

文章编号:1673-1689(2011)06-0917-07

产骨胶原蛋白酶菌种的筛选与鉴定

刘丽莉, 杨协力

(河南科技大学 食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471003)

摘要: 从堆积骨骼的土样中经初筛、复筛和牛骨粉发酵实验, 筛选出高产骨胶原蛋白酶的菌种 MBL13(酶活 36.80 ± 1.93 U/mL)。经形态学观察、生理生化特性、16S rDNA 序列分析和傅里叶红外测定细胞结构, 鉴定该菌株为蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*), 并经牛骨胶原蛋白的酶解对比实验表明, MBL13 所产的酶酶解骨胶原蛋白的能力强于标准品骨胶原酶 I 型(美国)。由于酶解后产生的多肽条带并不是连续的, 说明发酵液中的胶原蛋白酶对牛骨胶原蛋白的酶解具有特定的酶切位点。

关键词: 蜡样芽孢杆菌; 骨胶原蛋白酶; 分离; 鉴定

中图分类号: TS 209

文献标识码: A

Isolation and Identification of a Strain with Producing Bone Collagenase

LIU Li-li, YANG Xie-li

(College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003, China)

Abstract: In this study, a novel strain MBL13 was isolated from screened the soil in the animal bone factories through screening methods. It was found that the strain could secreted 36.80 ± 1.93 U/mL collagenase in fermentation broth. Furthermore, the strain was identified as *Bacillus cereus* through morphology, physiology biochemistry characteristic, 16S rDNA sequencing and Fourier Transform Infrared determination. the collagenase secreted from MBL13 exhibited higher hydrolysis capacity on bovine bone collagen than that of type I collagenase (United States). It was believed that the collagenase from MBL13 has the specific restriction sites due to the bands of peptides generated after digestion was not continuous.

Key words: *Bacillus cereus*, bone collagenase, isolation, identification

胶原蛋白酶的研究始于 19 世纪末。胶原蛋白酶(Collagenolytic protease)定义为在适当的 pH 值和温度下, 只切割活性胶原螺旋区或明胶而不作用于其他蛋白底物的酶类^[1]。然而, 只有为数有限的蛋白酶具有独特的特点可以引起胶原蛋白的降解。胶原蛋白酶按照其来源可分为微生物胶原蛋白酶

和动物胶原蛋白酶^[2]。胶原蛋白酶在医学上可用于治疗异常增生, 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^[3]。细菌胶原酶可分泌到胞外, 通过发酵可大量获得, 微生

收稿日期: 2010-12-20

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAD05A17)。

* 通信作者: 刘丽莉(1974-), 女, 河南洛阳人, 工学博士, 副教授, 主要从事发酵工程、酶工程及畜产品科学方面的研究。Email: yangliuyilang@126.com

物来源的胶原酶在应用方面具有更广的应用范围^[4]。

随着我国养殖业迅猛发展,屠宰所产生的副产物是不可忽视的。骨骼是丰富的蛋白质资源,主要成份是胶原蛋白,骨胶原蛋白是胶原蛋白的一种。现今利用高新技术如酶技术对庞大的骨资源进行深加工,开发新型的功能性骨胶原多肽具有十分重要的经济价值成为研究的热点^[5]。作者从堆积骨骼的土样中筛选出骨胶原蛋白酶的产生菌株,以探讨应用工业化发酵大规模生产该酶的可能。在国内外产骨骼胶原蛋白酶菌株的筛选尚属空白。本文筛选到的一株高产骨胶原蛋白酶菌株 MBL13,对其进行鉴定,为应用微生物生产骨胶原蛋白酶奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 样品 堆积骨骼处的土样,共30份,采自洛阳、湖南等地。骨明胶购自衡水晶宇明胶有限公司。

1.1.2 仪器 ZHWY-2102C 型立式双层恒温摇床:上海智诚有限公司产品;SW-CJ-2D 型 双人单面净化工作台:苏州净化设备有限公司生产;YM75(Z) 不锈钢立式电热蒸汽消毒器:上海三申医疗器械有限公司生产;UV-1800 型紫外可见分光光度计:日本岛津生产;DYCZ-24DN 型双垂直电泳仪:北京六一仪器厂生产;HD-3000 型核酸检测仪、恒流泵、收集器:上海嘉鹏科技有限公司生产;JSM-6390 扫描电镜:日本电子株式会社生产;真空冷冻干燥机:LABCONCD,USA 产品;超速冷冻离心机:Avanti J-E, Beckman coulter,USA 产品。

1.1.3 试剂 可溶性 I 型胶原(Soluble type I collagen from calfbone)和骨胶原酶 I 型(酶活大于 125 U/mg)均购自 Sigma 公司;电泳所需的生化试剂为超纯试剂,分别购自美国 Sigma 公司和 Fluka 公司;低分子量标准蛋白购自上海升正生物技术公司;其他试剂均为分析纯。

1.1.4 培养基

1) 种子培养基为 LB 培养基(营养肉汤培养基)(1 000 mL):牛肉膏 10 g,蛋白胨 10 g,NaCl 5 g,pH 7.2。

2) 富集培养基(1 000 mL):骨明胶 5 g,NaCl 5 g,蛋白胨 5 g,pH 7.2~7.5。

3) 初筛培养基(1 000 mL):骨明胶 20 g,NaCl 0.1 g,葡萄糖 5 g,KH₂PO₄ 0.5 g,MgSO₄·7H₂O

0.2 g,pH 7.2~7.5。

4) 复筛培养基(1 000 mL):葡萄糖 20 g,酵母粉 1.5 g,胰蛋白胨 10 g,NaH₂PO₄·2H₂O 0.5 g,K₂HPO₄·3H₂O 2.5 g,CaCl₂ 0.05 g,pH 7.0~7.2^[6]。

5) 固体培养基:在上述液体培养基中加入 2.0% 琼脂,即相应固体培养基。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种分离 采集土样 1.0 g,加至 100 mL 无菌水中制成悬浮液,充分振荡后取 1 mL 悬浮液加入装有富集培养基的三角瓶中,180 r/min,37 °C 培养 48 h。然后在平板培养基上划线分离,于 37 °C 培养 2~3 d,长出菌落后,挑单一菌落转接到斜面培养基上。

1.2.2 菌种筛选

1) 初筛:将富集培养液梯度稀释涂布于初筛培养基的平板上,37 °C 培养 48 h,滴加酸性汞试剂在菌落周围,如菌落周围出现透明圈者为阳性。(酸性汞试剂:HgCl₂ 15 g,浓 HCl 20 mL,加蒸馏水至 100 mL)。

2) 复筛:选取透明圈直径与菌落直径之比较大的菌株,接种于种子培养基中,摇瓶培养 12 h,按体积分数 6% 的接种量转入复筛培养基,180 r/min,37 °C 培养 48 h。4 000×g,10 min 离心,取上清液测菌株产骨胶原蛋白酶的活力^[7-8]。

3) 牛骨粉发酵实验:新鲜牛骨→修整、破碎→加热熬煮去脂→去骨髓、骨油→高压蒸煮脱脂→风干→超微粉碎→过筛,获取 100 目骨粉颗粒

将 8 g 牛骨粉装入 250 mL 三角瓶内(料液比为 1:6 (g:mL)),然后在 121 °C 灭菌 30 min 后,将筛选菌株按体积分数 6% 的接种量接种于牛骨粉培养液中,在 37 °C、180 r/min 的条件下发酵培养 54 h。测定骨粉溶液的游离氨基态氮含量和胶原蛋白降解率;筛选出降解能力最强的菌株。

1.2.3 菌种鉴定

1) 菌株的形态学与生理生化特征分析:按《常见细菌系统鉴定手册》与微生物实验手册,进行培养和生理生化特征的观察^[9]。

2) 16S rDNA 序列测定与系统发育分析:细菌总 DNA 的抽提方法参照《精编分子生物学实验指南》^[10]。上游引物序列(27F):AGAGTTTGATC-CTGGCTCAG,下游引物序列(1492R):TACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT。PCR 反应体系(25 μL)为:10×buffer 2.5 μL,25 μmol/L 的 MgCl₂ 0.5 μL,2.5 mmol/L dNTP 0.5 μL,上游引

物 1 μL , 下游引物 1 μL , DNA 0.5 μL , 5 u/ μL 的 Taq 酶 0.5 μL , 超纯水 17.5 μL 。16S rDNA 的 PCR 扩增条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 57 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 总共 35 个循环。最后, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 维持。得到的 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 条带回收后由上海生工生物工程技术有限公司完成。对测序得到的核苷酸序列, 在 GenBank 数据库中进行相似序列检索, 用 Clustalx 软件进行序列分析, 应用 Phylip-3.6 软件构建系统发育树^[11]。

3) 细胞结构检测: 红外光谱法: 在 300 mL 的三角瓶装入 100 mL 培养液, 接种经活化 5 代的测定菌株 3 环。在 180 r/min 摇床上 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 将培养 2 d 的种子发酵液于 10 000 $\times g$, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 30 min, 获得菌体, 然后用 0.9 g/dL 的 NaCl 溶液洗涤 3 次。冷冻干燥后, 取少量菌体掺入溴化钾压片测定 4 000~400 cm^{-1} 红外光谱, 光谱分辨率为 4 cm^{-1} , 信号扫描累加 64 次, 得到菌体的红外光谱^[12]。

1.2.4 牛骨胶原蛋白的酶解实验 筛选到的 MBL13 菌接种于种子培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h 后, 4 000 $\times g$, 10 min 离心取上清液 6 mL, 加入到 2.0 g 经 121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min 的牛骨胶原蛋白中, 室温放置 1~3 d, 其间每隔 6 h 振荡 1 次, 观察牛骨胶原蛋白的酶解的情况, 并对酶解后产生的多肽液进行 SDS-PAGE 分析。实验以配制相同酶活的购自美国的骨胶原酶 I 型标准品作对照试验。

牛骨胶原蛋白制备: 商品牛长骨→清洗→剔除肌肉、腱、软骨、海绵骨、骨膜等→砸碎(1 cm $\times$ 2 cm)→水洗、沥干→乙醚回流脱脂→0.48 mol/L HCl 脱矿物质→粗骨胶原蛋白→酸提→透析→冷冻真空干燥→牛骨胶原蛋白

1.2.5 骨胶原蛋白酶活性的测定方法 采用茆三

酮显色法^[13]。取 0.01 mL 酶液, 加入 20 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5) 缓冲溶液溶解的 1 mg/mL 可溶性 I 型胶原 0.3 mL, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min, 然后加入 0.6 mL 10% 三氯乙酸(TCA) 终止反应, 以先加终止液的相同反应物为对照, 反应物 10 000 $\times g$ 离心 10 min, 取上清液 0.2 mL 加入 0.5 mL 茆三酮显色溶液, 充分混合后, 盖住试管口, 在 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热 15 min, 冰水冷却 5 min 后, 加入 2.5 mL 60% 丙醇稀释。充分混匀后, 570 nm 处比色。

酶活力单位定义为: 在 37 $^{\circ}\text{C}$, pH 7.5 条件下, 每分钟水解胶原产生相当于 1 μmol 亮氨酸的酶量为 1 个酶活力单位(U)。

1.2.6 牛骨粉的游离氨基态氮含量和牛骨胶原蛋白降解率 游离氨基态氮含量的测定: 双指示剂甲醛电位滴定法; 总氮含量测定: 用凯氏定氮法测定发酵液中的总氮含量; 可溶性氮测定: 取发酵液 10 mL 加入质量分数为 10% 三氯乙酸溶液 10 mL 与之混合, 放置 30 min 后在转速 5 000 r/min, 离心 10 min, 用凯氏定氮法测定上清液中可溶性氮的浓度^[14]。

胶原蛋白降解率(%) = 可溶性氮/样品中的总氮含量 $\times 100\%$

2 结果与讨论

2.1 菌种的筛选

2.1.1 初筛 以骨胶原为唯一的氮源, 筛选到 120 株能利用骨胶原蛋白的菌株, 其中绝大部分为细菌。在产生水解圈的菌株中, 水解圈直径与菌落直径之比大于 3.0 的菌株有 9 株。在培养 48 h 和 60 h 后, 测得其水解圈直径、菌落直径及水解圈直径与菌落直径比值见表 1 所示。

表 1 初筛菌的菌落与水解圈的大小

Tab. 1 Diameters of the screened strains colony and hydrolysis circles

菌株 编号	水解圈直径/mm		菌落直径/mm		水解圈直径/菌落直径(D)	
	48 h	60 h	48 h	60 h	48 h	60 h
MBL1	7 $\pm$ 0.53 ^d	11 $\pm$ 0.21 ^g	1 $\pm$ 0.03 ^d	1.5 $\pm$ 0.02 ^f	7 $\pm$ 0.04 ^e	7.33 $\pm$ 0.07 ^b
MBL4	12 $\pm$ 0.78 ^b	19 $\pm$ 0.24 ^d	2 $\pm$ 0.04 ^e	3 $\pm$ 0.02 ^d	6 $\pm$ 0.04 ^d	6.3 $\pm$ 0.04 ^d
MBL7	12 $\pm$ 0.45 ^b	17 $\pm$ 0.34 ^e	3 $\pm$ 0.01 ^b	5 $\pm$ 0.01 ^b	4 $\pm$ 0.02 ^f	3.4 $\pm$ 0.01 ^g
MBL13	21 $\pm$ 0.96 ^a	30 $\pm$ 1.02 ^a	2 $\pm$ 0.02 ^e	3 $\pm$ 0.03 ^d	10 $\pm$ 0.23 ^a	10 $\pm$ 0.23 ^a
MBL14	8 $\pm$ 0.12 ^{cd}	15 $\pm$ 0.64 ^f	1 $\pm$ 0.01 ^d	2 $\pm$ 0.01 ^e	8 $\pm$ 0.14 ^b	7.5 $\pm$ 0.21 ^b
MBL15	21 $\pm$ 0.73 ^a	28 $\pm$ 0.93 ^b	3 $\pm$ 0.03 ^b	4 $\pm$ 0.02 ^e	7 $\pm$ 0.16 ^e	7 $\pm$ 0.06 ^e
MBL18	9 $\pm$ 0.14 ^e	17 $\pm$ 0.33 ^e	2 $\pm$ 0.02 ^e	4 $\pm$ 0.03 ^e	4.5 $\pm$ 0.03 ^e	4.25 $\pm$ 0.03 ^e
MBL19	4 $\pm$ 0.05 ^e	10 $\pm$ 0.41 ^b	1 $\pm$ 0.01 ^d	3 $\pm$ 0.01 ^d	4 $\pm$ 0.02 ^f	3.3 $\pm$ 0.01 ^g
MBL31	20 $\pm$ 0.85 ^a	23 $\pm$ 0.76 ^c	5 $\pm$ 0.01 ^a	6 $\pm$ 0.04 ^a	4 $\pm$ 0.01 ^f	3.83 $\pm$ 0.02 ^f

注: 不同的小写字母上标表示有显著水平差异($P < 0.05$)。

经表 1 结果分析可知,这 9 个菌株之间不同程度地在统计学分析上存在着显著性的差异($P<0.05$),尤其是培养 60 h 以后比值 D,9 个菌株之间都存在显著性差异($P<0.05$)。其中 3 株细菌 MBL1、MBL13 和 MBL14 菌株产酶能力较强,培养 48 h 和 60 h 后水解圈的直径与菌落直径之比大于 7.0。初筛出这 3 株菌进行下一步筛选试验。

2.1.2 菌株的复筛和牛骨粉发酵的筛选实验结果

为便于筛选的菌株用于骨粉发酵,所以针对以上筛选的 3 株菌进行了产胶原蛋白酶的酶活测定及用于牛骨粉发酵,同时测定游离氨基酸态氮和胶原蛋白降解率,从中最终确定用于牛骨粉发酵降解的产胶原蛋白酶最强的自然菌株。

表 2 降解牛骨胶原蛋白菌株的筛选

Tab. 2 Screening of microbiology that degraded bovine bone collagen

菌株编号	胶原蛋白酶的酶活/(U/mL)	游离氨基酸态氮/%	胶原蛋白降解率/%
MBL1	28.27±1.78 ^b	2.64±0.09 ^b	13.98±0.14 ^b
MBL13	36.80±1.93 ^a	4.12±0.10 ^a	16.37±0.09 ^a
MBL15	26.12±1.95 ^b	2.45±0.08 ^b	10.95±0.10 ^c

注:不同的小写字母上标表示有显著水平差异($P<0.05$)。

根据表 2 中 3 菌株对牛骨粉进行发酵实验结果分析表明,3 菌株在对骨胶原蛋白降解率指标上存在着显著性的差异($P<0.05$),而对于酶活和游离氨基酸态氮指标,MBL1 和 MBL15 之间没有显著性差异($P>0.05$),而编号为 MBL13 所测定的胶原蛋白酶活力最强,达到(36.80±1.93) U/mL;且游离氨基酸态氮和胶原蛋白降解率都为 3 菌株中的最大值,分别为(3.92±0.10)%和(15.97±0.09)%。此结果表明菌株的降解骨粉的能力与产胶原蛋白酶活之间存在着正相关性。分析原因是由于在发酵过程中菌株分泌胶原蛋白酶,将大分子量胶原蛋白降解成氨基酸和小分子量的肽类,从而导致胶原蛋白含量下降,游离氨基酸态氮含量上升。因此,确定 MBL13 作为筛选到的产骨胶原蛋白酶菌株。

2.2 MBL13 菌株鉴定及生理生化特性

2.2.1 形态特征 在复筛固体培养基上,菌株的菌落为圆型、隆起、灰白色、不透明、大蜡滴样状菌落。光学显微镜和扫描电镜下观察,菌体呈单个杆状,无荚膜,有芽孢,革兰氏染色为阳性菌;菌株菌长 2 μm,宽 0.56 μm(见图 1)。

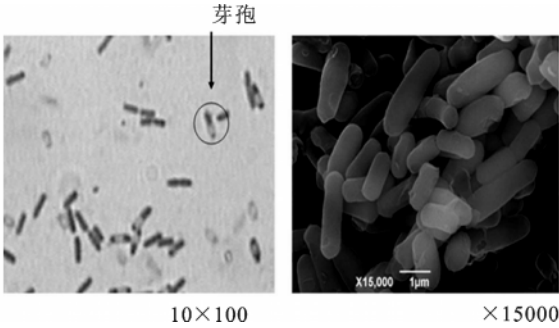


图 1 光学显微镜下 MBL13 菌的 G 染色和扫描电镜图
Fig. 1 The optical microscope G Staining and SEM photograph of MBL13

2.2.2 MBL13 菌株的生理生化特征 以枯草杆菌为对照,对 MBL13 的部分生理生化特征进行实验,结果见表 3。

表 3 MBL13 菌株的部分生理生化特征

Tab. 3 Physiological and bio-chemical characteristics of MBL13 strain

项目		MBL13	枯草芽孢杆菌
生长温度	25 ℃	+	+
	37 ℃	+	+
	46 ℃	+	+
革兰氏反应		+	+
抗溶菌酶		+	+
过氧化氢酶		+	+
V. P 反应		+	+
V. P 反应的 pH 值		5.92—6.48	6.0—6.4
pH=5.7 营养肉汤的生长		+	+
还原 NO ₃ ⁻		+	+
淀粉水解		+	+
明胶水解		+	+
干酪素分解		+	+
柠檬酸盐利用		+	+
耐盐性	2 g/dL	+	+
	5 g/dL	+	+
	7 g/dL	+	+
	10 g/dL	—	—
碳源产酸产气	葡萄糖	+	+
	麦芽糖	+	+
	乳糖	+	+
	蔗糖	+	+
	D-木糖	—	+
	D-甘露醇	—	—
阿拉伯糖		—	—

注:阳性:“+”,阴性:“—”。

根据以上 MBL13 菌的形态、部分生理生化测定,根据伯杰氏细菌鉴定手册(第八版)(RE 布坎南和 N E 吉本斯,1984)可初步把 MBL13 菌株定为芽孢杆菌属。为进一步证明菌株分类地位的可靠性,进行了分子鉴定。

2.2.3 16S rDNA 序列与发育树分析 16S rDNA 序列是细菌分子鉴定的重要指标,是细菌现代分类的基石。获得菌株部分长度 16S rDNA 序列(1 436 bp),向 GenBank 递交该序列(登录号:DQ148914),通过 Blast 程序与 GenBank 中核酸数据进行对比分析(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>),利用 RDP II 数据库(<http://rdp.cme.msu.edu>)与软

件 Phylip-3.6 构建系统发育树,结果见图 2。

分离菌株 MBL13 与 *Bacillus cereus* 和 *Bacillus thuringiensis* str. Al Hakam 的 16S rDNA 的相似性水平达到 98 % 以上,但结合菌株的形态学和生理学特性,可基本确定分离的菌株为蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)。

2.2.4 细胞结构检测 由于红外光谱素有分子指纹之称,采用傅里叶变换红外光谱非破坏性分析筛选到的菌株细胞结构,在 $4\,000\sim400\text{ cm}^{-1}$,信号扫描累加 64 次,获得完整细胞组分的红外光谱信息,经 OMNIC5.1 软件进行二阶导数转换处理,结果见图 3。

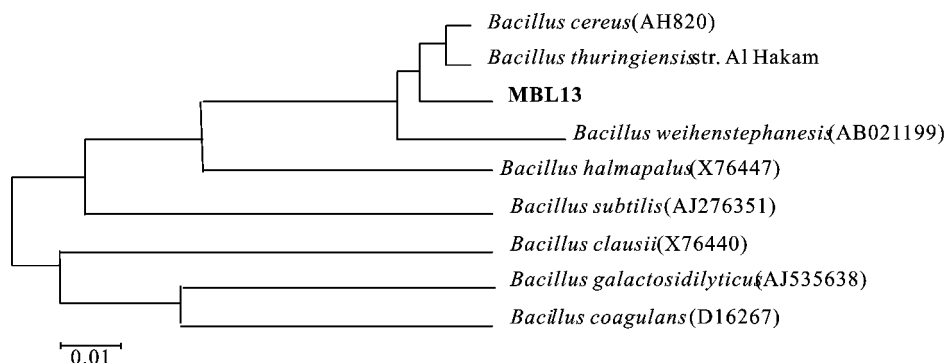
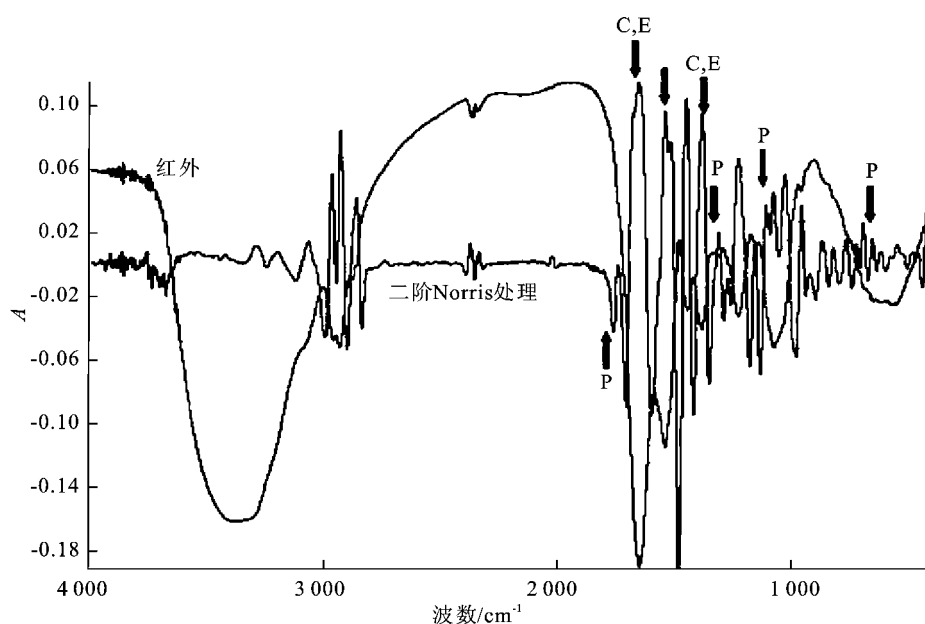


图 2 系统进化发育树结构图

Fig. 2 Phylogenetic tree of strain MBL13



C:荚膜; E:芽孢; P:多聚- β 羟基丁酸粒

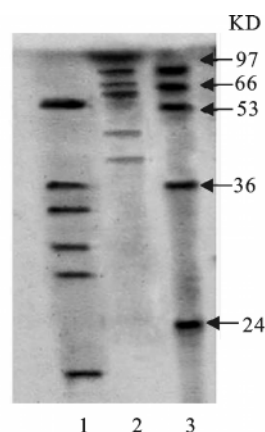
图 3 MBL13 菌的二阶导数红外光谱图

Fig. 3 Second derivative FTIR spectrum of MBL13 Strain

图3红外光谱图同时表达了多聚- β -羟基丁酸粒(PHB)、芽孢和荚膜的特征吸收峰。筛选到的菌株分别在 $1\,601\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,403\text{ cm}^{-1}$ 附近显示出反对称和对称的羧基伸缩振动吸收峰,显现出荚膜和(或)芽孢的存在。这种具有多肽荚膜结构的特征光谱在芽孢杆菌属,如:枯草芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌的光谱图中均同样存在。在 $1\,740\text{ cm}^{-1}$ 附近有一个很明显的酯基吸收峰,是PHB的主要特征吸收峰^[15]。因此,从红外光谱图分析表明该测定菌种完全符合蜡样芽孢杆菌的细胞结构特征。

2.3 牛骨胶原蛋白的酶解实验

将筛选到的MBL13菌进行液体培养,将其发酵液离心取上清液6 mL,测定其酶活,然后对2.0 g的牛骨胶原蛋白作室温酶解。同时以相同酶活的骨胶原酶I型标准品为对照组。实验表明该菌所产的酶在12 h开始酶解牛骨胶原蛋白,24 h酶解过半,36 h后完全酶解。标准对照组16 h才开始酶解,且36 h后酶解不完全。对酶解后的牛骨多肽液进行SDS-PAGE分析(见图4)。



1. MBL13 酶酶解 36 h 的胶原多肽液; 2. 标准骨胶原酶酶解 36 h 的胶原多肽液; 3. 标准蛋白质

图4 酶解牛骨胶原蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis collagenase digesting collagen of bovine bone

从图4可知,在MBL13的酶的多肽液中大部分多肽条带的分子量低于标准品酶骨胶原酶I型(对照组)。因此,结果表明MBL13所产的酶酶解骨胶原蛋白的能力强于标准品骨胶原酶I型。由于酶解后产生的多肽条带并不是连续的,说明发酵液中的胶原蛋白酶对牛骨胶原蛋白的酶解是特异的,具有特定的酶切位点。

3 结 语

胶原蛋白酶是一种经济价值较高的蛋白酶种,国外胶原蛋白酶的产生菌都是通过以胶原或重组胶原(reconstituted collagen)为底物筛选模型获得的,但这种方法涉及胶原的提取,操作复杂,胶原极易变性,成本较高。本研究利用骨明胶为唯一氮源的选择培养基,从堆积骨骼处筛选到一株高产胶原蛋白酶的菌株MBL13,通过形态、生理生化和分子生物学的鉴定,并经过红外光谱对其细胞结构检测,表明该菌株为蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*),其产酶酶活为36.80 U/mL。对牛骨胶原蛋白酶解表明该菌所产的为骨胶原酶,其酶解能力强于市场购买的标准骨胶原酶I型;且酶解具有特异性,有特定的酶切位点。因此,有重要的研究开发价值。

研究从堆积骨骼的土样中筛选到的降解专用菌株,为开发骨骼深加工提供新的思路。针对骨骼的酶解研究,相关报道很多,但有关骨专用的胶原蛋白酶的报道却很少。且目前我国有关胶原蛋白酶的生产,成本高,产量有限,限制了该酶的应用。本文的研究为解决工业化生产胶原蛋白酶提供了新型的专用生产出发菌,对我国酶制剂工业的发展有着积极的意义。

参考文献(References):

- [1] Peterkofsky B. Bacterial collagenase[M]. *Methods Enzymol*, 1982, 82:453-471.
- [2] Watanabe K. Collagenolytic proteases from bacteria[J]. *Appl Environ Microb and Appl Microbiol and Biotechnol*, 2004, 63 (5):520-526.
- [3] Gupta R, Beg Q K, Lorenz P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 59:15-32.
- [4] Swarna V Kanth, R Venba, B Madhan, et al. Studies on the influence of bacterial collagenase in leather dyeing[J]. *Dyes and Pigments*, 2008, 76(2): 338-347.
- [5] Olsen D, Yang C L, Bodo M, et al. Recombinant collagen and gelatin for drug delivery[J]. *Adv Drug Deli Rev*, 2003, 55

- (12): 1547—1567.
- [6] 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[J]. 微生物学通报, 2004, 31 (5): 43—48.
YANG Guang-yao, XIE Jun, XU ning, et al. Isolation and characterization of collagenolytic enzyme-producing strain from rotten hides and primary analysis of the enzyme property [J]. **Microbiology**, 2004, 31 (5): 43—48 (in Chinese).
- [7] Kim S K, Park P J, Kim J B, et al. Purification and characterization of a collagenolytic protease from the filefish *novodon modestus*[J]. **J Biochem Mol Biol**, 2002, 35 (2): 165—171.
- [8] 吴琦, 李军, 李陈, 等. 一株产胶原蛋白酶短小芽孢杆菌的分离与鉴定[J]. 中国皮革, 2007, 36 (17): 16—19.
WU qi, LI jun, LI chen, et al. Isolation and identification of a *Bacillus pumilus* with collagenase activity[J]. **China Leather**, 2007, 36 (17): 16—19 (in Chinese).
- [9] RE 布坎南, NE 吉本斯. 伯杰细菌鉴定手册(第八版)[M]. 北京: 科学出版社, 1984: 234.
- [10] 梁松平. 生物化学与分子生物学实验教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 2003, 18, 146—151.
- [11] 李玲, 陈林, 杨文革, 等. 一株他克莫司产生菌的筛选及鉴定[J]. 食品与生物技术学报, 2010, 29(3): 416—420.
LI Ling, CHEN Lin, YANG Wen-ge, et al. Isolation and identification of a tacrolimus producing strain[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2010, 29(3): 416—420 (in Chinese).
- [12] 万佳蓉, 马美湖, 周传云, 等. 蜡样芽孢杆菌的二阶导数红外光谱研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2007, 27 (5): 904—906.
WAN Jia-rong, MA Mei-hu, ZHOU Chuan-yun. Second derivative FTIR spectroscopic study of *Bacillus cereus*[J]. **Spectroscopy and Spectral Analysis**, 2007, 27 (5): 904—906 (in Chinese).
- [13] Kang S, Jang Y B, Choi Y J, et al. Purification and properties of a collagenolytic protease produced by marine bacterium *Vibrio vulnificus* CYK279H[J]. **Biotechnol Bioprocess Eng**, 2005, 10: 593—598.
- [14] 穆华荣, 于淑萍. 食品分析[M]. 化学工业出版社, 2004: 7.

《江南大学学报(自然科学版)》征稿、征订启事

《江南大学学报(自然科学版)》(双月刊)是由教育部主管、江南大学(国家“211 工程”重点建设高校)主办的自然科学类学术期刊。本刊主要刊载通信与控制工程、信息工程、机械工程、产品系统设计理论、纺织工程、应用化学、材料工程、土木工程、数理科学等学科的学术论文、研究报告,以及反映学科前沿研究动态的高质量综述。

本刊优先刊登国家自然科学基金和省部级及其以上科研项目析出论文,同时发表与企业及生产实际密切相关的应用性研究成果。热忱欢迎广大高校教学、科研人员及相关领域的专家、学者,在读硕士、博士研究生赐稿。

本刊为 A4 开本,128 页,每册订价 8.00 元;全年共 6 期,48.00 元;本刊邮发代号:28—189,全国各地邮局均可订阅,亦可向本刊编辑部直接订购。本刊可破季订阅。热忱欢迎广大读者订阅本刊。

邮编:214122 电子邮箱:xbzrkx@jiangnan.edu.cn

地址:江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号 电话:0510—85913519

江南大学学报(自然科学版)编辑部