

· 塑料解聚酶的设计与改造 ·

陈晟 江南大学生物工程学院教授、博士生导师，食品科学与技术国家重点实验室副主任。主要从事酶基因挖掘、分子改造、高效分泌和发酵过程调控方面的研究。作为项目负责人主持国家省部级项目 10 余项，发表 SCI 论文 50 余篇，获高等学校科学研究优秀成果奖科技进步一等奖及中国商业联合会科技进步奖特等奖。



夏伟 江南大学食品科学与技术国家重点实验室助理研究员，主要从事酶基因挖掘及分子设计、聚合物高效生物降解、多酶协同反应体系构建和糖质资源转化与利用相关研究。作为项目负责人主持国家省部级项目 3 项，以第一作者或通讯作者身份发表 SCI 论文 14 篇。



角质酶在生物可降解聚酯聚己二酸/对苯二甲酸丁二醇酯降解中的应用

王慧^{1,2,3}，吴敬^{1,2,3}，陈晟^{1,2,3*}，夏伟^{1,2,3*}

1 江南大学 食品科学与技术国家重点实验室，江苏 无锡 214122

2 江南大学生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122

3 江南大学 教育部食品安全国际合作联合实验室，江苏 无锡 214122

王慧, 吴敬, 陈晟, 夏伟. 角质酶在生物可降解聚酯聚己二酸/对苯二甲酸丁二醇酯降解中的应用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(5): 1987-1997.

WANG Hui, WU Jing, CHEN Sheng, XIA Wei. Application of cutinase in the degradation of biodegradable polyester poly(butylene adipate-co-terephthalate)[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(5): 1987-1997.

摘 要：随着废弃塑料带来的环境污染越来越严重，生物可降解聚酯已成为大众关注的焦点。

资助项目：国家重点研发计划(2019YFA0706900)；江苏省政策引导类计划(国际科技合作)(BZ2020010)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2019YFA0706900) and the Jiangsu Provincial Policy Guidance Programme-International Cooperation Projects (BZ2020010).

*Corresponding authors. E-mail: CHEN Sheng, chensheng@jiangnan.edu.cn; XIA Wei, weixia@jiangnan.edu.cn

Received: 2022-10-10; Accepted: 2023-01-26

聚己二酸/对苯二甲酸丁二醇酯[poly(butylene adipate-co-terephthalate), PBAT]是脂肪族和芳香族共聚形成的生物可降解聚酯,兼具两者的优异性能。针对PBAT在自然条件下对降解环境要求严格且降解周期长的不足之处,本研究探究了角质酶在PBAT降解中的应用和对苯二甲酸-丁二醇酯(butylene terephthalate, BT)含量对PBAT生物降解性的影响,以实现PBAT降解速率的提升。选取5种不同来源的聚酯降解酶对PBAT进行降解应用并比较出降解效果最优的酶,并测定了含有不同BT含量的PBAT聚酯的降解效率。结果表明,角质酶ICCG为降解效果最好的酶,且BT含量越高PBAT的降解率越低。此外,还确定了角质酶ICCG对高BT含量的PBAT(H)降解的最适温度、最适缓冲液类型、最适pH、最适E/S (enzyme to substrate)和最适底物浓度比分别为75 °C、Tris-HCl、9.0、0.4%和1.0%。本研究结果可为角质酶在PBAT降解中的应用提供一定的理论依据和实验参考。

关键词: 聚己二酸/对苯二甲酸丁二醇酯; 生物降解; 角质酶; BT含量

Application of cutinase in the degradation of biodegradable polyester poly(butylene adipate-co-terephthalate)

WANG Hui^{1,2,3}, WU Jing^{1,2,3}, CHEN Sheng^{1,2,3*}, XIA Wei^{1,2,3*}

1 State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

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

3 International Joint Laboratory on Food Safety, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: With the environmental pollution caused by waste plastics becoming increasingly serious, biodegradable polyester has become the focus of public attention. Poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT) is a biodegradable polyester formed by the copolymerization of aliphatic and aromatic groups, which has excellent performance of both. The degradation of PBAT under natural conditions requires strict environmental conditions and long degradation cycle. To address these shortcomings, this study explored the application of cutinase in PBAT degradation and the impact of butylene terephthalate (BT) content on the biodegradability of PBAT, so as to improve the degradation rate of PBAT. Five Polyester degrading enzymes from different sources were selected to degrade PBAT to pick out the most efficient enzyme. Subsequently, the degradation rate of PBAT materials with different BT content were determined and compared. The results showed that cutinase ICCG was the best enzyme for PBAT biodegradation, and the higher the BT content, the lower the degradation rate of PBAT. Furthermore, the optimum temperature, buffer type, pH, the ratio of enzyme to substrate (E/S) and substrate concentration in the degradation system were determined to be 75 °C, Tris HCl, 9.0, 0.4% and 1.0% respectively. These findings may facilitate the application of cutinase in PBAT degradation.

Keywords: poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT); biodegradation; cutinase; butylene terephthalate content

随着塑料制品的大规模生产,其废弃物也在环境中大量积累,其中少数可以被回收再利用,大部分通过焚烧和填埋处理,成为环境污染的重要来源之一^[1]。为响应“环保”和“禁塑令”的号召,生物可降解塑料成为人们的最佳选择^[2]。

聚己二酸/对苯二甲酸丁二醇酯[poly(butylene adipate-co-terephthalate), PBAT]是脂肪族芳香族共聚酯,由己二酸-丁二醇酯(butylene adipate, BA)和对苯二甲酸-丁二醇酯(butylene terephthalate, BT)缩聚而成(其具体结构式见图 1),不仅保持了芳香族聚酯的良好性能,而且由于其脂肪族成分,同时具有优异的生物降解性^[3],属于热塑性生物降解塑料。与其他生物可降解聚酯相比,PBAT 具有更好的延展性、断裂伸长率、耐热性和冲击性能,因此更适合广泛应用于食品包装和农业薄膜^[4]。据欧洲塑料协会报道,2021 年全球生物可降解塑料产量为 155.6 万 t,其中 PBAT 占 29.9%(约为 46.46 万 t),在生物可降解塑料中占比最高^[5]。被废弃后的生物可降解塑料只有少数在垃圾堆、土壤、淡水和海水中分解,大多数的则在自然界中废弃堆积对生态环境带来巨大威胁^[6-7]。目前研究表明 PBAT 的生物降解通常在 70%湿度和 55 °C 的堆肥降解中实现,这些条件在自然环境中不易存在^[8-9],缺乏在自然条件下的易降解性^[10],PBAT 在海水中几乎不可降解,364 d 内仅减重 3%^[11]。开发对环境友好的生物降解技术来帮助加速其降解,可有效缓解环境压力^[12]。

PBAT 生物降解主要是通过酶水解酯键将其断裂成己二酸-丁二醇酯和对苯二甲酸-丁二醇酯,继而终被水解成 1,4-丁二醇(1,4-butanediol, B)、己二酸(adipic acid, A)和对苯二甲酸(terephthalic acid, TPA)单体。目前,文献报道能降解聚酯的酶主要有角质酶、脂肪酶和酯酶。其中角质酶表现出最大的前景。角质酶(EC 3.1.1.74)是一种多功能酶^[13],可水解角质层、可溶性酯和不溶性甘油三酯,对各种人工聚酯同样具有水解作用^[14]。然而关于角质酶降解 PBAT 的相关报道很少,只是鉴定或表征一些对 PBAT 具有水解作用的酶,但降解率普遍较低,在实际应用中效果并不理想^[15]。因此,加速 PBAT 降解提高降解速率已成为亟待解决的问题。

本研究对比了 5 种不同来源且对聚酯具有较好降解作用的酶对 PBAT 的降解效果,研究了 BT 含量对其降解率的影响,并优化了降解体系。结果表明 PBAT 共聚酯的固态结构和热性能对其生物降解性有重要影响,而这两者取决于在 PBAT 合成过程中 BA 和 BT 的含量^[16],BT 的含量越高其生物降解性越低,这有助于了解 PBAT 组分对其生物降解性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109、BL21(DE3)均保藏于本研究室。聚己二酸/对苯

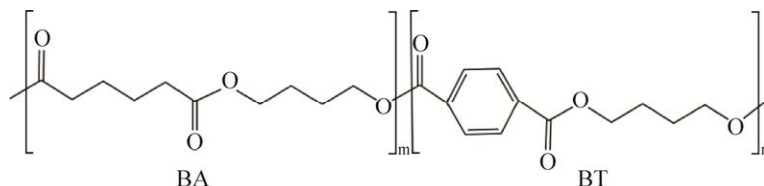


图 1 PBAT 化学结构式

Figure 1 The structure of PBAT.

二甲酸丁二醇酯 [poly (butylene adipate-co-terephthalate), PBAT] 分别购于营口康辉石化有限公司 [PBAT(M)] 和上海麦克林生化科技有限公司 [PBAT(H)]；聚丁二酸丁二醇酯 [poly (butylene succinate), PBS]、聚对苯二甲酸丁二醇酯 (polybutylene terephthalate, PBT) 购于上海麦克林生化科技有限公司；对苯二甲酸 (terephthalic acid, TPA) 购于 Sigma-Aldrich (上海) 贸易有限公司，为色谱级；蛋白胨、酵母粉购于 Oxoid 公司；质粒提取试剂盒购于北京 Tiangen 生化科技有限公司；蛋白质快速凝胶电泳试剂盒 (SDS-PAGE) 试剂盒购于上海碧云天生物科技有限公司；其他常用试剂均购于上海国药化学试剂有限公司。

1.2 培养基及缓冲液

LB 液体培养基(L): 蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, NaCl 10 g。

LB 固体培养基(L): 在 LB 液体培养基里加入 1.5%–2% (质量体积分数) 的琼脂粉。

TB 发酵培养基(L): 蛋白胨 10 g, 酵母 24 g, 甘油 5 g, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 16.43 g, KH_2PO_4 2.31 g。

磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer, PB): 100 mmol/L K_2HPO_4 用 100 mmol/L KH_2PO_4 调 pH 至 8.0。

Tris-HCl 缓冲液 (Tris-HCl buffer): 100 mmol/L Tris 用盐酸调 pH 至 8.0。

甘氨酸-氢氧化钠缓冲液 (Gly-NaOH buffer): 100 mmol/L 甘氨酸用 100 mmol/L NaOH 调 pH 至 8.0。

柠檬酸-磷酸盐缓冲液 (mcilvaine buffer): 100 mmol/L 磷酸氢二钠用 100 mmol/L 柠檬酸调 pH 至 8.0。

镍柱结合缓冲液 (binding buffer): 25 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 500 mmol/L NaCl。

镍柱洗脱缓冲液 (elution buffer): 25 mmol/L

Tris-HCl (pH 8.0), 500 mmol/L NaCl, 300 mmol/L 咪唑。

1.3 重组质粒的构建与转化

本研究选择枝叶堆肥 (leaf-branch compost) 宏基因组来源 LCC 的突变体 ICCG^[17-18]、白色高温双歧菌 (*Thermobifida alba*) 来源 Est119^[19-20]、嗜热子囊菌 (*Thermobifida fusca*) 来源 TfCut^[21]、大阪伊德氏杆菌 (*Ideonella sakaiensis*) 201-F6 来源 Dura-PETase^[22] 和弯曲高温单胞菌 (*Thermomonospora curvata*) 来源 Tcur0390^[23] 这 5 种聚酯降解酶进行研究。根据 NCBI 中 ICCG 氨基酸序列 (USU85609) 经密码子优化获得编码基因序列，后在苏州金唯智生物科技有限公司全基因合成，用全质粒的超级引物 PCR 检测 (megaprimer PCR of whole plasmids, MEGAWHOP) 方法连接至 pET-24a(+) 载体，构建重组质粒 pET-24a(+)-ICCG。将上述 PCR 产物用 *Dpn* I 在 37 °C 处理 2 h，以消除质粒模板，随后经热激转化至 *E. coli* JM109，挑取单菌落测序。转入 *E. coli* BL21(DE3)，分别得到重组菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET24a(+)-ICCG。其他重组菌均为本实验室前期保藏^[24]。

1.4 重组质粒的表达

分别将重组表达基因经热激转化至 *E. coli* BL(DE3)，挑选单菌落转至液体 LB 中培养 8–10 h；按接种量 5% 接入 TB 液体发酵培养基，37 °C、200 r/min 振荡培养 2 h，在菌体浓度 OD_{600} 为 0.5–1.0 时，加入异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG) 至终浓度 0.1 mmol/L，25 °C、200 r/min 进行摇瓶诱导发酵 24 h。

1.5 蛋白的分离纯化

测量发酵结束后发酵液的菌体浓度 OD_{600} ，将发酵液离心，*E. coli* BL21(DE3)/pET24a(+)-ICCG 菌株发酵上清即为角质酶 ICCG 的粗酶

液;其余重组菌株收集菌体,用 100 mmol/L 的磷酸钾缓冲液(pH 8.0)重悬菌体,保证菌体浓度 OD_{600} 在 20–30,高压匀浆破壁机进行破壁至菌液透明且不黏稠,离心收集破壁上清,即为 TfCut、Dura-PEase、Tcur0390 和 Est119 的粗酶液。用结合液平衡镍柱,低流速上样,依次用咪唑浓度为 15、30、60、90 和 150 mmol/L 的洗脱液除去杂蛋白,然后用洗脱液洗脱下目的蛋白。

1.6 聚酯的降解

将 PBS (不含 BT)、PBAT(M) (BT 含量适中)、PBAT(H) (BT 含量高)、PBT (酸部分全部为 BT)等塑料颗粒分别放入粉碎机内,倒入液氮冷却后打碎,然后过 60 目筛,收集筛下的颗粒。在反应瓶中分别加入 200 mg 的聚酯颗粒与 2 mg 纯化角质酶,在 100 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 8.0)中混合至总反应体系为 10 mL,并于 60 °C、200 r/min 恒温水浴摇床反应 48 h,其间使用 6 mol/L NaOH 每间隔 12 h 维持一次 pH 8.0。

1.7 降解体系的优化

最适温度:按 1.6 中的反应方法,将其置于不同温度(55–80 °C)的水浴摇床中反应 48 h,取样与甲醇稀释后进行 HPLC 检测,研究其最适温度。

最适缓冲液类型:在最适温度下,降解体系中缓冲体系分别为 100 mmol/L、pH 8.0 的不同缓冲液类型:PB 缓冲液、Tris-HCl 缓冲液、Gly-NaOH 缓冲液和 mcilvaine 缓冲液,将其置于水浴摇床中反应 48 h,取样与甲醇稀释后进行 HPLC 检测,研究其最适缓冲液类型。

最适 pH:在最适温度和最适缓冲液类型下,底物浓度为 2%,通过 HPLC 测定 100 mmol/L pH 5.0–9.0 降解体系中生成的 TPA 单体的量,研究其最适 pH。

最适酶/底物(enzyme to substrate, E/S):在

最适温度、最适缓冲液类型和最适 pH 条件下,通过改变加酶量和底物浓度来研究最适 E/S。

1.8 高效液相色谱(HPLC)测定降解终产物

1.8.1 高效液相色谱(HPLC)测定对苯二甲酸含量

反应结束后取 0.5 mL 反应液,离心取上清,加入甲醇稀释后,过 0.22 μ m 滤膜,滤液进行 HPLC 分析。

色谱条件:Agilent 1200 HPLC 色谱仪,Agilent 自动进样器,Athena C18-WP, 100 Å, 4.6 mm×250 mm, 5 μ m 色谱柱,Agilent 紫外检测器,检测波长为 240 nm,流动相为无水甲醇和 1% (质量体积分数)的乙酸水溶液按 35%:65%混合,柱温设定为 30 °C,流速为 0.5 mL/min。

1.8.2 高效液相色谱(HPLC)测定丁二酸含量

反应结束后取 0.5 mL 反应液,离心取上清,加入水稀释后,过 0.22 μ m 滤膜,滤液进行 HPLC 分析。

色谱条件:Agilent 1200 HPLC 色谱仪,Agilent 自动进样器,Aminex HPX-87H, 7.8 mm×300 mm 色谱柱,Agilent 视差检测器,流动相采用 5 mmol/L 硫酸,柱温设定为 35 °C,流速为 0.6 mL/min。

1.8.3 降解率的计算

通过计算产物峰面积与标准品峰面积的百分比进行定量。

PBAT 降解率按以下公式计算:PBAT 解聚率(%)= $A/(B \times C) \times 100$ 。

式中, A 是降解体系中释放的 TPA 的质量; B 是用 20% NaOH 全降解 PBAT 时,确定的 TPA 的占比百分数; C 是降解体系中 PBAT 量。

PBS 降解率按以下公式计算:PBS 解聚率(%)= $D \times 172/118/E \times 100$ 。

式中, D 是产生丁二酸(S)的质量;172 是

PBS 单体丁二酸-丁二醇酯的分子量; 118 是丁二酸分子量; E 是反应体系中 PBS 的量。

2 结果与分析

2.1 不同来源聚酯降解酶的表达

五种聚酯降解酶 pET24a(+)-ICCG、pET24a(+)-TfCut、pET24a(+)-PETase、pET24a(+)-Est119、pET24a(+)-Tcur0390 发酵表达后, 收集菌体, 高压匀浆破壁机破壁, 离心留上清, 即为粗酶液。用镍柱纯化制备纯酶, SDS-PAGE 分析结果如图 2 所示。角质酶 ICCG、Dura-PETase、TfCut、Tcur0390、Est119 预测蛋白大小分别为 28.8、30.3、28.3、31.2、30.0 kDa, 与蛋白条带所处位置基本一致。

2.2 不同来源聚酯降解酶对 PBAT 的降解性能分析

按 1.6 中所述方法, 对比 5 种不同来源的聚酯降解酶对 PBAT(H) 的降解, 以降解体系中释放的 TPA 单体为检测对象, 降解结果如图 3 所示, 根据 HPLC 结果分析, 在同一降解条件下, 角质酶 ICCG 对 PBAT(H) 的降解效果优于其他 4 种酶, 在 48 h 内降解体系中释放的 TPA 单体为 27.30 mg, 所以选择角质酶 ICCG 对 PBAT(H) 进行降解。

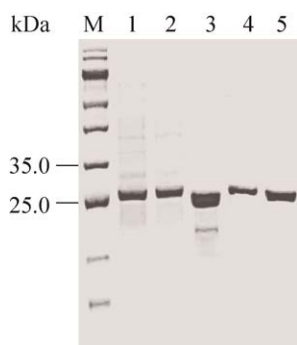


图 2 五种不同来源聚酯降解酶的 SDS-PAGE 分析
Figure 2 SDS-PAGE analysis of purified protein. M: Standard molecular weight protein; 1: ICCG; 2: Dura-PETase; 3: TfCut; 4: Tcur0390; 5: Est119.

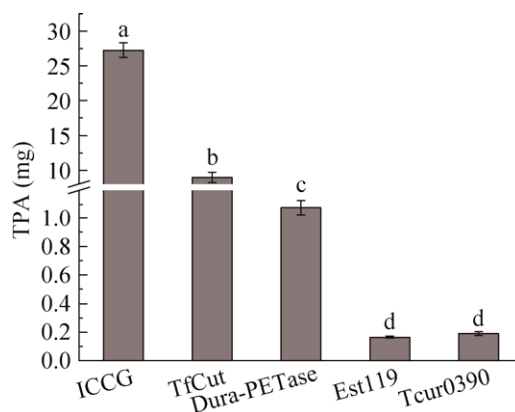


图 3 五种不同来源的聚酯降解酶对 PBAT(H) 的降解

Figure 3 Degradation of PBAT(H) by polyester degrading enzymes from five different origins. Each test was repeated three times in parallel, and the results were expressed as " $\bar{x} \pm s$ ". Bars marked with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

2.3 BT 含量对 PBAT 降解的影响

从 PBAT 结构可知, PBAT 由硬链段 BT 和软链段 BA 组成, 而其生物降解性与 BT 有关^[25]。为比较 BT 含量对其降解的影响, 选取了 4 种不同的材料: 不含 BT 的 PBS、BT 含量适中的 PBAT(M)、BT 含量较高的 PBAT(H)、全部为 BT 的 PBT。分别用 20% NaOH 全降解 PBAT(M) 和 PBAT(H), 确定两种 PBAT 中 BT 的含量, 降解结果如图 4A 所示, 根据 HPLC 结果分析, PBAT(M) 中 TPA 的平均质量占比为 37.95%, 即 BT (mol):BA (mol)=1:1; PBAT(H) 中 TPA 的平均质量占比为 51.04%, 即 BT (mol):BA (mol)=2:1。按 1.6 中所述方法, 角质酶 ICCG 分别对 PBS、PBAT(M)、PBAT(H)、PBT 进行降解, 降解结果如图 4B 所示, HPLC 结果显示, 48 h 内的降解速率由高到低排列分别是 PBS>PBAT(M)>PBAT(H)>PBT, 可见在 PBAT 中 BT 含量对 PBAT 的生物降解性有影响, BT 含量越高, PBAT 降解率越低, 因此本研究选取 BT 含量较

高降解率较低的 PBAT(H)作为后续优化降解体系的底物。在图 4B 中 48 h 时降解率没有提升, 由于酶在促进 PBAT(H)降解过程中产生了对苯二甲酸-丁二醇单酯[mono (4-hydroxybutyl)ester, MHBT]中间体和单体混合物, 其中 MHBT 中间体可竞争性地结合到酶与底物的结合位点, 从而抑制底物的进一步降解^[26-27], 2016 年 Barth 等观察到的角质酶 ICCG 活性可被聚对苯二甲酸乙二醇酯(polyethylene terephthalate, PET)降解的中间产物对苯二甲酸-乙二醇单酯[mono (2-hydroxyethyl)ester, MHET]抑制, 并且 MHBT 与 MHET 结构类似, 所以此实验结果与 Barth 等的观察结果一致^[28]。

2.4 角质酶 ICCG 对 PBAT(H)降解体系的优化

2.4.1 最适反应温度

按 1.7 中所述方法, 测定角质酶 ICCG 在 55–80 °C 对 PBAT(H)的降解效果。角质酶 ICCG 降解 PBAT(H)释放的 TPA 单体在 55–75 °C 条件下随温度增加逐步增高, 温度超过 75 °C 时体系中释放的 TPA 单体在逐步降低, 75 °C 条件下反应液中释

放的 TPA 单体最多, 对 PBAT(H)的降解效率最高, 所以 75 °C 为角质酶降解的最适温度(图 5)。

2.4.2 缓冲液类型优化

按 1.7 中所述方法, 在 75 °C 的条件下, 分别测定不同缓冲液类型(100 mmol/L、pH 8.0 的 PB、Tris-HCl、Gly-NaOH 和 mcilvaine)对降解的影响。根据 HPLC 结果分析(图 6A), 在 Tris-HCl 缓冲体系下降解释放的单体 TPA 含量最高, 说明在此缓冲液下降解率最高, Tris-HCl 缓冲液为最适缓冲液。

2.4.3 pH 优化

按 1.7 中所述方法测定角质酶 ICCG 在 75 °C, Tris-HCl 缓冲体系中 pH 在 5.0–9.0 的范围中对 PBAT(H)的降解效率。随着 pH 的增高, 角质酶 ICCG 降解 PBAT(H)释放 TPA 单体的含量增高, 降解效率提高(图 6B), 当 pH 为 9.0 时, 释放的 TPA 单体量最多, 为最适 pH。

2.4.4 E/S 优化

按 1.6 中反应体系测定角质酶 ICCG 在 75 °C, pH 9.0, Tris-HCl 缓冲体系中对 PBAT(H)降解的最适 E/S (通过固定底物浓度为 2%, 改

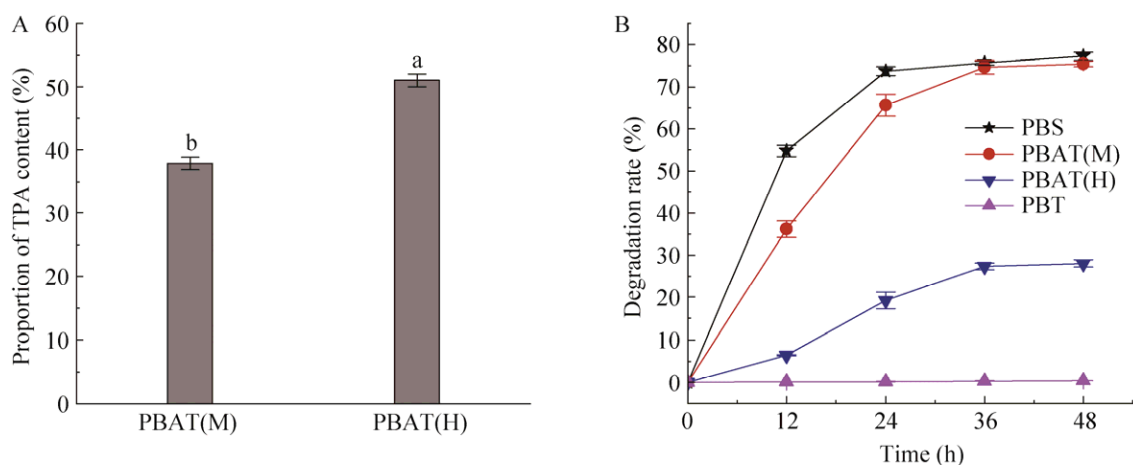


图 4 两种不同 PBAT 中 TPA 的质量占比(A)及角质酶 ICCG 对含有不同 TPA 含量的底物的降解(B)

Figure 4 Mass proportion of TPA in two different PBAT(A) and the degradation of substrates containing different TPA contents by cutinase ICCG (B). Each test was repeated three times in parallel, and the results were expressed as " $\bar{x} \pm s$ ". Bars marked with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

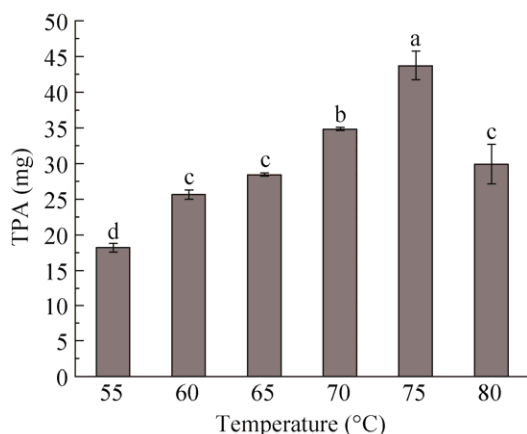


图5 反应温度对角质酶 ICCG 降解 PBAT(H)效率的影响

Figure 5 Effect of reaction temperature on the degradation rate of ICCG on PBAT(H). Each test was repeated three times in parallel, and the results were expressed as " $\bar{x} \pm s$ ". Bars marked with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

变加酶量的方式来确定最适 E/S)。液相结果如图 7A 所示, 当 E/S 为 0.4%、0.8%和 1.0% 时 48 h 降解体系中释放 TPA 单体的量几乎相同, PBAT(H)的降解速率几乎不变, 所以最适 E/S 为 0.4%。在此条件下, 进行底物浓度的优

化(图 7B), 当体系中底物浓度小于 1.0%时, PBAT 的降解率基本一致;当体系中底物浓度大于 1.0%时, PBAT(H)的降解率随着底物浓度的升高逐渐降低, 所以本降解体系的最适底物浓度是 1.0%, 降解率为 77.5%。

3 讨论

虽然 PBAT 属于生物可降解材料, 但有研究表明其在特定条件下才能达到较好的降解效果, 实际应用过程中其降解情况并不理想。据报道, 目前对 PBAT 有降解效果的酶[如来源于肉毒梭状芽孢杆菌(*Clostridium botulinum*)的酯酶 Cbotu_EstA 和 Cbotu_EstB^[29]; 来源于高温真菌特异腐质霉(*Humicola insolens*)的角质酶 Hic^[30]; 来源于类产碱假单胞菌(*Pseudomonas pseudoalcaligenes*)的酯酶 PpEst^[31]; 来源于南极假丝酵母(*Candida antarctica*)的脂肪酶 B (CALB)^[3]等], 对 PBAT 的降解效果并不显著, 短时间内仅对 PBAT 造成极小的重量损失。因此, 提高酶对 PBAT 的降解成为目前急需解决的问题。

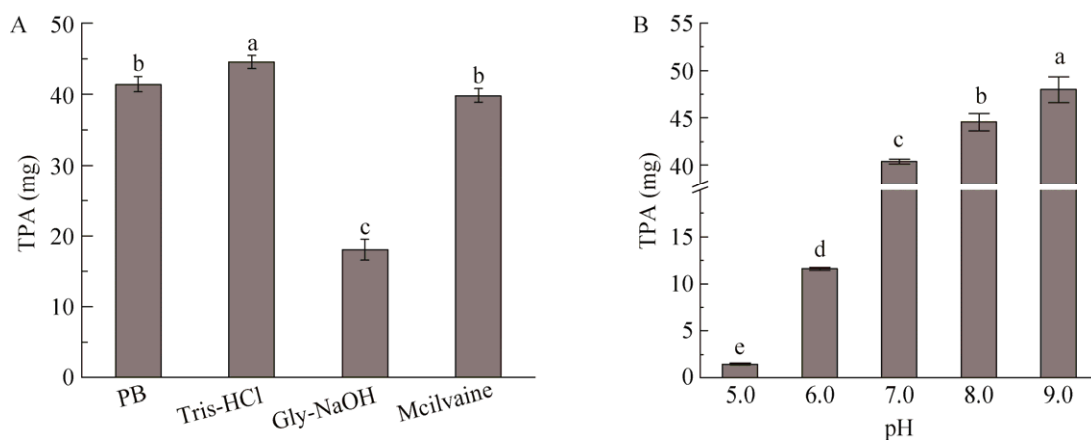


图6 角质酶 ICCG 对 PBAT(H)降解的最适缓冲液类型(A)和最适 pH (B)

Figure 6 The optimal buffer type (A) and pH (B) of cutinase ICCG for PBAT(H) degradation. Each test was repeated three times in parallel, and the results were expressed as " $\bar{x} \pm s$ ". Bars marked with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

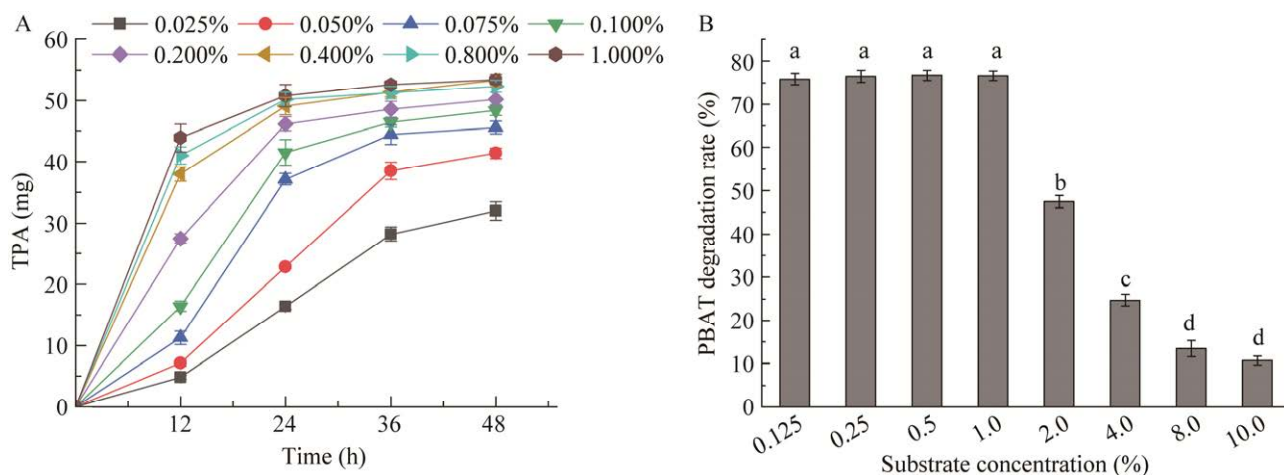


图7 角质酶 ICCG 对 PBAT(H)降解的最适 E/S (A)和最适底物浓度(B)

Figure 7 Optimum E/S (A) and substrate concentration (B) of cutinase ICCG for PBAT(H) degradation. Each test was repeated three times in parallel, and the results were expressed as " $\bar{x} \pm s$ ". Bars marked with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

本研究通过对比 5 种不同来源的聚酯降解酶对 PBAT 进行降解, 其中来源于枝叶堆肥 (leaf-branch compost) 中的角质酶 LCC 的突变体 ICCG 是降解效果最优的酶; 并且通过角质酶 ICCG 对 4 种不同 BT 含量的材料 [PBS、PBAT(M)、PBAT(H) 和 PBT] 分别进行降解, 其结果表明 48 h 内的降解速率由大到小排列分别是 PBS>PBAT(M)>PBAT(H)>PBT, 表明 PBAT 的生物降解速率取决于其 BT 的含量, BT 含量越高降解速率越低, 这与早前关于芳香族聚酯降解性能评估的相关研究结论相一致^[32-33]; 最后选取了 BT 含量较高降解率较低的 PBAT(H) 作为底物, 进行角质酶 ICCG 降解体系的优化, 得出最适温度为 75 °C; 最适缓冲液类型为 Tris-HCl; 最适 pH 9.0; 最适 E/S=0.4%; 最适底物浓度 1.0%; 在此最优体系下 ICCG 对 PBAT(H) 在 48 h 的降解率可达 77.5%。

本研究为角质酶 ICCG 对 PBAT 的降解, 以及 BT 含量对 PBAT 生物降解性的影响提供了实验证据, 有助于实现 PBAT 在短时间内快速降解的目标, 对 PBAT 生物降解技术的开发和

PBAT 材料的应用起到了推广作用。

REFERENCES

- [1] BAMBINO K, CHU J. Zebrafish in toxicology and environmental health[J]. *Current Topics in Developmental Biology*, 2017, 124: 331-367.
- [2] KHARE S, PRAKASH O. Current developments in biotechnology and bioengineering: production, isolation and purification of industrial products[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2017, 158: 380-381.
- [3] KANWAL A, ZHANG M, SHARAF F, LI CT. Enzymatic degradation of poly(butylene adipate co-terephthalate) (PBAT) copolymer using lipase B from *Candida antarctica* (CALB) and effect of PBAT on plant growth[J]. *Polymer Bulletin*, 2022, 79(10): 9059-9073.
- [4] BORDES P, POLLET E, AVEROUS L. Nano-biocomposites: biodegradable polyester/nanoclay systems[J]. *Progress in Polymer Science*, 2009, 34(2): 125-155.
- [5] EuropeanBioplastics. BioplasticsMarketData. 2021 [2022-11-28]. <https://www.european-bioplastics.org/market/>.
- [6] MAZHANDU ZS, MUZENDA E, MAMVURA TA, BELAID M, NHUBU T. Integrated and consolidated review of plastic waste management and bio-based biodegradable plastics: challenges and opportunities[J]. *Sustainability*, 2020, 12(20): 8360.

- [7] SONG JH, MURPHY RJ, NARAYAN R, DAVIES GBH. Biodegradable and compostable alternatives to conventional plastics[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences, 2009, 364(1526): 2127-2139.
- [8] LARRAÑAGA A, LIZUNDIA E. A review on the thermomechanical properties and biodegradation behaviour of polyesters[J]. European Polymer Journal, 2019, 121: 109296.
- [9] SAADI Z, CESAR G, BEWA H, BENGUIGUI L. Fungal degradation of poly(butylene adipate-co-terephthalate) in soil and in compost[J]. Journal of Polymers and the Environment, 2013, 21(4): 893-901.
- [10] CHAMAS A, MOON H, ZHENG JJ, QIU Y, TABASSUM T, JANG JH, ABU-OMAR M, SCOTT SL, SUH S. Degradation rates of plastics in the environment[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2020, 8(9): 3494-3511.
- [11] DELACUVELLERIE A, BENALI S, CYRIAQUE V. Microbial biofilm composition and polymer degradation of compostable and non-compostable plastics immersed in the marine environment[J]. Journal of Hazardous Materials, 2021, 419: 126526.
- [12] 张颖, 刘展志, 李光耀, 付雪妮, 张钰成, 王志远, 田亚平, 吴敬. 碳水化合物结合模块-嗜热子囊菌角质酶融合蛋白在 PET 降解中的应用[J]. 生物工程学报, 2022, 38(1): 217-225.
- ZHANG Y, LIU ZZ, LI GY, FU XN, ZHANG YC, WANG ZY, TIAN YP, WU J. The application of carbohydrate binding module-*Thermobifida fusca* cutinase fusion protein in polyethylene terephthalate degradation[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(1): 217-225 (in Chinese).
- [13] BAUER TL, BUCHHOLZ PCF, PLEISS J. The modular structure of α/β -hydrolases[J]. The FEBS Journal, 2020, 287(5): 1035-1053.
- [14] CHEN S, SU L, CHEN J. Cutinase: characteristics, preparation, and application[J]. Biotechnology Advances, 2013, 31(8): 1754-1767.
- [15] JIA H, ZHANG M, WENG Y. Degradation of poly(butylene adipate-co-terephthalate) by *Stenotrophomonas* sp. YCJ1 isolated from farmland soil[J]. Journal of Environmental Sciences, 2021, 103: 50-58.
- [16] GAN ZH, KUWABARA K, YAMAMOTO M. Solid-state structures and thermal properties of aliphatic-aromatic poly(butylene adipate-co-butylene terephthalate) copolyesters[J]. Polymer Degradation and Stability, 2004, 83(2): 289-300.
- [17] SULAIMAN S, YAMATO S, KANAYA E, KIM JJ, KOGA Y, TAKANO K, KANAYA S. Isolation of a novel cutinase homolog with polyethylene terephthalate-degrading activity from leaf-branch compost by using a metagenomic approach[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(5): 1556-1562.
- [18] TOURNIER V, TOPHAM CM, GILLES A, DAVID B, FOLGOAS C, MOYA-LECLAIR E, KAMIONKA E, DESROUSSEAU ML, TEXIER H, GAVALDA S, COT M, GUÉMARD E, DALIBEY M, NOMME J, CIOCI G, BARBE S, CHATEAU M, ANDRÉ I, DUQUESNE S, MARTY A. An engineered PET depolymerase to break down and recycle plastic bottles[J]. Nature, 2020, 580(7802): 216-219.
- [19] THUMARAT U, NAKAMURA R, KAWABATA T, SUZUKI H, KAWAI F. Biochemical and genetic analysis of a cutinase-type polyesterase from a thermophilic *Thermobifida alba* AHK119[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 95(2): 419-430.
- [20] HU XP, THUMARAT U, ZHANG X, TANG M, KAWAI F. Diversity of polyester-degrading bacteria in compost and molecular analysis of a thermoactive esterase from *Thermobifida alba* AHK119[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87(2): 771-779.
- [21] MÜLLER RJ, SCHRADER H, PROFE J, DRESLER K, DECKWER WD. Enzymatic degradation of poly(ethylene terephthalate): rapid hydrolyse using a hydrolase from *T. fusca*[J]. Macromolecular Rapid Communications, 2005, 26(17): 1400-1405.
- [22] CUI YL, CHEN YC, LIU XY, DONG SJ, TIAN YE, QIAO YX, MITRA R, HAN J, LI CL, HAN X, LIU WD, CHEN Q, WEI WQ, WANG X, DU WB, TANG SY, XIANG H, LIU HY, LIANG Y, HOUKN, et al. Computational redesign of a PETase for plastic biodegradation under ambient condition by the GRAPE strategy[J]. ACS Catalysis, 2021, 11(3): 1340-1350.
- [23] WEI R, OESER T, THEN J, KÜHN N, BARTH M, SCHMIDT J, ZIMMERMANN W. Functional characterization and structural modeling of synthetic polyester-degrading hydrolases from *Thermomonospora curvata*[J]. AMB Express, 2014, 4: 44.
- [24] CHEN XQ, GUO ZY, WANG L. Directional-path modification strategy enhances PET hydrolase

- catalysis of plastic degradation[J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 433: 128816.
- [25] MARTEN E, MÜLLER RJ, DECKWER WD. Studies on the enzymatic hydrolysis of polyesters. II. Aliphatic-aromatic copolyesters[J]. Polymer Degradation and Stability, 2005, 88(3): 371-381.
- [26] BARTH M. Effect of hydrolysis products on the enzymatic degradation of polyethylene terephthalate nanoparticles by a polyester hydrolase from *Thermobifida fusca*[J]. Biochemical Engineering Journal, 2015, 93: 222-228.
- [27] MEYER CIFUENTES IE, WU P, ZHAO YP, LIU WD, NEUMANN-SCHAAL M, PFAFF L, BARYS J, LI ZS, GAO J, HAN X, BORNSCHEUER UT, WEI R, ÖZTÜRK B. Molecular and biochemical differences of the tandem and cold-adapted PET hydrolases Ple628 and Ple629, isolated from a marine microbial consortium[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2022, 10: 930140.
- [28] BARTH M, HONAK A, OESER T, WEI R, BELISÁRIO-FERRARI MR, THEN J, SCHMIDT J, ZIMMERMANN W. A dual enzyme system composed of a polyester hydrolase and a carboxylesterase enhances the biocatalytic degradation of polyethylene terephthalate films[J]. Biotechnology Journal, 2016, 11(8): 1082-1087.
- [29] PERZ V, BAUMSCHLAGER A, BLEYMAIER K, ZITZENBACHER S, HROMIC A, STEINKELLNER G, PAIRITSCH A, ŁYSKOWSKI A, GRUBER K, SINKEL C, KÜPER U, RIBITSCH D, GUEBITZ GM. Hydrolysis of synthetic polyesters by *Clostridium botulinum* esterases[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2016, 113(5): 1024-1034.
- [30] PERZ V. Substrate specificities of cutinases on aliphatic-aromatic polyesters and on their model substrates[J]. New Biotechnology, 2016, 33(2): 295-304.
- [31] WALLACE PW, HAERNVALL K, RIBITSCH D, ZITZENBACHER S, SCHITTMAYER M, STEINKELLNER G, GRUBER K, GUEBITZ GM, BIRNER-GRUENBERGER R. PpEst is a novel PBAT degrading polyesterase identified by proteomic screening of *Pseudomonas pseudoalcaligenes*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(6): 2291-2303.
- [32] WITT U, -J MÜLLER R, -D DECKWER W. Evaluation of the biodegradability of copolyesters containing aromatic compounds by investigations of model oligomers[J]. Journal of Environmental Polymer Degradation, 1996, 4(1): 9-20.
- [33] MÜLLER RJ, WITT U, RANTZE E. Architecture of biodegradable copolyesters containing aromatic constituents[J]. Polymer Degradation and Stability, 1998, 59(1/2/3): 203-208.

(本文责编 陈宏宇)