

DOI:10.12113/202011002

氨基甲酸乙酯水解酶的家族生物信息学分析

张 献, 彭 涛, 张 耀, 李若熙, 杨丽娟 *

(酿酒生物技术及应用四川省重点实验室(四川轻化工大学), 四川 宜宾 644000)

摘 要:氨基甲酸乙酯(Ethyl carbamate, EC)是酒精饮料生产过程中自然产生的副产物,具有潜在的致癌性和遗传毒性,成为影响人们健康的隐患。利用氨基甲酸乙酯水解酶(Urethane hydrolase, UH)消除酒精饮料中已存在的 EC 具有直接、高效的作用。为了进一步探索 EC 水解酶的功能与作用,本实验利用生物信息学的方法对已注释的 EC 水解酶进行其氨基酸序列的物理性质、亲疏水性、信号肽、跨膜结构域、蛋白质的二级、三级结构及功能域进行预测分析,并将 EC 水解酶蛋白进行多序列比对分析。结果表明,EC 水解酶基因编码 472~551 aa,分子量在 50~62 kD 之间,理论等电点(pI)在 5 左右,均为酸性亲水性蛋白,无跨膜区和信号肽。二级结构预测结果显示 EC 水解酶的氨基酸都以 α 螺旋以及无规则卷曲为主,螺旋与折叠排列有序。此外,使用同源建模的方法对 EC 水解酶进行模型的构建,预测结果质量评估均较好,并使用同源比对的方法,分析出 EC 水解酶高保守氨基酸残基。这些分析与预测为挖掘新的 EC 水解酶、进一步研究 EC 与 EC 水解酶结合位点以及对 EC 水解酶的改造提供了理论依据。

关键词:氨基甲酸乙酯;氨基甲酸乙酯水解酶;生物信息学;结构预测

中图分类号:Q55 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-5565(2022)01-064-11

Bioinformatics analysis of urethane hydrolase family

ZHANG Xian, PENG Tao, ZHANG Yao, LI Ruoxi, YANG Lijuan *

(Liquor Making Bio-Technology & Application of Key Laboratory of Sichuan Province (Sichuan University of Science & Engineering), Yibin 644000, Sichuan, China)

Abstract: Ethyl carbamate (EC) is a naturally produced by-product in the production of alcoholic beverages. It has potential carcinogenicity and genetic toxicity, and has become a hidden danger that affects people's health. The use of urethane hydrolase (UH) to eliminate the existing EC in alcoholic beverages has a direct and efficient effect. In order to further explore the function and role of EC hydrolase, the bioinformatics methods were adopted to analyze the physical and chemical properties hydrophilicity and hydrophobicity, signal peptide, transmembrane domain, protein secondary and tertiary structure, and functional domains of the of amino acid sequence annotated EC hydrolase, and the EC hydrolase protein was subjected to multiple sequence comparison analysis. Results show that the EC hydrolase gene encoded 472-551 aa, the molecular weight was between 50-62 kD, and the theoretical isoelectric point (pI) was about 5. They were all acidic hydrophilic proteins without transmembrane domain and signal peptide. The secondary structure prediction results show that the amino acids of EC hydrolase were mainly alpha helix and random coil, and the helix and fold were arranged in order. In addition, the method of homology modeling was used to construct a model of EC hydrolase, and the quality evaluation of the prediction results was good. The highly conserved amino acid residues of EC hydrolase were analyzed by homology comparison. These analyses and predictions provide theoretical basis for further research on the binding sites of EC and EC hydrolase and the modification of EC hydrolase.

Keywords: Ethyl carbamate; Urethane hydrolase; Bioinformatics; Structure prediction

收稿日期:2020-11-14;修回日期:2021-04-25.

基金项目:四川轻化工大学人才引进项目(No.E10402638).

作者简介:张献,男,硕士研究生,研究方向:食品工程.E-mail: zx15708286249@163.com.

* 通信作者:杨丽娟,女,副教授,研究方向:生物化学与分子生物学.E-mail: yanglijuan@suse.edu.cn.

氨基甲酸酯(Ethyl carbamate 或 Urethane,简称 EC),存在于多种发酵食品和酒精饮料中,是一种具有致癌性的物质^[1-2]。2007 年,EC 被国际癌症研究机构 IARC (the International Agency for Research on Cancer) 归类为 2A 类致癌物质^[3]。日本、加拿大等^[4-5]国家对酒精饮料中 EC 含量有着严格的限量标准。目前消除 EC 有多种方法,包括对发酵工艺的优化、物理吸附、代谢工程改造酵母以及生物酶法消除等,其中用生物酶法来消除 EC 被认为是最为理想的一种方法^[6]。关于消除 EC 的生物酶研究中,用于 EC 消除的酶有两种,一种是酸性脲酶(Acid urease);另外一种就是氨基甲酸酯水解酶(Urethane hydrolase 或 urethanase)。1990 年,Kobashi^[7]等日本学者从小鼠肠道中的 *Citrobacter sp.* 中第一次发现 EC 水解酶,证实它能够降解 EC。2006 年,Akutsu-ShigenoY^[8]等从马红球菌(*Rhodococcus equistrain* TB-60)中得到了 EC 水解酶,并实现了该酶的异源表达。李京京^[9]等从小鼠的胃中筛选出一株具有 EC 降解能力的赖氨酸芽孢杆菌 *Lysinibacillus fusiformis* SC02,并通过对其蛋白

质的 N 段测序,获得了该酶的氨基酸序列。EC 水解酶存在于多种微生物中,并且不同微生物的 EC 水解酶的酶学性质差异较大,普遍存在对乙醇和酸的耐受力差、对底物的亲和力低的问题^[8, 10]。2016 年,刘晓慧^[11]等人通过计算机辅助以及定向改造技术对来自于赖氨酸芽孢杆菌 *Lysinibacillus fusiformis* SC02 的 EC 水解酶进行改造,提高了该酶的温度稳定性,但其对乙醇的耐受力并未有所提升。此外,EC 水解酶的氨基酸序列未得到有效解析。2019 年,Masaki^[12]等日本学者在假丝酵母 *Candida parapsilosis* 得到了 EC 水解酶,并获得了该酶的基因序列。目前,已报道的 EC 水解酶均属于酰胺酶家族,从 EC 分子的结构上来看,酯酶家族部分酶也能够对其进行水解,但是还未见有酯酶降解 EC 的报道^[6](见图 1)。EC 水解酶存在的这些问题限制了 EC 水解酶的发展与应用。若采用基因工程以及蛋白质工程的手段,对 EC 水解酶进行分析优化等研究,解决其存在的问题,可进一步推进 EC 水解酶在食品中的应用。

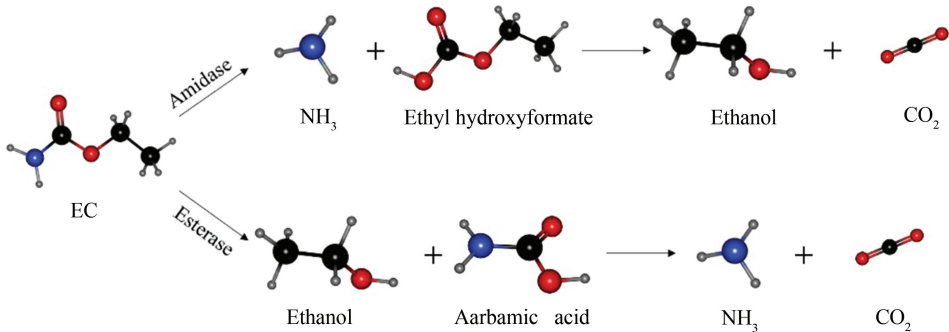


图 1 氨基甲酸酯水解机制^[6]

Fig.1 Hydrolysis mechanism of urethane^[6]

本研究采用生物信息学的方法对 EC 水解酶进行分析,结合 ProtParam、ProtScale、SignalP 5.0 Server、NetPhos 2.0 Server 等生物信息学软件,对微生物的 EC 水解酶氨基酸序列分别进行理化性质、序列分子进化、亲水或疏水性、二级结构、功能域、信号肽以及蛋白的磷酸化等方面进行分析和预测,为下一步 EC 水解酶的酶分子改造、基因工程菌的构建、表达等奠定基础。

1 材料与方法

1.1 数据来源

试验中的 EC 水解酶(UH)序列均来自美国国

家生物信息中心(NCBI)(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中已收录的完整的氨基酸序列,分别来自于马红球菌、赖氨酸芽孢杆菌以及假丝酵母(见表 1)。

表 1 氨基酸序列基本信息

Table 1 Basic information of amino acid sequence			
微生物名称	酶名称	氨基酸登录号	GanBank
马红球菌	UH	-	DD320008.1
赖氨酸芽孢杆菌	UH	ANG60415.1	KU353448.1
假丝酵母	UH	BBP47208.1	LC511748.1

注:“-”表示未查到,马红球菌的氨基酸序列经过基因翻译工具获得。

1.2 方法

采用 Expasy 网站提供的 ProtParam 工具对 EC

水解酶的氨基酸序列进行理化性质分析;亲疏水性特征使用 Expasy 网站的 ProtScale 工具进行分析;使用在线工具 NPSA server 中的 SOPMA 进行微 EC 水解酶的氨基酸序列二级结构分析和预测^[13];使用 CDD 和 SMART^[14] 对 EC 水解酶保守结构的分析;EC 水解酶信号肽的分析和预测采用工具 SignalP 5.0 server;运用 TMHMM 2.0 Server 进行 EC 水解酶的跨膜结构域的分析和预测;NetPhosK 3.1 Server 进行 EC 水解酶的氨基酸序列磷酸化位点分析;使用 SWISS-MODEL^[15] 和 I-TASSER 对 EC 水解酶进行 3D 建模,以及使用 SAVES^[16] 对模型进行评价。利用 Clustal Omega^[17] 进行氨基酸的多序列比对分析,并用 ESPript3.0 进行序列对比的结果显示。在线分析工具网址(见表 2)。

表 2 生物学在线分析工具网址

Table 2 Websites of online biology analysis tools	
工具	网址
ProtParam	http://web.expasy.org/protparam/
ProtScale	http://web.expasy.org/protscale/
SOPMA	https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html
CDD	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/
SMART	http://smart.embl-heidelberg.de/
SignalP 5.0 server	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
TMHMM 2.0 Server	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/
NetPhosK 3.1 Server	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/
SWISS-MODEL	https://swissmodel.expasy.org/
I-TASSER	https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/
SAVES	https://servicesn.mbi.ucla.edu/SAVES
Clustal Omega	https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/
ESPrpt3.0	http://esprpt.ibcp.fr/ESPrpt/cgi-bin/ESPrpt.cgi

2 结果与分析

2.1 EC 水解酶蛋白序列理化性质分析

使用 ProtParam 工具分析 3 条完整的 EC 水解酶蛋白序列(见表 3)。结果显示,目前在 NCBI 上所能检索到的 EC 水解酶氨基酸序列中,氨基酸数量在 472–551 之间,氨基酸数量最大的是假丝酵母,为 551 aa,分子量为 61.74 kDa 左右。理论等电点(pI)范围在 5.03~5.71 之间,最大的为 *Candida parapsilosis*。三个蛋白的负电荷氨基酸残基总数(Asp + Glu)都大于

正电荷氨基酸残基总数(Arg + Lys)。同时对三个 EC 水解酶的氨基酸残基组成也进行了分析(见表 4)。发现 3 个 EC 水解酶蛋白共有的且含量丰富的主要氨基酸为丙氨酸(Ala)、甘氨酸(Gly)、亮氨酸(Leu)。在蛋白质稳定性方面,*Rhodococcus equistrain* TB-60 的 EC 水解酶不稳定指数为 34.70,显示为较稳定蛋白,其余两种蛋白为不稳定蛋白。此外,脂肪系数的结果显示,3 个蛋白均表现为亲水性。

表 3 EC 水解酶的氨基酸序列理化性质

Table 3 Physicochemical properties of amino acid sequence of urethane hydrolase			
来源	<i>Rhodococcus equistrain</i> TB-60	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> SC02	<i>Candida parapsilosis</i>
基总数/aa	472	472	551
分子量/kDa	50.70	51.48	61.74
pI	5.03	5.39	5.71
Asp + Glu	58	58	67
Arg + Lys	38	45	60
不稳定系数	34.70	40.70	40.20
脂肪系数	83.35	94.85	87.97
总平均亲水系数	-0.213	-0.146	-0.256

表 4 EC 水解酶家族成员氨基酸组成成分分析

Table 4 Analysis of amino acid composition of members of urethane hydrolase family				%
Composition of amino acid	<i>Rhodococcus equistrain</i> TB-60	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> SC02	<i>Candida parapsilosis</i>	
Ala (A)	11.4	8.9	7.4	
Arg (R)	6.1	3.4	3.8	
Asn (N)	3.8	4.7	5.1	
Asp (D)	7.2	6.4	6.0	
Cys (C)	0.6	0.8	1.5	
Gln (Q)	2.5	3.8	2.9	
Glu (E)	5.1	5.9	6.2	
Gly (G)	10.8	7.8	6.2	
His (H)	2.8	2.3	1.3	
Ile (I)	3.8	7.4	4.7	
Leu (L)	9.1	9.1	11.1	
Lys (K)	1.9	6.1	7.1	
Met (M)	2.5	1.5	1.6	
Phe (F)	2.3	3.6	4.2	
Pro (P)	7.0	5.5	6.0	
Ser (S)	4.9	6.8	6.5	
Thr (T)	5.7	4.4	5.6	
Trp (W)	2.8	0.8	1.6	
Tyr (Y)	2.1	3.2	4.7	
Val (V)	7.4	7.4	6.5	

2.2 EC 水解酶氨基酸序列的亲水性/疏水性

经过 ProtScale 对 EC 水解酶氨基酸序列进行亲水性/疏水性预测。Hphob. /Kyte & Doolittle 量表规定疏水性越强的氨基酸标度值越高,当蛋白质的氨基酸标度值大于 0 时为疏水,小于 0 时为亲水。

在亲疏性分析中,马红球菌 *Rhodococcus equistrain* TB-60 的多肽链中 465 位 Trp 的值为 -2.156,亲水性最强,第 283 位 Cys 的值为 2.089,疏水性最强(见图 2a);赖氨酸芽孢杆菌 *Lysinibacillus fusiformis* SC02 的多肽链中第 463 位 Asn 的值是 -3.344,是最低分,亲水性最强,第 229 位 Leu 值是 1.978,为最高分,疏水性最强(见图 2b);假丝酵母 *Candida parapsilosis* 的多肽链中第 324 位 Pro 的值为 -3.244,亲水性最强,第 453 位 Val 的值为 2.156,疏水性最强(见图 2c);且在亲疏水性分析中三种微生物的 EC 水解酶都属于亲水性蛋白。

2.3 EC 水解酶的信号肽及跨膜区预测

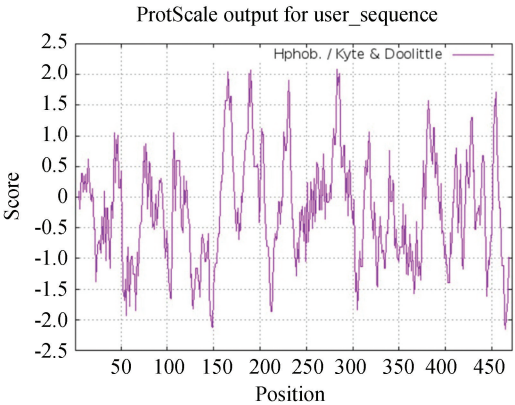
利用 SignalP 5.0 server 对三株菌的 EC 水解酶的氨基酸序列进行信号肽分析,都表示 EC 水解酶的氨基酸序列不含有信号肽(见图 3)。

利用在线工具 TMHMM 2.0 Server 对三株菌的 EC 水解酶的跨膜区进行分析及预测,3 株菌的 EC 水解酶在膜内的概率为 0,在膜外的概率为 100%(见图 4),说明 EC 水解酶不存在跨膜结构域。

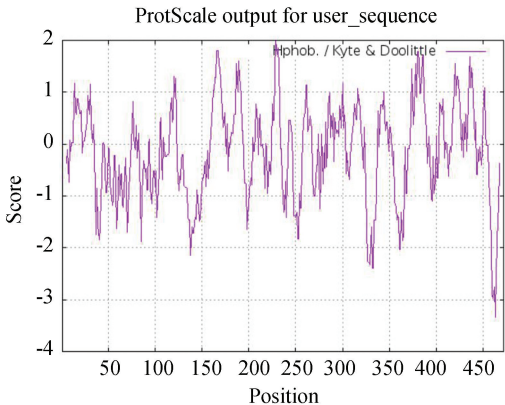
2.4 EC 水解酶的磷酸化位点预测

磷酸化作为蛋白质翻译后的修饰之一,在细胞的信号转导中起着重要的作用^[18]。蛋白质的磷酸化主要集中在肽链中具有游离羟基的酪氨酸、丝氨酸、苏氨酸残基上,这些残基本身不带电荷,当磷酸化作用后,便具有了电荷,从而使结构发生变化,进一步引起蛋白质活性的变化。通过在线软件 NetPhosK 3.1 Server 对 EC 水解酶的氨基酸序列进行预测。EC 水解酶氨基酸序列磷酸化位点(见表 5)。*Rhodococcus equistrain* TB-60 的 EC 水解酶中含有 15 个丝氨酸位点、10 个苏氨酸位点、6 个酪氨酸位点;*Lysinibacillus fusiformis* SC02 的 EC 水解酶中含有 23 个丝氨酸位点、11 个苏氨酸位点、7 个酪氨酸位点;*Candida parapsilosis* 的 EC 水解酶中

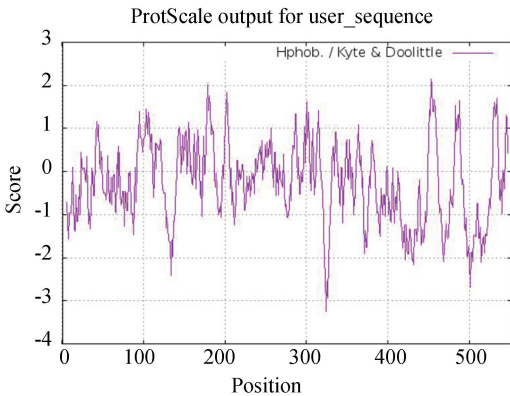
含有 30 个丝氨酸位点、16 个苏氨酸位点、12 个酪氨酸位点。



(a) *Rhodococcus equistrain* TB-60 EC水解酶的亲/疏水性分析



(b) *Lysinibacillus fusiformis* SC02 EC水解酶的亲/疏水性分析

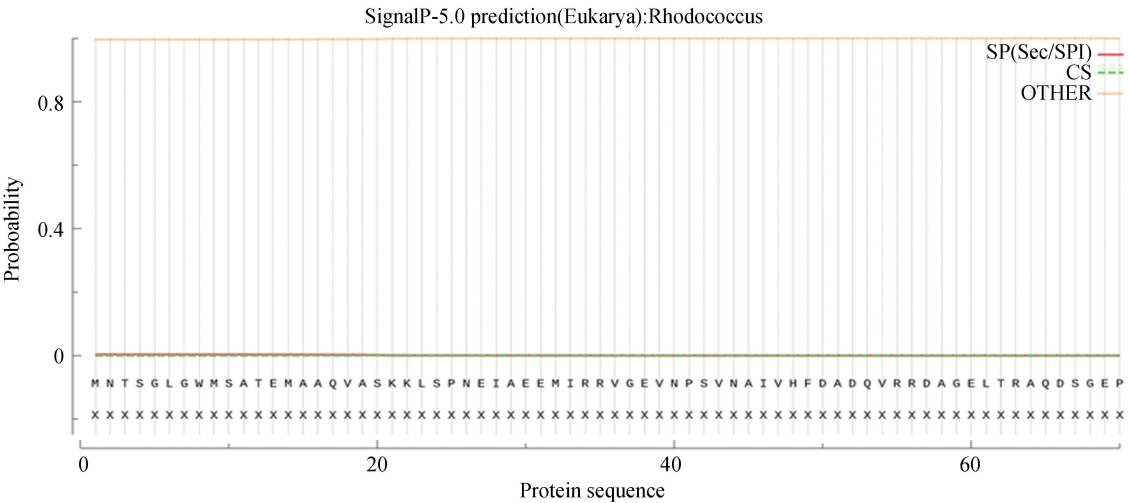


(c) *Candida parapsilosis* EC水解酶的亲/疏水性分析

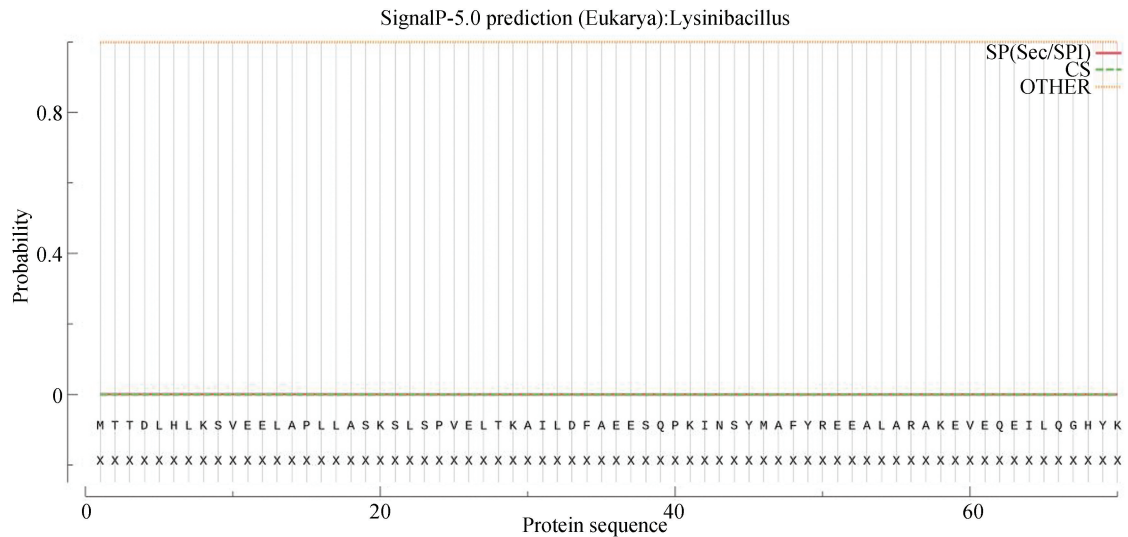
图 2 EC 水解酶的亲/疏水性分析
Fig.2 Hydrophilicity/hydrophobicity analysis of urethane hydrolase

表 5 EC 水解酶氨基酸序列磷酸化位点统计
Table 5 Statistics of phosphorylation sites of amino acid sequence of urethane hydrolase

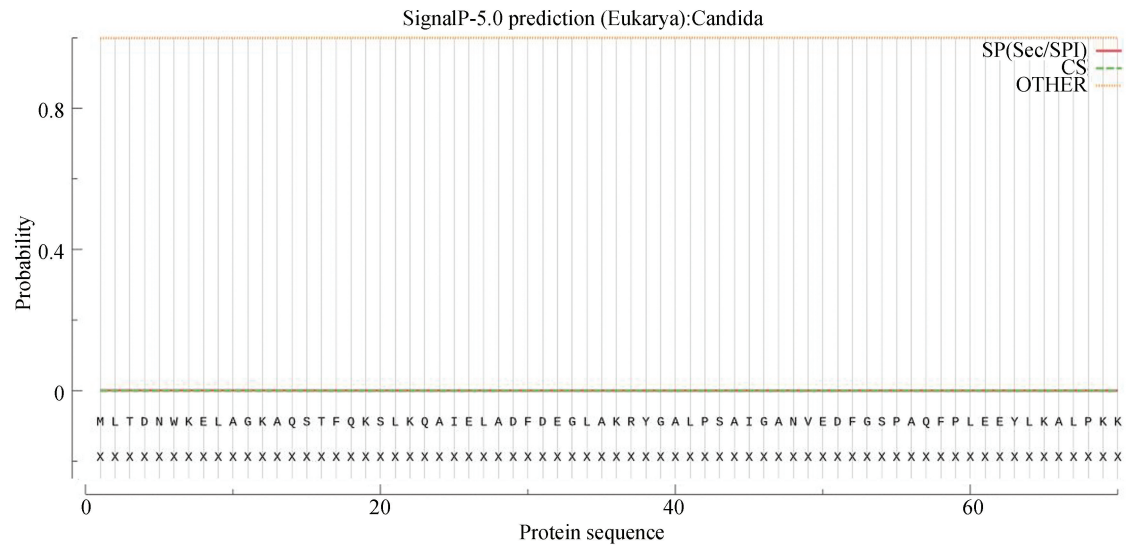
微生物种类	磷酸化位点个数		
	丝氨酸	苏氨酸	酪氨酸
<i>Rhodococcus equistrain</i> TB-60	15	10	6
<i>Lysinibacillus fusiformis</i> SC02	23	11	7
<i>Candida parapsilosis</i>	30	16	12



(a)*Rhodococcus equistrain* TB-60 EC水解酶信号肽预测



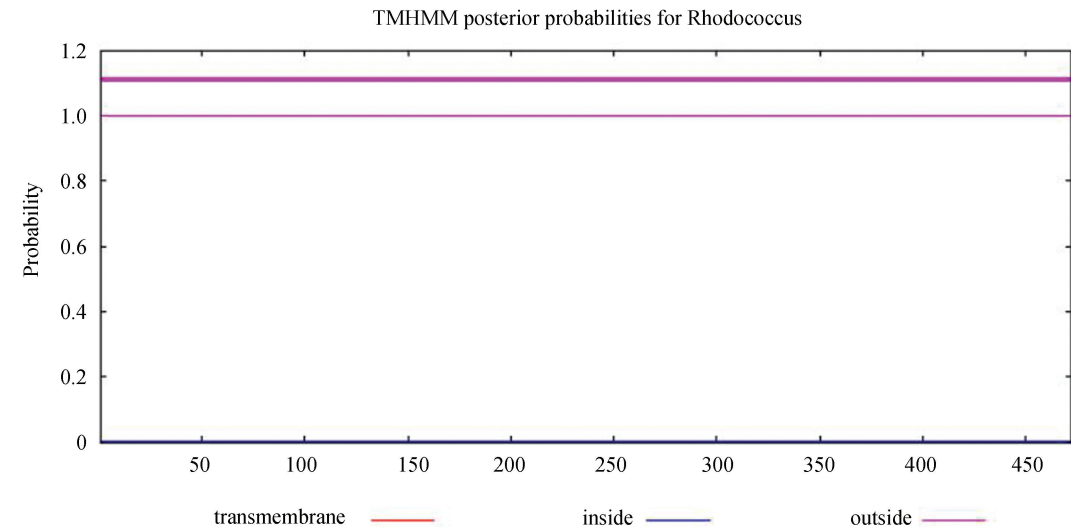
(b) *Lysinibacillus fusiformis* SC02 EC水解酶信号肽预测



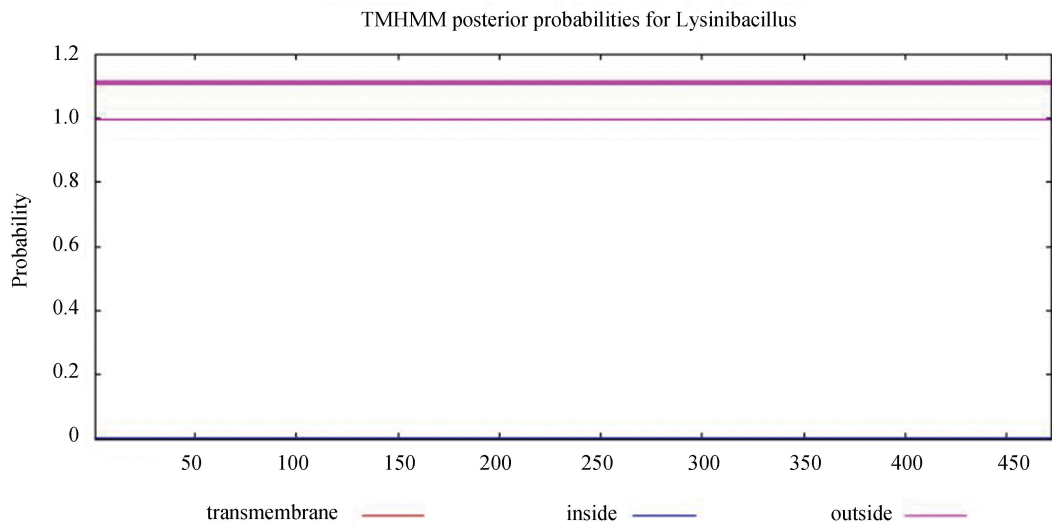
(c)*Candida parapsilosis* EC水解酶信号肽预测

图 3 EC 水解酶信号肽预测

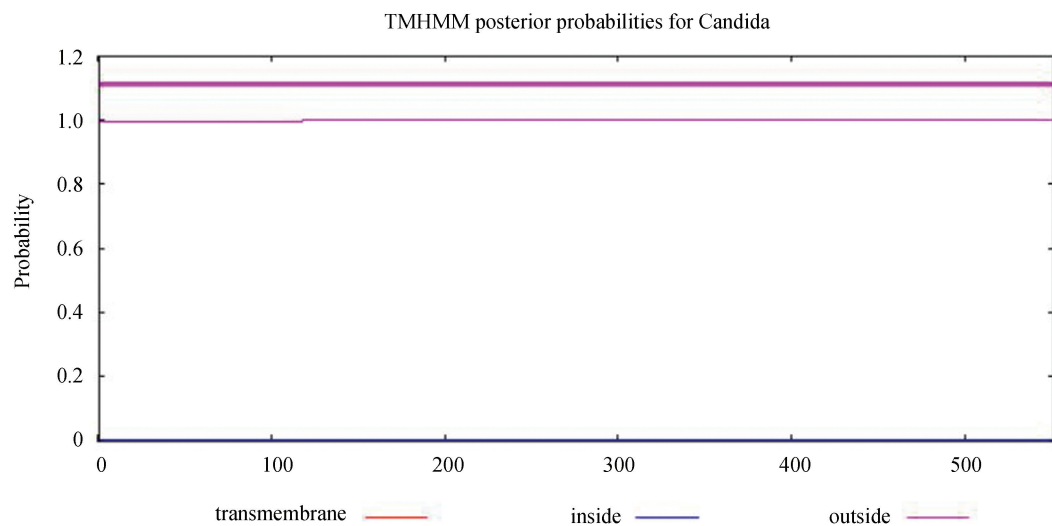
Fig.3 Signal peptide prediction of urethane hydrolase



(a) *Rhodococcus equistrain* TB-60 EC水解酶跨膜结构域预测



(b) *Lysinibacillus fusiformis* SC02 EC水解酶跨膜结构域预测



(c) *Candida parapsilosis* EC水解酶跨膜结构域预测

图 4 EC 水解酶跨膜结构域预测

Fig.4 Prediction of transmembrane domain of urethane hydrolase

2.5 二级结构分析

蛋白的二级结构一般由 α -螺旋、 β -链、 β -转角和无规则卷曲等结构原件组成^[19]。通过 SOPMA 在线工具对 3 株菌的 EC 水解酶的二级结构进行预测,结果(见图 5)。*Rhodococcus equistrain* TB-60 的 EC 水解酶中 α -螺旋占 41.53%,延伸链占 7.63%, β -转角

占 3.39%,无规则卷曲占 47.46%;*Lysinibacillus fusiformis* SC02 的 EC 水解酶中 α -螺旋占 48.09%,延伸链占 10.59%, β -转角占 3.6%,无规则卷曲占 37.71%;*Candida parapsilosis* 的 EC 水解酶中 α -螺旋占 39.34%,延伸链占 11.07%, β -转角占 3.45%,无规则卷曲占 46.10%。

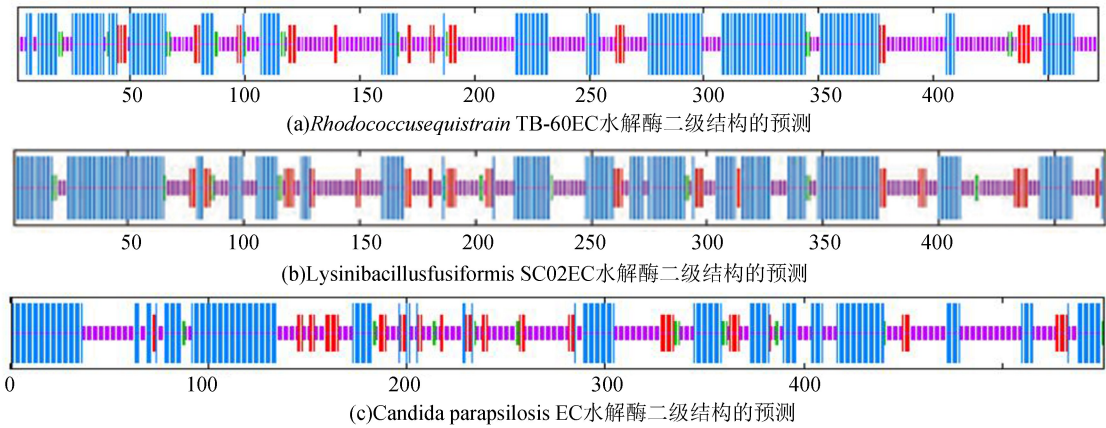


图 5 EC 水解酶二级结构的预测

Fig.5 Prediction of secondary structure of urethane hydrolase

注:蓝色代表 α -螺旋;绿色代表 β -转角;红色代表延伸链;紫色代表无规则卷曲。

2.6 保守结构域分析

通过 CDD 和 SMART 对 EC 水解酶的保守结构

域分析得出,来自于三种不同菌的 EC 水解酶都含有与酰胺酶家族相同的 Amidase 结构域(见图 6)。

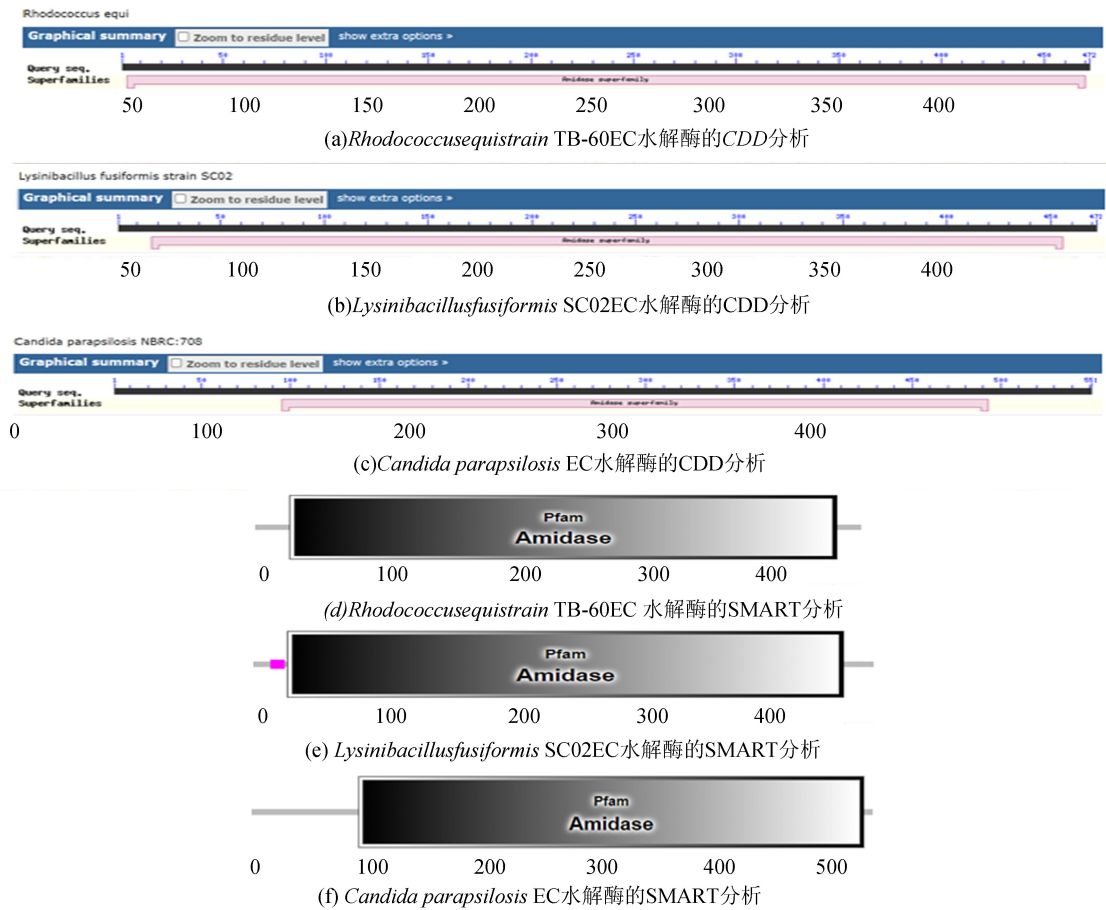


图 6 EC 水解酶结构域分析

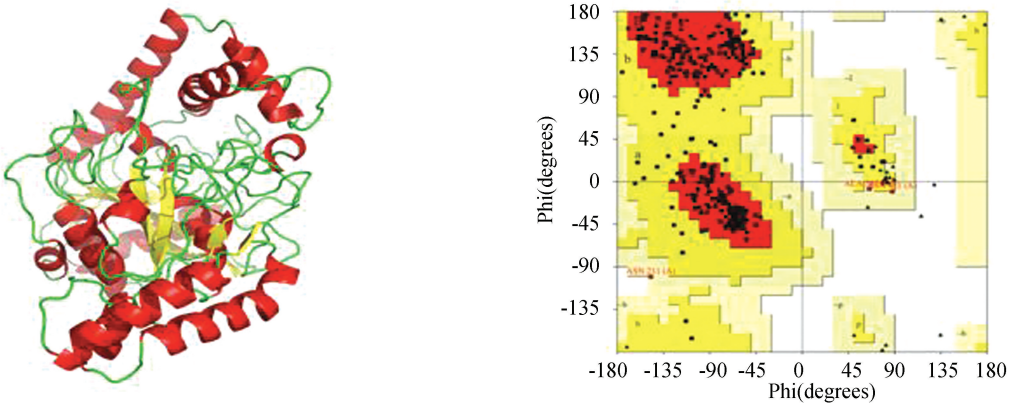
Fig.6 Urethane hydrolase domain analysis

2.7 蛋白质三级结构的预测与评价

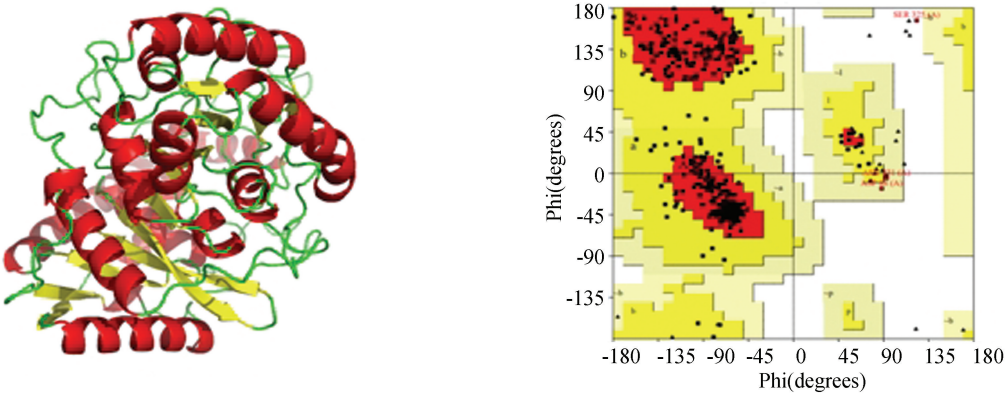
2.7.1 蛋白质三级结构

在 NCBI 上检索到的完整的 EC 水解酶的氨基酸序列有 3 条。利用 NCBI 上的 blastp 功能在蛋白质 PDB 数据库中分别获得与现存的 EC 水解酶序列相似度最高的氨基酸序列。*Rhodococcus equistrain* TB-60 的 EC 水解酶氨基酸序列与 *Bacterium* CSBL00001 的芳基酰基酰胺酶 (PDB:4YJ1_A) 同源性最高,为 33.81%。*Lysinibacillus fusiformis* SC02 的 EC 水解酶氨基酸序列与 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 的谷氨酰胺基转移酶 A 亚基 (PDB:4WJ3_A)

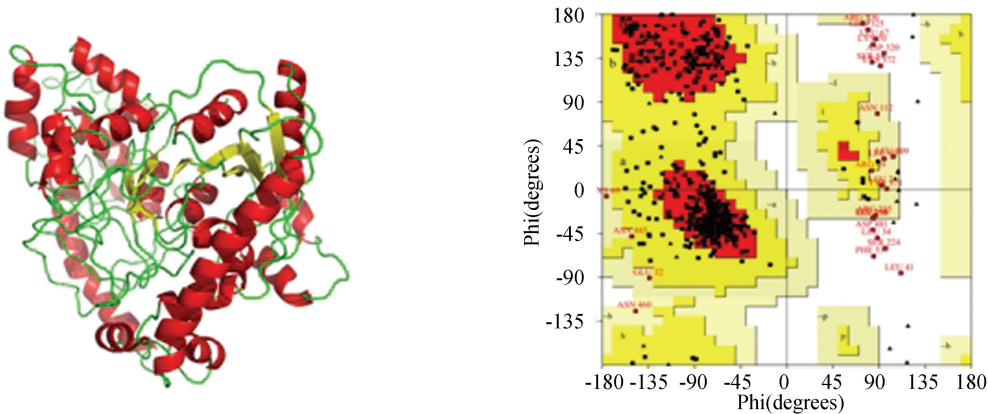
同源性最高,为 39.47%。*Candida parapsilosis* 的 EC 水解酶氨基酸序列与 *Rattus norvegicus* 的脂肪酰基酰胺水解酶 (PDB: 1MT5_A) 同源性最高,为 27.98%。由于使用 SWISS-MODEL 进行建模时,同源序列要大于 30%,故对 *Candida parapsilosis* 的 EC 水解酶进行建模时,使用 I-TASSER。预测得到的三维结构中 (见图 7a、7b、7c), α -螺旋用红色表示, β -折叠用黄色表示,绿色为无规则卷曲,总体来看,EC 水解酶的三维结构均以 α -螺旋以及无规则卷曲为主,这预测结果与二级结构预测相对应。



(a)*Rhodococcus equistrain* TB-60EC水解酶的三维结构模型 (左) 及拉氏构象图 (右)



(b)*Lysinibacillus fusiformis* SC02EC水解酶的三维结构模型 (左) 及拉氏构象图 (右)



(c) *Candida parapsilosis* EC水解酶的三维结构模型 (左) 及拉氏构象图 (右)

图 7 EC 水解酶三维结构模型与拉氏构象图

Fig.7 Three-dimensional structure model and Ramachandran plot of urethane hydrolase

2.7.2 蛋白质三维模型的评价

使用在线软件 SAVES 中的 Verify_3D 以及拉氏构象图对模型进行评价。*Rhodococcus equistrain* TB-60 的 EC 水解酶的 Verify_3D 评分为 87.80%; *Lysinibacillus fusiformis* SC02 的 EC 水解酶的 Verify_3D 评分为 89.44%; *Candida parapsilosis* 的 EC 水解酶的 Verify_3D 评分为 84.39%。

拉氏构象图简称拉氏图 (Ramachandran Plot), 其作用是体现出氨基酸残基在拉氏图中的区域分布。拉氏构象图分为四个区, 红色区域是最合适区域, 该区域内氨基酸数目越多, 则表示该蛋白模型的骨架结构越合理; 黄色区域是允许区域; 浅黄色区域是最大允许区; 而白色区域是不允许区, 该区域氨基酸的构象是不合理的。从图 7a、7b、7c 可知使用 SWISS-MODEL 以及 I-TASSER 所建的 EC 水解酶模

型, 处于允许区的氨基酸残基都大于 90%, 并且不允许区都小于 5%。

2.8 蛋白质多序列比对分析

利用在线软件 Clustal Omega 中的多序列比对功能对 3 个 EC 水解酶与 *Bacterium* CSBL00001 的芳基酰基酰胺酶的氨基酸序列进行比对 (见图 8)。三个 EC 水解酶的序列相似度为 29.17%。来自于真菌 *Candida parapsilosis* 的 EC 水解酶氨基酸序列与两个来源于细菌的相似度较低, 与 *Rhodococcus equistrain* TB-60 序列相似度为 14.49%, 与 *Lysinibacillus fusiformis* SC02 序列相似度为 15.22%, 而来源于细菌的两菌株氨基酸序列相似度为 31.3%。从图中可见位于 160 位左右的氨基酸残基保守性较强, 特别是 GGSSGG, 这些氨基酸残基在酰胺酶进化过程中具有较强的保守性。

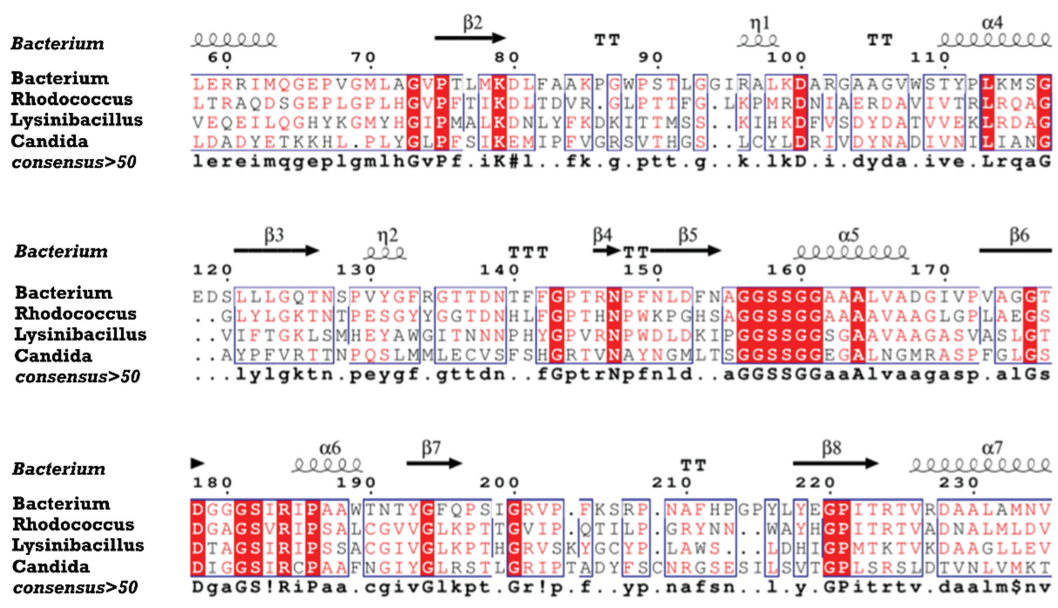


图 8 EC 水解酶的多序列比对结果

Fig.8 Results of multiple sequence alignment of urethane hydrolase

3 讨论

EC 作为 2A 类致癌物质, 广泛存在于酒精饮料等发酵食品中。应用微生物酶法去消除 EC 具有直接、高效的特点。EC 水解酶有三个完整的氨基酸序列得以鉴定, 且所发现的 EC 水解酶在酸性或者乙醇存在条件下不稳定, 不能在酒精饮料中得到广泛的应用。如果能利用分子生物学的手段对 EC 水解酶进行改造, 使其能被应用于食品生产过程中, 降低食品中 EC 的浓度, 具有重要意义。

生物信息学作为一门交叉学科, 利用数学、计算

机科学、生命科学技术理论和工具, 在生物科学领域的信息获取、加工、储存、分析等方面发挥着重要的作用。本研究利用生物信息学相关方法, 在 NCBI 中查找到三条完整编码 EC 水解酶的基因序列, 对其编码的氨基酸序列组成、基本理化性质进行分析, 通过软件预测蛋白的亲疏水性、信号肽、跨膜域, 更进一步预测了蛋白的二级以及三维结构。结果表明, 三个蛋白序列都具有与酰胺酶家族相同的 Amidase 保守结构域, 证明了目前已公布的 EC 水解酶都是酰胺酶, 与刘庆涛所说的一致^[6]。使用计算机进行分析蛋白质的稳定性时, 蛋白质的不稳定系数是一个重要的表征。不稳定指数是对蛋白质在实

验中的稳定性评估,当蛋白质的不稳定系数大于 40 时,推测该蛋白质为不稳定蛋白,当小于 40 时为稳定蛋白^[20]。氨基酸序列理化性质分析表明,除 *Rhodococcus equistrain* TB-60 的 EC 水解酶为较稳定蛋白,其余两种蛋白均表现为不稳定蛋白。在蛋白质中,氨基酸之间的亲/疏水性相互作用是形成其三级结构最重要作用力之一,亲疏水作用可以驱使蛋白质进行折叠,有利于蛋白质三级结构的稳定。亲疏水性预测结果显示,三个 EC 水解酶蛋白均属于亲水性蛋白。对蛋白的信号肽以及跨膜域分析表明,三株菌的 EC 水解酶都不含有跨膜域以及信号肽。蛋白质二级结构预测发现,EC 水解酶都以 α -螺旋、无规则卷曲为主。蛋白质空间结构预测,对其结构与功能的研究具有较为重要意义^[21]。本研究通过同源建模的方式得到了 EC 水解酶的三维结构,除对 *Candida parapsilosis* 的 EC 水解酶进行建模时,使用 I-TASSER,其余两种均使用 SWISS-MODEL 进行建模。三维结构模型的合理性通过 Verify_3D 以及 Ramachandran Plot 进行验证。Verify_3D 用于评估模型的三维结构与氨基酸一级序列结构的相容性,检测氨基酸侧链构象的合理性,SAVES 获得的评分 $\geq 80\%$,表明侧链构象合理^[22]。三个蛋白的三维结构的 Verify_3D 评分都大于 80%,说明侧链构象合理。在 Ramachandran Plot 中,模型评价要求处于允许区的氨基酸大于 90%,如果二面角中有高于 90%的都位于一般允许区,则可表明其空间结构具有一定的稳定性^[23-24]。三个蛋白质三维结构模型中处于允许区的氨基酸均大于 90%,表明模型中所有氨基酸均形成了一个合理的二面角稳定构型。

4 结 论

- 1) EC 水解酶基因编码 472~551 aa,分子量在 50~62 kD 之间,理论等电点(pI)在 5 左右,均为酸性亲水性蛋白;
- 2) 目前 EC 水解酶无跨膜区和信号肽;
- 3) 二级结构预测结果显示 EC 水解酶的氨基酸都以 α 螺旋以及无规则卷曲为主,螺旋与折叠排列有序;
- 4) 目前发现的 EC 水解酶均属于酰胺酶家族;
- 5) 对 EC 水解酶进行三维模型的构建,预测结果质量评估均较好,并使用同源比对的方法,分析出 EC 水解酶高保守氨基酸残基。利用生物信息学相关软件对 EC 水解酶蛋白进行预测和分析,为挖掘新的 EC 水解酶、进一步研究 EC 与 EC 水解酶结合位点以及对 EC 水解酶的改造提供了理论依据。

参考文献(References)

- [1] FORKERT P G. Mechanisms of lung tumorigenesis by ethyl carbamate and vinyl carbamate [J]. Drug Metabolism Reviews, 2010, 42 (2): 355 - 378. DOI: 10.3109/03602531003611915.
- [2] ZHAO X R, DU G C, ZOU H J, et al. Progress in preventing the accumulation of ethyl carbamate in alcoholic beverages[J]. Trends in Food Science & Technology, 2013, 32 (2): 97-107. DOI: 10.1016/j.tifs.2013.05.009.
- [3] LACHENMEIER D W. Consequences of IARC re-evaluation of alcoholic beverage consumption and ethyl carbamate on food control[J]. Deutsche Lebensmittel Rundschau Zeitschrift Für Lebensmittelkunde Und Lebensmittelrecht, 2007, 103(7): 307-311. DOI: 10.5281/zenodo.3463116.
- [4] GOWD V, SU H, KARLOVSKY P, et al. Ethyl carbamate: An emerging food and environmental toxicant[J]. Food Chemistry, 2018, 248: 312 - 321. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.12.072.
- [5] WEBER J V, SHARYPOV V I. Ethyl carbamate in foods and beverages: a review[J]. Environmental Chemistry Letters, 2009, 7(3): 233-247. DOI: 10.1007/s10311-008-0168-8.
- [6] 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(4): 567-576. DOI: 10.13345/j.cjb.180386.
LIU Qingtao, KANG Zhen, DU Guocheng. Advances in microbial enzymatic elimination of ethyl carbamate in Chinese rice wine[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2019, 35(4): 567-576. DOI: 10.13345/j.cjb.180386.
- [7] KOBASHI K, TAKEBE S, SAKAI T. Urethane-hydrolyzing enzyme from *Citrobacter* sp.[J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 1990, 38(5): 1326 - 1328. DOI: 10.1248/cpb.38.1326.
- [8] AKUTSU-SHIGENO Y, ADACHI Y, YAMADA C, et al. Isolation of a bacterium that degrades urethane compounds and characterization of its urethane hydrolase [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 70(4): 422-429. DOI: 10.1007/s00253-005-0071-1.
- [9] 李京京, 方芳, 张继冉, 等. 氨基甲酸乙酯水解酶的分
离纯化及酶学性质[J]. 食品与生物技术学报, 2014, 33
(12): 1239-1245. DOI: 10.13345/j.cjb.130277.
LI Jingjing, FANG Fang, ZHANG Jiran, et al. Purification and characterization of an urethanase[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2014, 33(12): 1239 - 1245. DOI: 10.13345/j.cjb.130277.
- [10] ZHOU N D, GU X L, TIAN Y P. Isolation and characterization of urethanase from *Penicillium variable* and its application to reduce ethyl carbamate contamination in Chinese rice wine[J]. Applied Biochemistry and Biotechnolo-

- gy, 2013, 170(3): 718–728. DOI: 10.1007/s12010-013-0178-2.
- [11] 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酯水解酶稳定性[J]. 生物工程学报, 2016, 32(9): 1233–1242. DOI: 10.13345/j.cjb.150527.
- LIU Xiaohui, FANG Fang, XIA Xiaole, et al. Site-directed mutagenesis to improve the stability of urethane hydrolase in Spindle-shaped *Bacillus lysine*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2016, 32(9): 1233–1242. DOI: 10.13345/j.cjb.150527.
- [12] MASAKI K, MIZUKURE T, KAKIZONO D, et al. New urethanase from the yeast *Candida parapsilosis*[J]. Journal of Bioence and Bioengineering, 2020, 130(2): 115–120. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2020.03.005.
- [13] ANGAMUTHU K, PIRAMANAYAGAM S. Evaluation of *in silico* protein secondary structure prediction methods by employing statistical techniques[J]. Biomedical and Biotechnology Research Journal, 2017, 1(1): 29–36. DOI: 10.4103/bbrj.bbrj_28_17.
- [14] SCHULTZ J, MILPETZ F, BORK P, et al. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains[J]. Canadian Metallurgical Quarterly, 1998, 95(11): 5857–5864. DOI: 10.1186/gb-2000-1-1-reports234.
- [15] ARNOLD K, BORDOLI L, KOPP J, et al. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling[J]. Bioinformatics, 2006, 22(2): 195–201. DOI: 10.1093/bioinformatics/bti770.
- [16] LASKOWSKI R A, RULLMANN J A, MACARTHUR M W, et al. AQUA and PROCHECK-NMR: Programs for checking the quality of protein structures solved by NMR[J]. Journal of Biomolecular NMR, 1996, 8(4): 477–486. DOI: 10.1007/BF00228148.
- [17] MADEIRA F, PARK Y M, LEE J, et al. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019[J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47(1): 636–641. DOI: 10.1093/nar/gkz268.
- [18] 杨莉莉, 李辉, 张慧. 鸡 RB1 基因的结构与功能分析[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017, (5): 16–19. DOI: 10.13881/j.cnki.hljxmsy.2017.0758.
- YANG Lili, LI Hui, ZHANG Hui. Analysis of the structure and function of the RB1 gene in chicken[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2017, (5): 16–19. DOI: 10.13881/j.cnki.hljxmsy.2017.0758.
- [19] 孟翔燕, 孟军, 葛家麒. 蛋白质二级结构预测方法的评价[J]. 生物信息学, 2010, 8(3): 206–209. DOI: 10.3969/j.issn.1672-5565.2010.03.006.
- MENG Xiangyan, MENG Jun, GE Jiaqi. A method for assessing methods for protein secondary structure prediction[J]. China Journal of Bioinformatics, 2010, 8(3): 206–209. DOI: 10.3969/j.issn.1672-5565.2010.03.006.
- [20] 李晓曼, 乳清蛋白的肽谱和蛋白质组研究[D]. 哈尔滨市: 哈尔滨工业大学, 2018. DOI: CNKI:CDMD;2.1018.893243.
- LI Xiaoman, The peptide profile and proteomics of whey protein[D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2018. DOI: CNKI:CDMD;2.1018.893243.
- [21] BENKERT P, BIASINI M, SCHWEDE T, et al. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models[J]. Bioinformatics, 2011, 27(3): 343–350. DOI: 10.1093/bioinformatics/btq662.
- [22] 王东东, 幽门螺杆菌 GyrB 的同源建模和分子对接研究[D]. 沈阳: 沈阳化工大学, 2018. DOI: CNKI:CDMD;2.1019.803584.
- WANG Dongdong. Homologous modeling and molecular docking of helicobacter pylori gyrB protein[D]. Shenyang: Shenyang University of Chemical Technology, 2018. DOI: CNKI:CDMD;2.1019.803584.
- [23] 谢勇, 洪晓昆, 鄢仁祥, 等. 重组琼胶酶 rAgaN3 基因的生物信息学分析[J]. 生物信息学, 2017, 15(1): 16–26. DOI: 10.3969/j.issn.1672-5565.2017.01.201608003.
- XIE Yong, HONG Xiaokun, YAN Renxiang, et al. Bioinformatics analysis of the recombinant rAgaN3 gene of agarase[J]. Chinese Journal of Bioinformatics, 2017, 15(1): 16–26. DOI: 10.3969/j.issn.1672-5565.2017.01.201608003.
- [24] 张一茜, 李卿, 张磊, 等. 西红花 MADS-box 基因家族的生物信息学分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 38(7): 3140–3154. DOI: 10.13417/j.gab.038.003140.
- ZHANG Yihan, LI Qing, ZHANG Lei, et al. Bioinformatics Analysis of MADS-box Gene Family in *Crocus sativus*[J]. Genomics and Applied Biology, 2019, 38(7): 3140–3154. DOI: 10.13417/j.gab.038.003140.