

· 塑料解聚酶的设计与改造 ·

侯颖 博士，河南科技大学副教授、硕士生导师。主要从事环境微生物和食品微生物资源开发与利用方面的研究，主持和参与完成国家自然科学基金项目多项，以第一作者和通讯作者发表论文 30 余篇，获得(参与)国家授权专利 10 余项，参编著作 1 部，教材 2 部。



刘卫东 博士，中国科学院天津工业生物技术研究所研究员、博士生导师。主要利用 X-射线晶体学技术对酶类生物催化剂进行晶体结构解析及性能改造研究。主持和参与多项国家自然科学基金项目、国家重点研发计划等项目的研究。以第一作者和通讯作者在 *Nature Communications*、*Angewandte Chemie*、*ACS Catalysis*、*ChemBioChem* 等期刊上发表研究论文 20 余篇。



来源于嗜热氢化杆菌的新型对苯二甲酸双(羟乙)酯水解酶的表达纯化与酶学性质

陈阳阳^{1,2}，高健^{2,3}，赵夷培^{2,4}，王浩^{2,5}，韩旭^{2,3}，张洁^{2,3}，顾群^{2,3,5}，侯颖^{1*}，刘卫东^{1,2,3,5*}

1 河南科技大学食品与生物工程学院，河南 洛阳 471000

2 中国科学院天津工业生物技术研究所 工业酶国家工程研究中心，天津 300308

3 国家合成生物技术创新中心，天津 300308

4 天津科技大学生物工程学院，天津 300457

5 中国科学院大学，北京 100049

陈阳阳，高健，赵夷培，王浩，韩旭，张洁，顾群，侯颖，刘卫东. 来源于嗜热氢化杆菌的新型对苯二甲酸双(羟乙)酯水解酶的表达纯化与酶学性质[J]. 生物工程学报, 2023, 39(5): 2015-2026.

CHEN Yangyang, GAO Jian, ZHAO Yipei, WANG Hao, HAN Xu, ZHANG Jie, GU Qun, HOU Ying, LIU Weidong. Expression, purification and characterization of a novel bis(hydroxyethyl) terephthalate hydrolase from *Hydrogenobacter thermophilus*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(5): 2015-2026.

资助项目：国家重点研发计划(2021YFC2103200)；国家自然科学基金(31400098)；天津市合成生物技术创新能力提升行动(TSBICIP-PTJJ-008, TSBICIP-KJGG-009, TSBICIP-KJGG-002, TSBICIP-IJCP-003)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2103200), the National Natural Science Foundation of China (31400098), and the Tianjin Synthetic Biotechnology Innovation Capacity Improvement Project (TSBICIP-PTJJ-008, TSBICIP-KJGG-009, TSBICIP-KJGG-002, TSBICIP-IJCP-003).

*Corresponding authors. E-mail: HOU Ying, houying76@126.com; LIU Weidong, E-mail: liu_wd@tib.cas.cn

Received: 2022-11-24; Accepted: 2023-01-19

摘要:石化来源的聚对苯二甲酸乙二醇酯(polyethylene terephthalate, PET)被广泛用于矿泉水瓶、食品包装和纺织品等领域,因其在自然界中不易分解,大量使用后的PET废弃物造成了严重的环境污染与资源浪费。使用生物酶法对PET废弃物进行解聚,并对解聚产物进行升级循环利用是进行塑料污染治理的重要方向之一,其中关键的是PET水解酶的解聚效率。对苯二甲酸双(羟乙基)酯(bis(hydroxyethyl) terephthalate, BHET)是PET生物酶解的中间产物,其累积是限制PET水解酶催化效率的一个重要因素,BHET水解酶和PET水解酶的联用能提升PET的整体水解效率。来源于嗜热氢化杆菌(*Hydrogenobacter thermophilus*)的双烯内酯酶(HtBHETase)对BHET有显著水解效果,将该酶在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中进行重组表达并纯化后,对其酶学性质进行了研究。结果显示,HtBHETase对短碳链的酯类如对硝基苯酚乙酸酯催化活性较高,HtBHETase以BHET为底物时的最适反应pH值和最适反应温度分别为5.0和55 °C;该酶有较好的热稳定性,经80 °C的条件处理1 h仍能保持80%以上活性,显示出了良好的热稳定性,HtBHETase有在PET塑料生物解聚中使用的潜力,本研究为推动生物酶法降解PET提供了新的参考。

关键词:对苯二甲酸双(羟乙基)酯;水解酶;表达纯化;酶学性质

Expression, purification and characterization of a novel bis(hydroxyethyl) terephthalate hydrolase from *Hydrogenobacter thermophilus*

CHEN Yangyang^{1,2}, GAO Jian^{2,3}, ZHAO Yipei^{2,4}, WANG Hao^{2,5}, HAN Xu^{2,3}, ZHANG Jie^{2,3}, GU Qun^{2,3,5}, HOU Ying^{1*}, LIU Weidong^{1,2,3,5*}

1 College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471000, Henan, China

2 National Engineering Center for Industrial Enzymes, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

3 National Technology Innovation Center of Synthetic Biology, Tianjin 300308, China

4 College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

5 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: PET (polyethylene terephthalate) is one of the most important petrochemicals that is widely used in mineral water bottles, food and beverage packaging and textile industry. Because of its stability under environmental conditions, the massive amount of PET wastes caused serious environmental pollution. The use of enzymes to depolymerize PET wastes and upcycling is one of the important directions for plastics pollution control, among which the key is the depolymerization efficiency of PET by PET hydrolase. BHET (bis(hydroxyethyl) terephthalate) is the main intermediate of PET hydrolysis, its accumulation can hinder the degradation efficiency of PET hydrolase significantly, and the synergistic use of PET hydrolase and BHET hydrolase can improve the PET hydrolysis efficiency. In this study, a dienolactone hydrolase from *Hydrogenobacter thermophilus* which can degrade BHET (HtBHETase) was identified. After heterologous expression in *Escherichia coli* and purification, the enzymatic

properties of *Ht*BHETase were studied. *Ht*BHETase shows higher catalytic activity towards esters with short carbon chains such as *p*-nitrophenol acetate. The optimal pH and temperature of the reaction with BHET were 5.0 and 55 °C, respectively. *Ht*BHETase exhibited excellent thermostability, and retained over 80% residual activity after treatment at 80 °C for 1 hour. These results indicate that *Ht*BHETase has potential in biological PET depolymerization, which may facilitate the enzymatic degradation of PET.

Keywords: bis(hydroxyethyl) terephthalate (BHET); hydrolase; expression and purification; enzymatic properties

合成塑料是指以各种石化来源的单体为原料通过加聚或缩合形成的高分子聚合物,聚酯类塑料聚对苯二甲酸乙二醇酯(polyethylene terephthalate, PET)因其应用价值成为使用最广泛的塑料之一。PET 的全球年消费量已超过 6 000 万 t, 仅次于聚乙烯(polyethylene, PE)^[1]。PET 由对苯二甲酸(terephthalic acid, TPA)和乙二醇(ethylene glycol, EG)通过酯键缩合而成,在自然环境下难以被微生物等降解,大量塑料废弃物对生态环境造成了较严重的影响。PET 塑料废弃物的回收利用根据所用方法不同可分为机械回收、化学回收和生物回收,其中机械回收法是目前最常用的回收方式,但回收产物性能降低,且难以去除污染物,导致仅能降级使用;化学法是处理过程需要有机溶剂和较高温度,且易产生副产物,导致成本较高;生物法则因反应条件温和、选择性高且绿色环保等优势成为最有潜力的方式^[2-3]。

近年来 PET 等塑料的生物降解获得越来越多的关注,许多 PET 塑料降解酶被筛选和鉴定出来,如酯酶(esterase)、脂肪酶(lipase)和角质酶(cutinase)^[4]等。来自丝状放线菌(*Thermobifida fusca*)的角质酶 Tfh (*Thermobifida fusca* hydrolase)是较早报道的能降解 PET 塑料的酶^[5];以 PET 塑料为主要能量和唯一碳源的 PET 降解菌 *Ideonella sakaiensis* 201-F6^[6]中有两个塑料解聚

相关的酶, *Is*PETase 能将 PET 解聚成小片段,再经过对苯二甲酸单(羟乙基)酯(monohydroxyethyl terephthalate, MHET)水解酶 *Is*MHETase 的作用,最终转化为 TPA 和 EG 单体,来源于叶枝堆肥宏基因的角质酶 LCC^[7]的变体可在 10 h 内以快速解聚非晶化 PET。PET 塑料生物法解聚生成的单体经回收后可用于其他产品的再合成,从而使塑料废弃物升级循环利用。近年来, PET 水解酶的催化机制、结构功能关系和定向改造等方面研究愈发深入^[8],已产生许多具有优异性质的突变体^[9-10]。对苯二甲酸双(羟乙基)酯(bis(hydroxyethyl) terephthalate, BHET)和 MHET 是 PET 酶法解聚的主要中间体,其积累不但会抑制 PET 水解酶的降解效率^[11-14],更会提高下游分离难度和成本。BHET 水解酶可以将 BHET 分解为 MHET 和 EG,再进一步水解为单体 TPA 和 EG,对后续单体回收以及再合成有极大的帮助。来源于 PET 塑料降解菌 *Ideonella sakaiensis* 的 *Is*MHETase^[6],来自氧化硫代单胞菌(*Comamonas thiooxydans*)和氢噬菌(*Hydrogenophaga* sp.)的 MHETase 类似酶^[15]以及来源于海洋微生物基因组的 Mle046 等酶^[16]均能水解 MHET,产生降解单体 TPA 和 EG。将能降解长链 PET 的 PETase 和降解短链 MHET 的 MHETase 进行组合,可以使 PET 酶解效率显著提高^[15],这将有助于 PET 废弃物更

有效的循环利用^[17]。

双烯内酯酶(dienolactone hydrolase)属于 α/β 水解酶家族,在蛋白质结构上与脂肪酶相似,具有保守的Cys/Ser-Asp-His三联体结构,但在底物特异性方面有较大差异,该类酶相比脂肪酶更倾向于水解链长较小的底物,因此这类酶中可能存在能对短链PET降解中间产物有降解效果的酶。在前期对PET降解酶相关工作的基础上,本研究对双烯内酯酶进行了筛选挖掘,来源于嗜热氢杆菌(*Hydrogenobacter thermophilus*)的HtBHETase能水解BHET,对其表达纯化后进行了酶学性质及热稳定性研究,为后续进行PET酶法解聚回收奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司;异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG)购自北京索莱宝科技有限公司;预制聚丙烯酰胺凝胶购自金斯瑞生物科技股份有限公司;BHET ($C_{12}H_{14}O_6$, Mw 254.24 g/mol, cas: 959-26-2), TPA ($C_8H_6O_4$, Mw 166.13 g/mol, cas: 100-21-0)购自Sigma公司;对硝基苯酯及其他试剂均为国产分析纯。

1.2 质粒构建

N端带有烟草蚀纹病毒(tobacco etch virus, TEV)酶切位点的HtBHETase基因序列由华大基因进行合成,并连接到pET-32a载体上,标记为pET-32a-TEV-HtBHETase。

1.3 HtBHETase 序列分析

根据已知的HtBHETase氨基酸序列,使用ExPasy在线工具ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)预测了解HtBHETase的基本理化性质,并于NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/)上

对其进行序列比对,获得其同源性序列,然后使用MEGA软件以邻接法(neighbor-joining method)构建HtBHETase系统进化树。

1.4 HtBHETase 异源表达纯化

将构建好的pET-32a-TEV-HtBHETase质粒转入*E. coli* BL21(DE3)感受态细胞,使用LB (Luria-Bertani)培养基于37℃培养至 OD_{600} 值为0.6–0.8,随后降温至16℃并添加0.3 mmol/L IPTG诱导20 h。离心收集菌体,使用含有25 mmol/L Tris-HCl、150 mmol/L NaCl和20 mmol/L 咪唑(pH 8.0)的缓冲液重悬细胞后,在4℃条件下进行高压破碎。17 000×g高速离心1 h去除细胞碎片,获得的粗酶液使用快速蛋白质液相层析系统(fast protein liquid chromatography, FPLC, GE Healthcare),通过镍离子亲和层析柱(Ni-NTA)进行纯化。向纯化后的酶蛋白中加入少量的TEV酶切掉其载体的组氨酸(6×His)和硫氧还蛋白(thioredoxin, Trx)标签。透析后再经过Ni-NTA亲和层析柱进一步进行纯化,最后获得的目的蛋白经浓缩储存于25 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, pH 8.0的缓冲液中。通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分析蛋白质的纯化情况,并用BCA试剂盒测定蛋白质浓度。浓缩后的蛋白质保存于–80℃。

1.5 HtBHETase 对 BHET 的水解活性鉴定

1.5.1 水解活性初步鉴定

将商业化的片状BHET研磨成粉末,取100 mL 100 mmol/L Tris-HCl缓冲液(pH 8.0),加入1 g 琼脂糖,微波加热至完全溶解,加入适量BHET粉末,混匀后倒成厚度约为20 mm的平板,待其凝固后即制成BHET塑料测活平板。在平板上挖出小孔并接入适量酶液,以加入等量缓冲液的孔作为空白对照,于30℃恒

温放置,观察是否有水解圈产生。

1.5.2 BHET 的水解产物分析

以高效液相色谱法确定 *Ht*BHETase 的 BHET 水解产物。使用 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)反应缓冲液,配制 1 mmol/L 的 BHET 溶液(含 20%二甲亚砜助溶),取 990 μ L 作为反应底物,添加 10 μ L 酶蛋白,400 r/min 反应 24 h。经 0.22 μ m 滤膜过滤后,使用配备有 Welch Ultimate XB-C18 柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m)的 Agilent1260 高效液相色谱系统(high performance liquid chromatography, HPLC)分析。柱温:30 $^{\circ}$ C,流动相:19%的乙腈,81%甲酸水(体积比)溶液,流速:0.8 mL/min,进样量:10 μ L,检测波长:254 nm。每个反应均进行 3 次平行实验。

1.6 *Ht*BHETase 的酶学性质研究

1.6.1 活性的测定

对硝基苯酚-标准曲线的制作,将 27.62 mg 对硝基苯酚溶解于 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)缓冲液中,制成 2 mmol/L 的母液稀释成不同浓度(0.05、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 mmol/L),测定 OD_{410} 值,用缓冲液作为空白,以吸光值为纵坐标,对硝基苯酚浓度为横坐标,制作标准曲线。

活性测定:以含有不同碳链长度的对硝基苯酯异丙醇溶液为底物(100 mmol/L),包括对硝基苯酚乙酸酯(C2)、对硝基苯酚丁酸酯(C4)、对硝基苯酚辛酸酯(C8)、对硝基苯酚癸酸酯(C10)、月桂酸酯(C12),加于缓冲液反应体系中至底物浓度为 1 mmol/L。反应体系所用缓冲液为 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0),反应总体积为 200 μ L,除空白对照加 10 μ L 缓冲液外,样品中平行添加等量 *Ht*BHETase,参照文献[18]的方法测定对硝基苯酚含量。酶活力单位(U)定义为此反应体系中 1 min 产生 1 μ mol 对硝基

苯酚所需的酶量(mg)。

1.6.2 最适反应条件及热稳定性的研究

TPA 标准曲线的建立:配制 0.01 mol/L TPA 溶液并稀释为 500、100、50、10、5、1 μ mol/L,参照 1.5.2 中高效液相色谱方法测定终产物 TPA 的含量,经高效液相检测后制作峰面积与浓度之间关系的标准曲线。根据 TPA 标准曲线计算反应体系中的最终产物浓度,所有反应均进行 3 次平行实验,实验结果取平均值。

最适反应 pH 的确定:以不同 pH 的缓冲液配制底物溶液,使蛋白在 pH 4.0、5.0、6.0、7.0 (磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液),pH 7.0、8.0、9.0 (Tris-HCl 缓冲液)的反应体系中反应 48 h 确定其最适反应 pH 值,反应温度设为 50 $^{\circ}$ C。

最适反应温度的确定:分别在 30、35、40、45、50、55、60、65、70 $^{\circ}$ C 条件下,磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(pH 5.0)反应体系中,反应 48 h,确定最适反应温度。

热稳定性分析:酶蛋白在不同温度(55、60、65、70、75、80、85 $^{\circ}$ C)条件下孵育 1 h,然后 12 000 r/min 离心 10 min,反应使用 pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液,测定上清中残余的酶活力来分析该酶的热稳定性。

2 结果与分析

2.1 *Ht*BHETase 蛋白的理化性质及系统进化树

*Ht*BHETase 蛋白 NCBI 登录号为 BAI70261.1,该蛋白质的理论分子量为 26.4 kDa,等电点为 5.21,在 NCBI 官网上进行 BLAST 比对得到其同源氨基酸序列并通过 MEGA 软件进行进化树分析。

进化树分析(图 1)显示,来源于嗜热氢杆菌(*Hydrogenobacter thermophilus*)的 *Ht*BHETase 与

热发状菌属(*Thermocrinis*)的 WP_079653268.1 同源性较近,与酸杆菌属(*Acidobacteria*)的 MBN8724478.1、粘球菌属(*Myxococcota*)的 MCL4686336.1 等亲缘关系较远。上述蛋白均归属于双烯内酯酶家族(dienelactone hydrolase family, DLH superfamily),具有典型的 α/β 水解酶折叠类结构域和保守的催化三联体结构。

2.2 *Ht*BHETase 的重组表达纯化

*Ht*BHETase 经诱导表达后,收集菌体进行破碎,离心后即得到粗酶液,之后通过镍离子亲和层析柱进行纯化。收集第 1 步纯化后较纯的部分,使用 TEV 酶切下标签,再进行第 2 步层析纯化使标签与蛋白分离。纯化后的 *Ht*BHETase 利用 SDS-PAGE 进行分析(图 2),浓缩后用于后续研究。

按照 Bradford 法测定蛋白浓度,并以对硝基苯丁酸酯为底物分别测定粗酶液与纯酶

的活力,经计算得到整个纯化过程的回收率为 63.3%,纯化倍数为 64 (表 1)。

2.3 BHET 水解活性初步鉴定结果

将添加了 *Ht*BHETase 的 BHET 琼脂平板在 30 °C 放置 10 h 后,使用全自动数码凝胶成像分析系统进行拍摄。如图 3 所示,添加 *Ht*BHETase (1 号)出现了明显的水解圈,其直径约为 1.4 cm,可初步确定 *Ht*BHETase 的 BHET 水解活性。

BHET 的水解过程如图 4 所示,过程中产生 MHET、EG,最终产生 TPA。

对高效液相色谱结果(图 5)进行分析,TPA 标准品在相同检测条件下的保留时间为 9.5 min,因此判断实验组 9.5 min 附近流出的物质为 TPA。对照组未加酶进行反应,因而在 18.6 min 时流出 BHET,而实验组已将 BHET 消耗完毕,由于 MHET 未得到纯品,因此使用

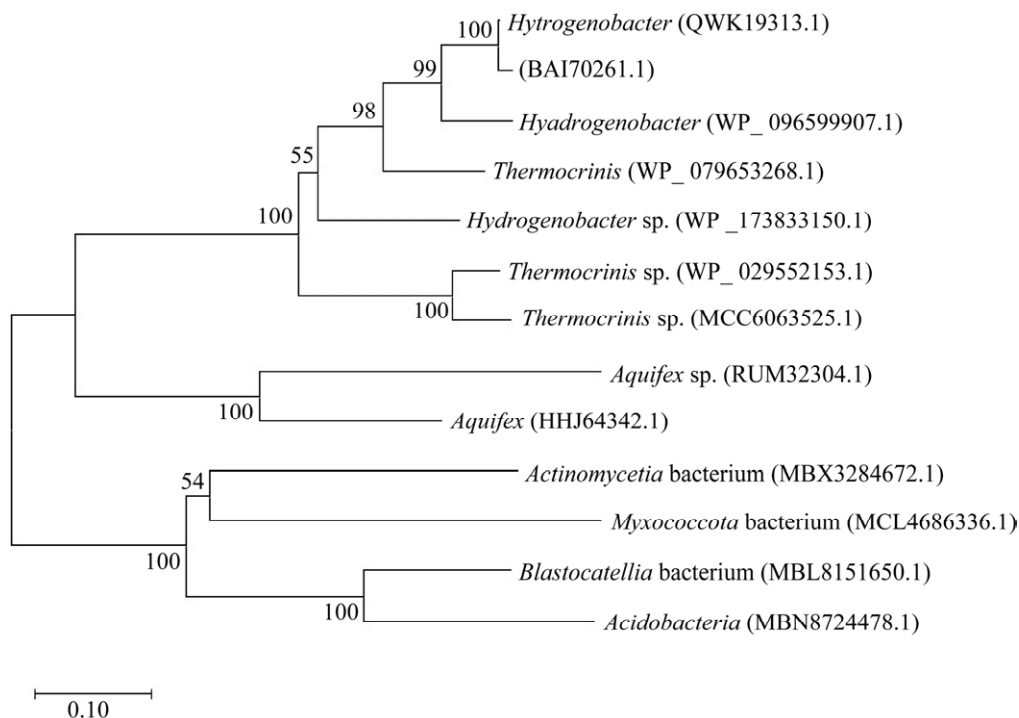


图 1 基于邻接法构建的 *Ht*BHETase 系统进化树

Figure 1 Phylogenetic tree of *Ht*BHETase constructed based on the neighbor-joining method.

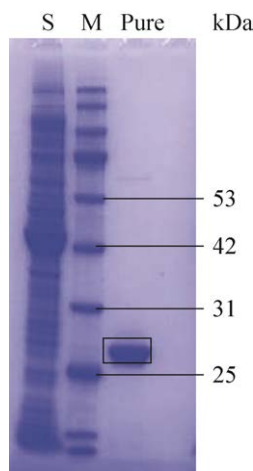


图 2 *HtBHETase* 纯化后的 SDS-PAGE 分析
Figure 2 SDS-PAGE analysis of purified *HtBHETase*. S: Unpurified protein; M: Protein molecular weight standards; Pure: The purified protein.

表 1 *HtBHETase* 的纯化结果
Table 1 Purification of *HtBHETase*

	Protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Total activity (U)	Rate of recovery (%)	Purification fold
Crude extract	2 915.129	0.041	120.686	100.0	1
Pure enzyme	28.860	2.650	76.479	63.3	64

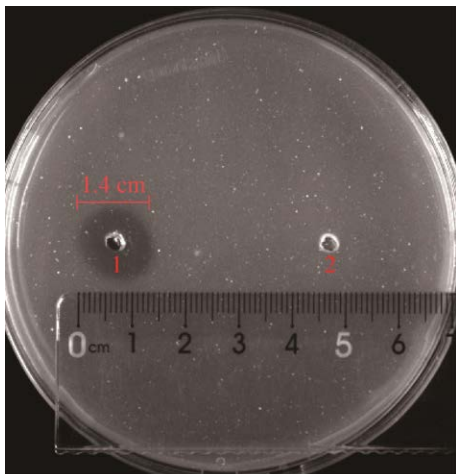


图 3 添加 *HtBHETase* 后的 BHET 琼脂平板
1: 添加 *HtBHETase*. 2: 空白对照
Figure 3 BHET-agar plates after adding *HtBHETase*.
1: Adding *HtBHETase*; 2: Blank control.

液相色谱-固相萃取-核磁共振/高分辨质谱联用仪(LC-SPE-NMR/MS)对保留时间在 13.9 min 的物质进行鉴定，根据质谱结果(图 6)判断为 MHET (m/z , 209, $[M-H]^-$)。

2.4 *HtBHETase* 的酶学性质研究

2.4.1 酯酶活性表征

以对硝基苯酚乙酸酯(C₂)、对硝基苯酚丁酸酯(C₄)、对硝基苯酚辛酸酯(C₈)、对硝基苯酚癸酸酯(C₁₀)和月桂酸酯(C₁₂)为底物，测定 *HtBHETase* 在 30 °C、Tris-HCl (pH 8.0)条件下对不同底物的水解活力，结果如图 7 所示。可知 *HtBHETase* 对乙酸酯的活力最高，以对硝基苯酚乙酸酯为底物的活力为 5.83 U/mg，而以月桂酸酯为底物的活力仅为 0.077 U/mg。结果表

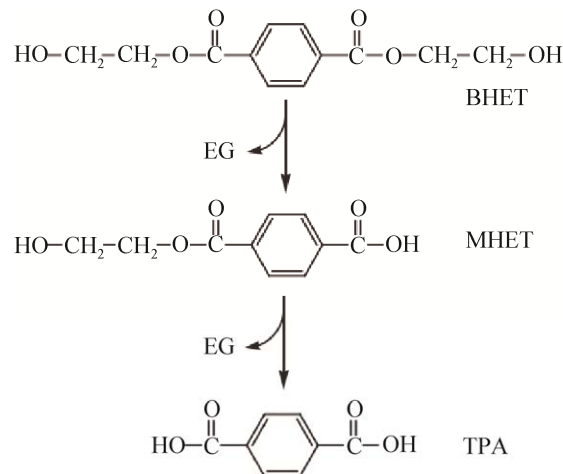


图 4 BHET 的水解反应示意图
Figure 4 Schematic illustration of the hydrolysis products of BHET. BHET: Bis(hydroxyethyl) terephthalate; MHET: Monohydroxyethyl terephthalate; TPA: Terephthalic acid.

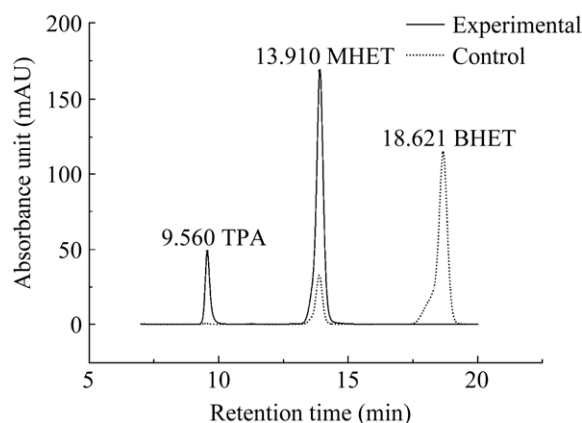


图5 使用 HPLC 对 BHET 降解产物进行鉴定

Figure 5 Analysis of BHET hydrolysates by HPLC. BHET: Bis(hydroxyethyl) terephthalate; MHET: Monohydroxyethyl terephthalate; TPA: Terephthalic acid.

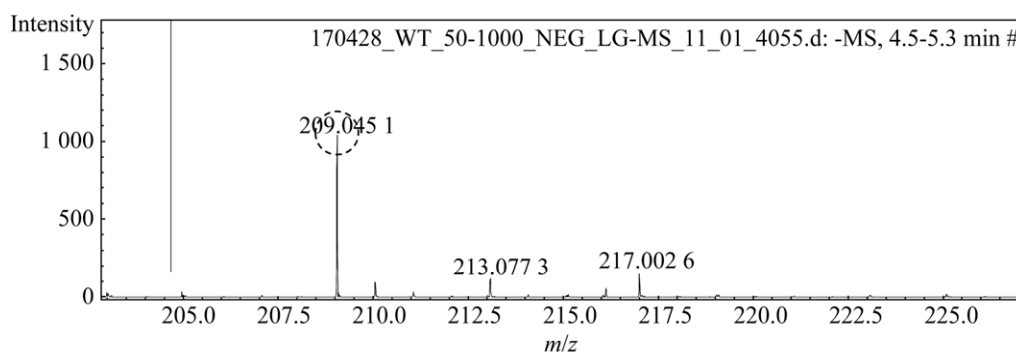


图6 MHET 的质谱鉴定

Figure 6 Mass spectrometric identification of MHET.

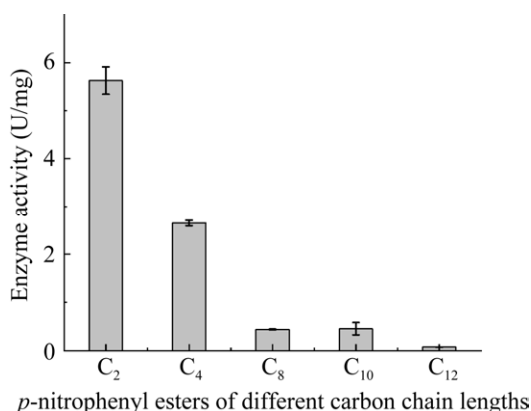


图7 *HtBHETase* 对不同碳链长度的对硝基苯酯的活性表征

Figure 7 Characterization of *HtBHETase* activity toward *p*-nitrophenyl esters with different carbon chain lengths.

明, *HtBHETase* 对碳链长度较短的底物催化活性较高, 最适反应底物为对硝基苯酚乙酸酯。

2.4.2 最适反应条件及热稳定性分析

50 °C 时, 不同 pH 对 *HtBHETase* 的活性影响如图 8 所示。在较低 pH 如 4.0 时, *HtBHETase* 几乎没有活性, 当 pH 值为 5.0 时, 该酶的活性达到最高。当 pH 值升高至 9.0 左右时蛋白仍有一半残余活性。不同缓冲液对酶的活性也有影响, 如同样在 pH 7.0 时, 在 Tris-HCl 缓冲液中该酶的活性比在磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液中的略高, 这可能是缓冲液中的离子成分的差异造成的。

HtBHETase 在不同温度的反应体系中反应 48 h 得到如图 9 的实验结果。随着反应温度的

升高, 酶的活性逐渐增强, 当温度为 55 °C 时, 酶活性最高。随着温度继续升高, 酶的活性迅速降低, 当温度为 70 °C 时, *HtBHETase* 的活性仅为最高活性的三分之一左右。由此可确定, 以 BHET 为底物, *HtBHETase* 的最适反应 pH 为 5.0, 最适反应温度为 55 °C。

HtBHETase 经不同温度(55–85 °C)热处理 1 h 后, 其活力变化结果如图 10 所示。因为 55 °C 为酶的最适反应温度, 因此以 55 °C 处理后的酶活力为 100%。由图可知, *HtBHETase* 经 55–70 °C 处理 1 h 仍有 90% 以上的酶活力。于 80 °C 处理 1 h 后, 酶的活力仍能保持约 80%。但当处理温度高于 80 °C 之后, 酶活力迅速降

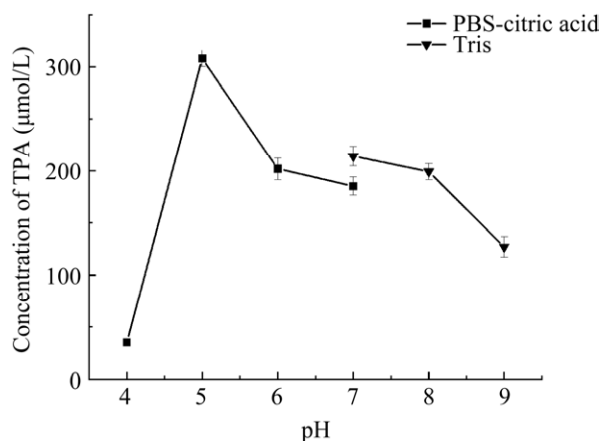


图8 pH对*HtBHETase*催化活性的影响
Figure 8 Effect of pH on *HtBHETase* activities.

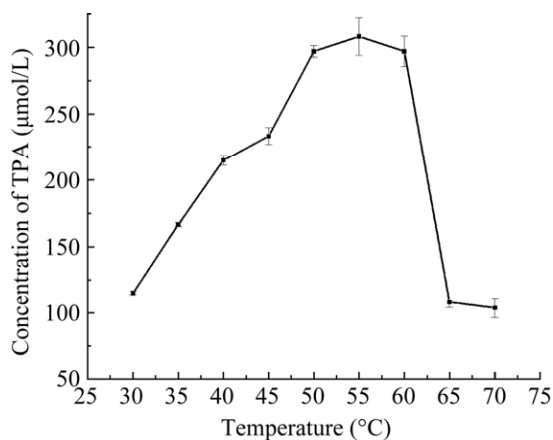


图9 温度对*HtBHETase*催化活性的影响
Figure 9 Effect of temperature on *HtBHETase* activities.

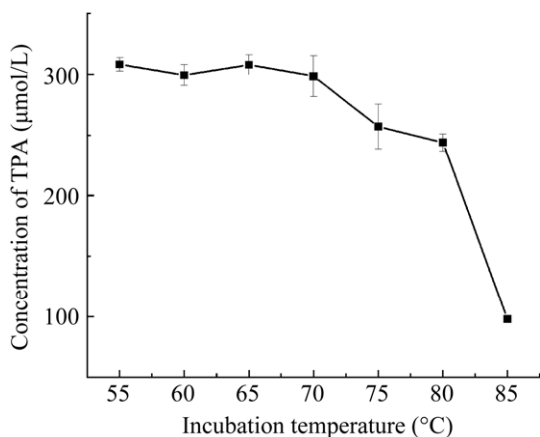


图10 *HtBHETase*的温度稳定性
Figure 10 Temperature stability of *HtBHETase*.

低。于85℃处理1h后酶活力仅为30%，此时的该酶已丧失大部分活性。由此可知*HtBHETase*在80℃以下具有良好的热稳定性。

3 讨论

近年来已有部分科研人员针对BHET的水解酶进行了相关研究。Qiu等^[19]从塑料垃圾中分离出一株可以水解BHET最终产生TPA的菌株，经鉴定确定为肠杆菌属，并克隆表达了胞外分泌的酯酶EstB。此酶可将BHET转化为MHET。酶学性质研究发现其最适pH为8.0，最适温度为40℃，但在50℃条件下1h即损失大半活性。Yoshida等^[6]在鉴定酶蛋白ISF6_4831的PET水解活性时发现在30℃条件下其能继续将BHET完全转化，有利于PET的水解，产物主要为MHET。有研究同时探究了叶和枝堆肥角质酶(LCC)对PET和BHET的活性，发现其对BHET最适反应温度为50℃，且能完全降解生成TPA^[20-21]。

PET酶解过程中温度的提升有助于加快PET的降解速率^[22]，而PET解聚反应过程中不断产生的TPA则会使体系中的酸性逐渐增强。这些因素都对酶法降解PET提出了更高的要求。耐热、适酸酶蛋白的发掘对进一步推动酶法降解PET具有重要价值。目前，关于BHET水解酶的性质研究还比较少，且不够深入。Qiu等^[19]整理了近些年已报道过的一些具有水解BHET能力的酶以及它们的来源与反应条件等信息，如表2所示。与它们的反应条件相比，*HtBHETase*显示出突出的酸性环境高活性和良好的热稳定性，这些特性将有利于其在PET酶促降解过程中发挥作用。

4 结论

本研究获得了一个新型的BHET的水解酶

表 2 BHET 水解酶来源和反应条件^[19]Table 2 Source and reaction conditions of BHET hydrolase^[19]

Enzyme	Accession No.	Temperature (°C)	pH	Strains	References
IsPETase	GAP3837.3.1	30	7.0	<i>Ideonella sakaiensis</i> 201-F6	[6]
TfH	WP_011291330.1	30	7.0	<i>Thermobifida fusca</i>	[6,22]
FsC	K02640	30	7.0	<i>Fusarium solani pisi</i>	[6]
LCC	AEV21261.1	30	7.0	Leaf-branch compost metagenome	[6,20]
HiC	ABC06408.1	70	7.0	<i>Humicola insolens</i>	[6,23]
EstB	MK681857	40	8.0	<i>Enterobacter</i> sp. HY1	[6,24]
BsEstB	ADH43200.1	40	7.0	<i>Bacillus subtilis</i> 4P3-11	[6]
HtBHETase	BAI70261.1	55	5.0	<i>Hydrogenobacter thermophilus</i>	This study

HtBHETase，经过重组表达纯化后得到了纯度较高的酶。进行酶学性质研究发现，该酶对短链的酯类如对硝基苯酚乙酸酯的催化活性较高。该酶可以将 BHET 水解最终产生 TPA，最适反应 pH 为 5.0，最适反应温度为 55 °C，并具有良好的耐热性，经 80 °C 的条件处理 1 h 仍能保持 80%以上酶活力，耐热性及耐酸性有利于 *HtBHETase* 在 PET 降解回收利用方面的应用。后续将通过对 *HtBHETase* 的蛋白质结构的解析来进一步系统揭示其水解 BHET 的催化机制和构效关系，并以此为依据开展工业方向的适用性改造。

REFERENCES

- [1] NICHOLSON SR, RORRER NA, CARPENTER AC, BECKHAM GT. Manufacturing energy and greenhouse gas emissions associated with plastics consumption[J]. *Joule*, 2021, 5(3): 673-686.
- [2] 黄逸伦, 张师军, 吴长江. 废旧 PET 回收循环利用方法的研究进展[J]. *现代塑料加工应用*, 2021, 33(3): 52-55.
HUANG YL, ZHANG SJ, WU CJ. Development of spent PET recycling methods[J]. *Modern Plastics Processing and Applications*, 2021, 33(3): 52-55 (in Chinese).
- [3] AL-SALEM SM, LETTIERI P, BAEYENS J. Recycling and recovery routes of plastic solid waste (PSW): a review[J]. *Waste Management*, 2009, 29(10): 2625-2643.
- [4] 李磊, 高鑫, 齐宏斌, 李超, 路福平, 毛淑红, 秦慧民. 现代生物技术推动塑料中聚对苯二甲酸乙二醇绿色降解的研究进展[J]. *合成生物学*, 2022, 3(4): 763-780.
LI L, GAO X, Qi HB, LI C, LU FP, MAO SH, QIN HM. Research progress of modern biotechnology-promoted green degradation of polyethylene terephthalate in plastics[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2022, 3(4): 763-780 (in Chinese).
- [5] MÜLLER R J, 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.
- [6] YOSHIDA S, HIRAGA K, TAKEHANA T, TANIGUCHI I, YAMAJI H, MAEDA Y, TOYOHARA K, MIYAMOTO K, KIMURA Y, ODA K. A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate)[J]. *Science*, 2016, 351(6278): 1196-1199.
- [7] 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.
- [8] 李志帅, 高健, 陈纯琪, 郭瑞庭, 刘卫东, 韩旭. 聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)塑料水解酶结构、功能及改造[J]. *生物加工过程*, 2022, 20(4): 374-384.
LI ZS, GAO J, CHEN CQ, GUO RT, LIU WD, HAN X. Structure, function and application of hydrolases for polyethylene terephthalate(PET) degradation[J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2022, 20(4): 374-384 (in Chinese).
- [9] LIU C, SHI C, ZHU S, WEI R, YIN CC. Structural and functional characterization of polyethylene terephthalate hydrolase from *Ideonella sakaiensis*[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2019, 508(1): 289-294.
- [10] 陈纯琪, 韩旭, 刘卫东, 马立新, 刘珂, 郭瑞庭. 基于结构改造来源于大阪伊德氏杆菌 201-F6 的 PET 水解酶[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(9): 3268-3275.
CHEN CQ, HAN X, LIU WD, MA LX, LIU K, GUO RT. Structure-based engineering of PET hydrolase from *Ideonella sakaiensis*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(9): 3268-3275 (in Chinese).
- [11] BARTH M, OESER T, WEI R, THEN J, SCHMIDT J, ZIMMERMANN W. 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.
- [12] 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.
- [13] BÅÅTH JA, BORCH K, JENSEN K, BRASK J, WESTH P. Comparative biochemistry of four polyester (PET) hydrolases[J]. *ChemBioChem*, 2021, 22(9): 1627-1637.
- [14] ODA M, YAMAGAMI Y, INABA S, OIDA T, YAMAMOTO M, KITAJIMA S, KAWAI F. Enzymatic hydrolysis of PET: functional roles of three Ca^{2+} ions bound to a cutinase-like enzyme, Cut190*, and its engineering for improved activity[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(23): 10067-10077.
- [15] KNOTT B C, ERICKSON E, ALLEN MD, GADO JE, GRAHAM R, KEARNS FL, PARDO I, TOPUZLU E, ANDERSON JJ, AUSTIN HP, DOMINICK G, JOHNSON CW, RORRER NA, SZOSTKIEWICZ CJ, COPIÉ V, PAYNE CM, WOODCOCK HL, DONOHOE BS, BECKHAM GT, MCGEEHAN JE. Characterization and engineering of a two-enzyme system for plastics depolymerization[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2020, 117(41): 25476-25485.
- [16] MEYER-CIFUENTES IE, Öztürk B. Mle046 is a marine mesophilic MHETase-like enzyme[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 693985.
- [17] 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, HOUK KN, WU B. Computational redesign of a PETase for plastic biodegradation under ambient condition by the GRAPE strategy[J]. *ACS Catalysis*, 2021, 11(3): 1340-1350.
- [18] 毕文慧, 姚健, 陈庆隆, 马吉平, 王洪秀. 1 株产嗜热酯酶菌株的分离、鉴定及酯酶部分酶学性质分析[J]. *微生物学杂志*, 2018, 38(6): 24-29.
BI WH, YAO J, CHEN QL, MA JP, WANG HX. Isolation and enzymatic properties of a thermophilic and thermostable esterase-producing strain[J]. *Journal of Microbiology*, 2018, 38(6): 24-29 (in Chinese).
- [19] QIU LQ, YIN XG, LIU TF, ZHANG HY, CHEN GM, WU SJ. Biodegradation of bis(2-hydroxyethyl) terephthalate by a newly isolated *Enterobacter* sp. HY1 and characterization of its esterase properties[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2020, 60(8): 699-711.
- [20] SHIRKE AN, WHITE C, ENGLAENDER JA, ZWARYCZ A, BUTTERFOSS GL, LINHARDT RJ, GROSS RA. Stabilizing leaf and branch compost cutinase (LCC) with glycosylation: mechanism and effect on PET hydrolysis[J]. *Biochemistry*, 2018, 57(7): 1190-1200.

- [21] SON HF, CHO IJ, JOO S, SEO H, SAGONG HY, CHOI SY, LEE SY, KIM KJ. Rational protein engineering of thermo-stable PETase from *Ideonella sakaiensis* for highly efficient PET degradation[J]. ACS Catalysis, 2019, 9(4): 3519-3526.
- [22] WU J, LIAO XW, YU FB, WEI ZB, YANG LY. Cloning of a dibutyl phthalate hydrolase gene from *Acinetobacter* sp. strain M673 and functional analysis of its expression product in *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2013, 97: 2483-2491.
- [23] de CASTRO AM, CARNIEL A, STAHELIN D, CHINELATTO LS JR. , de ANGELI HONORATO A, de MENEZES SMC. High-fold improvement of assorted post-consumer poly(ethylene terephthalate) (PET) packages hydrolysis using *Humicola insolens* cutinase as a single biocatalyst[J]. Process Biochemistry, 2019, 81: 85-91.
- [24] RIBITSCH D, HEUMANN S, TROTSCHA E, ACERO EH, GREIMEL K, LEBER R, BIRNER-GRUENBERGER R, DELLER S, EITELJOERG I, REMLER P, WEBER T, SIEGERT P, MAURER KH, DONELLI I, FREDDI G, SCHWAB H, GUEBITZ GM. Hydrolysis of polyethyleneterephthalate by pnitrobenzylesterase from *Bacillus subtilis*[J]. Biotechnology Progress, 2011, 27: 951-960.

(本文责编 陈宏宇)