

# 通过碳水化合物结合模块增强 LCC-ICCG 的 PET 降解效率

姚佳鑫<sup>1,2</sup>, 江雅儒<sup>3</sup>, 郝梦瑶<sup>1</sup>, 梁梦想<sup>2</sup>, 顾正华<sup>1</sup>, 张梁<sup>1,2</sup>, 郭忠鹏<sup>1,2\*</sup>

1 江南大学 粮食发酵与食品生物制造国家工程研究中心, 江苏 无锡 214122

2 江苏集萃未来食品技术研究所有限公司, 江苏 宜兴 214205

3 南京师范大学 食品与制药工程学院, 江苏 南京 210023

姚佳鑫, 江雅儒, 郝梦瑶, 梁梦想, 顾正华, 张梁, 郭忠鹏. 通过碳水化合物结合模块增强 LCC-ICCG 的 PET 降解效率[J]. 生物工程学报, 2024, 40(10): 3705-3721.

YAO Jiaxin, JIANG Yaru, HAO Mengyao, LIANG Mengxiang, GU Zhenghua, ZHANG Liang, GUO Zhongpeng. Enhancing PET degradation efficiency through fusing carbohydrate-binding modules in LCC-ICCG[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(10): 3705-3721.

**摘要:** 聚对苯二甲酸乙二醇酯(polyethylene terephthalate, PET)是全球产量最大的聚酯之一, 但由于其废弃量大且难降解, 环境污染严重。酶解法处理 PET 是目前的研究热点, 碳水化合物结合模块(carbohydrate binding module, CBM)的加入可以增加酶与底物之间的亲和力, 提高酶的降解能力。为了开发更高效的 PET 水解酶, 本研究在 PET 降解酶 LCC-ICCG 中引入来源于不同家族具有不同底物亲和力的碳水化合物结合结构域(CBM), 并以高结晶度 PET 粉末和无定型 PET 膜为底物, 对改造后酶的降解效率进行了表征, 以探寻降解能力最优的酶。结果表明, 融合 B 型 CBM 后降低了酶对 PET 的降解率和  $T_m$  值, 而引入 A、C 型 CBM 后, 酶对膜状底物的降解率得到了显著提高, PET 的降解速率和  $T_m$  值也得到了提升, 尤其是融合酶 LCC-ICCG-CBM9-2 对膜状 PET 底物的降解率对比原始酶 LCC-ICCG 提高了 10 倍以上。本研究的结果表明, 通过引入 A、C 两型 CBM 的方式, 可以提高 LCC-ICCG 对膜状 PET 降解率和热稳定性, 改善其活性低的问题, 从而更有效地降解 PET。本研究可为塑料降解提供技术支持, 有利于推进环保事业。

**关键词:** 聚对苯二甲酸乙二醇酯; 生物降解; PET 降解酶; LCC-ICCG; 碳水化合物结合模块

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFC2100300); 中央高校基本科研业务费专项资金(JUSRP123006, JUSRP123008)  
This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2100300) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities, China (JUSRP123006, JUSRP123008).

\*Corresponding author. E-mail: zpguo@jiangnan.edu.cn

Received: 2023-10-26; Accepted: 2024-01-15; Published online: 2024-06-11

# Enhancing PET degradation efficiency through fusing carbohydrate-binding modules in LCC-ICCG

YAO Jiaxin<sup>1,2</sup>, JIANG Yaru<sup>3</sup>, HAO Mengyao<sup>1</sup>, LIANG Mengxiang<sup>2</sup>, GU Zhenghua<sup>1</sup>, ZHANG Liang<sup>1,2</sup>, GUO Zhongpeng<sup>1,2\*</sup>

1 National Engineering Research Center of General Fermentation and Biomanufacturing, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 JITRI Future Food Technology Research Institute Co., Ltd., Yixing 214205, Jiangsu, China

3 School of Food Science and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, Jiangsu, China

**Abstract:** Polyethylene terephthalate (PET) is a largely-produced polymer worldwide. However, its extensive waste generation and resistance to degradation pose significant environmental concerns. Consequently, there is considerable interest in researching enzymatic degradation of PET. Relevant studies have shown that the addition of a carbohydrate binding module (CBM) can increase the affinity between the enzyme and the substrate, enhancing the enzyme's degradation ability. In order to develop more efficient PET hydrolytic enzymes, this study introduced carbohydrate binding domains (CBMs) from different families with different substrate affinities into the PET-degrading enzyme LCC-ICCG. High crystallinity PET powder and amorphous PET film were used as substrates to characterize the degradation efficiency of the modified enzymes, aiming to explore the enzyme with the optimal degradation ability. The results showed that the fusion of type B CBM reduced the degradation rate and  $T_m$  value of the enzyme towards PET, while the introduction of type A and type C CBMs significantly improved the degradation rate of the enzyme towards the film-like substrate. The degradation rate and  $T_m$  value of PET were also enhanced, especially with the fusion enzyme LCC-ICCG-CBM9-2, which showed an over 10-fold increase in the degradation rate compared to the original enzyme LCC-ICCG. Therefore, this study demonstrates that by introducing type A and type C CBMs, the degradation rate and thermal stability of LCC-ICCG towards film-like PET can be improved, addressing the issue of its low activity and enabling more effective PET degradation. This research provides support for plastic degradation technology and contributes to environmental conservation efforts.

**Keywords:** polyethylene terephthalate (PET); biodegradation; PET-degrading enzyme; LCC-ICCG; carbohydrate binding module (CBM)

塑料作为现代人类的标志性发明之一，给人类带来了巨大的便利，其中聚对苯二甲酸乙二醇酯(polyethylene terephthalate, PET)最为常用。截至2020年，世界PET塑料产量已达到8 716万 t<sup>[1]</sup>，然而大量的生产和不当的处理导

致塑料垃圾在全球分布，预计2050年废弃量将达到250亿 t<sup>[2]</sup>。其中，90%以上的废弃塑料被填埋处理而加重塑料污染<sup>[3]</sup>。这些废弃塑料可能会对800多种生物产生影响<sup>[4]</sup>，因此，寻求塑料尤其是PET塑料的降解方法十分必要。

近年来,针对 PET 降解问题,寻找环保高效的降解方法已成为研究热点。为了降解 PET,首先需要深入研究其降解机制。PET 降解产物包括对苯二甲酸双羟乙酯(bishydroxyethyl terephthalate, BHET)、对苯二甲酸单羟乙酯[mono(2-hydroxybutyl) ester, MHET]、对苯二甲酸(terephthalic acid, TPA)和乙二醇(ethylene glycol, EG),其中 TPA 和 EG 为最终降解产物。由于 PET 骨架结构高度稳定、结晶度较高,分子间作用力较弱且易产生氢键,因此其降解性能较差,在自然环境下表现出了极高的稳定性,需表面处理才能被微生物降解。作为一种半晶聚合物,PET 的玻璃化转变温度( $T_g$ )约为  $76\text{ }^\circ\text{C}$ 。相对于晶体 PET 而言,聚酯链在非晶态下时流动性增强,酯键更易于分解。目前我国回收利用废物塑料的两种类型是回收和能量回收,按照国际回收标准指南中的回收优先顺序<sup>[5]</sup>,回收利用方式可分为 4 个等级:第一、二级为利用物理方法处理后回收再生塑料,具体方法有熔融加工回收、溶剂分离回收、固相加工回收等;第三级为化学回收,如热/催化裂解和化学溶剂分解,制取化工原材料;第四级为废弃塑料焚烧,回收能量。但以上的方法都会造成环境污染<sup>[6]</sup>,因此绿色可靠的生物降解法得到了广泛关注。生物手段降解塑料不会造成污染,不需要消耗大量的能量,且对微生物的改造有大量的适用的分子操作手段和工具,是一种安全生态的降解方法<sup>[7]</sup>。目前可以通过 PET 降解酶将 PET 降解为 TPA 和 EG,降解后产生的单体可以循环利用。自 2005 年 Müller 等<sup>[8]</sup>在褐裂热杆菌(*Thermobifida fusca*)中发现可以水解聚酯(主要是 PET)的酶后,又相继发现了多种 PET 降解酶,但都存在反应周期长、热稳定性差、转化率低等缺陷,限制了 PET 降解酶的工业应用。

为了更有效地降解塑料,世界各国积极开展

合作,2019 年国家自然科学基金组织国际(地区)合作研究项目“废塑料资源高效生物降解转化的关键科学问题与技术(MIXed plastics biodegradation and UPcycling using microbial communities, MIX-UP)”。该项目聚焦“塑料污染”这一全球化的问题,联合中欧双方 14 家优势科研单位,开展实质性的重大前沿合作研究以满足生物降解塑料的需求,董维亮教授与姜岷教授等<sup>[9]</sup>认为实施该项目的过程中可以加强多学科交叉研究,挖掘塑料降解微生物资源和酶资源,深入研究降解特性、功能基因和关键酶的分子生化水平,将环境微生物研究转向废塑料资源化研究,促进塑料垃圾升级为碳资源,构建新型塑料低碳循环经济模式。同时各国研究小组也取得了大量进展, Silva 等<sup>[10]</sup>通过基因突变改造了来自嗜热子囊菌(*Thermobifida fusca*)的 Tfu\_0883,使突变体对底物的亲和力提高了 1.6 倍, Son 等<sup>[11]</sup>根据 PETase 的结构和机理进行改造。研究设计了来自大阪堺菌(*Ideonella sakaiensis*) 201-F6 的 IsPETase 的  $\beta 6$ - $\beta 7$  连接环和结合位点,获得了高活性和高稳定性、 $T_m$  值为  $57.62\text{ }^\circ\text{C}$  突变体,比野生型高出  $8.81\text{ }^\circ\text{C}$ 。Then 等<sup>[12]</sup>通过定向进化策略改造了 PETase,获得了具有更高  $T_m$  的突变体。降解酶中叶枝堆肥角质酶(leaf and branch compost keratinase, LCC)是一种由植物病原细菌分泌的降解植物保护性角质的酯酶<sup>[13]</sup>。Shirke 等<sup>[14]</sup>的研究表明糖基化 LCC 在温度升高  $10\text{ }^\circ\text{C}$  时比 LCC 的聚集程度更高。Tournier 等<sup>[15]</sup>的研究表明其突变体 LCC-ICCG 对 PET 的降解能力较强,其降解率在 9.3 h 时达到 90%,可见 LCC-ICCG 具有巨大的应用潜力。

碳水化合物结合结构域(carbohydrate binding module, CBM)是一类非催化活性的折叠蛋白,可以按底物结合特性分为 A、B、C 三类<sup>[16]</sup>:表面结合型(type A)、链式结合型(type B)和寡糖结

合型(type C)。CBM 可以将催化结构域靶向固体表面,增加亲水基质表面上的酶浓度,并可破坏纤维素结构<sup>[17]</sup>。其他类似结合模块是根据自然结构域的结构设计的,以改善酶在天然聚酯等疏水表面上的吸附。Dai 等<sup>[18]</sup>将来自里氏木霉(*Trichoderma reesei*)的CBM融合到 $IsPETase^{EHA}$ 的C末端,相较于原始酶, $IsPETase^{EHA}$ -CBM在30 °C和40 °C下的水解活性分别提高71.5%和44.5%;当蛋白质浓度从2.5  $\mu\text{g/mL}$ 增加到20  $\mu\text{g/mL}$ 时, $IsPETase^{EHA}$ -CBM的催化活性增加86%。Espino-Rammer 等<sup>[19]</sup>发现疏水蛋白HFBs可以显著增强PETase的活性,提高其对PET基质材料的吸附能力。Zhang 等<sup>[20]</sup>研究表明引入Tfuc-CenA的融合蛋白,融合酶的PET结合能力提高1.4–1.7倍,PET降解能力提高1.5倍。Xue等<sup>[21]</sup>将*Chitinolyticbacter meiyuanensis* SYBC-H1的几丁质结合域(chitin-binding domain, ChBD)融合到之前报道的LCC-ICCG变体的C端,显示出对PET底物更强的吸附力,降解性能提高了19.6%。但引入结合域不一定会提升PET降解酶的降解能力,Graham等<sup>[22]</sup>的研究表明,当固体百分比低于10%时,引入的5种CBM可促进PET的降解,但高于此阈值时,原始酶对PET的降解率已经高达97%,融合蛋白的存在不会带来额外好处,说明该CBM的引入对于工业酶促PET回收来说不是必需的。Weber等<sup>[23]</sup>通过体外实验和分子动力学模拟无法检测到BaCBM5与PET的结合。Dai等<sup>[18]</sup>研究中的聚(3-羟基丁酸酯)结合域[poly(3-hydroxybutyrate)-binding domain, PBM]与 $IsPETase^{EHA}$ 的融合严重降低了其催化活性, $IsPETase^{EHA}$ -PBM在30 °C和40 °C下的水解活性分别只有原始酶的46.4%和17.3%。本研究挑选了来自3种家族的3类CBM [ $TrCBM1$ <sup>[24]</sup>(PDB:2CBH, type A)、 $CfCBM4-1$ <sup>[25]</sup>(PDB:1GU3, type B)、 $CBM9-2$ <sup>[26]</sup>(PDB:1I82, type C)]。 $TrCBM1$

的催化三聚体可以与底物结合且其平面表面可以与不溶物或结晶表面贴合<sup>[27]</sup>, $CfCBM4-1$ 结合位点的残基形成的凹槽可以结合链式的高聚物, $CBM9-2$ 底物结合位点可以与单糖二糖或高聚物的还原末端结合。本研究将这三类CBM与LCC-ICCG(PDB:7W45)(图1)融合表达并探究酶活性和降解能力的变化,并通过多种技术筛选出最佳活性和稳定性的CBM融合酶。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株和试剂

大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)保藏于本实验室,本课题使用的所有重组质粒由天霖生物科技(上海)有限公司合成;无定形PET膜(0.25 mm厚度,结晶度小于8%)与PET粉末(300  $\mu\text{m}$ 直径,结晶度大于50%)购于Goodfellow公司;TPA、MHET和BHET购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司,均为色谱级;蛋白胨、酵母粉购于赛默飞世尔科技公司;质粒提取试剂盒、DNA产物纯化试剂盒购于南京诺唯赞生物技术股份有限公司;其他试剂购于国药集团化学试剂有限公司。

卡那霉素母液(50 mg/mL):称取1 g硫酸卡那霉素放入灭菌的50 mL烧杯中,加入20 mL无菌双蒸水充分溶解,然后用0.22  $\mu\text{m}$ 的微孔过滤器过滤后分装,最后放入-20 °C保存备用。

诱导剂IPTG母液(0.1 mol/L):称取1 g IPTG,加入40 mL无菌双蒸水中充分溶解,然后121 °C灭菌20 min,-20 °C保存备用。

### 1.2 培养基及缓冲液

LB液体培养基(g/L):胰蛋白胨10,酵母粉5,NaCl 10。

LB固体培养基:向LB液体培养基中加入1.5%(质量体积分数)的琼脂粉。

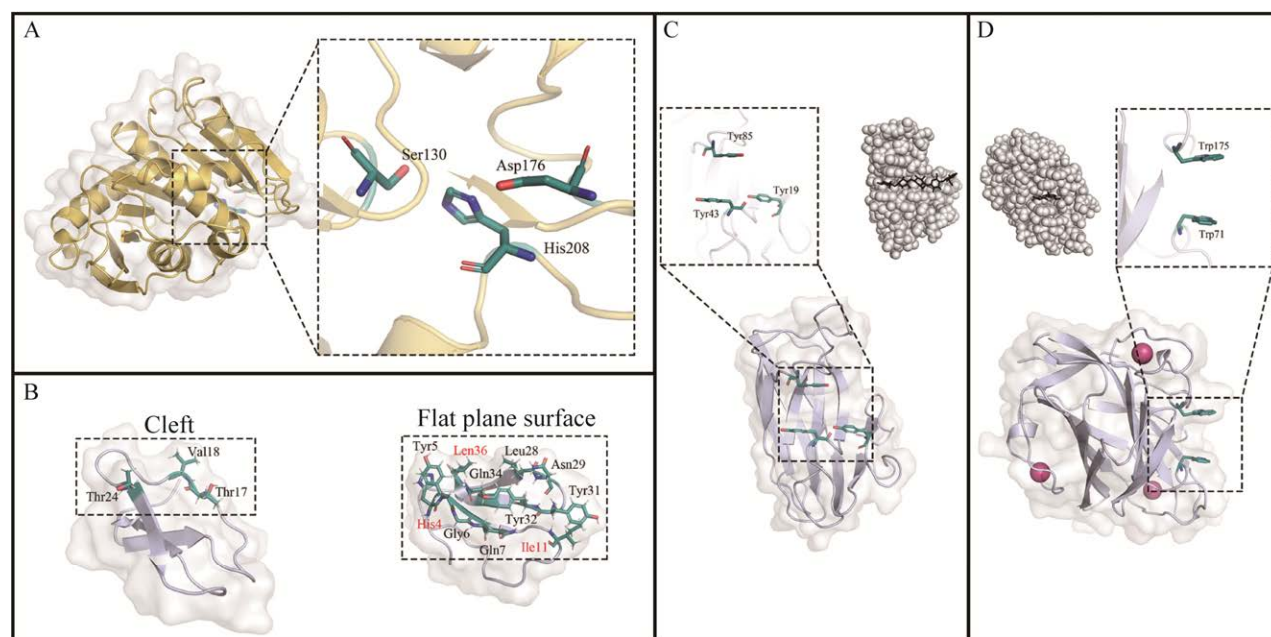


图 1 LCC-ICCG 与三种 CBM 的结构 A: LCC-ICCG. B: *TrCBM1*. C: *CfCBM4-1*. D: CBM9-2

Figure 1 Structure of LCC-ICCG with three types of CBM. A: LCC-ICCG. Its catalytic triplet is on the right side. B: *TrCBM1*. Left: The cleft. Right: The flat plane surface, defined as triplet tyrosine (color-coded red) and surrounding residues. C: *CfCBM4-1*. Its chain-bound model is on the upper right side. Its binding site is on the upper left side. D: CBM9-2. Three octahedral metal binding sites, presumed calcium, are drawn in warm pink. Its oligosaccharide binding model is on the upper left side. Its binding site is on the upper right side.

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。

磷酸盐缓冲液(phosphate buffer, PB): 100 mmol/L  $K_2HPO_4$  用 100 mmol/L  $KH_2PO_4$  调至 pH 8.0。

Tris-HCl 缓冲液(Tris-HCl buffer): 100 mmol/L Tris 用盐酸调至 pH 8.0。

Talon 缓冲液(binding buffer): 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 300 mmol/L NaCl。

镍柱洗脱缓冲液(elution buffer): 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 300 mmol/L NaCl, 300 mmol/L 咪唑。

### 1.3 重组质粒的构建

将基于大肠杆菌密码子偏好性优化后的 *LCC-ICCG* 基因(GenBank 登录号: ON645351), 分别与基于大肠杆菌密码子偏好性优化后的 3 种

类型 CBM 的基因[*TrCBM1* (GenBank 登录号: CM044617)、*CfCBM4-1* (GenBank 登录号: KB445553) 和 CBM9-2 (GenBank 登录号: CP069563.1)]使用连接肽基因序列(5'-GCTCTGGGTCGGACC CGGGCTGCTACCGGTGGTGGTCGCCGGACG ACGGGTGGTGGTGGTACCACG-3')连接, 克隆到 pET-26a (GenBank 登录号: GU476292.1)的载体(限制酶使用 *Nde* I、*Xho* I)中, 获得目的基因。

### 1.4 感受态的制备与转化

感受态细胞由实验室提前制备, 并使用热激法使重组质粒转化到感受态细胞中。

### 1.5 质粒的提取

将分离的大肠杆菌单菌落接种到 10 mL LB 培养基中, 在 37 °C 摇床上培养 8-10 h, 取 2-4 mL 菌液离心去除上清液, 收集下层沉淀的

菌体, 然后按照上海捷瑞生物工程有限公司 DNA 质粒抽提试剂盒说明书进行操作, 提取的质粒 DNA 采用酶切方法进行验证。

### 1.6 PET 降解酶在大肠杆菌中的表达

挑选单菌落转至 LB 液体培养基中, 在 37 °C、200 r/min 的条件下培养 8–10 h。将培养基的 5% 接入 TB 液体发酵培养基中, 37 °C、200 r/min 振荡培养 2 h。当菌体浓度( $OD_{600}$ )达到 0.5–1.0 时加入 IPTG, 使其终浓度达到 0.1 mmol/L, 并在 25 °C、200 r/min 的条件下进行摇瓶诱导发酵, 持续培养 24 h。

### 1.7 蛋白的纯化

将菌体细胞在 -80 °C 下冷冻至少 3 h, 然后加入 Talon 缓冲液重悬菌体, 进行超声振动处理并离心, 取上清液用于蛋白纯化。对含有 20% 乙醇的镍柱进行冲洗, 然后平衡镍柱并加入样品。接着进行多次平衡液冲洗和不同浓度咪唑 (50、100、200 mmol/L) 洗脱液冲洗, 并收集样品。最后将样品置于 4 °C 冰箱中保存, 通过 SDS-PAGE 确定蛋白纯度、Nanodrop 测定蛋白质浓度。

### 1.8 分子对接

在数据库中下载 3 种 CBM 和 PET 及其降解产物的结构类似物 2-羟乙基对苯二甲酸酯 (2-hydroxyethyl terephthalate, EMT) 的结构数据, 对 3 种 CBM 的结构进行优化, 包括氢键网络、质子化态和能量最小化(图 1), 并使用 Avogadro 软件构建和优化 EMT 结构。之后使用 AutoDock Vina<sup>[28]</sup> 进行对接, 挑选其中分数较高的 10 种构象。计算各构象的结合能的最小值, 使用该值评价 CBM 和 EMT 分子的亲和性与结合情况以预测 CBM 对 PET 链的亲合力, 并以该构象作为参考计算构象的均方根偏差 (root mean square deviation, RMSD)。

### 1.9 PET 降解反应

在一个 100 mL 的玻璃瓶中, 加入 49 mL 100 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 8.0) 和 1 mL 浓度为 0.69  $\mu\text{mol/L}$ 、pH 8.0、含有 300 mmol/L NaCl 和 20 mmol/L Tris-HCl 的纯化酶溶液, 然后添加 100 mg 的 PET 底物。在 60 °C 下以 170 r/min 的速度搅拌来进行解聚反应。反应 48 h 后采集样品, 每个酶进行 3 组平行试验<sup>[29]</sup>。

### 1.10 高效液相色谱测定产物

将 150  $\mu\text{L}$  的反应液与 150  $\mu\text{L}$  的甲醇和 6  $\mu\text{L}$  的 HCl (6 mol/L) 混合。使用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后, 将混合液直接加入高效液相色谱专用玻璃样品容器中。配制标准品, 将不同浓度的 TPA、MHET 和 BHET 加入到 100 mmol/L 磷酸钾缓冲溶液中, 并加入 150  $\mu\text{L}$  的甲醇和 6  $\mu\text{L}$  的 HCl (6 mol/L) 混合。在测定条件下, 使用 20  $\mu\text{L}$  进样预柱 (Supelco, Bellefonte) 的 Discovery HS C18 HPLC 柱 (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 在 1 mmol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  中以 1 mL/min 的甲醇梯度 (30%–90%) 进行分离, 在波长 240 nm 下检测通过 HPLC 柱分离降解产物 TPA、MHET 和 BHET<sup>[29]</sup>。

### 1.11 差示扫描荧光法 (differential scanning fluorescence, DSF) 测定溶解温度 ( $T_m$ )

制备 0.4 mg/mL 的蛋白质样品, 并储存在由 20 mmol/L Tris HCl (pH 8.0)、300 mmol/L NaCl 组成的缓冲液 A 中。首先将 DMSO 中的 SYPRO orange 5 000 $\times$  储备溶液稀释至 250 $\times$ 。将蛋白质样品加载到白色透明的 96 孔 PCR 板上, 每个孔的最终体积为 25  $\mu\text{L}$ 。每个孔中蛋白质和 SYPRO orange 的最终浓度分别为 0.14 mg/mL 和 10 倍。每孔的上样体积如下: 15  $\mu\text{L}$  缓冲液 A、9  $\mu\text{L}$  0.4 mg/mL 蛋白质溶液和 1  $\mu\text{L}$  250 $\times$  SYPRO orange 稀释溶液。然后用光学质量密封胶密封 PCR 板, 并在室温下以 2 000 r/min 旋转至少 5 min, 然后使用设置为使用 450/490 激发和

560/580 发射滤光片的 CFX96 实时 PCR 系统进行 DSF 实验。将样品以 0.3 °C/s 的速度从 25 °C 加热到 100 °C, 每 0.03 s 进行 1 次荧光测量。 $T_m$  使用 Bio-Rad CFX Manager 软件根据熔解曲线的一阶导数的峰确定<sup>[30]</sup>。

### 1.12 扫描电子显微镜(scanning electron microscopy, SEM)

保留反应 3 d 后的底物, 使用清洁剂去除表面的残留物, 用烘箱干燥样品。放入样品后, 使用显微镜目镜或低放大率模式, 在样品表面上找到目标区域后逐步增加放大倍率, 同时调整聚焦, 以获得清晰的图像。图像清晰后扫描、保存图片。

## 2 结果与分析

### 2.1 质粒酶切验证

按 1.5 中所述方法提取质粒 DNA 后使用限制酶 *Nde* I、*Xho* I 进行酶切验证, 结果如图 2 所示, 预期的 DNA 片段大小见表 1。经过酶切后, 样品中存在多个 DNA 片段的条带, 其中

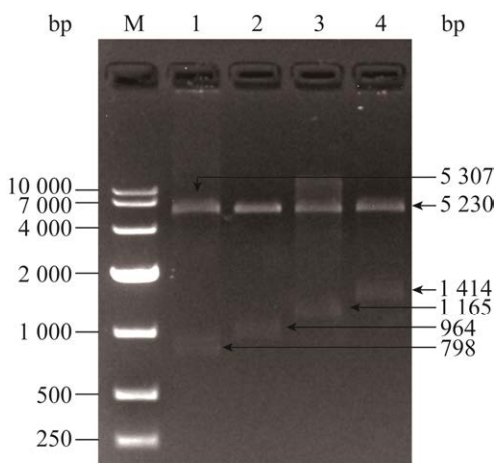


图 2 四种重组质粒双酶切电泳图

Figure 2 Electropherogram of double enzyme digestion of four recombinant plasmids. M: DNA marker; 1: pET26-SLJJ0; 2: pET26-SLJJ1; 3: pET26-SLJJ2; 4: pET26-SLJJ3.

pET26-SLJJ0 出现了与 5 307 bp 和 798 bp 相近的两条 DNA 片段, pET26-SLJJ1 出现了与 5 230 bp 和 964 bp 相近的两条 DNA 片段, pET26-SLJJ2 出现了与 5 230 bp 和 1 165 bp 相近的两条 DNA 片段, pET26-SLJJ3 出现了与 5 230 bp 和 1 414 bp 相近的两条 DNA 片段, 质粒 DNA 电泳检测结果与理论值大小接近, 说明重组质粒已经转化到大肠杆菌中。

### 2.2 SDS-PAGE 验证

降解酶发酵表达后收集菌体, 并使用超声破壁机破碎菌体, 离心后保留上清液, 即为粗酶液。用镍柱纯化制备纯酶, SDS-PAGE 结果如图 3 所示。预期的融合蛋白条带大小见表 2, LCC-ICCG、LCC-ICCG-*T*-CBM1、LCC-ICCG-*C*-CBM4-1

表 1 质粒酶切位点及产物片段大小

Plasmid name	Plasmid size (bp)	Restriction endonuclease	Product size (bp)
pET26-SLJJ0	6 105	<i>Nde</i> I/ <i>Xho</i> I	5 307/798
pET26-SLJJ1	6 194	<i>Nde</i> I/ <i>Xho</i> I	5 230/964
pET26-SLJJ2	6 395	<i>Nde</i> I/ <i>Xho</i> I	5 230/1 165
pET26-SLJJ3	6 644	<i>Nde</i> I/ <i>Xho</i> I	5 230/1 414

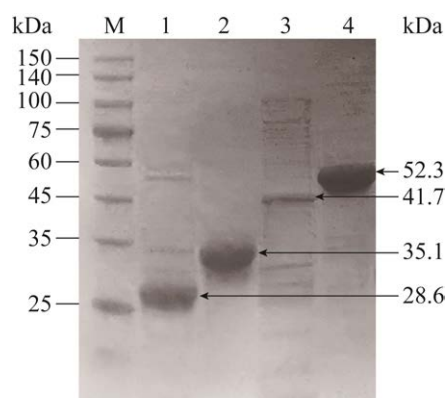


图 3 原始酶与 3 种融合酶的 SDS-PAGE 分析

Figure 3 SDS-PAGE analysis of the original enzyme versus three fusion enzymes. M: Protein marker; 1: LCC-ICCG; 2: LCC-ICCG-*T*-CBM1; 3: LCC-ICCG-*C*-CBM4-1; 4: LCC-ICCG-CBM9-2.

表 2 四种蛋白的大小

Table 2 The size of four proteins

Protein name	Size (kDa)
LCC-ICCG	28.6
LCC-ICCG- <i>Tr</i> CBM1	35.1
LCC-ICCG- <i>Cf</i> CBM4-1	41.7
LCC-ICCG-CBM9-2	52.3

和 LCC-ICCG-CBM9-2 的酶液在 SDS-PAGE 凝胶电泳中分别呈现与 28.6、35.1、41.7、52.3 kDa 接近的蛋白质条带, 说明成功表达并纯化了 LCC-ICCG、LCC-ICCG-*Tr*CBM1、LCC-ICCG-*Cf*CBM4-1 和 LCC-ICCG-CBM9-2 这 4 种酶。

### 2.3 PET 降解反应

#### 2.3.1 三种 CBM 对底物亲和力的预测

对接完成后, 对挑选出的构象的结合能进行计算, 结果显示 *Tr*CBM1 与 EMT 对接的结合能为 $-34.7544$  kcal/mol, *Cf*CBM4-1 与 EMT 对接的结合能为 $-13.3745$  kcal/mol, CBM9-2 与 EMT 对接的结合能为 $-45.5163$  kcal/mol (表 3)。CBM9-2 与 EMT 的结合能最低, 表明 CBM9-2 与 EMT 之间的亲和力更强且更稳定。相比之下, *Tr*CBM1 与 EMT 之间的结合能为 $-34.7544$  kcal/mol, *Cf*CBM4-1 与 EMT 之间的结合能为 $-13.3745$  kcal/mol, 这两种 CBM 与 EMT 的亲和力相对较弱, 该数据一定程度上也反映了对 PET 亲和力的区别, 同时在以 RMSD 中位数为中线, 从下四分数到上四分位数绘制(25%–75%)的箱线图中, 上下四分位数范围与中位数 CBM9-2 最小, *Tr*CBM1 次之, *Cf*CBM4-1 最大(图 4)。上下四分位数范围可以表明数据点的集中程度与 RMSD 变化的大小, 说明 *Tr*CBM1 和 CBM9-2 与 EMT 结合构象的结构稳定性和结构一致性较高, 该系统更为稳定。以上结果表明 *Tr*CBM1 和 CBM9-2 相较于 *Cf*CBM4-1 对底物的亲和力相对较高。为了验证预测结果, 使用 HPLC 检测了 4 种

表 3 三种 CBM 对 EMT 的结合能

Table 3 The binding energy of the three CBMs to EMT

CBM name	Binding energy (kcal/mol)
<i>Tr</i> CBM1	$-34.7544$
<i>Cf</i> CBM4-1	$-13.3745$
CBM9-2	$-45.5163$

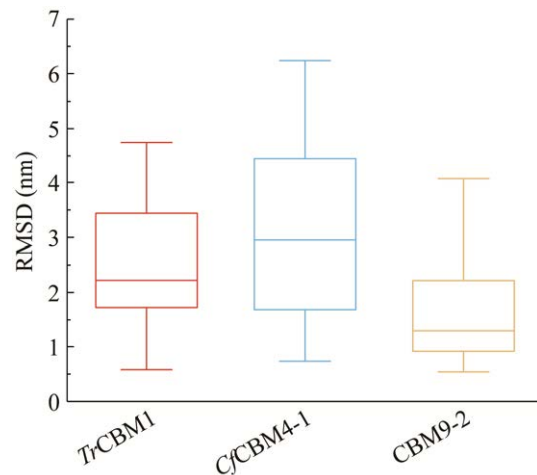


图 4 三种 CBM 对接后的 RMSD

Figure 4 RMSD after docking of three CBMs. Box-and-whisker plots with center line represent the median, boxes drawn from the lower to the upper quartile, and whiskers drawn between the lowest and highest RMSD values within 1.5 interquartile range of the lower and upper quartile.

酶对底物的降解率并用 SEM 观察底物侵蚀程度。

#### 2.3.2 四种 PET 水解酶降解能力的分析

根据 HPLC 实验结果, 可以计算出 4 种酶对 PET 的降解率。

$$\text{PET 降解率}(\%) = [(a/A + b/B + c/C) \times m/M] \times 100$$

其中  $a$  为 TPA 产量(mg),  $A$  为 TPA 的相对分子量(166);  $b$  为 MHET 的产量(mg),  $B$  为 MHET 的相对分子量(210);  $c$  为 BHET 的产量(mg),  $C$  为 BHET 的相对分子量(254);  $m$  为 PET 的相对分子量(192),  $M$  为 PET 底物的原始质量(mg)。



结果表明,在底物为粉末状 PET 的情况下,LCC-ICCG 对 PET 的降解率高于 3 种融合酶,是 LCC-ICCG-*TrCBM1* 的 1.95 倍,是 LCC-ICCG-*CfCBM4-1* 的 4.87 倍,是 LCC-ICCG-*CBM9-2* 的 1.52 倍(表 4)。在底物为膜状 PET 的情况下,LCC-ICCG 对 PET 的降解率低于 A、C 两型融合酶但高于 B 型融合酶,LCC-ICCG-*TrCBM1* 和 LCC-ICCG-*CBM9-2* 分别是 LCC-ICCG 的 3.18 倍和 10.74 倍,LCC-ICCG 是 LCC-ICCG-*CfCBM4-1* 的 1.79 倍。对于原始酶,结果符合先前研究得出的粉末状 PET 更易降解的结论<sup>[31]</sup>,由于 B 型融合酶在两种底物上的降解率都低于原始酶,这与本研究获取高降解性能 PET 水解酶的目的不相符。同时,A 型和 C 型融合酶相比原始酶表现出对膜状底物的高降解率和对粉末状底物的低降解率。该结果也符合 2.3.1 中 3 种 CBM 对底物亲和力的计算与预测。因此,本研

究将继续探究使用 A 型和 C 型融合酶时 PET 降解反应的过程,并研究造成 B 型降解酶降解能力较低的原因。

### 2.3.3 SEM 检测分析

观察 SEM 中保存的图片(图 5)可知,空白对照组表面光滑;被 LCC-ICCG 处理 3 d 的 PET 底物,表面不再平整,开始变得粗糙,并出现孔洞、裂缝及轻微侵蚀现象;被 LCC-ICCG-*TrCBM1* 处理 3 d 的底物,表面粗糙程度加深,表面凹凸

表 4 反应 48 h 时的 PET 降解率

Protein name	Degradation rate to membranous substrate (%)	Degradation rate to powdered substrates (%)
LCC-ICCG	2.09	8.53
LCC-ICCG- <i>TrCBM1</i>	6.65	4.37
LCC-ICCG- <i>CfCBM4-1</i>	1.17	1.75
LCC-ICCG- <i>CBM9-2</i>	22.44	5.62

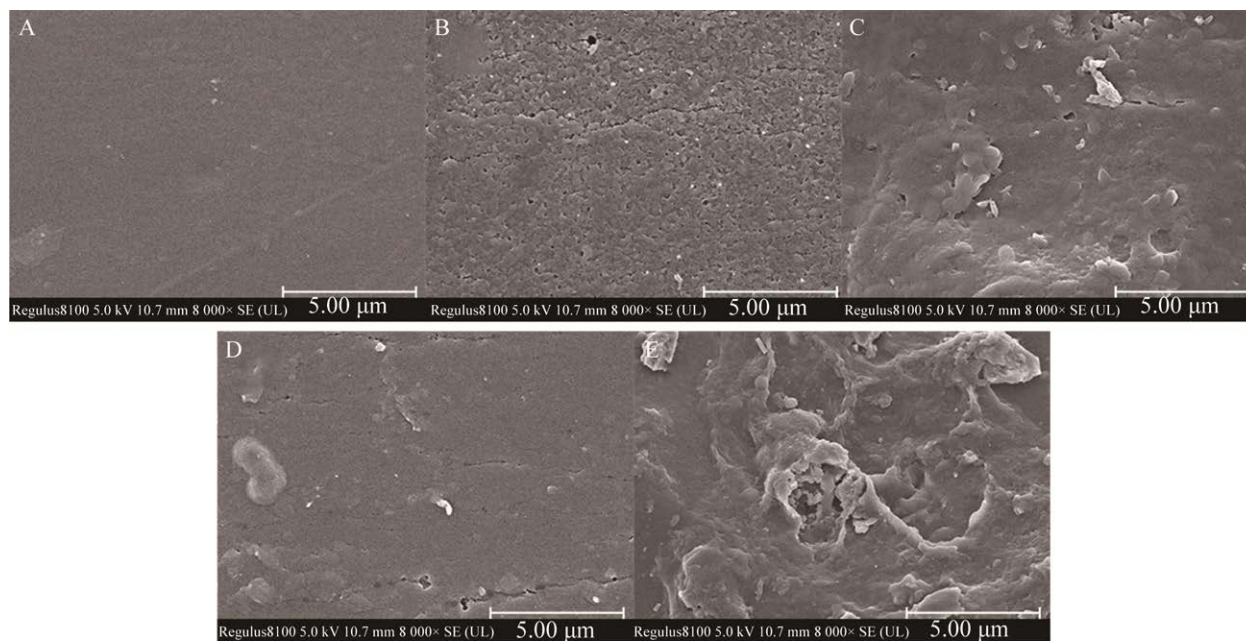


图 5 PET 薄膜扫描电镜图 A: 未处理. B: LCC-ICCG 处理. C: LCC-ICCG-*TrCBM1* 处理. D: LCC-ICCG-*CfCBM4-1* 处理. E: LCC-ICCG-*CBM9-2* 处理(8 000×)

Figure 5 SEM image of PET film. A: Untreated. B: LCC-ICCG treated. C: LCC-ICCG-*TrCBM1* treated. D: LCC-ICCG-*CfCBM4-1* treated. E: LCC-ICCG-*CBM9-2* treated (8 000×).

不平, 侵蚀程度加重; 被 LCC-ICCG-*Cf*CBM4-1 处理 3 d 的底物, 表面比较光滑, 出现少量坑洼, 侵蚀程度较低; 被 LCC-ICCG-CBM9-2 处理 3 d 的底物, 表面粗糙程度最大, 有明显凹陷, 出现较多孔洞, 侵蚀程度最大。SEM 结果说明了 4 种酶对膜状底物的吸附率, 进一步表明 LCC-ICCG-*Cf*CBM4-1 降低了原始酶底物的亲和力, LCC-ICCG-*Tr*CBM1 与 LCC-ICCG-CBM9-2 增加了原始酶底物的亲和力。其中 LCC-ICCG-CBM9-2 的亲和力最强, 增加了膜表面的酶浓度, 提高了降解率。

## 2.4 PET 降解过程的分析

将 A、C 型融合酶和原始酶继续按照之前的反应条件进行 48 h 的 PET 降解反应, 同时采用更小的时间间隔(前 8 h 每 1 h 取样 1 次, 后 40 h 每 10-14 h 取样 1 次)进行取样, 其他检测条件同上。

### 2.4.1 PET 降解过程中 3 种酶的降解速率分析

根据 HPLC 实验结果, 对反应过程的降解率变化的曲线的线性阶段进行拟合( $R^2 > 0.99$ ), 直线斜率即为 3 种酶对 PET 的平均反应速率。在底物为粉末状 PET 的情况下, LCC-ICCG 的平均反应速度低于两种融合酶, LCC-ICCG-*Tr*CBM1 和 LCC-ICCG-CBM9-2 分别是 LCC-ICCG 的 1.13 倍和 1.47 倍, 并且两种融合酶 PET 降解率增长趋势逐渐放缓(图 6)。在底物为膜状 PET 的情况下, LCC-ICCG 的平均反应速度也低于两种融合酶, LCC-ICCG-*Tr*CBM1 和 LCC-ICCG-CBM9-2 分别是 LCC-ICCG 的 1.68 倍和 7.01 倍。此外, LCC-ICCG-CBM9-2 降解率增长趋势逐渐加快(图 7)。

研究表明, 体积较大的酶与底物过于紧密的接触会产生较大的空间位阻, 导致后续的酶的活性位点无法结合底物从而影响降解速率<sup>[32]</sup>, 由于融合酶连接 CBM 后体积增加, 且 CBM 会

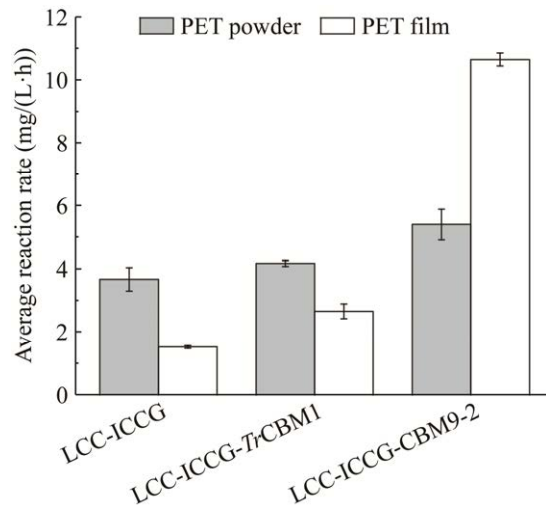


图 6 平均反应速率

Figure 6 Average reaction rate.

增加酶对底物的亲和力, 可能导致酶与粉末状底物的结合过于紧密, 影响了后续酶结合, 使得两种融合酶的平均速率高但降解率增长趋势逐渐放缓(表 2)。由两种 CBM 的结合方式可知, *Cf*CBM4-1 的平板平面会直接贴合在粉末状 PET 表面<sup>[24]</sup>(图 1), 而 CBM9-2 的 sandwich 结构会结合粉末状 PET 表面暴露的还原性残基, 由于接触面积的区别<sup>[26]</sup>(图 1), LCC-ICCG-*Tr*CBM1 会产生比 LCC-ICCG-CBM9-2 更大的空间位阻, 故 LCC-ICCG-*Tr*CBM1 对粉末状 PET 的降解速率更低, 符合研究结论。

对于膜状底物, 由于膜面光滑、比表面积较小, 且内部 PET 排布更为致密, 使得可与原始酶活性位点接触的面积较小, 原始酶对其降解率远低于粉末状底物。但是通过引入 CBM 改造的两种融合酶(尤其是 LCC-ICCG-CBM9-2)增加了酶和底物的结合能力, 导致融合酶对膜状底物的降解能力远大于原始酶 LCC-ICCG。Ribitsch 等<sup>[33]</sup>的研究表明, 疏水蛋白 HFB4 和 HFB7 与角质酶融合导致膜状 PET 水解速率增加了 16 倍, 角质酶与 PET 亲和力会影响水解速

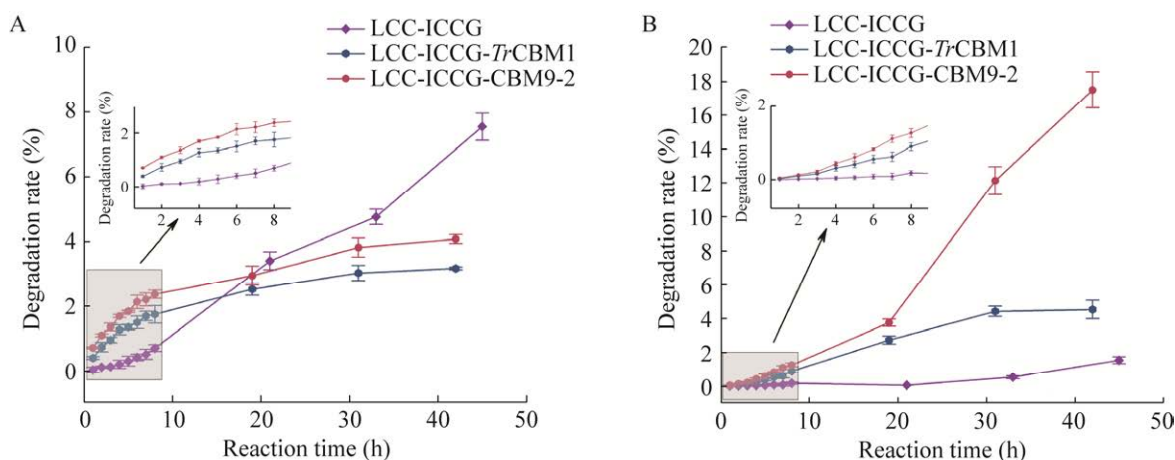


图 7 反应过程中 PET 降解率的变化 A: 底物使用粉末状底物. B: 底物使用膜状底物

Figure 7 Changes in PET degradation rate during reaction. A: 300  $\mu\text{m}$  diameter PET powder. B: Goodfellow PET film with a thickness of 0.25 mm.

率,与疏水蛋白的融合将导致每个 PET 表面单位的角质酶分子数量增加,因此增加了水解速率。故对于 LCC-ICCG-CBM9-2 而言,反应前期为 CBM 与暴露 PET 链还原性末端的吸附阶段,随着吸附的融合酶的增多,降解率增长趋势加快。相关研究表明较高的结晶度也会影响水解速率<sup>[34]</sup>,本研究中的粉末状底物的结晶度远高于膜状底物(无定形 PET 膜结晶度小于 8%,PET 粉末结晶度大于 50%),融合酶与粉末状底物结合后产生的空间位阻也会影响反应速率<sup>[32]</sup>,而分子对接和 SEM 结果显示 LCC-ICCG-CBM9-2 对 PET 的亲合力极强,酶表面的吸附率最高,因此其对膜状底物的平均反应速率超过了粉末状底物。

#### 2.4.2 PET 降解产物分析

HPLC 结果如图 8 所示,通过 HPLC 检测 BHET、MHET、TPA 标准品色谱图(图 8A),发现 3 种酶处理粉末状底物和膜状底物 48 h 后,反应液中能够检测到 MHET、TPA 相对应的吸收峰(图 8B)。但两种融合酶在使用膜状底物的情况下,在反应 48 h 后的反应液中出现了较低的 BHET 的吸收峰,而对于原始酶和使用粉末

状底物的情况下反应液中并未发现 BHET 的吸收峰。这符合 Sulaiman 等<sup>[13]</sup>的研究结果:使用 LCC-ICCG 对 PET 进行降解产物分析时,可以将 TPA 和 MHET 分别作为主峰和次峰从柱中洗脱出来,未检测到 BHET 的峰,这表明该酶具有将 PET 完全降解为 TPA 和乙二醇的能力。在 BHET 降解过程中会产生 MHET,Barth 等<sup>[35]</sup>也观察到角质酶 ICCG 的活性受到 PET 降解的中间产物 MHET 的抑制。融合酶会断裂大分子的 PET,断裂后产生大量的 BHET 多聚体,随着融合酶的持续吸附,BHET 又可以进一步分解为大量的 MHET,随着 BHET 逐渐减少和 MHET 的增加,竞争性抑制逐渐明显,从而导致少量 BHET 残留。而 MHET 降解也不断进行,导致后续 TPA 浓度持续增加。

#### 2.4.3 三种酶在 PET 降解反应中的酶活分析

取降解率变化曲线中的线性阶段的数据用于计算 3 种酶的酶活与比酶活。酶活定义:1 U=每 min 释放 1  $\mu\text{mol}$  TPA 所需的酶量。比酶活定义:1 U/mg=每 mg 酶蛋白的酶活。

结果表明,LCC-ICCG 和 LCC-ICCG-T7CBM1 对粉末状 PET 的活性较高,LCC-ICCG-CBM9-2

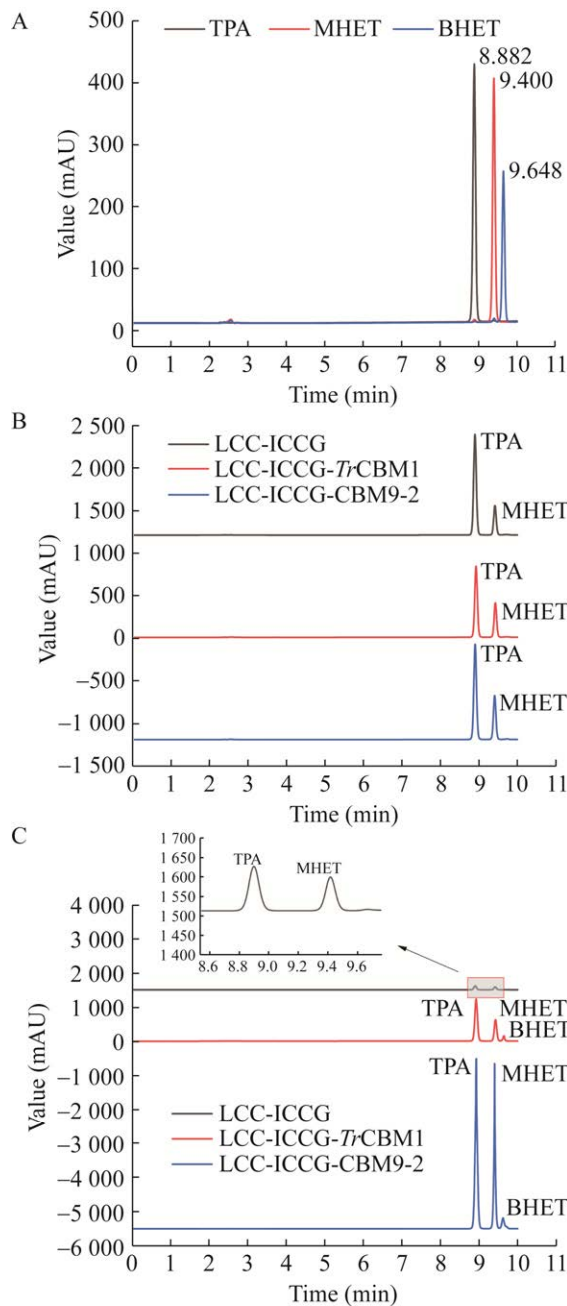


图 8 HPLC 分析 A: 标准样品. B: 底物使用粉末状底物. C: 底物使用膜状底物

Figure 8 HPLC analysis. A: Calibration standards. B: The substrate is 300  $\mu\text{m}$  diameter PET powder. C: Goodfellow PET film with a substrate thickness of 0.25 mm. 50 mg of filmed or powdered PET, and the same amount of LCC-ICCG, LCC-ICCG-TrCBM1, or LCC-ICCG-CBM9-2 were added to 100 mmol/L phosphate buffer (pH 8.0), then treated at 60  $^{\circ}\text{C}$  for 48 h.

对两种底物的活性基本相同且均高于 LCC-ICCG 和 LCC-ICCG-TrCBM1 (表 5, 图 9)。

## 2.5 热稳定性及降解能力分析

通过 DSF 测得原始酶 LCC-ICCG 的  $T_m$  值为 83.2  $^{\circ}\text{C}$ , LCC-ICCG-TrCBM1 较原始酶  $T_m$  值提高 8.1  $^{\circ}\text{C}$ , LCC-ICCG-CBM9-2 较原始酶  $T_m$  值降低 18.5  $^{\circ}\text{C}$ , LCC-ICCG-CBM9-2 较原始酶  $T_m$  值提高 11.3  $^{\circ}\text{C}$ , 表 4 提供了反应 48 h 降解率的相关数据, 汇总两组数据分析 4 种酶的性能, 结果如表 6 和图 10 所示。结合 SEM 结果, 添加不同种类 CBM 会导致原始酶出现性能差异。对 TrCBM1 和 CBM9-2 与 EMT 的结合模式分析可知(图 11), 在 TrCBM1 的结合过程中 Thr17、Thr24 与配体形成了 2 对碳氢键, Ser21、Cys25 与配体形成了 2 对传统氢键, Val18、Cys19 与配体形成了  $\pi$ -烷基相互作用, 在 CBM9-2 的结合过程中 Phe107 与配体形成了 1 对碳氢键, Arg98、Arg161、Asn172 与配体形成了 4 对传统氢键, Trp71、Trp175 与配体形成了  $\pi$ - $\pi$  堆积。这样的结合模式一定程度上反映了两种 CBM 对底物的亲和力。与 TrCBM1 相比, CBM9-2 形成的传统氢键的数目更多且距离更近, 其 sandwich 平面也形成了结合能力比  $\pi$ -烷基相互作用强度更高的  $\pi$ - $\pi$  堆积, TrCBM 则是结合能力的强度最低的碳氢键较多, 表明 CBM9-2 与底物的结合更稳定,

表 5 三种酶的酶活与比酶活

Table 5 Enzymatic activity and specific enzymatic activity of three enzymes

Protein name	Membranous substrate enzyme activity (U)/ Specific enzyme activity (U/mg)	Powdered substrate enzyme activity (U)/ Specific enzyme activity (U/mg)
LCC-ICCG	2 116/73 228	10 446/361 475
LCC-ICCG-TrCBM1	8 648/246 400	17 950/511 413
LCC-ICCG-CBM9-2	28 339/541 866	28 618/547 193

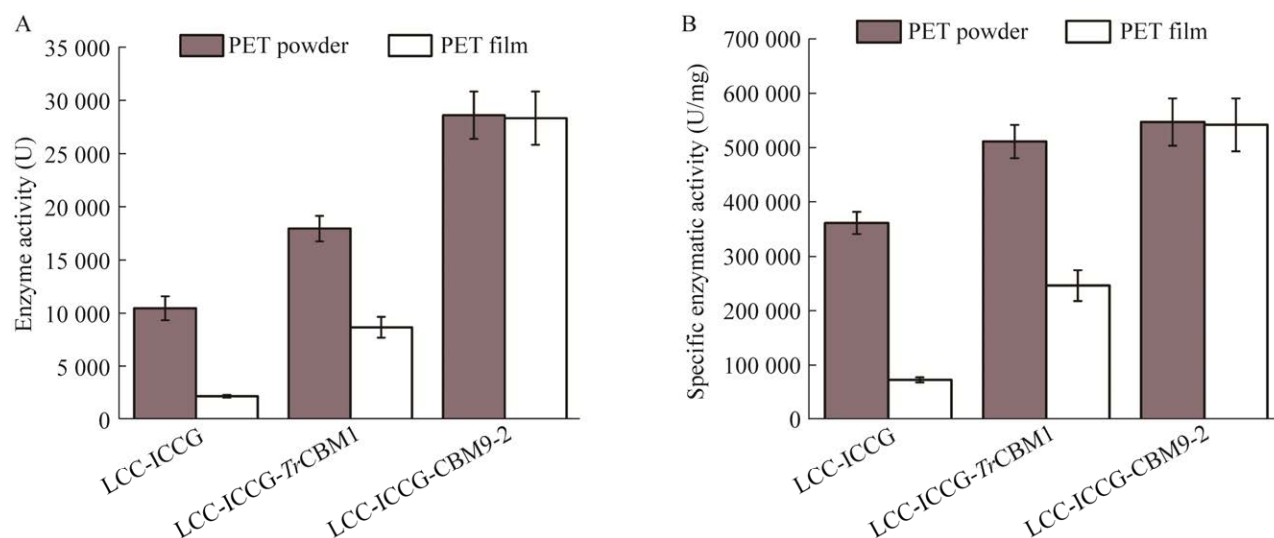


图 9 三种酶的酶活与比酶活 A: 酶活. B: 比酶活

Figure 9 Enzymatic activity and specific enzymatic activity of three enzymes. A: Enzymatic activity. B: Specific enzymatic activity.

表 6 三种融合酶与原始酶的性能对比

Table 6 Performance comparison of three fusion enzymes with the native enzyme

Protein name	Degradation rate (membrane substrate/powdered substrate) (fold)	$T_m$ (°C)	Reaction conditions
LCC-ICCG	1.00/1.00	83.2	60 °C, 48 h
LCC-ICCG-TrCBM1	3.18/0.51	91.3	60 °C, 48 h
LCC-ICCG-CfCBM4-1	0.56/0.21	64.7	60 °C, 48 h
LCC-ICCG-CBM9-2	10.74/0.65	94.5	60 °C, 48 h

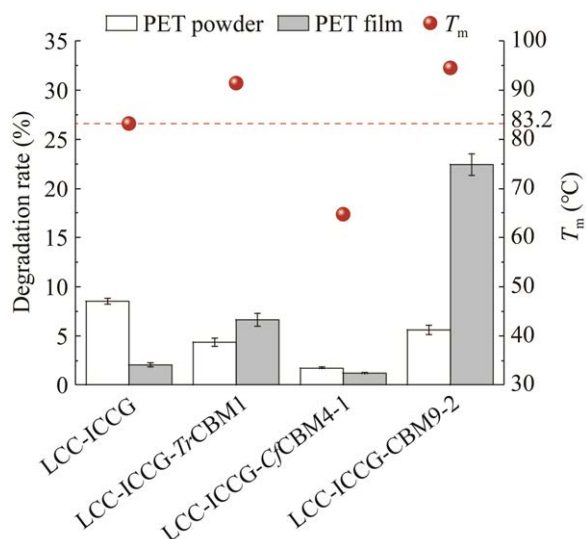


图 10 四种酶的性能

Figure 10 Properties of the four enzymes.

亲和力更强, 这与本实验结果相符。因此对于 LCC-ICCG-TrCBM1, 其 TrCBM 的催化三聚体 (Thr17、Val18、Thr24) 可以与底物结合, 同时研究也表明该类型 CBM 的平面表面也与晶体和不溶物结合<sup>[27]</sup> (图 1B), 对于 LCC-ICCG-CBM9-2, CBM9-2 第 2 个扭曲的  $\beta$ -折叠的底部平行排列着 2 个色氨酸残基 Trp175 和 Trp71, 可以结合高聚物的还原性末端形成 sandwich 结合平台(图 1D)<sup>[26]</sup>, 这些结构的存在增加了融合酶对底物的亲和力, 底物亲和力的增加与热稳定性的提高, 共同提升了其对膜状底物的降解率。而在添加 CfCBM4-1 时, CfCBM4-1 裂缝中的芳香族残基(Tyr19、Tyr31、Tyr32)的疏水

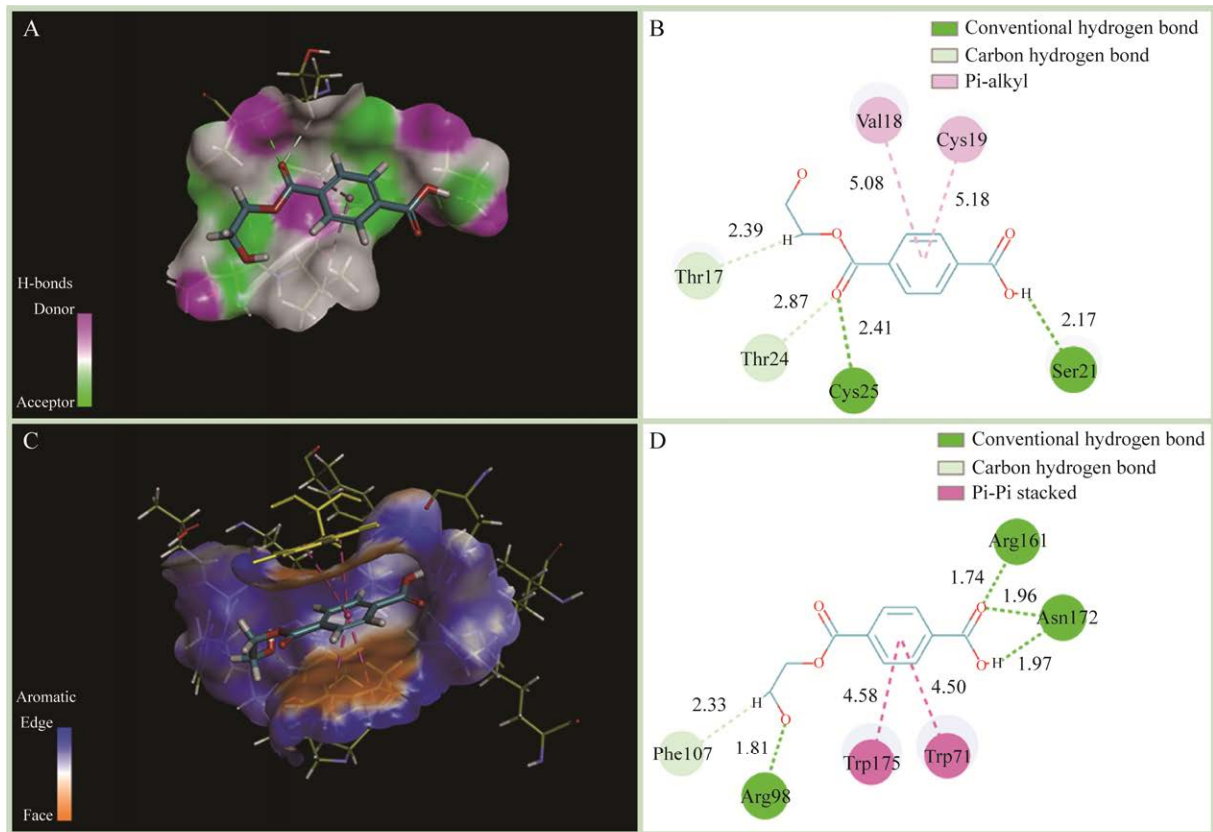


图 11 *TrCBM1* 和 *CBM9-2* 与 *EMT* 的结合模式

Figure 11 Combination mode of *TrCBM1* and *CBM9-2* with *EMT*. A: Hydrogen bond analysis of *TrCBM1*. B: 2D plot of *TrCBM1* interaction analysis with *EMT*. C: Aromatic analysis of *CBM9-2*. D: 2D plot of *CBM9-2* interaction analysis with *EMT*.

表面彼此面对，可以将高聚物的夹在其中，形成 sandwich 结合平台<sup>[36]</sup> (图 1C)，但 DSF 的结果显示其  $T_m$  值下降较大，这会导致融合酶的热稳定性下降，进而影响降解能力。

### 3 讨论与结论

虽然 PET 材料的  $T_g$  约为  $76\text{ }^\circ\text{C}$ ，但 PET 长时间浸入水中时， $T_g$  会降低<sup>[37]</sup>。一般来说，会降低到  $60\text{--}65\text{ }^\circ\text{C}$ <sup>[38-39]</sup>。在  $40\text{ }^\circ\text{C}$  的非水溶液中， $T_g$  甚至更低<sup>[40]</sup>。有研究认为这种现象是因为 PET 材料表层的  $T_g$  可能低于本体  $T_g$ <sup>[40-41]</sup>。另外，PET 的表面结晶起始温度为  $70\text{ }^\circ\text{C}$ ，块状晶体在  $85\text{ }^\circ\text{C}$  时形成<sup>[40]</sup>。Graham 等<sup>[22]</sup>发现在较低的 PET

负载量(质量分数)且温度低于热诱导结晶温度的条件下，随着温度升高，融合酶的 PET 水解活性也增加，但当温度高于热诱导结晶温度时，水解活性下降。同时，在较低的负载下，检测到所有融合酶的降解能力相对于原始酶均有所提高，但当负载过高时，原始酶对 PET 的降解率也会上升，导致融合酶的提升效应不明显，本实验力求获取高活性、高降解性能 PET 水解酶，实验条件代表了酶水解方案的权衡。由于原始酶是热稳定的，较高的操作温度可以提供更高的酶反应速率，但同时可能会由于温度上升逐渐增加结晶度而降低水解产量，导致酶水解效率降低。同时本实验结果中 *CfCBM4-1* 的

亲和力较弱,为了反映引入 CBM 后与原始酶的区别,不宜采用较高负载。综合考虑反应速率与检测要求,确定本研究实验条件。

本研究通过引入 CBM 的方式对 LCC-ICCG 进行改造,结果显示原始酶 LCC-ICCG 在降解膜状 PET 方面能力不足,但改造后的 LCC-ICCG 能够有效降解膜状和粉末状 PET,连接 B 型 CBM 降低了酶的热稳定性和对两种 PET 底物的降解率。Kognole 等<sup>[36]</sup>的分子动力学模拟结果表明 C<sub>f</sub>CBM4-1 与底物结合的 RMSD 和 SASA 值较大,说明与底物结合时构象变化大,构象变化可能影响了 LCC-ICCG 与 PET 的结合。而引入 A、C 两型 CBM 后,酶对膜状 PET 的降解率显著增加,LCC-ICCG-CBM9-2 的降解率达到了原始酶的 10.74 倍,同时引入 A、C 两型 CBM 后,也提高了酶的  $T_m$  值,增加酶的稳定性,Notenboom 等<sup>[26]</sup>的研究表明 CBM9-2 串联重复序列经常出现在嗜热和超嗜热生物的基因组中,并且该 CBM 的钙结合位点稳定了多肽的三维结构,从而有助于增加蛋白质的热稳定性。该结构的存在可能是 LCC-ICCG-CBM9-2 较原始酶  $T_m$  提升较大的原因。此外,改造后的两种酶对 PET 的平均转化速率更高,且 LCC-ICCG-CBM9-2 的酶活性更高。

本研究中 LCC-ICCG-CBM9-2 具有较好的 PET 降解效率。为了进一步提高该酶的降解能力,可以采取优化和改良该酶的措施,如适当调整 CBM9-2 和酶的结合方式,减小空间位阻,或者更改 CBM9-2 中的金属离子,以提高该酶稳定性和对底物的适应性。同时由于不同 PET 负载对实验结果的影响较大<sup>[22]</sup>,也可以使用不同 PET 负载来检测该酶降解能力的变化以寻求 PET 降解的最佳条件。另外,也可以采用双酶反应体系来减少 MHET 的竞争性抑制。总之,本研究可以为 PET 降解酶的改造和应用提供参

考并探索该酶在环保等领域的应用,为解决全球塑料污染问题以及更高效、更可持续的 PET 废弃物处理技术提供依据。

## REFERENCES

- [1] LEBRETON L, ANDRADY A. Future scenarios of global plastic waste generation and disposal[J]. Palgrave Communications, 2019, 5: 6.
- [2] OH S, STACHE EE. Chemical upcycling of commercial polystyrene *via* catalyst-controlled photooxidation[J]. Journal of the American Chemical Society, 2022, 144(13): 5745-5749.
- [3] 孙发长. 简述填埋法降解塑料的方法[J]. 文理导航, 2012(5): 8.
- [4] WILCOX C, van SEBILLE E, HARDESTY BD. Threat of plastic pollution to seabirds is global, pervasive, and increasing[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(38): 11899-11904.
- [5] AHMED T, SIPRA H. Handbook of Research on Environmental and Human Health Impacts of Plastic Pollution[M]. Pennsylvania: IGI Global, 2020.
- [6] 王琪, 瞿金平, 石碧, 陈宁, 聂敏, 杨双桥. 我国废弃塑料污染防治战略研究[J]. 中国工程科学, 2021, 23(1): 160-166.  
WANG Q, QU JP, SHI B, CHEN N, NIE M, YANG SQ. Prevention and control of waste plastics pollution in China[J]. Strategic Study of Chinese Academy of Engineering, 2021, 23(1): 160-166 (in Chinese).
- [7] 许楹, 殷超凡, 岳纹龙, 周宁一. 石油基塑料的微生物降解[J]. 生物工程学报, 2019, 35(11): 2092-2103.  
XU Y, YIN CF, YUE WL, ZHOU NY. Microbial degradation of petroleum-based plastics[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2019, 35(11): 2092-2103 (in Chinese).
- [8] 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.
- [9] 周杰, 苏海佳, 吴琼, 邢建民, 董维亮, 姜岷. 中欧组织间合作研究项目 MIX-UP 助力实现“碳中和”[J]. 生物工程学报, 2021, 37(10): 3414-3424.  
ZHOU J, SU HJ, WU Q, XING JM, DONG WL, JIANG M. MIXed plastics biodegradation and UPcycling using microbial communities: the NSFC-EU

- 2019 project MIX-UP to help achieve “carbon neutrality”[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021, 37(10): 3414-3424 (in Chinese).
- [10] SILVA C, DA S, SILVA N, MATAMÁ T, ARAÚJO R, MARTINS M, CHEN S, CHEN J, WU J, CASAL M, CAVACO-PAULO A. Engineered *Thermobifida fusca* cutinase with increased activity on polyester substrates[J]. Biotechnology Journal, 2011, 6(10): 1230-1239.
- [11] 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.
- [12] THEN J, WEI R, OESER T, BARTH M, BELISÁRIO-FERRARI MR, SCHMIDT J, ZIMMERMANN W. Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> binding site engineering increases the degradation of polyethylene terephthalate films by polyester hydrolases from *Thermobifida fusca*[J]. Biotechnology Journal, 2015, 10(4): 592-598.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 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(7802): 216-219.
- [16] 周顺华. 碳水化合物结合结构域及其应用[J]. 现代食品, 2016, 3(5): 113-115.  
ZHOU SH. Carbohydrate binding module and its applications[J]. Grain Distribution Technology, 2016, 3(5): 113-115 (in Chinese).
- [17] BIUNDO A, RIBITSCH D, GUEBITZ GM. Surface engineering of polyester-degrading enzymes to improve efficiency and tune specificity[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(8): 3551-3559.
- [18] DAI LH D, QU YY, HUANG JW, HU YM, HU HB, LI SY, CHEN CC, GUO RT. Enhancing PET hydrolytic enzyme activity by fusion of the cellulose-binding domain of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*[J]. Journal of Biotechnology, 2021, 334: 47-50.
- [19] ESPINO-RAMMER L, RIBITSCH D, PRZYLUCKA A, MAROLD A, GREIMEL KJ, HERRERO ACERO E, GUEBITZ GM, KUBICEK CP, DRUZHININA IS. Two novel class II hydrophobins from *Trichoderma* spp. stimulate enzymatic hydrolysis of poly(ethylene terephthalate) when expressed as fusion proteins[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(14): 4230-4238.
- [20] ZHANG Y, WANG L, CHEN J, WU J. Enhanced activity toward PET by site-directed mutagenesis of *Thermobifida fusca* cutinase-CBM fusion protein[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 97(1): 124-129.
- [21] XUE R, CHEN YP, RONG H, WEI R, CUI ZL, ZHOU J, DONG WL, JIANG M. Fusion of chitin-binding domain from *Chitinolyticbacter meiyuanensis* SYBC-H1 to the leaf-branch compost cutinase for enhanced PET hydrolysis[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2021, 9: 762854.
- [22] GRAHAM R, ERICKSON E, BRIZENDINE RK, SALVACHÚA D, MICHENER WE, LI YH, TAN ZP, BECKHAM GT, McGEEHAN JE, PICKFORD AR. The role of binding modules in enzymatic poly(ethylene terephthalate) hydrolysis at high-solids loadings[J]. Chem Catalysis, 2022, 2(10): 2644-2657.
- [23] WEBER J, PETROVIĆ D, STRODEL B, SMITS SHJ, KOLKENBROCK S, LEGGEWIE C, JAEGER KE. Interaction of carbohydrate-binding modules with poly(ethylene terephthalate)[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(12): 4801-4812.
- [24] TOKUNAGA Y, NAGATA T, SUETOMI T, OSHIRO S, KONDO K, KATAHIRA M, WATANABE T. NMR analysis on molecular interaction of lignin with amino acid residues of carbohydrate-binding module from *Trichoderma reesei* Cel7A[J]. Scientific Reports, 2019, 9: 1977.
- [25] KOGNOLE AA, PAYNE CM. Cello-oligomer-binding dynamics and directionality in family 4 carbohydrate-binding modules[J]. Glycobiology, 2015, 25(10): 1100-1111.
- [26] NOTENBOOM V, BORASTON AB, KILBURN DG, ROSE DR. Crystal structures of the family 9 carbohydrate-binding module from *Thermotoga maritima* xylanase 10 A in native and ligand-bound



- forms[J]. *Biochemistry*, 2001, 40(21): 6248-6256.
- [27] 李恒, 唐双焱. 碳水化合物结合结构域研究进展[J]. *微生物学报*, 2017, 57(8): 1160-1167.
- LI H, TANG SY. Carbohydrate-binding modules: assisted polysaccharide recognition[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(8): 1160-1167 (in Chinese).
- [28] TROTT O, OLSON AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading[J]. *Journal of Computational Chemistry*, 2010, 31(2): 455-461.
- [29] CHEN ZZ, DUAN RD, XIAO YJ, WEI Y, ZHANG HX, SUN XZ, WANG S, CHENG YY, WANG X, TONG SW, YAO YX, ZHU C, YANG HT, WANG YY, WANG ZF. Biodegradation of highly crystallized poly(ethylene terephthalate) through cell surface codisplay of bacterial PETase and hydrophobin[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 7138.
- [30] STEINBERG TH, JONES LJ, HAUGLAND RP, SINGER VL. SYPRO orange and SYPRO red protein gel stains: one-step fluorescent staining of denaturing gels for detection of nanogram levels of protein[J]. *Analytical Biochemistry*, 1996, 239(2): 223-237.
- [31] CUIYL, 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, et al. Computational redesign of a PETase for plastic biodegradation under ambient condition by the GRAPE strategy[J]. *ACS Catalysis*, 2021, 11(3): 1340-1350.
- [32] SEWELL BT, BERMAN MN, MEYERS PR, JANDHYALA D, BENEDIK MJ. The cyanide degrading nitrilase from *Pseudomonas stutzeri* AK61 is a two-fold symmetric, 14-subunit spiral[J]. *Structure (London, England: 1993)*, 2003, 11(11): 1413-1422.
- [33] RIBITSCH D, ACERO EH, PRZYLUCKA A, ZITZENBACHER S, MAROLD A, GAMERITH C, TSCHELIEßNIG R, JUNGBAUER A, RENNHOFFER H, LICHTENEGGER H, AMENITSCH H, BONAZZA K, KUBICEK CP, DRUZHININA IS, GUEBITZ GM. Enhanced cutinase-catalyzed hydrolysis of polyethylene terephthalate by covalent fusion to hydrophobins[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(11): 3586-3592.
- [34] THOMSEN TB, SCHUBERT S, HUNT CJ, BORCH K, JENSEN K, BRASK J, WESTH P, MEYER AS. Rate response of poly(ethylene terephthalate)-hydrolases to substrate crystallinity: basis for understanding the lag phase[J]. *ChemSusChem*, 2023, 16(13): e202300291.
- [35] 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.
- [36] KOGNOLE AA, PAYNE CM. Cellulose-specific type B carbohydrate binding modules: understanding oligomeric and non-crystalline substrate recognition mechanisms[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11(1): 1-16.
- [37] LANGEVIN D, GRENET J, SAITER JM. Moisture sorption in pet influence on the thermokinetic parameters[J]. *European Polymer Journal*, 1994, 30(3): 339-345.
- [38] THOMSEN TB, HUNT CJ, MEYER AS. Influence of substrate crystallinity and glass transition temperature on enzymatic degradation of polyethylene terephthalate (PET)[J]. *New Biotechnology*, 2022, 69: 28-35.
- [39] ODA M, YAMAGAMI Y, INABA S, OIDA T, YAMAMOTO M, KITAJIMA S, KAWAI F. Enzymatic hydrolysis of PET: functional roles of three Ca<sup>2+</sup> ions bound to a cutinase-like enzyme, Cut190\*, and its engineering for improved activity[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(23): 10067-10077.
- [40] TARAZONA NA, WEI R, BROTT S, PFAFF L, BORNSCHEUER UT, LENDLEIN A, MACHATSCHEK R. Rapid depolymerization of poly(ethylene terephthalate) thin films by a dual-enzyme system and its impact on material properties[J]. *Chem Catalysis*, 2022, 2(12): 3573-3589.
- [41] SHINOTSUKA K, BLIZNYUK VN, ASSENDER HE. Near-surface crystallization of PET[J]. *Polymer*, 2012, 53(24): 5554-5559.

(本文责编 陈宏宇)