

研究报告

## 产胶原酶的蜡样芽胞杆菌发酵条件优化及酶的分离纯化

李晔 张西轩 曹广秀 张真 阮海华\*

(天津商业大学生物技术与食品科学学院 天津市食品生物技术重点实验室 天津 300134)

**摘要:**【目的】优化蜡样芽胞杆菌 R75E 菌株产胶原酶的条件, 并通过蛋白分离纯化技术获得高纯度胶原酶。【方法】利用单因素及正交试验优化蜡样芽胞杆菌 R75E 产胶原酶的发酵条件及发酵培养基, 将发酵液离心除菌后得到粗酶液, 对其依次通过硫酸铵分级沉淀、Butyl FF 疏水层析及 Superdex™ 200 凝胶过滤层析等方法对目标胶原酶进行分离纯化, 利用 SDS-PAGE 电泳检测其纯度。【结果】优化后发酵条件为培养温度 41 °C、接种量 6%、培养时间 36 h, 优化后发酵培养基为葡萄糖 10 g/L、蛋白胨 5 g/L、起始 pH 7.0, 粗酶液酶活力较优化前提高了 2.9 倍; 将该粗酶液经过一系列纯化后得到纯度超过 90% 的胶原酶产物, 其纯化倍数和回收率分别为 18.4 和 1.1%。【结论】获得蜡样芽胞杆菌 R75E 的最佳产酶条件, 并对胶原酶分离纯化的方法进行了探索, 为微生物胶原酶的开发应用奠定基础。

**关键词:** 蜡样芽胞杆菌, 胶原酶, 发酵条件优化, 分离纯化

## Fermentation optimization and purification conditions for collagenase from *Bacillus cereus*

LI Ye ZHANG Xi-Xuan CAO Guang-Xiu ZHANG Zhen RUAN Hai-Hua\*

(Tianjin Key Laboratory of Food Science and Biotechnology, College of Biotechnology and Food Science, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China)

**Abstract:** [Objective] This paper aimed to investigate the optimal fermentation of collagenase-producing conditions from *Bacillus cereus* R75E and obtain the high purity collagenase by protein separation and purification techniques. [Methods] We optimized the fermentation conditions and fermentation mediums for maximum production of collagenase from *Bacillus cereus* R75E using single factor experiment and orthogonal test. The collagenase-containing crude enzyme was obtained after centrifuging from the overnight fermentation of *Bacillus cereus* R75E. Then, the target collagenase was sequentially purified by ammonium sulfate precipitation, Butyl FF hydrophobic chromatography and Superdex™ 200 gel filtration chromatography. Its purity was detected by

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 81101220, 31540066); Tianjin Municipal Science and Technology Commission (No. 12JCQJJC08100); Tianjin Young Backbone Talents Supporting Project; Tianjin Innovation Team Building Project (No. TD12-5049)

\*Corresponding author: Tel: 86-22-26686254; E-mail: ruanhaihua@tjcu.edu.cn

**Received:** July 08, 2015; **Accepted:** September 30, 2015; **Published online** (www.cnki.net): November 06, 2015

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(No. 81101220, 31540066); 天津市应用基础与前沿研究计划项目(No. 12JCQJJC08100); “十二五”天津市中青年骨干创新人才支持计划; 天津市创新团队建设项目(No. TD12-5049)

\*通讯作者: Tel: 86-22-26686254; E-mail: ruanhaihua@tjcu.edu.cn

**收稿日期:** 2015-07-08; **接受日期:** 2015-09-30; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2015-11-06

SDS-PAGE electrophoresis. **[Results]** The optimal fermentation conditions and mediums for maximum production of collagenase from *Bacillus cereus* R75E were as follows: the fermentation temperature was 41 °C, the inoculation volume was 6%, the fermentation time was 36 h, the carbon source was 10 g/L glucose, the nitrogen source was 5 g/L peptone, and the initial pH was 7.0. The total crude enzyme activity was increased by 2.9 times compared with that of the non-optimized control. Finally, the target collagenase was purified with a purity of more than 90%. The purification fold and recovery of the target collagenase were reached to 18.4 and 1.1%, respectively. **[Conclusion]** We get the optimum collagenase producing conditions from *Bacillus cereus* R75E and construct a technological process for collagenase purification, which lay a foundation for the development and application of microbial collagenase.

**Keywords:** *Bacillus cereus*, Collagenase, Fermentation conditions optimization, Purification

胶原酶的化学名为胶原蛋白水解酶 (Collagenase), 它能在生理 pH 和温度条件下特异性地降解难以被普通蛋白酶降解的天然胶原纤维<sup>[1]</sup>。根据来源可分为微生物胶原酶与动物胶原酶<sup>[2]</sup>。其中, 微生物胶原酶因底物范围广、酶切位点多、生产成本低等优点而被广泛应用<sup>[2]</sup>。商品化的微生物胶原酶主要是对 I 型胶原蛋白具有特异降解能力的胶原酶, 即 I 型胶原酶<sup>[3]</sup>, 目前广泛应用于医学和分子生物学等基础研究领域<sup>[4-7]</sup>。其中, 溶组织梭状芽孢杆菌(*Clostridium histolyticum*)所产的胶原酶应用最广, 研究背景最清楚, 其有效成分为胶原酶 G (Collagenase G, Col G)<sup>[8-9]</sup>。但这些胶原酶产品多为梭状芽孢杆菌培养物直接冻干而得的粗品, 其成分复杂、纯度普遍较低, 限制了胶原酶产品的应用范围。因此, 获得高纯度的胶原酶将具有重要的理论及工业应用价值。

本实验室从人初乳中筛选出一株产胶原酶的野生型蜡样芽孢杆菌 R75E (*Bacillus cereus* R75E), 并克隆到该胶原酶蛋白的编码基因 *colR75E* (GenBank 登录号 KP987200)。序列分析表明, 该基因与已报道的溶组织梭状芽孢杆菌(*Clostridium histolyticum*)胶原酶 ColG 的编码基因具有 69% 的相似性, 同属于 I 型胶原酶<sup>[8]</sup>。基于此, 本研究旨在提高野生型菌株胶原酶的产量, 着重优化该菌株产胶原酶的条件, 并利用一系列高效的蛋白分离纯化方法对目标蛋白进行分离, 最终获得纯度高于 90% 的蜡样芽孢杆菌胶原酶。这就克服了目前商业化胶

原酶成分复杂、纯度低的缺点, 为国内胶原酶的大规模生产应用奠定理论基础, 提高了胶原酶的应用范围。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种:** 蜡样芽孢杆菌 R75E (*Bacillus cereus* R75E)由本实验室分离、鉴定, 保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称 CGMCC), 保藏编号为 CGMCC 8614。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** 蛋白质 Marker, 立陶宛 Fermentas (MBI)公司; 牛跟腱来源的 I 型胶原蛋白, 北京索莱宝生物科技有限公司(Solarbio); 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、过硫酸铵、十二烷基硫酸钠(SDS)、考马斯亮蓝 R250/G250、TEMED, 美国 Amresco 公司; 其它试剂均为国产分析纯及常见生化试剂。

AKTA Purifier 10 蛋白纯化仪、HiTrap™ Butyl FF 疏水层析柱、Superdex™ 200 分子筛层析柱, 美国 GE Healthcare 公司; 超滤管(15 mL, 货号: R9EN00493), Millipore 公司。

**1.1.3 培养基:** 种子培养基与基础培养基均为 LB 液体培养基<sup>[10]</sup>。

### 1.2 方法

**1.2.1 粗酶液的制备:** 将蜡样芽孢杆菌 R75E 活化后接入 5 mL 种子培养基中, 37 °C、150 r/min 培养 12 h, 再以 2% 的接种量接入 50 mL 基础培养基中,

基础发酵条件为 37 °C、150 r/min。发酵结束后，将发酵液于 4 °C 条件下 12 000 r/min 离心 20 min，所得上清即为蜡样芽胞杆菌 R75E 所产胶原酶的粗酶液。

**1.2.2 酶活力测定：**胶原酶活性测定采用目前通用的 Mandl 法<sup>[11]</sup>，其酶活力单位(U)定义为：在 37 °C、pH 7.5 及存在 0.36 mmol/L Ca<sup>2+</sup>的条件下，每分钟分解 I 型胶原蛋白(牛筋腱来源)释放 1 μmol 游离氨基酸所需的酶量为一个酶活力单位(1 U)。每个酶活力数值重复测定 3 次，取平均值。

**1.2.3 产酶条件优化：**将菌株接种到液体培养基中，于 150 r/min 条件下摇床培养，测定粗酶液中胶原酶活力。以提高胶原酶产量为目的，首先考察温度、接种量和时间 3 个因素对菌株产酶的影响，优化发酵条件；其次分析碳源、氮源及起始 pH 值 3 个因素对菌株产酶的影响，优化发酵培养基。

所有指标均设置 3 个平行实验，结果以平均值±标准差表示；单因素及正交试验的结果均采用 SPSS 软件进行统计分析。

**1.2.4 蛋白浓度的测定：**蛋白浓度测定采用考马斯亮蓝法<sup>[12]</sup>，以牛血清白蛋白为标准品。

**1.2.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE 电泳)：**按照文献[13]的方法进行电泳，其分离胶浓度为 10%，上样量为 20 μL。

**1.2.6 胶原酶谱法：**基于明胶酶谱法<sup>[14]</sup>，将凝胶中的明胶替换为终浓度为 0.1%的 I 型胶原蛋白。

**1.2.7 蜡样芽胞杆菌胶原酶的分离纯化：**(1) 硫酸铵分级沉淀：在最佳产酶条件下发酵、制备粗酶液，依次向 5 等份粗酶液中加入硫酸铵粉末，使其盐最终饱和度分别达到 0、20%、40%、60%、80%。在 0 °C 条件下过夜沉淀蛋白，12 000 r/min 离心 20 min 后取上清；进而继续向对应的 5 份上清中依次加入硫酸铵粉末，使其盐饱和度依次提高至 20%、40%、60%、80%、100%，相同条件下沉淀过夜后离心，弃上清、留沉淀；最终，所得沉淀即依次为在盐饱和度和区间为 0–20%、20%–40%、40%–60%、

60%–80%、80–100%条件下沉淀所得的蛋白。用 0.2 mol/L 的 PBS (Na<sub>2</sub>HPO<sub>3</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>3</sub>, pH 7.4)缓冲液分别复溶，用胶原酶谱法检测后确定活力最高的组分，依此选择最佳的蛋白沉淀条件。

(2) Butyl FF 疏水层析：用 10 倍柱体积内含 1 mol/L 硫酸铵的 PBS 缓冲液(pH 7.4, 0.02 mol/L)平衡 HiTrap<sup>TM</sup> Butyl FF 疏水层析柱，同时向活力最高的沉淀组分复溶液中补加硫酸铵，调整其电导率值至 170 mS/cm 即可上样。上样结束后，利用 10 倍柱体积柱平衡所用的 PBS 缓冲液润洗柱子。以 PBS 缓冲液(pH 7.4, 0.02 mol/L)进行线性梯度洗脱，设定 40 min 内电导率由 170 mS/cm 降至 0 mS/cm，收集单位为 1 mL/管。该纯化过程中流速恒定为 1.0 mL/min，用 SDS-PAGE 电泳检测洗脱产物。将含有目标胶原酶的洗脱液合并，并用 15 mL 的超滤管(最小截留分子量为 10 kD)进行超滤浓缩。

(3) Superdex<sup>TM</sup> 200 凝胶过滤层析：将疏水层析后获得的胶原酶超滤浓缩液上样至 Superdex<sup>TM</sup> 200 分子筛层析柱，洗脱缓冲为 PBS 缓冲液(pH 7.4、0.02 mol/L)，同时按照 1 mL/管的体积单位收集蛋白峰，该纯化过程的流速均设为 0.5 mL/min。洗脱结束后用 SDS-PAGE 电泳检测蛋白洗脱情况，将含有目标胶原酶的洗脱液合并，并用 15 mL 的超滤进行超滤浓缩。最后用 Quantity One-4.6.2 (Basic) 软件对所得胶原酶的电泳结果进行扫描分析，鉴定所得胶原酶蛋白的纯度。

## 2 结果与分析

### 2.1 蜡样芽胞杆菌 R75E 产酶条件的优化

产酶条件的优化包括优化发酵条件及发酵培养基两大部分，采取先单因素后正交的试验模式，以粗酶液的活力值作为衡量指标，逐步优化并提高蜡样芽胞杆菌 R75E 的胶原酶产量。

**2.1.1 优化发酵条件的单因素试验：**选取发酵温度、发酵时间、接种量 3 个因素分别研究其对于蜡样芽胞杆菌 R75E 产胶原酶的影响。

(1) 发酵温度：如图 1A 所示，随着发酵温度的

逐渐升高, 所得粗酶液的活力值也随之平缓升高, 直至 41 °C 时达到最高值。然而, 当发酵温度超过 41 °C 后, 粗酶液的活力值急剧下降, 49 °C 时粗酶液的活力值仅为最高值的 35.3%。由此表明: 蜡样芽孢杆菌 R75E 产胶原酶的最佳发酵温度应为 41 °C。

(2) 发酵时间: 如图 1B 所示, 使培养温度保持在 41 °C, 分析不同发酵时间对蜡样芽孢杆菌 R75E 产胶原酶的影响。当发酵时间介于 12–24 h 时, 所得粗酶液的活力值总体趋于稳定, 于发酵 24 h 时达到最大值。此后, 随着培养时间的延长, 胶原酶活力开始逐渐下降, 超过 42 h 后活力值会显著降低。由此表明: 蜡样芽孢杆菌 R75E 产胶原酶的最佳发酵时间应为 24 h。

(3) 发酵接种量: 将蜡样芽孢杆菌 R75E 以不同的接种量在 41 °C 下培养 24 h, 由此分析不同接种量对蜡样芽孢杆菌 R75E 产胶原酶的影响。如图 1C 所示, 随着接种量提高所得粗酶液的活力值呈现先增后减的总体趋势, 当接种量为 4% 时其活力值最大, 即为最佳发酵接种量。

**2.1.2 发酵条件的正交试验:** 采用  $L_9(3^4)$  正交试验研究发酵条件对蜡样芽孢杆菌 R75E 菌株产胶原酶的影响, 具体试验设计及结果见表 1。

由表 1 可知, 各因素影响蜡样芽孢杆菌 R75E 菌株产酶的主次顺序为:  $A>B>C$ 。蜡样芽孢杆菌 R75E 产胶原酶的最佳发酵条件为  $A_2B_3C_3$ , 即发酵温度为 41 °C、发酵接种量 6%、发酵时间 36 h, 按该条件重复发酵后所得粗酶液的活力值提高至  $13.21 \times 10^{-3}$  U/mL, 优化效果显著。

**2.1.3 发酵培养基的单因素试验:** 按 2.1.2 中所得的最佳发酵条件, 分析碳源、氮源及起始 pH 值 3 个因素分别对蜡样芽孢杆菌 R75E 菌株产酶的影响, 优化发酵培养基。

(1) 碳源: 向基础培养基中分别加入含量为 1% (质量体积比) 的 3 种碳源, 结果如表 2 所示, 以葡萄糖作为碳源效果最佳, 所得粗酶液的活力值最高; 其次为可溶性淀粉; 而蔗糖作为碳源时, 活力值最低。

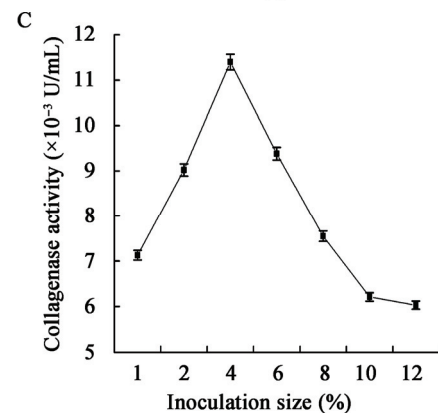
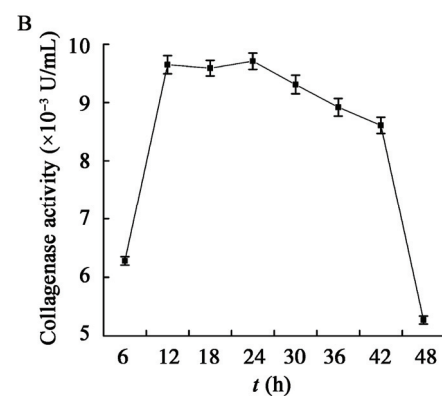
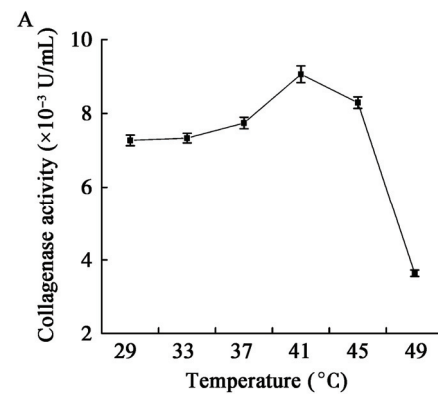


图 1 发酵温度(A)、时间(B)及接种量(C)对酶活力的影响

Figure 1 Effects of temperature (A), time (B) and inoculation size (C) on collagenase production from *Bacillus cereus* R75E

(2) 氮源: 用含量为 1% (质量体积比) 的牛肉提取物、蛋白胨和明胶作为氮源, 研究 3 种氮源对蜡样芽孢杆菌 R75E 产酶的影响。结果如表 3 所示, 依据所得粗酶液的活力值大小, 可知蛋白胨作为氮源效果最佳。

表 1  $L_9(3^4)$  优化 R75E 菌株产胶原酶发酵条件的试验结果  
Table 1  $L_9(3^4)$  orthogonal test of fermentation conditions for collagenase production from *Bacillus cereus* R75E

试验号 Number	A 发酵温度 A Temperature (°C)	B 发酵接种量 B Inoculation size (%)	C 发酵时间 C Time (h)	D 空列 D Vacant column	酶活力 Enzyme activity ( $\times 10^{-3}$ U/mL)
1	1(37)	1(2.0)	1(12)	1	6.15
2	1	2(4.0)	2(24)	2	6.58
3	1	3(6.0)	3(36)	3	9.19
4	2(41)	1	2	3	8.50
5	2	2	3	1	12.80
6	2	3	1	2	8.71
7	3(45)	1	3	2	3.82
8	3	2	1	3	3.24
9	3	3	2	1	9.29
$K_1$	7.31	6.16	6.03	9.41	
$K_2$	10.00	7.54	8.12	6.37	$T=91.00$
$K_3$	5.42	9.06	8.60	6.98	
$R$	4.58	2.90	2.57	3.04	

表 2 不同碳源对酶活的影响  
Table 2 Effects of various carbon sources on collagenase production from *Bacillus cereus* R75E

碳源 Carbon source (1%)	酶活 Enzyme activity ( $\times 10^{-3}$ U/mL)
可溶性淀粉 Soluble starch	9.00 $\pm$ 0.14
葡萄糖 Glucose	14.11 $\pm$ 0.16
蔗糖 Sucrose	2.13 $\pm$ 0.04

表 3 不同氮源对酶活的影响  
Table 3 Effects of various nitrogen sources on collagenase production from *Bacillus cereus* R75E

氮源 Nitrogen source (1%)	酶活 Enzyme activity ( $\times 10^{-3}$ U/mL)
牛肉提取物 Beef extract	11.71 $\pm$ 0.14
蛋白胨 Peptone	15.05 $\pm$ 0.13
明胶 Gelatin	8.03 $\pm$ 0.12

(3) 起始 pH 值：以 1%葡萄糖为碳源、1%蛋白胨为氮源，研究不同起始 pH 值对蜡样芽胞杆菌 R75E 产酶的影响。结果如表 4 所示，随着起始 pH 值的升高，所得粗酶液的活力值呈现先缓增后骤减的趋势，其中起始 pH 值 7.0 时活力值最高，且高于 8.0 的起始 pH 值不适于蜡样芽胞杆菌 R75E 的发酵。

**2.1.4 发酵培养基的正交试验：**采用  $L_9(3^4)$  正交试验研究发酵培养基对蜡样芽胞杆菌 R75E 菌株产胶原酶的影响，具体试验设计及结果见表 5，方差分析见表 6。

由表 5 可知，各因素影响 R75E 菌株发酵产酶的主次顺序为：A>C>B，即由大到小依次为碳源含量、起始 pH 值、氮源含量。由表 6 可知，因素 A 和 C 的各水平间存在显著差异( $P<0.05$ )，说明因素 A 和因素 B 值对蜡样芽胞杆菌 R75E 产酶影响较大，因此只能选择在正交试验中有最大 K 值的水平。因素 B 没有显著差异，说明氮源含量在正交设计的 3 水平内对产酶无显著影响。因此，最后确定蜡样

表4 不同起始 pH 对酶活的影响  
Table 4 Effects of various original pH on collagenase production from *Bacillus cereus* R75E

起始 pH Original pH	酶活 Enzyme activity ( $\times 10^{-3}$ U/mL)
6.0	7.50 $\pm$ 0.08
6.5	11.33 $\pm$ 0.11
7.0	15.38 $\pm$ 0.12
7.5	14.93 $\pm$ 0.13
8.0	12.21 $\pm$ 0.08
8.5	1.70 $\pm$ 0.03

芽孢杆菌 R75E 菌株产胶原酶的最佳发酵培养基组成为 A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>C<sub>2</sub>, 即葡萄糖 10 g/L、蛋白胨 5 g/L、起始 pH 值为 7.0, 按该条件重复发酵后所得粗酶液的活力值提高至  $22.38 \times 10^{-3}$  U/mL, 优化效果显著。

综上所述, 蜡样芽孢杆菌 R75E 产酶的最佳条件包括: 发酵温度为 41 °C、发酵接种量为 6% 与发酵时间 36 h 构成的发酵条件, 以及碳源为葡萄糖(10 g/L)、氮源为蛋白胨(5 g/L)且起始 pH 值为 7.0 的发酵培养基。

## 2.2 胶原酶分离纯化

**2.2.1 硫酸铵分级沉淀:** 按照 1.2.7 所述方法, 对

最佳产酶条件下获得的粗酶液进行硫酸铵分级沉淀, 获得了在 0–20%、20%–40%、40%–60%、60%–80%、80%–100% 共 5 个盐饱和度区间对应的蛋白沉淀组分。对上述沉淀复溶后进行胶原酶谱检测及 SDS-PAGE 电泳检测。其中, 胶原酶谱检测结果如图 2A 所示, 在 40%–60% 的硫酸铵沉淀组分中, 可以在 110 kD 处观察到最明显的负染条带, 表明在该盐饱和度区间绝大多数目标胶原酶可被沉淀下来; 其对应的 SDS-PAGE 电泳检测结果如图 2B 所示, 在相应的 110 kD 的位置能明显观察到目标胶原酶条带。综上所述, 硫酸铵分级沉淀可以显著浓缩目标胶原酶蛋白, 为下游的分离纯化奠定了良好的开端。

**2.2.2 Butyl FF 疏水层析:** HiTrap™ Butyl FF 疏水层析柱洗脱曲线如图 3A 显示, 电导率值降低过程中分别在其降到 100 mS/cm 及 40 mS/cm 时先后出现了洗脱峰 a 及洗脱峰 b。将洗脱峰 a 和洗脱峰 b 相应的洗脱液进行 SDS-PAGE 电泳检测, 结果如图 3B 显示, 在泳道 3–5 中出现 110 kD 的目标胶原酶, 表明目标胶原酶蛋白在峰 b 对应的洗脱液中, 而洗脱峰 a 中对应大量的杂蛋白。综上, 通过疏水层析

表5 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)优化 R75E 菌株产胶原酶发酵培养基组成的试验结果  
Table 5 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) orthogonal test of medium composition for collagenase production from *Bacillus cereus* R75E

试验号 Number	A 葡萄糖 A Glucose (g/L)	B 蛋白胨 B Peptone (g/L)	C 起始 pH C Original pH	D 空列 D Vacant column	酶活力 Enzyme activity ( $\times 10^{-3}$ U/mL)
1	1(5)	1(5)	1(6.5)	1	12.5
2	1	2(10)	2(7.0)	2	13.8
3	1	3(15)	3(7.5)	3	10.3
4	2(10)	1	2	3	22.5
5	2	2	3	1	16.0
6	2	3	1	2	19.3
7	3(15)	1	3	2	14.7
8	3	2	1	3	17.3
9	3	3	2	1	19.6
K <sub>1</sub>	12.20	16.57	16.37	16.03	T=194.67
K <sub>2</sub>	19.27	15.70	18.63	15.93	
K <sub>3</sub>	17.20	16.40	13.67	16.70	
R	7.07	0.87	4.96	0.77	

表 6 方差分析结果  
Table 6 Variance analysis results

变异源 Source of variation ( <i>SV</i> )	平方和 Sum of squares ( <i>SS</i> )	自由度 <i>df</i>	均方 Mean square ( <i>MS</i> )	<i>F</i> 值 <i>F</i> value	<i>P</i> 值 <i>P</i> value
A	79.208 9	2	39.604 44	76.000 00	0.012 99
B	1.268 9	2	0.634 44	1.217 48	0.450 96
C	37.095 6	2	18.547 78	35.592 75	0.027 33
D	1.042 2	2	0.521 11		
误差 Error	1.042 2	2	0.521 11		
总和 Sum	118.615 6				

将大量的杂蛋白与目标胶原酶分开，对后续的纯化非常有利。进一步将含有目标胶原酶的洗脱液合并进行超滤浓缩，检测结果如图 3C 所示：超滤后胶原酶蛋白的浓度显著提高，且杂蛋白的分子量都分布在 70 kD 以下，目标蛋白与杂蛋白分子量差异

显著。

**2.2.3 Superdex™ 200 凝胶过滤层析：**基于疏水层析所得产物中目标胶原酶与杂蛋白的分子量差异较大，因此进一步利用 Superdex™ 200 分子筛进行分离。如图 4A 所示，分子筛分离的全过程中共出现 8 个蛋白峰(a-h)。利用 SDS-PAGE 电泳逐峰检测，其主要结果如图 4B 所示，可知目标胶原酶主要分布于蛋白峰 d 中。此外，目标胶原酶所在的泳道中无明显可见的杂蛋白。进一步将蛋白峰 d 对应的收集液进行超滤浓缩并用 SDS-PAGE 电泳检测其浓缩产物，结果如图 4C 所示，利用 Quantity One-4.6.2 (Basic)软件对中胶原酶蛋白所在泳道进行灰度分析，结果表明胶原酶蛋白的纯度为 91.3%，即目标胶原蛋白酶被成功分离纯化。

结合上述结果，对每一步纯化所得的产物进行活力测定，结果如表 7 所示：数据表明经过一系列分离纯化的步骤，最终获得了纯度高于 90% 的胶原酶，其比活力达到 8.289 U/mg，纯化倍数达到 18.4 倍。

### 3 讨论

近年来，在高纯度生物酶的分离纯化工艺中，层析是一项最关键的技术，与其它分离技术相比，它具有分离效率高、适用性广、过程易于放大和易于自动化等特点，因而得到了广泛的应用<sup>[15]</sup>。但迄今为止，层析技术应用于微生物胶原酶纯化的报道及产品甚少，主要原因是野生型微生物的胶原酶产

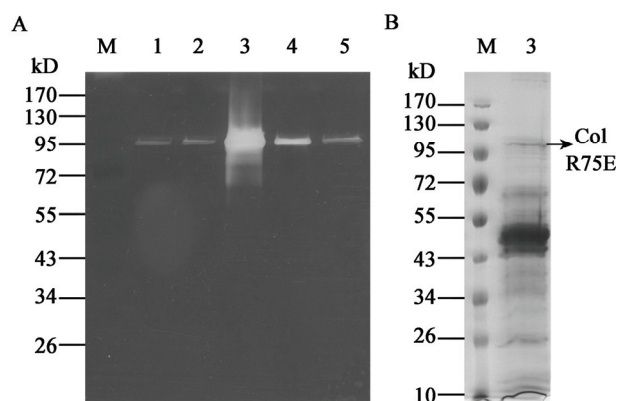


图 2 硫酸铵分级沉淀的胶原酶谱以及 SDS-PAGE 电泳检测结果

Figure 2 Zymography and SDS-PAGE analysis of the purified collagenase protein by ammonium sulfate precipitation

注：A：胶原酶谱法检测硫酸铵分级沉淀所得蛋白；B：SDS-PAGE 电泳检测 40%–60%饱和度硫酸铵沉淀后所得蛋白。M：标准蛋白 Marker；1–5：均为硫酸铵分级沉淀所得蛋白，其硫酸铵浓度分别为 0–20%，20%–40%，40%–60%，60%–80%，80%–100%。

Note: A: Zymography analysis of samples by ammonium sulfate precipitation; B: SDS-PAGE analysis of 40%–60% ammonium sulfate precipitated protein. M: Marker; 1–5: Precipitated proteins by ammonium sulfate, the concentration of ammonium sulfate is 0–20%, 20%–40%, 40%–60%, 60%–80%, 80%–100%, respectively.

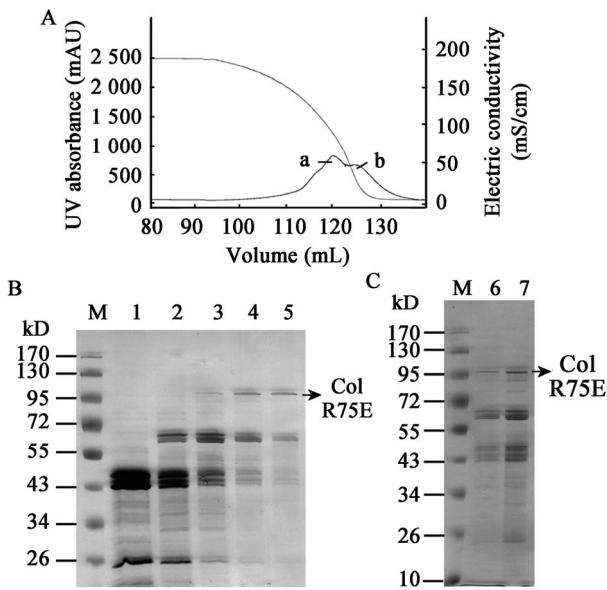


图3 疏水层析洗脱曲线及洗脱蛋白的 SDS-PAGE 电泳图  
Figure 3 Elution curve of butyl FF hydrophobic chromatography and SDS-PAGE detection of eluted proteins

注: A: 疏水层析洗脱峰图; B: 疏水层析洗脱蛋白的 SDS-PAGE 电泳图; C: 疏水层析所得蛋白超滤前后的 SDS-PAGE 电泳图。  
M: 标准蛋白 Marker; 1-2: 洗脱峰 a 对应的洗脱液; 3-5: 洗脱峰 b 对应的洗脱液; 6: 超滤前的洗脱液; 7: 超滤后的洗脱液。  
Note: A: Elution profile of butyl FF hydrophobic chromatography; B: SDS-PAGE analysis of elutions by butyl FF hydrophobic chromatography; C: Comparison of eluted protein before and after ultrafiltration by SDS-PAGE. M: Marker; 1-2: Eluted proteins correlated to peak a; 3-5: Eluted proteins correlated to peak b; 6: Combined 3-5 eluted proteins before ultrafiltration; 7: The concentrated protein after ultrafiltration.

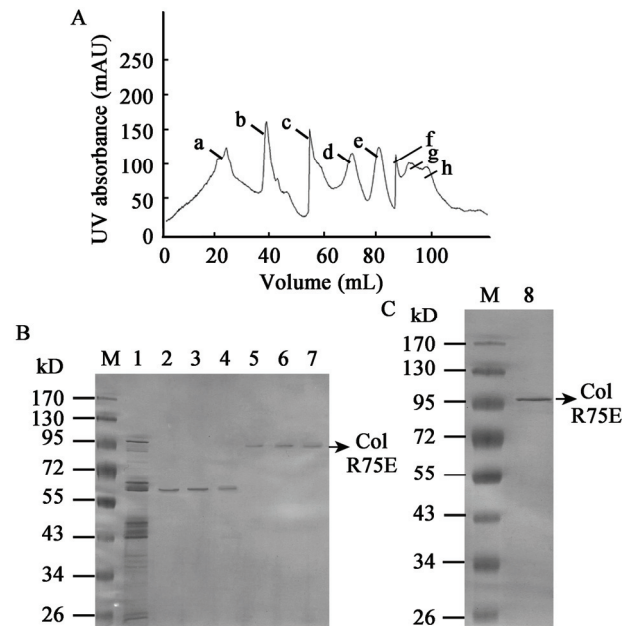


图4 分子筛层析监测曲线及 SDS-PAGE 电泳图  
Figure 4 Curve of protein by Superdex™ 200 gel filtration and SDS-PAGE detection of eluted proteins

注: A: 凝胶过滤层析蛋白检测峰图; B: 蛋白 SDS-PAGE 电泳图; C: 目标胶原酶超滤浓缩后的 SDS-PAGE 电泳图。M: 标准蛋白 Marker; 1: 过柱前的蛋白样品; 2-4: 峰 c 对应的收集液; 5-7: 峰 d 对应的收集液; 8: 超滤浓缩后的目标胶原酶样品。  
Note: A: Elution curve of protein by Superdex™ 200 gel filtration; B: SDS-PAGE analysis of protein from both of curve c and curve d; C: SDS-PAGE analysis of concentrated collagenase from curve d. M: Marker; 1: The sample before Superdex™ 200 gel filtration; 2-4: Protein correlated to curve c; 5-7: Proteins correlated to peak d; 8: Concentrated collagenase by ultrafiltration from curve d.

表7 蜡样芽孢杆菌胶原酶分离纯化  
Table 7 Purification of collagenase by *Bacillus cereus* R75E

纯化步骤 Purification step	体积 Volume (mL)	总蛋白 Protein (mg)	比活力 Specific activity (U/mg)	总活力 Proteolytic activity (U)	纯化倍数 Fold	回收率 Recovery (%)
粗酶液 Crude enzyme	667	33.10	0.451	14.93	1.0	100
40%-60%硫酸铵沉淀 40%-60% ammonium sulfate precipitation	10	6.56	0.631	4.14	1.4	27.7
疏水层析 Butyl FF hydrophobic chromatography	3	0.67	2.164	1.45	4.8	9.7
超滤浓缩 Ultrafiltration	1	0.35	3.065	1.07	6.8	7.2
凝胶过滤层析 Superdex™ 200 gel filtration	5	0.03	6.671	0.21	14.8	1.4
超滤浓缩 Ultrafiltration	1.5	0.02	8.289	0.17	18.4	1.1



量较低，且所得发酵液成分复杂。本研究在胶原酶产生菌蜡样芽胞杆菌 R75E 最佳产酶条件下，利用硫酸铵分级沉淀及两步柱层析法实现了胶原酶的分离纯化，最终得到纯度为 91.3% 的胶原酶。在该酶的分离纯化过程中，根据胶原酶的理化性质、分子量及酶活特性<sup>[16]</sup>，选择合适的酶活检测方法(胶原酶谱)和符合理化性质的层析柱，将极大地提高酶纯化的效率。在 Nagano 等<sup>[17]</sup> 2000 年建立的枯草芽胞杆菌 FS-2 (*Bacillus subtilis* FS-2) 胶原酶的纯化方法中，采用了四步柱层析：DEAE Sepharose-CL6B、CM-cellulose、Butyl-Toyopearl 650M、Sephadex-G75。与之相比，本研究所涉及的纯化方法有以下优势：

(1) 通过目标胶原酶的结构预测确定层析步骤的顺序。在层析方法的选择上，本研究除了参考胶原酶的理化性质外，更结合了胶原酶的结构预测结果。首先由 ProtParam 在线分析平台预测胶原酶理化性质，结果显示其等电点 pI 为 5.30，总平均疏水指数(GRAVY)为-0.692，表明该蛋白为稳定的亲水性蛋白。由以上理化性质可初步判断柱层析的第一步应为疏水层析或用阴离子交换层析。但 Phyre<sup>2</sup> 在线分析平台预测目标胶原酶与胶原酶 Col G 结构相似(相似性 69%)<sup>[8]</sup>，均为以一个  $Zn^{2+}$  为活性中心的金属蛋白酶<sup>[8,18-19]</sup>。因此为了最大程度保留胶原酶的活力，防止活性中心的金属离子的丧失，柱层析的第 1 步应选用疏水层析，而不是阴离子交换层析。

(2) 提高层析效率，减少柱层析步骤。根据疏水层析洗脱液的电泳结果，由于目标胶原酶与杂蛋白之间分子量差距在 40 kD 以上，所以选择凝胶过滤层析。凝胶过滤层析所需的设备简单、操作方便、分离迅速且不影响分子的生物学活性<sup>[20]</sup>。通过两步柱层析成功实现了目标胶原酶的分离。由于柱层析相应配套的层析设备和装置复杂而又昂贵<sup>[15]</sup>，所以与 Nagano 等<sup>[17]</sup> 的四步柱层析纯化胶原酶的方法相比，本研究的纯化方法既更多地保留了胶原酶活力，又大大降低了纯化的成本。

从胶原酶的比活力角度而言，本研究中纯化得到的胶原酶比活力为 8.289 U/mg，与现在市场上商品化梭状芽胞杆菌所产 I 型胶原酶标准品(Sigma 公司，货号：c0130)的 0.417 U/mg 的比活力值相比，高近 19.9 倍。

目前，我国在微生物胶原酶的应用还处于刚起步阶段，由于高纯度胶原酶的提取工艺复杂、生产成本高，国内市场依赖大量高价进口胶原酶产品，限制了微生物胶原酶的应用。因此，基于微生物胶原酶的最佳产酶条件建立分离纯化手段具有广泛的工业应用前景。

## 参考文献

- [1] Jin M, Li JW, Wang ZY. Researches on collagenase secreted by microbes[J]. Amino Acids and Biotic Resources, 2003, 25(1): 3-8 (in Chinese)  
金敏, 李君文, 王忠彦. 微生物胶原酶研究进展[J]. 氨基酸和生物资源, 2003, 25(1): 3-8
- [2] Mandl I. Bacterial collagenases and their clinical applications[J]. Arzneimittelforschung, 1981, 32(10A): 1381-1384
- [3] van Wart HE, Steinbrink DR. Complementary substrate specificities of class I and class II collagenases from *Clostridium histolyticum*[J]. Biochemistry, 1985, 24(23): 6520-6526
- [4] Kin T, Johnson PRV, Shapiro AMJ, et al. Factors influencing the collagenase digestion phase of human islet isolation[J]. Transplantation, 2007, 83(1): 7-12
- [5] Tokmina-Roszyk M, Tokmina-Roszyk D, Bhowmick M, et al. Development of a Förster resonance energy transfer assay for monitoring bacterial collagenase triple-helical peptidase activity[J]. Analytical Biochemistry, 2014, 453: 61-69
- [6] Ostlie DJ, Juang D, Aguayo P, et al. Topical silver sulfadiazine vs collagenase ointment for the treatment of partial thickness burns in children: a prospective randomized trial[J]. Journal of Pediatric Surgery, 2012, 47(6): 1204-1207
- [7] Chen C, Li GH, Chen AM. Culture of rabbit osteoblasts digested by collagenase in DMEM containing fetal bovine serum[J]. Chinese Journal of Clinical Rehabilitation, 2006, 10(41): 223-225
- [8] Eckhard U, Schönauer E, Nüss D, et al. Structure of collagenase G reveals a chew -and -digest mechanism of bacterial collagenolysis[J]. Nature Structural and Molecular Biology, 2012, 18(10): 1109-1114
- [9] Eckhard U, Huesgen PF, Brandstetter H, et al. Overall, Proteomic protease specificity profiling of *Clostridial* collagenases reveals their intrinsic nature as dedicated degraders of collagen[J]. Journal of Proteomics, 2014, 100: 102-114
- [10] Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. Huang PT Trans. Beijing: Science Press, 2002: 1595-1604 (in Chinese)  
萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2002: 1595-1604
- [11] Mandl I, MacLennan JD, Howes EL, et al. Isolation and characterization of proteinase and collagenase from *Cl. histolyticum*[J]. The Journal of Clinical Investigation, 1953, 32(12): 1323-1329

- [12] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72 (1/2): 248-254
- [13] Ausubel FM, Kingston RE, Seidman JG, et al. Short Protocols in Molecular Biology[M]. Translated by Ma XJ and Shu YL. Beijing: Science Press, 2005: 379-404 (in Chinese)  
奥斯伯 FM, 金斯顿 RE, 赛德曼 JG, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 马学军, 舒跃龙, 译. 北京: 科学出版社, 2005: 379-404
- [14] Kocabiyyik S, Erdem B. Intracellular alkaline proteases produced by thermoacidophiles: detection of protease heterogeneity by gelatin zymography and polymerase chain reaction (PCR)[J]. Bioresource Technology, 2002, 84(1): 29-33
- [15] Pu Y, Wang ZX. Advancement of ion exchange chromatography and hydrophobic interaction chromatography media application in protein chromatography[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2004, 20(6): 975-982 (in Chinese)  
浦宇, 王芝祥. 蛋白质层析用离子交换和疏水作用层析介质的发展概况[J]. 生物工程学报, 2004, 20(6): 975-982
- [16] Bao SX, Yao RH. Separation and purification of protein and recent advances in chromatography[J]. Journal of South China University of Technology (Natural Science), 1996, 24(12): 98-103 (in Chinese)  
鲍时翔, 姚汝华. 蛋白质分离纯化与层析技术进展[J]. 华南理工大学学报: 自然科学版, 1996, 24(12): 98-103
- [17] Nagano H, To KA. Purification of collagenase and specificity of its related enzyme from *Bacillus subtilis* FS-2[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2000, 64(1): 181-183
- [18] Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, et al. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis[J]. Nature Protocols, 2015, 10(6): 845-858
- [19] La Rocca G, Pucci-Minafra I, Marrazzo A, et al. Zymographic detection and clinical correlations of MMP-2 and MMP-9 in breast cancer sera[J]. British Journal of Cancer, 2004, 90(7): 1414-1421
- [20] Shi W, Yu T. Protein chromatography separation[J]. Inner Mongolia Agricultural Science and Technology, 2011(1): 110-112 (in Chinese)  
史伟, 禹婷. 蛋白质的层析分离[J]. 内蒙古农业科技, 2011(1): 110-112

## 科技信息摘录

### 研究发现肠道菌群影响肥胖机制

一项新研究显示, 面对高脂饮食时, 肠道菌群会产生乙酸, 从而影响肥胖、胰岛素抵抗和代谢综合征。这项在啮齿动物中进行的研究显示, 乙酸短链脂肪酸有着激活副交感神经系统的功能。无论是乙酸生成增加, 还是接下来的副交感神经系统激活, 都可能为肥胖治疗提供新途径。

过往研究显示, 肠道菌群的变化与肥胖、胰岛素抵抗和代谢综合征有关, 但肠道菌群是如何导致这些症状的却一直不清楚。

美国耶鲁大学医学院 Gerald Shulman 研究团队显示, 与喂食了正常饮食的啮齿类动物相比, 被喂食了高脂饮食的啮齿类动物会产生更多的乙酸。研究显示, 乙酸生成的增加是肠道菌群导致的, 并且它们会激活副交感神经系统增加饥饿激素, 并且增加由葡萄糖刺激的胰岛素分泌。在这篇近日发表于《自然》的研究中, 研究人员发现, 这会形成一个正反馈循环, 导致食欲增强、食物摄入增加、体重增加、脂肪肝疾病以及胰岛素抵抗。

在同期发表的新闻观点文章中, 瑞士日内瓦大学 Mirko Trajkovski 和 Claes Wollheim 写道: “这项研究突出了之前不为人知的肠道菌群通过向大脑发送信号, 促进胰岛素分泌的作用。”此外, 研究显示这些微生物会影响食欲, 给研究肠道菌群如何引发肥胖提供了一个线索。

——摘自《科学网》2016-06-21

<http://paper.sciencenet.cn/htmlpaper/201662122554289439780.shtm>