

分类号: Q81

单位代码: 10363

密 级: 公开

学 号: 2220520128

可降解氨基甲酸乙酯的酯酶异源表达与分子改造

HETEROLOGOUS EXPRESSION AND
MOLECULAR ENGINEERING OF AN ETHYL
CARBAMATE-DEGRADING ESTERASE

学生姓名: 朱司宝

校内导师: 刘庆涛

校外导师: 张温清

专 业: 生物与医药

研究方向: 生物技术与工程

论文答辩日期: 2025 年 5 月 15 日

安徽工程大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

学位论文作者签名：朱司宝

日期：2025 年 5 月 16 日

安徽工程大学学位论文版权使用授权书

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权安徽工程大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密 ☐，在 年解密后适用本版权书。

本学位论文属于

不保密 ☒。

学位论文作者签名：朱司宸

指导教师签名：刘庆江

日期：2025年5月16日

日期：2025年5月16日

可降解氨基甲酸乙酯的酯酶异源表达与分子改造

摘 要

氨基甲酸乙酯 (ethyl carbamate, EC) 是一种广泛存在于发酵食品中的 2A 类致癌物质, 难以被传统理化方法有效去除, 而酶法由于可以直接降解 EC 而被认为是有效的消减策略。目前报道的 EC 水解酶主要为酰胺酶, 但多数酰胺酶存在 EC 与前体物质尿素的底物竞争效应, 导致 EC 降解效率受限。近年来酯酶被报道具有 EC 水解活性, 因其水解酯键时不受尿素竞争效应的干扰而在研究中得到广泛关注。本论文主要研究内容和结果如下:

(1) 酯酶的挖掘与性质表征。本研究在 NCBI 数据库中挖掘出 4 个在 pH 4.5 及 7.0 条件下均具有 EC 降解能力的酯酶 (ES1、ES5、ES8 和 ES9), 实现了它们在大肠杆菌中的可溶性表达, 并对其进行了纯化及酶学性质表征。结果表明, ES1、ES5、ES8 和 ES9 最适温度分别为 70 °C、70 °C、55 °C 及 55 °C, ES1、ES5、ES9 最适 pH 值呈碱性, ES8 呈中性; 4 种酶在体积分数 10% 乙醇存在条件下, 可分别保持 50.48%、48.44%、42.60% 及 33.59% 左右的酶活力。4 种酶在 pH 4.5 条件下对 EC 的 K_m 值分别为 210.7、213.8、256.2 mmol/L 及 127.2 mmol/L, k_{cat}/K_m 值分别为 214.31、203.20、161.46 L/(mmol • s) 及 257.43 L/(mmol • s)。

(2) 酯酶的理性设计改造。研究基于序列一致性回归策略对中性酯酶 ES8 进行理性设计, 通过定点突变得得到 V129S、V161L 和 I229M,

并经组合突变后得到 V129S/I229M、V161L/I229M 和 V129S/V161L/I229M，突变体的比酶活力分别为 WT 的 1.56、1.45、5.17、3.66、6.90 和 5.68 倍。酶学表征显示，在 pH 4.5 的酸性环境下，V129S/I229M 具有突变体中最佳的催化速率与底物亲和力，分别较 WT 提升 655.08%和 52.99%，但其在酸性与高温环境下的稳定性未明显改善，而 V161L 在 pH 4.0 下残余酶活力达到 WT 的 1.46 倍，表明其酸稳定性则得到显著增强。分子对接与分子动力学模拟结果显示，V129S/I229M 的催化速率与亲和力提升可能是由于酶与底物间的氢键相互作用力增加、底物通道亲水性提高、催化活性中心疏水性增强和酶的催化三联体附近残基柔性提高；V161L 氢键分析结果表明，位于 α 螺旋结构的 L161 与位于 Loop 结构的 F166 间形成新的氢键，这可能会稳固柔性区域的构象，且分子动力学模拟结果同样显示 V161L 的突变大幅减少突变体的构象波动，因此 V161L 的酸稳定性增强的可能原因是其稳固了酶在酸性环境中的催化构象。

(3)构建二硫键提高酯酶稳定性。本章通过在线服务器 Disulfide by Design 2 与 Discovery Studio 2023 软件对酯酶 V129S/I229M（简称 Est8-CE）进行二硫键预测，并结合分子动力学模拟的 RMSF 结果确定在柔性区域构建二硫键位点 Q149C-F157C（简称 Est8-CES1）与 L212C-L242C（简称 Est8-CES2）。通过实验表征出 Est8-CE 及其突变体的酶学性质，结合底物结合构象分析与分子动力学模拟对突变体的稳定性提升机制进行解析。研究结果表明 Est8-CES1 与 Est8-CES2 的热稳定性与酸稳定性得到明显提升，二者在 80 °C 下的半衰期分别是

Est8-CE 的 8.14 倍与 3.14 倍,且在酸性环境下均具有较 Est8-CE 更高的相对酶活力。分子动力学模拟的轨迹分析结果显示二硫键的引入显著降低了 Est8-CE 的 RMSD 与 RMSF,表明突变体的结构稳定性得到增强;此外,结合酶与底物的分子作用力分析结果推测突变体与底物间减少的氢键相互作用与催化区域的刚性增强是造成其底物亲和力与催化速率降低的原因。

关键词: 氨基甲酸乙酯;酯酶;序列一致性回归策略;催化速率;二硫键

HETEROLOGOUS EXPRESSION AND MOLECULAR ENGINEERING OF AN ETHYL CARBAMATE- DEGRADING ESTERASE

ABSTRACT

Ethyl carbamate (EC) is a Group 2A carcinogen commonly found in fermented foods, especially in alcoholic beverages. It is difficult to remove using traditional physical or chemical methods. Enzymatic degradation of EC is seen as an effective strategy due to its direct breakdown. Most EC-hydrolyzing enzymes reported so far are amidases, but substrate competition between EC and urea limits their efficiency. Esterases, however, show promise as they lack this competition during ester bond hydrolysis, thus attracting attention for EC removal. The main research content and findings of this study are summarized as follows:

(1) Discovery and characterization of esterases. In this study, four esterases (ES1, ES5, ES8, and ES9) with EC-degrading activity at both pH 4.5 and pH 7.0 were mined from the NCBI database. These enzymes were successfully expressed in a soluble form in *Escherichia coli*, purified, and subjected to comprehensive enzymatic characterization. The results indicated that the optimal temperatures for ES1, ES5, ES8, and ES9 were

70 °C, 70 °C, 55 °C, and 55 °C, respectively; while the optimal pH values for ES1, ES5, and ES9 were alkaline, ES8 exhibited a neutral optimum. All four enzymes showed markedly reduced stability at temperatures above 45 °C or at pH values below 5.0. In the presence of 10% (v/v) ethanol, their residual activities were approximately 50.48%, 48.44%, 42.60%, and 33.59%, respectively. At pH 4.5, the K_m values for EC were determined to be 210.7, 213.8, 256.2, and 127.2 mmol/L for ES1, ES5, ES8, and ES9, respectively, with corresponding k_{cat}/K_m values of 214.31, 203.20, 161.46, and 257.43 L/(mmol·s). Structural analysis suggested that the relatively narrow substrate channel entrance of ES9 might hinder EC entry, thereby limiting its maximum reaction rate, while its high EC affinity could be attributed to stronger hydrogen-bond interactions between ES9 and EC.

(2) Rational design modification of esterases. A “sequence regression consistency strategy” was employed to rationally redesign the substrate-binding pocket of the neutral esterase ES8 to enhance its substrate affinity and catalytic rate toward EC. Through site-directed mutagenesis, the single mutants V129S, V161L, and I229M were generated, and their combinatorial mutations yielded V129S/I229M, V161L/I229M, and V129S/V161L/I229M, which exhibited 1.56-, 1.45-, 5.17-, 3.66-, 6.90-, and 5.68-fold increases in enzyme activity relative to the wild type (WT), respectively. Enzymatic characterization revealed that under acidic conditions (pH 4.5), the V129S/I229M mutant achieved the highest

catalytic rate and substrate affinity among the mutants, with increases of 655.08% and 52.99% compared to WT; however, its stability under acidic and high-temperature conditions was not significantly improved. In contrast, the V161L mutant displayed a residual activity at pH 4.0 that was 1.46 times that of WT, indicating markedly enhanced acid stability. Molecular docking and molecular dynamics simulations suggest that the improvements in catalytic rate and affinity observed in V129S/I229M may result from increased hydrogen-bond interactions between the enzyme and substrate, enhanced hydrophilicity of the substrate channel, and increased flexibility of residues near the catalytic triad facilitating the transition state. Furthermore, hydrogen-bond analysis of V161L indicates that the mutation fosters the formation of a new hydrogen bond between an α -helical residue L161 and an adjacent loop residue F166, thereby stabilizing the flexible region; molecular dynamics simulations also demonstrate that the V161L mutation substantially reduces conformational fluctuations, which likely underlies its enhanced acid stability.

(3) Construction of disulfide bonds to enhance esterase stability. Disulfide bond prediction for the V129S/I229M mutant (termed Est8-CE) was performed using the online server Disulfide by Design 2 and Discovery Studio 2023, and combined with RMSF results from molecular dynamics simulations, two disulfide bond sites were identified within flexible regions: Q149C–F157C (designated Est8-CES1) and L212C–

L242C (designated Est8-CES2). The enzymatic properties of Est8-CE and its mutants were characterized experimentally, and analyses of substrate-binding conformations along with molecular dynamics simulations were used to elucidate the mechanisms underlying the observed stability enhancements. The results indicated that both Est8-CES1 and Est8-CES2 exhibited significantly improved thermal and acid stabilities, with half-lives at 80 °C that were 8.14-fold and 3.14-fold greater than that of Est8-CE, respectively, and higher relative enzyme activities under acidic conditions. Trajectory analyses from molecular dynamics simulations revealed that the introduction of disulfide bonds markedly reduced the RMSD and RMSF of Est8-CE, indicating enhanced structural stability. Additionally, the reduction in hydrogen-bond interactions between the mutant enzymes and the substrate, along with increased rigidity in the catalytic region, appears to contribute to a decrease in substrate affinity and catalytic rate.

Sibao Zhu (Biology and Medicine)

Supervised by Qingtao Liu

KEY WORDS: ethyl carbamate, esterase, sequence consensus regression strategy, catalytic rate, disulfide bond

目 录

摘 要.....	I
ABSTRACT.....	IV
第 1 章 绪论.....	1
1.1 氨基甲酸乙酯概述.....	1
1.1.1 氨基甲酸乙酯危害性.....	1
1.1.2 氨基甲酸乙酯的形成途径.....	2
1.1.3 氨基甲酸乙酯的检测方法.....	3
1.1.4 氨基甲酸乙酯的限定标准.....	4
1.2 发酵食品中氨基甲酸乙酯消减策略研究现状.....	4
1.2.1 代谢工程选育低产尿素的酵母.....	4
1.2.2 生产工艺降低氨基甲酸乙酯的形成.....	5
1.2.3 酸性脲酶降解尿素.....	5
1.2.4 氨基甲酸乙酯水解酶.....	5
1.3 酯酶概述.....	6
1.3.1 酯酶水解原理.....	7
1.3.2 酯酶在水解氨基甲酸乙酯中的应用.....	7
1.4 酶催化速率改造策略.....	8
1.4.1 定向进化.....	8
1.4.2 理性设计.....	8
1.4.3 半理性设计.....	9
1.5 酶的稳定性提升策略.....	9
1.6 本课题的研究意义与主要研究内容.....	10
1.6.1 研究意义.....	10
1.6.2 主要研究内容.....	11
第 2 章 可降解 EC 的酯酶挖掘与酶学性质表征	12
2.1 引言.....	12

2.2 实验材料.....	12
2.2.1 菌株与质粒.....	12
2.2.2 主要材料与试剂.....	13
2.2.3 主要仪器与设备.....	14
2.2.4 培养基与溶液配制.....	14
2.3 实验方法.....	15
2.3.1 基于生物信息学的酯酶基因挖掘.....	15
2.3.2 ES1-ES9 重组质粒构建	15
2.3.3 大肠杆菌感受态细胞的制备与转化.....	15
2.3.4 重组酯酶的表达及蛋白纯化.....	16
2.3.5 重组酯酶的酶活力测定.....	16
2.3.6 重组酯酶的酶学性质测定.....	17
2.3.7 酯酶结构建模与结构分析.....	18
2.3.8 数据分析.....	19
2.4 结果与讨论.....	19
2.4.1 酯酶挖掘与序列分析.....	19
2.4.2 重组酯酶的表达、EC 降解能力鉴定及纯化	20
2.4.3 重组酯酶的酶学性质分析.....	21
2.4.4 结构分析揭示酯酶动力学参数差异潜在机制.....	26
2.5 结论.....	28
第 3 章 理性设计提升酯酶的底物亲和力与催化速率.....	30
3.1 引言.....	30
3.2 实验材料.....	30
3.2.1 菌株与质粒.....	30
3.2.2 主要材料与试剂.....	30
3.2.3 主要仪器与设备.....	31
3.2.4 培养基和溶液配置.....	31
3.3 实验方法.....	31
3.3.1 同源建模与突变位点选取.....	31

3.3.2 突变酶重组表达工程菌株构建.....	31
3.3.3 ES8 及其突变体的表达与纯化.....	33
3.3.4 ES8 及其突变体酶活力测定.....	33
3.3.5 ES8 及其突变体的酶学性质表征.....	33
3.3.6 催化速率与底物亲和力提升机制分析.....	33
3.3.7 数据处理与分析.....	33
3.4 结果与讨论.....	33
3.4.1 基于序列一致性回归策略的理性设计.....	33
3.4.2 酶学性质表征.....	36
3.4.3 底物亲和力与催化速率及稳定性提升机制分析.....	39
3.5 结论.....	42
第 4 章 基于多重计算策略构建二硫键提高酯酶稳定性.....	44
4.1 引言.....	44
4.2 实验材料.....	44
4.2.1 菌株与质粒.....	44
4.2.2 主要材料与试剂.....	45
4.2.3 主要仪器与设备.....	45
4.2.4 培养基与溶液配制.....	45
4.3 实验方法.....	45
4.3.1 突变位点的选择.....	45
4.3.2 质粒的提取与 PCR 扩增.....	46
4.3.3 酶的表达与纯化.....	46
4.3.4 引入二硫键的鉴定.....	46
4.3.5 酶活性测定.....	47
4.3.6 酶学性质测定.....	47
4.3.7 突变体的分子动力学模拟及结构分析.....	47
4.3.8 数据处理与分析.....	47
4.4 结果与讨论.....	47
4.4.1 二硫键位点选取策略.....	47

4.4.2 Est8-CE 及其突变体的酶学性质表征	50
4.4.3 亲和力降低与稳定性提升机制解析.....	53
4.5 结论.....	56
第 5 章 结论与展望.....	57
5.1 结论.....	57
5.2 展望.....	58
参考文献.....	59
攻读学位期间发表的学术论文目录.....	70
致谢.....	71

第 1 章 绪论

1.1 氨基甲酸酯概述

1.1.1 氨基甲酸酯危害性

氨基甲酸酯 (ethyl carbamate, EC), 又名尿烷、乌拉坦, 是一种广泛存在于发酵食品中的酯类有毒有害物质, 对人体具有潜在的致癌性, 主要在发酵食品的储藏和运输过程中形成^[1]。该物质最初被用做抗肿瘤药物以抑制细菌和小鼠肿瘤细胞的生长^[2], 但在之后美国国家毒理学计划 (NTP) 根据动物实验数据将 EC 指定为“潜在致癌物”。NTP 的研究表明 EC 会在啮齿动物通过接触的不同途径在不同的组织部位诱发肿瘤, 而啮齿动物口服 EC 会导致淋巴瘤、白血病和包括肺、肝、乳腺和皮肤等多个器官部位的癌症^[3]。随着研究的不断深入, EC 的致癌性机理被报道, 即细胞色素 P450 氧化的 EC 会导致 DNA 链损伤, 从而引发癌症, 且在对酒精饮料中的 EC 进行研究时, 发现乙醇会进一步增加 EC 的致癌风险^[4]。1987 年, EC 被国际癌症研究机构 (international agency for research on cancer, IARC) 列为 2B 类致癌物, 之后经研究者们对其致癌性进一步分析, 此机构于 2007 年从新将 EC 评估升级为 2A 类致癌物^[5], 由此可见 EC 的对人体健康危害性与降低其在食品中含量的必要性。

自 1943 年 EC 被证实具有致癌性风险以来, 目前学术界对其致癌机理已有深入的研究与报道^[6]。研究表明, EC 主要在人体内通过被细胞色素 P450 氧化进而破坏 DNA。EC 的致癌机制如下, 发酵液中的 EC 进入细胞内的代谢途径主要有以下三种: (1) 约 5% 的 EC 在人体中以尿液的形式被排出, 而 90% 左右的 EC 被肝脏酯酶分解为无毒的乙醇、 NH_3 和 CO_2 , 随后经人体代谢排出, 在此途径中的 EC 无致癌性; (2) 约 0.5% 的 EC 经线粒体 P450 的氧化下转化为中间代谢物, 这些代谢物经过进一步的转化后可以形成环氧乙烷基甲酸甲脂, 此环氧化物会与 DNA 结合并造成其加聚, 从而引起癌变; (3) 剩余极少量的 EC 可通过 P450 转化为 *N*-羟基氨基-甲酸乙酯, 并在铜离子存在的条件下分解成 NO 、 O_2 , 经过一系列的化学变化最后引发 DNA 损伤, 影响特定碱基发生改变^[7]。除已经得到解析的细胞色素 P450 氧化 EC 损伤 DNA 途径外, Yang 等人^[8]报道了 EC 的另一条

铁死亡代谢机制的致癌途径，研究发现由于细胞内 EC 的摄入导致红细胞核因子 2 失活（Nrf2）与谷胱甘肽（GSH）的耗竭。

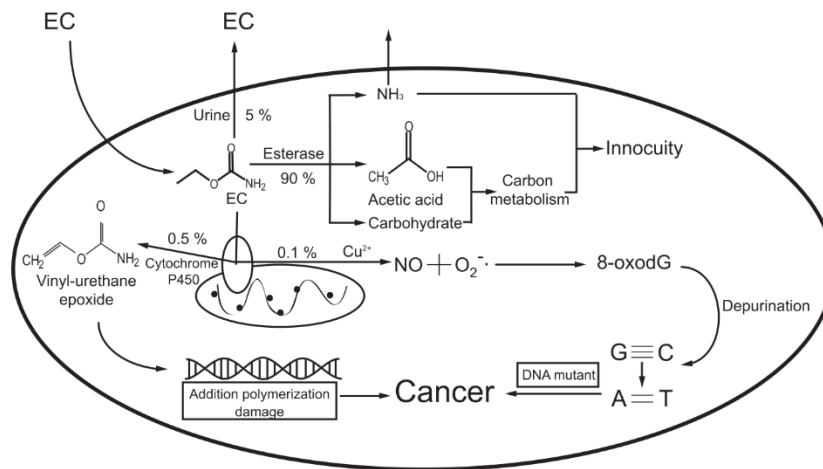


图 1-1 氨基甲酸乙酯的致癌机制^[6]

Figure 1-1 Carcinogenic mechanism of ethyl carbamate^[6]

1.1.2 氨基甲酸乙酯的形成途径

发酵食品中与乙醇生成 EC 的前体物质主要有五种，分别为尿素、氨甲酰磷酸、瓜氨酸、焦碳酸二乙酯与氰化物^[9]。在实际的工业生产过程中形成 EC 的主要前体物质为尿素，其次为氰化物与瓜氨酸，三种来源的前体物质形成的 EC 占生成总量的 90%以上^[10]。

（1）尿素来源

尿素作为 EC 的主要前体物质，其主要包含两个来源^[11, 12]。一方面是在发酵过程中原材料所自身携带的尿素，包括在原料种植过程中施加的氮肥与发酵中添加的含有尿素的其他辅料；另一方面在酵母细胞的发酵过程中，其会通过自身的精氨酸代谢途径合成尿素。在细胞中的尿素通常会利用尿素水解酶进行分解，然而在生产过程中往往因为发酵介质中含有酵母偏好氮源而导致尿素水解酶活性被抑制，产生了氮代谢物阻遏效应（nitro catabolite repression, NCR），细胞中的尿素无法得到有效的分解，然后在尿素渗透酶的作用下被排入发酵液中，自发与乙醇反应形成 EC（ $\text{H}_2\text{NCONH}_2 + \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} \rightarrow \text{H}_2\text{NCO}_2\text{C}_2\text{H}_5 + \text{NH}_3$ ）。

（2）氰化物来源

在许多的酒精饮料中，氰化物与乙醇形成 EC 的机制得到了解析。氰化物的来源主要包含两个方面^[13, 14]，一是由发酵原料中的生氰糖苷经一系列的反应生成得到；二是在发酵与蒸馏过程中，介质内含有的尿素被分解后产生氰化物。

（3）瓜氨酸来源

经近年来的研究报道，瓜氨酸与乙醇也可以形成 EC^[15,16]。其机制为微生物在发酵后期的苹果酸-乳酸发酵过程中乳酸菌将发酵液中的剩余精氨酸进行降解生成瓜氨酸，但瓜氨酸与乙醇反应形成的 EC 含量较低，占总体生成量较少。

（4）其他来源

在酒精饮料中，氨甲酰磷酸、焦碳酸二乙酯也可以形成 EC。20 世纪 70 年代初，氨甲酰磷酸就被发现可以与乙醇反应可以形成 EC，但在实际生产中其 EC 生成量极低，不作为 EC 主要前体物质^[17]。焦碳酸二乙酯最早被用于葡萄酒中杀菌，但在后续研究中发现其会与乙醇形成 EC，被禁止在发酵中使用^[18]。

1.1.3 氨基甲酸乙酯的检测方法

EC 在食品和酒精饮料中的含量范围较大，通常低至几 ng/L 高至几百 μg/L。由于样品中可能存在干扰物质，因此需要使用高灵敏度的方法进行定量检测。以下是几种常用的 EC 检测方法：

（1）气相色谱法（GC）是测定 EC 的常用方法，通常使用氨基甲酸丙酯或氨基甲酸丁酯作为内标^[19]。GC 法具有较高的灵敏度和选择性，适用于食品和酒精饮料中 EC 的定量分析。

（2）气相色谱质谱联用法（GC-MS）是国际上公认的 EC 检测方法，具有高灵敏度和良好的复现性^[20]。刘俊等人^[21]开发了一种基于顶空固相微萃取（HS-SPME）气相色谱质谱联用（GC-MS）的自动快速检测方法，适用于黄酒中 EC 的测定。

（3）气相色谱串联质谱法（GC-MS/MS）具有更高的灵敏度和准确性^[22]。Hamlet 等^[23]建立了一种正离子化学电离 GC-MS/MS 方法，用于测定面包中的 EC 含量。以此方法对家用和商品小麦面包的 50 个样品进行检测分析，结果显示其检测限为 0.6 μg/L。

（4）傅里叶变换红外光谱法（FTIR）结合偏最小二乘回归法可用于核果酒中 EC 的快速分析。与 GC-MS/MS 相比，FTIR 的检测不涉及前端色谱分析，通常会降低检测灵敏度。但 FTIR 的检测速度仅需 2 分钟即可检测到低至 7.5 μg/L^[24]，且无需复杂的样品前处理，操作简便。然而，其较低的准确性被多数用于大批量样品的定性筛选。

(5) 高效液相色谱荧光法(HPLC-FLD)是一种灵敏的 EC 检测方法。HPLC-FLD 在检测 EC 的精准度方面不如 GC-MS 高,但由于其成本较低,在很多的实验室中得到使用,常用于白酒与葡萄酒中 EC 的检测。Chen 等人^[25]开发了基于 EC 与 9-羟基吨(9-xanthidol)在酸性介质中反应生成荧光物质 1-黄葱酮(1-xanthylurethane)的检测方法,在 10-500 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性关系良好。该方法与 GC-MS 比较结果无显著差异,适用于酒精饮料中 EC 的快速筛选。

(6) 表面增强拉曼光谱法(SERS)已用于研究 EC 检测分析。一些研究人员使用金纳米粒子基底作为 SERS 放大器来检测酒精饮料中的 EC 浓度,其检测限低至 0.1 $\mu\text{g/L}$ ^[26, 27]。银纳米粒子也可以用作 SERS 放大器,并已用于检测 EC 浓度范围广泛的酒精饮料^[28]。尽管 SERS 有望成为一种快速的 EC 检测方法,但仍需要继续努力优化 SERS 放大器,以确保分析结果具有可重复性。

1.1.4 氨基甲酸乙酯的限定标准

世界卫生组织食品添加剂联合专家委员会(Joint Expert Committee for Food Additives, JECFA)指出,酒精饮料在 EC 摄入的比例中含量较高,所以如黄酒、清酒、白兰地、白酒、葡萄酒等发酵酒精饮料中 EC 的存在和含量引起了各个国家的重视^[29, 30]。为保障酒类的饮用安全,国际卫生组织与世界许多国家对进出口食品中的 EC 含量在一定范围内进行了约束并制定了严格的标准^[31, 32]。例如在 2020 年,加拿大规定了蒸馏酒、清酒、白兰地中 EC 的最大含量分别为 150、200、400 $\mu\text{g/L}$ ^[33]。在国际进出口市场中一些欧美国家对我国出口的黄酒中 EC 的限定含量为 100 $\mu\text{g/L}$,但目前国内生产的黄酒中 EC 含量仍然较高(100-750 $\mu\text{g/L}$)^[34, 35],且尚无有效的方法直接降低食品中 EC 的含量,这不仅限制了我国酒类的外销,还会影响国内的酒精饮料消费者身体健康。

1.2 发酵食品中氨基甲酸乙酯消减策略研究现状

1.2.1 代谢工程选育低产尿素的酵母

由于尿素是 EC 的主要前体物质,所以基于对酿酒酵母的尿素合成途径的解析,利用代谢工程对酿酒酵母中生产、转运和利用尿素的通路进行改造^[36-39],如通过筛选精氨酸酶缺陷型的突变体来减少降解精氨酸所产生的尿素;敲除转运和代谢精氨酸的基因;强化细胞利用和吸收尿素的基因;弱化瓜氨酸和尿素向外转运的基因,但这些方法无法处理除尿素以外的底物生成的 EC 且针对单一菌种的

改造也无法适应部分发酵食品中混合发酵的情况。

1.2.2 生产工艺降低氨基甲酸乙酯的形成

尿素作为 EC 的主要前体物质，要精选发酵的原料或对原料进行预处理，控制发酵过程中尿素的带入^[40]。例如通过细加工（如精炼和水洗）来减少原料中 EC 的前体物质含量。另外针对另一个生产 EC 的前提物质氰化物，可以通过对发酵过程中的温度、pH、发酵时间等进行优化以此减少 EC 的形成。此外国外多采用二次蒸馏或多次蒸馏的方法对发酵后得到的酒精饮料进行降低 EC 含量，而国内一般通过减少灭菌的时间、以吸附材料截留 EC 以减少酒精饮料中的 EC 含量，但这些处理方法并不完善，有的会降低成品的营养含量，有的会影响酒精饮料的风味，还有的对于 EC 的消减不完全和效率低下。

1.2.3 酸性脲酶降解尿素

酸性脲酶则更加直接地针对 EC 前体物质尿素进行分解，即利用酸性脲酶直接将尿素水解成无毒的乙醇、二氧化碳和氨。目前主要应用在降低黄酒与葡萄酒中的 EC 含量，使尿素含量降低了 95%以上^[41]。酸性脲酶可以有效减少 EC 的前体物质尿素，从而达到控制 EC 含量的目标，目前很多国家允许向酒精类饮料中添加脲酶^[42]，但它却无法降解已经合成的 EC。

1.2.4 氨基甲酸乙酯水解酶

EC 水解酶是一种直接以 EC 作为底物进行降解的酶类，目前根据水解 EC 官能键的不同分为酰胺类水解酶与酯类水解酶，但截止目前报道的绝大多数 EC 水解酶皆为酰胺类水解酶。如 1990 年，Kobashi 等人^[43]首次在柠檬酸杆菌（*Citrobacter* sp.）中发现了一种具有 EC 水解活性的酰胺酶。随后，研究者们从不同来源的微生物中陆续发现了多种 EC 水解酶，并对其酶学性质进行了研究。2006 年，Akutsu-Shigeno 等人^[44]从马红球菌（*Rhodococcus equi* TB-60）克隆了具有 EC 水解活性的脲酶基因，并在大肠杆菌中实现了活性表达。2020 年，Masaki 等人^[45]发现来源于假丝酵母（*Candida parapsilosis*）的酰胺酶在乙醇环境下表现出较好的 EC 水解活性，其在 20%乙醇中仍能保持 73%的活性。2022 年 Dong 等人^[46]发现一株来自于醋酸钙不动杆菌（*Acinetobacter calcoaceticus*）的酯酶同样具有 EC 水解活性。而在降解 EC 的策略中，与其他降解酒精饮料中 EC 的方法相比，EC 水解酶具有直接高效地将 EC 水解为安全无害物质的优势，例如研究

报道 EC 水解酶可将成品米酒与酱油中的 EC 降低 15%-50%^[33,47,48], 国内外亦有很多研究人员希望对该类酶可以有效得到食品级异源表达, 但目前仅有 14 个具有 EC 降解作用的酶得到鉴定及表征, 其中包含 7 个酰胺酶^[33, 44, 45, 49-52]、6 个脲酶^[53-58]和 1 个酯酶^[46]。尽管 EC 水解酶在降解 EC 方面具有潜在的应用价值, 但其在工业中的广泛应用仍面临诸多挑战, 主要原因之一即为 EC 水解酶降解 EC 过程中会与 EC 前体物质尿素产生底物竞争效应, 而发酵环境中的尿素含量是 EC 的上百倍, 这就导致 EC 往往无法得到有效降解, 而 2022 年 Dong 等人^[46]报道的酯酶具有 EC 水解活性, 因其通过断裂酯键进行水解 EC, 所以在水解过程中不存在尿素的底物竞争效应, 在实际的 EC 降解过程中具有重大应用价值。

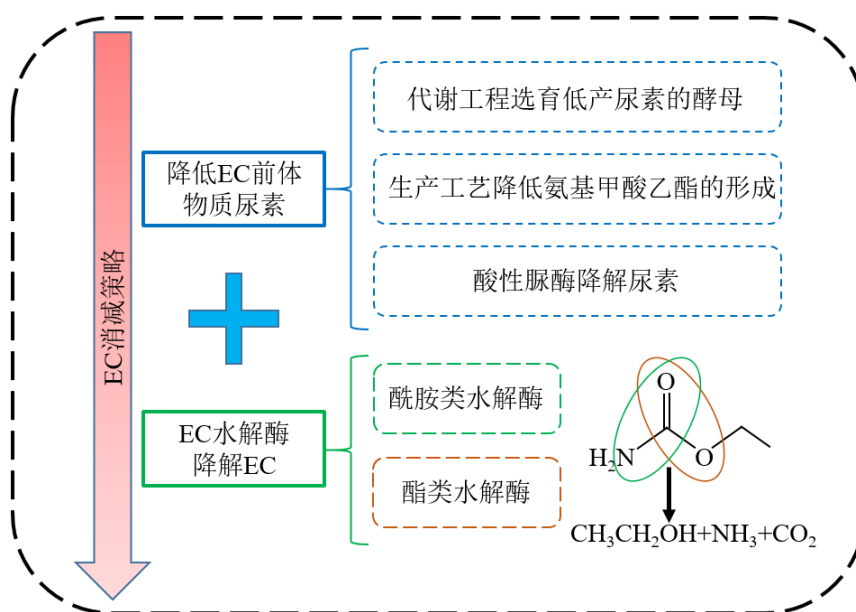


图 1-2 氨基甲酸乙酯的消减策略

Figure 1-2 Reduction strategy of ethyl carbamate

1.3 酯酶概述

酯酶 (EC 3.1) 在自然界中分布广泛, 具有专一性强、反应条件温和与底物谱广等优势, 并且酯水解反应一般不需要辅因子的参与, 具备较好的稳定性。酯酶根据分解后的产物性质被细分为四组, 包括羧酸酯水解酶 (EC 3.1.1), 硫酸酯水解酶 (EC 3.1.2), 磷酸单酯水解酶 (EC 3.1.3) 与磷酸二酯水解酶 (EC 3.1.4)^[59]。羧酸酯水解酶的底物是由羧酸与醇经缩合得到的酯类化合物, 而根据羧酸酯水解酶的底物特异性, 其主要又被分为羧酸酯酶 (EC 3.1.1.1) 与甘油三酯水解酶 (EC 3.1.1.3); 一般狭义认为酯酶专指羧酸酯酶, 而甘油三酯水解酶则被称为脂肪酶,

二者都可以催化断裂羧酸与醇形成的酯键^[60]。大部分的酯酶都属于 α/β 水解酶超家族，含有由 8 条基本平行的 β 折叠片与围绕蛋白中心的 5 条 α 螺旋组成的典型折叠结构，并且通常含有一个在空间上相互靠近的“催化三联体”(Ser-His-Asp) 行使催化功能^[61]。

1.3.1 酯酶水解原理

羧酸酯酶 (EC 3.1.1.1) 的水解过程主要由四部分组成：首先当酯酶处于游离态时，亲核残基丝氨酸和组氨酸形成一条氢键，而酸性残基天冬氨酸与组氨酸之间也形成一条氢键，即催化三联体通过组氨酸与其他两个残基间形成氢键网络使丝氨酸得到活化，使其羟基氧原子具备较强的亲核能力；之后活化丝氨酸的羟基对底物羰基进行亲核攻击，随后组氨酸与天冬氨酸间形成氢键，并由组氨酸接收丝氨酸羟基的一个质子形成“氧阴离子空穴”；此时丝氨酸与底物间形成四面体中间体，丝氨酸羟基的氧负离子继续进攻底物羰基导致底物的一部分与丝氨酸释放的质子间形成醇，而另一部分则会与丝氨酸形成酰基-酶复合物；最后组氨酸激活水分子，使其进行亲核攻击酰基-酶复合物的羰基并将其水解，与此同时组氨酸还会向丝氨酸返回一个质子，使底物从中间体状态得到释放形成酸^[59]。

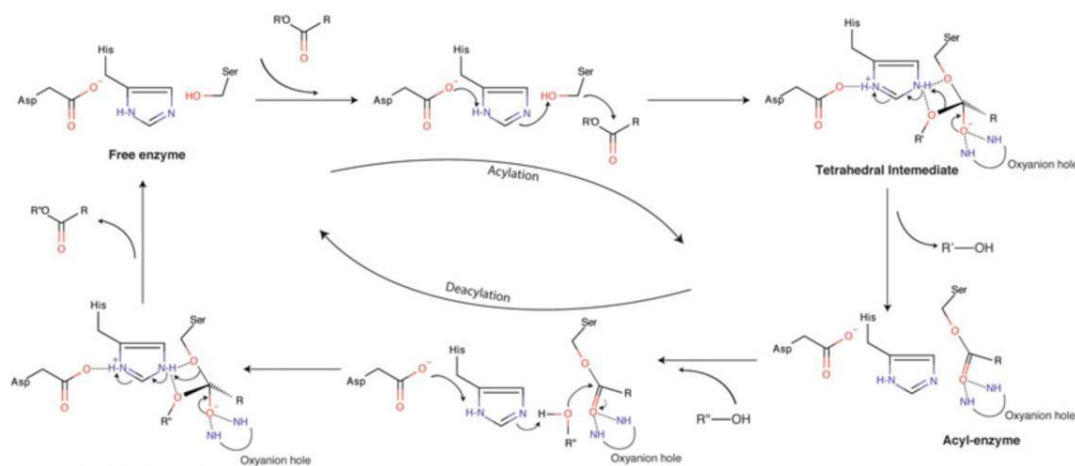


图 1-3 酯酶的水解机制^[62]

Figure 1-3 The mechanism of esterase catalysis^[62]

1.3.2 酯酶在水解氨基甲酸乙酯中的应用

截止至 2021 年研究发现的 EC 水解酶皆为通过断裂酰胺键而降解 EC，而在 2022 年 Dong 等人^[46]发现来源于 *A. calcoaceticus* 的酯酶也具有 EC 水解酶活性，其比活力达 68.31 U/mg，并且在 60% 的乙醇环境中 20 °C 保温 1 h 仍保留 40% 的酶活力，将酯酶纯化后应用在白酒中可使 EC 浓度降低 50 $\mu\text{g/L}$ 以上，在酒精饮

料中表现出较高的应用潜力。

酯酶虽然在白酒中具备明显降解 EC 含量的效果，但多数的发酵食品（如黄酒）中的环境除乙醇浓度高外仍有 pH 值较低的问题，且目前报道的酯酶对环境中的 EC 消减不完全，其在白酒中降解 12 h 后 EC 含量仍有 60% ($>150\text{ }\mu\text{g/L}$)，未能将食品中的 EC 含量降低至出口限定标准以内 ($<100\text{ }\mu\text{g/L}$)。尽管新报道的酯酶由于不会在水解过程中产生 EC 与尿素的底物竞争作用而被认为具有应用在工业生产中的潜力，但其仍存在一定的局限性，例如其催化效率低和耐酸性差等^[63]。因此可以通过基因挖掘而获取到具有优良酶学性质的可降解氨基甲酸酯的酯酶，或者对已经鉴定表征的具有 EC 水解活性的酯酶进行分子改造以获得优良突变体。

1.4 酶催化速率改造策略

1.4.1 定向进化

定向进化是一种模拟自然进化过程的酶改造策略，通过引入随机突变和高通量筛选，获得具有改进性能的酶突变体^[64, 65]。其优点在于无需深入了解酶的结构功能关系，适用于未知结构的酶或复杂酶系统。Schnettler 等人^[66]以定向进化为策略改造非金属依赖性磷酸三酯酶 P91，通过结合液滴微流控的超高通量筛选技术将 P91 的活性提高 360 倍，使其催化效率与自然进化的金属依赖性磷酸三酯酶相当。Liu 等人^[67]通过对拟除虫菊酯水解酯酶进行随机诱变获得两个良性单点突变体 A171V 与 D256N，将两个位点结合后获得突变体 M2，其相较于 WT 催化速率提升 2.46 倍，对底物拟除虫菊酯水解率达 98%。定向进化无需深入了解酶的结构与功能的关系，适用于复杂结构与功能关系的酶，但由于其工作量较大的缺点，突变体库通常包含数百万个突变体，筛选过程耗时且成本较高，所以需要建立起高效合理的筛选方法才能得到良性突变体，无法对所有酶适用。

1.4.2 理性设计

理性设计是一种基于酶的结构功能关系和催化机制的精准改造策略，通过计算机模拟和分子动力学分析，理性设计可以精确地引入突变，从而提升酶的亲和力与催化速率^[68, 69]。其操作流程包括：（1）结构分析，通过酶的晶体结构（PDB）或建模软件（如 SWISSMODEL）获得酶的 3D 结构。（2）计算模拟，利用分子动力学（molecular dynamics simulation, MD）模拟和能量计算，识别潜在的突变

位点。(3) 定点突变, 通过计算机辅助设计工具(如 Rosetta、Discovery Studio) 设计突变位点, 并进行实验验证。例如 Liu 等人^[70]以来源于赖氨酸芽孢杆菌 (*Lysinibacillus fusiformis* SC02) 具有 EC 水解活性的酰胺酶为研究对象, 采用计算机辅助设计构建突变体 Q328C, 其在 40 °C 下的半衰期是 WT 的 7.46 倍。Li 等人^[71]基于氨基甲酸酯酶 UMG-SP2 的晶体结构为导向进行理性设计得到突变体 A141G, 其较 WT 相比对底物聚氨酯的活性提高 30.7 倍。理性设计可以精准、高效的显著提升酶的稳定性和催化速率, 但因为其需要对酶的结构功能关系有深入了解, 且计算模拟的准确性依赖于结构数据的质量, 所以在实际的蛋白质改造中的成功率较低, 所获得的多数突变体皆为负向突变。

1.4.3 半理性设计

半理性设计结合了定向进化和理性设计的优点, 通过理性选择突变位点并结合高通量筛选, 显著提高了筛选效率和突变体的质量^[72, 73]。其设计步骤包括:(1) 位点选择, 通过序列比对、结构分析和计算模拟, 选择潜在的突变位点。(2) 饱和突变, 在选定位点引入饱和突变(如 NNK 密码子), 构建“小而精”的突变文库。(3) 高通量筛选, 利用高通量筛选方法, 快速筛选出具有改进性能的突变体。例如刘庆涛等人^[55]通过位点饱和突变的半理性设计, 筛选并改造具有 EC 水解活性的脲酶中酶活影响较高的氨基酸位点, 其最佳突变体 L253P/L187N 的底物亲和力提升 49%, 催化速率提升 1027%。康婷婷等人^[74]以半理性设计的方法显著提高了来源于 *Agrobacterium tumefaciens* d3 的 EC 水解酶 AmdA 的催化活性, 其首先通过多序列比对得到酶活力提高 375% 的突变体 G195A, 之后研究者对催化三联体周围位点进行饱和突变获得酶活性提高 53% 的突变体 I97L, 最后将两个突变位点进行组合得到酶活力提高至 518% 的突变体 I97L/G195A。半理性设计结合了定向进化和理性设计的优点, 具有较高的筛选效率以及更多样的突变体。尽管如此, 其仍需要一定的结构信息和计算资源支持, 另外由于需要高通量筛选方法进行筛选, 所以在改造过程中仍需要考虑到酶的作用机制以建立起合适的筛选方法。

1.5 酶的稳定性提升策略

目前对酶的稳定性提高策略主要包含:(1) 定向进化筛选高稳定性突变体, 例如通过筛选耐受高温、酸性环境或有机溶剂的突变体, 可以获得在苛刻条件下

仍保持催化效率, 稳定性得到提高的酶^[75,76]; (2) 融合已知稳定性高的酶结构域片段, 对于同源性高且稳定性差异显著的蛋白, 在替换不到 20% 的氨基酸就足以明显改变酶的稳定性^[77]; (3) 针对酶结构进行优化疏水核心和引入二硫键, Sutthibutpong 等人^[78]通过在木聚糖酶 XynA 中研究疏水相互作用、氢键与二硫键对其热稳定性影响发现, 二硫键对酶的稳定性提升效果最为显著。二硫键是由蛋白质中两个空间上相近的 Cys 的巯基基团所形成的共价键, 其对蛋白质的空间折叠、催化活性和稳定性具有极其重要的影响^[79]。目前的诸多研究表明, 在蛋白质中引入二硫键可以稳定其内部的柔性区域, 降低蛋白质的整体构象熵从而提高稳定性^[80,81]。例如, Kanaya 等人^[82]通过定点突变, 将 WT 核糖核酸酶 H 中原为 Cys13 与 Asn44 的位点改为 Cys44, 通过设计出二硫键, 使突变体的熔解温度 (T_m) 达 62.3 °C, 比 WT 提高了 11.8 °C; 在无变性剂条件下, 突变体的展开自由能和变性曲线中点分别增加了 2.1–2.8 kcal/mol 和 0.36–0.48 M, 从而极大地增强了其热稳定性和构象稳定性。此外, 在 NAD⁺ 依赖性甲酸脱氢酶 (FDH) 中, 由于天然半胱氨酸 (Cys) 的氧化会引起酶失活, Zheng 等人^[83]采用定点突变策略, 在 Ala10 与 Cys23 以及 Ile239 与 Cys262 之间引入新的二硫键, 从而消除了 FDH 中天然游离 Cys 的氧化, 结果显示突变体显著增强了耐酸性, 在 60 °C 下其半衰期增加了 6.7 倍, 与此同时催化效率也提高了 1.4 倍。考虑到二硫键对蛋白质稳定性的增强作用尤为显著, 因此通过在蛋白质中引入二硫键来提高酶稳定性是一种行之有效的策略。

1.6 本课题的研究意义与主要研究内容

1.6.1 研究意义

目前报道的 EC 水解酶主要为酰胺酶, 其存在对底物的亲和力差、催化效率低、耐酸性或耐醇性差等问题致使其不能直接降解发酵食品中的 EC^[33]。酯酶作为新报道具有 EC 水解活性的水解酶, 因其在反应过程中不存在 EC 与尿素与底物竞争效应而被关注并研究, 但其在酸性环境下无法正常发挥酶活性且催化速率远远无法达到工业使用的要求, 因此筛选并改造出一个耐酸耐乙醇且可以有效水解 EC 的高活性酯酶对消除发酵食品中的 EC 至关重要。

本研究通过对已报道的唯一一个 EC 水解酯酶的蛋白质序列为依据^[46], 筛选并改造出具有较好的 EC 亲和力以及在酸性环境下较高的催化速率的新型 EC 水

解酶，为未来解决发酵食品和酒精饮料中的 EC 问题提供新方法。同时 EC 水解酶研究尚浅，在酸性条件下不稳定的特性使得其无法应用于发酵食品和酒精饮料中 EC 的降解，通过对酯酶理性设计的进一步研究，解析出其突变体在酸性环境下催化速率提升的机制，也为其他的 EC 水解酶的改造提供参考。

1.6.2 主要研究内容

本文主要研究内容如下：

(1)基于已知序列的 EC 水解酯酶，利用 NCBI 数据库进行基因序列比对，挖掘出可能有 EC 降解活力的新型 EC 水解酯酶，经全基因合成并在大肠杆菌中可溶性表达后，表征出具有高 EC 水解活性的酯酶酶学性质。

(2)通过序列比对，挖掘氨基酸序列与蛋白功能的关系，基于序列一致性回归策略指导酯酶进行理性改造；利用同源建模和分子对接进行酶与底物的作用力分析，此外针对改造的底物通道进行亲疏水性分析以观察 EC 对底物通道的继续偏好，之后利用分子动力学模拟来探究酯酶底物亲和力与催化速率提升的机制原理。

(3)为进一步提升酯酶的稳定性，通过多重计算方法结合分子动力学的 RMSF 结果，在酯酶的高柔性区域中构建二硫键以使其空间结构在不同的极端环境更加稳定；通过酶学性质表征分析二硫键在酯酶稳定性提升的功能，以分子动力学模拟与分子间作用力分析阐释二硫键提升酯酶稳定性的机理。

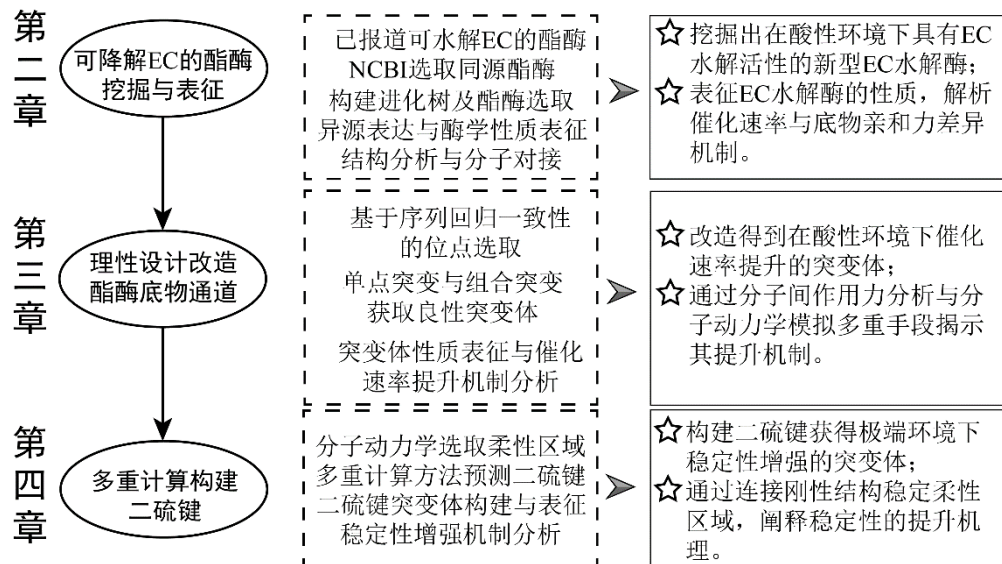


图 1-4 本文技术路线图

Figure 1-4 Technology roadmap for this paper

第 2 章 可降解 EC 的酯酶挖掘与酶学性质表征

2.1 引言

EC 是发酵食品中的致癌性物质，而使用 EC 水解酶对其进行直接降解是目前较为直接有效的消减策略^[6, 84]。EC 水解酶包含酰胺酶与酯酶两类，其中多数酰胺类 EC 水解酶由于会在水解过程中会与环境内高含量的 EC 前体物质尿素发生底物竞争反应而无法有效的降解 EC；而 EC 水解酯酶催化断裂 EC 中的酯键而非酰胺键，不会与其前体物质发生底物竞争，所以被视为降解发酵食品中 EC 的一种有效的新方法^[85]。但目前仅有一个可降解 EC 的酯酶得到报道^[46]，为获得高降解活力的新型 EC 水解酯酶与丰富 EC 水解酯酶酶库，本章从 NCBI 数据库中通过基因挖掘获取新酶并进行性质表征。

2.2 实验材料

2.2.1 菌株与质粒

实验所用菌株与质粒见表 2-1 与表 2-2。

表 2-1 实验菌株
Table 2-1 Experimental strain

菌株	基本描述	来源
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	空载菌株，卡那霉素抗性，T7 启动子	实验室保藏
<i>E. coli</i> BL21/pET30a-es1	含有 pET30a-es1 质粒的工程菌株	本论文构建
<i>E. coli</i> BL21/pET30a-es2	含有 pET30a-es2 质粒的工程菌株	本论文构建
<i>E. coli</i> BL21/pET30a-es3	含有 pET30a-es3 质粒的工程菌株	本论文构建
<i>E. coli</i> BL21/pET30a-es4	含有 pET30a-es4 质粒的工程菌株	本论文构建
<i>E. coli</i> BL21/pET30a-es5	含有 pET30a-es5 质粒的工程菌株	本论文构建
<i>E. coli</i> BL21/pET30a-es6	含有 pET30a-es6 质粒的工程菌株	本论文构建
<i>E. coli</i> BL21/pET30a-es7	含有 pET30a-es7 质粒的工程菌株	本论文构建
<i>E. coli</i> BL21/pET30a-es8	含有 pET30a-es8 质粒的工程菌株	本论文构建
<i>E. coli</i> BL21/pET30a-es9	含有 pET30a-es9 质粒的工程菌株	本论文构建

表 2-2 实验质粒
Table 2-2 The list of experimental plasmid

质粒	基本描述	来源
pET30a-es1	用于过表达酯酶 ES1 的质粒	苏州金唯智生物科技 有限公司全基因合成
pET30a-es2	用于过表达酯酶 ES2 的质粒	
pET30a-es3	用于过表达酯酶 ES3 的质粒	
pET30a-es4	用于过表达酯酶 ES4 的质粒	
pET30a-es5	用于过表达酯酶 ES5 的质粒	
pET30a-es6	用于过表达酯酶 ES6 的质粒	
pET30a-es7	用于过表达酯酶 ES7 的质粒	
pET30a-es8	用于过表达酯酶 ES8 的质粒	
pET30a-es9	用于过表达酯酶 ES9 的质粒	

2.2.2 主要材料与试剂

表 2-3 实验试剂
Table 2-3 Experimental reagent

试剂名称	试剂规格	生产厂家
异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG)	AR	生物工程 (上海) 有限公司
硫酸卡那霉素	AR	生物工程 (上海) 有限公司
氨基甲酸乙酯 (EC)	AR	生物工程 (上海) 有限公司
尿素	AR	生物工程 (上海) 有限公司
Bradford 法蛋白浓度测定试剂盒	-	生物工程 (上海) 有限公司
感受态制备试剂盒	-	生物工程 (上海) 有限公司
HisTrap™ HP 5 mL 亲和层析柱	-	思拓凡生物科技有限公司
HiTrap™ 5 mL 脱盐柱	-	思拓凡生物科技有限公司
十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺 (SDS-PAGE) 凝胶配制试剂盒	-	碧云天生物科技有限公司
蛋白质 Marker	-	碧云天生物科技有限公司
胰蛋白胨	BR	英国 Oxoid 公司
酵母提取物	BR	英国 Oxoid 公司
琼脂粉	BR	国药集团化学试剂有限公司

续表 2-3 实验试剂
Table 2-3 (continued) Experimental reagent

试剂名称	试剂规格	生产厂家
无水乙醇	AR	国药集团化学试剂有限公司
氯化钠	AR	国药集团化学试剂有限公司
Triton X-100	BR	国药集团化学试剂有限公司
乙二胺四乙酸 (EDTA)	AR	国药集团化学试剂有限公司
金属盐 (MgSO ₄ 、CuSO ₄ 、ZnSO ₄ 、 FeCl ₃ 、CaCl ₂ 、BaCl ₂ 、CoCl ₂ 、LiCl)	AR	国药集团化学试剂有限公司
硼砂	AR	国药集团化学试剂有限公司
Tris	AR	国药集团化学试剂有限公司

2.2.3 主要仪器与设备

表 2-4 实验仪器
Table 2-4 Experimental instrument

仪器名称	型号	生产厂家
蛋白纯化仪	ÄKTA go	思拓凡生物科技有限公司
全波长酶标仪	SpectraMax ABS	美谷分子仪器有限公司
凝胶成像系统	MINI Space 100	上海天能生命科学有限公司
冷冻离心机	H1750R	湖南湘仪实验仪器有限公司
生化培养箱	ZQZY-88BES	上海知楚仪器有限公司
紫外-可见光分光光度计	UV-5500PC	上海元析仪器有限公司
金属浴	SE 22331 Hamburg	德国 Eppendorf 公司
超声破碎仪	JY92-IIDN	宁波新芝生物科技有限公司
蛋白电泳槽	Mini-PROTEAN Tetra	Bio-Rad Laboratories

2.2.4 培养基与溶液配制

Luria-Bertani (LB) 培养基: 5 g/L 酵母粉、10 g/L 胰蛋白胨、10 g/L NaCl, 固体培养基另加 15 g/L 琼脂粉。

终止剂: 25 g 三氯乙酸用超纯水溶解并定容至 250 mL;

显色剂 I: 15 g 苯酚和 0.625 g 亚硝基铁氰化钠, 用超纯水溶解并定容至 250 mL;

显色剂 II: 13.125 g NaOH 和 7.5 mL NaClO 溶液, 用超纯水溶解并定容至 250 mL。

TBE 缓冲液 10×母液: Tris 108 g/L, EDTA 7.44 g/L, 硼酸 55 g/L。

卡那霉素 (Kan) 溶液: 称取 0.5 g 卡那霉素, 将其充分溶解在适量无菌水中, 然后定容至 10 mL, 通过 0.22 μ L 滤膜进行过滤, 于 -20 °C 贮藏。

2.3 实验方法

2.3.1 基于生物信息学的酯酶基因挖掘

以文献报道的来源于醋酸钙不动杆菌 *Acinetobacter calcoaceticus* (Genbank No. BAC55927.1) 的酯酶氨基酸序列信息为依据, 通过美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 数据库的 BLASTp 程序对酯酶进行比对。选择序列相似性靠前的 80 条序列, 使用 MEGA11 软件进行氨基酸序列比对, 并使用邻近法搭建酯酶进化树; 距离模型选用 *p-distance*, 检验次数设置为 1000 次。由于氨基酸序列相似性越高, 则其具有 EC 降解活性的可能性越高; 同时, 为了兼顾序列之间的多样性, 我们以序列相似性 80% 为阈值, 选取了与查询序列相似性大于等于 80% 的 9 个序列, 分别命名为 ES1-ES9。

2.3.2 ES1-ES9 重组质粒构建

酯酶基因经密码子优化、全基因合成, 及通过 *Nde*I 及 *Xho*I 双酶切连接的方法构建重组表达质粒 pET30a-*es1*-pET30a-*es9*, 此部分内容均由苏州金唯智生物科技有限公司完成。将重组表达质粒通过化学转化的方法将其转化进入 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞中, 并涂布于含 50 μ g/mL 硫酸卡那霉素的 LB 固体平板, 于 37 °C 过夜培养, 阳性转化子即为酯酶异源重组表达菌株。苏州金唯智生物科技有限公司构建的质粒均在 C 端与组氨酸标签融合, 以便于通过亲和层析进行蛋白纯化。

2.3.3 大肠杆菌感受态细胞的制备与转化

(1) 感受态细胞的制备

于 LB 固体培养基中划线 *E. coli* BL21 (DE3) 菌株培养获得单菌落; 单菌落培养 10-12 h 为种子液, 按 1% 体积接入扩大培养至 OD_{600nm} 为 0.4 左右; 低温下离心菌液并于冰中静置 10 min; 离心收集菌体, 使用预冷的 0.1 mol/L CaCl₂ 重悬低温静置 40 min; 再次离心, 倒出上清液, 菌体使用含 15% 甘油的 0.1 mol/L 的

CaCl₂ 溶液重悬；静置 10 min 后分装并于 -80 °C 保存。

(2) 大肠杆菌感受态细胞的转化

吸取 10 μL 合成得到的质粒与 100 μL 大肠杆菌感受态细胞混匀，随后在 42 °C 水浴锅下热激 70 s 并立即冰浴 5 min，再加入 500 μL LB 无抗液体培养基 37 °C 活化培养 1 h。活化结束后涂布于相应的含 50 μg/mL 卡那霉素抗性平板，37 °C 静置培养 12 h 后得到阳性转化子，并送至上海生工生物工程有限公司进行核苷酸测序。

2.3.4 重组酯酶的表达及蛋白纯化

挑取重组表达菌株单菌落，接种至含 50 μg/mL 硫酸卡那霉素的 LB 液体培养基，于 37 °C、200 rpm 条件下振荡培养至 600 nm 下 OD 值为 0.5-0.6 后，加入终浓度 1 mmol/L IPTG 诱导表达，在 30 °C、200 rpm 培养 8 h。取诱导发酵后菌液 25 mL 于 8000 rpm 离心 5 min 收集清洗菌体，加入 10 mL 磷酸盐缓冲液（phosphate buffered saline, PBS; 20 mmol/L, pH 7.0）重悬菌体。在冰浴条件下通过超声波破碎仪（900 W）破碎细胞。破碎条件如下：功率 30%，超声 2 s、间隔 3 s，30 min。超声破碎液经 8000 ×g 离心 30 min 后收集上清液，即为粗酶液。粗酶液经过 0.22 μm 水系醋酸纤维膜后，使用 HisTrap[™] 纯化柱通过 Ni-NTA 亲和层析法在 ÄKTA 纯化仪中进行纯化，先使用 5-10 倍柱体积的超纯水洗去保存液，然后用 5-10 倍柱体积的结合缓冲液（20 mmol/L PBS 缓冲液，pH 7.4）预平衡后将蛋白样品装入柱中。镍柱重新平衡后，非特异性结合蛋白使用 10% 洗脱缓冲液（20 mmol/L PBS 缓冲液，500 mmol/L 咪唑，pH 7.4）洗脱，之后使用 60% 洗脱缓冲液洗脱出目标蛋白。洗脱液使用 HiTrap[™] 脱盐柱进行脱盐处理，使用脱盐缓冲液（20 mmol/L, PB 缓冲液，pH 7.4）平衡后上样，继续洗脱收集脱盐蛋白用于后续分析。在 10% SDS-PAGE 凝胶上观测纯化酶的表现分子量与均一性。使用改良型 Bradford 试剂盒测定纯化蛋白的浓度。

2.3.5 重组酯酶的酶活力测定

每分钟分解底物 EC 产生 1 μmol NH₄⁺ 所需酶量为 1 个酶活力单位。根据 Berthelot 反应显色法^[54]，在波长 625 nm 条件下测定吸光值计算酶活。吸取 350 μL 含 340 mmol/L EC 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液（pH 4.5，20 mmol/L，对照组为柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液）于 1.5 mL 离心管中，在一定温度（如 37 °C）保温

5 min 后, 加入 50 μL 经过适当稀释的酶液, 在相同温度下反应 20 min 后, 立即加入 200 μL 终止剂终止反应, 混匀后依次加入 200 μL 显色剂 I、200 μL 显色剂 II, 混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 继续保温显色 20 min。显色结束后于 625 nm 处测定吸光值, 铵根离子标准曲线公式为 $Y=366.9x-22.27$ ($R^2=0.9983$), Y 为铵根离子浓度/ $(\mu\text{mol/L})$, x 为吸光值。酶活力计算公式如下:

$$\text{酶活力}/(\text{U/L}) = \frac{\Delta\text{OD}_{625} \times k \times n}{20 \times 50 \times 10^{-6}} \quad (2-1)$$

式中: ΔOD_{625} 为样品与空白对照的吸光值之差; k 为铵根离子标准曲线的斜率; n 为酶液的稀释倍数; 20 为反应时间 20 min; 50×10^{-6} 为反应中所用的酶液体积 (L)。

2.3.6 重组酯酶的酶学性质测定

为测定重组酯酶的最适反应温度, 将纯化后的酶液在不同温度 (20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80 $^{\circ}\text{C}$) 条件下测定酶活力, 将最高酶活力定义为 100%, 计算相对酶活力, 其中测得酶活力最大值对应的温度即为 EC 水解酯酶的最适反应温度。

为测定重组酯酶的热稳定性, 将纯化后的酶液分别置于 20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80 $^{\circ}\text{C}$ 保温 1 h, 迅速加热或冷却至所对应的最适反应温度后, 在最适反应温度及 pH 4.5 条件下测定残余酶活力, 以未保温处理的酶活力定义为 100%, 计算剩余酶活力。

为测定重组酯酶的最适 pH 值, 分别配制 20 mmol/L 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液 (pH 3.0-8.0)、20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0-9.0) 和 20 mmol/L Gly-NaOH 缓冲液 (pH 9.0-10.0), 将底物 EC 与缓冲液混合配制成浓度为 340 mmol/L 的底物缓冲液; 在相对应的 pH 值及最适反应温度条件下测定酶活力, 以最大酶活力为 100% 计算相对酶活力, 确定该酶的最适 pH 值。

为测定重组酯酶的 pH 值稳定性, 将纯酶分别置于上述不同 pH 值的缓冲液中, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏处理 6 h 后, 在最适反应条件下测定残余酶活力, 以未经冷藏处理的酶液活力为 100%, 计算相对酶活力。

为测定重组酯酶的乙醇与氯化钠耐受性, 将纯化的酶液加入含底物的不同体积分数的乙醇 (0%-40%) 溶液中, 于最适反应条件下测定酶活力, 以考察不同

体积分数乙醇溶液对酶活力的影响；将酶液加入到含底物不同质量浓度(0%-20%)的氯化钠溶液中，在最适反应条件下测定残余酶活力，考察酶对氯化钠的耐受性。

为测定金属离子和化学试剂对重组酯酶酶活力的影响，将酶与终浓度为 1 mmol/L 的不同金属离子 (Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Ca^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Co^{2+} 、 Li^{+}) 以及终浓度为 0.1 mmol/L (0.1%) 的化学试剂金属离子螯合剂乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) 和 Triton X-100 混合，于 37 °C 保温 5 min，之后在最适反应条件下测定酶的残余酶活力，以未添加金属离子和化学试剂时的酶活力为 100%，计算相对酶活力。

为了考查酯酶在酸性条件下对 EC 的亲合力及催化活力，将纯化的酯酶与不同终浓度 (10-1000 mmol/L) 的 EC 反应，在 pH 4.5 及最适反应温度条件下测定酶的初始反应速率，采用 Graph Pad 拟合计算酶对 EC 的 K_m 和 V_{max} (酶促反应最大速度)。 k_{cat} (催化常数) 计算公式为 $k_{cat}=V_{max}/[E]$ ，其中[E]为酯酶的摩尔浓度。

2.3.7 酯酶结构建模与结构分析

通过 trRosetta (<https://yanglab.qd.sdu.edu.cn/trRosetta/>) 对酯酶进行基于深度学习和同源模板的结构建模，获得酯酶三维结构。采用 COACH (<https://seq2fun.dcmf.med.umich.edu//COACH/>) 在线工具预测酯酶与 EC 结合位点。使用 Discovery Studio 2023 软件中的 CDOCKER 程序对酯酶与底物进行分子对接，获得酯酶与 EC 复合物 3D 结构。用 PyMoL 软件对获得的酯酶三维结构进行比对，获得均方根差值 (root mean square deviation, RMSD)，分析酯酶结构差异。采用 PyMoL 软件通过 Wizard-Measurement 的方法，测量底物通道最宽或最窄处所对应的氨基酸残基末端原子间的距离，在 NCBI 中的 PubChem 网站 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载 EC 的原子结构，采用 ChemDraw 软件计算 EC 分子的尺寸大小。采用 PyMoL 软件分析酯酶活性口袋氨基酸组成，以计算酯酶底物通道与活性口袋中氨基酸的净电荷与亲水指数。蛋白质净电荷计算公式为：

$$Q = (nR - nD + nK + nH) \times 1.602 \times 10^{-19} \quad (2-2)$$

式中：Q 是蛋白质的净电荷/C；nR 是精氨酸残基的数量；nD 是天冬氨酸残基的数量；nK 是赖氨酸残基的数量；nH 是组氨酸残基的数量。

根据 20 种氨基酸残基的亲水指数进行统计酶的底物通道与活性口袋氨基酸组成的亲水指数。采用 PyMoL 软件分析酯酶与 EC 之间形成的氢键相互作用力。

2.3.8 数据分析

所有实验数据皆为三次平行实验得出,数据结果采用平均值±标准偏差表示。采用 Microsoft Office Excel 2016 软件处理数据,数据统计和图表绘制使用 Origin 9.8 软件。

2.4 结果与讨论

2.4.1 酯酶挖掘与序列分析

来自于醋酸钙不动杆菌 *A. calcoaceticus* (GenBank No. BAC55927.1) 的酯酶具有 EC 水解酶活力,且其降解 EC 为无毒的氨、乙醇及 CO₂^[46]。本研究以该酯酶氨基酸序列为模板,进行 BLASTp 搜索,对获得的蛋白序列构建系统进化树(图 2-1)。选择了与模板序列相似度在 80%以上的 9 个蛋白(分别命名为 ES1-ES9),进行氨基酸比对分析。来自于不动杆菌 *Acinetobacter* sp. NBRC 110496 (WP_043970715.1) 的 ES9 与模板酯酶氨基酸序列相似度为 81.2%。目前结构得到解析的酯酶中,来源于恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* IFO12996 的酯酶(PDB no. 1ZOI)与 ES9 具有最高的氨基酸相似度(70%),通过 COACH 对 ES9 蛋白 EC 结合位点进行预测,结果显示,结合位点大约位于蛋白分子的中间,距底物通道入口 12 Å,由 7 个氨基酸残基组成(Trp31、Leu33、Thr98、Val124、Phe166、Phe203、Val229)(图 2-2)。序列比对结果显示,9 个酯酶都含有“Ser97-Asp227-His256”催化三联体及 α/β 水解酶超家族大多数成员具有的保守区序列 G-H-S⁹⁷-T-G(图 2-2)。选取 1-9 号代表性的酯酶为研究对象,进行下一步的实验分析。

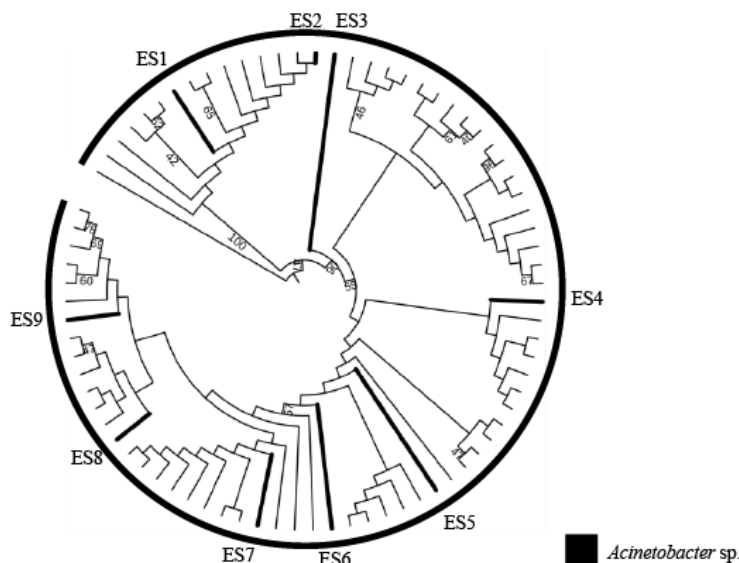
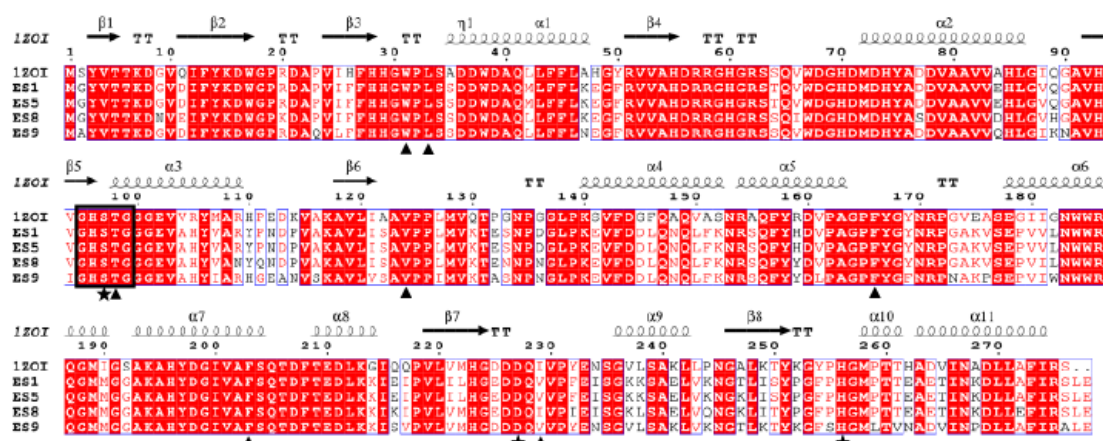


图 2-1 酯酶序列系统进化树

Figure 2-1 Phylogenetic tree based on the amino acid sequences of esterases



注：黑色五角星代表催化活性位点，黑色三角代表底物结合位点。

图 2-2 酯酶氨基酸序列比对结果

Figure 2-2 Amino acid sequence alignment of esterases

2.4.2 重组酯酶的表达、EC 降解能力鉴定及纯化

9 株重组大肠杆菌经诱导发酵及超声破碎后，进行酶活力测定和重组蛋白表达分析。酶活力测定结果表明（图 2-3），除 ES6 及 ES7 仅对 EC 具有极其微弱酶活力外，其余 7 个酯酶对 EC 均具有水解作用，且 ES1、ES5、ES8 和 ES9 在 pH 4.5 及 pH 7.0 条件下均具有相对较高的酶活力；以尿素为底物进行酶活力测定发现，9 种酯酶均未显示酶活力，结果表明酯酶对尿素无水解作用。SDS-PAGE 分析结果显示（图 2-4A、B），与不含酯酶的重组大肠杆菌相比，9 种重组大肠杆菌的细胞裂解液上清和沉淀样品都在 30 kDa 附近均出现了条带，与重组酯酶分子质量理论值（ES1-ES9：30.95、30.99、30.96、30.96、30.98、30.90、31.01、31.06、

30.97 kDa) 基本相符, 由此说明 ES1-ES9 全部在 *E. coli* BL21 (DE3) 细胞内实现了可溶性表达, 但 ES4 表达量较少 (图 2-4A、B)。因此, 选定 ES1、ES5、ES8 和 ES9 进行进一步的 Ni-NTA 亲和层析纯化, 结果如图 2-4C 所示, 蛋白胶上显示为单一条带, 因此 4 种酯酶均得到了良好的纯化。

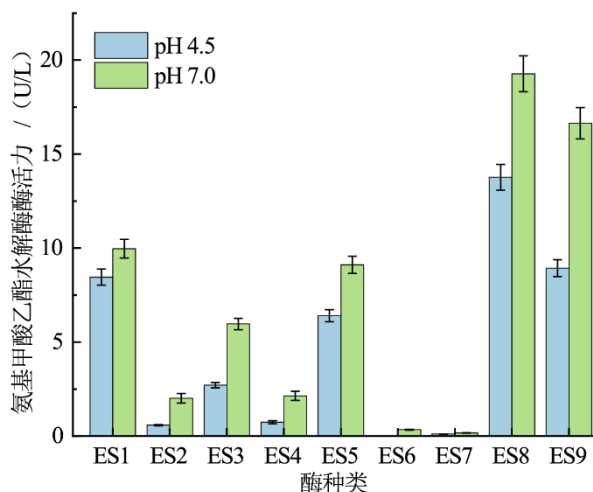
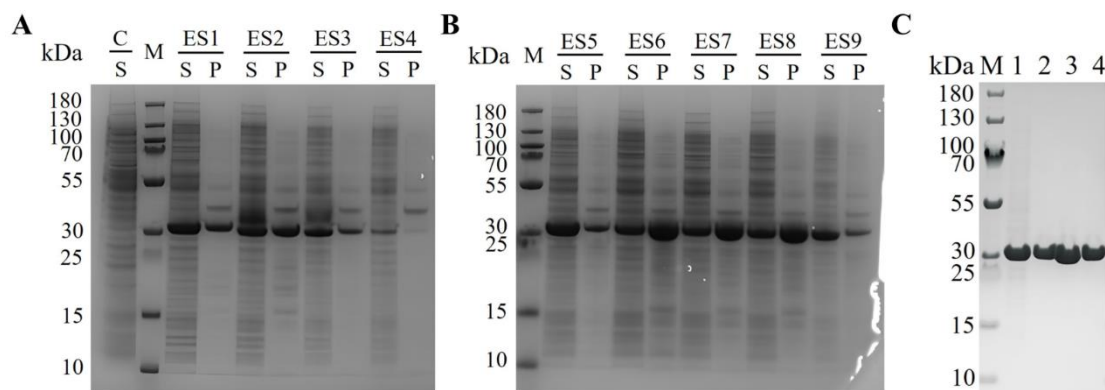


图 2-3 不同 pH 值条件下的重组大肠杆菌粗酶液以 EC 为底物时的酶活力

Figure 2-3 Activities of crude recombinant esterases toward EC at different pH conditions



注 a,b,c: M.标准分子质量蛋白, N.不含酯酶基因的对照菌株, S.大肠杆菌的细胞破碎上清液, P.大肠杆菌的细胞破碎沉淀。

图 2-4 重组大肠杆菌诱导发酵后胞内蛋白和纯化酯酶 SDS-PAGE 图。(A) 重组酯酶 ES1-ES4 生产菌; (B) 重组酯酶 ES5-ES9 生产菌; (C) 重组大肠杆菌经发酵后的纯化蛋白。

Figure 2-4 SDS-PAGE patterns of intracellular proteins and purified esterases from recombinant *E. coli* after induced fermentation. (A) Recombinant esterase ES1-ES4-producing *bacteria*; (B) Recombinant esterase ES5-ES9-producing *bacteria*; (C) Purified proteins from recombinant *E. coli* after fermentation.

2.4.3 重组酯酶的酶学性质分析

2.4.3.1 最适反应温度和温度稳定性

在不同温度 (20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75 °C 和 80 °C) 条件下测定了 4 种酯酶的活力, 结果如图 2-5A 所示。ES1 和 ES5 的酶活力从

20–70 °C一直在增加，在 70 °C时达到峰值，因此它们的最适温度均为 70 °C，远远高于来源于根瘤农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* d3^[50] (55 °C) 的酰胺酶和副地衣芽孢杆菌 *Bacillus paralicheniformis*^[55] (50 °C) 的双功能脲酶；在反应温度高于 70 °C后，酶的蛋白结构可能被破坏导致酶活力大幅度降低；ES8 与 ES9 最适温度均为 55 °C，高于来源于米曲霉 *Aspergillus oryzae*^[45] 的酰胺酶 (40 °C)；其中 ES8 随着温度的升高，酶活性丧失较慢，在 70 °C时酶活力降低至 50%左右，而 ES9 在温度仅升高 5 °C的情况下，酶活力降低至 50%左右；重组酶 ES1 与 ES5 在 50-70 °C范围内相对活性在 50%以上，而重组酶 ES8 在 45-70 °C范围内，ES9 在 45-60 °C范围内相对活性在 50%以上。

4 种酯酶分别在不同温度下孵育 1 h 后在最适反应温度及 pH 4.5 条件下检测其残余酶活力，结果显示 (图 2-5B)，4 种酯酶均在温度低于 40 °C时较稳定，经处理后其酶活性均可保持 90%以上，当温度高于 45 °C后酶活力下降明显，表明 4 种酯酶在温度高于 45 °C后空间结构受到较大程度影响。4 种酯酶在 65 °C保温 1 h，酶活性仍残余约 50%，表现出比可降解 EC 的酰胺酶及脲酶更好的热稳定性 [49, 50, 52, 55]。

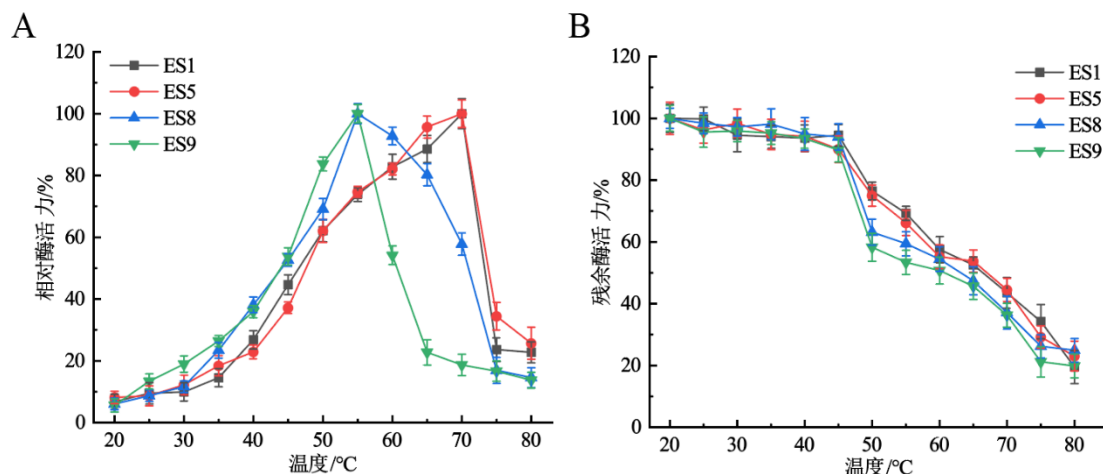


图 2-5 温度对酯酶活力的影响。(A) 最适反应温度；(B) 温度稳定性。

Figure 2-5 Effect of temperature on enzyme activity of esterases. (A) Optimum reaction temperature; (B) Temperature stability.

2.4.3.2 最适反应 pH 值和 pH 值稳定性

分别在 pH 3.0-8.0 条件下测定 4 种酯酶的酶活力，测定结果表明 (图 2-6A)，在 pH 3.0-7.0 条件下，随着 pH 值的升高，酶活力逐渐提升，ES8 在 pH 7.0 下的酶活力最高，为中性酶；而 ES1、ES5 与 ES9 均为碱性酶，其随着 pH 值上升到

8.0 的过程中, 酶活性也一直处于上升状态。当 pH 6.0-8.0 时, 4 种酯酶的活性均可以保持 80% 以上, 表明在接近中性的条件下可以较好的释放酶活力; 当 pH 值大于 8.0 时, 由于更换缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, pH 8.0-9.0 和 20 mmol/L Gly-NaOH 缓冲液, pH 9.0-10.0), 4 种酯酶以 EC 为底物时的酶活力均无法测定出, 推测更换的缓冲液会影响测定酶活力时的显色反应。在 pH 4.5 条件下 ES1、ES5、ES8 与 ES9 相对酶活力分别为 79.19%、64.22%、69.96%、50.99%, 4 种酯酶均具有超过 50% 的相对酶活力, 相较于酰胺类 EC 水解酶本研究挖掘出的酯酶可以在 pH 4-5 条件下发挥更好的活性^[33, 44, 45, 49-52]。

将酯酶在不同 pH 值条件下 4 °C 保温 6 h 后测定酶活力, 结果如图 2-6B 所示, 当酯酶在 pH 值为 7.0-8.0 时, 4 种酯酶的残余酶活力均保持在 90% 以上, 当 pH 值低于 7 或大于 8 时, 残余酶活力明显下降; ES1、ES5、ES8 与 ES9 经 pH 4 条件下处理后, 分别可保持 68.65%、42.68%、43.80%、19.87% 左右的酶活力; 相较于酰胺类 EC 水解酶^[33, 44, 45, 49-52]及来源于解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* JP-21 的中性脲酶^[56], ES1 表现出更好的酸稳定性。以上结果表明, 所获得的 4 个重组酯酶在 pH 6.0-8.0 内具有较好的反应活性以及稳定性, 适用于弱酸、中性及弱碱等发酵食品中 EC 降解方面的应用。许多发酵食品(如黄酒、酱油等)的 pH < 5.5, 因此应用于此类发酵食品中 EC 降解时, 需要对酯酶的结构进行进一步的修饰, 以改善其在酸性条件下的稳定性及催化活性等^[86]。

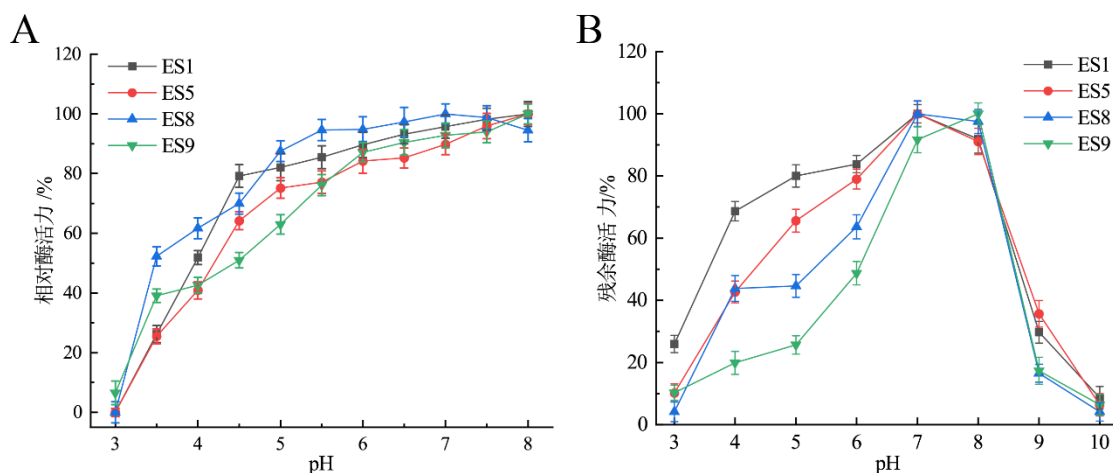


图 2-6 pH 对酯酶活力的影响。(A) 最适反应 pH; (B) pH 稳定性。

Figure 2-6 Effect of pH on enzyme activity of esterases. (A) Optimum reaction pH; (B) pH stability.

2.4.3.3 乙醇与氯化钠对酶活力的影响

EC 较多形成于高乙醇或高盐环境的发酵食品中, 因此通过测定不同浓度乙

醇与 NaCl 环境对酯酶活性的影响,以表征其是否具有在实际工业应用中的潜力。乙醇浓度对 EC 水解酯酶活性的影响如图 2-7A 所示。当乙醇体积分数为 10%时,ES1、ES5、ES8 与 ES9 的相对酶活力分别为 50.48%、48.44%、42.60%、33.59%,当乙醇体积分数为 20%时,其相对酶活力分别为 40.98%、36.03%、27.97%、22.72%,表明 4 种酯酶均具有一定的乙醇耐受性。ES1 与来源于赖氨酸芽孢杆菌 *Lysinibacillus fusiformis* SCO2^[49]的突变体(21.03%)相比,在 20%的乙醇环境下 ES1 有着其 2 倍的相对酶活力(40.98%),表现出一定的乙醇耐受性,而 ES9 在含乙醇的环境下则酶活性降低较快,结合之前其温度及 pH 值稳定性结果,推测 ES9 对环境耐受性较低,结构较不稳定。

由图 2-7B 可知,当氯化钠质量分数为 5%时,ES1、ES5、ES8 与 ES9 的相对酶活力分别为 24.09%、20.41%、16.11%、10.73%,当氯化钠质量分数高于 5%时,4 种酯酶对 EC 基本失去催化活力,表明 4 种酯酶耐盐性均较差,不具有应用于高盐发酵食品中 EC 降解的潜力。

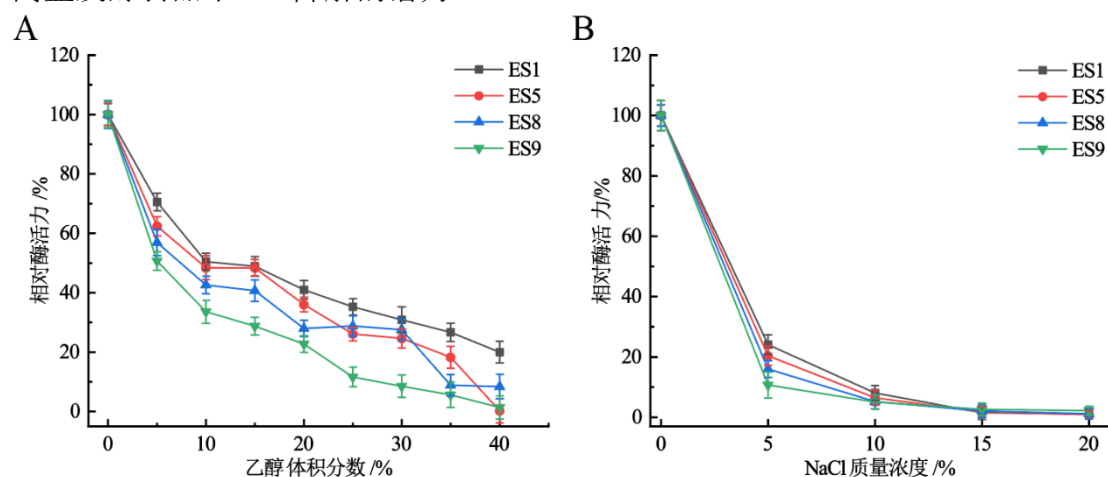


图 2-7 乙醇和 NaCl 对酯酶活力的影响。(A) 不同乙醇浓度下的相对酶活力;(B) 不同 NaCl 浓度下的相对酶活力。

Figure 2-7 Effect of ethanol and NaCl on esterase activity. (A) Relative enzyme activity at different ethanol concentrations; (B) Relative enzyme activity at different NaCl concentrations.

2.4.3.4 金属离子和化学试剂对酶活力的影响

不同的金属离子与化学试剂对酯酶的酶活性的影响,结果如图 2-8 所示,所检测的大多数金属离子对酯酶活力均有一定的抑制作用。经 Cu^{2+} 处理后,ES1、ES5、ES8 及 ES9 的相对酶活力分别为 12.11%、2.31%、34.69%、37.07%,说明 Cu^{2+} 对 ES5 的抑制效应相比 ES1、ES8 及 ES9 较强。经 Fe^{3+} 处理后,ES1、ES5、ES8 及 ES9 的相对酶活力分别为 5.81%、5.15%、1.78%、9.98%。经 Co^{2+} 处理后,

ES1、ES5、ES8 及 ES9 的相对酶活力分别为 4.79%、7.57%、3.46%、3.39%，结果表明 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Co^{2+} 均可显著抑制 4 种酯酶的活性，而 Zn^{2+} 对 ES1 有小幅度的激活作用，可激活 26.49% 的酶活力，推测 Zn^{2+} 和酯酶 ES1 结合后可能会形成更稳定的复合物。

在 EDTA 存在的情况下，酶活力依然在 90% 以上，证明 4 种酯酶为非金属依赖型酶或金属离子包埋在酯酶深处无法被螯合出。在表面活性剂 Triton X-100 存在时，ES1、ES5、ES8 及 ES9 分别可保持 91.03%、111.92%、67.86%、84.35% 的酶活力，说明表面活性剂 Triton X-100 对 ES5 有小幅激活作用，对 ES1 及 ES9 影响不大，对 ES8 活力有一定的抑制作用。

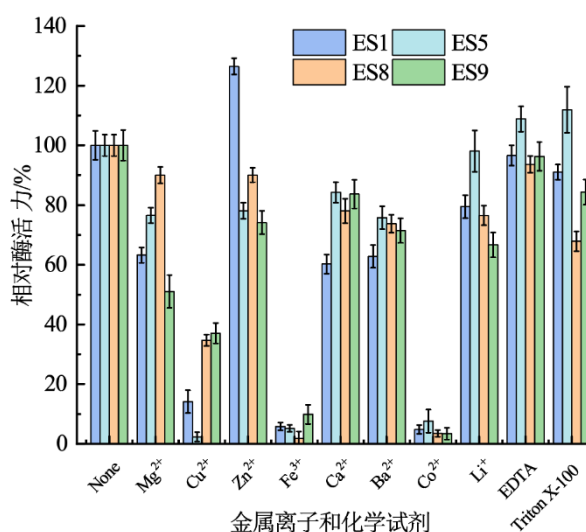


图 2-8 金属离子与化学试剂对酯酶活力的影响

Figure 2-8 Effects of metal ions and chemical reagents on esterase activity of esterases

2.4.3.5 重组酯酶的动力学参数测定

鉴于大多发酵食品（如黄酒、酱油等）均偏酸性（ $\text{pH} < 5.0$ ），因此本研究检测 4 种酯酶在酸性（ $\text{pH} 4.5$ ）条件下的动力学参数。以 EC 为底物，在 $\text{pH} 4.5$ 条件下测定重组酶在 10-1000 mmol/L EC 浓度下的初始反应速率，然后由 Graph Pad 将初始反应速率与对应的底物浓度拟合计算，得到 ES1、ES5、ES8 和 ES9 的酶促反应参数。结果表明（表 2-5），ES1、ES5、ES8 和 ES9 的 K_m 值分别为（ 210.7 ± 9.3 ）、（ 213.8 ± 8.92 ）、（ 256.2 ± 11.02 ）、（ 127.2 ± 6.53 ）mmol/L； $V_{\max}$ 值分别为（ 87.54 ± 4.19 ）、（ 84.14 ± 4.96 ）、（ 79.91 ± 3.64 ） $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ 和（ 63.44 ± 2.96 ） $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ ； k_{cat}/K_m 值分别为（ 214.31 ± 23.24 ）、（ 203.20 ± 21.47 ）、（ 161.46 ± 17.43 ） $\text{L}/(\text{mmol} \cdot \text{s})$ 及（ 257.43 ± 23.89 ） $\text{L}/(\text{mmol} \cdot \text{s})$ 。酰胺类 EC

水解酶在 $\text{pH} < 5.0$ 条件下无催化活性, 它们在最适 pH 条件下对 EC 的 K_m 为 0.87-37.2 mmol/L^[33, 44, 49-52]。来源于 *B. paralicheniformis*^[55] 的双功能酸性脲酶在 $\text{pH} 4.5$ 条件下对 EC 的 K_m 及 k_{cat}/K_m 值分别为 1018 mmol/L 及 440 L/ (mmol · s), 因此与该酸性脲酶相比, 本研究中重组酯酶具有较高的 EC 亲和力, 但重组酯酶催化效率 k_{cat}/K_m 值与酸性脲酶相比较低。文献未报导来自于 *A. calcoaceticus* 的模板酯酶在酸性 ($\text{pH} 4.5$) 条件下的动力学参数值^[46]。

以上结果表明通过基因挖掘得到的酯酶对酸性条件 ($\text{pH} 4.5$) 下对 EC 具有较弱的亲和力及催化效率, 但从对尿素的非降解的底物特异性和一定程度的乙醇耐受性来看, 酯酶作为一种新的 EC 水解酶仍具有良好的应用前景。因此后续可对重组酯酶进行定向改造以提高其在酸性条件下对 EC 的亲和力和催化效率。

表 2-5 重组酯酶的动力学参数

Table 2-5 Kinetic parameters of the recombinant esterase

酶种类	动力学参数			
	$K_m/$ (mmol/L)	$V_{\text{max}}/$ ($\mu\text{mol}/$ (min · mg))	$k_{\text{cat}}/\text{s}^{-1}$	$k_{\text{cat}}/K_m/$ L/ (mmol · s)
ES1	210.7±9.3	87.54±4.19	45.15±4.19	214.31±23.24
ES5	213.8±8.92	84.14±4.96	43.44±4.96	203.20±21.47
ES8	256.2±11.02	79.91±3.64	41.36±3.64	161.46±17.43
ES9	127.2±6.53	63.44±2.96	32.74±2.96	257.43±23.89

2.4.4 结构分析揭示酯酶动力学参数差异潜在机制

底物通道形状与大小、活性口袋氨基酸的疏水性与净电荷等效应均对酶的底物特异性、最大反应速率等产生一定的影响^[87-92]。将酯酶氨基酸序列分别提交至 trRosetta 网站进行蛋白质结构建模得到 4 种酯酶的蛋白三维结构(图 2-9, A-D), 用 PyMol 对获得的酯酶进行结构分析, 发现以 ES1 为模板进行比对时, ES5、ES8 和 ES9 的 RMSD 值分别为 0.26、0.45 Å 和 0.49 Å, 均小于 0.5 Å, 表明 4 种酯酶在高级结构中表现出高的相似性。底物通道入口分析显示, ES1 与 ES5 的入口处被氨基酸残基分隔成两部分; ES8 通道入口处形状不规则; ES9 的通道入口较为规整, 呈椭圆形, 没有氨基酸残基凸起阻碍底物进出, 因而可能更有利于底物的结合与释放^[87, 89]。然而经过对底物通道最宽距离的测量发现, ES9 的底物通道相较于另外 3 种酯酶最宽的直径缩短了 1.3-5.1 Å; 对底物通道最窄距离测量

结果显示 (ES1 及 ES5 取底物通道占比最大口袋测量结果), ES9 的底物通道相较于另外 3 种酯酶最窄的直径缩短了 2.2-3.4 Å。EC 的三维分子结构尺寸分别为 8.74、6.07 Å 与 4.62 Å 左右 (图 2-9E), ES9 的底物通道入口最宽与最窄距离分别为 6.9 Å 及 5.2 Å (图 2-9D), 因此 EC 只能沿着特定取向进入 ES9 活性口袋, 而对于其它 3 个酶来说, EC 可能沿着更多不同的取向进入活性口袋, 由此可能影响了 ES9 对 EC 的最大反应速率^[87, 89, 90]。

对形成酯酶活性口袋的氨基酸残基计算净电荷与亲水指数。4 种酯酶活性口袋内的净电荷相同, 均为 $3.204 \times 10^{-19} \text{ C}$ 。酯酶 ES1、ES5、ES8 和 ES9 活性口袋氨基酸的亲水指数分别为 30.3、30.9、30.4、25.1, 亲水指数越大疏水性就越强, 所以 ES9 催化环境亲水性强于其它 3 个酯酶。在水解酶的催化水解反应中, 亲水性氨基酸残基有利于与底物形成更多的氢键相互作用, 从而固定底物在催化反应中的空间位置、促进酶对底物的催化作用^[92]。使用 Discovery Studio 2023 软件对酯酶 ES8 及 ES9 分别与底物 EC 进行分子对接, 用 PyMOL 软件分析酯酶与 EC 复合物结构。结果显示 (图 2-9, F-G), 酯酶 ES8 与 S97 之间形成 1 对氢键, 而 ES9 分别与 S97 及 H256 均形成 1 对氢键, 较强的氢键相互作用可能使得 ES9 更易与 EC 进行结合, 致使 ES9 对 EC 的亲合力较高^[88, 91, 92]。

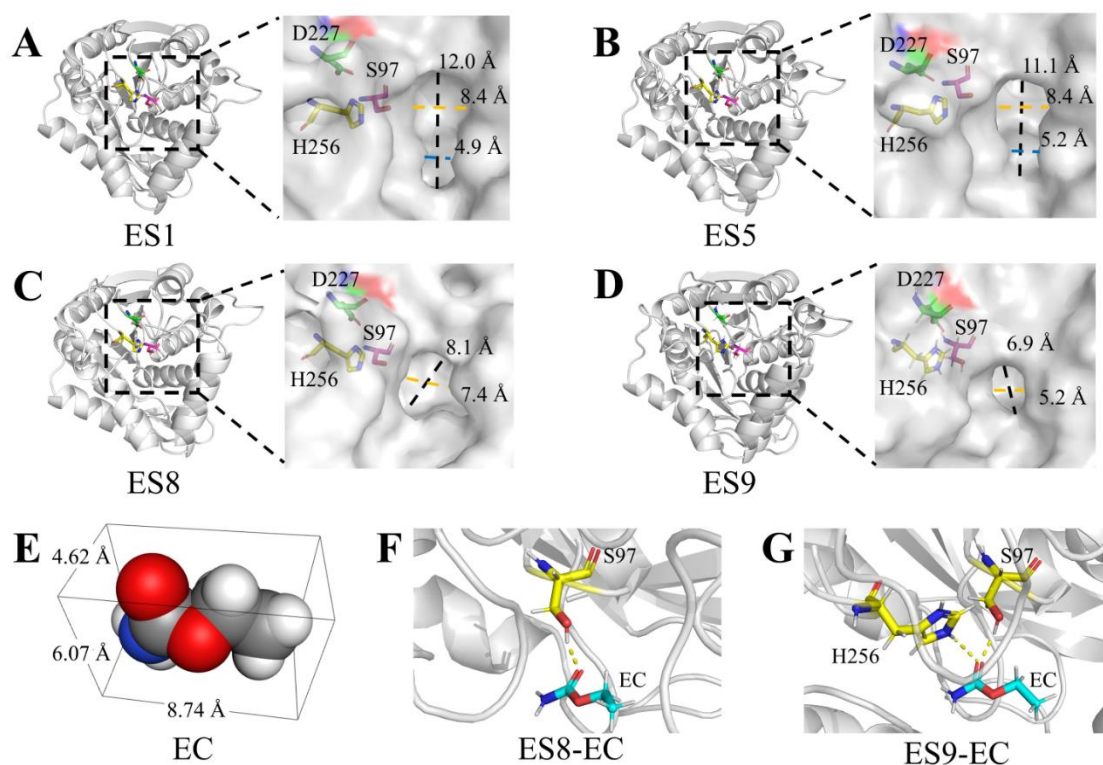


图 2-9 重组酯酶的三维结构及 ES8 和 ES9 与 EC 分子对接结构图。(A)、(B)、(C)、(D) 分别为 ES1、ES5、ES8 与 ES9 的底物通道展示；(E) 底物 EC 的长宽高测量；(F)、(G) 分别为 ES8、ES9 与底物 EC 的分子对接结构。

Figure 2-9 Three-dimensional structures of recombinant esterases and molecular docking structures of ES8 and ES9 with ethyl carbamate. (A), (B), (C), and (D) Show the substrate channels of ES1, ES5, ES8, and ES9, respectively; (E) The length, width, and height measurements of substrate EC; (F) and (G) The molecular docking structures of ES8, ES9, and substrate EC, respectively.

2.5 结论

(1) 本研究从 NCBI 数据库中挖掘到 4 种具有 EC 降解作用的酯酶 (ES1、ES5、ES8 和 ES9)，并实现了它们在重组大肠杆菌 BL21 (DE3) 中的异源表达，经测定其 EC 水解活性选定四个在 pH 4.5 与 pH 7.0 下均具有较高活力的 ES1、ES5、ES8 和 ES9 进行进一步酶学性质表征。

(2) 4 种酯酶最适 pH ≥ 7.0 ，它们 pH 4.0–5.0 条件下均有活力；其中在 pH 4.0 条件下 ES1 的稳定性最强，在此条件下 4 °C 放置 6 h 后可保持 68.65% 的残余酶活力。4 种酯酶对低浓度的乙醇具有一定的耐受性，ES1 对乙醇耐受性最强，它在乙醇体积分数 10% 时，可保持 50.48% 左右的酶活力，因此具有应用于低酒精度酒精饮料中 EC 降解的潜力。4 种酯酶不具有高盐耐受性，当氯化钠质量浓度高于 5% 时，酯酶基本失去活力。4 种酯酶在 pH 4.5 条件下对 EC 的亲和力 ($K_m > 100 \text{ mmol/L}$) 及催化效率 ($k_{cat}/K_m < 300 \text{ L}/(\text{mmol} \cdot \text{s})$) 均较低，不利于它们对

酸性环境中低含量 EC 的降解。未来可通过蛋白质工程技术，对酯酶进行定向改造，获得在酸性条件下 EC 亲和力及催化效率提高的酯酶，以促进其在实际反应体系中的应用。

（3）对酯酶进行结构分析推测，ES9 相对较小的底物通道可能影响了 EC 的进入，从而影响了 ES9 对 EC 的最大反应速率；而 ES9 高的 EC 亲和力可能归因于 ES9 与 EC 之间强的氢键作用力。

本研究获得了具有一定的乙醇耐受性、酸耐受性且 EC 降解活性的酯酶，不仅丰富了 EC 水解酶库，也为未来控制低酒精度酒精饮料中 EC 含量提供了新方法。

第3章 理性设计提升酯酶的底物亲和力与催化速率

3.1 引言

通过结合统计学而提出的“回归一致突变”假说在近些年酶的催化活性提升改造中得到验证^[93,94]。在该假说中,给定位置上残基的相对频率反映了该位置上每个残基对某些酶性质的相对重要性,在酶的长久进化中,同一位点的氨基酸残基不断改变并趋于某些特定的氨基酸残基,这些残基可能给酶带来更高的活性或更强的环境耐受性等,由于针对酶的一级序列进行分析,所以此策略对未得到结构解析的酶进行改造具有更大的优势。基于在之前研究中酯酶 ES8 酶学性质表征结果,其具有改造和投入实际应用的潜力,所以本研究首次将序列一致性回归策略应用于 EC 水解酶 ES8 的改造,通过对其进行理性设计,获得了具有较高催化速率与酸耐受性的突变体,之后利用分子对接与分子动力学模拟分析了突变体的分子间作用力及稳定性变化,解析造成突变体催化速率得到提升的机制,为发酵食品中 EC 的含量控制提供一种方法,同时也为其他酶的改造提供一定参考。

3.2 实验材料

3.2.1 菌株与质粒

本章使用的菌株与质粒见 2.2.1。

3.2.2 主要材料与试剂

表 3-1 实验试剂
Table 3-3 Experimental reagent

试剂名称	试剂规格	生产厂家
KOD One™PCR Master Mix	-	东洋纺(上海)生物科技有限公司
<i>DpnI</i>	-	Thermo Fisher Scientific
DNA 柱纯化试剂盒	-	Thermo Fisher Scientific
考马斯亮蓝 R-250	BR	上海生物工程有限公司
TAE 缓冲液贮存液 (50×)	-	上海生物工程有限公司

3.2.3 主要仪器与设备

表 3-2 实验仪器
Table 3-4 Experimental instrument

仪器名称	型号	生产厂家
聚合酶链式反应（polymerase chain reaction, PCR）扩增仪	Mastercycler nexus	德国 Eppendorf 公司

注：未列出与前面章节重复仪器

3.2.4 培养基和溶液配置

本章所使用培养基与溶液见 2.2.4。

3.3 实验方法

3.3.1 同源建模与突变位点选取

AlphaFold3 具有原子级别的高精度结构预测技术，其在处理复杂蛋白结构中具有显著优势。在 AlphaFold3 服务器（<https://alphafoldserver.com/>）中上传 ES8 的蛋白质序列进行同源建模，并使用服务器自带程序进行模型的评估。

以底物对接后的蛋白复合物为分析依据，使用 Discovery Studio 2023 软件选择形成底物通道的所有氨基酸残基作为突变候选位点。使用 ConSurf 服务器（https://consurf.tau.ac.il/consurf_index.php）计算突变候选位点的氨基酸残基频率，选择保守性较低的位点突变为频率次高的残基^[93]。

3.3.2 突变酶重组表达工程菌株构建

3.3.2.1 ES8 的质粒提取

接种 ES8 单菌落于含有卡那抗性的 LB 液体基中，37 °C，220 rpm 培养 12 h，离心收集 2 mL 菌液收集菌体，并使用质粒 DNA 小量抽提试剂盒提取 ES8 质粒。

3.3.2.2 PCR 扩增引入突变基因

（1）引物设计

根据 ES8 的质粒序列设计相关突变引物（表 3-3）：

表 3-3 PCR 引物序列
Table 3-3 PCR primer sequence

引物名称	引物序列 (5'→3')
V129S-F	TCCTCTTATG <u>TCA</u> AAGACTGAGAACAACC
V129S-R	TCTCAGTCTTT <u>TGAC</u> ATAAGAGGAGGAACA
L146F-F	TCGACGACTT <u>CC</u> CAGAACCAGCTATT
F146F-R	TGGTTCTG <u>GAA</u> GTCGTCGAATACTT
Y158F-F	CTCACAGTTCTT <u>CT</u> TACGATGTTCTTG
Y158F-R	AACATCGTAGA <u>AGA</u> ACTGTGAGCGAT
V161L-F	CTACTACGATC <u>TT</u> CCTGCTGGCCCTT
V161L-R	GGCCAGCAGGA <u>AG</u> ATCGTAGTAGAAC
W184F-F	TATTCTTAAC <u>TCT</u> TGGCGCCAGGGCAT
W184F-R	CTGGCGCCAGA <u>AG</u> TTAAGAATAACAG
I229M-F	AGATGATCAGATG <u>TT</u> CCTATTGAAAT
I229M-R	CAATAGGAAC <u>CA</u> TCTGATCATCTTCGC

注:突变位点已使用下划线标出

3.3.2.3 突变基因的 PCR 扩增与纯化

以 3.3.2.1 中提取出的 ES8 质粒为模板, 使用 KOD OneTM PCR Master MIX 高保真酶和携带突变位点的引物进行 PCR 扩增, 扩增条件如下: 98 °C 预变性 5 min; 98 °C 变性 10 s; 引物 60 °C 退火 5 s; 68 °C 延伸 32 s; 15 个循环; 68 °C 再延伸 5 min; 4 °C 保存。PCR 扩增体系 (50 μL) 见表 3-4。

表 3-4 PCR 扩增体系
Table 3-4 PCR amplification system

试剂	体积 (μL)
KOD One TM PCR Master MIX	25
上游引物	0.75
下游引物	0.75
基因模板	1
ddH ₂ O	22.5

质粒模板经 PCR 扩增后, 取 5 μL 产物以 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳, 确定

目的条带位置正确后，在 PCR 产物中加入 1 μ L *DpnI* 酶，于 37 °C 消解 3-4 h。消解结束后使用 DNA 柱纯化试剂盒对 PCR 产物进行纯化，经再一次核酸胶验证条带正确后热激转化于 *E. coli* BL21 (DE3) 的感受态细胞中，活化后涂布于含有卡那霉素的抗性平板中，经 37 °C 静置过夜培养后，挑取阳性转化子制作种子液并送往上海生物工程有限公司测序验证。

3.3.3 ES8 及其突变体的表达与纯化

本章 ES8 及其突变体的表达与纯化方法见 2.3.4。

3.3.4 ES8 及其突变体酶活力测定

本章酶活力测定方法见 2.3.5。

3.3.5 ES8 及其突变体的酶学性质表征

本章酶学性质表征方法见 2.3.6。

3.3.6 催化速率与底物亲和力提升机制分析

使用 PyMol 2.6 软件对突变后的酶与底物的对接复合物进行分子间作用力分析，包括氢键的展示与键长的测量；使用 Discovery Studio 2023 软件对酶复合物进行分子动力学模拟。经对 ES8 及突变体的底物复合物赋予 charmm36 力场后，将其于 Explicit Periodic Boundary 模式下溶剂化在一个立方体的水盒子中，蛋白质位于立方体中心，距离盒子的边缘 7 Å，之后进行动力学模拟，条件如下：能量最小化 2000 步，升温至 310.5 K，平衡 500 ps，采样 100 ns，步长 50 ps。模拟后的结果在 Analyze Trajectory 流程进行轨迹分析（包括 RMSD 与 RMSF），参数如下：Molecular Scope 选择 Intermolecular (between molecular)；RMSD Reference 参数选择 First Frame；Atom Group 与 Atom Group to Fit 参数设置为 Backbone，对分析后的数值使进行数据处理与折线图绘制。

3.3.7 数据处理与分析

使用 Microsoft Excel 软件绘制表格，Origin 2021 软件绘制折线图，GraphPad Prism 8.0 拟合非线性曲线，借助 Python 软件调节分子对接模型的颜色、透明度及对比度，使用 Adobe Illustrator 软件进行图片的拼接标注等。

3.4 结果与讨论

3.4.1 基于序列一致性回归策略的理性设计

3.4.1.1 突变位点选取

首先使用 AlphaFold3 在线服务器将酯酶 ES8 蛋白序列进行同源建模, 得到一个具有较好的可信度蛋白模型, 服务器对蛋白模型分析显示, 97%的氨基酸残基处于最佳区域(Very high, pIDDT>90), 另外 3%的残基处于可信区域(Confident, 90>pIDDT>70), 本研究以此模型作为参考进行蛋白质结构分析。

使用 Discovery Studio 2023 软件将底物 EC 对接至 ES8 的底物活性口袋, 并选取所有参与形成底物通道与活性口袋的氨基酸残基(图 3-1A)。由于形成 ES8 的底物通道与活性口袋的氨基酸残基多数具有较高的保守性, 利用 ConSurf 服务器分析 ES8 的氨基酸残基的出现频率与保守性(图 3-1B)。图 3-1B 的结果显示, 30 个残基中, 一半残基位于 α 螺旋上, 另外近一半残基位于 Loop 上, 一个位于 β 折叠上。ES8 中 97 和 256 位氨基酸残基是酯酶的催化三联体残基, 且均具有较高的保守性, 它的突变会直接导致酶活性丧失, 此外还存在部分高保守性残基也会影响蛋白质的催化活性或蛋白质的正确折叠, 不合适作为分子改造的突变位点。综合上述因素的考虑, 选择氨基酸残基出现频率<50%的位点作为突变位点^[93], 即 129、146、158、161、184 和 229 位点。

使用 ConSurf 服务器的分析结果结合选取的突变位点制作氨基酸频率热图, 结果如图 3-1C 所示。在氨基酸频率 10%-50%范围内, 突变位点的当前氨基酸残基均为其所有氨基酸频率的最高值, 但也仍有其他氨基酸残基在自然进化中具有较高的频率。在蛋白质的不断进化与演变中, 位点中多变的氨基酸残基赋予了酶各式各样的功能, 部分酶环境耐受性强、部分酶催化速率高、以及部分酶的底物亲和力强等^[94]。经对蛋白模型进行分析, 所选突变位点 V129、L146 与 I229 位于底物通道部分, 而 Y158、V161 与 W184 位于催化活性中心(图 3-1D)。针对在酶的底物通道与活性口袋区域所选出的六个位点具有较高的可能性提高 ES8 的底物亲和力与催化速率, 所以在突变位点中选取当前位点残基外频率最高的氨基酸残基进行理性突变, 改造获得具有更好底物催化速率与亲和力的良性突变体。

3.4.1.2 突变体的构建

构建单点突变体 V129S、L146F、Y158F、V161L、W184F 与 I229M, 对其诱导表达后纯化, 并对所有单点突变体进行比酶活力测定。SDS-PAGE(图 3-2A)显示突变体都得到了较好的纯化, L146F 的比酶活力与 WT 无明显差异, 而 Y158F 与 W184F 的比酶活力明显下降, 仅为 WT 比酶活力的 19.6%与 39.5%, 推测其

突变后的 Phe 侧链较大，影响到酶的催化构象；V129S、V161L 与 I229M 的比酶活力为 WT 的 1.56、1.45 倍和 5.17 倍，结果表明 229 位点突变显著增强了 ES8 的催化效率。由于 I229M 突变体的酶活性提升较为显著，所以以其为模板构建组合突变体 V129S/I229M、V161L/I229M 与 V129S/V161L/I229M，并经测序验证及纯化后测定组合突变体的比酶活力，图 3-2B 数据表明，以 I229M 为模板的组合突变体在其基础上比酶活力均得到了不同程度的提升，V129S/I229M、V161L/I229M 与 V129S/V161L/I229M 的比酶活力分别为野生型（WT）的 3.66、6.90 倍与 5.68 倍。

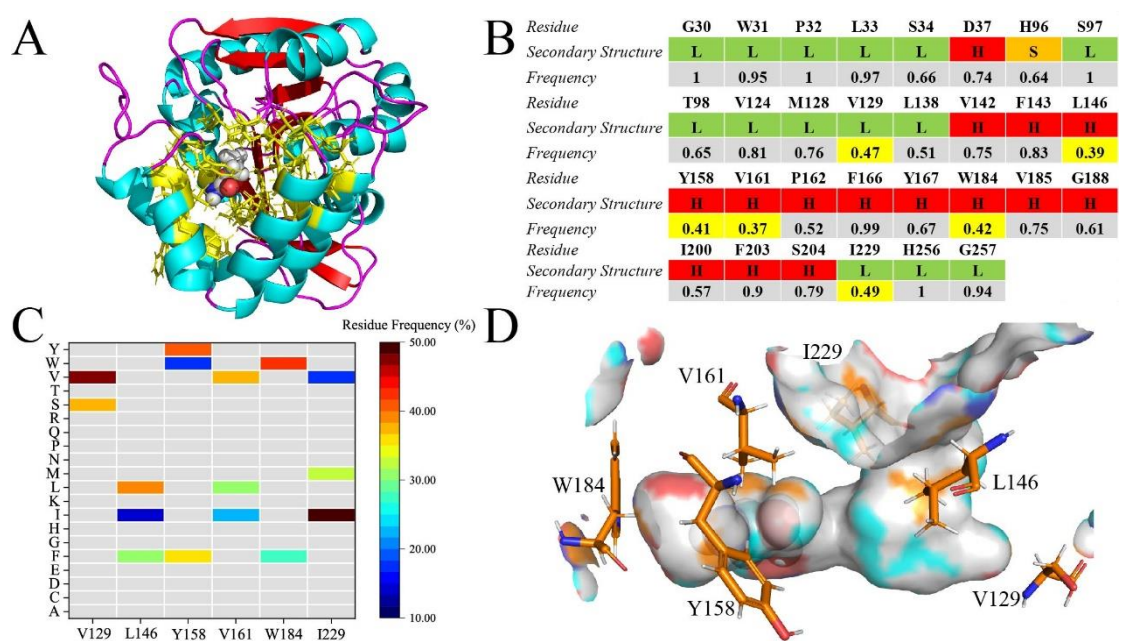
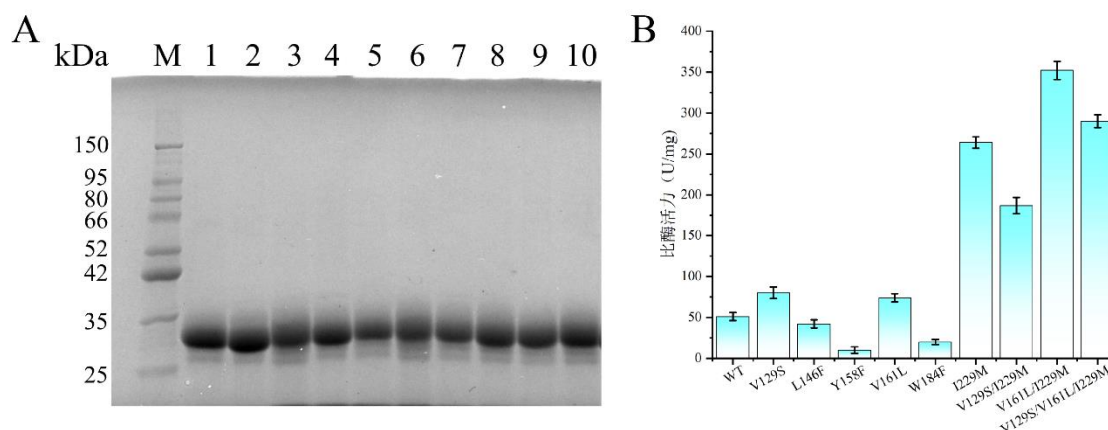


图 3-1 突变位点选取策略。(A) 底物通道位点选取；(B) 形成通道的位点残基结构与保守性分析；(C) 候选位点中残基频率统计；(D) 候选位点所在的结构位置。

Figure 3-1 Mutation site selection strategy. (A) Substrate channel site selection; (B) Residue structure and conservation analysis of channel-forming sites; (C) Residue frequency statistics in candidate sites; (D) Structural positions where candidate sites are located.



注 a: M 为 DNA marker, 1-10 泳道分别为 WT、V129S、L146F、Y158F、V161L、W184F、I229M、V129S/I229M、V161L/I229M、V129S/V161L/I229M。

图 3-2 ES8 及其突变体纯酶蛋白胶图与比酶活力测定。(A) ES8 及其突变体的纯化酶蛋白胶图; (B) 纯化后的 ES8 及其突变体的比酶活力测定。

Figure 3-2 SDS-PAGE of ES8 and its mutants pure enzyme, with specific enzyme activity assay. (A) Protein gelogram of purified enzyme from ES8 and its mutants; (B) Specific enzyme activity assay of purified ES8 and its mutants.

3.4.2 酶学性质表征

将得到的 6 个良性突变体进行酶学性质测定并与 WT 的酶学性质进行比较分析。最适反应温度结果显示 (图 3-3A), WT 与三个单突变体 V129S、V161L 和 I229M 的最适反应温度均为 55 °C, 随后经组合突变后得到的 V129S/I229M、V161L/I229M 与 V129S/V161L/I229M 的最适反应温度同样为 55 °C; 六个突变体在 40 °C-60 °C 下均保持着 40% 以上的相对酶活力, 显示出较宽泛的反应温度区间以及对不同温度环境下的适应性。在对突变体的热稳定性测定结果中 (图 3-3B), 突变体 V161L 的热稳定相较于 WT 显著提高, 在 70 °C 保温半小时后仍保持 86.5% 的残余酶活力, 且 161 位点的加入使突变体 V161L/I229M 的热稳定性也得到了显著的提升, I229M 在 70 °C 下残余酶活力 25.8%, 而 V161L/I229M 在此环境下的相对酶活力为 65.8%, 即 V161L/I229M 的残余酶活力提升至 I229M 残余酶活力的 255%。

最适反应 pH 测定数据表明 (图 3-3C), 所有的突变体的最适反应 pH 值仍与 WT 的最适 pH 值相同为 pH 7.0, 且在 pH 5.0-8.0 范围内, 突变体与 WT 均保持 80% 以上的酶活性, 显示出较宽泛的 pH 反应区间; I229M 与 V161L 在 pH 4.0 的条件下仍保持 78.9% 与 75.6% 的相对酶活力, 而 WT 在此条件下的相对酶活力仅为 61.7%, 这使得改造后的耐酸突变体在大多数发酵食品的偏酸环境下 (如黄酒中 pH 值为 4.0-5.0) 仍具有较高的 EC 降解活性。pH 稳定性结果表明 (图 3-

3D), 在 pH 7.0-8.0 下, 酯酶 ES8 及其突变体均能保持较高的残余酶活力(>90%), 而在 pH 4 的酸性环境下 V161L 的残余酶活力是突变体中最高达 64.1%, 而 WT 残余酶活力仅为 43.8%。结合 V161L 在最适反应 pH 测定中在 pH 4-6 下保留 75.6%-89.4%的相对酶活性分析, 其具有所有突变体中最佳的酸耐受性。

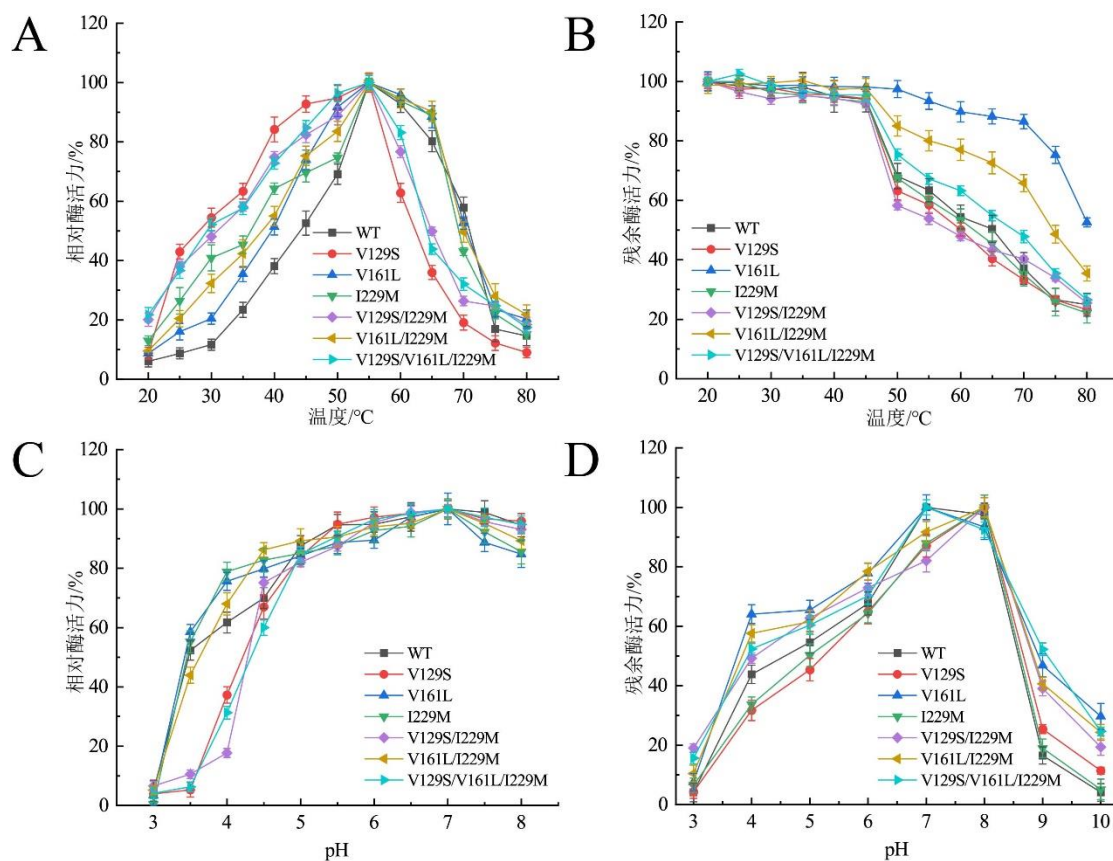


图 3-3 温度与 pH 对酯酶的活力影响。(A) 最适反应温度; (B) 温度稳定性; (C) 最适反应 pH; (D) pH 稳定性。

Figure 3-3 Effect of temperature and pH on esterase activity. (A) Optimum reaction temperature; (B) Temperature stability; (C) Optimum reaction pH; (D) pH stability.

不同乙醇浓度对酶活力的影响如图所示(图 3-4A), 六个突变体与 WT 的下降趋势相同, 但 V161L 在乙醇浓度为 0%-30%的环境下, 相对酶活性较 WT 提升了 5%-10%; 在乙醇稳定性测定中(图 3-4B), 所有酶的残余酶活力趋势几近相同, 在乙醇浓度低于 20%的环境下均能保持 50%以上的残余酶活力, 测定数据表明突变并未对酶的乙醇稳定性造成显著影响。不同 NaCl 浓度对酶活力的影响如图 3-4C 所示, 在 NaCl 浓度超过 10%后, ES8 及其突变体几乎完全丧失酶活力。

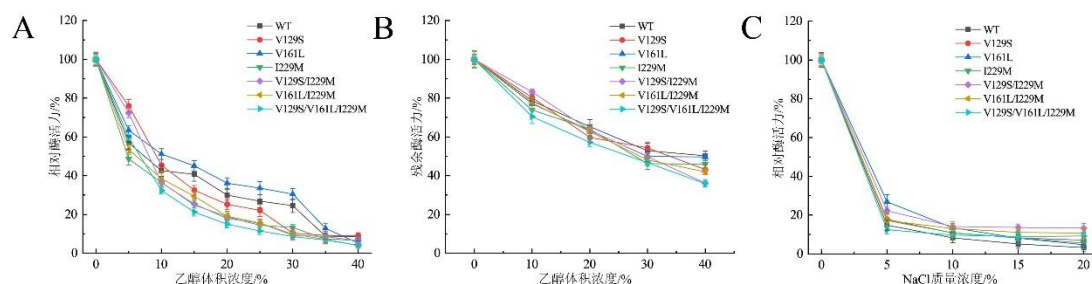


图 3-4 乙醇和 NaCl 对酯酶活力的影响。(A) 不同乙醇浓度下的相对酶活力；(B) 不同乙醇浓度下的残余酶活力；(C) 不同 NaCl 浓度下的相对酶活力。

Figure 3-4 Effect of ethanol and NaCl on esterase activity. (A) Relative enzyme activity at different ethanol concentrations; (B) Residual enzyme activity at different ethanol concentrations; (C) Relative enzyme activity at different NaCl concentrations.

酶动力学参数测定结果如表 3-7 所示，所有突变体的催化速率较 WT 均得到了提高，突变体 V129S、V161L、I229M、V129S/I229M、V161L/I229M 和 V129S/V161L/I229M 的催化速率分别是 WT 的 1.80、1.28、3.98、6.55、4.59 与 5.22 倍。单点突变体中 V129S 的 K_m 值降低至 $196.13 \pm 9.98 \text{ mmol/L}$ ，相较于 WT 的 K_m 值降低了 23.45%，表明其底物亲和力得到提升，而与其催化速率提升最大的单突变体 I229M 结合后，双点突变体 V129S/I229M 具有着最佳的底物亲和力与最大的催化速率，其 K_m 值为 $120.44 \pm 12.74 \text{ mmol/L}$ ，与 WT 相比其 K_m 值降低了 52.99%、催化速率提升了 655.08%。V161L/I229M 具有着所有突变体中最大的转化数为 230.41 s^{-1} ，是 WT 转化数的 557.08%，这可能是由于其在酸性环境下具有较好耐受性有关，但 V161L/I229M 的底物亲和力较差导致其催化速率低于 V129S/I229M 和 V129S/V161L/I229M（表 3-7）。

表 3-7 ES8 及其突变体的动力学参数

Table 3-7 The apparent kinetic parameters of ES8 and its variants

ES8 及其突变体	动力学参数			
	$V_{\max}/(\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg}))$	$K_m/(\text{mmol/L})$	$k_{\text{cat}}/\text{s}^{-1}$	k_{cat}/K_m L/ (mmol · s)
WT	79.91 ± 3.64	256.22 ± 11.02	41.36 ± 1.92	161.46 ± 17.43
V129S	110.25 ± 5.32	196.13 ± 9.98	57.04 ± 2.75	290.91 ± 27.56
V161L	134.71 ± 3.99	336.31 ± 11.27	69.73 ± 2.07	207.34 ± 18.37
I229M	370.84 ± 6.09	298.08 ± 12.41	191.95 ± 3.15	644.13 ± 25.39

续表 3-7 ES8 及其突变体的动力学参数

Table 3-7 (continue) The apparent kinetic parameters of ES8 and its variants

ES8 及其突变体	动力学参数			
	$V_{\max}/(\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg}))$	$K_m/(\text{mmol}/\text{L})$	$k_{\text{cat}}/\text{s}^{-1}$	k_{cat}/K_m L/ (mmol · s)
V129S/I229M	246.03 ± 4.67	120.44 ± 12.74	127.35 ± 2.42	1057.69 ± 19.00
V161L/I229M	445.15 ± 6.86	311.17 ± 14.77	230.41 ± 3.57	740.64 ± 24.17
V129S/V161L/I229M	321.16 ± 5.85	197.15 ± 8.87	166.22 ± 3.03	843.11 ± 34.16

综合各单突变体与组合突变体的催化速率与酶学性质分析, 相较于 WT 的酶学性质, 129 位点的突变主要提高了底物亲和力, 161 位点的突变主要提升了热稳定性与酸稳定性, 229 位点的突变则主要显著提高了催化速率, 而在组合突变体中双突变体 V129S/I229M 具有最佳的底物亲和力与催化速率; 后续将进一步分析每个位点所引起的分子间作用力与疏水性变化, 以解析位点的突变对催化速率与稳定性的提升机制。

3.4.3 底物亲和力与催化速率及稳定性提升机制分析

为了解析出突变体底物亲和力、催化速率与稳定性增强的分子机制, 本研究通过分子对接分析了突变体前后的分子间作用力变化。分子对接结果表明(图 3-5), WT 在活性中心的催化三联体 S97 与底物 EC 存在氢键相互作用, 形成一对键长 2.2 Å 的氢键(图 3-5A), 而 129 位点由 Val 突变为 Ser 后, 其与底物间的氢键作用力的类型及数量与 WT 保持相同, 但键长缩短为 1.9 Å(图 3-5B); I229M 的氨基酸残基与底物 EC 间形成了三对氢键, 分别为底物 EC 作为氢键受体与供体 S122 间形成键长 1.5 Å 的氢键, 另外两对则是以底物 EC 作为氢键供体与受体 D227 与 V230 间形成的两对氢键, 其键长分别为 2.6 Å 与 2.1 Å(图 3-5C); V129S/I229M 的氢键数量与 I229M 相同为三条氢键, 但其中催化三联体残基 S97 与底物 EC 间形成了两条氢键, 键长分别为 2.3 Å 与 2.5 Å, 另外一条氢键为 EC 与 M229 残基之间形成, 键长 2.4 Å(图 3-5D)。氢键是决定酶与底物结合强度的主要相互作用之一, 同时质子转移途径通常也由氢键参与形成, 所以氢键作用力的强弱会极大影响酶的底物亲和力与催化速率^[95]。根据分子对接的结果分析, 推测 V129S 与底物间较短的键长增强了酶与底物间的相互作用力, 可能是造成底

物亲和力提高的原因，而 I229M 与底物间形成三条氢键，大幅度增强了酶与底物间的结合作用，稳定了酯酶的催化构象加快了其催化速率。V129S/I229M 相较于两个单点突变体，其不仅具有与催化三联体 S97 之间的氢键，而且与 I229M 同样具有三对氢键，这些分子间作用力的变化在提高了酯酶的底物亲和力同时也大幅度增强了催化速率^[96]。

通过比较 129 与 229 位点突变前后的亲疏水性变化以分析催化速率的提升原因。如图所示（图 3-5，E-F），129 位点的突变明显提高底物通道区域的亲水性，底物 EC 具有亲水的氨基基团，底物通道的亲水性增强有利于吸引 EC 进入通道从而更快与催化三联体结合并进行水解；而 V129S 与 I229M 结合后，V129S/I229M 的催化活性中心区域由低疏水性转变为高疏水性（图 3-5，G-H），其催化中心的疏水性得到显著增加，一个疏水性更强的催化环境能够更好地稳定反应过渡态，通过增强非极性相互作用降低过渡态的能量，进一步促进底物转化为产物。通过突变改造底物通道与催化中心的亲疏水性，以此实现酶与底物更快的结合速度与过渡态更低的能量，提升酶的水解速率。

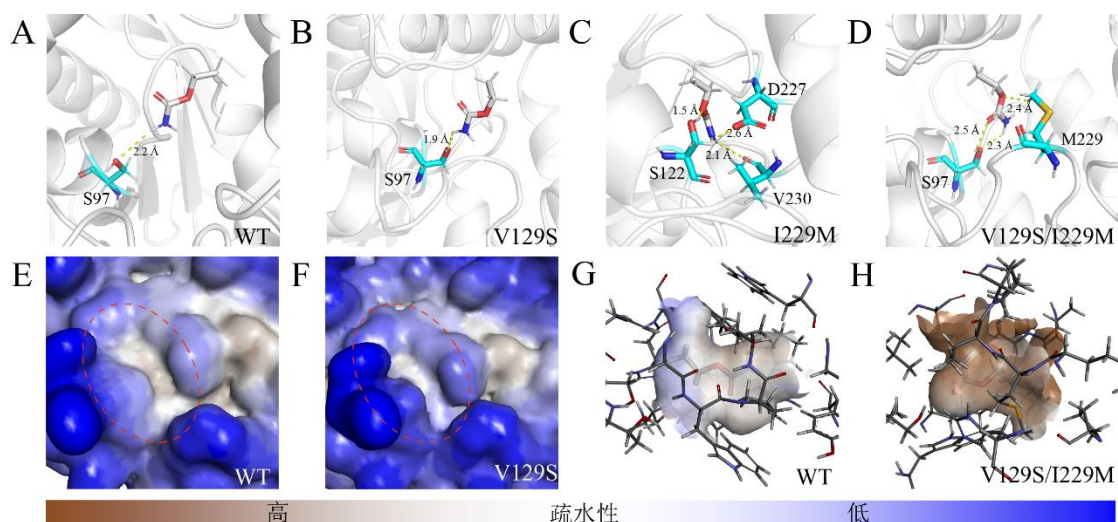


图 3-5 ES8 及其突变体的分子间作用力与亲疏水性分析。(A)、(B)、(C)、(D) 分别为 WT、V129S、I229M 和 V129S/I229M 与底物 EC 的分子对接；(E) ES8 的 129 位点 Val 残基表面；(F) V129S 的 129 位点 Ser 残基表面；(G) ES8 的催化口袋；(H) V129S/I229M 的催化口袋。

Figure 3-5 Analysis of intermolecular forces and hydrophilicity of ES8 and its mutants. (A), (B), (C), and (D) Molecular docking of WT, V129S, I229M, and V129S/I229M with the substrate EC; (E) Surface of Val at site 129 of ES8; (F) Surface of Ser at site 129 of V129S; (G) Catalytic pocket of ES8; (H) Catalytic pocket of V129S/I229M.

使用分子动力学模拟分析突变体构象变动，对 WT 及其所有突变体进行了 100 ns 时间尺度的分子动力学模拟。均方根偏差（root mean square deviation，

RMSD) 反映蛋白质整体构象相对于初始结构的平均偏差, 用于评估模拟过程中结构的稳定性, 从图 3-6A 的 RMSD 结果表明, WT 与突变体在 50 ns 后均表现出稳定的趋势; 所有的突变体相较于 WT 的 RMSD 值均更高, 表明突变体的整体柔性更大, 这也为突变体的酶活力增加提供依据。其中 I229M 的 RMSD 值最高 (0.40 nm), 与其在单突变体中比酶活力提升最显著的结果一致, 引入 V129S 突变后, V129S/I229M 的 RMSD 值降至 0.35 nm, 表明其结构刚性得到增强, 且比酶活力也得到进一步提升, 实现了催化速率与稳定性的协同优化。均方根波动值 (root mean square fluctuation, RMSF) 表示原子柔性的大小, 即每个原子在一定时间范围内相对其平均位置的相对偏差, 它在一定程度上可以表征蛋白质稳定性的变化, 是评价蛋白质局部区域柔性的重要参数^[97,98]。在图 3-6B 的 RMSF 结果中, 三个单点突变体均有显著的局部 RMSF 峰值, 其中 I229M 在 170-190 位点的 RMSF 波动值明显增加, 其在此区域内的 RMSF 均值达到 3.125 nm, 推测局部区域的高柔性是 I229M 催化速率显著提升的原因之一; 而 V129S/I229M 在催化三联体附近的氨基酸残基也具有明显的 RMSF 波动值增加, 尤其是 S97 位点附近的残基位点 (95-107) 具有显著的波动值提升, 底物通道与催化三联体附近的氨基酸残基 RMSF 波动值大幅度提升而导致活性相关区域的柔性增加, 可能是造成突变体催化速率大幅度提升的一个关键因素。

RMSD 结果 (图 3-6B) 分析表明 161 位点突变可以显著增加酶的结构稳定性, V161L/I229M 与 V129S/V161L/I229M 的 RMSD 值与 WT 相近, 相较于未加入 V161L 突变的 I229M 与 V129S/I229M 的 RMSD 值显著降低。在 RMSF 结果中催化速率最高的 V129S/I229M 在催化三联体附近位点 (95-107, 223-235, 252-264) 具有明显的波动, 而 V161L 的突变则使 V129S/V161L/I229M 的波动值较未突变前降低 0.03-0.18 nm, 显著提升催化区域的稳定性, 使酶在酸性环境中也可以保持其催化构象。分子动力学模拟表明, V161L 突变通过引入新的氢键相互作用 (V161L 与 F166 间, 图 3-6C), 显著增强了底物通道附近 Loop 区域 (残基 162-171) 的刚性 (图 3-6B)。图 3-6A 显示在分子动力学模拟稳定后, V129S/V161L/I229M 的 RMSD 值 (0.28 nm) 较双突变体 V129S/I229M (0.35 nm) 进一步降低, 且其催化三联体邻近残基 (95-107) 的 RMSF 波动值减少 0.03-0.18 nm (图 3-6B), 表明 V161L 突变通过稳定局部构象优化了酶活性的结构基础^[99]。

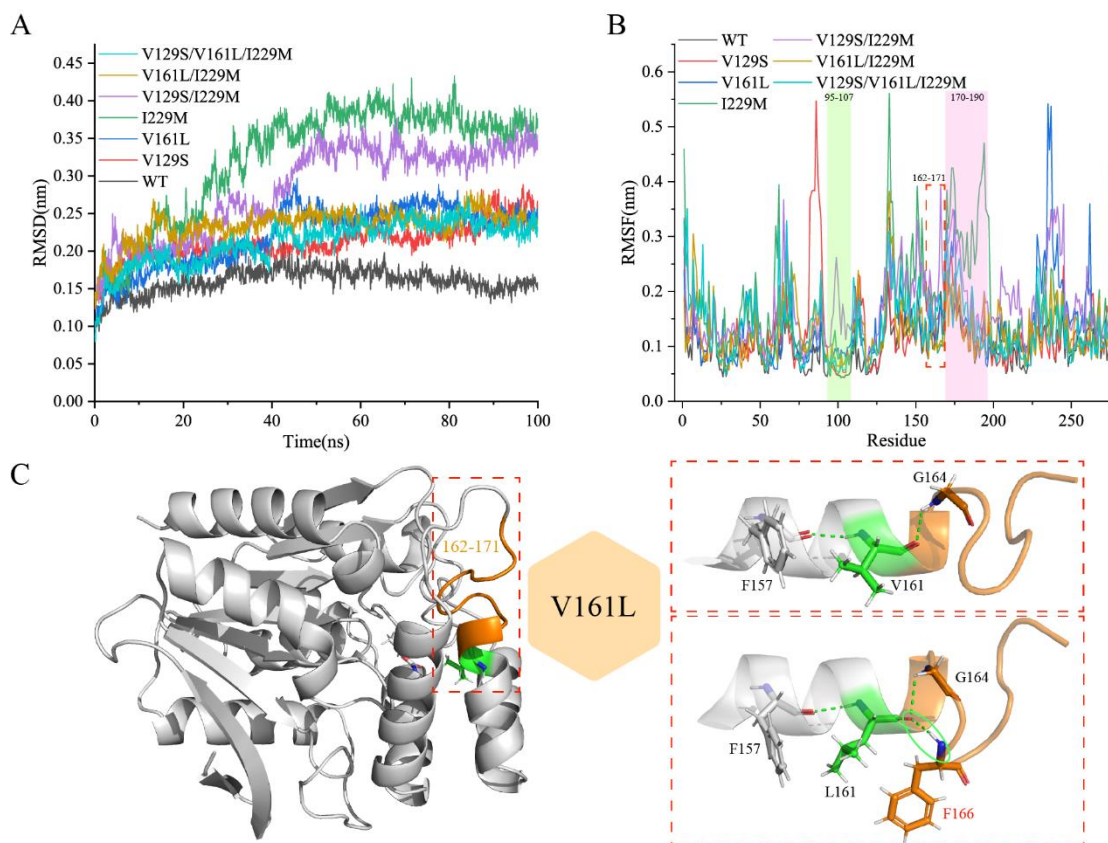


图 3-6 分子动力学模拟与 V161L 分子间作用力。(A)、(B) 100 ns 下的分子动力学模拟轨迹分析结果 RMSD 与 RMSF; (C) 161 位点的突变前后的分子间作用力变化。

Figure 3-6 Molecular dynamics simulation and intermolecular force of V161L. (A) and (B) Results of molecular dynamics simulation trajectory analysis at 100 ns RMSD and RMSF; (C) Changes in intermolecular forces before and after mutation at site 161.

3.5 结论

(1) 在这项研究中，我们尝试通过应用序列一致性回归策略结合酶的底物通道结构进行改造以提升 EC 水解酯酶的性质。基于上述理性设计，本研究通过定点突变得到酶活力提高的突变体 V129S、V161L、I229M、V129S/I229M、V161L/I229M 和 V129S /V161L/I229M，其比酶活力分别为 WT 的 1.56、1.45、5.17、3.66、6.90 倍和 5.68 倍。

(2) 酶学性质表征结果显示，在 pH 4.5 的酸性环境下 V129S/I229M 较 WT 催化速率与底物亲和力分别提升 655.08%和 52.99%，而在 pH 4.0 条件 4 °C 放置 6 h，V161L 的残余酶活力是 WT 的 1.46 倍，结果显示其酸稳定性明显提高。

(3) 为阐明底物亲和力与催化速率及稳定性提高的可能机制，研究对 WT 及其突变体进行分子对接与分子动力学模拟，结果显示 V129S/I229M 的催化速率与亲和力提升是由于酶与底物间的氢键相互作用力增加、底物通道亲水性提高、

催化活性中心疏水性增强和酶的催化三联体附近残基柔性提高促进底物的过渡态转变造成的；而 V161L 通过增加与底物通道附近 Loop 区域的分子间作用力，稳定催化中心的局部构象从而提高酶在极性环境中的稳定性。

第 4 章 基于多重计算策略构建二硫键提高酯酶稳定性

4.1 引言

影响酶分子稳定性的主要因素包括盐桥、氢键、疏水堆积、二硫键等，二硫键可以降低酶分子的熵值，提高酶分子的刚性，是稳定酶结构最关键的因素^[62]。

本研究旨在向之前上一节中得到的高催化速率酯酶突变体 V129S/I229M (Est8 catalytic enhanced mutant, Est8-CE) 的蛋白分子表面引入成对半胱氨酸形成二硫键，利用 Discovery Studio 2023 软件与 Disulfide by design 2.0 服务器结合 RMSF 结果进行潜在二硫键预测，寻找位于分子表面中柔性较高区域，且更容易形成二硫键的潜在突变位点，将其定点突变成半胱氨酸，通过增加表面蛋白间的分子间作用力以此提高酶稳定性。使用 trRosetta 和 AlphaFold3 服务器进行蛋白质结构的同源建模，经过结构比对与分子对接，对酶-底物复合物进行二硫键预测。

4.2 实验材料

4.2.1 菌株与质粒

表 4-1 实验菌株
Table 4-1 Experimental strain

菌株	基本描述	来源
<i>E. coli</i> BL21/pET30a- <i>est8-ce</i>	含有 ES8 突变质粒 pET30a- <i>es8-V129S/I229M</i> 的工程菌株	本论文构建

表 4-2 实验质粒
Table 4-2 The list of experimental plasmid

质粒	基本描述	来源
pET30a- <i>es8-V129S/I229M</i>	用于过表达酯酶 ES8 突变体 V129S/I229M 的质粒	本论文构建

4.2.2 主要材料与试剂

表 4-3 实验试剂
Table 4-3 Experimental reagent

试剂名称	试剂规格	生产厂家
DTNB (Ellman 试剂) (5,5-二 硫代-双-(2-硝基苯甲酸))	BR	生物工程 (上海) 有限公司

4.2.3 主要仪器与设备

本章所使用主要仪器见 2.2.3 与 3.2.3。

4.2.4 培养基与溶液配制

本章所使用培养基见 2.2.4 与 3.2.4。

4.3 实验方法

4.3.1 突变位点的选择

以突变体 Est8-CE 的蛋白序列为依据, 利用 AlphaFold3 服务器进行蛋白质同源建模预测, 模拟出其晶体结构, 随后由 Discovery Studio 2023 优化, 利用 Ramachandran 图对所得结构进行了验证。对得到的 Est8-CE 进行分子动力学模拟, 具体过程见 3.2.2, 模拟的轨迹结果经分析后计算均方根波动, 确定改造的柔性区域以提高 Est8-CE 在酸性及乙醇环境下的结构刚性。

分别通过 Disulfide by design 2.0 服务器与 Discovery Studio 2023 软件对同源建模得到的 Est8-CE 蛋白结构基于二硫键的形成原则进行预测, Disulfide by design 2.0 服务器通过结合几何约束、能量函数、B 因子分析和残基深度等多维度条件, 预测可能形成且具有稳定性的二硫键, 而 Discovery Studio 2023 软件基于如下参数进行二硫键预测并给出打分: 能量变化、温度因子变化、氨基酸间隔、氨基酸埋藏深度、体积变化、Coil-Coil 之间与 Chi3 角度变化等。通过以上两种二硫键的预测方法, 经结构预测得到的两组符合在其蛋白结构中形成的拟二硫键。

在预测得到的拟二硫键位点中, 对来源于 Disulfide by design 2.0 服务器预测的结果以能量值进行排序, 根据 Disulfide by design 2.0 服务器对来自于不同蛋白质的 1505 个二硫键的键能计算, 90%的二硫键键能小于 2.176 kcal/mol, 所以筛选键能大于 2.176 kcal/mol 的拟二硫键位点; 对来源于 Discovery Studio 2023 软件的预测结果以综合评分作为标准, 选取分数大于 90 的拟二硫键位点作为参考。

在酶的稳定性提升策略中, 一个不容忽视的点就是酶的稳定性与催化速率间

的“取舍效应”(trade-off effect)^[100],为尽可能减少酶的催化活性受到的影响,即对突变位点的选择尽可能避免具有较高的保守性,尤其是部分位点中的残基在酶的结构中作为催化功能与结构支撑的主要组成部分。为避免酶的活性大幅度降低甚至失活,使用 ConSurf 服务器预测蛋白质中的残基位点的保守性,对得到的拟二硫键中包含结构残基或功能残基的高保守位点进行筛选。

准确预测柔性区域是通过二硫工程提高蛋白质稳定性的关键,通过在 310.15 K 下进行 100 ns 的 MD,鉴定了 WT 蛋白的柔性区域,然后通过引入二硫键将这些柔性区域定向固化。为了确定柔性区域内二硫键插入的位置,使用 Disulfide by design 2.0 服务器与 Discovery Studio 2023 软件进行综合识别并结合柔性区域进行综合选取合适的二硫键进行构建,Disulfide by design 2.0 服务器可在 <http://cptweb.cpt.wayne.edu/DbD2/index> 上获得。

4.3.2 质粒的提取与 PCR 扩增

本章质粒提取与 PCR 扩增方法见 3.3.2,引物如下表:

表 4-4 PCR 引物序列
Table 4-4 PCR primer sequence

引物名称	引物序列 (5'→3')
Q149C-F	GACCTTCAGAACT <u>GT</u> CTATTCAAGAATCGCTCAC
Q149C-R	CTTGAATAGACAGTTCTGAAGGTCGTCGAAAAAT
F157C-F	TCGCTCACAGT <u>GT</u> TACTACGATCTGCCTGC
F157C-R	GGCAGATCGTAGTA <u>ACA</u> CTGTGAGCGATTC
L212C-F	CACGGAGGACT <u>GT</u> TAAGAAGATTAAGATCCC
L212C-R	TAATCTTCTT <u>ACA</u> GTCTCCGTGAAATCTG
L242C-F	GTGCTGAATGT <u>GT</u> TCAGAACGGCAAAC
L242C-R	GTTCTGAAC <u>ACA</u> TTTCAGCACTCAACTTC

注:突变位点已使用下划线标出

4.3.3 酶的表达与纯化

本章酶的表达与纯化方法见 2.3.4。

4.3.4 引入二硫键的鉴定

采用 Ellman 试剂 5,5'-二硫代-双-[2-硝基苯甲酸](DTNB)检测游离巯基。当半胱氨酸中的游离巯基存在时,它们与 DTNB 反应,生成 2-硝基-5-硫代苯甲

酸 (TNB)。该反应在 412 nm 处产生最大吸收峰。因此, 412 nm 处的吸光度可作为蛋白质中游离巯基存在的可靠指标。为了评估突变体中二硫键的形成, 在相同浓度下, 对 Est8-CE 和突变体中游离巯基的含量进行了测定。如果突变体显示出与 Est8-CE 相同水平的游离巯基, 这表明与引入的半胱氨酸对成功形成了二硫键。相反, 突变体中游离巯基水平的增加表明无法形成二硫键。

为了进行二硫键检测, 将 1 mg/mL 纯酶溶液与 5 mL 0.1 mmol/L DTNB 分析溶液混合。37 °C 孵育 10 min, 在 412 nm 处测定反应混合物的吸光度。

4.3.5 酶活性测定

酶活性测定方法见 2.3.5。

4.3.6 酶学性质测定

酶的最适反应温度、最适反应 pH、pH 稳定性、乙醇耐受性、乙醇稳定性与酶动力学参数测定方法见 2.3.5。

为了评估 Est8-CE 突变体的热稳定性, 测定了 Est8-CE 及突变体在 70 °C 下的半衰期 $T_{1/2}$ 。将纯化后的酶样品在不同时间间隔的高温下孵育, 检测剩余酶活性。不加热酶反应体系作为对照(100%), 酶活性降低一半所需的时间记录为 $T_{1/2}$ 。

4.3.7 突变体的分子动力学模拟及结构分析

分子动力学参数及轨迹分析方法见 3.3.6。

4.3.8 数据处理与分析

数据处理分析方法见 3.3.7。

4.4 结果与讨论

4.4.1 二硫键位点选取策略

Est8-CE 的三维结构由 AlphaFold3 构建, 随后由 Discovery Studio 2023 进行优化。模型结构的 Ramachandran 图数据表明 99.8% 的残基位于有利区和允许区, 这说明 Est8-CE 结构的合理性和可信性。

确定酶结构中的柔性区域可以为二硫键的构建提供选点依据, 在分子动力学模拟中对运动轨迹分析得出的 RMSF 是量化单个氨基酸灵活性的有效参数, 而较高的 RMSF 值表明酶结构在此区域的刚性较差。在这项研究中, 针对酯酶 Est8 (第 2 章中的 ES8) 与高催化速率突变体 Est8-CE (第 3 章中的 V129S/I229M) 的分子动力学结果, RMSF 显著增加的区域被确定为灵活性增强的区域。这些区

域被指定用于进一步分析和潜在的进化改进,在之前的研究中的催化速率提升机制分析得出,通过增加催化三联体附近区域的柔性可以有效增加酶的催化速率,图 4-1A 显示了 Est8 与 Est8-CE 的 RMSF 结果间存在 5 个 RMSF 显著增加区域,分别为 91-116、131-179、197-231、236-244 与 249-263,其中 91-116、197-231 与 249-263 三个区域分别包含催化三联体之一,为避免使酶的活力降低,这三个区域不宜进行二硫键改造,而 131-179 与 236-244 被指定为需要改进的柔性区域(图 4-1B)。

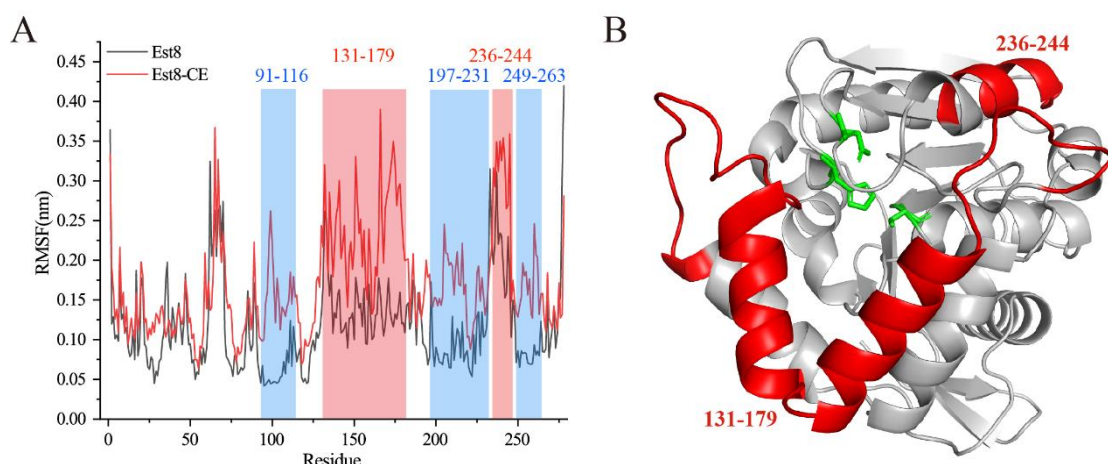


图 4-1 蛋白内柔性区域选取与所其处结构。(A) Est8 与 Est8-CE 的分子动力学 RMSF 结果;(B) 131-179 与 236-244 的结构位置。

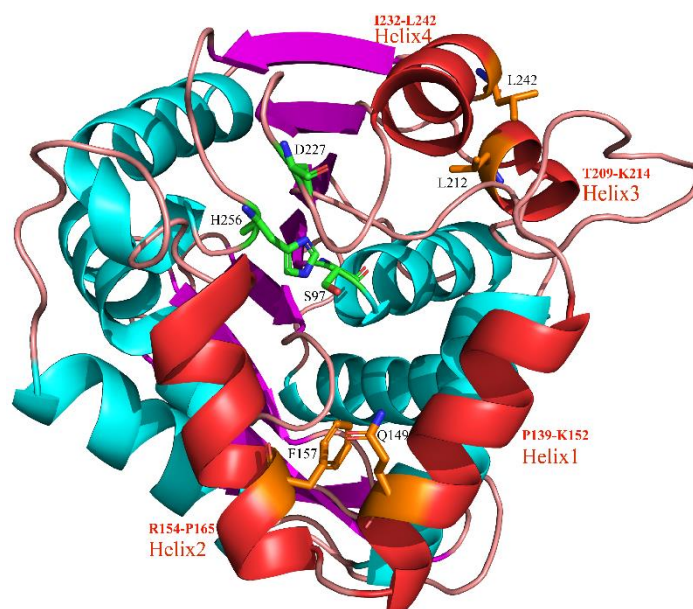
Figure 4-1 Selection of flexible regions in proteins and their structures. (A) Molecular dynamics RMSF results of Est8 and Est8-CE; (B) Structural positions of 131-179 and 236-244.

为提升 131-179 与 236-244 区域的结构刚性,筛选区域内更符合二硫键特征与结构的拟突变位点,我们使用 Disulfide by Design 2.0 与 Discovery Studio 2023 软件对分别来源于 trRosetta 与 AlphaFold3 服务器同源建模得到的酯酶 Est8-CE 结构模型进行潜在的二硫键预测,对两种预测结果分别以能量与得分进行排序,选取在 Disulfide by Design 2.0 结果中能量低于 2.176 kcal/mol 与在 Discovery Studio 2023 中得分大于 90 的二硫键,并对结果中包含催化残基位点与结构残基位点的高保守位点进行排除,如表所示为二硫键筛选后的预测结果。在预测出的 9 对二硫键中,有两对二硫键重复出现,分别是 Q149-F157 与 L212-L242,表明在 Est8-CE 中这两个二硫键更有可能形成,结合 Est8-CE 在 131-179 与 236-244 两个区域的高柔性,故我们选取 Q149-F157 与 L212-L242 位点构建二硫键突变体 Es8-CES1 与 Es8-CES2 进行进一步的数据分析。

表 4-5 预测的二硫键能量与得分
Table 4-5 Predicted disulfide bond energy and scores

Disulfide by Design 2.0		Discovery Studio 2023	
拟二硫键	能量/kcal mol ⁻¹	拟二硫键	得分
L212-L242	0.61	L212-L242	97.76
S177-V180	0.86	Y158-G188	95.27
Q149-F157	1.89	Q149-F157	93.81
Y158-G188	1.98	A40-A263	93.23
-	-	E11-S64	93.19

由图 4-2 可知, 筛选的两个拟二硫键位点均位于构成 Est8-CE 中的主要构象支撑的 α -螺旋结构中, 图中显示二硫键 Q149C-F157C 位于由 P139-K152(Helix1) 与 R154-P165(Helix2) 位点区域形成的两段长 α -螺旋结构中间, 而 L212C-L242C 位于 T209-K214(Helix3) 与 I232-L242(Helix4) 的两段较短的 α -螺旋结构内侧, 且二硫键 Q149C-F157C 连接的 α -螺旋结构靠近底物通道, 这可能会对维持酶在酸性或乙醇环境下的构象稳定性具有重要作用。使用 Discovery Studio 2023 进行虚拟氨基酸突变及稳定性评估, 结果表明 Es8-CES1 与 Es8-CES2 突变体均表现出优异的稳定性, 巩固了其进一步提高稳定效果的可能。



注: Helix1 (P139-K152); Helix2 (R154-P165); Helix3 (T209-K214); Helix4 (I232-L242)

图 4-2 突变位点及改造区域结构

Figure 4-2 Mutation sites and altered regional structure

表 4-6 Discovery Studio 2023 的虚拟氨基酸突变结果
Table 4-6 Virtual amino acid mutation results

突变体	能量 (Kcal/mol)	影响
Est8-CES1	-2.06	STABILIZING
Est8-CES2	-1.17	STABILIZING

4.4.2 Est8-CE 及其突变体的酶学性质表征

利用突变体引物进行定点诱变，构建了 Est8-CES1 和 Est8-CES2 突变体。随后，通过 SDS-PAGE 分析证实这些突变酶在大肠杆菌 BL21 中成功表达并进行纯化，图 4-3A 显示蛋白基本实现可溶性表达，沉淀中含量较少，纯化条带显示均一无其他杂带表明纯化良好(图 4-3B)。使用 Ellman 试剂验证突变体中引入的半胱氨酸对的形成，如图 4-3C 所示，EST8-CE 和突变体都显示出相当水平的游离巯基浓度，这表明在引入的半胱氨酸对之间成功形成了二硫键。比酶活力测定结果显示（图 4-3D），突变体 Est8-CES1 较 Est8-CE 的比酶活力提高 21%，而 Est8-CES1 降低 22%。

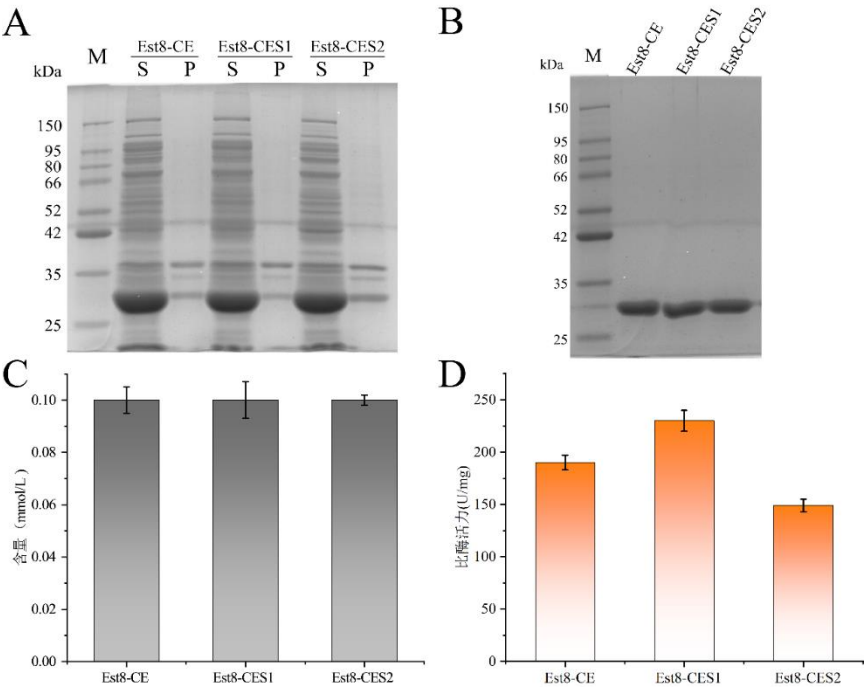


图 4-3 Es8-CE 及其突变体的蛋白胶图与游离巯基及比酶活力测定。(A) 细胞破碎上清与沉淀胶图，M 标准分子质量蛋白，S 破碎上清，P 破碎沉淀；(B) 纯化酶蛋白胶图；(C) 游离巯基测定；(D) 比酶活力测定。

Figure 4-3 Protein gel map of Es8-CE and its mutants with free sulfhydryl and specific enzyme activity assays.(A) Cell-broken supernatant and precipitation gelogram, M standard molecular mass protein, S broken supernatant, P broken precipitate; (B) purified enzyme protein gelogram; (C) free sulfhydryl group assay; (D) specific enzyme activity assay.

为了确定 Est8-CE 和突变体的最佳温度,在 20-80 °C 范围内测量相对酶活力。如图 4-4A, EST8-CE、Est8-CES1 与 Est8-CES2 的最适反应温度为 55 °C、65 °C 与 55 °C, 在 65 °C 时 EST8-CE 的相对酶活性显著降低至 49%, 相比之下 Est8-CES1 与 Est8-CES2 在此条件下相对酶活性为 100% 与 80%; Est8-CES1 在 65 °C 前相对酶活性近乎呈线性上升, 当反应温度提升至 70 °C 后酶活性降低至 47%, 表明其在 70 °C 下催化构象受到较大的破坏, 而 Est8-CES2 在 50-65 °C 的温度范围内始终保持 80% 以上的相对酶活性表明其具有较宽的高活性温度反应区间。温度半衰期测定结果显示 (图 4-4B), 在 80 °C 下 Est8-CE、Est8-CES1 与 Est8-CES2 的半衰期分别为 7 min, 57 min 与 22 min; 突变体不仅在较高温度下活性更高, 而且在高温下也具有较好的稳定性, Est8-CES1 与 Est8-CES2 的半衰期达到了 Est8-CE 的 8.14 倍与 3.14 倍, 结果证明二硫键构建有效增强了酶在高温下的稳定性。

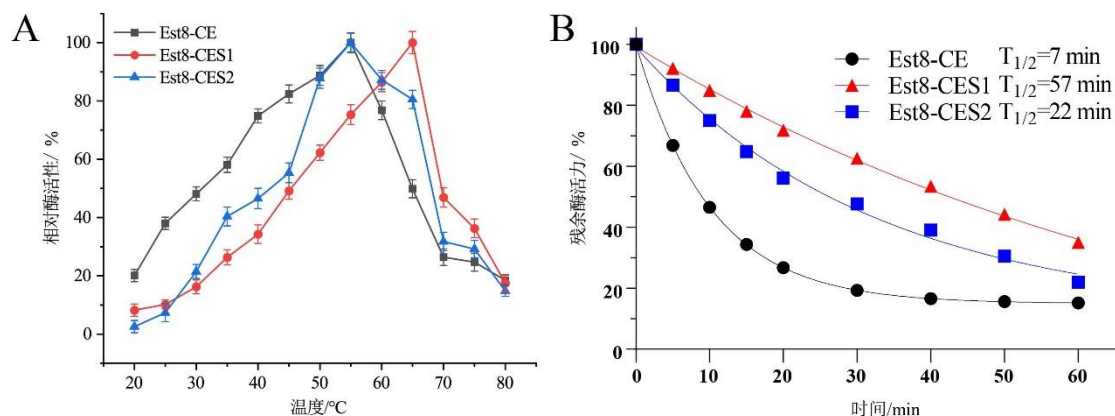


图 4-4 温度对酶活力的影响。(A) 最适反应温度; (B) 80 °C 下的半衰期。

Figure 4-4 Effect of temperature on enzyme activity. (A) Optimum reaction temperature; (B) Half-life at 80 °C.

为了研究 Est8-CE 和突变体的最佳 pH, 在 3.0-8.0 的 pH 范围内测量了酶活性。如图 4-5A 所示, EST8-CE 和 Est8-CES2 的最适 pH 值均为 7.0, 而 Est8-CES1 的最适 pH 降低为 5.5。EST8-CE、Est8-CES1 和 Est8-CES2 在 pH 4.5-8.0 的较宽泛范围内均具有 70% 的相对酶活力, 可以较好的适应不同的酸碱环境; 值得注意的是, 与 EST8-CE 和 Est8-CES2 相比, Est8-CES1 在 4.0-5.5 的弱酸范围内保持了几近最大的相对酶活性, 表现出较好的酸耐受性。pH 稳定性结果显示 (图 4-5B), Est8-CES1 在 pH 7.0 下稳定性最好, 而 EST8-CE 和 Est8-CES2 为 pH 8.0; 此外 Est8-CES1 在 pH 3.0-7.0 的酸性环境下具有三者中最佳的稳定性, 其在 pH 4.0 与 pH 5.0 下 4 °C 放置 6 h 后仍具有 73% 与 83% 的残余酶活力, 而 Est8-CE 在

相同 pH 环境下仅有 49%与 67%的残余酶活性。实验数据表明 Est8-CES1 在酸性环境下可以保持较好的稳定性。

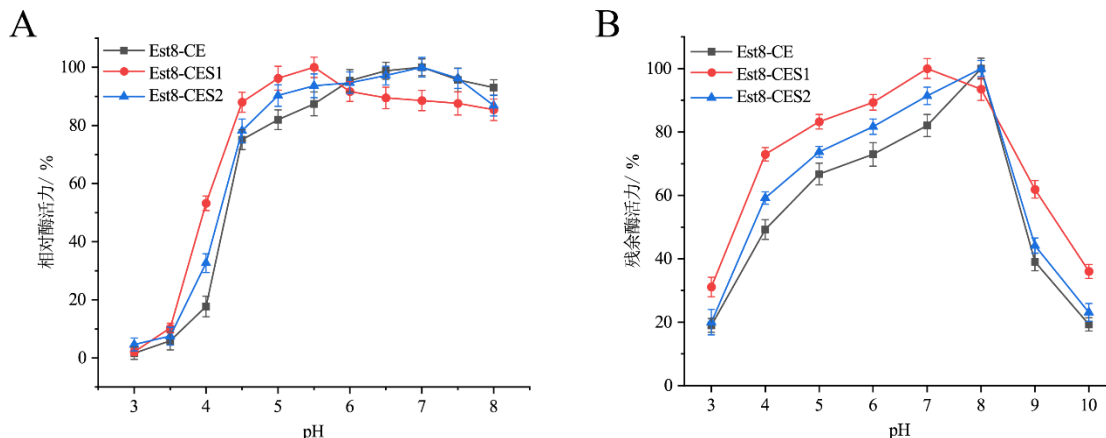


图 4-5 pH 对酶活力的影响。(A) 最适反应 pH; (B) pH 稳定性。

Figure 4-5 Effect of pH on enzyme activity. (A) Optimum reaction pH; (B) pH stability.

如图 4-6A 所示, 在 10%的乙醇浓度下, 三个酶均具有 60%以上的相对酶活力, 而在 10%-40% (v/v) 的乙醇浓度下, 两个突变体较 Est8-CE 的相对酶活性均获得了明显的提升, 如在 20%乙醇浓度下, Est8-CES1 Est8-CES2 与保留 49%与 32%的相对酶活力, 是 Est8-CE 的 2.72 倍与 1.78 倍。乙醇稳定性结果如图 4-6B 所示, Est8-CES2 整体与 Est8-CE 趋势相同, 乙醇稳定性未得到显著提升, 而 Est8-CES1 在 0%-40%的乙醇环境下, 其始终保持着 50%以上的残余酶活力, Est8-CE 在 40%乙醇环境下仅有 36%的残余酶活力。图 4-6 表明 Est8-CES1 具有较好的乙醇耐受性, 在低酒精度的酒精饮料中具有可直接应用的潜力, 此外实验结果还表明构建二硫键可以有效增加酶对极端环境的抗逆性^[101]。

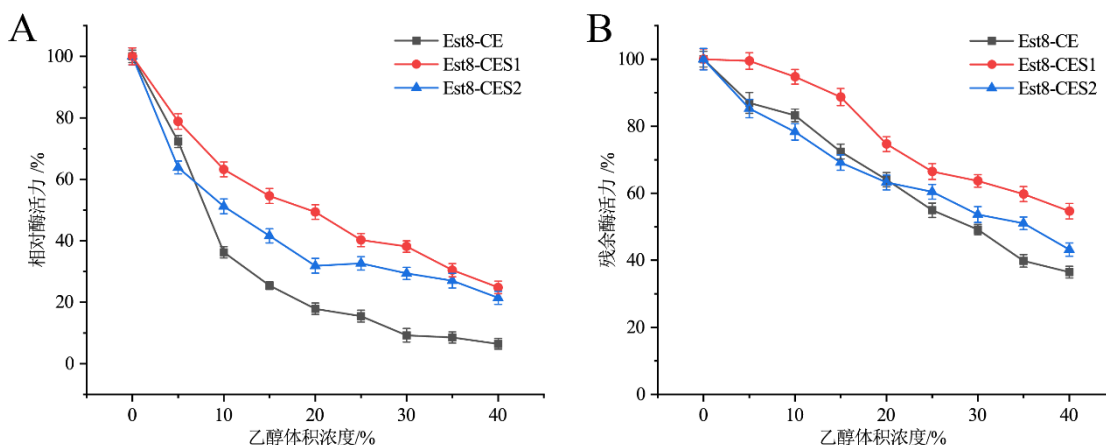


图 4-6 乙醇对酯酶活力的影响。(A) 不同乙醇浓度下的相对酶活力; (B) 不同乙醇浓度下的残余酶活力。

Figure 4-6 Effect of ethanol on esterase activity. (A) Relative enzyme activity at different ethanol concentrations; (B) Residual enzyme activity at different ethanol concentrations.

在 10-1000 mmol/L 的 EC 浓度下测定 Est8-CE 和突变体的动力学参数。所有数据均通过非线性回归拟合。如表 4-6 所示, 突变体与 EST8-CE 的 $V_{\max}$ 和 K_m 值存在显著差异, Est8-CES1 的 $V_{\max}$ 为 $386.78 \pm 9.41 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$, 相较于 EST8-CE 的 $246.03 \pm 4.67 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ 提高至 157.22%, Est8-CES2 的 $V_{\max}$ 与底物亲和力较 Est8-CE 均有明显降低, 导致其催化速率显著下降。Est8-CES1 显著的 $V_{\max}$ 提升表明, 在 Est8-CE 中引入二硫键增加了其在酸性环境下的催化速度, 推测与其酸耐受性加强有关, 但 Est8-CES1 的底物亲和力显著降低, 其 K_m 达到 Est8-CE 的 1.94 倍, 表明蛋白刚性的增强导致亲和力与催化速率降低, 推测影响了催化区的柔性。综上所述 Est8-CES1 的 $V_{\max}$ 显著高于 EST8-CE, 但由于其亲和力大幅降低导致催化速率仍低于 Est8-CE, 而 Est8-CES1 的动力学性能均较差, 导致其催化速率显著降低。

表 4-6 Est8-CE 及其突变体动力学参数

Table 4-6 The apparent kinetic parameters of Est8-CE and its variants

Est8-CE 及其 突变体	动力学参数			
	$V_{\max}/(\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg}))$	$K_m/(\text{mmol}/\text{L})$	$k_{\text{cat}}/\text{s}^{-1}$	k_{cat}/K_m L/ (mmol · s)
Est8-CE	246.03 ± 4.67	120.44 ± 12.74	127.35 ± 2.42	1057.69 ± 19.00
Est8-CES1	386.78 ± 9.41	234.54 ± 10.72	200.22 ± 4.85	853.68 ± 25.42
Est8-CES2	214.54 ± 5.88	177.89 ± 8.77	111.06 ± 4.24	624.32 ± 15.39

4.4.3 亲和力降低与稳定性提升机制解析

实验表明, 突变体与 Est8-CE 在不同条件下的稳定性方面存在明显差异, 尤其是 Est8-CES1 在热稳定性、酸稳定性与乙醇稳定性三个方面均有所提高, 但对底物的亲和力有明显的降低。为了深入了解突变体亲和力与稳定性差异的机制, 从分子间作用力和 MD 模拟轨迹分析的两方面对其进行了分析。

分子对接结果如图 4-7 所示, Est8-CE (4-7A)、Est8-CES1 (4-7B) 和 Est8-CES2 (4-7C) 与底物 EC 间分别形成 3、2 和 2 条氢键相互作用力, 且每个酯酶中皆包含一条与催化三联体中 S97 形成的氢键。其中 Est8-CE 具有三条氢键且其中两条是与 Ser97 间形成, 所以其具有着三个酯酶中最好的底物亲和力, 而 Est8-CES1 与 Est8-CES2 与底物间的分子间作用力相似, 皆是 W31 与 S97 各与底物

形成一条氢键。Est8-CES1 的两个氢键长度分别是 2.5 Å 与 2.7 Å，而 Est8-CES2 的氢键长度为 2.1 Å 与 2.4 Å，在同类型的氢键相互作用下，酶-底物间较短的氢键键长会使酶的亲和力更高，所以 Est8-CES2 有着比 Est8-CES1 更低的 K_m 值^[93]。Est8-CES1 和 Est8-CES2 的蛋白模型显示成功在 α -螺旋结构中构建二硫键，二硫键 C149-C157（图 4-7B）与 Q212-F242（图 4-7C）各将两段 α -螺旋结构连接在一起；在蛋白质结构中 α -螺旋是最重要的刚性结构，同时其在蛋白质折叠中也会引导其他结构域的折叠，在 Est8-CES1 中二硫键 C149-C157 通过连接两个靠近底物通道的 α -螺旋结构，从而稳固催化通道以及蛋白内部的催化活性口袋，有利于酶抵抗酸性、高温或高乙醇浓度的外部环境^[102-104]。Est8-CES1 在外部的极端环境中表现出较好的稳定性，并且由于其在酸性环境下结构稳定导致 V_{max} 也得到了显著提升，推测可能是由于构建的二硫键强化了蛋白整体结构的刚性造成的。Est8-CES2 同样连接着两段 α -螺旋结构，但构建的二硫键距离活性中心较远（图 4-7C），无法有效稳固酶的催化构象，导致 Est8-CES2 在各类环境下的稳定性差于 Est8-CES1，但其底物亲和力高于 Est8-CES1，表明 Est8-CES1 中二硫键 C149-C157 在稳定催化活性中心的同时也会减慢底物与酶活性中心的结合。

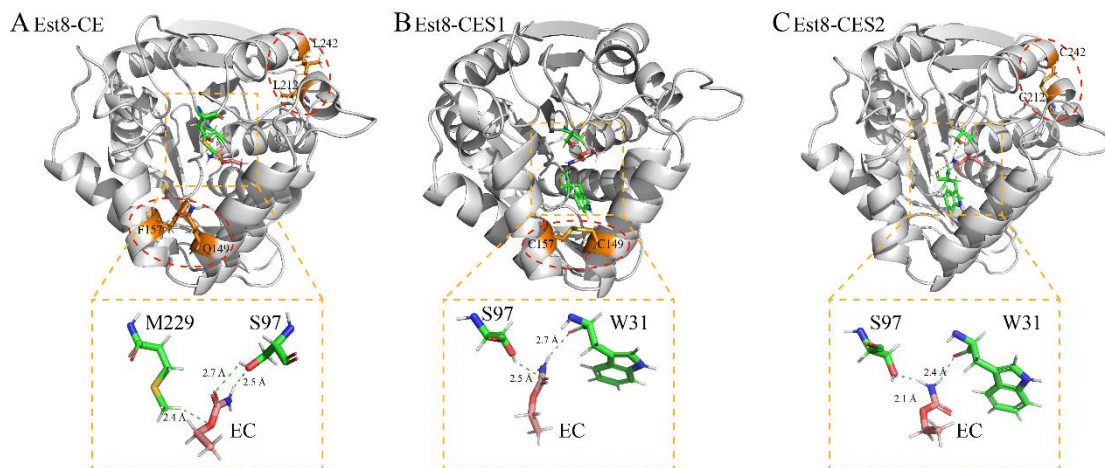


图 4-7 Est8-CE 及其突变体的蛋白结构与分子对接。(A)、(B)、(C) 分别为 Est8-CE、Est8-CES1、Est8-CES2 与底物 EC 的分子对接。

Figure 4-7 Protein structure and molecular docking of est8 CE and its mutants. (A), (B), (C) Molecular docking of Est8-CE, Est8-CES1 and Est8-CES2 to substrate EC.

如图 4-8A 所示，RMSD 值越低表明结构越稳定，二硫键突变体 Est8-CES1 与 Est8-CES2 的 RMSD 值较 Est8-CE 明显降低，Est8-CE 在动力学模拟 50 ns 后 RMSD 值趋于平稳至 0.33 nm，而 Est8-CES1 与 Est8-CES2 在仅 30 ns 的分析动力学模拟结构就趋于稳定，二者的 RMSD 值各稳定在 0.18 nm 与 0.24 nm，相较

于与 Est8-CE 各降低 45%与 27%的蛋白整体波动幅度。图 4-8A 结果表明二硫键的构建不仅使突变体在动力学模拟中 RMSD 值大幅降低，而且显著减少突变体进入平稳期时间，有效增加了酶的整体结构稳定性。

RMSF 同样值被用于评估蛋白质稳定性，是评价蛋白质局部区域柔性的重要参数^[105, 106]。如图 4-8B 所示，在 100 nm 的分子动力学模拟中，Est8-CES1 与 Est8-CES2 的 RMSF 平均值相较于 Est8-CE 分别降低了 31%与 22%，而针对局部区域的柔性分析表明，在两个突变体中分别构建的二硫键对两个高柔性区域均有显著的柔性降低作用；在高柔性区域 131-179 与 236-244 中，Est8-CES1 与 Est8-CES2 在 131-179 区域的平均 RMSF 值比 Est8-CE 低 54%与 58%，而在 236-244 区域则降低 59%与 62%。在蛋白结构中高柔性区域中引入二硫键有效地提升了蛋白质在酸性、乙醇环境及高温下的稳定性，但柔性的降低也使酶的催化速率下降，在催化三联体位点附近的区域（95-107，223-235，252-264）柔性也出现了降低，尤其在 S97 附近的位点，两个突变体在 95-107 位点区域的平均 RMSF 值仅为 Est8-CE 的 38%（图 4-8B）。催化区域的柔性降低一方面导致突变体与底物间的氢键相互作用力减少，亲和力降低，另一方面催化口袋的较强刚性不利于底物的结合与释放，导致突变体的催化速率都呈降低结果，但突变体的整体构象稳定性得到了提升，这使得酯酶在实际的发酵生产中面对极端环境（酸性、乙醇及高温）具有更好的稳定性，可以较好的发挥降解 EC 的功能^[11, 107]。

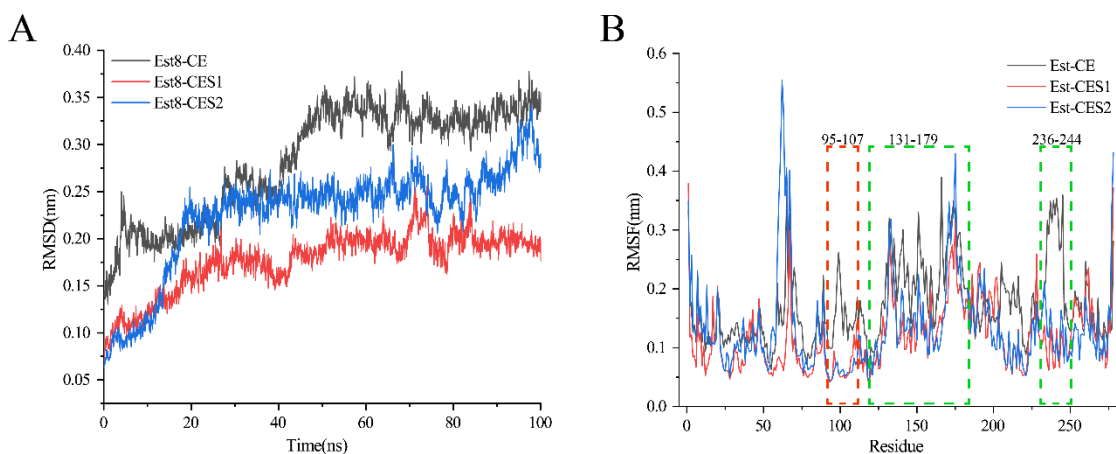


图 4-8 Est8-CE 及其突变体的分子动力模拟轨迹分析结果。(A) RMSD; (B) RMSF。

Figure 4-8 Results of molecular dynamics simulation trajectory analysis of Est8-CE and its mutants. (A) RMSD; (B) RMSF.

表 4-7 ES8-CE 及其突变体柔性区域的平均 RMSF 值
Table 4-7 Mean RMSF values for ES8-CE and its mutants flexible regions

柔性区域	平均 RMSF 值 (nm)		
	Est8-CE	Est8-CES1	Est8-CES2
95-107	1.6	0.6	0.6
131-179	2.4	1.1	1.0
223-235	1.8	1.3	1.4
236-244	3.2	1.3	1.2
252-264	1.7	1.3	1.7

4.5 结论

(1) 在上一节中通过理性设计的突变体 Est8-CE 具有显著提升的催化速率，但其在极端环境下的稳定性较差，无法较好的发挥 EC 降解功能。本章通过在线服务器 Disulfide by Design 2 与 Discovery Studio 2023 软件对酯酶 Est8-CE 进行二硫键预测，并结合分子动力学模拟的结果确定在柔性区域构建的二硫键位点 Q149C-F157C 与 L212C-L242C。

(2) 通过实验表征出 Est8-CE 及其突变体的酶学性质，结合底物结合构象分析与分子动力学模拟对突变体的稳定性提升机制进行解析。实验数据表明突变体 Est8-CES1 (Q149C-F157C) 与 Est8-CES2 (L212C-L242C) 在极端环境下的稳定性得到了明显的提升，在热稳定性方面 80 °C 条件下 Est8-CES1 和 Est8-CES2 的半衰期分别是 Est8-CE 的 8.14 倍与 3.14 倍，在 pH 4.0 的酸性环境下 4 °C 放置 6 h 后 Est8-CES1 的残余酶活力是 Est8-CE 的 1.49 倍，而在 20%乙醇条件下 Est8-CES1 的残余酶活力高达 Est8-CE 的 2.72 倍。分子动力学的轨迹分析结果表明二硫键的引入显著降低了 Est8-CE 的 RMSD 与 RMSF，证明突变体的结构稳定性得到增强，有望于在极端环境下进行使用；而分子间作用力分析展示突变体与底物间减少的氢键相互作用与催化区域的刚性增强是造成其底物亲和力与催化速率降低的原因。

第 5 章 结论与展望

5.1 结论

EC 作为 2A 类致癌物质，在近些年广泛受人们的关注，而针对 EC 的降解方法也有大量学者进行研究报道。酶法消减发酵食品中 EC 具有直接高效、条件温和、环境友好等优点，在实际的工业生产中具有重要的应用价值；但目前得到报道的 EC 水解酶因酸耐受性差、乙醇耐受性差以及底物催化速率低等问题在工业生产中无法实现应用。本论文根据目前唯一报道的来源于醋酸钙不动杆菌的 EC 水解酯酶进行基因挖掘，并针对性质较优的 ES8 进行催化速率改造与稳定性改造，以期得到在酸性环境下催化速率与稳定性提高的突变体，扩充目前的 EC 水解酶库以及为 EC 水解酶的工业应用提供参考。主要研究结论如下：

(1) 通过对来源于 *A. calcoaceticus* 中具有 EC 降解活性的酯酶序列在 NCBI 数据库中进行基因挖掘，得到 4 个在 pH 4.5 与 pH 7.0 下的具有较高 EC 水解活力的酯酶 ES1、ES5、ES8 与 ES9 并进行酶学性质表征。酶学性质结果表明挖掘得到的四个新型 EC 水解酯酶在低浓度乙醇与酸性环境中仍具有水解 EC 的活力，其中 ES8 在酸性环境下耐受性较好，而 ES9 因其与底物 EC 间具有更强的氢键相互作用力所以底物亲和力更强。

(2) 研究通过理性设计对基因挖掘获得的酯酶 ES8 进行底物亲和力与催化速率改造，根据选取形成 ES8 底物结合口袋的氨基酸位点，以保守性分析结合序列一致性回归策略选取改造位点进行定点突变。本研究通过定点突变得到酶活力提升的突变体 V129S、V161L、I229M、V129S/I229M、V161L/I229M 和 V129S/V161L/I229M。突变体的酶学性质结果显示，V129S/I229M 较 WT 催化速率与底物亲和力分别提升 655.08%和 52.99%，而 V161L 在酸性环境下具有 WT 1.5 倍的残余酶活力。为阐明突变体催化速率与底物亲和力及酸稳定性提高的可能机制，研究对 WT 及其突变体进行分子对接与分子动力学模拟，解析出亲和力与催化速率提升可能是由于酶与底物间的氢键相互作用力增加、底物通道亲水性提高、催化活性中心疏水性增强和酶的催化三联体附近残基柔性提高促进底物的过渡态转变造成的，而酸稳定性的提高原因可能是通过增加 α 螺旋结构与底物通

道附近 Loop 区域的氢键相互作用力，稳定催化中心的局部构象。

(3) 研究通过构建蛋白表面 α -螺旋结构间的二硫键，成功使 ES8 的突变体 V129S/I229M (Est8-CE) 的多项稳定性明显提高。研究通过在线服务器 Disulfide by Design 2 与 Discovery Studio 2023 软件结合分子动力学模拟的结果确定在柔性区域构建的二硫键位点 Q149C-F157C 与 L212C-L242C。通过实验表征出 Est8-CE 突变体的酶学性质，结合底物结合构象分析与分子动力学模拟对突变体的稳定性提升机制进行解析。实验数据表明突变体在不同环境下的稳定性均有所提升，其中突变体 Est8-CES1 的 80 °C 半衰期、pH 4.0 与 20% 乙醇环境的稳定性分别是 Est8-CE 的 8.14 倍、1.49 倍与 2.72 倍。使用分子动力学模拟分析蛋白结构变化，轨迹分析结果表明二硫键的引入显著降低了 Est8-CE 的 RMSD 与 RMSF，证明突变体的结构稳定性得到增强，有望于在极端环境下进行使用；而分子间作用力分析突变体与底物间减少的氢键相互作用与催化区域的刚性增强可能是造成其底物亲和力与催化速率降低的原因。

5.2 展望

(1) 本研究中挖掘出的酯酶虽然不会水解 EC 的前体物质尿素，但其可能会水解酒精饮料中的其他酯类，进而影响酒精饮料的风味。未来的研究可对酯酶的底物特异性进行测定，并通过结构改造和定向突变优化该酶的底物特异性，降低对非目标酯类的水解作用。

(2) 尽管本研究得到催化速率与底物亲和力显著提升的酯酶突变体，但其底物亲和力相较于其他 EC 水解酶仍然较低，导致无法应用在微量 EC 的降解。未来有必要结合其他设计策略，利用计算机对 EC 水解酶从头设计，构建出具有更好底物亲和力与催化速率的 EC 水解酶。

(3) 本研究得到酯酶 Est8-CES1 具有在酸性及乙醇环境下较好的稳定性，但目前尚未在食品中实际应用和检测。未来可进一步将该酶用于酒精饮料中的 EC 降解实验，以验证其在工业生产条件下实现 EC 降解的可行性和实际效果。

参考文献

- [1] Gowd V, Su H, Karlovsky P, etc. Ethyl carbamate: an emerging food and environmental toxicant[J]. Food Chemistry, 2018, 248: 312-321.
- [2] Hubner P, Groux P M, Weibel B, etc. Genotoxicity of ethyl carbamate (urethane) in *Salmonella*, yeast and human lymphoblastoid cells[J]. Mutation research, 1997, 390(1-2): 11-19.
- [3] Beland F A, Benson R W, Mellick P W, etc. Effect of ethanol on the tumorigenicity of urethane (ethyl carbamate) in B6C3F1 mice[J]. Food and Chemistry Toxicol, 2005, 43(1): 1-19.
- [4] Sakano K, Oikawa S, Hiraku Y, etc. Metabolism of carcinogenic urethane to nitric oxide is involved in oxidative DNA damage[J]. Free radical biology & medicine, 2002, 33(5): 703-714.
- [5] Pflaum T, Hausler T, Baumung C, etc. Carcinogenic compounds in alcoholic beverages: an update[J]. Archives of Toxicology, 2016, 90(10): 2349-2367.
- [6] Zhao X R, Du G C, Zou H J, etc. Progress in preventing the accumulation of ethyl carbamate in alcoholic beverages[J]. Trends in Food Science & Technology, 2013, 32(2): 97-107.
- [7] Aresta M, Boscolo M, Franco D W. Copper(II) catalysis in cyanide conversion into ethyl carbamate in spirits and relevant reactions[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(6): 2819-2824.
- [8] Xu Y, Li Y T, Li J X, etc. Ethyl carbamate triggers ferroptosis in liver through inhibiting GSH synthesis and suppressing Nrf2 activation[J]. Redox Biology, 2022, 53: 102349.
- [9] Jiao Z, Dong Y, Chen Q. Ethyl carbamate in fermented beverages: presence, analytical chemistry, formation mechanism, and mitigation proposals[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2014, 13(4): 611-626.
- [10] 陈蓉锋, 沈琳, 费鹏, 等. 发酵食品中氨基甲酸乙酯检测方法的进展[J]. 食

- 品工业, 2018, 39(8): 263-268.
- [11] Tavilli E, Esti M, Fidaleo M. Effective ethyl carbamate prevention in red wines by treatment with immobilized acid urease[J]. Foods, 2024, 13(16): 2476.
- [12] Vasyagin E A, Urakov V N, Shalamitskiy M Y, etc. Development of a wine yeast strain capable of malolactic fermentation and reducing the ethyl carbamate content in wine[J]. Foods, 2025, 14(1): 54.
- [13] Cui K, Wu Q, Xu Y. Biodegradation of ethyl carbamate and urea with *Lysinibacillus sphaericus* MT33 in Chinese liquor fermentation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(6): 1583-1590.
- [14] Galinaro C A, Ohe T H, da Silva A C, etc. Cyanate as an active precursor of ethyl carbamate formation in sugar cane spirit[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(33): 7415-7420.
- [15] Kim Y G, Lyu J, Kim M K, etc. Effect of citrulline, urea, ethanol, and urease on the formation of ethyl carbamate in soybean paste model system[J]. Food Chemistry, 2015, 189: 74-79.
- [16] Zhang P, Du G, Zou H, etc. Mutant potential ubiquitination sites in dur3p enhance the urea and ethyl carbamate reduction in a model rice wine system[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(8): 1641-1648.
- [17] Fang R S, Syahputra J C, Airhunmwunde O, etc. Improving the enzyme property of ornithine transcarbamylase from *Lactobacillus brevis* through site-directed mutation[J]. Lwt-Food Science and Technology, 2020, 133: 109953.
- [18] 张伟平, 赵鑫锐, 堵国成, 等. 酿酒酵母氮代谢物阻遏效应及其对发酵食品安全的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2012, 18(5): 862-872.
- [19] Jagerdeo E, Dugar S, Foster G D, etc. Analysis of ethyl carbamate in wines using solid-phase extraction and multidimensional gas chromatography/mass spectrometry[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(21): 5797-5802.
- [20] Walker G, Winterlin W, Fouda H, etc. Gas chromatographic analysis of urethan (ethyl carbamate) in wine[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1974,

22(6): 944-947.

- [21] 刘俊, 徐岩, 陈双, 等. 顶空-固相微萃取-气质联用技术快速测定黄酒中氨基甲酸乙酯的方法研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(04): 60-63+69.
- [22] Xian Y, Wu Y, Dong H, etc. Ice-bath assisted sodium hydroxide purification coupled with GC-MS/MS analysis for simultaneous quantification of ethyl carbamate and 12 N-nitrosoamines in yellow rice wine and beer[J]. Food Chemistry, 2019, 300: 125200.
- [23] Hamlet C G, Jayaratne S M, Morrison C. Application of positive ion chemical ionisation and tandem mass spectrometry combined with gas chromatography to the trace level analysis of ethyl carbamate in bread[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2005, 19(16): 2235-2243.
- [24] Ribeiro M A, Tonin A P P, Polisel C B, etc. Determination of ethyl carbamate in sugar cane spirit by direct injection electrospray ionization tandem mass spectrometry using 18-crown-6/trifluoroacetic acid spiking additives[J]. Food Analytical Methods, 2019, 12(1): 69-75.
- [25] 陈达炜, 苗虹, 赵云峰, 等. 酒精度对高效液相色谱-荧光法分析白酒中氨基甲酸乙酯含量的影响[J]. 色谱, 2013, 31(12): 1206-1210.
- [26] Li M, Zhao Y, Cui M, etc. SERS-active Ag nanostars substrates for sensitive detection of ethyl carbamate in wine[J]. Analytical Sciences, 2016, 32(7): 725-728.
- [27] Yang D, Zhou H, Ying Y, etc. Surface-enhanced Raman scattering for quantitative detection of ethyl carbamate in alcoholic beverages[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2013, 405(29): 9419-9425.
- [28] Qi H, Chen H, Wang Y, etc. Detection of ethyl carbamate in liquors using surface-enhanced Raman spectroscopy[J]. Royal Society Open Science, 2018, 5(12): 181539.
- [29] Lachenmeier D W, Lima M C, Nobrega I C, etc. Cancer risk assessment of ethyl carbamate in alcoholic beverages from Brazil with special consideration to the spirits cachaca and tiquira[J]. BMC Cancer, 2010, 10: 266.
- [30] 郝丽刚, 胡建祥, 胡景辉, 等. 白酒中氨基甲酸乙酯研究进展概述[J]. 中国

酿造, 2024, 43(9): 14-20.

- [31] Jung S, Kim S, Kim I, etc. Risk assessment of ethyl carbamate in alcoholic beverages in Korea using the margin of exposure approach and cancer risk assessment[J]. Food Control, 2021, 124.
- [32] Wang D J, Li W, Albasha N, etc. Long-term exposure to house dust mites accelerates lung cancer development in mice[J]. Journal of Experimental and Clinical Cancer Research, 2023, 42(1): 26.
- [33] Liu Q T, Wang H, Zhang W Q, etc. High salt-resistant urethanase degrades ethyl carbamate in soy sauce[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(38): 21266-21275.
- [34] Fu M L, Liu J, Chen Q H, etc. Determination of ethyl carbamate in Chinese yellow rice wine using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2010, 45(6): 1297-1302.
- [35] Mo W M, He H L, Xu X M, etc. Simultaneous determination of ethyl carbamate, chloropropanols and acrylamide in fermented products, flavoring and related foods by gas chromatography triple quadrupole mass spectrometry[J]. Food Control, 2014, 43: 251-257.
- [36] Chen Y, Zeng W Z, Fang F, etc. Elimination of ethyl carbamate in fermented foods[J]. Food Bioscience, 2022, 47.
- [37] Gao M M, Li W Y, Fan L L, etc. Reduced production of ethyl carbamate in wine by regulating the accumulation of arginine in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Biotechnology, 2024, 385: 65-74.
- [38] Wei T Y, Jiao Z H, Hu J J, etc. Chinese yellow rice wine processing with reduced ethyl carbamate formation by deleting transcriptional regulator dal80p in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Molecules, 2020, 25(16): 3580.
- [39] Wu D H, Xie W J, Li X M, etc. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* using the CRISPR/Cas9 system to minimize ethyl carbamate accumulation during Chinese rice wine fermentation[J]. Applied Microbiology

- and Biotechnology, 2020, 104(10): 4435-4444.
- [40] Lago L O, Nicolli K P, Marques A B, etc. Influence of ripeness and maceration of the grapes on levels of furan and carbonyl compounds in wine - Simultaneous quantitative determination and assessment of the exposure risk to these compounds[J]. Food Chemistry, 2017, 230: 594-603.
- [41] Du H, Song Z, Xu Y. Ethyl Carbamate formation regulated by lactic acid bacteria and nonconventional yeasts in solid-state fermentation of Chinese moutai-flavor liquor[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(1): 387-392.
- [42] Redan B W. Processing aids in food and beverage manufacturing: potential source of elemental and trace metal contaminants[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(46): 13001-13007.
- [43] Kobashi K, Takebe S, Sakai T. Urethane-hydrolyzing enzyme from *Citrobacter* sp.[J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1990, 38(5): 1326-1328.
- [44] Akutsu-Shigeno Yukie, Adachi Yusuke, Yamada Chise, etc. Isolation of a bacterium that degrades urethane compounds and characterization of its urethane hydrolase[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 70(4): 422-429.
- [45] Masaki K, Fujihara K, Kakizono D, etc. *Aspergillus oryzae* acetamidase catalyzes degradation of ethyl carbamate[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2020, 130(6): 577-581.
- [46] Dong N, Xue S, Guo H, etc. Genetic engineering production of ethyl carbamate hydrolase and its application in degrading ethyl carbamate in Chinese liquor[J]. Foods, 2022, 11(7): 937.
- [47] Liu Q T, Yao X H, Liang Q X, etc. Molecular engineering of *Bacillus paralicheniformi* 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.
- [48] Wu Q, Zhao Y M, Wang D, etc. Immobilized *Rhodotorula mucilaginosa*: a novel urethanase-producing strain for degrading ethyl carbamate[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2013, 171(8): 2220-2232.

- [49] Jia Y Y, Zhou J W, Du G C, etc. Identification of an urethanase from *Lysinibacillus fusiformis* for degrading ethyl carbamate in fermented foods[J]. Food Bioscience, 2020, 36.
- [50] Yao X, Kang T, Pu Z, etc. Sequence and structure-guided engineering of urethanase from *Agrobacterium tumefaciens* d3 for improved catalytic activity[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(23): 7267-7278.
- [51] 高孝, 高洁, 刘晓宇, 等. 氨基甲酸乙酯水解酶异源表达及酶学性质分析[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(10): 195-201.
- [52] Zhang X, Zhang Y, Fan T, etc. Structure-guided engineered urethanase from *Candida parapsilosis* with pH and ethanol tolerance to efficiently degrade ethyl carbamate in Chinese rice wine[J]. Ecotoxicological and Environmental Safety, 2024, 276: 116335.
- [53] Yang Y, Kang Z, Zhou J, etc. High-level expression and characterization of recombinant acid urease for enzymatic degradation of urea in rice wine[J]. Applied Microbiol Biotechnol, 2015, 99(1): 301-308.
- [54] Liu X, Zhang Q, Zhou N, etc. 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.
- [55] Liu Q, Yao X, Liang Q, etc. 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.
- [56] 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.
- [57] Zheng H, Meng K, Liu J, etc. Identification and expression of bifunctional acid urea-degrading enzyme/urethanase from *Enterobacter* sp. R-SYB082 and its application in degradation of ethyl carbamate in Chinese rice wine (Huangjiu)[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2022, 102(11): 4599-4608.
- [58] Wang H, Li D D, Zhu S B, etc. Characterization of urease from *Providencia* sp. LBBE and Its application in degrading urea and ethyl carbamate in rice wine[J].

- Fermentation, 2024, 10(12): 653.
- [59] 刘喆,李家霖,白利平. 微生物酯酶研究进展[J]. 微生物学报, 2023, 63(2): 451-464.
- [60] Mcdonald A G, Boyce S, Tipton K F. ExplorEnz: the primary source of the IUBMB enzyme list[J]. Nucleic Acids Research, 2009, 37(Database issue): D593-597.
- [61] Nardini M, Dijkstra B W. Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing[J]. Current Opinion in Structural Biology, 1999, 9(6): 732-737.
- [62] 赵国伟. 基于分子动力学模拟的蛋白酶 PB92 工程化二硫键突变体稳定性设计研究[D]; 山西大学, 2024.
- [63] Deng H, Ji L, Han X Y, etc. Research progress on the application of different controlling strategies to minimizing ethyl carbamate in grape wine[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2023, 22(3): 1495-1516.
- [64] Bhuyan S K, He W, Cui J, etc. Directed evolution of peroxidase DNAzymes by a function-based approach[J]. Biology Methods and Protocols, 2025, 10(1): bpae088.
- [65] James J, Towers S, Foerster J, etc. Optimisation strategies for directed evolution without sequencing[J]. PLoS Computational Biology, 2024, 20(12): e1012695.
- [66] Schnettler J D, Klein O J, Kaminski T S, etc. Ultrahigh-throughput directed evolution of a metal-free alpha/beta-hydrolase with a Cys-His-Asp triad into an efficient phosphotriesterase[J]. Journal of the American Chemical Society, 2023, 145(2): 1083-1096.
- [67] Liu X, Liang M, Liu Y, etc. Directed evolution and secretory expression of a pyrethroid-hydrolyzing esterase with enhanced catalytic activity and thermostability[J]. Microbial Cell Factories, 2017, 16(1): 81.
- [68] Ishak S N H, Aris S, Halim K B A, etc. Molecular dynamic simulation of space and earth-grown crystal structures of thermostable T1 lipase *Geobacillus zalihae* revealed a better structure[J]. Molecules, 2017, 22(10): 1574.
- [69] Ovchinnikov S, Park H, Varghese N, etc. Protein structure determination using

- p>metagenome sequence data[J]. Science, 2017, 355(6322): 294-298.
- [70] 刘晓慧, 方芳, 夏小乐, 等. 定点突变改造提高纺锤形赖氨酸芽孢杆菌氨基甲酸乙酯水解酶稳定性[J]. 生物工程学报, 2016, 32(9): 1233-1242.
- [71] Li Z, Han X, Cong L, etc. Structure-guided engineering of a versatile urethanase improves its polyurethane depolymerization activity[J]. Advanced Science, 2025: e2416019.
- [72] Sun H, Cheng Y, Zhao L, etc. Improvement of the catalytic performance of chitosanase Csn-PD from *Paenibacillus dendritiformis* by semi-rational design[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 264(Pt 2): 130753.
- [73] Zhang Y, Zhang T, Miao M. Semi-rational design in simultaneous improvement of thermostability and activity of beta-1,3-glucanase from *Alkalihalobacillus clausii* KSMK16[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 283(Pt 2): 137779.
- [74] Kang T T, Lin J P, Yang L R, etc. Expression, isolation, and identification of an ethanol-resistant ethyl carbamate-degrading amidase from *Agrobacterium tumefaciens* d3[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2021, 132(3): 220-225.
- [75] Eijssink V G, Gaseidnes S, Borchert T V, etc. Directed evolution of enzyme stability[J]. Biomolecular Engineering, 2005, 22(1-3): 21-30.
- [76] Reetz M T, Soni P, Fernandez L, etc. Increasing the stability of an enzyme toward hostile organic solvents by directed evolution based on iterative saturation mutagenesis using the B-FIT method[J]. Chemical Communications, 2010, 46(45): 8657-8658.
- [77] Lehmann M, Wyss M. Engineering proteins for thermostability: the use of sequence alignments versus rational design and directed evolution[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2001, 12(4): 371-375.
- [78] Sutthibutpong T, Rattanarojpong T, Khunrae P. Effects of helix and fingertip mutations on the thermostability of xyn11A investigated by molecular dynamics simulations and enzyme activity assays[J]. Journal of Biomolecular Structure and

- Dynamics, 2018, 36(15): 3978-3992.
- [79] Fass D. Disulfide bonding in protein biophysics[J]. Annual Review of Biophysics, 2012, 41(2012): 63-79.
- [80] Craig Douglas B, Dombkowski A A. Disulfide by Design 2.0: a web-based tool for disulfide engineering in proteins[J]. BMC Bioinformatics, 2013, 2105(14): 346.
- [81] Matsumura M, Signor G, Matthews B W. Substantial increase of protein stability by multiple disulphide bonds[J]. Nature, 1989, 342(6247): 291-293.
- [82] Kanaya S, Katsuda C, Kimura S, etc. Stabilization of *Escherichia coli* ribonuclease H by introduction of an artificial disulfide bond[J]. Journal of Biological Chemistry, 1991, 266(10): 6038-6044.
- [83] Zheng J, Yang T, Zhou J, etc. Elimination of a free cysteine by creation of a disulfide bond increases the activity and stability of *Candida boidinii* formate dehydrogenase[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017, 83(2): e02624-16.
- [84] 刘庆涛, 康振, 堵国成. 微生物酶法消除黄酒中氨基甲酸乙酯研究进展[J]. 生物工程学报, 2019, 35(04): 567-576.
- [85] 刘庆涛, 朱司宝, 王天文, 等. 降解氨基甲酸乙酯的酯酶挖掘及酶学性质表征[J]. 食品科学, 2025, 46(2): 99-107.
- [86] Wu Q, Zhang C, Zhu W, etc. Improved thermostability, acid tolerance as well as catalytic efficiency of *Streptomyces rameus* L2001 GH11 xylanase by N-terminal replacement[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2023, 162: 110143.
- [87] Huang X, Holden H M, Raushel F M. Channeling of substrates and intermediates in enzyme-catalyzed reactions[J]. Annual Review of Biochemistry, 2001, 70: 149-180.
- [88] Mohanan N, Wong C H, Budisa N, etc. Characterization of polymer degrading lipases, lip1 and lip2 from *Pseudomonas chlororaphis* PA23[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2022, 10: 854298.
- [89] Pravda L, Berka K, Svobodova Varekova R, etc. Anatomy of enzyme channels[J]. BMC Bioinformatics, 2014, 15(1): 379.

- [90] Sahu I, Glickman M H. Proteasome in action: substrate degradation by the 26S proteasome[J]. Biochemical Society Transactions, 2021, 49(2): 629-644.
- [91] Sanchez-Arroyo A, Plaza-Vinuesa L, Abeijon-Mukdsi M C, etc. A new and promiscuous alpha/beta hydrolase from *Acinetobacter tandoii* DSM 14970(T) inactivates the mycotoxin ochratoxin A[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2024, 108(1): 230.
- [92] Wang Q Y, Xie N Z, Du Q S, etc. Active hydrogen bond network (AHBN) and applications for improvement of thermal stability and pH-sensitivity of pullulanase from *Bacillus naganoensis*[J]. PLoS One, 2017, 12(1): e0169080.
- [93] Wang Z, Wang H, Feng T, etc. Simultaneous enhancement of the thermostability and catalytic activity of d-allulose 3-epimerase from *Clostridium bolteae* ATTC BAA-613 based on the "back to consensus mutations" hypothesis[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(16): 9297-9306.
- [94] Kim D, Noh M H, Park M, etc. Enzyme activity engineering based on sequence co-evolution analysis[J]. Metabolic Engineering, 2022, 74(2022): 49-60.
- [95] Zhao G, Wang J, Tang Q, etc. Improving the catalytic activity and thermostability of mas1 lipase by alanine substitution[J]. Molecular Biotechnology, 2018, 60(4): 319-328.
- [96] Tseng W C, Chen Y C, Chang H C, etc. Altering the substrate specificity of recombinant l-rhamnose isomerase from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* NTOU1 to favor d-allose production[J]. Journal of Biotechnology, 2022, 358: 9-16.
- [97] Liu Z, Fu X, Yuan M, etc. Surface charged amino acid-based strategy for rational engineering of kinetic stability and specific activity of enzymes: linking experiments with computational modeling[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 182: 228-236.
- [98] Zhang X, Li W, Pan L, etc. Improving the thermostability of alginate lyase FlAlyA with high expression by computer-aided rational design for industrial preparation of alginate oligosaccharides[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2022, 10: 1011273.

- [99] Fan G, Wu Q, Li Q, etc. Impact of the disulfide bond on hydrolytic characteristics of a xylanase from *Talaromyces thermophiles* F1208[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 164: 1748-1757.
- [100] Fang J, Pu H, Lu J, etc. Disentangling activity-stability trade-off in the catalytic degradation of malodorous sulfur-containing VOCs driven by active sites' self-dynamic evolution[J]. Journal of Hazardous materials, 2025, 486: 137035.
- [101] Zhu M, Zhai W, Song R, etc. Enhanced thermostability of *Geobacillus stearothermophilus* alpha-amylase by rational design of disulfide bond and application in corn starch liquefaction and bread quality improvement[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(48): 18928-18942.
- [102] Arai K, Okumura M, Lee Y H, etc. Diselenide-bond replacement of the external disulfide bond of insulin increases its oligomerization leading to sustained activity[J]. Communications Chemistry, 2023, 6(1): 258.
- [103] Cruz F M, Macias A, Moreno-Manuel A I, etc. Extracellular cysteine disulfide bond break at Cys122 disrupts PIP(2)-dependent Kir2.1 channel function and leads to arrhythmias in Andersen-Tawil Syndrome[J]. bioRxiv, 2023, 6(7): 544151.
- [104] Li G, Soo H S, Huang J, etc. Disulfide bond accelerated transesterification in poly(beta-hydrazide disulfide esters) toward fast network rearrangements[J]. Macromolecular Rapid Communications, 2023, 44(15): e2300133.
- [105] Sharma R, Hetzer M W. Disulfide bond in SUN2 regulates dynamic remodeling of LINC complexes at the nuclear envelope[J]. Life Sci Alliance, 2023, 6(8): e202302031.
- [106] Troussicot L, Vallet A, Molin M, etc. Disulfide-bond-induced structural frustration and dynamic disorder in a peroxiredoxin from MAS NMR[J]. Journal of the American Chemical Society, 2023, 145(19): 10700-10711.
- [107] Zhang L, Qiu Y, Zhang Y, etc. Decoding the formation and elimination mechanism of ethyl carbamate in strong-aroma baijiu[J]. Foods, 2024, 13(23): 3743.

攻读学位期间发表的学术论文目录

- [1] 《食品科学》，2024 年，第 46 卷第 2 期，99-107；
题目：降解氨基甲酸乙酯的酯酶挖掘及酶学性质表征；
作者：刘庆涛，朱司宝，王天文，李闯，钱森和，张温清，程凡，田淑芳；
本人第二作者，导师第一作者。
- [2] 发明专利，实审 2024 年 6 月，专利号 202410181367.1；
题目：一种可降解氨基甲酸乙酯的酯酶、表达载体、工程菌及其应用；
发明人：刘庆涛，朱司宝，钱森和，王天文，汪涵，杨浩，周阿成。
本人第二发明人，导师第一发明人。
- [3] 发明专利，受理 2025 年 3 月，申请号 202510311167.8；
题目：一种降解氨基甲酸乙酯的酯酶突变体及其应用；
发明人：刘庆涛，朱司宝，程凡，赵世光，刘艳，刘嘉仪，周仁杰，赵明，
刘勇军；
本人第二发明人，导师第一发明人。

致谢

论文在此收尾，人亦感慨良多，漫漫求学路在此也落下帷幕。回望读研三年历程，那些在实验室里艰难奋战的学习、在数据迷雾中摸索前行的焦灼、在课题进展时豁然开朗的欣喜，此刻皆化为心头沉甸甸的感激。时间在悄然中流逝，人也在挫折中不断成长；一路走来，幸得良师益友相伴，家人倾力支持，方能在科研长途中坚定前行。

首先谨以最诚挚的敬意感谢我的导师刘庆涛博士，感谢导师以渊博的学识为我指明研究方向，以严谨的治学态度带领我逐步走向科研的道路。从选题时的耐心引导，到实验受挫时的豁达鼓励，再到论文修改时逐字逐句的批注，您不仅是学术道路的引路人，更是人生品格的塑造者。让我受益良多的不只是踏进科研的大门，更在为人处事上您教会我的许多。

感谢各位师弟师妹在匆忙时帮助灭菌、有问题时互相探讨以及生活经验的分享，希望以后我们还会常联系、不忘记。感谢李闯老师、周健师姐与程一晗师兄在科研起始的引导与帮助，感谢三楼实验室的小伙伴的帮助，谢谢王雨晴、张贤、张秀山、于倩倩、方天志等同门的互相帮助与陪伴，希望大家都能赶赴星海。

在此向陪伴七年的好友张耀宇做出感谢，自从你我各自读研便见面甚少，但我们的并未因此而失去默契。失落时的安慰，开心时的分享，繁忙时的挂念，我们在交流中协同进步，在鼓励中共同成长。我的好朋友，世界上的另一个我，祝你博士的旅程一番风顺，早日在科研界有所斩获。其次谢谢好友郭玲、王宾，室友姜心豪、杨健平、张青强，同学孙佳成、张轩绮、韩红祥、龙振东、杨子成等的人的帮助。

最后，谨以此文献给我的父母。二十余载求学路，你们以沉重的双肩扛起我追逐科学的梦想。忘不了视频通话时你们反复说着“别担心钱，需要就买”的朴实言语，更忘不了回家看到母亲偷偷收起的止痛药和父亲弯下的脊梁。你们用半生辛劳为我铺垫求学路，今日论文终成，愿字里行间皆能化作对二老养育之恩的寸草心。