

一种新型聚酰胺水解酶的鉴定和性质分析

郑芷然^{1,2}, 丛琳^{1,2}, 李志帅^{2,3,4}, 刘卫东^{2,3,4}, 游松^{1*}, 韩旭^{2,3*}

1 沈阳药科大学 生命科学与生物制药学院, 辽宁 沈阳 110016

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 中国科学院大学, 北京 100049

郑芷然, 丛琳, 李志帅, 刘卫东, 游松, 韩旭. 一种新型聚酰胺水解酶的鉴定和性质分析[J]. 生物工程学报, 2024, 40(9): 3103-3113.

ZHENG Zhiran, CONG Lin, LI Zhishuai, LIU Weidong, YOU Song, HAN Xu. Identification and characterization of a novel polyamide hydrolase[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(9): 3103-3113.

摘要: 不可自然降解塑料的广泛应用对生态环境的危害日益严峻, 塑料高聚物污染物已成为生态环境治理的焦点, 其中利用酶等生物法对高聚物进行解聚具有一定优势, 不仅反应条件温和, 解聚产物还可以进行回收进入再循环。本研究使用 4-硝基丙酰苯胺为模式底物, 对实验室建立的塑料解聚酶库进行筛选, 获得了一个来源于红色亚栖热菌(*Meiothermus ruber*)的能水解酰胺键的 α/β 水解酶 MrABH, 将其在大肠杆菌中进行表达, 并利用亲和层析技术纯化获得了纯度较高的酶, 对其催化性质、酶学性质以及催化聚酰胺的产物进行了研究, 发现 MrABH 在 pH 8.0–10.0 都有良好的稳定性, 其最适 pH 为 9.0, 最适温度为 30 °C; 动力学分析表明其对酯键和酰胺键的催化效果相近, MrABH 能解聚尼龙 6 (polyamide 6, PA6)和尼龙 66 (polyamide 66, PA66)生成单体和寡聚物, 未来有望应用于聚酰胺的生物解聚和再循环利用。

关键词: 聚酰胺; 聚酰胺水解酶; 表达纯化; 酶学性质

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFC2103600); 国家自然科学基金(32371530)

This work was supported by the State Key Research and Development Program of China (2021YFC2103600) and the National Natural Science Foundation of China (32371530).

*Corresponding authors. E-mail: HAN Xu, han_x@tib.cas.cn; YOU Song, yousong206@aliyun.com

Received: 2024-02-05; Accepted: 2024-05-28; Published online: 2024-06-03

Identification and characterization of a novel polyamide hydrolase

ZHENG Zhiran^{1,2}, CONG Lin^{1,2}, LI Zhishuai^{2,3,4}, LIU Weidong^{2,3,4}, YOU Song^{1*}, HAN Xu^{2,3*}

1 School of Life Sciences and Biopharmaceutical Sciences, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, Liaoning, China

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

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

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

Abstract: The widespread use of non-naturally degradable plastics is causing increasingly serious harm to the environment. Reducing plastic pollutants has become the core of ecological and environment management. Biological methods such as enzymes demonstrate advantages in depolymerizing plastics with mild reaction conditions and recycling of depolymerization products. However, there are few reports on the biological depolymerization of polyamide plastics. In this study, by using 4-nitropropionanilide as the model substrate, we screened against our plastic depolymerase library and obtained a *Meiothermus ruber*-derived enzyme (MrABH) that can hydrolyze the polyamide bond. We expressed this enzyme in *Escherichia coli* and purified the protein by affinity chromatography. Furthermore, we investigated the catalytic properties, enzymatic properties, and catalytic products of this enzyme with polyamide as the substrate. MrABH had good stability at pH 8.0–10.0, with the optimal performance at pH 9.0 and 30 °C. The catalytic performance of this enzyme for ester bonds and amide bonds was similar. MrABH can catalyze the depolymerization of PA6 and PA66 to produce monomers and oligomers, demonstrating the potential to be used in the depolymerization and recycling of polyamide.

Keywords: polyamide; polyamide hydrolase; expression and purification; enzymatic properties

聚酰胺(polyamide, PA), 即“尼龙”, 属于线型高分子材料, 其聚合物大分子主链含有酰胺基团重复结构单元(-CO-NH-), 常见的聚酰胺有由己内酰胺聚合的尼龙 6 (polyamide 6, PA6)^[1]和己二胺和己二酸聚合的尼龙 66 (polyamide 66, PA66)^[2], 两者产量约占全球尼龙总产量的 90%^[3]。这些聚酰胺具有优良的强度和刚性, 并具有耐化学物质和耐热等特点^[4], 被应用于众多领域^[5], 如服装^[6]、医疗^[7]、汽车^[8]、建筑^[9]等。然而, 由于稳定的化学特性^[10], 聚酰胺在自然界中的降解难度大, 自然降解和分解速度非常

缓慢^[11]。随着尼龙的广泛应用, 其对生态环境造成的污染也越来越严重^[12-15]。

目前, 利用酶法催化降解塑料的研究主要集中在聚酯型塑料, 如聚对苯二甲酸乙二醇酯 (polyethylene terephthalate, PET)^[16-18], 其中效果显著的有来自叶枝堆肥的角质酶(leaf and branch compost cutinase, LCC)^[19], 其突变体能在 10 h 内快速解聚 90%非晶化 PET 废物^[20], 并回收其解聚后的单体产物对苯二甲酸(terephthalic acid, TPA)用于循环再利用。目前利用酶法降解聚酰胺的研究较少, 2008 年, 来源于布氏白僵菌

(*Beauveria brongniartii*)的酰胺酶^[21]和来源于皮疽诺卡菌(*Nocardia farcinica*)的酰胺酶^[22]被发现可水解 PA6 和 PA66 等聚酰胺,提高尼龙织物的亲水性。此外, Negoro 等发现联合使用 6-氨基己酸环二聚体水解酶 NylA^[23]、6-氨基己酸二聚体水解酶 NylB^[24]和 6-氨基己酸低聚体水解酶 NylC^[25],在一定条件下可以将 PA6 低聚物转化为其单体 6-氨基己酸^[3]。2023 年, Quartinello 等^[26]发现来源于克鲁弗酵母(*Saccharomyces kluyveri*)的二氢嘧啶酶 DHPaseSK 也可以降解各种聚酰胺。除水解酶外,部分氧化酶也被证明对聚酰胺具有解聚作用,如锰过氧化物酶 MnP^[27]、木质素过氧化物酶 LiP^[28]等。

本实验室前期进行了一系列 PET 等塑料解聚酶的结构功能和改造的研究^[29-33],建立了丰富的塑料解聚酶酶库。为了推进聚酰胺的绿色降解,快速筛选出可降解聚酰胺的解聚酶,以 4-硝基丙酰苯胺为模式底物,对塑料解聚酶库进行筛选,筛选原理如图 1 所示。本研究筛选到一种来源于嗜热菌(*Meiothermus ruber*)的 α/β 水解酶 MrABH,该酶具有酰胺酶的特性,可以降解聚酰胺。本研究对其进行表达纯化,利用液相色谱-质谱联用技术(liquid chromatograph-mass spectrometer, LC-MS)对其降解聚酰胺的产物进行了验证,并对该酶的性质进行了系统的研究,证明 MrABH 能够降解聚酰胺中的酰胺键,在降解聚酰胺方面有潜在的应用价值。

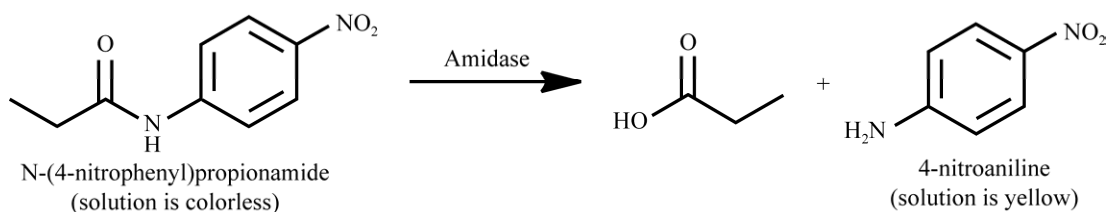


图 1 聚酰胺水解酶的筛选原理

Figure 1 Principles of screening for polyamide hydrolase.

1 材料与方 法

1.1 材 料

大肠杆菌 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;PA6(相对黏度 2.31)和 PA66(相对黏度 2.60)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;己二胺购于西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;4-硝基丙酰苯胺(CAS: 4850-93-5)、4-硝基戊酰苯胺(CAS: 18279-23-7)、4-硝基苯戊酸酯(CAS: 1956-07-6)均购自上海吉至生化科技有限公司;质粒提取试剂盒购于天根生化科技(北京)有限公司。

1.2 MrABH 的表达及纯化

嗜热菌(*Meiothermus ruber*)来源的 MrABH (GenBank 登录号: WP_024050179.1)基因经密码子优化后,由北京六合华大基因科技有限公司合成并连接至 pCold TF 载体。将重组质粒 pCold TF-MrABH 转化至大肠杆菌 BL21(DE3)中,挑取单菌落接种于 5 mL 含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素(ampicillin, Amp)的小试管中,在 37 $^{\circ}$ C 摇床中 220 r/min 培养 14–16 h;接着以 1%接种量转接到 1 L LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 摇床中 220 r/min 培养至 OD_{600} 约为 0.6,加入终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG,降温至 16 $^{\circ}$ C 后,诱导表达 16 h,5 000 r/min 离心 20 min 收集菌体。

菌体重悬于 50 mL 包含 25 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl 的缓冲液(pH 9.0)中, 经低温高压匀浆机破碎后, 菌液 4 °C、15 500 r/min 低温高速离心 1 h, 取上清用于后续纯化。使用 Ni-NTA 柱特异性结合目的蛋白, 用含有 25 mmol/L Tris-HCl、150 mmol/L NaCl、500 mmol/L 咪唑的缓冲液(pH 9.0)梯度洗脱蛋白, 目的蛋白在咪唑浓度达到 50 mmol/L 时可完全洗脱下来, 收集目的蛋白。使用截留分子量为 10 kDa 的超滤管浓缩洗脱后的目的蛋白, 并将缓冲液更换为 50 mmol/L N,N-二羟乙基甘氨酸(bicine), pH 9.0, 保存于-80 °C 待用。

1.3 酶学性质

1.3.1 酶活测定方法

4-硝基丙酰苯胺溶液为无色, 在酰胺酶的作用下水解生成黄色的 4-硝基苯胺和丙酸。4-硝基苯胺在紫外范围有吸收, 可通过测定其在 405 nm 处吸光度的变化确定 4-硝基苯胺的生成量, 从而表征酶活。以 500 $\mu\text{mol/L}$ 4-硝基丙酰苯胺为底物, 加入 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 纯酶, 反应 3 h, 100 °C 加热 5 min, 终止反应。取 200 μL 反应液置于 96 孔板中, 并使用酶标仪检测其 OD_{405} 的变化。以 1–500 $\mu\text{mol/L}$ 梯度范围内的 4-硝基苯胺制作标准曲线。

1.3.2 最适温度与热稳定性分析

在 50 mmol/L bicine 缓冲液(pH 9.0)中, 分别测定 MrABH 在 20、30、40、50 °C 下催化 4-硝基丙酰苯胺的酶活, 确定其最适反应温度。以最高酶活为 100%, 计算其他温度的相对酶活。

测定 MrABH 的热稳定性时, 将一定量纯酶在相同的缓冲液中(50 mmol/L N,N-二羟乙基甘氨酸, pH 9.0)在 20、30、40、50 °C 下保温 72 h, 分别于 2、4、6、8、24、48、72 h 取样, 冰浴冷却至室温后测定其酶活。以最初加入酶的活性为 100%, 计算相对酶活。

1.3.3 最适 pH 与 pH 稳定性分析

配制不同 pH (5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0) 缓冲液, 在 30 °C 时测定 MrABH 酶活, 确定其最适反应 pH。以最高酶活为 100%, 计算其他 pH 时的相对酶活。

测定 MrABH 的 pH 稳定性时, 将一定量纯酶置于 pH 5.0–9.0 的缓冲液中, 4 °C 放置 72 h, 分别于 2、4、6、8、24、48、72 h 取样, 测定其酶活。以最初加入酶的活性为 100%, 计算其他 pH 下的相对酶活。其中 pH 5.0–7.0 的缓冲液用 50 mmol/L Bis-Tris 配制、pH 8.0–9.0 的缓冲液用 50 mmol/L N,N-二羟乙基甘氨酸配制、pH 10.0 的缓冲液用 50 mmol/L Gly-NaOH 配制。

1.4 MrABH 降解催化动力学测定

MrABH 的催化反应动力学分析: 分别以 4-硝基戊酰苯胺和 4-硝基苯戊酸酯为底物, 浓度范围为 0.5–500.0 $\mu\text{mol/L}$, 分别测定其在 30 °C 温度条件下水解酰胺键、酯键的酶活。Michaelis-Menten 参数 K_m 和 V_{max} , 可使用酶标仪 SpectraMAX 190 和 SoftMax Pro 7.1 软件中的 Michaelis-Menten 模板直接测得, 检测波长为 405 nm。

1.5 聚酰胺的酶解及产物测定

以聚酰胺 PA6 和 PA66 作为底物, 研究 MrABH 对聚酰胺的水解作用。在 0.5 mL 含有 10 $\mu\text{mol/L}$ 纯酶的缓冲液中(50 mmol/L N,N-二羟乙基甘氨酸, pH 9.0)分别加入 5 mg 的 PA6、PA66 粉末(30 目), 在 30 °C、1 000 r/min 条件下反应 5 d。

使用 LC-MS 对反应液进行定性鉴定。HPLC 配备反相 C18 柱(5 μm , 4.6 mm \times 250 mm, 月旭 Ultimate XB-C18), 总运行时间为 30 min。流动相 A 为超纯水中含有 5 mmol/L NH_4COOH , 流动相 B 为乙腈, 流速 0.8 mL/min, 进样量 20 μL , 检测波长 210 nm, 柱温为 40 °C, MS 使用负电离模式。

2 结果与分析

2.1 MrABH 序列分析

MrABH 与已知酯酶的结构相似性不到 30%，其中相似性最高(28%)的是绿弯菌(*Chloroflexus* sp. MS-G)来源的 PETase 202 (PDB ID: 7QJM)，通过 Batch CD-Search 确定 MrABH 的第 87–248 氨基酸序列存在 α/β 水解家族酶的保守结构域。与其他 α/β 水解家族酶进行多序列比对分析，结果如图 2 所示，MrABH 具有高度保守的催化三联体 Ser150-Asp195-His224，且催化残基 Ser 位于保守的五肽基序(GXSXG)中。利用 MEGA 计算 MrABH 与已报道聚酰胺水解酶的遗传距离，自展值设置为 Bootstrap Method 并计算 1 000 次，

选择用 ρ -distance 方法进行计算，计算结果如表 1 所示，MrABH 与已报道聚酰胺水解酶的序列相似性低于 20.00%。这些结果表明，MrABH 是一种具有 α/β 水解家族酶特征的新型聚酰胺水解酶。

2.2 MrABH 蛋白表达纯化

在大肠杆菌 BL21(DE3)中对 MrABH 野生型蛋白进行诱导表达，成功表达的蛋白经过 Ni-NTA 亲和层析梯度洗脱、透析浓缩后，经 SDS-PAGE 验证，所表达的目的蛋白分子量与理论分子量(77 kDa)基本一致(图 3)。

2.3 MrABH 最适 pH 及 pH 稳定性

反应体系的 pH 值是影响酶活的一个关键因素，pH 的改变可影响氨基酸的解离状况，从而

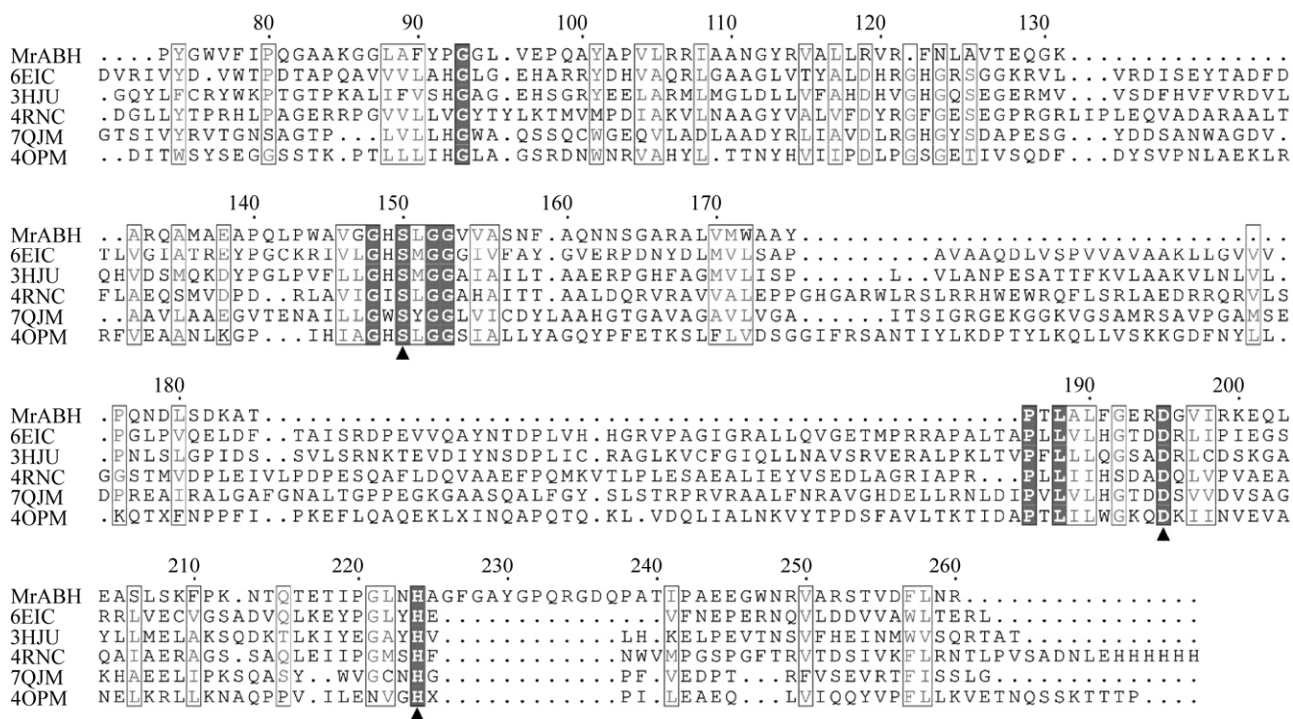


图 2 MrABH 和其他 α/β 水解酶的序列分析

Figure 2 Sequence alignment of MrABH with other α/β hydrolases. 6EIC: Lipase Rv0183 from *Mycobacterium Tuberculosis*. 3HJU: Lipase hMAGL from *Homo sapiens*. 7QJM: PETase 202 from *Chloroflexus* sp. MS-G. 4RNC: Esterase RhEst1 from *Rhodococcus* sp. ECU1013. 4OPM: Lipase Lip1 from *Acinetobacter baumannii* AYE. Highly conserved AS regions are extracted from the known structures of the α/β hydrolase fold enzymes family and the Ser-Asp-His catalytic triad are indicated by solid triangles (▲).

表 1 已报道的聚酰胺水解酶与 MrABH 的差异
Table 1 Discrepancy of reported polyamide hydrolases with MrABH

Reported polyamide hydrolases sequences	Discrepancy with MrABH (%)
DHPase (PDB ID: 2FVM)	91.53
NfpolyA (WP_011209364.1)	86.97
NylA (PDB ID: 3A2P)	85.23
NylB (PDB ID: 1WYB)	88.03
NylC (PDB ID: 3AXG)	88.50
FsC (PDB ID: 1CEX_A)	89.90
The_Cut1 (PDB ID: 5LUI)	88.89
HiC (PDB ID: 4OYY)	86.91
Subtilisin (WP_015715621.1)	89.45

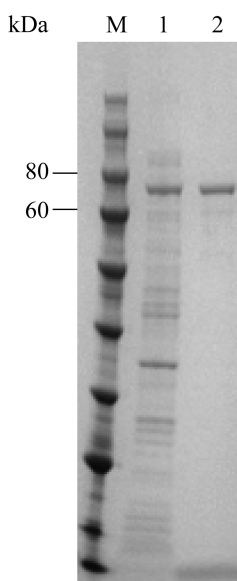


图 3 MrABH 的 SDS-PAGE 分析

Figure 3 SDS-PAGE analysis of MrABH. M: Protein marker; Lane 1: Crude enzyme; Lane 2: Purified enzyme.

导致酶的结构、催化活性及稳定性的变化。为确定 MrABH 的最适 pH 范围,以 4-硝基丙酰苯胺为底物,在 30 °C 的条件下测定 MrABH 在 pH 5.0–10.0 范围内的活性,结果如图 4A 所示,随着 pH 的不断升高,MrABH 的酶活也逐渐升高,在 pH 9.0 时,酶活最高。因此 MrABH 的

最适 pH 为 9.0,在 pH 8.0 和 pH 10.0 时的相对酶活分别为 95% 和 74%。

为测定 MrABH 在不同 pH 的稳定性,将 MrABH 在不同 pH 缓冲液的体系中 4 °C 放置 72 h,分别检测不同时间的酶活。由图 4B 可知,MrABH 的 pH 稳定范围为 8.0–10.0。在此范围内 4 °C 保存 72 h,MrABH 的酶活可保持在 80% 以上。

2.4 MrABH 最适温度及温度稳定性

温度是影响酶活力的重要因素之一,当温度较低时,酶活力低,反应速率慢;但温度过高会破坏酶的天然构象,导致酶变性和失活,对酶反应也会产生不利影响。测定不同温度下 MrABH 对 4-硝基丙酰苯胺的水解酶活。结果如图 4C 所示,MrABH 的最适反应温度为 30 °C,当温度继续上升时,酶活急剧下降,可能是由于高温导致 MrABH 变性。

测定 MrABH 在 20、30、40、50、60 °C 下的热稳定性,结果如图 4D 所示,MrABH 在 20、30 °C 下,具有较好热稳定性,半衰期均超过 72 h。但在 40、50、60 °C 条件下不稳定,在 40、50 °C 放置 8 h 后,MrABH 完全失活,酶活性未检出,在 60 °C 放置 4 h,MrABH 完全失活。

2.5 动力学分析

分别以 4-硝基苯戊酸酯和 4-硝基戊酰苯胺为模型底物,测定了 MrABH 的动力学参数,探讨其水解酯键、酰胺键的差异,结果如表 2 所示。从测得的 k_{cat} 、 K_m 数值可以看出,虽然 MrABH 更偏好水解酯键,但 MrABH 对酯键、酰胺键两种键的动力学参数在同一数量级,证明其水解酰胺键与酯键的能力差异不大。

2.6 性质鉴定

酶在塑料表面附着和释放,可将长链聚合物水解成低聚物,甚至更短的单体。MrABH 分别与 PA66、PA6 在 30 °C 下孵育 5 d,使用 LC-MS

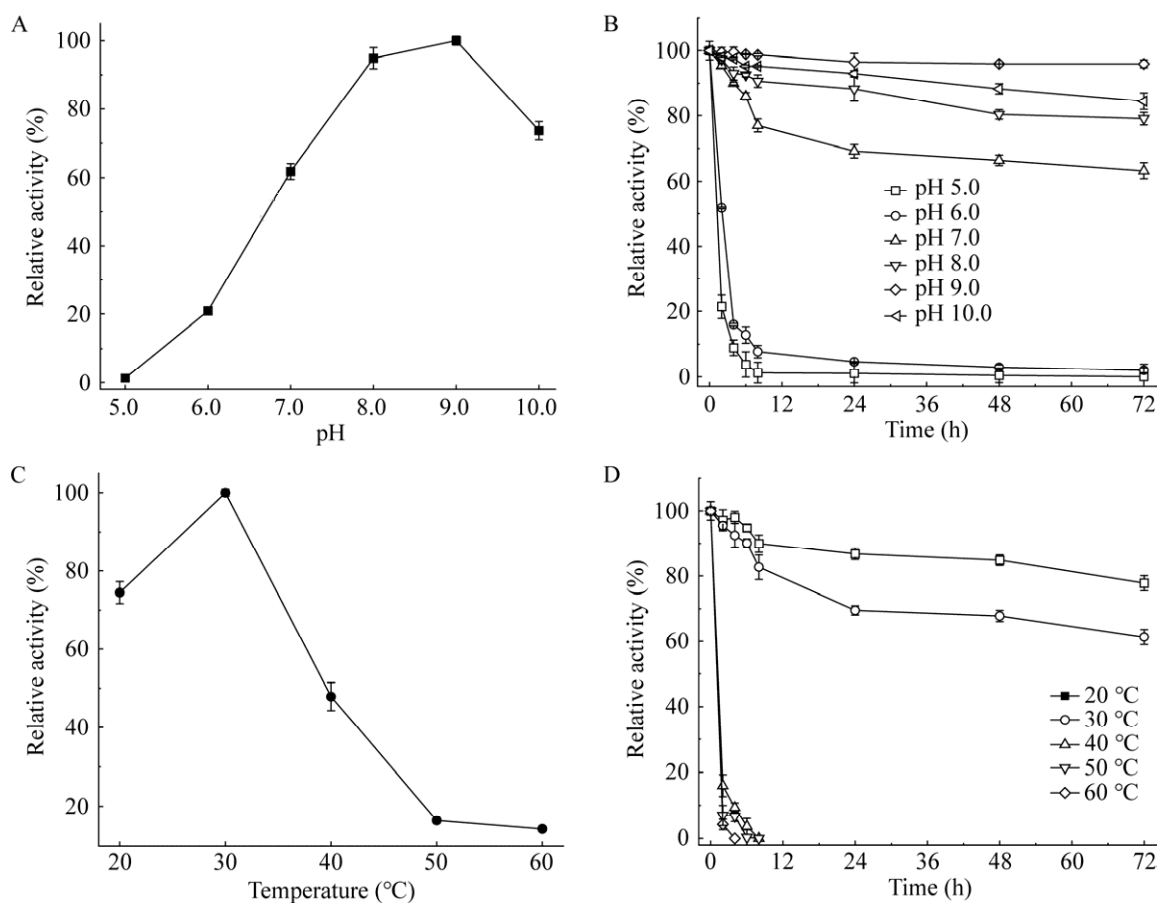


图 4 pH 和温度对 MrABH 的影响 A: 最适 pH. B: pH 稳定性. C: 最适温度. D: 温度稳定性

Figure 4 Effects of pH and temperature on the MrABH. A: pH optimum. B: pH stability. C: Temperature optimum. D: Thermal stability.

表 2 MrABH 的动力学参数

Table 2 Kinetic parameters of MrABH

Substrates	K_m (mol/L)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m (mol/(L·s))
4-nitrophenyl valerate	9.09×10^{-2}	70.80	7.78×10^2
N-(4-nitrophenyl)pentanamide	9.78×10^{-2}	43.80	4.45×10^2

对反应液中的产物进行定性, MS 采用负离子模式, 结果如图 5 所示。在 MrABH 催化 PA66 的反应液中, 检出了单体己二酸($m/z=146.06$)、二聚体($m/z=244.18$)、三聚体($m/z=372.23$), 证实了长链的 PA66 可被 MrABH 降解, 释放出单体己二酸及其寡聚物。而在 PA6 的反应液中, 也检出了单体 6-氨基己酸($m/z=131.09$)、二聚体

($m/z=244.18$)、三聚体($m/z=357.26$)。这些结果均表明, MrABH 可以催化降解聚酰胺, 生成单体和寡聚物。

3 讨论与结论

随着塑料制品的广泛应用, 对其绿色环保的要求越来越高, 因此发展推进酶法等对环境友好的生物降解方法具有重要的意义。近几年聚酯型塑料如 PET 等的生物催化降解得到了快速发展, 筛选到大量可以降解 PET 的酯酶(esterase)、脂肪酶(lipase)和角质酶(cutinase)等, 已经可以从经过数周培养后验证微量释放

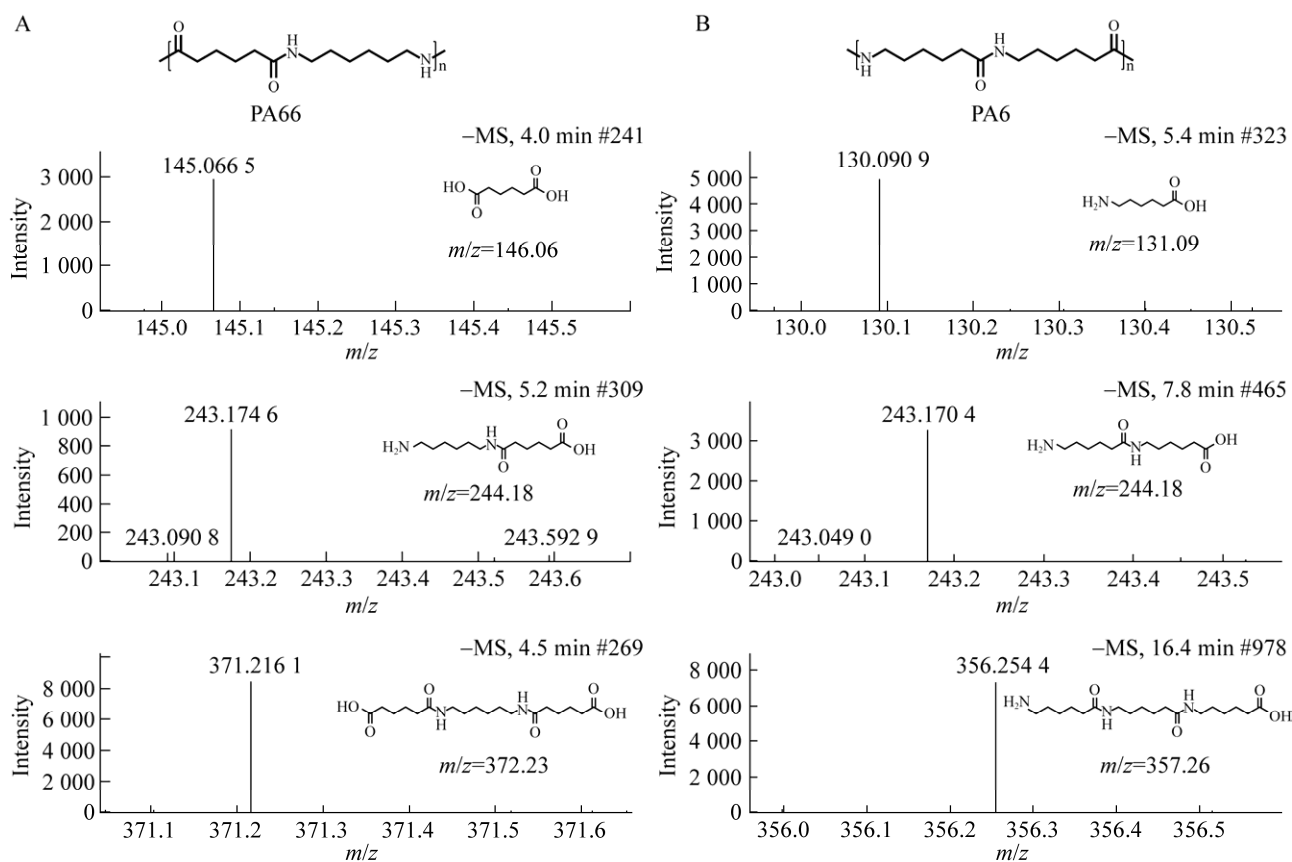


图 5 MrABH 水解 PA66、PA6 A: MrABH 催化 PA66 反应液的 LC-MS 结果. B: MrABH 催化 PA6 反应液的 LC-MS 结果.

Figure 5 Hydrolysis of PA66 and PA6 by MrABH. A: LC-MS analyses of reaction solutions containing MrABH and PA66. B: LC-MS analyses of reaction solutions containing MrABH and PA6.

的单体发展到数小时内完成高效的解聚^[20]。此外,对聚氨酯塑料(polyurethane, PU)降解也有不少报道,如大多数的 PU 水解酶是酯解酶,如角质酶(CpCut1、HiC、LCC、TfCut2、Tcur1278、Tcur0390)^[34-36]、脂肪酶(PueA、PueB、CR lipase)^[38-39]以及酯酶(PudA、PulA、E3576)^[40-41],这些酶只能通过水解软段中的酯键来降解 PU。PU 的氨基甲酸酯基团被认为是酯和酰胺键的组合,若能挖掘更多可水解聚合物中酰胺键的酶,不仅能应用于 PA 塑料的水解,还可以与酯酶协同作用水解 PU 塑料中的氨基甲酸酯键^[42]。

本研究拟扩展酶法降解塑料的应用,探索

聚酰胺生物降解的潜在可能。酰胺酶是一类能够催化水解酰胺键生成相应氨基和羧基的水解酶,迄今为止,已报道几种酶具有聚酰胺水解活性,分别是酰胺酶(NfpolyA、NylA、NylB、NylC)^[22-25]、二氢嘧啶酶(DHPase)^[26]、蛋白酶(subtilisin)^[43]和角质酶(FsC、The_Cut1、HiC)^[43-45]。本研究以 4-硝基丙酰苯胺为模式底物,筛选具有催化酰胺键能力的酶;最终筛选鉴定了一种来源于嗜热菌(*Meiothermus ruber*)的聚酰胺水解酶,该酶属于 α/β 水解酶家族,并对该酶进行了较为系统的研究。构建质粒使其在大肠杆菌中可溶表达,经过 Ni-NTA 亲和层析得到较

纯的蛋白。酶学性质研究显示 MrABH 反应最适 pH 为 9.0, 最适温度为 30 °C。MrABH 在 pH 8.0–10.0 范围内都具有较好的稳定性, 72 h 后仍能保持 80% 以上的酶活。MrABH 具有良好的温度稳定性, 该酶在 30 °C 的环境条件下, 半衰期超过 72 h。经质谱鉴定, 该酶可以催化降解长链的 PA6 和 PA66 生成单体和寡聚物, 证明其在降低聚酰胺污染方面具有潜在的应用价值, 为此类聚酰胺水解酶的进一步研究和改造提供了理论依据。

REFERENCES

- [1] MATTHIES P, SEYDL WF. History and development of nylon 6[C]//Seymour RB, Kirshenbaum GS. High Performance Polymers: Their Origin and Development. Dordrecht: Springer, 1986: 39-53.
- [2] KOHAN MELVIN I. The history and development of nylon-66[C]//SEYMOUR RB, KIRSHENBAUM GS. High Performance Polymers: Their Origin and Development. Dordrecht: Springer, 1986: 19-37.
- [3] NEGORO S, KATO DI, OHKI T, YASUHIRA K, KAWASHIMA Y, NAGAI K, TAKEO M, SHIBATA N, KAMIYA K, SHIGETA Y. Structural and functional characterization of nylon hydrolases[M]. Methods in Enzymology. New York: Academic Press. 2021, 648: 357-389.
- [4] DASGUPTA S, HAMMOND WB, GODDARD WA. Crystal structures and properties of nylon polymers from theory[J]. Journal of the American Chemical Society, 1996, 118(49): 12291-12301.
- [5] DEOPURA B, ALAGIRUSAMY R, JOSHI M, GUPTA B. Polyesters and Polyamides[M]. Oxford: Woodhead Publishing, 2008: 419-592.
- [6] SONG YN, MA RJ, XU L, HUANG HD, YAN DX, XU JZ, ZHONG GJ, LEI J, LI ZM. Wearable polyethylene/polyamide composite fabric for passive human body cooling[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2018, 10(48): 41637-41644.
- [7] PANT HR, KIM HJ, BHATT LR, JOSHI MK, KIM EK, KIM JI, ABDAL-HAY A, HUI KS, KIM CS. Chitin butyrate coated electrospun nylon-6 fibers for biomedical applications[J]. Applied Surface Science, 2013, 285: 538-544.
- [8] SAHA S, KUMAR V, RENCHECK ML, TEKINALP H, KNOUFF B, BLANCHARD P, YOON J, COPENHAVER K, HASSEN AA, WANG H, MAHURIN SM, JAYANTHI K, KUNC V. Development of multifunctional nylon 6,6-based nanocomposites with high electrical and thermal conductivities by scalable melt and dry blending methods for automotive applications[J]. Materials Today Communications, 2024, 38: 107657.
- [9] SINGH S, PAHSHA E, KALLA P. Investigations on GUJCON-CRF nylon 6 fiber based cement concrete for pavement[J]. Materials Today: Proceedings, 2023, 3: 1-7.
- [10] FAIRGRIEVE S. Nylon degradation: problems and opportunities[J]. Plastics Engineering, 2008, 64(7): 34-42.
- [11] TOMASINI A, LEÓN-SANTIESTEBAN HH. Nylon Uses in Biotechnology[M]. Biocomposites. Amsterdam: Elsevier, 2015: 319-346.
- [12] LEBRETON L, SLAT B, FERRARI F, SAINTE-ROSE B, AITKEN J, MARTHUSE R, HAJBANE S, CUNSOLO S, SCHWARZ A, LEVIVIER A, NOBLE K, DEBELJAK P, MARAL H, SCHOENEIC-ARGENT R, BRAMBINI R, REISSER J. Evidence that the Great Pacific Garbage Patch is rapidly accumulating plastic[J]. Scientific Reports, 2018, 8: 4666.
- [13] LEAR G, KINGSBURY JM, FRANCHINI S, GAMBARINI V, MADAY SDM, WALLBANK JA, WEAVER L, PANTOS O. Plastics and the microbiome: impacts and solutions[J]. Environmental Microbiome, 2021, 16(1): 2.
- [14] PENG C, HE N, WU YH, LU Y, SUN HW, WANG L. Excretion characteristics of nylon microplastics and absorption risk of nanoplastics in rats[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2022, 238: 113586.
- [15] ZHENG XW, LIU XL, ZHANG LL, WANG ZM, YUAN Y, LI J, LI YY, HUANG HH, CAO X, FAN ZQ. Toxicity mechanism of nylon microplastics on *Microcystis aeruginosa* through three pathways: photosynthesis, oxidative stress and energy metabolism[J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 426: 128094.
- [16] 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.

- [17] BELL EL, SMITHSON R, KILBRIDE S, FOSTER J, HARDY FJ, RAMACHANDRAN S, TEDSTONE AA, HAIGH SJ, GARFORTH AA, DAY PJR, LEVY C, SHAVER MP, GREEN AP. Directed evolution of an efficient and thermostable PET depolymerase[J]. *Nature Catalysis*, 2022, 5: 673-681.
- [18] CASTRO-RODRÍGUEZ JA, RODRÍGUEZ-SOTRES R, FARRÉS A. Determinants for an efficient enzymatic catalysis in poly(ethylene terephthalate) degradation[J]. *Catalysts*, 2023, 13(3): 591.
- [19] 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.
- [20] 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: 216-219.
- [21] ALMANSA E, HEUMANN S, EBERL A, KAUFMANN F, CAVACO-PAULO A, GÜBITZ GM. Surface hydrolysis of polyamide with a new polyamidase from *Beauveria brongniartii*[J]. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2008, 26(5): 371-377.
- [22] HEUMANN S, EBERL A, FISCHER-COLBRIE G, POBEHEIM H, KAUFMANN F, RIBITSCH D, CAVACO-PAULO A, GUEBITZ GM. A novel aryl acylamidase from *Nocardia farcinica* hydrolyses polyamide[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 102(4): 1003-1011.
- [23] YASUHIRA K, SHIBATA N, MONGAMI G, UEDO Y, ATSUMI Y, KAWASHIMA Y, HIBINO A, TANAKA Y, LEE YH, KATO DI, TAKEO M, HIGUCHI Y, NEGORO S. X-ray crystallographic analysis of the 6-aminohexanoate cyclic dimer hydrolase: catalytic mechanism and evolution of an enzyme responsible for nylon-6 byproduct degradation[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(2): 1239-1248.
- [24] NEGORO S, KAWASHIMA Y, SHIBATA N, KOBAYASHI T, BABA T, LEE YH, KAMIYA K, SHIGETA Y, NAGAI K, TAKEHARA I, KATO DI, TAKEO M, HIGUCHI Y. Mutations affecting the internal equilibrium of the reaction catalyzed by 6-aminohexanoate-dimer hydrolase[J]. *FEBS Letters*, 2016, 590(18): 3133-3143.
- [25] NEGORO S, SHIBATA N, TANAKA Y, YASUHIRA K, SHIBATA H, HASHIMOTO H, LEE YH, OSHIMA S, SANTA R, OSHIMA S, MOCHIJI K, GOTO Y, IKEGAMI T, NAGAI K, KATO DI, TAKEO M, HIGUCHI Y. Three-dimensional structure of nylon hydrolase and mechanism of nylon-6 hydrolysis[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(7): 5079-5090.
- [26] QUARTINELLO F, SUBAGIA R, ZITZENBACHER S, REICH J, VIELNASCHER R, BECHER E, HALL M, RIBITSCH D, GUEBITZ GM. Dihydropyrimidinase from *Saccharomyces kluyveri* can hydrolyse polyamides[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2023, 11: 1158226.
- [27] NOMURA N, DEGUCHI T, SHIGENO-AKUTSU Y, NAKAJIMA-KAMBE T, NAKAHARA T. Gene structures and catalytic mechanisms of microbial enzymes able to biodegrade the synthetic solid polymers nylon and polyester polyurethane[J]. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, 2001, 18: 125-147.
- [28] FRIEDRICH J, ZALAR P, MOHORCIC M, KLUN U, KRZAN A. Ability of fungi to degrade synthetic polymer nylon-6[J]. *Chemosphere*, 2007, 67(10): 2089-2095.
- [29] Von HAUGWITZ G, HAN X, PFAFF L, LI Q, WEI HL, GAO J, METHLING K, AO YF, BRACK Y, MICAN J, FEILER CG, WEISS MS, BEDNAR D, PALM GJ, LALK M, LAMMERS M, DAMBORSKY J, WEBER G, LIU WD, BORNSCHEUER UT, WEI R. Structural insights into (tere)phthalate-ester hydrolysis by a carboxylesterase and its role in promoting PET depolymerization[J]. *ACS Catalysis*, 2022, 12(24): 15259-15270.
- [30] PFAFF L, GAO J, LI ZS, JÄCKERING A, WEBER G, MICAN J, CHEN YP, DONG WL, HAN X, FEILER CG, AO YF, BADENHORST CPS, BEDNAR D, PALM GJ, LAMMERS M, DAMBORSKY J, STRODEL B, LIU WD, BORNSCHEUER UT, WEI R. Multiple substrate binding mode-guided engineering of a thermophilic PET hydrolase[J]. *ACS Catalysis*, 2022, 12(15): 9790-9800.
- [31] CHEN CC, HAN X, LI X, JIANG PC, NIU D, MA LX, LIU WD, LI SY, QU YY, HU HB, MIN J, YANG Y,

- ZHANG LL, ZENG W, HUANG JW, DAI LH, GUO RT. General features to enhance enzymatic activity of poly(ethylene terephthalate) hydrolysis[J]. *Nature Catalysis*, 2021, 4: 425-430.
- [32] 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.
- [33] 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: 2106.
- [34] LIU JW, XIN KY, ZHANG TY, WEN Y, LI D, WEI R, ZHOU J, CUI ZL, DONG WL, JIANG M. Identification and characterization of a fungal cutinase-like enzyme CpCut1 from *Cladosporium* sp. P7 for polyurethane degradation[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2024, 90(4): e0147723.
- [35] Di BISCEGLIE F, QUARTINELLO F, VIENASCHER R, GUEBITZ GM, PELLIS A. Cutinase-catalyzed polyester-polyurethane degradation: elucidation of the hydrolysis mechanism[J]. *Polymers*, 2022, 14(3): 411.
- [36] SCHMIDT J, WEI R, OESER T, SILVA LADE, BREITE D, SCHULZE A, ZIMMERMANN W. Degradation of polyester polyurethane by bacterial polyester hydrolases[J]. *Polymers*, 2017, 9(2): 65.
- [37] 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.
- [38] HOWARD GT, MACKIE RI, CANN IKO, OHENE-ADJEI S, ABOUDEHEN KS, DUOS BG, CHILDERS GW. Effect of insertional mutations in the pueA and pueB genes encoding two polyurethanases in *Pseudomonas chlororaphis* contained within a gene cluster[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 103(6): 2074-2083.
- [39] GAUTAM R, BASSI AS, YANFUL EK. *Candida rugosa* lipase-catalyzed polyurethane degradation in aqueous medium[J]. *Biotechnology Letters*, 2007, 29(7): 1081-1086.
- [40] NAKAJIMA-KAMBE T, ONUMA F, AKUTSU Y, NAKAHARA T. Determination of the polyester polyurethane breakdown products and distribution of the polyurethane degrading enzyme of *Comamonas acidovorans* strain TB-35[J]. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1997, 83(5): 456-460.
- [41] VEGA RE, MAIN T, HOWARD GT. Cloning and expression in *Escherichia coli* of apolyurethane-degrading enzyme from *Pseudomonas fluorescens*[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 1999, 43(1/2): 49-55.
- [42] MAGNIN A, POLLET E, PERRIN R, ULLMANN C, PERSILLON C, PHALIP V, AVÉROUS L. Enzymatic recycling of thermoplastic polyurethanes: synergistic effect of an esterase and an amidase and recovery of building blocks[J]. *Waste Management*, 2019, 85: 141-150.
- [43] SILVA C, ARAÚJO R, CASAL M, GÜBITZ GM, CAVACO-PAULO A. Influence of mechanical agitation on cutinases and protease activity towards polyamide substrates[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 40(7): 1678-1685.
- [44] ARAÚJO R, SILVA C, O'NEILL A, MICAEL N, GUEBITZ G, SOARES CM, CASAL M, CAVACO-PAULO A. Tailoring cutinase activity towards polyethylene terephthalate and polyamide 6,6 fibers[J]. *Journal of Biotechnology*, 2007, 128(4): 849-857.
- [45] BIUNDO A, SUBAGIA R, MAURER M, RIBITSCH D, SYRÉN PO, GUEBITZ GM. Switched reaction specificity in polyesters towards amide bond hydrolysis by enzyme engineering[J]. *RSC Advances*, 2019, 9(62): 36217-36226.

(本文责编 郝丽芳)