

食品生物技术

重组酸性脲酶对黄酒中尿素和氨基甲酸乙酯的降解应用

周建立^{1,2}, 康振^{1,2,3}, 刘庆涛^{1,2}, 堵国成^{2,3}, 陈坚^{2,3}

1 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学生物工程学院, 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

周建立, 康振, 刘庆涛, 等. 重组酸性脲酶对黄酒中尿素和氨基甲酸乙酯的降解应用. 生物工程学报, 2016, 32(1): 74-83.

Zhou JL, Kang Z, Liu QT, et al. Degradation of urea and ethyl carbamate in Chinese Rice wine by recombinant acid urease. Chin J Biotech, 2016, 32(1): 74-83.

摘 要: 氨基甲酸乙酯 (Ethyl carbamate, EC) 作为一种潜在致癌物质普遍存在于传统发酵食品中。利用酸性脲酶消除 EC 前体物质尿素是一种具有潜在重要应用价值的策略。本研究在前期成功实现食品级耐乙醇酸性脲酶高效表达制备的基础上, 系统研究了重组酸性脲酶对尿素和 EC 的水解过程。重组酸性脲酶对模拟体系以及黄酒体系中的尿素具有很好的降解能力 (60 mg/L 的尿素在 25 h 内完全被降解), 表明该重组酸性脲酶适用于黄酒中尿素的消除。虽然重组酸性脲酶也具有降解 EC 的催化活性, 但在黄酒中添加重组酸性脲酶对 EC 的浓度无明显影响。进一步研究发现重组酸性脲酶对尿素和 EC 的 K_m 值分别为 0.714 7 mmol/L 和 41.32 mmol/L, 研究结果为应用定向进化策略改造重组酸性脲酶实现同时水解尿素和 EC 提供了理论依据。

关键词: 重组酸性脲酶, 氨基甲酸乙酯, 尿素, 食品安全, 酶法降解

Received: March 27, 2015; **Accepted:** May 21, 2015

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2012CB720802), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2011AA100905), the National Science Foundation for Post-doctoral Scientists of China (No. 2013 M540414).

Corresponding authors: Zhen Kang. Tel: +86-510-85918307; Fax: +86-510-85918309; E-mail: zkang@jiangnan.edu.cn

Jian Chen. Tel: +86-510-85918307; Fax: +86-510-85918309; E-mail: jchen@jiangnan.edu.cn

国家重点基础研究计划 (973 计划) (No. 2012CB720802), 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2011AA100905), 国家博士后基金面上项目 (No. 2013 M540414)。

网络出版时间: 2015-06-08

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20150608.1421.003.html>

Degradation of urea and ethyl carbamate in Chinese Rice wine by recombinant acid urease

Jianli Zhou^{1,2}, Zhen Kang^{1,2,3}, Qingtao Liu^{1,2}, Guocheng Du^{2,3} and Jian Chen^{2,3}

1 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 The Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Ethyl carbamate (EC) as a potential carcinogen commonly exists in traditional fermented foods. It is important eliminate urea that is the precursors of EC in many fermented foods, including Chinese Rice wine. On the basis of achieving high-level overexpression of food-grade ethanol-resistant acid urease, we studied the hydrolysis of urea and EC with the recombinant acid urease. Recombinant acid urease showed degraded urea in both the simulated system with ethanol and Chinese Rice wine (60 mg/L of urea was completely degraded within 25 h), indicating that the recombinant enzyme is suitable for the elimination of urea in Chinese Rice wine. Although recombinant acid urease also has degradation catalytic activity on EC, no obvious degradation of EC was observed. Further investigation results showed that the K_m value for urea and EC of the recombinant acid urease was 0.7147 mmol/L and 41.32 mmol/L, respectively. The results provided theoretical foundation for realizing simultaneous degradation of urea and EC.

Keywords: recombinant acid urease, ethyl carbamate, urea, food safety, enzymatic degradation

氨基甲酸乙酯 (Ethyl carbamate, EC), 是一种天然存在于所有发酵食品和酒精饮料中的成分, 是由尿素和乙醇自发反应生成的具有潜在致癌性的物质^[1-2]。在酒精饮料中尿素含量会间接影响 EC 的含量, 世界各国和国际卫生组织对酒中的 EC 浓度都有严格的限量标准, 因此降低酒精饮料中 EC 浓度成了至关重要的问题。在酒精饮料中, 尿素一部分是由原料自身引入的, 另外绝大部分是作为副产物由酵母细胞内的精氨酸分解代谢所产生的^[3]。因此消除酒精饮料中的尿素成为减少 EC 浓度的可行方法之一^[4]。

脲酶普遍存在于细菌、真菌和高等植物中^[5-6], 所有已知的不同来源的脲酶在结构上具有高度同源性^[7]。酸性脲酶指的是在酸性条件下仍然能够降解尿素的脲酶, 因此可以在呈酸性的酒精饮料中发挥作用。酸性脲酶在大鼠胃肠

道的乳酸乳杆菌中首次发现^[8], 目前已经分离出了许多具有酸性脲酶活性的肠道细菌并研究了它们的特性^[9-11], 但是所报道的酸性脲酶均表现出高度的专一性, 即只能专一地分解尿素, 不能分解 EC。综上所述, 深入研究酸性脲酶及其性质对于酒类行业的发展具有重要意义。本实验室前期在具有乳糖筛选标记的食品级乳酸乳球菌 NZ9000 中, 利用诱导剂乳酸链球菌肽成功表达了来源于罗伊氏乳杆菌的酸性脲酶^[12], 该酶对尿素和 EC 均有显色反应, 并且具有良好的耐乙醇特性。为进一步分析其不同体系中对尿素和 EC 的降解能力, 首先对重组酸性脲酶进行分离纯化, 研究了纯酶在缓冲液 (pH 4.5) 和市售黄酒中对尿素和 EC 的降解能力并测定了 K_m 值, 为今后分子改造酸性脲酶提供了方向和基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和培养基

产酸性脲酶菌株 NZ9000-LR(MG1363 *pepN::nisRK*; harboring pNZ8149-*ureABCEFGD*; Cm^r) 由本实验室构建。种子培养基为 M17 肉汤培养基, 发酵培养基成分为蛋白胨 1.5%, 酵母抽提物 0.1%, 葡萄糖 5.0%, 硫酸镁 1.0 mmol/L, 硫酸锰 0.1 mmol/L。

1.1.2 主要试剂和仪器

M17 肉汤培养基、蛋白胨和酵母抽提物购自 Oxoid 公司; 其他化学试剂均为国产分析纯。本研究所使用的仪器主要有: AKTA 蛋白纯化系统 (Aamersham pharmacia biotech); SDS-PAGE 系统 (Aamersham pharmacia biotech); UV-2450 光谱分光光度计 (Shimadzu Co., Kyoto, Japan); Hitrap DEAE FF 弱阴离子柱 (GE Healthcare); Superdex 200 pg 凝胶柱 (GE Healthcare)。

1.2 方法

1.2.1 重组酸性脲酶的分离纯化

粗酶液的制备: 将单菌落接种至含氯霉素 (10 µg/mL) 的 M17 液体培养基中, 30 °C 静置培养 16 h; 按 2.0% 的接种量接种于 3 L 发酵罐中, 装液量为 1.5 L, 培养温度为 30 °C, 搅拌转速为 100 r/min, 当 OD_{600} 约为 0.4 时, 加入终浓度为 10 ng/mL 的乳酸链球菌肽, 诱导表达 8 h。离心收集菌体后, 用 200 mL 的 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4) 溶液洗涤菌体 2 次并重悬, 加入终浓度为 5 mg/mL 的溶菌酶后 30 °C 水浴处理 1 h, 超声破碎 20 min, 离心收集上清, 加入无水乙醇至不同终浓度 (10%–80%), 冰上放置 30 min, 离心收集沉淀, 用 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4)

溶液重悬沉淀, 测定各乙醇浓度下的酶活大小。

Hitrap DEAE FF 柱离子交换层析: 将酶活最高的乙醇浓度下的上清液在 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4) 溶液中过夜透析后, 加样到 Hitrap DEAE FF 柱中, 用 0–1.0 mol/L NaCl 溶液梯度洗脱, 流速 4.0 mL/min, 收集活性部位。

Superdex 200 pg 凝胶柱过滤层析: 将经过 DEAE 柱洗脱的活性部位加样到 Superdex 200 pg 凝胶柱中, 用 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4) 溶液洗脱, 流速 1.0 mL/min, 收集洗脱液后经 10% SDS-PAGE 分析鉴定纯化后的蛋白。

1.2.2 酶活测定方法

分别向两个比色管中加入 200 µL 酶液和缓冲液。然后加入 800 µL 3.0% 尿素或 EC 溶液, 在 37 °C 水浴反应 20 min 后, 立即加入 1.0 mL 终止剂 (10% 三氯乙酸), 振荡混匀后加入 1.0 mL 显色剂 I (15 g 苯酚和 0.625 g 亚硝基铁氰化钠用蒸馏水定容至 250 mL) 和 1.0 mL 显色剂 II (13.125 g NaOH 和 7.5 mL 次氯酸钠用蒸馏水定容至 250 mL), 混匀后 37 °C 水浴处理 20 min 后取出, 用蒸馏水定容至 25 mL, 625 nm 处检测吸光值。缓冲液作空白对照。

酶活活力定义: 在常压、37 °C、pH 4.5 的条件下, 每分钟分解尿素或 EC 产生 1 µmol 铵离子的酶量为 1 个酶活单位 U。

1.2.3 重组酸性脲酶在缓冲液中对尿素和 EC 的降解能力分析

为了分析重组酸性脲酶在缓冲液中对尿素和 EC 的降解能力, 设计了一系列含不同浓度尿素和 EC 的缓冲液, 如表 1 所示。50 mL 的摇瓶中装液量为 20 mL, 酶的添加量为 500 U/L, 定时取样, 样品中尿素含量采用高效液相色谱方法测定^[13], 样品中 EC 含量采用 GC-MS 测定^[14-16]。

表 1 不同浓度尿素和 EC 的柠檬酸钠缓冲液

Table 1 Sodium citrate buffer with different concentration of urea and EC

Number	Urea (mmol/L)	EC (mmol/L)
1	10	0
2	10	10
3	10	100
4	10	500
5	0	100
6	1	100

1.2.4 重组酸性脲酶在黄酒中对尿素和 EC 的降解能力分析

为了分析重组酸性脲酶在黄酒中对尿素和 EC 的降解能力，向市售黄酒中分别添加不同浓度的尿素和 EC。50 mL 摇瓶中装液量为 20 mL，酶的添加量分别为 50、100、200 和 500 U/L，定时取样，测定样品中尿素和 EC 的含量。

1.2.5 重组酸性脲酶对尿素和 EC 动力学常数 K_m 值的测定

为了初步分析重组酸性脲酶与尿素和 EC 的结合能力，将纯化后的酶液与含不同浓度的

尿素和 EC 的缓冲液反应，测定不同浓度下的吸光值，使用 GraphPad Prism 软件计算重组酸性脲酶对尿素和 EC 的动力学常数 K_m 值。

1.2.6 重组酸性脲酶与尿素和 EC 的模拟结构分析

利用在线结构模拟网站 <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER> 对 UreC 进行结构模拟，获得的 UreC 结构通过 <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/BSP-SLIM> 与尿素和 EC 进行分子对接，并用 Pymol 软件对获得的对接结果进行分析。

2 结果

2.1 重组酸性脲酶的分离与纯化

重组酸性脲酶在终浓度为 40%–60% 的乙醇溶液中沉淀下来。图 1 为纯化过程中 Hitrap DEAE FF 柱离子交换层析的色谱图，图 2 为纯化过程中 Superdex 200 pg 凝胶柱过滤层析的色谱图。将各阶段纯化的样品进行 SDS-PAGE 检测，电泳结果如图 3 所示，其中通道 6 为已电泳纯的重组酸性脲酶。

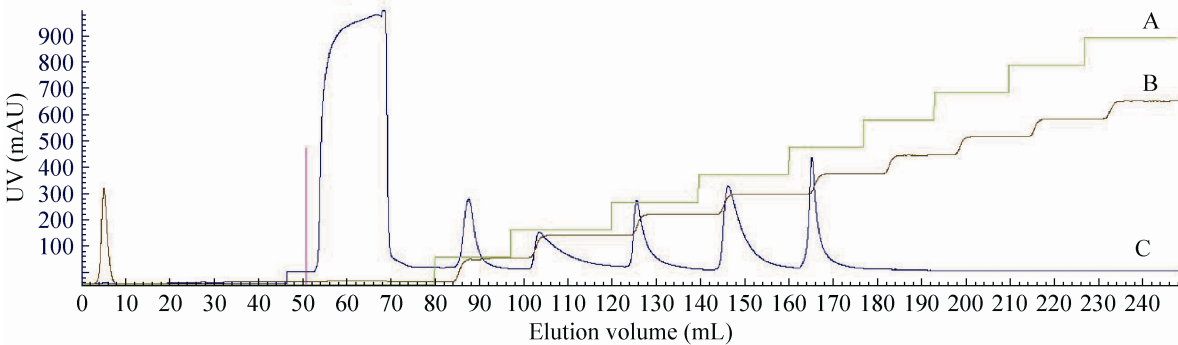


图 1 Hitrap DEAE FF 柱离子交换色谱图

Fig. 1 Ion Exchange Chromatography of acid urease by Hitrap DEAE FF. (A) Conc. (B) Cond. (C) UV.

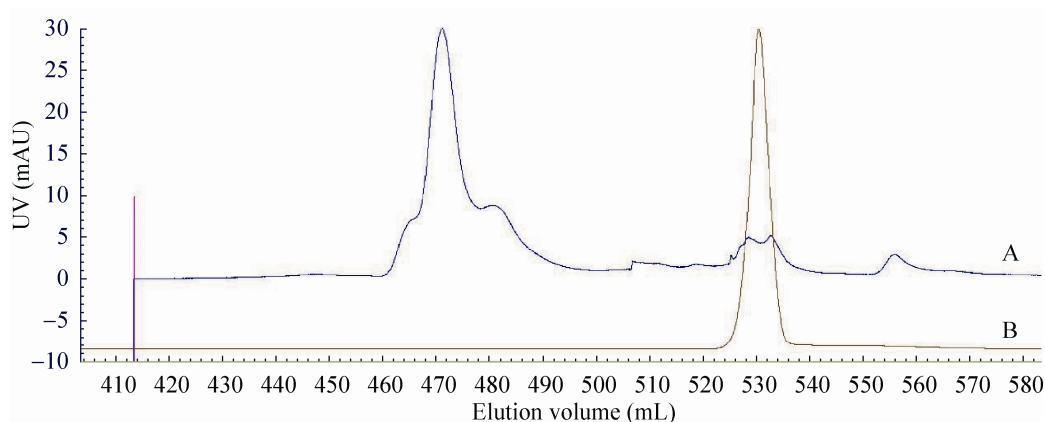


图2 Superdex 200 pg 凝胶柱过滤层析色谱图

Fig. 2 Gel filtration chromatography of acid urease by Superdex 200 pg. (A) UV. (B) Cond.

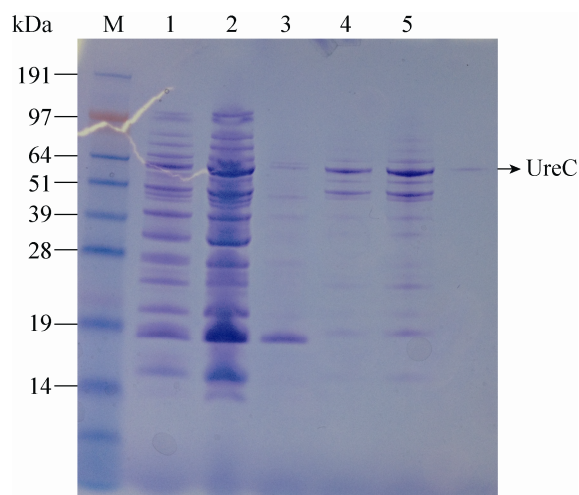


图3 SDS-PAGE 检测重组酸性脲酶的纯化

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the recombinant acid urease. M: protein marker; 1: cell lysis supernatant; 2: 40%–60% ethanol precipitation; 3: penetrating fluid; 4: Hitrap DEAE FF sample; 5: concentrated liquid by Hitrap DEAE FF; 6: superdex 200 pg sample.

2.2 重组酸性脲酶在缓冲液中对尿素和 EC 的降解能力分析

在含有不同浓度尿素和 EC 的缓冲液中重组酸性脲酶对尿素和 EC 的降解情况如图 4 所示, 由各降解曲线可知在缓冲液中酶对尿素有

很强的降解能力, 6 h 时尿素已基本完全降解, 而酶对 EC 的降解能力较微弱, 并且尿素的存在对 EC 的降解没有影响。

2.3 重组酸性脲酶在黄酒中对尿素和 EC 的降解能力分析

为了分析在黄酒中重组酸性脲酶对尿素和 EC 的降解能力, 在市售黄酒 (pH 4.1, 酒精浓度 15%) 中, 添加 500 U/L 的酶液, 同时向市售黄酒中加入 50 mg/L 的尿素以及 400 μ g/L EC 后添加 500 U/L 的酶液, 降解结果如图 5 所示。检测结果表明, 在黄酒中重组酸性脲酶对尿素的降解能力明显, 2 h 时已基本完全降解, 但对 EC 的降解能力很微弱, 基本无降解。

2.4 不同酶量的重组酸性脲酶在黄酒中对尿素的降解能力分析

鉴于在黄酒中重组酸性脲酶对尿素有显著的降解能力, 向黄酒中及加入了 50 mg/L 尿素的黄酒中分别添加 50、100、200 和 500 U/L 的酶液, 降解结果如图 6 所示。结果表明, 随着酶量的增加, 尿素的降解速率也随之加快, 酶的最佳添加量为 100 U/L。

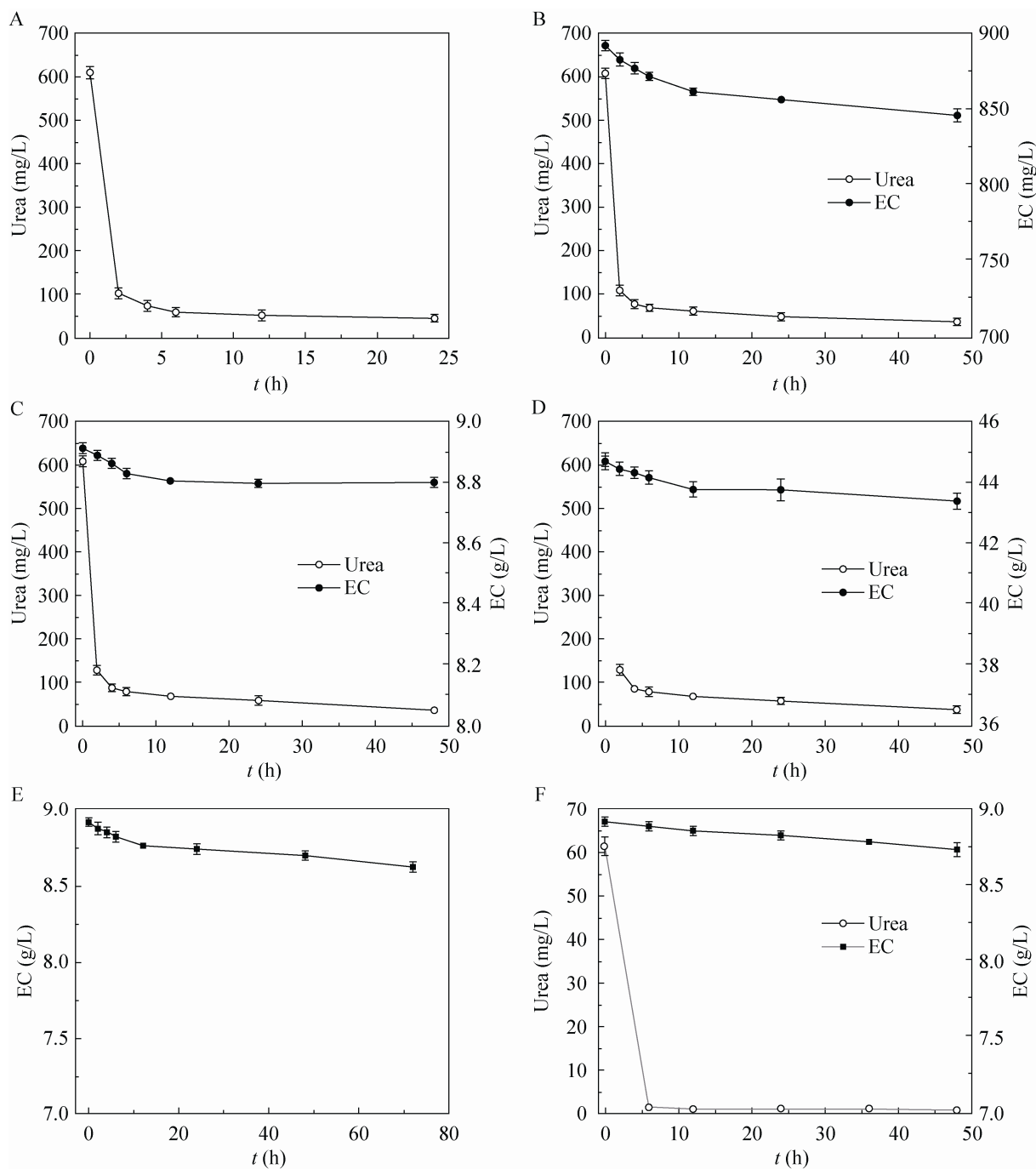


图 4 重组酸性脲酶对不同浓度的尿素和 EC 降解曲线

Fig. 4 The degradation curve of different concentrations of urea and EC. (A) 10 mmol/L urea. (B) 10 mmol/L urea, 10 mmol/L EC. (C) 10 mmol/L urea, 100 mmol/L EC. (D) 10 mmol/L urea, 500 mmol/L EC. (E) 100 mmol/L EC. (F) 1 mmol/L urea, 100 mmol/L EC.

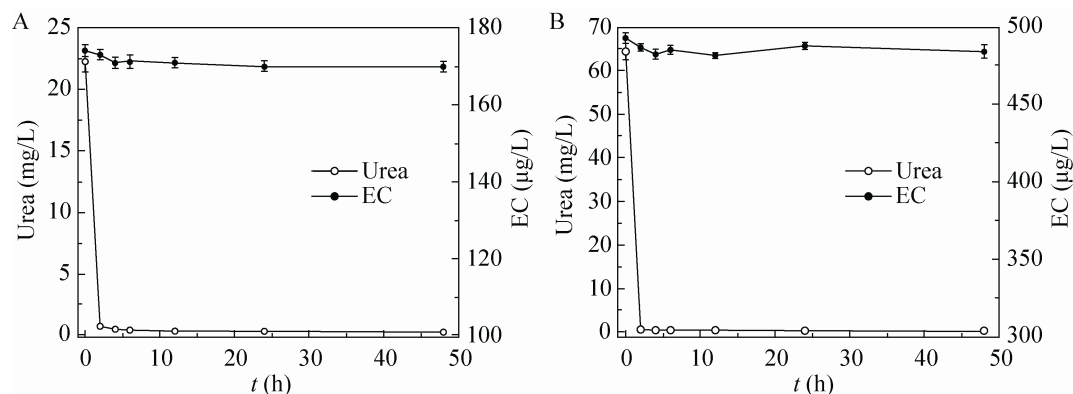


图 5 黄酒中重组酸性脲酶对尿素和 EC 的降解曲线

Fig. 5 The degradation curve of urea and EC in Chinese Rice wine. (A) Without urea and EC. (B) 50 mg/L urea, 400 µg/L EC.

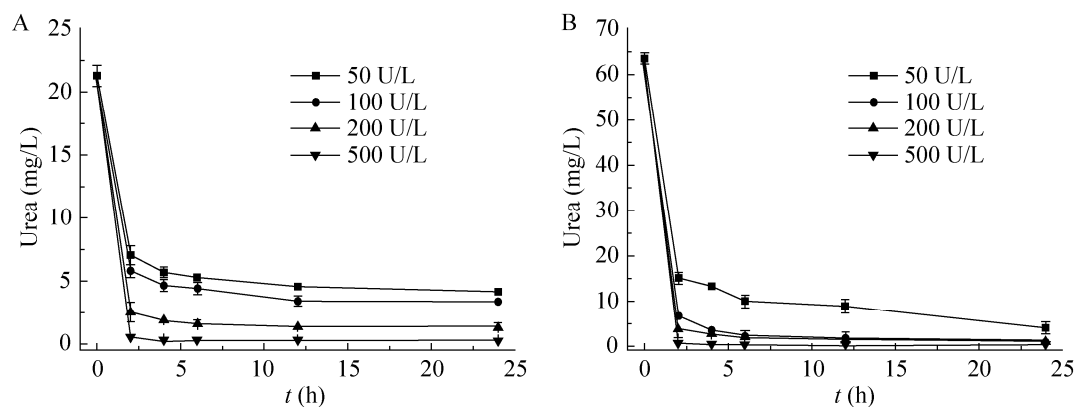


图 6 不同酶量的重组酸性脲酶对黄酒中尿素的降解曲线

Fig. 6 The degradation curve of urea with different enzyme dosage in Chinese Rice wine. (A) Without urea and EC. (B) 50 mg/L urea.

2.5 重组酸性脲酶对尿素和 EC 的动力学常数 K_m 值的测定

通过分析重组酸性脲酶在缓冲液体系和黄酒体系中对尿素和 EC 的降解能力, 该酶对两者的降解能力不同, 进一步测定该酶对尿素和 EC 的动力学常数 K_m 值。将纯酶分别与不同浓度的尿素和 EC 反应, 测定对应的吸光值, 采用 GraphPad Prism 计算动力学常数 K_m 值, 如图 7 所示。酶对尿素和 EC 的 K_m 值分别为 0.714 7 mmol/L 和 41.32 mmol/L。

2.6 重组酸性脲酶与尿素和 EC 的模拟结构分析

根据在线模拟结构网站模拟重组酸性脲酶与尿素和 EC 的结合区域, 结果如图 8 所示。模拟结构显示由于尿素的空间位阻比 EC 小, 尿素更容易与重组酸性脲酶的催化活性中心结合。另一方面, 尿素与氨基酸残基 Asp365 和 Ala368 形成两个氢键, 而 EC 与氨基酸残基 Ser172 形成一个氢键, 由此推测, 尿素与重组酸性脲酶的结合能力比 EC 强, 更容易被降解。

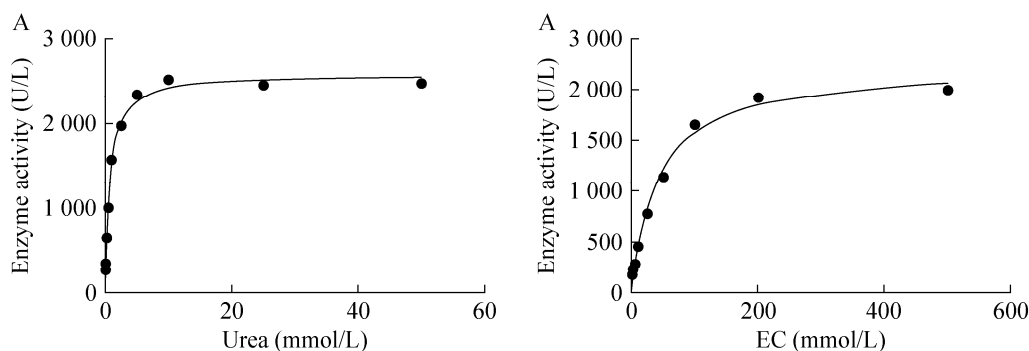


图 7 尿素和 EC 的 GraphPad Prism 示意图

Fig. 7 GraphPad Prism plots of urea and EC. (A) Urea. (B) EC.

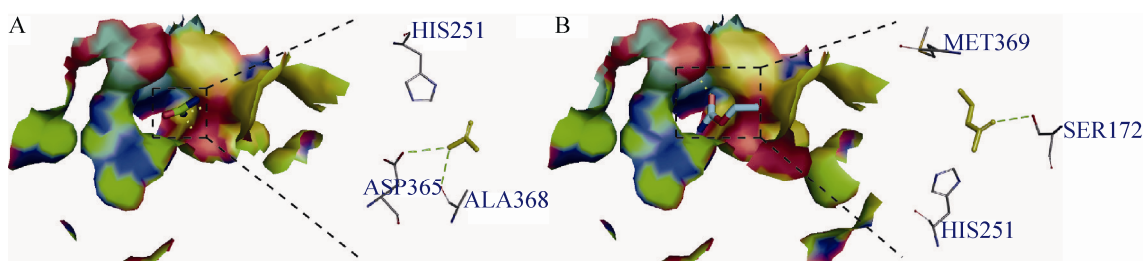


图 8 重组酸性脲酶与尿素和 EC 的结合区域

Fig. 8 The binding domains of urea and EC with the recombinant acid urease. (A) Urea. (B) EC.

3 讨论

由于酸性脲酶能够在酸性条件下将尿素分解为氨和二氧化碳,因此具有降解黄酒中尿素和 EC 的潜力。目前,人们已经从不同菌属如罗伊氏乳杆菌^[17-18]、发酵乳杆菌^[19]、节杆菌属^[20]、嗜热链球菌^[21-24]、唾液链球菌^[25]以及肠杆菌属^[11]等分离纯化出酸性脲酶。而所报道的酸性脲酶对尿素具有高度的催化专一性,对 EC 没有催化活性^[18-20]。本实验室前期成功构建了表达酸性脲酶的乳酸乳球菌 NZ9000-LR^[12]。在此基础上,本研究首先对酶进行了分离纯化,初步发现该酶不仅对尿素具有高效的催化活性,对 EC 也有一定的催化活性。为进一步系统分析该酶在不同体系中对尿素和 EC 的降解能力,设计了一系

列含有不同浓度尿素和 EC 的缓冲液,检测发现重组酸性脲酶对 EC 的降解能力相对微弱,但当 EC 过量存在时 (g/L 级别) 有一定的降解效果,并且尿素的存在对 EC 的降解没有影响。随后初步考察了重组酸性脲酶在黄酒中对尿素和 EC 的降解应用,结果显示对 EC 降解相对微弱。

本实验通过在黄酒中添加不同酶量的重组酸性脲酶研究对尿素的降解情况,其中添加 50 U/L 酶液 1 d 内可使 60 mg/L 尿素完全降解。Yang 等^[11]添加 80 U/L 酶液 7 d 内使 25 mg/L 尿素降解完全;Kakimoto 等添加 10 U/L 酶液 6 d 内使 50 mg/L 尿素降解完全;Miyagawa 等^[20]添加 90 U/L 酶液 13 d 内使 50 mg/L 尿素降解完全,说明该重组酸性脲酶对黄酒中尿素的降解能力

十分显著。另一方面,重组酸性脲酶对尿素和 EC 的 K_m 值分别为 0.714 7 mmol/L 和 41.32 mmol/L, 对 EC 的 K_m 值是对尿素 K_m 值的 57.8 倍,并通过对重组酸性脲酶与尿素和 EC 的结合区域分析,初步判定该酶对 EC 的结合能力比尿素弱。尽管如此,该酶对 EC 的催化能力是之前报道的酸性脲酶所没有的^[20-26]。

综上所述,结合重组酸性脲酶对 EC 的酶活显色反应以及其在缓冲液和黄酒中对 EC 的降解能力,该酶对 EC 具有一定的催化活性,但是由于与 EC 的结合能力较弱,对低浓度 EC 的降解能力不明显。这为今后通过分子改造重组酸性脲酶与底物的结合区域或者催化活性区域,筛选具有高效催化 EC 的酸性脲酶提供了基础和思路,具有广阔的应用前景和较高的潜在价值。

REFERENCES

- [1] Ough CS, Crowell EA, Mooney LA. Formation of ethyl carbamate precursors during grape juice (Chardonnay) fermentation. I. Addition of amino acids, urea, and ammonia: effects of fortification on intracellular and extracellular precursors. *Am J Enol Vitic*, 1988, 39(3): 243–249.
- [2] Schlatter J, Lutz WK. The carcinogenic potential of ethyl carbamate (urethane): risk assessment at human dietary exposure levels. *Food Chem Toxicol*, 1990, 28(3): 205–211.
- [3] Schehl B, Senn T, Lachenmeier DW, et al. Contribution of the fermenting yeast strain to ethyl carbamate generation in stone fruit spirits. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 74(4): 843–850.
- [4] Ough CS, Trioli G. Urea removal from wine by an acid urease. *Am J Enol Vitic*, 1988, 39(4): 303–307.
- [5] Mobley HL, Hausinger RP. Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. *Microbiol Rev*, 1989, 53(1): 85–108.
- [6] Mobley HL, Island MD, Hausinger RP. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol Rev*, 1995, 59(3): 451–480.
- [7] Qin YJ, Cabral JMS. Review properties and applications of urease. *Biocatal Biotransform*, 2002, 20(1): 1–14.
- [8] Moreau MC, Ducluzeau R, Raibaud P. Hydrolysis of urea in the gastrointestinal tract of "monoxenic" rats: effect of immunization with strains of ureolytic bacteria. *Infect Immun*, 1976, 13(1): 9–15.
- [9] Kakimoto S, Okazaki K, Sakane T, et al. Isolation and taxonomic characterization of acid urease-producing bacteria. *Agric Biol Chem*, 1989, 53(4): 1111–1117.
- [10] Suzuki K, Benno Y, Mitsuoka T, et al. Urease-producing species of intestinal anaerobes and their activities. *Appl Environ Microbiol*, 1979, 37(3): 379–382.
- [11] Yang LQ, Wang SH, Tian YP. Purification, properties, and application of a novel acid urease from *Enterobacter* sp.. *Appl Biochem Biotechnol*, 2010, 160(2): 303–313.
- [12] Yang YQ, Kang Z, Zhou JL, et al. High-level expression and characterization of recombinant acid urease for enzymatic degradation of urea in rice wine. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(1): 301–308.
- [13] Clark S, Francis PS, Conlan XA, et al. Determination of urea using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection after automated derivatisation with xanthidrol. *J Chromatogr A*, 2007, 1161(1/2): 207–213.
- [14] Lee K-G. Analysis and risk assessment of ethyl carbamate in various fermented foods. *Eur Food Res Technol*, 2013, 236(5): 891–898.
- [15] Zhang J, Liu GX, Zhang Y, et al. Simultaneous determination of ethyl carbamate and urea in alcoholic beverages by high-performance liquid

- chromatography coupled with fluorescence detection. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(13): 2797–2802.
- [16] Huang WH, Geng PL, Cheng HP, et al. Detection of ethyl carbamate in Jiangxiang Baijiu (liquor) by SPE-GC/MS. *Liquor-Making Sci Technol*, 2014, (8): 105–108 (in Chinese).
- 黄卫红, 耿平兰, 程化鹏, 等. SPE-GC/MS 法测定酱香型白酒中氨基甲酸乙酯. *酿酒科技*, 2014, (8): 105–108.
- [17] Kakimoto S, Miyashita H, Sumino Y, et al. Properties of acid ureases from *Lactobacillus* and *Streptococcus* strains. *Agric Biol Chem*, 1990, 54(2): 381–386.
- [18] Kakimoto S, Sumino Y, Akiyama IS, et al. Purification and characterization of acid urease from *Lactobacillus reuteri*. *Agric Biol Chem*, 1989, 53(4): 1119–1125.
- [19] Kakimoto S, Sumino Y, Kawahara K, et al. Purification and characterization of acid urease from *Lactobacillus fermentum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1990, 32(5): 538–543.
- [20] Miyagawa K, Sumida M, Nakao M, et al. Purification, characterization, and application of an acid urease from *Arthrobacter mobilis*. *J Biotechnol*, 1999, 68(213): 227–236.
- [21] Mora D, Fortina M, Parini C, et al. Genetic diversity and technological properties of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from dairy products. *J Appl Microbiol*, 2002, 93(2): 278–287.
- [22] Mora D, Maguin E, Masiero M, et al. Characterization of urease genes cluster of *Streptococcus thermophilus*. *J Appl Microbiol*, 2004, 96(1): 209–219.
- [23] Mora D, Monnet C, Parini C, et al. Urease biogenesis in *Streptococcus thermophilus*. *Res Microbiol*, 2005, 156(9): 897–903.
- [24] Zotta T, Ricciardi A, Rossano R, et al. Urease production by *Streptococcus thermophilus*. *Food Microbiol*, 2008, 25(1): 113–119.
- [25] Chen YYM, Clancy KA, Burne RA. *Streptococcus salivarius* urease: genetic and biochemical characterization and expression in a dental plaque *Streptococcus*. *Infect Immun*, 1996, 64(2): 585–592.
- [26] Takebe S, Kobashi K. Acid urease from *Lactobacillus* of rat intestine. *Chem Pharm Bull*, 1988, 36(2): 693–699.

(本文责编 郝丽芳)