

定点突变改造提高纺锤形赖氨酸芽孢杆菌氨基甲酸酯水解酶稳定性

刘晓慧^{1,2}, 方芳^{1,2}, 夏小乐¹, 堵国成^{2,3,4}, 陈坚^{1,3,4}

1 江南大学 生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 食品安全与营养协同创新中心, 江苏 无锡 214122

3 江南大学 糖化学与生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

4 江南大学 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122

刘晓慧, 方芳, 夏小乐, 等. 定点突变改造提高纺锤形赖氨酸芽孢杆菌氨基甲酸酯水解酶稳定性. 生物工程学报, 2016, 32(9): 1233-1242.

Liu XH, Fang F, Xia XL, et al. Stability enhancement of urethanase from *Lysinibacillus fusiformis* by site-directed mutagenesis. Chin J Biotech, 2016, 32(9): 1233-1242.

摘要: 氨基甲酸酯 (Ethyl carbamate, EC) 是一种存在于发酵食品和酿造酒精饮料中的潜在致癌物质。利用生物酶法去除食品饮料中的 EC 是一种较为安全有效的方法。本研究以来源于赖氨酸芽孢杆菌 *Lysinibacillus fusiformis* SC02 的氨基甲酸酯水解酶为研究对象, 采用计算机辅助设计突变位点, 构建了其不稳定区域 Q328 位点的饱和突变体。通过酶学性质分析发现, 突变体 Q328C 和 Q328V 在 40 °C 下的半衰期分别提高了 7.46 和 1.99 倍, Q328R 在高温下也有比原酶更好的耐受性。此外, 突变体 Q328C 对乙醇的耐受性和酸耐受性也有所提高。对氨基甲酸酯水解酶分子改造的结果表明, 通过改造其不稳定区域 Q328 位点, 可以提高酶的热稳定性及对酸和乙醇的耐受性。

关键词: 定点突变, 氨基甲酸酯水解酶, 氨基甲酸酯, 酶稳定性

Received: December 11, 2015; **Accepted:** March 2, 2016

Supported by: Major State Basic Research Development Program of China (973 Program) (No. 2012CB720802), National Natural Science Foundation of China (No. 31371821).

Corresponding author: Fang Fang. Tel: +86-510-85918307; Fax: +86-510-85918039; E-mail: ffang@jiangnan.edu.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2012CB720802), 国家自然科学基金 (No. 31371821) 资助。

Stability enhancement of urethanase from *Lysinibacillus fusiformis* by site-directed mutagenesis

Xiaohui Liu^{1,2}, Fang Fang^{1,2}, Xiaole Xia¹, Guocheng Du^{2,3,4}, and Jian Chen^{1,3,4}

1 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 Synergetic Innovation Center of Food Safety and Nutrition, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

4 National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Ethyl carbamate as a potential carcinogen commonly exists in traditional fermented foods and beverages. Enzymatic removal of ethyl carbamate from fermented foods and beverages is an efficient and safe method. In this study, we mutated urethanase from *Lysinibacillus fusiformis* SC02 on the Q328 site through computer aided design approaches. The half-life of resulting mutants Q328C and Q328V was detected to be 7.46 and 1.96 folds higher than that of the original enzyme, and Q328R presented better thermal-tolerance than the original urethanase when incubated at high temperature. The tolerance of Q328C to ethanol and acid also increased when compared with that of the original enzyme. The stability and tolerance to acid and ethanol of urethanase could be improved by modification on its Q328 site.

Keywords: site-directed mutagenesis, urethanase, ethyl carbamate, enzyme stability

氨基甲酸乙酯 (Ethyl carbamate, EC) 是发酵食品 (酱油、腐乳、泡菜) 和酒精饮料 (葡萄酒、黄酒、白酒) 在生产、储藏过程中生成的对人体具有潜在致癌性和遗传毒性的一种微量有害物质^[1-3]。2007年,国际癌症研究机构 (International Agency for Research on Cancer, IARC) 正式将其致癌级别由 2B 类提高为 2A 类^[4]。因此,控制食品饮料中 EC 的含量,对保障食品安全至关重要。

目前对食品及饮料中氨基甲酸乙酯的控制策略主要包括:改造发酵菌株来减少 EC 前体物质的生成^[5]、向发酵食品中添加脲酶^[6]、改善传统发酵工艺条件^[7-8]等。由于 EC 的生成机制复杂,性质稳定一旦生成很难用物理或化学方法去除,目前还没有可以消除不同发酵产品中 EC 的一种有效方法。应用生物酶法去除成品中的 EC

是一种较为安全有效的方法^[9-11]。氨基甲酸乙酯水解酶 (Urethanase, UH) 能够降解 EC,生成无害的乙醇、二氧化碳和氨,具有潜在的工业应用价值。

目前对氨基甲酸乙酯水解酶的研究主要集中在新菌株的筛选以及对酶的酶学性质研究和应用上。Mohapatra 等从海绵体中分离得到 1 株产 UH 酶的微球菌,其最佳 pH 值和温度分别为 4.5 及 37 °C^[9]。Zhao 等筛选到 1 株产 UH 酶的地衣芽孢杆菌,此酶对黄酒中的 EC 具有一定降解效果,其最适反应 pH 为 4.5,在 37 °C、20%乙醇条件下保存 2 h,酶活剩余 64%^[12]。Zhou 等筛选到 1 株产中性 EC 酶的变幻青霉菌,能降低黄酒中的 EC 含量而不影响黄酒的风味^[13]。目前对 UH 的基因序列报道较少,仅有 Kambe 等从马红球菌中得到一段编码 UH 的基因,并在大肠杆菌

中实现了异源表达^[14]。李京京等筛选到 1 株产 UH 的赖氨酸芽孢杆菌 *Lysinibacillus fusiformis* SC02, 并将得到的编码 UH 的基因 (ID :KU353448) 在大肠杆菌中实现了异源表达^[15]。但此酶为中性酶, 在大肠杆菌中表达后酶的稳定性较差。定点突变是改善酶分子特性的一个主要方法^[16-17]。本研究针对 UH 酶热不稳定等问题, 通过计算机辅助设计突变位点, 以期获得性质改良的突变酶, 为促进 UH 酶在降解发酵类食品中的 EC 提供技术手段, 为深入研究 UH 蛋白的结构与功能提供有利的参考数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒

大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3)、含有编码 UH 基因的质粒 pET20b-UH 均为本实验室保存。

1.1.2 培养基

LB 培养基 (g/L): 蛋白胨 10, 酵母粉 5, 氯化钠 10; 固体培养基加入 2.0% (W/V) 的琼脂。

TB 液体培养基 (g/L): 甘油 5, 蛋白胨 12, 酵母粉 24, 磷酸二氢钾 2.32, 三水合磷酸氢二钾 16.43。

1.1.3 主要试剂

DNA 分子量标准和磷酸化酶购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 氨苄青霉素、细菌基因提取试剂盒和 PCR 引物购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; DNA 胶回收试剂盒购自 Omega 公司; NuPAGE 预制凝胶购自 Life Technologies 公司; 酵母粉、蛋白胨购自 Oxoid 公司。

1.2 基于计算机辅助方法设计突变位点

1.2.1 UH 蛋白三维结构的同源建模

以 PDB 数据库中同源性较高的模板分别建

模, 选取覆盖率最高、gap 较少、综合评分最高且同源性排第 3 (37.58%) 的 Glutamyl-tRNA (Gln) amidotransferase subunit A (PDB ID: 2G5H) 为模板, 用在线三维结构模拟程序 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/interactive>) 对 UH 蛋白进行三维结构建模。

1.2.2 B-factors 值预测

本研究采用 FlexServ 软件 (<http://mmb.pcbub.es/FlexServ/input.php>) 对 UH 不稳定区域 B-factor 值进行分析。

1.2.3 分子动力学模拟预测

本研究使用分子动力学软件 Gromacs (<http://www.gromacs.org/>) 预测 UH 蛋白的 RMSD 及原子的 RMSF 值^[18]。

1.2.4 预测蛋白质折叠自由能变化

本研究中通过软件 PoPMuSiC-2.1 (<http://dezyme.com/>) 分析提高蛋白酶热稳定性的潜在突变位点^[19]。其中该软件是基于突变体折叠自由能 ($\Delta\Delta G$) 的变化值来进行分析的。

1.3 定点突变

本研究中对基因的定点突变采用重组质粒 pET20b-UH 全序列扩增的方法。PCR 条件: 95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 68 °C 2.5 min, 30 个循环; 68 °C 5 min。PCR 引物序列参见表 1。获得的重组质粒送上海生物工程有限公司测序验证。

1.4 重组工程菌培养及 UH 酶诱导表达

将大肠杆菌重组工程菌接种到 LB 培养基中, 于 37 °C、220 r/min 条件下过夜培养。将种子液按 3% 的接种量转接到 TB 培养基中, 于 37 °C、220 r/min 条件下培养至 OD_{600} 为 0.6, 加入 ITPG 至终浓度为 0.1 mmol/L, 在 25 °C、220 r/min 条件下培养 18 h。

表 1 突变引物

Table 1 Primers for the site-directed mutagenesis

Primer names	Primer sequences (5'-3')
Q328-R	TAAATCTGAATGGTGTATAGCTGCTG
Q328-F	CAAAAGAGACCACAAGATTTTGGTG
Q328Y-F	TACAAGAGACCACAAGATTTTGGTG
Q328A-F	GCTAAGAGACCACAAGATTTTGGTG
Q328C-F	TGTAAGAGACCACAAGATTTTGGTG
Q328D-F	GATAAGAGACCACAAGATTTTGGTG
Q328F-F	TTCAAGAGACCACAAGATTTTGGTG
Q328G-F	GGTAAGAGACCACAAGATTTTGGTG
Q328I-F	ATCAAGAGACCACAAGATTTTGGTG
Q328L-F	CTTAAGAGACCACAAGATTTTGGTG
Q328H-F	CATAAGAGACCACAAGATTTTGGTG
Q328K-F	AAGAAGAGACCACAAGATTTTGGTG
Q328M-F	ATGAAGAGACCACAAGATTTTGGTG
Q328N-F	AACAAGAGACCACAAGATTTTGGTG
Q328R-F	AGAAAGAGACCACAAGATTTTGGTG
Q328S-F	TCTAAGAGACCACAAGATTTTGGTG
Q328T-F	ACTAAGAGACCACAAGATTTTGGTG
Q328W-F	TGGAAGAGACCACAAGATTTTGGTG
Q328V-F	GTTAAGAGACCACAAGATTTTGGTG
Q328P-F	CCTAAGAGACCACAAGATTTTGGTG
Q328E-F	GAAAAGAGACCACAAGATTTTGGTG

1.5 蛋白质纯化

将重组菌液在 4 °C、9 000 r/min 下离心 15 min 收集菌体。用 20 mmol/L、pH 7.0 的磷酸盐缓冲溶液洗涤菌体 2 次并重悬菌体，冰浴超声破碎。将破碎后的菌液于 4 °C、9 000 r/min 条件下离心 20 min 并收集上清液。纯化时先用缓冲液 A(含 250 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑的 20 mmol/L、pH 7.4 的磷酸盐缓冲液) 平衡镍柱，洗脱用缓冲液 B(含 250 mmol/L NaCl, 500 mmol/L 咪唑的 20 mmol/L、pH 7.4 的磷酸盐缓冲液)

进行梯度洗脱，收集有酶活的洗脱组分进行脱盐处理。

1.6 酶活测定

氨基甲酸酯水解酶活性的测定方法采用测定产物氨的生成来计算。取 1 mL 酶液(对照为超纯水)加入 1 mL 3%的 EC 溶液，于 37 °C 恒温水浴箱中反应 15 min 后，加入 1 mL 10%三氯乙酸终止反应。反应终止后加入 1 mL 显色剂 I (15 g 苯酚和 0.625 g 亚硝基铁氰化钠定容至 250 mL) 和 1 mL 显色剂 II (13.125 g NaOH 和 7.5 mL 次氯酸钠定容至 250 mL)，混匀后在 37 °C 水浴箱中保温 20 min，反应结束后用超纯水定容至 10 mL，测定 625 nm 下的吸光度^[20]。酶活定义：常压、37 °C、pH 7.0 条件下，1 min 分解 EC 产生 1 μmol 氨所需酶量为 1 个酶活力单位 (U)。

1.7 酶学性质测定

1.7.1 最适反应温度的测定

将纯化后的野生 UH 酶及其突变体在不同温度下 (20–65 °C，间隔 5 °C) 进行酶促反应，测定其最适反应温度。

1.7.2 半衰期 $t_{1/2}$ 的测定

将纯化后的野生 UH 酶及其突变体置于 40 °C 下保温，每隔一定时间取样测定酶活。由公式 $\ln C_t = \ln C_0 + kt$ ， $t_{1/2} = \ln 2/k$ 计算出酶的半衰期。其中， C_0 是初始酶活， C_t 是时间为 t 时所对应的酶活。

1.7.3 pH 对酶活性的影响

将纯化后的野生 UH 酶及其突变体在不同的 pH 4.5–7.0 条件下进行酶促反应，测定不同 pH 值下的酶活。

1.7.4 乙醇对酶活的影响

将纯化后的野生 UH 酶及其突变体分别在

浓度为 0%、2%、5%、10% 和 15% 的乙醇条件下反应,测定不同乙醇浓度下的酶活。

1.7.5 酶反应动力学参数测定

以 5–300 mmol/L 氨基甲酸酯为底物,分别测定在相应浓度条件下酶的反应速率。根据底物浓度与反应速度之间的关系,使用 GraphPad Prism 软件计算动力学常数 K_m 与 V_{max} 的值。

2 结果与分析

2.1 基于计算机辅助设计突变位点

为了提高氨基甲酸酯水解酶在应用条件下的耐受性,以赖氨酸芽孢杆菌 *Lysinibacillus fusiformis* SC02 来源的 UH 酶为研究对象,通过蛋白质分子同源建模和稳定性分析,寻找与酶分子不稳定性相关的结构或区域。通过 FlexServ 软件对 UH 蛋白每个氨基酸的 B-factor 值(或 B 值)进行分析可知,序列中 Gln328 位 B-factor 响应值最高,Gln357 的 B-factor 也较高,说明该部分结构不稳定,紊乱度较大(图 1)。

采用分子动力学软件 Gromacs 对组成 UH 蛋白中各氨基酸 RMSF 值进行预测,结果表明最不稳定的区域在 328 位氨基酸附近(图 2)。

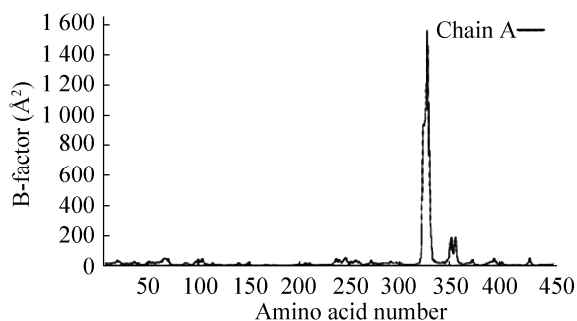


图 1 组成氨基甲酸酯水解酶各氨基酸的 B 值
Fig. 1 The B-factor values of amino acids that composed of urethanase.

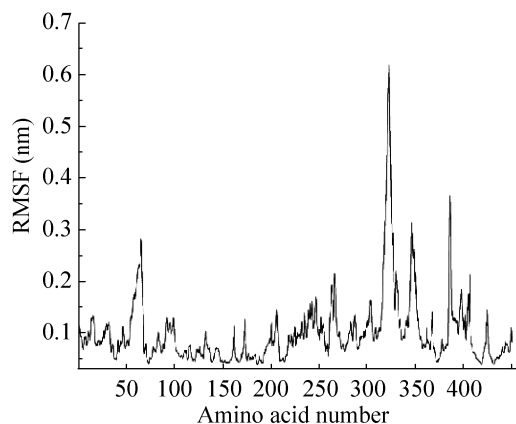


图 2 组成氨基甲酸酯水解酶各氨基酸的 RMSF 值
Fig. 2 The RMSF values of amino acids that composed of urethanase.

借助 Discovery Studio 程序对 UH 建模并呈现其 3D 结构(图 3)。图中红色为 RMSF 值最高的 6 个氨基酸:Ser325、Asp326、Leu327、Gln328、Lys329、Arg330。其中 RMSF 最高的点为 Gln328,说明这一区域结果最不稳定,这与 B-factor 分析结果一致。

通过 PoPMuSiC 软件分析可知,328Gln 及 402Asp 的 $\Delta\Delta G$ 分别为 -2.30 和 -6.56,均为负值。说明这 2 个区域为蛋白质潜在的不稳定区域。

基于以上结果,可以得出 Q328 位点区域不稳定,因此对 328 位点进行饱和突变。

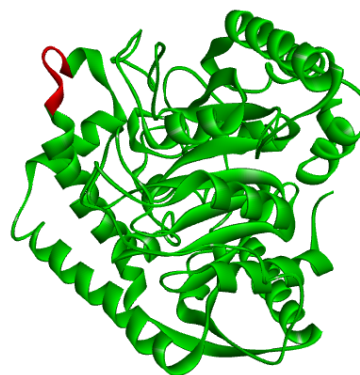


图 3 UH 蛋白三维结构图
Fig. 3 The three-dimensional structure of urethanase.

2.2 UH 突变体的异源表达及酶的分离纯化

以重组质粒 pET20b-UH 为模板,通过全质粒 PCR 扩增获得了 UH 在 328 位的 19 个全部突变体。通过测定 UH 突变体活性,发现只有 Q328C、Q328V、Q328R 和 Q328H 4 个突变株有活性。对这 4 个有活性的突变体分别进行诱导表达和纯化,获得了较纯的 UH 突变体的纯酶 (图 4)。

2.3 突变体与野生酶酶学性质的比较

2.3.1 温度对野生酶和突变体酶活性的影响

由图 4 可知,野生酶和突变体的最适反应温度均为 30 °C,但突变体 Q328C、Q328R、Q328V 在 30 °C 以上比野生酶的稳定性好。在 37 °C 保温 1 h 后, Q328C、Q328R、Q328V 和 UH 的残留酶活分别为 76.9%、60.8%、75.8%和 51.9%,分别比原酶提高了 24.0%、8.9%和 23.9%。在 40 °C,上述突变体的残留酶活分别提高了 31.7%、19.7%和 28.9%。突变体 Q328V 和其他酶相比,具有更宽的温度稳定范围。

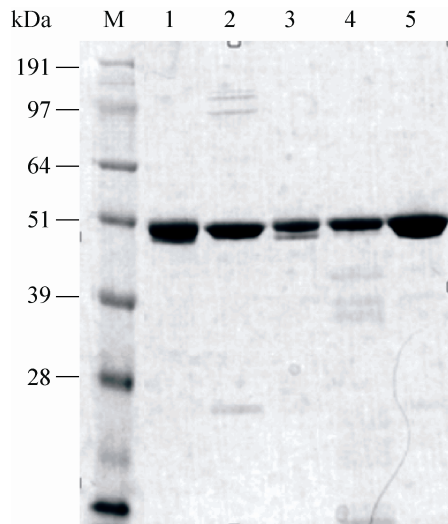


图 4 UH 和其突变体蛋白质纯化

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the purified urethanase and its mutants. M: marker; 1: purified UH; 2-5: purified Q328C, Q328H, Q328R, Q328V.

2.3.2 野生酶和突变体半衰期的比较

本研究考察了 40 °C 条件下 UH 及其突变体的半衰期。结果表明,突变体 Q328C、Q328V 和 Q328R 的半衰期都比 UH 长 (表 2)。其中 Q328C 的半衰期最长,达到 27.40 min,是 UH 的 7.46 倍。

2.3.3 pH 对野生酶和突变体酶活性的影响

由图 5 可知,UH 突变体 Q328C 和 Q328R 在 pH 6.0 及以下较野生酶的稳定性有所提高。其中,Q328R 较野生酶在低 pH 下的相对酶活提高幅度较小;而 Q328C 在酸性条件下酶活的提高幅度较为明显:在 pH 6.0 条件下相对酶活提高了 11%,在 pH 4.5 条件下,相对酶活也提高了 11%。由此可见,突变体 Q328C 在酸性条件下较野生酶的稳定性有所提高。

表 2 UH 酶及其突变体在 40 °C 的半衰期

Table 2 The half-life of wild-type urethanase and its mutants at 40 °C

Mutants	Half-life at 40 °C (min)
UH	3.67±0.10
Q328H	3.05±0.11
Q328C	27.4±0.68
Q328R	3.99±0.12
Q328V	7.18±0.25

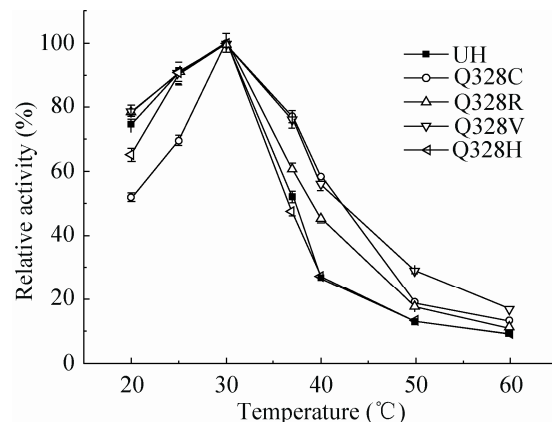


图 5 温度对野生酶和突变酶活性的影响

Fig. 5 The effect of temperature on urethanase and its mutants.

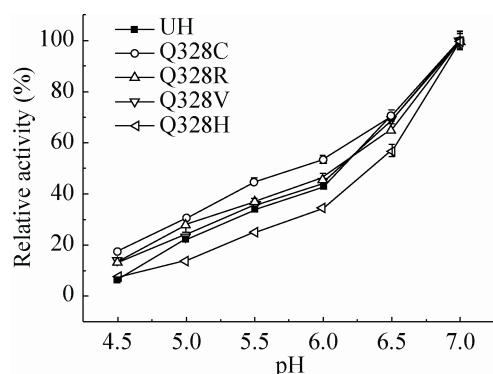


图6 pH对野生酶及其突变体酶活性的影响
Fig. 6 The effect of pH on urethanase and its mutants.

2.3.4 乙醇对野生酶和突变体酶活性的影响

乙醇对野生酶和突变体酶活性的影响如图7所示,突变酶Q328C在不同乙醇浓度下耐受性均较UH有所提高,尤其在低乙醇浓度下效果更为明显。在2%的乙醇条件下,突变酶Q328C的残留酶活为70.2%,比野生酶提高了25%。在5%乙醇条件下,Q328C的残留酶活为40.2%,比野生酶提高了13%。其他突变体和野生酶相比,对乙醇的耐受性变化不大。

2.3.5 酶反应动力学参数测定

用GraphPad Prism软件测定野生酶和突变体的动力学常数 K_m 及 V_{max} 值,结果如表3所示。

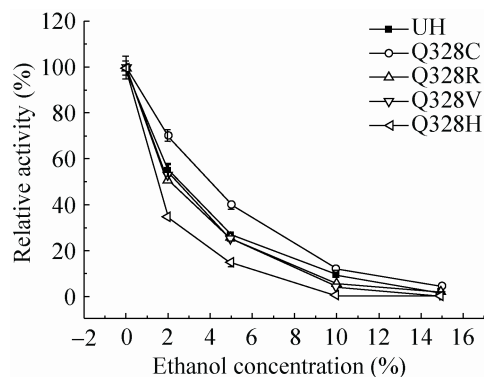


图7 乙醇对野生酶及其突变体酶活性的影响
Fig. 7 The effect of ethanol on urethanase and its mutants.

表3 野生酶和突变酶的动力学常数

Table 3 Kinetic parameters of wild-type enzyme and mutant enzymes

Mutants	K_m (mmol/L)	V_{max} ($\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$)
UH	53.51 \pm 3.959	426.6 \pm 11.73
Q328H	90.24 \pm 20.13	237.1 \pm 22.60
Q328C	73.70 \pm 4.387	768.9 \pm 18.52
Q328R	48.31 \pm 5.169	1053 \pm 40.74
Q328V	33.16 \pm 4.12	714.2 \pm 29.31

通过定点突变,突变体Q328V的 K_m 值有所降低,说明与底物结合能力增强。同时,Q328C、Q328R、Q328V最大反应速率增大。

3 讨论

RMSF值在分子动力学中是评价一个系统灵活性大小的关键参数,其计算原子在分子动力学轨迹中的迁移率,反映了氨基酸的构象稳定性情况。B值反映了蛋白质分子在晶体中的构象状态,一般B值越高说明紊乱度越大,相应位置的构象就越不稳定或柔性越强。本研究采用基于计算机辅助设计定点突变的方法,预测了组成UH酶的各个氨基酸的B值和RMSF值。动力学模拟表明Q328位点的B值和RMSF值最高,说明该点最不稳定。

通过软件模拟各突变体的RMSF值如图8所示,各突变体的B值如图9所示。Q328C、Q328V、Q328R和Q328H的RMSF值分别由原来的0.618变为0.417、0.582、0.605和0.668;B值分别由原来的1530变为1090、1480、1510和1600。对比各突变体328位点的RMSF值和B值,可见突变体Q328C的RMSF值和B值变低,Q328H的RMSF值和B值升高,Q328V的RMSF值和B值降低幅度较小,Q328R的RMSF值和B值基本不变。说明突变体Q328C的构象

稳定性增强, Q328H 的稳定性降低, Q328V 稳定性有较小幅度增强, 而 Q328R 的稳定性基本不变, 与实验结果一致。同时该位点位于 loop 环上, 该区域仍有较高的 RMSF 值和 B 值。通过动力学分析蛋白分子中各原子的 RMSF 值和 B 值对预测突变位点有较好的指导作用。

蛋白质分子内作用力的种类和数量对酶分子热稳定性和催化活性产生重要影响^[21]。本研究通过 DS 软件模拟发现, UH 野生酶 328Gln 与 324His 和 325Ser 之间各有一个氢键 (Hydrogen bond interaction, 图 10A)。将这一位点突变为 Cys 后, 增加了 2 个疏水相互作用力: 328Cys-403Leu 的苯基作用 (Alkey interaction, 图 10B) 和 328Cys-324His 的磷-苯基相互作用 (Pi-alkey interaction, 图 10B)。有报道指出, 增

强蛋白内部的疏水作用有助于蛋白整体稳定性的提高^[22], 本研究中 UH 突变体 Q328C 热稳定的提高与这一结论一致。

本文建模时参考的模板为 Glutamyl-tRNA (Gln) amidotransferase subunit A (PDB ID: 2G5H), 与目的蛋白仅有 37.58% 的同源性, 较低的同源性可能会带来对所建模型的评价误差, 仅可作为参考。但该模板在所有模板中覆盖率最高, gap 较少, 综合评分最高, 因此作为选择依据。

本研究首次对编码氨基甲酸酯水解酶的基因序列进行了分子改造, 通过定点突变提高了酶的稳定性, 为深入研究 UH 酶的蛋白结构与功能提供有利的参考数据, 为促进 UH 酶在降解发酵类食品中的应用提供技术手段。

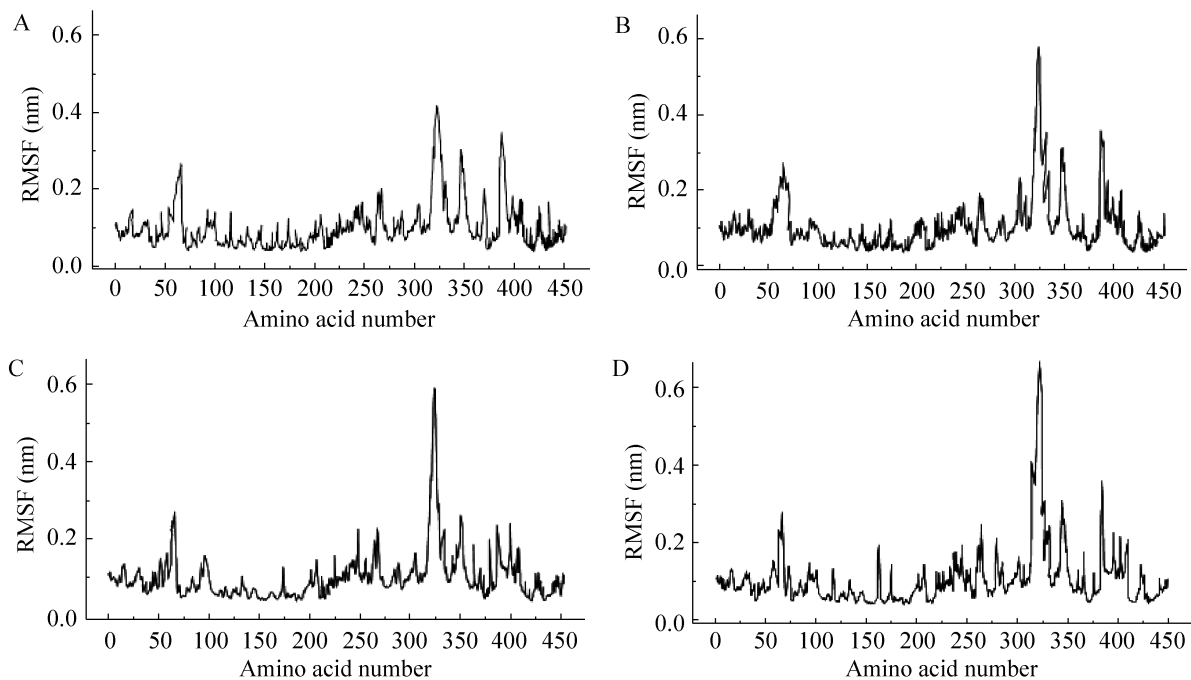


图 8 突变体各氨基酸的 RMSF 值

Fig. 8 The RMSF values of amino acids that composed of urethanase of mutants. (A) Q328C. (B) Q328V. (C) Q328R. (D) Q328H.

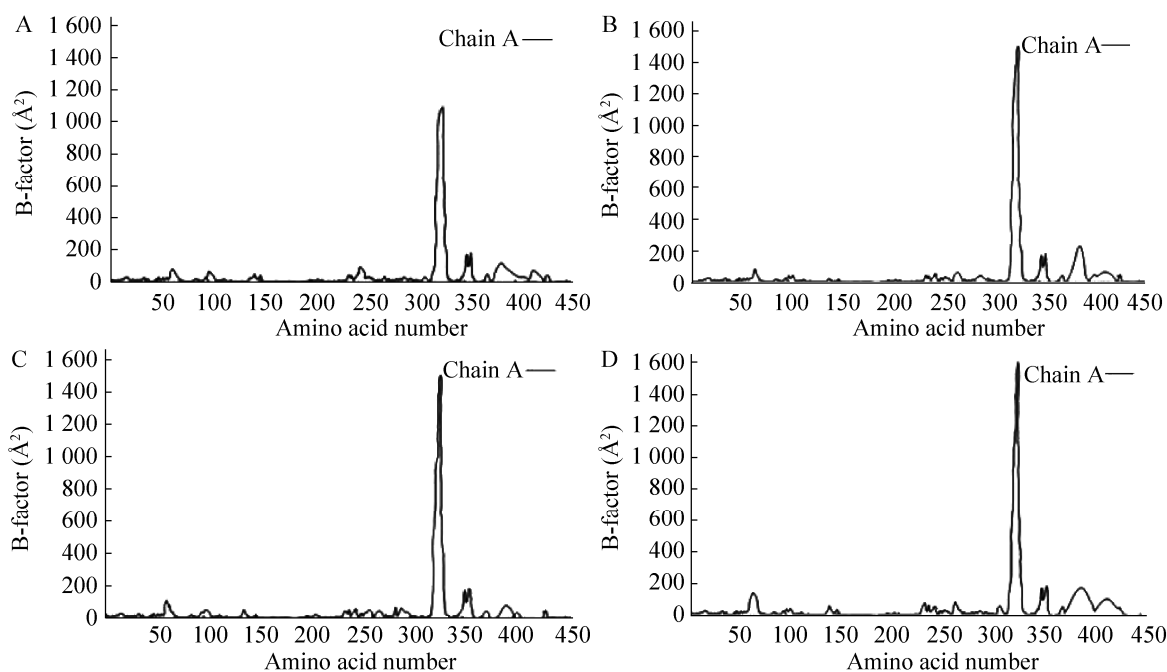


图 9 突变体各氨基酸的 B 值

Fig. 9 The B values of amino acids that composed of urethanase of mutants. (A) Q328C. (B) Q328V. (C) Q328R. (D) Q328H.

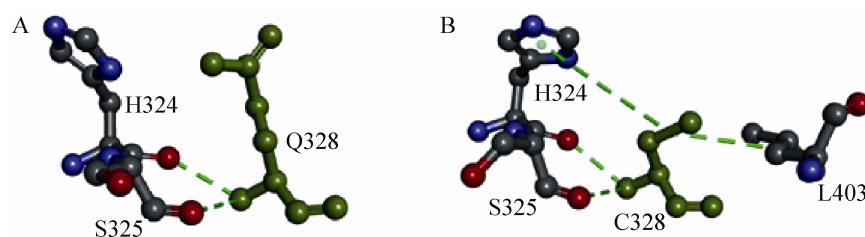


图 10 Q328C 的局部立体图

Fig. 10 The stereoscopic view of urethanase mutant Q328C. (A) The bonds formed by wild-type Q328. (B) The bonds formed by mutant C328.

REFERENCES

- [1] Baan R, Straif K, Grosse Y, et al. Carcinogenicity of alcoholic beverages. *Lancet Oncol*, 2007, 8(4): 292–293.
- [2] Schlatter J, Lutz WK. The carcinogenic potential of ethyl carbamate (urethane): risk assessment at human dietary exposure levels. *Food Chem Toxicol*, 1990, 28(3): 205–211.
- [3] Weber JV, Sharypov VI. Ethyl carbamate in foods and beverages—a review//Lichtfouse E, Ed. *Climate Change, Intercropping, Pest Control and Beneficial Microorganisms*. Netherlands: Springer, 2009.
- [4] Lachenmeier, DW. Consequences of IARC re-evaluation of alcoholic beverage consumption and ethyl carbamate on food control. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau: Zeitschrift fuer Lebensmittelkunde und Lebensmittelrecht*, 2007,

- 103(7): 307–311.
- [5] Van der Merwe GK, Husnik JI, Coulon J, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* to minimize the production of ethyl carbamate in wine. *Am J Enol Vitic*, 2006, 57(2): 113–124.
- [6] Yang LQ, Wang SH, Tian YP. Purification, properties, and application of a novel acid urease from *Enterobacter* sp. *Appl Biochem Biotechnol*, 2010, 160(2): 303–313.
- [7] Hasnip S, Caputi A, Crews C, et al. Effects of storage time and temperature on the concentration of ethyl carbamate and its precursors in wine. *Food Addit Contam*, 2004, 21(12): 1155–1161.
- [8] Woo IS, Kim IH, Yun UJ, et al. An improved method for determination of ethyl carbamate in Korean traditional rice wine. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2001, 26(6): 363–368.
- [9] Mohapatra BR, Bapuji M. Characterization of urethanase from *Micrococcus* species associated with the marine sponge (*Spirasfrella* species). *Lett Appl Microbiol*, 1997, 25(6): 393–396.
- [10] Zhou ND, Gu XL, Tian YP. Isolation and characterization of urethanase from *penicillium variable* and its application to reduce ethyl carbamate contamination in Chinese rice wine. *Appl Biochem Biotechnol*, 2013, 170(3): 718–728.
- [11] Wu Q, Zhao YM, Wang D, et al. Immobilized *Rhodotorula mucilaginosa*: a novel urethanase-producing strain for degrading ethyl carbamate. *Appl Biochem Biotechnol*, 2013, 171(8): 2220–2232.
- [12] Zhao CJ, Kobashi K. Purification and characterization of iron-containing urethanase from *Bacillus licheniformis*. *Biol Pharm Bull*, 1994, 17(6): 773–778.
- [13] Zhou ND, Gu XL, Zha XH, et al. Purification and characterization of a urethanase from *Penicillium variable*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2014, 172(1): 351–360.
- [14] Kambe T, Shigeno Y. Novel urethanase gene: Japan, PCT/JP2005/014950. 2006–02–23.
- [15] Li JJ, Fang F, Zhang JR, et al. Purification and characterization of an urethanase. *J Food Sci Biotechnol*, 2014, 33(12): 1239–1245 (in Chinese). 李京京, 方芳, 张继冉, 等. 氨基甲酸酯水解酶的分离纯化及酶学性质. *食品与生物技术学报*, 2014, 33(12): 1239–1245.
- [16] Choi JG, Ju YH, Yeom SJ, et al. Improvement in the thermostability of D-psicose 3-epimerase from agrobacterium tumefaciens by random and site-directed mutagenesis. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(20): 7316–7320.
- [17] Michael Gromiha M, Oobatake M, Kono H, et al. Importance of mutant position in Ramachandran plot for predicting protein stability of surface mutations. *Biopolymers*, 2002, 64(4): 210–220.
- [18] Van der Spoell D, van Maaren PJ, Coleman C. GROMACS molecule & liquid database. *Bioinformatics*, 2012, 28(5): 752–753.
- [19] Zhang SB, Wu ZL. Identification of amino acid residues responsible for increased thermostability of feruloyl esterase A from *Aspergillus niger* using the PoPMuSiC algorithm. *Bioresour Technol*, 2011, 102(2): 2093–2096.
- [20] Lv SY, Fang F, Du GC, et al. Expression and fermentation optimization of urethanase in *Bacillus subtilis*. *Chin J Process Eng*, 2014, 14(5): 846–852(in Chinese). 吕思熠, 方芳, 堵国成, 等. 氨基甲酸酯水解酶在枯草芽孢杆菌中的表达及发酵优化. *过程工程学报*, 2014, 14(5): 846–852.
- [21] Xie Y, An J, Yang GY, et al. Enhanced enzyme kinetic stability by increasing rigidity within the active site. *J Biol Chem*, 2014, 289(11): 7994–8006.
- [22] Kellis Jr JT, Nyberg K, Sali D, et al. Contribution of hydrophobic interactions to protein stability. *Nature*, 1988, 333(6175): 784–786.

(本文责编 陈宏宇)