

# 具胶原蛋白酶活性铜绿假单胞菌的筛选\*

杨光垚 谢君 徐宁 李灵 张义正\*\*

(四川大学生命科学学院四川省分子生物学及生物技术重点实验室 成都 610064)

**摘要:** 从成都皮革厂等堆积废弃毛皮、皮革的场所采集土样, 通过以明胶为主要基质培养基进行富集和初筛, 获得 95 株有明胶酶活性菌株。挑选其中 28 株明胶酶活性较高的菌株进行牛皮消化试验, 有 12 株菌能在 48 h 内完全消化小牛皮。以 III 型酸性胶原为底物, 测定了 12 株菌发酵培养液中胶原蛋白酶活性, 确认这 12 株菌都具有胶原蛋白酶活性, 酶活力基本相同, 约 10~16 U/mL。经形态观察、生理生化特征分析及 BIOLOG 微生物鉴定仪鉴定, 这 12 株菌分为两类, 分别是铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 和火神发光杆菌 (*Photobacterium loeigi*) (结果另文发表)。对铜绿假单胞菌产生胶原蛋白酶粗酶性质进行了研究, 其酶活最适温度为 32℃, 最适 pH 为 7.5, 可以被金属蛋白酶抑制剂 EDTA 和 EGTA 部分抑制, 不能被 PMSF 抑制。对铜绿假单胞菌产胶原蛋白酶发酵条件的研究表明, 不仅培养基中氮源、碳源和金属离子影响产酶量, 而且发酵工艺对胶原蛋白酶的产生也有较大影响。

**关键词:** 胶原蛋白酶 (collagenase), 铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*)

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 05-0043-06

## Isolation and Characterization of Collagenolytic Enzyme-Producing Strain from Rotten Hides and Primary Analysis of the Enzyme Property

YANG Guang-Yao XIE Jun XU Ning LI Ling ZHANG Yi-Zheng\*\*

(College of Life Science, Sichuan University, Sichuan Key Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Chengdu, 610064)

**Abstract:** Bacteria isolated from rotten hides, one identified as *Pseudomonas aeruginosa* later, were shown to decompose fresh hides completely in 48 hours at room temperature. Strongly collagenolytic activity was detected when native collagen from calfskin was used as substrate. The optimal reaction pH value and temperature of the collagenase produced by *P. aeruginosa* are 7.5 and 32℃ respectively. EDTA and EGTA inhibit the collagenolytic activity severely while PMSF has little effect on it. Not only media components but also fermentation conditions have different effect on the production of this collagenolytic enzyme.

**Key words:** Collagenase, *P. aeruginosa*.

胶原酶 (collagenase, E.C 3.4.24.3) 是指作用于胶原或其变性明胶而不作用其它蛋白质的酶类<sup>[1]</sup>。它来源广泛, 多种微生物以及动物的许多组织细胞都可以产生胶原酶。胶原酶在环境保护上可用于皮革边角废弃物变废为宝, 高值转化; 在医学研究中可用于治疗腰椎间盘突出症、癍痕疙瘩、杜普伊特伦症等, 具有极大的应用价值。来自溶组织梭菌 (*Clostridium histolyticum*)、溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 等的胶原蛋白酶已有

\* 国家高科技计划项目 (No.2002AA214181)

\*\* 联系人 Tel: 028-85412738, E-mail: Yizhang@scu.edu.cn

收稿日期: 2003-11-24, 修回日期: 2004-03-18

广泛的研究。目前,已从许多动物组织和微生物中获得胶原酶。

以下报道我们对胶原酶产生菌的筛选、鉴定的研究结果。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 样品来源:分别从成都皮革厂、成都屠宰厂等处采集土样、水样。

1.1.2 培养基:种子培养基(100 mL):牛肉膏 0.5 g, NaCl 0.5 g, 蛋白胨 1 g。富集培养基(100 mL):明胶 1 g, 蛋白胨 0.5 g, NaCl 0.5 g, pH 7.2~7.5。初筛培养基(100 mL):明胶 2 g, 蛋白胨 0.5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.02 g, NaCl 0.01 g, pH 7.2~7.5。复筛培养基(100 mL):蔗糖 2 g, 酵母膏 0.15 g,  $\text{CaCl}_2$  0.02 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0.25 g,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.05 g, pH 6.0~7.0。以上培养基加入 1.6%琼脂配制成相应固体培养基。

### 1.2 方法

1.2.1 明胶酶产生菌的筛选<sup>[2]</sup>:将采集的样品用生理盐水浸泡后,富集培养,梯度稀释涂布于初筛平板上进行初筛。将菌种接种于初筛平板上,37℃培养 1~3 d,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:  $\text{HgCl}_2$  15 g, 浓 HCl 20 mL, 加蒸馏水至 100 mL)。

1.2.2 牛皮消化实验:取新鲜小牛皮,切成重约 1 g 的小块,加入发酵 2 d 的培养液,室温放置,观察牛皮消化情况。

1.2.3 胶原酶酶活测定:参照文献[3]进行。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<sup>[4]</sup>。酶活力单位定义为:在 37℃, pH 7.5 条件下,每分钟每毫升发酵液水解胶原产生相当于 1  $\mu\text{g}$  甘氨酸的酶量为 1 个酶活力单位(U/mL)。

1.2.4 菌种的鉴定:参照文献[2]。

## 2 结果

### 2.1 明胶酶产生菌的分离与筛选

从成都市皮革厂和屠宰场等地采集土样、水样共 20 份,生理盐水浸泡,经明胶富集培养后,稀释后涂含 2%明胶的初筛平板。从 20 份样品中分离到 95 株产明胶酶菌株。根据水解圈直径与菌落直径比值判断产明胶酶活力的大小,其比值为 2~10 不等。

### 2.2 牛皮消化实验

挑选明胶酶活力高的 28 株菌(水解圈直径与菌落直径比值大于 5)接种于初筛培养基液中培养,取其发酵液,加入切成重约 1 g 的新鲜牛皮,室温消化。从中筛选到 12 株菌 24 h 后能使牛皮开始消化,48 h 后完全消化,而其他菌株对牛皮没有完全消化或者没有消化。由于小牛皮中含有大量胶原成分,可以认为这些菌株产生了胶原酶。

将菌株发酵液用于消化猪皮得到类似结果,48h 后能将猪皮完全消化。

### 2.3 胶原酶活力测定

将 12 株菌进行摇瓶复筛,发酵液降解胶原,然后用茚三酮法测定胶原酶的活力。发现这 12 株菌产酶活力相近,低的 10 U/mL,高的 16 U/mL。重复实验表明,胶原酶活力基本稳定。选择其中酶活较高、产酶稳定的 13# 进一步实验,暂将其命名为 MBL13。

## 2.4 菌种初步鉴定结果

**2.4.1 个体特征:** 光学显微镜下观察, MBL13 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, 可以看到这个菌株有明显的 1 根极生鞭毛, 菌长  $1.5\ \mu\text{m} \sim 3.0\ \mu\text{m}$ , 宽  $0.5\ \mu\text{m} \sim 0.8\ \mu\text{m}$  (图 1)。

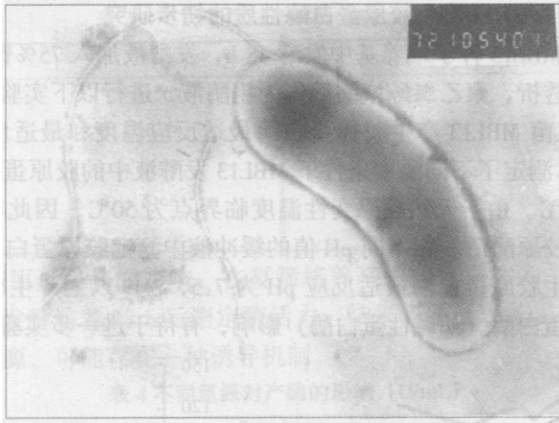


图 1 MBL13 菌株的电镜结果 ( $2.9 \times 10^4$ )

**2.4.2 菌落特征:** 观察了 MBL13 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 h。结果见表 1。

表 1 胶原酶产生菌的培养特征

液体培养	培养特征	固体培养	菌落特征
菌膜	无	大小	1~2 mm
混浊	混浊	形状	椭圆
沉淀	有	轮廓	整齐
颜色	绿	表面	光滑
		高低	微凸
		颜色	绿

**2.4.3 生理生化特征:** 参照文献 [2] 所用方法, 对这个菌的部分生理生化特征进行了实验观察, 结果见表 2。

表 2 胶原酶产生菌的生理生化特征

检测项目	检测结果	检测项目	检测结果
革兰氏反应	-	5% NaCl	+
pH 5.7	+	7% NaCl	-
过氧化氢酶	+	10% NaCl	-
V.P 反应	-	果糖产酸产气	+/-
V.P 反应的 pH 值	6.7~7.0	葡萄糖产酸产气	+/-
淀粉水解	-	木糖产酸产气	+/-
柠檬酸盐利用	+	乳糖产酸产气	-/-
		蔗糖产酸产气	-/+
		甘露醇产酸产气	+/+

**2.4.4 菌种鉴定结果:** 根据上述各种指标的检测结果, 筛选到的 MBL13 菌株初步鉴定为铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)。为进一步证明菌株分类地位的可靠性, 利用

BIOLOG 微生物鉴定仪进行了鉴定，鉴定结果与上述一致。

### 2.5 菌株传代稳定性

MBL13 在牛肉膏蛋白胨斜面培养基上传代 5 次，每次检测牛皮消化情况和测定胶原酶酶活，结果表明该菌株具有很好的传代稳定性。

### 2.6 铜绿假单胞菌 MBL13 产生胶原蛋白酶性质的初步研究

铜绿假单胞菌 MBL13 种子培养基中发酵 48 h，发酵液加入 75% 饱和度硫酸铵，4℃ 沉淀过夜，离心、透析，聚乙二醇浓缩后作为粗酶液，进行以下实验。

**2.6.1 铜绿假单胞菌 MBL13 产生胶原蛋白酶最适反应温度和最适反应 pH:** 在 pH7.5 Tris-HCl 缓冲液中，测定了不同温度条件下 MBL13 发酵液中的胶原蛋白酶活性，该酶的最适反应温度为 32℃。由于天然胶原变性温度临界点为 50℃，因此在此温度以上测定的活性不能认为是胶原酶活。在不同 pH 值的缓冲液中测定胶原蛋白酶的活性，结果显示铜绿假单胞菌产生胶原蛋白酶最适反应 pH 为 7.5，pH9 以上产生较高酶活性可能是粗酶液含有的杂质蛋白酶（如碱性蛋白酶）影响，有待于进一步实验证明（图 2）。

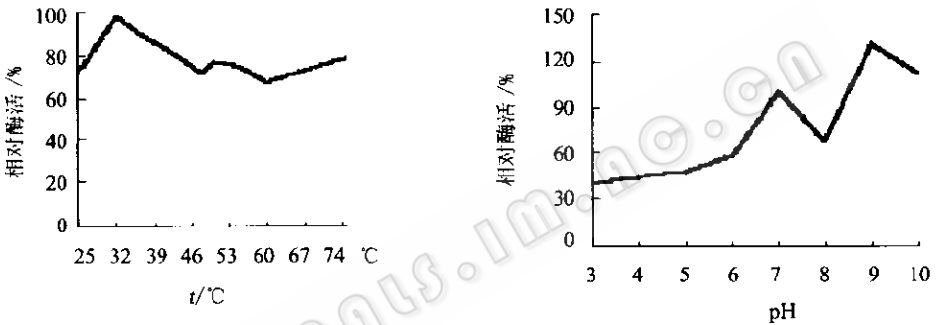


图 2 最适反应温度和 pH

**2.6.2 铜绿假单胞菌 MBL13 产生胶原蛋白酶热稳定性:** 将铜绿假单胞菌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。

**2.6.3 抑制剂对铜绿假单胞菌 MBL13 产生胶原蛋白酶的作用:** 分别用 0.1 mmol/L PMSF、10 mmol/L EDTA、10 mmol/L EGTA 在 4℃ 处理胶原酶 30 min，然后测定剩余胶原酶酶活，结果见图 4：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。

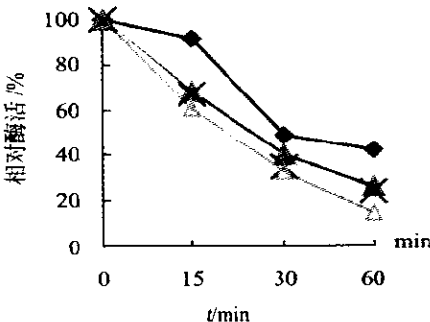


图 3 胶原蛋白酶的热稳定性

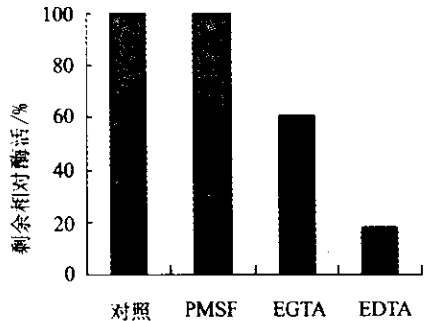


图 4 抑制剂对胶原酶酶活的影响

## 2.7 铜绿假单胞菌 MBL13 产生胶原蛋白酶发酵条件研究

**2.7.1 碳源对产胶原蛋白酶的影响:** 在复筛培养基中, 分别加入 2% 的不同碳源, 其他成分不变。摇瓶发酵培养 48 h 后测定酶活力, 结果见表 3。结果显示, 不同碳源对产酶影响很大, 其中蔗糖为碳源时酶活力最高, 而乳糖则不被利用。

表 3 不同碳源对产酶的影响 (U/mL)

碳源	酶活	碳源	酶活
半乳糖	11.03	葡萄糖	22.05
淀粉	20.18	纤维素	14.31
果糖	7.04	乳糖	未测出
糊精	8.68	蔗糖	23.46
木糖	22.29	甘露醇	7.51

**2.7.2 氮源对产胶原蛋白酶的影响:** 在复筛培养基中, 分别加入 1% 的不同氮源, 其他成分不变。摇瓶发酵培养 48 h 后测定酶活力, 结果表明 (表 4): 明胶为氮源时酶活力大大高于其他氮源, 可能存在一种诱导机制。

表 4 不同氮源对产酶的影响 (U/mL)

氮源	酶活	氮源	酶活
硫酸铵	7.62	鱼粉	4.88
磷酸二氢铵	4.39	牛肉膏	8.05
尿素	7.56	胰蛋白胨	3.17
明胶	24.38	黄豆蛋白胨	未测出
黄豆粉	未测出		

**2.7.3 金属离子对产胶原蛋白酶的影响:** 在复筛培养基中分别添加不同的无机盐, 结果表明 (表 5): 二价金属离子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, 二价金属离子能结合其活性中心。

表 5 金属离子对产酶的影响 (U/mL)

离子	酶活	离子	酶活
硫酸镁	11.66	硫酸亚铁	8.02
硫酸铝	4.62	硫酸铜	16.28
溴化钾	4.37	氯化锌	9.72
氯化钙	21.38	氯化锰	5.59
氯化钡	24.30		

## 2.8 铜绿假单胞菌 MBL13 产生胶原蛋白酶发酵工艺研究

**2.8.1 不同接种浓度对铜绿假单胞菌 MBL13 产胶原蛋白酶的影响:** 将 24 h 种龄的种子培养基以不同浓度接入发酵培养基, 摇瓶振荡培养 48h 后, 测定其中胶原酶活性。结果显示, 低浓度时胶原蛋白酶的活性随接种量的增加而增大, 6% 的接种浓度获得胶原酶活性最高。

**2.8.2 培养基不同起始 pH 对铜绿假单胞菌 MBL13 产胶原酶的影响:** 将发酵培养基 pH 调节成不同的 pH 值, 发酵 48 h, 测定胶原酶活性。结果表明, 培养基起始 pH 对产酶影响较大, 可能在发酵起始阶段影响菌体的生长。培养基起始 pH 为 6.5 时, 获得胶原酶活性最高。

**2.8.3 不同瓶装体积对铜绿假单胞菌 MBL13 产胶原蛋白酶的影响:** 在 100 mL 三角瓶中

装入不同量的发酵培养基,在其他条件一致的情况下发酵 48 h,测定酶活。结果表明,摇瓶装量 10% 体积时产酶活性最高,这可能是因为铜绿假单胞菌是一种好氧菌,通氧量的增加促进了细菌的生长。

**2.8.4 不同发酵温度对铜绿假单胞菌 MBL13 产胶原蛋白酶的影响:**将发酵培养基 pH 调至 7.0,不同温度下发酵 48 h 测胶原酶酶活。结果表明,37℃ 发酵对产酶更为有利。

### 3 讨论

本实验以明胶为底物,初筛富集具有明胶酶活性菌株<sup>[5]</sup>。由于明胶为变性的胶原,其氨基酸序列基本保持不变,因而胶原酶酶活可能与明胶酶酶活相关。同时,我们用含有大量天然胶原的新鲜小牛皮作为进一步筛选的底物,以能完全消化小牛皮作为有胶原酶存在的依据。实验表明,我们筛选到 12 株能完全消化小牛皮的菌株都具有胶原酶活性,酶活性略高于金敏等筛选到的地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 胶原蛋白酶活性<sup>[6]</sup>。

铜绿假单胞菌是假单胞菌属的模式种,在中性或碱性培养基中呈绿色,在酸性培养基中呈红色,可以作为判定其属性的重要依据之一<sup>[7,8]</sup>。早在 1966 年, Schoellmann 和 Fisher 等在蛋白胨丰富的培养基上筛选到了具有胶原酶酶活的铜绿假单胞菌菌株,进行了分离纯化初步研究<sup>[9]</sup>; Lee Carrick 等 1975 年纯化了分子量为 34,000 的胶原酶,对其酶学性质进行了研究<sup>[10]</sup>; 1984 年, Wellisch 等在 38 株铜绿假单胞菌中发现 34 株菌具有胶原酶活性。由于胶原酶的定义并不明确以及理解不同,一些研究认为,铜绿假单胞菌并不产生胶原酶, Morihara 等将其归于弹性蛋白酶或碱性蛋白酶<sup>[11]</sup>。一般认为,胶原酶活性是指能降解天然非变性的胶原<sup>[12]</sup>。按照这个定义,本试验筛选到的铜绿假单胞菌能降解新鲜小牛皮和提取自小牛皮的 III 型可溶性胶原 (购自 Sigma 公司),我们认为,该菌株能产生具有胶原酶酶活的蛋白酶。

### 参考文献

- [1] Tschesche H, Macartney H. *Methods of Enzymatic Analysis*, 1981, V: 239 ~ 248.
- [2] 张纪忠. 微生物分类学. 上海: 复旦大学出版社, 1988. 89 ~ 109.
- [3] Joseph R M, Joseph H D. *Biochemistry*, 1978, 17: 2857 ~ 2863.
- [4] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术. 北京: 高等教育出版社, 1997.
- [5] Harry L, Smith J R, Goodner K. *Journal of Bacteriology*, 1958, 76: 662 ~ 665.
- [6] 金敏, 王忠彦, 胡承, 等. 四川大学学报 (自然科学版), 2000, 37 (5): 764 ~ 767.
- [7] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册 (第八版). 北京: 科学出版社, 1984.
- [8] Wahba A H. *Journal of General Microbiology*, 1965, 38: 329 ~ 342.
- [9] Schoellmann G, Fisher E. *Biochim Biophys Acta*, 1966, 122: 557 ~ 559.
- [10] Carrick L, Richard J, Berk S. *Biochim Biophys Acta*, 1975, 391: 422 ~ 434.
- [11] Morihara K, Homma J Y. *Bacterial Enzymes and Virulence*, CRC press, 1985. 41 ~ 79.
- [12] Wllisch G, Cohen E, Cahane Z, et al. *Journal of Clinical Microbiology*, 1984, 20: 1020 ~ 1021.