

矢野鞘氨醇菌酯酶 SyEst870 的重组表达及其对氨基甲酸酯类农药的降解

谢晓倩, 冯印, 周圆媛, 颜鑫, 袁晓琴, 仇伍霞, 毛新芳, 刘忠渊*

四川轻化工大学 化学工程学院, 四川 自贡 643000

谢晓倩, 冯印, 周圆媛, 颜鑫, 袁晓琴, 仇伍霞, 毛新芳, 刘忠渊. 矢野鞘氨醇菌酯酶 SyEst870 的重组表达及其对氨基甲酸酯类农药的降解[J]. 生物工程学报, 2025, 41(4): 1605-1620.

XIE Xiaoqian, FENG Yin, ZHOU Yuanyuan, YAN Xin, YUAN Xiaolin, QIU Wuxia, MAO Xinfang, LIU Zhongyuan. Recombinant expression of *Sphingobium yanoikuyae* esterase SyEst870 capable of degrading carbamate pesticides[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(4): 1605-1620.

摘要: 氨基甲酸酯类农药是针对有机氯和有机磷农药的缺点而开发的一种新型广谱杀虫、杀螨、除草剂, 其广泛使用及缓慢降解导致环境污染, 对生态系统和人类健康造成损害, 残留农药的处理是目前环境保护中亟待解决的问题。本研究通过原核表达矢野鞘氨醇菌(*Sphingobium yanoikuyae*) SGNH/GDSL 水解酶家族蛋白 SyEst870, 研究重组蛋白对氨基甲酸酯类农药的降解能力。构建原核表达载体 pET-32a-SyEst870, 转化大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21 进行异源表达并纯化; 以对硝基苯酚乙酸酯为底物结合对硝基苯酚标准曲线测定酶活性以及温度、pH、金属离子的影响; 通过液相色谱-质谱联用技术(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)检测 SyEst870 对甲萘威、速灭威、异丙威的降解能力, 并使用气相色谱-质谱联用技术(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)检测 SyEst870 对 3 种农药的降解产物。结果显示, 通过大肠杆菌异源表达得到 SyEst870 可溶性蛋白, 经过亲和层析得到酶活为 677.5 U 的 SyEst870, SyEst870 在 30 °C、pH 7.0 条件下, 24 h 内对起始浓度为 100 mg/L 的甲萘威、速灭威和异丙威降解率分别为 82.34%、84.43%、92.87%; 甲萘威的降解产物主要为 α -萘酚和异氰酸甲酯; 速灭威的降解产物主要为间甲酚和异氰酸甲酯; 异丙威的主要降解产物为 2-异丙基苯酚和异氰酸甲酯。相较于氨基甲酸酯类农药在自然环境中数天到数周的半衰期, 重组蛋白 SyEst870 可快速消除氨基甲酸酯类农药的残留。本研究为解决环境和果蔬中的农药残留问题奠定了基础。

关键词: 矢野鞘氨醇菌; SGNH/GDSL 水解酶; 原核表达; 氨基甲酸酯类农药

资助项目: 国家自然科学基金(32260072)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32260072).

*Corresponding author. E-mail: lzyl168@163.com

Received: 2024-09-04; Accepted: 2025-01-10; Published online: 2025-01-15

Recombinant expression of *Sphingobium yanoikuyae* esterase SyEst870 capable of degrading carbamate pesticides

XIE Xiaoqian, FENG Yin, ZHOU Yuanyuan, YAN Xin, YUAN Xiaoqin, QIU Wuxia, MAO Xinfang, LIU Zhongyuan*

College of Chemical Engineering, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong 643000, Sichuan, China

Abstract: Carbamate pesticides, a new type of broad-spectrum pesticides for controlling pests, mites, and weeds, are developed to address the shortcomings of organochlorine and organophosphorus pesticides. Their widespread use and slow degradation have led to environmental pollution, causing damage to ecosystems and human health. Managing pesticide residues is a pressing issue in the current environmental protection. This study aims to investigate the expression of SyEst870, a member of the SGNH/GDSL hydrolase family in *Sphingobium yanoikuyae*, in a prokaryotic system and evaluate the ability of the recombinant protein to degrade carbamate pesticides. The prokaryotic expression vector pET-32a-SyEst870 was constructed and transformed into the *Escherichia coli* BL21 for heterologous expression. The purified protein was studied in terms of enzyme activity and effects of temperature, pH, and metal ions on the enzyme activity, with *p*-nitrophenol acetate as the substrate and based on the standard curve of *p*-nitrophenol. LC-MS (liquid chromatography-mass spectrometry) was employed to examine the degradation effects of SyEst870 on carbaryl, metolcarb, and isoprocarb. GC-MS (gas chromatography-mass spectrometry) was employed to detect the degradation products of SyEst870 for the three pesticides. The soluble protein SyEst870 was successfully obtained through the heterologous expression in *Escherichia coli*, which yielded an enzyme with the activity of 677.5 U after affinity chromatography. SyEst870 exhibited degradation rates of 82.34%, 84.43%, and 92.87% for carbaryl, metolcarb, and isoprocarb, respectively, at an initial concentration of 100 mg/L within 24 h at 30 °C and pH 7.0. The primary degradation products of carbaryl were identified as α -naphthol and methyl isocyanate. Metolcarb was mainly degraded into *m*-cresol and methyl isocyanate, and isoprocarb was mainly degraded into 2-isopropylphenol and methyl isocyanate. Compared with the half-life of carbamate pesticides in the natural environment, which ranges from a few days to several weeks, the recombinant protein SyEst870 can rapidly eliminate the residues of carbamate pesticides. This study lays a foundation for addressing pesticide residues in the environment and in fruits and vegetables.

Keywords: *Sphingobium yanoikuyae*; SGNH/GDSL hydrolase family; prokaryotic expression; carbamate pesticides

SGNH/GDSL 水解酶家族蛋白是一个多样化的脂肪酶和酯酶家族, 大部分酯酶和脂肪酶具有保守的 Gly-X-Ser-X-Gly 五肽结构域, 属于 α/β 水解酶超家族, 但并非所有的脂解酶都具有这种共同的五肽基序。1995 年, Upton 等^[1]首

次报道了 GDSL 脂解酶家族, 因其具有保守残基 Ser、Gly、Asn 和 His, 又进一步被归类为 SGNH 水解酶超家族, 这些酶在催化丝氨酸亲核试剂周围都存在 GDSL 的序列片段。相较于 α/β 水解酶家族的典型折叠模式, 该酶的三级结

构呈现出较为明显的差异特征,在目前已知的水解酶中具有一定的结构独特性。其活性位点与其他丝氨酸水解酶的典型 Ser-His-Asp (Glu) 三联体非常相似。细菌脂解酶根据氨基酸序列、系统发育、保守序列和生物功能分为 19 个家族^[2],与其他细菌脂解酶家族相比,SGNH 水解酶超家族包含 5 个保守序列区(I-V)。在 I 区中,1 个保守的 Gly-Asp-Ser-Leu (X)基序包含 N 端附近的活性位点丝氨酸残基。此外,4 个不变残基(Ser、Gly、Asn、His)分别分布在保守域 I、II、III 和 V 中^[3]。正常情况下,Gly (II 区)和 Asp (IV 区)残基构成氧阴离子孔(oxyanion hole),作为质子供体在催化反应中负责提供质子氢。残基 Ser (第 I、IV 区)构成催化三联体,但一些 SGNH 水解酶缺乏 Asp/Glu,因此形成催化二联体^[4]。虽然 SGNH 家族水解酶具有显著的结构同源性,但是除保守序列和活性位点的相对位置及折叠方式相似以外,其他总体结构的序列相似性较低^[5]。虽然细菌来源的 SGNH 水解酶家族具有来源广泛、功能多样且催化机制独特等特点,在细菌致病性、碳源代谢和天然产物合成等方面发挥重要生物学功能,在医药、化工、生物燃料和环境修复等领域具有较大的应用潜力,但目前只有少数 SGNH 家族水解酶的晶体结构被解析^[6]。虽然酯酶具有多功能的催化活性、对极端条件的抵抗力等特点^[7],但是在农药降解酶的实际应用中,如何将酶大规模工业化生产出来且保持稳定性仍是目前研究者所必须解决的一个关键性问题。

中国作为世界上的农业大国,农药是保证农作物产量和质量不可或缺的一部分。使用较为广泛和常见的残留农药种类包括有机磷、有机氯、氨基甲酸酯、拟除虫菊酯类等^[8],氨基甲酸酯类农药和有机磷农药类似,通过抑制乙酰胆碱酯酶,使其不能分解乙酰胆碱造成乙酰胆碱堆积,阻断正常神经传导造成生物体的死

亡,氨基甲酸酯已经替代有机氯农药成为第 3 类杀虫剂^[9]。近年来氨基甲酸酯类农药因为其广谱的杀虫性,使用量大幅增加,但同时也会对环境 and 人类造成威胁,会导致内分泌失调、泌尿系统紊乱、各组织和器官失调,甚至导致不孕或对其后代可能致癌致畸致突变^[10]。微生物技术可以被视为一种可以有效工作的潜在工具,通过微生物的代谢活动能够改善生物降解过程,作为一种环保选择,用于从污染环境中降解氨基甲酸酯类杀虫剂。目前针对氨基甲酸酯类农药的降解研究主要集中在水解酶上,其中酯酶和酰胺酶能降解氨基甲酸酯类农药,断裂酯键得到相应酚类物质^[11]。Hashimoto 等^[12]从甲萘威处理过的土壤中分离出了能够降解甲萘威的根瘤菌属(*Rhizobium* sp.)菌株 AC100,从该菌株的质粒 DNA 中克隆出了甲萘威水解酶基因 *cehA*,并测定了包含 *cehA* 基因的 10 kb 核苷酸序列,并且通过建库、回复突变的方法得到一个 2.3 kb 的 *cehA* 基因,此基因的表达产物能够降解水解速灭威、灭杀威、灭除威等;徐剑宏等^[13]从鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas agrestis*) CDS-1 中克隆到了呋喃丹的水解酶基因。丛健^[14]利用重组羧酸酯酶 E4 对多种氨基甲酸酯类农药进行降解,发现重组羧酸酯酶 E4 对残杀威、甲萘威、仲丁威和克百威具有生物活性,而对其他的氨基甲酸酯类农药没有活性,重组羧酸酯酶 E4 在 2.5 h 内降解了 64%甲萘威,3 h 内对残杀威、仲丁威和克百威的降解率分别为 48%、59%、50%,说明重组羧酸酯酶 E4 具有底物特异性。税良勇等^[15]从茶尺蠖中分离出羧酸酯酶 EoCarE592 并高效降解高效氯氟氰菊酯、甲基对硫磷和异丙威这 3 种农药,其他氨基甲酸酯类农药降解酶及基因见表 1。农药生物降解主要是在微生物作用下进行的,归根到底是通过其分泌的酶来完成的,直接采用酶进行农药修复比微生物处理更具优势。

表 1 氨基甲酸酯类农药降解酶/基因

Table 1 Aminocarbonyl pesticide degrading enzymes/genes

Bacteria	Enzyme/gene	Reference
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Ethyl carbamate hydrolase (ECH)	[16]
<i>Citrobacter</i> sp.	Urethanase	[17]
<i>Rhodococcus equi</i> TB-60	Urethane hydrolase	[18]
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	EC-degrading esterases	[19]
<i>Candida parapsilosis</i>	New urethanase (CPUTNase)	[20]
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> d3	Enantioselective amidase (AmdA)	[21]
<i>Rhodococcus</i> sp. D-6	Novel hydrolase (IpcH)	[22]
<i>Achromobacter</i> WM111	Methyl carbamate-degrading hydrolase (MCD)	[23]
<i>Pseudomonas</i> sp. strain C5pp	Carbaryl hydrolase gene (<i>mcbA</i>)	[24]
<i>Pseudomonas</i> sp. OXA20	Carbamate hydrolase gene (<i>cehA</i>)	[25]
<i>Novosphingobium</i> sp. KN65.2	Carbamate hydrolase gene (<i>cfbJ</i>)	[26]
<i>Sphingomonas</i> sp. CDS-1	Carbofuran hydrolase gene (<i>cehA</i>)	[27]

目前尚未见关于矢野鞘氨醇菌的 SGNH/GDSL 水解酶家族基因具有降解含酯键农药的能力的报道。本研究在前期工作中发现,矢野鞘氨醇菌在含酯键的高浓度马拉硫磷的胁迫下依旧能够生长,这可能和它体内的酯酶有关,搜索 NCBI 数据库中矢野鞘氨醇菌的现有基因序列,鉴定并克隆了 SGNH/GDSL 水解酶家族基因 *Est870* (GenBank 登录号: CP033230.1),其核苷酸序列长度为 1 125 bp,编码 375 个氨基酸。本研究构建了原核表达载体 pET-32a-SyEst870,并转化大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21 进行异源表达和亲和层析,通过气相色谱和超高效液相色谱-质谱检测重组蛋白 SyEst870 对氨基甲酸酯类农药的降解。将通过基因工程方法异源表达的酯酶用于农药污染治理是一种有益的尝试,同时也为解决农药使用过度及残留问题奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

氨苄青霉素钠、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、对硝基苯酚乙酸酯、牛血清白蛋白 BSA、咪唑、DNA 分子量标准 marker (100–5 000 bp)和 RealBand 预染

蛋白 marker (10–180 kDa)均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;丙酮、乙腈、甲醇、盐酸、二氯甲烷和甘油均购自成都市科隆化学品有限公司;甲萘威、速灭威(色谱纯)均购自上海泰坦科技股份有限公司,其他试剂均为国产分析纯。

气相色谱仪[配有 FID (flame ionization detector)检测器]购自安捷伦科技有限公司;气质联用仪购自 ThermoFisher Scientific 公司;QTRAP 液相质谱仪购自 AB Sciex 公司;Acquity UPLC 液相色谱仪购自 Waters 公司;超纯水制造系统购自四川优普超纯科技有限公司;电泳系统(trans-blot SD cell, SDS-PAGE)购自 Bio-Rad 公司;智能型电热恒温培养箱购自上海一恒科学仪器有限公司;恒温培养摇床购自上海精胜科学仪器有限公司;医用冷冻离心机购自四川蜀科仪器有限公司;台式离心机购自上海卢湘仪仪器有限公司;全波长酶标仪(ReadMax 1200)购自上海闪谱生物科技有限公司;超声波实验设备购自宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.2 生物信息学分析

基于 NCBI 的矢野鞘氨醇菌转录组数据库获得 SyEst870 基因的 cDNA 序列和氨基酸序列,登录 NCBI 数据库下载其他菌种的 SGNH/GDSL

水解酶家族的氨基酸序列, 利用在线软件 ESPript (<https://esprict.ibcp.fr/ESPript/cgi-bin/ESPript.cgi>)进行多序列比对。利用 MEGA 6 软件的邻接 (neighbor-joining, NJ)法^[15]构建矢野鞘氨醇菌 SyEst870 与其他菌种的酯酶系统发育树。利用在线软件 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>)进行二级、三级结构预测与同源建模。利用 PyMOL 软件进行蛋白质活性中心位点展示与活性口袋预测。

1.3 原核表达

构建原核表达载体 pET-32a-SyEst870, 提取质粒, 转化到 *E. coli* BL21 感受态细胞中, 接种到含有 100 mg/L 氨苄青霉素 (ampicillin, A⁺) 的 LB 固体培养基上, 37 °C 培养至形成单菌落。将单菌落在含有 100 mg/L A⁺ 的 LB 液体培养基中, 于 37 °C、180 r/min 培养 4 h, 加入 IPTG 至终浓度为 100 μ mol/L 诱导 4 h, 以不添加 IPTG 的阳性菌作为空白对照, 用 SDS-PAGE 检测蛋白表达情况, 筛选优良表达的阳性克隆菌株。将优良表达菌株转接于 300 mL 含有 100 mg/L A⁺ 的 LB 液体培养基中, 于 15 °C、180 r/min 培养 12 h, 加入 IPTG 至终浓度为 100 μ mol/L 诱导 12 h, 6 000 r/min 离心 30 min, 用 pH 8.0 Tris-HCl 重悬 3 次, 进行超声破碎 (功率 200 W, 超声 4 s, 停顿 4 s)。

1.4 蛋白纯化

取适量 His-Tag Purification Resin 凝胶柱装柱, 用 Tris-HCl (pH 8.0) 平衡柱体, 加入细菌破碎后的上清, 于 4 °C、30 r/min 旋转摇床挂柱 1 h, 收集流穿液, 重复上柱 2–3 次以充分结合 His 标签蛋白。依次用 20、50、100、150、250、500 mmol/L 的咪唑洗脱 15 min, 用 SDS-PAGE 检测蛋白洗脱情况。将洗脱下来的蛋白用 Tris-HCl (pH 8.0) 以 1:100 的体积进行透析以除掉咪唑, 每隔 4 h 换 1 次透析液, 透析 48 h,

获得目的蛋白。

1.5 Western blotting 检测目的蛋白 SyEst870

将上述透析后的目的蛋白进行蛋白定量, 用 SDS-PAGE 检测, 将蛋白胶置于转膜缓冲液中平衡 5 min, 然后于转移槽中 200 mA 转膜 90 min, 用封闭缓冲液封闭 1.5 h, 在用封闭缓冲液按照 1:3 000 稀释的一抗 (Anti $\times$ His-Tag 小鼠多克隆抗体) 中 4 °C 过夜孵育, 用 TBST Buffer 洗膜 3 次 15 min, 在 1:15 000 稀释的二抗 (HRP-conjugated goat anti-mouse IgG) 中 37 °C 孵育 2 h, 用 TBST Buffer 洗膜 3 次 15 min, ECL (enhanced chemiluminescence) 染色液避光染色 1 min, 曝光 15 s 观察结果。

1.6 SyEst870 酶活测定

酯酶可以水解对硝基苯酚酯类的酯键, 催化生成的产物对硝基苯酚 (*p*-nitrophenol, *p*-NP) 在 405 nm 波长有最大吸收峰。参照宗维^[28]酶活测定的方法并略加修改。用甲醇配制 1 mmol/L 的 *p*-NP 母液, 梯度配制成不同浓度的 *p*-NP 标准液, 测定其在 405 nm 处吸光度, 绘制 *p*-NP 标准曲线。取 100 μ L 待测酶液加入到含终浓度为 10 mmol/L 对硝基苯酚乙酸酯 (*p*-nitrophenyl acetate, *p*-NPA) 的 2.9 mL Tris-HCl (pH 8.0) 的缓冲溶液中混合均匀, 设定此为标准反应体系。在 30 °C 条件下孵育 5 min, 以高温灭活酶作为对照, 进行 3 次平行实验, 取 3 mL 待测液于石英比色皿中, 用对照组调零, 在紫外分光光度计中测定 405 nm 处吸光度。1 个酶活性单位 (U) 定义为: 单位时间催化生成 1 μ mol *p*-NP 所需酶量, 即 1 U=1 μ mol/(mL $\cdot$ min)。

1.7 酶学性质研究

1.7.1 温度及温度的稳定性研究

在标准反应体系下, 100 μ L 待测酶液加入到含终浓度为 10 mmol/L *p*-NPA 的 2.9 mL pH 8.0 Tris-HCl 的缓冲溶液中混合均匀, 分别置

于 10、20、30、40、50、60 °C 恒温水浴锅中孵育 5 min, 以高温灭活酶作为对照, 进行 3 次平行实验, 对照组调零, 测定酶活力确定最适反应温度。将酶分别置于 10、20、30、40、50、60 °C 恒温水浴锅中, 各孵育 0.5、1、2、3、4 h 后测定酶活力, 以未经热处理的酶的酶活力作为 100%, 计算相对酶活力, 以确定温度稳定性。

1.7.2 pH 及 pH 稳定性研究

在标准反应体系中, 反应温度为 30 °C 时, 测定不同 pH (3.0–10.0) 条件下 SyEst870 的酶活性, 所使用的缓冲液为: 柠檬酸盐缓冲液 (pH 3.0–5.0)、PBS 缓冲液 (pH 6.0–7.0)、Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0–10.0)。以高温灭活酶作为对照, 进行 3 次平行实验, 对照组调零, 测定酶活力确定最适反应 pH。将 SyEst870 分别置于 pH 7.0–10.0、30 °C 分别孵育 1、3、6、9 h 后取样测定酶活, 以未经处理的酶的酶活力作为 100%, 计算相对酶活力, 以确定稳定 pH 性。

1.7.3 金属离子对酶活力的影响

在标准反应体系中, 分别加入金属离子: Mn^{2+} 、 Ni^{+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Li^{+} 、 Ca^{2+} 、 K^{+} 、 Mg^{2+} 、 Na^{+} 、 Fe^{2+} 使终浓度分别为 1、10、20 mmol/L, 以 *p*-NPA 为底物, 在 30 °C、pH 8.0 条件下孵育 5 min, 测定酶活, 以未添加金属离子的酶活力为 100%, 计算相对酶活力, 分析金属离子对 SyEst870 酶活的影响。

1.8 SyEst870 对农药的降解

参照 GB/T 20796—2006^[29] 和刘菲菲等^[30] 的方法并略作修改。以甲醇为溶剂配制 1 g/L

的甲萘威、速灭威、异丙威准品溶液, 并将溶液稀释为 10、40、70、100 µg/L 的工作液, 过 0.22 µm 的微孔滤膜, 用高效液相色谱-质谱法测定每个工作液中甲萘威、速灭威、异丙威的峰面积, 以峰面积对应的浓度制作浓度与峰面积标准曲线。

在 5.9 mL 含甲萘威(速灭威/异丙威)终浓度为 100 mg/L 的 pH 7.0 的磷酸盐缓冲溶液中加入 100 mL 酶活为 677.5 U 的 SyEst870 酶液混合均匀, 于 30 °C 恒温水浴锅中分别避光孵育 0、4、8、12、16、20、24 h 后加入 6 mL 二氯甲烷等体积萃取, 振荡 30 min, 8 000 r/min 离心 15 min, 上层水相再利用 6 mL 二氯甲烷进行二次萃取, 吸取两次下层有机相 6 mL 于旋蒸瓶, 旋转蒸发去除有机溶剂, 加入 6 mL 乙腈进行超声溶解, 并稀释 1 000 倍到 µg/L, 过 0.22 µm 的微孔滤膜, 装瓶检测。每组实验重复 3 次, 以 100 mg/L 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)为空白对照。

甲萘威、速灭威和异丙威液相色谱条件: Waters ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 mm×50 mm, 1.7 µm) 色谱柱, 流动相为乙腈:0.1% 甲酸水=90%:10% (V/V), 流速 0.2 mL/min, 柱温 25 °C, 进样量 1 µL; 液相质谱部分参数见表 2, 涡轮离子喷雾温度(turbo ion spray temperature, TEM) 500 °C, 帘气压力(curtain gas, CUR) 25.0 psi, 雾化气压力(nebulizer gas, GS1) 50 psi, 辅助气压力(auxiliary gas, GS2) 50 psi, 电离方式: 正离子, 电喷雾电离。

表 2 甲萘威、速灭威和异丙威的质谱参数

Table 2 Mass spectrum parameter of carbaryl, metolcarb and isoprocarb

Compound	Parent ion (<i>m/z</i>)	Daughter ion (<i>m/z</i>)	De-clustering voltage (DP)/(V)	Inlet voltage (EP)/(V)	Collision energy (CE)/(V)	Outlet voltage (CXP)/(V)
Carbaryl	201.9	145.0	+50.1	+13.9	+17.0	+13.3
Metolcarb	166.0	109.0	+55.0	+10.9	+17.4	+7.3
Isoprocarb	194.0	95.0	+64.0	+14.1	+20.9	+6.0

2 结果与分析

2.1 多序列比对和系统发育树

将 SyEst870 与鞘氨醇单胞菌(*Sphingobium scionense*)、根瘤菌(*Rhizorhapis suberifaciens*)、新疆链球菌(*Altericroceibacterium xinjiangense*)、尼氏链球菌(*Streptomyces niphimycinicus*)、丁氏银杆菌(*Silvibacterium dinghuense*)、马里斯溶杆菌(*Lysobacter maris*)的 SGNH 水解酶进行多序列比对(图 1), 图中黑色圆形为 SGNH/GDSL

水解酶家族的保守序列 Gly¹⁹⁶-Asp¹⁹⁷-Ser¹⁹⁸, 蓝色三角形表示 SGNH/GDSL 水解酶家族的催化三联体活性中心 Ser¹⁹⁸-X-Asp³⁷²-X-His³⁷⁵, 蓝色箭头表示 SGNH/GDSL 水解酶家族的氧阴离子空穴 Ser¹⁹⁸-X-Gly²³⁵-X-Asn²⁷⁴, 作为质子供体在催化反应中负责提供质子氢。将来源于 16 个物种的 SGNH 水解酶的氨基酸序列进行比对, 构建系统发育树, SyEst870 和鞘氨醇单胞菌以及根瘤菌的 Est 的分支较近, 说明其与鞘氨醇单胞菌以及根瘤菌亲缘关系最近(图 2)。

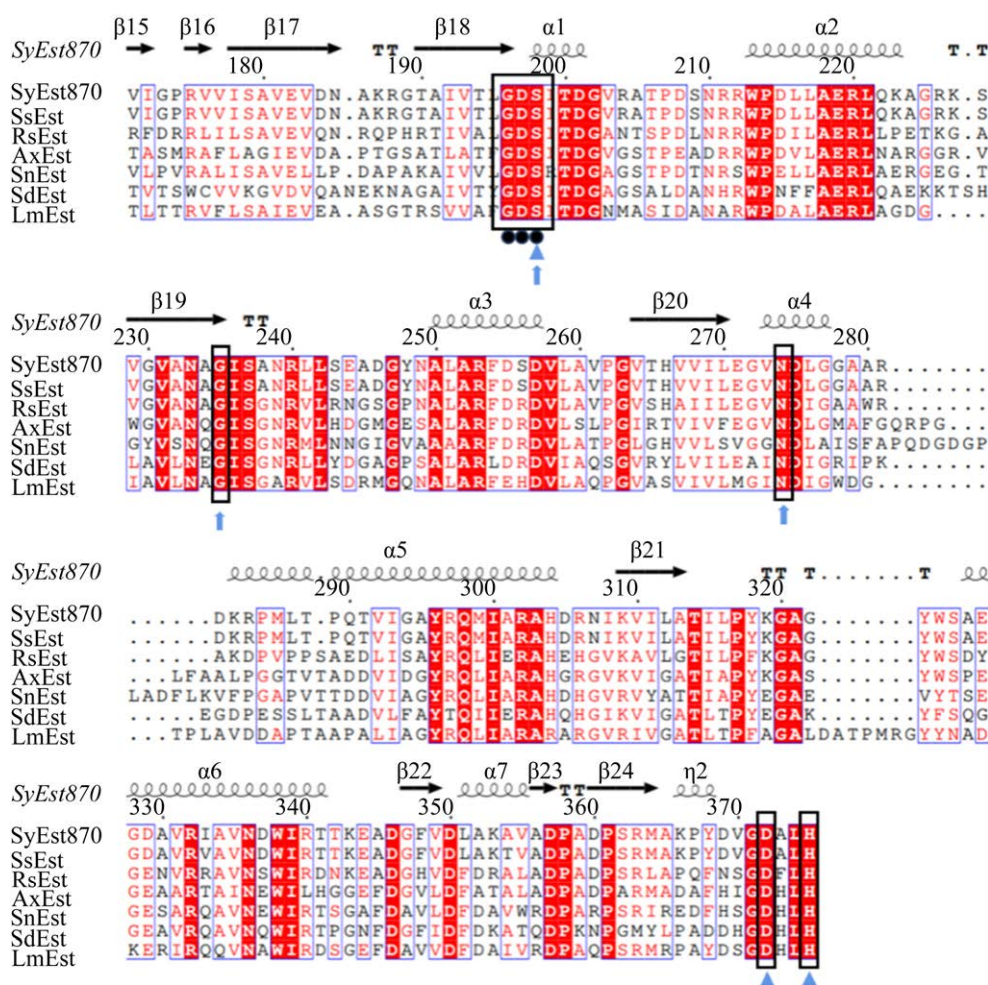


图 1 SyEst870 的多序列比对

Figure 1 Multiple sequences alignment of SyEst870. SsEst: *Sphingobium scionense* (GenBank accession number: WP_188084112.1); RsEst: *Rhizorhapis suberifaciens* (GenBank accession number: WP_184473722.1); AxEst: *Altericroceibacterium xinjiangense* (GenBank accession number: WP_126171883.1); SnEst: *Streptomyces niphimycinicus* (GenBank accession number: WP_216342538.1); SdEs: *Silvibacterium dinghuense* (GenBank accession number: WP_164981544.1); LmEst: *Lysobacter maris* (GenBank accession number: WP_111267035.1).

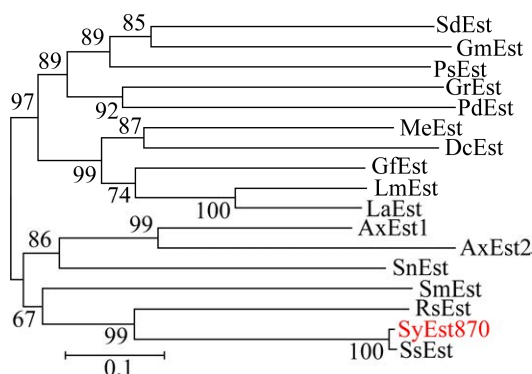


图 2 邻法构建的基于氨基酸序列的矢野鞘氨醇菌 SyEst870 和其他物种 Est 的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of SyEst870 from *Sphingobium yanoikuyae* and Est from other species by neighbor-joining method based on amino acid sequences. SdEst: *Silvibacterium dinghuense* (GenBank accession number: WP_164981544.1); GmEst: *Granulicella mallensis* (GenBank accession number: WP_014263858.1); PsEst: *Pseudomonas* (GenBank accession number: WP_150346300.1); GrEst: *Granulicella rosea* (GenBank accession number: WP_089410040.1); PdEst: *Phenylobacterium deserti* (GenBank accession number: WP_111513668.1); MeEst: *Mesorhizobium* (GenBank accession number: WP_136622225.1); DcEst: *Duganella callida* (GenBank accession number: WP_135201365.1); GfEst: *Geminicoccus flavidas* (GenBank accession number: WP_200840467.1); LmEst: *Lysobacter maris* (GenBank accession number: WP_111267035.1); LaEst: *Lysobacter alkalisoli* (GenBank accession number: WP_208543277.1); AxEst1: *Altericroceibacterium xinjiangense* (GenBank accession number: WP_126171883.1); AxEst2: *Aurantiacibacter xanthus* (GenBank accession number: WP_119592109.1); SnEst: *Streptomyces niphimycinicus* (GenBank accession number: WP_216342538.1); SmEst: *phingomonas montana* (GenBank accession number: WP_076069632.1); RsEst: *Rhizorhapis suberifaciens* (GenBank accession number: WP_184473722.1); SsEst: *Sphingobium scionense* (GenBank accession number: WP_188084112.1).

根据 SyEst870 的序列相似性在 SWISS-MODEL 网站进行同源建模, 经比对 SyEst870 与同为 SGNH 水解酶家族的碳水化合物酯酶 PbeAcXE 的三维结构高度相似, Global Model Quality Estimation (GNQE) 值为 0.75,

QMEANDisCoGlobal 值为 0.74 ± 0.06 , 以 PbeAcXE 的三维结构(图 3A)为模板构建 SyEst870 的三维结构(图 3B), 2 种蛋白质的三维结构高度相似。根据 α -碳与酰胺平面交角图(图 3C), 氨基酸进入最大允许区(深绿色区域)和允许区(浅绿色区域)的氨基酸残基占整个同源序列的比例为 97%, 表明 SyEst870 的三维结构在立体化学的允许区域内可以稳定存在, 且符合立体化学构想规则。来源于大肠杆菌的 TAP (PDB 登录号: 1IVN)因其多功能性成为最受关注且研究最为深入的 SGNH 家族水解酶^[31], 该蛋白具有典型的 SGNH 家族水解酶三维结构, 其中心为平行的 β -折叠, β -折叠两侧覆盖若干 α -螺旋, 构成 $\alpha/\beta/\alpha$ 折叠结构, α -螺旋和 β -折叠分别以蓝色和绿色表示, 催化三联体以棍状模型显示(图 3D), SyEst870 三维结构和 TAP 相似, α -螺旋和 β -折叠分别以绿色和红色表示, 催化三联体以粉色棍状模型显示(图 3E)。用 PyMol 软件对蛋白质活性中心催化三联体氨基酸位置进行可视化分析, 3 个氨基酸残基 Ser198、Asp372、His375 提供结构框架与活性中心的亲水性和疏水性提供的范德华力密切相关(图 4A、4B)。黄色氨基酸为 SyEst870 的活性中心周围蛋白(图 4C), 共同形成了 SyEst870 的活性口袋(图 4D)。

2.2 重组 SyEst870 的表达

SyEst870 蛋白共有 375 个氨基酸, 相对分子质量为 59 kDa, 7 个阳性克隆菌株在经过 IPTG 诱导后在 59 kDa 左右出现高表达量条带(图 5A 泳道 2), 与 SyEst870 理论分子量大小相同, 经过扩大培养、诱导破碎后, SyEst870 以可溶性蛋白的形式存在(图 5A 泳道 3); SyEst870 蛋白 Ni 柱亲和层析最适的洗脱咪唑浓度为 150 mmol/L (图 5B 泳道 5); Western blotting 检测结果表明 SyEst870 正确表达(图 5C 泳道 1); 采用 BSA 蛋白定量法对纯化后的 SyEst870 进行定量, 终浓度为 0.286 4 mg/mL。

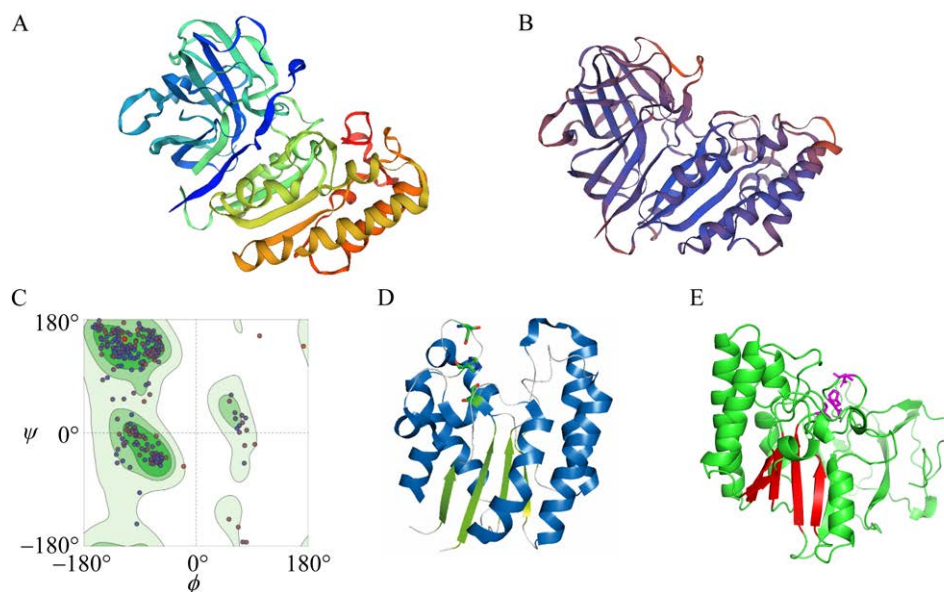


图 3 矢野鞘氨醇菌 SyEst870 同源建模结果

Figure 3 The result of homologous modeling of SyEst870. A: The three-dimensional structure of the carbohydrate esterase PbeAcXE; B: The three-dimensional structure of SyEst870; C: The intersection angle diagram of the α -carbon and the amide plane; D: The three-dimensional structure and active center of TAP (PDB accession number: 1IIVN) in *Escherichia coli*; E: The three-dimensional structure and active center of SyEst870.

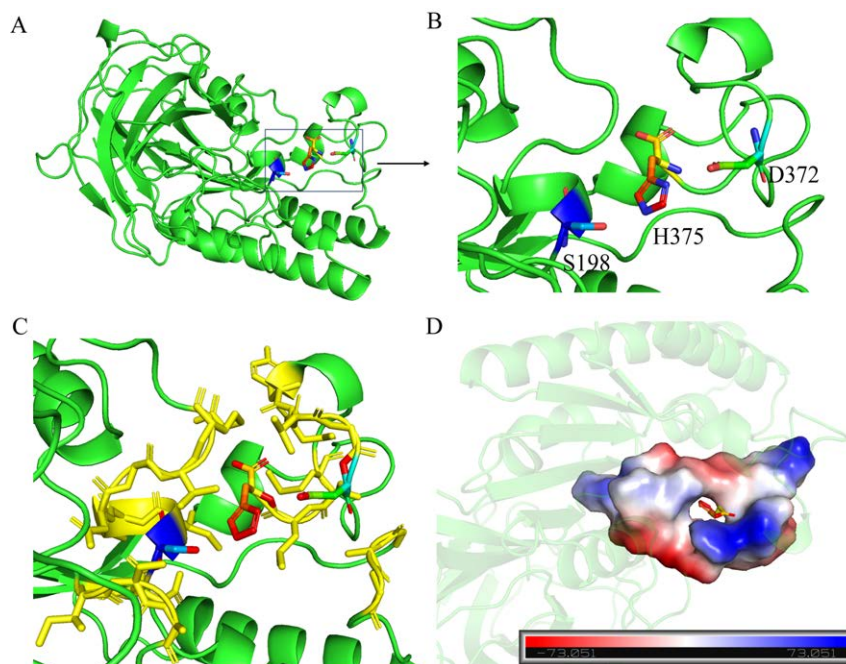


图 4 SyEst870 活性中心位点展示与活性口袋预测

Figure 4 The demonstration of active central sites and prediction of active pockets of SyEst870. A–B: SyEst870 catalytic triad; C: Protein around the active center of SyEst870; D: Active pocket prediction of SyEst870.

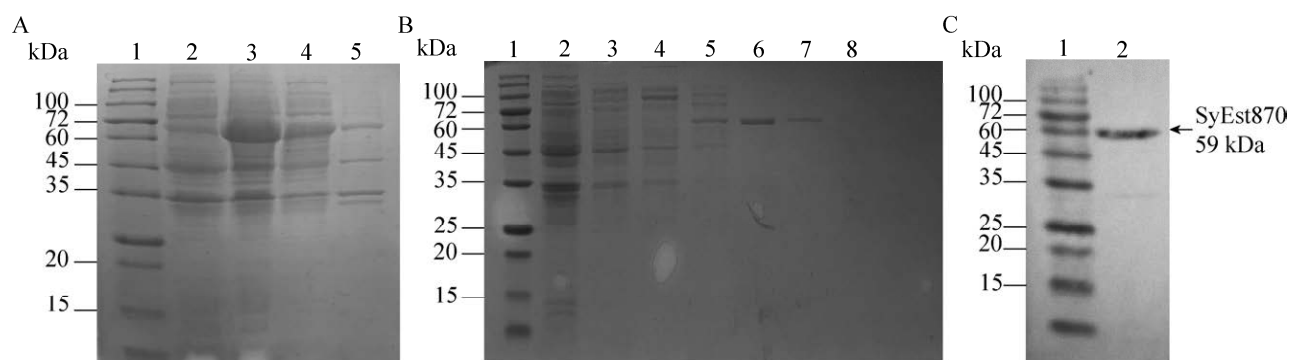


图5 重组 SyEst870 的表达

Figure 5 Expression of recombinant SyEst870. A: The SDS-PAGE detection of expression of the SyEst870. 1: Protein molecular weight marker; 2: Lysis of bacteria without induction by IPTG; 3: Lysis of bacteria after induction by IPTG; 4: Supernatant after ultrasonic crushing; 5: Sedimentation after ultrasonic crushing. B: Detect the purification of SyEst870 through SDS-PAGE. 1: Protein molecular weight marker; 2: Flow-through sample; 3–8: Protein samples washed with 20, 50, 100, 150, 250, 500 mmol/L imidazole elution buffer, respectively. C: Western blotting analysis of the SyEst870. 1: Protein Molecular Weight Marker; 2: The purified SyEst870 detected by Western blotting.

2.3 重组 SyEst870 的酶学性质

在标准反应体系中, 100 μ L 浓度为 0.286 4 mg/mL 的纯化后的 SyEst870 在 10–60 $^{\circ}$ C 都具有较高活性, 最适温度为 30 $^{\circ}$ C 左右, 30 $^{\circ}$ C 之前酶活随温度升高而增加, 30 $^{\circ}$ C 之后随着温度的增加酶活呈很明显的下降趋势(图 6A); SyEst870 在 10–40 $^{\circ}$ C 范围内具有良好的耐受性, 酶活随着时间的推移也能保持稳定状态, 在 50–60 $^{\circ}$ C 的高温环境下不耐受, 30 min 内空间结构被破坏, 变成沉淀析出, 丧失酶活(图 6B); SyEst870 在碱性环境下表现出较高酶活, 酸性环境下不耐受, pH 低于 6.0 时酶活为零, pH 大于 6.0 时随着 pH 增加酶活明显增加最适反应 pH 为 8.0 左右(图 6C); 在中性环境下随时间推移酶活逐渐降低, pH 8.0 时 SyEst870 的酶活维持相对稳定状态, pH 9.0 和 pH 10.0 在 9 h 后酶活开始明显降低(图 6D); 大部分金属离子对 SyEst870 的酶活无明显影响, 但 Ni^{+} 、 Cu^{2+} 对 SyEst870 的酶活具有明显抑制作用, 且随着浓度增加, 对 SyEst870 酶活的抑制作用增强, 相同浓度的 Cu^{2+} 比 Ni^{+} 对 SyEst870 的酶活抑制作用更强,

10 mmol/L Cu^{2+} 相比较于 1 mmol/L 和 20 mmol/L 的 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 对 SyEst870 的酶活促进作用更明显(图 6E)。

2.4 重组 SyEst870 对氨基甲酸酯类农药的降解

氨基甲酸类农药同有机磷农药一样通过抑制乙酰胆碱酯酶的活性来发挥毒性, 因此, 为了减轻氨基甲酸酯农药对非靶生物的危害, 有必要研究不同的降解方法, 对于氨基甲酸酯类的农药, 酯键断裂是使其毒性降低的第一步^[32]。还有研究表明, 具有相同催化机制的其他类型的农药降解酶同样可用于氨基甲酸酯农药的酶降解, 例如, 用氯氰菊酯降解酶对甲萘威进行水解, 发现 100 mg/L 的甲萘威可以在 48 h 内完全降解^[33]。呋喃丹也属于氨基甲酸酯类农药, 目前已报道大量呋喃丹降解菌株, 在报道的呋喃降解菌株中, 鞘氨醇属具有优良的呋喃降解能力, 在本研究中 100 mg/L 的甲萘威、速灭威和异丙威与 SyEst870 孵育 24 h 后残留量分别为 17.66、15.57、7.13 mg/L, 降解率分别为 82.34% (图 7A)、84.43% (图 8A) 和 92.87% (图 9A)。目

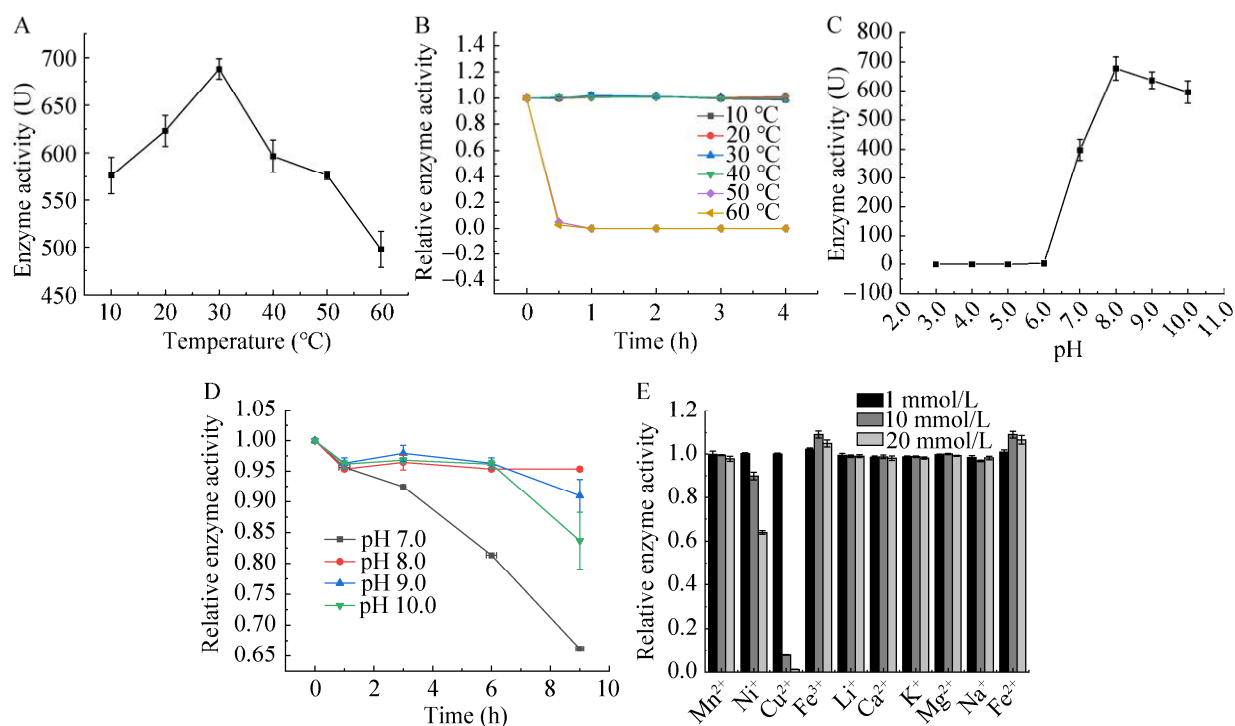


图 6 重组 SyEst870 的酶学性质

Figure 6 Enzymatic properties of recombinant SyEst870. A: The optimal reaction temperature of the SyEst870; B: Temperature tolerance of the SyEst870; C: The optimal reaction pH of the SyEst870; D: The pH tolerance of the SyEst870; E: The effect of metal ions on enzyme activity of SyEst870.

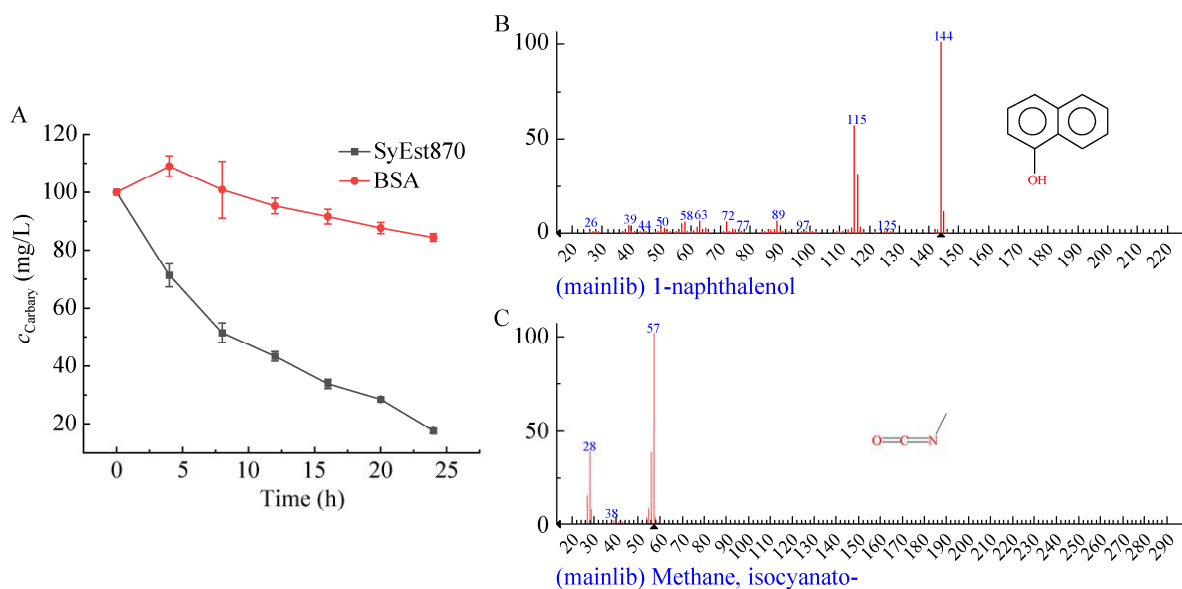


图 7 SyEst870 对甲萘威的降解

Figure 7 Degradation of carbaryl by SyEst870. A: The degradation curves of carbaryl by SyEst870 within 24 h; B: 1-naphthalenol, the degradation product of carbaryl by SyEst870; C: Methane isocyanato-, the degradation product of carbaryl by SyEst870.

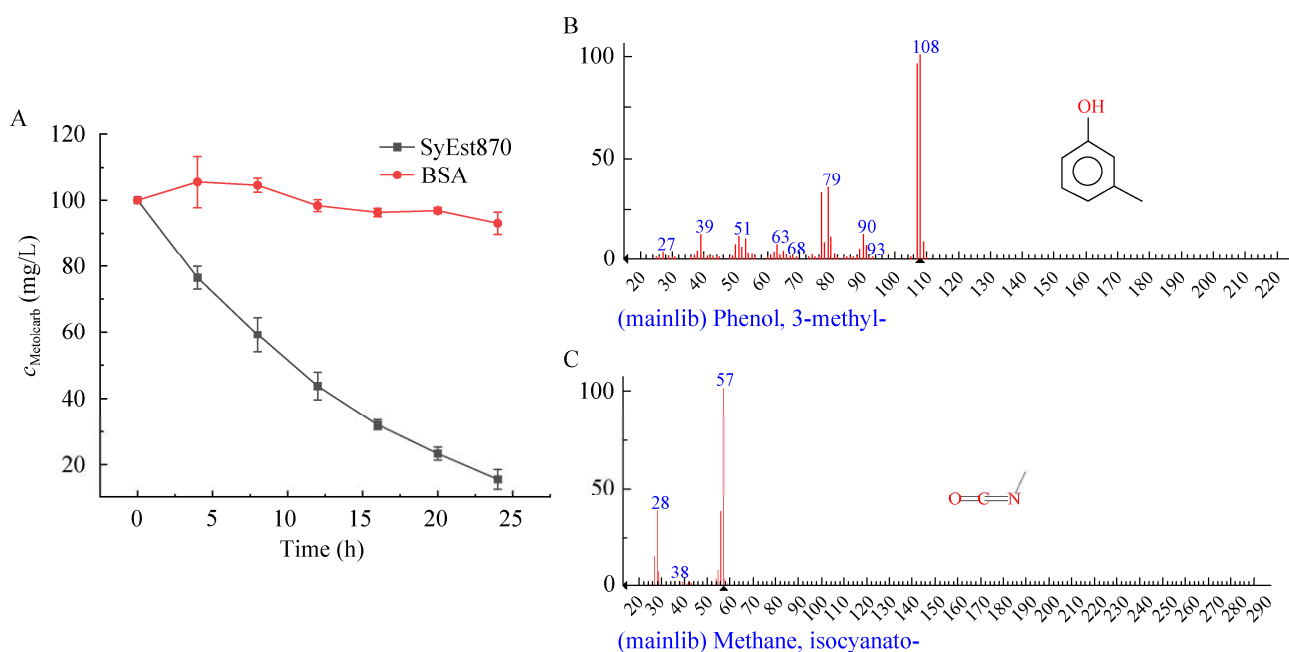


图 8 SyEst870 对速灭威的降解

Figure 8 Degradation of metolcarb by SyEst870. A: The degradation curves of metolcarb by SyEst870 within 24 h; B: Phenol 3-methyl, the degradation product of metolcarb by SyEst870; C: Methane isocyanato, the degradation product of metolcarb by SyEst870.

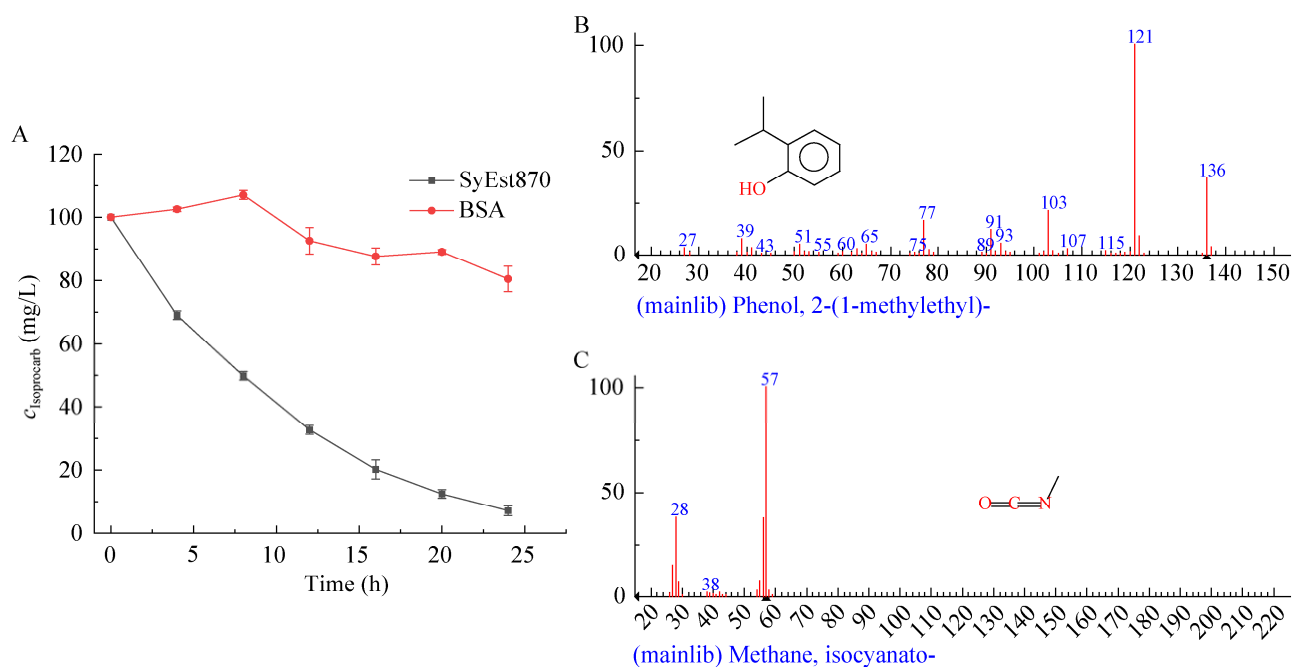


图 9 SyEst870 对异丙威的降解

Figure 9 Degradation of isoprocarb by SyEst870. A: The degradation curves of isoprocarb by SyEst870 within 24 h; B: Phenol 2-(1-methylethyl), the degradation product of isoprocarb by SyEst870; C: Methane isocyanato, the degradation product of isoprocarb by SyEst870.

前报道的酯酶(EC 3.1)和羧酸酯酶(EC 3.1.1.1)可以从氨基甲酸酯类的 C-O 键断裂,使其成为相应的醇和酸,表明酶对类农药的降解第一步均为断裂酯键^[34]。SyEst870 作用于甲萘威的 C-O 键使其成为 α -萘酚和异氰酸甲酯(图 7B、7C),同理,速灭威的主要降解产物为间甲酚和异氰酸甲酯(图 8B、8C),异丙威的主要降解产物为 2-异丙基苯酚和异氰酸甲酯(图 9B、9C)。

3 讨论与结论

目前针对将矢野鞘氨醇菌运用于农药降解方面的报道较少,而关于其 SGNH/GDSL 水解酶家族参与农药降解过程的研究更是处于极度匮乏的状态。SGNH/GDSL 水解酶家族不同于许多脂肪酶(EC 3.1.1.3)和酯酶(EC 3.1.1.1)具有 GxSxG 序列,其中,活性位点 S (丝氨酸)在保守序列中靠近中心位置,而在 GDSL 中,活性位点丝氨酸则靠近 N 端^[1]。在该家族中 Ser-Gly-Asn-His 分别位于 I、II、III 和 V 保守域中,这 4 个残基在酶的催化功能中都起着关键作用。保守域 I 中的丝氨酸作为亲核试剂和氧阴离子空穴的质子供体,保守域 I 中的甘氨酸和保守域 III 中的天冬酰胺作为氧阴离子空穴的另外 2 个质子供体,保守域 V 中的组氨酸残基作为碱基,通过脱质子化羟基,使活性位点 Ser 更具亲核性^[3]。

本研究前期从农药污染的土壤中分离筛选出多种菌种,通过用不同农药对菌种进行梯度胁迫,最后确定矢野鞘氨醇菌对多种农药具有耐药性。目前对氨基甲酸酯降解酶的研究主要集中在水解酶上,且大部分为酯酶,酯酶最有可能参与含酯键农药的降解,断裂酯键成为相应的醇和酸,其中 SGNH/GDSL 水解酶家族在农药方面研究的相关报道还比较少,本研究对 NCBI 数据库中矢野鞘氨醇菌的现有基因序列进

行检索,鉴定并克隆了 SGNH/GDSL 水解酶家族基因 SyEst870 (GenBank 登录号: CP033230.1),其核苷酸序列长度为 1 125 bp,编码 375 个氨基酸片段。生物信息学分析表明, SyEst870 与其他菌种的 SGNH 家族水解酶的保守序列和活性位点的相对位置相似。生化分析显示,经亲和层析, SyEst870 浓度达 0.286 4 mg/mL。以 *p*-NPA 为底物,在 30 °C、pH 8.0 条件下,其酶活测定为 677.5 U,其最适反应温度为 30 °C (图 6A),在 10–60 °C 范围内都具有一定的活性,在 10–40 °C 温度范围内酶活力在 4 h 后仍保持 95% 以上,其温度稳定性良好(图 6B);在 pH 7.0–10.0 范围内酶活保持在 400 U 以上,最适反应 pH 为 8.0 左右(图 6C),在酸性环境中不耐受,但在 pH 7.0–10.0 中 9 h 后仍保持 65% 以上活性(图 6D),是一种偏碱性酯酶,该酶最适 pH 高于已经报道的大多数酯酶,如分别从蔬菜土壤和毛豆腐宏基因组文库中分离出来的酯酶 Pyc3 和 Est684,其最适 pH 为 7.0^[35],宗维^[28]研究中的 Est882 在 pH 7.0–10.0 条件下处理 25 h 后,其剩余酶活可以保持在 50% 以上,在 pH 8.0 和 pH 9.0 条件下处理 25 h 后,其剩余酶活均保持了 80% 以上,相较于 SyEst870 具有更优良的稳定性; Ni⁺、Cu²⁺ 对 SyEst870 的酶活具有明显抑制作用,且随着浓度增加,对 SyEst870 酶活的抑制作用增强,10 mmol/L 的 Fe²⁺、Fe³⁺ 对 SyEst870 的酶活促进作用相较于 1 mmol/L 和 20 mmol/L 的 Fe²⁺、Fe³⁺ 对 SyEst870 的酶活促进作用更明显(图 6E)。

SGNH/GDSL 酯酶是具有多功能特性的水解酶,在制药、食品、生化及生物学领域展现出潜在应用价值,可用于重要酯化物的水解与合成。生物降解能利用酶促反应在温和的条件下降解许多持久性的有毒化合物。Bhat 等^[36]发现产气肠杆菌中的甘油磷酸二酯酶(GpdQ)

作为一种有前途的生物修复酶能够催化单、双和三酯底物的水解,包括某些有机磷酸酯农药和神经毒剂的降解;Masaki 等^[37]将从平滑念珠菌(*Candida parapsilosis*)中获得的 *amdS* 基因在米曲霉中异源表达,纯化后的水解酶能降解氨基甲酸乙酯。Ufarté 等^[38]从牛胃液中分离出的羧酸酯酶对于聚氨酯结构化合物和一些氨基甲酸酯农药具有水解活性,其对苯氧威降解较高,达到 69%以上。本研究中 SyEst870 对 100 mg/L 的氨基甲酸酯类的农药甲萘威、速灭威和异丙威在 24 h 内分别降解了 82.34%、84.43%和 92.87%,表明该酶对含酯键的农药具有广泛的底物特异性,其中异氰酸甲酯为主要的降解产物,由甲基氨基甲酸在中性环境中不稳定发生自脱水形成。虽然 SyEst870 的最适 pH 为 8.0,但氨基甲酸酯在碱性环境中不稳定,所以降解 pH 为 7.0,农药的分子大小及空间位阻也间接影响其与酶的结合,同时酶浓度和农药浓度都可以影响降解速率,因酶的活性位点有限,农药浓度越高降解速率不一定会随之升高,所以在酶和农药的浓度选择上有进一步的优化空间,且后期可以考虑将游离的酶进行固定化处理,以此实现农药污染环境的整治及酶的应用效能提升,但如何保障固定化酶使用过程中的稳定性和周期性,将成为该应用得以突破的关键。SyEst870 作为 SGNH/GDSL 家族酯酶一员,能水解氨基甲酸酯类的酯键,本研究为进一步探究矢野鞘氨醇菌对农药的耐药性以及为将 SGNH/GDSL 水解酶家族运用于农药的降解奠定了基础。

作者贡献声明

谢晓倩:方案设计、实验操作、数据管理、初稿写作;冯印、周圆媛、颜鑫:实验操作;袁晓琴、仇伍霞:监督指导、稿件润色修改;

毛新芳:监督指导;刘忠渊:数据管理、方案设计、经费支持、提供材料、稿件润色修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明没有任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] UPTON C, BUCKLEY JT. A new family of lipolytic enzymes[J]. Trends in Biochemical Sciences, 1995, 20(5): 178-179.
- [2] KOVACIC F, BABIC N, KRAUSS U, JAEGER KE. Classification of Lipolytic Enzymes from Bacteria[M]. Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils, and Lipids. Cham: Springer International Publishing, 2019: 255-289.
- [3] AKOH CC, LEE GC, LIAW YC, HUANG TH, SHAW JF. GDSL family of serine esterases/lipases[J]. Progress in Lipid Research, 2004, 43(6): 534-552.
- [4] AŠLER IL, ŠTEFANIĆ Z, MARŠAVELSKI A, VIANELLO R, KOJIĆ-PRODIĆ B. Catalytic dyad in the SGNH hydrolase superfamily: in-depth insight into structural parameters tuning the catalytic process of extracellular lipase from *Streptomyces rimosus*[J]. ACS Chemical Biology, 2017, 12(7): 1928-1936.
- [5] LEŠČIĆ AŠLER I, IVIĆ N, KOVAČIĆ F, SCHELL S, KNORR J, KRAUSS U, WILHELM S, KOJIĆ-PRODIĆ B, JAEGER KE. Probing enzyme promiscuity of SGNH hydrolases[J]. ChemBioChem, 2010, 11(15): 2158-2167.
- [6] 于婷婷. 碱性嗜热 SGNH 家族酯酶的异源表达、酶学性质及功能研究[D]. 昆明: 云南师范大学, 2015. YU TT. Heterologous expression, enzymatic properties and functions of alkaline thermophilic SGNH family esterase[D]. Kunming: Yunnan Normal University, 2015 (in Chinese).
- [7] CHANDRA P, ENESPA, SINGH R, ARORA PK. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review[J]. Microbial Cell Factories, 2020, 19(1): 169.
- [8] 周钦方, 张瑜, 王雯, 王丽芳, 王斌. 水果农药残留快速检测研究现状及展望[J]. 农业与技术, 2023, 43(7): 23-27. ZHOU QF, ZHANG Y, WANG W, WANG LF, WANG B. Research status and prospect of rapid detection of pesticide residues in fruits[J]. Agriculture and Technology, 2023, 43(7): 23-27 (in Chinese).
- [9] 徐辉. 氨基甲酸酯农药多残留分析技术概述[J]. 世界农药, 2006, 28(1): 39-42. XU H. Overview of multi-residue analysis technology of carbamate pesticides[J]. World Pesticides, 2006, 28(1): 39-42 (in Chinese).
- [10] 乔广浩, 刘欣. 杀虫剂西维因毒性及雌激素活性进

- 展研究[J]. 环境科学与技术, 2010, 33(2): 99-105.
- QIAO GH, LIU X. Some progress in research on toxicity and estrogenic activity of carbaryl[J]. Environmental Science & Technology, 2010, 33(2): 99-105 (in Chinese).
- [11] CHAUDHRY GR, MATEEN A, KASKAR B, BLODA M, RIAZUDDIN S. Purification and biochemical characterization of the carbamate hydrolase from *Pseudomonas* sp. 50432[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2002, 36(1): 63-70.
- [12] HASHIMOTO M, FUKUI M, HAYANO K, HAYATSU M. Nucleotide sequence and genetic structure of a novel carbaryl hydrolase gene (cehA) from *Rhizobium* sp. strain AC100[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(3): 1220-1227.
- [13] 徐剑宏, 洪青, 武俊, 严秋香, 李顺鹏. 转座子挽救法克隆鞘氨醇单胞菌 CDS-1 中呋喃丹水解酶相关基因[J]. 应用与环境生物学报, 2009, 15(5): 677-681.
- XU JH, HONG Q, WU J, YAN QX, LI SP. Cloning of a gene related to carbofuran hydrolyzing from *Sphingomonas agrestis* CDS-1 by transposon rescue[J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2009, 15(5): 677-681 (in Chinese).
- [14] 丛健. 羧酸酯酶 E4、细胞色素 P450 CYP9G2 和羧酸酯酶 B1 突变基因的重组酶对农药的生物降解[D]. 北京: 中国农业大学, 2006.
- CONG J. Biodegradation of pesticides by recombinant enzymes of carboxylesterase E4, cytochrome P450 CYP9G2 and carboxylesterase B1 mutated genes[D]. Beijing: China Agricultural University, 2006 (in Chinese).
- [15] 税良勇, 赵忠祎, 冯印, 谢晓倩, 袁晓琴, 毛新芳, 刘忠渊. 茶尺蠖羧酸酯酶 EoCarE592 的重组表达及其对农药的降解能力测定[J]. 昆虫学报, 2024, 67(1): 48-57.
- SHUI LY, ZHAO ZY, FENG Y, XIE XQ, YUAN XQ, MAO XF, LIU ZY. Recombinant expression of carboxylesterase EoCarE592 of *Ectropis obliqua* (Lepidoptera: Geometridae) and determination of its ability to degrade pesticides[J]. Acta Entomologica Sinica, 2024, 67(1): 48-57 (in Chinese).
- [16] DONG NH, XUE SY, GUO H, XIONG KX, LIN XP, LIANG HP, JI CF, HUANG ZG, ZHANG SF. Genetic engineering production of ethyl carbamate hydrolase and its application in degrading ethyl carbamate in Chinese liquor[J]. Foods, 2022, 11(7): 937.
- [17] KOBASHI K, TAKEBE S, SAKAI T. Urethane-hydrolyzing enzyme from *Citrobacter* sp.[J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 1990, 38(5): 1326-1328.
- [18] AKUTSU-SHIGENO Y, ADACHI Y, YAMADA C, TOYOSHIMA K, NOMURA N, UCHIYAMA H, NAKAJIMA-KAMBE T. Isolation of a bacterium that degrades urethane compounds and characterization of its urethane hydrolase[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 70(4): 422-429.
- [19] JIA YY, ZHOU JW, DU GC, CHEN J, FANG F. Identification of an urethanase from *Lysinibacillus fusiformis* for degrading ethyl carbamate in fermented foods[J]. Food Bioscience, 2020, 36: 100666.
- [20] MASAKI K, MIZUKURE T, KAKIZONO D, FUJIHARA K, FUJII T, MUKAI N. New urethanase from the yeast *Candida parapsilosis*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2020, 130(2): 115-120.
- [21] KANG TT, LIN JP, YANG LR, WU MB. 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.
- [22] ZHU Q, LIU HF, PAN KH, ZHU WH, QIAO YH, LI Q, HU JQ, ZHANG ML, QIU JG, YAN X, GE J, HONG Q. The novel hydrolase IpcH initiates the degradation of isoprocarb in a newly isolated strain *Rhodococcus* sp. D-6[J]. Journal of Hazardous Materials, 2024, 476: 135045.
- [23] NAQVI T, CHEESMAN MJ, WILLIAMS MR, CAMPBELL PM, AHMED S, RUSSELL RJ, SCOTT C, OAKESHOTT JG. Heterologous expression of the methyl carbamate-degrading hydrolase MCD[J]. Journal of Biotechnology, 2009, 144(2): 89-95.
- [24] TRIVEDI VD, JANGIR PK, SHARMA R, PHALE PS. Insights into functional and evolutionary analysis of carbaryl metabolic pathway from *Pseudomonas* sp. strain C5pp[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 38430.
- [25] ROUSIDOU K, CHANIKA E, GEORGIADOU D, SOUEREF E, KATSAROU D, KOLOVOS P, NTOUGIAS S, TOURNA M, TZORTZAKAKIS EA, KARPOUZAS DG. Isolation of oxamyl-degrading bacteria and identification of cehA as a novel oxamyl hydrolase gene[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 616.
- [26] NGUYEN TPO, HELBLING DE, BERS K, FIDA TT, WATTIEZ R, KOHLER HP E, SPRINGAEL D, de MOT R. Genetic and metabolic analysis of the carbofuran catabolic pathway in *Novosphingobium* sp. KN65.2[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(19): 8235-8252.
- [27] YAN X, JIN W, WU G, JIANG WK, YANG ZG, JI JB, QIU JG, HE J, JIANG JD, HONG Q. Hydrolase CehA and monooxygenase CfdC are responsible for carbofuran degradation in *Sphingomonas* sp. strain CDS-1[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(16): e00805-18.
- [28] 宗维. SGNH 家族酯酶 Est882 酶学性质、固定化及应用的初步研究[D]. 广州: 广东药科大学, 2022.
- ZONG W. Preliminary study on enzymatic properties, immobilization and application of SGNH family esterase Est882[D]. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University, 2022 (in Chinese).
- [29] 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 肉与肉制品中甲萘威残留量的测定: GB/T 20796—2006[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of

- China, Standardization Administration of the People's Republic of China. Determination of carbaryl in meat and meat products: GB/T 20796—2006[S]. Beijing: Standards Press of China, 2007 (in Chinese).
- [30] 刘菲菲, 赵成林, 朱国念. 超高效液相色谱-串联质谱法检测水稻及稻田环境中速灭威的残留[J]. 农药学报, 2013, 15(4): 445-450.
- LIU FF, ZHAO CL, ZHU GN. Determination of metolcarb residue in rice and paddy field by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2013, 15(4): 445-450 (in Chinese).
- [31] LO YC, LIN SC, SHAW JF, LIAW YC. Crystal structure of *Escherichia coli* thioesterase I/protease I/lysophospholipase L1: consensus sequence blocks constitute the catalytic center of SGNH-hydrolases through a conserved hydrogen bond network[J]. Journal of Molecular Biology, 2003, 330(3): 539-551.
- [32] SHIN DH, KIM DU, SEONG CN, SONG HG, KA JO. Genetic and phenotypic diversity of carbofuran-degrading bacteria isolated from agricultural soils[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, 22(4): 448-456.
- [33] HU KD, WANG XJ, ZHU JW, LIU AP, AO XL, HE L, CHEN SJ, ZHOU K, YANG Y, ZOU LK, LIU SL. Characterization of carbaryl-degrading strain *Bacillus licheniformis* B-1 and its hydrolase identification[J]. Biodegradation, 2020, 31(1/2): 139-152.
- [34] SUN MW, XU W, ZHANG WL, GUANG CE, MU WM. Microbial elimination of carbamate pesticides: specific strains and promising enzymes[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2022, 106(18): 5973-5986.
- [35] LI G, WANG K, LIU YH. Molecular cloning and characterization of a novel pyrethroid-hydrolyzing esterase originating from the Metagenome[J]. Microbial Cell Factories, 2008, 7: 38.
- [36] BHAT N, NUTHO B, VANGNAI A, TAKAHASHI K, RUNGROTMONGKOL T. Substrate binding mechanism of glycerophosphodiesterase towards organophosphate pesticides[J]. Journal of Molecular Liquids, 2021, 329: 115526.
- [37] MASAKI K, FUJIHARA K, KAKIZONO D, MIZUKURE T, OKUDA M, MUKAI N. *Aspergillus oryzae* acetamidase catalyzes degradation of ethyl carbamate[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2020, 130(6): 577-581.
- [38] UFARTÉ L, LAVILLE E, DUQUESNE S, MORGAVI D, ROBE P, KLOPP C, RIZZO A, PIZZUT-SERIN S, POTOCKI-VERONESE G. Discovery of carbamate degrading enzymes by functional metagenomics[J]. PLoS One, 2017, 12(12): e0189201.