

文章编号:1673-1689(2008)06-0093-05

酒用酸性脲酶的纯化及其 N 端序列的测定

杨鲁强, 王松华, 田亚平*, 徐岩, 赵光鳌

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 采用乙醇分级沉淀、Superdex200 凝胶过滤、Mono Q 离子交换对 *Enterobactria sp.* R-SYB082 产酒用酸性脲酶进行了纯化。SDS-PAGE 电泳结果表明, 该酶已达到电泳纯, 纯化倍数为 21.1, 酶活回收 42%。Superdex200 凝胶过滤测定其全酶相对分子质量约为 430 000, SDS-PAGE 电泳测定其亚基相对分子质量约为 72 000, 表明该酶为同源六聚体, 并利用 Edman 降解法测定了蛋白质 N 端序列的 8 个氨基酸残基序列: S-F-K-M-D-R-K-Q。酶反应的最适 pH 为 4.5, 最适温度为 35 ℃。以尿素为底物时, 该酶表现 K_m 及 V_{max} 分别为 19.5 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.87 $\mu\text{mol/min}$ 。 Na^+ 、 Mn^{2+} 对酶活有一定的激活作用, Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 对酶活有一定的抑制作用, 酒石酸、琥珀酸对酶活有一定的激活作用, 草酸、乙酸对酶活有一定的抑制作用。

关键词: 酸性脲酶; 尿素; 肠杆菌属细菌; 纯化; N 端序列

中图分类号: Q 814.1

文献标识码: A

Purification and N-terminal Analysis of An Acid Urease

YANG Lu-qiang, WANG Song-hua, TIAN Ya-ping*, XU Yan, ZHAO Guang-ao
(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi, 214122, China)

Abstract: An acid urease from *Enterobactria sp.* R-SYB082 was purified to electrophoretic homogeneity by three successive steps including ethanol precipitation, superdex 200 and Mono Q, with a yield and purification-fold of 42% and 21.1, respectively. The molecular weight of the enzyme was estimated to be 430 000 by gel filtration and 72 000 by SDS-PAGE, suggesting that it's a hexamer comprising of six identical subunits. Automated Edman degradation showed that the N-terminal sequence of acid urease was S-F-K-M-D-R-K-Q. The purified enzyme was optimally active at 35 ℃ and at pH 4.5. The apparent K_m and V_{max} values for hydrolyze of urea were 19.5 $\mu\text{mol/L}$ and 0.87 $\mu\text{mol/min}$, respectively. The activity can be activated by Na^+ , Mn^{2+} , tartaric acid and succinic acid but inhibited by Ca^{2+} , Zn^{2+} , oxalic acid and acetic acid.

Key words: acid urease; urea; *Enterobactria sp.*; purification; N-terminal sequence

脲酶(Urea amido hydrolase, EC3.5.1.5)又称
氨基水解酶,可催化尿素水解产生 CO_2 和 NH_3 。与

一般的脲酶相比,酸性脲酶能够耐受酸性环境,并
且在大部分的低乙醇度酒精饮料中仍具有很高的

收稿日期:2007-11-23.

基金项目:国家“十一五”科技支撑计划项目(2007BAK36B02).

作者简介:杨鲁强(1981-),男,山东济宁人,生物化学与分子生物专业硕士研究生。

* 通讯作者:田亚平(1964-),女,安徽淮南人,教授,硕士生导师,工学博士,主要从事生生化分离方面的研究。

Email: yapingtian@hotmail.com

活性,因而可以用来去除酒精饮料中所含有的尿素^[1-2]。在葡萄酒、日本清酒中都添加酸性脲酶来降解酒中含有的尿素^[3]。目前国际葡萄酒组织、欧盟、美国FDA都允许脲酶作为食品添加剂^[4]。1997年江南大学全文海及赵光鳌教授进行过酸性脲酶产生菌的筛选、发酵条件优化及在黄酒中的应用研究,此后本课题组又筛选获得了一株酸性脲酶产生菌 *Enterobacteria* sp. R-SYB082,并对发酵生产条件及粗酶在黄酒中的应用进行了研究^[6]。在此基础上,作者对来自 *Enterobacteria* sp. R-SYB082 的酸性脲酶进行了纯化,分析了其N端氨基酸序列并研究了纯酶的酶学性质以及金属离子和有机酸对酶活的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种 *Enterobacteria* sp. R-SYB082,作者所在试验室筛选。

1.1.2 试剂 相对分子质量测定标准蛋白质、SDS-PAGE电泳标准蛋白质、考马斯亮蓝G250,均购自Sigma公司,其余分析纯试剂均购自国药集团上海化学试剂公司。

1.1.3 仪器 AKTA explor 100 (Amersham Biosciences)、UNICO2100紫外可见分光光度计、Mini Protein3电泳仪和凝胶成像仪(BIORAD公司),ABI PROCISE™ 492cLC蛋白质测序仪(Applied Biosystems)。

1.2 方法

1.2.1 菌体制备 菌种从斜面培养基接种到二级种子液,34℃培养20h,然后接种到一级种子液中,34℃培养20h,种子液接种到发酵培养基中,上罐培养28h后,菌液经6000 r/min离心15 min,收集菌体,经去离子水洗涤一次,缓冲液洗涤一次,离心收集菌体。

1.2.2 粗酶液的制备 每克湿菌体加6倍体积的pH 5.5柠檬酸缓冲液(20 mmol/L),并加入EDTA至终浓度为16 mmol/L,4℃预冷后,用高压均质机在 8.0×10^7 Pa压力下破碎3次。破碎液在4℃下9000 r/min离心15 min,收集上清液,即为粗酶液,置4℃保存备用。

1.2.3 乙醇分级沉淀 向粗酶液中搅拌加入预冷的乙醇至终体积分数为10%,15000 r/min冷冻离心10 min,收集上清液。上清液继续搅拌加入预冷乙醇至终体积分数为40%,15000 r/min冷冻离心10 min,弃去上清液,收集沉淀。将沉淀溶于少量

pH 5.5柠檬酸缓冲液(20 mmol/L)中,4℃保存备用。

1.2.4 Superdex200 凝胶过滤层析 将0.5 mL醇沉得到的酶液加到用pH 6.8磷酸钠缓冲液(20 mmol/L)预先平衡好的Superdex200层析柱(10 mm×300 mm)上,用平衡缓冲液进行洗脱,每管收集0.5 mL,测定各管酶活,收集合并有酶活部分,聚乙二醇浓缩后4℃保存备用。

1.2.5 MonoQ 离子交换层析 将2 mL凝胶过滤后的酶液加到用pH 6.8磷酸钠缓冲液(20 mmol/L)预先平衡好的MonoQ层析柱(10 mm×100 mm)上,用0~0.6 mol/L的NaCl(平衡缓冲液配制)进行复合梯度洗脱:先用5个床体积的平衡缓冲液洗去未吸附蛋白质,0~0.25 mol/L洗5个床体积,0.25~0.45 mol/L洗12个床体积,0.45~0.6 mol/L洗3个床体积。每管收集1 mL,测定各管酶活,收集合并有酶活部分,4℃保存备用。

1.2.6 酶活测定 采用Berthelot反应的比色法^[6]。酶活定义:在常压、37℃、pH 5.5的条件下,每分钟分解底物尿素产生1 μmol氨为一个酶活力单位。

1.2.7 蛋白质质量分数测定 蛋白质质量分数根据Bradford法测定^[7],以牛血清白蛋白为标准蛋白质。

1.2.8 SDS-PAGE电泳分析 按文献[8]的方法进行。分离胶质量浓度12 g/dL,浓缩胶质量浓度5 g/dL,电泳电压45 V。

1.2.9 酸性脲酶的PVDF膜印迹和N端序列的测定 参考Matsudaria^[9]的方法,用Bio-Rad电转装置进行:1)经过MonoQ纯化后,将活性峰进行SDS-PAGE电泳,然后将SDS-PAGE胶浸入CAPS缓冲液(10 mmol/L CAPS, pH 11,体积分数10%甲醇)约5 min,以除去Tris和甘氨酸,同时将PVDF膜浸入体积分数100%甲醇约10 s,再浸入CAPS缓冲液。另外将转膜用的海绵、滤纸也浸入另一容器内的CAPS缓冲液。2)安装转膜装置,100 V恒压,转移时间1 h。3)取出PVDF膜,以去离子水淋洗,浸入体积分数100%甲醇约10 s。4)染色(体积分数0.1%考马斯亮蓝R-250,体积分数1%乙醇,体积分数40%甲醇)1~2 min,重复脱色3次。5)用去离子水淋洗后,置于干净滤纸上晾干;剪下待测序的条带,由氨基酸序列分析仪测定氨基酸N端序列。

1.2.10 全酶相对分子质量的测定 全酶相对分子质量的测定采用Superdex200凝胶过滤法,标准

蛋白质分别为: ferritin (440 000), fibrinogen (341 000), aldolase (158 000)。

1.2.11 不同 pH、温度及金属离子对酶活的影响

在不同 pH 值下分别测定酶活,以最高酶活为 100% 计算相对酶活力。在 25~80 °C 范围内,每 5 °C 测定一次酶活,以最高酶活为 100% 计算相对酶活力。参照黄酒中含有的部分金属离子及有机酸种类及浓度,在纯酶溶液中分别添加相应的金属离子及有机酸,37 °C 保温 1 h 后,在标准条件下测定酶活,以未加金属离子及有机酸的酶液为 100%, 计算相对酶活力。

1.2.12 米氏常数 K_m 及最大反应速度 V_{max} 的测定

以尿素为底物,按 Lineweaver-Burk 作图法计算

K_m 及 V_{max} [11]。

2 结果与讨论

2.1 酸性脲酶的分离纯化

取 0.5 mL 乙醇分级沉淀后的酶液进行 Superdex200 层析,共洗脱出 4 个蛋白质峰,见图 1。只有峰 1 的后半部分有酶活,富集该部分并浓缩后进行 MonoQ 离子交换层析。用 0~0.6 mol/L NaCl 进行梯度洗脱,共出现 3 个蛋白质峰,见图 2,只有最后一个峰有酶活。酸性脲酶主要纯化过程及各步纯化效果见表 1。最终比活 101.7 U/mg,纯化倍数 21.1,收率 42%。经 3 步纯化后,SDS-PAGE 电泳表明:该酶为单一条带,对应相对分子质量为 72 000,见图 3。

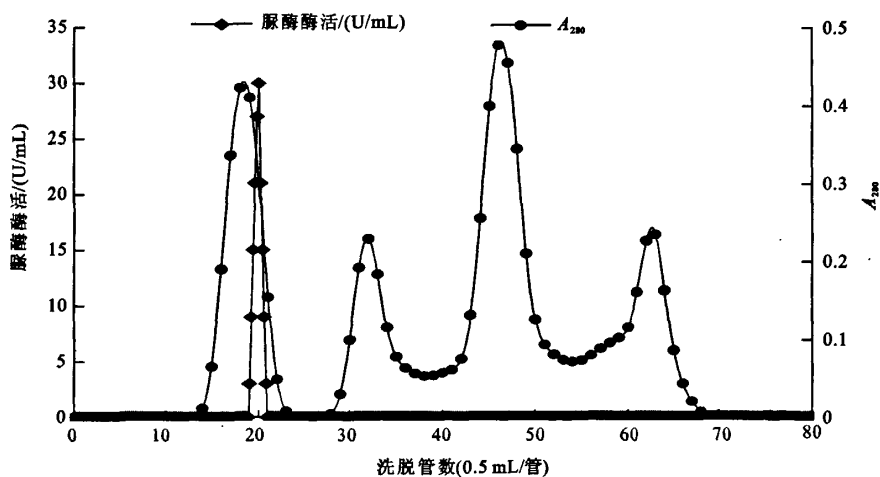


图 1 Superdex200 凝胶过滤色谱

Fig. 1 Chromatography of acid urease on Superdex200

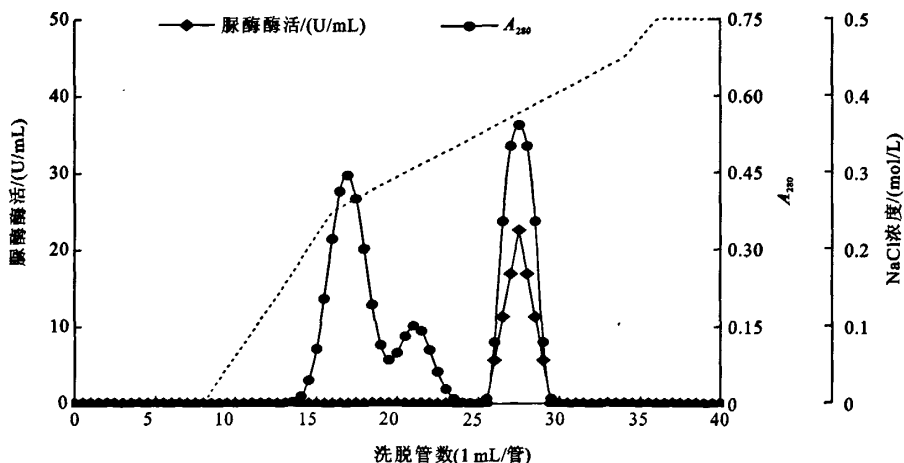


图 2 MonoQ 离子交换色谱

Fig. 2 Chromatography of acid urease on Mono Q

表 1 酸性脲酶纯化表
Tab. 1 Summary of purification of acide urease

步骤	总酶活/U	总蛋白质质量/mg	比活/(U/mg)	收率/%	纯化倍数
粗酶液	1453±29.3	300±6	4.8±0.1	100	1
10%—30%醇沉	1089±21.8	131±2.62	8.3±0.16	75±1.5	1.7±0.03
Superdex 200	988±20	17±0.34	58.1±1.16	68±1.36	12.1±0.2
Mono Q	610±12.2	6±0.12	101.7±2	42±0.84	21.1±0.42

2.2 蛋白质 N 段序列的测定

采用 Edman 降解法测定酸性脲酶 N 端序列的 8 个氨基酸残基为:S-F-K-M-D-R-K-Q。结果表明, SDS-PAGE 电泳图谱中经过 MonoQ 离子交换后的单一条带为同种蛋白质。

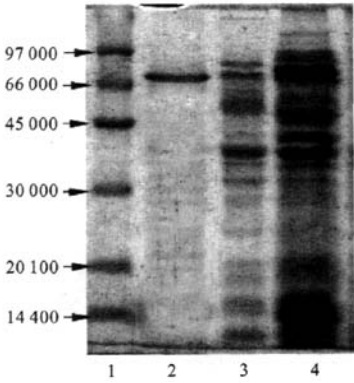


图 3 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 3 SDS-PAGE profiles of acid urease

2.3 全酶相对分子质量的测定

凝胶过滤法测定全酶相对分子质量约为 430 000,而纯化后的酸性脲酶 SDS-PAGE 电泳结果为相对分子质量 72 000 的单一条带,表明该酸性脲酶为同种亚基的六聚体。这种结构同已知的来源于植物及真核微生物的大部分脲酶相似,但是与 Jabriet 等和 Miyagawa 等分别从 *K. aerogenes* 和 *A. mobilis* 分离得到的酸性脲酶所具有的 3 种不同亚基的多聚体结构明显不同^[11-12]。

2.4 酶反应的最适 pH 值及最适温度

该酶的最适反应 pH 值在 4.5 左右,见图 4。与黄酒的 pH 值接近,在 pH 值低于 3 或大于 6 时,酶活下降较快。最适反应温度在 35 ℃左右,见图 5。当温度超过 55 ℃后,酶活迅速降低,这一性质有利于在黄酒中反应完成后利用巴氏消毒法对脲酶灭活。

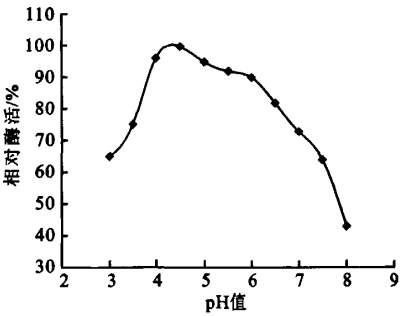


图 4 酶的最适作用 pH 值

Fig. 4 Optimum pH of acid urease

2.5 米氏常数 K_m 和最大反应速度 V_{max} 的测定

以尿素为底物,测定不同底物浓度 s 下反应的初速度 v ,按 Lineweaver-Burk 作图法取双倒数作 $1/v-1/s$ 曲线,计算得米氏常数 K_m 为 19.5 $\mu\text{mol/L}$,最大反应速度 V_{max} 为 0.87 $\mu\text{mol/min}$ 。

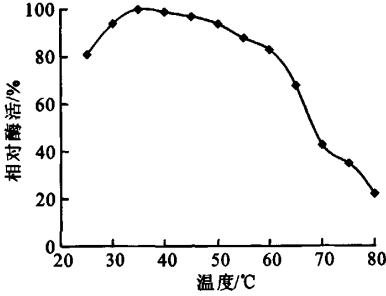


图 5 酶的最适反应温度

Fig. 5 Optimum temperature of acid urease

2.6 金属离子及有机酸对酸性脲酶酶活的影响

按照 1.2.13 中所述方法研究金属离子及有机酸对酸性脲酶酶活的影响。结果表明, Na^+ 、 Mn^{2+} 对酶活有一定的激活作用, Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 抑制作用较大, K^+ 、 Mg^{2+} 、 Fe^{3+} 影响不大。酒石酸、琥珀酸对酶有一定的激活作用,其他酸对酶活均有抑制作用,其中草酸、乙酸抑制作用最大,见表 2。

表 2 金属离子及有机酸对酶活的影响

Tab. 2 Effect of metal cations and organic acid on activity of Urease

金属离子 及有机酸	浓度/ (mmol/L)	相对 酶活/%
K ⁺	10	97±1.94
Na ⁺	10	115±2.3
Mg ²⁺	10	96±1.92
Ca ²⁺	10	82±1.64
Mn ²⁺	10	121±2.42
Zn ²⁺	10	86±1.72
Fe ³⁺	10	96±1.92
乳酸	2.5	85±1.7
草酸	2.5	63±1.26
乙酸	2.5	71±1.42
酒石酸	2.5	108±2.16
琥珀酸	2.5	105±2.1

上述研究表明,黄酒中的单一组分对酶活有些

有激活作用,有些表现出抑制作用,而黄酒是一个非常复杂的体系,组分对酶活的影响往往是综合的。王玉美等^[6]在应用实验中发现肠杆菌产酸性脲酶在黄酒中仍表现出较高的酶活,具有优良的应用特性。

3 结 语

作者对来源于 *Enterobactria* sp R-SYB082 的酒用酸性脲酶进行了乙醇分级沉淀、凝胶过滤和离子交换 3 步纯化,达到了电泳纯,并利用 Edman 降解法测定了其 N 端的 8 个氨基酸残基。该纯化方法同已报道的酸性脲酶纯化方案相比收率高,步骤简单。其全酶相对分子质量为 430 000,亚基相对分子质量为 72 000,说明该酶为同源六聚体,这种结构与植物及真核微生物的脲酶结构类似,与已报道的 G⁻ 菌的脲酶结构不同^[14]。

参考文献(References):

[1] Kobashi K, Takabe S. Removal of urea from alcoholic beverages with an acid urease[J]. *Appl Toxi*,1988, 8(1):73—74.

[2] Yoshizawa K, Takahashi K. Utilization of urease for decomposition of urea in sake[J]. *Brew Soc Japan*,1988,83(2):142—144.

[3] Kakimoto S, Sumino Y. Purification and characterization of acid urease from *Lactobacillus fermentum*[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*,1990,32:538—543.

[4] Butzke C E, Bisson L F. Ethyl carbamate preventative action manual[M]. US:Food and Drug Administration,1997:7.

[5] 王玉美,田亚平,赵光鹭,等. 肠杆菌酸性脲酶的提取及基本特性[J]. *食品工业科技*,2007(4):178—180.

Wang Y M, Tian Y P, Zhao G A. The extraction and characterization of an acid urease from *Enterobacter* sp[J]. *Science and Tecnology of Food Industry*,2007(4):178—180. (in Chinese)

[6] Weatherburn M W. Phenol-Hypochlorite reaction for determination of aminonia[J]. *Anal Chem*,1967,39(8):971—974.

[7] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding[J]. *Anal Biochem*, 1976,72(2):48—54.

[8] Laemmli U K. Cleavage of structural protein during the assembly of head of bacteriophage T4[J]. *Nature*,1970, 227:680—685.

[9] Matsudaria P. Sequence form picomole quantities of proteins electroblototed onto polyvinylidene difluoride meubrans[J]. *J Biol Chem*,1987,262:10035—10038.

[10] 王镜岩,朱圣庚,徐长法. 生物化学[M]. 北京:高等教育出版社,2002:351—363.

[11] Jabri E, Carr M B, Hausinger R P, et al. The crystal structure of urease from *Klebsiella aerogenes*[J]. *Science*, 1995, 268: 998—1004.

[12] Miyagawa K, Sumida M, Nakao M, et al. Purification, characterization, and application of an acid urease from *Arthrobacter mobilis*[J]. *Journal of Biotechnology*, 1998, 68: 227—236.

[13] Mobley H L, Island M D, Hausinger R P. Molecular biology of microbial ureases[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1995, 59(3): 451—480.

(责任编辑:李春丽)