破碎功率为 300 W 时, 17β -雌二醇降解酶的酶活力最高;随着破碎功率的不断增大,降解酶活力逐渐下降;破碎功率过低时,降解酶释放不完全而使酶活力较低;破碎功率超过最佳值时,由于超声波空化现象而导致热能增加,从而破坏了酶活性。

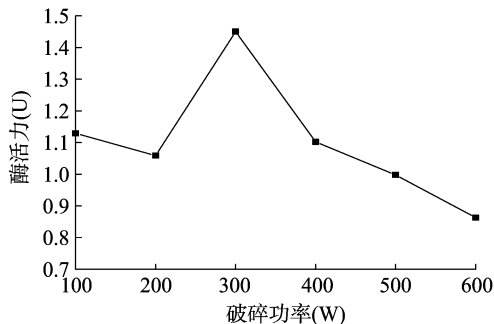


图2 破碎功率对 17β -雌二醇降解酶活性的影响

2.1.3 破碎时间对超声波破碎提取 17β -雌二醇的影响

设菌体悬液浓度为 200 mg/mL,超声破碎功率为 300 W,破碎时间分别为 5、12、19、26、33、40、47 min(工作 4 s,间隔 6 s)。图 3 结果表明,在菌体浓度和超声波破碎功率保持不变的前提下, 17β -雌二醇降解酶的酶活力在破碎时间为 26 min 时达到最大值;随着破碎时间的增加,降解酶活力呈下降趋势。可能随着时间的增加,超声产生的热量也逐渐增多,从而导致酶活力下降。

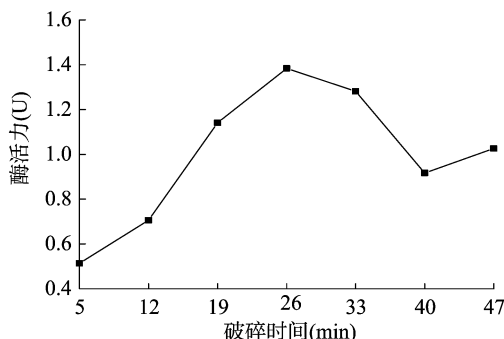


图3 破碎时间对 17β -雌二醇降解酶活性的影响

2.2 超声波提取 17β -雌二醇降解酶条件的优化

以破碎功率、菌体浓度、破碎时间为响应变量,根据单因素试验确定上下水平后,按 Box-Behnken 原理设计试验并进行优化分析。各试验组的因素水平设计见表 1,试验分组及结果见表 2。

表 1 响应面分析试验的因素水平设计

水平	因素		
	A:超声波破碎功率(W)	B:超声波破碎时间(min)	C:细胞浓度(mg/mL)
-1	200	19	150
0	300	26	200
1	400	33	250

运用 Design-Expert 8.0.7.1 软件对表 2 的数据进行回归分析,以降解酶活力(Y)为因变量,破碎功率(A)、破碎时

表 2 Box - Behnken 试验设计及结果

试验组	水平			降解酶活力 (U)
	A: 超声波破 碎功率(W)	B: 超声波破 碎时间(min)	C: 细胞浓度 (mg/mL)	
1	-1	1	0	1.028
2	0	0	0	1.432
3	1	0	1	1.329
4	1	0	-1	1.346
5	0	1	-1	1.229
6	-1	0	1	1.186
7	1	-1	0	1.159
8	0	0	0	1.452
9	1	1	0	1.392
10	0	-1	-1	0.961
11	0	0	0	1.388
12	-1	0	-1	1.216
13	0	0	0	1.429
14	0	-1	1	1.319
15	0	0	0	1.432
16	0	1	-1	1.321
17	-1	-1	0	1.274

间(B)、菌体浓度(C)为自变量,建立回归方程如下: $Y=1.43+0.065A-0.012B-3.036\times10^3C+0.12AB+3.25\times10^{-3}AC-0.17BC-0.032A^2-0.18B^2-0.13C^2$ 。式中: Y 为降解酶活力的预测值, A 、 B 、 C 分别为3个自变量的编码值。

从表3可以看出方程的总模型的 $P<0.001$,表明方程的总模型对降解酶活性的影响极其显著;其中破碎时间的二次项 $P<0.001$,表示破碎时间的二次项对降解酶活性的影响是极其显著的;同时菌体浓度的二次项 $P<0.05$,表明菌体浓度二次项对降解酶活性的影响是显著的。回归模型各项的方差分析结果表明,影响降解酶活性的各因素按影响大小排序为破碎功率>破碎时间>菌体浓度,其中破碎功率的影响达到极显著水平($P<0.001$), $R^2_{\text{adj}}=94.70\%$ (表4),失拟项为0.6661,不显著,说明回归方程拟合程度良好。

为了进一步研究相关变量间的交换作用,应用Design-Expert 8.0.7.1软件绘制响应面曲线图进行可视化分析,3组以降解酶活力为响应值的趋势图见图4至图6。用Design-Expert 8.0.7.1软件进行分析,可以求得最适的提取条件为: $A=1.00$ 、 $B=0.40$ 、 $C=-0.24$,即超声波破碎条件为功率400 W、时间29 min、菌体浓度为188 mg/mL。在此条件下进

表 3 回归方程的方差分析

项目	平方和	自由度	均方	<i>F</i>	<i>P</i>
模型	0.32	9	0.035	32.79	<0.000 1
A(功率)	0.034	1	0.034	31.51	0.000 8
B(时间)	8.016×10^{-4}	1	8.016×10^{-4}	0.74	0.417 7
C(菌体浓度)	5.161×10^{-5}	1	5.161×10^{-5}	0.048	0.833 3
A ²	3.445×10^{-3}	1	3.455×10^{-3}	3.20	0.117 0
B ²	0.11	1	0.11	104.87	<0.000 1
C ²	0.054	1	0.054	50.17	0.000 2
AB	0.057	1	0.057	53.07	0.000 2
AC	4.225×10^{-3}	1	4.225×10^{-5}	0.039	0.848 9
BC	0.065	1	0.065	59.86	0.000 1
残差	7.566×10^{-3}	7	1.081×10^{-3}		
失拟项	1.135×10^{-3}	2	5.676×10^{-4}	0.44	0.666 1
净误差	6.431×10^{-3}	5	1.286×10^{-3}		
总离差	0.33	16			

表 4 回归方程的可信度分析

项目	降解酶活力 平均值(U)	复相关系数的 平方 R^2 (%)	校正后的 R^2 (%)	Y 的变异 系数 CV
数值	1.29	97.68	94.70	2.55

行预测破碎试验,可得酶活为1.484 U,可信度为0.991。在此条件下进行验证试验,最后得到酶活为1.477 U,证明预测值与试验值基本一致。

3 结论

本试验研究了1株17β-雌二醇高效降解菌的超声破碎的优化条件。首先利用单因素试验确定了破碎时间、破碎功率、菌体浓度等最佳破碎条件,然后用中心组合设计和响应面分析法确定了影响因子的取值。优化后的破碎条件为破碎功率400 W、破碎时间29 min、菌体浓度188 mg/mL。在此破碎

条件下,降解酶酶活力为1.477 U,与预测值拟合良好,说明该模型能很好地预测实际破碎情况。

参考文献:

[1]丁小东,朱明华. 环境激素污染研究[J]. 能源环境保护,2006,20(4):13-15.
[2]Gross-Sorokin M Y, Roast S D, Brighty G C. Assessment of feminization of male fish in English rivers by the Environment Agency of England and Wales[J]. Environmental Health Perspectives, 2006, 114(Suppl 1):147-151.
[3]Johnson A C, Sumpter J P. Removal of endocrine-disrupting chemicals in activated sludge treatment works[J]. Environmental Science and Technology, 2001, 35(24):4697-4703.
[4]Kavlock R J, Daston G P, Derosa C, et al. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U. S. EPA-sponsored workshop[J]. Environmental Health Perspectives, 1996, 104(Suppl 4):715-740.

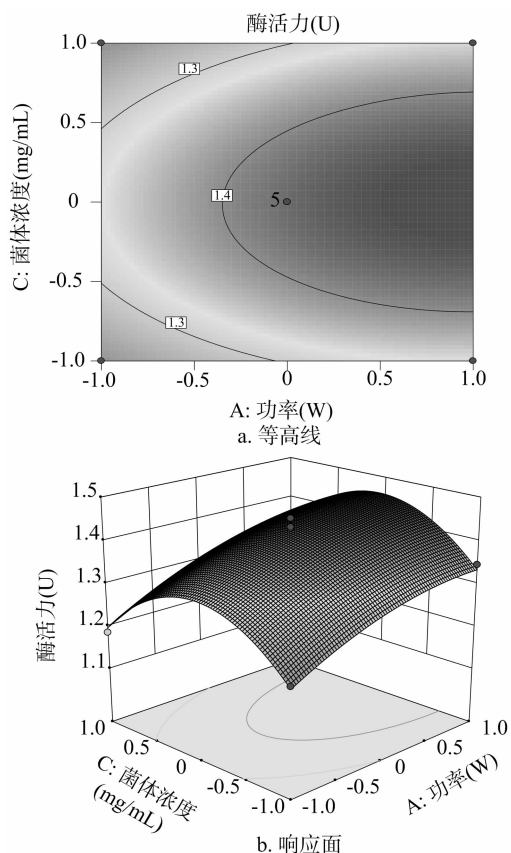


图4 菌体浓度和破碎功率交互作用的响应面与等高线

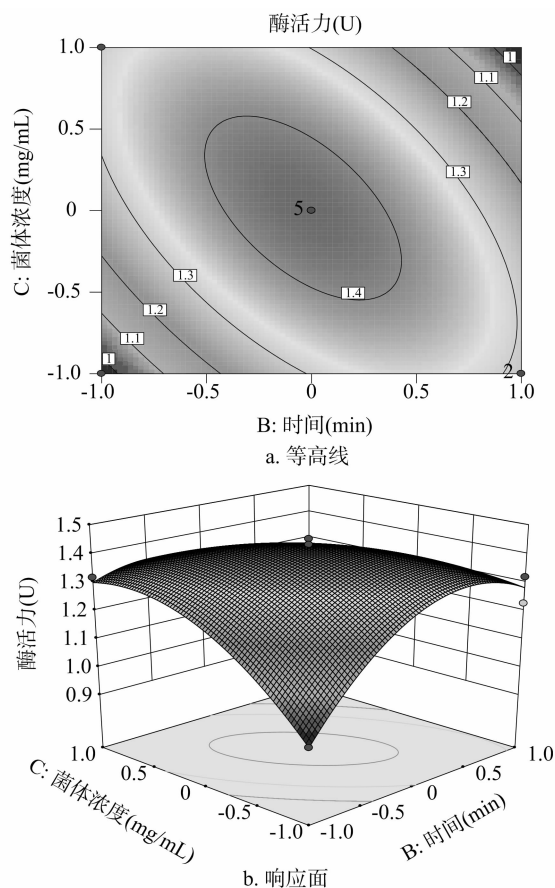


图6 菌体浓度和破碎时间交互作用的响应面与等高线

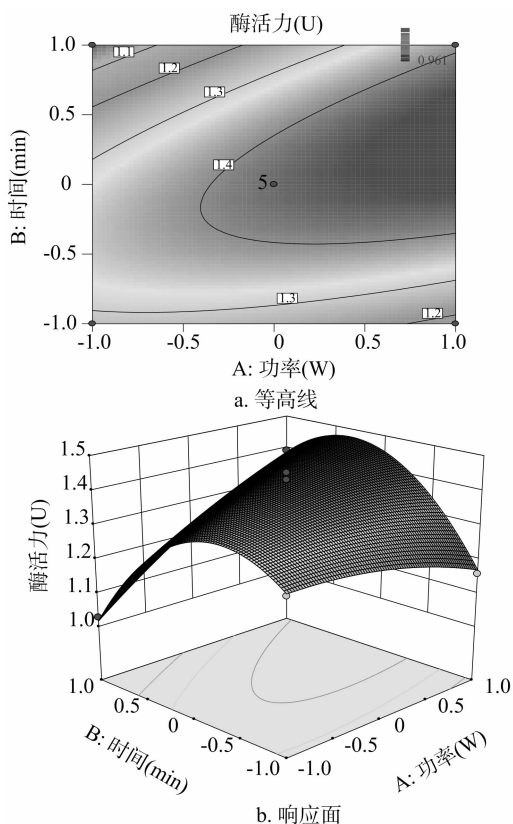


图5 破碎功率和破碎时间交互作用的响应面与等高线

- [5] 世界资源研究所, 联合国环境规划署, 联合国开发计划署, 等. 1998-99 世界资源报告: 全球环境指南 [M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1999.
- [6] Hinteman T, Schneider C, Schöler H F, et al. Field study using two immunoassays for the determination of estradiol and ethinylestradiol in the aquatic environment [J]. Water Research, 2006, 40 (12): 2287-2294.
- [7] 任海燕, 纪树兰, 刘志培, 等. 17α -乙炔基雌二醇降解菌的分离鉴定及降解特性 [J]. 环境科学, 2006, 27 (6): 1186-1190.
- [8] Haiyan R, Shulan J, Ahmad N, et al. Degradation characteristics and metabolic pathway of 17α -ethinylestradiol by *Sphingobacterium* sp. JCR5 [J]. Chemosphere, 2007, 66 (2): 340-346.
- [9] Fujii K, Kikuchi S, Satomi M, et al. Degradation of 17β -estradiol by a gram-negative bacterium isolated from activated sludge in a sewage treatment plant in Tokyo, Japan [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68 (4): 2057-2060.
- [10] Fan Z, Casey F X M, Hakk H, et al. Persistence and fate of 17β -estradiol and testosterone in agricultural soils [J]. Chemosphere, 2007, 67 (5): 886-895.
- [11] Muller M, Patureau D, Godon J J, et al. Molecular and kinetic characterization of mixed cultures degrading natural and synthetic estrogens [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 85 (3): 691-701.
- [12] Yu C P, Roh H, Chu K H. 17β -estradiol-degrading bacteria isolated from activated sludge [J]. Environmental Science & Technology, 2007, 41 (2): 486-492.
- [13] 纪建业. 脂肪酶活力测定方法的改进 [J]. 通化师范学院学报, 2005, 26 (6): 51-53.