

淡水湖渔场沉积物中产胶原蛋白酶菌株的筛选及发酵优化

唐白露¹, 谭朵朵¹, 黎梦姣¹, 李婧妮¹, 周芷洁¹, 王梓涵¹, 陈中元¹, 夏虎¹, 何海伦^{*2}

1 湖南文理学院生命与环境科学学院 常德市农业生物大分子研究中心 环洞庭湖水产健康养殖及加工湖南省重点实验室 水生动物重要疫病分子免疫技术湖南省重点实验室, 湖南 常德 415000

2 中南大学生命科学学院, 湖南 长沙 410013

唐白露, 谭朵朵, 黎梦姣, 李婧妮, 周芷洁, 王梓涵, 陈中元, 夏虎, 何海伦. 淡水湖渔场沉积物中产胶原蛋白酶菌株的筛选及发酵优化[J]. 微生物学通报, 2022, 49(7): 2715-2729

Tang Bailu, Tan Duoduo, Li Mengjiao, Li Jingni, Zhou Zhijie, Wang Zihan, Chen Zhongyuan, Xia Hu, He Hailun. Screening of a collagenase-producing strain from the sediments in fishing grounds of freshwater lakes and optimization of the fermentation conditions[J]. Microbiology China, 2022, 49(7): 2715-2729

摘要:【背景】胶原蛋白酶能够高效降解水不溶性的胶原蛋白, 在各行业中都有着广泛的应用。淡水湖渔场中大部分动物残骸中的胶原蛋白都会沉降到沉积物中, 因而其生态环境中应含有丰富的产胶原蛋白酶菌株。【目的】以环洞庭湖水系淡水湖渔场沉积物为样品, 筛选产胶原蛋白酶菌株, 并对其中一株产酶量和生物安全性均高的菌株进行鉴定及发酵产酶条件的初步研究, 以为胶原蛋白和胶原蛋白酶的工业生产及应用奠定基础。【方法】采用稀释涂布平板法和点种法筛选产胶原蛋白酶菌株, 通过茚三酮显色法测定发酵液胶原蛋白酶酶活, 并结合 16S rRNA 基因序列比对和系统发育分析确定产酶菌株的种类。采用滤纸片扩散法检测菌株抗生素敏感性和溶血性, 用溴甲酚紫显色法检测菌株氨基酸脱羧酶活性, 硝酸还原酶活性测定用试剂盒, 通过单因素试验法和正交试验法进行菌株产胶原蛋白酶发酵条件的优化。【结果】从环洞庭湖水系中的 4 个淡水湖渔场的表层沉积物中共筛选分离得到 113 株产胶原蛋白酶菌株, 并从中挑选一株来自东湖沉积物的产酶量和生物安全性均高的菌株, 该菌株为 *Exiguobacterium* 属细菌, 命名为 *Exiguobacterium* sp. DJ1。菌株 DJ1 的最佳产

基金项目: 湖南省教育厅科学研究项目(20C1270); 湖南文理学院校级科研项目(E07019031); 湖南文理学院微生物技术创新团队项目([2020] 26 号); 常德市农业生物大分子研究中心开放课题(2020AB07); 环洞庭湖水产健康养殖及加工湖南省重点实验室开放课题(2019KJ011)

Supported by: Scientific Research Project of Hunan Education Department (20C1270); Scientific Research Project of Hunan University of Arts and Sciences (E07019031); Microbial Technology Innovation Team Project of Hunan University of Arts and Sciences ([2020] 26); Open Project of Changde Research Center for Agricultural Biomacromolecule (2020AB07); Open Project of Hunan Provincial Key Laboratory for Health Aquaculture and Product Processing in Dongting Lake Area (2019KJ011)

*Corresponding author: E-mail: helenhe@csu.edu.cn

Received: 2021-11-19; Accepted: 2022-02-24; Published online: 2022-03-31

酶条件为: 30.0 g/L 明胶, 10.0 g/L 蛋白胨, 5.0 g/L 鱼粉, 0.5 g/L KH_2PO_4 , 0.2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g/L NaCl, pH 8.5, 3%的接种量, 28 °C 的培养温度, 100 mL/250 mL 的装液量。优化后的胶原蛋白酶活达(185.45±23.87) U/mL, 约为优化前的 3.7 倍。【结论】淡水湖渔场沉积物中含有丰富的产胶原蛋白酶菌株。菌株 DJ1 具有较高的产酶能力和生物安全性, 经发酵条件优化使该菌株的酶活提高了约 3.7 倍, 为胶原蛋白和胶原蛋白酶的工业化应用奠定了理论基础, 具有广阔的应用前景。

关键词: 胶原蛋白酶; 产胶原蛋白酶细菌; 湖泊沉积物; 发酵工艺

Screening of a collagenase-producing strain from the sediments in fishing grounds of freshwater lakes and optimization of the fermentation conditions

TANG Bailu¹, TAN Duoduo¹, LI Mengjiao¹, LI Jingni¹, ZHOU Zhijie¹, WANG Zihan¹, CHEN Zhongyuan¹, XIA Hu¹, HE Hailun^{*2}

¹ Hunan Provincial Key Laboratory for Health Aquaculture and Product Processing in Dongting Lake Area, Hunan Provincial Key Laboratory for Molecular Immunity Technology of Aquatic Animal Diseases, Changde Research Center for Agricultural Biomacromolecule, College of Life and Environmental Sciences, Hunan University of Arts and Science, Changde 415000, Hunan, China

² School of Life Science, Central South University, Changsha 410013, Hunan, China

Abstract: [Background] Collagenase can efficiently degrade water-insoluble collagen and is widely used in various industries. Most of the collagen from animal remains in fishing grounds of freshwater lakes will settle into sediments, and thus the ecological environment should be rich in collagenase-producing strains. **[Objective]** The collagenase-producing strains were screened from the sediments of freshwater lakes around Dongting Lake. Among them, a strain with high enzyme production and biosafety was identified and the fermentation conditions for enzyme production were optimized. The result is expected to lay a foundation for the industrial production and application of collagen and collagenase. **[Methods]** The collagenase-producing strains were screened with the spread plate method and the spot inoculation method. The collagenase activity of fermentation broth was determined by the ninhydrin colorimetry. Enzyme-producing strains were identified by 16S rRNA gene sequence alignment and phylogenetic analysis. Antibiotic sensitivity and haemolytic activity were detected with the disk diffusion method, amino acid decarboxylase activity by the bromocresol purple chromogenic assay, and nitrate reductase activity by nitrate reductase activity assay kit. Single factor experiment and orthogonal experiment were carried out to optimize the fermentation conditions for producing collagenase. **[Results]** A total of 113 collagenase-producing strains were screened out. Among them, a strain with high enzyme production and biosafety was selected from the sediment of East Lake in Huarong County, which was identified an *Exiguobacterium* strain and named *Exiguobacterium* sp. DJ1. The optimal enzyme production conditions of strain DJ1 were as follows: in 100 mL medium of 30.0 g/L gelatin, 10.0 g/L peptone, 5.0 g/L fish meal, 0.5 g/L KH_2PO_4 , 0.2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g/L NaCl in a 250 mL flask, with the initial pH of 8.5, inoculum of 3%, and culture

temperature of 28 °C. Under the optimized conditions, the activity of collagenase reached (185.45±23.87) U/mL, which was about 3.7 times higher than that before optimization. [Conclusion] There are abundant collagenase-producing strains in the sediments in fishing grounds of freshwater lakes. Strain DJ1 has high enzyme-producing capacity and biosafety. After optimization of fermentation conditions, the enzyme activity of strain DJ1 is increased by about 3.7 times, which lays a theoretical foundation for the industrial application of collagen and collagenase.

Keywords: collagenase; collagenase-producing bacteria; lake sediment; fermentation process

胶原蛋白具有复杂的三股螺旋超分子结构并在各结构层次中存在交联作用, 导致其具有极强的疏水性及分子稳定性, 所以大多数蛋白酶不具备良好的胶原蛋白降解能力。而胶原蛋白酶是一类在适宜条件下能高效降解胶原蛋白的酶类, 并且在胶原蛋白降解成胶原蛋白寡肽的过程中, 蛋白质的生物活性能被完整保留^[1]。胶原蛋白酶对胶原蛋白的特异降解性使其广泛应用于医学、食品、化工和饲料等领域^[2-3]。根据来源不同, 可将胶原蛋白酶分为两大类: 微生物来源的胶原蛋白酶和动物来源的胶原蛋白酶。动物胶原蛋白酶含量较少, 不易提取, 而微生物胶原蛋白酶具有可分泌到胞外、可通过发酵大量获取和易于分离提取等优点, 因此, 研究和开发微生物来源的胶原蛋白酶具有更广阔的应用前景和现实意义。目前研究较多的胶原蛋白酶产生菌主要有溶组织梭菌(*Clostridium histolyticum*)、产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)和溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)等^[4-6], 其制备的胶原酶已作为商品酶进行出售。随着对微生物胶原酶研究的不断深入, 大量新来源的胶原酶产生菌被报道。

淡水鱼的皮、骨、鳞和肉中都含有丰富的胶原蛋白, 由于胶原蛋白的水不溶性和复杂的三螺旋多肽结构, 大部分动物残骸中的胶原蛋白都会沉降到沉积物中。生态环境中存在多种与生存环境相适应的功能微生物, 因此, 淡水湖渔场沉积物中应含有丰富的产胶原蛋白酶菌

株。目前, 筛选分离自淡水湖沉积物中的产胶原蛋白酶菌株和胶原蛋白酶的相关研究较少。本文从环洞庭湖水系中的华容县东湖、澧县北民湖、津市西湖和汉寿县安乐湖 4 个淡水湖渔场的表层沉积物中筛选产胶原蛋白酶的菌株, 对其中一株产酶量和生物安全性均高的菌株进行 16S rRNA 基因序列比对和系统发育分析, 并对其发酵产酶条件进行初步研究, 以期为胶原蛋白和胶原蛋白酶的工业生产和应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

从环洞庭湖水系中的华容县东湖、澧县北民湖、津市西湖和汉寿县安乐湖 4 个淡水湖渔场采集表层沉积物, 使用 3 L 的抓斗式采泥器进行采样, 样品装入无菌袋中, 迅速带回实验室, -20 °C 保存。

1.1.2 主要试剂和仪器

明胶, 天津市科密欧化学试剂有限公司; 胶原蛋白, 上海麦克林生化科技有限公司; 含抗生素的滤纸片(青霉素, 10 μg/片; 氨苄西林, 10 μg/片; 哌拉西林, 100 μg/片; 头孢氨苄, 30 μg/片; 头孢唑啉, 30 μg/片; 头孢呋辛钠, 30 μg/片; 头孢他啶, 30 μg/片; 头孢曲松, 30 μg/片; 头孢哌酮, 75 μg/片; 阿米卡星, 30 μg/片; 庆大霉素, 10 μg/片; 卡那霉素, 30 μg/片; 链霉素, 10 μg/片; 四环素, 30 μg/片; 米诺环素,

30 $\mu\text{g}/\text{片}$; 红霉素, 15 $\mu\text{g}/\text{片}$; 林可霉素, 2 $\mu\text{g}/\text{片}$; 万古霉素, 30 $\mu\text{g}/\text{片}$; 多粘菌素 B, 300 IU/片; 多西环素, 30 $\mu\text{g}/\text{片}$), 湖南比克曼生物科技有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 北京全式金生物技术股份有限公司; 硝酸还原酶活性测定试剂盒, 南京建成生物工程研究所; 其他试剂均为分析纯。

抓斗式采泥器, 青岛聚创环保设备有限公司; 恒温振荡器, 上海一恒科学仪器有限公司; 台式冷冻离心机, 艾本德股份公司; 酶标仪, 伯腾仪器有限公司; 基因扩增仪, 杭州博日科技股份有限公司。

1.1.3 培养基

LB 液体/固体培养基按照文献[7]配制; 明胶筛选培养基按照文献[8]配制, 不加琼脂粉即为明胶发酵培养基; 氨基酸脱羧酶测定培养基按照文献[9]配制。

1.2 产胶原蛋白酶菌株的筛选

1.2.1 产胶原蛋白酶菌株的筛选分离

取 10 g 沉积物样品置于三角瓶中(含 50 颗玻璃珠, 90 mL 无菌水), 于 28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 充分混匀。用无菌水对上清液进行梯度稀释, 取 10^{-1} – 10^{-6} 稀释液各 100 μL 涂布于明胶筛选培养基上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2–3 d, 挑取有明显透明圈的菌株纯化培养备用。取 2 μL 纯化后的菌液 (OD_{600} 约等于 1.0) 点种到明胶筛选培养基上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 1 d 后测量透明圈和菌落直径。观察或测量透明圈时, 滴加酸性汞试剂(15 g HgCl_2 , 20 mL 浓盐酸, 加蒸馏水至 100 mL) 在菌落周围使透明圈更明显。

1.2.2 胶原蛋白酶酶活测定

菌液按 0.1% (体积分数) 接种量接种于明胶发酵培养基中(装液量为 50 mL/250 mL 锥形瓶), 于 28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养 1 d。取菌液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、13 000 r/min 离心 5 min, 留上清用于酶活测定。

甘氨酸标准曲线的制作步骤: 将 600 μL 不同浓度(0、0.6、1.2、2.4、3.6 mmol/L)的甘氨酸、600 μL 乙酸缓冲液(2 mol/L, pH 5.4)与 600 μL 茚三酮显色液混合后, 于 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中水浴 15 min, 室温冷却 10 min, 然后取 25 μL 反应液, 加入 175 μL 60%乙醇稀释后测量 OD_{570} 。酶促反应体系包括 1 mg 胶原蛋白、0.5 mL Tris-HCl (0.1 mol/L, pH 7.5, 含 10 mmol/L CaCl_2) 和 100 μL 合适稀释度的酶液, 28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 反应 30 min, 加入 500 μL 10%三氯乙酸终止反应, 13 000 r/min 离心 5 min 后进行茚三酮显色反应。测得反应液在 570 nm 处的吸光值后进行胶原蛋白酶酶活的计算。酶活单位定义为: 在 28 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 7.5 的条件下, 1 mL 酶液每分钟水解胶原产生相当于 1 μg 甘氨酸的酶量为 1 个酶活单位(U)^[10]。

1.3 产酶菌株的系统发育分析

参照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取基因组 DNA。以基因组 DNA 为模板, 采用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'), 参照文献[11]中的方法进行 16S rRNA 基因序列的扩增。将扩增得到的 DNA 片段送至擎科生物科技有限公司进行 DNA 测序, 测序结果通过 BLASTn 与 GenBank 和 EzTaxon 数据库中的序列进行比对。初步确定系统发育上的亲缘关系后, 选择近缘种进行系统发育分析。将菌株及其近缘种的 16S rRNA 基因序列通过 MEGA X 的 ClustalW 程序进行比对, 在 MEGA X 中使用邻接法构建系统发育树。用 bootstrap 值分析(1 000 个重复)来评估进化树的拓扑关系, 并使用 Jukes 和 Cantor 提出的模型对进化距离进行计算^[12]。

1.4 菌株安全性评价

利用含抗生素的滤纸片对菌株进行抗生素

敏感性检测实验。取 OD_{600} 约为 1.0 的菌液 200 μL 涂布于 LB 固体平板上, 平板表面贴上直径为 6 mm 的含抗生素的滤纸片, 于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 1 d 后, 依据抑菌圈直径大小, 参考文献[13]的方法判断菌株对抗生素的敏感性。使用血平板并采用滤纸片扩散法检测菌株的溶血性, 结果参照 Luis-Villaseñor 等^[14]的方法进行判定。将直径 6 mm 的无菌滤纸片贴在血平板表面, 取 OD_{600} 约为 1.0 的菌液 20 μL 滴加于滤纸片上, 于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 d, 观察菌株周围有无透明溶血环。菌株氨基酸脱羧酶活性检测时, 对照组 1 无氨基酸、不接菌, 对照组 2 无氨基酸、接菌, 3 个实验组分别含有 L-赖氨酸、L-精氨酸或 L-鸟氨酸。将菌液按 1% (体积分数) 的接种量接种于测定培养基中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 d, 观察培养基颜色变化^[15]。菌株硝酸还原酶活性测定按照硝酸还原酶活性测定试剂盒的说明书进行^[15]。

1.5 产胶原蛋白酶发酵条件实验方法

采用单因素试验法进行菌株产酶发酵培养基成分的优化, 分别进行无机盐组分(明胶发酵培养基组、无 KH_2PO_4 组、无 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 组、无 NaCl 组和无无机盐组)、碳源(以蔗糖、甘露糖、半乳糖或可溶性淀粉代替 2.5 g/L 的蛋白胨)和氮源(以 NH_4NO_3 、 KNO_3 、黄豆粉或鱼粉代替 2.5 g/L 的蛋白胨)的优化。采用 $L_{16}(4^5)$ 正交表设计三因素四水平正交试验对碳源含量、氮源含量及明胶含量进行优化, 正交试验的因素和水平见表 1。采用单因素试验法进行菌株产酶发酵培养条件的优化, 分别进行接种量(0.1%、1%、3%、5%、10%、15%、20%) (体积分数)、初始 pH 值(5.5、6.5、7.5、8.5、9.5)、培养温度(15、28、37、45 $^{\circ}\text{C}$)和装液量(10、25、50、100、150 mL)的优化。

表 1 正交试验的因素及水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment

水平	因素		
Level	Factor		
	明胶	蛋白胨	鱼粉
	Gelatin (%)	Peptone (%)	Fish meal (%)
1	0.5	0.10	0.25
2	1.0	0.25	0.50
3	2.0	0.50	1.00
4	3.0	1.00	2.00

2 结果与分析

2.1 胶原蛋白酶产生菌的筛选结果

使用明胶筛选培养基, 结合梯度稀释法和点种法, 从 4 个淡水湖渔场的表层沉积物中共筛选分离得到 113 株具有明显水解圈的产胶原蛋白酶菌株(透明圈与菌落直径比 >1.00)。菌株分布情况如图 1 所示, 从汉寿县安乐湖表层沉积物中筛选分离得到的产胶原蛋白酶菌株的数量最多, 占总量的 51%, 其中 84% 的菌株透明圈与菌落直径比 ≥ 2.00 , 最大值为 3.47。从华容县东湖表层沉积物中筛选分离得到的产胶原蛋白酶菌株的数量仅次于汉寿县安乐湖, 占总量的 31%, 其中 86% 的菌株透明圈与菌落直径比 ≥ 2.00 , 最大值为 4.54。从澧县北民湖与津市西湖表层沉积物中筛选分离得到的产胶原蛋白酶菌株的数量分别占总量的 7% 和 11%, 其中透明圈与菌落直径比 ≥ 2.00 的菌株分别为 38% 和 50%, 最大值分别为 2.33 和 2.69。

依据透明圈与菌落直径比值的大小和菌株来源的不同, 最终选取了 20 株产酶量较高的菌株于 28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 条件下进行摇瓶发酵实验, 并对培养 1 d 的发酵液进行胶原蛋白酶酶活测定。由图 2 和图 3 可知, 来自汉寿县安乐湖表层沉积物中的 9 株菌透明圈与菌落直径比在 2.64–3.47 之间, 发酵液上清酶活在

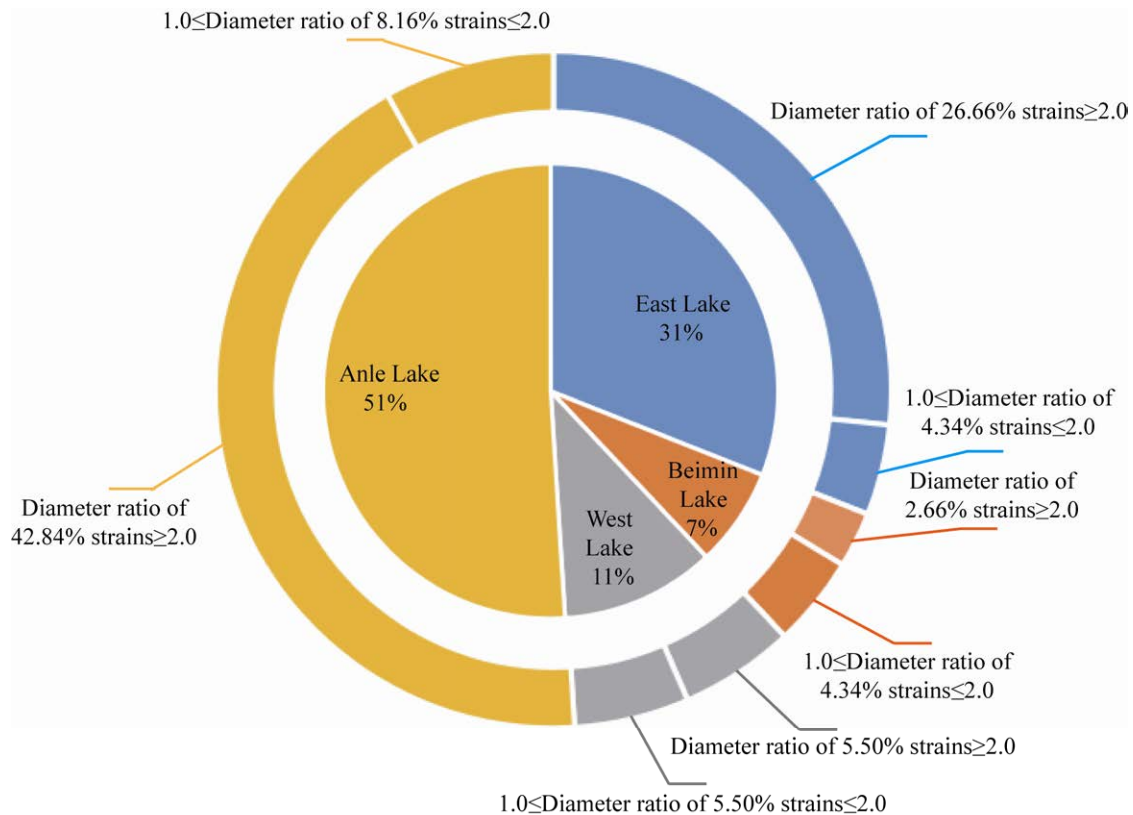


图 1 来自 4 个淡水湖渔场沉积物的 113 株产胶原蛋白酶菌株的分布情况

Figure 1 The distribution of 113 collagenase-producing strains from the sediments in fishing grounds of four freshwater lakes.

18.61–82.38 U/mL 之间；来自澧县北民湖表层沉积物中的 2 株菌透明圈与菌落直径比分别为 2.33 和 2.18，发酵液上清酶活分别为 71.24 U/mL 和 53.02 U/mL；来自华容县东湖表层沉积物中的 6 株菌透明圈与菌落直径比在 2.83–4.54 之间，发酵液上清酶活在 46.83–69.91 U/mL 之间；来自津市西湖表层沉积物中的 3 株菌透明圈与菌落直径比分别为 2.69、2.52 和 2.48，发酵液上清酶活分别为 67.23、30.26 和 42.08 U/mL。由图 2 可知，20 株产胶原蛋白酶菌株的透明圈与菌落直径比的大小顺序为：菌株 D1-66-2>菌株 A9-3>菌株 A3-6>菌株 D6>菌株 A2-15>菌株 A9-6>菌株 A33>菌株 D1-66-1>菌株 A4-23>菌株 D7-1>菌株 A5-1>菌株 D19>菌株 D8>菌株

A23>菌株 M3>菌株 A27>菌株 M4>菌株 M3-35>菌株 B2-48>菌株 B2；由图 3 可知，20 株产胶原蛋白酶菌株的酶活的高低顺序为：菌株 A4-23>菌株 A2-15>菌株 B2-48>菌株 D6>菌株 A5-1>菌株 M3>菌株 D19>菌株 A23>菌株 A9-3>菌株 A3-6>菌株 D1-66-1>菌株 B2>菌株 D8>菌株 D1-66-2>菌株 D7-1>菌株 M3-35>菌株 A9-6>菌株 A27>菌株 M4>菌株 A33。综合图 2 和图 3 的结果可知，菌株 D6 的透明圈与菌落直径比和发酵液上清酶活都位于前列，都处于较高水平，因此选择来自华容县东湖表层沉积物的产胶原蛋白酶菌株 D6 [直径比为 3.37，酶活为(69.91±4.33) U/mL]进行初步鉴定和系统发育分析。

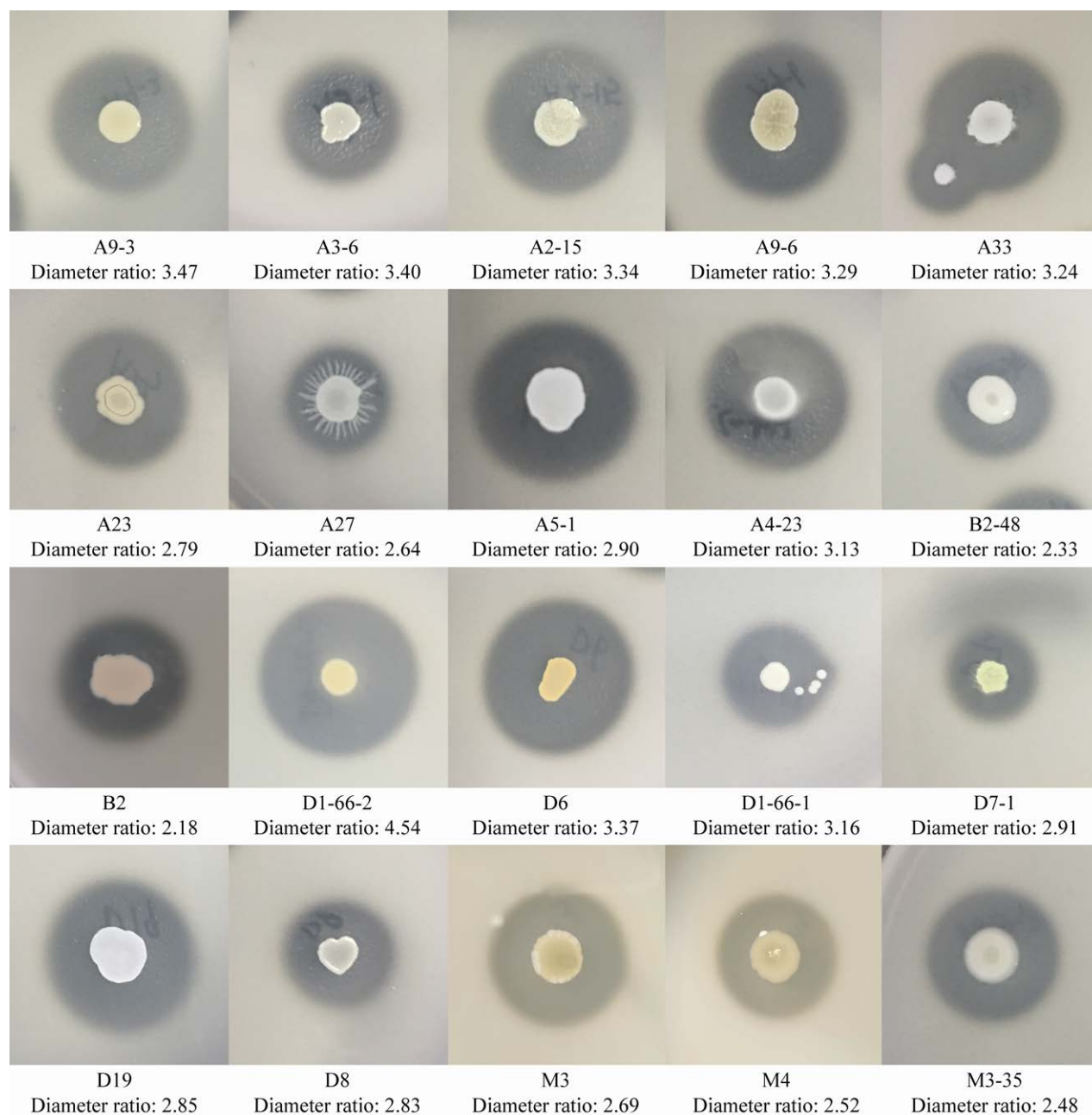


图 2 来自 4 个淡水湖渔场沉积物的 20 株菌在明胶筛选培养基上的水解圈 A: 来自汉寿县安乐湖表层沉积物的菌株; B: 来自澧县北民湖表层沉积物的菌株; D: 来自华容县东湖表层沉积物的菌株; M: 来自津市西湖表层沉积物的菌株

Figure 2 Transparent zones on gelatin screening medium of 20 strains of bacteria from the sediments in fishing grounds of four freshwater lakes. A: The strain is from the surface sediments of Anle Lake in Hanshou county; B: The strain is from the surface sediments of Beimin Lake in Li county; D: The strain is from the surface sediments of East Lake in Huarong county; M: The strain is from the surface sediments of West Lake in Jinshi city.

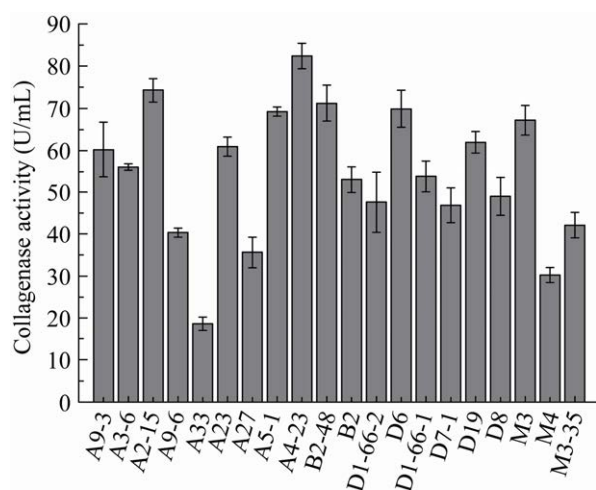


图3 来自4个淡水湖渔场沉积物的20株菌的发酵液上清胶原蛋白酶活性

Figure 3 The collagenase activity of the supernatant of fermentation broth of 20 strains of bacteria from the sediments in fishing grounds of four freshwater lakes.

2.2 胶原蛋白酶产生菌的系统发育分析

菌株 D6 的 16S rRNA 基因序列长度为 1 461 bp, 序列比对表明菌株 D6 的 16S rRNA 基因与微小杆菌属(*Exiguobacterium*)的 *E. enclense* NIO-1109 具有 98.73% 的序列相似性, 表明菌株 D6 属于微小杆菌属。在基于 16S rRNA 基因序列由邻接法得到的系统发育树(图 4)中, 菌株 D6 位于微小杆菌属的分支, 并且和菌株 *E. indicum* HHS31 形成一个自展值大于 60% 的内分支, 表明菌株 D6 和菌株 *E. indicum* HHS31 有较近的系统发育关系。根据实验结果, 将菌株 D6 命名为 *Exiguobacterium* sp. DJ1。

2.3 菌株 *Exiguobacterium* sp. DJ1 的安全性评价

抗生素敏感性检测实验结果表明, 菌株 DJ1

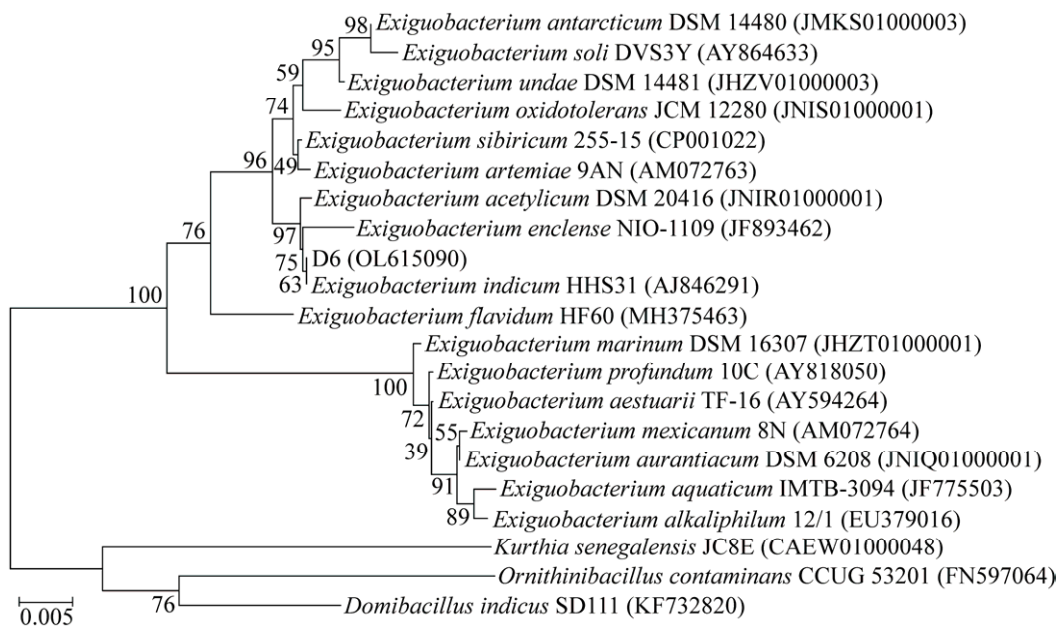


图4 基于16S rRNA基因序列由邻接法构建的系统发育树 括号中的序号表示菌株16S rRNA基因序列在GenBank中的序列号;分支点上的数字为自展支持率(%);标尺表示每个核苷酸位置有0.005个核苷酸替换,表示相似性百分比

Figure 4 Neighbour-joining phylogenetic trees based on the 16S rRNA gene sequences. Serial numbers between brackets indicate accession numbers of the 16S rRNA gene sequences of strains in GenBank; Numbers at nodes indicate levels of bootstrap support (%); The scale bar indicates 0.005 nucleotide substitutions per nucleotide position.

对 4 种抗生素(氨苄西林、头孢氨苄、头孢他啶和林可霉素)具有抗药性, 对链霉素的敏感性表现为一般, 对 15 种抗生素(青霉素、哌拉西林、头孢唑啉、头孢呋辛钠、头孢曲松、头孢哌酮、庆大霉素、阿米卡星、卡那霉素、四环素、米诺环素、红霉素、万古霉素、多粘菌素 B 和多西环素)表现为敏感(图 5A)。溶血性实验结果显

示, 菌株 DJ1 未产生明显的透明溶血环(图 5B), 无溶血现象, 呈 γ 溶血, 表明该菌株无溶血性, 一般不致病。氨基酸脱羧酶活性检测实验结果显示, 菌株 DJ1 培养 2 d 后, 对照组 1 呈蓝紫色, 对照组 2 与 3 个实验组均呈黄色(图 5C), 表明该菌株无赖氨酸、精氨酸和鸟氨酸脱羧酶活性, 不产生相应的有毒物质。硝酸还原酶活

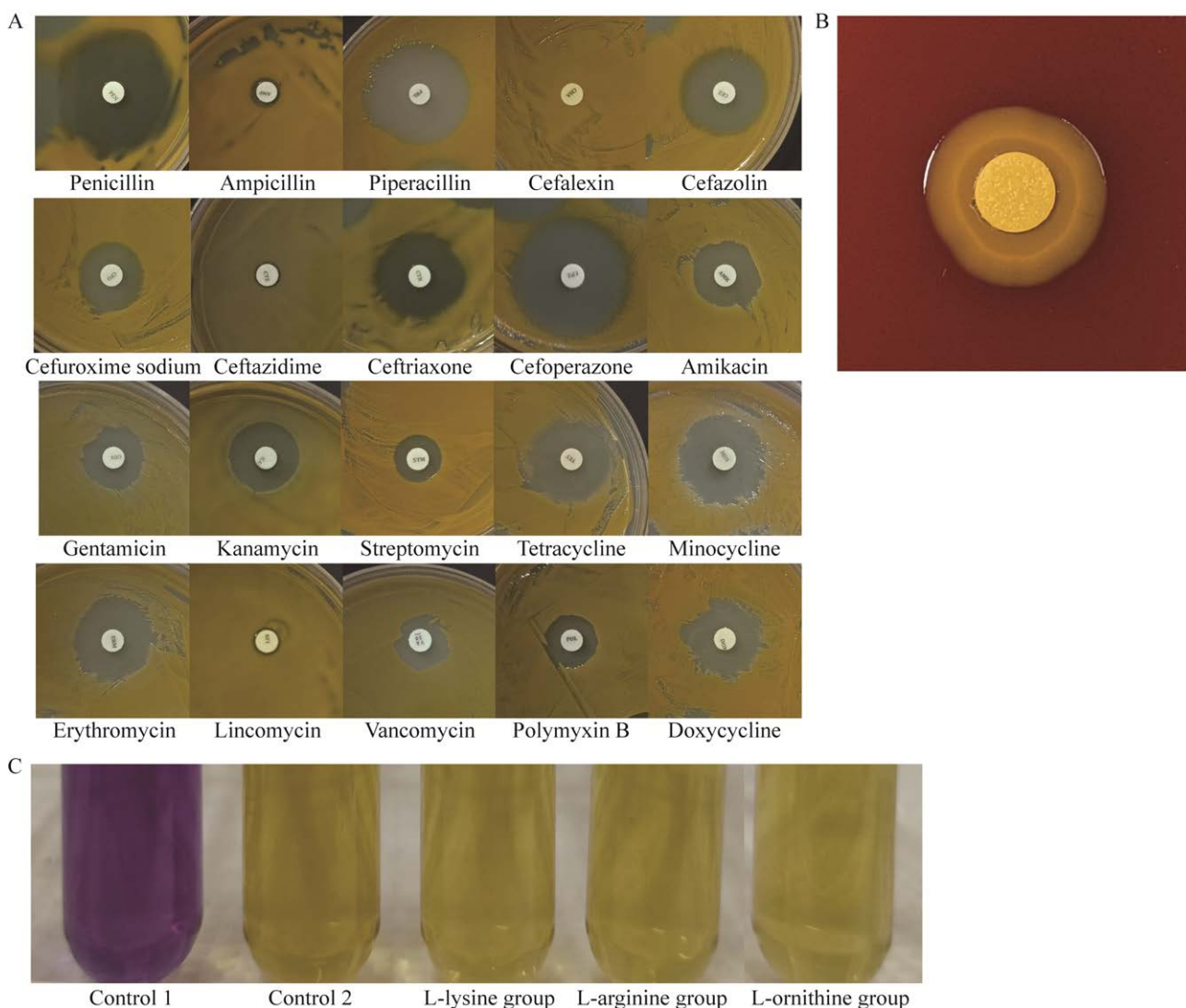


图 5 菌株 DJ1 的安全性实验 A: 菌株 DJ1 对 20 种抗生素的敏感性; B: 菌株 DJ1 的溶血性; C: 菌株 DJ1 的氨基酸脱羧酶活性, 对照组 1 无氨基酸、不接菌, 对照组 2 无氨基酸、接菌

Figure 5 Safety trials of strain DJ1. A: Susceptibility of strain DJ1 to 20 antibiotics; B: Haemolytic activity of strain DJ1; C: Amino acid decarboxylase activity of strain DJ1, control 1 had no amino acid and was not inoculated, control 2 had no amino acid but was inoculated.

性测定实验结果显示, 菌株 DJ1 的硝酸还原酶活为 $0.11 \mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{h})$, 数值约等于 0。而且实验组和对照组的吸光值分别为 0.05 和 0.04, 两者几乎一致, 表明该菌株无硝酸还原酶活性, 不会将硝酸盐还原成亚硝酸盐, 从而危害动植物健康。综上表明, 菌株 DJ1 具有较高的生物安全性。

2.4 发酵条件对菌株 *Exiguobacterium* sp. DJ1 产酶的影响

2.4.1 单因素试验法分析培养基成分的影响

菌株 DJ1 发酵产酶培养基的最佳无机盐组

分为 KH_2PO_4 、 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 NaCl , 用该组培养基培养菌株 1 d 后上清液酶活最高, 为 $(79.53\pm 27.07) \text{U}/\text{mL}$ (图 6A)。菌株 DJ1 发酵产酶培养基的最佳碳源为蛋白胨, 用该组培养基培养菌株 1 d 后上清液酶活最高, 为 $(51.33\pm 7.03) \text{U}/\text{mL}$ (图 6B)。菌株 DJ1 发酵产酶培养基的最佳氮源为鱼粉, 用该组培养基培养菌株 1 d 后上清液酶活最高, 为 $(127.01\pm 5.21) \text{U}/\text{mL}$ (图 6C)。

2.4.2 正交试验法分析培养基成分含量的影响

采用 $L_{16}(4^5)$ 正交表研究三因素四水平对菌株 DJ1 胶原蛋白酶产量的影响。实验方案和结

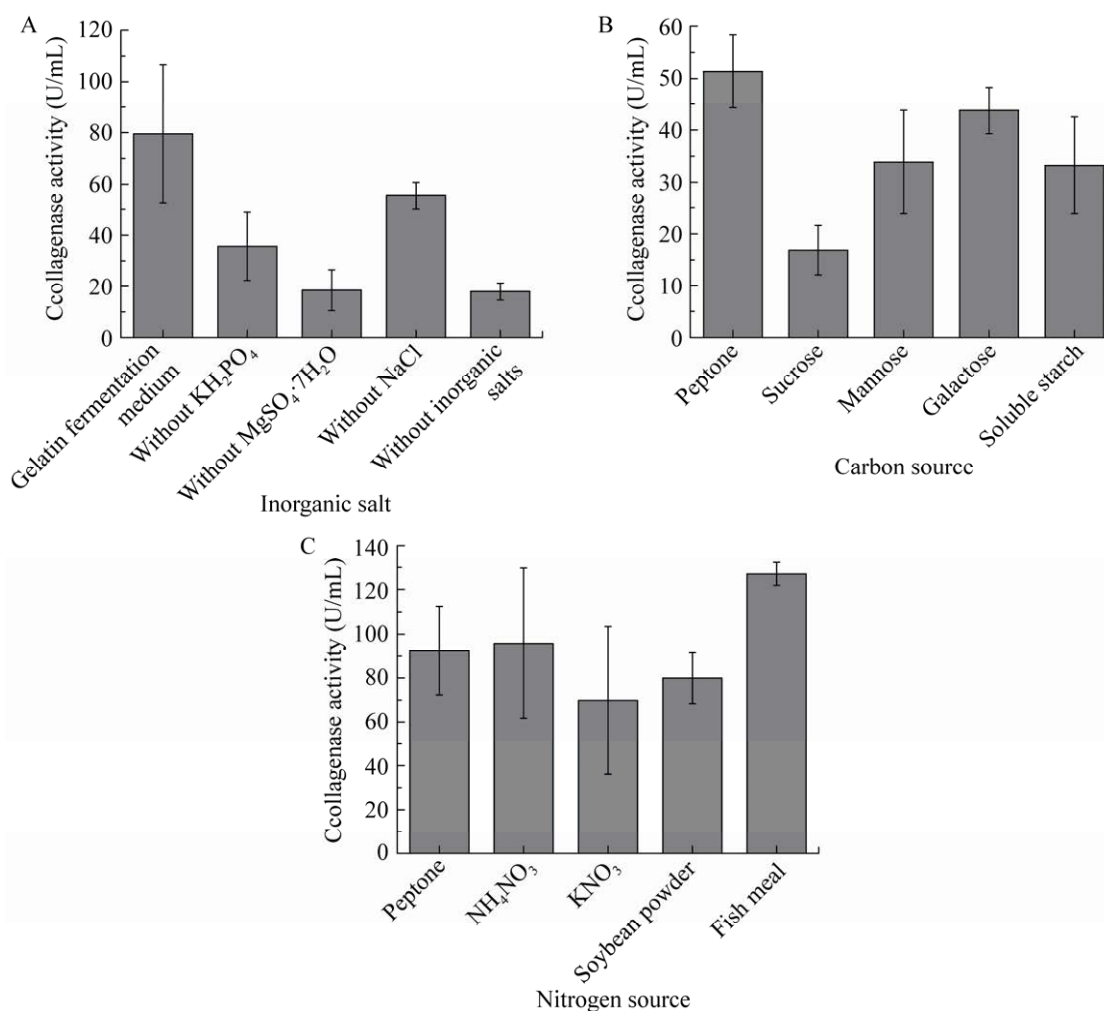


图 6 培养基成分对菌株 DJ1 发酵产酶的影响 A: 不同无机盐组分; B: 不同碳源; C: 不同氮源

Figure 6 The influence of medium component on collagenase production of strain DJ1. A: Different inorganic salt components; B: Different carbon sources; C: Different nitrogen sources.

果见表 2 和表 3, 方差分析结果表明, 明胶浓度(A 因素)、蛋白胨浓度(B 因素)和鱼粉浓度(C 因素)对发酵产酶均具有显著性影响, 主次顺序为 A 、 B 、 C 。各效应显著性测验结果见表 4, A 因素 4 个水平中差异显著, 以 A_4 水平产酶量最高; B 因素 4 个水平中差异显著, 以 B_4 水平产酶量最高; C 因素 4 个水平中差异显著, 以 C_2 水平产酶量最高。综上所述, 该正交试验获得的最优方案为 $A_4B_4C_2$ 。因此, 选择明胶 3% (质量体积分数)、蛋白胨 1% (质量体积分数)、鱼粉 0.5% (质量体积分数) 作为发酵产酶的最优组分, 并用此方案进行后续发酵产酶培养条件的优化。

2.4.3 单因素试验法分析培养条件的影响

由图 7A 可知, 当菌株 DJ1 的接种量为 3% 和 10% 时, 上清液酶活分别为 (244.87 ± 23.55) U/mL 和 (261.70 ± 40.09) U/mL。考虑种子液的用量与菌液的加入对总体积的影响, 选择 3% 的接种量

表 2 $L_{16}(4^5)$ 正交试验表头设计和实验结果

Table 2 Design of $L_{16}(4^5)$ table head of orthogonal experiments and trial results

处理号 No.	A	B	C	酶活			平均值 Mean (U/mL)
				Enzyme activity (U/mL)			
				I	II	III	
1	1	1	1	76.14	82.56	72.13	76.94
2	1	2	2	122.64	121.04	164.07	135.92
3	1	3	3	124.78	108.75	111.95	115.16
4	1	4	4	101.53	101.80	152.84	118.72
5	2	1	2	74.27	61.44	77.48	71.06
6	2	2	1	58.15	76.70	68.79	67.88
7	2	3	4	125.85	90.57	148.30	121.58
8	2	4	3	65.04	67.72	78.46	70.41
9	3	1	3	117.57	132.80	123.98	124.78
10	3	2	4	64.38	46.21	25.63	45.41
11	3	3	1	128.79	105.27	111.15	115.07
12	3	4	2	184.65	178.77	168.88	177.43
13	4	1	4	160.06	189.46	177.70	175.74
14	4	2	3	114.89	95.38	88.17	99.48
15	4	3	2	156.05	171.82	186.78	171.55
16	4	4	1	271.77	252.79	249.85	258.14

表 3 方差分析结果

Table 3 The results of variance analysis

变异来源 Sources of variation	自由度 Degree of freedom	平方和 Sum of square	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value
区组 Randomized blocks	2	473.55	236.78	0.93	0.405 6
处理组合 Treatment combination	15	131 528.21			
明胶 Gelatin (%)	3	55 539.59	18 513.20	72.65**	0.000 0
蛋白胨 Peptone (%)	3	30 669.32	10 223.11	40.12**	0.000 0
鱼粉 Fish meal (%)	3	9 243.96	3 081.32	12.09**	0.000 0
空白列 Blank column	6	36 075.33	6 012.56	23.59**	0.000 0
误差 Error	30	7 644.84	254.83		
总变异 Total	47	139 646.60			

注: **: 差异极显著, $P < 0.01$

Note: **: Extremely significant difference, $P < 0.01$.

表 4 新复极差法多重比较

Table 4 Duncan's new multiple range test for multiple comparisons

处理 Treatment	平均值 Mean	差异显著性 Significance difference	
		$P < 0.05$	$P < 0.01$
A_4	176.23	a	A
A_3	115.67	b	B
A_1	111.69	b	B
A_2	82.73	c	C
B_4	156.18	a	A
B_3	130.84	b	B
B_1	112.13	c	C
B_2	87.17	d	D
C_2	138.99	a	A
C_1	129.51	a	AB
C_4	115.36	b	BC
C_3	102.46	b	C

用于后续优化实验。由图 7B 可知,当初始 pH 为 8.5 时上清液酶活最高,为(197.83±13.71) U/mL。由图 7C 可知,当培养温度为 28 °C 时上清液酶活最高,为(173.51±4.71) U/mL。由图 7D 可知,当装液量为 100 mL/250 mL 时上清液酶活最高,为(185.45±23.87) U/mL,约为优化前的 3.7 倍。

3 讨论与结论

本文从环洞庭湖水系中的华容县东湖、澧县北民湖、津市西湖和汉寿县安乐湖 4 个淡水湖渔场的表层沉积物中共筛选分离得到 113 株产胶原蛋白酶菌株,表明淡水湖渔场沉积物中含有丰富的产胶原蛋白酶菌株。对来自东湖的产酶菌株 D6 进行 16S rRNA 基因序列比对分

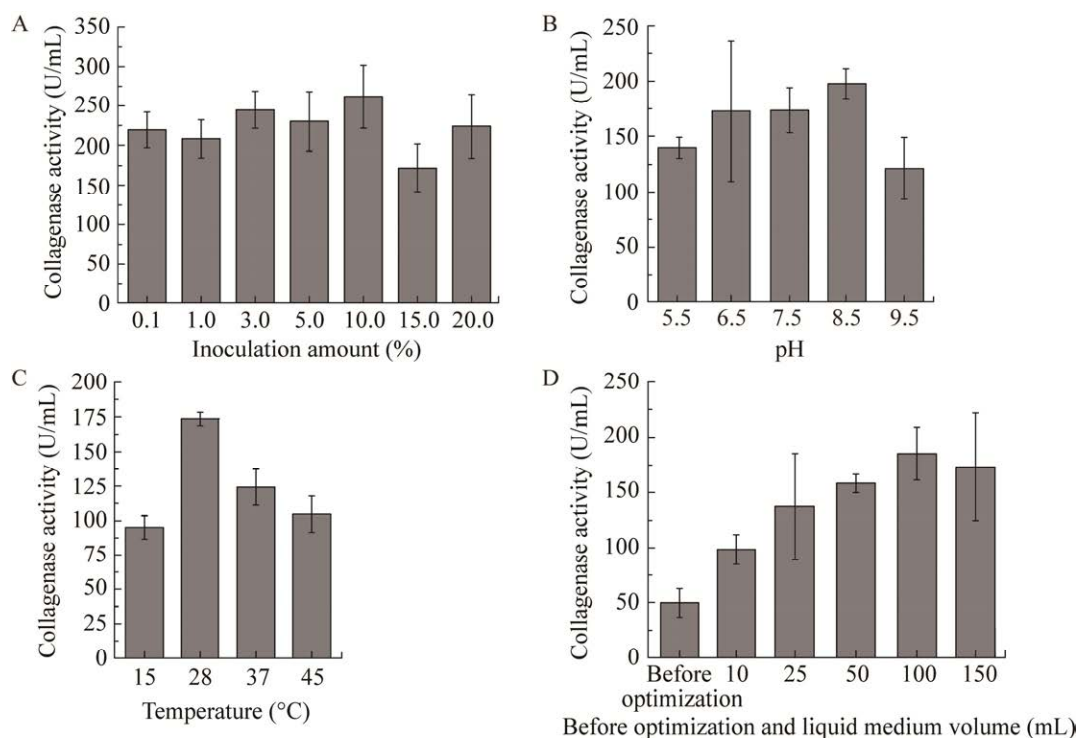


图 7 培养条件对菌株 DJ1 发酵产酶的影响及优化前后酶活的变化 A: 不同接种量; B: 不同初始 pH; C: 不同培养温度; D: 不同装液量及优化前后酶活变化

Figure 7 The influence of culture conditions on collagenase production of strain DJ1 and the changes of collagenase activity before and after optimization. A: Different inoculation amount; B: Different initial pH; C: Different temperature; D: Different liquid medium volume and the changes of collagenase activity before and after optimization.

析, 鉴定该菌株为 *Exiguobacterium* 属细菌, 命名为 *Exiguobacterium* sp. DJ1。菌株 DJ1 对 15 种抗生素表现敏感, 无溶血性, 无赖氨酸、精氨酸和鸟氨酸脱羧酶活性, 无硝酸还原酶活性, 表明菌株 DJ1 安全可控, 不会产生有毒物质, 具有较高的生物安全性, 可应用于生产。对菌株 DJ1 的产酶发酵条件进行优化得到的最佳产酶条件为: 30.0 g/L 明胶、10.0 g/L 蛋白胨、5.0 g/L 鱼粉、0.5 g/L KH_2PO_4 、0.2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.1 g/L NaCl、pH 8.5、3% (体积分数) 的接种量、28 °C 的培养温度、100 mL/250 mL 的装液量。优化条件下的胶原蛋白酶酶活为 (185.45 ± 23.87) U/mL, 未优化条件下的胶原蛋白酶酶活为 (49.68 ± 13.06) U/mL, 酶活提高了约 3.7 倍。表明菌株 DJ1 及其产生的胶原蛋白酶具有一定的应用潜力。

研究发现, 分离自淡水沉积物中的 1 株梭状芽孢杆菌属(*Clostridium*)新菌^[16]和 3 株黄杆菌属(*Flavobacterium*)新菌能够水解明胶等大分子有机物^[17], 表明淡水渔场沉积物中具有能够降解胶原蛋白的细菌资源。从 4 个淡水湖渔场的表层沉积物中共筛选分离到 113 株产胶原蛋白酶菌株, 与其他环境样品相比数量颇丰。如李芸等从餐厨垃圾、畜肉市场和屠宰场等处的土样和水样中分离到 11 株高效降解胶原蛋白的菌株^[18]; 刘丽莉等从 50 份堆积骨骼处土样中筛选到 60 株能利用胶原蛋白的菌株^[19]; 李星硕等从 7 份肉联厂附近的土壤中筛选到 17 株胶原蛋白产生菌^[20]; 邓加聪等从海产品市场附近污泥中分离到 20 株具有胶原蛋白水解活性的菌株^[21]; 杨光垚等从皮革厂、屠宰场等处采集的 20 份土样和水样中筛选到 95 株有明胶酶活性的菌株^[22]。本文从 113 株产胶原蛋白酶菌株中挑选出一株高产菌株, 经鉴定为 *Exiguobacterium* 属细菌。*Exiguobacterium* 属具有广阔的生境, 但

目前对于该属的认识仍然有限, 其在环境污染生物修复中的作用引发了关注^[23]。研究表明 *Exiguobacterium* 属有多种活性酶, 能分解有机污染物(偶氮染料、农药和石油等), 可以从几丁质丰富的废料中提取几丁质, 有较高的 β -葡萄糖苷酶活性和蛋白酶活性^[23-24]。截至目前, 尚未发现 *Exiguobacterium* 属相关胶原蛋白酶的报道, 本文关于 *Exiguobacterium* 属胶原蛋白酶的研究可拓宽对该属菌株的认识和实际应用。

由于胶原蛋白酶具有巨大的工业潜力和应用前景, 所以越来越多的胶原蛋白酶产生菌被报道。如有研究表明枯草芽孢杆菌胶原酶活为 44.98 U/mL^[8]、蜡样芽孢杆菌胶原酶活为 26.70–36.80 U/mL^[19-21,25]、沙雷氏菌胶原酶活为 21.19–22.46 U/mL^[26-27]、铜绿假单胞菌和火神发光杆菌胶原酶活为 10.00–16.00 U/mL^[22]。与其他产胶原蛋白酶菌株相比, 本文筛选到的胶原酶活为 69.91 U/mL 的微小杆菌 DJ1 具有较高的初始酶活。为进一步探究胶原蛋白酶产生菌的应用价值, 相关研究对菌株的发酵产酶条件进行了优化, 以获得更高的产酶量。如李茂琳等对 *Brevibacillus laterosporus* AL-13 的产酶培养基成分进行了优化, 使胶原酶活提高为 (153.06 ± 3.73) U/mL, 提高了约 9.5 倍^[7]; 荆哲华等对 *Bacillus glycinifermentans* 的发酵条件进行了优化, 使胶原酶活提高为 (5.97 ± 0.52) U/mL, 提高了约 4.8 倍^[28]; 李星硕等对蜡样芽孢杆菌 Col15 的产酶发酵条件进行了优化, 使胶原酶活提高为 (65.81 ± 2.06) U/mL, 提高了约 1.5 倍^[20]; Pequeno 等对一株蜡样芽孢杆菌的发酵产酶条件进行了优化, 使胶原酶活提高为 (305.39 ± 5.15) U/mL, 提高了约 15 倍^[29]。相比其他发酵优化的研究结果, 本文对菌株 DJ1 发酵产酶条件的优化使胶原酶活提高为 (185.45 ± 23.87) U/mL, 提高了约 3.7 倍, 获得了较高的酶活, 优化前后产酶量的

扩大倍数较为理想。同时,本文利用价格低廉的鱼粉代替了部分氮源,在获得较高酶量的同时降低了生产成本。因此,菌株 DJ1 有望成为一株工业化的胶原蛋白酶产生菌,本研究可为其工业化生产和应用奠定基础,但其产量的提高需要通过进一步放大发酵工艺探索,相关酶学性质和产物稳定性也需要通过进一步实验研究。

REFERENCES

- [1] Raskovic B, Bozovic O, Prodanovic R, Niketic V, Polovic N. Identification, purification and characterization of a novel collagenolytic serine protease from fig (*Ficus carica* var. Brown Turkey) latex[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2014, 118(6): 622-627
- [2] Avila Rodríguez MI, Rodríguez Barroso LG, Sánchez ML. Collagen: a review on its sources and potential cosmetic applications[J]. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 2018, 17(1): 20-26
- [3] Vergne DMC, Vasconcelos ACP, Batista RA, Freitas MM, Júnior RLCA, Freitas O, Pereira NL, Cardoso JC. Collagen modification by Maillard reaction[J]. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2018, 131(1): 671-679
- [4] Brazzelli M, Cruickshank M, Tassie E, McNamee P, Robertson C, Elders A, Fraser C, Hernandez R, Lawrie D, Ramsay C. Collagenase clostridium histolyticum for the treatment of Dupuytren's contracture: systematic review and economic evaluation[J]. *Health Technology Assessment: Winchester, England*, 2015, 19(90): 1-202
- [5] Obana N, Nomura N, Nakamura K. Structural requirement in *Clostridium perfringens* collagenase mRNA 5' leader sequence for translational induction through small RNA-mRNA base pairing[J]. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195(12): 2937-2946
- [6] Lu YS, Feng JM, Wu ZH, Jian JC. Genotype analysis of collagenase gene by PCR-SSCP in *Vibrio alginolyticus* and its association with virulence to marine fish[J]. *Current Microbiology*, 2011, 62(6): 1697-1703
- [7] 李茂琳, 谭军, 王红英, 王迪, 张宇, 徐桐, 钱斯日古楞. 一株产胶原蛋白酶细菌的鉴定及产酶条件优化[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(14): 118-126
Li ML, Tan J, Wang HY, Wang D, Zhang Y, Xu T, Qiansiri GL. Identification of a collagenase-producing bacterium and optimization of enzyme producing conditions[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(14): 118-126 (in Chinese)
- [8] 孙佳佳, 王红英, 钱斯日古楞, 常凯. 产胶原蛋白酶枯草芽孢杆菌的筛选[J]. *大连工业大学学报*, 2010, 29(4): 248-250
Sun JJ, Wang HY, Qiansiri GL, Chang K. Screening of collagenase-producing *Bacillus* strain[J]. *Journal of Dalian Polytechnic University*, 2010, 29(04): 248-250 (in Chinese)
- [9] 卢士玲, 李文军, 李开雄. 发酵肉制品中优势菌酶学活性初探[J]. *肉类研究*, 2006(1): 22-25
Lu SL, Li WJ, Li KX. Preliminary study on enzymatic activity of dominant bacteria in fermented meat products[J]. *Meat Research*, 2006(1): 22-25 (in Chinese)
- [10] 周强强. 胶原蛋白酶产生菌的筛选及其产酶特性研究[D]. 长春: 吉林大学硕士学位论文, 2009
Zhou QQ. Screening of collagenase-producing strain and studying on the characteristics of collagenase[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin University, 2009 (in Chinese)
- [11] 张科, 苏智鹏, 许阳, 李清利, 王瑜, 刘丽, 李冰洁, 周云霞, 夏西超. 蟋蟀后肠纤维素降解细菌的分离与鉴定[J]. *生物资源*, 2020, 42(2): 228-233
Zhang K, Su ZP, Xu Y, Li QL, Wang Y, Liu L, Li BJ, Zhou YX, Xia XC. Isolation and identification of cellulose-degrading bacteria in the posterior intestine[J]. *Biotic Resources*, 2020, 42(2): 228-233 (in Chinese)
- [12] Jukes TH, Cantor CR. Evolution of protein molecules[A]//*Mammalian Protein Metabolism*[M]. Amsterdam: Elsevier, 1969
- [13] 罗方兴, 毛盼, 王荣华, 曾丹, 肖调义, 钟蕾. 中华鳖腐皮病的病原鉴定与药敏试验[J]. *水生态学杂志*, 2013, 34(3): 85-89
Luo FX, Mao P, Wang RH, Zeng D, Xiao TY, Zhong L. Studies on pathogenic identification and drug sensitivity analysis of skin fester disease in *Trionyx sinensis*[J]. *Journal of Hydroecology*, 2013, 34(3): 85-89 (in Chinese)
- [14] Luis-Villaseñor IE, Macías-Rodríguez ME, Gómez-Gil B, Ascencio-Valle F, Campa-Córdova ÁI. Beneficial effects of four *Bacillus* strains on the larval cultivation of *Litopenaeus vannamei*[J]. *Aquaculture*, 2011, 321(1/2): 136-144
- [15] 凌宇恒. 饲用海洋动物源益生菌在幼鲍养殖中的初步应用研究[D]. 厦门: 厦门大学硕士学位论文, 2017

- Ling YH. Application of feed probiotics from marine animal for juvenile abalone aquaculture[D]. Xiamen: Master's Thesis of Xiamen University, 2017 (in Chinese)
- [16] Sallam A, Steinbüchel A. *Clostridium sulfidigenes* sp. nov., a mesophilic, proteolytic, thiosulfate- and sulfur-reducing bacterium isolated from pond sediment[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 59(Pt 7): 1661-1665
- [17] Tamaki H, Hanada S, Kamagata Y, Nakamura K, Nomura N, Nakano K, Matsumura M. *Flavobacterium limicola* sp. nov., a psychrophilic, organic-polymer-degrading bacterium isolated from freshwater sediments[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003, 53(Pt 2): 519-526
- [18] 李芸, 王李忻, 葛梦娇, 尹军霞, 陈梦娜. 餐厨垃圾中胶原蛋白和几丁质原位降解菌株的筛选与鉴定[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(8): 304-307
- Li Y, Wang LX, Ge MJ, Yin JX, Chen MN. Screening and identification of strain to degrade collagen and chitin in kitchen waste *in situ*[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2018, 46(8): 304-307 (in Chinese)
- [19] 刘丽莉, 马美湖, 余秀芳, 王文涛. 胶原蛋白酶产生菌的筛选及酶的分离纯化[J]. 生物工程学报, 2010, 26(2): 194-200
- Liu LL, Ma MH, Yu XF, Wang WT. Screening of collagenase-producing strain and purification of *Bacillus cereus* collagenase[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2010, 26(2): 194-200 (in Chinese)
- [20] 李星硕, 朱玥明, 管于平, 柏玮, 贾士儒, 孙媛霞. 产胶原酶菌株的筛选鉴定、发酵优化及胶原酶纯化[J]. 微生物学报, 2016, 56(6): 1034-1043
- Li XS, Zhu YM, Guan YP, Bai W, Jia SR, Sun YX. Screening, identification and fermentation optimization of a collagenase-producing strain and purification of the collagenase[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2016, 56(6): 1034-1043 (in Chinese)
- [21] 邓加聪, 郑虹, 陈丽琴. 胶原蛋白酶产生菌的筛选及初步鉴定[J]. 中国酿造, 2013, 32(4): 78-81
- Deng JC, Zheng H, Chen LQ. Screening and preliminary identification of collagenase-producing bacteria[J]. China Brewing, 2013, 32(4): 78-81 (in Chinese)
- [22] 杨光垚, 谢君, 徐宁, 李灵, 张义正. 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 GY, Xie J, Xu N, Li L, Zhang YZ. 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)
- [23] 张莹, 石萍, 马炯. 微小杆菌 *Exiguobacterium* spp. 及其环境应用研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2013, 19(5): 898-904
- Zhang Y, Shi P, Ma J. *Exiguobacterium* spp. and their applications in environmental remediation[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2013, 19(5): 898-904 (in Chinese)
- [24] Chang J, Park IH, Lee YS, Ahn SC, Zhou Y, Choi YL. Cloning, expression, and characterization of β -glucosidase from *Exiguobacterium* sp. DAU5 and transglycosylation activity[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2011, 16(1): 97-106
- [25] 刘丽莉, 杨协力. 产骨胶原蛋白酶菌种的筛选与鉴定[J]. 食品与生物技术学报, 2011, 30(6): 917-923
- Liu LL, Yang XL. Isolation and identification of a strain with producing bone collagenase[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2011, 30(6): 917-923 (in Chinese)
- [26] 赵海霞, 赵培培, 陈惠, 吴琦. 一株产胶原蛋白酶沙雷氏菌的分离及鉴定[J]. 中国饲料, 2012(1): 9-11, 14
- Zhao HX, Zhao PP, Chen H, Wu Q. Isolation and identification of a *Serratia marcescens* with collagenase activity[J]. China Feed, 2012(1): 9-11, 14 (in Chinese)
- [27] 马蕾, 王红英, 钱斯日古楞. 一株产胶原蛋白酶嗜虫沙雷氏菌的分离与鉴定[J]. 食品工业科技, 2012, 33(13): 143-145
- Ma L, Wang HY, Qiansiriguleng. Isolation and identification of a *Serratia entomophila* with collagenase activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(13): 143-145 (in Chinese)
- [28] 荆哲华, 吴浩浩, 朱素芹, 高风正, 曾名湧. 耐高温胶原蛋白酶菌株的筛选和产酶条件优化[J]. 食品科技, 2017, 42(12): 11-17
- Jing ZH, Wu HH, Zhu SQ, Gao FZ, Zeng MY. Screening of thermostable collagenase strain and optimizing conditions for enhancing thermostable collagenase production[J]. Food Science and Technology, 2017, 42(12): 11-17 (in Chinese)
- [29] Pequeno ACL, Arruda AA, Silva DF, Duarte Neto JMW, Silveira Filho VM, Converti A, Marques DAV, Porto ALF, Lima CA. Production and characterization of collagenase from a new Amazonian *Bacillus cereus* strain[J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2019, 49(5): 501-509