

• 食品生物技术 •

定点突变提高解淀粉芽孢杆菌 JP-21 脲酶应用特性

贾云耀^{1,2}, 方芳^{1,2}

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 江南大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122

贾云耀, 方芳. 定点突变提高解淀粉芽孢杆菌 JP-21 脲酶应用特性. 生物工程学报, 2020, 36(8): 1640–1649.

Jia YY, Fang F. Improving applicability of urease from *Bacillus amyloliquefaciens* JP-21 by site-directed mutagenesis. Chin J Biotech, 2020, 36(8): 1640–1649.

摘要: 氨基甲酸乙酯 (Ethyl carbamate, EC) 是一种存在于发酵食品和酒精饮料中的可致癌物, 过量摄入可能会影响人体健康。酶法降解是减少发酵食品中氨基甲酸乙酯及其前体尿素含量的有效方法之一。脲酶具有氨基甲酸乙酯水解酶和尿素酶两种活性, 因此在减少发酵食品中氨基甲酸乙酯及其前体尿素方面具有良好的应用前景。目前脲酶降解发酵酒精饮料中氨基甲酸乙酯面临的主要问题是脲酶对氨基甲酸乙酯的催化活性及亲和力较低, 因而其降解效果不理想。文中成功在大肠杆菌 *Escherichia coli* 中表达了来源于解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* JP-21 的脲酶, 表达水平为尿素酶 3 291.74 U/L, 氨基甲酸乙酯水解酶 227.26 U/L。通过模拟脲酶中催化亚基 UreC 与氨基甲酸乙酯对接的结构, 确定了 M326 和 M374 这两个影响酶与底物结合的位点。采用点饱和突变获得了 3 株氨基甲酸乙酯水解酶活性提高的突变体 M374A、M374T 和 M326V, 以 EC 为底物时的 K_m 分别为 101.84 mmol/L、129.49 mmol/L 和 121.67 mmol/L, 比野生型分别降低了 37.47%–50.82%。突变体可以降解黄酒中 97% 的尿素, M374T 对黄酒中 EC 的降解效果最好, 可将黄酒中 EC 从 513.90 $\mu\text{g/L}$ 降至 393.57 $\mu\text{g/L}$, 降解率是野生脲酶的 1.97 倍。研究结果对今后改造脲酶催化特性和改善其应用特性具有重要意义, 可为开发减控发酵食品中的微生物代谢氨 (胺) 类危害物策略提供参考。

关键词: 脲酶, 黄酒, 氨基甲酸乙酯, 尿素, 点饱和突变, 底物亲和力

Improving applicability of urease from *Bacillus amyloliquefaciens* JP-21 by site-directed mutagenesis

Yun Yao Jia^{1,2}, and Fang Fang^{1,2}

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

2 State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Ethyl carbamate (EC) is a carcinogen detected in fermented foods and alcohol beverages. Excessive intake of EC

Received: December 18, 2019; **Accepted:** March 5, 2020

Supported by: National Key Research and Development Program of China (Nos. 2017YFC1600403, 2017YFC1600405).

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

国家重点研发计划 (Nos. 2017YFC1600403, 2017YFC1600405) 资助。

is possibly harmful to health. Enzymatic degradation is one of the most effective approaches for reducing EC in fermented foods. Urease catalyzes the hydrolysis of both EC and urea. This confers urease a good application prospect in reducing EC and its precursor urea in fermented foods. Currently, degradation of EC in alcohol beverages by urease is inefficient due to its low urethanase activity and poor affinity to EC. Urease from *Bacillus amyloliquefaciens* JP-21 was successfully expressed in *Escherichia coli* at the level of 3 292 U/L urease and 227.3 U/L urethanase. Two key residues M326 and M374 were characterized that might block the binding of enzyme to EC, through simulating docking the structure of catalytic subunit UreC of urease with EC. Three mutants (M374A, M374T and M326V) of urease with improved urethanase activity were obtained by performing point saturated mutagenesis approach. Using EC as the substrate, K_m values of M374A, M374T and M326V were detected to be 101.8 mmol/L, 129.5 mmol/L and 121.7 mmol/L, respectively, which were decreased by 37.47%–50.82% compared with that of the wild type urease. These mutants can degrade more than 97% of urea in rice wine and mutant M374T shows the highest degradation of EC in rice wine. EC content in rice wine was reduced from 525 $\mu\text{g/L}$ to 393 $\mu\text{g/L}$ by using M374T, and the EC degradation rate of it is 0.97 folds higher than that of the wild type urease. The results are of great significance for engineering the catalytic properties of urease and improving its industrial properties, and lays a good foundation for developing strategies to reducing microbial metabolic ammonia (amine) hazards in fermented foods.

Keywords: urease, rice wine, ethyl carbamate, urea, point saturation mutation, substrate affinity

氨基甲酸乙酯 (Ethyl carbamate, EC) 是一种在传统发酵食品中检测出的氨类危害物^[1-3]。2007年EC被国际癌症研究机构(IARC)正式归类为2A类致癌物质,即对人类很可能有致癌性^[4]。在酒精饮料中,EC主要由尿素和乙醇反应生成。因此消除酒精饮料中EC的思路分为降低EC前体物质尿素的含量和直接降低EC的含量^[5]。脲酶(EC 3.5.1.5)具有尿素酶和氨基甲酸乙酯水解酶两种酶的活性,利用脲酶同时降解EC及其前体尿素被认为是最有希望彻底消除酒精饮料中EC的方法^[5-7]。目前,来源于发酵乳杆菌 *Lactobacillus fermentum* 和运动节杆菌 *Arthrobacter mobilis* 的脲酶已应用于降解酒精饮料中的尿素。发酵乳杆菌 *L. fermentum* 的脲酶在 15 °C 条件下反应 2 d (或在 30 °C 条件下反应 15 h), 可使清酒 (pH 4.4, 17%±1% (V/V) 乙醇) 中的尿素降至 1 $\mu\text{g/L}$ 以下^[8]。运动节杆菌 *A. mobilis* 的脲酶(90 U/L), 在 15 °C 条件下反应 13 d 可彻底消除日本清酒中的尿素^[9]。罗伊氏乳杆菌 *Lacobacillus reuteri* 100-23 脲酶 (500 U/L), 可在 20 °C 条件下反应 2 h 后消除黄酒模拟体系 (pH 4.8, 16% (V/V) 乙醇, 48 mg/L 尿素, 106 $\mu\text{g/L}$ EC) 中的尿素, 但是对 EC 没有明显的降解效果。向黄酒中添加 6 000 U/L 的副地衣芽孢杆菌 *Bacillus*

paralicheniformis 脲酶, 可在 37 °C 下、50 h 内高效降解尿素, 但是对 EC 并无明显降解效果。副地衣芽孢杆菌脲酶突变体 (10 000 U/L) 于 20 °C 反应 50 h 可使黄酒中 EC 从 500 $\mu\text{g/L}$ 降至 320 $\mu\text{g/L}$ ^[10-11]。

本研究以一株可降解白酒酒醅中尿素和 EC 的解淀粉芽孢杆菌 *B. amyloliquefaciens* JP-21 脲酶为研究对象, 通过模拟脲酶与 EC 分子空间对接寻找与酶催化活性相关的突变位点, 以期获得对 EC 催化能力提高的突变体, 为促进酶法高效降解发酵食品饮料中的 EC 及其前体提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

本研究所用细菌菌株及质粒均为本实验室保藏 (表 1)。

1.2 试剂及仪器

试剂: D5-氨基甲酸乙酯、9-羟基占吨购于西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司; 异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG)、质粒提取试剂盒、购于生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 细菌基因组提取试剂盒购自天根生化 (北京) 有限公司; 胶回收试剂盒购于美国 Thermo Scientific 公司; 尿素购自上海麦克林生化科技有限公司; 氨基甲酸乙酯

购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司；DNA 聚合酶、无缝克隆试剂盒购自诺唯赞生物科技有限公司；其他药品均购于国药集团化学试剂有限公司。

仪器：氮吹仪、酶标仪购自美国 Thermo Fisher 公司；GC/MS-QP2010 购自日本岛津公司；安捷伦 1260 高效液相色谱 (HPLC) 购自美国安捷伦公司。

1.3 脲酶的克隆表达与纯化

1.3.1 表达脲酶重组菌的构建

本研究所用引物如表 2 所示。以解淀粉芽孢杆菌 JP-21 的基因组为模板，用引物 UreABC-F/UreABC-R 扩增脲酶基因。以质粒 pRSF-Duet-1 为模板，用引物 P1-F/P1-R 利用 PCR 进行质粒线

性化，PCR 产物经胶回收后用限制性核酸内切酶 *Dpn* I 消化模板。基因片段和线性化质粒经胶回收后利用无缝克隆试剂盒进行连接，并转化至 *E. coli* JM109，获得质粒 pRSF-Duet-UreABC。为强化催化亚基 *ureC* 的表达，将 *ureC* 置于 *ureA* 和 *ureB* 的上游进行表达^[12]。具体操作为：以质粒 pRSF-Duet-UreABC 为模板，用引物 UreC-F/UreC-R、UreAB-F/UreAB-F 分别进行扩增，胶回收后用无缝克隆试剂盒将这两个片段与线性化质粒 pRSF-Duet-1 进行连接，并转化至 *E. coli* JM109。提取含有正确序列转化子的重组质粒，转化至 *E. coli* BL21(DE3)，构建的表达脲酶的重组菌命名为 *E. coli* BL21-p-UreCAB。

表 1 本研究所用质粒和菌株

Table 1 Plasmids and strains used in this study

Name	Description	Source
Plasmids		
pRSF-Duet-1	Expression vector, <i>kan^R</i> , T7 promotor	Lab stock
pRSF-Duet-UreABC	pRSF-Duet-1 containing UreABC	This work
pRSF-Duet-UreCAB	pRSF-Duet-1 containing UreCAB	This work
Strains		
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Expression host	Lab stock
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> JP-21	Strain with capability of degrading urea and EC	[13]
<i>E. coli</i> BL21-p-UreCAB	<i>E. coli</i> harboring pRSF-Duet-UreCAB	This work

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this work

Primer name	Primer sequence (5'-3')
P1-F	TTAACCTAGGCTGCTGCCAC
P1-R	GGTATATCTCCTTATTAAAGTTAAACAAAATTA
UreABC-F	<u>CTTTAATAAGGAGATATACC</u> ATGAACTGACACCGGTTGAACA
UreABC-R	<u>GTGGCAGCAGCCTAGGTTAA</u> TAAAAATAAGAAATAACGCTGTCCTAGC
UreC-F	<u>CTTTAATAAGGAGATATACC</u> ATGCACCACCACCACCACAAAATGTCGCGTGAGCAA
UreC-R	<u>CAACCGGTGTCAGTTTCAT</u> TAAAAATAAGAAATAACGCTGTCCTAGC
UreAB-F	<u>A</u> ATGAACTGACACCGGTTGAACA
UreAB-F	<u>GTGGCAGCAGCCTAGGTTAA</u> TCATCGGATCGCCTCCTCC
M326-F	TGATATGNNKATGGTCTGCCATC
M326-R	ACCATMNNCATATCAAGATGCTCG
M374-F	GCAGGCGNNKGGCAG
M374-R	CTGCCMNNCGCCTGC

Homologous sequences used for one-step seamless cloning were underlined. Codons used for mutation were indicated in bold.

1.3.2 重组脲酶的表达与纯化

用于表达脲酶的重组大肠杆菌在 LB 培养基 (含 50 mg/L 卡那霉素), 37 °C、220 r/min 条件下过夜培养, 然后按 1% (V/V) 的接种量转接至 TB 培养基 (含 50 mg/L 卡那霉素), 37 °C、220 r/min 培养至 OD_{600} 为 0.6–0.8, 加入 6 mmol/L 的 Ni_2SO_4 和 0.1 mmol/L IPTG, 在 30 °C、220 r/min 的条件下继续培养 15 h。所获菌液于 4 °C、8 000 r/min 条件下离心 5 min 收集菌体, 用 20 mmol/L PBS 缓冲液 (pH 7.4) 洗涤 2 次后, 重悬于结合缓冲液 (20 mmol/L pH 7.4 PBS 缓冲液、0.5 mol/L NaCl), 冰水浴超声破碎后于 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液即为脲酶粗酶液。重组脲酶采用镍柱亲和层析进行纯化, 用洗脱缓冲液 (20 mmol/L pH 7.4 PBS、0.5 mol/L NaCl、0.5 mol/L 咪唑) 进行梯度洗脱, 收集有活性的组分进行透析脱盐用于后续分析和研究。

1.4 脲酶活力测定

采用 Berthelot 比色法测定脲酶活力^[14]: 脲酶可以降解尿素或 EC 生成氨, 氨与苯酚-次氯酸钠反应形成靛酚蓝, 通过检测该显色反应 OD_{625} 的变化来表征酶活。

具体操作为: 取经稀释的酶液 200 μ L, 添加到 200 μ L 含有 30 g/L 尿素或 EC 的 50 mmol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (pH 6.0) 中, 混匀后在 37 °C 条件下反应 15 min, 立即加入 200 μ L 终止剂 (10% 三氯乙酸), 振荡混匀后, 再依次加入 200 μ L 显色剂 I 和 200 μ L 显色剂 II。再次混匀后, 于 37 °C 继续反应 20 min。反应液经过稀释后, 测定其 OD_{625} 的变化, 以灭活的酶液作为空白对照。利用 0、0.1、0.2、0.3、0.4 mmol/L NH_4Cl 溶液作为铵离子标准曲线, 根据氯化铵标准曲线即可计算反应体系生成铵的总量, 以此来计算酶活。

酶活单位定义: 在常压、37 °C 及 pH 6.0 的条件下, 每分钟分解 1 μ mol EC 或尿素所需要的酶量

为一个酶活力单位。

1.5 同源建模及蛋白结构分析方法

脲酶的 UreC 亚基为催化亚基, 包含了脲酶的催化活性口袋及底物结合口袋^[15-16], 通过氨基酸序列比对, 选择巴氏芽孢杆菌 *Bacillus pasteurii* 脲酶 UreC 的晶体结构 (PDB ID:2UBPc) 为模板, 利用 Swiss Model 数据库对解淀粉芽孢杆菌 *B. amyloliquefaciens* JP-21 UreC 进行 3D 结构模拟^[17]。利用 Discovery Studio 2017 (Accelrys, San Diego, CA, USA) 软件对 UreC 与底物 EC 进行分子对接, 并用 Pymol 2.1 软件 (<https://pymol.org/2/>) 对蛋白质结构进行分析。

1.6 单点饱和突变库的构建及突变库筛选方法

采用重叠延伸的方法构建单点饱和突变文库, 在建库过程中, 通过引入简并密码子 NNK (N: A、T、G、C; K: G、C) 的方式在突变位点引入随机突变。简并密码子 NNK 可以代表 32 种密码子, 编码 20 种氨基酸, 因而可以保证构建突变体文库的覆盖性。以质粒 pRSF-Duet-UreCAB 为模板, 用表 2 中的引物 M326-F/M326R、M374-F/M374-R 分别进行 PCR, 获得环形的 PCR 产物, 经限制性核酸内切酶 *Dpn* I 消化模板质粒及胶回收后, 转化 *E. coli* BL21(DE3)。

将含有突变体的转化子分别在 96 孔板和摇瓶中培养, 通过比较 EC 酶活性进行初筛和复筛, 挑选 EC 酶酶活高的突变体进行测序。

1.7 脲酶突变体酶学性质研究

1.7.1 脲酶温度稳定性测定

将脲酶纯酶 (1 000–1 200 U/L) 置于不同温度下 (30 °C、40 °C、50 °C、60 °C、70 °C) 保温 30 min 后测定酶活。以未经保温处理的酶活为 100%, 计算不同温度下的相对酶活。

1.7.2 脲酶最适 pH 及 pH 稳定性测定

测定最适 pH 时, 使用 50 mmol/L、pH 3.0–7.0 的柠檬酸- Na_2HPO_4 缓冲液配制底物溶液, 在不同 pH 条件下测定酶活, 以测得的最高酶活为 100%,

分别计算其他 pH 条件下酶活的相对值。

测定 pH 稳定性时, 将脲酶纯酶置于 pH 3.0–7.0 的缓冲液中, 4 °C 放置 6 h 后测定其残余酶活力。以测得的最高酶活为 100%, 分别计算其他 pH 条件下酶活的相对值。

1.7.3 脲酶对乙醇的耐受性测定

将脲酶与乙醇 (终浓度为 0–40% (V/V)) 混合, 在 37 °C 条件下放置 2 h 后测定酶活。以不含乙醇的酶液所测酶活力为 100%, 分别计算不同乙醇浓度下的相对酶活。

1.7.4 脲酶酶学动力学参数测定

分别测定不同底物浓度下的催化反应速率, 利用 GraphPad Prism 7 对结果进行非线性回归曲线拟合, 以此计算 K_m 和 V_{max} 。以尿素为底物时的浓度范围为 2–80 mmol/L, 以 EC 为底物时的浓度范围为 100–1 800 mmol/L。

1.7.5 脲酶半衰期测定

脲酶半衰期的测定利用 Arrhenius 方程的原理进行测定和计算^[18]。将稀释的脲酶纯酶在 70 °C 条件下保温, 每隔 2 min 取样测定其残余酶活力。取残余酶活力最高的为 100%。记脲酶残余酶活力的百分比为 A_r , 通过绘制保温时间与 $\ln A_r$ 的线性拟合, 所得直线斜率的相反数为 K_d , 即热失活速率常数。脲酶半衰期 ($t_{1/2}$) 的计算公式为 $t_{1/2} = \ln 2 / K_d$ 。

1.7.6 脲酶降解黄酒中尿素及 EC

为考察解淀粉芽孢杆菌 JP-21 脲酶对黄酒中 EC 和尿素的降解并比较其他脲酶的降解效果^[10], 将市售黄酒中尿素和 EC 含量分别调整至 51.90 mg/L 和 513.25 $\mu\text{g/L}$ (经测定, 所购市售黄酒含 35.27 mg/L 尿素, 320.43 $\mu\text{g/L}$ EC)。向此黄酒中添加终浓度为 6 000 U/L 的脲酶, 37 °C 下反应 50 h, 取样测定样品中尿素及 EC 的含量。

尿素测定采用二乙酰单氧化反应法用高效液相色谱进行测定^[19], EC 的测定采用固相微萃取结合 GC-MS 的方法^[20–22]。

尿素与乙醇可自发反应生成 EC, 因此黄酒存放一段时间后 EC 含量会逐渐增加。为考察脲酶对

黄酒中 EC 的全面减控效果, 采用加热黄酒的方法 (90 °C 保温 30 min) 加速 EC 生成过程, 并评估脲酶对 EC 的减控效果^[23]。

1.7.7 统计分析方法

运用 SPSS 19.0 软件对野生脲酶及脲酶突变体降解黄酒中 EC 含量的结果进行显著性差异分析。

2 结果与分析

2.1 酶催化中心氨基酸位点分析

解淀粉芽孢杆菌 JP-21 脲酶为脱辅基脲酶, 由 *ureA*、*ureB* 和 *ureC* 三个基因编码, 具有尿素酶和 EC 酶两种活性。但是其对 EC 的亲合力较差, 因此需要改造以提高它对 EC 的亲合力。据报道, 位于活性位点周围的甲硫氨酸易被氧化, 会使支链变大^[24], 从而影响酶活性位点空间, 阻碍酶与底物的完美结合, 使得酶活力降低甚至失活^[25]。而脲酶催化亚基 UreC 活性中心的 Ni^{2+} 作为路易斯酸, 具有氧化剂的作用^[26]。为减小甲硫氨酸被氧化引起的空间位阻效应, 选择在脲酶活性中心周围寻找甲硫氨酸进行突变。脲酶催化亚基 UreC 模拟结构与底物 EC 对接的结果展示了其活性中心附近氨基酸残基的分布状况, 距离 EC 分子 2.541 Å 的 M326 及距离 EC 分子 3.776 Å 的 M374 这两个甲硫氨酸是最靠近脲酶活性中心的, 易受 Ni^{2+} 氧化性的影响, 于是选择这两个甲硫氨酸作为改造位点 (图 1)。

2.2 点饱和和突变库的构建及筛选

为了提高解淀粉芽孢杆菌 JP-21 脲酶对 EC 的催化效率, 根据酶催化中心氨基酸位点分析, 选择了 M326 和 M374 两个位点进行点饱和突变。通过初筛和复筛, 获得了 EC 酶活性提高的正向突变体 M326V、M374A 及 M374T, EC 酶活性分别为 378.28 U/L (比酶活 2.71 U/mg, 蛋白量 139.59 mg/L)、328.19 U/L (比酶活 2.60 U/mg, 蛋白量 126.23 mg/L)、508.71 U/L (比酶活 3.38 U/mg, 蛋白量 150.51 mg/L), 分别是野生脲酶的 1.67、1.14、2.23 倍 (图 2)。

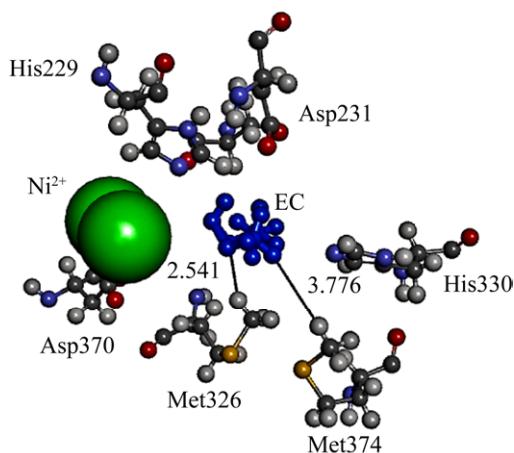


图1 脲酶 α 亚基活性中心氨基酸分布示意图
Fig. 1 Schematic diagram of amino acid distribution of UreC active center.

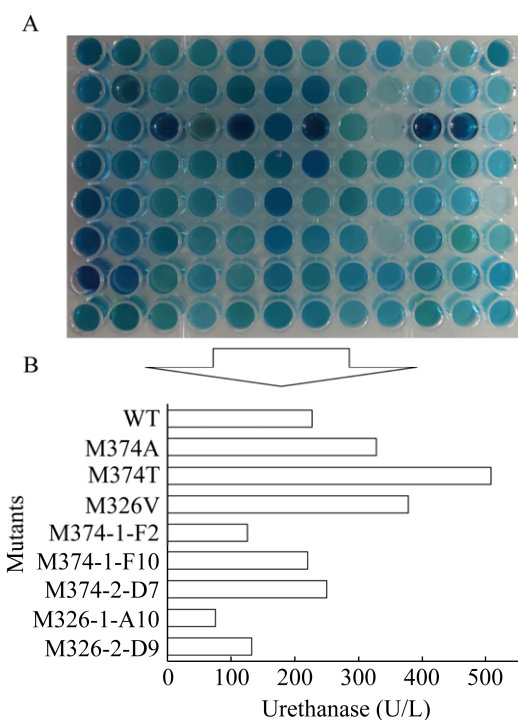


图2 氨基甲酸酯水解酶活性提高的脲酶突变体筛选 (A: 以 EC 为底物进行 96 孔板筛选; B: 脲酶突变体摇瓶发酵水平的 EC 酶活力, 其中 M374-1-F2 至 M326-2-D9 为突变体编号)

Fig. 2 Screening of urease mutants with increased urethanase activity. (A) 96-well plate screening with EC as substrate. (B) Urethanase activity of urease mutants in shake flask fermentation levels, where M374-1-F2 to M326-2-D9 represent urease mutants. EC: Docking with EC as substrate.

2.3 脲酶突变体的分离纯化

通过 6×His 标签介导的亲和层析,对 WT 和上述 3 个正向脲酶突变体 M326V、M374A 和 M374T 进行了纯化,获得了较纯的 *B. amyloliquefaciens* JP-21 脲酶纯酶,由 UreA、UreB 和 UreC 三个亚基组成 (图 3)。

2.4 脲酶突变体酶学性质分析

2.4.1 脲酶突变体的热稳定性

通过对脲酶热稳定性的研究,发现野生脲酶和脲酶突变体在低于 50 °C 的条件下均保持了近 100% 的酶活。M326V 在 70 °C 条件下,尿素酶和 EC 酶热稳定性明显高于野生脲酶和其他两个突变体,比野生脲酶的相对酶活分别提高了 9.34% 和 7.12% (图 4)。

2.4.2 突变体最适 pH 及 pH 稳定性

发酵食品一般为酸性体系,如黄酒的 pH 为 3.8–4.9^[27]。研究脲酶最适 pH 及 pH 稳定性对于评价脲酶在黄酒中的应用至关重要。由图 5 可知,野生脲酶和脲酶突变体的最适 pH 均为 6.0。虽然最适反应 pH 没有改变,但 M374A 和野生脲酶及其他突变体相比,具有更宽的 pH 稳定性范围,尤其是在 pH 3.0–5.5 时,M374A 的尿素酶和 EC 酶活性分别比野生脲酶高 30% 和 20%。此外,野生

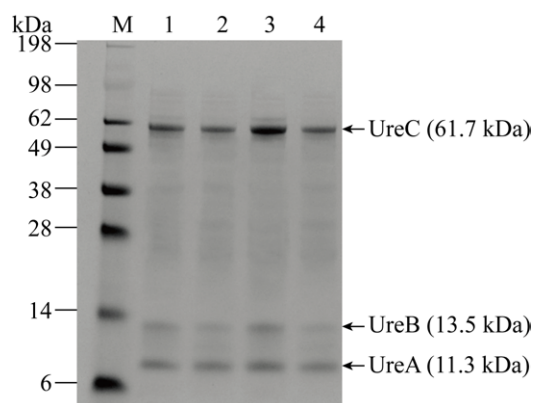


图3 脲酶及其突变体的表达与纯化

Fig. 3 Expression and purification of urease and its mutants. M: standard protein marker; 1–4: purified wild type urease and its mutants M374A, M374T, M326V.

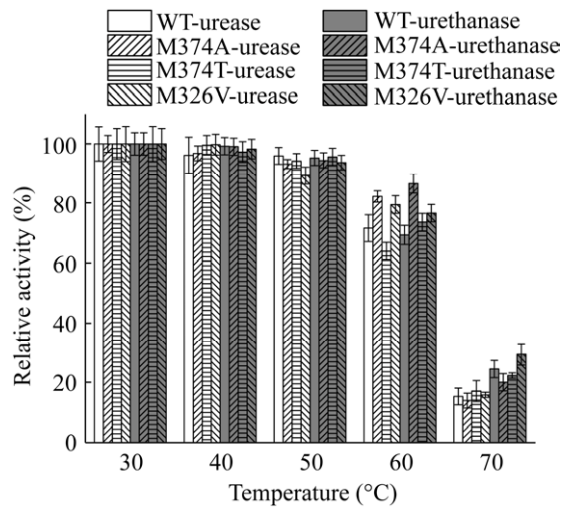


图4 脲酶及其突变体的温度稳定性

Fig. 4 Thermostability of urease and its mutants.

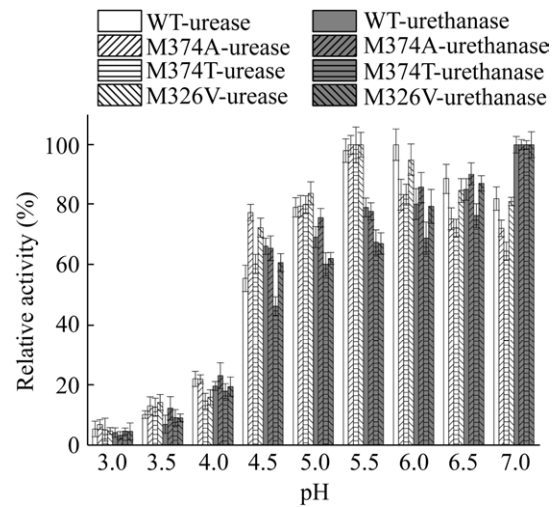


图6 脲酶及其突变体的 pH 稳定性

Fig. 6 pH stability of urease and its mutants.

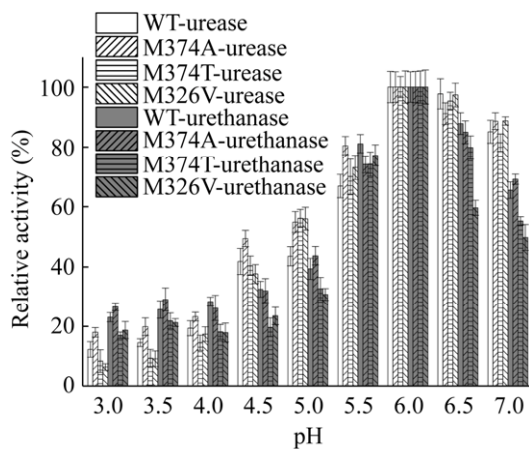


图5 脲酶及其突变体的最适反应 pH

Fig. 5 Detection of the optimum reaction pH of urease and its mutants.

脲酶在 pH 6.0 时稳定性最好，而突变体在 pH 5.5 时稳定性最佳，并且在 pH 4.5 时，M374A 的脲酶相对酶活相比野生脲酶提高了 39% (图 6)。

2.4.3 脲酶突变体对乙醇的耐受性

黄酒的酒精度为 14%–20%^[28]，探究脲酶在不同酒精浓度下的耐受性可以更好地表征其实际应用性能。由图 7 可以看出，来源于 JP-21 的脲酶及其突变体在 20% 乙醇条件下保存 2 h，其尿素酶和 EC 酶活力仍有 60% 和 50% 以上。这说明，此

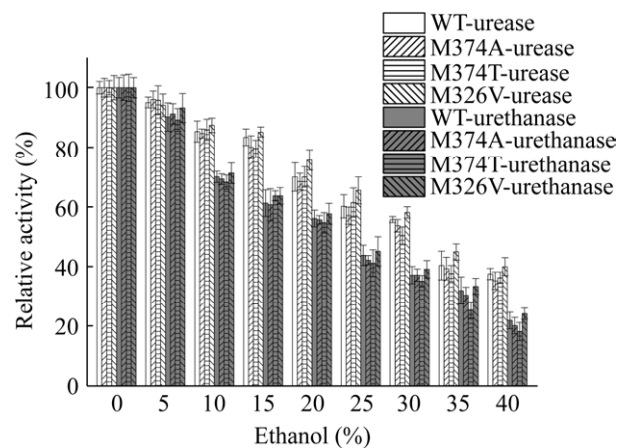


图7 脲酶及其突变体对乙醇的耐受性

Fig. 7 Tolerance of urease and its mutants to ethanol.

酶对的乙醇耐受性较好，具有降解酒精饮料中 EC 及尿素的潜力。

2.4.4 脲酶突变体的半衰期

为进一步比较脲酶及其突变体的稳定性，分析并比较了它们的半衰期。结果表明，野生脲酶和 M374 位点突变体的半衰期没有显著差异，而突变体 M326V 的尿素酶和 EC 酶半衰期与野生脲酶相比略有延长，分别是野生脲酶的 1.10 倍和 1.15 倍 (表 3)。

表 3 脲酶及其突变体在 70 °C 的半衰期
Table 3 The half-life of urease and its mutants at 70 °C

Name	Urease		Urethanase	
	K_d	$t_{1/2}$ (min)	K_d	$t_{1/2}$ (min)
WT	0.086 9	7.97	0.142 0	4.88
M374A	0.086 1	8.05	0.139 1	4.98
M374T	0.087 0	7.96	0.154 3	4.49
M326V	0.079 3	8.74	0.122 6	5.65

2.4.5 脲酶突变体酶学动力学参数分析

为比较脲酶及其突变体的催化特性,测定了它们的酶反应动力学参数。由表 4 可以看出,突变体 M374A、M374T 和 M326V 以 EC 为底物的 K_m 比野生脲酶分别降低了 50.82%、37.47% 和 41.24%, 酶的比活力分别是野生脲酶的 1.03 倍、1.09 倍和 1.05 倍。这说明,通过改造由模拟结构确定的影响酶与底物结合的关键位点 M374 和 M326, 显著提高了解淀粉芽孢杆菌 JP-21 脲酶对

EC 的亲合力。M374A 对尿素和 EC 的 K_m 分别降低到 3.05 mmol/L 和 101.84 mmol/L, 显著低于来源于副地衣芽孢杆菌 *B. paralicheniformis* 的脲酶(尿素酶 K_m 为 23.7 mmol/L, EC 酶 K_m 为 1 018 mmol/L)。突变体对尿素的 K_m 基本没有发生变化, M374A、M374T 和 M326V 三个突变体酶的比活力分别是野生型的 1.15 倍、1.29 倍和 1.19 倍。本研究是以 EC 作为底物分子与脲酶催化亚基 UreC 进行分子对接来选择突变位点的。由于 EC 与尿素在结构和分子大小上存在差异,改造策略对 EC K_m 的提高优于对尿素 K_m 的提高。

2.4.6 脲酶降解黄酒中尿素及 EC

为了考察脲酶突变体的应用性能是否得到了提高,考察了脲酶对黄酒中尿素和 EC 的降解能力。结果显示,添加脲酶反应 50 h 后,黄酒中的尿素基本被完全降解,尿素含量为 1.6–2.5 mg/L, 去除率大于 97% (图 8A)。在野生脲酶作用下,黄

表 4 脲酶及其突变体的酶学动力学参数
Table 4 Kinetic parameters of the wild-type urease and its mutants

Name	Urease			Urethanase		
	K_m (mmol/L)	V_{max} (U/L)	Activity (U/mg)	K_m (mmol/L)	V_{max} (U/L)	Activity (U/mg)
WT	3.41±0.27	880.71±10.28	35.63±1.25	207.07±5.27	596.81±54.31	17.71±1.57
M374A	3.05±0.36	574.23±7.21	39.22±2.18	101.84±10.53	337.84±10.43	18.26±1.29
M374T	3.83±0.18	847.17±9.77	39.35±1.79	129.49±8.73	499.23±8.47	19.27±1.84
M326V	3.30±0.17	732.52±9.54	38.54±2.51	121.67±5.24	454.47±10.37	18.66±1.73

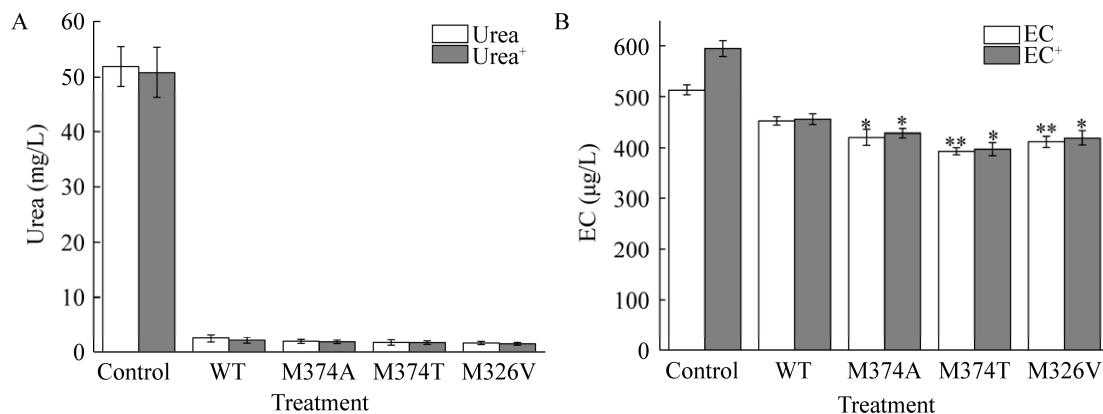


图 8 脲酶降解黄酒中尿素和氨基甲酸乙酯

Fig. 8 Reduction of urea and EC in rice wine by urease. Urea⁺ and EC⁺: urea and EC detected in rice wine after heat treatment; * and ** represent significant differences ($P<0.05$) and extremely significant ($P<0.01$) differences.

酒中的 EC 由 513.90 $\mu\text{g/L}$ 降到了 452.21 $\mu\text{g/L}$, 降解率达 12.00%。脲酶突变体 M374A、M374T、M326V 可将黄酒中的 EC 分别降至 420.68 $\mu\text{g/L}$ 、393.57 $\mu\text{g/L}$ 、412.11 $\mu\text{g/L}$, 降解率分别是野生脲酶的 1.52 倍、1.97 倍和 1.66 倍。此外, 经酶处理的酒加热后, 对照中的 EC 由 513.90 $\mu\text{g/L}$ 增至 595.07 $\mu\text{g/L}$, 而经脲酶及其突变体 M374A、M374T、M326V 处理过的黄酒中的 EC 分别为 428.68 $\mu\text{g/L}$ 、397.77 $\mu\text{g/L}$ 、419.62 $\mu\text{g/L}$, 含量基本没有增加 (图 8B)。说明通过具有双酶活性 (脲酶和 EC 酶) 的脲酶处理, 基本消除了尿素并显著减少了 EC。这对于减少黄酒的贮存过程中 EC 含量的增加具有重要意义。

3 总结与讨论

利用酶法降解 EC 及其前体尿素被认为是最有希望彻底消除酒精饮料中 EC 的方法^[5-7]。目前脲酶的工业化应用还存在 EC 酶活力差、对 EC 亲和力低等问题。本研究通过在线数据库查找和对比, 模拟了解淀粉芽孢杆菌 *B. amyloliquefaciens* JP-21 催化亚基 UreC 的 3D 结构, 通过模拟 UreC 与底物 EC 分子对接的结构, 确定了影响酶与底物结合的两个关键位点 M326 和 M374。通过对这两个位点进行突变, 成功获得 3 株 EC 酶活性提高的突变体 M374A、M374T 和 M326V。它们在 pH 稳定性、对 EC 的亲和力、对黄酒中的 EC 降解率等方面的特性均有不同程度提升。突变体 M374A 具有更宽的 pH 稳定性范围, 在 pH 3.0-5.5 时, M374A 的脲酶和 EC 酶活性分别比野生脲酶高 30% 和 20%, 在 pH 4.5 时的脲酶相对酶活比野生脲酶提高了 39%。以 EC 为底物时, 脲酶突变体 M374A、M374T 和 M326V 的 K_m 分别为 101.84 mmol/L、129.49 mmol/L 和 121.67 mmol/L, 比野生脲酶分别降低了 50.82%、37.47% 和 41.24%。来源于解淀粉芽孢杆菌 *B. amyloliquefaciens* JP-21 的脲酶及其突变体可基本消除黄酒中的尿素。脲

酶突变体 M374A、M374T、M326V 对黄酒中 EC 的降解率比野生型有显著提高, 分别是野生型的 1.52 倍、1.97 倍和 1.66 倍。降解效果最好的脲酶突变体 M374T 可以将黄酒中的 EC 从 513.90 $\mu\text{g/L}$ 降至 393.90 $\mu\text{g/L}$, 并显著减少黄酒加热后 EC 的生成。本研究结果对今后改造脲酶催化特性和改善其应用特性具有重要意义, 可为开发减控发酵食品中的微生物代谢氨 (胺) 类危害物策略提供参考。

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. *Environ Chem Lett*, 2009, 7(3): 233-247.
- [4] Lachenmeier DW. Consequences of IARC re-evaluation of alcoholic beverage consumption and ethyl carbamate on food control. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau: Zeitschrift für Lebensmittelkunde und Lebensmittelrecht*, 2007, 103(7): 307-311.
- [5] Zhao XR, Du GC, Zou HJ, et al. Progress in preventing the accumulation of ethyl carbamate in alcoholic beverages. *Trends Food Sci Technol*, 2013, 32(2): 97-107.
- [6] Fidaleo M, Esti M, Moresi M. Assessment of urea degradation rate in model wine solutions by acid urease from *Lactobacillus fermentum*. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(17): 6226-6235.
- [7] Yang YQ, Kang Z, Zhou JL, et al. High-level expression and characterization of recombinant acid urease for enzymatic degradation of urea in rice wine. *Appl Microbiol Biot*, 2015, 99(1): 301-308.
- [8] Kakimoto S, Sumino Y, Kawahara K, et al. Purification and characterization of acid urease from *Lactobacillus fermentum*. *Appl Microbiol Biot*, 1990, 32(5): 538-543.

- [9] Miyagawa K, Sumida M, Nakao M, et al. Purification, characterization, and application of an acid urease from *Arthrobacter mobilis*. *J Biotechnol*, 1999, 68(2/3): 227–236.
- [10] Liu QT, Chen YQ, Yuan ML, et al. A *Bacillus paralicheniformis* iron-containing urease reduces urea concentrations in rice wine. *Appl Environ Microbiol*, 2017, 83(17): 01258–17, 1–11.
- [11] Liu QT, Yao XH, Liang QX, et al. Molecular engineering of *Bacillus paralicheniformis* acid urease to degrade urea and ethyl carbamate in model Chinese rice wine. *J Agr Food Chem*, 2018, 66(49): 13011–13019.
- [12] Liu QT, Jin XR, Fang F, et al. Food-grade expression of an iron-containing acid urease in *Bacillus subtilis*. *J Biotechnol*, 2019, 293: 66–71.
- [13] Ding X, Li QY, Liu F, et al. Isolation of microbial strains for degradation of ethyl carbamate in Luzhou-flavour Baijiu and characterization of corresponding enzymes. *Food Ferment Ind*, 2018, 44(7): 29–36 (in Chinese).
丁霞, 李巧玉, 刘凡, 等. 降解浓香型白酒中氨基甲酸乙酯菌株的筛选及产酶特性研究. *食品与发酵工业*, 2018, 44(7): 29–36.
- [14] Weatherburn MW. Phenol-Hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal Chem*, 1967, 39(8): 971–974.
- [15] Carter EL, Flugge N, Boer JL, et al. Interplay of metal ions and urease. *Metallomics*, 2009, 1(3): 207–221.
- [16] Kappaun Karine K, Piovesan Angela RP, Carlini Celia RC, et al. Ureases: Historical aspects, catalytic, and non-catalytic properties — A review. *J Adv Res.*, 2018, 13: 3–17S1141461269.
- [17] Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(Web Server issue): 296–303.
- [18] Malikkides CO, Weiland RH. On the thermal denaturation of glucose oxidase. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 24(8): 1911–1914.
- [19] Clark Shona C, Francis PS, Conlan XA, et al. Determination of urea using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection after automated derivatisation with xanthidol. *J Chromatogr A*, 2007, 1161(1/2): 207–213.
- [20] Xia Q, Yuan H, Wu C, et al. An improved and validated sample cleanup method for analysis of ethyl carbamate in chinese liquor. *J Food Sci*, 2014, 79(9): 1854–1860.
- [21] Zhong QD, Yao L, Xiong ZH. Determination of EC content in rice wine by GC/MS and HPLC-FLD. *Food Ferment Ind*, 2007, 33(3): 115–119 (in Chinese).
钟其顶, 姚亮, 熊正河. 采用 GC/MS 和 HPLC-FLD 2 种方法测定黄酒中的 EC 含量. *食品与发酵工业*, 2007, 33(3): 115–119.
- [22] Battaglia R, Conacher HBS, Page BD. Ethyl carbamate (urethane) in alcoholic beverages and foods: A review. *Food Additives & Contaminants*, 1990, 7(4): 477–496.
- [23] Gu GX. *Brewing Technology*. 2nd ed. Beijing: China Light Industry Press, 1996: 506–508 (in Chinese).
顾国贤. *酿造酒工艺学*. 2 版. 北京: 中国轻工业出版社, 1996: 506–508.
- [24] Vogt W. Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal. *Free Radical Biology & Medicine*, 1995, 18(1): 93–105.
- [25] Khemakhem B, Ali MB, Aghajari N, et al. Engineering of the α -amylase from *Geobacillus stearothermophilus* US100 for detergent incorporation. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2009, 102(2): 380–389.
- [26] Maroney MJ, Ciurli S. Nonredox nickel enzymes. *Chem Rev*, 2014, 114(8): 4206–4228.
- [27] Yu GS. Probe into pH range of rice wine and prevention and control of exceeding standards. *Food Ferment Ind*, 2002, 28(1): 76–78 (in Chinese).
俞关松. 黄酒 pH 值指标范围的探讨及超标的预防控制. *食品与发酵工业*, 2002, 28(1): 76–78.
- [28] Li Y. Discussion on rice wine acidity and its related indexes. *China Brew*, 2009, 28(6): 179–181 (in Chinese).
李颖. 黄酒酸度与其他指标的相关性探讨. *中国酿造*, 2009, 28(6): 179–181.

(本文责编 郝丽芳)