

一种聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)水解新酶的挖掘与酶学性质分析

赵伟^{1,3}, 毕海珍^{2,3}, Yew Maxine³, 翟欢欢³, 张翠英¹, 朱蕾蕾^{3*}

1 天津科技大学 生物工程学院, 天津

2 天津中医药大学 研究生院, 天津

3 中国科学院天津工业生物技术研究所, 低碳合成工程生物学全国重点实验室, 天津

赵伟, 毕海珍, Yew Maxine, 翟欢欢, 张翠英, 朱蕾蕾. 一种聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)水解新酶的挖掘与酶学性质分析[J]. 微生物学报, 2025, 65(7): 3126-3135.

ZHAO Wei, BI Haizhen, Yew Maxine, ZHAI Huanhuan, ZHANG Cuiying, ZHU Leilei. Discovery and characterization of a new enzyme for hydrolyzing polyethylene terephthalate (PET)[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(7): 3126-3135.

摘要: 【目的】聚对苯二甲酸乙二醇酯(polyethylene terephthalate, PET)的生物酶法解聚是通过PET水解酶催化PET水解, 得到终产物对苯二甲酸和乙二醇。通过基因挖掘获得新的PET水解酶, 可为废弃PET的生物酶法解聚提供可用于分子改造的蛋白。【方法】通过基因挖掘的方法发现来源于 *Alkalilimnicola ehrlichii* 的未知功能蛋白(命名为 AePETase)具有水解无定形PET膜的活性, 并对 AePETase 进行异源表达、纯化和酶学性质研究。【结果】确定了 AePETase 的 T_m 值为 $(53.0 \pm 0.7)^\circ\text{C}$, 最适反应温度为 45°C , 最适缓冲液体系为 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ (100 mmol/L, pH 8.0), 较合适的酶浓度为 $1.0 \mu\text{mol/L}$ 以内。在 45°C 条件下, 无定形PET膜的水解产物量为已报道的 IsPETase 的 13.4 倍(72 h)。【结论】AePETase 对 PET 具有较好的水解活性, 是一种具有较大潜力的 PET 水解新酶。

关键词: PET 水解酶; 基因挖掘; AePETase

资助项目: 国家重点研发计划(2023YFC3905000)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2023YFC3905000).

*Corresponding author. E-mail: zhu_ll@tib.cas.cn

Received: 2025-01-06; Accepted: 2025-03-04; Published online: 2025-06-04

Discovery and characterization of a new enzyme for hydrolyzing polyethylene terephthalate (PET)

ZHAO Wei^{1,3}, BI Haizhen^{2,3}, Yew Maxine³, ZHAI Huanhuan³, ZHANG Cuiying¹, ZHU Leilei^{3*}

1 School of Biological Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin, China

2 Graduate School, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin, China

3 State Key Laboratory of Engineering Biology for Low-carbon Manufacturing, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin, China

Abstract: [Objective] The enzymatic depolymerization of polyethylene terephthalate (PET) involves the hydrolysis of PET catalyzed by PET hydrolases, leading to the production of terephthalic acid and ethylene glycol. In this study, we identified a new PET hydrolase through gene mining, with the goal of providing enzymes for efficient depolymerization of waste PET. [Methods] A previously uncharacterized functional enzyme, named as AePETase, was identified through gene mining. This enzyme demonstrated the ability to hydrolyze amorphous PET films. Subsequently, heterologous expression, purification, and enzymatic characterization were performed for AePETase. [Results] AePETase showed a T_m value of (53.0 ± 0.7) °C, and an optimal reaction temperature of 45 °C. The optimal buffer was $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ (100 mmol/L, pH 8.0), and the optimal enzyme concentration was 1 $\mu\text{mol/L}$. After 72 h, the hydrolysis of amorphous PET films by AePETase resulted in 13.4-fold more products than that by the reported *Is*PETase. [Conclusion] AePETase demonstrates significant hydrolytic activity on PET and represents a promising new enzyme for hydrolyzing PET.

Keywords: polyethylene terephthalate (PET) hydrolase; gene mining; AePETase

聚对苯二甲酸乙二醇酯 (polyethylene terephthalate, PET)是由对苯二甲酸 (terephthalic acid, TPA)和乙二醇 (ethylene glycol, EG)通过酯键连接而成的一种应用广泛的石油基合成聚合物^[1]。由于 PET 具有低成本、便携性、耐用性和气体阻隔能力等优点,已被广泛应用于饮料瓶、产品包装和纺织等行业^[2]。

现阶段大部分 PET 塑料制品为一次性消费品,废弃后主要通过物理、化学和生物法 3 种方式实现降解与循环利用。物理再生法是将废弃 PET 塑料经过清洗、破碎、再加工等方式得到 PET 纤维或 PET 瓶等再生产品;化学循环法是将废弃 PET 材料通过化学法完全或部分降解为单体或低聚物,实现循环利用,主要方法包括

水解法、氨解法、醇解法和热降解法等^[3-6];生物酶法主要通过酶催化水解将 PET 降解为对苯二甲酸双羟乙酯 [bis(2-hydroxyethyl) terephthalate, BHET]、对苯二甲酸单羟乙酯 [mono(2-hydroxyethyl) terephthalate, MHET]、对苯二甲酸和乙二醇等产物。生物酶法反应条件温和且安全环保,降解产物单体能够用于重新合成 PET,具有循环经济的应用前景。

近年来,已从微生物中发现多种可降解 PET 的 PET 水解酶,如角质酶和 PETase 等。角质酶是存在于大多数植物病原菌和腐生植物中的胞外丝氨酸酯酶^[7],属于 α/β -水解酶家族,具有由 Ser、His 和 Asp 组成的催化三联体活性位点^[8]。目前研究发现多种嗜热性角质酶(如 LCC、

Cut190、TfCut2、HiC、FSC、PES-H1、TfH 等^[9-14])能够在高温条件下降解 PET 塑料。PETase 是 2016 年从以 PET 为唯一碳源的大阪伊德氏杆菌(*Ideonella sakaiensis*) 201-F6 中鉴定出的常温 PET 水解酶^[15]。IsPETase 具有典型的 α/β -水解酶折叠结构^[16], 由 S160-H237-D206 构成的催化三联体以及由 Y87 和 M161 构成的氧阴离子穴; 当 PET 通过疏水相互作用与 PETase 结合时, 通过催化三联体进行 2 次亲核攻击, 裂解酯键使产物从活性中心释放^[17-18]。与角质酶相比, 来源于 *I. sakaiensis* 201-F6 的 IsPETase 能够在 30–40 °C 更加特异性地降解 PET。

本研究以 IsPETase 的氨基酸序列作为模板进行 BLAST, 对中常温 PET 水解酶进行基因挖掘, 并将重组质粒转入大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)中进行异源表达、纯化以及酶学性质研究, 以期为废弃 PET 的生物酶法解聚提供可进一步改造的新酶催化剂。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

菌株 *E. coli* BL21(DE3)和质粒 pET-22b(+)均由本实验室保存; 含有 PET 水解酶基因的重组质粒 pET22b-AmPETase 和 pET22b-AePETase 委托苏州金唯智生物科技有限公司天津分公司合成。

1.1.2 主要试剂和仪器

氨苄青霉素(ampicillin, Amp)购自北京兰博利德商贸有限公司; 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; 无定形 PET 膜(Goodfellow, 250 μ m)购自顾特服(上海)贸易有限公司。

Agilent 1260 Infinity II, 安捷伦科技有限公司; 酶标仪, Molecular Devices 公司; 恒温摇床, 上海知楚仪器有限公司; 高压灭菌锅, 上海伯能仪器有限公司。

1.2 PET 水解酶的基因挖掘

以来源于 *I. sakaiensis* 201-F6 的 IsPETase 氨基酸序列为模板, 使用蛋白聚类分析工具(enzyme similarity tool, EFI)在 UniProtKB 数据库(<https://www.uniprot.org/>)中进行 BLAST, 通过设定 alignment score threshold 值对 BLAST 得到的所有序列进行序列相似性比较, 进而构建得到序列相似网络图(sequence similarity network, SSN)。使用 Cytoscape v.3.10.3 软件对序列相似网络图进行可视化, 选择 IsPETase 所在簇中的 100 条序列, 并使用 MEGA 软件进行多序列比对, 去除不合群序列。使用邻接法将剩余序列构建系统发育树, 选用步长检验的检验方法, 设置检验次数为 1 000 次。距离模型选择 *P*-distance, 部分删除多序列比对中 contain 空位的列。最终得到的步长检验合并树大多数的节点可信度大于 70%, 进而通过考虑所属分支、序列相似性、菌属来源等因素选择了 2 条候选序列进行蛋白表达与活性表征。

1.3 PET 水解酶的表达与纯化

将 PET 水解酶表达载体 pET22b-AmPETase 和 pET22b-AePETase 转入 *E. coli* BL21(DE3)中, 涂布平板, 37 °C 培养 12 h 长出单克隆菌落。挑取单菌落于 20 mL LB 培养基中, 37 °C、220 r/min 培养 12–16 h, 以体积分数 1% 的接种量接种到 1 L LB 培养基中, 37 °C、220 r/min 摇床培养至 OD_{600} 为 0.6–0.8, 加入诱导剂 IPTG, 使其终浓度为 0.1 mmol/L, 20 °C 继续培养 24 h。培养完成后, 使用 4 °C、5 000 r/min 低温高速离心机离心 50 min, 收集菌体与上清液粗酶液。使用 0.45 μ m 滤膜将粗酶液过膜处理后, 再使用 5 kDa 滤膜浓缩至原体积的 10%。0.22 μ m 滤膜过膜处理后, 使用 AKTA 纯化仪和 5 mL HisTrap HP 层析柱纯化蛋白, A 液为含 300 mmol/L NaCl 的 50 mmol/L NaH_2PO_4 缓冲液(pH 8.0), B 液为含 300 mmol/L NaCl 和 250 mmol/L 咪唑的 50 mmol/L NaH_2PO_4 缓冲液(pH 8.0)。利用不同

浓度咪唑梯度洗脱的方式得到纯化后的蛋白,再使用 50 mL HiPrep 26/10 脱盐柱将纯化后蛋白置换至 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液(100 mmol/L, pH 8.0)中,保存于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 。

1.4 PET 水解酶表观熔化温度(T_m 值)的测定

使用荧光热稳定性测定法检测 PET 水解酶的 T_m 值。检测方法:将 20 μL 蛋白混合液(包含 0.5 mg/mL 纯化后蛋白 10 μL , 超纯水 2.5 μL , 蛋白质染液 2.5 μL 和蛋白质染液缓冲液 5 μL)转移到 96 孔 PCR 板中,用光学质量密封胶带密封,并在 ABI 7500 FAST RT-PCR 仪中以 1% 的加热速率从 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 加热到 $99\text{ }^\circ\text{C}$ 。监测升温过程中蛋白质变性的荧光信号变化, T_m 值由一阶导数曲线确定。

1.5 PET 水解酶活性的测定

标准品标准曲线的配制:标准品有对苯二甲酸单羟乙酯[mono(2-hydroxyethyl) terephthalate, MHET]、对苯二甲酸(terephthalic acid, TPA)。分别配制成 10 mmol/L 母液,并稀释至 $10\text{--}1\ 000\ \mu\text{mol/L}$ 的梯度标准溶液,通过 HPLC 检测可得到标准品的标准曲线。

HPLC 检测条件:EF-C18 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm),流动相为 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ (20 mmol/L, pH 7.0)缓冲液,内含 30%–70% 乙腈线性梯度液,流速为 0.8 mL/min,上样量为 10 μL ,检测波长为 260 nm。

PET 水解酶活性的测定:在 2 mL $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ (100 mmol/L, pH 8.0)缓冲液中,将 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 纯酶与 6 mm 圆形无定形 PET 膜(Goodfellow, 8.3 mg)分别在 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 和 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下反应 48 h。加入等体积含有 25% 乙腈的缓冲液终止反应,对样品进行稀释和过膜处理(0.22 μm 滤膜)后,用于高效液相色谱分析。

1.6 酶水解反应的最适温度研究

酶水解活性测定温度设置为 $30\text{、}35\text{、}40\text{、}45\text{、}50\text{ }^\circ\text{C}$,分别取 24 h 和 72 h 样品,终止反应

后检测水解产物 TPA、MHET 含量,HPLC 检测方法同 1.5 节。

1.7 酶水解反应的最适缓冲液体系研究

酶水解活性测定缓冲液分别设置为 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ (100 mmol/L, pH 7.0)、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ (100 mmol/L, pH 8.0)、Tris-HCl (50 mmol/L, pH 8.0)、 KH_2PO_4 (100 mmol/L, pH 8.0)、Glycine-NaOH (100 mmol/L, pH 9.0),分别取 24 h 和 72 h 样品,终止反应后检测水解产物 TPA 和 MHET 的含量,HPLC 检测方法同 1.5 节。

1.8 酶水解反应的最适酶量研究

酶水解活性测定的酶浓度设置为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 $\mu\text{mol/L}$,分别取 24 h 和 72 h 样品,终止反应后检测水解产物 TPA 和 MHET 的含量,HPLC 检测方法同 1.5 节。

1.9 PET 水解酶与 *IsPETase* 水解活性比较

在 $45\text{ }^\circ\text{C}$ 、2 mL $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ (100 mmol/L, pH 8.0)缓冲液条件下,分别进行 0.5 $\mu\text{mol/L}$ AePETase 和 *IsPETase* 纯酶与 6 mm 无定形 PET 膜的水解反应,分别取 24 h 和 72 h 样品,终止反应后检测水解产物量,比较 PET 水解酶与 *IsPETase* 水解产物 TPA 和 MHET 的含量,HPLC 检测方法同 1.5 节。

2 结果与分析

2.1 PET 水解酶的挖掘

如图 1A 所示,通过 Cytoscape v.3.10.3 软件对序列相似网络图进行可视化分析,构建得到的序列相似网络中,*IsPETase* 所在的簇为第一条红色簇,与 *IsPETase* 所在节点相关联的其他节点中包含的蛋白质序列可能与 *IsPETase* 具有相似功能(催化 PET 水解)。从相关节点包含的蛋白质序列中挑选 100 条序列构建系统发育树。如图 1B 所示,将系统发育树根据起始节点划分为 3 部分。考虑到发育树节点的划分与物种蛋白进化

及亲缘关系有关, 选择与模板序列距离较近的同—节点分支的来源于 *Alkalilimnicola ehrlichii* 的假定蛋白和较远的不同节点分支的来源于大白蚁马杜拉放线菌(*Actinomadura macrotermitis*)的假定蛋白在 *E. coli* BL21(DE3)中表达并验证功能, 分别命名为 AePETase 和 AmPETase。AePETase 和 AmPETase 的理论分子量分别为 33.0 kDa 和 30.8 kDa, 与 IsPETase 的序列一致性分别为 48% 和 39%。

2.2 酶的可溶性表达与纯化

对挖掘到的 PET 水解酶基因进行合成, 转入 *E. coli* BL21(DE3)中后, 用 IPTG 进行诱导表达, 并通过 SDS-PAGE 分析 AmPETase 和 AePETase 在 *E. coli* BL21(DE3)中的可溶性表达情况。如图 2A 所示, 与 pET22b(+)空载相比, 候选酶 AmPETase 在分子量 25–35 kDa 处有明显条带, 大小与理论分子量(30.8 kDa)一致, 因此判断 AmPETase 在 *E. coli* BL21(DE3)中可溶性表达较好。如图 2B 所示, 与 pET22b(+)空载相比, 候选酶 AePETase 在分子量 25–35 kDa 处有明显条带, 大小与理论分子量(33.0 kDa)一致, 因此判断 AePETase 在 *E. coli* BL21(DE3)中可溶性表达较好。进一步通过 AKTA 纯化, 获得了纯度较高

的 AmPETase 和 AePETase 纯酶(图 2C), 用于后续的酶学性质研究。

2.3 热稳定性测定

通过 ABI 7500 FAST RT-PCR 仪检测从 25 °C 加热到 99 °C 过程中蛋白质变性的荧光信号变化, 确定一阶导数曲线, 计算 PET 水解酶的平均 T_m 值。AmPETase 的 T_m 值为(54.6±1.4) °C, AePETase 的 T_m 值为(53.0±0.7) °C。因此推断 AmPETase 和 AePETase 均为中常温 PET 水解酶。

2.4 无定形 PET 膜水解活性

分别在 30 °C 和 40 °C 条件下, 在 2 mL $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ (100 mmol/L, pH 8.0) 缓冲液中将 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 纯酶与 6 mm 圆形无定形 PET 膜反应 48 h。如图 3A 所示, 在 30 °C 条件下, AmPETase 并未检测到最终产物 TPA 与 MHET, AePETase 生成了 0.48 $\mu\text{mol/L}$ 的 TPA 与 MHET; 如图 3B 所示, 在 40 °C 条件下, AmPETase 并未检测到最终产物 TPA 和 MHET, 而 AePETase 生成了 86.72 $\mu\text{mol/L}$ 的 TPA 和 MHET。因此推断 AmPETase 对无定形 PET 膜无水解活性, 而 AePETase 对无定形 PET 膜具有较好的水解活性, 并选择 AePETase 进行后续相关酶学性质研究。

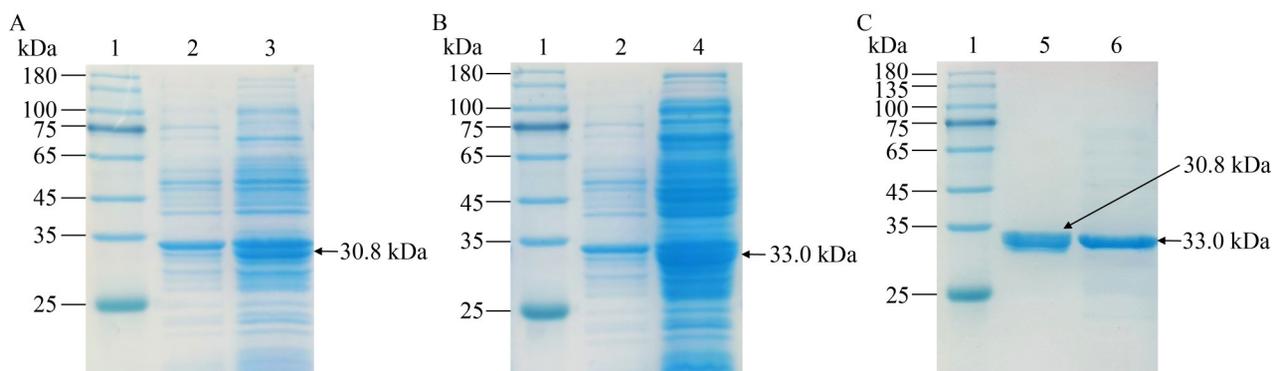


图2 SDS-PAGE分析AmPETase (A)和AePETase (B)的可溶性表达及纯化后的AmPETase和AePETase (C)
 Figure 2 SDS-PAGE analysis of soluble expression of AmPETase (A) and AePETase (B), and the purification efficiency of AmPETase and AePETase (C). 1: Protein marker; 2: pET22b(+); 3: Extracellular crude enzyme supernatant of pET22b-AmPETase; 4: Extracellular crude enzyme supernatant of pET22b-AePETase; 5: Purified AmPETase; 6: Purified AePETase.

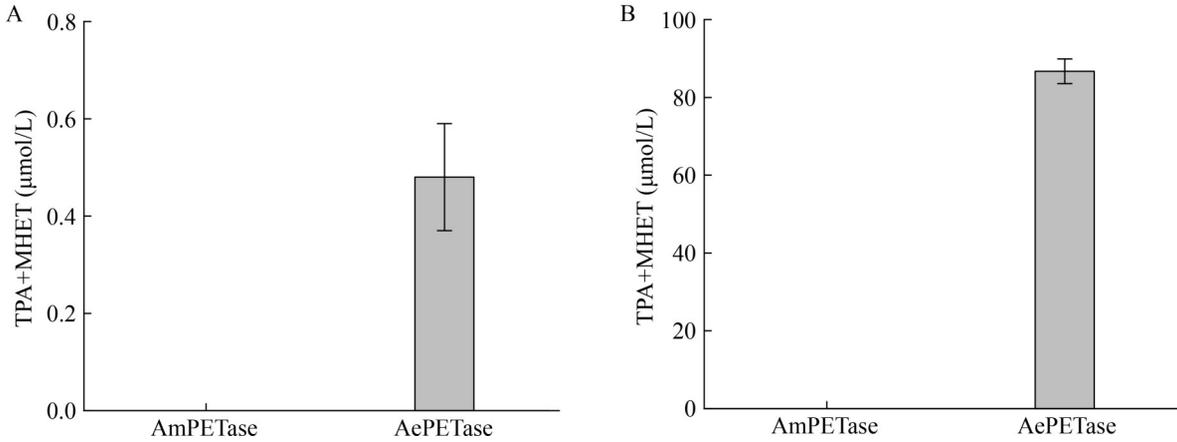


图3 两种新酶在30 °C (A)和40 °C (B)水解无定形膜产物量

Figure 3 Total amount of products from the hydrolysis of amorphous membranes by AmPETase and AePETase at 30 °C (A) and 40 °C (B).

2.5 最适温度

在 30–50 °C 条件下, 进行 AePETase 与无定形 PET 膜水解反应, 检测了 24 h 和 72 h 的 TPA 与 MHET 总产量。如图 4 所示, 随着反应温度从 30 °C 增加到 45 °C, TPA 与 MHET 总产量不断增加。在 30 °C 时, 72 h 的总产量为 1.04 $\mu\text{mol/L}$, 而在 45 °C 时, 72 h 总产量提升至 192.67 $\mu\text{mol/L}$; 从 45 °C 增加到 50 °C, TPA 与 MHET 总产量开始下降, 在 50 °C 时, 72 h 总产量下降为 4.72 $\mu\text{mol/L}$, 说明 AePETase 在 45 °C 下对无定形 PET 膜具有最高的水解活性。

2.6 最适缓冲液与 pH

选择总产物量较高的反应温度 40 °C 和 45 °C, 分别在以下 5 种缓冲液体系中进行 AePETase 与无定形 PET 膜水解反应: $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ (100 mmol/L, pH 7.0)、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ (100 mmol/L, pH 8.0)、Tris-HCl (50 mmol/L, pH 8.0)、 KH_2PO_4 (100 mmol/L, pH 8.0)、Glycine-NaOH (100 mmol/L, pH 9.0), 检测 24 h 和 72 h 的 TPA 与 MHET 总产量。如图 5 所示, 在 40 °C 时, $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ (100 mmol/L, pH 8.0) 和 KH_2PO_4 (100 mmol/L, pH 8.0) 的 72 h 总产物量基本相同, 分别为 152.25 $\mu\text{mol/L}$ 和 150.68 $\mu\text{mol/L}$;

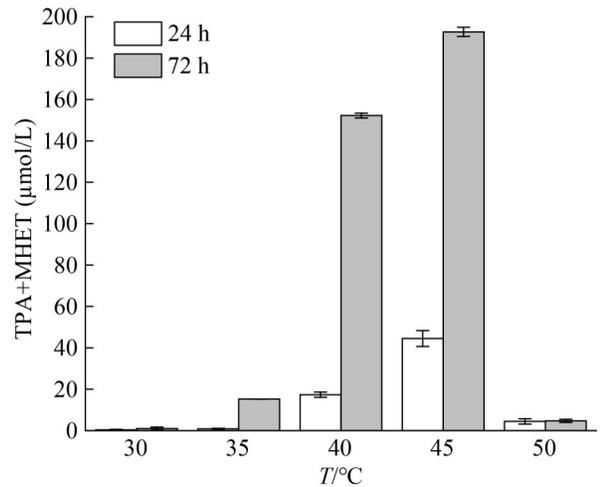


图4 不同温度下无定形膜水解产物总量

Figure 4 Total amount of products from the hydrolysis of amorphous membranes at different temperatures.

而在 45 °C 时, $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ (100 mmol/L, pH 8.0) 的 72 h 总产物量更高, 说明 AePETase 在 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ (100 mmol/L, pH 8.0) 缓冲液下对无定形 PET 膜具有更高的水解活性。在 40 °C 和 45 °C 条件下, Tris-HCl (50 mmol/L, pH 8.0) 和 Glycine-NaOH (100 mmol/L, pH 9.0) 均未检测到水解产物。

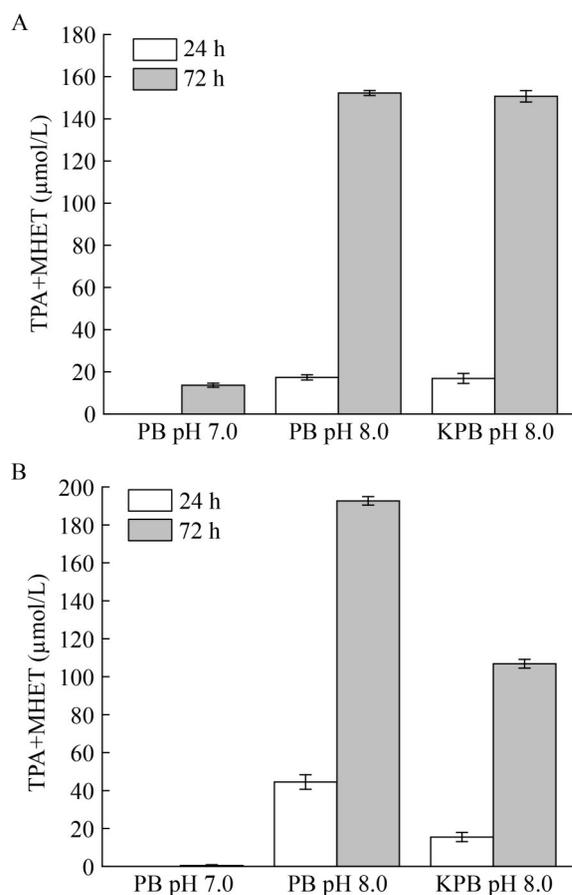


图5 40 °C (A)和45 °C (B)条件下, 不同缓冲液体系无定形膜水解产物总量

Figure 5 Total amount of products from the hydrolysis of amorphous membranes with different buffer systems at 40 °C (A) and 45 °C (B). PB: $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$; KPB: KH_2PO_4 .

2.7 最适酶量

在酶浓度设置为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 $\mu\text{mol/L}$ 的条件下, 进行 AePETase 与无定形 PET 膜水解反应, 检测了 24 h 和 72 h 的 TPA 与 MHET 总产量。如图 6 所示, 随着酶浓度从 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 增加到 1.0 $\mu\text{mol/L}$, 24 h 产物总量从 44.49 $\mu\text{mol/L}$ 下降到 13.68 $\mu\text{mol/L}$, 但 72 h 水解产物总量提高至 200.84 $\mu\text{mol/L}$; 当酶浓度从 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 增加到 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 时, 24 h 和 72 h 水解产物量均出现降低现象。因此推测

AePETase 较为合适的酶浓度应为 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 以内。

2.8 AePETase 与 IsPETase 水解 PET 的活性比较

如图 7 所示, AePETase 在 24 h 和 72 h 的水解产物总量均高于 IsPETase。在 72 h 时,

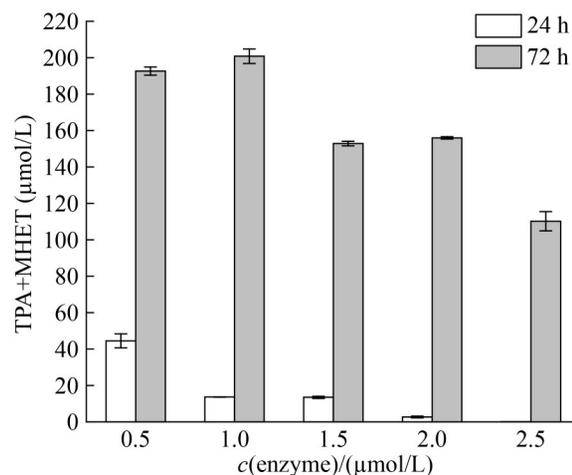


图6 不同酶浓度无定形膜水解产物总量

Figure 6 Total amount of products from the hydrolysis of amorphous membranes with different enzyme concentrations.

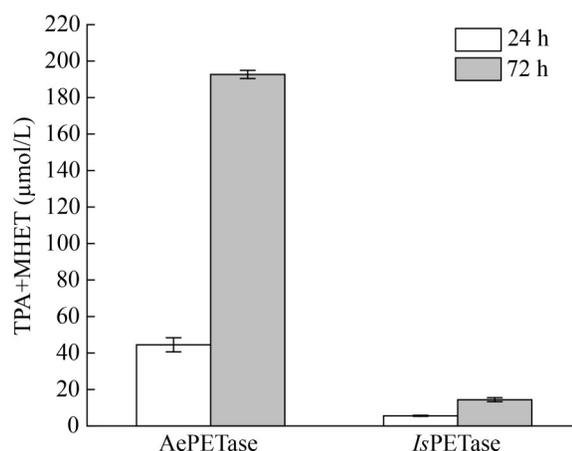


图7 AePETase与IsPETase水解无定形膜产物总量比较

Figure 7 Comparison of the total amount of products from the hydrolysis of amorphous membranes by AePETase and IsPETase.

AePETase 与 *Is*PETase 的水解产物总量分别为 192.67 $\mu\text{mol/L}$ 和 14.39 $\mu\text{mol/L}$, AePETase 的总产物量达到 *Is*PETase 的 13.4 倍。

3 讨论与结论

PET 塑料已成为固体垃圾和海洋微塑料污染的重要来源之一,对废弃 PET 进行有效地降解回收,是解决固体废弃物污染的重要方向。在本研究中,通过基因挖掘手段挑选了 2 条以 *Is*PETase 为模板挖掘到的中常温候选 PET 水解酶,并在 *E. coli* BL21(DE3)中实现了异源表达与酶学性质研究。研究发现,与 *Is*PETase 处于同一分支的 AePETase 相较于 *Is*PETase 对无定形 PET 膜具有更显著的水解活性,而不同分支的 AmPETase 虽实现了可溶性表达与纯化,但与无定形 PET 膜反应时未检测到水解产物。结构分析发现 2 条候选新酶均具有与 *Is*PETase 相似的 Ser-His-Asp 催化三联体。考虑到无定形 PET 膜是由 TPA 和 EG 构成的长链大分子且具有一定结晶度,而结晶度对 PET 水解酶的反应速率有较大影响^[19],推测 AmPETase 可能对具有结晶度的长链酯键大分子水解能力较差,因此未检测到产物。

对 AePETase 的酶学性质检测表明,该酶在 40–45 °C 具有较高的水解活性,最适缓冲液体系为 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ (100 mmol/L, pH 8.0),而 Tris-HCl (50 mmol/L, pH 8.0) 和 Glycine-NaOH (100 mmol/L, pH 9.0) 均未检测到水解产物,原因可能是这 2 种缓冲液体系影响了 AePETase 的水解活性。在对酶浓度进行优化的过程中发现, AePETase 较为合适的酶浓度为 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 以内,高浓度的酶并不会产生更多产物,这种现象与目前大多数 PET 水解酶相似。在确定最适条件后,对 AePETase 与已报道的 *Is*PETase 进行了水解活性比较,发现 AePETase 的水解活性远高于 *Is*PETase,是一种具有较高潜力的 PET 水解新酶。后续可通过分子改造等方法提高 AePETase 的水解活性和热稳定性。

作者贡献声明

赵伟: PET 水解酶的挖掘、性能测试及文章撰写; 毕海珍: PET 水解酶的克隆表达; Yew Maxine: PET 水解酶的活性测试; 翟欢欢: 部分数据分析及文章修改; 张翠英: 实验设计及文章修改; 朱蕾蕾: 整体实验设计及文章修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在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。

参考文献

- [1] WEBB H, ARNOTT J, CRAWFORD R, IVANOVA E. Plastic degradation and its environmental implications with special reference to poly(ethylene terephthalate)[J]. *Polymers*, 2013, 5(1): 1-18.
- [2] BORNSCHEUER UT. Feeding on plastic[J]. *Science*, 2016, 351(6278): 1154-1155.
- [3] VEREGUE FR, PEREIRA Da SILVA CT, MOISÉS MP, MENEGUIN JG, GUILHERME MR, ARROYO PA, FAVARO SL, RADOVANOVIC E, GIROTTO EM, RINALDI AW. Ultrasmall cobalt nanoparticles as a catalyst for PET glycolysis: a green protocol for pure hydroxyethyl terephthalate precipitation without water[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2018, 6(9): 12017-12024.
- [4] MUSALE RM, SHUKLA SR. Deep eutectic solvent as effective catalyst for aminolysis of polyethylene terephthalate (PET) waste[J]. *International Journal of Plastics Technology*, 2016, 20(1): 106-120.
- [5] TANG J, MENG XS, CHENG XJ, ZHU QQ, YAN DX, ZHANG YJ, LU XM, SHI CY, LIU XM. Mechanistic insights of cosolvent efficient enhancement of PET methanol alcohololysis[J]. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2023, 62(12): 4917-4927.
- [6] LIU ZD, ZHANG X, WANG MM, ZHANG D. Study on the hydrolysis of PET catalyzed by carbonates under microwave irradiation[J]. *Advanced Materials Research*, 2014, 1078: 36-39.
- [7] PURDY RE, KOLATTUKUDY PE. Hydrolysis of plant cuticle by plant pathogens. Properties of cutinase I, cutinase II, and a nonspecific esterase isolated from *Fusarium solani* pisi[J]. *Biochemistry*, 1975, 14(13): 2832-2840.
- [8] MARTINEZ C, de GEUS P, LAUWEREYS M, MATTHYSSENS G, CABBILLAU C. *Fusarium solani* cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent[J]. *Nature*, 1992, 356(6370): 615-618.
- [9] SULAIMAN S, YOU DJ, KANAYA E, KOGA Y,

- KANAYA S. Crystal structure and thermodynamic and kinetic stability of metagenome-derived LC-cutinase[J]. *Biochemistry*, 2014, 53(11): 1858-1869.
- [10] KAWAI F, ODA M, TAMASHIRO T, WAKU T, TANAKA N, YAMAMOTO M, MIZUSHIMA H, MIYAKAWA T, TANOKURA M. A novel Ca²⁺-activated, thermostabilized polyesterase capable of hydrolyzing polyethylene terephthalate from *Saccharomonospora viridis* AHK190[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(24): 10053-10064.
- [11] ROTH C, WEI R, OESER T, THEN J, FÖLLNER C, ZIMMERMANN W, STRÄTER N. Structural and functional studies on a thermostable polyethylene terephthalate degrading hydrolase from *Thermobifida fusca*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(18): 7815-7823.
- [12] RONKVIST ÅM, XIE WC, LU WH, GROSS RA. Cutinase-catalyzed hydrolysis of poly(ethylene terephthalate)[J]. *Macromolecules*, 2009, 42(14): 5128-5138.
- [13] ARNAL G, ANGLADE J, GAVALDA S, TOURNIER V, CHABOT N, BORNSCHEUER UT, WEBER G, MARTY A. Assessment of four engineered PET degrading enzymes considering large-scale industrial applications[J]. *ACS Catalysis*, 2023, 13(20): 13156-13166.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] JOO S, CHO IJ, SEO H, SON HF, SAGONG HY, SHIN TJ, CHOI SY, LEE SY, KIM KJ. Structural insight into molecular mechanism of poly(ethylene terephthalate) degradation[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 382.
- [17] HAN X, LIU WD, HUANG JW, MA JT, ZHENG YY, KO TP, XU LM, CHENG YS, CHEN CC, GUO RT. Structural insight into catalytic mechanism of PET hydrolase[J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1): 2106.
- [18] 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.
- [19] SCHUBERT SW, THOMSEN TB, CLAUSEN KS, MALMENDAL A, HUNT CJ, BORCH K, JENSEN K, BRASK J, MEYER AS, WESTH P. Relationships of crystallinity and reaction rates for enzymatic degradation of poly(ethylene terephthalate), PET[J]. *ChemSusChem*, 2024, 17(10): e202301752.