

Lysinibacillus sphaericus 胶原酶的异源表达、鉴定及其在抗氧化活性肽制备中的应用

吴海星, 黄安妮, 高霞, 申铨日, 夏光华, 张雪莹

Heterologous Expression and Characterization of Collagenase from *Lysinibacillus sphaericus* and Its Application in the Preparation of Antioxidant Peptides

WU Haixing, HUANG Anni, GAO Xia, SHEN Xuanri, XIA Guanghua, and ZHANG Xueying

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024050254>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

响应面法优化复合酶酶解制备可口革囊星虫胶原蛋白抗氧化肽工艺研究

Optimization of the Preparation of Collagen Antioxidant Peptides from *Phascolosoma esculenta* by Compound Enzymatic Hydrolysis by Response Surface Methodology

食品工业科技. 2021, 42(22): 230-239 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021070183>

牛骨胶原水解物抑制鲢鱼肌原纤维蛋白氧化和增强凝胶特性研究

Oxidation Inhibition and Gel Properties Enhancement of Myofibrillar Protein from Silver Carp by Bovine-bone Collagen Hydrolysate

食品工业科技. 2021, 42(11): 73-80 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020080092>

牛骨源胶原蛋白肽的制备及其生理活性研究进展

Research Progress on Preparation and Biological Activity of Bovine Bone Collagen Peptides

食品工业科技. 2020, 41(15): 357-364 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.15.055>

酶解技术提取动物组织中的胶原蛋白及其肽的研究进展

Advances in Extraction of Collagen and Its Peptides from Animal Tissues by Enzymatic Hydrolysis

食品工业科技. 2020, 41(15): 332-338 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.15.051>

响应面优化藏羊皮胶原蛋白肽超声辅助提取工艺及其体内抗氧化活性分析

Optimization of Ultrasonic Assisted Extraction of Tibetan Sheep Skin Collagen Peptide by Response Surface Methodology and Its Antioxidant Activity *in Vivo*

食品工业科技. 2023, 44(11): 163-170 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022060009>

胶原蛋白肽的制备、生物活性及应用研究进展

Research Progress on Preparation, Biological Activity and Application of Collagen Peptides

食品工业科技. 2024, 45(23): 396-404 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024010019>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

吴海星, 黄安妮, 高霞, 等. *Lysinibacillus sphaericus* 胶原酶的异源表达、鉴定及其在抗氧化活性肽制备中的应用 [J]. 食品工业科技, 2025, 46(6): 206–216. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024050254

WU Haixing, HUANG Anni, GAO Xia, et al. Heterologous Expression and Characterization of Collagenase from *Lysinibacillus sphaericus* and Its Application in the Preparation of Antioxidant Peptides[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(6): 206–216. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024050254

· 生物工程 ·

Lysinibacillus sphaericus 胶原酶的异源表达、鉴定及其在抗氧化活性肽制备中的应用

吴海星¹, 黄安妮¹, 高霞¹, 申铨日¹, 夏光华^{1,2,*}, 张雪莹^{1,2,*}

(1.海南大学食品科学与工程学院, 南海水产资源高效利用工程研究中心, 海洋食品精深加工海口市重点实验室, 国家对虾加工技术研发分中心(海南), 海南海口 570228;

2.大连理工大学, 海洋食品精深加工关键技术省部共建协同创新中心, 辽宁大连 116034)

摘要:目的: 对来源于 *Lysinibacillus sphaericus* 的胶原酶 LsCol1 进行异源表达、纯化、酶学性质及底物特异性研究, 并用于水解罗非鱼皮胶原蛋白制备抗氧化活性肽, 以期为新型胶原酶资源的开发及其在生物活性肽制备中的应用提供理论依据。方法: 使用序列分析工具 BLAST、Clustal Omega 等分析 LsCol1 的氨基酸序列, 利用 AlphaFold 3 预测其三维结构, 借助化学合成技术获得 LsCol1 的基因序列全长并在 *Escherichia coli* 中异源表达, 使用镍亲和层析分离纯化 LsCol1, 研究其酶学特性及底物特异性, 最后利用 LsCol1 水解罗非鱼皮胶原蛋白制备抗氧化活性肽。结果: LsCol1 基因序列全长为 3219 bp, 编码 1072 个氨基酸, N 端含有催化域, C 端附属结构域由一个多囊肾病样结构域和两个胶原结合结构域组成。纯化后的重组胶原酶 LsCol1 分子量为 120 kDa, 最适反应温度和 pH 分别为 37 °C 和 7.5, 在低于 30 °C 和 pH7.0~10.0 范围内稳定性较好, Ca²⁺对 LsCol1 的酶活力呈促进作用。底物特异性实验结果表明, LsCol1 的最适作用底物为罗非鱼皮胶原蛋白。以罗非鱼皮胶原蛋白为底物制备的水解物具有良好的抗氧化活性, 当水解物浓度为 4 mg/mL 时, 其 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐自由基和羟基自由基清除率分别为 65.9%、97.6% 和 32.1%。结论: *L. sphaericus* 来源的重组胶原酶 LsCol1 具有良好的催化活性, 在抗氧化活性肽制备方面具有潜在的应用价值。

关键词: 胶原蛋白, 胶原酶, 酶学特性, 胶原蛋白水解物, 抗氧化活性

中图分类号: Q814

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2025)06-0206-11

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024050254

本文网刊:



Heterologous Expression and Characterization of Collagenase from *Lysinibacillus sphaericus* and Its Application in the Preparation of Antioxidant Peptides

WU Haixing¹, HUANG Anni¹, GAO Xia¹, SHEN Xuanri¹, XIA Guanghua^{1,2,*}, ZHANG Xueying^{1,2,*}

(1. School of Food Science and Engineering, Hainan University, Hainan Engineering Research Center of Aquatic Resources Efficient Utilization in South China Sea, Key Laboratory of Seafood Processing of Haikou, National R & D Branch Center for Prawn Processing Technology (Hainan), Haikou 570228, China;

2. Collaborative Innovation Center of Provincial and Ministerial Co-construction for Marine Food Deep Processing, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China)

Abstract: Objective: Collagenase from *Lysinibacillus sphaericus* (LsCol1) was heterologously expressed and purified, and its enzymatic property and substrate specificity were determined. It was then used to hydrolyze tilapia skin collagen to

收稿日期: 2023-05-27

基金项目: 海南省重点研发计划项目 (ZDYF2020172); 海南省自然科学基金 (322RC587); 海南大学科研启动基金项目 (KYQD (ZR) 20046)。

作者简介: 吴海星 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 水产品加工与贮藏, E-mail: 1962432444@qq.com。

* 通信作者: 张雪莹 (1989-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 水产品加工副产物综合利用, E-mail: 994257@hainanu.edu.cn。

prepare antioxidant peptides, with the aim of providing a theoretical basis for the development of a new collagenase resource and its application in the preparation of bioactive peptides. Methods: The amino acid sequence of LsCol1 was analyzed using BLAST and Clustal Omega, and the three-dimensional structure was predicted using AlphaFold 3. The gene sequence of LsCol1 was obtained using chemical synthesis technology, and it was then heterologously expressed in *Escherichia coli*. LsCol1 was purified using nickel affinity chromatography, and its enzymatic properties and substrate specificity were studied. Finally, the antioxidant peptide was prepared by hydrolyzing tilapia skin collagen with LsCol1. Results: The full length of LsCol1 gene was 3219 bp and encoded 1072 amino acids. The N-terminal of LsCol1 had a catalytic domain, and the C-terminal accessory domain consists of a polycystic kidney disease-like domain and two collagen-binding domains. The molecular weight of purified recombinant collagenase LsCol1 was 120 kDa. The optimal reaction temperature and pH of LsCol1 were 37 °C and 7.5, respectively, and it was relatively stable in the range below 30 °C and pH7.0~10.0. Ca^{2+} promoted LsCol1 activity. The substrate specificity experiment showed that the optimal substrate for LsCol1 was tilapia skin collagen. The hydrolysate prepared from tilapia skin collagen displayed good antioxidant activity, with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical, and hydroxyl radical, scavenging rates of 65.9%, 97.6%, and 32.1%, respectively, at a concentration of 4 mg/mL. Conclusion: The collagenase LsCol1 from *L. sphaericus* had high catalytic capacity and potential application in the preparation of bioactive peptides.

Key words: collagen; collagenase; enzymatic properties; collagen hydrolysate; antioxidant activity

胶原蛋白是一种重要的结构蛋白,由三条多肽链相互缠绕形成稳定的右手超螺旋结构,螺旋区域由重复的氨基酸序列 Gly-X-Y 构成,其中 X 多为脯氨酸,而 Y 多为羟脯氨酸^[1]。胶原蛋白广泛存在于动物的肌腱、骨骼、软骨、韧带和皮肤中,约占总蛋白含量的 30%^[2]。胶原蛋白水解后得到的胶原蛋白肽生物活性十分广泛,如抗氧化^[3]、改善关节疼痛^[4]、提高骨密度^[5]、降血压^[6]、降血糖^[7]、促进伤口愈合^[8]、提高面部皮肤的水分含量和弹性以及增强表皮屏障功能^[9]等,对人类健康具有积极影响。目前,胶原蛋白肽已作为膳食补充剂被添加到食品和饮料中,或者作为生物活性成分加入到化妆品、医疗保健品和药品中^[10]。罗非鱼是我国重要的经济鱼类,据统计 2023 年罗非鱼的全国年产量约为 181 万吨^[11]。罗非鱼经生产加工后会产生大量富含胶原蛋白的鱼皮、鱼鳞等副产物,但是这些加工副产物的高值化利用率较低,造成了严重的资源浪费。因此,以罗非鱼皮或鱼鳞为原料提取胶原蛋白进而将其水解制备生物活性肽,不仅可以减轻环境负担,同时提高了其经济价值。

胶原蛋白的水解方法包括化学法和酶法。化学法缺乏特异性和选择性,并且需要使用腐蚀性化学品,易污染环境^[12]。相较于化学法,酶法反应过程可控,反应条件温和,降低了氨基酸被破坏的风险^[13],因此更符合清洁生产和安全食用的生产模式。

胶原酶(EC 3.4.24.3)是一种在生理条件下能够水解天然胶原蛋白的酶,对胶原蛋白具有高度特异性^[14],可用于嫩化肉制品^[15]、澄清和稳定啤酒^[16]、制备胶原蛋白活性肽^[17]等。根据胶原酶的来源,可分为微生物来源的胶原酶和动物来源的胶原酶。但是,对前者的研究更早些。细菌胶原酶能够与天然胶原蛋白结合并打开缠绕的多肽链,而且可以在多个酶切位点水解胶原蛋白的肽键,最终得到小分子胶原蛋白

肽^[18-19]。目前,已报道的产胶原酶的微生物包括梭菌(*Clostridium histolyticum*、*Clostridium perfringens*、*Clostridium capito*)、弧菌(*Vibrio alginolyticus*、*Vibrio parveyi*、*Vibrio parahaemolyticus*)和芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*、*Bacillus cereus*、*Bacillus subtilis*)等^[20],并且 *C. histolyticum* 和 *V. alginolyticus* 来源的胶原酶已被开发为商品化胶原酶。但是,上述菌株大部分为致病菌,在产胶原酶的同时也会产生相应的毒素,因而不适用于食品和营养领域。因此,从食品安全的角度出发,继续筛选非致病性的产胶原酶微生物仍是当下的研究方向。

最近, Bach 等^[21]报道了一株产胶原酶的微生物 *Lysinibacillus sphaericus* VN3,以牛跟腱胶原蛋白为底物时,粗酶液的酶活力高达 56.8 U/mg(酶活力定义为每分钟生成 1 μmol 亮氨酸所需要的酶量)。随后,该课题组从 *L. sphaericus* VN3 的发酵液中纯化到了胶原酶 LS,研究发现 LS 能够将小块牛皮和肌腱水解为可溶性的胶原蛋白溶液,并且在 pH 6.0~8.0 的条件下,可溶性的胶原蛋白形成了具有良好抗炎以及促进伤口愈合作用的胶原膜。*L. sphaericus* 是一种非致病性的革兰氏阳性细菌,属于 *Lysinibacillus* 属,也被称为 *Bacillus sphaericus*。综合考虑 *L. sphaericus* 较强的产胶原酶能力及其非致病性特点,有望从 *L. sphaericus* 的发酵液中分离纯化到适用于食品加工的胶原酶。然而,野生酶缺乏稳定性,并且以各种同工酶的形式共存,使得分离纯化过程复杂,成本较高,这严重阻碍了胶原酶的大规模生产和应用。而利用基因工程技术构建异源表达系统,是解决上述问题的有效手段。基于上述研究背景,本研究从已公布的 *L. sphaericus* KCCM 35418 的基因组中检索到了一条可能编码胶原酶的基因序列(命名为 *Lscol1*),并首次在大肠杆菌中异源表达,分离纯化后研究其酶学特性以及底物特异性,最后用

于酶解罗非鱼皮胶原蛋白制备抗氧化活性肽。本研究旨在丰富现有的胶原酶资源,为杆菌来源胶原酶的研究奠定理论基础,同时提供一种罗非鱼皮抗氧化活性肽的制备方法,为酶法制备抗氧化活性肽的研究提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

Escherichia coli BL21(DE3)、表达质粒 pET-28a(+) 德国 Novagen 公司; LB(Luria-Bertani)培养基、酪蛋白、不溶性牛跟腱 I 型胶原蛋白、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(Isopropylthio- β -D-galactoside, IPTG)、硫酸卡那霉素和咪唑 生工生物工程(上海)股份有限公司;牛皮明胶、鸡 II 型胶原蛋白、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, DPPH)、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS) 上海麦克林化学试剂化工有限公司;酸溶性牛跟腱 I 型胶原蛋白 北京索莱宝科技有限公司;乙二醇双四乙酸(Ethylene glycol tetraacetic acid, EGTA)、乙二胺四乙酸(Ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) 阿拉丁试剂(上海)有限公司;罗非鱼皮 海南翔泰渔业股份有限公司;其它试剂均为国产分析纯。

DYY-60 蛋白电泳仪 北京市六一仪器厂; LG2020D 凝胶成像系统 杭州朗基科学仪器有限公司; SMP7 多功能酶标仪 美国 BIO-RAD 公司; NRY-200 恒温培养摇床 上海南荣实验室设备有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 目的基因的获取及其生物信息学分析 根据美国国家生物信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)已公布的 *L. sphaericus* KCCM 35418 的全基因组 DNA 序列信息(NCBI 登陆号 CP026120.1),从中筛选出一条可能编码胶原酶的基因序列 *Lscol1*(NCBI 登录号 WP_107921913.1)。去除信号肽后,委托生工生物工程(上海)股份有限公司对基因序列进行密码子优化及合成。

使用 NCBI 数据库中的 BLAST 功能对 *LsCol1* 的氨基酸序列进行同源性分析;利用在线工具 SignalP 5.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测信号肽序列以及利用 ExPASy 的 ProtParam 工具(<http://web.expasy.org/protparam/>)预测理论分子量和等电点^[22];利用 InterPro(<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>)预测结构域^[23];利用 AlphaFold 3 预测三维结构^[24],借助 PyMOL 2.5 软件对三维结构进行可视化分析;利用 Clustal Omega(<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>)和 Jalview 2.11.32 软件进行同源序列比对^[23],参考氨基酸序列包括来源于 *B. cereus* ATCC 14579 的 ColA(NCBI 登录号

Q81BJ6)、来源于 *C. histolyticum* 的 ColG(Q9X721)和 ColH(Q46085)、来源于 *B. cereus* Q1 的 ColQ1(B9J3S4)以及来源于 *Clostridium tetani* 的 ColT(Q899Y1),对各结构域进行比对时,ColG、ColH 和 ColT 的结构域边界参考 Eckhard 等^[25]的研究结果,ColQ1 和 ColA 的结构域边界参照 Hoppe 等^[23]的研究结果。

1.2.2 重组胶原酶的表达及分离纯化 参照王逗等^[22]报道的方法,略作修改。将合成的目的基因与表达载体 pET-28a(+)连接,转化到感受态细胞 *E. coli* BL21(DE3)中。之后,将重组菌接种到含有卡那霉素(50 μ g/mL)的 LB 液体培养基中,在 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 的条件下培养。当菌液的 OD₆₀₀ 值达 0.6~0.8 时,添加终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG,继续在 18 $^{\circ}$ C、160 r/min 的条件下诱导培养。24 h 后,离心(4 $^{\circ}$ C, 8000 r/min, 5 min)收集菌体。而后,将菌体重悬在 pH7.5 的 Tris-HCl 缓冲液中,在冰水浴下超声破碎(功率 350 W,工作 3 s,间隔 5 s),破碎结束后离心(4 $^{\circ}$ C, 8000 r/min, 10 min),留取上清液,即获得粗酶液。最后,使用镍亲和层析色谱柱分离纯化重组胶原酶。纯化重组酶前,向镍亲和层析色谱柱中加入 5 倍体积的结合缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl, pH7.5)使色谱柱平衡,之后将上述粗酶液上样于平衡好的纯化柱中,静置 10 min 后使杂蛋白流出,再用 10 倍柱体积的清洗缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl, pH7.5)洗脱杂蛋白,最后使用洗脱缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl, pH7.5)将目的蛋白洗脱下来,回收目的蛋白。

1.2.3 重组胶原酶的酶谱分析 参照陈世化^[26]报道的方法,稍作修改。制备 5% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)浓缩胶和 10% 的分离胶,向分离胶中分别加入 0.1%(w/v)的酸溶性牛跟腱 I 型胶原蛋白或明胶溶液用于胶原酶谱和明胶酶谱分析。电泳结束,将凝胶用洗脱液(50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, 2.5% Triton X-100, 5 mmol/L CaCl₂, pH7.6)振荡(50 r/min)清洗 4 次,洗脱液每 15 min 换一次。接着,用漂洗液(50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, 5 mmol/L CaCl₂, pH7.6)振荡(50 r/min)漂洗 2 次,漂洗液每 10 min 换一次。之后,用孵育液(50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, 5 mmol/L CaCl₂, 0.2 mmol/L NaCl, 0.02% 聚氧乙烯月桂醚, pH7.6)孵育凝胶,于室温下静置反应 24 h。最后,用考马斯亮蓝快速染色对凝胶染色,室温下染色半个小时。染色结束后脱色处理,直至凝胶上显示白色条带。

1.2.4 不溶性牛跟腱 I 型胶原蛋白的扫描电镜分析

称取 5 mg 不溶性牛跟腱 I 型胶原蛋白于含有 50 mmol/L Tris-HCl 及 10 mmol/L 氯化钙的离心管中,加入 6 U/g *LsCol1*,在 30 $^{\circ}$ C 下反应,监测不同酶

解时间下不溶性牛跟腱 I 型胶原蛋白的表观变化情况。

取上述反应 5 h 的样品,离心(8000 r/min, 5 min)处理,除去上清液。用蒸馏水清洗底物 3 次,使用 4% 的戊二醛固定样品 24 h。固定结束后,离心(8000 r/min, 5 min)去掉固定液,用蒸馏水清洗 3 次。之后,使用梯度浓度的乙醇脱去水分。最后,放置于烘箱中 60 ℃ 过夜烘干,用于扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)观察。

1.2.5 重组胶原酶活力的测定 参考 Mandl 等^[27]报道的方法,稍作修改。向 0.1 mL 1% 的明胶溶液中加入 0.5 mL pH7.0 的 Tris-HCl 缓冲液(含 10 mmol/L CaCl₂),然后加入 0.2 mL 纯化的重组胶原酶液,对照组中加入 0.2 mL 热灭活的酶液。混匀之后,将反应液置于 37 ℃ 恒温水浴中反应 10 min。反应结束后,离心(8000 r/min, 5 min)处理。吸取 0.5 mL 上清液至 10 mL 试管中,加入 0.5 mL 茚三酮显色剂和 0.5 mL 乙酸缓冲液,混匀后置于沸水浴中,15 min 后取出冷却至室温,再加入 1.5 mL 60% 乙醇溶液,充分混匀,然后在 570 nm 下测定样品的吸光度。酶活力单位定义为:在 37 ℃、pH7.0 条件下,每分钟水解胶原产生 1 μmol/L 甘氨酸所需要的酶量为 1 个酶活力单位(U)。

1.2.6 重组胶原酶酶学特性研究

1.2.6.1 最适反应 pH 及 pH 稳定性的测定 在方法 1.2.5 的基础上,分别在 pH3.0~10.0 的缓冲液中测定重组胶原酶的最适反应 pH,将最适反应 pH 下的相对酶活定义为 100%。为探究胶原酶的 pH 稳定性,将酶液加入到 pH5~10 的缓冲液中,在 4 ℃ 下孵育 1~6 h,孵育结束后测定重组胶原酶的酶活。将孵育前胶原酶的酶活定义为 100%^[28]。

1.2.6.2 最适反应温度及热稳定性的测定 在方法 1.2.5 的基础上,在最适反应 pH 下,分别在 20~60 ℃ 下测定重组胶原酶的酶活,将最适反应温度下的相对酶活定义为 100%。为探究胶原酶的温度稳定性,将酶液放置到 20~50 ℃ 水浴中恒温孵育 1~6 h。孵育结束后,在最适反应 pH 和温度下测定胶原酶的酶活。将孵育前胶原酶的酶活定义为 100%^[28]。

1.2.6.3 金属离子和金属离子螯合剂对重组胶原酶活性的影响 在方法 1.2.5 的基础上,向反应体系中分别加入终浓度为 10 mmol/L 的金属离子(K⁺、Li⁺、Mg²⁺、Zn²⁺、Ba²⁺、Mn²⁺、Co²⁺、Ca²⁺、Cu²⁺、Pb²⁺、Fe²⁺)或终浓度为 1 mmol/L 或 5 mmol/L 的金属离子螯合试剂(EDTA、EGTA),测定重组胶原酶的酶活。将未添加金属离子或金属离子螯合试剂时的相对酶活定义为 100%^[26]。

1.2.6.4 胶原酶的底物特异性 在方法 1.2.5 的基础上,在最适反应条件下,分别以明胶、不溶性牛跟腱 I 型胶原蛋白、鸡 II 型胶原蛋白、罗非鱼皮胶原蛋

白、牛血清白蛋白和酪蛋白作为底物,测定重组胶原酶的活性。其中,以不溶性牛跟腱 I 型胶原蛋白作为底物时反应时间为 3 h,其它底物的反应时间均为 10 min^[26]。

1.2.6.5 胶原酶动力学参数的测定 参照 Wu 等^[29]报道的方法,稍作修改。在最适反应条件下,以不同的浓度(0.2、0.4、0.6、0.8、1、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0 mg/mL)的明胶作为底物,反应 10 min 后测定重组胶原酶的反应初速度。采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法,计算重组胶原酶的动力学参数 K_m (mg/mL)和 V_{max} 值(μmol/min/mg),计算公式如下:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

式中, V 为酶促反应速度(μmol/min/mg); [S] 为底物浓度(mg/mL)。

1.2.7 罗非鱼皮胶原蛋白水解物的制备

1.2.7.1 罗非鱼皮胶原蛋白的制备 参照 Bi 等^[30]的方法,略做改动。称取 500 g 鱼皮,将其剪成 0.5 cm×0.5 cm 小块。之后,加入 5 L 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液,于 4 ℃ 冰箱中搅拌两天,一天更换两次碱液,以除去杂蛋白。用蒸馏水将鱼皮清洗至中性,再按上述比例加入无水乙醇,在 4 ℃ 冰箱里继续搅拌两天,每天更换一次试剂,除去鱼皮当中的脂肪和色素。结束后,用蒸馏水洗净,冷冻干燥。随后,按 1:10(m/V)的比例向冷冻干燥的鱼皮中加入蒸馏水,在 50 ℃ 下热提 5 h。提取结束后,用纱布过滤除去不溶物质。最后,将样品真空冷冻干燥,并采用 SDS-PAGE 进行分析。

1.2.7.2 罗非鱼皮胶原蛋白水解物的制备 参照 Hong 等^[31]的方法,稍做改动。取 0.5 g 1.2.7.1 中制备的罗非鱼皮胶原蛋白加入到 50 mL Tris-HCl 缓冲液(50 mmol/L, pH7.5, 含 10 mmol/L CaCl₂)中,之后加入 3 U 纯化的 LsCol1,于 30 ℃ 下振荡反应。定时(20 min、1、6、12 h)取样,沸水中灭活 10 min 后离心(8000 r/min, 10 min),留取上清液用于后续试验。

1.2.7.3 罗非鱼皮胶原蛋白水解物水解度的测定 使用邻苯二甲醛法^[32]测定胶原蛋白水解物的水解度(DH)。向试管中加入 10 μL 罗非鱼皮胶原蛋白水解物,再加入 1.2 mL 邻苯二甲醛工作液,在室温下避光反应 10 min 后,于 340 nm 处测定吸光值。计算公式如下:

$$DH(\%) = \frac{(NH_2)_1 - (NH_2)_0}{(NH_2)_2 - (NH_2)_0}$$

式中, (NH₂)₀ 为样品中未水解的游离氨基酸含量, mg/mL; (NH₂)₁ 为样品中水解的游离氨基酸含量, mg/mL; (NH₂)₂ 为样品的总游离氨基酸含量, mg/mL。

1.2.8 罗非鱼皮胶原蛋白水解物抗氧化活性的测定

1.2.8.1 DPPH 自由基清除率的测定 参照陈惠敏等^[33]的方法,稍有改动。取 100 μL 酶解 6 h 的罗非鱼皮胶原蛋白水解物加入到 96 孔板中,再加入 100 μL 的 DPPH 工作液,混匀后在室温下避光反应 30 min。之后,于 517 nm 处测定吸光度值。以 0.1 mg/mL 的抗坏血酸作为阳性对照,每组试验三组平行。DPPH 自由基清除率计算公式如下:

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100$$

式中, A_0 为 100 μL DPPH 溶液与 100 μL 无水乙醇混合液的吸光值; A_1 为 100 μL 样品与 100 μL DPPH 溶液混合液的吸光值; A_2 为 100 μL 样品与 100 μL 无水乙醇混合液的吸光值。

1.2.8.2 ABTS⁺自由基清除率 参照李小锋等^[34]的方法,稍有改动。用 0.2 mol/L pH7.4 的 PBS 缓冲液将 ABTS 稀释,使其在 734 nm 处的吸光值为 0.70±0.02。之后,取 20 μL 样品加入到 96 孔板中,再加入 200 μL ABTS 工作液,混匀,室温下避光放置 5 min,在 734 nm 下测定吸光值。ABTS⁺自由基清除率按以下公式计算:

$$\text{ABTS}^+ \text{ 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100$$

式中, A_0 为 20 μL PBS 溶液与 200 μL ABTS 溶液混合液的吸光值; A_1 为 20 μL 样品与 200 μL ABTS 溶液混合液的吸光值; A_2 为 20 μL 样品与 200 μL PBS 溶液混合液的吸光值。

1.2.8.3 羟基自由基清除率 参照 Qiu 等^[35]的方法,并略有改动。向离心管中依次加入 0.5 mL 4.5 mol/L 的 FeSO_4 溶液、0.5 mL 4.5 mol/L 的水杨酸乙醇溶液和 0.5 mL 4.4 mol/L 的 H_2O_2 溶液,立即混匀。随后,加入 0.5 mL 样液,在 37 $^\circ\text{C}$ 水浴锅内反应 30 min,并于 510 nm 下测定其吸光值,空白对照

组为等体积的蒸馏水。计算公式如下:

$$\text{羟基自由基清除率}(\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

式中, A_0 为对照组吸光值; A_1 为样品组吸光值。

1.3 数据处理

所有样品平行测定 3 次,实验结果均以平均值±标准偏差表示。使用 SPSS 26 软件的单因素方差分析(one-way ANOVA)对数据进行显著性分析, $P < 0.05$ 为差异显著。同时,采用 Graphpad Prism 8.0 软件绘制图表。

2 结果与分析

2.1 胶原酶的生物信息学分析

胶原酶 LsCol1 基因序列全长为 3219 bp,编码 1072 个氨基酸,蛋白亚基的分子量为 123 kDa,预测的等电点为 4.66。将 LsCol1 的氨基酸序列提交至 NCBI 数据库进行同源性分析,与 *B. cereus* Q1 来源的 ColQ1 氨基酸序列一致性为 72.3%,与 *B. cereus* 14579 来源的 ColA 一致性为 71.7%,与 *C. histolyticum* 来源的 ColG 一致性为 44.2%,与 *C. histolyticum* 来源的 ColH 的一致性为 41.9%,与 *C. tetani* 来源的 ColT 一致性为 48.9%。

根据信号肽和结构域预测结果可知,LsCol1 属于肽酶 M9 家族,含有引导蛋白胞外分泌的 N 端信号肽(signal peptide)、功能未知的前肽(propeptide)、与胶原水解有关的肽酶 M9 家族 N 端结构域(activator domain, AD)^[36-37]、M9 家族肽酶结构域(peptidase domain M9 family, PD)、一个多囊肾病样结构域(polycystic kidney disease-like domain, PKD)和两个能够结合纤维状胶原蛋白的胶原结合结构域(collagen-binding domain, CBD)(图 1)。AD 结构域和 PD 结构域共同构成了胶原酶的催化域(collagenase unit),能够将结合的纤维状胶原蛋白水

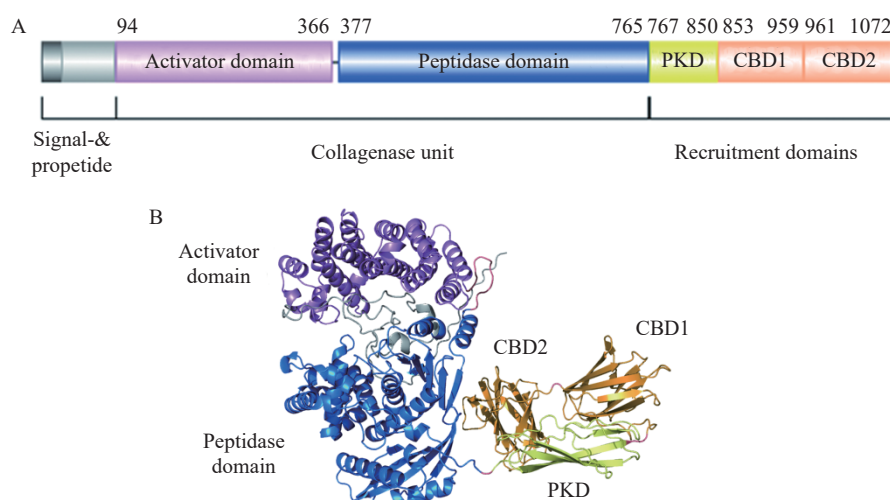


图 1 胶原酶 LsCol1 的结构分析

Fig.1 Structural analysis of collagenase LsCol1

注:(A)LsCol1 的结构域示意图,利用在线工具 IBS Illustrator 生成^[41]; PKD: 多囊肾病样结构域; CBD: 胶原结合结构域;(B)LsCol1 的三维结构图。

A Collagenase unit

LsColI_94-765	-----YSMAELNNMSNREL IHTLGSIRWYQITDLFQFNDDTKAFYQNEERMQVI INELGNRGSSTFKDDSKGIETFVEVLRSAFYVAFYNNELSYL	91
ColA_93-764	-----YTLAELNKMPSNEL IDTL SKI SWNQITDLFQFNDDTKAFYQNKERMVNI INELQGRGRTFKENSKGIETFVEVLRSAFYVGYNNELSYL	91
ColG_119-760	-----YDFEYLNGLSYTEL TNL I KNI KWNQI INGLFNSTGSGQKFGDKNRVQAI INALQESGRYTTANDMKGIETFVEVLRAFGYLYGYNDEL SYL	91
ColH_41-721	QVNESKRYTVSYLTKNYDLVDLLVKTEI ENLPDLFYSSDAKEFFYGNKTRMSFI MDEI GRRAPQYTEI DHKGIPTLVEVVVRGFLGFHNNKLEI	98
ColQI_94-765	-----YSMADLNKMDQDEL VETLGC I KWHQITDLFQFNDDTKAFYQNKERMQVI INELAHRRGSTFRDDSKGIQTFTEVLRSAFYLYNNELSEL	91
ColT_57-731	-----YSFNDLNKLSNKEI LDLTSK I KWSDI SDFQYKNKDSYTFYNSKPNKGL IDGLYKGCNYSITDDKGIIDLVEI LRSRGFLFYNNELSLKLYI	91
LsColI_94-765	NERSFQDKCLPALNEI AKNPNFKLGTDEQDKVVSAYGKLI GNASSDVTQVQATNI LKQYNENLSTYESENSKGQAIYDI IHGIDYDLSYLYDTR- K	188
ColA_93-764	KERSFHDKCLPALKAI AKNRFNLTGTAEDQDRVVTAYGKLI GNASSDTEVQYAVNVKLKHYNDNLSTYVSDYAKGQAVYEI VKGI DYDI QSYLQDNT- K	188
ColG_119-760	NDRNFQDKCI PAMI AI QKNPNFKLGTAVQDEVI TSLGKLI GNASANAEEVNVCPVLKQFRENLNQYAPDYVKGTAVNEL IKGIEFDFSGAAEY- - K	186
ColH_41-721	NKRSFKERVIPS I LAI QKNPNFKLGTQVQDKI VSAITGLLAGNETAPPEVNNFTPI LQDCI KNI DRYALDDLKSKALFNVLAAPTYDI TEYLRAK- E	195
ColQI_94-765	NERSFQDKCLPALKAI AKNPNFKLGTAEQDQTVVSAYGKLI GNASSDTEVQYASNI LKQYNENLSTYESENSKGQAIYDI IQGIDYDI QSYL I EAR- K	188
ColT_57-731	NDKSFQDKCI PAMI AI ENNKNFKLGTGNGQDQTVVHALGKLI IGNTSCDNEVNNFTPI LQDCI KNI DRYALDDLKSKALFNVLAAPTYDI TEYLRAK- E	188
LsColI_94-765	EANTTMWYGI DSFI EEVNNI ALIHNVTDSNSWL INNGIYYAGRLGQFHSNPNKGL EVVSQAMHMPYLS EAYFVAVEQIT TNYGGRDLNGNTVDLQK	286
ColA_93-764	QPNETMWYGI DNFI NEVNNI ALVGNI TNENSWL INNGIYYAGRLGQFHSNPNKGL EVI TQAMNLYPRLSGAYFVAVEQIMKTNYGKDYSGNAVDLQK	286
ColG_119-760	DVKTMPWYGI DPFI INELKALGLYGN I TSATEWASDVG IYLL SKFGLYSTNRNDI VQSLKAVDMYKY -GKI AFVAMER I TNYGGRDLNGNTVDLQK	283
ColH_41-721	KPENTPWYGI DGI INELKALGLYGN I NDNNSWI I DNGIYH I APLGLHSHNNK I G I ETLTEVMKVYPYLSMQHQLQSDAQI I KRHYDSKDAEAGNI I PDK	293
ColQI_94-765	EANETMWYGIKVDGI INEINRI ALLNEVTENKWLNNNGI IYH I ASRLGKFSNPNKGL EVVTSQAMHMPYLS EAYFVAVEQIT TNYGGRDLNGNTVDLQK	286
ColT_57-731	DYKNTWPSGKI DSFI IDT I SKFAS I SNVTKDNQW I INNSIYYTAKLSKYHSNPS I PHSV I DNC I E I FPDYSEQYF TAI EAI KEDFNSRDSKGNV I DINK	287
LsColI_94-765	VREEGKQYL PKTYTFDDGSI VFKTGQDVTEDK I QRLYAAKEVKAQYHRV I GNDQALEPQNADD I LTVI YNSPDQYLRNRLQYGYETNNGGI I E	384
ColA_93-764	IREEGKQYL PKTYTFDDGSI VFKTGQDVTEEK I KRLYAAKEVKAQYHRV I GNDKALEPQNADD I LTVI YNSPDQYLRNRLQYGYETNNGGI I E	384
ColG_119-760	FLDDAEKHYL PKTYTFDNGTF I I RAGDKVSEKI KRLYASREVKSQFHRVVGNDKALEVGNADD I LTMK I FNSPEEYKNTN I NGVSTDNNGGLY I E	381
ColH_41-721	FKKEGKEKYPCKTYTFDDGKVI I KAGARVEEKKVRLYASKEVNSQF FRVYGI D KPLEEGNPD I LTMV I YNSPEEYKLNRLQYGYETNNGGI I E	391
ColQI_94-765	IRKEGKEQYL PKTYTFDDGSI VFKTGQDVTEEK I KRLYAAKEVKAQYHRV I GNDKALEPQNADD I LTVI YNSPEEYKLNRLQYGYETNNGGI I E	384
ColT_57-731	L I EEGKHYL PKTYTFDNGK I I I KAGDKVESEKI KRLYASKEVKSQFHR I GNDKPLEVGNADD I LTVI YNSPEEYKLNRLQYGYETNNGGI I E	385
LsColI_94-765	TGTFYTYERTPEQSI YSLEELFRHEHYTHLQGRYEPGLFGTGDYMQ- -NERLTFWQEGNAEFFAGSTRTNVPRKSI I SGLSHDP- SQRYYAEQTM	479
ColA_93-764	KGTFYTYERTPKQSI YSLEELFRHEHYTHLQGRYEPGLFGSGEYMQ- -NERLTFWQEGNAEFFAGSTRTNVPRKSM I SGLSDP- ASRYTAKTL	479
ColG_119-760	FLDDAEKHYL PKTYTFDNGTF I I RAGDKVSEKI KRLYASREVKSQFHRVVGNDKALEVGNADD I LTMK I FNSPEEYKNTN I NGVSTDNNGGLY I E	381
ColH_41-721	EGTFYTYERTAEQSYTLEELFRHEHYTHLQGRYAPGLGQWGRTKLYD- -NDRLTWYEEGGAELFAGSTRTSGI LPRKSI I YSNI I HNTTNNRNYK I SDTV	479
ColQI_94-765	TGTFYTYERTPEQSI YSLEELFRHEHYTHLQGRYEPGLFGTGDYMQ- -NERLTFWQEGNAEFFAGSTRTNVPRKSI I SGLSDP- ASRYTAKTL	479
ColT_57-731	IGTFYTYERTPEQSI YSLEELFRHEHYTHLQGRYI I PGLFNGKDFYKGNNGRI I TWFEESGAEFFAGSTRT- SGLPRKSMVGGLSKNP- KERFNADKLL	481
LsColI_94-765	FATY- -GSWDFYNSFALQSYMYTHQFMDFR I QDL I RANDVKNYDAYRDTLSKDSQLNMEYQAYMQQL I DNQETVEPQVAEDYLMPEHPKALNEVQ	575
ColA_93-764	FSKY- -GSWDFYKYSFALQSYLYNHQFETFDKLDL I RANDVKNYDSYRESLSNNTQLNAEYQAYMQQL I DNQDKYNNPVKVTNDY I I QHAPKPLAEVK	575
ColG_119-760	NSGVDSDWMMFYNGYFAVAHYLYEKDMPFT I KMKNAI LNTDVKSYDEI I KKLSDANKNTEYQNH I QELADKYQAG I PLVSDDYLRKHGYKKAASEVY	575
ColH_41-721	HSKYGA- SFEFYNYACMFMDYMYNKKM I LNKLDLAKNNDVQYDNI I RDL SSNYALNDKQYQDHMOER I DNYENLTVPFVADDYLRKHGYKKNPNEI Y	584
ColQI_94-765	FAKY- -GSWDFYNSFALQSYLYTHQFETFDK I QDL I RANDVKNYDAYRENLSKDPKLNKEYQYEQYMQQL I DNQDKYNNPVAVADDYLAEPHAPKSLTAVE	575
ColT_57-731	HSKYSD- GWDYFYKYGAFSDYMYNNKKFLS I DLVSTMKNNVQYKYEAL I EESKDSK I NKDYEYHMEENLNNYDNY I I PLVSDDYMKQYDNNKSLHEI K	578
LsColI_94-765	QEIVDI I AHVKDANMTKHQSQFFNTFTLEGTGYGSAQTQGESQDWKTMKQVNNQMLEQL SQKEWSGYKTMATAYFVNNYRNAANQFEYDVVFHGVSTDDG	672
ColA_93-764	NEI IVDVANI I KDAKI I KYESQFFNTFTVVEGKYTGGSKESEDWAMSKQVNNQMLEQL SQKEWSGYKTMATAYFVNNYRNAANQFEYDVVFHGVSTDDG	672
ColG_119-760	SEI I SKAASLTNTSVTAESQYFNTFTLRGTYTGETSKGEFKDQWEMSKKLDGLTLESLAKNSWSGYKTLTAYFTNRYVTSDNKVQYDVVFHGVSTDDG	672
ColH_41-721	SEI I SEVAKLDAKSEVKKSQYFSTFTLRGSYTGAGSKGL EDQAKM I I DDLKLLDTYSWSGYKTLTAYFTNRYVTSDNKVQYDVVFHGVSTDDG	672
ColQI_94-765	KEMTETLPMKDAKMTKHQSQFFNTFTLEGTGYGSAQTQGESQDWKTMKQVNNQMLEQL SQKEWSGYKTMATAYFVNNYRNAANQFEYDVVFHGVSTDDG	672
ColT_57-731	SDI I EKAMDVKNSQ I TKESSQYFDYTNLKATYTLSSNKE I I SNWYNNMNI I NEALNKLDNL SWGGYKTMATAYFVNNYRNAANQFEYDVVFHGVSTDDG	675
PKDs		
LsColI_767-850	TQAP I VQVNGPYTGM I NEKI I QFNSDGSKD TGEI I VSYLWDFDGDGAT- SEANPPTHVYENEGTYKVT I TVKNKNGQESKQQTATV- - 84	
ColA_766-849	TKTTI I VNMNGPYSGI I VNEEI I QFNSDGSKSGKGI I SYLWNFGDGGT- STEANPPTHVYEGKGYTVELTVKDSRGKESKEQTKVT- - 84	
ColG_795-880	NKAP I AKVTGPSTGAVGRNI I EFSGKDSKDEGKI I VSYDWDGDGAT- SRGKNSVHAYKKAGTYNVT I LKVTDDKGATATESFT I E I KN 86	
ColH_725-810	NSLPYGI I NGTYKGTKEKI I KFSSEGSFDPDGKI I VSYEWDGDGDK- SNEENPEHSYDKVGYT I VTKLVYTD DKGESVSTTTAE I KD 86	
ColH_814-900	NKLPV I VMHVPKSGALNQKVVYFGYKGT I YDPDGI I AGYQWDFDGDGSD I FSEQNP SHVYTKKGEY I TVLRVMDSSGQMSKTKM I I TD 87	
ColQI_767-850	NKAPTNI I NGPYNGLYKEGI I QFNSDGSKDEGKI I VSYLWDFDGDGRT- STEVNPVHYEREGSYKVAL I VKDDKGESKSETTVT- - 84	
CBDs		
LsColI_853-959	-----GGTQGEHMTI- -PFNKPI I KGLS I ENDTN- VYQFDI I TSL E I D I SVVNEN- -Q I GMTWVLYHESDKENYVAYGQE- DGG 74	
LsColI_961-1072	-----TKTEI I EPNRPEEATML- PFHTPLSGSLMEDHTD VYEFNVTSPKEI D I SVLNEN- -Q I GMTWVLYHESDSQNYASFQGE- DGN 80	
ColA_852-960	-----DPQTSESYEEKVL- PFNTLVKGNL I TPDQTDVYTFNVTDPKEVD I SVVNEQ- -N I GMTWVLYHESDMQNYVACGED- EGN 77	
ColG_885-999	TP I TKEMEPNDD I KEANGP I VEGVTYKGDNLGSDADTFYFDVKGDDGDT I ELPSYG- -SSNFTWL VYKEGDQDNH I ASG I D- KNN 83	
ColG_1004-1118	NEKLKEKENNDSDDKATVI I PNFNTTMOGSL I GDDSRDYYSEFVKEEGEVNI I ELDDKD- -EFGVTWTLHPESNI I NDRI TYGQV- DGN 83	
ColH_903-1021	YPIGTEKEPNNSKETASGP I VPG I PVSGT I ENTSDQDYFYFDVI I TPGEVK I DINKLG- -YGGATWVYVDENNNNAVSYA- -TD- DGG 81	
ColQI_853-965	-----GSLTESEPNRPEEANRI- GLNTT I KGLS I GGDHDTVYTFNVAASAKD I D I SVLNEN- -G I GMTWVLYHESDMQNYVACGED- NGN 81	
ColT_755-870	-----IYEKENNDSFDDKANKI- HKNQ I VMATLDTEYRDTYFDALTS GSI D I T I ENI HGNSDAFNWLYNDEDLNNY I AYPTKKEDN 82	
ColT_878-991	IKKI I HEKENNDSFETANKI- TLDTLVLGNLDYKDVSDI I YSFDI ENTKDLN I KLTNLN- -NLGI AWNLKYESDNLNNY I AYGA KSD- N 82	
LsColI_853-959	T I K G K Y N- A K P G K Y Y L V Y Y K F- D D E N G T Y T V Q V Q N- - - - 107	
LsColI_961-1072	M I N G K L N- A K P G K Y Y L V Y Y K F- E N E N G T Y T V H V Q- - - - 112	
ColA_852-960	V I K G K F A- A K P G K Y Y L V Y Y K F- D D K N G E Y S L L V K- - - - 109	
ColG_885-999	S K V G T F K S T G K- R H Y V F I Y K H D S A S N I S Y S L N I- - - - 115	
ColG_1004-1118	K V S N K V K- L R P G K Y Y L V Y Y K F- S G- S G N Y E L R V N K- - - - 115	
ColH_903-1021	N L S G K F K A D K P G R Y Y I H L Y M F- N G S Y M P Y R I N I E G S V G R 119	
ColQI_853-965	H I E A N F N- A K P G E Y Y L V Y Y K F- D N G D G T Y K L S V K- - - - 113	
ColT_755-870	K L M G S F K V H K P G R Y Y I L V Y Y K F- S L N K V N Y K L N I S D- - - - 116	
ColT_878-991	A I V G N N- L S P G K Y Y L V Y Y K F- S G D K G N Y S V I I N- - - - 114	

B

	AD	PD	PKD1	PKD2	CBD1	CBD2
ColQI	75	81	67	-	58	-
ColA	75	79	62	-	61	-
ColG	44	52	55	-	25	39
ColH	40	52	51	42	35	-
ColT	44	53	-	-	30	40
LsColI	100	100	100	-	100	100

图 2 胶原酶 LsColI 的序列分析

Fig.2 Sequence analysis of collagenase LsColI

注: (A) LsColI 与其它胶原酶的氨基酸序列比对分析; 紫色背景为胶原酶的激活结构域(AD); 蓝色背景为肽酶 M9 家族结构域(PD); 红色字体为与锌结合的保守氨基酸残基; 橙黄色字体为与钙结合的保守氨基酸残基; LsColI 的结构域边界根据结构域预测结果及其与其它胶原酶的氨基酸序列比对结果推断得出; 每一行序列右侧的数字表示该行的氨基酸数目; (B) LsColI 的各结构域与其它来源胶原酶相应结构域的相似性(%)分析, 蓝色背景颜色越深代表相似性越高; 相似性通过 BLASTp 计算得出^[42]。

解。据报道, 来源于 *Pseudoalteromonas* sp. SM9913 的丝氨酸蛋白酶含有的 PKD 结构域能够与胶原纤维结合并使其膨胀^[38]。另有研究表明, PKD 能够增强酶与胶原纤维的结合能力^[39]。CBD 结构域和 PKD 结构域在胶原酶水解明胶和可溶性胶原蛋白时并不是必需的, 但是在水解不溶性胶原纤维时不可或

缺^[40]。结构域序列比对结果显示, 在 LsColI 的 PD 结构域中含有参与锌结合的保守氨基酸序列⁵⁰¹HEXXH⁵⁰⁵和保守的谷氨酸残基(E⁵³³)(标记为红色字体)(图 2A), 而上述保守基序和保守氨基酸残基是肽酶 M9 家族中锌金属蛋白酶的典型特征。同时, 在 PD 结构域和附属结构域(CBD 或 PKD 结构域)

中含有参与钙结合的保守氨基酸残基(标记为橙黄色字体)(图 2A)。另外, LsCol1 与芽孢杆菌属来源的 ColQ1 和 ColA 的相似性远高于梭菌属来源的 ColG、ColH 和 ColT, 并且与上述胶原酶相似性较高的氨基酸序列集中在 PD 结构域(图 2B)。

2.2 重组胶原酶的分离纯化及其水解能力分析

胶原酶基因 *Lscol1* 在 *E. coli* BL21(DE3) 中成功表达后, 采用镍亲和层析色谱对重组胶原酶进行分离纯化。纯化后的 LsCol1 在 SDS-PAGE 上出现了单一条带, 分子量约为 120 kDa(图 3A, 泳道 6), 与其预测的分子量相一致。之后, 利用酸溶性牛跟腱 I 型胶原蛋白和明胶酶谱对纯化的重组胶原酶进行分析, 以鉴定其对酸溶性牛跟腱 I 型胶原蛋白和明胶的降解能力。如图 3B 和图 3C 所示, 在与 LsCol1 分子量相对应的位置均观察到了负染条带, 表明 LsCol1 具有水解酸溶性牛跟腱 I 型胶原蛋白和明胶的活性。随后, 本研究利用 LsCol1 酶解不溶性牛跟腱 I 型胶原蛋白。随着酶解时间的延长, 不溶性牛跟腱 I 型胶原蛋白首先变得膨胀, 然后被逐渐降解, 反应 12 h 后基本降解完全(图 3D)。为了进一步了解不溶性牛跟腱 I 型胶原蛋白在降解过程中的结构变化, 反应 5 h 后将胶原蛋白取出进行 SEM 分析。由

图 3E 可知, 对照组的胶原蛋白结构致密, 而实验组的胶原纤维束孔隙增大, 已被降解为分散状的细小胶原纤维。由以上实验结果可知, LsCol1 是真正的胶原酶。

2.3 重组胶原酶的酶学特性研究

2.3.1 最适反应 pH 及 pH 稳定性 如图 4A 所示, LsCol1 的最适反应 pH 为 7.5, 与 *L. sphaericus* VN3 (pH7)^[21]、*B. subtilis* B13 (pH7.5)^[15] 和 *B. pumilus* Col-J (pH7.5)^[30] 来源的胶原酶相近。LsCol1 在 pH7~10 范围内催化活性较高, 相对酶活力大于 54.4%。但是, 当反应液 pH 低于 6 时, 催化活性明显降低, 此时相对酶活力小于 12.0%。LsCol1 在 pH7.0~10.0 范围内稳定性较好, 孵育 3 h 后相对酶活力为 51.0%~70.8%。而来源于 *L. sphaericus* VN3 的胶原酶在 pH6~8 范围内稳定性较好, 在 37 °C 下孵育 30 min 后残余酶活力高于 70%^[21]。

2.3.2 最适反应温度及热稳定性 LsCol1 的最适反应温度为 37 °C(图 5A), 与来源于 *L. sphaericus* VN3^[21] 和 *B. cereus* FRCY9-2^[43] 的胶原酶相一致, 但是低于 *B. subtilis* B13 (50 °C)^[15] 来源的胶原酶。当孵育温度低于 30 °C 时, LsCol1 的热稳定性较好,

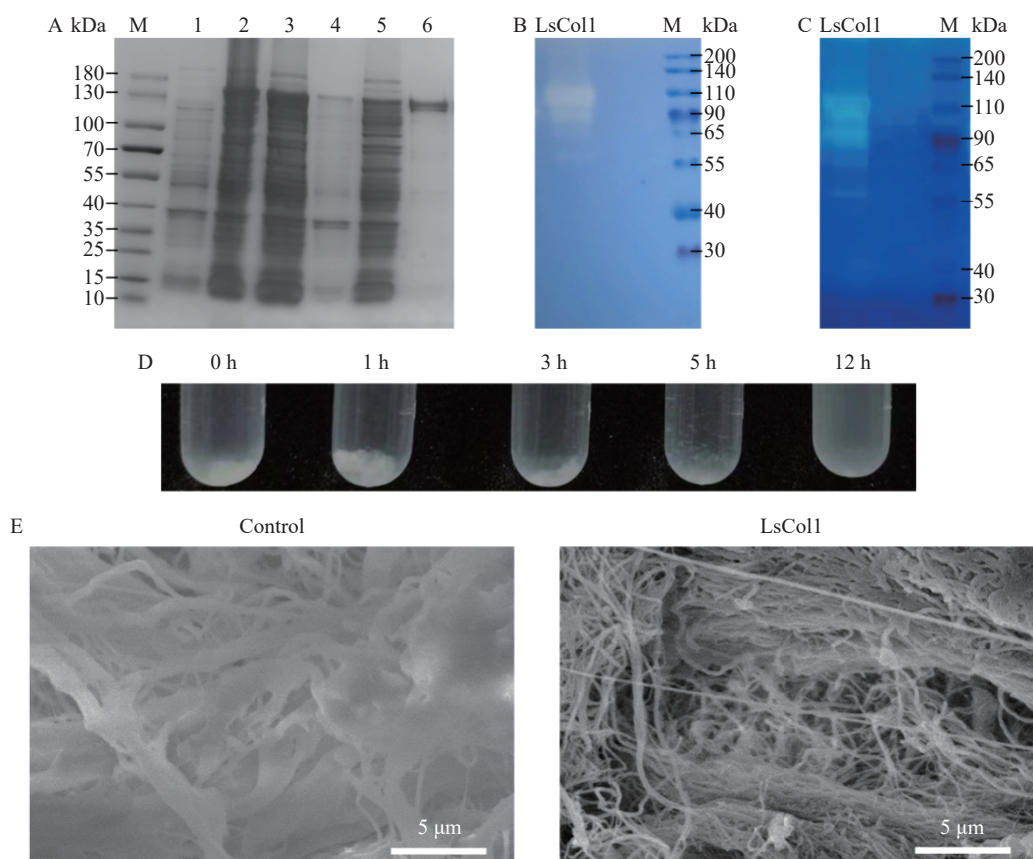


图 3 胶原酶 LsCol1 的酶解特性

Fig.3 Enzymatic properties of collagenase LsCol1

注: (A)LsCol1 的 SDS-PAGE 分析, M: marker; 1: 未经 IPTG 诱导的重组菌; 2: 经 IPTG 诱导的重组菌; 3: 诱导后重组菌的破壁上清液; 4: 诱导后重组菌的破壁沉淀; 5: 清洗缓冲液洗脱的杂蛋白; 6: 纯化后的胶原酶; (B)LsCol1 的胶原酶谱分析, M: marker; (C)LsCol1 的明胶酶谱分析, M: marker; (D)重组胶原酶 LsCol1 对不溶性牛跟腱 I 型胶原蛋白的降解活性; (E)水解反应 5 h 后牛跟腱 I 型胶原蛋白的 SEM 图; Control: 未经酶解作用的对照组; 对照组和实验组的放大倍数均为 5000×。

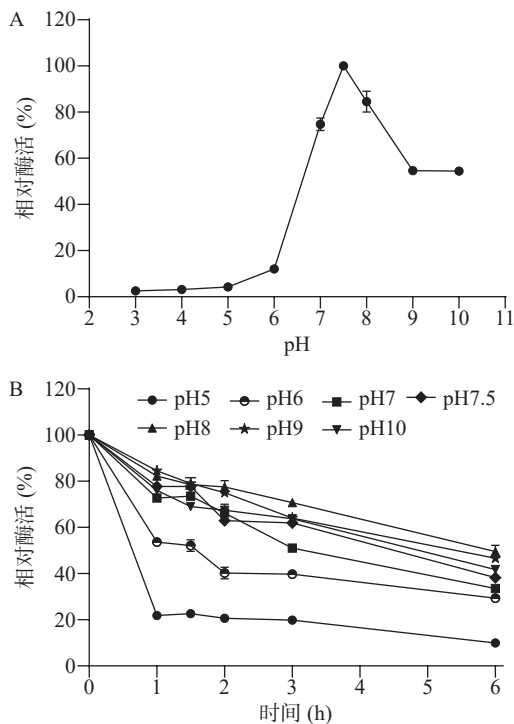


图 4 胶原酶 LsCol1 的最适反应 pH(A)和 pH 稳定性(B)
Fig.4 Optimum pH (A) and pH stability (B)
of collagenase LsCol1

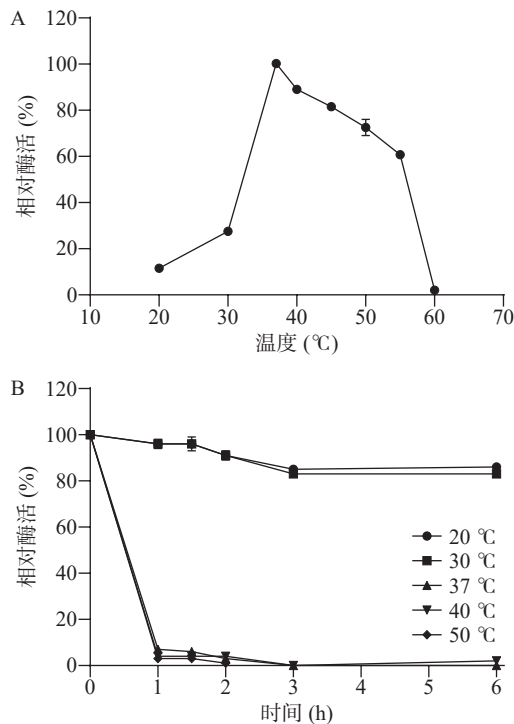


图 5 胶原酶 LsCol1 的最适反应温度(A)和热稳定性(B)
Fig.5 Optimum temperature (A) and thermostability (B)
of collagenase LsCol1

孵育 6 h 后,残余酶活力高于 86.0%。但是超过此温度后,LsCol1 的催化活性明显降低,在 37 ℃ 下仅孵育 1 h 已经失去了大部分酶活力(图 5B)。已报道的很多微生物胶原酶的热稳定性都比较差,如 *Streptomyces* sp. strain 3B 来源的胶原酶在 47 ℃ 下处理 20 min 后相对酶活力低于 10.0%^[44], *Vibrio*

vulnificus CYK279 来源的胶原酶在 45 ℃ 下处理 1 h 后残余酶活力下降至 10.0%^[45]。

2.3.3 金属离子和金属离子螯合剂对酶活性的影响
如表 1 所示,胶原酶 LsCol1 的酶活性受到金属离子螯合剂 EDTA 的强烈抑制作用,表明该胶原酶属于金属蛋白酶^[46]。Zn²⁺对 LsCol1 的酶活性呈强烈的抑制作用,但是 Ca²⁺对 LsCol1 的酶活性表现为激活作用,并且当 Ca²⁺螯合剂 EGTA 存在时,其相对酶活力明显降低,表明 LsCol1 属于 Ca²⁺依赖型。据报道,Ca²⁺能够改变胶原酶的局部构象结构,在 Ca²⁺存在的情况下,酶的催化活性和稳定性均有所提高^[40,47]。其它金属离子对 LsCol1 的酶活性表现为无影响或呈不同程度的抑制作用。

表 1 金属离子和金属离子螯合剂对胶原酶 LsCol1 活性的影响

Table 1 Effects of metal ions and inhibitors on the activity of collagenase LsCol1		
金属离子或抑制剂	浓度 (mmol/L)	相对酶活力 (%)
对照	0.0	100
EDTA	1.0	6.0±0.4
	5.0	1.0±0.0
EGTA	1.0	81.0±4.5
	5.0	39.7±2.5
K ⁺	10.0	100.5±2.2
Li ⁺	10.0	94.4±2.6
Mg ²⁺	10.0	96.2±1.6
Zn ²⁺	10.0	1.2±0.2
Ba ²⁺	10.0	84.9±6.9
Mn ²⁺	10.0	49.4±1.3
Co ²⁺	10.0	80.3±6.7
Ca ²⁺	10.0	117.8±1.0
Cu ²⁺	10.0	1.6±0.2
Pb ²⁺	10.0	3.5±0.2
Fe ²⁺	10.0	10.5±1.3

2.3.4 重组胶原酶的底物特异性及动力学分析 如表 2 所示,除了明胶和不溶性牛跟腱 I 型胶原蛋白外,LsCol1 还能够水解罗非鱼皮胶原蛋白和鸡 II 型胶原蛋白,并且以罗非鱼皮胶原蛋白为底物时酶活力最高。但是,LsCol1 对牛血清白蛋白和酪蛋白无水解作用。另外,本研究以明胶为底物对胶原酶 LsCol1 的动力学参数进行了测定。如图 6 所示,经计算得知,LsCol1 的 V_{max} 值为 5.9 μmol/min/mg,

表 2 胶原酶 LsCol1 的底物特异性
Table 2 Substrate specificity of collagenase LsCol1

底物	特异性酶活 (U/mg)
牛血清白蛋白	0
酪蛋白	0
明胶	2.1±0.0
罗非鱼皮胶原蛋白	14.1±0.4
不溶性牛跟腱 I 型胶原蛋白	0.2±0.0
鸡 II 型胶原蛋白	1.0±0.1

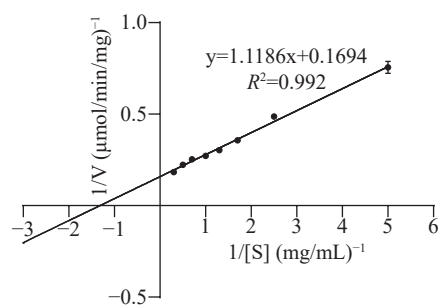


图6 胶原酶 LsCol1 对于明胶底物的 Lineweaver-Burk 双倒数曲线图

Fig.6 Lineweaver-Burk plot of collagenase LsCol1 to gelatin

K_m 值为 0.7 mg/mL。

2.4 罗非鱼皮胶原蛋白的提取及其水解物的制备

提取物经过 SDS-PAGE 分析,可以清楚地观察到三条(α_1 、 α_2 和 β)符合胶原蛋白特征的多肽链(图 7A)。之后,以提取的罗非鱼皮胶原蛋白为底物,利用 LsCol1 进行酶解。如图 7B 所示,胶原蛋白水解物的水解度随着酶解时间的延长而升高,反应 6 h 后变化趋于平缓,此时的水解度为 24.9%。

2.5 胶原蛋白水解物抗氧化活性分析

机体内氧化还原不平衡可能导致细胞、组织和器官等发生不可逆的病理改变,从而增加罹患炎症^[48]、癌症^[49]和高血压^[50]等疾病的风险,而利用水产动物胶原蛋白制备抗氧化活性肽一直是研究的热点。本研究对制备的罗非鱼皮胶原蛋白水解物的抗氧化活性进行了分析,评价方法包括 DPPH 自由基、ABTS⁺自由基和羟基自由基清除能力。如图 8 所

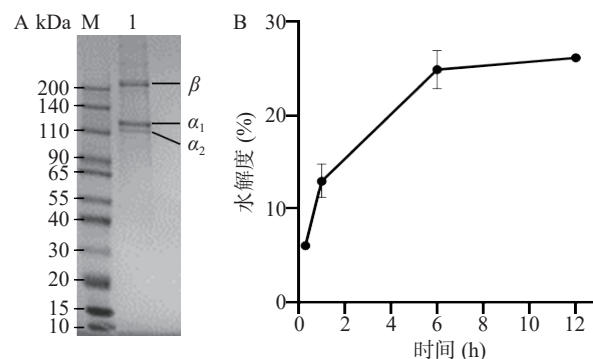


图7 罗非鱼皮胶原蛋白的 SDS-PAGE(A)及水解度(B)

Fig.7 SDS-PAGE (A) and hydrolysis degree (B) of tilapia skin collagen

注: M; marker; 1: 制备的罗非鱼鱼皮胶原蛋白。

示,胶原蛋白水解物的抗氧化活性随着水解物浓度的提高而增强。当水解物浓度为 4 mg/mL 时,其 DPPH 自由基、ABTS⁺自由基和羟基自由基清除率分别为 65.9%、97.6% 和 32.1%。盛周煌等^[51]利用复合蛋白酶制备罗非鱼皮胶原蛋白水解物,当水解物的浓度为 4 mg/mL 时,其 ABTS⁺自由基和羟基自由基清除率分别约为 80% 和 30%;当水解物浓度为 20 mg/mL 时,其 DPPH 自由基清除率约为 15%。邢瀚文等^[52]利用 *B. subtilis* 固态发酵罗非鱼皮制备胶原蛋白水解物,当水解物的浓度为 4 mg/mL 时,其 DPPH 自由基和羟基自由基清除率分别约为 50% 和 30%。由此可见,本实验制备的胶原蛋白水解物展现了更高的抗氧化能力。

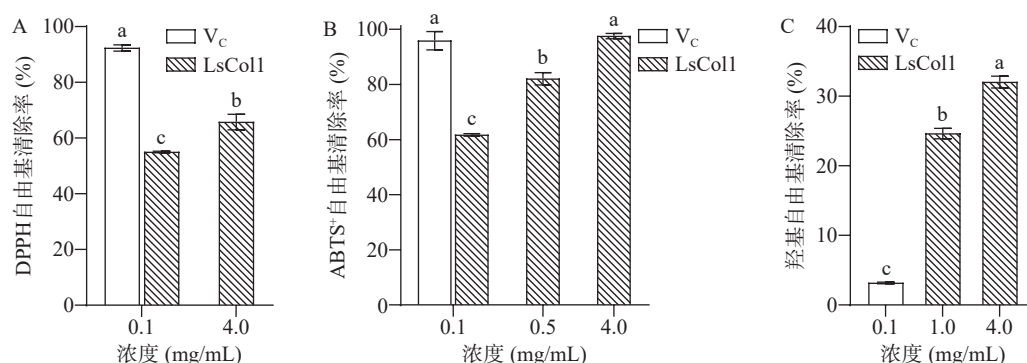


图8 胶原蛋白水解物的抗氧化活性分析

Fig.8 Analysis of antioxidant activity of collagen hydrolysate

注: (A)罗非鱼皮胶原蛋白水解物的 DPPH 自由基清除率; (B)ABTS⁺自由基清除率; (C)羟基自由基清除率; 不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

3 结论

本研究从 *L. sphaericus* KCCM 35418 的基因组中筛选到的胶原酶 LsCol1 基因序列全长 3219 bp, 编码 1072 个氨基酸。LsCol1 属于肽酶 M9 家族, N-端含有信号肽、前肽和催化域, C 端含有一个 PKD 结构域和两个 CBD 结构域。重组胶原酶 LsCol1 不仅能够水解明胶和酸溶性牛跟腱胶原蛋白, 并且对不溶性牛跟腱胶原蛋白也具有水解活性, 表明该酶是真

正的胶原酶。LsCol1 的最适反应温度和 pH 分别为 37 °C 和 7.5, 在 30 °C 以下以及 pH7.0~10.0 范围内稳定性较好。LsCol1 为 Ca^{2+} 依赖型金属蛋白酶, 当 Ca^{2+} 存在时, LsCol1 的催化活性显著提高。LsCol1 对罗非鱼皮胶原蛋白和鸡 II 型胶原蛋白也具有水解活性, 尤其是以罗非鱼皮胶原蛋白为底物时水解活性最强, 酶活力 14.1 U/mg。利用 LsCol1 水解罗非鱼皮胶原蛋白制备抗氧化活性肽, 当水解物浓度为

4 mg/mL 时,其 DPPH 自由基、ABTS⁺自由基和羟基自由基清除率分别为 65.9%、97.6% 和 32.1%。在后续研究中,拟借助分子对接等手段分析 LsCol1 的关键氨基酸残基,通过分子改造提高 LsCol1 的体外稳定性,进而提升其工业适用性。

© The Author(s) 2025. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] JAFARI H, LISTA A, SIEKAPEN M M, et al. Fish collagen: Extraction, characterization, and applications for biomaterials engineering[J]. *Polymers*, 2020, 12(10): 2230.
- [2] STENZEL K H, MIYATA T, RUBIN A L, et al. Collagen as a biomaterial[J]. *Annual Review of Biophysics*, 1974, 3: 231–253.
- [3] HERNANDEZ-RUIZ K L, LOPEZ-CERVANTES J, SANCHEZ-MACHADO D, et al. Collagen peptide fractions from tilapia (*Oreochromis aureus* Steindachner, 1864) scales: Chemical characterization and biological activity[J]. *Food Bioscience*, 2023, 53: 102658.
- [4] LEE H J, UN KIM D, KIM C O. The efficacy and safety of low-molecular-weight collagen peptides for joint pain in patients with osteoarthritis: A randomized, double-blind, placebo-controlled study[J]. *Journal of Functional Foods*, 2023, 109: 105792.
- [5] LAMPROPOULOU-ADAMIDOU K, KARLAFTI E, ARGYROU C, et al. Effect of calcium and vitamin D supplementation with and without collagen peptides on volumetric and areal bone mineral density, bone geometry and bone turnover in postmenopausal women with osteopenia[J]. *Journal of Clinical Densitometry*, 2022, 25(3): 357–372.
- [6] CHEN Junde, SUN Shanshan, LI Yushuang, et al. Proteolysis of tilapia skin collagen: Identification and release behavior of ACE-inhibitory peptides[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2020, 139: 110502.
- [7] HE Long, WANG Xinyue, WANG Yanru, et al. Production and identification of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides from discarded cowhide collagen[J]. *Food Chemistry*, 2023, 405: 134793.
- [8] CAO Yanpeng, SHI Xin, ZHAO Xin, et al. Acellular dermal matrix decorated with collagen-affinity peptide accelerate diabetic wound healing through sustained releasing Histatin-1 mediated promotion of angiogenesis[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2022, 624: 122017.
- [9] ZHAO Xiaocao, ZHANG Xuejiao, LIU Dengyong. Collagen peptides and the related synthetic peptides: A review on improving skin health[J]. *Journal of Functional Foods*, 2021, 86: 104680.
- [10] 杨晓东, 张杨, 张寿, 等. 胶原蛋白肽的提取及应用研究进展[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(9): 469–476. [YANG Xiaodong, ZHANG Yang, ZHANG Shou, et al. Research progress in extraction and application of collagen peptides[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(9): 469–476.]
- [11] 王丹, 高宏泉, 宋丹丹, 等. 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2024: 24–25. [WANG Dan, GAO Hongquan, SONG Dandan, et al. China fishery statistical yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2023: 24–25.]
- [12] KHATRI M, NAUGHTON R J, CLIFFORD T, et al. The effects of collagen peptide supplementation on body composition, collagen synthesis, and recovery from joint injury and exercise: A systematic review[J]. *Amino Acids*, 2021, 53(10): 1493–1506.
- [13] MATINONG A M E, CHISTI Y, PICKERING K L, et al. Collagen extraction from animal skin[J]. *Biology*, 2022, 11(6): 905.
- [14] RAN Liyuan, SU Hainan, ZHAO Guoyan, et al. Structural and mechanistic insights into collagen degradation by a bacterial collagenolytic serine protease in the subtilisin family[J]. *Molecular Microbiology*, 2013, 90(5): 997–1010.
- [15] SORAPUKDEE S, SUMPAVAPOL P, BENJAKUL S, et al. Collagenolytic proteases from *Bacillus subtilis* B13 and *B. siamensis* S6 and their specificity toward collagen with low hydrolysis of myofibrils[J]. *LWT- Food Science and Technology*, 2020, 126: 109307.
- [16] BARZKAR N, BABICH O, SUKHIKH S, et al. Exploring the sources and potential applications of marine collagenases[J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2024, 58: 103150.
- [17] WANG Houchuntai, TU Zongcai, WANG Hui. Preparation of high content collagen peptides and study of their biological activities[J]. *Food Research International*, 2023, 174: 113561.
- [18] SONG Yihang, FU Yousi, HUANG Shiyang, et al. Identification and antioxidant activity of bovine bone collagen-derived novel peptides prepared by recombinant collagenase from *Bacillus cereus*[J]. *Food Chemistry*, 2021, 349: 129143.
- [19] BHAGWAT P K, DANDGE P B. Collagen and collagenolytic proteases: A review[J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2018, 15: 43–55.
- [20] 王学川, 王雪莹, 杨淑琴, 等. 微生物胶原酶研究进展[J]. *皮革科学与工程*, 2021, 31(2): 16–22, 27. [WANG Xuechuan, WANG Xueying, YANG Shuqin, et al. A review: Microbial collagenase[J]. 2021, 31(2): 16–22, 27.]
- [21] BACH T M H, PHAM T, DINH T S, et al. Characterization of collagenase found in the nonpathogenic bacterium *Lysinibacillus sphaericus* VN3[J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2020, 84(11): 2293–2302.
- [22] 王逗, 游锦若, 申铨日, 等. 橙黄小单孢菌(*Micromonospora aurantiaca*)几丁质酶基因的克隆、表达、鉴定及应用[J]. *南方水产科学*, 2023, 19(5): 143–153. [WANG Dou, YOU Jinruo, SHEN Xuanri, et al. Cloning, expression and application of a chitinase gene from *Micromonospora aurantiaca*[J]. *South China Fisheries Science*, 2023, 19(5): 143–153.]
- [23] HOPPE I J, BRANDSTETTER H, SCHONAUER E. Biochemical characterisation of a collagenase from *Bacillus cereus* strain Q1[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 4187.
- [24] ABRAMSON J, ADLER J, DUNGER J, et al. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3[J]. *Nature*, 2024, 630: 493–500.
- [25] ECKHARD U, SCHONAUER E, BRANDSTETTER H. Structural basis for activity regulation and substrate preference of clostridial collagenases G, H, and T[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(28): 20184–20194.
- [26] 陈世化. *Bacillus cereus* MH19 基因组分析及胶原酶分离纯化与重组表达[D]. 武汉: 华中农业大学, 2020. [CHEN Shihua, *Bacillus cereus* MH19 genome analysis and collagenase separation and purification and recombinant expression[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2020.]
- [27] MANDL I, MACLENNAN J D, HOWES E L, et al. Isolation and characterization of proteinase and collagenase from *Cl. histolyticum*[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 1953, 32(12): 1093–1100.

1323–1329.

[28] LIMA C A, RODRIGUES P M, PORTO T S, et al. Production of a collagenase from *Candida albicans* URM3622[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2009, 43(3): 315–320.

[29] WU Qi, LI Chen, LI Chenglei, et al. Purification and characterization of a novel collagenase from *Bacillus pumilus* Col-J[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2010, 160: 129–139.

[30] BI Chunhuan, LI Xiaohui, QI Xin, et al. Effect of extraction methods on the preparation of electrospun/electrosprayed microstructures of tilapia skin collagen[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2019, 128(2): 234–240.

[31] HONG G P, MIN S G, JO Y J. Anti-oxidative and anti-aging activities of porcine by-product collagen hydrolysates produced by commercial proteases: Effect of hydrolysis and ultrafiltration[J]. *Molecules*, 2019, 24(6): 1104.

[32] SPELLMAN D, MCEVOY E, OCUINN G, et al. Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis[J]. *International Dairy Journal*, 2003, 13(6): 447–453.

[33] 陈惠敏, 吴晓平, 汪少芸. 黑豆粕饮料发酵工艺的优化及其抗氧化活性评价[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(5): 129–138.

[CHEN Huimin, WU Xiaoping, WANG Shaoyun. Optimization of fermentation technology and evaluation of antioxidant activity of black soybean meal beverage[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2023, 44(5): 129–138.]

[34] 李小锋, 张露, 马天新, 等. 多宝鱼不同水解物肽段组成及体外抗氧化活性比较[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(3): 95–101. [LI Xiaofeng, ZHANG Lu, MA Tianxin, et al. Comparison of peptide composition and *in vitro* antioxidant activity of different hydrolysates of turbot meat[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2023, 44(3): 95–101.]

[35] QIU Wenjing, CHEN Xu, TIAN Yongqi, et al. Protection against oxidative stress and anti-aging effect in *Drosophila* of royal jelly-collagen peptide[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2019, 135: 110881.

[36] ECKHARD U, SCHONAUER E, NUSS D, et al. et al. Structure of collagenase G reveals a chew and digest mechanism of bacterial collagenolysis[J]. *Nature Structural and Molecular Biology*, 2011, 18(10): 1109–1114.

[37] BARRAUD P, BANERJEE S, MOHAMED W I, et al. A bimodular nuclear localization signal assembled via an extended double-stranded RNA-binding domain acts as an RNA-sensing signal for transportin 1[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(18): 1852–1861.

[38] WANG Yukai, ZHAO Guoyan, LI Yang, et al. Mechanistic insight into the function of the C-terminal PKD domain of the collagenolytic serine protease desasein MCP-01 from deep sea *Pseudalteromonas* sp. SM9913: Binding of the PKD domain to collagen results in collagen swelling but does not unwind the collagen triple helix[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(19): 14285–14291.

[39] MATSUSHITA O, JUNG C M, MINAMI J, et al. A study of the collagen-binding domain of a 116-kDa *Clostridium histolyticum* collagenase[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(6):

3643.

[40] BAUER R, JANOWSKA K, TAYLOR K, et al. Structures of three polycystic kidney disease-like domains from *Clostridium histolyticum* collagenases ColG and ColH[J]. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2015, 71(3): 565–577.

[41] LIU Wenzhong, XIE Yubin, MA Jiyong, et al. IBS: an illustrator for the presentation and visualization of biological sequences[J]. *Bioinformatics*, 2015, 31(20): 3359–3361.

[42] ALTSCHUL S F, GISH W, MILLER W, et al. Basic local alignment search tool[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1990, 215(3): 403–410.

[43] AHMED R, GETACHEW A T, CHO Y J, et al. Application of bacterial collagenolytic proteases for the extraction of type I collagen from the skin of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2018, 89: 44–51.

[44] PETROVA D, DEREKOVA A, VLAHOV S. Purification and properties of individual collagenases from *Streptomyces* sp. strain 3B[J]. *Folia Microbiologica*, 2006, 51: 93–98.

[45] KANG S I, JANG Y B, CHOI Y J, et al. Purification and properties of a collagenolytic protease produced by marine bacterium *Vibrio vulnificus* CYK279H[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2005, 10(6): 593–598.

[46] BAEHAKI A, SUKARNO, SYAH D, et al. Production and characterization of collagenolytic protease from *Bacillus licheniformis* F11.4 originated from Indonesia[J]. *Asian Journal of Chemistry*, 2014, 26(10): 2861–2864.

[47] WILSON J J, MATSUSHITA O, OKABE A, et al. A bacterial collagen-binding domain with novel calcium-binding motif controls domain orientation[J]. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 2003, 22: 1743–1752.

[48] YANG Yuliang, ZHU Lingyu, GUO Zitao, et al. Yak bone collagen-derived anti-inflammatory bioactive peptides alleviate lipopolysaccharide-induced inflammatory by inhibiting the NF- κ B signaling pathway and nitric oxide production[J]. *Food Bioscience*, 2023, 52: 102423.

[49] HE Mengying, WANG Mengyuan, XU Tao, et al. Reactive oxygen species-powered cancer immunotherapy: Current status and challenges[J]. *Journal of Controlled Release*, 2023, 356: 623–648.

[50] KAUR S, KAUR S, KAUR A, et al. A cross-sectional study to correlate antioxidant enzymes, oxidative stress and inflammation with prevalence of hypertension[J]. *Life Sciences*, 2023, 313: 121134.

[51] 盛周煌, 贾盟盟, 朱良. 罗非鱼皮胶原蛋白多肽的体外抗氧化活性[J]. *食品科技*, 2018, 43(11): 274–278. [SHENG Zhouhuang, JIA Mengmeng, ZHU Liang. *In vitro* antioxidant activity of collagen peptides from tilapia skin[J]. *Food Science and Technology*, 2018, 43(11): 274–278.]

[52] 邢瀚文, 韩玮, 施文正, 等. 固态发酵法制备罗非鱼皮胶原蛋白肽及其抗氧化活性研究[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(19): 104–110. [XING Hanwen, HAN Wei, SHI Wenzheng, et al. Tilapia skin collagen peptides prepared by solid-state fermentation and its antioxidant activity[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(19): 104–110.]