

*Bacillus cereus*胞外胶原蛋白酶水解牛骨胶原蛋白的动力学

刘丽莉, 杨协力, 任广跃, 段 续

(河南科技大学食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471003)

摘 要: 针对从细菌蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)MBL13中提取得到的胶原蛋白酶水解牛骨胶原蛋白的动力学性质进行研究。考察底物质量浓度、时间、温度、酶质量浓度、pH值5个因素对酶解水解度的影响, 优化酶解的条件; 并对酶解过程的动力学进行分析。结果表明: 最佳的酶解工艺参数为底物质量浓度30g/L、时间6h、温度45℃、初始酶液质量浓度为0.35g/100mL、pH8.0。在此基础上推导出酶解动力学方程为: $V = 9.3633[S]/(114.785 + [S])$ 。并在波长230nm和570nm处对酶解过程动态变化进行测定, 表明胶原多肽含量不断增加的动态变化。

关键词: 胶原蛋白酶; 牛骨胶原蛋白; 胶原多肽; 酶解; 动力学

Hydrolysis Kinetics of Bovine Bone Collagen by *Bacillus cereus* Extracellular Collagenase

LIU Li-li, YANG Xie-li, REN Guang-yue, DUAN Xu

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

Abstract: In order to explore the hydrolysis kinetics of bovine bone collagen by collagenase isolated from *Bacillus cereus* MBL13 and the optimal hydrolysis conditions, the effects of substrate concentration, hydrolysis temperature, enzyme concentration, hydrolysis pH and hydrolysis time on the degree of hydrolysis (DH) were analyzed. The optimal conditions for the hydrolysis of bovine bone collagen were bone collagen concentration of 30 g/L, hydrolysis time of 6 h, hydrolysis temperature of 45 °C, initial enzyme concentration of 0.35 g/100 mL and hydrolysis pH of 8.0. Based on the experimental data, a kinetic model equation was obtained as $V = 9.3633 \cdot [S]/(114.785 + [S])$. Enzymatic hydrolysis process was analyzed at the wavelength of 230 nm and 570 nm.

Key words: collagenase; bovine bone collagen; collagen polypeptide; enzymatic hydrolysis; kinetics

中图分类号: TS251

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)21-0192-04

近年来, 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。以牛骨为例, 其约占牛体质量的12%~20%, 即每生产100kg牛肉就会有12~20kg的牛骨产生。在我国的骨加工业中, 畜骨大部分用于生产骨胶、骨油、骨粉等, 用于生产动物饲料, 其附加值都很低, 尤其是牛骨深加工开发研究较少。因此, 进一步开发牛骨深加工产品势在必行。

胶原蛋白是动物体骨骼中含量最大的一种蛋白质, 将胶原蛋白进一步酶解可得到性能更加优良的胶原多肽, 将其应用于美容化妆品、医学、药用、食品工业等领域^[1-3], 能够充分提升其附加值。对Chambers等^[4]对骨骼进行了酶解研究; Surówka等^[5]采用中性蛋白酶进行了酶解鸡头骨蛋白的研究; Linder等^[6-8]将小牛骨骼进行酶性水解回收小牛骨蛋白的研究。王朝旭^[9]、孙骞^[10]等进行

了蛋白酶对猪骨蛋白进行酶解的研究。而从牛骨中提取胶原蛋白, 是获取天然胶原蛋白及其酶解活性多肽的一条重要途径; 以牛骨为原料制备骨胶原多肽可充分提高牛骨产品的附加值, 也是牛骨开发利用和发展的一条新出路。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^[11-12]。然而, 只有为数有限的蛋白酶能降解胶原蛋白。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。细菌胶原酶可分泌到胞外, 通过发酵可大量获得, 此类胶原酶具有更广的应用范围。将胶原蛋白酶解是一个复杂的反应过程, 其动力学研究对于了解其酶解机理、确定酶解过程的关键影响因素、选择适宜的控制参数范围以及制备性能优异的胶原多肽产品工艺等均具有重要意义^[13]。

收稿日期: 2011-09-19

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划项目(2006BAD05A17)

作者简介: 刘丽莉(1974—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为畜产食品科学与技术。E-mail: yangliuyilang@126.com

因此, 本实验采用从蜡样芽孢杆菌*Bacillus cereus* MBL13中提取的胶原蛋白酶对牛骨胶原蛋白进行酶解, 优化酶解条件, 拟合酶解动力学方程; 并对多肽形成过程中的酶解动态特性进行研究分析。确定酶解过程的关键影响因素, 了解细菌胶原蛋白酶的作用机理, 为牛骨胶原蛋白的深加工开发提供一定的理论依据, 同时为进一步开发和利用新型的细菌胶原蛋白酶提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜牛骨 市售。

蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)胞外胶原蛋白酶, 从华中农业大学食品科学技术学院微生物实验室提供的*Bacillus cereus* MBL13菌株中纯化分离得到, 酶活力1560U/mg^[14]。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

Avanti J-E超速冷冻离心机 美国Beckman Coulter公司; UV1800紫外分光光度仪 美国Mapada公司; KDN-2C型定氮仪 上海纤检仪器有限公司; FD-1真空冷冻干燥机 北京德天佑科技发展有限公司。

1.3 方法

1.3.1 牛骨胶原蛋白的提取

按照文献[15-17]报道的提取方法, 由新鲜牛骨制备胶原蛋白。

1.3.2 牛骨胶原蛋白的酶解

牛骨胶原蛋白溶液室温条件下搅拌2h, 于90℃热处理20min。冷却后加入蜡样芽孢杆菌胶原蛋白酶, 固定酶解的条件为: 取样200mL, 胶原蛋白质量浓度为40.0g/L、温度为40℃、pH7.0, 加入0.40g/100mL胶原蛋白酶液, 分别研究不同底物质量浓度(30.0、40.0、50.0、60.0、70.0g/L)、温度(30、35、40、45、50、55、60℃)、酶液质量浓度(0.20、0.25、0.30、0.35、0.40、0.45g/100mL)和pH值(3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0)条件下, 在控温振荡器上反应, 每隔一定时间, 取出样品液, 90℃灭酶10min, 待降至室温, 4000r/min离心10min, 得到澄清的酶解液, 测定不同酶解时间水解度的变化。

1.4 测定指标与方法

1.4.1 水解度的测定

$$\text{水解度}/\% = \frac{\text{水解后生成的一NH}_2\text{的量}}{\text{样品总含氮量}} \times 100$$

其中, 水解后生成的一NH₂的量由甲醛滴定法测得, 样品总含氮量由凯氏定氮法测定^[18]。

1.4.2 胶原蛋白酶活力的测定

采用茚三酮显色法^[19]测定。

1.4.3 胶原蛋白酶水解牛骨胶原蛋白的动态过程

在以上实验确定的酶解条件下, 进行酶解牛骨胶原蛋白, 在不同时间取样, 分别在波长为230nm和570nm条件下测定酶解液的吸光度, 绘制变化曲线。

2 结果与分析

2.1 底物质量浓度和时间对牛骨胶原蛋白酶解的影响

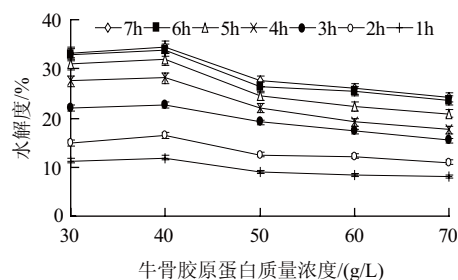


图1 不同时间水解度-底物质量浓度曲线

Fig.1 Hydrolysis degree-substrate concentration curves under different time

在反应体系中底物对酶反应存在一定的作用, 即底物存在着促进反应速率和对酶产生抑制的双重作用。由图1可知, 水解度随底物质量浓度的升高呈现先上升后下降的趋势, 在底物质量浓度为30~40g/L范围内, 水解度随底物质量浓度的升高而增加($P>0.05$), 即底物对反应起着促进作用; 但当底物质量浓度超过40g/L时, 底物对酶解产生抑制作用。因此, 采用30g/L的底物质量浓度为宜。

图1表明, 水解度随处理时间的延长而增加, 尤其是酶解时间低于3h时, 此变化较为显著($P<0.05$), 可能由于底物经酶作用后, 其易被酶水解的肽键数目减少以及酶变性失活的加重导致水解速率的下降。因此, 选用6h左右的酶解时间较为适宜。

2.2 酶解温度对牛骨胶原蛋白酶解的影响

文献[9-10]表明, 在一定的温度范围内, 温度对酶解反应有促进作用, 但过高的温度会使酶的活力受到抑制而失活。因此, 酶解温度的选择极为重要。在不同的反应温度条件, 测定不同酶解时间下的水解度变化, 结果见图2。

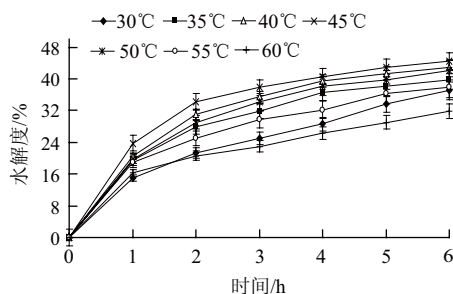


图2 不同温度条件下水解度-时间曲线

Fig.2 Hydrolysis degree-hydrolysis time curves under different temperatures

由图2可知, 温度对酶解反应有显著的影响作用。

在同一时间条件下,随着温度的升高,水解度呈现先增加而后下降的变化。在30~45℃的温度范围内,提高反应温度,可使牛骨胶原蛋白酶解的程度更加彻底,45℃时,水解度达到最高值。而后当温度不断增加时,高温引起酶活性下降,酶解反应的水解度反而不断下降。因此采用45℃为适宜的温度选择。

2.3 酶液质量浓度对牛骨胶原蛋白酶解的影响

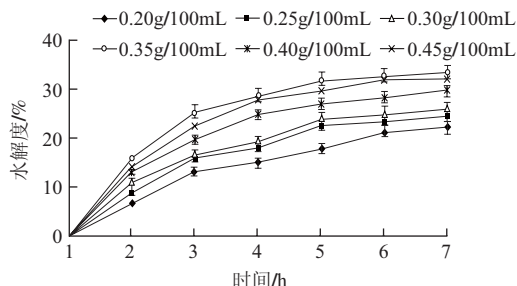


图3 不同酶液质量浓度下水解度-时间曲线

Fig.3 Hydrolysis degree-time curves under different enzyme concentrations

由图3可知,在一定范围内,随初始酶液质量浓度的增加,反应速率呈线性增加,而且不同的初始酶液质量浓度条件下的水解度都表现为随着时间的延长而不断增加的变化,最终趋向于一个极限值。这种趋势表明胶原蛋白酶降解牛骨胶原蛋白遵循一级反应规律。反应时间6.0h与1.0h和2.0h相比,水解度呈现极显著性的差异($P < 0.01$)。在初始酶液质量浓度为0.3g/100mL时,酶解水解度最大。因此,选用初始酶液质量浓度为0.35g/100mL。

2.4 pH值对牛骨胶原蛋白酶解的影响

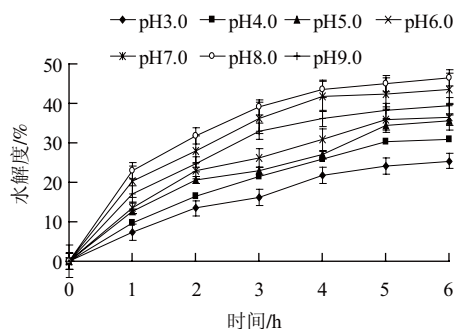


图4 不同pH值条件下水解度-时间曲线

Fig.4 Hydrolysis degree-hydrolysis time curves under different pH conditions

由图4可知,在同一时间条件下,水解度随pH值的增大而呈现先升高而后下降的变化。当pH值为3.0~8.0范围内,水解度表现为不断的升高,在pH值为8.0时,水解度最大,且pH8.0与pH3.0的水解度呈现极显著差异($P < 0.01$),而后水解度反而随pH值的增大而降低。故选择pH8.0为佳。

2.5 牛骨胶原蛋白酶解动力学特性研究

米氏(Michaelis-Menten)的中间产物学说表明:首先酶(E)与底物(S)结合生成中间产物(ES),然后ES再分解成产品(P),E则重新游离出来。因此,将牛骨胶原蛋白酶解的反应过程采用式(1)表达^[20]。



通过质量守恒定律推导出蜡样芽孢杆菌胶原蛋白酶解牛骨胶原蛋白的Michaelis-Menten方程如式(2)。

$$V = V_{\max} [S] / K_m + [S] \quad (2)$$

式中: V 为反应速率; $[S]$ 为反应底物质量浓度; K_m 为米氏常数。

为确定胶原蛋白酶解牛骨胶原蛋白的最佳条件,在以上优化的酶解条件下,将牛骨胶原蛋白配成不同质量浓度的溶液,于45℃进行酶促反应,并测定各实验的水解度,计算反应的速率,用 $1/V$ 对 $1/[S]$ 作图。结果见图5。

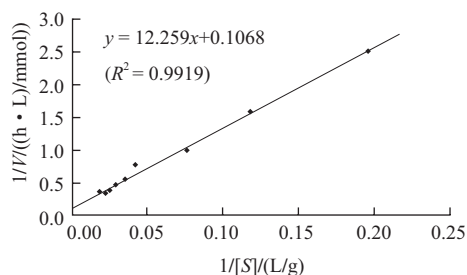


图5 Lineweaver Burk方程 $1/v$ 对 $1/[S]$ 作图

Fig.5 Lineweaver Burk plot

并根据图5结果,拟合出Lineweaver Burk米氏方程(3):

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} = \frac{9.3633 \times [S]}{114.7850 + [S]} \quad (3)$$

由米氏方程(3),作出反应速率与底物质量浓度关系图,如图6所示。

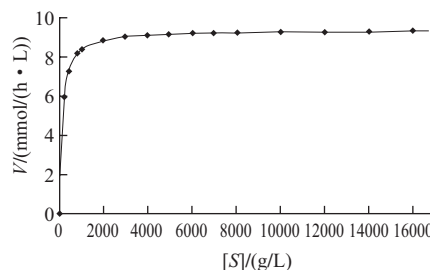


图6 反应速率与底物牛骨胶原蛋白质量浓度的关系图

Fig.6 Relationship between reaction velocity and bovine bone collagen concentration

由图6可知,酶解反应呈现以下规律:在牛骨胶原蛋白质量浓度很低时,反应速率与底物质量浓度呈正比为一级反应;而当底物质量浓度再持续增大,反应速率增加的幅度越来越小,呈现混合级反应,反应速率主要取

决于底物质量浓度和底物与酶结合之间的浓度关系；但当底物牛骨胶原蛋白质量浓度达到某一定值后，再增加底物质量浓度，反应速率趋于恒定，呈现为明显的零级反应，所有的酶已经被饱和。此时达到的速率为酶解的最大反应速率；而当底物质量浓度 $[S]=K_m$ 时，反应的速率为 $1/2V_{max}$ 。由于 K_m 可判断酶与底物的亲和力，即 K_m 越小，亲和力越大，越有利于牛骨胶原蛋白的酶解。

2.6 牛骨胶原蛋白的酶解动态变化

由于未酶解的胶原蛋白的凝胶较透明、色白，而酶解开始后，溶液颜色逐渐变深，这主要与产生小分子质量的胶原多肽有关。溶液的颜色越深，酶解反应越彻底。因此，在波长570nm条件下，酶解液吸光度的变化可反映出酶解液中胶原多肽量^[21]。由于天然胶原蛋白在波长230nm附近有强烈的光吸收，因此，在该波长处对酶解液的吸光度进行扫描测定，可反映出未酶解的胶原蛋白的量^[22]。因此，针对不同时间的酶解液样品在波长570nm和230nm条件下，进行吸光度扫描测定。

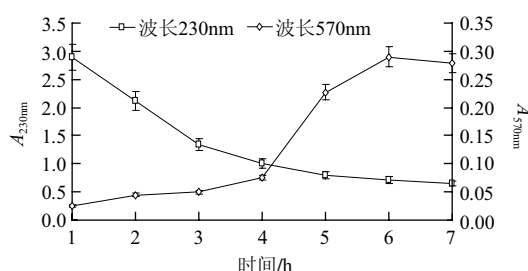


图7 230nm、570nm波长处酶解液吸光度随酶解时间的变化

Fig.7 Absorbance change of hydrolysates with various hydrolysis time at 230 nm and 570 nm

由图7可知，在波长230nm时，酶解开始的前3h内，吸光度迅速下降，说明酶解牛骨胶原蛋白迅速($P<0.05$)；而随着酶解时间延长，时间为4~5h之间时，吸光度的变化率减慢，表明原液中胶原蛋白的质量浓度仍在进一步下降，但其反应速率开始呈现下降趋势；当时间为6h以后，吸光度变化很小，基本趋于恒定，表明牛骨胶原蛋白的酶解过程基本完成。而同时，在波长570nm处测得的多肽的含量则呈现不同的变化趋势，在反应时间为4h之前，多肽的含量呈现平稳的略增加现象($P>0.05$)，而当酶解时间为4~6h，吸光度呈现极显著增加($P<0.01$)，说明溶液值胶原多肽含量增加显著，而6h以后吸光度开始呈下降变化，可能原因是胶原多肽进一步水解成更小分子质量的氨基酸。

3 结论

本实验针对从自然界筛选的蜡样芽孢杆菌*Bacillus cereus* MBL13所产的胶原蛋白酶对牛骨胶原蛋白进行了酶解动力学探讨，以期对牛骨胶原蛋白酶解的生化反应器的设计和牛骨的深加工开发提供一定的理论依据，为进

一步开发和利用新型的细菌胶原蛋白酶奠定基础。实验首先针对影响酶解的5个因素(底物质量浓度、时间、温度、酶初始质量浓度、pH值)进行了分析，确定了最佳的酶解条件为：底物质量浓度30g/L、酶解时间6h、温度45℃、初始酶液质量浓度0.35g/100mL、pH8.0。通过采用优化后的酶解参数，推导出描述蜡样芽孢杆菌胶原蛋白酶解牛骨胶原蛋白的动力学方程。最后测定了不同波长230nm和570nm条件下酶解液吸光度的变化，证实了酶解过程中胶原蛋白在不断减少，同时胶原多肽在不断变化的动态变化。

参考文献:

- OLSEN D, YANG Chunlin, BODO M, et al. Recombinant collagen and gelatin for drug delivery[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2003, 55(12): 1547-1567.
- GELSE K, PÖSCHL E, AIGNER T. Collagens: structure, function, and biosynthesis[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2003, 55(12): 1531-1546.
- MORIMURA S, NAGATA H, UEMURA Y, et al. Development of an effective process for utilization of collagen from livestock and fish waste[J]. *Process Biochemistry*, 2002, 7(3): 1403-1412.
- CHAMBERS J, RASMUSSEN P B. Enzymatic treatment of bones[J]. *J Sci Food Agric*, 1988, 42: 87-94.
- SURÓWKA K, FIK M. Studies on the recovery of proteinaceous substances from chicken heads[J]. *J Food Sci Technol*, 1992, 27: 9-12.
- LINDER M, JACQUES F, ROZAN P, et al. Protein recovery from veal bones by enzymatic hydrolysis[J]. *J Food Sci*, 1995, 60(5): 949-958.
- LINDER M, FANNI J, PARMENTIER M. Functional properties of veal bone hydrolysates[J]. *J Food Sci*, 1996, 61(7): 712-716; 720.
- LINDER M, ROZAN P, ELKOSSORI R L, et al. Nutritional value of veal bone hydrolysate[J]. *J Food Sci*, 1997, 62(1): 183-187.
- 王朝旭, 赵丹, 王小雪, 等. 酶法水解骨蛋白最佳条件的研究[J]. *食品科学*, 2001, 22(2): 48-49.
- 孙骞, 王峥, 罗永康, 等. 猪骨蛋白生物活性肽酶法制备工艺的研究[J]. *肉类研究*, 2008, 22(5): 37-41.
- WATANABE K. Collagenolytic proteases from bacteria[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 63: 520-526.
- PARK P J, LEE S H, BYUN G H, et al. Purification and characterization of a collagenase mackerel, *Scomber japonicus*[J]. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 35(6): 576-582.
- HORN M M, VIRGINIA C, MARTINS A, et al. Interaction of anionic collagen with chitosan: effect on thermal and morphological characteristics[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2009, 77(2): 239-243.
- LIU Lili, MA Meihu, CAI Zhaoxia, et al. Purification and properties of a collagenolytic protease produced by *Bacillus cereus* MBL13 strain[J]. *Food Technology and Biotechnology*, 2010, 48(2): 151-160.
- MILADINOV V D, GENNADIOS A, HANNA M A. Gelatin manufacturing process and product: US, 0142368A1[P]. 2002.
- 刘丽莉, 马美湖, 杨协力. 牛骨 I 型胶原蛋白提取及结构表征[J]. *食品科学*, 2010, 31(2): 87-91.
- NOMURA Y, SAKAI H, ISHII Y, et al. Preparation and some properties of type I collagen from fish scales[J]. *Biosci Biotech Biochem*, 1996, 60(12): 2092-2094.
- MEARA G M O, MUNRO P A. Effects of reaction variables on the hydrolysis of lean beef tissue by alcalase[J]. *Meat Science*, 1984, 11: 227-238.
- BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding[J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254.
- SONOBE T, WORASUWANNARAK N. Kinetic analyses of biomass pyrolysis using the distributed activation energy model[J]. *Fuel*, 2008, 87(3): 414-421.
- 郑巧东, 贡军贤, 林东强, 等. 胶原蛋白酸解为胶原多肽的动力学研究[J]. *中国皮革*, 2005, 34(5): 21-23.
- 蒋挺大. 胶原与胶原蛋白[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006.