

# 嘌呤核苷磷酸化酶的表达及其在啤酒中的应用

李玉淼<sup>1,2,3</sup>, 朱德伟<sup>1,2,3</sup>, 朱洪康<sup>1,2,3</sup>, 孙军勇<sup>1,2,3</sup>, 陆健<sup>\*1,2,3,4</sup>

(1. 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 3. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 4. 宿迁市江南大学 产业技术研究院, 江苏 宿迁 223800)

**摘要:** 为了开发一种能水解核苷的嘌呤核苷磷酸化酶 (Purine Nucleoside Phosphorylase, PNPase), 将其添加到糖化醪液中, 增加麦汁中的游离嘌呤碱基质量浓度, 在后续发酵阶段游离嘌呤碱基被酵母利用, 提高了嘌呤物质的利用率, 最终啤酒中的嘌呤质量浓度减少。将 PNPase 的编码基因 *deoD* 导入表达载体 pET-28a(+) 中, 采用化学转化法将载体转入到大肠杆菌 BL21 (DE3) 进行诱导表达, 研究重组 PNPase 的活性, 并将其应用到糖化工艺中。获得的重组 PNPase 活性为 184.46 U/mL, 添加到糖化醪液中后, 麦汁中游离嘌呤碱基质量浓度升高, 酵母可吸收的游离嘌呤质量浓度增多, 啤酒发酵液嘌呤质量浓度显著降低, 为后续研究使啤酒嘌呤含量的降低奠定了一定的基础。

**关键词:** 嘌呤核苷磷酸化酶; 原核表达; 嘌呤碱基; 啤酒

中图分类号: Q 815 文献标志码: A 文章编号: 1673-1689(2017)12-1264-05

## Expression of Purine Nucleoside Phosphorylase and Its Application in Beer

LI Yumiao<sup>1,2,3</sup>, ZHU Dewei<sup>1,2,3</sup>, ZHU Hongkang<sup>1,2,3</sup>, SUN Junyong<sup>1,2,3</sup>, LU Jian<sup>\*1,2,3,4</sup>

(1. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 4. Industrial Technology Research Institute of Jiangnan University in Suqian, Suqian 223800, China)

**Abstract:** To develop a purine nucleoside phosphorylase which can hydrolysis nucleoside. Adding purine nucleoside phosphorylase to the mash liquid, it could increase the free purine content in wort, which were utilized by yeast during the fermentation stage. As result, the utilization of purine could improve, purine content decreased in beer. The gene *deoD* encoding PNPase was cloned into the expression vector pET-28a (+) and the expression vector was transformed into *E.coli* BL21 (DE3) using chemical transformation. The activity of recombinant PNPase was analyzed and it was applied to the mashing process. The results showed that the enzyme activity of obtained recombinant PNPase was 184.46 U/mL. When it was added to the mash liquid, the free purine content in wort was

收稿日期: 2015-06-18

基金项目: 国家 863 计划项目(2013AA102109); 江苏省普通高等学校科研成果产业化推动项目(JHB2012-26); 高等学校学科创新引智计划(111 计划)项目(111-2-06); 江苏高校优势学科建设工程项目。

\* 通信作者: 陆 健(1968—), 男, 江苏太仓人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事发酵工程方面的研究。

E-mail: jlu@jiangnan.edu.cn

引用本文: 李玉淼, 朱德伟, 朱洪康, 等. 嘌呤核苷磷酸化酶的表达及其在啤酒中的应用[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(12): 1264-1268.

increased. Thus, yeast could use more free purine, purine content decreased significantly in beer, laying the foundation for the further reduction of purine content in beer.

**Keywords:** purine nucleoside phosphorylase, prokaryotic expression, purine bases, beer

啤酒是以麦芽为原料,经酵母发酵而成的低乙醇饮料,含有丰富的营养物质<sup>[1]</sup>,这其中也含有大量的嘌呤类物质(purines)<sup>[2]</sup>。这些嘌呤类物质主要来自麦芽,此外发酵后期酵母自溶也会产生少量嘌呤<sup>[3]</sup>。啤酒中嘌呤类物质包括嘌呤核苷酸、结合态的嘌呤核苷和游离态的嘌呤碱基,酵母能且只能利用游离态的嘌呤碱基<sup>[4]</sup>。

嘌呤进入人体后代谢为尿酸,正常人体内尿酸是1 000~1 200 mg。如果每天尿酸的生成和排泄量相当,人体内尿酸代谢处于一种平衡状态;但若排泄不足或者生成过剩,就会使体内尿酸含量过高,从而导致高尿酸血症<sup>[5]</sup>。医学观点认为高尿酸血症是痛风发生的基础,而啤酒是诱发痛风的一个因素。它主要表现在两方面,一是啤酒中含有大量的尿酸前体嘌呤类物质;二是乙醇对尿酸的形成有重要的影响。但是,尽管乙醇也影响血浆中尿酸的水平,啤酒中的嘌呤却起着主要的作用<sup>[6]</sup>。

通过对市售啤酒的大量检测,结果表明啤酒中主体嘌呤物质为嘌呤核苷<sup>[7]</sup>。啤酒酿造过程中,经糖化工艺制得的麦汁含有大量的嘌呤核苷和游离嘌呤碱基,这些嘌呤类物质经发酵工艺,由于酵母能且只能利用游离态的嘌呤碱基,仅有部分的游离嘌呤被酵母利用,剩余的嘌呤类物质仍然存在于啤酒中。而嘌呤核苷磷酸化酶能够将麦汁中的嘌呤核苷分解为游离嘌呤碱基,嘌呤核苷含量降低,同时在发酵过程中,更多的游离嘌呤碱基为酵母所利用,最终提高了嘌呤类物质的利用率,达到最大程度的降低啤酒中的嘌呤含量<sup>[8]</sup>。但是,目前市场上嘌呤核苷磷酸化酶的使用成本较高,平均320元/mg。因此,开发能用于啤酒酿造、价格合理的嘌呤核苷磷酸化酶将具有较为广阔的应用前景。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

**1.1.1 试剂与材料** LB/Kan<sup>r</sup>液体培养基:蛋白胨10 g/L,酵母提取物5 g/L,NaCl 10 g/L,另加入50 μg/mL卡那霉素。

PCR引物:上海生工生物工程有限公司合成;Taq DNA聚合酶、限制性内切酶Hind III和BamH I、T4 DNA连接酶、IPTG;均购自上海生工生物工程有限公司;嘌呤核苷磷酸化酶(200 U/mg):购自近岸蛋白质科技有限公司;大麦麦芽、Matcalfe:中粮麦芽(江阴)有限公司;腺嘌呤碱基(Adenine, A)、鸟嘌呤碱基(Guanine, G)、次黄嘌呤碱基(Hypoxanthine, H)、黄嘌呤碱基(Xanthine, X):购自Sigma公司;次黄嘌呤核苷(肌苷 Inosine, Ino):购自上海笛柏试剂公司。

**1.1.2 仪器** EBC-LF型标准麦芽粉碎仪:北京德之杰啤酒技术有限公司;YQ-PJ-6B型全自动糖化仪:轻工业所西安轻机所光电公司;Agilent 1260高效液相色谱仪:美国安捷伦公司;SCIENTZ JY 92-11超声波细胞粉碎仪;琼脂糖凝胶电泳仪、垂直电泳仪:美国Bio-Rad公司;JD-801凝胶成像仪:江苏省捷达科技发展有限公司。

**1.1.3 菌株与质粒** 大肠杆菌JM109和BL21(DE3),载体pET-28a(+)和pMD18-T:均为作者所在实验室保存。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 引物设计和PCR扩增** 根据PNPase基因的核苷酸序列设计一对引物<sup>[9]</sup>,分别在上游引物3'端和下游引物的5'端引入Hind III和BamH I酶切位点,其中:

上游引物为5'-CGCGGATCCATGGCTACCC-3'

下游引物为5'-CCCAAGCTTCTCTTTATCGCC CAG-3'

用以上引物扩增编码PNPase的基因,反应条件如下:95℃预变性5 min,94℃变性1 min,55℃退火30 s,72℃延伸45 s,共30个循环,结束后72℃延伸5 min用来补平DNA末端。

**1.2.2 克隆载体和表达载体的构建** 利用T4 DNA连接酶将PCR扩增的产物与载体pMD18-T进行连接,所获产物转化到感受态细胞E.coli JM109中,挑取平板上生长正常的菌落,碱法提取。以空载体质粒为对照,电泳检测转化质粒,对初步确定有外源

基因进入的质粒送样进行测序分析。

将表达载体 pET-28a(+) 和重组 pMD18-T 载体分别用 *Hind* III 和 *Bam*H I 进行双酶切后连接, 所获连接产物转化到感受态细胞 *E.coli* BL21 (DE3) 中。提取重组质粒, 以空载体质粒为对照进行电泳。对初步确定有外源基因进入的质粒进行酶切鉴定, 筛选阳性克隆。

**1.2.3 目的蛋白质的诱导表达** 取含有 pET-28a (+) 重组子的 BL21 菌落, 于含有卡那霉素 (50  $\mu$ g/mL) 的 LB 液体培养基中 37  $^{\circ}$ C 振荡培养过夜, 以此作为种子液。按 1% 的接种比例转接到 LB 液体培养基中, 37  $^{\circ}$ C 培养至  $OD_{600}=0.6$ , 此时加入异丙基- $\beta$ -硫代半乳糖苷, 30  $^{\circ}$ C 继续诱导表达 4 h。

取诱导后的菌液进行离心, 用预冷的破胞液重悬菌体沉淀, 按功率 200 W, 工作 5 s 间歇 5 s 进行超声波破碎, 过后取细胞裂解液于 4  $^{\circ}$ C 下 12 000 r/min 离心 20 min, 回收上清液则为粗酶。

**1.2.4 蛋白质质量分数测定** 测定蛋白质质量分数采用 Bradford 法, 以牛血清白蛋白溶液做标准液, 制作标准曲线<sup>[10]</sup>。

**1.2.5 蛋白质 SDS-PAGE** 分离胶为 12 g/dL, 浓缩胶为 5 g/dL, 将凝胶装到电泳装置上, 加入电泳缓冲液。开始时电压为 60 V, 待样品变成一条直线进入分离胶后调为 80 V, 观察凝胶板上的样品溴酚蓝条带走近底端时, 停止电泳。电泳结束后经固定液固定 0.5 h, 考马斯亮蓝染色 1 h, 最后用甲醇: 乙酸: 水 (1:1:8) 的脱色液脱色约 5 h 即可。

**1.2.6 高效液相色谱 (HPLC) 检测<sup>[11-12]</sup>** 色谱操作条件: 色谱柱 Waters T3 (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu$ m); 流动相:  $KH_2PO_4$ - $H_3PO_4$  pH 4.0; 紫外检测器波长: 254 nm; 流速: 1 mL/min; 柱温: 25  $^{\circ}$ C; 进样量: 20  $\mu$ L。

**1.2.7 酶活性测** 反应体系: 2 mL 反应液 (2 mmol/L 肌苷, 50 mmol/L  $KH_2PO_4$ - $K_2HPO_4$ , pH 7.5) 于 60  $^{\circ}$ C 水浴预热 5 min, 加入 10  $\mu$ L 酶液反应, 结束后立即煮沸 5 min 灭酶, 用 HPLC 测定反应液中次黄嘌呤的增加值<sup>[13]</sup>。

PNPase 的酶活单位定义为: 在上述反应后, 每分钟产生 1  $\mu$ mol 次黄嘌呤所需的酶量。

**1.2.8 样品前处理<sup>[14]</sup>** 样品中游离嘌呤碱基测定前处理方法: 麦汁超声除气后, 经 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤, 滤液进行高效液相色谱检测<sup>[14]</sup>。

样品中总嘌呤碱基测定前处理方法: 准确吸取

10 mL 麦汁, 加入 0.5 mL 的 70% 高氯酸, 混匀, 沸水浴 1 h 后迅速进行冰浴冷却, 用 NaOH 溶液调至中性。使用中速滤纸滤去沉淀物, 将溶液定容至 50 mL, 再用稀磷酸调节 pH 为 4.0, 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤。

**1.2.9 麦汁糖化工艺曲线** 糖化开始时, 分别向糖化醪液中添加商品嘌呤核苷磷酸化酶 0.032 U/mL, 相同活力的经 12 000 r/min 离心 20 min 后回收的粗酶液, 待糖化结束后比较嘌呤核苷磷酸化酶对麦汁中嘌呤类物质含量的影响, 见图 1。

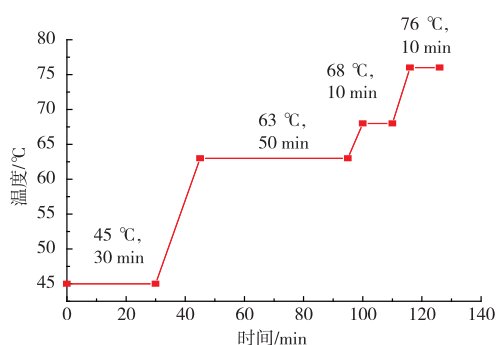


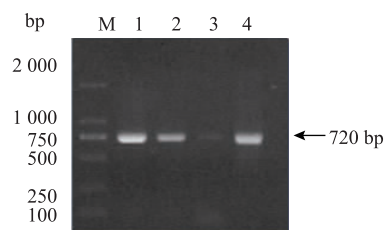
图 1 糖化工艺曲线

Fig. 1 Profile of mashing

## 2 结果与分析

### 2.1 PNPase 目的基因的扩增和测序

按照 1.2.1 的方法, 以大肠杆菌 DNA 为模板, 基于引物引导新链合成, 成功扩增了 PNPase 目的基因。图 2 显示获得大小约 720 bp 的特异性条带。将扩增成功的条带经 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒回收, 通过 T4 DNA 连接酶与 pMD18-T 克隆载体进行连接。利用 *E.coli* JM109 感受态细胞进行转化实验, 过后随机挑取平板上正常生长的菌落, 碱法提取。琼脂糖电泳检测转化质粒, 对初步确定有外源基因进入的质粒送样进行测序分析, 测序结果表明正确。



M: DNA marker; 1, 2: PCR 扩增产物; 3: 阴性对照; 4: 阳性对照

图 2 PCR 扩增 *deoD*

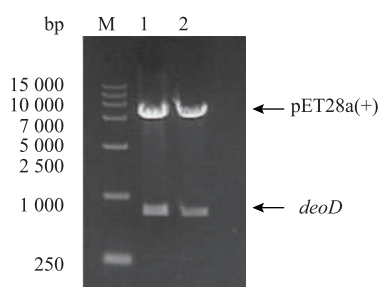
Fig. 2 PCR amplification of *deoD*



## 2.2 表达载体的构建、筛选和鉴定

用 Hind III、BamH I 双酶切克隆载体 pMD18-T 上的 PNPase 基因和表达载体 pET-28a(+), 连接, 得到的质粒转化到 *E.coli* BL21(DE3) 中。从菌液中少量提取质粒, 以空载体质粒为对照进行电泳, 从质粒大小上初步确定有外源基因进入载体。

Hind III、BamH I 双酶切鉴定片段大小, 根据酶切后片段的数目及大小确认目的基因是否正确连上。图 3 显示酶切结果与预期大小一致。



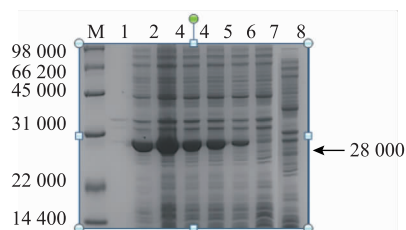
M: DNA marker; 1, 2: ET-28a(+)-*deoD*/Hind III+BamH I

图 3 pET-28a(+)-*deoD* 双酶切结果

Fig. 3 Plasmid pET-28a (+)-*deoD* digested by double enzymes

## 2.3 大肠杆菌中重组质粒的表达分析

图 4 为经超声波破碎后的细胞裂解液 SDS-PAGE 分析图。以 *E.coli* BL21(pET-28(+)) 为对照, 重组菌在 28 000 左右明显增加了表达条带, 送样鉴定确为表达产物 PNPase。同时分析结果显示, 随着诱导时间的延长, 蛋白质表达量随之增加; 诱导产物有少量分泌到培养基上清液中, 但主要以胞内可溶蛋白形式存在, 且胞内可溶蛋白质中 PNPase 约占 59%。



M: 蛋白质相对分子质量标准; 第 1 条泳道为诱导 4 h 后破碎沉淀; 第 2 条泳道为诱导 4 h 后破碎上清液; 第 3~6 条泳道为诱导 4、3、2、1 h 后总蛋白质; 第 7 条泳道为未诱导前总蛋白质; 第 8 条泳道为空质粒诱导 4 h 总蛋白质。

图 4 重组菌中 *deoD* 表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE result of expression product of *deoD*

## 2.4 重组 PNPase 的酶活力分析

对影响 PNPase 表达的因素, 如培养温度、诱导剂浓度、诱导时机、诱导后培养时间进行了分析, 初步确定为培养温度 30 ℃、诱导剂浓度 0.05 mmol/L、在对数生长期中期诱导表达以及诱导后继续培养 4 h。

按 1.2.7 酶活性测定方法, 对经上述优化后获得的酶液进行酶活测定。重组菌诱导 4 h 后 PNPase 活力为 184.46 U/mL, 对照菌酶活力为 11.39 U/mL, 重组菌相对应的酶活力要显著高于对照菌<sup>[6]</sup>。

## 2.5 糖化后麦汁中游离嘌呤碱基质量浓度的测定

采用 1.2.6 的检测方法对糖化工艺所制的麦汁中游离嘌呤碱基质量浓度进行测定, 结果见表 1。

由表 1 可知, 相比空白麦汁, 添加商品酶的麦汁中游离嘌呤碱基总量从 30.03 mg/L 升高至 44.98 mg/L, 增加 49.78%; 添加自制粗酶的麦汁中游离嘌呤碱基质量浓度从 30.03 mg/L 升高至 40.10 mg/L, 增加 33.53%, 效果类似, 并且处理后的麦汁中游离嘌呤碱基质量浓度增高。这说明通过 PNPase 的添加, 可有效分解麦汁中的嘌呤核苷, 进而提高麦汁中游离嘌呤碱基质量浓度。

表 1 大麦麦芽麦汁中游离嘌呤碱基质量浓度的测定

Table 1 Determination of free purine bases in wort of barley malts (mg/L)

物质	麦汁	麦汁+商品酶 (0.032 U/mL)	麦汁+粗酶液 (0.032 U/mL)
游离腺嘌呤	19.39	20.68	20.23
游离鸟嘌呤	6.27	13.22	13.71
游离次黄嘌呤	0.74	6.89	1.32
游离黄嘌呤	3.60	4.19	4.15
游离总嘌呤	30.03	44.98	40.10

## 2.6 发酵液中游离嘌呤碱基质量浓度的测定

采用 1.2.6 的检测方法对发酵液中游离嘌呤碱基质量浓度进行测定, 结果见表 2。

由表 2 可知, 空白发酵液中游离嘌呤质量浓度为 9.83 mg/L, 与空白麦汁中游离嘌呤为 30.03 mg/L 对比, 酵母可吸收利用 20.2 mg/L 游离碱基; 相类似, 添加商品酶的发酵液中游离嘌呤总量为 8.02 mg/L, 与添加商品酶的麦汁中游离嘌呤为 44.98 mg/L 相比, 酵母吸收利用 36.96 mg/L 游离碱基; 添加自制粗酶的发酵液中游离嘌呤总量为 8.12 mg/L, 与添加自制粗酶的麦汁中游离嘌呤为 40.10 mg/L

相比,酵母可利用 31.98 mg/L 游离碱基。这说明使用部分嘌呤核苷被分解的麦汁进行啤酒发酵,酵母可以吸收利用更多的游离嘌呤碱基,提高了嘌呤类物质的利用率。

表 2 发酵液中游离嘌呤碱基质量浓度的测定

Table 2 Determination of free purine bases in fermentation broth (mg/L)

物质	发酵液	发酵液+商品酶 (0.032 U/mL)	发酵液+粗酶液 (0.032 U/mL)
游离腺嘌呤	5.08	3.07	2.99
游离鸟嘌呤	1.29	1.30	1.02
游离次黄嘌呤	0.17	0.28	0.18
游离黄嘌呤	3.29	3.37	3.93
游离总嘌呤	9.83	8.02	8.12

### 2.7 发酵液中总嘌呤质量浓度的测定

采用 1.2.6 的检测方法对发酵液中总嘌呤质量浓度进行测定,结果见表 3。

由表 3 可知,相比空白发酵液,添加商品酶的发酵液中总嘌呤从 77.45 mg/L 降至 50.65 mg/L,降低 34.60%;添加自制粗酶的发酵液中总嘌呤碱基总量从 77.45 mg/L 降至 54.85 mg/L,降低 29.18%。这说明通过 PNPase 的添加,嘌呤核苷在糖化阶段被部分分解,同时生成的游离嘌呤碱基与麦汁中原本存在的游离嘌呤碱基,在发酵阶段被酵母吸收利用,最终导致啤酒中总嘌呤含量(嘌呤核苷+游离嘌呤碱基)降低,这一结论可以为低嘌呤啤酒的生产

提供依据。

表 3 发酵液中总嘌呤质量浓度的测定

Table 3 Determination of total purines in fermentation broth (mg/L)

物质	发酵液	发酵液+商品酶 (0.032 U/mL)	发酵液+粗酶液 (0.032 U/mL)
总腺嘌呤	33.60	25.95	25.30
总鸟嘌呤	36.95	17.90	18.85
总次黄嘌呤	3.35	2.45	2.35
总黄嘌呤	3.55	4.35	8.35
总嘌呤	77.45	50.65	54.85

## 3 结语

利用基因工程的技术手段在大肠杆菌中表达 PNPase 基因,在一定表达量的基础上,测定重组菌的酶活性。将其初步应用于啤酒的糖化工艺,使糖化工艺阶段中游离嘌呤碱基含量大幅度增加,显示构建的重组菌具有很好的应用价值。同时也发现在啤酒发酵过程中更多的游离嘌呤碱基可以为酵母所利用,较大程度的降低啤酒中的嘌呤质量浓度,为低嘌呤啤酒的生产提供方法。

本研究中,所酿啤酒用原料为全麦芽,且糖化及发酵工艺尚未进行优化,所获空白发酵液中总嘌呤质量浓度为 77.45 mg/L。后续试验将结合酶的作用以及调整配料、糖化工艺、发酵工艺,预期获得低嘌呤啤酒。

## 参考文献:

- [1] 顾国贤. 酿造酒工艺学[M]. 北京:中国轻工业出版社,2007.
- [2] 邵景涛. 啤酒中嘌呤类物质含量影响因素的研究[D]. 无锡:江南大学,2013.
- [3] 商曰玲. 啤酒酿造过程中嘌呤含量的变化研究[D]. 泰安:山东农业大学,2009.
- [4] LIU Changshu, LI Hong, CUI Yuanqian, et al. Absorption characteristics of purine compounds by yeast[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2014, 35(19):151-155. (in Chinese)
- [5] 林先军. 低嘌呤类物质啤酒的研究[D]. 无锡:江南大学,2006.
- [6] TETSUYA Y, YUJI M, SUMIO T, et al. Effect of beer on the plasma concentrations of uridine and purine bases[J]. *Metabolism*, 2002, 51(10):1317-1323. (in Chinese)
- [7] YUJI S, HIDEKO Y, TAKEHIRO M, et al. Process for manufacturing beer[P]. USA:6013288;2000-01-11.
- [8] GAO Jingtao, SHANG Yueling, SUN Junyong, et al. Effect of mashing technology on the content of total free purine bases in wort [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2013, 34(11):164-169. (in Chinese)
- [9] DANIEL F V, FRITHA H, KONANANI R, et al. Cloning, purification and characterisation of a recombinant purine nucleoside phosphorylase from *Bacillus halodurans* Alk36[J]. *Extremophiles*, 2010, 14:185-192.
- [10] 张龙翔. 生化试验方法和技术(第2版)[M]. 北京:高等教育出版社,1982:138-140.