

脲酶基因挖掘及其在枯草芽孢杆菌中的重组表达

周霞, 景晓冉, 顾洁, 毕家华, 伍伦杰, 聂尧*, 徐岩

(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 氨基甲酸乙酯(ethyl carbamate, 简称 EC)是一种存在于黄酒中的潜在致癌物, 酶法降解 EC 及其前体物质尿素因此备受关注。该研究通过基因挖掘获得了解淀粉芽孢杆菌 IT-45 的脲酶(Ba-urease)基因并在食品级系统枯草芽孢杆菌中实现了表达与应用。通过密码子优化、核糖体结合位点优化重构脲酶基因簇后, 酶活力从 6.85 U/mL 提升至 9.01 U/mL; 通过调整基因 *ureC* 的位置, 脲酶活力进一步提升至 10.15 U/mL。研究发现, 重组脲酶的最适反应温度为 37 °C; 最适反应 pH 范围为 6.5~7.0, 为中性脲酶。摇瓶发酵的最佳培养条件为: TB 培养基、接种体积分数 5%、诱导温度 28 °C、Ni²⁺添加量 4 mmol/L。在最佳发酵条件下, 酶活力达到 12.5 U/mL, 在酶法降解黄酒中的尿素具有应用前景。

关键词: 脲酶; 枯草芽孢杆菌; 尿素降解; 重组表达; 食品级表达系统

中图分类号: Q 814.9 文章编号: 1673-1689(2022)05-0028-10 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2022.05.004

Gene Mining of Urease and Recombinant Expression in *Bacillus subtilis*

ZHOU Xia, JING Xiaoran, GU Jie, BI Jiahua, WU Lunjie, NIE Yao*, XU Yan

(School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Ethyl carbamate (EC) is a potential carcinogenic chemical in yellow rice wine. Urease has attracted much attention because of its degradation of urea, the precursor of EC. To guarantee the food safety of rice wine, the gene encoding *Bacillus amyloliquefaciens* IT-45 urease (Ba-urease) was realized by gene mining and expressed in recombinant *Bacillus subtilis*. The enzyme activity of urease increased from 6.85 U/mL to 9.01 U/mL after the urease gene cluster reconstructed by the optimization of codon and ribosome binding site. The urease activity was further increased to 10.15 U/mL by adjusting the position of gene *ureC*. The optimal reaction condition of recombinant urease was 37 °C and pH 6.5~7.0. Under the optimal fermentation conditions, the enzyme activity reached 12.5 U/mL. The production of food-grade recombinant urease has potential application in traditional fermented food industry.

Keywords: urease, *Bacillus subtilis*, urea degradation, recombinant expression, food-grade expression system

收稿日期: 2021-01-07

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFC1604102)。

* 通信作者: 聂尧(1977—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事酶工程方面的研究。E-mail: ynie@jiangnan.edu.cn

氨基甲酸乙酯 (ethyl carbamate 或 urethane, 简称 EC), 是一种存在于发酵食品和乙醇饮料 (奶酪、酱油; 黄酒、清酒、威士忌) 中的氮类危害物^[1-4]。2007 年, 国际癌症研究机构 IARC (International Agency for Research on Cancer) 正式将 EC 上升为 2A 类致癌物^[5], 与丙烯酰胺同等危险, 引起人们对其安全的广泛关注。研究表明, 尿素是黄酒中与乙醇反应生成 EC 的最主要前体物质。因而, 去除黄酒中 EC 的主要策略是直接降低 EC 的含量和间接降低前体物质尿素的含量^[6]。脲酶 (Urease, EC 3.5.1.5)^[7] 因其不需更换酵母或生产工艺、直接高效的特性在解决黄酒中 EC 的食品安全问题中占据优势。

目前, 已报道的脲酶通常来自发酵乳杆菌^[8]、运动节杆菌^[9]、肠杆菌属^[10-11]、罗伊氏乳杆菌^[12]、副地衣芽孢杆菌^[13-15]、葡萄球菌^[16]等, 然而, 这些微生物来源的脲酶基因簇的基因组组成较为复杂, 编码相应脲酶的活化过程需要所有辅助亚基 UreE、UreF、UreG、UreD/UreH 的参与, 缺一不可, 且相关辅助亚基的功能并不清晰。而来源于解淀粉芽孢杆菌^[17]的基因簇通常包含 UreA、UreB、UreC 共 3 个结构亚基, 基因异源表达及调控的可行性较高, 然而, 已报道来源于解淀粉芽孢杆菌 *B. amyloliquefaciens* JP-21 的脲酶基因簇仅在大肠杆菌系统中重组表达, 难以用于传统发酵食品加工体系。

为达到食品安全应用的要求, 脲酶基因的异源表达备受关注。枯草芽孢杆菌是当前研究得最好的食品安全级微生物 (GRAS)^[18-20], 已被广泛用于生产各种工业酶。植酸酶^[21]等在枯草系统中得以高效生产, 但枯草系统用于表达重组脲酶的研究不多。当前仅有 Liu 等人^[15]在枯草芽孢杆菌中实现了副地衣芽孢杆菌 ATCC 9945a 中含铁脲酶 (Bp_Urease) 的生产, 摇瓶发酵酶活力只达到 1 307 U/L。本研究在枯草芽孢杆菌中实现了基因挖掘所得的解淀粉芽孢杆菌 IT-45 来源的脲酶基因簇 (*ureABC*) 的表达, 并通过密码子优化、核糖体结合位点优化重构脲酶基因簇以及调整基因 *ureC* 的位置来进一步提升脲酶活力, 在酶法降解黄酒中的尿素应用上具有潜力。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株及质粒 *E. coli* JM109、*B. subtilis* WB600; 分别为作者所在实验室保存的克隆和表达宿主菌

株; pP43NMK: 作者所在实验室保存的质粒; 脲酶基因簇 *Ba-urease*: 从 *B. amyloliquefaciens* IT-45 全基因组 (GenBank: CP004065.1) 中获得。

1.1.2 主要试剂 蛋白胨、酵母粉: 购自美国 Oxoid 公司; NaCl、K₂HPO₄·3H₂O、KH₂PO₄、Na₂HPO₄·12H₂O、NaH₂PO₄·2H₂O、NaOH、NaClO、苯酚、亚硝基铁氰化钠、甘油、尿素、三氯乙酸、柠檬酸、柠檬酸钠: 购自国药集团化学试剂公司; 甲醇 (HPLC)、乙腈 (HPLC): 购自上海阿达玛斯试剂有限公司; PrimeSTAR[®] MAX DNA Polymerase、QuickCut Enzyme、Marker: 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; ClonExpress[®] II One Step Cloning Kit: 购自南京诺唯赞生物科技有限公司。

显色剂 I: 苯酚 15 g, 亚硝基铁氰化钠 0.625 g, 用超纯水定容至 250 mL。

显色剂 II: NaOH 13.125 g, NaClO 7.5 mL, 用超纯水定容至 250 mL。

1.1.3 主要仪器 超声波细胞破碎仪: 南京新辰生物科技有限公司; DK-S34 型水浴锅: 上海森信实验仪器有限公司; Five Easy Plus 型 pH 计: 上海 METTLER TOLEDO 公司; C1000 Touch PCR 仪: 美国 Bio-rad 公司; 核酸电泳装置: 美国 Bio-Rad 公司; AlphaImager Mini 凝胶成像仪: 美国 Protein Simple 公司; CYTATION3 酶标仪: 美国 BioTek 公司; Agilent 1260 Infinity II 型高效液相色谱仪: 美国安捷伦科技公司。

1.2 实验方法

1.2.1 基因挖掘 采用 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 的 BLAST 分析工具以及 Clustal Omega 软件 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) 对脲酶编码基因进行核苷酸序列比对、氨基酸序列比对。采用 iTOL v5 (<https://itol.embl.de/itol.cgi>) 对序列比对文件进行系统发育树分析。比较不同来源的脲酶基因结构, 选定研究出发的基因序列。

1.2.2 重组菌的构建与表达 构建质粒所用的引物见表 1。以基因合成所得的包含 *B. amyloliquefaciens* IT-45 中脲酶基因簇的质粒为模板, 用引物 U-F/U-R 扩增脲酶基因簇 *Ba-urease* (*ureABC*)。以质粒 pP43NMK 为模板, 用引物 P-F/P-R 进行质粒线性化。利用 ClonExpress[®] II One Step Cloning Kit 将经胶回收后的基因片段 *Ba-urease* 和线性化质粒 pP43NMK 进行连接, 并转化至 *E. coli* JM109, 挑取

转化子并验证正确,获得质粒 pP43NMK-Ure。

为强化脲酶的表达,通过密码子优化(<http://www.kazusa.or.jp/codon/>)以及核糖体结合位点(RBS)优化(<https://salislab.net/software/>)重新组装所有基因,获得基因 *Ba-urease-1*。为了对结构亚基 UreC 进行强化表达,将 *ureC* 移置至 *ureA* 和 *ureB* 的上游,从而获得基因 *Ba-urease-2*。用引物 U-F1/U-R1、U-F2/U-R2 分别扩增基因 *Ba-urease-1*、*Ba-urease-2*,用引物 P-F1/P-R2、P-F2/P-R2 分别进行

质粒 pP43NMK 线性化,利用 ClonExpress® II One Step Cloning Kit 将经胶回收后的基因片段和线性化质粒进行连接,并转化至 *E. coli* JM109,挑取转化子验证正确,分别获得质粒 pP43NMK-Ure-1、pP43NMK-Ure-2。

最后,将构建成功的重组质粒转化至 *B. subtilis* WB600 中,获得重组表达菌株 *B. subtilis* WB600/pP43NMK-Ure、*B. subtilis* WB600/pP43NMK-Ure-1、*B. subtilis* WB600/pP43NMK-Ure-2。

表 1 质粒构建所用引物

Table 1 Primers used in plasmid construction

引物名称	引物序列(5'-3')
U-F	GGTAAGAGAGGAATGTACACATGAAACTGACACCGTTGAAC
U-R	GACCATGATTACGCCAAGCTTTTAAAAATAAGAAATAACGCTG
P-F	AAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTG
P-R	GTGTACATTCTCTTACCTATAATGGTACCGCTATCAC
U-F1	CGCGCGATTATGTAATAATAAGACACGATAAACTTTACACCCGTC
U-R1	GACCATGATTACGCCAAGCTTTTAGAAAAGGAAGTAACGTTG
P-F1(同 P-F2)	AAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGT
P-R1(同 P-R2)	TTATATTTTACATAATCGCGCGCTTTTTCACGCCCATTTTC
U-F2	CGCGCGATTATGTAATAATAATGCACCTTTCCGGGGAATTCGC
U-R2	GACCATGATTACGCCAAGCTTTTAAACGGATAGCTTCTCCATCC

注:下划线序列为用于组装的同源臂

采用所构建的重组 *B. subtilis* 单菌落,接种于含有 50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素的 5 mL LB 液体培养基中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 的摇床中振荡培养 10 h。按照 3 %的接种体积分数转接于含有 50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素的 100 mL TB 液体培养基中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 的摇床中振荡培养 50 h,每隔一定时间测定菌体浓度及脲酶活力。

1.2.3 酶活测定 酶活单位(U)定义:在常压、37 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 7.0 的条件下,每分钟分解 1 μmol 尿素所需要的酶量。脲酶活力采用 Berthelot 反应比色法^[22]测定:脲酶水解尿素生成氨,氨与苯酚-次氯酸钠反应生成靛酚蓝,从而可以通过检测该显色反应在 625 nm 下的 OD 值变化来表征酶活。

取粗酶液 200 μL ,添加至 200 μL 含有 30 g/L 尿素的 10 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0)中,混匀。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴下反应 20 min,立即加入 200 μL 10%三氯乙酸,混匀终止反应。随后,依次加入 200 μL 显色剂 I 和 200 μL 显色剂 II,混匀后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴下反应 20 min。反应结束后,8 000 r/min 离心 5 min,

适当稀释,以灭活的酶液作为空白对照,测定其 OD_{625 nm} 的变化。使用 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 mmol/L NH_4Cl 溶液进行酶活反应,做出氨离子标准曲线,用于计算反应体系生成氨的总量并计算酶活。

最适反应温度:将粗酶液和尿素混合,在不同温度(20、25、28、30、35、37、40 $^{\circ}\text{C}$)下反应后测定酶活,以最高酶活为 100 %,分别计算不同温度下酶活的相对值。

最适反应 pH:用 10 mmol/L 的柠檬酸、柠檬酸三钠溶液以及 10 mmol/L 的磷酸氢二钾、磷酸二氢钾溶液调节反应体系的 pH(4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0)并测定酶活,以最高酶活为 100%,分别计算不同 pH 下酶活的相对值。

1.2.4 摇瓶发酵条件优化 挑取所构建的重组 *B. subtilis* 单菌落,接种于含有 50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素的 5 mL LB 液体培养基中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 的摇床中振荡培养 10 h。

按 3%的接种体积分数分别转接于含有 50 $\mu\text{g/mL}$

卡那霉素的 100 mL LB、TB、M9 液体培养基中,在 37 ℃、200 r/min 的摇床中振荡培养 50 h,每隔一定时间测定脲酶活力。

分别按 3%、5%、7%、9% 的接种体积分数转接于含有 50 μg/mL 卡那霉素的 100 mL TB 液体培养基中,在 37 ℃、200 r/min 的摇床中振荡培养 50 h,每隔一定的时间测定脲酶活力。

按 3% 的接种体积分数转接于含有 50 μg/mL 卡那霉素的 100 mL TB 液体培养基中,在 37 ℃、200 r/min 的摇床中培养 8 h 后,变温(17、25、28、30、37 ℃)诱导,每隔一定的时间测定脲酶活力。

按 3% 的接种体积分数转接于含有 50 μg/mL 卡那霉素、不同 Ni²⁺ 浓度(0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 mmol/L) 的 100 mL TB 液体培养基中,在 37 ℃、200 r/min 的摇床中振荡培养 50 h,每隔一定时间测定脲酶活力。

1.2.5 尿素降解的测定 反应体系:将 500 μL 粗酶液加至 500 μL 尿素溶液(300 mg/L)中混匀,

37 ℃ 反应 1 h。

反应体系中的尿素含量通过高效液相色谱法(HPLC)测定^[23],样品的处理方法和液相色谱条件参照文献[24]。

2 结果与分析

2.1 基因挖掘与结构分析

通过 NCBI 核苷酸数据库中脲酶各种亚基的编码基因的对比分析发现,不同种属之间的脲酶结构基因同源性很低,但其结构亚基对应的蛋白质氨基酸序列之间同源性较高,其中 *ureC* 编码的 α 结构亚基保守性最高^[25]。在传统酒精饮料发酵过程中会产生乳酸杆菌属、芽孢杆菌属等同属于厚壁菌门的菌株^[26],且对酒精饮料没有安全隐患。所以在厚壁菌门中挖掘 *UreC* 的蛋白质编码序列,并采用 Clustal Omega 软件进行氨基酸序列的比对以及系统发育树的分析,见图 1。

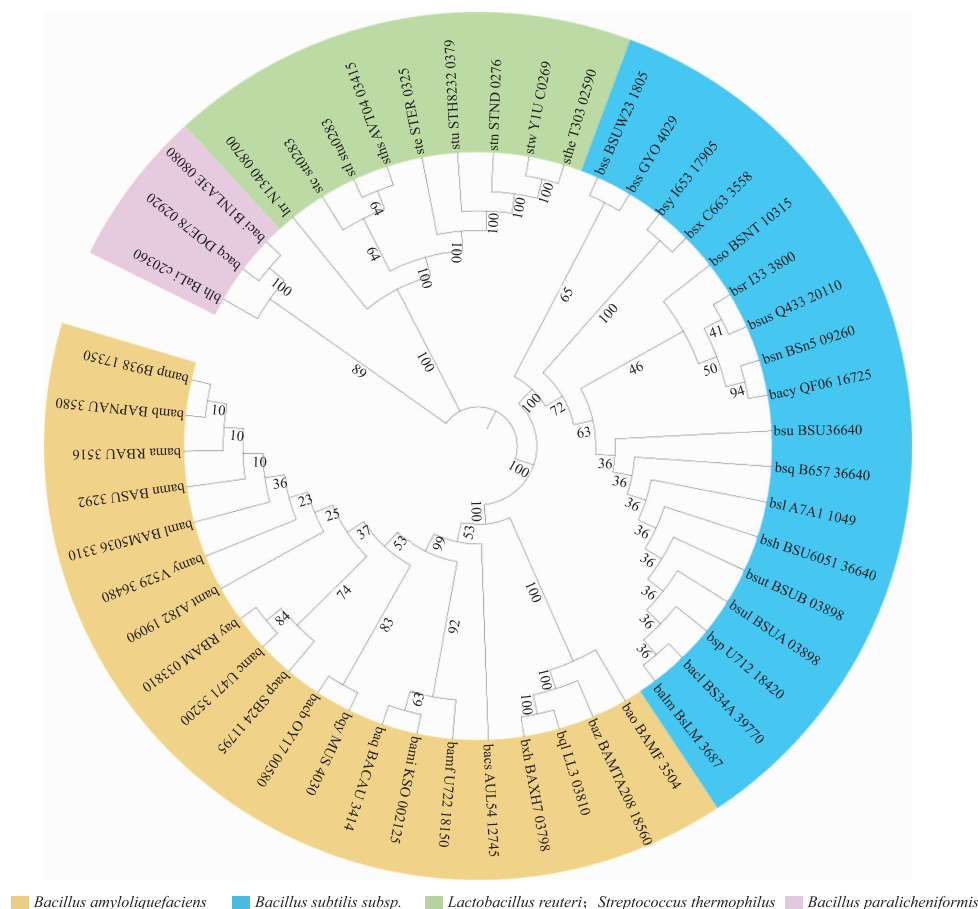


图 1 系统发育树

Fig. 1 Evolutionary tree

对挖掘所得的不同来源的脲酶基因进行结构分析,见图2。发现 *B. amyloliquefaciens* IT-45 基因组 (GenBank:CP004065.1) 中只有 *ureA*、*ureB*、*ureC* 这3个结构基因,无其他辅助基因,且与枯草芽孢杆菌属具有相似的特性。与其处于系统发育树同一分支的 *B. amyloliquefaciens* JP-21 来源脲酶基因簇

已在大肠杆菌中成功表达,并通过点饱和突变提高活性^[17],但在枯草芽孢杆菌中的重组表达有待研究。因此,选择来源于 *B. amyloliquefaciens* IT-45 的脲酶基因簇 *Ba-urease* (*ureABC*) 作为研究出发的脲酶结构基因。

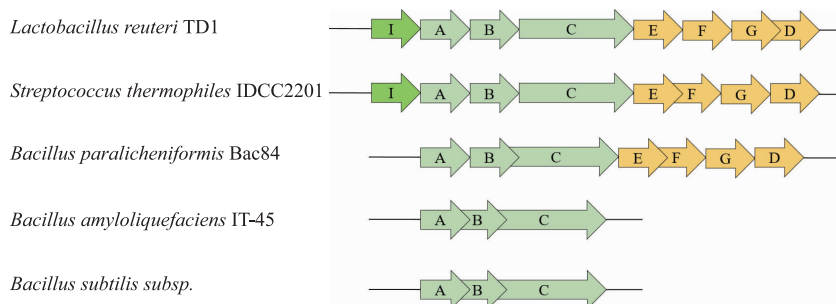


图2 不同来源脲酶的基因簇

Fig. 2 Structures of urease gene clusters in different microorganisms

2.2 脲酶基因的克隆与表达

脲酶基因簇 *Ba-urease* 由3个结构基因 *ureA*、*ureB*、*ureC* 组成,细菌来源的脲酶是由结构亚基 UreA、UreB、UreC 形成的异源多聚体 (UreABC)^{3[27]}。基于脲酶的活化机制,成熟的脲酶蛋白质结构中的结构亚基 (UreA、UreB、UreC) 的数量为 1:1:1^[28],因而可以通过提高结构亚基的表达量来提高脲酶的产量。而作为大亚基的 UreC 是催化亚基,其对脲酶的活力至关重要。此外,文献[29]表明,在同一个操纵子中表达多个基因时,离启动子越远的基因表达量越低。对脲酶基因簇 *Ba-urease* 加以分析,发现各亚基基因之间有重叠,因此,在本研究中对脲酶基因簇进行了完整基因归位、枯草密码子优化、RBS 优化以及将大亚基 UreC 调换至靠近启动子处来进行重构,见图3。核酸电泳验证见图4(a)。由图4(b)的 SDS-PAGE 电泳分析可知,发酵样品经浓缩后,有符合 UreC 的 61 150 大小的条带,超声破碎后上清液有微弱条带,大部分条带均在沉淀中。

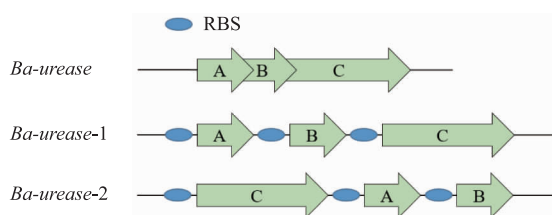


图3 *Ba-urease* 基因簇变换流程

Fig. 3 Manipulation of the *Ba-urease* gene cluster

重组菌株 *B. subtilis* WB600/pP43NMK-Ure 表达原始脲酶基因簇 (*Ba-urease*) 时,发酵后仅能在菌体全细胞时检测到脲酶活力 (6.85 U/mL),见图5。

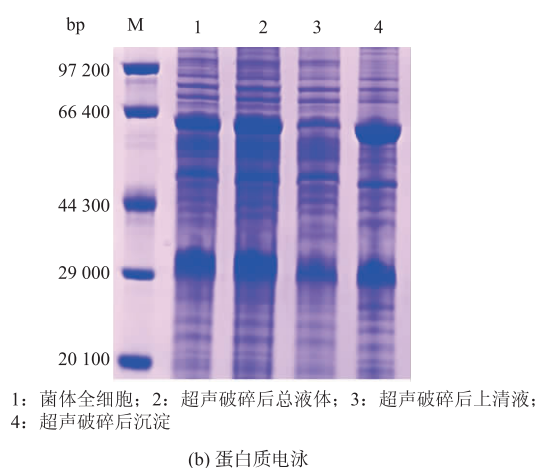
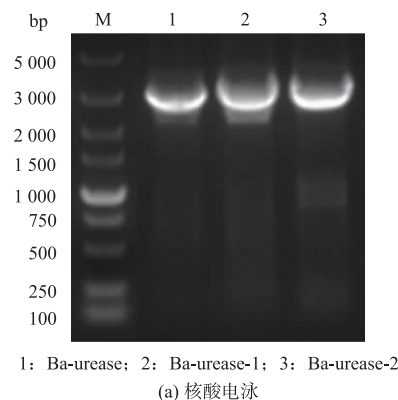
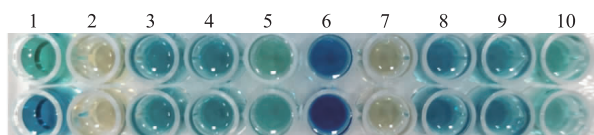


图4 重组菌株的验证

Fig. 4 Verification of recombinant strains



上:对照组;下:实验组;1~5:发酵 10 h;6~10:发酵 20 h;1 和 6:菌体全细胞;2 和 7:发酵上清液;3 和 8:破碎后总液体;4 和 9:破碎后上清液;5 和 10:破碎后沉淀。

图 5 酶活检测的显色反应

Fig. 5 Color reaction of enzyme activity detection

对重组菌株 *B. subtilis* WB600/pP43NMK-Ure、*B. subtilis* WB600/pP43NMK-Ure-1、*B. subtilis* WB600/pP43NMK-Ure-2 发酵 50 h, 前期每隔 5 h 取样, 后期 10 h 取样, 平行测 OD 以及酶活, 见图 6。重组菌 *B. subtilis* WB600/pP43NMK-Ure-1 摇瓶发酵后, 脲酶活力最高可达 9.01 U/mL, 相对于原始脲酶基因簇提高了 31%。重组菌 *B. subtilis* WB600/pP43NMK-Ure-2 摇瓶发酵后, 脲酶活力最高可达 10.15 U/mL, 相对于原始脲酶基因簇提高了 48%, 相对于密码子、RBS 优化重构的基因簇提高了 13%。

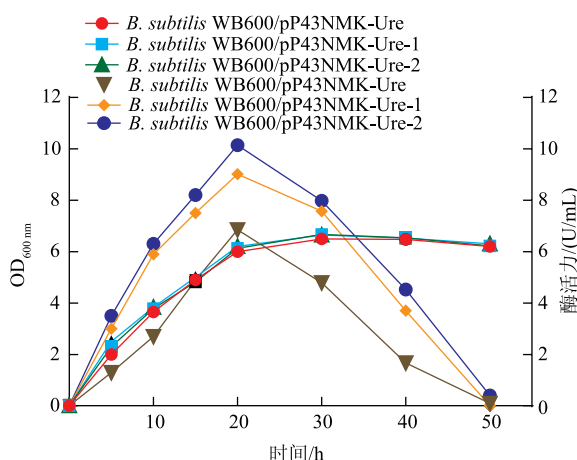


图 6 重组菌株摇瓶发酵酶活力随时间变化曲线

Fig. 6 Time courses of enzyme activity in recombinant strains in shake-flasks

2.3 酶学性质表征

酶分子与底物之间的相互作用和结合概率可以通过提高反应温度来增强, 从而提高酶活, 但是反应温度过高会破坏酶分子的空间结构, 导致酶活丧失, 因此需要选择合适的反应温度来充分发挥酶的催化功能。在 20、25、28、30、35、37、40 °C 下进行测定, 结果见图 7(a)。重组脲酶的最适反应温度为 37 °C, 且在 30~37 °C 范围内可以保持 30% 以上的酶活力。

探究重组脲酶的最适反应 pH, 可以用来评价此重组脲酶能否用于降解黄酒中的尿素。在其他条件不变的情况下, 测定重组脲酶在 pH 4.0~7.0 范围内的酶活力, 结果见图 7(b)。重组脲酶在 pH 6.5 时活力最高, 与 pH 7.0 时相差 0.03 倍, 可得最适反应 pH 范围为 6.5~7.0。

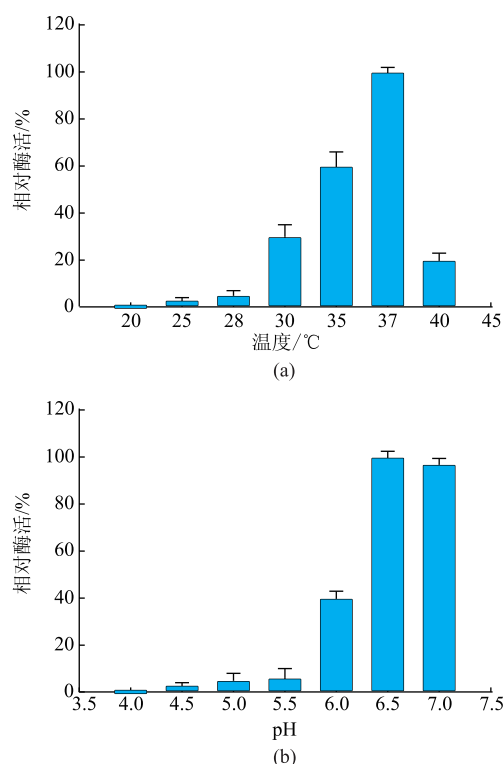


图 7 最适反应条件

Fig. 7 Optimal reaction conditions

发酵乙醇饮料一般为酸性体系, 其中黄酒的 pH 约为 3.5~4.8。目前, 对黄酒中尿素降解有一定效果的是酸性脲酶, 只有日本和美国的少数企业实现了工业化生产, 其使用因安全问题在国内有一定的限制^[30]。国内对酸性脲酶的研究仍处于实验阶段, 尚未达到商业化供应的水平, 这大大限制了酸性脲酶处理黄酒的工业化应用。我国目前市售的脲酶几乎都是植物来源的中性脲酶, 其来源广泛且价格低廉。该酶在中性条件时活性高, 但在酸性条件下酶活极低, 一般认为这种中性脲酶不适用于黄酒中尿素的降解^[13], 需要进行耐酸性改造或固定化研究才有工业化应用的可能性。

2.4 摇瓶发酵优化表征

培养基营养成分和接种体积分数都影响着细胞的生长和蛋白质的表达。选取 LB、TB、M9 培养

基,分别按照 3%、5%、7%、9 %的接种体积分数进行转接,探究其对产酶能力的影响。如图 8(a)、8(b)所示, 营养元素丰富的 TB 培养基发酵产生的脲酶酶活最高,为 10.15 U/mL;接种体积分数为 5%时,酶活为 10.43 U/mL。因而,确定 TB 培养基中 5%接种体积分数为脲酶重组菌 *B. subtilis* WB600/pP43NMK-Ure-2 的最佳条件。

在一定温度范围内,较高的诱导温度可以加速菌体生长和蛋白质合成,但是过快的蛋白质合成速率会导致新生肽链来不及折叠从而形成无活性的包涵体,导致酶活低下甚至没有活性;诱导温度过低会减缓菌体生长,导致蛋白质合成的速率过低,同样会造成酶活低下。为提高脲酶的表达量及活性,需要确定合适的诱导温度。如图 8(c)所示,当诱

导温度为 28 ℃时,脲酶酶活达到 11.3 U/mL,相对于 37 ℃发酵时提高了 11%。因而,确定 28 ℃为重组菌 *B. subtilis* WB600/pP43NMK-Ure-2 表达脲酶的最佳诱导温度。

脲酶是依赖于金属离子的水解酶,在其催化亚基 UreC 中存在 2 个 Ni^{2+} 结合位点^[31],适量添加 Ni^{2+} 可以有效提高脲酶酶活。 Ni^{2+} 添加量过少,无法完全激活脲酶; Ni^{2+} 添加过量,会对菌体产生毒害,影响菌体生长和脲酶酶活。如图 8(d)所示,当 Ni^{2+} 添加量为 4 mmol/L 时脲酶活力最高,脲酶酶活力达到 12.3 U/mL,相对于 28 ℃发酵且不添加 Ni^{2+} 提高了约 9%。因而,确定 4 mmol/L 为脲酶重组菌 *B. subtilis* WB600/pP43NMK-Ure-2 的最佳 Ni^{2+} 添加量。

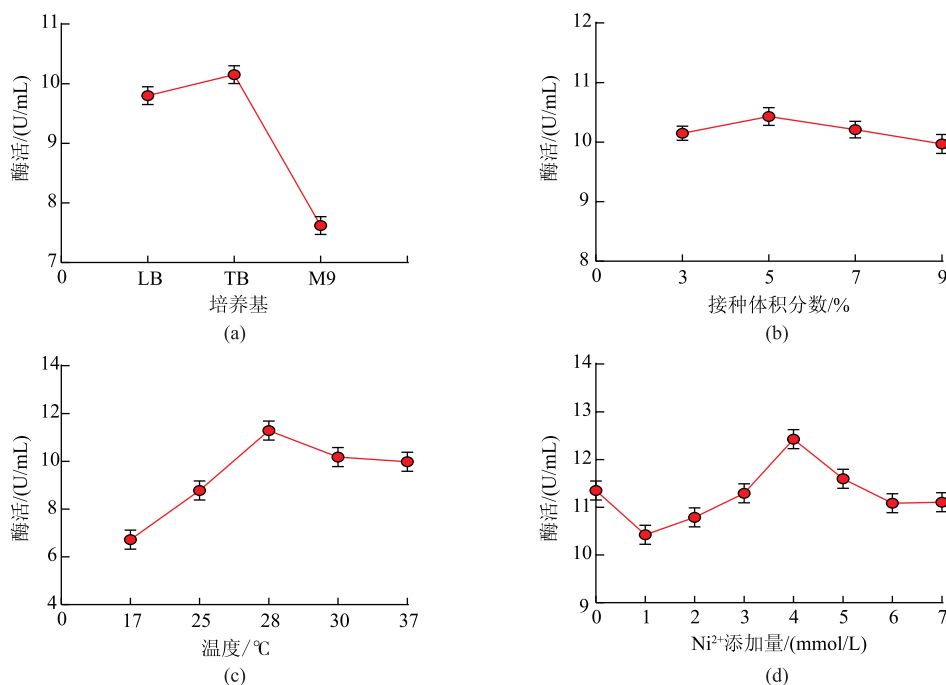


图 8 发酵条件的优化

Fig. 8 Optimization of fermentation conditions

2.5 尿素降解的测定

对重组菌株 *B. subtilis* WB600/pP43NMK-Ure-2 进行最佳条件的发酵,在常压、37 ℃、pH 7.0 的反应条件下,检测到脲酶酶活为 12.5 U/mL。取该条件发酵下得到的粗酶液 500 μL , 加至 500 μL 尿素溶液 (300 mg/L) 中混匀,37 ℃反应 1 h。通过高效液相色谱法检测尿素质量浓度,结果见图 9。反应体系中的尿素质量浓度显著降低,表明该重组脲酶可以有效降解尿素。

3 结 语

在本研究中,作者利用食品级系统 *B. subtilis* WB600/pP43NMK 实现了来源于 *Bacillus amyloliquefaciens* IT-45 的脲酶 *Ba-urease* 的摇瓶发酵表达,并验证了其可以有效降解尿素。

通过前期的脲酶基因挖掘和结构分析,获得了来源于 *B. amyloliquefaciens* IT-45 的只包含 3 个结构亚基的脲酶基因簇 *Ba-urease*。所有亚基的表达对

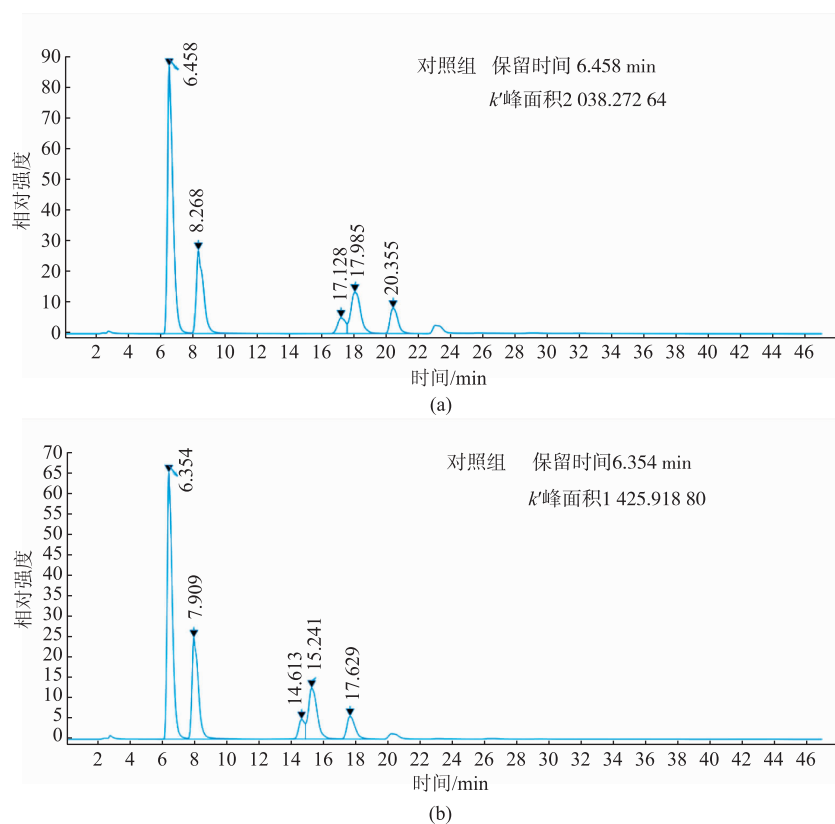


图9 高效液相色谱荧光检测法测定尿素色谱图

Fig. 9 Chromatogram of urea by HPLC-FLD

活力产生都必不可少,因此采用对所有基因进行枯草芽孢杆菌密码子优化、将各亚基重叠部分完全分开并在中间插入优化的核糖体结合位点重新组装脲酶基因簇 *Ba-urease* 的策略,使 *Ba-urease* 的酶活力从 6.85 U/mL 提升至 9.01 U/mL; 通过调整基因 *ureC* 至 *ureA*、*ureB* 前,强化了 *UreC* 的表达,脲酶活力进一步提升至 10.15 U/mL,相对于原始脲酶活力提高了 48%。在此基础上,探究了重组脲酶的酶学性质,可得:最适反应温度为 37 ℃,且在 30~37 ℃ 范围内可以保持 30% 以上的酶活力; 最适反应 pH 范围为 6.5~7.0,为中性脲酶。对重组脲酶 *Ba-urease* 在 100 mL 摇瓶发酵的基础上进行条件优化,最终

确定培养基为 TB、接种体积分数 5%、诱导温度 28 ℃、 Ni^{2+} 添加量 4 mmol/L 的最佳发酵条件,酶活力达到了 12.5 U/mL,相对于原始脲酶活力提高了 82%,这是目前为止解淀粉芽孢杆菌来源脲酶食品级摇瓶发酵的最高值。

基于工业化应用的需求,将重组脲酶 *Ba-urease* 加入尿素溶液中反应,通过高效液相色谱检测到尿素质量浓度显著降低。该重组脲酶安全有效、操作方便,反应 pH 及其稳定性仍需进一步提高。本研究为食品工业中酶法降解黄酒中的尿素提供了一种方法,具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] HUBNER P, GROUX P M, WEIBEL B, et al. Genotoxicity of ethyl carbamate (urethane) in *Salmonella*, yeast and human lymphoblastoid cells[J]. *Mutation Research*, 1997, 390(1-2): 11-19.
- [2] WEBER J V, SHARYPOV V I. Ethyl Carbamate in foods and beverages: a review[J]. *Environmental Chemistry Letters*, 2009, 7(3): 233-247.

- [3] FORKERT P G. Mechanisms of lung tumorigenesis by ethyl carbamate and vinyl carbamate[J]. **Drug Metabolism Reviews**, 2010,42(2):355-378.
- [4] GOWD V, SU H M, KARLOVSKY P, et al. Ethyl carbamate: an emerging food and environmental toxicant[J]. **Food Chemistry**, 2018,248:312-321.
- [5] LACHENMEIER D W. Consequences of IARC re-evaluation of alcoholic beverage consumption and ethyl carbamate on food control[J]. **Deutsche Lebensmittel Rundschau Zeitschrift Für Lebensmittelkunde Und Lebensmittelrecht**, 2007,103(7):307-311.
- [6] ZHAO X R, DU G C, ZOU H J, et al. Progress in preventing the accumulation of ethyl carbamate in alcoholic beverages[J]. **Trends in Food Science & Technology**, 2013,32(2):97-107.
- [7] KRAJEWSKA B. Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: a review[J]. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2009,59(1-3):9-21.
- [8] KAKIMOTO S, SUMINO Y, KAWAHARA K, et al. Purification and characterization of acid urease from *Lactobacillus fermentum*[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 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]. **Journal of Biotechnology**, 1999,68(2-3):227.
- [10] LIU J, XU Y, NIE Y, et al. Optimization production of acid urease by *Enterobacter* sp. in an approach to reduce urea in Chinese rice wine[J]. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 2012,35(4):651-657.
- [11] LIU X F, ZHANG Q, ZHOU N, et al. Expression of an acid urease with urethanase activity in *E. coli* and analysis of urease gene[J]. **Molecular Biotechnology**, 2017,59(2-3):84-97.
- [12] YANG Y Q, KANG Z, ZHOU J L, et al. High-level expression and characterization of recombinant acid urease for enzymatic degradation of urea in rice wine[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2015,99(1):301-308.
- [13] LIU Q T, CHEN Y Q, YUAN M L, et al. A *Bacillus paralicheniformis* iron-containing urease reduces urea concentrations in rice wine[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2017,83(17):e01258.
- [14] LIU Q T, YAO X H, LIANG Q X, et al. Molecular engineering of *Bacillus paralicheniformis* acid urease to degrade urea and ethyl carbamate in model chinese rice wine[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2018,66(49):13011-13019.
- [15] LIU Q T, JIN X R, FANG F, et al. Food-grade expression of an iron-containing acid urease in *Bacillus subtilis*[J]. **Journal of Biotechnology**, 2019,293:66-71.
- [16] ZHANG A N, LIU K, CAO J J, et al. *Staphylococcus cohnii* HFUTY-08: a novel acid urease-producing strain[J]. **Annals of Microbiology**, 2018,68(6):365-374.
- [17] 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[J]. **生物工程学报**, 2020,36(8):1640-1649.
- [18] HE W W, MU W M, JIANG B, et al. Food-grade expression of D-Psicose 3-epimerase with tandem repeat genes in *Bacillus subtilis*[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2016,64(28):5701-5707.
- [19] VAN DIJL J M, HECKER M. *Bacillus subtilis*: from soil bacterium to super-secreting cell factory[J]. **Microbial Cell Factories**, 2013,12(1):3.
- [20] SCHUMANN W. Production of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*[J]. **Advances in Applied Microbiology**, 2007,62:137-189.
- [21] FARHAT-KHEMAKHEM A, FARHAT M B, BOUKHRIS I, et al. Heterologous expression and optimization using experimental designs allowed highly efficient production of the PHY US417 phytase in *Bacillus subtilis* 168[J]. **AMB Express**, 2012,2(1):10.
- [22] WEATHERBURN M W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia[J]. **Analytical Chemistry**, 1967,39(8):971-974.
- [23] CLARK S, FRANCIS P S, CONLAN X A, et al. Determination of urea using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection after automated derivatisation with xanthidrol[J]. **Journal of Chromatography A**, 2007,1161(1-2):207-213.

- [24] 郭双丽. 中国黄酒贮存过程中尿素对氨基甲酸乙酯形成的影响及其物理减除技术研究[D]. 无锡:江南大学,2016.
- [25] FARRUGIA M A,MACOMBER L,HAUSINGER R P. Biosynthesis of the urease metallocenter[J]. **Journal of Biological Chemistry**,2013,288(19):13178-13185.
- [26] 王雪山. 不同环境清香类型白酒发酵微生物种群结构比较及溯源解析[D]. 无锡:江南大学,2018.
- [27] BENINI S,RYPNIEWSKI W R,WILSON K S,et al. A new proposal for urease mechanism based on the crystal structures of the native and inhibited enzyme from *Bacillus pasteurii*:why urea hydrolysis costs two nickels[J]. **Structure**,1999,7(2):205-216.
- [28] KARINE K,ANGELA R P,CELIA R C,et al. Ureases:Historical aspects,catalytic,and non-catalytic properties - a review[J]. **Journal of Advanced Research**,2018,13:3-17.
- [29] JUMINAGA D,BAIDOO E E K,REDDING-JOHANSON A M,et al. Modular engineering of L-tyrosine production in *Escherichia coli*[J]. **Applied and Environmental Microbiology**,2012,78(1):89-98.
- [30] 范文来,王栋. 近10年我国传统饮料酒白酒和黄酒品质安全研究现状与展望[J]. 食品安全质量检测学报,2019,10(15):4811-4829.
- [31] MARONEY M J,CIURLI S. Nonredox nickel enzymes[J]. **Chemical Reviews**,2014,114(8):4206-4228.

科技信息

美国批准反式-2-己烯醛作为动物用食品防腐剂

2022年4月11日,美国食品药品监督管理局(FDA)发布2022-07683号文件,根据Anitox Corporation提交的申请,修订食品添加剂法规,允许安全使用反式-2-己烯醛(Trans-2-hexenal)作为防腐剂用于家禽和猪类的食品。

[信息来源] 江苏省技术性贸易措施信息平台.美国批准反式-2-己烯醛作为动物用食品防腐剂[EB/OL]. (2022-4-24). <http://www.tbt.org.cn/>