

发光杆菌产生胶原酶及其 应用于制备胶原蛋白的研究

专 业 皮革化学与工程

硕士研究生 徐宁 指导老师 张新申教授

胶原酶是一种特异降解胶原螺旋区或明胶，而不作用于其它蛋白质底物的酶类。胶原酶可用于治疗胶原异常增生；可应用于胶原结构、生物合成的研究和胶原蛋白多肽的制备等，因此，胶原酶的研究，具有重要的理论和应用价值。在胶原蛋白和肽的制备中，由于高压、热碱和强酸等方法，具有耗时、耗能、产物分子量不易控制、腐蚀设备和使氨基酸的构型发生变化等缺陷，已逐渐被淘汰。而酶学方法制备胶原蛋白，由于生化反应条件温和、无需特殊设备、氨基酸不破坏、无消旋作用、活性收率高，且过程清洁无污染，所以具有显著的优势。但已有的报道多采用胰酶、胃蛋白酶或一些微生物蛋白酶，它们对胶原的螺旋区域作用不强，因此所有采用动物皮为原料制备胶原蛋白和肽的方案中，都必须预先对其进行热变性处理，然后再进行酶解，所得胶原蛋白多肽得活性受到很大影响。

本论文针对以上不足，从一株对动物皮有降解能力的发光杆菌 mb115 菌株出发，研究该菌的基本生理生化性质和产酶条件，优化了其培养基组成，并研究了该菌所产酶对胶原的降解条件，对所得胶原蛋白多肽的分子量和氨基酸进行了分析。

对发光杆菌 mb115 菌株形态观察和生理生化分析结果是：该菌短杆状，单个或形成短链，能运动，不产生芽孢；透射电子显微镜下观察，可以看到该菌株都有明显的鞭毛，菌长 1-1.8 μm ，宽 0.5-1 μm ；菌落呈圆形、整齐光滑、半透明；该菌可以水解淀粉，利用柠檬酸盐，但耐盐性比较差，可以利用多种糖发酵产酸，具有很好的传代稳定性。

对发光杆菌 mb115 菌株产胶原蛋白酶发酵条件的研究表明, 其产胶原蛋白酶最佳培养条件为牛肉膏 2%、蔗糖 2%、酵母粉 0.2%、CaCl₂ 0.04%、K₂HPO₄ · 3H₂O 0.25%和 NaH₂PO₄ · 2H₂O 0.05%; 最佳碳源为蔗糖, 氮源为牛肉膏, 起始 pH6.5, 摇瓶装量 10%, 发酵温度 37℃, 接种浓度 6%。

对发光杆菌 mb115 发酵液中胶原酶性质的研究表明, 该菌所产胶原酶的最适反应温度为 32℃、pH7.5, 丝氨酸蛋白酶抑制剂 PMSF 几乎不影响粗酶液的酶活, 金属蛋白酶抑制剂 EDTA、EGTA 抑制该菌产胶原酶的活性。

本论文以鲜猪皮为原料, 采用发光杆菌 mb115 所产胶原蛋白酶, 研究了制备胶原蛋白多肽的反应条件。单因素正交试验确定的最佳反应条件是: pH7.5、液比 2.5、反应时间 6h、温度 35℃、酶量 3%。SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳和氨基酸分析表明, 制备出的胶原蛋白多肽的分布主要在 6.6kD 以下, 含有 18 种氨基酸。

关键词: 发光杆菌, 发酵条件, 胶原酶, 胶原蛋白, 制备

***Photobacterium* Producing Collagenases and Their Applications in Preparation of Collagen Proteins**

Major: Leather Chemistry and Engineering

Master's Degree Candidate: Xu Ning

Supervisor: Prof. ZHANG Xin-shen

Collagenase is one kind of enzymes that can degrade native helical collagen fibrils or glutin but not degrade others proteins. Collagenase can cure exceptional hyperplasia of collagen; is used for studies of configuration, biologic synthesise of collagen and preparation of collagen and polypeptide. So the study of collagenase has important academic signification and applied value. Now the means of hot alkali, high pressure, and strong acid have be wash out gradually that are used for producing collagen and polypeptide. Because these means consume time, erode equipment and change the configuration of amino acid. Protease have be used abroad for producing collagen and polypeptide, but trypsin, pepsin and some microbial protease do not incise helix region of native collagen, that the process of producing collagen and polypeptide must have a step that materials of collagen are denaturalized by high temperature. In this way these protease can incise materials of collagen, but the bioactivity of collagen and polypeptide were impacted hugely.

Pseudomonas mbl15 was studied that had ability to degrade animal skin. The results of form observe of *Pseudomonas* mbl15 were short, bacilliform, single or rudder chain; it can move and did not come into being gemma of a fungus. it had flagellum; the long and wide of mbl15 was respectively 1-1.8 μ m and 0.5-1 μ m by TEM. The colony was round, orderliness velvet and translucence. The results of physiology and biochemistry *Pseudomonas* mbl15 showed that mbl15 can hydrolyze amylum and utilize citrate and some glucide, but it's salt endurance was weakly.

The optimal fermentation conditions for producing collagenase from *Pseudomonas mbl15* were determined by single factor analysis and orthogonal analysis and the results were as follows. The compositions of fermentation medium were: 2% beef extract, 2% sucrose, 0.20% yeast extract, 0.02% CaCl_2 , 0.25% $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0.05% $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. The optimal cultivation conditions were 37°C, inoculum 6%, initiate pH 6.5, volume of medium in bottle 10%. Properties of coarse collagenase from *mbl15* protease were studied. The optimal reaction temperature and pH value of the coarse collagenase were 32°C and 7.5. The activity of collagenase of the coarse collagenase was restrained partially by EDTA and EGTA. PMSF didn't impact enzyme activity.

Fresh pigskin was hydrolyzed applying the coarse collagenase from *mbl15*. The results showed that. Technology conditions of hydrolyzing pigskin using the coarse collagenase from *mbl15* were studied. The optimal conditions of technology conditions were as follows: temperature 35°C, liquor ratio 2.5, hydrolysis time 6h, pH 7.5, mass of enzyme 3%. Character of composition of amino acid and molecular weight of collagen proteins were analysed.

Key word: *Pseudomonas*, fermentation conditions , collagenase , collagen, preparation

1 前言

1.1 胶原酶

胶原酶 (collagenase, E.C3.4.24.3) 是一类在生理条件下只作用天然胶原螺旋区或明胶而不作用于其它蛋白底物的酶类^[1]。胶原酶在医学上可用于治疗胶原异常增生, 如腰椎间盘突出症等疾病, 也可在细胞研究中应用于分离胃肠细胞、胰岛和上皮细胞等, 还可应用于胶原结构、生物合成的研究等, 具有重要的理论研究意义和应用研究价值。它来源广泛, 多种微生物、动物的许多组织细胞(尤其在病理条件下)都可产生胶原酶^[2,3]。其中动物胶原酶可分为两类^[4-8]; 一类是间质胶原酶类, 包括成纤维细胞胶原酶 (MMP-1)、中性白细胞胶原酶 (MMP-8) 和胶原酶 (MMP-13); 另一类是IV型胶原酶, 包括 72kD IV型胶原酶和 92kD IV型胶原酶。而微生物来源的胶原酶主要是细菌胶原酶^[2, 9]。

1962年, Cross等发现动物胶原酶, 70年代, Vaes报道无活性鼠骨胶原酶可被胰蛋白酶激活, 从而能直测酶活性, 使胶原酶研究飞速发展。一般而言, 动物在正常的生理条件下胶原酶的分泌和胶原的合成呈动态平衡, 但在某些病理条件下, 胶原酶合成过多或过少, 其中, 有许多胶原酶以酶原的形式存在, 只在微生物蛋白酶的激活下才具有活性^[10, 11, 12]。动物胶原酶在组织的形态建成、血管形成和组织修复等结缔组织生理过程, 对胞外基质的控制降解具有重要的意义, 反之, 在某些病理过程中如细胞凋亡、类风湿性关节炎、牙周炎、肿瘤细胞的浸润和转移等, 对组织的过度降解也十分重要^[13, 14, 15]。

对微生物胶原酶的研究比对动物来源胶原酶研究早, 它主要是由致病细菌产生。最早对微生物来源胶原酶研究的是溶组织梭状芽孢杆菌胶原酶^[16], 现已有临床应用。细菌来源胶原酶不同于动物胶原酶^[17], 主要在于: (1) 底物种类不同。梭菌胶原酶除 7S 不能降解外, 几乎能以同样的速度降解 5 种类型 (I-V 型) 的胶原且对动物胶原酶不能降解的 IV、V 型也能轻易降解; (2) 裂解方式不同。梭菌胶原酶可作用于胶原的多个位点, 产生平均只有 5 个残基的小分子短肽, 而动物胶原酶作用于胶原 N 端 3、4 处 Gly-Leu 或 Gly-Ile 肽键, 产生一个 3、4 片段和 1/4 片段, 分别命名为 TC^A 和 TC^S; (3) 获得的难易不同。因梭菌胶原酶可分泌到胞外, 通过发酵可大量获得, 而动物胶原酶需组织培养和提取, 较难获得; (4) 潜在的降解胶原能力不同。梭菌胶原酶具有更高的活性。因而, 微生物来源的胶原酶在应用方面具有更广的应用范围。

近几十年来,随着对微生物胶原酶研究的不断深入,大量新来源胶原酶产生菌及其生化遗传特性被报道^[18-22]。金敏筛选出产胶原蛋白酶的地衣芽孢杆菌^[23],该菌产酶的最适碳源为蔗糖,氮源为明胶,起始 pH 为 7.5,容瓶装量为 10ml,种龄是 24h,接种量为 6%。在此条件下,摇瓶振荡发酵后,酶活达 25U/ml 发酵液,较原发酵培养基发酵后的酶活提高 35%。随着生物技术的不断发展,人们利用基因工程技术改造和克隆菌株,已提高菌株的产酶活力和胶原酶的纯度^[24,25]。目前,商品化开发的微生物胶原酶主要是 *Chistolyticum* 和 *V.alginolyticus* 胶原酶。

1.2 产胶原酶的主要微生物及相应胶原酶的性质

微生物胶原酶来源广泛,近年来的研究表明:许多人体致病菌都是包括降解胶原等酶类的产生菌,它们涉及的疾病均与宿主组织内胶原等大分子的水解有关,这些致病主要发生在软组织和肌肉、口腔、皮肤、中央神经系统、羊膜等处^[3]。另外,还有许多土壤、皮毛、海水来源的微生物都能产生胶原酶^[26,27,28]。

1.2.1 梭菌

梭菌胶原酶最早被鉴定,并被研究的。产胶原酶的梭菌很多,如 *C.histolyticum*、*C.perfringens*、*C.capito* 等,其中, *C.histolyticum* 和 *C.perfriengens* 研究较为透彻。

C.histolyticum 是引起肌肉坏死的致病梭菌,它产生的胞外胶原酶是 1938 年 Maschmann 等首先研究的^[22],由于其重要的应有价值,有关研究日益增多(曾被命名为 chostridiopeptidaseA、collagenaseA 等)。*C.Histolyticum* 严格的厌氧,一般而言,产胶原酶的 *C.histolyticum* 生长在 Handl 和 Howes 或 Warren 等研究的条件之下^[29,30],而在培养基中添加巯基乙酸钠,提供还原环境,更有利于胶原酶的生产^[31]。对其产生的胶原酶的种类,由于分离纯化的纯度、可能的自动降解及命名的不同,报道不尽相同^[32-37]。

C.hiltolyticum 胶原酶的生化性质已被深入研究^[38-40]。研究表明:它有多种形式,分子量也各不相同,经 SDS-聚丙烯酰胺电泳达同质性后,测得它们的分子量为 68kD-125KD,其中, α 为 68kD、 β 115kD、 γ 79kD、 δ 100kD、 ϵ 110kD、 ζ 125KD; 等电点是 5.35-6.20,而胶原酶 α 、 γ 的亚种 α_1 、 α_2 和 γ_1 、 γ_2 的等电点

不同但分子量相同。不同的研究者采用不同的方法、不同底物在 *Cl.histolyticum* 中检测到胶原蛋白酶的种类并不相同,可能数目为 2~6 种不同的胶原蛋白酶^[41-45]。因此, *Cl.histolyticum* 产生的胶原蛋白酶命名也是非常混乱的,如 A、B、C, 或者 α 、 β 、 γ 等。

Michael 等人 1984 年以 FLGPA、FALGPP 和胶原为底物,采用放射性标记的酶活检测办法,通过分子筛层析、亲和层析等步骤,对 *Cl.histolyticum* 产生的胶原蛋白酶进行了深入的研究,按照其分离顺序,获得 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 和 ζ 等 6 种不同的胶原蛋白酶。它们分子量大小不同,性质上具有相似性,即能水解胶原、明胶和合成多肽,对明胶的活性是对胶原活性的 5-10 倍,对弹性蛋白、酪素等蛋白质没有活性或者活性很低。根据它们对可溶性胶原和合成多肽 FALGPA 的酶活强弱,分为 2 类: I 型胶原蛋白酶具有较高的胶原酶活性和适中的 FALGPA 水解性, II 型胶原蛋白酶有较高的多肽水解性和适中的胶原酶活性

1.2.2 弧菌

弧菌来源的胶原蛋白酶是另一类研究得较为深入的胶原蛋白酶。产生胶原蛋白酶的弧菌种类也很多,包括: *V.alginolyticus*、*V.barveyi* (*V. B-30*)、*V.parahaemolyticus*、*V.vulnificus*、*V.cholerae* 等, *V.alginolyticus* 和 *V.barveyi* 的研究相对较多。

溶藻弧菌 (*V.alginolyticus*) 是筛选自腐烂毛皮的革兰氏阴性需氧菌,具有耐盐、胶原酶活性高的特点,最初被鉴定为解毒无色杆菌 (*Achromobacter iophagus*)^[46]。最初的研究认为解毒无色杆菌是非致病菌,其产生胶原蛋白酶的研究价值可能超过梭菌来源的胶原蛋白酶。后来的研究表明,溶藻弧菌可能引起腹泻和食物中毒,是一种致泻弧菌。

溶藻弧菌胶原蛋白酶在 15-35℃、0.85-10% NaCl、pH6.4-8 的条件下,存在诱导物时可以产生。溶藻弧菌胶原蛋白酶的诱导物可以是胶原、胶原分子片段或者分子量 1kD~60kD 的蛋白胨。研究表明,利用纯化的溶藻弧菌胶原蛋白酶降解蛋白胨诱导物后,能显著降低诱导物的诱导能力;而用胰蛋白酶降解蛋白胨诱导物,则不对诱导物的诱导能力产生影响。说明在诱导过程中,起到诱导作用的是胶原蛋白酶敏感的肽键^[47, 48]。

Welton 等和 Keil 等分别从溶藻弧菌培养物上清液中获得分子量为 112kD 和 104kD 的胶原蛋白酶,可能是同一种蛋白酶。纯化的溶藻弧菌 104kD 胶原蛋白酶能够发生自催化降解作用,产生至少 3 种不同大小、有活性的胶原蛋白酶形式,它们都可以作用于活性胶原和合成多肽。对其中活性最高的组分研究表明,其最适反应 pH 为 8.5;分子量为 70kD,由 2 个分子量为 35kD 的亚基组成,单独的亚基组分没有胶原蛋白酶活性;2 个亚基 N 末端测序结果相同。第二种活性形式的分子量为 80kD,由 2 个分子量为 35kD 的亚基非共价结合 1 个分子量为 5kD 的多肽组成。这两种活性形式的亚基氨基酸组成是相同的。第三种活性形式大小与原酶接近,没有详细的研究结果^[49]。

Keil 比较了来自溶藻弧菌、溶组织梭菌、冠状虫霉(*Entomophthora coronata*, 一种真菌)和纹皮蝇(*Hypoderma lineatum*, 一种昆虫)的胶原蛋白酶,发现来自溶藻弧菌的胶原蛋白酶活性最高^[50]。溶藻弧菌和溶组织梭菌的胶原蛋白酶都是 Zn 金属蛋白酶,作用于活性胶原时,都是从胶原螺旋区的中间部分开始切割,而不是从末端;溶藻弧菌优先作用于 33-34 和 41-42 两个位点,这与动物胶原酶的作用于 41-42 位点类似,而与溶组织梭菌的胶原蛋白酶不同^[51]。

Nguyen 等人通过 HPLC 方法在溶藻弧菌分离到 2 种不同的胶原蛋白酶,其中一种命名为 collagenase A 与上述相同;另外一种命名为 collagenase B,分子量为 320kD,作用于胶原活性是 collagenase A 的 2 倍,不能水解合成多肽。这 2 种胶原蛋白酶都被 EDTA 抑制,属于金属蛋白酶。免疫学反应表明, collagenase B 与动物胶原酶有免疫学关系,这是唯一的一例细菌胶原蛋白酶与动物胶原酶有免疫学反应的报道^[52]。

来自 *V.barveyi* (V. B-30)的胶原蛋白酶也有一定的研究。Merkel JR 等人利用重组胶原平板(reconstituted collagen)的方法,从海水中分离到具有胶原蛋白酶活性的 *V.barveyi* 菌株,该菌株被认为是非致病菌株,其胶原蛋白酶的产生受胶原类物质的诱导^[53, 54]。

1.2.3 类菌体

类菌体胶原蛋白酶的研究与牙周疾病相关。牙周表皮层含胶原组织的降解通常会导致牙周袋的形成。牙周袋的含氧水平低于口腔中其他部分,容易导致厌氧生物的生长,最终产生牙周炎,其特点就是牙龈组织胶原纤维含量降低和

牙槽骨的破坏。临床分离了很多导致牙周炎产生的厌氧细菌,如 *Porphyromonas asaccharolytica*、*P.gingivalis*、*P.endodontalis*、*Prevotella intermedia* 和 *P.melaninogenica* 等,胶原酶活性测定表明这些菌株都能产生具有胶原蛋白酶活性的蛋白酶^[55]。*P.gingivalis* 是最常见的菌株,可以产生具有多种底物活性的蛋白酶,因而受到人们的关注。

1.3 胶原酶的应用

1.3.1 腰椎间盘突出症的治疗

1973年,美国仪器和药物管理局考虑允许胶原酶在 Knoll 医药公司及其加拿大子公司投产,国内上海医药工业研究院由溶组织梭状芽孢杆菌中制备胶原酶的冻干制品,已用于临床。

至今,胶原酶治疗腰间盘突出症已广泛用于临床^[56-58]。它利用胶原酶对胶原有特异的降解作用,使它溶解髓核中的胶原蛋白。将胶原酶注入硬膜外前间隙,敷于突出的核髓表面(目的是有利于吸收),破坏胶原蛋白的螺旋结构,作用于三条-肽链距C端1/4处,将其水解成两个片段,成为变形胶原而被水解吸收,最终使髓核变软、变小,使受压的神经根得以松懈。胶原酶旁路注射手术费用便宜,操作简便,疗效满意,是治疗腰间盘突出症的最佳方法之一。

1.3.2 预防和治疗瘢痕疙瘩^[59, 60]

瘢痕的形成机制目前尚不完全清楚,一般认为它的形成是由于机体炎症反应、胶原的合成与降解不平衡、异常粘多糖的出现及肌成纤维细胞的增生所制。

胶原酶可促进烧伤等各种伤口愈合,有效预防和治疗瘢痕疙瘩。瘢痕组织在病理学上是一种血液循环不良、结构异常、神经分布错乱的不健全组织,其基质为增厚的结缔组织,主要是胶原纤维、弹力纤维,表层为菲薄的上皮结构,仅由几层上皮细胞组成,称为瘢痕上皮,无毛囊、腺体等皮肤附属结构和真皮乳头。

1.3.3 治疗杜普伊特伦病^[61]

杜普伊特伦病是一种手指向手掌的手畸形,往往导致手的功能性残废。通过对22例病情严重的需要进行外科手术的杜普伊特伦病患者注射胶原酶后,在

短期随访中，85%的受治手指有肯定疗效，且比传统的手术疗法更安全更有效，目前，其一期临床正在研究之中。

1.3.4 在细胞分离上的应用

来源于溶组织梭菌的胶原蛋白酶已经作为一个常用的细胞学研究的工具，在细胞分离和器官分离中特别是胰岛的分离中广泛应用。利用胶原蛋白酶作为细胞分散剂处理含有大量胶原成分的器官时，获得的各种类型的细胞不仅保存完整的功能和形状，而且细胞存活率高。Stefanov 等人研究了细菌胶原蛋白酶分离不同来源的滋养层细胞的效果^[62]；Klock 等人将商业化溶组织梭菌胶原蛋白酶的粗酶纯化后，成功分离了用于糖尿病研究的猪的胰岛^[63]；利用细菌胶原蛋白酶分离人的胰岛也有研究报道^[64, 65]。

1.3.5 在食品工艺中的应用

细菌胶原蛋白酶降解胶原的能力可能应用于食品工艺。Rodrigues-Szulc 等用细菌胶原蛋白酶处理牛肉的结缔组织，快速有效地去除了牢固附着在牛肉上的细菌；用胶原蛋白酶处理肉制品可以使其嫩化，在食品工艺中可能具有重要的应用价值^[66]。

1.4 胶原蛋白的制备研究进展

近年来，天然类蛋白质和肽的研究进展迅速，以及人们自身对纯天然产物需求的不断增加，纯天然性已经成了人们追求时尚，各种以纯天然动植物为原料的产品也应运而生。

动物皮中的胶原作为一大类蛋白质，在生物体内起着重要作用。人们在探讨胶原的化学、物理、生物学特性的过程中逐渐认识和开辟着胶原广泛应用的新领域，以求开发具有高附加值的胶原新产品，尤其当人们认识到天然活性胶原蛋白和肽具有其它高分子材料无可比拟的高的生物相容性和强的生物降解性时，更加意识到天然活性胶原蛋白和肽作为生物材料在医药、食品和美容护肤品等工业中的重要性。

用生物化学的方法来处理含胶原的原料是美国和日本工作者首先发展起来的^[67, 68]。国外较详细的研究酶法制胶始于 1962 年，以追求胶原在酶作用下易

于溶解且有较高的回收率为目标，他们研究的对象主要是牛皮，且所使用的酶大多是胃蛋白酶，胰蛋白酶、无花果蛋白酶、菠萝蛋白酶以及通常筛选菌种获得的对胶原蛋白具有高活力的酸性微生物蛋白酶等。

国内关于酶解制胶的研究起步较晚，虽然在这方面的研究也取得了一些进展，但仍未实现工业化，这主要与原料的预处理及生产过程的控制有关。另外，使用动物性蛋白酶，使得产品的成本提高也是一大障碍。

国内外有关胶原蛋白的提取从原料上划分主要有 3 种：

(1) 以动物的骨、腱、尾等组织为原料：余海等^[69]报道了用 0.5M 乙酸 400ml，在 4℃ 下提取 4 天，从小鼠尾肌腱提取胶原的方法。李斯明^[70]等采取酸性条件下的胃蛋白酶酶解方法，从新鲜猪关节软骨制备出高纯度的 II 型胶原。这些方法^[71-73]都可以获得比较高纯度的胶原，但原料有限，成本高，主要用于科学研究。

(2) 以制革工业中的皮边角料为原料：我国是制革大国，制革废弃物产量巨大，利用皮边角废料制取胶原蛋白可解决制革业的污染，浪费问题，又将废弃物转化利用^[74-77]。制革中的废料大多经过酸碱的长时间浸泡，少量的经过鞣制，所以皮中胶原蛋白的结构已发生不可逆的改变，大大影响了胶原蛋白的品质。

(3) 以资源丰富的动物鲜皮为原料：以我国资源丰富的猪皮，羊皮，牛皮为原料，提取胶原蛋白。赵胜年^[78]报导了以新鲜猪皮为原料，用国产胰酶进行酶水解反应，提取水解胶原蛋白的工艺技术。李开雄等^[79]报道了胶原蛋白的制备采用酸提和盐提方法。德国人 Meyer 等将^[80]干牛皮经碾磨后，在一定的湿度和温度下，经搅拌制备出胶原蛋白。因为以动物的鲜皮为原料，只要采取适当的提取工艺，可以最大限度的保持胶原蛋白的天然结构，且可以实现大规模生产。

在制备方法上，现在已经逐渐淘汰采用高压^[75]、热碱^[76]、强酸^[81]的方法，因为这些方法耗时、耗能、产物分子量不易控制，腐蚀设备，使氨基酸的构型发生变化。酶法提取胶原蛋白可以弥补上述方法的缺点，酶水解条件温和，无需特殊设备，氨基酸不破坏，无消旋作用，收率高，清洁无污染。现在的报道多采用胰酶、胃蛋白酶^[82]或其它单一酶制剂^[73]。使的胶原蛋白产物结构受到限制，且由于胶原特殊的空间结构，一般酶作用专一性不强。

1.5 本论文研究主要研究内容

胶原酶 (collagenase, E.C3.4.24.3) 是一类在生理条件下只作用天然胶原螺旋区或明胶而不作用于其它蛋白质底物的酶类。胶原酶在医学上可用于治疗胶原异常增生, 如腰椎间盘突出症等疾病, 也可在细胞研究中应用于分离胃肠细胞、胰岛和上皮细胞等, 还可应用于胶原结构、生物合成的研究等, 具有重要的理论研究意义和应用研究价值。

在胶原蛋白和肽的制备中, 由于高压、热碱和强酸等方法, 具有耗时、耗能、产物分子量不易控制、腐蚀设备和使氨基酸的构型发生变化等缺陷, 已逐渐被淘汰。而酶学方法制备胶原蛋白, 由于生化反应条件温和、无需特殊设备、氨基酸不破坏、无消旋作用、活性收率高, 且过程清洁无污染, 所以具有显著的优势。但已有的报道多采用胰酶、胃蛋白酶或一些微生物蛋白酶, 它们对胶原的螺旋区域作用不强, 因此所有采用动物皮为原料制备胶原蛋白和肽的方案中, 都必须预先对其进行热变性处理, 然后再进行酶解, 所得胶原蛋白多肽得活性受到很大影响。

因为胶原蛋白酶是专一降解胶原的蛋白酶, 不需要对胶原进行变性, 就可以在温和的条件下降解胶原, 且可以保持胶原蛋白和肽的天然结构。本论文从一株对动物皮有降解能力的发光杆菌 mb115 菌株出发, 研究该菌的基本生理生化性质和产酶条件, 优化其培养基组成, 并研究其酶对胶原的降解条件, 对所得胶原蛋白多肽的分子量和氨基酸进行了分析。

2 胶原酶产生菌株生理生化性质的研究

2.1 引言

胶原酶 (collagenase) 作为一种内肽酶它在一定 pH 和温度等条件下能切开天然胶原的三股螺旋结构,^[1] 进一步的研究证实, 胶原酶能够水解含—Pro—X—Gly—Pro 氨基酸序列的多肽和蛋白质, 它的作用位点在 Gly 残基的 N 端, 产生—Pro—X 和 Gly—Pro— (Pro 和 Gly 分别代表脯氨酸和甘氨酸, X 代表各种氨基酸)。

胶原酶来源广泛, 多种微生物、动物的许多组织细胞 (尤其在病理条件下) 都可产生胶原酶^[2, 3]。其中动物胶原酶可分为两类^[4-8]: 一类是间质胶原酶类, 包括成纤维细胞胶原酶 (MMP-1)、中性白细胞胶原酶 (MMP-8) 和胶原酶 (MMP-13); 另一类是 IV 型胶原酶, 包括 72kD IV 型胶原酶和 92kD IV 型胶原酶。而微生物来源的胶原酶主要是细菌胶原酶^[2, 9]。

对微生物胶原酶的研究比对动物来源胶原酶研究早, 它主要是由致病细菌产生。最早对微生物来源胶原酶研究的是溶组织梭状芽孢杆菌胶原酶^[16], 现已有临床应用。细菌来源胶原酶不同于动物胶原酶^[17], 主要在于: (1) 底物种类不同。梭菌胶原酶除 7S 不能降解外, 几乎能以同样的速度降解 5 种类型 (I-V 型) 的胶原且对动物胶原酶不能降解的 IV、V 型也能轻易降解; (2) 裂解方式不同。梭菌胶原酶可作用于胶原的多个位点, 产生平均只有 5 个残基的小分子短肽, 而动物胶原酶作用于胶原 N 端 3、4 处 Gly-Leu 或 Gly-Ile 肽键, 产生一个 3、4 片段和 1/4 片段, 分别命名为 TC^A 和 TC⁸; (3) 获得的难易不同。因梭菌胶原酶可分泌到胞外, 通过发酵可大量获得, 而动物胶原酶需组织培养和提取, 较难获得; (4) 潜在的降解胶原能力不同。梭菌胶原酶具有更高的活性。因而, 微生物来源的胶原酶在应用方面具有更广的应用范围。

本文从一株对皮胶原有降解作用的发光杆菌菌株 mbl15 出发, 研究了该菌的菌落特征, 生理生化特征等。

2.2 材料和方法

2.2.1 菌株

发光杆菌 mbl15 (*Photobacterium*) 四川大学分子生物学与生物技术重点实验室提供。

2.2.2 主要仪器和试剂

胰蛋白胨 (Tryptone), 酵母膏 (Yeast Extract) Oxoid 原装

I 型胶原(insoluble)来自牛跟腱 Sigma 公司

其它试剂均为国产试剂

HZQ-X100 振荡培养箱 哈尔滨东联电子技术开发有限公司

HPS-160 生化培养箱 同上

UV-265 型全自动可见紫外分光光度计 日本岛津公司

光学显微镜 日本奥林巴斯

HITACHI-450 扫描电镜 日本 HITACHI

2.2.3 培养基^[83]

牛肉膏 0.3%, NaCl 0.5%, 蛋白胨 1% pH7.0-7.2

2.2.4 酶活测定方法^[23, 84, 85]

以 I 型胶原为底物, 反应体系为: 1mg I 型胶原, 0.1mol/L, pH7.5 Tris · HCl (含 10mmol CaCl₂) 0.5ml, 离心后发酵液 0.1ml, 37℃ 反应 20min, 加入等体积 10%三氯乙酸终止反应。茚三酮显色法测定反应所释放的水溶性氨基酸、短肽, 以甘氨酸显色制定标准曲线。酶活力单位定义为: 在 37℃, pH7.5 条件下, 每分钟水解胶原产生相当于 1 μg 甘氨酸的酶量为 1 个酶活力单位(U)。

2.2.5 甘氨酸标准曲线的建立

试剂: 0.3mmol 甘氨酸溶液

还原茚三酮: 1.取 5g 水合茚三酮, 用 125ml 100℃蒸馏水溶解, 形成黄色溶液。2.将 5g 抗坏血酸用 250ml 蒸馏水溶解, 在电磁搅拌下将抗坏血酸溶液加到茚三酮溶液中, 不断有沉淀出现,

3.滴加完后在室温下继续搅拌 15 分钟,冰箱内冷却,过滤,沉淀用冷水洗涤 3 次,真空干燥。

茚三酮显色液:取 85mg 水合茚三酮和 15mg 还原茚三酮用 10ml 乙二醇甲醚溶解。

2mol/L pH5.4 的乙酸缓冲溶液:86mL 2mol/L 乙酸钠加入 14ml 2mol/L 乙酸,混匀。

方法:取 14 只试管分成两组,分别加入 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0ml 0.3mmol/L 标准甘氨酸溶液,用水补足到 1ml。1ml 含 0.03~0.3 $\mu\text{mol/L}$ 的甘氨酸溶液与 1ml 2mol/L pH5.4 的乙酸缓冲液充分混合,然后加入 1ml 茚三酮显色液,充分混合,用试管盖盖住,在 100℃水浴中加热 15min,用自来水冷却,放置 5~10min,加入 3ml 60%乙醇稀释,于 570nm 出比色。以 1ml 水代替甘氨酸作空白。

2.2.6 发光杆菌 mb115 生理生化性质测定^[96]

2.2.6.1 革兰氏染色

试剂:结晶紫液(赫克尔 Hucker 的配方)

甲液:结晶紫 2g, 乙醇(95%) 20ml;

乙液:草酸铵 0.8g, 蒸馏水 80ml

将甲、乙两液相混合,静置 48h 后使用。

卢哥尔(Lugol)氏碘液

碘片 1g, KI 2g, 蒸馏水 300ml

0.5%蕃红水溶液

蕃红 0.5, 乙醇液(2.5%) 20ml, 蒸馏水 80ml

挑少许经 18~24h 培养的菌株,待测菌株和枯草杆菌分别涂在玻片上的左中右三小滴水中,火焰固定,滴加结晶紫初染 1~1.5min,加卢哥氏染液 1~2min,水洗,95%乙醇脱色 20sec,加蕃红液复染 1min,水洗,吸干。菌体红色为革兰氏染色阴性,蓝紫色为革兰氏染色阳性。

2.2.6.2 鞭毛染色(银染法)

a.染液

甲液：丹宁酸	5g	FeCl ₃	1.5g
甲醛(15%)	2.0ml	NaOH(1%)	1.0ml
蒸馏水	100ml		
乙液：AgNO ₃	2g	蒸馏水	100ml

将 AgNO₃ 溶解后，取出 10ml 备用，向其余的 90ml AgNO₃ 液中慢慢滴入浓氢氧化铵，则形成很浓厚的沉淀，再继续滴加氢氧化铵并不断振摇溶液到刚刚溶解沉淀成为澄清溶液为止。再将备用的 AgNO₃ 慢慢回滴，则出现薄雾，但轻轻摇动后，薄雾状的沉淀又消失，再继续滴入 AgNO₃，直至摇动后仍呈现轻微而稳定的薄雾状沉淀为止。如雾重，则银盐沉淀出，不宜使用。

b. 载玻片的准备

将新的玻片插在专用金属架上，浸入洗液中 3~5d。使用前取出玻片，用水冲去洗液，再用蒸馏水洗。放入 95%乙醇中脱水。取出玻片，在火焰上燃烧掉酒精，立即使用。

c. 菌液制备及涂片

用于鞭毛染色的菌种应预先连续在新制备的斜面接种 2~3 代后再使用。将待测定的菌株接种在普通肉汤培养基斜面上于 37℃ 培养 12~15h，用接种环挑取斜面上少许菌苔，在载玻片的水滴中轻沾几下，将玻片稍倾斜，使菌液随水滴缓慢流到另一端，然后平放在空气中干燥。

d. 染色

滴加甲液染 3~5min，用蒸馏水冲洗。将乙液冲去残水后，加乙液染 30~60sec，并在小火稍加热，使其冒蒸汽而染液不干，然后用蒸馏水冲洗。风干，镜检。

2.2.6.3 芽孢染色

将新鲜培养的菌体按常规方法制片后，滴加饱和的孔雀绿水溶液（约为 7.6%），用微火加热至染料冒蒸汽并维持 5min。加热过程中随时添加染色液。用自来水冲洗，在以 0.5%沙黄液复染 1min，水洗、吸干、镜检。芽孢呈绿色，菌体和芽孢囊呈微红色。

2.2.6.4 荚膜染色（湿墨汁法）

加一滴墨汁于干净的载玻片上，并挑少量菌与其充分混匀。放一清洁盖玻片于混合液上，然后在盖玻片上放一张滤纸，向下轻压吸收多余菌液。显微镜下可见：背景灰色，菌体较暗，在其周围呈现一明亮的透明圈，即是荚膜。

2.2.6.5 过氧化氢酶的测定

从普通牛肉膏培养基下面挑一环菌，涂在干净的载玻片上，滴加 10% 的过氧化氢，有气泡产生者为阳性。

2.2.6.6 甲基乙酰甲醇试验 (V.P 试验)

培养基(1000mL): 蛋白胨 5g, 葡萄糖 5g

NaCl 5g, pH7.0-7.2

分装试管, 每管约 4~5ml

将带测菌株接种于上述培养基中, 37℃培养 4~6d。取培养液约 2ml 和等量的 40% NaOH (或 KOH) 相混合, 加入少量 (约 0.5~1.0mg) 肌酸, 充分震荡 2~5min 后, 如培养液出现红色, 即为 V.P 阳性。培养 7d 后, 测定培养液的 pH 值, 填入 V.P 中的 pH 项内。

2.2.6.7 淀粉水解

培养基: 普通肉汤培养基 + 0.2%可溶性淀粉

将培养基制成平板, 菌体点种在平板上, 37℃培养 2~4d, 形成菌落后, 在平板上滴加卢哥尔氏碘液, 以铺满菌落周围为适, 平板呈蓝色, 而菌落周围如有无色透明圈出现, 说明淀粉被水解, 透明圈的大小, 说明水解淀粉能力的大小。

2.2.6.8 酪素水解

牛奶平板的制备: 取 5g 脱脂奶粉加入 50ml 蒸馏水中, 另称 1.5g 琼脂溶于 50ml 蒸馏水中, 将两液分开灭菌, 待冷至 45~50℃时, 将两液混匀倒平板, 即成。

将菌种点种于牛奶平板上, 37℃培养, 观察有无透明圈产生。

2.2.6.9 硝酸盐还原试验

培养基：普通肉汤培养液 + 0.1% KNO₃

试剂：格里斯氏(Griess)试剂

A 液：对氨基苯磺酸 0.5g 稀醋酸(10%) 150ml

B 液：α-萘胺 0.1g 稀醋酸(10%) 150ml

蒸馏水 20ml

二苯胺试剂：0.5g 二苯胺溶于 100ml 浓硫酸中，用 20ml 蒸馏水稀释。

将带测菌种接种于硝酸盐液体培养基中（需做不接种的对照管），37℃培养 1、3、5d。取 2 支干净的试管倒入少许培养液，然后在其中分别各加 1 滴试剂 A 液和 B 液，在对照管中同样加试剂，当培养液变为粉红色、玫瑰红色、橙色或棕色等时，表示有亚硝酸盐存在，为硝酸盐还原阳性。如无红色出现，则可加 1~2 滴二苯胺试剂，此时培养液如呈蓝色，则表示仍有硝酸盐存在。

2.2.6.10 柠檬酸盐或丙酸盐的利用

培养基(1000ml)

柠檬酸钠（或丙酸钠） 2g NaCl 5g

MgSO₄ · 7H₂O 0.2g (NH₄)₂HPO₄ 1g

1%溴百里酚蓝水溶液(指示剂) 10ml

K₂HPO₄ · 3H₂O 1g 琼脂 20g

以上成分除指示剂外加热溶解，调节 pH6.8-6.9，再加入指示剂。培养基分装试管，灭菌后摆成斜面备用。

取幼龄菌种接种于斜面上，37℃培养 3~7d，培养基呈蓝色者为阳性反应，不变者则为阴性。

2.2.6.11 对溶菌酶抗性的测定

在 100ml 的三角瓶中，放入 60~65ml 无菌的 0.01mol/L HCl，在其中加入 0.1g 溶菌酶，瓶上塞无菌棉花，在小火上煮沸 20min 后，冷至室温，加无菌的 0.01mol/L HCl 补足到 100ml。取 1ml 溶菌酶溶液与 99ml 无菌的肉汤培养液混合，分装无菌试管，每管 2.5ml，在含有 0.001%溶菌酶肉汤管子及无溶菌酶的营养肉汤对照管中，各接种 1 环菌液，37℃培养 5~7d，观察其生长情况。

2.2.6.12 在 pH5.7 营养肉汤上的生长

培养基(1000ml): 蛋白胨 10g 葡萄糖 20g
pH 5.7 分装试管, 灭菌

取菌液一环, 接种于上述培养基中, 同时接种普通肉汤培养基 (pH7.2) 做对照, 37℃培养 1~3d 后观察生长情况。

2.2.6.13 糖或醇类发酵试验

培养基 (1000ml)

(NH ₄) ₂ HPO ₄	1g	酵母膏	0.2g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2g	糖或醇类	10g
KCl	5g	琼脂	5~6g
0.4%溴甲酚紫乙醇液(指示剂)			2ml

在加入指示剂前调节 pH6.8-7.0, 然后加入指示剂, 分装试管, 培养基高度约为 4~5cm, 灭菌。

测定糖或醇类包括葡萄糖、阿拉伯糖、木糖、蔗糖、乳糖、甘露醇。

用 18~24h 幼龄的菌种, 用针穿刺接种于培养基中, 37℃培养 1、2、4、7d 甚至 14d, 观察结果。指示剂由紫色变黄, 表示糖类发酵产酸。

2.4 结果

2.4.1 甘氨酸标准曲线绘制

以吸光度值为纵坐标, 甘氨酸浓度为横坐标, 作标准曲线, 并求出其回归方程。

甘氨酸浓度的回归方程为: $y=2.0652x+0.00989$

其中: x 表示甘氨酸浓度, y 表示吸光度, R=0.99934

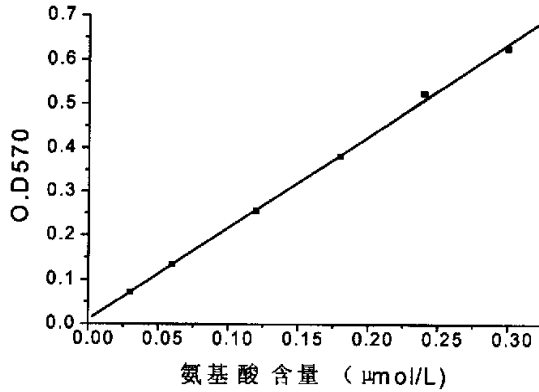
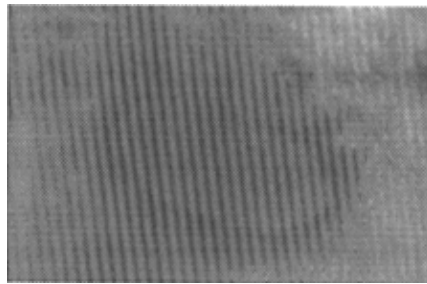


图 2.1 吸光度与甘氨酸浓度的关系

Fig2.1 Relation of absorbance and concentration of glycine

2.4.2 发光杆菌 mbl15 个体特征

光学显微镜下观察, mbl15 菌体短杆状, 单个或形成短链, 能运动, 不产生芽孢。透射电子显微镜下观察(图 2.2), 可以看到该菌株都有明显的鞭毛, mbl15 菌长 $1-1.8\ \mu\text{m}$, 宽 $0.5-1\ \mu\text{m}$ 。



mbl15 菌 (放大 2.9×10^4 倍)

图 2.2 mbl15 菌株的电镜结果

Fig2.1 Observation results of mbl15's electron microscope

2.4.3 菌落特征

观察了 mbl15 菌株在液体和固体培养基条件下的培养特征, 生长时间均为 48 小时。结果见表 2.1。

表 2.1 发光杆菌 mbl15 的培养特征
Tab2.1 Culture characters of mbl15

特征	菌株 mbl15
液体培养特征	
菌膜	—
混浊	+
沉淀	—
颜色	正常
固体培养特征	
大小（直径）	1mm
形状	圆
轮廓	整齐
表面	光滑、微凸
光学特征	半透明
质度	正常
培养基颜色	正常

2.4.4 生理生化特征

对 mbl15 的部分生理生化特征进行了实验观察，结果见表 2.2。表明 mbl15 菌株，可以水解淀粉，利用柠檬酸盐，但耐盐性比较差，可以利用多种糖发酵产酸。

表 2. 发光杆菌 mbl15 的生理生化特征
Tab2.2 Characters of physiology and biochemistry of mbl15

特征	菌株 mbl15	枯草杆菌 (对照)
单兰氏反应	-	+
淀粉水解	+	+
柠檬酸盐利用	+	+
pH 5.7 培养基生长	+	+
过氧化氢酶	+	+
V.P 反应	+	+
V.P 反应的 pH 值	5.5-6.0	6.0-6.4
耐盐性		
5% NaCl	--	+
7% NaCl	-	+
10% NaCl	--	-
碳源利用产酸		
果糖	+	+
葡萄糖	+	+
木糖	+	+
乳糖	+	-
蔗糖	+	+
甘露醇	-	+

2.4.5 菌株传代稳定性

将 mbl15 菌株在牛肉膏蛋白胨斜面培养基上传代 5 次，每次检测牛皮降解情况和测定胶原酶酶活，结果图 2.3 表明 mbl15 菌株均具有很好的传代稳定性。图 2.4 是对牛皮的水解实验，带有毛发的牛皮被 mbl15 菌液降解后只剩下毛发，说明菌液中含有胶原蛋白酶，但没有对毛发有降解能力的角蛋白酶。

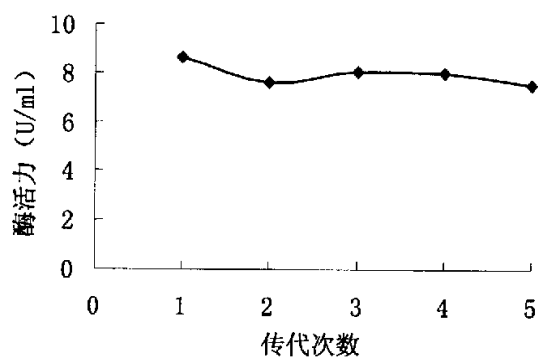
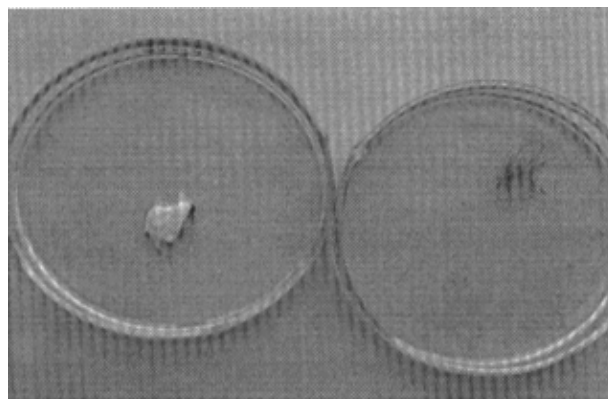


图 2.3 传代次数对酶活影响

Fig2.3 Effects on collagenase activity with transfer of culture



左边培养皿：降解前带有毛发的牛皮

右边培养皿：降解后只剩下毛发

图 2.4 牛皮消化实验

Fig2.4 Experiments of digesting cowhide

2.5 讨论

2.5.1 胶原酶产生菌

虽然对于发光杆菌属研究较少,但研究表明,弧菌科弧菌属的多个菌株产生胶原蛋白酶。其中溶藻弧菌(*V.alginolyticus*)研究最多,它可引起腹泻和食物中毒,是一种致泻弧菌。Keil比较了来自溶藻弧菌、溶组织梭菌、冠状虫霉(*Entomophthora coronata*,一种真菌)和纹皮蝇(*Hypoderma lineatum*,一种昆虫)的胶原蛋白酶,发现来自溶藻弧菌的胶原蛋白酶活性最高。溶藻弧菌和溶组织梭菌的胶原蛋白酶都是Zn金属蛋白酶,作用于活性胶原时,都是从胶原螺旋区的中间部分开始切割,而不是从末端;溶藻弧菌优先作用于33-34和41-42两个位点,这与动物胶原酶的作用于41-42位点类似,而与溶组织梭菌的胶原蛋白酶不同。其所产胶原蛋白酶无毒理作用、培养基简单、无需厌氧设备、活性较高,其胶原蛋白酶基因序列已经测定^[85];副溶血弧菌(*V.parahaemolyticus* 04)^[88]、创伤弧菌(*V.vulnificus*)^[89]、霍乱弧菌(*V.cholera*)^[90]和*V.barveyi* (*V.B-30*)^[91]等都有一定程度的研究,多个胶原蛋白酶已经进行了纯化研究,相应基因已经克隆测序。这些菌产生的胶原蛋白酶都属于金属蛋白酶,但基因同源性较小,编码氨基酸序列保守性差。

发光杆菌属与弧菌属都属于弧菌科,亲缘关系较近,可能具有产生胶原蛋白酶的能力,四川大学分子生物学实验室的杨光垚博士和华南农大的谢君教授已经发现其具有产胶原酶的能力^[108],通过本实验也证明了这一点。

2.5.2 胶原酶活力的检测

在国外,对于胶原酶活性的测定已报道众多的方法,如粘度法、同位素法、荧光法、酶联法以及考马氏亮兰法等^[92-97]。然而这些方法有的灵敏度不高,有的虽有高灵敏度,但受条件限制在国内难做到,这也可能是国内开展这方面研究少的原因。在诸多的方法中,因 C^{14} 标记的可溶性胶原为底物的同位素测定方法灵敏度高而应用较广泛。但由于该方法需要严格的操作环境(C^{14} 的半衰期为1452年),标记底物购买困难且价格又相当昂贵,一般研究难以承受。国内的王一等通过修改的Terato K法,使用氨基酸分析仪测定羟脯氨酸浓度,在进行茚三酮反应比色测定胶原酶活性,获得较稳定的结果,但此方法对仪器的要求也较高。

本论文结合本实验室条件，采用经过 mbl15 胶原酶作用胶原后生成的氨基酸和多肽与茚三酮反应，茚三酮在弱酸性溶液中与 α -氨基酸共热，引起氨基酸氧化脱氧、脱羧反应，最后茚三酮与反应产物——氨和还原茚三酮发生作用，

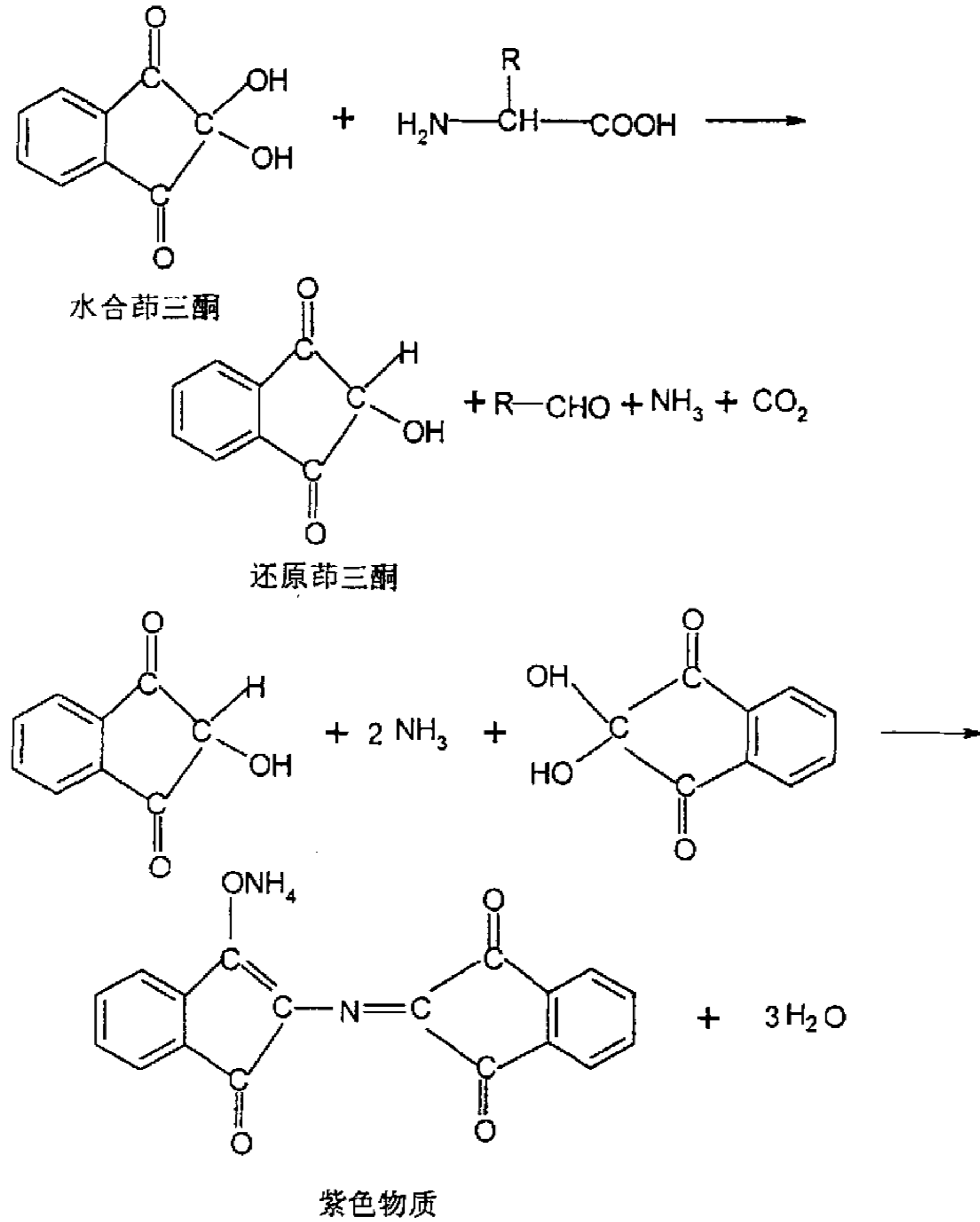


图 2.4 茚三酮与氨基酸反应

Fig2.4 Action of hydrindantin and amino

生成紫色物质，其反应原理^[98]如图 2.4，通过比色可测定出氨基酸和短肽的总量。该方法简便，仪器要求低，重复性好。

3 胶原酶产生菌发酵条件及酶学性质的初步研究

3.1 引言

近几十年来, 随着对微生物胶原酶研究的不断深入, 大量新来源胶原酶产生菌及其生化遗传特性被报道^[3-7]。国内金敏筛选出产胶原蛋白酶的地衣芽孢杆菌^[8], 该菌产酶的最适碳源为蔗糖, 氮源为明胶, 起始 pH 为 7.5, 容瓶装量为 10ml, 种龄是 24h, 接种量为 6%。在此条件下, 摇瓶振荡发酵后, 酶活达 25U/ml 发酵液, 较原发酵培养基发酵后的酶活提高 35%。随着生物技术的不断发展, 人们利用基因工程技术改造和克隆菌株, 已提高菌株的产酶活力和胶原酶的纯度^[9-10]。目前, 商品化开发的微生物胶原酶主要是 *Chistolyticum* 和 *V.alginolyticus* 胶原酶。

本研究报道了发光杆菌 mbl15 菌株产胶原酶的最佳发酵条件和该酶酶学性质的初步研究结果。

3.2 材料和方法

3.2.1 菌种

同 2.2.1

3.2.2 培养基^[6]

种子培养基 (%) : 牛肉膏 0.3, NaCl 0.5,
胰蛋白胨 1, pH7.2-7.4

发酵培养基 (%) : 蔗糖 2, 胰蛋白胨 0.7 , 酵母膏 0.15, CaCl₂ 0.005,
K₂HPO₄ · 3H₂O 0.25, NaH₂PO₄ · 2H₂O 0.05,
pH 7.2-7.5

3.2.3 主要仪器和试剂

I 型胶原(insoluble)来自牛跟腱	Sigma 公司
蛋白质分子量 marker	成都天泰试剂公司
酵母膏, 蛋白胨	Oxodi 公司
四甲基乙二胺 (TEMED)	Sigma 公司

苯甲基磺酰氟 (PMSF)	乙二胺四乙酸 (EDTA)	
乙二醇二四乙酸 (EGTA)	考马斯亮蓝 R-250	AMRESCO 公司
十二烷基磺酸钠 (SDS)		CNI 公司
丙烯酰胺 甲叉双丙烯酰胺		Sigma 公司
其它试剂均为国产分析纯		
DYY-III-5 型温压稳流电泳仪		北京六一仪器厂
DYY-III21 电泳槽		北京六一仪器厂
其它仪器同 2.2.2		

3.2.4 胶原酶活力测定方法

同 2.2.4

3.2.5 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS—PAGE) ^[99]

3.2.5.1 试剂

(1) 30%丙烯酰胺母液

含 29% 丙烯酰胺(w/v) , 1% 甲叉双丙稀酰胺(w/v)。

(2) 4×Tris · HCl/SDS (pH 8.8)

在 300 ml 去离子 H₂O 中溶解 91g Tris 碱 (1.5mol/L), 用 1mol/L HCl 调节 pH 值 至 8.8, 补加去离子 H₂O 至整体积达到 500 ml。再加入 2g SDS, 于 4℃可以保存 1 个月。

(3) 4×Tris · HCl/SDS (pH 6.8)

在 40ml 去离子 H₂O 中溶解 6.05g Tris 碱(0.5mol/L), 用 1mol/L HCl 调节 pH 值至 6.8, 补加去离子 H₂O 至整体积达到 100ml。再加入 0.4g SDS, 于 4℃可以保存 1 个月。

(4) SDS 电泳缓冲液 (5×)

Tris 碱(0.125mol/L) 15.1g

甘氨酸(0.96mol/L) 72.0g

SDS 5.0g

溶于 1000ml 去离子水中。在使用前稀释至 1×SDS 电泳缓冲液。

(5) SDS 样品缓冲液(2×)

4×Tris·HCl/SDS, pH6.8	25ml
甘油[20%(w/v)]	20ml
二硫代苏糖醇 (DTT)	3.1g
溴酚蓝	1mg

加去离子蒸馏水至 100ml 并混匀。等量分装成 1ml 并于-20℃贮存。

(6) 考马斯亮蓝 R-250 染色液 (100ml)

甲醇	50ml
考马斯亮蓝 R-250	0.05%
乙酸	10ml
H ₂ O	40ml

(7) 考马斯亮蓝脱色液(100ml)

乙酸	5ml
甲醇	16.5ml
H ₂ O	78.5ml

3.2.5.2 操作步骤

- (1) 用 2 块干净的玻璃平板和垫片组装电泳装置中的玻璃平板夹层，并固定在灌胶支架上。
- (2) 在 25ml 量杯中，先后加入 5.25ml H₂O； 3.75ml 4×Tris·HCl/SDS, pH8.8； 6.00ml 聚丙烯酰胺母液，混匀后加入 0.05ml 10%过硫酸铵和 0.01ml TEMED。将配好的分离胶溶液沿夹层中一片垫片的边缘加入于玻璃夹层中。
- (3) 分别从两边垫片往夹层中缓慢加入一层重蒸去离子水。让凝胶在室温下聚合 30~60min。
- (4) 倾去顶层的水，并以 1×Tris·HCl /SDS, pH8.8 缓冲液冲洗凝胶的顶部表面。
- (5) 在 25ml 量杯中，混匀 3.05ml H₂O； 1.25ml 4×Tris·HCl/SDS, pH6.8 ; 0.65ml 聚丙烯酰胺母液，混合后加入 0.025ml 10%过硫酸铵和 0.005ml TEMED。将配好的积层胶溶液沿夹层中一片垫片的边缘加入于玻璃夹层中，直至离夹层的顶部约 1cm 高为止。

- (6) 将梳子插入夹层的积层胶液体中，必要时，再补加积层胶溶液充盈剩余空间。让积层胶在室温下聚合 30~45min。
- (7) 在具螺口盖的微量离心管中，用 2×SDS 样品缓冲液按 1:1(v/v) 稀释待测蛋白质样品，于 100℃煮沸 3~5min。同样缓冲液溶解蛋白质分子量标准混合物。
- (8) 小心地拔出梳子，避免撕裂聚丙烯酰胺凝胶的加样孔。
- (9) 将玻璃平板安装在电泳装置上，倒入 1×SDS 电泳电极缓冲液，使之淹没凝胶的加样孔。
- (10) 微量注射器将同样浓度的蛋白质样品等体积加入到样品孔中，对照孔中加入蛋白质分子量标准样品，若有空置的加样孔，须加等体积的空白 1×SDS 样品缓冲液，以防相邻泳道样品的扩散。
- (11) 连接电源，先在 10mA 恒流下电泳至溴酚蓝染料从积层胶进入分离胶，再将电流调至 15mA 至溴酚蓝到达凝胶底部为止。
- (11) 关闭电源并撤去导线，弃去电极缓冲液。
- (12) 在不损坏凝胶的基础上，将凝胶剥离出来并切去凝胶的一角做上标记。接着就可以进行蛋白质的检测。

3.2.5.3 SDS 聚丙烯酰胺凝胶的染色——考马斯亮蓝染色

- (1) 将聚丙烯酰胺凝胶放在塑料容器中并以 3~5 倍体积的固定液覆盖，在旋转摇床上缓慢摇动 1h。
- (2) 倾去固定液，以考马斯亮蓝染色液覆盖凝胶，并缓慢摇动 4h。
- (3) 倾去染色液，用约 50ml 固定液冲洗凝胶。
- (4) 倾去固定液，以脱色液覆盖凝胶，缓慢摇动 2h，倾去脱色液，在加入新脱色液同时至获得蓝色条带及干净的背景。凝胶可放于 7%乙酸或水中保存。

3.2.6 明胶活性聚丙烯酰胺凝胶电泳^[100]

与 SDS-PAGE 相似，在分离胶中加入 0.6%明胶，加样缓冲液中不加巯基乙醇，还原条件下电泳。电泳结束后，2.5% Triton 浸泡 1h 复性。0.05mol/L Tris-HCl (pH 7.5)、0.02mol/L CaCl₂ 反应 2h 后，考马斯亮兰染色 2h，脱色，观察水解带的出现。

3.3 结果

3.3.1 mb115 菌株发酵条件研究

3.3.1.1 碳源对产酶的影响

在发酵培养基中，分别加入 2%的不同碳源，其它成分不变。摇瓶发酵培养 48h 后测定酶活力，结果见表 3.1。结果显示，该菌可利用多种碳源产酶，不同碳源对产酶影响很大，其中葡萄糖为碳源时酶活力最高，蔗糖次之。

表 3.1 碳源对产酶的影响
Tab. 3.1 Effects on collagenase activity with carbon sources

碳源	酶活 (U/ml)	碳源	酶活 (U/ml)
半乳糖	3.14	葡萄糖	12.16
可溶性淀粉	7.15	纤维素	4.98
果糖	2.56	乳糖	3.78
糊精	2.49	蔗糖	11.46
木糖	3.42	麦芽糖	8.61
红薯	6.75		

3.3.1.2 氮源对产酶的影响

在发酵培养基中，分别加入 1%的不同氮源，其它成分不变。摇瓶发酵培养 48h 后测定酶活力，结果见表 3.2，牛肉膏为氮源时酶活力大大高于其他氮源，而无机氮源很难被利用。

表 3.2 氮源对产酶的影响
Tab3.2 Effects on collagenase activity with nitrogen sources

氮源	酶活 (U/ml)	氮源	酶活 (U/ml)
硫酸铵	未测出	鱼粉	10.17
硝酸铵	未测出	牛肉膏	15.82
尿素	3.39	胰蛋白胨	5.65
明胶	2.83	大豆蛋白胨	5.65
氯化铵	未测出	酪蛋白	3.67

3.3.1.3 金属离子对产胶原蛋白酶的影响

在发酵培养基中分别添加不同的无机盐, 结果表明 (表 3.3): Ca^{2+} 对产酶有明显的促进作用, 这可能是由于胶原酶属于金属蛋白酶, Ca^{2+} 能结合其活性中心, 增加其活性。

表 3.3 金属离子对产酶的影响
Tab3.3 Effects on collagenase activity with metallic ions

盐	酶活 (U/ml)	盐	酶活 (U/ml)
硫酸镁	4.52	硫酸亚铁	2.64
硫酸铝	6.51	硫酸铜	5.21
氯化锌	5.21	氯化钙	10.23

3.3.1.4 接种浓度对产酶的影响

将 24h 种龄的种子培养基以不同浓度接入发酵培养基, 250ml 摇瓶振荡培养 48h 后, 测定其中胶原酶活力, 结果见图 3.1。其中, 6% 的接种浓度最好。

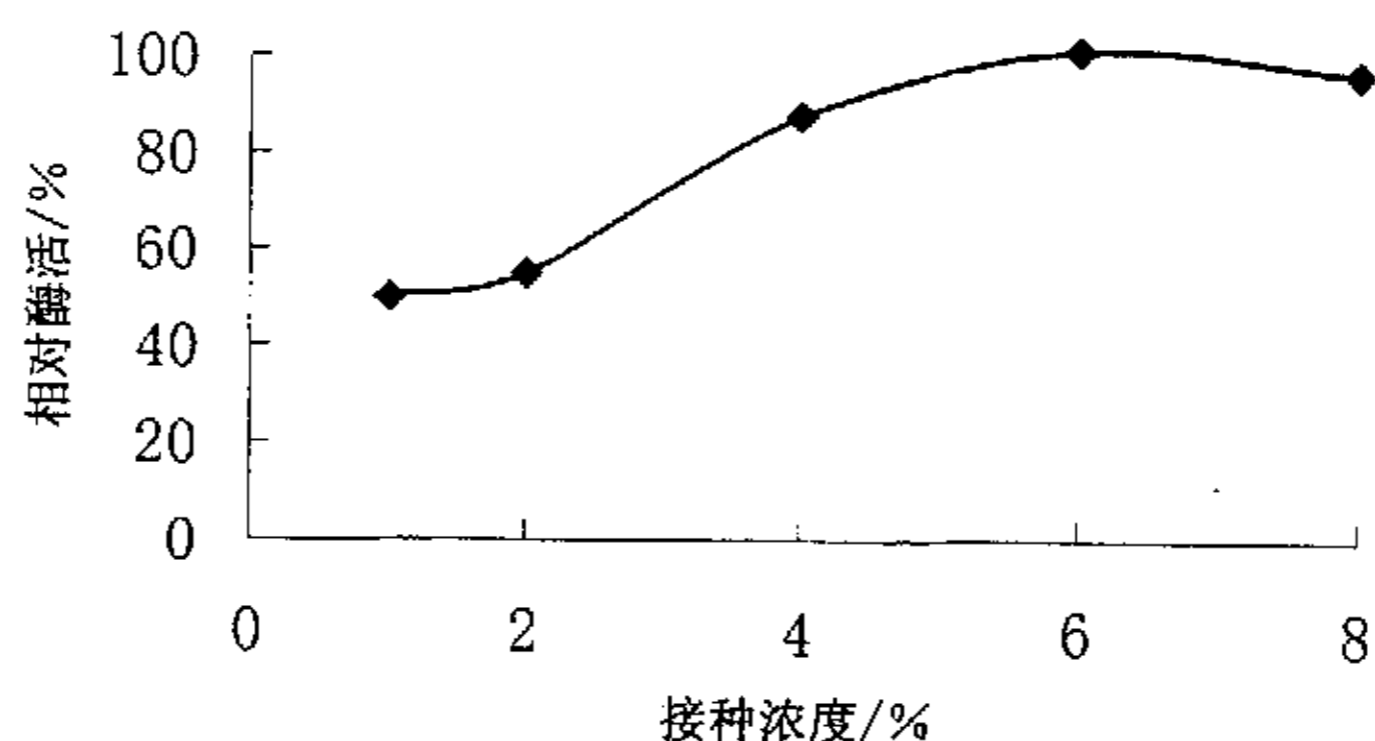


图 3.1 接种浓度对酶活的影响
Fig3.1 Effects on collagenase activity with inoculum

3.3.1.5 培养基起始 pH 对产酶的影响

将发酵培养基用 NaOH 或 HCl 调节成不同的 pH 值，接种 6% 种子培养基发酵 48h，测定胶原酶活力，见图 3.2。结果表明，培养基起始 pH 对产酶影响较大，pH6.5 时最佳。

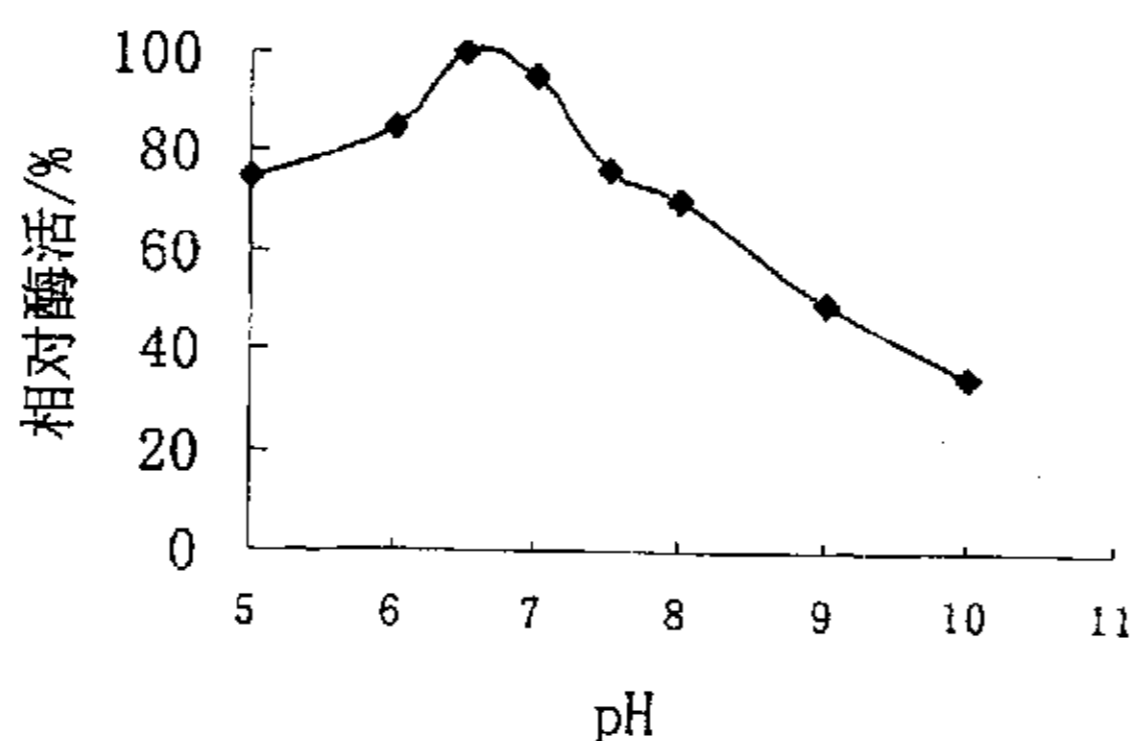


图 3.2 起始 pH 对酶活的影响
Fig3.2 Effects on collagenase activity with initiate pH

3.3.1.6 瓶装体积对产胶原酶的影响

在 250ml 三角瓶中装入不同量的发酵培养基，在其它条件一致的情况下发酵 48 小时，测定酶活。结果表明，摇瓶装量 5% 体积时产酶活性最高，表明通

氧量的增加促进了细菌的生长, 见图 3.3。

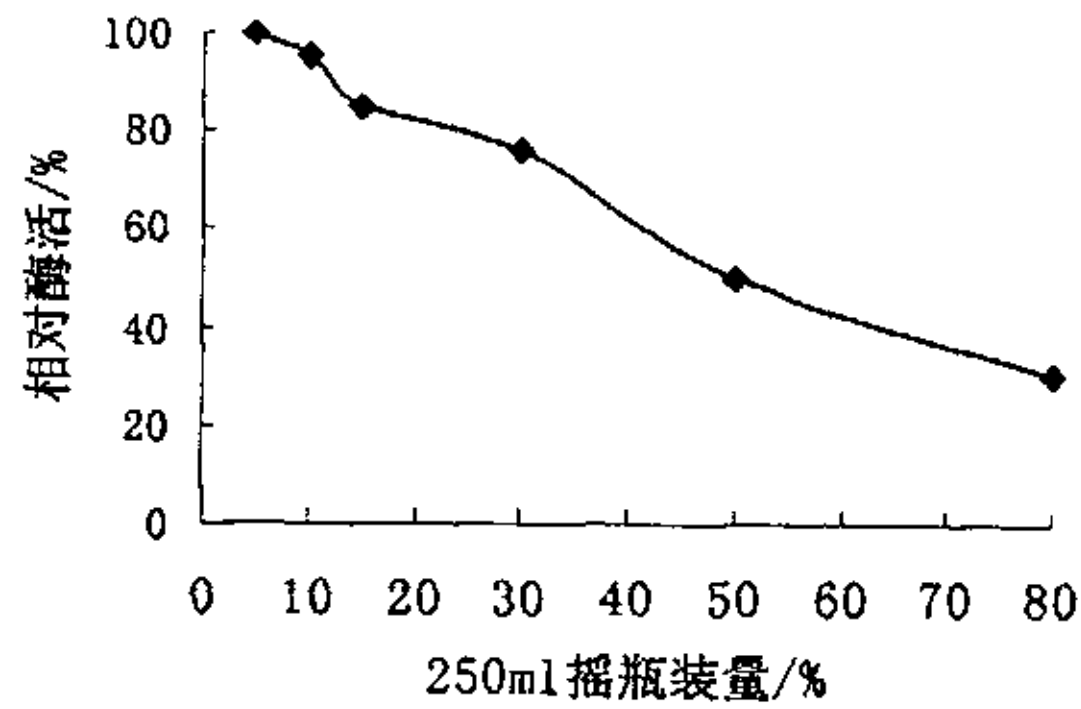


图 3.3 摇瓶装量对产酶的影响

Fig3.3 Effects on collagenase activity with different volume of medium in bottle

3.3.1.7 发酵温度对产酶的影响

将发酵培养基 pH 调至 6.5, 分别在 25、28、32、37、41、45°C 温度下发酵 48 小时测胶原酶酶活, 结果见图 3.4, 结果表明, 37°C 发酵对产酶更为有利。

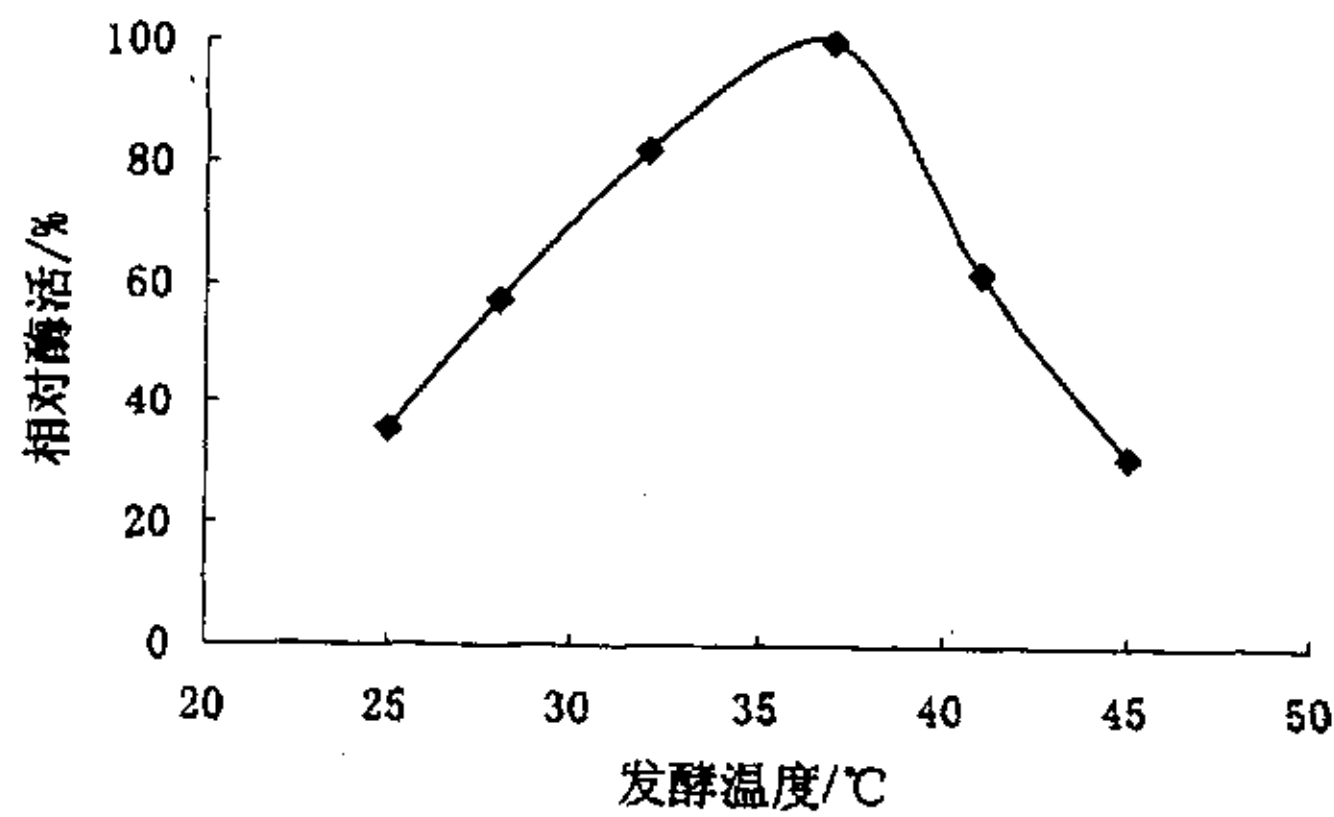
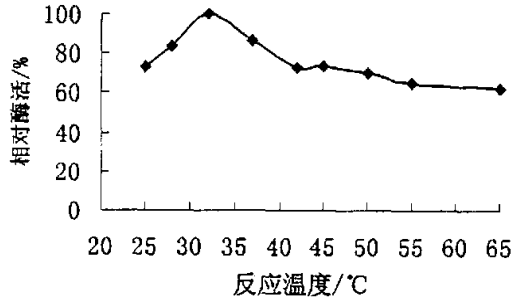


图 3.4 发酵温度对产酶的影响

Fig3.4 Effects on collagenase's activities with different ferment temperatures

3.3.2 mbl15 菌株产胶原酶的粗酶性质

3.3.2.1 胶原蛋白酶最适反应温度和最适反应 pH



(注：图中温度依次为 25、28、32、37、42、45、50、55、65℃)

图 3.5f 反应温度对产酶活性的影响

Fig 3.5 Effects on collagenase's activities with different temperatures

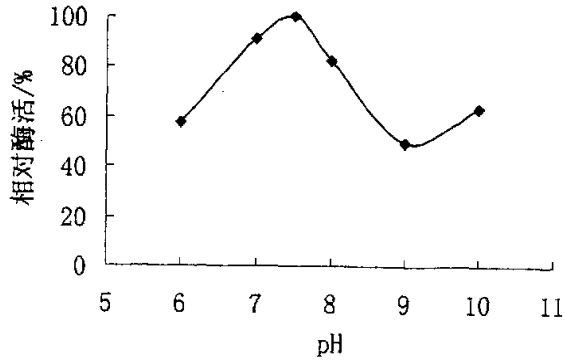


图 3.6 pH 对产酶活性的影响

Fig 3.6 Effects on collagenase activity with pHs

由图 3.5 和图 3.6 上可知，mbl15 菌株的胶原蛋白酶最适反应温度为 32℃，

由于天然胶原变性温度临界点为 60~65℃，因此在此温度以上测定的活性不能认为是胶原酶活。mb115 菌株胶原蛋白酶最适反应 pH 为 7.5。

3.3.2.2 mb115 菌株产生胶原蛋白酶热稳定性

将 mb115 菌株产生的胶原蛋白酶液置于 40℃、50℃、60℃、70℃ 条件下，于不同时间取样测定胶原酶的剩余活力，结果见图 3.7。

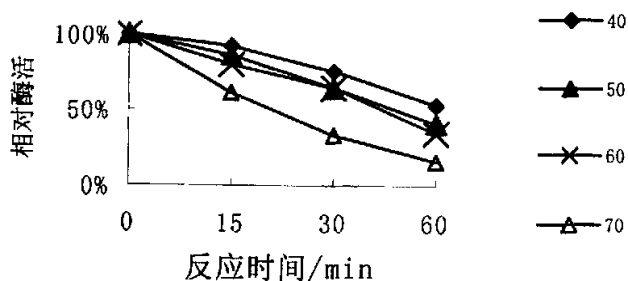


图 3.7 mb115 产生胶原蛋白酶热稳定性
Fig 3.7 Thermal stability of mb115 collagenase

3.3.2.3 抑制剂对 mb115 菌株产生胶原蛋白酶的作用

分别用 0.1mmol/L PMSF、10mmol/L EDTA、10mmol/L EGTA 在 4℃ 处理胶原酶 30min，然后测定剩余胶原酶酶活，结果见图 3.8。结果表明，丝氨酸蛋白酶抑制剂 PMSF 几乎不影响粗酶液酶活，金属蛋白酶抑制剂 EDTA、EGTA 可以抑制大部分胶原酶酶活。

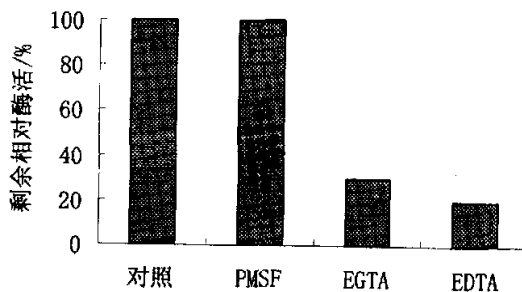
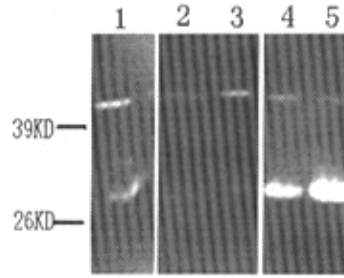


图 3.8 抑制剂对胶原酶酶活的影响

Fig 3.8 Effects on collagenase activity with different inhibitors

3.3.2.4 mbl15 菌株明胶酶的分析

明胶活性 SDS-PAGE 显示, 发光杆菌 mbl15 只产生分子量分别约为 30kD 和 40kD 的 2 种胞外明胶酶。在明胶活性 SDS-PAGE 电泳后, 反应时加入抑制剂 EDTA, 结果显示 EDTA 对 30kD 明胶酶有抑制作用, 而 PMSF 对 40kD 明胶酶有部分抑制作用 (图 3.9)



1 道为未加入抑制剂; 2、3 道分别为: 1 mmol/L 和 10mmol/L EDTA;4、5 道分别为 0.1mmol/L 和 1mmol/L PMSF.

图 3.9 mbl15 菌株胞外明胶酶的分析
Fig3.9 Analysis of gelatinase of mbl15

3.3.3 正交试验优化培养基组成

表 3.4 因素水平表

Tab3.4 Levels of factors

因 子	水 平		
A 牛肉膏 (%)	1	2	4
B 酵母粉 (%)	0.1	0.15	0.2
C 蔗糖 (%)	1	2	4
D CaCl ₂ (%)	0.01	0.02	0.04

表 3.5 正交试验表
Tab3.5 Orthogonal experiment

	牛肉膏 (%)	酵母粉 (%)	蔗糖 (%)	CaCl ₂ (%)	酶活 (U/ml)
1	1.00	0.10	1.00	0.01	5.56
2	1.00	0.15	2.00	0.02	9.45
3	1.00	0.20	4.00	0.04	6.21
4	2.00	0.10	1.00	0.04	10.45
5	2.00	0.15	2.00	0.01	7.46
6	2.00	0.20	4.00	0.02	8.13
7	4.00	0.10	1.00	0.02	6.54
8	4.00	0.15	2.00	0.04	9.81
9	4.00	0.20	4.00	0.01	12.58
K1	7.100	7.543	7.860	8.560	
K2	9.643	8.907	10.827	8.040	
K3	8.680	8.973	6.737	8.823	
极差 R	2.543	1.430	4.090	0.783	

通过对单因素试验, 最佳碳源为葡萄糖, 氮源为牛肉膏, 起始 pH6.5, 摇瓶装量 5%, 发酵温度 37°C, 接种浓度 6%。但考虑到成本因素, 选用蔗糖作为碳源且 5% 的摇瓶装量太少, 选用 10% 的摇瓶装量。将培养基成分蔗糖、牛肉膏、酵母粉和 CaCl₂ 4 个因素作 3 个不同浓度水平正交试验, 列表 L₉(3⁴), 经极差分析 (表 5), 表明: $R_C > R_A > R_B > R_D$, 各因素对酶活影响的主次顺序为 C-A-B-D, 最优方案是 A₂、B₃、C₂、D₃。即蔗糖最重要, 其次是牛肉膏、酵母膏、CaCl₂。其产胶原蛋白酶最佳培养基为牛肉膏 2%、蔗糖 2%、酵母粉 0.2%、CaCl₂ 0.04%。

3.4 讨论

3.4.1 mbl15 菌株发酵条件

利用微生物发酵生产目的产物，除了受其菌株本身的影响以外，发酵培养基条件以及发酵工艺也是十分重要的影响因素。本实验选用的 mbl15 菌株产生胶原蛋白酶对发酵条件都有较强的依赖性。实验结果表明，在以蔗糖作为碳源、牛肉膏作为主要氮源的培养基中，瓶装体积小发酵条件下，mbl15 菌株产生胶原蛋白酶量较大，这可能是由于该菌为严格好氧菌，在通氧量高的条件下，生长代谢迅速；mbl15 菌株菌生长条件要求比较简单，不需要特殊的生长素，在一个简单的有机化合物作为唯一碳源和能源的培养基中就可以生长，培养基中 CaCl_2 的存在，可能作为一种底物诱导作用。

据文献报道与发光杆菌同属的溶藻弧菌 (*V.alginolyticus*) 是筛选自腐烂毛皮的革兰氏阴性需氧菌，具有耐盐、胶原酶活性高的特点，最初被鉴定为解毒无色杆菌 (*Achromobacter iophagus*)^[46]。最初的研究认为解毒无色杆菌是非致病菌，其产生胶原蛋白酶的研究价值可能超过梭菌来源的胶原蛋白酶。后来的研究表明，溶藻弧菌可能引起腹泻和食物中毒，是一种致泻弧菌。溶藻弧菌胶原蛋白酶在 15-35℃、0.85-10% NaCl、pH6.4-8 的条件下，存在诱导物时可以产生。溶藻弧菌胶原蛋白酶的诱导物可以是胶原、胶原分子片段或者分子量 1kD~60kD 的蛋白胨^[47, 48]。本试验结果未发现胶原或明胶对产酶活性有所提高，说明这两种菌的诱导机制有所不同。

3.4.2 mbl15 菌株发酵酶液性质

通过实验得出 mbl15 菌株胶原酶的最适反应温度 32℃，pH7.5，丝氨酸蛋白酶抑制剂 PMSF 几乎不影响粗酶液酶活，金属蛋白酶抑制剂 EDTA、EGTA 可以抑制大部分胶原酶酶活。

表 3.6 部分胶原酶性质
Tab3.6 Character of part collagenase

菌种	蛋白酶 类型	分子量 (kD)	最适 pH	最适温度 (°C)
<i>Cl.perfringens</i>	金属	120	7.2	42
<i>Cl.histolyticum</i>	金属	66~125	—	—
<i>Cytophaga sp.L43-1</i>	—	120	—	—
<i>Empedobacter collagenolyticum</i>	金属	—	7.6	30
<i>Acinetobacter sp.</i>	金属	102	7.6	37
<i>V. B-30</i>	金属	105	7.6	37
<i>Alicyclobacillus sendaiensis</i>	丝氨酸	37	3.9	—
<i>P.aeruginosa</i>	金属	17.5×2	7.3	—
<i>V.alginolyticus</i>	金属	82	7.2	30-35
<i>Geobacillus collagenovorans</i>	丝氨酸	105×2	—	—
<i>Treponema denticola</i>	丝氨酸	67	—	—

从表 3.6 中可以看出，胶原酶的性质差别较大，保守性差。可能原因在于胶原本身种类较多，结构复杂，已经发现至少 25 种胶原基因，19 种胶原^[101]；微生物胶原蛋白酶与动物胶原酶不同，已经研究的微生物胶原酶并不具有相似的胶原结合区域(collagen-binding domain)^[102]；大多数微生物作用于不同胶原底物位点并不专一，既可能作用于胶原螺旋区也可能作用胶原非螺旋区。

4. 发光杆菌 mbl15 胶原蛋白酶降解鲜猪皮的研究

4.1 引言

胶原的科学定义是：“细胞外基质（ECM）的结构蛋白质，分子中至少应有一个结构域具有链组成的三股螺旋构象（即胶原域）”。胶原是一种长约300nm、由3条平行多肽链构成的杆状分子，每条链呈左旋结构，3股螺旋盘绕同轴形成右旋。在三链螺旋区常见 Gly-X-Y 的序列，Gly 是甘氨酸，X 和 Y 常为脯氨酸和羟脯氨酸，该三链螺旋以链间氢键和分子间及分子内的交联而呈稳定状态。胶原是皮肤、肌腱和软骨的主要成分，组成哺乳动物总蛋白的25~33%，在几乎所有器官的结缔组织中都有分布。它以不溶性纤维存在于细胞外间质的粘多糖和蛋白内，赋予组织的结构形态和强度，因此导致这类蛋白降解或丢失的任何过程与健康都有重要的关系^[103]。

胶原蛋白属生物高分子材料，经过适当提取处理的胶原具有良好的生物相容性和生物降解性，可进一步加工成营养保健品、高级化妆品、食品、生物农药、生物肥料等。其应用领域涉及多个分支，据报道用途最多的领域是医药、化妆品、食品^[104]。

动物皮是胶原最丰富的资源，胶原分子的天然独特骨架，使得动物皮大量用于制革，而制革工业中只有25%左右的原料皮变成革，其余的都在制革过程中作为片、削、磨和修边屑等固体废物扔掉。而我国是制革大国，年投产1.7亿张动物皮，将有140万吨废弃物产生^[105]，丢弃数量如此巨大的废弃物，不仅造成严重环境污染，而且是资源的极大浪费。皮革废屑的主要成份是胶原蛋白，是丰富的蛋白质资源。因而，将其高值转化，变废为宝，具有十分重要的经济价值。

本文研究了发光杆菌 mbl15 胶原蛋白酶的粗纯，及对鲜猪皮的降解作用，并对其产物进行了分析。

4.2 材料和方法

4.2.1 发光杆菌 mbl15 发酵液

按照本实验室得到的发光杆菌 mbl15 最佳发酵条件，培养基组成：牛肉膏2%、蔗糖2%、酵母粉0.15%、CaCl₂ 0.02%、K₂HPO₄·3H₂O 0.25%、NaH₂PO₄·2H₂O

0.05%，起始 pH6.5，摇瓶装量 5%，发酵温度 37℃，接种浓度 6%培养 48h，37℃通气培养 48h。

4.2.2 仪器与试剂

蛋白质电泳试剂购自成都天泰试剂公司

其它试剂均为国产分析纯

数控恒温水浴锅	上海实验仪器总厂
电动搅拌器	深圳国华仪器厂
氨基酸分析仪	美国惠普公司
电热套	深圳国华仪器厂
DYY-III-5 型温压稳流电泳仪	北京六一仪器厂
SPM—10 酸度计	浙江肖山仪器厂
DYY-III21 电泳槽	北京六一仪器厂

4.2.3 发光杆菌 mb115 胶原酶的硫酸铵沉淀

在发酵液中缓慢加入硫酸铵，直至终浓度达到 30%。4℃静置过夜后，10000rpm 离心 30min，收集上清液，弃去沉淀。

在得到的上清液中继续缓慢的加入硫酸铵，直至终浓度达到 100%。4℃静置过夜，10000rpm 离心 30min，弃去上清液，小心收集沉淀。

4.2.4 mb115 粗酶液的制备

硫酸铵沉淀产物加入蒸馏水溶解。4000rpm 离心 30min，10000rpm 离心 30min，除去其中的不溶成分。

将得到的上清液放入透析袋。多次反复更换透析液，直至透析袋中溶液电导低于 500 μ S。

10,000rpm 离心 30 min，收集上清液，用 0.8 μ m 的滤膜进行真空抽滤，完全除去其中的不溶性杂质，冷冻干燥。

4.2.5 脂肪含量

按食品中脂肪的测定方法 GB 5009.6-85，索氏抽提法。

称取 5.0~10.0g 样品，置于蒸发皿中，加入海砂约 20g 于沸水浴上，蒸干后，再于 95~105℃干燥，研细，全部移入滤纸筒内。蒸发皿及附有样品的玻璃棒，均用沾有乙醚的脱脂棉擦净，并将棉花放入滤纸筒内。

将滤纸筒放入索氏抽提器的抽提筒内，连接已干燥至恒量的接收瓶，由抽提器冷凝管上端加入无水乙醚或石油醚至瓶内容积的 2/3 处，于水浴上加热，使乙醚或石油醚不断回流提取，抽取 6~12h。

取下接收瓶，回收乙醚或石油醚，待接收瓶内乙醚剩 1~2ml 时在水浴上蒸干，再于 95~105℃干燥 2h，放干燥器内冷却 0.5h 后称量。

脂肪含量计算公式：

$$X = \frac{m_1 - m_0}{m_2} \times 100\% \quad (4-1)$$

式中，X——样品中脂肪的含量，%；

m_1 ——接收瓶和脂肪的质量 g

m_0 ——接收瓶的质量 g

m_2 ——样品的质量 g

4.2.6 灰分

灰分按食品中灰分的测定方法 GB5009.4-85 测定，即将一定质量样品放入瓷坩锅，至于高温炉中灼烧后所残留的无机物质含量。

结果计算：

$$w_3 = \frac{m_1 - m}{m_2 - m} \times 100\% \quad (4-2)$$

式中， w_3 ——样品中灰分百分含量，%；

m ——坩锅质量 g

m_1 ——坩锅和水分质量 g

m_2 ——坩锅和样品质量 g

4.2.7 胶原蛋白和肽的氨基酸组成分析

由四川农业大学动物营养研究所测定。

色谱条件：色谱柱采用 HP 阳离子交换树脂作为柱填料，内径 Φ 2.6mm，长 150mm；洗脱方式为 4 段梯度洗脱，由计算机控制；柠檬酸缓冲液为洗脱液，流速 0.225ml/min，泵压 $2\sim 3 \times 10^6$ Pa；色谱柱温度 51℃，反应浴温度 98℃，反应圈内径 0.25mm，长 2.0m；进样体积 50ul。以 570nm 和 440nm 同时检出。

实验操作：

1. 样品预处理，取 10~15ml 胶原蛋白溶液，用含苯酚的 6mol/L HCl 在 110℃ 水解 24h，过滤、蒸干，再溶解、定容至 50ml，作为测定氨基酸组成的分析样品。
2. 取上述待测分析样品 50ml，用 HP1100LC 型氨基酸分析仪测定水解产物中各种氨基酸组成。

4.2.8 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 测定胶原蛋白分子量 同 3.2.5

4.2.9 蛋白质含量测定

参照食品中蛋白质的测定方法 GB5009.5—85，即用凯氏定氮法测出样品中的总氮量，再换算成蛋白质含量。

4.2.9.1 试剂和溶液

盐酸: 0.1mol/L 标准溶液。

氢氧化钠: 饱和溶液。

硼酸: 2% 溶液。

混合催化剂: 无水硫酸钾或硫酸钠、硫酸铜、硒按 100:10:2 的重量比配制而成。

混合指示液: 以 0.2% 甲基红与 0.1% 次甲基蓝相等体积混合配成

4.2.9.2 仪器和设备

凯氏烧瓶: 250ml

半微量凯氏定氮仪

4.2.9.3 操作

- a. 在干净的凯氏烧瓶里，加入约 2g 催化剂和被测样品，称重后直接注入凯氏烧瓶底部，再沿瓶壁徐徐加入 15~20ml 浓硫酸，并轻轻摇荡，使样品全部被硫酸脱水炭化。
- b. 将加好试剂的凯氏烧瓶放入通风橱内的可调电炉上，先小火加热，至冒出白烟。
后加大火力，直至瓶内溶液变成透明蓝色后，再继续加热约 20~30min 即可。
- c. 将已冷却的溶液移入 100ml 容量瓶内，并用蒸馏水重复冲洗凯氏烧瓶 5~6 次，全部冲洗液倒入容量瓶中，最后在液温 20℃ 时定容至 100ml 刻度线处。
- d. 蒸馏：吸取容量瓶内样品 10ml 放入半微量凯氏定氮仪的反应室内，加入约 4ml 饱和氢氧化钠，放开蒸汽管夹，在通入的热蒸汽作用下，样品与饱和氢氧化钠反应，放出 NH₃，经冷却管冷却后流入盛有 2% 的硼酸溶液接受杯中，成为 NH₄HB₄O₇，使原来淡紫红色的硼酸溶液(内加有适量的混合指示剂)变为淡苹果绿色，直至硼酸接受杯中溶液增加至约 30ml 时取下接受杯，同时用蒸馏水少许将冷却管末端(浸入接受杯部分)残余液滴冲洗入接受杯内。
- e. 滴定：将接受杯内液体用 0.1mol/L 盐酸标准溶液滴定，至出现淡紫红色时为止，读出所消耗的盐酸毫升数。

4.2.9.4 结果与计算

$$CP(\%) = \frac{N \times V \times 0.014 \times 6.25}{W} \times 100\% \quad (4-3)$$

式中：CP——蛋白质含量，%；

N——盐酸浓度；

V——滴定消耗的盐酸标准溶液的体积，ml；

0.014——1.0ml 的盐酸标准溶液相当于 0.014g 氮；

W——样品重，g。

4.2.10. 胶原蛋白制备的反应条件

将鲜猪皮进行筛选分类，并用低浓度的碱水清洗，进行手工的仔细去脂，清洗，切成小块。实验采用脱脂酶和碱进行鲜猪皮的脱脂。加入发光杆菌 mbl15 菌株胶原蛋白酶进行酶解，酶解反应后 90℃ 5min 酶灭活，10000rpm 离心 10min，微孔滤膜过滤，冰箱保存。

4.3 结果与讨论

4.3.1 猪皮中主要成分的分析

表 4.1 猪皮主要成分分析
Tab4.1 Analysis of primary component of pig skin

成分	含量(%)
水分	62.3
脂肪	1.03
蛋白质	34.3
灰份	0.32

4.3.2 发光杆菌 mbl15 胶原蛋白粗酶的制备

4.3.2.1 硫酸铵沉淀

25ml 容量瓶中分别加入不同量的固体硫酸铵，并添加发酵液至刻度线，达到不同的饱和度，4℃ 静置过夜，10,000g 离心 20min 后，测定上清液的胶原蛋白酶活性。由图 4.1 可知：当硫酸铵饱和度低于 30% 时，大部分胶原蛋白酶存在于上清液中，当硫酸铵饱和度达到 65% 左右时，几乎全部的胶原蛋白酶已经沉淀。因此，选择 30%~65% 的硫酸铵饱和度进行梯度沉淀。

4.3.2.2 mbl15 固体酶

发光杆菌 mbl15 发酵液经过硫酸铵沉淀，将得到的上清液放入透析袋，多次反复更换透析液，直至透析袋中溶液电导低于 500 μ S。10,000rpm 离心 30

min, 收集上清液, 用 0.8 μ m 的滤膜进行真空抽滤, 完全除去其中的不溶性杂质, 冷冻干燥, 得到固体酶。原始发酵液中酶活为 14.6U/mL, 换算成 19.2 U/mg, 经过硫酸铵沉淀, 透析, 滤膜过滤, 冷冻干燥后, 酶活可达 65.3 U/mg。

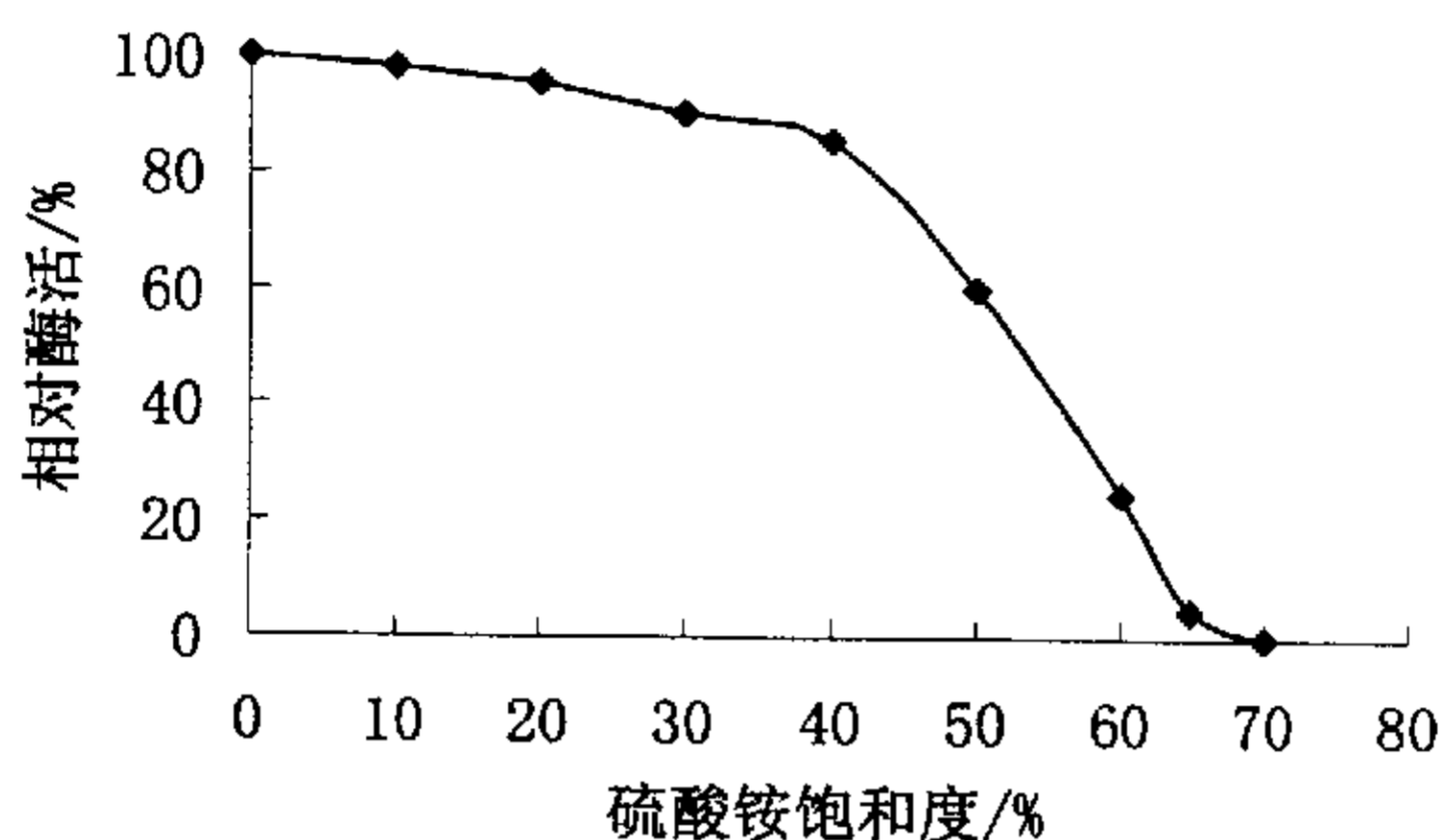


图 4.1 mbl 15 发酵液中胶原蛋白酶的盐析曲线

Fig4.1 Saltingout curve of collagenase of fermentation liquor of mbl15

4.3.3 胶原蛋白制备的单因素实验

将经过预处理的鲜猪皮放入反应器中, pH7.5, 酶量 1%(酶 /猪皮), 反应时间 6h, 温度 32 $^{\circ}$ C,液比 2。保持五个因素中的 4 个不变, 考察其中某个因素对胶原蛋白提取率的影响。得率以胶原蛋白水解液中蛋白质含量占鲜猪皮蛋白质含量的百分数表示。结果如以下几个图:

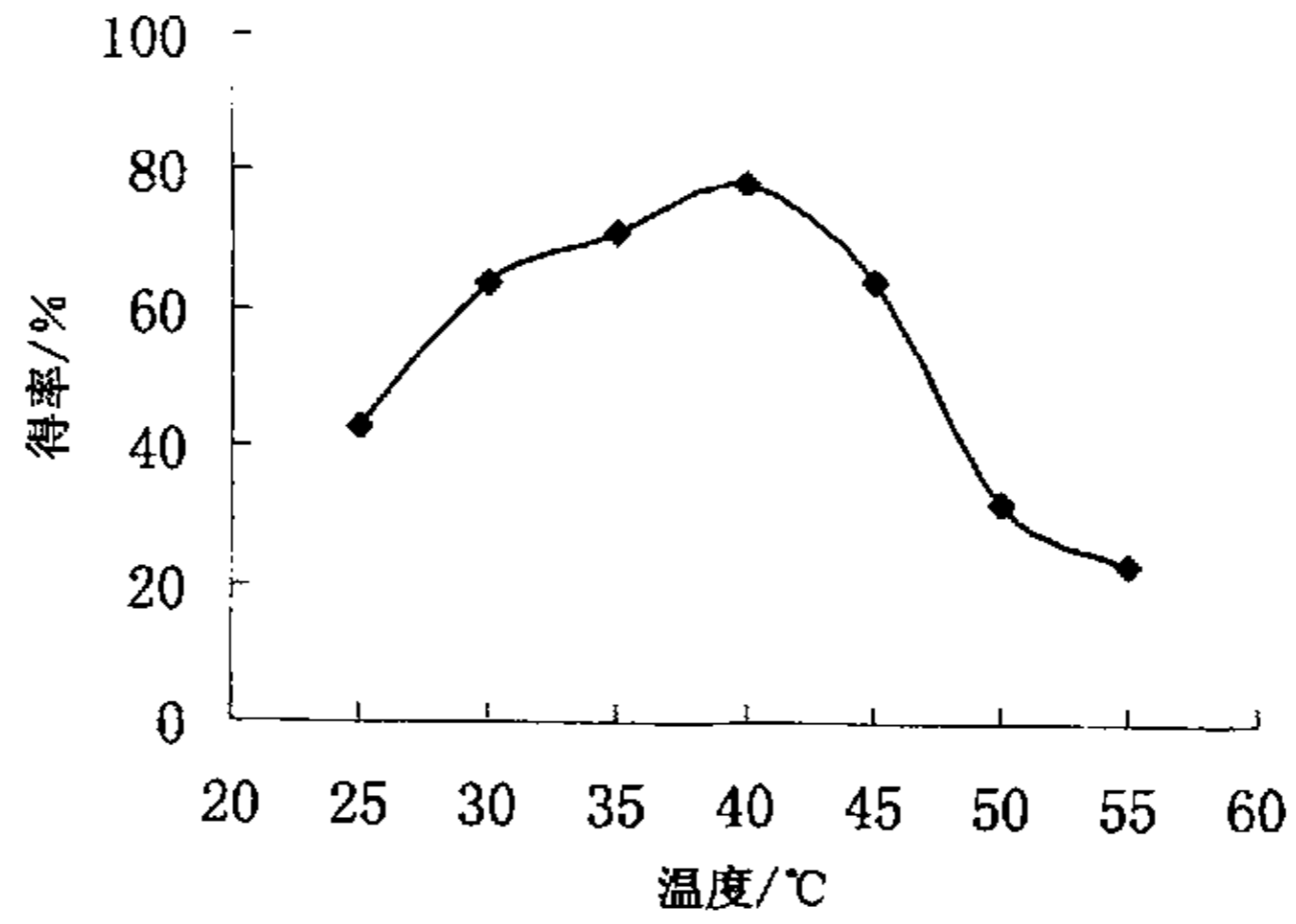


图 4.2 温度对得率的影响

Fig4.2 Effects on collagen yield with temperature

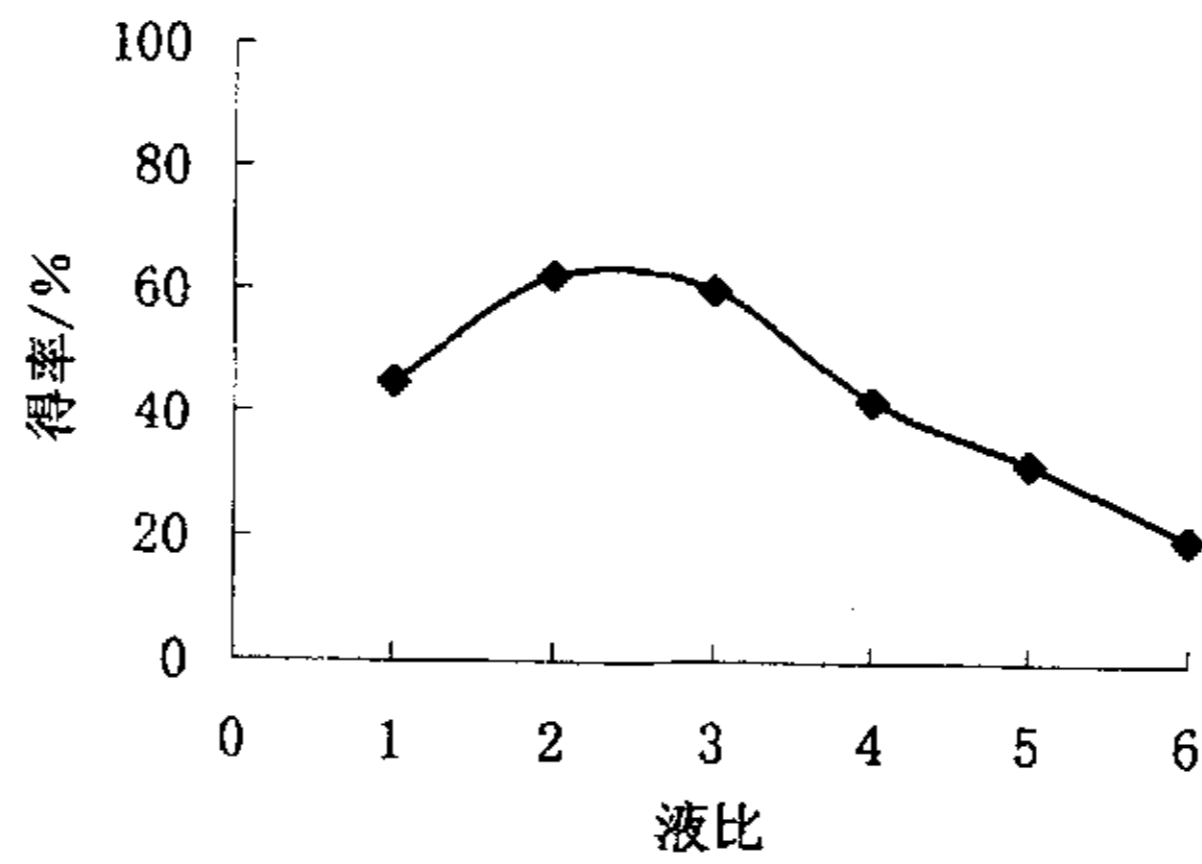


图 4.3 液比对得率的影响

Fig4.4 Effects on collagen yield with liquor ratio

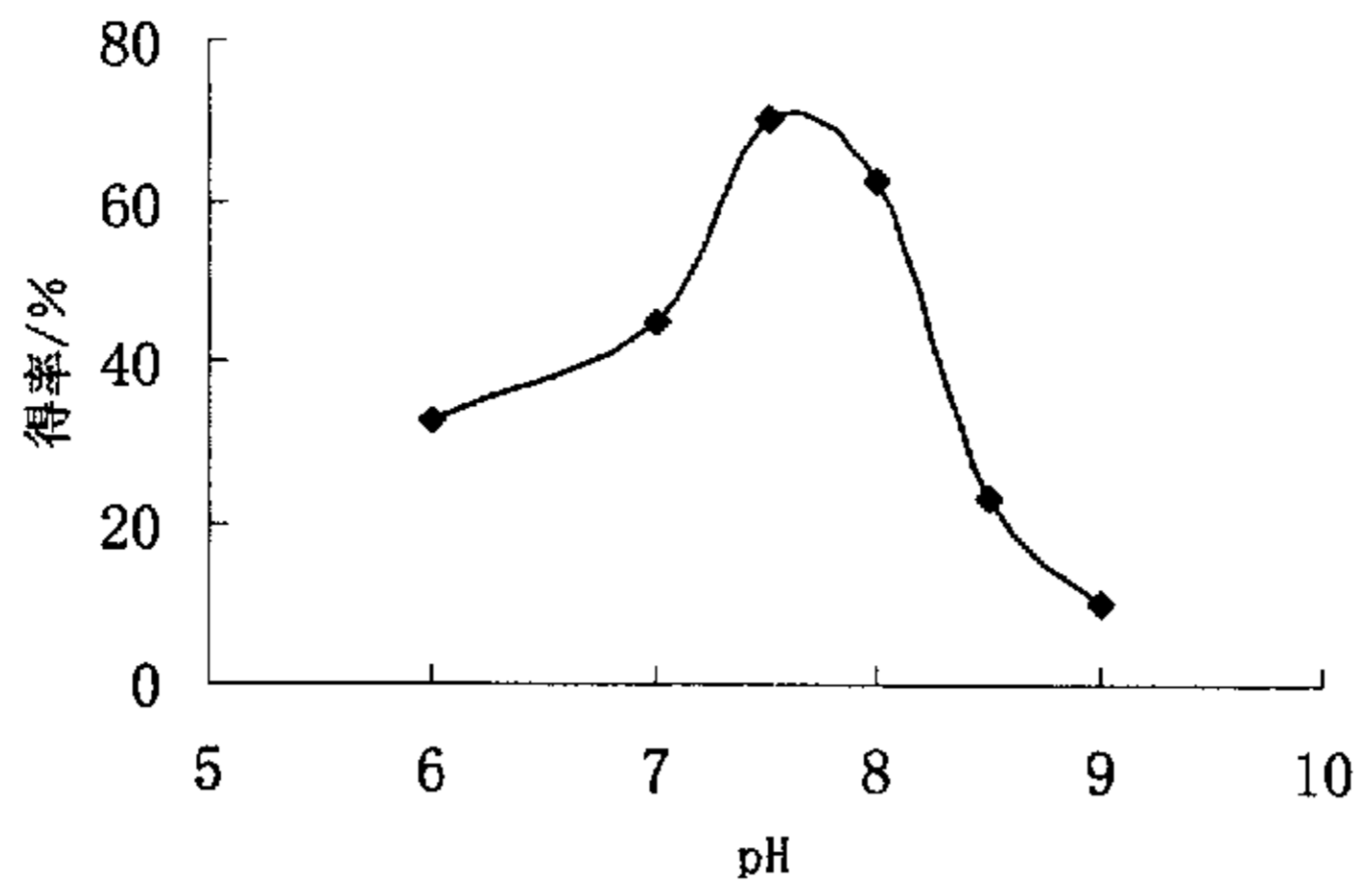


图 4.4 pH 对得率的影响

Fig4.5 Effects on collagen yield with pH

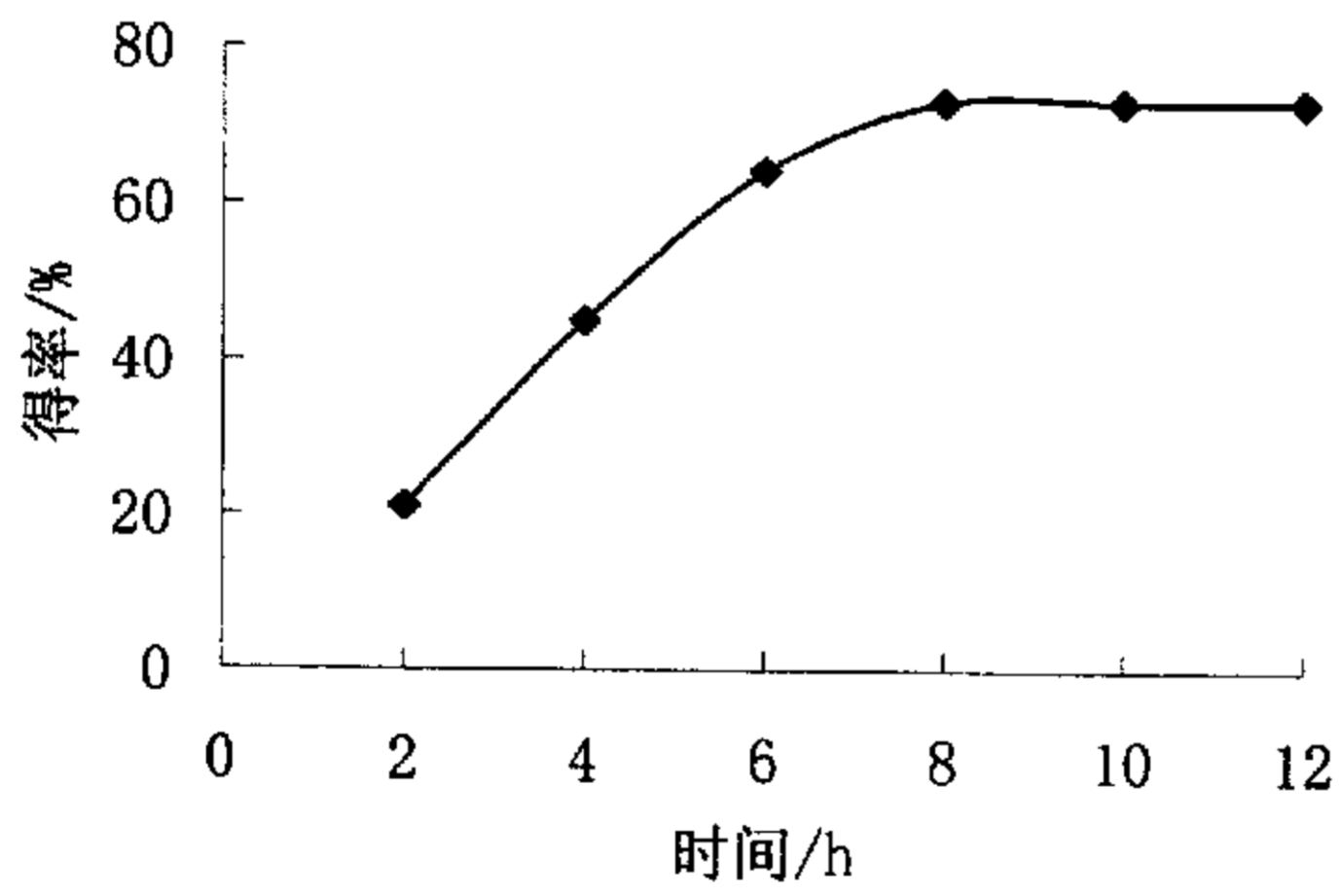


图 4.5 时间对得率的影响

Fig4.5 Effects on collagen yield with time

由单因素对得率的影响可知，温度升高，得率提高，但温度超过一定程度后，得率很低，因为生物蛋白酶在高温稳定性降低，酶的活性区域的蛋白受到温度的影响而变性，从而酶的活力降低。随着时间增加，得率提高，到达一定时间后，得率保持不变，说明反应时间延长，酶活力也逐渐降低，得率达到一个终点，也可能存在产物对酶的抑制作用。液比对得率的影响也是随着液比的增大，得率由大变小，说明酶浓度太低对猪皮的降解能力变小。通过不同酶量的试验表明，随着酶量的增加，得率不断增加，根据酶动力学的米氏方程可知^[98]，在酶促反应中，如果底物浓度足够大，足以使酶饱和，则反应速度与酶浓度成正比。在本试验中，当酶的量增加时，底物不足以使酶饱和，所以酶的反应速度也不断的增加，得率也随着增大。pH对得率的影响也很大，过低或过高的pH可使酶变性，活力下降。

4.3.3 胶原蛋白提取的正交试验

根据单因素试验结果，拟定正交试验，以酶的用量、反应时间、温度、液比和pH五个因素作为考察对象，设计了5因素4水平的正交试验，以胶原蛋白的得率为考察指标，讨论5个因素的影响。

表 4.1 因素水平表

Tab4.1 Levels of factors

因子	水平			
	1	2	3	4
A 温度 (°C)	30	35	40	45
B 酶量 (%)	1	2	3	4
C 时间 (h)	4	6	8	10
D pH	6	7	7.5	8
E 液比	2	2.5	3	4

表 4.2 正交试验表
Tab4.2 Table of orthogonal experiments

试验号	A	B	C	D	E	得率 (%)
1	1	1	1	1	1	23.4
2	1	2	2	2	2	62.4
3	1	3	3	3	3	75.5
4	1	4	4	4	4	31.4
5	2	1	2	3	4	72.3
6	2	2	1	4	3	56.1
7	2	3	4	1	2	42.5
8	2	4	3	2	1	33.5
9	3	1	3	4	2	45.1
10	3	2	4	3	1	30.7
11	3	3	1	2	4	43.2
12	3	4	2	1	3	36.8
13	4	1	4	2	3	32.0
14	4	2	3	1	4	26.8
15	4	3	2	4	1	27.4
16	4	4	1	3	2	58.6

表 4.3 正交试验极差分析
Table4.3 range analysis of orthogonal experiments

K1	48.175	43.200	29.325	32.375	28.750
K2	51.100	44.000	35.725	42.775	52.150
K3	38.950	47.150	45.225	59.275	50.100
K4	36.200	40.075	45.050	40.000	43.425
极差 R	14.900	7.075	15.575	26.900	23.400

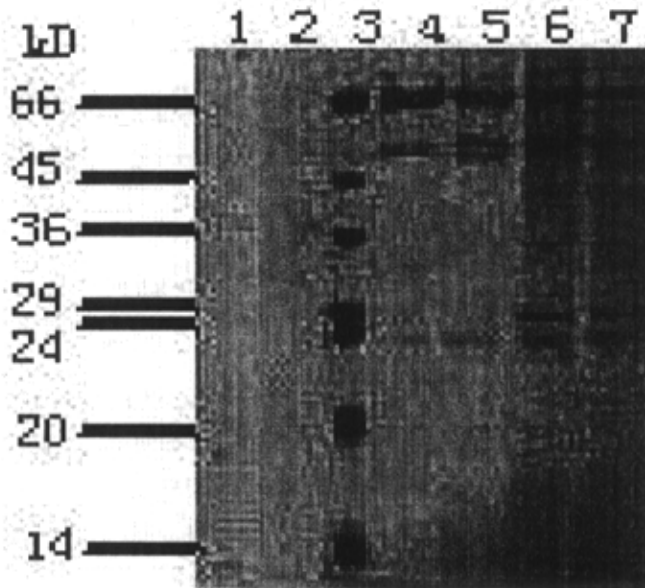
由正交试验的极差分析结果可知： $R_D > R_E > R_C > R_A > R_B$ ，最优方案是

A₂、B₃、C₃、D₃、E₂。从表 4.3 可知，pH 是影响水解产率的最主要因素，说明该酶在降解猪皮胶原的过程中对 pH 值的依赖很强，对 pH 值的变化很敏感。其次是液比、时间、温度和酶量。

由以上分析可得，胶原蛋白提取的最佳条件是：pH7.5、液比 2.5、反应时间 8h、温度 35℃、酶量 3%。

4.3.4 胶原蛋白分子量及氨基酸分析

4.3.4.1 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS - PAGE) 测定分子量分布



1. 空白样；2. 发酵酶液；3. 蛋白质分子量 Marker；4-7 不同水解时间 2、4、6 和 8h。

图 4.7 不同时间酶解所得胶原蛋白分子量对比

Fig 4.7 compare of molecular weight of collagen from different hydrolysis time

胶原蛋白多肽 SDS-PAGE 分析，发现其多肽并不是连续的，说明发酵液中胶原蛋白酶对猪皮的消化是特异的，具有特定的酶切位点，随着水解时间延

长，胶原蛋白多肽的分布也越来越宽的。66kD、47kD、29 kD 的蛋白质电泳带都比较明显。而 14 kD 以下的小分子多肽也存在。

4.3.4.1 氨基酸分析

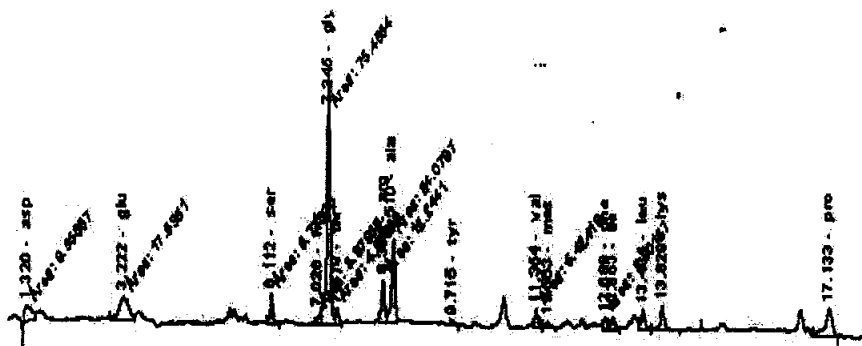


图 4.9 水解胶原蛋白的氨基酸组成
Fig4.9 Composition of amino acids in collagen proteins of hydrolysis

迄今为止，文献中已报道胶原家族多达 19 之多^[103]。新类型的胶原还在不断发现之中，它们在组织内的分布具有一定的组织特异性，如肌腱，皮肤中主要含有 I 型胶原；软骨中主要含有 II 型胶原；而血管壁、皮肤和各种软组织或器官的间质中却同时含有 I 型和 III 型胶原，只是在不同的器官中，这两种胶原含量的比例不同。III 型胶原常被看作是纤维性胶原的胚胎形式，而且相当大一部分是在胚胎时期和新生时期合成的。随着成熟的到来，III 型胶原逐渐被 I 型和具有更成熟交联结构的胶原代替；IV 型胶原只存在于基膜中；V 型胶原仅分布在细胞的外周。

猪皮水解胶原蛋白氨基酸组成分析结果见图 4.9 和表 4.4。比较牛皮胶原蛋白^[106,107]和本实验所得胶原蛋白的氨基酸组成可以看出，二者氨基酸组成、含量非常相似。此结果表明，本实验制备胶原蛋白多肽的方案不会破坏胶原的氨基酸组成。所得胶原蛋白多肽含有 18 种氨基酸，包括 20 种组成蛋白质基本氨基酸中的 16 种（不含有半胱氨酸(Cys)，色氨酸 (Trp) 天冬酰胺 (Asn)，谷氨酰

氨 (Gln) 和两种胶原蛋白特有氨基酸羟赖氨酸(Hyl), 羟脯氨酸(Hyp)。

表 4.4 胶原蛋白氨基酸组成 (残基个数/100g 个残基)

Tab4.4 Composition of amino acids in collagen proteins

氨基酸	胶原 (牛皮)	胶原蛋白液
甘氨酸(Gly)	33.4	32.24
苏氨酸(Thr)	1.7	1.65
精氨酸(Arg)	4.8	5.31
丙氨酸(Ala)	10.5	10.12
酪氨酸(Tyr)	0.47	0.35
亮氨酸(Leu)	2.5	2.70
赖氨酸(Lys)	2.5	2.10
脯氨酸(Pro)	12.9	12.20
谷氨酸(Glu)	7.2	7.40
丝氨酸(Ser)	3.8	2.9
组氨酸(His)	0.46	0.38
缬氨酸(Val)	1.9	2.15
异亮氨酸(Ile)	1.1	1.37
天冬氨酸(Asp)	4.8	4.70
甲硫氨酸(Met)	0.66	0.75
苯丙氨酸(Phe)	1.3	1.41
羟赖氨酸(Hyl)	0.68	0.55
羟脯氨酸(Hyp)	9.2	8.24
半胱氨酸(Cys)	—	—
色氨酸 (Trp)	—	—
天冬酰胺 (Asn)	—	—
谷氨酰胺 (Gln)	—	—

4.4 小结:

4.4.1 本文研究了以鲜猪皮为原料,使用自制发光杆菌 mbl15 胶原蛋白酶,制备胶原蛋白多肽的工艺条件。通过单因素和正交试验确定的最佳工艺条件是: pH7.5、液比 2.5、反应时间 8h、温度 35℃、酶量 3%。

4.4.2 通过 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳和氨基酸分析表明制备出的胶原蛋白多肽的分布主要在 66kD 以下,含有 18 种氨基酸。

5 结论

1. 本论文对发光杆菌 mb115 菌株形态观察和生理生化分析结果：该菌短杆状，单个或形成短链，能运动，不产生芽孢；透射电子显微镜下观察，可以看到该菌株都有明显的鞭毛，菌长 1-1.8 μm ，宽 0.5-1 μm ；菌落呈圆形、整齐光滑、半透明；该菌可以水解淀粉，利用柠檬酸盐，但耐盐性比较差，可以利用多种糖发酵产酸，具有很好的传代稳定性。
2. 本论文对发光杆菌 mb115 菌株产胶原蛋白酶发酵条件的研究表明，其产胶原蛋白酶最佳培养条件为牛肉膏 2%、蔗糖 2%、酵母粉 0.2%、 CaCl_2 0.04%、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.25%和 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05%；最佳碳源为蔗糖，氮源为牛肉膏，起始 pH6.5，摇瓶装量 10%，发酵温度 37 $^{\circ}\text{C}$ ，接种浓度 6%。对发光杆菌 mb115 发酵液中胶原酶性质的研究表明，该菌所产胶原酶的最适反应温度为 32 $^{\circ}\text{C}$ 、pH7.5，丝氨酸蛋白酶抑制剂 PMSF 几乎不影响粗酶液的酶活，金属蛋白酶抑制剂 EDTA、EGTA 抑制该菌产胶原酶的活性。
3. 本论文以鲜猪皮为原料，采用发光杆菌 mb115 所产胶原蛋白酶，研究了制备胶原蛋白多肽的反应条件。单因素正交试验确定的最佳反应条件是：pH7.5、液比 2.5、反应时间 8h、温度 35 $^{\circ}\text{C}$ 、酶量 3%。SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳和氨基酸分析表明，制备出的胶原蛋白多肽的分布主要在 66kD 以下，含有 18 种氨基酸。

参考文献

1. MacLennan J.D., Mandl I. , Howes E.L. Bacterial digestion of collagen[J]. J Clin Invest. 1953, 32(12): 1317-1322.
2. Gallop , Seifter. Preparation and properties of soluble collagens , Methods in Enzymology[M]. New York, Academic Press, 1963, 635.
3. Harrington DJ, Bacterial collagenases and collagen-degrading enzymes and their potential role in human disease[J]. Infect and Immunity, 1996, 64: 1885—1891.
4. Bozic CR, Gerard NP. The murine interleukin 8 type B receptor homologue and its ligands. Expression and biological characterization[J]. J. Biol. Chem., 1994, 269: 29355-29358.
5. Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S. Partial purification and characterization of a neutral protease which cleaves type IV collagen[J]. Biochemistry, 1981, 20(1): 100-104.
6. Wilhelm SM, Collier IE, BL Marmer. SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages [J]. J. Biol. Chem., 1989, 264: 17213-17221.
7. Laura Ravanti, Jyrki Heino. Induction of Collagenase-3 (MMP-13) Expression in Human Skin Fibroblasts by Three-dimensional Collagen Is Mediated by p38 Mitogen-activated Protein Kinase[J]. J. Biol. Chem., 1999, 274: 2446 - 2455.
8. Milagros Balbín, Antonio Fueyo, Vera Knäuper. Collagenase 2 (MMP-8) Expression in Murine Tissue-remodeling Processes[J]. J. Biol. Chem., 1998, 273: 23959 - 23968.
9. Reid GC, Woods DR, Robb FT. Peptone induction and rifampin-insensitive collagenase production by *Vibrio alginolyticus*[J]. J. Bacteriol., 1980, 142(2): 447-454.
10. DeCarlo A. A., Jr, Windsor L. J. Activation and novel processing of matrix metalloproteinases by a thiol-proteinase from the oral anaerobe *Porphyromonas gingivalis*[J]. J. Dent. Res., 1997, 76: 1260-1270.
11. Birkedal-Hansen H., Moore W. G. Matrix metalloproteinases: a review[J]. Crit. Rev. Oral. Biol. Med, 1993, 4: 197-250.
12. Kahari VM and Saarialho-Ker U. Matrix metalloproteinases in skin[J]. Exp Dermatol, 1997, 6(5): 199-213
13. Yoshihara, K., Matsushita, O., Minami, J. et al, 1994. Cloning and nucleotide sequence

- analysis of the colH gene from *Clostridium histolyticum* encoding a collagenase and a gelatinase. *J. Bacteriol.* 176 (21):6489-6496
14. Makinen PL, Clewell DB, Makinen KK, et al.. Purification and substrate specificity of a strongly hydrophobic extracellular metalloendopeptidase (gelatinase) from *Streptococcus faecalis* (strain OG1-10) [J]. *J Biol Chem*, 1989, 264:3325-3334
 15. I.Mandl. Bacterial collagenases and their clinical applications[J]. *Drug Res*, 1982, 32:1381-1384.
 16. Kuriyama N, Kuriyama H, Julin CM, et al. Pretreatment with protease is a useful experimental strategy for enhancing adenovirus-mediated cancer gene therapy[J]. *Hum Gene Ther.* 2000, 11(16):2219-2230.
 17. Labadie J, Montel MC. Purification and study of some properties of a collagenase produced by *Empedobacter collagenolyticum*[J]. *Biochimie*, 1982, 64(1): 49-53
 18. Lund T, Granum PE. The 105-kDa protein component of *Bacillus cereus* non-haemolytic enterotoxin (Nhe) is a metalloprotease with gelatinolytic and collagenolytic activity[J]. *FEMS Microbiol Lett*, Sep 1999, 178(2): 355-361.
 19. Nagano H, KA To. Purification of collagenase and specificity of its related enzyme from *Bacillus subtilis* FS-2[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, 64(1): 181-183.
 20. Labadie J. Synthesis of collagenase by the phytopathogenic bacterium *Corynebacterium rathayii*[J]. *J Appl Bacteriol*, 1990, 69(6): 828-33.
 21. Jackson RJ, Dao ML. Cell-associated collagenolytic activity by group B streptococci[J]. *Infect. Immun.*, 1994, 62: 5647 - 5651.
 22. Labadie J, Montel MC. Purification and study of some properties of a collagenase produced by *Empedobacter collagenolyticum*[J]. *Biochimie*, 1982, 64(1): 49-53.
 23. 金敏, 王忠彦, 胡承, 等. 产胶原酶地衣芽孢杆菌菌种的分离、筛选及发酵条件研究[J]. *四川大学学报(自然科学版)*, 2000, 37(5): 514-518
 24. Sasagawa Y, Izaki K, Matsubara Y. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding the collagenase from *Cytophaga* sp. L43-1 strain[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1995, 59(11): 2068-2073.
 25. Jung CM, Matsushita O, Katayama S. Expression of the colH gene encoding *Clostridium histolyticum* collagenase in *Bacillus subtilis* and its application to enzyme

- purification[J].Microbiol Immunol, 1996, 40(12): 923-929.
26. Endo A., Murakawa S. Purification and properties of collagenase from a Streptomyces species[J]. J. Biochem., 1987, 102: 163 - 170.
 27. Welton RL, Woods DR. Halotolerant collagenolytic activity of Achromobacter iophagus[J]. J Gen Microbiol, Mar 1973; 75(1): 191-6.
 28. Dreisbach JH, Merkel JR. Induction of collagenase production in Vibrio B-30[J]. J. Bacteriol., 1978, 135(2): 521-7.
 29. WARREN GH and GRAY J. A simplified culture medium for the production of collagenase[J]. Nature, 1961, 192: 755-756.
 30. MACLENNAN JD, MANDL I. Bacterial digestion of collagen[J]. J. Clin. Invest., 1953, 32(12): 1317-1322
 31. Takahashi S, Seifter S. New culture conditions for Clostridium histolyticum leading to production of collagenase of high specific activity[J]. J Appl Bacteriol, 1972, 35(4): 647-657.
 32. Sugawara R, Harper E. Purification and characterization of three forms of collagenase from Clostridium histolyticum[J]. Biochemistry, 1984, 23(22): 5175-5181.
 33. Lwebuga-Mukasa JS, Harper E. Collagenase enzymes from Clostridium: characterization of individual enzymes[J]. Biochemistry, 1976, 15(21): 4736-4741.
 34. I Emod and B Keil. Five Sepharose-bound ligands for the chromatographic purification of Clostridium collagenase and clostripain[J]. FEBS Lett, 1977, 77(1): 51-56.
 35. Bond MD and Van Wart HE. Characterization of the individual collagenases from Clostridium histolyticum[J]. Biochemistry, 1984, 23(13): 3085-3091.
 36. Bond MD and Van Wart HE. Relationship between the individual collagenases of Clostridium histolyticum: evidence for evolution by gene duplication[J]. Biochemistry, 1984, 23(13): 3092-3099.
 37. Bond M.D et al, Biochem biophy Res Comm, 1981, 23:243-249
 38. Welton RL and Woods DR. Collagenase production by Achromobacter iophagus[J]. Biochim Biophys Acta, 1975, 384(1): 228-34.
 39. Keil-Dlouha V, Misrahi R., Keil B. The induction of collagenase and a neutral proteinase by their high molecular weight substrates in Achromobacter iophagus[J]. J Mol Biol,

- 1976, 107(3): 293-305.
40. Keil-Dlouha V. Chemical characterization and study of the autodigestion of pure collagenase from *Achromobacter iophagus*[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1976, 429(1): 239-51.
 41. Bicsak TA, Harper E. Purification of nonspecific protease-free collagenase from *clostridium histolyticum*[J]. *Anal Biochem*, 1985, 145:286-291
 42. Emod I, Tong NT, Keil B. Chemical characterization of the homogeneous collagenase from *clostridium histolyticum*[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1981, 659:283-291
 43. Lwebuga-Mukasa JS, Harper E, Taylor P. Collagenase enzymes from *Clostridium*: characterization of individual enzymes[J]. *Biochemistry*, 1976, 15: 4736-4741
 44. Oppenheim f, Franzblau C. A modified procedure for the purification of clostridial collagenase[J]. *Prep Biochem*, 1978, 8:387-407
 45. Sugasawara R, Harper E. Purification and characterization of three forms of collagenase from *Clostridium histolyticum*[J]. *Biochemsty*, 1984, 23:5175-5181
 46. Makinen KK, Makinen PL. Purification and properties of an extracellular collagenolytic protease produced by the human oral bacterium *Bacillus cereus* (strain soc 67) [J]. *J Biol Chem*, 1987, 262: 12488-12495
 47. Keil-Dlouha V, Misrahi R, Keil B. The induction of collagenase and a neutral proteinase by their high molecular weight substrates in *achromobacter iophagus*[J]. *J Mol Biol*, 1976, 107:293-305
 48. Reid GC, Woods DR, Robb FT. Peptone induction and rifampin-insensitive collagenase production by *vibrio alginolyticus*[J]. *J Bacterial*, 1980, 142:447-454
 49. Keil-Dlouha V, Keil B. Subunit structure of achromobacter collagenase[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1978, 522:218-228
 50. Keudell K, Conte M. Enzymes of microbial isolates from infected pulp chambers-a preliminary report[J]. *J Endodont*, 1976, 2:217-219
 51. Lecroisey A, Keil B. Differences in the degradation of native collagen by two microbial collagenases[J]. *Biochem J*. 1979, 179(1):53-58.
 52. Nguyen TT, Dumas J, Keil-Dlouha V. New achromobacter collagenase and its immunological relationship with a vertebrate collagenase[J]. *Biochim Biophys Acta*,

- 1988, 955:43-49
53. Eiler H, Hopkins FM. Successful treatment of retained placenta with umbilical cord injections of collagenase in cows[J]. J Am Vet Med Assoc. 1993, 203(3): 436-43.
 54. Merkel JR, Dreibach JH, Ziegler HB. Collagenolytic activity of some marine bacteria[J]. Apple Microbiol, 1975, 29:145-151
 55. Harrington J. Bacterial collagenases and collagen-degrading enzymes and their potential role in human disease[J]. Infection and immunity, 1996, 64(6):1885-1891
 56. Tschesche H, Knauper V, Kramer S et al. Latent collagenase and gelatinase from human neutrophils and their activation. Matrix Suppl[J].1992 1:245-255.
 57. Toyoshima T, Matsushita O, Minami J, et al. Collagen-binding domain of a *Clostridium histolyticum* collagen exhibits a broad substrate spectrum both *in vitro* and *in vivo*[J]. Connect Tissue Res, 2001, 42:281-290
 58. Wilhelm SM, Collier IE. SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages [J]. J. Biol. Chem., Oct 1989; 264: 17213 - 17221.
 59. J.F Handsbrough Et al, J of Burn Care and Rehabilitation[J], 1994, 16: 214-247
 60. Soroff H.S, Sasvary O.H et al, J Buin Care Rehabili, 1994, 15(1):13-17
 61. H.s Horoff et al, J of Burn Care&Rehabilitation, 1994, 15:13-17
 62. Stefanov D, Georgieva R, Petrova L. Effect of collagenase from different sources on isolation of trophoblast cells[J]. In Vitro Cell Dev Biol. 27A(10):1991, 769-770.
 63. Klock G, Kowalski MB, Hering BJ, et al. Fractions from commercial collagenase preparations: use in enzymic isolation of the islets of Langerhans from porcine pancreas[J]. Cell Transplant.1996, 5(5):543-551.
 64. Downing R. Collagenase and human islet isolation[J]. Cell Transplant. 1997, 6(2):199.
 65. Hurion N., Fromentin, Keil H. Proteolytic enzymes of *Entromophthora coronata*, characterization of a collagenase[J]. comparative Biochemistry and physiology, 1997 56B:259-264
 66. Makino K., Oshima K., Kurokawa K., et al. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V cholerae*[J]. Lancet 361: 2003, 743-749
 67. Cerman Patent, 1, 029, 968, U.S. Patent 2, 908, 615 and Brit , P.817, 367, "Methods

- of Preparing Gelatin and Glue”
68. fujii T, An enzymatic method of producing gelatin. Bulletin of the society of scientific photography of Japan 1966, 16
 69. 余海, 钟伟, 等. 微型夹板在口腔颌面部骨折急诊处理中的应用[J].海南医学, 2000, 11 (3): 64-65
 70. 李斯明, 叶春婷, 等. 高纯度猪软骨 II 型胶原的制备与检测[J].生物医学工程学杂志, 2001, 18(4): 592-594
 71. Fedeli, Gianfranco;Cislaghi, Luigi;Vandoni, Guido.Extrationof collagen for Pharmaceutical and coametic use.PCT Int.Appl. WO 9405702, 1994
 72. Moldvai, Csongor.Production collagen.HU 63862(hung.Patent), 1993.
 73. 孙书臣.医用胶原的无变形提取方法, CN 1064970C. 1996
 74. 张铭让等.制革工业中的绿色化学与技术[J].化学进展, 1998, 10 (2): 185-194
 75. Milik, M.Afzal, Hafiz, Haque A . Protein concentration and commercial fat from limed hide scrap[J].Sci.Int.1993, 5(2):185-188
 76. Kumaraguru, S, Sastry, T.P, Rose, C.Hydrolysis of tannery fleshings using pancreatic enzymes: A biotechnological tool for solid waste management[J].J.Amer.Leather chemists Assoc, 1998, 93:32-39
 77. 蒋挺大, 张春萍.胶原蛋白[M].北京: 化学工业出版社, 2001:74-82
 78. 赵胜年.酶解鲜猪皮提取水解胶原蛋白的研究[J].食品工业科技, 1998, (5):16-17,
 79. 李开雄 赵志远.猪皮中胶原蛋白的提取及其应用[J].肉类研究, 1996, (4):43-46, 48
 80. Meyer, Michael, Harzer, Dieter. Preparation of water-soluble collagen degradation products from dried cow-hide pelt by shear stress[J]. Leder Haeutemarkt, 1999, 7: 27-31.
 81. Price N. C. Proteins LABFAX .Bios Scientific Publishers. Academic Press, 1996
 82. 段和平.胶原蛋白口服液及其制备方法, CN 1140089A.1995
 83. 沈萍, 范秀容, 李广武, 等.微生物学实验 (第三版) [M], 北京, 高等教育出版社, 1999, 214.
 84. 张龙翔, 张庭芳, 李令暖, 等.生化实验方法和技术[M], 北京, 高等教育出版社, 1997, 163-165.
 85. Rosen H. A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1957, 67: 10-1

86. 张纪忠.微生物分类学[M].复旦大学出版社, 1988, 89-109.
87. Mandl I, Maclennan JD, Howes EL.Isolation and characterization of proteinase and collagenase from *Cl. Histolyticum*[J]. J Clin Invest. 1953, 32(12):1323-1329.
88. Kim SK; Yang JY, Cha J. Cloning and sequence analysis of a novel metalloprotease from *Vibrio parahaemolyticus* 04[J].Gene, 2002, 283(1-2):277-283.
89. Kim Y.R, Lee SE, Kim Cm , etal.Characterization and pathogenic significance of *Vibrio vulnificus* antigens preferentially expressed in septicemic patients.Infect[J]. Immun. 2003, 71(10):5464-5471
90. Heidelberg JF, Eisen JA, Nelson WC.DNA sequence of both chromosome of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*[J]. Nature, 2000, 406(6975):477-483
91. Merkel JR, Dreisbach JH. Purification and characterization of a marine bacterial collagenase[J]. Biochemistry, 1978 17(14):2857-2863
92. Colowick S.P.Methods in Enzymology[M].New York:Academic Press, 1970.613.
93. Gisslow M.T, McBride B.C.A rapid sensitive collagenase assay[J].Anal Biochem 1975, 68:70
94. Bond M.D, Auld D.S, Lobb R.R, etal.A convenient fluorescent assay for vertebrate collagenases.Anal Biochem, 1986, 155:315
95. Nethery A, Lyons J.S, OGrady R.L.Aspectrophotometric collagenase assay.Anal Biochem, 1986, 159:390
96. Yoshioka H, Oyamada, Usuku G.An assay of collagenase activity using enzyme-linked immunosorbent assay for mammalian collagenase.Anal Biochem, 1987, 166:172.
97. Terato K, Nagai Y, Kawanishi K, etal.A rapid assay method of collagenase activity using ¹⁴C-labeled soluble collagen as substrate.Biochim Biophys Acta, 1976, 445:753.
98. 沈同, 王镜岩.生物化学[M].高等教育出版社, 1990, 97-98, 255
99. 奥斯泊, F., R.布伦特, RE.金斯顿, DD.穆尔等.精编分子生物学实验指南(Short Protocols in Molecular Biology)[M], 科学出版社 1999.
100. Koki M, Naveed B.K. Shams, LA., etal. Cleavage and activation of corneal matrix metalloproteases by *Pseudomonas aeruginosa* proteases[J]. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 1993, 34: 1945-1953.
101. Watanabe K.Collagenolytic proteases from bacteria[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2004,

- 63:520-526.
102. Miyoshi S, Nakazawa H, Kawata K, et al , 1998. Characterization of the hemorrhagic reaction caused by *Vibrio vulnificus* Metalloprotease, a member of the thermolysin family. *Infect Immun* 66: 4851-4855.
103. 景沛. 胶原蛋白质 (I-XVIII 型) [J]. 生命的化学, 1995, 15 (6): 30-31.
104. 胡胜, 李志强, 陈敏,, 皮胶原蛋白的酶法提取及在高附加值领域的应用[J]. 皮革科学与工程, 2002, 12 (5): 38-43.
105. 王碧, 林炜, 马春辉, 张铭让,, 皮革废弃物资源回用—胶原蛋白的利用基础、现状及前景[J]. 皮革化工, 2001, 18 (3): 10-14.
106. 成都科技大学, 西北轻工业学院编. 制革化学与工艺学[M]. 轻工业出版社, 1998
107. 沃德.A.G, 考茨.A, 李文渊译. 明胶的科学与工艺学[M]. 轻工业出版社, 1982
108. Yang G.Y., Xie J., Xu L. et al. Purification and Partial Characterization of a Collagenolytic Enzyme Produced by *Pseudomonas Aeruginosa* SCU Screened from rotten hides, 2004 高技术通讯英文版 (已接收)

攻读硕士期间科研成果

1. 徐宁, 杨光垚, 谢君, 张新申. 发光杆菌 mbl15 产胶原酶发酵条件的研究, 2004 皮革科学与工程 (已接收)
2. 杨光垚, 谢君, 徐宁, 等. 具胶原蛋白酶活性铜绿假单胞菌的筛选, 2004 微生物学通报(已接收)
3. Yang G.Y., Xie J., Xu L. et al. Purification and Partial Characterization of a Collagenolytic Enzyme Produced by *Pseudomonas Aeruginosa* SCU Screened from rotten hides, 2004 高技术通讯英文版 (已接收)
4. “天然活性蛋白质和肽的制备方法” (专利申请号: 02133462.5, 公开号: CN1403583A), 发明人之一;
5. “天然活性蛋白质和肽的分级制备方法” (专利申请号: 02133463.3, 公开号: CN1403471A), 发明人之一;
6. “天然活性蛋白质和肽的分离与纯化制备方法” (专利申请号: 02133461.7, 公开号: CN1403582A), 发明人之一;
7. 四川省科技成果“茶叶副产物综合利用研究”, 四川省科技厅 2003 年 03 月组织鉴定, 完成人之一;

声 明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师张新申教授指导下进行的研究工作。据我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包括其他人已发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得四川大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

本学位论文成果是本人在四川大学读书期间在导师指导下取得的，论文成果归四川大学所有，特此声明。

致 谢

本论文是在导师张新申教授的悉心指导和鼓励下完成，在此向他表示深深的谢意。张新申教授严谨的治学态度，渊博的专业知识以及对科学的执着追求是我永远的楷模。我将永远铭记恩师的谆谆教诲，在以后的学习和工作中更加孜孜不倦地追求和探索。在此要感谢已故导师张铭让教授对我的栽培，是他带领我走进了科学殿堂之门，并打下坚实的科研基础。特别感谢华南农业大学教授谢君博士，这几年来对我科研工作的指导和生活上的关心，使得本论文可以顺利完成。

同时感谢本实验室的蒋小平老师、陈荣义和顾红梅同学，以及其他老师和同学对我的帮助。另外，还要感谢四川大学分子生物学实验室张义正教授、向永录老师、杨光垚博士、孙讯博士、汪松虎同学和曾青春等的支持和帮助。

最后，我要感谢我的父母，谢谢他们长期以来对我的培养、关怀和教育，在离家七年的川大求学期间给了我无私的爱。