

变幻青霉氨基甲酸乙酯降解酶产酶条件优化及酶的底物特异性

谷晓蕾, 田亚平*

(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: 在单因素优化基础上, 运用正交试验设计理论, 优化氨基甲酸乙酯降解酶产生菌 *P. variable* JN-A525 的产酶条件。优化发酵培养基配方为: 葡萄糖 20 g/L, 牛肉膏 10 g/L, KH_2PO_4 5 g/L, NaCl 1 g/L, KCl 5 g/L; 发酵条件为: 初始 pH 6.0、培养温度 32 °C、接种体积分数 3%、250 mL 摇瓶装量 70 mL、摇床转速 100 r/min, 在此优化条件下酶活比优化前提高了 3.47 倍。对经超声破碎、 $(\text{Na})_2\text{SO}_4$ 盐析、Superdex G-75 凝胶过滤层析步骤初步纯化的酶之底物特异性的研究表明, 在模拟黄酒体系下, 该酶对尿素和氨基甲酸乙酯有相对强的降解作用, 对一些酯类和氨基酸没有降解作用。

关键词: 氨基甲酸乙酯降解酶; 优化; 纯化; 底物特异性

中图分类号: Q 55 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2013)06—0603—05

Optimization of Fermentation Conditions of *P. variable* JN-A525 and Substrate Specificity of Urethanase

GU Xiao-lei, TIAN Ya-ping*

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The fermentation process for *P. variable* JN-A525 was optimized by single factor experiment and orthogonal tests. The results showed that the medium was composed of glucose 20 g/L, beef extract 10 g/L, KH_2PO_4 5 g/L, NaCl 1 g/L and KCl 5 g/L. The optimum fermentation conditions was 32 °C, inoculum volume 3%, the optimum amount in flask 70/250 mL and the rotation speed of 100 r/min. Under these optimal conditions, the highest urethanase activity is 3.47 fold more than that of previous conditions. After sonication methods, sodium-sulfate salting-out and superdex G-75 gel filtration chromatography, the urethanase from *Penicillium variable* JN-A525 is further determined substrate specificity. Under simulated conditions, the urethanase has a relatively strong catalytic activity to urea and EC. Meanwhile, urethanase cannot catalyze the decomposition of amino acids and esters.

Keywords: urethanase, optimization, purification, substrate specificity

收稿日期: 2012-10-12

基金项目: 国家 973 计划项目(2012CB720802)。

* 通信作者: 田亚平(1964—), 女, 江苏无锡人, 工学博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事生物活性物质方面的研究。

E-mail: yapingtian@hotmail.com

氨基甲酸乙酯 (Ethyl Carbamate, 又叫 Urethane), 是一种具有遗传毒性及致癌性的物质^[1-5], 存在于许多发酵食品 (如酱油、酵母、奶酪等) 和酒精饮料 (如黄酒、白酒、葡萄酒等) 中^[6-12]。随着人民生活水平的不断提高, 天然发酵食品中微量成分的合理控制和食品品质的不断提升已日益受到国内外食品行业的关注。研究表明, 去除成品黄酒中已产生 EC 的主要途径之一为酶解法^[13]。

目前, 国内主要是对氨基甲酸乙酯检测方法的研究, 而对氨基甲酸乙酯降解酶的研究报道较少。国外则早在 20 世纪 60 年代, 就有报道说小鼠能降解被 ¹⁴C 标记的氨基甲酸乙酯, 之后, Yamamoto 等人在小鼠肝脏中发现了降解氨基甲酸乙酯的能力, 因为作用能力很低, 所以, 他们并不能确认这是酶促反应所致。近来, 国外报道的来自小鼠粪便的柠檬酸杆菌 (Kyoichi Kobashi 等人, 1990 年)^[4]、小鼠肠胃的地衣芽孢杆菌 (Zhao Chun Ju 等人, 1991 年)^[5] 和 B.R. Mohapatra 筛选自海洋微生物的球状细菌所产的氨基甲酸乙酯降解酶在酸性和中性条件下都具有一定的酶活。

本课题组前期筛选和鉴定出一种 *P. variable* JN-A525 菌株具有产 EC 降解酶的能力, 粗酶特性研究和初步应用效果发现, 其最适 pH 在酸性范围, 有一定耐乙醇能力, 在复杂的实际黄酒体系中仍然有水解氨基甲酸乙酯的能力, 具备一定的应用潜力。为提高该菌产酶能力, 作者对 *P. variable* JN-A525 的生长及其产酶的适宜条件进行研究, 并对所产氨基甲酸乙酯降解酶初步纯化, 进一步考察该酶在模拟黄酒体系中所表现的底物特异性, 为酶解法控制黄酒微量成分的实际应用建立了良好基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株 *P. variable* JN-A525 是作者所在实验室筛选获得的产氨基甲酸乙酯降解酶的菌株。

1.1.2 培养基

1) 种子培养基: 蛋白胨 1 g/L, NaCl 5 g/L, KH₂PO₄ 2 g/L, pH 5.5。

2) 基础发酵培养基: 葡萄糖 20 g/L, 蛋白胨 10 g/L, pH 6.0。

1.2 实验方法

1.2.1 孢子悬浮液的制备 用适量的无菌水洗下琼脂斜面上新鲜、生长旺盛的孢子, 然后移入装有种子培养基的三角瓶中, 置于恒温调速摇床中进行培养, 转速为 230 r/min, 温度为 30 ℃, 培养 6 h。

1.2.2 酶活的测定方法 根据 Berthelot 反应^[14-15], 用比色法 625nm 测定酶活力。

1.2.3 蛋白质含量的测定 采用 Forlin 酚法^[16]测定, 以牛血清白蛋白为标准。

1.2.4 发酵条件的优化 以 *P. variable* JN-A525 生长状况、产酶活力为指标, 优化培养基碳源、氮源、初始 pH、培养温度、接种量、装液量等。并在单因素实验的基础上对接种量、装液量、起始 pH 和发酵温度进行 4 因素 3 水平 $L_9(3^4)$ 正交试验。

1.2.5 酶的初步纯化流程 酶的初步纯化流程见图 1。

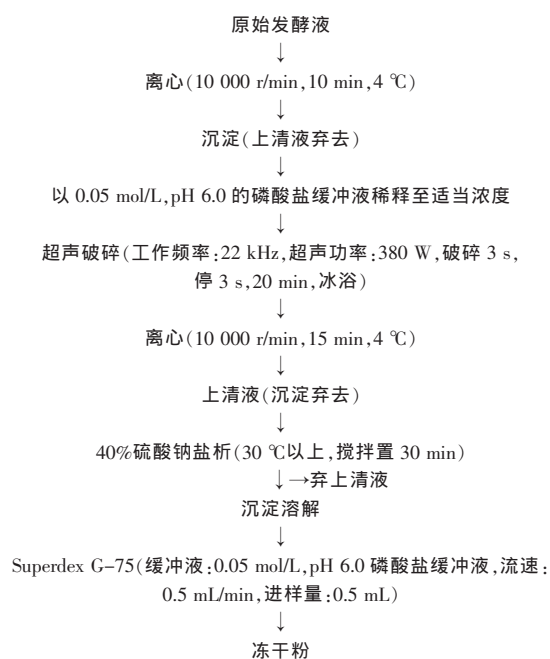


图 1 酶的初步纯化流程图

Fig. 1 Workflow of preliminary purification of urethanase

1.2.6 初步纯化酶的底物特异性 在 15% 酒精含量、pH 4.4 的条件下, 分别以 3% 甘氨酸、3% 谷氨酸、3% 氨基甲酸甲酯、3% 氨基甲酸乙酯、3% γ -氨基丁酸、3% 苯酯、3% 苯胺酰胺、3% 尿素、3% 氨基丁酸、3% 丁酯、3% 谷氨酰胺为底物, 各取 1 mL 于标记好的比色管中, 分别加入 1 mL 酶液, 50 ℃ 水浴反应 30 min, 测定 OD₆₂₅ 值。

2 结果与讨论

2.1 正交试验

前期对碳源、氮源、温度、转速、接种量、装液量、pH 值、无机盐离子等单因素进行考察,在此基础上,采用四因素三水平进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,不考虑因素间的相互作用,因素设计见表 1,研究结果见表 2。

表 1 四因素三水平正交设计

Table 1 Factors and levels of the orthogonal experiment

水平	实验因素			
	装液量/mL A	接种体积 分数/% B	发酵温度/℃ C	发酵 pH 值 D
1	60	1	28	5
2	70	3	30	6
3	80	5	32	7

表 2 正交试验结果

Table 2 Results of the orthogonal experiment

实验号	因素				酶活/ (U/L)
	装液量/ mL A	接种体积 分数/% B	发酵 温度/℃ C	发酵 pH 值 D	
1	1	1	1	1	430.6
2	1	2	2	2	385.1
3	1	3	3	3	400.4
4	2	1	2	3	352.2
5	2	2	3	1	490.4
6	2	3	1	2	422.8
7	3	1	3	2	398.3
8	3	2	1	3	405.6
9	3	3	2	1	338.6
K_1	405.4	393.7	419.7	419.9	
K_2	421.8	427.0	358.6	402.1	
K_3	380.8	387.3	429.7	386.1	
k_1	135.1	131.2	139.9	140.0	
k_2	140.6	142.3	119.5	134.0	
k_3	126.9	129.1	143.2	128.7	
极差 R	13.7	13.2	23.7	11.3	
主次顺序	$C>A>B>D$				
优水平	A_2	B_2	C_3	D_1	
优组合	$A_2B_2C_3D_1$				

由极差分析可以看出,各因素影响酶活力顺序为: $C>A>B>D$,即发酵温度是影响 EC 降解酶酶活力的主要因素,其次是装液量,然后是接种量和发酵 pH 值。产 EC 降解酶最适条件组合为: $A_2B_2C_3D_1$,即 250 mL 的三角瓶装液量 70 mL,接种体积分数 3%,发酵温度 32 ℃,发酵初始 pH 6。

将正交试验所得的最佳组合 $A_2B_2C_3D_1$ 。做 3 次重复实验,测定酶活力平均值为 522.1 U/L,与初始单因素优化前的 150 U/L 相比,酶活水平提高了 3.47 倍。1997 年,B.R. Mohapatra 和 M. Bapuji 筛选自海洋微生物的球状细菌所产的氨基甲酸乙酯降解酶酶活为 0.897 IU/mL^[13]。上述摇瓶的优化条件为后期进一步的发酵放大研究创造了良好的基础。

2.2 酶的初步纯化

前期考察表明该真菌所产的能降解氨基甲酸乙酯的酶是一种胞内酶,收集菌体破碎细胞后对粗酶进行研究,发现其最适温度为 50 ℃,最适 pH 6.0,具一定的乙醇耐受性(黄酒的酒精度 15%时,相对酶活仍能达 65%左右),模拟黄酒体系(乙醇 15%,EC 3%,pH 4.4)中对氨基甲酸乙酯(EC)有相对较强的水解能力,对氨基甲酸甲酯(MC)也有一定作用。

在上述基础上,为排除杂质干扰,相对准确地了解氨基甲酸乙酯降解酶的特性,采用超声破碎、盐析、Superdex G-75 凝胶过滤层析基本步骤进行初步纯化,纯化结果见表 3。

表 3 变幻青霉氨基甲酸乙酯降解酶的初步纯化结果

Table 3 Results of the preliminary purification of urethanase from *Penicillium variable* JN-A525

步骤	酶活/ (U/L)	蛋白质质量 分数/(mg/mL)	比酶活/ (U/mg)	纯化倍数
超声破碎	550	0.528	0.96	—
盐析	1834.9	1.3	1.41	1.47
Superdex G-75	1679.8	0.54	3.11	3.24

真菌发酵后的体系往往非常复杂,纯化过程中跟踪分析氨基甲酸乙酯降解酶的活性,过程中需要特别注意氨离子的干扰,盐析过程选择了硫酸钠在夏天 30 ℃以上的室温进行,表 3 结果表明,纯化过程中该酶比活已获得逐步提高,幅度不大的原因可能与该酶低浓度时的稳定性欠佳有一定关系,所以后期可进一步采用传统诱变育种和分子生物学手段来提升产酶水平和所产酶的稳定性。

2.3 模拟黄酒体系下酶底物特异性验证

超声破碎后的粗酶液已进行过一些酶学基本特性的研究,为排除干扰,对经过上面步骤纯化后的酶在模拟黄酒体系下进行底物特异性方面的验证。图2结果表明:*Penicillium variable* JN-A525菌株所产EC分解酶对氨基甲酸乙酯、尿素、苯甲酰胺有相对较强的降解能力,对氨基甲酸甲酯也可以作用,但作用较弱,对一些氨基酸基本没表现作用。因尿素是生成氨基甲酸乙酯的前体物质,因此该酶

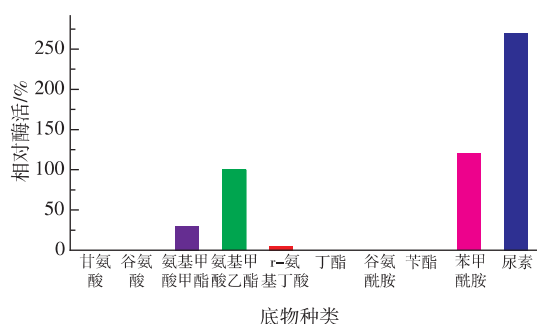


图2 变幻青霉所产EC降解酶的底物特异性

Fig. 2 Substrate specificity of urethanase from *Penicillium variable* JN-A525

可通过作用于尿素,减少其进一步与乙醇生成氨基甲酸乙酯的可能,亦可直接作用于氨基甲酸乙酯,降低黄酒中氨基甲酸乙酯的含量。

3 结语

作者在单因素研究基础上运用正交研究变幻青霉 *Penicillium variable* JN-A525 产氨基甲酸乙酯降解酶的培养基和发酵条件,使得酶活提高了3.47倍,为后期大规模发酵调控的研究建立了一定的基础。

对初步纯化后的氨基甲酸乙酯降解酶在模拟黄酒体系下的底物特异性的研究,说明了该酶不但可通过作用于尿素,减少其进一步与乙醇生成氨基甲酸乙酯的可能,亦可直接作用于氨基甲酸乙酯,降低黄酒中氨基甲酸乙酯的含量,说明该酶有在黄酒一些微量成分的控制中发挥作用的潜力。

真菌产生的酶系往往非常丰富和复杂,还有周期较长的缺陷,因此课题组将在充分考察其所产酶的特性基础上,进一步采用分辨率较高手段纯化该酶,获得其蛋白质序列,可为其后期的异源高效表达创造良好条件。

参考文献:

- [1] 吴世嘉,王洪新. 发酵食品中氨基甲酸乙酯的研究进展[J]. 化学与生物工程, 2009, 26(9): 15.
WU Shi-jia, WANG Hong-xin. Research advancement of ethyl carbamate in fermented food [J]. *Chemistry and Bioengineering*, 2009, 26(9): 15. (in Chinese)
- [2] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteindyo building[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248.
- [3] Ough C S. Ethyl carbamate in fermented beverages and foods: Naturally occurring ethyl carbamate[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1996, 24: 323-327.
- [4] ZHAO C J, Kobashi K. Urethanase in rat tissues[J]. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, 1994, 17: 773-778.
- [5] Chun J Z, Lisa I, Kyoichi K. Urethanase of *Bacillus licheniformis* sp. isolated from mouse gastrointestinal [J]. *Chemistry Pharmaceutical Bulletin*, 1991, 9: 3303-3306.
- [6] WANG B, LI Y F, HUANG C Z. Characterization of interaction of DNA with Hoechst33258 using resonance light scattering spectra and their analytical application[J]. *Journal of Southwest University: Natural Science Edition*, 2008, 5: 62-66.
- [7] LI R T, SU J S, LONG Y F. Resonance light scattering spectrophotometric determination of trace DNA with the system of FYO-CTMAB and its analytical application[J]. *Journal of Hunan University of Science and Technology: Natural Science Edition*, 2007, 3: 109-112.
- [8] 高年发, 宝菊花. 氨基甲酸乙酯的研究进展[J]. 中国酿造, 2006, 9: 1-4.
GAO Nian-fa, BAO Ju-hua. Research advancement of ethyl carbamate[J]. *China Brewing*, 2006, 9: 1-4. (in Chinese)
- [9] 王斌, 李原芳, 黄承志. 双苯甲亚胺与DNA作用的共振光散射特征及其分析应用[J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2008, 5: 62-66.
WANG Bin, LI Yuan-fang, HUANG Cheng-zhi. Characterization of interaction of DNA with Hoechst33258 using resonance light

- scattering spectra and their analytical application[J]. **Journal of Southwest University: Natural Science Edition**, 2008, 5: 62-66. (in Chinese)
- [10] 李韧韬,苏界殊,龙云飞. 固黄 O-CTMAB-DNA 三元体系的共振光散射光谱的研究及应用[J]. 湖南科技大学学报:自然科学版, 2007, 3: 109-112.
- LI Ren-tao, SU Jie-shu, LONG Yun-fei. Resonance light scattering spectrophotometric determination of trace DNA with the system of FYO-CTMAB and its analytical application[J]. **Journal of Hunan University of Science and Technology: Natural Science Edition**, 2007, 3: 109-112. (in Chinese)
- [11] 周景文,堵国成,陈坚. 发酵食品有害氨(胺)类代谢物:形成机制和消除策略[J]. 中国食品学报, 2011, 11(9): 8.
- ZHOU Jing-wen, DU Guo-cheng, CHEN Jian. Harmful amines (ammonia) metabolites in fermented foods: formation mechanism and the elimination strategy[J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**, 2011, 11(9): 8. (in Chinese)
- [12] 刘俊,赵光鳌,徐岩. 黄酒中氨基甲酸乙酯直接减除技术的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2011, 31(2): 171-175
- LIU Jun, ZHAO Guang-ao, XU Yan. Directly removal of ethyl carbamate in Chinese rice wine[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2011, 31(2): 171-175 (in Chinese)
- [13] CHUN J Z, Kyoichi K. Purification and characterization of iron-containing urethanase from *Bacillus licheniformis* [J]. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, 1994, 17(6): 773-778.
- [14] Mohapatra B R, Bapuji M. Characterization of urethanase from *Micrococcus* species associated with the marine sponge (*Spirasfrella species*) [J]. **Letters in Applied Microbiology**, 1997, 25: 393-396.
- [15] 王秀奇. 基础生物化学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999: 177-181.

会 议 信 息

会议名称(中文): 第一届中国淡水生态学学术研讨会

所属学科: 生态学, 环境生态

开始日期: 2013-07-01

结束日期: 2013-07-04

所在城市: 广东省 广州市

主办单位: 中国生态学会

承办单位: 暨南大学 中国科学院地理与湖泊研究所 中国科学科水生生物研究所

联系人: 刘宁宁, 肖林

联系电话: +86-20-85220462, +86-20-85220239

传真: +86-20-38374065

E-MAIL: spray_80@yahoo.com.cn osss@jnu.edu.cn

通讯地址: 暨南大学生态学系, 广州

邮政编码: 510632

会议网站: <http://www.esc.org.cn/n12785215/n12785472/14589085.html>

会议名称(中文): 微生物生态与海洋环境论坛

所属学科: 海洋物理, 生态学

开始日期: 2013-07-25

结束日期: 2013-07-20

所在城市: 浙江省 宁波市

具体地点: 宁波大学海洋学院

主办单位: 中国生态学会微生物生态专业委员会、宁波市科协

协办单位: 中国科学院生态环境研究中心

承办单位: 宁波大学、宁波市海洋与渔业协会

会议嘉宾: 姓名 职务 简介 演讲题目

[会务组联系方式] 联系人: 吕文洲

联系电话: 18958226200

E-MAIL: wenzhoulv@yahoo.com

会议网站: <http://www.esc.org.cn/n12785215/n12785472/14699275.html>