

聚对苯二甲酸乙二醇酯水解酶检测方法的研究进展

张晗笑, 肖云杰, 杨海涛, 王泽方*

天津大学生命科学学院, 天津 300072

张晗笑, 肖云杰, 杨海涛, 王泽方. 聚对苯二甲酸乙二醇酯水解酶检测方法的研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3219-3235.

ZHANG Hanxiao, XIAO Yunjie, YANG Haitao, WANG Zefang. Detection methods for polyethylene terephthalate degrading enzymes: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3219-3235.

摘 要: 聚对苯二甲酸乙二醇酯(polyethylene terephthalate, PET)是应用最广泛的合成聚酯之一。由于PET不易降解, 在环境中积累, 对陆地、水生生态系统以及人类健康构成严重威胁。基于生物酶催化的生物降解策略为PET回收利用提供了一种绿色途径, 在过去20年间, 已发现了多种PET水解酶, 并通过蛋白质工程等手段来改善这些酶的降解性能, 但是目前仍未找到适合大规模工业应用的PET水解酶。利用传统的检测方法筛选PET水解酶是一个缓慢而复杂的过程。为了促进PET酶法回收的工业化应用, 需要研发高效的检测方法。近年来, 研究人员开发了多种表征PET水解酶的分析方法。本文总结了可用于筛选PET水解酶的检测方法, 如高效液相色谱法、紫外吸光度法和荧光激活液滴分选法等, 并对其在筛选PET水解酶的应用方面进行了展望。

关键词: 检测方法; 聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)水解酶; 荧光检测法; 生物传感器

Detection methods for polyethylene terephthalate degrading enzymes: a review

ZHANG Hanxiao, XIAO Yunjie, YANG Haitao, WANG Zefang*

School of Life Sciences, Tianjin University, Tianjin 300072, China

Abstract: Polyethylene terephthalate (PET) is one of the most widely used synthetic polyester. It poses serious threat to terrestrial, aquatic ecosystems and human health since it is difficult to be broken down and deposited in the environment. The biodegradation based on enzymatic catalysis offers a sustainable method for recycling PET. A number of PET hydrolases have been discovered in the last 20 years, and protein engineering has increased their degradation

资助项目: 国家自然科学基金(31970048)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31970048).

*Corresponding author. E-mail: zefangwang@tju.edu.cn

Received: 2023-02-02; Accepted: 2023-05-06; Published online: 2023-05-09

capabilities. However, no PET hydrolases that are practical for widespread industrial use have been identified. Screening of PET hydrolase using conventional detection techniques is laborious and inefficient process. Effective detection techniques are required to promote the commercialization of PET hydrolases. Using efficient detection techniques to screen potent industrial enzymes is essential for supporting the widespread industrial implementation of PET hydrolases. To define PET hydrolase, scientists have created a number of analytical techniques recently. The detection techniques that can be used to screen PET hydrolase, including high performance liquid chromatography, ultraviolet absorption spectrometric, and fluorescence activated droplet sorting method, are summarized in this study along with their potential applications.

Keywords: detection methods; polyethylene terephthalate (PET) hydrolase; fluorescence detection; biosensor

Science 杂志在 2021 年提出了 125 个科学前沿问题^[1], 其中包括“我们如何更好地管理塑料废弃物?(How can we better manage the world's plastic waste?)”以及“我们可以创造一种环保的塑料替代品吗?(Can we create an environmentally friendly replacement for plastics?)”。塑料主要是以石油、煤、天然气等化石燃料为原材料, 通过聚合作用形成的高分子聚合物^[2-3]。在过去半个多世纪中, 塑料因其耐用、轻便、绝缘性好和生产成本低等特性, 成为人类工作和生活中必不可少的材料。但是, 这些特性也导致塑料不易降解, 大多数塑料在环境中能够持续存在很长时间^[4]。2021 年, 全球塑料产量近 3.9 亿 t, 其中聚对苯二甲酸乙二醇酯(polyethylene terephthalate, PET) 的产量约占 6.2%^[5]。PET 由乙二醇(ethylene glycol, EG)和对苯二甲酸(terephthalic acid, TPA) 缩聚而成, 是应用最广泛的聚酯塑料之一^[6]。PET 在自然界中很难分解, 未分解部分在环境中积累形成塑料废弃物, 对陆地、水生生态系统以及人类健康构成严重威胁。

为了应对 PET 造成的环境污染问题, 研究人员开始关注对环境友好的生物降解策略。研究表明, 多种水解酶能够切割 PET 单体之间的酯键^[7]。一些真菌和细菌产生的酶可以将 PET 水解

为单体对苯二甲酸双(2-羟乙基)酯[bis(2-hydroxyethyl) terephthalic acid, BHET]、对苯二甲酸单(2-羟乙基)酯[mono(2-hydroxyethyl) terephthalic acid, MHET]、TPA 和 EG^[6,8-11]。PET 酶法回收的研究已有 20 多年的历史^[12]。传统的 PET 生物降解检测方法包括: (1) 直接可视化观察。使用扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)或原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)等, 对 PET 塑料的可见变化进行评估, 包括表面粗糙程度变化, 形成空洞或裂缝等。通过该方法获得的参数可作为 PET 发生酶解的第一指标, 并可用于研究 PET 表面侵蚀的机理。(2) 测定 PET 的重量损失。PET 薄膜等样品重量损失的测定在降解测试中被广泛使用。(3) 机械性能和摩尔质量的变化。当 PET 发生降解时, 其物理特性会发生改变, 其中, PET 的拉伸强度等性能与 PET 摩尔质量密切相关, 通常被直接视为降解的指标。但是在生物降解过程中, 只有观察到明显的质量损失时, 材料的性能才能发生改变, 表面侵蚀并不影响材料内部性质。(4) 二氧化碳(carbon dioxide, CO₂)的排放以及氧气(oxygen, O₂)的消耗。在好氧条件下, 微生物利用 O₂ 氧化碳原子, 形成 CO₂, CO₂ 的形成以及 O₂ 的消耗都是 PET 发生水解的良好指标^[13]。以

上这些方法在早期鉴定 PET 水解酶或微生物的工作中发挥了重要作用,然而,随着研究的深入,这些方法无法对降解产物进行定量分析,不能深入揭示 PET 水解酶的分子机制,而表现出一定的局限性。此外,新型 PET 水解酶的筛选是一个漫长而复杂的过程^[14],使用传统的方法进行检测可能需要长达几个月的时间。因此,需要高效的筛选方法去探索自然界中丰富的微生物资源以及数量庞大的突变体文库。为了更准确地对 PET 水解产物进行定量分析,深入了解其分子机制,同时寻求更快速的检测方法,研究人员开发了一系列针对于 PET 水解酶的筛选方法。在这些方法的使用过程中,除直接使用 PET 作为水

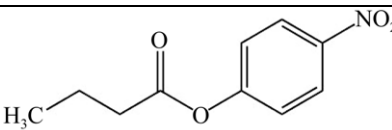
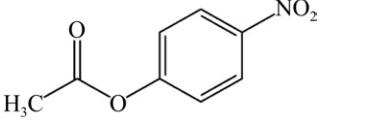
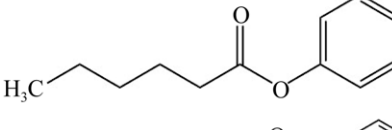
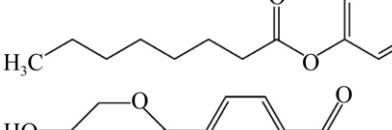
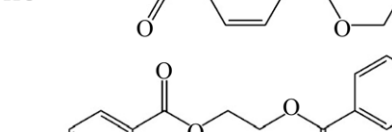

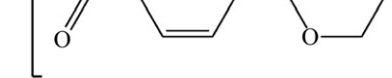
解底物外,还可使用其他不同的底物进行测定,如低聚 PET、对硝基苯基乙酸酯(*p*-nitrophenyl acetate, *p*NPA)和 BHET 等。通过测定其各自形成的水解产物来评估 PET 水解酶的水解活性(表 1)。根据近些年的研究进展,本文总结了一些 PET 水解酶的筛选方法。

1 高效液相色谱法在表征和筛选 PET 水解酶中的应用

PET 的水解产物 TPA、MHET、BHET 均含有羰基,在 240–244 nm 范围内具有紫外吸收^[6,8,15]。此外,这 3 种产物上带有的苯环也具有吸光性^[16],在 254–260 nm 范围内可以检测到紫外吸收^[17–19]。

表 1 用于 PET 水解酶活性分析的模型底物

Table 1 Model substrates used for analyzing PET hydrolase activity

Compound	Abbreviation	Structural formula	Hydrolysate
<i>p</i> -nitrophenyl acetate	<i>p</i> NPA		<i>p</i> NP, acetate
<i>p</i> -nitrophenyl butyrate	<i>p</i> NPB		<i>p</i> NP, butyrate
<i>p</i> -nitrophenyl caproate	<i>p</i> NPC		<i>p</i> NP, hexanoate
<i>p</i> -nitrophenyl caprylate	<i>p</i> NPO		<i>p</i> NP, caprylate
Bis (2-hydroxyethyl) terephthalic acid	BHET		MHET, TPA, EG
Ethylene glycol bis (p-methyl benzoate)	2PET		4-methylbenzoic acid
Polyethylene glycol terephthalate	PET		MHET, TPA, EG

高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 被广泛应用于定量检测 PET 水解产物。其基本原理是流动相各组分经过固定相时, 与固定相之间发生作用的强度不同, 导致在固定相中滞留时间不同, 达到分离的目的。使用反相色谱柱 ODS (octadecylsilyl, 也称 C18) 可以有效地分离 PET 水解产生的化合物, 即 TPA、MHET 和 BHET^[6,8,20]。将反应混合物装入用极性流动相平衡过的色谱柱中, 通过提高有机溶剂的浓度进行梯度洗脱。3 种产物在洗脱过程中, TPA 的保留时间最短, BHET 的保留时间最长。

2016 年, Yoshida 等^[8]报道, 从暴露于 PET 的天然微生物群落中筛选出一株名为大版伊德氏菌 (*Ideonella sakaiensis*) 201-F6 的新型细菌, 它可以产生 PET 水解酶, 以 PET 为主要能源和碳源生长。该酶因专一性降解 PET 而被命名为 PETase。通过对 PETase 水解 PET 后的产物进行分析, 研究人员发现, 降解产物中 MHET 含量最多, 同时含有少量的 TPA 和 BHET。近年来, 对 PETase 进行改造成为全球范围内的热门研究课题。2020 年, Son 等^[18]通过结构生物信息学分析对 PETase 的底物结合位点进行优化, 以瓶级 PET 膜为底物, 通过 HPLC 测定 PETase 突变体的 PET 水解活性, 得到了热稳定性更高的突变体 PETase^{S121E/D186H/S242T/N246D}。在 37 °C 条件下, 该变体可以保持 20 d 的 PET 水解活性。2022 年, Lu 等^[21]通过 HPLC 分析改造后的 PETase 突变体 FAST-PETase 的水解活性, 发现 FAST-PETase 在 50 °C 条件下 96 h 内生成了 33.8 mmol/L 的 PET 单体, 并在不到两周的时间内基本完全降解热预处理后的水瓶 (约 9 g)。HPLC 是目前唯一能准确定量 PET 降解产物的检测方法^[8,14,17,22-25]。其准确性和灵敏性对于降解分析非常重要。但是该方法在分析速度和吞吐量上受到一定限制, 难

以应用于大型突变体文库和宏基因组文库的筛选。可以通过优化洗脱梯度减少分析时间, 提高分析效率。此外, HPLC 无法“连续”测量同一酶反应的酶动力学。

目前, 可以进行高速分析的超高效液相色谱 (ultra performance liquid chromatography, UPLC) 已经被广泛应用, 相比 HPLC, UPLC 具有更快的筛选速度、更高的灵敏度以及更好的分离度, 使得分析时间大大缩短, 同时还可以减少溶剂用量, 降低分析成本。2020 年, Tournier 等^[6]通过计算机辅助酶工程, 使用 UPLC 对 PET 解聚动力学进行测定, 获得了叶枝堆肥角质酶 (leaf-branch compost cutinase, LCC) 突变体 ICCG, 将酶催化 PET 解聚的转化率提高到了 90%。2022 年, Bell 等^[26]以筛选高温下酶活性提高的 PETase 突变体为目的, 利用 UPLC 搭建了一个自动化、高通量的定向进化平台, 成功获得了一种耐热的 PETase 突变体 (HotPETase, T_m=82.5 °C), 该变体可以更快地解聚半结晶 PET。Bell 等^[26]开发的 UPLC 方法, 能够在 2 min 内完成对单一降解反应产生的 MHET 和 TPA 的分析, 在 2 d 内对 2 000 多种酶变体的降解活性进行测定。UPLC 具有分离度高、检测速度快、灵敏度高等优点, 是一种理想的高通量检测方法, 但是 UPLC 设备价格相对昂贵, 现实中需要结合实际需求选择设备。

2 基于 PET 纳米颗粒的琼脂平板培养快速筛选法

琼脂板培养快速筛选法解决了 HPLC 检测通量低的问题, 是宏基因组文库中活性筛选的常用工具, 特别是对于脂肪分解酶的筛选^[27-28]。在琼脂平板制备时加入 PET, 就可以通过菌落周围产生透明水解圈的大小筛选具有 PET 水解活性的菌落^[29-30]。PET 水解是一个表面侵蚀的过程,

由于 PET 分子排列致密,使得 PET 水解酶只能接触到 PET 表面的酯键。将固态 PET 制备成纳米颗粒可以有效提高 PET 水解酶与 PET 的接触面积,直径为 100 nm 的 PET 颗粒的比表面积大约是直径为 300 μm 的 PET 片的 3 000 倍^[31]。此前, Gan 等^[32-33]利用激光散射法对假单胞菌(*Pseudomonas*)脂肪酶水解聚己内酯(polycaprolactone, PCL)纳米颗粒的活性进行了研究,发现使用 PCL 纳米颗粒代替薄膜时,酶解速度提高了 10^3 倍。这说明通过使用纳米级的 PET 颗粒,提高聚合物的比表面积,进而提高酶的降解速率是可行的。Pirillo 等^[34]将 0.5 g PET 溶解在 50 mL 六氟异丙醇中,在剧烈的搅拌下,将 PET 溶液滴入 500 mL 蒸馏水中, PET 在水中被稀释形成纳米颗粒,通过过滤除去较大颗粒,并使用蒸发器除去沸点较低的六氟异丙醇,干燥后得到平均直径为 80 nm 的颗粒,随后将 PET 纳米颗粒加入到琼脂平板的制备中。Danso 等^[35]将具有 PET 降解活性的克隆接种到含有 PET 纳米颗粒的琼脂平板上,过夜培养后,菌落周围产生了透明水解圈。Charnock^[36]将商业 PET 片加到二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)中,加热至 180 $^{\circ}\text{C}$ 溶解 PET,随后在将 PET 溶液滴入到琼脂中的同时,使用超声波均质仪将 PET 分散到琼脂中,在平板上接种菌落之后,能够水解 PET 的细菌菌落周围会形成透明水解圈,由此判断菌落是否存在 PET 降解活性,此方法快速、高效,每周可以筛选数百万个克隆^[37]。

2021 年, Liu 等^[38]提出了一种新的共培养体系来回收 PET 和 BHET 水解后的单体。他们将水解 PET 与生成聚羟基丁酸酯(polyhydroxy butyrate, PHB)耦合,在解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*) Po1f 中表达来自 *Ideonella sakaiensis* 201-F6 的 PETase,将 PET 粉末和 BHET 添加到琼脂平板中,发现表达解脂耶氏酵母 Po1f 菌落

的周围形成了透明的水解圈,表明该菌落能够分泌 PETase。然后, Liu 等^[38]将含有来自真养产碱杆菌(*Ralstonia eutropha*)的 *phbCAB* 操纵子的重组质粒转化至从 PET 废物中分离的 TPA 降解菌株旋施假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)中。以共培养的方式在一个发酵步骤中直接水解 BHET 生成生物塑料 PHB。该研究为利用人工微生物菌群实现 PET 废弃物的生物降解和回收利用提供了新的思路。2022 年,为了实现 IsPETase 的定向进化, Wang 等^[39]以 BHET 作为 PET 的模型底物添加至琼脂平板中,通过菌落周围产生透明水解圈直径的大小反映酶的活性水平,最终获得了活性较高的突变体 IsPETase^{S139T}。2022 年, Zhang 等^[30]为了探索潜在的隶属于拟杆菌门(Bacteroidetes)的 PET 酯酶,通过基于隐马尔可夫模型(hidden markov model, HMM)的 PETase 特异性搜索算法,从黄杆菌科(Flavobacteriaceae)和卟啉单胞菌科(Porphyromonadaceae)中鉴定了几个 PETase 候选基因。在含有三丁酸甘油酯(tributyryn, TBT)的琼脂平板进行初步测试,筛选出具有酯酶活性的重组酯酶,这些酯酶也能够水解对硝基苯基己酸酯和对硝基苯基癸酸酯,随后将重组酯酶进一步在含有聚己内酯(polymeric polycaprolactone, PCL)、BHET 和聚氨酯(polyurethane, PU)的琼脂平板上进行孵育,在这些底物的琼脂板上均产生明显的透明水解圈,随后使用 UPLC 验证了这些酯酶对 PET 的水解活性。

琼脂平板培养快速筛选法是一种简单直接的筛选方法,但是对 PET 水解酶突变体间差异的可视化较弱,仅适用于突变体的初步筛选,排除无活性或活性极低的突变体,筛选出的突变体的水解活性仍需要其他检测方法如 HPLC 或 UPLC 法进行准确定量。另外,该方法大多需要将酶展示在细胞表面或进行外泌表达,无法筛选

进行胞内表达的微生物,可以尝试将微生物细胞裂解,将细胞粗提物滴加到平板上,通过控制温度与湿度进行降解反应。

3 基于紫外/可见光分光光度计的分析方法在表征和筛选 PET 水解酶中的应用

基于紫外/可见光分光光度计的分析方法,其原理是通过检测反应体系中生成具有光吸收性产物所引起的吸光度变化,或测定由合适的 pH 指示剂染料所引起的吸光度变化来分析。另外,也可通过反应体系浊度的变化来检测 PET 水解酶活性。

3.1 比色法测定 4-硝基苯酚的水解度在表征和筛选 PET 水解酶中的应用

在开发高效 PET 水解酶的过程中,对 PET 水解酶的动力学进行研究有助于了解酶的催化机制,对酶的理性改造具有指导意义。由于 PET 水解过程缓慢,导致以 PET 为底物进行 PET 水解酶动力学分析时,无法获得有效的动力学参数,如 K_m 和 K_{cat} 等。另外,由于 PET 分子量巨大,在解析 PET 水解酶的酶促水解机理时,难以获得酶与 PET 配体的复合物,因此需要选择降解速度快且分子量小的底物进行酶促测定^[40]。4-硝基苯酚(*p*-nitrophenyl, *p*NP)是一种常用的酯酶(EC.3.1.1.X)活性测定化合物,例如脂肪酶(E.C.3.1.1.3)^[41]。大多数酶促测定以 *p*NP 衍生物为底物,例如 *p*NPA 和对硝基苯基丁酸酯(*p*-nitrophenyl butyrate, *p*NPB)。酯酶通过水解 *p*NP 衍生物中酰基和 *p*NP 之间的酯键生成 *p*NP 单体,在碱性条件下 *p*NP 显黄色,通过在 405–420 nm 处测定其吸光度进行定量^[42–43]。2013 年, Ribitsch 等^[44]以 *p*NPB 为底物测定了角质酶 *Thc_Cut1* 及其余 2 个结合模块的融合蛋白的动力学参数 K_m 和 K_{cat} 。2015 年, Dimarogona

等^[45]以 *p*NPA、*p*NPB 等底物对纯化后的角质酶进行动力学研究,在 410 nm 下检测 *p*NP 的吸光度,计算动力学常数 K_m 和 K_{cat} 。其中一个酶活性单位被定义为每分钟释放 1 $\mu\text{mol/L}$ *p*NP 的酶量。2016 年, Yoshida 等^[8]测定了 PETase 和其同源酶对 *p*NP 连接的脂肪酸酯的活性。*p*NP 衍生物分解过程简单,结果易于测定,可应用于酶学分析以及随机诱变过程中活性与非活性克隆比例的测定。此外,连接不同链长脂肪酸酯的 *p*NP 衍生物可以用来探测酶活性位点的大小。2019 年, Liu 等^[46]测试了 PETase 对 5 种 *p*NP 酯的活性,为了使 PETase 能够水解萘酯,他们根据晶体结构信息设计了突变体进行定点突变,得到了能够水解萘酯的突变体 PETase^{S93M}、PETase^{W159F} 和 PETase^{N241F}。

由于 *p*NP 的解离常数与 pH 和温度有关,所以在分析 *p*NP 的吸光度时,需要考虑 pH 和温度的影响^[41]。另外,该方法的主要缺点是 PET 和 *p*NP 脂肪酸酯之间的结构相似性较低,不能完全反映酶对 PET 的水解能力。但该方法适合用于大规模初筛具有酯键水解能力的酶,大大降低了初期的筛选压力。

3.2 紫外吸光度法分析 PET 的酶水解动力学

紫外(ultraviolet, UV)吸光度法检测 PET 水解酶活性可以作为一种高通量筛选手段。其检测原理与 HPLC 相似,都是基于 PET 水解产物 MHET、TPA、BHET 上苯环的吸光性^[6,17,23–24]。2021 年, Zhong-Johnson 等^[47]提出了一种简单、快速和高效的 PET 水解酶筛选方法,该方法基于 PET 水解产物在 260 nm 处的吸光特性,通过 NanoDrop 或 UV 分光光度计测定酶反应动力学。此外,研究人员还比较了 PETase 的耐热突变体 TS-PETase 和野生型 PETase 的动力学曲线,发现该方法能够反映耐热突变引起的酶行为变化,耐热突变株可以在不提高酶催化速率的情况下

随着时间的推移产生更多的产物。尽管与野生型相比具有相似的内在催化潜能,但耐热突变体无论在常温还是高温下,都表现出优异的 PET 降解能力。此外,当野生型 PETase 失去活性后,耐热突变体仍能随着时间的推移继续水解 PET,从而提高了 TS-PETase 的总转化率。如果缺少动力学研究,TS-PETase 转化率的提高可能被错误地归因于催化性能的提高,而不是稳定性的提高。该研究表明,紫外吸光度法能准确测定 PET 水解酶的动力学特征,如反应轨迹和反应的线性区域等。

总的来说,该法简单、快速,是一种高通量的检测方法,并能反映酶动力学的变化。但其单独使用可能存在问题,还需要通过 HPLC 进行结果验证。另外,该方法的局限性在于检测前要将不溶性的底物与可溶性的水解产物分离,因此只适用于易分离的底物。2022年,Thomsen等^[48]提出了一种分区的 UV 测定法,用于连续检测 PET 酶降解过程中生成的可溶性水解产物。该方法将透明微孔板中两个对角相邻孔的壁去除,以确保 2 个相邻孔之间的可溶性酶水解产物通过,一个孔用于容纳 PET 片,另一个用于在 240 nm 处连续读取酶产物的吸光度。该方法省去了将底物分离的步骤,并可实现同一酶反应的“连续”检测。其次,酶降解机制的不同会导致产物生成的比例不一样,而 UV 测定法只能反映产物混合物整体的吸光度,无法对每种产物进行定量,不能进一步分析酶的降解机制。

3.3 浊度法分析 PET 纳米颗粒的水解度

浊度法分析 PET 水解酶活性的体系相对简单,可应用于 96 孔板筛选,具有一定的通量,不需要将底物与产物进行分离,而且可以直接以 PET 作为反应底物,排除非特异性底物带来的误差。其原理是 PET 纳米颗粒分散在水中产生丁达尔效应,通过分光光度计记录溶液在 600 nm 处的光密度(OD_{600})来测定溶液的浊度^[49]。在 PET

纳米颗粒的酶解过程中,随着悬浮液中纳米颗粒尺寸和数量的降低,溶液的 OD_{600} 将会降低,其降低速率与酶活性成正比^[50]。

为了研究聚酯水解酶 TfCut2 对 PET 纳米颗粒的降解活性,Wei等^[50]将 PET 纳米颗粒固定在琼脂糖凝胶中进行快速酶解,避免了反应过程中较大粒径颗粒的沉淀。利用分光光度计在 600 nm 处测定纳米颗粒酶解引起的浊度的降低,由此直接计算出酶解反应的初始反应速率和相应的动力学常数。2019年,Wei等^[51]又报道了一种新的浊度法,用于快速筛选具有 BHET 和乙二醇双(对-甲基苯甲酸酯) [ethylene glycol bis (p-methyl benzoate), 2PET] 两种 PET 模型底物水解活性的酶。该方法通过预混 BHET 和 2PET 纳米颗粒悬液与四甲基乙二胺(etramethylethylenediamine, TEMED)、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐 (tris hydrochloride, Tris-HCl) 和商业 Rotiphorese 凝胶原液,得到底物预混液。向微孔板中加入过硫酸铵溶液和 TfCa 酶液后,将底物预混液加入到微孔板中,将微孔板放入预热至 60 °C 的微孔板读取器中,监测浊度下降情况。

通过将 PET 底物固定在琼脂糖凝胶或者聚丙烯酰胺凝胶的浊度测定法,避免了底物形成沉淀而带来的比浊度测量误差,具有较好的重复性。同时浊度法还可以测量 PET 水解酶对于其他底物的活性,如 BHET 和 2PET。但是,基于微孔板的浊度分析法检测通量有限,难以应用于大型文库的筛选。相比之下,琼脂平板培养快速筛选法的通量要高于浊度分析法。

4 荧光法在表征和筛选 PET 水解酶中的应用

4.1 基于 TPA 的微孔板荧光检测法在筛选 PET 水解酶中的应用

在很早以前的研究中就已经提出使用荧光

法定量检测 TPA 可以反映 PET 水解酶的降解活性^[52-53]。TPA 以对苯二甲酸酯的形式存在于碱性缓冲液中。1994 年, Mason 等^[54]报道在碱性缓冲液(pH>8)中, TPA 以去质子化形式存在, 可以与过氧化氢(hydrogen peroxide, H₂O₂)中的羟基自由基(hydroxyl radical, 分子式为·OH)发生反应, 产生带有荧光的羟基对苯二甲酸离子(2-hydroxyterephthalate, HOTP)。2003 年, O'NEILL 等^[55]将 TPA 与 H₂O₂在 90 °C 下反应 30 min 后, 用激发波长为 315 nm 的发光光谱仪在 300–600 nm 之间扫描样品, 在 425 nm 的发射波长下检测到 HOTP 的存在。但是, H₂O₂和 TPA 反应转化为 HOTP 需要在 90 °C 的高温下进行, 会导致样品产生气泡, 严重干扰荧光分析。此外, 90 °C 的高温也不适合在微孔板读取器中进行操作分析, 难以应用于大规模筛选。芬顿(Fenton)反应中, 铁(ferrum, 化学式为 Fe)在室温下自氧化产生游离的·OH^[56], 可以代替 H₂O₂。Fe(II)与乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)络合物通过稳定 Fe(III)来促进这一反应的发生^[57], 从而促进 TPA 的羟基化。此外, 多种化合物清除·OH 的能力也可以用 Fe(II)-EDTA 络合物介导的 TPA 羟基化反应评估^[58-60]。

2012 年, Wei 等^[61]建立了一种适用于 96 孔微孔板的 TPA 荧光检测法, 用于 PET 水解酶活性的检测。该方法基于 Fe 自氧化介导的 fendon 反应, 将 PET 水解产物置于 96 孔微孔板中, 在每个孔中加入 5 mmol/L EDTA、5 mmol/L 硫酸亚铁(ferrous sulfate, FeSO₄)和 pH 8.5 的磷酸盐缓冲液, 在室温下孵育 10 min, 引发 TPA 的羟基化反应, 随后在 360 nm 的激发波长和 465 nm 的发射波长下, 检测荧光产物 HOTP (图 1)。HOTP 荧光强度与 TPA 浓度(0.01–0.075 mmol/L)之间呈线性关系, HOTP 荧光在室温下可稳定保持 50 min。2020 年, Pfaff 等^[62]改进了 TPA 荧光分

析法, 在添加 ZYM-5052 自诱导培养基的 96 深孔板中表达来自褐色嗜热裂孢菌(*Thermobifida fusa*) KW3 菌株的 TfCut2 及其失活变体 TfCut2_S130A。通过在–80 °C 反复冻融获得粗细胞裂解物, 离心后取可溶性蛋白上清液, 在 96 孔板中将其与 PET 纳米颗粒进行水解反应, 随后向每孔反应液中加入 25 μL EDTA (5 mmol/L)和 25 μL FeSO₄ (5 mmol/L), 在室温下孵育 10 min 引发 TPA 的羟基化反应, 并使用微孔板读取器检测在 315 nm 处激发波长和在 421 nm 处发射波长下的荧光强度。考虑到 PET 的主降解产物有 TPA

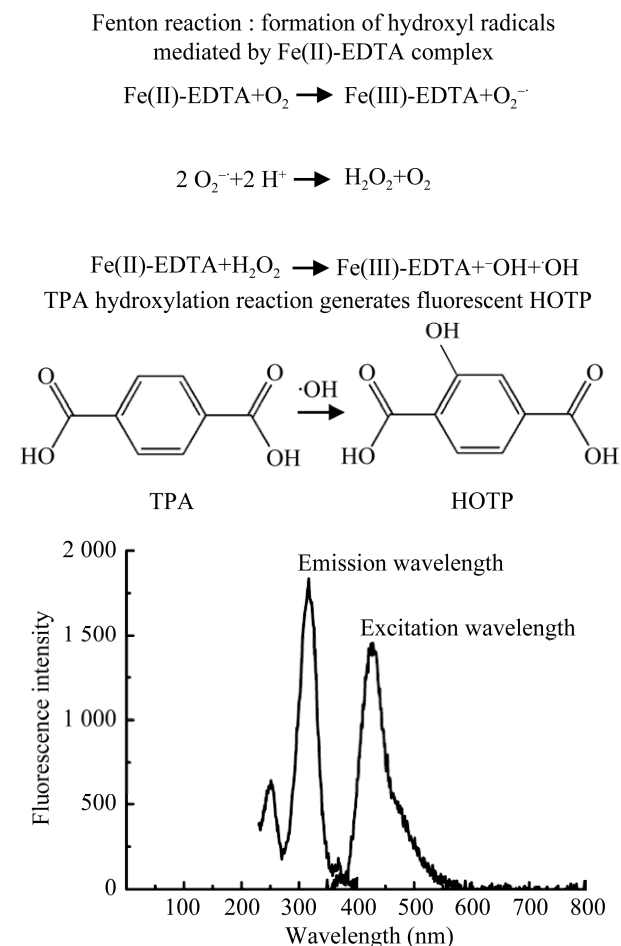


图 1 铁自氧化介导的 TPA 羟基化反应生成荧光 HOTP 的示意图^[62]

Figure 1 A schematic diagram of fluorescent HOTP produced by hydroxylation of TPA mediated through iron autoxidation^[62].

和 MHET, 只检测 TPA 的荧光强度存在一定的局限性, Weigert 等^[63]向反应液中添加了 200 mmol/L 的 MHET 降解酶 MHETase, 在 10 min 后 MHET 被完全转化为 TPA。此外, Weigert 等^[63]还将 PET 溶解在三氟乙酸(trifluoroacetic acid, TFA)中, 并将其应用于 96 孔或 384 孔板的涂层。通过控制涂层干燥步骤中的温度得到不同结晶度的 PET 薄膜, 在减少荧光测定过程中分离底物步骤的同时, 还可以检测不同结晶度下 PET 水解酶的降解情况。

芬顿反应介导的荧光检测, 可以有效地区分活性和非活性 PET 水解酶。该方法也适用于新型 PET 水解酶突变体文库的筛选, 通常比吸光度法更加灵敏, 适用于检测浓度较低的化合物。

而且当反应混合物中有残留酶时, 会干扰 HPLC 以及 UV 吸光度的测定, 该方法则不受残留酶的影响。但是会受到其他能与·OH 发生反应的物质的干扰, 如 Tris 缓冲液, 因此, 在测定时一般选择磷酸盐缓冲液。

4.2 基于荧光激活液滴分选系统的超高通量 PET 水解酶活性检测法

基于微液滴微反应器的超高通量酶活筛选体系是一项新技术。该技术通过将表达有目标酶的细菌细胞、荧光底物及构成反应体系的其他成分包裹在直径仅有几微米的“水-油”一级微液滴或“水-油-水”二级微液滴中, 形成酶微反应器^[64](图 2A)。利用流式细胞仪或微流控芯片, 根据微反应器中产物的荧光信号强度来定量酶活性。

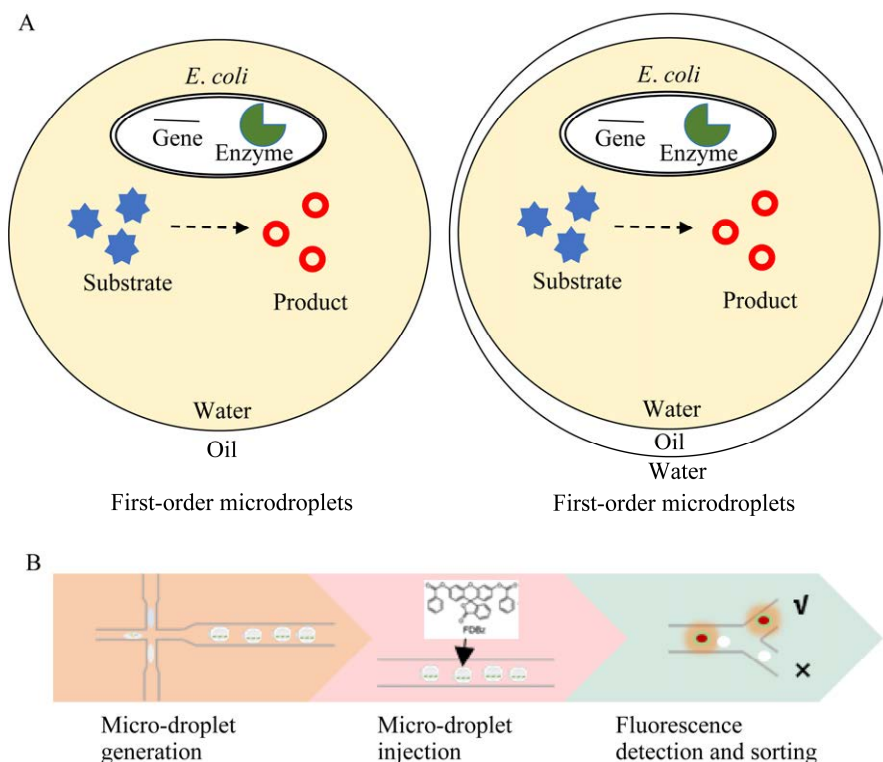


图 2 荧光激活液滴分选系统 A: 一级微液滴和二级微液滴酶微反应器^[64]. B: 分选系统的 3 大组成部分, 包括微液滴生成、微液滴注射和荧光激活分选^[65]

Figure 2 Fluorescence activated droplet sorting system. A: Primary microdroplet and secondary microdroplet enzyme microreactor^[64]. B: Three major components of the sorting system, including microdroplet generation, microdroplet injection and fluorescence activated sorting^[65].

2022年, Qiao等^[65]研发了一种荧光激活液滴分选(fluorescence-activated droplet sorting, FADS)系统,用于高通量筛选水解PET的微生物或变体酶。该系统包括3个模块:产生和孵化微液滴的模块、以荧光素二苯甲酸酯(fluorescein dibenzoate, FDBz)作为荧光探针的微量注射模块,以及用于检测和分选具有PET降解活性微液滴的模块(图2B)。研究人员利用搭建的微流控平台,从一家涤纶纺织厂的废水样本中,筛选得到了9个不同种属的具有PET降解活性的菌株。FADS系统可以加快筛选速度,极大地简化操作流程,提高分选效率和灵活性,同时降低大型文库筛选的成本。除PET外,FADS系统还可以应用于筛选水解其他合成塑料的微生物或酶,如聚酯^[66]、聚乙烯^[67]和聚碳酸酯^[68]等。

该方法不需要针对目标酶设计特定的底物分子或复杂的筛选体系,理论上只要有适合于微液滴实验的荧光底物即可,具有极高的通用性。基于荧光激活液滴分选系统的超高通量筛选平台,为通过随机诱变和定向进化获得高活性PET水解酶提供了可能性。虽然该方法中的底物FDBz很早便被合成用于脂肪酶的鉴定,但是FDBz与PET结构相似性低,不是PET水解酶的特异性底物,在筛选的过程中可能更倾向于筛选出具有脂肪酶活性的菌株。因此该方法适合大规模初筛具有酯键水解活性的酶,无法特异性地筛选出具有PET水解活性的酶。

Zumstein等^[69]提出一个概念性方法,通过监测嵌入聚酯的酯基荧光探针经共水解产生的荧光,来跟踪聚酯的水解。这项工作的目标是开发和验证一种酶促聚酯水解法,研究人员以二月桂酸荧光素(fluorescein dilaurate, FDL)作为探针,月桂酸基将探针有效地固定在聚己二酸丁二醇酯基质中,从而将探针从聚酯中的浸出降至最低。此外,水解产物荧光素是高度水溶性的,很

容易通过荧光测量检测到。该方法可应用于筛选PET水解酶的荧光激活液滴分选系统,有望克服底物特异性的问题。

5 基于生物传感器的超高通量PET水解酶活性检测法

针对PET水解产物TPA建立智能和易于应用的生物传感器,可实现对自然界中水解PET的微生物的快速筛选,有望成为一种高通量的筛选方法。先前的研究报道了一些参与吸收TPA的转录因子:TpiA-TpiB^[70]、TphR^[71],及其降解途径^[72]等。这些转录因子可以被用来生成生物传感器。到目前为止,报道了3种可以应用于检测TPA的生物传感器。

Pardo等^[71]设计了一种TPA生物传感器,该传感器由睾丸酮丛毛单胞菌(*Comamonas testosterone*)的转录因子TphR及其调控核苷酸序列和超折叠绿色荧光蛋白(superfolder green fluorescent protein, sfGFP)组成,用来评估贝利不动杆菌(*Acinetobacter baylyi*) ADP1对TPA的转运能力。在睾丸酮丛毛单胞菌株中,TphR是一种转录激活剂,与TPA结合后,负责将TPA转化为原儿茶酸盐。该生物传感器系统结合流式细胞荧光分选技术(fluorescence activated cell sorting, FACS)可以筛选吸收TPA的贝利不动杆菌突变体。

恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)的转录因子XylS能结合苯甲酸和各种衍生物,但不能识别TPA^[73-75]。2022年,Li等^[76]对XylS进行定向进化,生成了一种能够结合TPA并对其作出反应的XylS突变体,该突变体可用于构建全细胞生物传感器。将xylS基因、启动子Pm和绿色荧光蛋白编码基因(sfGFP)重组到pUC57质粒(图3A),将重组质粒转化到大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21 (DE3)细胞中,生成一种新的大肠杆菌

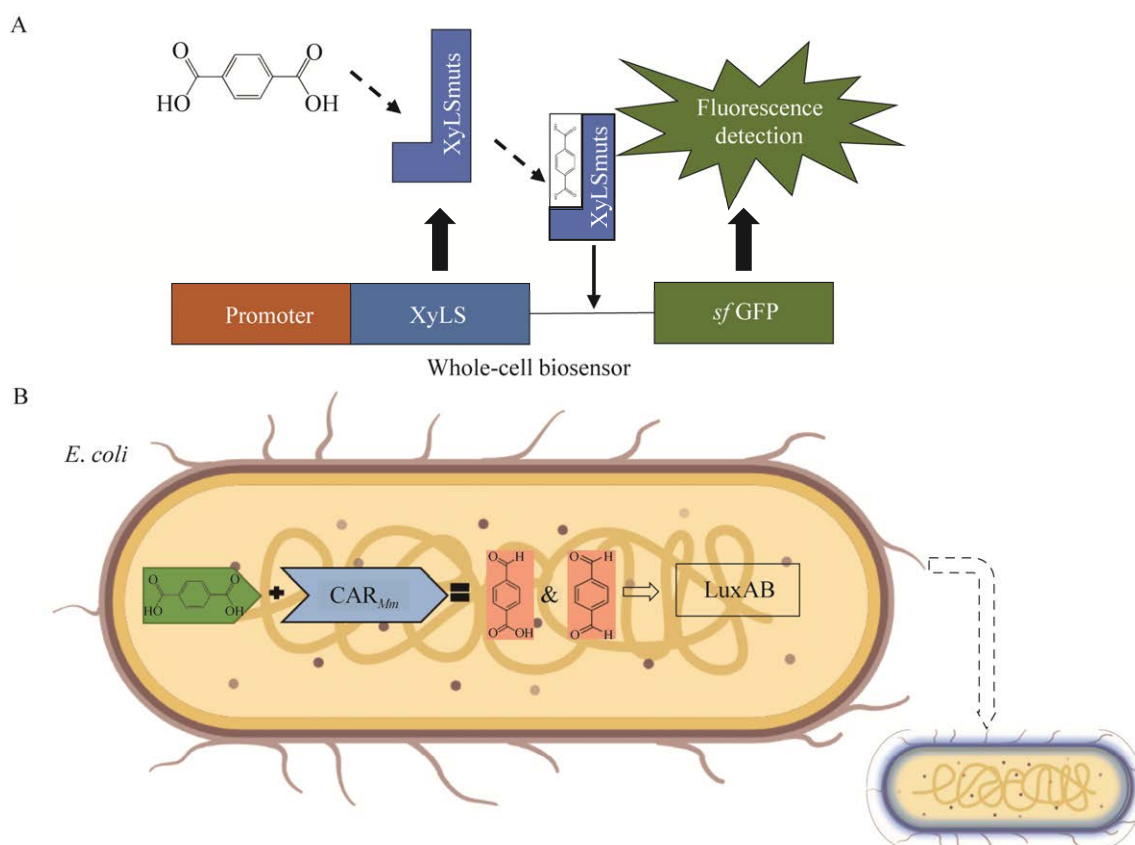


图3 通过检测 TPA 来筛选 PET 水解酶的生物传感器的示意图^[76-77] A: 用于 TPA 荧光检测的工程化 XylS 全细胞生物传感器. B: 用于检测大肠杆菌中 TPA 的酶偶联生物传感器

Figure 3 Biosensor used for screening PET hydrolases by detecting TPA^[76-77]. A: Fluorimetric detection of TPA using engineered XylS-based whole-cell biosensor. B: Enzyme-coupled biosensor for the detection of TPA in *E. coli*.

生物传感器 pUC57-Xyls-sfGFP, 并应用于 TPA 的荧光检测。培养 BL21(DE3) 细胞, 在细胞 OD_{600} 达到 0.6 时, 加入不同浓度的 TPA, 收集不同时间段下的样品, 在 488 nm 的激发波长和 515 nm 的发射波长下检测样品的荧光强度。在这一理念的引领下, 利用 RNA 高通量测序技术, 将很快识别出更多的用来降解此类聚合物的寡聚物和单体的启动子, 从而为开发更高效的生物传感器奠定基础。

2022 年, Bayer 等^[77]构建了一种细胞传感器, 用于 TPA 的高通量检测。该细胞传感器将羧酸还原酶(carboxylate reductase, CAR_{Mm})和来自发光假单胞菌(*P. luminescens*)的荧光素酶 LuxAB 偶联, LuxAB 用于检测大肠杆菌(*Escherichia coli*)

中结构多样的醛类^[78]。 CAR_{Mm} 将 TPA 还原为 4-羧基苯甲醛(4-carboxybenzaldehyde, 4-CBAL) 和对苯二甲醛(terephthalaldehyde, TAL)后, 进一步被荧光素酶 LuxAB 感知, 并产生生物荧光(图 3B)。荧光强度反映水解产物中 TPA 的量, 可以作为评估 PET 水解酶活性的方法。该系统不仅为 TPA 提供了基于生物传感器的高通量分析方法, 而且在反应过程中生成了 TPA 衍生的高活性醛, 如 TAL, 避免了危险的化学反应过程^[79], 同时将 TAL 在同一反应容器中进行转化, 可以得到相应的二胺, 具有潜在的工业应用价值^[80-81]。

全细胞生物传感器可以直接检测 PET 降解产物, 为 PET 水解酶提供了一种通用的筛选方

法。通过优化生物传感器组件和开发更高效的用于 TPA 检测的转录因子, 以进一步提高生物传感器的检测性能, 推动高效 PET 水解酶的研究进展。但是上述 3 种方法能否成功应用于大规模文库的筛选还需实验进行验证。另外, PET 主降解产物为 MHET, 基于 TPA 检测的生物传感器可能只部分反映 PET 水解酶的活性, 因此可以在该方法的基础上进行优化, 筛选出能够同时识别 MHET 和 TPA 的菌株, 从而建立更准确的检测方法, 为更深入地了解 PET 水解酶活性提供帮助。

6 展望

酶生物催化降解法为可持续管理和回收 PET 塑料垃圾提供了一种绿色化学的替代方案。通过将酶介导的生物催化降解整合到塑料回收过程中, 以配合或取代目前的回收方法。例如, 将机械处理后的 PET 材料, 转移到含有 PET 降解酶的生物反应器中进行生物催化降解, 生成解聚单体并合成新的塑料产品或升级为价值更高的产品^[82]。虽然这方面的研究工作在最近取得了重大进展, 但在工业层面上将酶生物催化大规模应用于 PET 回收仍然存在关键挑战, 其中一项是如何开发有效且高效的 PET 水解酶筛选方法, 从宏基因组学或突变体库中发现高效的 PET 水解酶。

目前的 PET 水解酶筛选方法大多集中于底物的变化或者产物的生成方面。只有 HPLC 和 UPLC 检测法能够实现 PET 水解产物的定量检测。可以实现 PET 水解产物半定量检测的方法有 UV 吸光度法、浊度法、基于 TPA 的微孔板荧光法和生物传感器法, 这些方法能够整体反映 PET 水解酶活性的高低而无法确定具体的产物量。琼脂板培养快速筛选法只能定性检测有无 PET 水解酶活性而无法反映水解能力的强弱。

pNP 比色法和以 FDBz 为底物的荧光激活液滴分选系统可定性检测酶有无酯键水解活性而无法确定酶是否具有 PET 水解活性, 需要进一步进行 PET 水解活性验证。

上述检测方法均存在一定的局限性。在实际测定过程中, 建议将几种检测方法结合使用或者将目前这些方法进行优势整合, 开发出简便易行且成本低廉的高效筛选方法。例如, HPLC 可以定量检测反应产物, 分析酶的分子机制, 但是低通量使得 HPLC 不适用于初筛和动力学测量, 而紫外分光光度法可以快速进行分析筛选, 反映酶的催化能力, 2 种方法相辅相成, 可以深入研究 PET 水解酶的内切活性和外源活性。此外, 将基于 TPA 的微孔板荧光检测法与荧光激活液滴分选系统相结合, 以 PET 纳米颗粒作为底物, 利用荧光激活液滴分选系统检测 TPA 荧光, 避免了非特异性底物带来的假阳性结果的误差, 提高了分选效率。另外, 组学技术、合成生物学、蛋白质工程技术的快速发展, 为发现、表征、修饰 PET 降解酶提供了一系列强大的工具, 为寻找高效和低成本的新型 PET 水解酶提供了新的可能性, 结合高效的筛选方法, 将大大推动高效 PET 水解酶的研究进展。

REFERENCES

- [1] LEVIN AG. 125 Questions: Exploration Aild Discovery[EB/OL]. [2023-03-13]. <https://www.science.org/content/resource/125-questions-exploration-and-discovery>.
- [2] HOPEWELL J, DVORAK R, KOSIOR E. Plastics recycling: challenges and opportunities[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2009, 364(1526): 2115-2126.
- [3] AMOBONYE A, BHAGWAT P, SINGH S, PILLAI S. Plastic biodegradation: frontline microbes and their enzymes[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 759: 143536.
- [4] WEI R, ZIMMERMANN W. Microbial enzymes for the recycling of recalcitrant petroleum-based plastics:

- how far are we?[J]. *Microbial Biotechnology*, 2017, 10(6): 1308-1322.
- [5] Plastics-the Facts 2022[EB/OL]. [2023-03-13]. <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2022>.
- [6] TOURNIER V, TOPHAM CM, GILLES A, DAVID B, FOLGOAS C, MOYA-LECLAIR E, KAMIONKA E, DESROUSSEAUX 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.
- [7] HIRAGA K, TANIGUCHI I, YOSHIDA S, KIMURA Y, ODA K. Biodegradation of waste PET: a sustainable solution for dealing with plastic pollution[J]. *EMBO Reports*, 2019, 20(11): e49365.
- [8] 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.
- [9] GROß C, HAMACHER K, SCHMITZ K, JAGER S. Cleavage product accumulation decreases the activity of cutinase during PET hydrolysis[J]. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2017, 57(2): 243-255.
- [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] HU XP, THUMARAT U, ZHANG X, TANG M, KAWAI F. Diversity of polyester-degrading bacteria in compost and molecular analysis of a thermoactive esterase from *Thermobifida alba* AHK119[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87(2): 771-779.
- [12] KAWAI F, KAWABATA T, ODA M. Current knowledge on enzymatic PET degradation and its possible application to waste stream management and other fields[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(11): 4253-4268.
- [13] ARNLING BÄÄTH J, BORCH K, WESTH P. A suspension-based assay and comparative detection methods for characterization of polyethylene terephthalate hydrolases[J]. *Analytical Biochemistry*, 2020, 607: 113873.
- [14] REN W, OESER T, SCHMIDT J, RENÉ ME, BARTH M, THEN J, ZIMMERMANN W. Engineered bacterial polyester hydrolases efficiently degrade polyethylene terephthalate due to relieved product inhibition[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2016, 113(8): 1658-1665.
- [15] SEO H, KIM S, SON H F, SAGONG H Y, JOO S, KIM K J. Production of extracellular petase from *Ideonella sakaiensis* using sec-dependent signal peptides in *E. coli*[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2019, 508(1): 250-255.
- [16] CARNIEL A, VALONI É, NICOMEDES J, Da CONCEIÇÃO GOMES A, MACHADO de CASTRO A. Lipase from *Candida antarctica* (CALB) and cutinase from *Humicola insolens* act synergistically for PET hydrolysis to terephthalic acid[J]. *Process Biochemistry*, 2017, 59: 84-90.
- [17] 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.
- [18] SON HF, JOO S, SEO H, SAGONG HY, LEE SH, HONG H, KIM KJ. Structural bioinformatics-based protein engineering of thermo-stable PETase from *Ideonella sakaiensis*[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2020, 141: 109656.
- [19] CUI YL, 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.
- [20] EBERL A, HEUMANN S, BRÜCKNER T, ARAUJO R, CAVACO-PAULO A, KAUFMANN F, KROUTIL W, GUEBITZ GM. Enzymatic surface hydrolysis of poly(ethylene terephthalate) and bis(benzoyloxyethyl) terephthalate by lipase and cutinase in the presence of surface active molecules[J]. *Journal of Biotechnology*, 2009, 143(3): 207-212.
- [21] LU HY, DIAZ DJ, CZARNECKI NJ, ZHU CZ, KIM W, SHROFF R, ACOSTA DJ, ALEXANDER BR, COLE HO, ZHANG Y, LYND NA, ELLINGTON AD, ALPER

- HS. Machine learning-aided engineering of hydrolases for PET depolymerization[J]. *Nature*, 2022, 604(7907): 662-667.
- [22] ODA M, YAMAGAMI Y, INABA S, OIDA T, YAMAMOTO M, KITAJIMA S, KAWAI F. Enzymatic hydrolysis of PET: functional roles of three Ca^{2+} ions bound to a cutinase-like enzyme, Cut190*, and its engineering for improved activity[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(23): 10067-10077.
- [23] 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: 382.
- [24] AUSTIN HP, ALLEN MD, DONOHOE BS, RORRER NA, KEARNS FL, SILVEIRA RL, POLLARD BC, DOMINICK G, DUMAN R, EL OMARI K, MYKHAYLYK V, WAGNER A, MICHENER WE, AMORE A, SKAF MS, CROWLEY MF, THORNE AW, JOHNSON CW, LEE WOODCOCK H, MCGEEHAN JE, et al. Characterization and engineering of a plastic-degrading aromatic polyesterase[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(19): E4350-E4357.
- [25] THEN J, WEI R, OESER T, GERDTS A, SCHMIDT J, BARTH M, ZIMMERMANN W. A disulfide bridge in the calcium binding site of a polyester hydrolase increases its thermal stability and activity against polyethylene terephthalate[J]. *FEBS Open Bio*, 2016, 6(5): 425-432.
- [26] 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(8): 673-681.
- [27] POPOVIC A, TCHIGVINTSEV A, TRAN H, CHERNIKOVA TN, GOLYSHINA OV, YAKIMOV MM, GOLYSHIN PN, YAKUNIN AF. Metagenomics as a tool for enzyme discovery: hydrolytic enzymes from marine-related metagenomes[M]// *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Cham: Springer International Publishing, 2015, 883: 1-20.
- [28] PEÑA-GARCÍA C, MARTÍNEZ-MARTÍNEZ M, REYES-DUARTE D, FERRER M. High throughput screening of esterases, lipases and phospholipases in mutant and metagenomic libraries: a review[J]. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 2016, 19(8): 605-615.
- [29] 韦韧. 聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)水解酶的高通量筛选: 进展与挑战[J]. *生物加工过程*, 2022, 20(4): 353-364.
- WEI R. High-throughput screening assays for PET hydrolases: progress and challenges[J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2022, 20(4): 353-364 (in Chinese).
- [30] ZHANG HL, PEREZ-GARCIA P, DIERKES RF, APPLGATE V, SCHUMACHER J, CHIBANI CM, STERNAGEL S, PREUSS L, WEIGERT S, SCHMEISSER C, DANSO D, PLEISS J, ALMEIDA A, HÖCKER B, HALLAM SJ, SCHMITZ RA, SMITS SHJ, CHOW J, STREIT WR. The bacteroidetes *Aequorivita* sp. and *Kaistella jeonii* produce promiscuous esterases with PET-hydrolyzing activity[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 12: 803896.
- [31] PIRILLO V, POLLEGIONI L, MOLLA G. Analytical methods for the investigation of enzyme-catalyzed degradation of polyethylene terephthalate[J]. *The FEBS Journal*, 2021, 288(16): 4730-4745.
- [32] CHI W, GAN Z. A novel method of studying polymer biodegradation[J]. *Polymer*, 1998, 39(18): 4429-4431.
- [33] GAN Z, FUNG JT, JING X, CHI W, KULICHE WK. A novel laser light-scattering study of enzymatic biodegradation of poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles[J]. *Polymer*, 1999, 40(8): 1961-1967.
- [34] PIRILLO V, ORLANDO M, TESSARO D, POLLEGIONI L, MOLLA G. An efficient protein evolution workflow for the improvement of bacterial PET hydrolyzing enzymes[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 23(1): 264.
- [35] DANSO D, SCHMEISSER C, CHOW J, ZIMMERMANN W, WEI R, LEGGEWIE C, LI XZ, HAZEN T, STREIT WR. New insights into the function and global distribution of polyethylene terephthalate (PET)-degrading bacteria and enzymes in marine and terrestrial metagenomes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(8): e02773-17.
- [36] CHARNOCK C. A simple and novel method for the production of polyethylene terephthalate containing agar plates for the growth and detection of bacteria able to hydrolyze this plastic[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2021, 185: 106222.
- [37] WEI R, von HAUGWITZ G, PFAFF L, MICAN J, BADENHORST CPS, LIU WD, WEBER G, AUSTIN

- HP, BEDNAR D, DAMBORSKY J, BORNSCHEUER UT. Mechanism-based design of efficient PET hydrolases[J]. ACS Catalysis, 2022, 12(6): 3382-3396.
- [38] LIU P, ZHANG T, ZHENG Y, LI Q, SU T, QI Q. Potential one-step strategy for PET degradation and PHB biosynthesis through co-cultivation of two engineered microorganisms[J]. Engineering Microbiology, 2021, 1: 100003.
- [39] WANG X, SONG C, QI Q, ZHANG Y, LI R, HUO L. Biochemical characterization of a polyethylene terephthalate hydrolase and design of high-throughput screening for its directed evolution[J]. Engineering Microbiology, 2022, 2(2): 100020.
- [40] FECKER T, GALAZ-DAVISON P, ENGELBERGER F, NARUI Y, SOTOMAYOR M, PARRA LP, RAMÍREZ-SARMIENTO CA. Active site flexibility as a hallmark for efficient PET degradation by *I. sakaiensis* PETase[J]. Biophysical Journal, 2018, 114(6): 1302-1312.
- [41] SYEDD-LEÓN R, SANDOVAL-BARRANTES M, TRIMIÑO-VÁSQUEZ H, VILLEGAS-PEÑARANDA LR, RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ G. Revisiting the fundamentals of *p*-nitrophenol analysis for its application in the quantification of lipases activity. A graphical update[J]. Uniciencia, 2020, 34(2): 31-43.
- [42] ALCANTARA A, PACE V, HOYOS P, SANDOVAL M, HOLZER W, HERNAIZ M. Chemoenzymatic synthesis of carbohydrates as antidiabetic and anticancer drugs[J]. Current Topics in Medicinal Chemistry, 2014, 14(23): 2694-2711.
- [43] STOYTICHEVA M, MONTERO G, ZLATEV R, LEON JA, GOCHEV V. Analytical methods for lipases activity determination: a review[J]. Current Analytical Chemistry, 2012, 8(3): 400-407.
- [44] RIBITSCH D, YEBRA AO, ZITZENBACHER S, WU J, NOWITSCH S, STEINKELLNER G, GREIMEL K, DOLISKA A, OBERDORFER G, GRUBER CC, GRUBER K, SCHWAB H, STANA-KLEINSCHEK K, ACERO EH, GUEBITZ GM. Fusion of binding domains to *Thermobifida cellulolytica* cutinase to tune sorption characteristics and enhancing PET hydrolysis[J]. Biomacromolecules, 2013, 14(6): 1769-1776.
- [45] DIMAROGONA M, NIKOLAIVITS E, KANELLI M, CHRISTAKOPOULOS P, SANDGREN M, TOPAKAS E. Structural and functional studies of a *Fusarium oxysporum* cutinase with polyethylene terephthalate modification potential[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2015, 1850(11): 2308-2317.
- [46] LIU C, SHI C, ZHU S, WEI R, YIN CC. Structural and functional characterization of polyethylene terephthalate hydrolase from *Ideonella sakaiensis*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2019, 508(1): 289-294.
- [47] ZHONG-JOHNSON EZL, VOIGT CA, SINSKEY AJ. An absorbance method for analysis of enzymatic degradation kinetics of poly(ethylene terephthalate) films[J]. Scientific Reports, 2021, 11: 928.
- [48] THOMSEN TB, SCHUBERT SW, HUNT CJ, WESTHP, MEYER AS. A new continuous assay for quantitative assessment of enzymatic degradation of poly(ethylene terephthalate) (PET)[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2023, 162: 110142.
- [49] UNCITI-BROCETA JD, CANO-CORTÉS V, ALTEA-MANZANO P, PERNAGALLO S, DÍAZ-MOCHÓN JJ, SÁNCHEZ-MARTÍN RM. Number of nanoparticles per cell through a spectrophotometric method-a key parameter to assess nanoparticle-based cellular assays[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 10091.
- [50] WEI R, OESER T, BARTH M, WEIGL N, LÜBS A, SCHULZ-SIEGMUND M, HACKER MC, ZIMMERMANN W. Turbidimetric analysis of the enzymatic hydrolysis of polyethylene terephthalate nanoparticles[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2014, 103: 72-78.
- [51] BELISÁRIO-FERRARI MR, WEI R, SCHNEIDER T, HONAK A, ZIMMERMANN W. Fast turbidimetric assay for analyzing the enzymatic hydrolysis of polyethylene terephthalate model substrates[J]. Biotechnology Journal, 2019, 14(4): 1800272.
- [52] 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.
- [53] NIMCHUA T, PUNNAPAYAK H, ZIMMERMANN W. Comparison of the hydrolysis of polyethylene terephthalate fibers by a hydrolase from *Fusarium oxysporum* LCH I and *Fusarium solani* f. sp. *psi*[J]. Biotechnology Journal, 2007, 2(3): 361-364.
- [54] MASON TJ, LORIMER JP, BATES DM, ZHAO Y. Dosimetry in sonochemistry: the use of aqueous terephthalate ion as a fluorescence monitor[J].

- Ultrasonics Sonochemistry, 1994, 1(2): S91-S95.
- [55] O'NEILL A, CAVACO-PAULO A. Monitoring biotransformations in polyesters[J]. Biocatalysis and Biotransformation, 2004, 22(5/6): 353-356.
- [56] WELCH KD, DAVIS TZ, AUST SD. Iron autoxidation and free radical generation: effects of buffers, ligands, and chelators[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2002, 397(2): 360-369.
- [57] YANG XF, GUO XQ. Fe(II)-EDTA chelate-induced aromatic hydroxylation of terephthalate as a new method for the evaluation of hydroxyl radical-scavenging ability[J]. The Analyst, 2001, 126(6): 928-932.
- [58] LI LX, ABE Y, KANAGAWA K, SHOJI T, MASHINO T, MOCHIZUKI M, TANAKA M, MIYATA N. Iron-chelating agents never suppress Fenton reaction but participate in quenching spin-trapped radicals[J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 599(2): 315-319.
- [59] 杨智临. 铁基材料产羟基自由基特征与除砷机制[D]. 北京: 中国地质大学博士学位论文, 2020.
- YANG ZL. Hydroxyl radical hydroxyl radical production and arsenic removal by iron-bearing materials[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of China University of Geosciences, 2010 (in Chinese).
- [60] 吴娜怡郁, 郭晓青, 陈晓靓, 代甜甜, 张晓春. 超声波辅助优化黔产野生地瓜叶总黄酮提取及清除羟基自由基研究[J]. 广东化工, 2022, 49(7): 39-41.
- WU NYY, GUO XQ, CHEN XJ, DAI TT, ZHANG XC. Ultrasonic assisted optimization of wild melon leaves in Guizhou extraction of total flavonoids[J]. Guangdong Chemical Industry, 2022, 49(7): 39-41 (in Chinese).
- [61] WEI R, OESER T, BILLIG S, ZIMMERMANN W. A high-throughput assay for enzymatic polyester hydrolysis activity by fluorimetric detection[J]. Biotechnology Journal, 2012, 7(12): 1517-1521.
- [62] PFAFF L, BREITE D, BADENHORST CPS, BORNSCHEUER UT, WEI R. Fluorimetric high-throughput screening method for polyester hydrolase activity using polyethylene terephthalate Nanoparticles[M]// Methods in Enzymology. Amsterdam: Elsevier, 2021: 253-270.
- [63] WEIGERT S, GAGSTEIGER A, MENZEL T, HÖCKER B. A versatile assay platform for enzymatic poly(ethylene-terephthalate) degradation[J]. Protein Engineering, Design and Selection, 2021, 34: gzab022.
- [64] 马富强, 杨广宇. 基于液滴微流控技术的超高通量筛选体系及其在合成生物学中的应用[J]. 生物技术通报, 2017, 33(1): 83-92.
- MA FQ, YANG GY. Ultra-high-throughput screening system based on droplet microfluidics and its applications in synthetic biology[J]. Biotechnology Bulletin, 2017, 33(1): 83-92 (in Chinese).
- [65] QIAO YX, HU R, CHEN DW, WANG L, WANG ZY, YU HY, FU Y, LI CL, DONG ZY, WENG YX, DU WB. Fluorescence-activated droplet sorting of PET degrading microorganisms[J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 424: 127417.
- [66] DELRE C, JIANG YF, KANG P, KWON J, HALL A, JAYAPURNA I, RUAN ZY, MA L, ZOLKIN K, LI T, SCOWN CD, RITCHIE RO, RUSSELL TP, XU T. Near-complete depolymerization of polyesters with nano-dispersed enzymes[J]. Nature, 2021, 592(7855): 558-563.
- [67] TENNAKOON A, WU X, PATERSON AL, PATNAIK S, PEI Y, LAPOINTE AM, AMMAL SC, HACKLER RA, HEYDEN A, SLOWING II, COATES GW, DELFERRO M, PETERS B, HUANG W, SADOW AD, PERRAS FA. Catalytic upcycling of high-density polyethylene via a processive mechanism[J]. Nature Catalysis, 2020, 3(11): 893-901.
- [68] ARTHAM T, DOBLE M. Biodegradation of physicochemically treated polycarbonate by fungi[J]. Biomacromolecules, 2010, 11(1): 20-28.
- [69] ZUMSTEIN MT, KOHLER HP E, MCNEILL K, SANDER M. High-throughput analysis of enzymatic hydrolysis of biodegradable polyesters by monitoring cohydrolysis of a polyester-embedded fluorogenic probe[J]. Environmental Science & Technology, 2017, 51(8): 4358-4367.
- [70] HOSAKA M, KAMIMURA N, TORIBAMI S, MORI K, KASAI D, FUKUDA M, MASAI EIJI. Novel tripartite aromatic acid transporter essential for terephthalate uptake in *Comamonas* sp. strain E6[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(19): 6148-6155.
- [71] PARDO I, JHA RK, BERMEL RE, BRATTI F, GADDIS M, MCINTYRE E, MICHENER W, NEIDLE EL, DALE T, BECKHAM GT, JOHNSON CW. Gene amplification, laboratory evolution, and biosensor screening reveal MucK as a terephthalic acid transporter in *Acinetobacter baylyi* ADP1[J]. Metabolic Engineering, 2020, 62: 260-274.
- [72] KASAI D, KITAJIMA M, FUKUDA M, MASAI E. Transcriptional regulation of the terephthalate catabolism operon in *Comamonas* sp. strain E6[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010,

- 76(18): 6047-6055.
- [73] FIGUEIREDO R, PORTILLA LLERENA JP, KIYOTA E, FERREIRA SS, CARDELI BR, SOUZA SCR, SANTOS BRITO M, SODEK L, CESARINO I, MAZZAFERA P. The sugarcane ShMYB78 transcription factor activates suberin biosynthesis in *Nicotiana benthamiana*[J]. *Plant Molecular Biology*, 2020, 104(4/5): 411-427.
- [74] OGAWA Y, KATSUYAMA Y, UENO K, OHNISHI Y. Switching the ligand specificity of the biosensor XylS from meta to para-toluic acid through directed evolution exploiting a dual selection system[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(12): 2679-2689.
- [75] MAJEWSKI P, GUTOWSKA A, SACHA P, SCHNEIDERS T, TALALAJ M, MAJEWSKA P, ZEBROWSKA A, OJDANA D, WIECZOREK P, HAUSCHILD T, KOWALCZUK O, NIKLINSKI J, RADZIWON P, TRYNISZEWSKA E. Expression of AraC/XylS stress response regulators in two distinct carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* ST89 biotypes[J]. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2020, 75(5): 1146-1150.
- [76] LI JW, NINA MRH, ZHANG XY, BAI YP. Engineering transcription factor XylS for sensing phthalic acid and terephthalic acid: an application for enzyme evolution[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2022, 11(3): 1106-1113.
- [77] BAYER T, PFAFF L, BRANSON Y, BECKER A, WU SK, BORNSCHEUER UT, WEI R. Biosensor and chemo-enzymatic one-pot cascade applications to detect and transform PET-derived terephthalic acid in living cells[J]. *iScience*, 2022, 25(5): 104326.
- [78] BAYER T, BECKER A, TERHOLSEN H, KIM IJ, MENYES I, BUCHWALD S, BALKE K, SANTALA S, ALMO SC, BORNSCHEUER UT. LuxAB-based microbial cell factories for the sensing, manufacturing and transformation of industrial aldehydes[J]. *Catalysts*, 2021, 11(8): 953.
- [79] BAYER T, MILKER S, WIESINGER T, WINKLER M, MIHOVILOVIC M, RUDROFF F. *In vivo* synthesis of polyhydroxylated compounds from a “hidden reservoir” of toxic aldehyde species[J]. *Chemcatchem*, 2017, 9(15): 2919-2923.
- [80] WANG X, GAO SY, WANG J, XU SB, LI H, CHEN KQ, OUYANG P. The production of biobased diamines from renewable carbon sources: current advances and perspectives[J]. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2021, 30: 4-13.
- [81] ROHAN R, PAREEK K, CAI WW, ZHANG YF, XU GD, CHEN ZX, GAO ZQ, DAN Z, CHENG HS. Melamine-terephthalaldehyde-lithium complex: a porous organic network based single ion electrolyte for lithium ion batteries[J]. *Journal of Materials Chemistry*, 2015, 3: 5132-5139.
- [82] WEI R, TISO T, BERTLING J, O'CONNOR K, BLANK LM, BORNSCHEUER UT. Possibilities and limitations of biotechnological plastic degradation and recycling[J]. *Nature Catalysis*, 2020, 3(11): 867-871.

(本文责编 陈宏宇)