

氨基甲酸乙酯水解酶的分离纯化及酶学性质

李京京^{1,2}, 方芳^{1,2}, 张继冉^{1,2}, 刘龙^{*1,2,3}, 堵国成^{1,2,3,4}, 陈坚^{1,2,4}

(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. 食品安全与营养协同创新中心, 江苏 无锡 214122; 3. 江南大学 糖化学与生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 4. 江南大学 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 氨基甲酸乙酯是发酵食品生产过程中的副产物, 具有致癌性和遗传毒性, 影响食品安全。酶法降解氨基甲酸乙酯是一种高效安全的去毒方法。从小鼠肠道筛选得到一株具有降解氨基甲酸乙酯活性的赖氨酸芽孢杆菌。通过对其细胞破碎上清液进行硫酸铵沉淀、离子交换层析、疏水层析和凝胶层析分离纯化, 得到了氨基甲酸乙酯水解酶纯酶。SDS-PAGE 电泳图显示, 该酶亚基分子量约为 50 kDa。该酶最适反应温度为 35 ℃, 最适 pH 值为 7.0, 在 10~45 ℃时, 具有良好的热稳定性。以氨基甲酸乙酯为底物反应, 其 K_m 和 K_{cat} 分别为 37.2 mmol/L 和 1 176.4 s⁻¹。金属离子显著抑制酶活力, 而 EDTA 对酶活力无影响, 表明此酶为非金属酶。此外, 该酶对低浓度的 NaCl 和乙醇有一定的耐受性, 具有在酱油和黄酒中去除氨基甲酸乙酯的应用潜力。

关键词: 赖氨酸芽孢杆菌; 氨基甲酸乙酯; 氨基甲酸乙酯水解酶; 分离纯化; 酶学性质

中图分类号: Q 556.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2014)12—1239—07

Purification and Characterization of an Urethanase

LI Jingjing^{1,2}, FANG Fang^{1,2}, ZHANG Jiran^{1,2}, LIU Long^{*1,2,3}, DU Guocheng^{1,2,3,4}, CHEN Jian^{1,2,4}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Synergetic Innovation Center of Food Safety and Nutrition, Wuxi 214122, China; 3. The Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 4. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Ethyl carbamate (EC, or urethane), a by-product of fermented food, has been shown to be possible carcinogenic and genotoxic to human. Enzymatic removal of EC from fermented foods and beverages is an efficient and safe method. *Lysinibacillus fusiformis*, a strain isolated from the gastrointestinal tracts of mice, showed the activity of hydrolyzing urethane. The protein with urethanase activity was purified to electrophoretic homogeneity by ammonium sulfate precipitation, ion exchange chromatography, hydrophobic interaction chromatography and gel filtration chromatography. The monomeric molecular weight of this urethanase was detected to be approximate

收稿日期: 2014-03-24

基金项目: 国家 973 计划项目 (2012CB720802)。

* 通信作者: 刘龙 (1980—), 男, 山东诸城人, 工学博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事营养化学品的微生物制造及工业酶的分子改造研究。E-mail: longliu@jiangnan.edu.cn

50 kDa by SDS-PAGE. Enzymatic properties analysis demonstrated that the purified enzyme was stable at temperature range 10~45 °C, the optimal reaction conditions of it was determined to be at 35 °C and at pH 7.0. Using urethane as the substrate, the kinetic constants of K_m and K_{cat} were detected to be 37.2 mmol/L and 1 176.4 s⁻¹, respectively. The activity was inhibited by metal ions while EDTA had no effect on enzyme activity. The results showed that the urethanase was not an ion-associated enzyme. In addition, the enzyme showed tolerance to low concentration of ethanol and NaCl, indicating its potential applications in removing urethane from fermented products (rice wine and soy sauce).

Keywords: *Lysinibacillus fusiformis*, ethyl carbamate, urethanase, purification, enzymatic properties

氨基甲酸乙酯(ethyl carbamate, EC)是发酵食品^[1-2]和发酵酒^[3-4]生产过程中自然产生的副产物,对人体具有潜在的致癌性和遗传毒性^[5-6],能够引起肺肿瘤、肝癌、皮肤癌等。2007年,世界卫生组织的国际癌症研究机构将氨基甲酸乙酯由2B类致癌物提升为2A类^[7]级别。因此,EC在发酵食品中的存在可能会影响人体健康,必须采取有效措施控制EC在发酵食品中的含量。

研究人员采取一些措施控制氨基甲酸乙酯的生成。如通过选育低产尿素酵母菌^[8]、向发酵食品中添加脲酶^[9]、控制发酵条件^[10-11]等方法来减少葡萄酒和韩国传统米酒中氨基甲酸乙酯的生成量,但是由于氨基甲酸乙酯生成途径多样^[12],上述方法不能解决其他途径生成氨基甲酸乙酯的问题。并且氨基甲酸乙酯性质稳定,一旦形成不容易去除。20世纪90年代,国外学者分别从小鼠粪便和小鼠肠道中筛选得到了柠檬酸杆菌和地衣芽孢杆菌等氨基甲酸乙酯降解菌株^[13-14],但由于其产酶能力低下,难以满足食品工业中的实际应用,并且降解菌株的食品安全性问题也是影响其应用的原因之一。近几年,国内研究者也筛选到能够降解氨基甲酸乙酯的菌株^[15-16],并对其性质进行了研究。但各种微生物的降解特性不同,且发酵食品的成分复杂,限制了降解菌株的实际应用。因此,筛选更多能够降解氨基甲酸乙酯的食品级安全菌株,研究其降解特性,并实现氨基甲酸乙酯降解酶的外源表达,对食品中氨基甲酸乙酯的去除尤为重要。

作者从小鼠肠道内筛选得到一株能够降解氨基甲酸乙酯的赖氨酸芽孢杆菌,并考察了氨基甲酸乙酯水解酶纯酶的酶学特性,为今后酶的定向分子改造和修饰、提高催化效率、奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 氨基甲酸甲酯(Methyl carbamate)、氨基甲酸乙酯(Ethyl carbamate)、氨基甲酸丁酯(n-Butyl carbamate)、乙酰胺(Acetamide)、谷氨酰胺(L-glutamine)、苯甲酰胺(Benzamide),均购自Sigma-Aldrich公司;蛋白质分子量标准,购自碧云天公司;酵母粉、蛋白胨,购自Oxoid公司;其他常用试剂均为市售分析纯。

1.1.2 仪器 HiTrap Q XL、Phenyl HP、Mono Q、Superdex-200 prep grade 纯化柱, KTA FPLC 蛋白质纯化系统, 购自GE公司; Mini-PROTEAN® 蛋白质电泳系统、Gel Doc™ XR+凝胶成像系统, 购自美国伯乐公司。

1.1.3 菌种 赖氨酸芽孢杆菌 *Lysinibacillus fusiformis* SCO₂ 由作者所在研究室分离自小鼠肠道内,并保藏于中国典型微生物菌种保藏中心,保藏编号为CCTCC NO. M2012414。

1.1.4 培养基

1)种子培养基(LB液体培养基):蛋白胨 10 g/L,酵母粉 5 g/L,氯化钠 10 g/L;pH 7.0。

2)活化培养基(LB固体培养基):在LB液体培养基中添加琼脂粉 20 g/L。

3)发酵培养基(营养肉汤培养基):蛋白胨 10 g/L,牛肉膏 3 g/L,氯化钠 5 g/L;pH 7.0。

1.2 方法

1.2.1 酶活力测定 根据Berthelot反应^[17]显色法,在波长625 nm下测定吸光值,计算酶活。具体步骤如下:取两支10 mL的比色管,分别加入1 mL酶液和超纯水。然后在两管中分别加入1 mL含3 g/dL

氨基甲酸乙酯的 20 mmol/L 磷酸缓冲液,振荡混匀,在 37 ℃ 恒温水浴箱中反应 15 min 后,在两管中各加入 1 mL 终止剂(体积分数 10% 的三氯乙酸),混匀后加入显色剂,强烈震荡混匀,继续在 37 ℃ 恒温水浴箱中保温 20 min 后取出,用超纯水定容到 10 mL,625 nm 处比色,并计算酶活。在此实验条件下,定义每分钟分解底物产生 1 μmol NH_4^+ 所需的酶量为一个酶活力单位(U)。

1.2.2 蛋白质浓度测定 以牛血清白蛋白质(BSA)为标准,采用 Bradford 法^[18]测定蛋白质含量。

1.2.3 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析 根据《工业微生物实验手册》中方法^[19],对纯化后的氨基甲酸乙酯水解酶蛋白质进行 SDS-PAGE。上层浓缩胶质量分数为 5%,下层分离胶质量分数为 12%。首先采用电压 80 V,聚集蛋白质,至蛋白质进入分离胶后,电压改为 100 V,当蛋白质染料电泳至凝胶底部时,结束电泳。经考马斯亮蓝 R-250 溶液染色 1 h,甲醇-冰醋酸脱色液脱色 2 h,观察凝胶,确定酶蛋白质相对分子质量。

1.2.4 赖氨酸芽孢杆菌氨基甲酸乙酯水解酶的分离纯化

1)粗酶液的制备:将保存于-80 ℃ 冰箱的菌种,在含有 3 g/dL 氨基甲酸乙酯的平板上划线培养,挑取单菌落接种于种子培养基培养过夜,转接营养肉汤液体培养基中,摇床转速 200 r/min,30 ℃ 培养 24 h。4 ℃ 下 10 000 r/min 离心 20 min,弃上清液收集菌体。用 20 mmol/L pH 7.0 的磷酸盐缓冲溶液洗涤 2 次后重悬菌体。将待破样品放于冰水浴上,超声功率 25 W,破 1 s 停 1 s 超声破碎至溶液清亮。将破碎液于 4 ℃、10 000 r/min 离心 20 min,收集上清液即为所需粗酶液。

2)硫酸铵分级沉淀:将固体硫酸铵研磨至细粉状,在 70 ℃ 烘箱中烘干至恒质量。将固体硫酸铵缓慢加入到粗酶液中并不断搅拌,至 30% 饱和度,4 ℃ 静置 4 h,10 000 r/min 离心 20 min,弃沉淀取上清液。向上清液中继续加入固体硫酸铵至 80% 饱和度,如上述条件下进行沉淀,后离心弃上清液取沉淀。将蛋白质沉淀溶解于适量 20 mmol/L pH 7.0 的磷酸盐缓冲溶液中,用 10 kDa 透析袋在相同的缓冲溶液中对蛋白质样品透析脱盐至无 NH_4^+ 存在。

3)离子交换层析:起始缓冲液 A 为 20 mmol/L pH 7.0 的磷酸盐缓冲溶液。洗脱缓冲液 B 为含

1 mol/L NaCl 的 20 mmol/L pH 7.0 的磷酸盐缓冲溶液。采用 HiTrap Q XL 1 mL 的阴离子交换柱,先用起始缓冲液平衡交换柱,上样后用洗脱缓冲液梯度洗脱蛋白质,采用梯度体积分数 20% B,40% B,60% B,80% B,100% B 液洗脱,体积流量为 1 mL/min,收集 2 mL/管,测定各管酶活,合并有活性管并透析除盐。

4)疏水层析:起始缓冲液 C 为 20 mmol/L pH 7.0 的磷酸盐缓冲溶液。洗脱缓冲液 D 为含 1 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的 20 mmol/L pH 7.0 的磷酸盐缓冲溶液。向蛋白质样品中缓慢加入固体硫酸铵至终浓度为 1 mol/L,经 0.22 μm 滤膜过滤,上样于提前经 D 液平衡的 Phenyl HP 1 mL 的疏水柱,采用梯度体积分数 100% D,80% D,60% D,40% D,20% D 液洗脱,体积流量为 1 mL/min,收集 2 mL/管,分别测定收集各管酶活性,合并活性管并透析除盐。

5)离子交换层析:起始缓冲液 E 为 20 mmol/L pH 7.0 的磷酸盐缓冲溶液。洗脱缓冲液 F 为含 1 mol/L NaCl 的 20 mmol/L pH 7.0 的磷酸盐缓冲溶液。将上步纯化的蛋白质上样至 Mono Q 5/50GL 离子柱,采用线性洗脱方式,体积流量为 1 mL/min,收集 2 mL/管,测定各管收集液酶活,合并有活性各管。

6)凝胶过滤层析:Superdex-200 prep grade 凝胶柱,进样量为 0.5 mL,柱体积 120 mL,缓冲液为 20 mmol/L pH 7.0 的磷酸盐缓冲溶液,体积流量 0.5 mL/min。收集出峰处酶液,测定不同出峰处酶活,合并有酶活各管,SDS-PAGE 检测。

1.2.5 氨基甲酸乙酯水解酶的酶学性质

1)酶的最适反应温度和热稳定性:将纯化得到的酶液与底物分别在 15、20、25、30、35、40、45、50、55、60 ℃ 不同的温度下反应,测定相应条件下的酶活,确定酶的最适反应温度。将酶液在上述不同的温度条件下保温 1 h 后,调整酶液至最适反应温度,并在最适温度下测定残余酶活力,确定酶的热稳定性。

2)酶的最适反应 pH:酶促反应分别在柠檬酸盐缓冲液(pH 4.0~6.0)、磷酸盐缓冲液(pH 7.0~7.5)、硼酸盐缓冲液(pH 8.0)的缓冲体系中反应,反应结束测定不同 pH 条件下的酶活,确定最适反应 pH。

3)酶对 NaCl 和乙醇的耐受性检测:将纯化得到的氨基甲酸乙酯水解酶在不同 NaCl 的缓冲液中保温 1 h(对照组添加相应质量分数 NaCl),测定酶活,计算各 NaCl 质量分数条件下相对酶活,确定

NaCl 对酶活稳定性的影响。将纯化得到的氨基甲酸乙酯水解酶在不同体积分数乙醇缓冲液中保温 1 h (对照组添加相应体积分数乙醇),测定酶活,计算各乙醇条件下相对酶活,确定乙醇对酶活稳定性的影响。

4)金属离子、EDTA 对酶活力的影响:将酶液与终浓度为 1 mmol/L 的金属离子或 EDTA 的缓冲液混合,在 37 °C 条件下保温 5 min,测定酶活力。以未添加金属离子测得酶活为 100%, 确定金属离子对酶活力的影响。

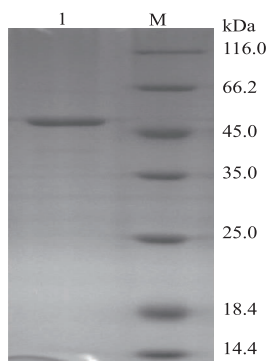
5)酶的底物特异性检测:在最适温度和最适 pH 条件下,将纯酶液分别与质量浓度为 3 g/dL 氨基甲酸乙酯、氨基甲酸甲酯、氨基甲酸丁酯、乙酰胺、L-谷氨酰胺、苯甲酰胺反应,测定相应酶活,以酶对氨基甲酸乙酯的酶活为 100%, 换算得到酶对其他底物的降解活性。

6)动力学参数的确定:分别测定氨基甲酸乙酯水解酶在 1~30 mmol/L 氨基甲酸乙酯体系中的反应速度,根据底物浓度与反应初速度之间的关系,利用 Lineweaver-Burk 双倒数法确定动力学参数 K_m 与 K_{cat} 。

2 结果与分析

2.1 赖氨酸芽孢杆菌氨基甲酸乙酯水解酶的分离纯化

将细胞破碎后获得的粗酶液依次经过硫酸铵沉淀、离子层析、疏水层析和凝胶层析多步纯化,得到氨基甲酸乙酯水解酶的纯酶。SDS-PAGE 蛋白质电泳检测(图 1)显示,纯化结果为单一条带,达到电泳纯,亚基分子量大小约为 50 kDa。经过纯化(表 1),氨基甲酸乙酯水解酶的纯度提高了 279 倍,回收率为 7%,酶的比活力达 81.7 U/mg。



M: molecular mass markers; 1: purified urethanase

图 1 纯化后的赖氨酸芽孢杆菌氨基甲酸乙酯水解酶

Fig. 1 Purified urethanase from *Lysinibacillus fusiformis*

表 1 赖氨酸芽孢杆菌氨基甲酸乙酯水解酶的纯化

Table 1 Purification of urethanase from *Lysinibacillus fusiformis*

步骤	总蛋白 质/mg	总活力/ U	比活力/ (U/mg)	提纯 度/倍	产率/ %
粗提液	1380.0	404.0	0.3	1.0	100
30%~80% (NH ₄) ₂ SO ₄	494.1	228.2	0.5	1.6	57
HiTrap Q XL	118.7	186.4	1.6	5.4	46
Phenyl High Performance	3.6	135.7	37.3	127.3	34
Mono Q	1.0	42.0	40.0	136.5	10
Superdex-200 prep grade	0.4	28.7	81.7	278.9	7

2.2 酶反应的最适温度及其稳定性

如图 2 所示,在 10~60 °C 的范围内,随着温度的逐渐升高,酶活呈现先上升后下降的趋势,最适反应温度为 35 °C;当反应温度超过 45 °C 后,酶活急剧下降,但在 60 °C 时仍保持 20% 的酶活。

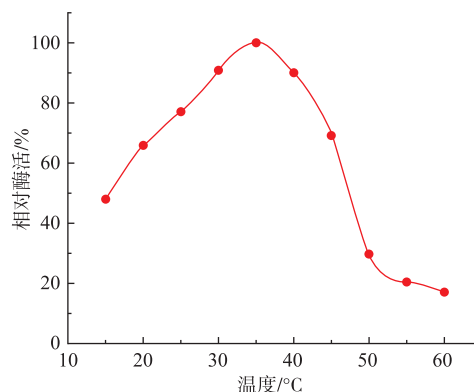


图 2 反应温度对氨基甲酸乙酯水解酶的活力影响

Fig. 2 Effects of temperature on the activity

由图 3 可以看出,当酶液在温度为 10~45 °C 条件下,酶活力可保持 90% 以上,具有较好的稳定性;高于 45 °C 后,酶活稳定性显著下降,当温度达到 55 °C 以上,酶活几乎完全丧失。

2.3 酶反应的最适 pH

pH 值对酶活性的影响如图 4 所示。当 pH 值在 4.0~7.0 范围内,随着 pH 的升高,酶活逐渐升高,在 pH 为 7.0 时,酶活力达到最高;当 pH 高于 7.0 后,酶活急剧下降;在 pH 为 8.0 时,酶活力完全丧失。上述结果表明,该氨基甲酸乙酯水解酶为中性酶。

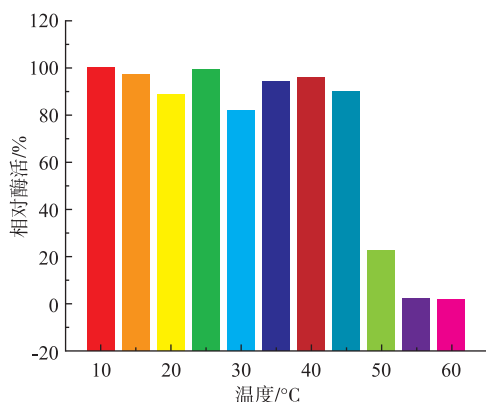


图3 温度对氨基甲酸酯水解酶稳定性的影响

Fig. 3 Effects of temperature on urethanase stability

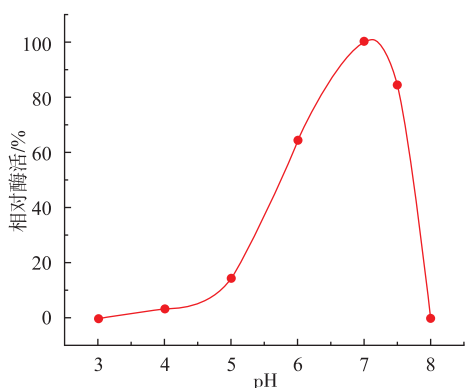


图4 反应 pH 值对氨基甲酸酯水解酶酶活的影响

Fig. 4 Effects of pH on urethanase activity

2.4 酶对盐和乙醇的耐受性

氨基甲酸酯水解酶对 NaCl 和乙醇的耐受性分别如图 5 和图 6 所示。随着 NaCl 质量分数和乙醇体积分数的增加,酶活性都呈下降趋势。当 NaCl 质量分数为 10% 时,酶活保留了 10%,当 NaCl 质量分数为 15% 时,残余酶活力为未经 NaCl 处理酶活的 8%。乙醇的添加同样抑制了氨基甲酸酯水解酶的活性,当乙醇体积分数为 10% 时,酶活力保持了 20% 左右,乙醇体积分数为 18% 时,残余酶活力为 5%。该结果表明,此氨基甲酸酯水解酶对低质量分数的 NaCl 和低体积分数乙醇具有一定耐受性,可为在酱油和黄酒中使用提供参考。

2.5 金属离子与 EDTA 对酶活力的影响

各种金属离子和 EDTA 对氨基甲酸酯水解酶活力的影响如表 2 所示,考察的所有金属离子对酶活力有不同程度的抑制作用。 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 和 Mg^{2+} 抑制了 15%~20% 的酶活力, Fe^{2+} 和 Ni^{2+} 分别使酶活降为原来的 49% 和 48%,而 Cu^{2+} 严重抑制酶

活达 72%。上述金属离子对酶活力无激活作用,且金属整合剂 EDTA 对酶活力无显著影响,表明此酶是非金属依赖型酶。

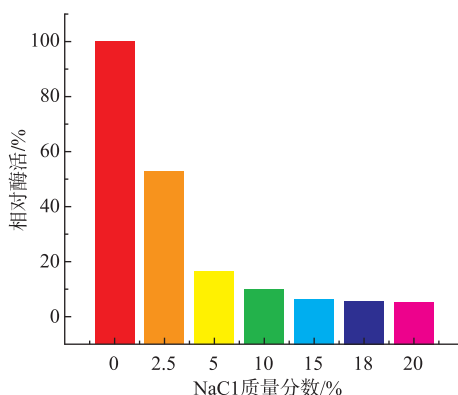


图5 氨基甲酸酯水解酶对 NaCl 的耐受性

Fig. 5 Effects of NaCl on urethanase activity

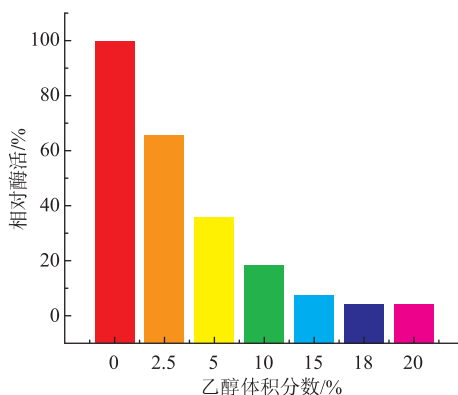


图6 氨基甲酸酯水解酶对乙醇的耐受性

Fig. 6 Effects of ethanol on urethanase activity

表2 金属离子与 EDTA 对酶活力的影响

Table 2 Effects of metal ions and EDTA on urethanase activity

金属离子或金属整合剂	相对酶活/%
$MnCl_2$	86
$FeSO_4$	49
$ZnCl_2$	85
$CaCl_2$	85
$CoCl_2$	79
$CuSO_4$	28
$MgCl_2$	79
$NiCl_2$	48
EDTA	106

2.6 酶的底物特异性

为了考察氨基甲酸酯水解酶的底物特异性,

分别以氨基甲酸甲酯、氨基甲酸乙酯、氨基甲酸丁酯、乙酰胺、苯甲酰胺和谷氨酰胺为底物,检测该酶对不同底物的水解能力。由表 3 可知,以氨基甲酸甲酯、氨基甲酸乙酯、氨基甲酸丁酯为底物时,随着底物碳原子的增加,该酶的水解能力逐渐降低,对氨基甲酸丁酯的降解活性仅为对氨基甲酸乙酯的 8%。此酶对乙酰胺有一定的降解作用,而对苯甲酰胺和谷氨酰胺则没有降解效果。底物特异性的考察表明,此酶能够特异性降解氨基甲酸乙酯。

表 3 氨基甲酸乙酯水解酶底物特异性

Table 3 Substrate specificity of urethanase

底物	相对酶活/%
Methyl carbamate	107
Ethyl carbamate	100
n-Butyl carbamate	8
Acetamide	82
Benzamide	0
L-glutamine	0

2.7 酶反应动力学

如图 7 所示,以氨基甲酸乙酯为底物,测定不同底物浓度下酶促反应速率。

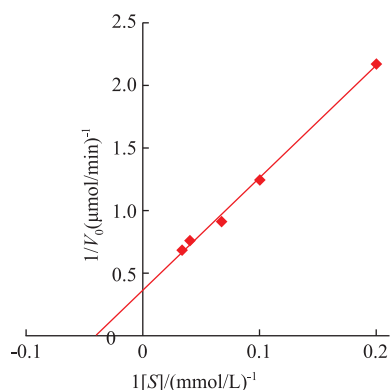


图 7 赖氨酸芽孢杆菌氨基甲酸乙酯水解酶催化氨基甲酸乙酯的 Lineweaver-Burk 图

Fig. 7 Lineweaver -Burk plots of purified urethanase from *Lysinibacillus fusiformis*

参考文献:

- [1] International Agency for Research on Cancer. Alcoholic beverage consumption and ethyl carbamate (urethane) [J]. **IARC Momographs**, 2007, 96: 1-5.
- [2] Fu M L, Liu J, Chen Q H, et al. Determination of ethyl carbamate in Chinese yellow rice wine using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection[J]. **Int J Food Sci Tech**, 2010, 45: 1297-1302.

根据 Lineweaver-Burk 双倒数法得到方程

$$y=10.265x+0.2736 \quad (R^2=0.999)$$

计算得出该氨基甲酸乙酯水解酶的 K_m 值为 37.5 mmol/L, 转化数 K_{cat} 为 $1\ 176.4\ s^{-1}$ 。

3 讨论

课题研究中首次分离纯化得到一种来自赖氨酸芽孢杆菌的氨基甲酸乙酯水解酶,并考察其酶学性质。SDS-PAGE 显示其亚基分子量约为 50 kDa,不同于地衣芽孢杆菌^[14](亚基分子量 42 kDa)、马红球菌^[20](亚基分子量 55 kDa)、肺炎克雷伯氏菌^[21](亚基分子量 55 kDa) 和变幻青霉^[22](亚基分子量 13.7 kDa) 来源的氨基甲酸乙酯水解酶的亚基分子量,表明此酶是一种新型的氨基甲酸乙酯水解酶。金属离子对不同微生物源的氨基甲酸乙酯水解酶影响不同,如终浓度 1 mmol/L 的 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Ca^{2+} 对地衣芽孢杆菌^[14]氨基甲酸乙酯水解酶无激活作用,而来源于肺炎克雷伯氏菌^[21]的氨基甲酸乙酯水解酶活力却受到 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Ca^{2+} 的显著激活,酶活提高 15% 左右。在实验中发现, Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 显著抑制了该氨基甲酸乙酯水解酶的活性,而 EDTA 对酶活性无影响,其机理有待进一步研究。底物特异性的考察表明,其对氨基甲酸甲酯、氨基甲酸乙酯和氨基甲酸丁酯的水解活性依次减小,与来源于地衣芽孢杆菌^[14]的水解活性相反,其是随着底物碳链长度的增加,酶活力增强。考察此酶酶学性质,发现其能够耐受质量分数 15% 的 NaCl 和体积分数 15% 的乙醇,保温 1 h 后,残余酶活逾 8%,具有应用在含盐和乙醇的食品(酱油和黄酒等)中的潜力。

纯化后的酶蛋白质可通过 N 端测序并与 NCBI 数据库比对得到序列信息,将有助于通过设计简并引物和基因克隆的方式获得该氨基甲酸乙酯水解酶的编码基因,从而为外源高效表达、蛋白结构解析、催化机理的阐明和酶分子的定向改造奠定基础,并实现应用于不同食品中降解氨基甲酸乙酯。

- [3] Hasnip S, Crews C, Potter N, et al. Survey of ethyl carbamate in fermented foods sold in the United Kingdom in 2004 [J]. **J Agr Food Chem**, 2007, 55: 2755–2759.
- [4] EFSA. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the European Commission on ethyl carbamate and hydrocyanic acid in food and beverages[J]. **EFSA**, 2007, 551: 1–44.
- [5] Miller Y E, Dwyer–Nield L D, Keith R L, et al. Induction of a high incidence of lung tumors in C57BL/6 mice with multiple ethyl carbamate injections[J]. **Cancer Lett**, 2003, 198(2): 139–144.
- [6] Weber J V, Sharypov V I. Ethyl carbamate in foods and beverages: A review[J]. **Environ Chem Lett**, 2009, 7(3): 233–247.
- [7] Baan R, Straif K, Grosse Y, et al. Carcinogenicity of alcoholic beverages[J]. **Lancet Oncol**, 2007, 8(4): 292–293.
- [8] Kitamoto K, Oda–Miyazaki K, Gomi K, et al. Mutant isolation of non–urea producing sake yeast by positive selection [J]. **J Ferment Bioeng**, 1993, 75(5): 359–363.
- [9] Yang L Q, Wang S H, Tian Y P. Purification, properties and application of a novel acid urease from *Enterobacter* sp [J]. **Appl Biochem and Biotech**, 2010, 160(2): 303–313.
- [10] Stevens D F, Ough C S. Ethyl carbamate formation: Reaction of urea and citrulline with ethanol in wine under low to normal temperature conditions[J]. **Am J Enol Viticult**, 1993, 44: 309–312.
- [11] Woo I S, Kim I H, Yun U J, et al. An improved method for determination of ethyl carbamate in Korean traditional rice wine [J]. **J Ind Microbiol Biot**, 2001, 26(6): 363–368.
- [12] 吴世嘉, 王洪新. 发酵食品中氨基甲酸酯的研究进展[J]. 化学与生物工程, 2009, 26(9): 15–19.
WU Shijia, WANG Hongxin. Research advancement of ethyl carbamate in fermented food[J]. **Chem Bioeng**, 2009, 26(9): 15–19. (in Chinese)
- [13] Zhao C J, Kobashi K. Urethanase in rat tissues[J]. **J Toxicol Env Heal A**, 1992, 37: 37–45.
- [14] Zhao C J, Kobashi K. Purification and characterization of iron–containing urethanase from *Bacillus licheniformis* [J]. **Biol Pharm Bull**, 1994, 17(6): 773–778.
- [15] Zhou N D, Gu X L, Tian Y P. Isolation and characterization of urethanase from *Penicillium variable* and its application to reduce ethyl carbamate contamination in Chinese rice wine[J]. **Appl Biochem Biotechnol**, 2013, 170(3): 718–728.
- [16] Wu Q, Zhao Y M, Wang D, et al. Immobilized *Rhodotorula mucilaginosa*: a novel urethanase–producing strain for degrading ethyl carbamate[J]. **Appl Biochem Biotechnol**, 2013, 171(8): 2220–2232.
- [17] Mohapatra B R, Bapuji M. Characterization of urethanase from *Micrococcus* species associated with the marine sponge (*Spirasfrella species*)[J]. **Lett Appl Microbiol**, 1997, 25: 393–396.
- [18] 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: 248–254.
- [19] 诸葛健, 王正祥. 工业微生物实验手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994: 284–288.
- [20] Akutsu–Shigeno Y, Adachi Y, Yamada C, et al. Isolation of a bacterium that degrades urethane compounds and characterization of its urethane hydrolase[J]. **Appl Microbiol Biot**, 2006, 70: 422–429.
- [21] 卜攀攀, 陈坚, 堵国成. 耐盐氨基甲酸酯水解酶的分离纯化及酶学性质[J]. 生物工程学报, 2014, 30(3): 404–411.
BU Panpan, CHEN Jian, DU Guocheng. Purification and characterization of a halophilic urethanase from *Klebsiella pneumonia* [J]. **Chin J Biotech**, 2014, 30(3): 1–8. (in Chinese)
- [22] Zhou N D, Gu X L, Zha X H, et al. Purification and characterization of a urethanase from *Penicillium variable*[J]. **Appl Biochem Biotechnol**, 2014, 172(1): 351–360.