

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

张颖^{1,2,3}, 刘展志^{1,2,3}, 李光耀^{1,2,3}, 付雪妮², 张钰成², 王志远², 田亚平², 吴敬^{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

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. 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. Chin J Biotech, 2022, 38(1): 217-225.

摘要: 随着全球经济的发展, 聚对苯二甲酸乙二醇酯 (PET) 塑料的生产量大幅提高, 其废弃总量也逐年递增。废弃 PET 处理方法主要包括填埋、焚烧及生物降解等。填埋和焚烧均会造成二次污染, 而生物降解因其环境友好特性逐渐成为研究热点。相关研究表明, 碳水化合物结合模块 (carbohydrate binding module, CBM) 可以有效增强 PET 降解酶对 PET 的吸附, 从而增加降解速率。通过大引物 PCR (megaprimer PCR of whole plasmids, MEGAWHOP) 技术, 将炭疽杆菌 (*Bacillus anthracis*) 来源的 CBM 与嗜热子囊菌 (*Thermobifida fusca*) 角质酶 (Tfuc) 构建融合蛋白 BaCBM2-Tfuc 并表征其 PET 降解性能。在 60 °C 条件下, BaCBM2-Tfuc 降解 PET 膜的效率是 Tfuc 的 2.8 倍。本研究可为构建高效降解 PET 的融合蛋白提供技术支持。

关键词: 聚对苯二甲酸乙二醇酯; 生物降解; 角质酶; 碳水化合物结合模块; 融合蛋白

Received: January 12, 2021; **Accepted:** March 29, 2021

Supported by: National Key R&D Program of China (2019YFA0706900); Jiangsu Provincial Science and Technology Department Policy Guidance Program-International Cooperation Projects-Innovation Cooperation Project of “B&R” (BZ2020010)

Corresponding authors: TIAN Yaping. Tel: +86-510-85327326; E-mail: yapingtian@hotmail.com

WU Jing. Tel: +86-510-85327802; Fax: +86-510-85326653; E-mail: jingwu@jiangnan.edu.cn

基金项目: 国家重点研发计划 (2019YFA0706900); 江苏省科技厅政策引导类计划 (国际科技合作/港澳台科技合作)——“一带一路”创新合作项目 (BZ2020010)

The application of carbohydrate binding module-*Thermobifida fusca* cutinase fusion protein in polyethylene terephthalate degradation

ZHANG Ying^{1,2,3}, LIU Zhanzhi^{1,2,3}, LI Guangyao^{1,2,3}, FU Xueni², ZHANG Yucheng², WANG Zhiyuan², TIAN Yaping², WU Jing^{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 Bioengineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 Joint Laboratory for International Cooperation in Food Safety by the Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: With the development of global economy, the dramatically increased production of polyethylene terephthalate (PET) plastics has led to a remarkably increased amount of plastic waste. PET waste can be treated by landfill, incineration, or biodegradation. While landfilling and incineration may cause secondary pollution, biodegradation has since received increased attentions due to its environmental friendliness. Recent studies have indicated that the carbohydrate binding module (CBM) can effectively enhance the binding of PET degrading enzymes to PET, and consequently increasing PET degradation rate. Here we constructed a fusion protein *BaCBM2-Tfuc* containing the *BaCBM2* from *Bacillus anthracis* and the cutinase *Tfuc* from *Thermobifida fusca*, by megaprimer PCR of whole plasmids (MEGAWHOP). Notably, the PET film degradation efficiency (at 60 °C) of *BaCBM2-Tfuc* was 2.8 times that of *Tfuc*. This study may provide technical support for constructing fusion proteins capable of efficiently degrading PET.

Keywords: polyethylene terephthalate; biodegradation; cutinase; carbohydrate-binding module; fusion protein

塑料是最常用的合成材料之一, 坚固耐用, 重量轻且具有成本效益^[1], 已广泛应用于各类商品, 如食品包装、高分子材料、粘合剂等。自 20 世纪 50 年代以来, 全球塑料产量呈指数级增长, 截至 2017 年, 全球累计合成塑料生产量已超 83 亿 t^[2]。聚对苯二甲酸乙二醇酯 (polyethylene terephthalate, PET) 是一种石油基塑料, 由对苯二甲酸 (terephthalic acid, TPA) 和乙二醇 (ethylene glycol, EG) 通过酯键聚合而成, 分子结构致密^[3], 因其具有良好的热塑性、耐用性、稳定性, 被广泛应用于制造食品

外包装、饮料外包装等。1973 年由 Wyeth^[4]发表有关 PET 瓶的专利, 之后 20 世纪 80 年代开始广泛生产一次性软饮料瓶。

PET 制品降解困难, 在环境中持续积累会对生态构成严重威胁^[5], 也是“白色污染”的主要来源之一, 目前回收利用是处理 PET 废弃物的主要手段^[6]。而针对无法有效回收利用的塑料 PET 处理方法主要包括填埋、焚烧^[7]及生物降解^[8]等。填埋需占用土地资源, 处理时间漫长, 还会污染环境; 焚烧产生的二噁英、一氧化碳等有毒气体和烟尘会造成二次污染; 目前, 生

物降解技术因其环境友好特性逐渐成为研究热点。生物降解主要是通过酶作用 PET 材料, 通过水解酯键将其断裂成双 (2-羟基乙基) 对苯二甲酸酯 (bis(2-hydroxyethyl) terephthalate, BHET) 和 2-羟乙基甲基对苯二甲酸酯 (2-hydroxyethyl methyl terephthalate, MHET), 继而水解为终产物 EG 和 TPA。

目前, 文献报道能降解 PET 的酶主要有角质酶、脂肪酶、羧酸酯酶、木瓜蛋白酶^[9]和 PETase^[10]等。角质酶 (EC3.1.1.74) 是可以水解角质的酯酶, 还可以降解一些长链、短链脂肪酸酯、可溶性的合成酯和乳化的甘油三酯, 是一种多功能水解酶, 可以降解 PET。但是 PET 表面光滑疏水, 分子结构致密, 限制了角质酶对 PET 的结合与降解。张瑶等研究发现, 利用具有 PET 基材结合能力的碳水化合物结合模块 (carbohydrate binding module, CBM) CenA 构建角质酶 Tfuc-CenA 融合蛋白, 可将角质酶的 PET 结合能力增强 1.4–1.7 倍, PET 降解效率提高 1.5 倍^[11]。Espino-Rammer 等发现木霉 (*Trichoderma*) 来源的疏水蛋白 HFBs (HFB4 和 HFB7) 可显著提高角质酶 TfCut1 对 PET 的水解效率^[12]。Ribitsch 等研究同样表明, 真菌来源的疏水蛋白可显著增强 TfCut1 对 PET 膜表面的有效吸附以及降解活性^[13]。Islam 等在锚定肽 (anchor peptide, AP) 方面开展了深入研究, 将锚定肽 Tachystain TA2 与弯曲高温单孢菌 (*Thermomonospora curvata*) 来源的角质酶 Tcur1278 构建融合蛋白, 可对聚氨酯降解效率提升 6.6 倍^[14]。因此, 通过添加 CBM、AP 等外源疏水结合模块以及分子改造等手段, 可以有效提高 PET 降解酶对 PET 表面的结合能力, 提高酶的底物可及性, 从而促进 PET 降解。

本研究将炭疽杆菌 (*Bacillus anthracis*) 来源的 BaCBM2 与嗜热子囊菌 (*Thermobifida fusca*)

的角质酶 Tfuc 构建融合蛋白, 并表征了该融合蛋白的酶学性质及其 PET 降解性能, 为废弃 PET 的生物降解提供了技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

胰蛋白酶、酵母粉购于英国 Oxoid 公司; PET 膜购于德国 Goodfellow 公司; 对苯二甲酸 (terephthalic acid, TPA)、对硝基苯丁酸酯 (4-nitrophenyl butyrate, pNPB)、对硝基苯酚 (p-nitrophenol, pNP) 购于美国 Sigma 公司, 均为色谱级; 2×Phanta Max Master Mix、DNA Marker 购于南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 聚丙烯酰胺凝胶电泳试剂盒购于碧云天生物科技有限公司; 直链烷基苯磺酸盐 (Linear Alkylbenzene Sulfonates, LAS) 等常用试剂购于国药集团。

1.2 培养基及缓冲液

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

LB 固体培养基 (g/L): 在 LB 液体培养基里加入 1% 的琼脂粉 (W/V)。

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

磷酸钾缓冲液: 100 mmol/L K_2HPO_4 用 100 mmol/L KH_2PO_4 调 pH 至 8.0

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

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 目的基因的合成

根据 NCBI 中 BaCBM2 氨基酸序列 (MK349005) 和连接肽氨基酸序列 (GGGGGS)₃, 合成基因。

1.4 PCR 扩增获取目的基因

大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21(DE3)/pET-24a(+)-Tfuc (NCBI 登录号: WP_011291330.1), *E. coli* BL21(DE3)/pET-20b(+)-eGFP (NCBI 登录号: ABG78037.1) 由本实验室合成。设计引物 (表 1), 利用 PCR 扩增 *BaCBM2* 和连接肽基因。

1.5 重组质粒的构建和转化

根据天根公司琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒说明书中的步骤回收 PCR 产物, 随后将胶回收的片段作为 Mega 引物, 用 megaprimer PCR of whole plasmids (MEGAWHOP) 构建重组质粒 pET24a(+)-*BaCBM2*-Tfuc 和 pET20b(+)-*BaCBM2*-eGFP。

将上述 PCR 产物用 *Dpn* I 在 37 °C 处理 2 h, 随后经热激转化至 *E. coli* JM109, 挑取单菌落测序。测序成功后, 热激转化至 *E. coli* BL21(DE3), 分别得到重组菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET24a(+)-*BaCBM2*-Tfuc 和 *E. coli* BL21(DE3)/pET20b(+)-*BaCBM2*-eGFP。

1.6 *BaCBM2*-Tfuc 和 *BaCBM2*-eGFP 的表达

分别将重组菌接种于液体 LB 培养基生长 8–10 h; 按 5% 接种量将种子液接入 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 IPTG 至终浓度 1 mmol/L, 25 °C、200 r/min 进行摇瓶诱导发酵 24 h。

1.7 融合蛋白的分离纯化

收集发酵结束的发酵液, 测量菌体浓度

OD_{600} , 将发酵液 8 000 r/min、4 °C 离心 20 min, 收集菌体, 用 50 mmol/L 的磷酸钾缓冲液 (pH 8.0) 吹吸重悬, 保证菌体浓度 OD_{600} 在 25–30。提前打开高压匀浆破壁机预冷, 进行破壁, 至菌液透明且不粘稠, 8 000 r/min、4 °C 离心 20 min, 收集上清, 即为粗酶液。用 binding buffer 平衡镍柱, 低流速上样, 依次用 10、20、30、50、100 和 200 mmol/L 的 elution buffer 除去杂蛋白, 然后用 elution buffer 洗脱下目的蛋白。

1.8 *BaCBM2*-eGFP 对 PET 膜的荧光吸附强度测定

分别加入 2 mL 等荧光值的 eGFP 和 *BaCBM2*-eGFP 置于 1 cm×1 cm PET 膜表面, 25 °C、200 r/min 孵育 1 h。孵育结束后, 用 100 mmol/L 的磷酸钾缓冲液 (pH 8.0), 25 °C、5 min 洗涤 3 遍。再用 0.25 mmol/L LAS, 25 °C 洗去非特异性蛋白吸附。于激光共聚焦显微镜 (波长 488/530, 增益 800) 下观察 PET 膜表面的荧光强度。

1.9 *BaCBM2*-Tfuc 酶活力测定

在 37 °C 条件下, 采用连续分光光度法测定酶活力。反应总体积为 1.5 mL, 包括 30 μL 酶液 (蛋白浓度 20–40 mg/L)、30 μL 50 mmol/L pNPB 和 1 440 μL 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0), 在波长 405 nm 处, 记录 pNP 的生成速率。

酶活的定义为: 每分钟将 pNPB 催化水解生成 1 μmol pNP 所需要的酶量即为一个酶活力单位 (1 U)。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer names	Primer sequences (5'→3')	Size (bp)
<i>BaCBM2</i> -eGFP-F	GAAGGAGATATACATGCCACCTTCTCA	27
<i>BaCBM2</i> -eGFP-R	TGATACACGGGACATTGCCGCTGCAG	26
<i>BaCBM2</i> -Tfuc-F	AGGAGATATACATATGCCACCTTCTCAGT	30
<i>BaCBM2</i> -Tfuc-R	ATAAGGGTTGGCCATTGCCGCTGCAGCTGC	30

1.10 酶学性质研究

最适反应 pH 的测定: 100 mmol/L pH 6.0–9.5 (梯度为 0.5) 的缓冲液, 37 °C 预热 10 min 后, 吸取 1 440 μ L 缓冲液至 0.5 cm 比色皿中, 先后加入 30 μ L 的酶液和 30 μ L 的 pNPB 溶液, 摇匀立即放入分光光度计 (405 nm), 每隔 5 s 记录吸光值, 反应 1 min。以测的最高酶活为 100%, 计算各个 pH 下的相对酶活。

最适反应温度的测定: 在最适 pH 下, 将缓冲液放置于不同温度 (40–90 °C) 下预热 10 min, 吸取 1 440 μ L 缓冲液至 0.5 cm 比色皿中, 先后加入 30 μ L 的酶液和 30 μ L 的 pNPB 溶液, 摇匀立即放入分光光度计 (405 nm), 每隔 5 s 记录吸光值, 反应 1 min。以测的最高酶活为 100%, 计算各个温度下的相对酶活。

温度热稳定性: 将重组酶分别置于 40 °C、60 °C 和 80 °C 水浴锅中, 每隔一段时间进行取样按照 1.9 的方法测定残余酶活, 定义反应 0 h 时酶活为 100%。

1.11 动力学测定

用对硝基苯丁酸酯作为底物测定融合蛋白和角质酶活性。在 37 °C、pH 8.0、底物浓度 0.05–10.00 mmol/L 范围内测定动力学参数。利用 Michaelis-Menten 方程, 计算动力学数据。

1.12 PET 膜降解应用

处理 PET 膜: 0.1% SDS 溶液于 50 °C 孵育 30 min, 50 °C 超净水孵育 5 min, 50 °C 无水乙醇孵育 5 min, 50 °C 烘干。

将 Tfuc 和重组酶等蛋白量加入含有 PET 膜 (1 cm \times 1 cm) 的玻璃试管中, 分别在 40 °C、150 r/min 和 60 °C、150 r/min 恒温水浴摇床反应 4 d。

1.13 高效液相 (HPLC) 测定 TPA 含量

反应结束后, 取 1 mL 反应液, 离心取上清, 过 0.22 μ mol/L 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 \AA , 4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m 色谱柱, Agilent 紫外检测器, 流动相采用 65% (V/V) 1% 乙酸溶液和 35% 的甲醇溶液, 柱温设定为 30 °C, 流速为 0.5 mL/min。

1.14 扫描电子显微镜 (SEM)

观察样品室的真空“PVG”值, 当其达到 9.0×10^{-5} Pa 时, 放入处理好的样品。在低放大倍数, 调节聚焦使样品清晰, 移动样品位置, 找到目标区域后, 调节放大倍数, 锁定后进行扫描图像, 保存图片。

2 结果与分析

2.1 融合蛋白 *BaCBM2-eGFP* 的构建及对 PET 膜结合能力分析

以 pET20b(+)-*eGFP* 为模板, 以 *BaCBM2-eGFP-F*、*BaCBM2-eGFP-R* 为引物 (表 1), 构建融合蛋白 *BaCBM2-eGFP*。

BaCBM2-eGFP 融合蛋白与 PET 膜孵育结合后, 使用激光共聚焦显微镜检测融合蛋白对 PET 膜的结合情况。结果显示 (图 1), 对照组 *eGFP* 与 PET 膜孵育、洗脱后, PET 膜上没有荧光残留。*BaCBM2-eGFP* 与 PET 膜孵育, 洗脱后 PET 膜上还残留荧光信号, 表明 *BaCBM2* 对 PET 有一定的结合能力。

2.2 融合蛋白 *BaCBM2-Tfuc* 的构建、摇瓶发酵及蛋白纯化

以 pET24a(+)-*Tfuc* 为模板, 以 *BaCBM2-Tfuc-F*、*BaCBM2-Tfuc-R* 为引物 (表 1), 构建融合蛋白 *BaCBM2-Tfuc*。

融合蛋白 *BaCBM2-Tfuc* 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 20% 硫酸铵沉淀, 再用镍柱纯化制备纯酶, SDS-PAGE 分析结果如图 2 所示。*Tfuc* 预测蛋白大小为 29 kDa, *BaCBM2-Tfuc*

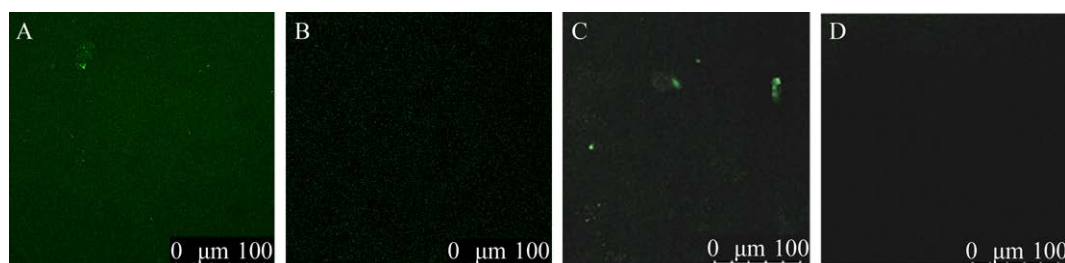


图1 激光共聚焦显微镜结果 ($\times 40$) A: 孵育后未洗脱 *BaCBM2*-eGFP; B: 孵育后未洗脱 eGFP; C: 洗脱后 *BaCBM2*-eGFP; D: 洗脱后 eGFP

Figure 1 Results of laser confocal microscopy ($\times 40$). (A) *BaCBM2*-eGFP is not eluted after incubation. (B) eGFP is not eluted after incubation. (C) *BaCBM2*-eGFP after elution. (D) eGFP after elution.

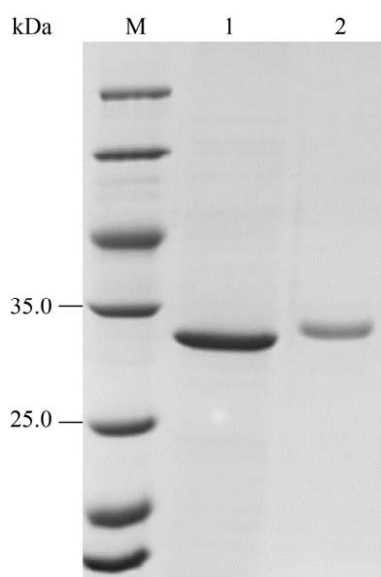


图2 SDS-PAGE 分析

Figure 2 SDS-PAGE analysis. M: standard molecular weight protein; 1: Tfic purified protein; 2: *BaCBM2*-Tfic purified protein.

预测蛋白大小为 37 kDa, 与蛋白条带所处位置基本一致。

2.3 融合蛋白 *BaCBM2*-Tfic 的酶学性质

2.3.1 融合蛋白 *BaCBM2*-Tfic 的最适 pH

按 1.10 中所述方法测定融合蛋白 *BaCBM2*-Tfic 在 37 °C 下、pH 6.0–9.5 的缓冲体系中 pNPB 水解活性。融合蛋白 *BaCBM2*-Tfic 在 pH 7.5–8.0 的缓冲液中酶活较接近, pH 8.0

为融合蛋白的最适 pH (图 3), 表明融合蛋白 *BaCBM2*-Tfic 在弱碱性环境下酶活较高。角质酶 Tfic 的最适 pH 也为 8.0^[15]。

2.3.2 最适温度及热稳定性

融合蛋白 *BaCBM2*-Tfic 在 40–80 °C 条件下酶活随温度增加逐步增加。温度超过 80 °C 时, *BaCBM2*-Tfic 的酶活略微下降 (图 4A)。将融合蛋白分别放置于 40 °C、60 °C 和 80 °C 中, 每隔一段时间进行取样, 测定 pNPB 水解酶活性, 以未保温 (4 °C 保存, pH 8.0) 的酶液活性为 100%。融合蛋白在 60 °C (Tfic 最适温度) 条件下半衰期为 30 h (图 4C), 在 40 °C 条件下保持 210 h 后酶活还保持在 60% 以上 (图 4B)。融合

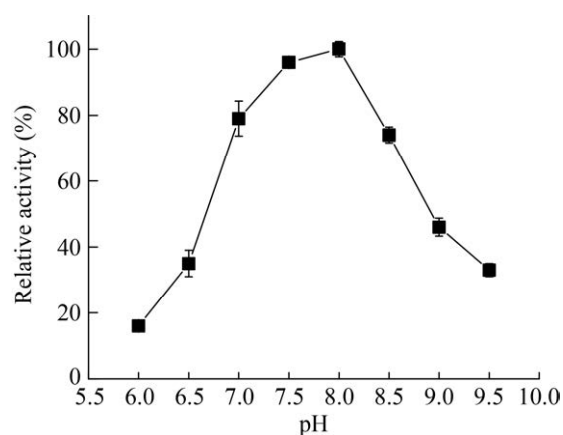


图3 *BaCBM2*-Tfic 最适 pH

Figure 3 Optimal pH of *BaCBM2*-Tfic.

蛋白的最适反应温度为 80 °C,但是在这个温度下融合蛋白很快就会完全失活 (图 4D),且 PET 在 80 °C 下结晶率还会有所提高,不利于降解。综合以上理由,选择 40 °C 和 60 °C 进行 PET 降解应用。

2.4 动力学测定

为了测试由 Tfuc 和 *BaCBM2* 组成的融合蛋白是否保留了各自的生物学活性,我们使用可溶性模型底物对硝基苯丁酸酯 (pNPB) 分别测试了融合蛋白和 Tfuc 的酶活性。在表 2 中给出针对 pNPB 的动力学参数。与 Tfuc 相比,融合蛋白 K_m 值增加, k_{cat} 有所增加,催化效率 (k_{cat}/K_m) 也有所增加。相比于 Tfuc,融合蛋白 N 端 *BaCBM2* 结构域的疏水性可能阻碍其与

pNPB 的结合,导致 K_m 升高。此外,由于 *BaCBM2* 结构域具有疏水性,导致底物聚集,因此融合蛋白能够更快地与 pNPB 反应,导致 k_{cat} 增加。

2.5 对 PET 薄膜降解性能的分析

2.5.1 HPLC 检测结果

为了验证 *BaCBM2*-Tfuc 融合蛋白能否提高 PET 的降解效率,以 Tfuc 为对照,测定了融合蛋白对 PET 的降解效率,结果见图 5。*BaCBM2*-Tfuc 融合蛋白和 Tfuc 分别处理 PET 薄膜 4 d 后,根据 HPLC 结果分析,40 °C 下,*BaCBM2*-Tfuc 降解 PET 膜的降解率是 Tfuc 的 1.3 倍;60 °C 下,*BaCBM2*-Tfuc 降解 PET 膜的降解率是 Tfuc 的 2.8 倍。

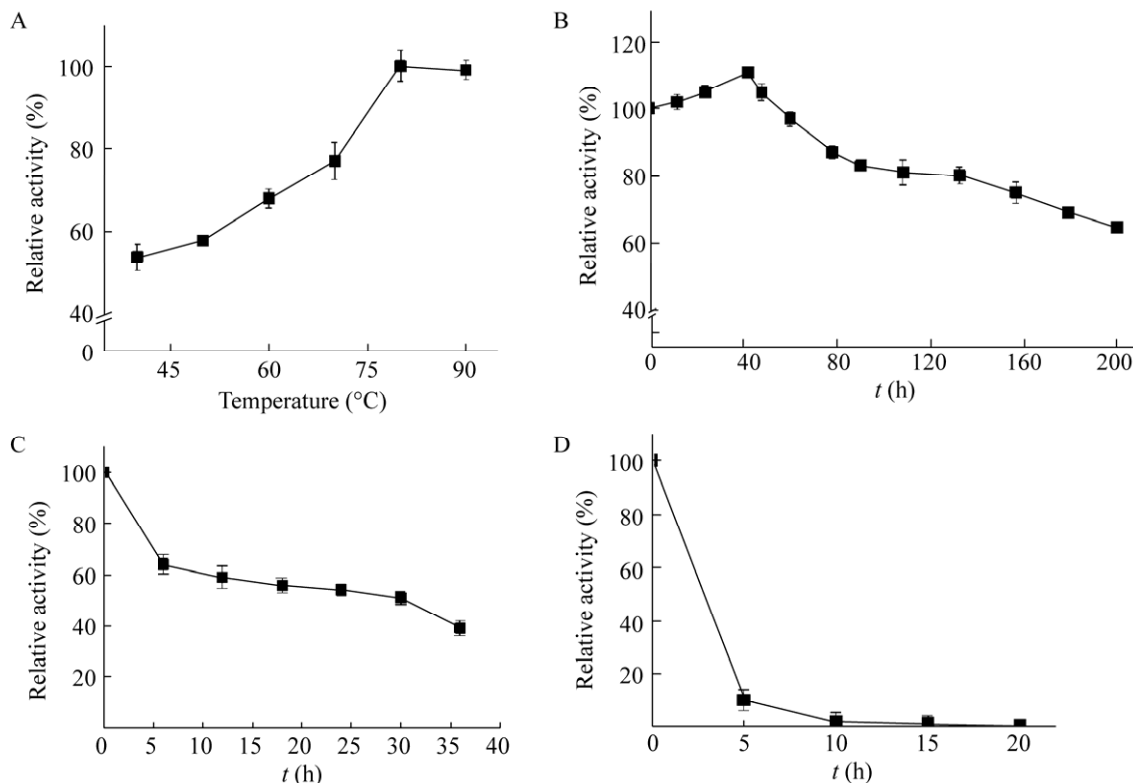


图 4 *BaCBM2*-Tfuc 最适温度 (A) 及温度稳定性 (B: 40 °C; C: 60 °C; D: 80 °C)

Figure 4 Optimum temperature (A) and temperature stability (B: 40 °C; C: 60 °C; D: 80 °C) of *BaCBM2*-Tfuc.

表 2 动力学参数

Table 2 Kinetic parameters

Cutinase	pNPB		
	K_m (mmol/L)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m (mmol/(L·s))
Tfuc	0.12±0.02	120.79±16.69	1 006.57
BaCBM2-Tfuc	0.17±0.01	187.48±1.35	1 102.81

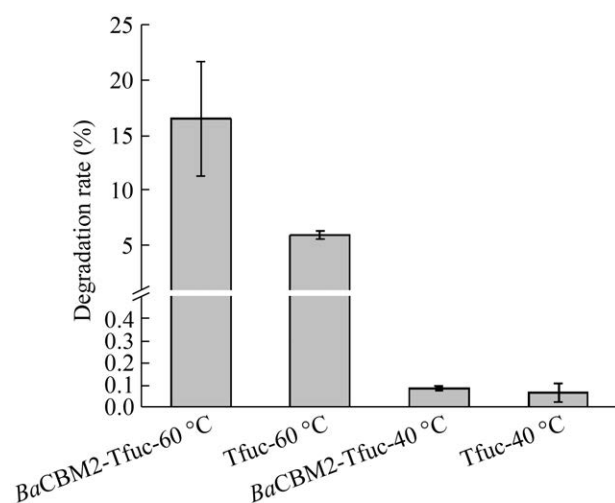


图 5 对 PET 薄膜的降解率

Figure 5 The rate of degrading PET film.

王宏阳等^[16]报道经耐碱性菌株鞣丸酮丛毛单胞菌处理后的 PET 纤维,失重率为 0.41%。日本学者^[10]发现一株新的菌株大阪伊德氏杆菌 (*Ideonella sakaiensis*) 201-F6,能够以 0.13 mg/d 的速率降解 PET 薄膜。张瑶等^[11]研究发现,利

用具有 PET 基材结合能力的碳水化合物结合模块 CenA 构建角质酶 Tfuc-CenA 融合蛋白,可将 PET 降解效率提高 1.5 倍。对比已有研究,本方法在一定程度上提高了 Tfuc 对 PET 的降解效率,优于直接微生物降解和张瑶的 Tfuc-CenA 融合蛋白。

2.5.2 SEM 检测

空白对照组 (图 6A) 表面光滑。Tfuc 处理 4 d,表面变得粗糙,并有碎裂及轻微侵蚀现象 (图 6B)。BaCBM2-Tfuc 融合蛋白经同样条件处理 4 d,表面粗糙程度加深,有明显凹槽,呈现大面积侵蚀现象 (图 6C)。SEM 结果进一步说明碳水化合物结合模块可以提高酶对不溶性 PET 膜的吸附率,增加 PET 膜表面酶的浓度,从而提高对 PET 的降解效率。

3 结论

通过共聚焦显微镜检测到 BaCBM2 对 PET 有一定的结合能力。然后利用 MEGAWHOP PCR 技术构建融合蛋白 BaCBM2-Tfuc。BaCBM2-Tfuc 的最适 pH 为 8.0,最适温度为 80 °C。通过对 pNPB 的动力学测定表明,相比于 Tfuc, BaCBM2-Tfuc 对 pNPB 的 K_m 及 k_{cat} 均有所增加。融合蛋白 BaCBM2-Tfuc 在 60 °C

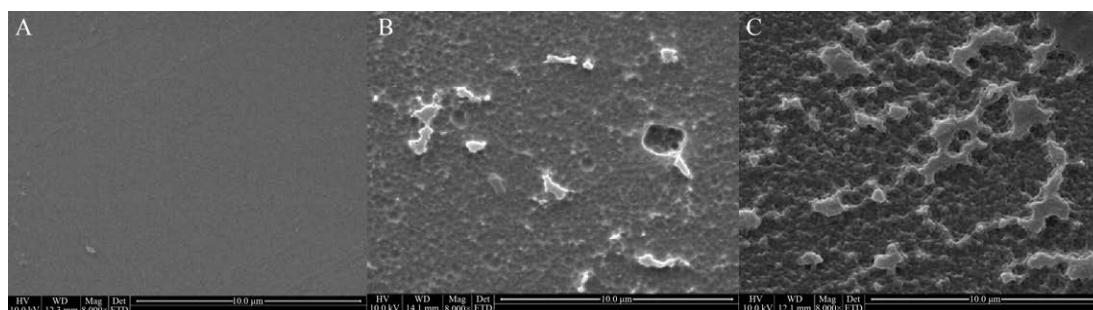


图 6 PET 薄膜扫描电镜图 A: 未处理; B: Tfuc 角质酶处理; C: BaCBM2-Tfuc 处理 (8 000×)

Figure 6 SEM image of PET film. (A) Untreated. (B) Tfuc treated. (C) BaCBM2-Tfuc treated (8 000×).

(Tfuc 最适温度) 下半衰期为 30 h, 对 PET 膜的降解率是 Tfuc 的 2.8 倍。本研究表明通过添加 *BaCBM2* 可以有效提高 Tfuc 对 PET 表面的结合能力, 从而促进 PET 降解, 为废弃 PET 的生物降解提供了技术支持。

REFERENCES

- [1] Chae Y, An YJ. Current research trends on plastic pollution and ecological impacts on the soil ecosystem: a review. *Environ Poll*, 2018, 240: 387-395.
- [2] Geyer R, Jambeck JR, Law KL. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Sci Adv*, 2017, 3(7): e1700782.
- [3] Webb HK, Arnott J, Crawford RJ, et al. Plastic degradation and its environmental implications with special reference to poly (ethylene terephthalate). *Polymers*, 2012, 5(1): 1-18.
- [4] Wyeth N. PET-a global perspective//Seymour RB, Kirshenbaum GS, Eds. *High Performance Polymers: Their Origin and Development*. Dordrecht: Springer, 1986: 417-423.
- [5] Tokiwa Y, Kawabata G, Jarerat A. A modified method for isolating poly(vinyl alcohol)-degrading bacteria and study of their degradation patterns. *Biotechnol Lett*, 2001, 23(23): 1937-1941.
- [6] 欧育湘, 赵毅, 韩廷解. 聚对苯二甲酸乙二醇酯回收技术现状及进展. *化工进展*, 2010, 29(6): 1086-1090. Ou YX, Zhao Y, Han YJ. Status and recent developments of PET recovery technology. *Chem Ind Eng Pro*, 2010, 29(6): 1086-1090 (in Chinese).
- [7] 曾历, 李勇, 刘亮, 等. 聚酯(PET)回收料制备粉末涂料用聚酯树脂的合成研究. *合成材料老化与应用*, 2019, 48(2): 47-50. Zeng L, Li Y, Liu L, et al. Study on the synthesis of polyester resins for powder coatings from reclaimed polyester (PET). *Synth Mater Ag Appl*, 2019, 48(2): 47-50 (in Chinese).
- [8] 王晓春. DTP 和 PET 酶及微生物降解性能探讨[D]. 天津: 天津工业大学, 2002. Wang XC. Discussion on degradation performance of DTP and PET enzyme and microorganism[D]. Tianjin: Tianjin University, 2002 (in Chinese).
- [9] Kawai F, Kawabata T, Oda M. Current state and perspectives related to the polyethylene terephthalate hydrolases available for biorecycling. *ACS Sustainable Chem Eng*, 2020, 8(24): 8894-8908.
- [10] Yoshida S, Hiraga K, Takehana T, et al. A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). *Science*, 2016, 351(6278): 1196-1199.
- [11] Zhang Y, Wang L, Chen J, et al. Enhanced activity toward PET by site-directed mutagenesis of *Thermobifida fusca* cutinase-CBM fusion protein. *Carbohydr Polym*, 2013, 97(1): 124-129.
- [12] Espino-Rammer L, Ribitsch D, Przylucka A, et al. Two novel class II hydrophobins from *Trichoderma* spp. Stimulate enzymatic hydrolysis of poly (ethylene terephthalate) when expressed as fusion proteins. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79(14): 4230-4238.
- [13] Ribitsch D, Herrero AE, Przylucka A, et al. Enhanced cutinase-catalyzed hydrolysis of polyethylene terephthalate by covalent fusion to hydrophobins. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81(11): 3586-3592.
- [14] Islam S, Apitius L, Jakob F, et al. Targeting microplastic particles in the void of diluted suspensions. *Environ Int*, 2019, 123: 428-435.
- [15] 陈晟, 陈坚, 吴敬. 一种嗜热细菌来源角质酶的分纯化及酶学性质. *应用与环境生物学报*, 2009, 15(6): 846-850. Chen S, Chen J, Wu J. Purification and characterization of cutinase from a Thermophilic Bacterium. *Chin J Appl Chem*, 2009, 15(6): 846-850 (in Chinese).
- [16] 王宏阳. 碱性 PET 分解菌的全细胞生物催化剂研究[D]. 天津: 天津工业大学, 2016. Wang HY. Study on whole cell biocatalyst of alkaline PET decomposing bacteria[D]. Tianjin: Tianjin University, 2002 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)