

· 塑料解聚酶的设计与改造 ·

**孙登岳** 齐鲁工业大学讲师。主要研究领域为酶工程与蛋白质工程(新酶分子的基因挖掘、酶的结构与功能解析、酶的理性设计与定向进化、酶基因高效表达系统的构建与优化、酶制剂应用技术的开发与拓展)和工业微生物育种(基于代谢工程策略,以微生物为平台进行重要化学品和功能物质的合成)。



**曾志雄** 齐鲁工业大学教授、课题组 PI。主要研究领域为端粒保护及维持的分子机制,主要利用生物化学和结构生物学及细胞生物学方法研究端粒及端粒酶相关蛋白的结构和功能;表观遗传如 DNA 甲基化与去甲基化、组蛋白修饰与识别等的结构基础;植物代谢重要途径中关键酶的结构和功能;重要工业用酶的结构解析及改造。



## 来源于糖丝菌双(2-羟乙基)对苯二甲酸酯水解酶的酶学性质表征及降解特性分析

张洁<sup>1</sup>, 单瑞达<sup>1</sup>, 李霞<sup>1,2</sup>, 曾志雄<sup>1\*</sup>, 孙登岳<sup>1,2\*</sup>

1 齐鲁工业大学(山东省科学院)生物工程学院, 山东 济南 250000

2 齐鲁工业大学(山东省科学院)生物材料与绿色造纸国家重点实验室, 山东 济南 250000

张洁, 单瑞达, 李霞, 曾志雄, 孙登岳. 来源于糖丝菌双(2-羟乙基)对苯二甲酸酯水解酶的酶学性质表征及降解特性分析[J]. 生物工程学报, 2023, 39(5): 2027-2039.

ZHANG Jie, SHAN Ruida, LI Xia, ZENG Zhixiong, SUN Dengyue. Enzymatic properties and degradation characterization of a bis(2-hydroxyethyl) terephthalate hydrolase from *Saccharothrix* sp.[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(5): 2027-2039.

**摘 要:** 聚对苯二甲酸乙二醇酯[poly(ethylene terephthalate), PET]降解酶的发掘是国内外研究的热

资助项目: 国家自然科学基金(22207060); 山东省自然科学基金(ZR2021QC193, ZR2021QC038)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (22207060) and the Natural Science Foundation of Shandong Province, China (ZR2021QC193, ZR2021QC038).

\*Corresponding authors. E-mail: SUN Dengyue, dysun@qlu.edu.cn; ZENG Zhixiong, zengzx@qlu.edu.cn

Received: 2022-12-10; Accepted: 2023-02-06; Published online: 2023-02-17

点。双(2-羟乙基)对苯二甲酸酯[bis-(2-hydroxyethyl) terephthalic acid, BHET]是 PET 降解过程的一种中间化合物,会与 PET 竞争酶的底物结合位点,从而抑制 PET 进一步降解。因此,探寻新型 BHET 降解酶,对进一步提高 PET 的降解效率具有促进作用。本研究通过基因挖掘发现了一种来源于浅黄糖丝菌(*Saccharothrix luteola*)参与 PET 降解过程的水解酶基因 *sle* (ID: CP064192.1, 5085270–5086049),其编码的蛋白质可以将 BHET 水解为单(2-羟乙基)对苯二甲酸酯[mono-(2-hydroxyethyl) terephthalate, MHET]和对苯二甲酸(terephthalic acid, TPA)。将 BHET 水解酶(Sle)通过重组质粒在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中异源表达,结果表明,在异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside, IPTG)诱导终浓度为 0.4 mmol/L,诱导时长为 12 h,诱导温度为 20 °C 时蛋白的表达量最高。通过镍亲和层析、阴离子交换层析和凝胶过滤层析 3 步分离纯化,获得了高纯度的 Sle 重组蛋白;同时对其酶学性质进行了表征, Sle 最适温度和 pH 分别为 35 °C 和 8.0,在 25–35 °C 和 pH 7.0–9.0 区间内能保持 80%以上的残余酶活,且金属离子  $\text{Co}^{2+}$  能提高酶活力;进一步通过同源序列及 Sle 复合物结构分析得知,该酶属于二烯酸内酯水解酶(dienelactone hydrolase, DLH)家族,具备该家族典型的催化三联体,预测其催化位点分别为 S129、D175 和 H207,并初步分析了其催化机理。最后,利用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)鉴定了该酶能够特异性降解 BHET 生成 MHET 和 TPA,属于 BHET 降解酶。本研究为生物酶法高效降解 PET 塑料提供了新的酶资源。

关键词: 聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET); 双(2-羟乙基)对苯二甲酸酯(BHET)降解酶; 分离纯化; 酶学性质

## Enzymatic properties and degradation characterization of a bis(2-hydroxyethyl) terephthalate hydrolase from *Saccharothrix* sp.

ZHANG Jie<sup>1</sup>, SHAN Ruida<sup>1</sup>, LI Xia<sup>1,2</sup>, ZENG Zhixiong<sup>1\*</sup>, SUN Dengyue<sup>1,2\*</sup>

1 School of Biological Engineering, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Ji'nan 250000, Shandong, China

2 State Key Laboratory of Bio-based Materials and Green Papermaking, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Ji'nan 250000, Shandong, China

**Abstract:** The discovery of new enzymes for poly(ethylene terephthalate) (PET) degradation has been a hot topic of research globally. Bis-(2-hydroxyethyl) terephthalate (BHET) is an intermediate compound in the degradation of PET and competes with PET for the substrate binding site of the PET-degrading enzyme, thereby inhibiting further degradation of PET. Discovery of new BHET degradation enzymes may contribute to improving the degradation efficiency of PET. In this paper, we discovered a hydrolase gene *sle* (ID: CP064192.1, 5085270–5086049) from *Saccharothrix luteola*, which can hydrolyze BHET into mono-(2-hydroxyethyl) terephthalate (MHET) and terephthalic acid (TPA). BHET hydrolase

(Sle) was heterologously expressed in *Escherichia coli* using a recombinant plasmid, and the highest protein expression was achieved at a final concentration of 0.4 mmol/L of isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG), an induction duration of 12 h and an induction temperature of 20 °C. The recombinant Sle was purified by nickel affinity chromatography, anion exchange chromatography, and gel filtration chromatography, and its enzymatic properties were also characterized. The optimum temperature and pH of Sle were 35 °C and 8.0, and more than 80% of the enzyme activity could be maintained in the range of 25–35 °C and pH 7.0–9.0 and  $\text{Co}^{2+}$  could improve the enzyme activity. Sle belongs to the diene lactone hydrolase (DLH) superfamily and possesses the typical catalytic triad of the family, and the predicted catalytic sites are S129, D175, and H207. Finally, the enzyme was identified as a BHET degrading enzyme by high performance liquid chromatography (HPLC). This study provides a new enzyme resource for the efficient enzymatic degradation of PET plastics.

**Keywords:** poly(ethylene terephthalate) (PET); bis-(2-hydroxyethyl) terephthalate (BHET) degrading enzyme; isolation and purification; enzymatic properties

聚对苯二甲酸乙二醇酯 [poly(ethylene terephthalate), PET] 是生产生活中最常用的合成聚合物之一, 特别在包装和纺织领域<sup>[1]</sup>。它是以石油为原料, 由对苯二甲酸 (terephthalic acid, TPA) 和乙二醇 (ethylene glycol, EG) 通过酯化反应生成双(2-羟乙基)对苯二甲酸酯 [bis-(2-hydroxyethyl) terephthalic acid, BHET], BHET 进一步缩聚生成的合成 PET 聚酯<sup>[2-3]</sup>。因为 PET 合成方式简单, 产品结实耐用并且生产成本较低, 因此 PET 被广泛应用于工业化生产。然而, 由于废弃 PET 自身具有化学惰性和抗自然退化的特点<sup>[4]</sup>, 因此, 很难自身分解, 给全球环境带来严重的威胁<sup>[5-7]</sup>。

目前, PET 的常规处理方法具有很大的局限性, 其处理产生的污染物会对全球环境带来二次伤害且造成巨大的能源损耗。近年来, 随着生物技术的巨大进步, 使得微生物酶法降解在治理环境污染方面成了首选的策略<sup>[8]</sup>, 微生物酶法降解 PET 的一大优势就是作用条件简单, 降解产物为小分子对环境无害且可重复加工<sup>[9]</sup>。已有研究表明, 从微生物中分离出的聚酯水解酶可以将 PET 酶解为 BHET、单(2-羟乙

基)对苯二甲酸酯 [mono-(2-hydroxyethyl) terephthalate, MHET]、EG 和 TPA 等组分, 而得到的这些单体可进一步被生产利用, 从而实现 PET 可持续回收利用<sup>[10]</sup>。因此, 在未来使用微生物酶法降解 PET 必将成为学者研究的新热点<sup>[11]</sup>。

与纤维素酶水解纤维素生成产物纤维素二糖和葡萄糖对纤维素酶活性有抑制作用相类似<sup>[12]</sup>, PET 的酶解产物 BHET 和 MHET 同样能够竞争性地抑制 PET 水解酶降解 PET 的能力<sup>[13]</sup>。因此, 减少这种抑制作用对促进 PET 的降解具有重要的作用。Qiu 等<sup>[14]</sup>分离了具有 BHET 降解能力的微生物, 克隆并表达了相应的酯酶, 并对其酶学性质进行了研究。验证了该 BHET 水解酶是通过水解 BHET 一个酯键为 MHET, 再将 MHET 水解为单体 TPA 来降解底物 BHET 的, 进而有效地缓解抑制作用, 提高 PET 水解酶的催化效率。由此可见, 利用 BHET 水解酶与 PET 水解酶形成双酶催化系统, 可以为 PET 的降解提供了一种有前景的替代方法<sup>[14]</sup>。

在本文中, 我们研究了一种来源于浅黄糖丝菌 (*Saccharothrix luteola*) 的新的水解酶基因 *sle*。通过对 *sle* 基因进行载体构建、诱导表达

和分离纯化,表征了其酶学性质。通过同源建模和分子对接技术预测了该酶的催化活性位点,为后续酶工程改造创造了条件。此外,经过高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)分析,证明了 Sle 是一种 BHET 水解酶,能够在一定条件下特异性地水解 BHET 生成 MHET 和 TPA。因此,在未来,这种新型的水解酶将有可能被设计用来降解塑料和在塑料降解酶的基础上促进塑料单体的生成<sup>[13,15]</sup>。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 质粒和菌株

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  和 BL21(DE3),均购自南京诺唯赞生物科技有限公司;pET-28a(+)载体由本实验室保存。

#### 1.1.2 主要试剂

质粒小量提取试剂盒、DNA 胶纯化回收试剂盒,购自 Omega 公司;限制性内切酶、T4 DNA 连接酶,购自宝生物工程(大连)有限公司;IPTG、卡那霉素,购自生工生物工程(上海)股份有限公司;离子交换柱、凝胶过滤柱,购自 GE 公司;10 kDa 超滤管,购自 Millipore 公司;MHET、BHET 和 TPA,购自 Sigma 公司;其他的试剂均为分析纯试剂,购自国药集团有限公司。

#### 1.1.3 主要缓冲液

裂解缓冲液(lysis buffer): 400 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 10% (体积分数)甘油。

清洗缓冲液(wash buffer): 400 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 10% (体积分数)甘油, 20 mmol/L 咪唑。

洗脱缓冲液(elution buffer): 400 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 10% (体积分数)甘油, 300 mmol/L 咪唑。

起始缓冲液: 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)。

分子筛缓冲液: 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L DTT。

## 1.2 方法

### 1.2.1 Sle 表达载体的构建

编码水解酶 Sle 的序列由金唯智生物科技有限公司优化合成。以该序列为模板设计引物。上游引物: 5'-GAGGAGGAGTTCGGCGC-3', 下游引物: 5'-GACCGAGTGC GGACAGGTG-3'。其中上游引物含有 BamH I 酶切位点 (GGATCC), 下游引物含 Hind III 酶切位点 (AAGCTT)。通过聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增目的片段, PCR 扩增体系为 50  $\mu$ L。程序为: 98  $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 98  $^{\circ}$ C 变性 10 s, 54  $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 s, 共 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。将得到的目的片段和空载体 pET-28a(+)用限制性内切酶 BamH I 和 Hind III 进行双酶切, 双酶切产物经胶回收试剂盒纯化回收, 酶切后的片段与酶切后的载体, 用 T4 DNA 连接酶连接后, 转化至 *E. coli* DH5 $\alpha$  中。挑单菌落后提质粒, 双酶切验证阳性克隆, 最后测序验证并检查有无突变或移码。

### 1.2.2 重组蛋白的诱导表达及分离纯化

将测序正确的重组质粒转化到 *E. coli* BL21 (DE3)感受态细胞中, 划菌接种到终浓度为 50  $\mu$ g/mL 卡那霉素的种子液中生长过夜, 温度为 37  $^{\circ}$ C<sup>[16]</sup>。将种子液以 1% 的比例接种到 1 000 mL 的培养基中, 在相同条件下培养。当 600 nm 光密度达到 0.7 左右时, 冰浴 10 min, 后加入终浓度为 0.4 mmol/L 的 IPTG 进行诱导表达。在 20  $^{\circ}$ C 孵育 12 h 后, 4 000 r/min、4  $^{\circ}$ C 离心 15 min 获得细胞<sup>[17]</sup>。pET-28a(+)-Sle 重组细胞用裂解缓冲液进行重悬, 加入 80  $\mu$ L 50 mg/mL 的溶菌酶, 40  $\mu$ L 1 mol/L 的苯甲基磺

酰氟(phenyl methane sulfonyl fluoride, PMSF)和 10  $\mu\text{L}$   $\beta$ -巯基乙醇混匀。孵育 20 min, 打开高压细胞破碎仪预冷, 随后在低温条件下破碎细胞, 破碎条件设为 750 Pa 左右, 4 min (视破碎情况调节), 直至菌液清澈且不粘稠。4  $^{\circ}\text{C}$ 、13 000 r/min 离心 1 h 去除细胞碎片。用 Ni-NTA 亲和层析柱纯化带有 His 标签的目标蛋白, 将上清液与裂解缓冲液环境中的 Ni-NTA agarose 树脂填料进行混合, 静音混合器上 4  $^{\circ}\text{C}$  温育 1 h 左右<sup>[18]</sup>。

随后, 将结合有蛋白的填料加入 12 mL 的一次性层析柱中, 再用 2 个柱体积(column volume, CV)清洗缓冲液清洗杂蛋白, 最后用定量的洗脱缓冲液洗脱目的蛋白。收集到的 Sle 蛋白经过起始缓冲液稀释, 得到低盐浓度的蛋白液, 离心过膜后, 使用阴离子交换柱进行梯度洗脱, 取出峰处蛋白用超滤管进行浓缩后, 通过分子筛缓冲液进行凝胶过滤层析。最后, 将纯化后的蛋白保存在 4  $^{\circ}\text{C}$  直到进一步分析。总蛋白浓度采用 BCA 检测试剂盒(Solarbio)测定。通过考马斯亮蓝染色, SDS-PAGE 分析目标蛋白的浓度和纯度<sup>[19]</sup>。

### 1.2.3 酶活性测定

利用 Palm 等<sup>[20]</sup>报道的利用高效液相色谱法测定酶活性的方法。采用终浓度分别为 0.1 mmol/L BHET、0.4 mg/mL 酶浓度和 100 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.0)的反应体系进行催化, 温度 35  $^{\circ}\text{C}$ , 反应 3 h。3 h 后取出放置 100  $^{\circ}\text{C}$  开水中煮沸 10 min 终止反应。所有实验组进行 3 个重复, 空白组除不加酶外, 其余的条件都相同。

### 1.2.4 Sle 最适反应温度和热稳定性

最适温度测定: 在 25–60  $^{\circ}\text{C}$  的范围内, 测定蛋白的酶活, 将最高的酶活设置为 100%。

热稳定性测定: 将稀释后的 Sle 酶液置于 25–60  $^{\circ}\text{C}$  条件下保温 0.5、1、2 h, 再冰浴 10 min,

离心除去沉淀, 按照 1.2.3 方法进行酶活性测定, 以 4  $^{\circ}\text{C}$  的酶活设置为 100%。

### 1.2.5 Sle 最适反应 pH 和 pH 稳定性

最适反应 pH 测定: 以 100 mmol/L 的 MES (pH 5.5–6.5)、磷酸盐(pH 6.0–8.0)、Tris (pH 7.0–9.0)、HEPES (pH 7.0–9.5)、甘氨酸(pH 8.0–9.5)缓冲溶液取代 100 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.0), 以酶活最高者为 100%。

pH 稳定性测定: 用上述不同 pH 的缓冲液稀释酶液至合适浓度, 在 4  $^{\circ}\text{C}$  下孵育 1 h, 测定残余酶活, 以酶活最高者为 100%。

### 1.2.6 金属离子对 Sle 酶催化活性影响

在 5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ 、 $\text{CuCl}_2$ 、 $\text{BaCl}_2$ 、 $\text{FeCl}_3$ 、 $\text{CoCl}_2$ 、 $\text{NiSO}_4$ 、 $\text{ZnCl}_2$ 、 $\text{AlCl}_3$ 、 $\text{MnSO}_4$ 、 $\text{CaCl}_2$  盐溶液存在的条件下, 测试不同金属离子对重组 Sle 催化活性的影响。酶活性测定在 pH 8.0 和 35  $^{\circ}\text{C}$  条件下进行。一个不添加任何金属离子的反应被用作实验的阳性对照。

### 1.2.7 底物选择性分析

将重组蛋白 Sle 与不同底物如 PET、BHET 和 MHET 进行催化反应, 以终产物 TPA 含量来计算酶活, 测试 Sle 对底物的催化选择性。为促进底物的溶解度, 反应在含有 10%的二甲基亚砜的反应体系中进行, 其他条件与上述反应方法一致, 酶活最高者为 100%。

### 1.2.8 Sle 的催化产物分析

采用岛津 HPLC 进行的产物分析, 将灭活的反应液以 12 000 r/min 转速离心 10 min 后, 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤, 进行色谱分析。色谱条件: 岛津自动进样器, C18 柱, 岛津紫外检测器, 流速为 0.5 mL/min, 采用 60% (体积分数)的 50 mmol/L 磷酸二氢钾水溶液和 40%的甲醇溶液作为流动相, 柱温设定为 35  $^{\circ}\text{C}$ 。在 240 nm 波长处检测 TPA、MHET 和 BHET, 并通过标准曲线实现定量, 最终以产物 MHET 和 TPA 的总量来计算酶活。

### 1.2.9 同源建模及分子对接

从 NCBI 数据库中搜索 Sle 的氨基酸序列, 上传至同源建模网站 SWISS-MODEL 中, 得到给定氨基酸序列的蛋白质三维结构预测结果如: 1jfr、7W66 和 7nei, 对其进行质量评估, 最终选择最佳三维结构作为目标模型<sup>[21]</sup>。同时从 PubChem 数据库中下载底物小分子 BHET 的三维结构, 保存为 SDF 格式, 用 OpenBabel 软件转换为 PDB 格式。利用 Auto-Dock-Vina 工具对受体和配体进行 pdbqt 格式转换、加氢和计算电荷预处理, 为后续对接做准备。对接时, 首先找到 BHET 对接位点, 将蛋白的活性中心设置为中心坐标, 使网格区域将可能活性区域覆盖, 构象搜索策略采用拉马克遗传算法, 初始种群数目设置为 150, 对接次数设置为 100, 能量评定最大次数设置为 25 000 000, 其余参数选择默认值。最后使用 Pymol 软件对配体对接方式和关键作用残基结果进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 pET-28a(+)-Sle 重组质粒的验证

将挑取的单菌落先利用菌落 PCR 进行验证, 得到了一条 0.8 kb 左右的条带, 与目的基因的大小一致(图 1A); 然后利用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 对转化子进行双酶切, 由图 1B 可知, 得到两条大小分别为 0.8 kb 和 5.3 kb 的清晰条带, 与预期结果一致; 且将该转化子送测序公司验证序列正确, Sle 重组质粒构建成功。

### 2.2 Sle 诱导表达条件优化

对 Sle 重组蛋白的最佳诱导表达条件进行探究, 在不同诱导温度(16、20、37 °C)、不同诱导剂 IPTG 的浓度(0.2、0.4、0.6 mmol/L), 不同诱导时间(10、12、14 h)的条件下表达蛋白, 测定上清液中可溶性蛋白的浓度, 再稀释上清液为同一蛋白浓度通过 Image lab 灰度分析

SDS-PAGE 图, 得出目标蛋白的浓度。由图 2 可知, 在温度 20 °C 和 0.4 mmol/L 的 IPTG 浓度下诱导 12 h 的条件下, 上清液中目的蛋白浓度最高为 0.46 mg/mL。由此可见, 高温、高诱导剂浓度和长时间诱导, 并不能提高可溶性蛋白的表达量。因为蛋白质分子是三维结构型,

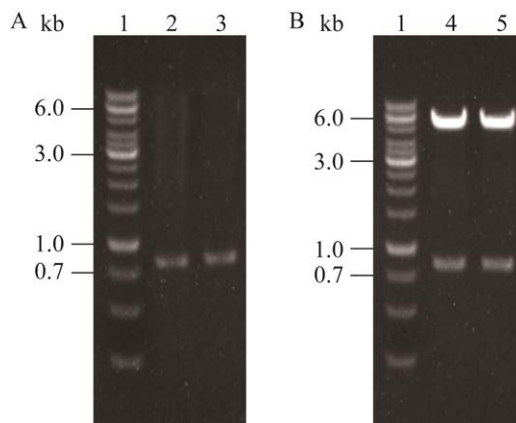


图 1 菌落 PCR (A) 和酶切验证 (B)

Figure 1 Colony PCR and enzyme digestion of pET-28a(+)-Sle. A: Colony PCR. 1: DNA marker; 2–3: Colony PCR. B: Enzyme digestion of pET-28a(+)-Sle. 1: DNA marker; 4–5: Double enzyme digestion.

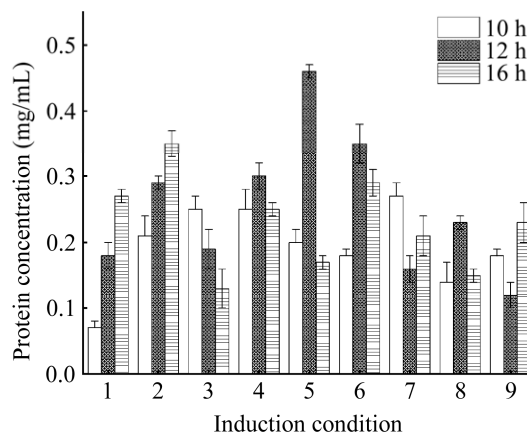


图 2 不同诱导条件下可溶性蛋白的浓度

Figure 2 The concentration of soluble Sle under different induction conditions. 1–3: 16 °C (0.2 mmol/L, 0.4 mmol/L, 0.6 mmol/L); 4–6: 20 °C (0.2 mmol/L, 0.4 mmol/L, 0.6 mmol/L); 7–9: 37 °C (0.2 mmol/L, 0.4 mmol/L, 0.6 mmol/L).



在高温条件和高诱导剂条件下,氨基酸链易生成速度过快,导致没有充足的时间进行盘曲折叠,最后形成没有活性的包涵体。因此,合适的诱导剂浓度、中低温度和诱导时间等诱导条件对蛋白质的正确折叠和可溶性表达至关重要。

### 2.3 Sle 表达菌株的分离纯化

pET-28a(+)-Sle 重组蛋白经 Ni-NTA 亲和色谱柱纯化后 SDS-PAGE 结果如图 3A 所示,由图可见,目标蛋白可以进行可溶性表达,但是也有部分目标蛋白错误地折叠以包涵体的形式存在,目的蛋白溶出条带大小在 25 kDa 和 35 kDa 之间有明显表达,与预测值(27.8 kDa)基本一致。之后对蛋白进行了精制,分别利用阴离子

交换色谱和凝胶过滤色谱进行纯化,结果如图 3B-3C 所示。通过阴离子交换层析纯化,得到了纯度较高的 Sle 蛋白,后续浓缩的过程中,仍有杂蛋白。因此,在阴离子交换层析纯化的基础上继续利用凝胶过滤层析进行纯化,结果如图 3C 所示,经过 SDS-PAGE 分析,获得了高纯度的目标蛋白,进而以此蛋白进行酶学性质表征测定以及催化实验。

### 2.4 Sle 序列进化树及三维结构催化活性中心形成机制

系统进化树分析显示 *sle* 基因编码蛋白质序列与已经报道的来自肠杆菌 *Enterobacter* sp. 的 BHET 水解酶(MK681857.1)的同源性只有

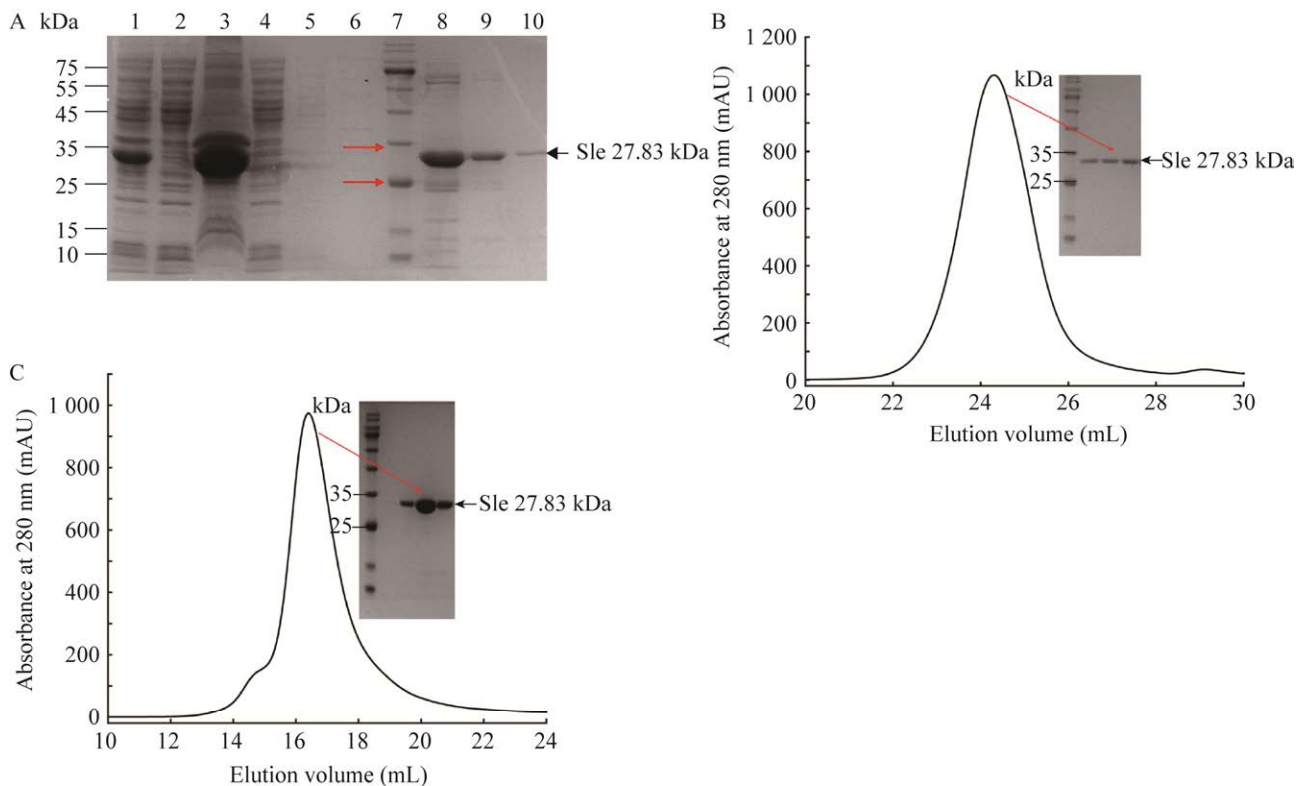


图 3 纯化的 Sle 的 SDS-PAGE 凝胶电泳分析

Figure 3 SDS-PAGE gel electrophoresis analysis of purified Sle. A: Ni column chromatography. 1: Sonication; 2: Supernatant; 3: Sediment; 4: Flow-through; 5: Lysis buffer; 6: Wash buffer; 7: Standard marker; 8–10: Elution buffer. B: Purification of Sle by ion exchange using SOURCE Q column. C: Purification of Sle by gel filtration using a Superdex 200 Increase 10/300 column.

15.61%，与链霉菌 *Streptomyces* sp. HB132 的水解酶(WP\_239580210.1)和糖丝菌 *Saccharothrix* sp.的水解酶(WP\_230570991.1)的保守性分别为 77.13%和 91.92% (图 4A)。

通过 SWISS-MODEL 筛选出与 Sle 的序列同源率为 76.08%，全局模型质量估测值(global model quality estimate, GMQE)为 0.87 和 QMEANDisCo 全局分数为-0.3 的来源于脱叶链霉菌 (*Streptomyces exfoliatus*) 的脂肪酶 SeL (PDB:1jfr) 的晶体结构，以此为模板进行同源建模后再进行分子对接，对接结果表明配体 BHET 小分子能够结合到 Sle 的催化三联体中心上方的

一个宽而浅的疏水口袋，对接时的结合能为 -28.40 kJ/mol，结合自由能为 -12.38 kJ/mol，对接能为 -34.95 kJ/mol, Sle 的复合物结构如图 4B 所示。Sle 蛋白结构由 9 个  $\alpha$  螺旋、9 个  $\beta$  链和多个环区组成。三维结构分析显示，与其他蛋白酶如脂肪酶具有的“盖子”结构相比，该酶具有典型的  $\alpha/\beta$ -水解酶折叠类结构域和催化三联体，Sle 序列中存在 G-H-S-M-G 基序。活性位点由残基 S129、D175 和 H207 组成(图 4C)。

为进一步探索 Sle 酶对 BHET 的催化机制，我们对其相互作用进行了分析，BHET 上羰基 O 原子与 Sle 酶的 S129 羟基形成一个氢键，键长

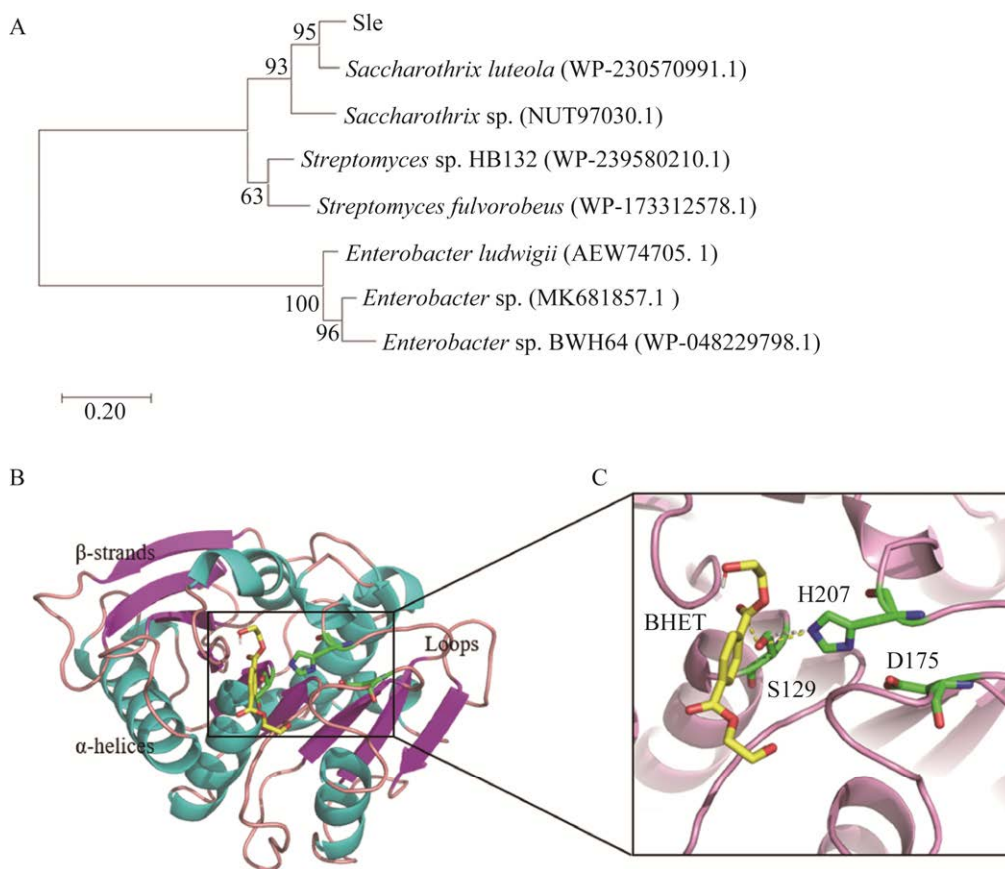


图 4 Sle 进化树分析(A)和复合物结构(B)活性中心示意图(C)

Figure 4 Structural analysis of the Sle-substrate complex model. A: Phylogenetic analysis of Sle. B: Sle complex structure model. C: Schematic diagram of the active center, the catalytic triad center (S129, D175, H207) and BHET are colored as green sticks and yellow sticks, respectively.



为 2.3 Å, Y91、M130 和 W154 构成氧阴离子口袋, S129 作为亲核试剂和 H207、D175 形成电荷中继网络<sup>[22]</sup>。此外, Sle 水解酶具有保守的分子内二硫键(C240–C256), 连接了 Sle 蛋白 C 末端和最后一个 loop 环, 距离催化活性中心较远, 因此, 其不直接影响酶活性, 但与酶结构的完整性相关, 影响结构的稳定性。通过结构分析, 提出了 Sle 水解酶的催化中心形成机制, 这也为进一步酶的定向修饰和应用奠定了良好的基础。

## 2.5 酶学性质表征

### 2.5.1 温度对 Sle 活性和稳定性的影响

以 BHET 为底物, 按上述方法对 Sle 在 25–60 °C 条件下的生化性质进行了表征探究。由图 5A 可见, Sle 在 35 °C 显示最高酶活且能在 25–35 °C 保持 80% 以上的相对酶活, 随着温度的升高, 酶活性不断下降, 当温度达到 60 °C, 残余酶活只有 23.42%。

此外, 该酶在 35 °C 以下孵育 2 h, 残余酶活仍有 80%。在 25–35 °C 之间保温 2 h 内, 出现热激活现象, 残留酶活高于初始酶活, 之后酶活随着温度和保温时间的升高而下降。

当温度升到 55 °C, 只有不到 20% 的残余酶活(图 5B)。结果表明, Sle 应属于中低温的酶。

### 2.5.2 pH 对 Sle 活性和稳定性的影响

按照 1.2.5 描述的方法测定 Sle 重组酶在不同 pH 缓冲液体系中的残余酶活。由图 6A 可见, 在碱性环境下, 该酶活性普遍较酸性环境高。在同样 pH 下, 比较于磷酸盐、甘氨酸和 Tris 缓冲液, HEPES 更适合 Sle 的催化反应。极端 pH 条件(如 5.5、9.5)下, MES、HEPES 和甘氨酸缓冲液中 Sle 的酶活性均低于 30%。因此, Sle 重组蛋白在 pH 为 8.0 的 HEPES 缓冲液中酶活性最高, 其最适 pH 为 8.0。

在 pH 6.0–9.0 条件下, 4 °C 孵育 1 h, 测定 Sle 的残余酶活。由图 6B 可见, 在 pH 7.5–8.5 之间, 酶可以保留 90% 以上的活性。在 pH 8.0 时, Sle 最稳定。这也说明, Sle 具有良好的 pH 耐受范围, 可为后续的 PET 双酶降解提供新的选择。

## 2.6 金属离子对酶活性影响

金属离子通常是酶的潜在抑制剂或激活剂, Sle 与各种金属离子在 35 °C 下预孵育 1 h, 测定它们对 Sle 活性的影响。由图 7 可知, 在

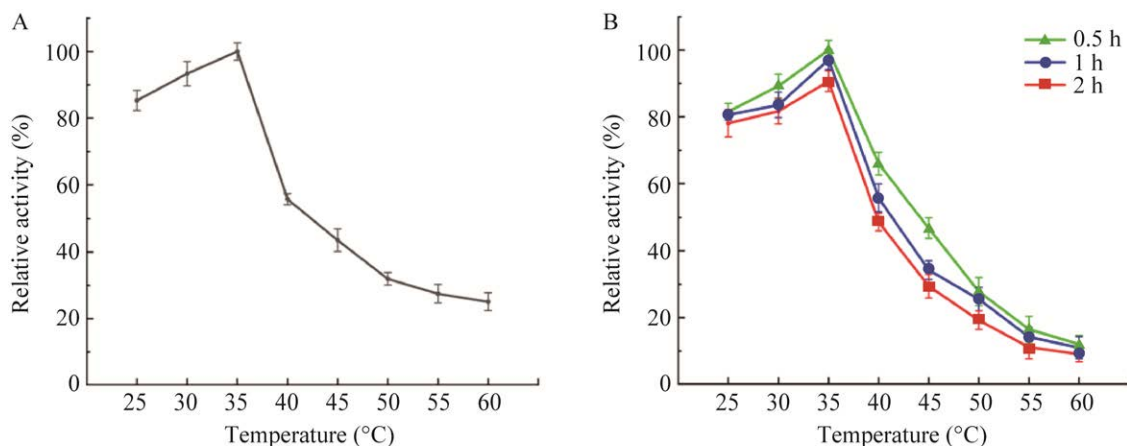


图 5 温度对 Sle 酶活和热稳定性的影响

Figure 5 Effect of temperature on Sle enzyme activity and thermal stability. A: The effect of temperature on activity of Sle. B: Thermostability of Sle.

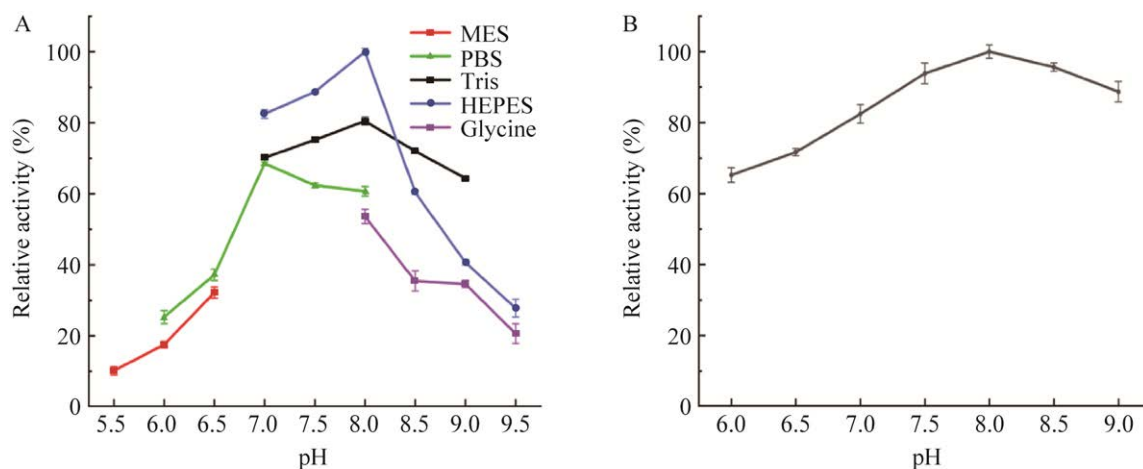


图6 pH对Sle酶活和催化稳定性的影响

Figure 6 Effect of pH on the activity and stability of Sle. A: The effect of pH on activity of Sle. B: pH stability of Sle.

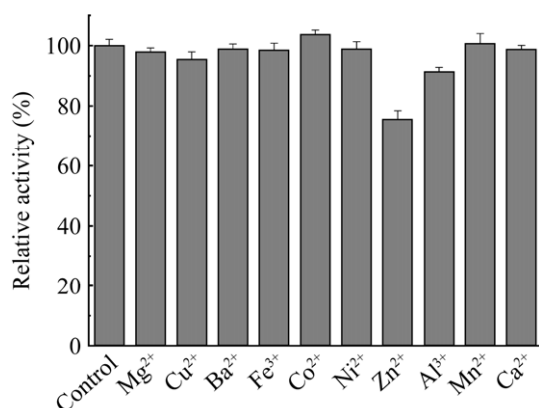


图7 金属离子对Sle活性的影响

Figure 7 Effect of metal ions on Sle activity.

$Co^{2+}$ 的存在下, Sle的酶活性有所提高, 但提高的数值非常有限。此外,  $Zn^{2+}$ 和 $Al^{3+}$ 存在时能够抑制其酶活性, 使其分别降低了25%和9%。其他常见金属离子如 $Mg^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Ba^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$ 、 $Ni^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 对其酶活性基本无明显影响, 这也说明Sle具有良好的稳定性。

## 2.7 Sle底物特异性研究

测定Sle对不同底物PET、BHET和MHET的催化选择性, 结果如图8所示, 该酶对BHET的催化活性最高, 对PET的催化活性只有BHET的11%。推断可能由于PET是长链大分

子, 不易进入其底物结合口袋, 导致其对PET的催化效果欠佳。BHET和MHET在分子链长短及大小方面相似, 但是结果表明, Sle对BHET具有较好的底物特异性, 这可能是因为底物结合口袋氨基酸残基对BHET更敏感, 导致对BHET降解效果较好, 由此可见, 该酶属于BHET降解酶。

## 2.8 高效液相(HPLC)检测Sle催化产物

按照1.2.3中描述的催化体系进行反应后, 利用HPLC对酶催化产物进行检测分析, 结果如图9所示。底物BHET在反应3 h后, 检测

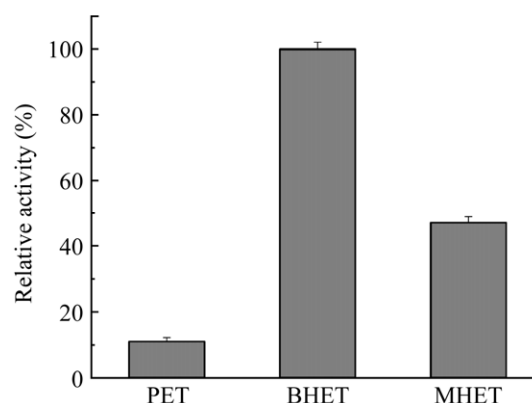


图8 Sle的底物选择性

Figure 8 Substrate selectivity of Sle.

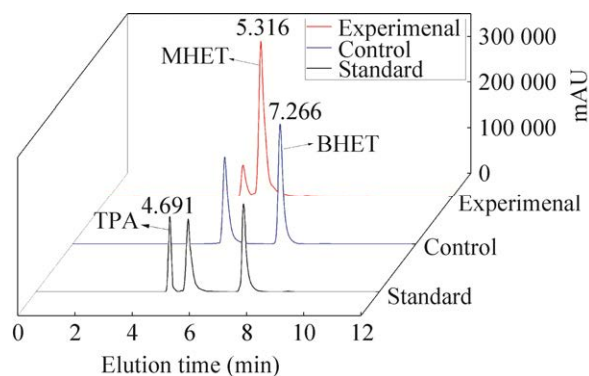


图9 HPLC检测BHET降解产物

Figure 9 Determination of BHET degradation products by HPLC.

到两种主要的代谢产物 MHET 和 TPA, 分别在 5.316 min 和 4.691 min 出峰。由图 9 可知, 当空白组不添加酶进行反应时, 有部分 MHET 生成, 说明 BHET 自身就易水解。同样条件下, 实验组添加酶液进行反应后, 底物 BHET 可以高效地反应生成 MHET 和 TPA。因此, 通过 Sle 对 BHET 的降解产物分析, 进一步明确了 Sle 是 BHET 降解酶, 这也为后续研究生物酶法降解 PET 的新酶挖掘提供了基础。

### 3 讨论

废弃 PET 对全球环境造成了污染, 如何正确处理废弃 PET 已经成为治理环境污染的重要课题。目前, PET 的处理方法主要是垃圾填埋法、热处理法和化学回收法, 其中热处理法的主要缺点是产生致癌物质二恶英和呋喃, 化学回收法虽然不会造成二次污染但是其工作成本高, 均不利于环境和经济的可持续发展。因此, 生物降解 PET 技术越来越被社会各界认可, 其作用条件温和, 降解产物无害且能循环利用。此前的报道也发现一些酶具有水解 BHET 的能力, 如 *H. insolens* 中的角质酶 HiC<sup>[23]</sup>、*Candida antarctica* 中的脂肪酶 CALB<sup>[24]</sup>、*Enterobacter* 中的 EstB<sup>[14]</sup>、细菌中的 IsPETase 和 LCC<sup>[25-26]</sup>

等, 与其他 BHET 水解酶相比, Sle 可以在较短时间内将 BHET 转化为 MHET 和单体 TPA, 具有优良的催化能力, 能够及时减轻 BHET 和 MHET 对 PET 水解酶的抑制, 促进废弃 PET 的降解。然而该酶不耐受高温, 与 PET 水解酶高温降解条件存在较大的温度差异, 因此对酶分子进行改造显得至关重要。首先, 结合复合物三维结构针对非保守性氨基酸进行定点突变, 筛选出热稳定性提高的酶变种。其次, 改造活性中心附近的氨基酸残基, 扩大酶分子的底物结合口袋, 更有利于底物与酶分子结合, 提高降解速率, 实现工业化降解废弃 PET 的途径。

本研究文成功克隆表达了来源于浅黄糖丝菌(*S. luteola*)中一种具有降解塑料中间体的水解酶 Sle, 该酶的理论蛋白分子量大小为 27.83 kDa。将重组质粒 pET-28a(+)-Sle 在 *E. coli* BL21(DE3) 中进行异源表达, 经过 Ni 亲和色谱、阴离子交换色谱和凝胶过滤色谱 3 步纯化, 得到了高纯度的 Sle 目的蛋白。根据测得的酶学性质结果显示, Sle 对 BHET 降解的最适温度和最适 pH 分别为 35 °C 和 8.0, 且在 25–35 °C 和 pH 7.0–9.0 区间内能保持 80% 以上的酶活, 具有较好的 pH 耐受性。此外, 除  $\text{Co}^{2+}$  能够较大幅度地提高酶活力,  $\text{Zn}^{2+}$  和  $\text{Al}^{3+}$  降低酶活力外, 其他常见金属离子对酶活力基本无影响, 因此, 该酶具有良好的稳定性。采用 HPLC 鉴定了 Sle 能特异性水解 BHET, 且其催化产物为 MHET 和 TPA, 验证了 Sle 属于 BHET 水解酶。根据获得的复合物三维结构, 分析得到了 Sle 的催化活性中心由 S129、D175 和 H207 组成, 解析了其催化中心形成机制, 为后续该酶晶体结构解析及改造应用提供了基础。

### REFERENCES

- [1] SAGONG HY, SEO H, KIM T, SON HF, JOO S, LEE

- SH, KIM S, WOO JS, HWANG SY, KIM KJ. Decomposition of the PET film by MHETase using exo-PETase function[J]. ACS Catalysis, 2020, 10(8): 4805-4812.
- [2] SHI LX, LIU HF, GAO SF, WENG YX, ZHU LL. Enhanced extracellular production of IsPETase in *Escherichia coli* via engineering of the pelB signal peptide[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(7): 2245-2252.
- [3] HUANG X, CAO LC, QIN ZM, LI SF, KONG W, LIU YH. Tat-independent secretion of polyethylene terephthalate hydrolase PETase in *Bacillus subtilis* 168 mediated by its native signal peptide[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(50): 13217-13227.
- [4] GEYER R, JAMBECK JR, LAVENDER LAW K. Production, use, and fate of all plastics ever made[J]. Science Advances, 2017, 3(7): e1700782.
- [5] THOMPSON RC, MOORE CJ, VOM SAAL FS, SWAN SH. Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2009, 364(1526): 2153-2166.
- [6] HOPEWELL J, DVORAK R, KOSIOR E. Plastics recycling: challenges and opportunities[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2009, 364(1526): 2115-2126.
- [7] CHEN CC, HAN X, KO TP, LIU WD, GUO RT. Structural studies reveal the molecular mechanism of PETase[J]. The FEBS Journal, 2018, 285(20): 3717-3723.
- [8] 姜杉, 苏婷婷, 王战勇. 聚对苯二甲酸乙二醇酯 (PET)生物降解进展[J]. 塑料, 2021, 50(4): 90-95.
- JIANG S, SU TT, WANG ZY. Progress in biodegradation of polyethylene terephthalate (PET)[J]. Plastics, 2021, 50(4): 90-95 (in Chinese).
- [9] GOMES TS, VISCONTE LLY, PACHECO EBAV. Life cycle assessment of polyethylene terephthalate packaging: an overview[J]. Journal of Polymers and the Environment, 2019, 27(3): 533-548.
- [10] 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.
- [11] WITT U, YAMAMOTO M, SEELIGER U, MÜLLER RJ, WARZELHAN V. Biodegradable polymeric materials—not the origin but the chemical structure determines biodegradability[J]. Angewandte Chemie International Edition, 1999, 38(10): 1438-1442.
- [12] GAN Q, ALLEN SJ, TAYLOR G. Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview, an experimental study and mathematical modelling[J]. Process Biochemistry, 2003, 38(7): 1003-1018.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] KNOTT BC, 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, LEE WOODCOCK H, 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 of the United States of America, 2020, 117(41): 25476-25485.
- [16] MAO SH, LIU X, GAO X, ZHU ZL, SUN DY, LU FP, QIN HM. Design of an efficient whole-cell biocatalyst for the production of hydroxyarginine based on a multi-enzyme cascade[J]. Bioresource Technology, 2020, 318: 124261.
- [17] QIN HM, GAO DK, ZHU ML, LI C, ZHU ZL, WANG HB, LIU WD, TANOKURA M, LU FP. Biochemical characterization and structural analysis of ulvan lyase from marine *Alteromonas* sp. reveals the basis for its salt tolerance[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 147: 1309-1317.
- [18] MAO SH, CHENG XT, ZHU ZL, CHEN Y, LI C, ZHU ML, LIU X, LU FP, QIN HM. Engineering a thermostable version of D-allulose 3-epimerase from *Rhodospirellula baltica* via site-directed mutagenesis based on B-factors analysis[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2020, 132: 109441.
- [19] ZHU ZL, LI C, CHENG XT, CHEN Y, ZHU ML, LIU

- X, MAO SH, QIN HM, LU FP. Soluble expression, purification and biochemical characterization of a C-7 cholesterol dehydrogenase from *Drosophila melanogaster*[J]. Steroids, 2019, 152: 108495.
- [20] PALM GJ, REISKY L, BÖTTCHER D, MÜLLER H, MICHELS EAP, WALCZAK MC, BERNDT L, WEISS MS, BORNSCHEUER UT, WEBER G. Structure of the plastic-degrading *Ideonella sakaiensis* MHEase bound to a substrate[J]. Nature Communications, 2019, 10: 1717.
- [21] WATERHOUSE A, BERTONI M, BIENERT S, STUDER G, TAURIELLO G, GUMIENNY R, HEER FT, de BEER TAP, REMPFER C, BORDOLI L, LEPORE R, SCHWEDE T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes[J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(W1): W296-W303.
- [22] 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(04): 374-384.
- LI ZS, GAO J, CHEN SC, GUO RT, LIU WD, HAN X. Structure, function and application of hydrolases for polyethylene terephthalate (PET) degradation[J]. Bioprocessing. 2022, 20(4): 374-384 (in Chinese).
- [23] MACHADO de CASTRO A, CARNIEL A, STAHELIN D, CHINELATTO LS Jr, de ANGELI HONORATO H, 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] NIMCHUA T, EVELEIGH DE, SANGWATANAROJ U, PUNNAPAYAK H. Screening of tropical fungi producing polyethylene terephthalate-hydrolyzing enzyme for fabric modification[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2008, 35(8): 843-850.
- [25] 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.
- [26] 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.

(本文责编 陈宏宇)