

# 短须嗜热单孢菌聚羟基脂肪酸酯解聚酶的表达、热稳定性改造及在 PHB 降解中的应用

李志刚<sup>1,2</sup>, 陈世恒<sup>1,2</sup>, 孔德民<sup>1,2</sup>, 陈晟<sup>1,2</sup>, 王蕾<sup>1,2</sup>, 吴敬<sup>1,2\*</sup>

1 江南大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

李志刚, 陈世恒, 孔德民, 陈晟, 王蕾, 吴敬. 短须嗜热单孢菌聚羟基脂肪酸酯解聚酶的表达、热稳定性改造及在 PHB 降解中的应用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3351-3363.

LI Zhigang, CHEN Shiheng, KONG Demin, CHEN Sheng, WANG Lei, WU Jing. Expression, thermal stability modification and application in PHB degradation of polyhydroxyalkanoate depolymerase from *Thermomonospora umbrina*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3351-3363.

**摘要:** 聚羟基脂肪酸酯解聚酶(polyhydroxyalkanoate depolymerase, PHAD)可用于聚羟基脂肪酸酯(polyhydroxyalkanoate, PHA)的降解回收, 为开发热稳定性好的 PHAD, 本研究在大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)中成功表达了来自短须嗜热单孢菌(*Thermomonospora umbrina*)的 PHA 解聚酶(TumPHAD), 并通过二硫键理性设计获得了热稳定性提升的突变体 A190C/V240C, 其最适温度为 60 °C, 比野生型提高 20 °C, 50 °C半衰期为 7 h, 是野生型酶的 21 倍。将突变体 A190C/V240C 用于典型 PHA 之一的聚羟基丁酸酯(polyhydroxybutyrate, PHB)降解, 在 50 °C条件下, PHB 的 2 h 和 12 h 降解率较野生型分别提高了 2.1 倍和 3.8 倍。本研究获得的 TumPHAD 突变体 A190C/V240C 具有耐高温、热稳定性好和 PHB 降解能力强的特点, 对 PHB 的降解回收具有重要意义。

**关键词:** 聚羟基脂肪酸酯; 聚羟基脂肪酸酯解聚酶; 热稳定性改造; 二硫键; 聚羟基丁酸酯

资助项目: 国家重点研发计划(2019YFA0706900); 江苏省重点研发计划(BE2021625); 江苏省政策引导类计划(BZ2020010)  
This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2019YFA0706900), the Jiangsu Provincial Key Research and Development Program (BE2021625), and the Jiangsu Provincial Policy Guidance Program (BZ2020010).

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

Received: 2022-12-12; Accepted: 2023-05-04

# Expression, thermal stability modification and application in PHB degradation of polyhydroxyalkanoate depolymerase from *Thermomonospora umbrina*

LI Zhigang<sup>1,2</sup>, CHEN Shiheng<sup>1,2</sup>, KONG Demin<sup>1,2</sup>, CHEN Sheng<sup>1,2</sup>, WANG Lei<sup>1,2</sup>, WU Jing<sup>1,2\*</sup>

1 State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

**Abstract:** Polyhydroxyalkanoate depolymerase (PHAD) can be used for the degradation and recovery of polyhydroxyalkanoate (PHA). In order to develop a PHAD with good stability under high temperature, PHAD from *Thermomonospora umbrina* (TumPHAD) was heterologously expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3). At the same time, a mutant A190C/V240C with enhanced stability was obtained *via* rational design of disulfide bonds. Characterization of enzymatic properties showed that the mutant A190C/V240C had an optimum temperature of 60 °C, which was 20 °C higher than that of the wild type. The half-life at 50 °C was 7 hours, at 50 °C which was 21 times longer than that of the wild type. The mutant A190C/V240C was used for the degradation of polyhydroxybutyrate (PHB), one of the typical PHA. At 50 °C, the degradation rate of PHB being treated for 2 hours and 12 hours was 2.1 times and 3.8 times higher than that of the wild type, respectively. The TumPHAD mutant A190C/V240C obtained in this study shows tolerance to high temperature resistance, good thermal stability and strong PHB degradation ability, which may facilitate the degradation and recovery of PHB.

**Keywords:** polyhydroxyalkanoate; polyhydroxyalkanoate depolymerase; thermal stability modification; disulfide bond; polyhydroxybutyrate

聚羟基脂肪酸酯(polyhydroxyalkanoate, PHA)是微生物体内用于储存碳源和能量的可生物降解聚酯<sup>[1]</sup>,当碳源供应远大于需求时,PHA会以包涵体的形式在细胞内积攒,在碳源缺乏时为细胞提供能量<sup>[2]</sup>。根据组成PHA单体的C原子的数量<sup>[3]</sup>,可以将PHA分为3类:由3-5个C组成的是短链PHA;由6-14个C组成的是中链PHA;由超过14的C组成的是长链PHA<sup>[4]</sup>。

聚羟基丁酸酯(polyhydroxybutyrate, PHB)是一种具有代表性的PHA,结晶度高、质地坚硬<sup>[5]</sup>,是一种热塑性生物塑料<sup>[6]</sup>,凭借其优越

的物理、机械和免疫学性能有望取代聚丙烯和聚乙烯等石油基塑料<sup>[7]</sup>。随着PHB的应用越来越广泛,人们对PHB的降解研究也越来越多。PHB在特定条件下可以被降解,但存在条件苛刻、降解速率慢、能耗大等问题,酶降解能在一定程度上解决这些问题。PHB材料大规模回收处理往往在高温环境中进行,因此挖掘降解能力强、耐热能力强的PHB解聚酶有重要意义。

目前,已经从委内瑞拉链霉菌(*Streptomyces venezuelae*) SO1<sup>[8]</sup>、草酸青霉菌(*Penicillium oxalicum*) DSYD05-1<sup>[9]</sup>、脱叶链霉菌(*Streptomyces*

*exfoliatus*) K10 DSMZ<sup>[10]</sup>、子囊链霉菌(*Streptomyces ascomycinicus*)<sup>[11]</sup>、南极拟酵母(*Pseudozyma antarctica*)<sup>[12]</sup>、烟曲霉菌(*Aspergillus fumigatus*) Pdf1<sup>[13]</sup>、筒青霉菌(*Penicillium simplicissimum*) LAR13<sup>[14]</sup>、链霉菌(*Streptomyces* sp.) KJ-72<sup>[15]</sup>、深红螺菌(*Rhodospirillum rubrum*)<sup>[16]</sup>和拟青霉菌(*Paecilomyces* sp.) 1407<sup>[17]</sup>等菌株中发现 PHA 解聚酶(PHA depolymerase, PHAD), 并且测定了酶学性质, 其中大部分酶的最适温度为 30–40 °C, 极少数酶的最适温度为 50 °C, 但也存在高温环境下稳定性差的缺陷, 这意味着目前发掘的 PHA 解聚酶难以满足高温环境下的应用需求。

本研究表达了一种来自短须嗜热单孢菌(*Thermomonospora umbrina*)的 PHA 解聚酶(TumPHAD), 研究了其酶学性质, 并通过定点突变引入二硫键提高其最适温度和热稳定性, 得到突变体 A190C/V240C, 最后借助高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)和傅里叶变换红外光谱(fourier transform infrared spectrometer, FTIR)对酶降解 PHB 的能力进行评价, 最后得到一种耐高温、降解能力强的 PHA 解聚酶突变体 A190C/V240C。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要实验材料

#### 1.1.1 菌株及质粒

大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109 和 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞为本实验室保藏。pET-28a(+)质粒为本实验室保藏。

#### 1.1.2 主要试剂

DNA 聚合酶 2×Phanta Max Master Mix 购自南京诺唯赞生物科技有限公司; 限制性内切酶 QuickCut *Dpn* I、核酸上样缓冲液 10×Loading Buffer、DL10 000 DNA Marker、Premixed Protein Marker (Low)购自宝生物 TaKaRa 生物工

程有限公司; 蛋白质快速凝胶电泳试剂盒(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)试剂盒、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液购自上海碧云天生物技术有限公司; 质粒提取试剂盒购自江苏康为世纪生物科技股份有限公司; TumPHAD 的基因序列及突变的引物均由苏州安升达生物科技有限公司合成; 聚羟基丁酸酯(PHB)、对硝基苯酚(*p*-nitrophenol, *p*NP)购自上海麦克林生化科技有限公司; 3-羟基丁酸(3-hydroxybutyric acid, 3-HB)、4-硝基苯基丁酸酯(4-nitrophenyl butyrate, *p*NPB)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 卡那霉素(kanamycin, Kana)购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

#### 1.1.3 主要仪器

PCR 仪购自伯乐生命医学产品有限公司; DNA 电泳仪购自北京六一生物科技有限公司; 蛋白凝胶电泳仪购自伯乐生命医学产品有限公司; 凝胶成像仪购自上海天能科技有限公司; 分光光度计购自上海美谱达仪器有限公司; 高压匀浆破壁机购自基伊埃技术设备有限公司; 高速离心机购自贝克曼库尔特有限公司; 傅里叶变换红外光谱仪购自尼高力仪器公司; 高效液相色谱仪购自安捷伦科技有限公司。

### 1.2 基因挖掘

目前报道的耐高温、耐碱性环境的 PHA 解聚酶数量较少, 为开发能高温降解 PHA 的酶, 从 BRENDA 数据库中筛选最适温度和最适 pH 较高的 PHA 解聚酶蛋白序列, 以其为探针在 NCBI 数据库中 BLASTp, 筛选保留与探针序列 50%–80%相似性且目的序列彼此之间相似性低于 80%的序列, 以获取耐热耐碱性环境的蛋白序列。使用 AlphaFold 进行结构模拟, 使用 AutoDock 以 PHB 的三聚体为配体进行分子对接, 选定来自 *T. umbrina* 的潜在 PHA

解聚酶为研究对象, 其未被注释和报道, 后续对其进行克隆表达和性质研究。

### 1.3 重组质粒构建

对来自 *T. umbrina* 的 PHA 解聚酶(NCBI 登录号为 WP\_116026544.1)基因序列进行了针对 *E. coli* 中表达的密码子优化, 优化后基因由苏州安升达生物科技有限公司合成。

将目的基因通过酶切连接构建至 pET-28a(+)载体上, 得到重组质粒并转化至宿主 *E. coli* JM109 感受态细胞中, 均匀涂布到 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  卡那霉素平板上, 37  $^{\circ}\text{C}$  过夜培养, 挑取单菌落, 培养后提取质粒, 使用 *Nco* I 对其酶切验证, 随后测序验证正确后得到重组质粒 pET-28a(+)-*Tu*。

### 1.4 目的蛋白表达纯化

构建重组表达菌株 *E. coli* BL21(DE3)/pET28a(+)-*Tu*, 挑取单菌落至 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  卡那霉素 LB 培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$  过夜培养。以 5% (体积分数)接种量接种 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  卡那霉素 TB 培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 2 h, 加入终浓度为 0.2 mmol/L 的异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside, IPTG)诱导, 30  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 继续培养 24 h。随后收集发酵液, 4  $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 收集菌体, 加入 Tris-HCl 缓冲液(20 mmol/L, pH 8.0)重悬, 在 4  $^{\circ}\text{C}$ 、85 MPa 压力条件下高压匀浆破壁 5 min, 4  $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 10 min 收集上清中的粗酶液, 并使用 Ni-NTA 对粗酶进行纯化。使用平衡缓冲液冲洗柱子后将粗酶加到纯化柱中, 分别使用 30、60、150 mmol/L 咪唑进行梯度洗脱, 通过 SDS-PAGE 对不同洗脱条带进行分析以探究其最适洗脱浓度, 使用超滤管(10 kDa)对纯酶进行浓缩换液以除去其中咪唑对蛋白的影响, 并通过 SDS-PAGE 验证纯化酶的纯度。

### 1.5 酶活测定方法的建立

底物配制: 称取适量 pNPB, 使用乙腈溶解, 配制成浓度为 50 mmol/L 的 pNPB 溶液。

在 0.5 cm 比色皿中, 加入 1.44 mL 预热的缓冲液, 加入 30  $\mu\text{L}$  酶液和 30  $\mu\text{L}$  酶活测定底物, 摇匀后立即放入分光光度计中, 每隔 5 s 测量一次吸光值, 反应时间 1 min。

酶活定义: 一定条件下, 每分钟催化 pNPB 水解生成 1  $\mu\text{mol}$  pNP 所需要的酶量为一个酶活力单位(U)。

$$\text{酶活力(U/mL)} = \frac{(K - b) \times V_1 \times N}{a \times V_2 \times 1000}$$

式中: K: 酶反应所测不同时间 A 值和时间所成曲线的斜率;  $V_1$ : 反应体积(mL);  $V_2$ : 加酶量(mL);  $N$ : 稀释倍数;  $a=0.0058$ ,  $b=0.0097$  (由 pNP 标准曲线得出)。

### 1.6 最适温度及热稳定性测定

按照酶活测定方法测定其最适温度, 分别在 30  $^{\circ}\text{C}$ 、35  $^{\circ}\text{C}$ 、40  $^{\circ}\text{C}$ 、45  $^{\circ}\text{C}$ 、50  $^{\circ}\text{C}$ 、55  $^{\circ}\text{C}$ 、60  $^{\circ}\text{C}$ 、65  $^{\circ}\text{C}$ 、70  $^{\circ}\text{C}$  下测定纯化酶在 50 mmol/L 的 Tris-HCl (pH 8.0)缓冲液中的酶活, 每组设置 3 次平行, 酶活以相对酶活的形式表示。

热稳定性的测定方法为, 将适当稀释的纯化酶放入 50  $^{\circ}\text{C}$  水浴锅中孵育, 每隔一段时间取样并测定其残余酶活, 每组设置 3 次平行。酶活以相对酶活的形式表示。

### 1.7 最适 pH 及 pH 稳定性测定

最适 pH 的测定方法为用不同 pH 值的缓冲液(pH 6.0–8.0 采用 50 mmol/L 的磷酸盐缓冲液, pH 8.0–8.5 采用 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液, pH 8.5–10.0 采用 50 mmol/L 的甘氨酸-NaOH 缓冲液)对纯化酶进行适度稀释, 按照酶活测定方法, 测定其在 40  $^{\circ}\text{C}$  条件下的酶活, 每组设置 3 次平行, 酶活以相对酶活的形式表示。

pH 稳定性的测定方法为, 使用不同 pH 缓

冲液稀释的纯化酶置于 4 °C 环境中保存 24 h, 使用最适 pH 缓冲液测酶活, 每组设置 3 次平行, 酶活以相对酶活的形式表示。

### 1.8 RMSF 分析及热稳定性改造

对 TumPHAD 进行结构模拟后, 使用分子动力学模拟分析 TumPHAD 的均方根波动(root mean square deviation, RMSF), 考察各个氨基酸残基运动的自由程度, 在自由程度离散较大的部分添加二硫键以增加蛋白的热稳定性。

通过 Disulfide by Design 2 预测二硫键并结合 RMSF 分析选定 6 对二硫键, 设计突变引物(表 1), 以 pET-28a(+)-*Tu* 重组质粒为模板, 以表 1 中对应引物进行第一轮 PCR 扩增, 体系为:

2×Phanta Max Master Mix 12.5 μL, 模板 1 μL, 上游和下游引物各 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 9.5 μL, 扩增条

件为: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 6 min, 共循环 30 次; 72 °C 延伸 10 min。得到的 PCR 产物使用 *Dpn* I 消化模板质粒后转入 *E. coli* JM109 感受态细胞中, 培养方式同 1.3。提取其中的质粒, 测序正确后得到单点突变质粒。以单点突变质粒为模板用表 1 中对应引物再次进行 PCR 扩增, 方法同上, 得到二硫键双突变质粒 pET-28a(+)-A190C/V240C、pET-28a(+)-E188C/V240C、pET-28a(+)-E42C/D110C、pET-28a(+)-G228C/G253C、pET-28a(+)-A37C/P104C 和 pET-28a(+)-T28C/A93C, 转入 *E. coli* BL21(DE3) 构建重组表达菌株。

### 1.9 降解 PHB 能力的评价方法

PHA 解聚酶可以水解 PHB 生成 3-羟基丁酸(3-HB), 通过 FTIR、HPLC 测定 PHB 的消耗

表 1 突变引物设计

Table 1 Mutation primer design

Name of mutants	Primer name	Primer sequence (5'→3')	Size (bp)
E188C/V240C	E188C-F	TGTATGCGT <b>GT</b> CTGGCGGG	19
	E188C-R	CCCGCCAG <b>AC</b> ACGCATACA	19
	V240C-F	CGGCGTGGT <b>GT</b> AACGTGAA	19
	V240C-R	TTTCACGTT <b>AC</b> ACCACGCCG	20
A190C/V240C	A190C-F	GCGGAACT <b>GT</b> GTGGCGCGG	19
	A190C-R	CGCGCC <b>AC</b> ACAGTTCCGCAT	20
	V240C-F	CGGCGTGGT <b>GT</b> AACGTGAA	19
	V240C-R	TTTCACGTT <b>AC</b> ACCACGCCG	20
E42C/D110C	E42C-F	CCCGCT <b>GT</b> TCATCCGGTG	19
	E42C-R	GACCGGAT <b>GA</b> CACAGCGGG	19
	D110C-F	GCAAAGT <b>GT</b> TCTGGAACG	19
	D110C-R	CGTTCCAG <b>AC</b> ACACTTTGC	19
G228C/G253C	G228C-F	GTGTTTTTT <b>T</b> GTAGCGGCTG	20
	G228C-R	CAGCCGCT <b>AC</b> AAAAAAACAC	19
	G253C-F	GGTGAGCT <b>GT</b> CCGCTCGAC	19
	G253C-R	TTCGAGCG <b>GA</b> CAGCTCACC	19
A37C/P104C	A37C-F	GGATCT <b>GT</b> TAGCAGCCCG	19
	A37C-R	GGGCTGCT <b>AC</b> ACAGATCCGC	20
	P104C-F	GCGGCAGCT <b>GT</b> TTTCATGG	19
	P104C-R	CCATGAAA <b>AC</b> AGCTGCCGCT	20
T28C/A93C	T28C-F	AAGGCAGCT <b>GT</b> ACCCTGTT	19
	T28C-R	AACAGGGT <b>AC</b> AGCTGCCTTC	20
	A93C-F	GGCATTGAT <b>GT</b> TCTGGCGCG	20
	A93C-R	CGCGCCAG <b>ACA</b> ATCAATGCC	20

Codons used for mutation were indicated in bold.

或 3-HB 的生成量评价野生型 TumPHAD 及其突变体对 PHB 的降解能力。向 15 mL 粗酶液 (4.0 g/L, pH 8.0) 中加入 30.0 mg PHB, 50 °C、170 r/min 反应 12 h, 每隔 2 h 取样, 期间保持 pH 为 8.0, 设置 3 组平行实验, 且设置空白对照。反应 12 h 后, 重新向反应体系中加入 15 mL 酶液, 每隔 2 h 取样检测, 计算 3-HB 的生成量并比较补加酶液前后降解率的变化情况。

### 1.9.1 FTIR 测定 PHB 降解情况

PHB 在被降解后官能团会发生改变, 通过 FTIR 对比反应前后 PHB 官能团的变化评价 PHB 的降解程度。将反应 6 h 的样品在 12 000 r/min 条件下离心 5 min, 保留沉淀, 使用 ddH<sub>2</sub>O 多次清洗后, 高温烘干, 使用 FTIR 检测。检测条件: 在 ATR 模式下, 分辨率为 1 cm<sup>-1</sup>, 扫描范围为 4 000–650 cm<sup>-1</sup>。

### 1.9.2 HPLC 测定 3-HB 生成量

通过 HPLC 定量测定 3-HB 的生成量来定量分析 PHB 的降解率。反应体系 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 使用 1 mol/L 硫酸调至 pH 2.0, 离心取上清并使用 0.22 μm 水相滤膜进行过滤, 随后使用 HPLC 进行分析。检测条件:

Aminex HPX-87H Column (300 mm×7.8 mm), 流动相为 5 mmol/L 硫酸, 紫外检测波长 210 nm, 进样量 20 μL, 流速 0.6 mL/min, 柱温 20 °C。

配制不同浓度的 3-HB 标准液, 使用 HPLC 检测分析, 绘制浓度-峰面积标准曲线用于计算 3-HB 的生成量。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因挖掘筛选和重组质粒构建

从 BRENDA 数据库中选出来源于 *S. venezuelae* (NCBI 登录号为 AFQ93689.1) 和荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*, NCBI 登录号为 AAA64538.1) 的 2 条最适温度和最适 pH 较高的蛋白序列, 筛选出与探针序列相似性 50%–80% 且序列之间相似性低于 80% 的 103 条目的序列。在结果中选择嗜热来源的 *T. umbrina* 蛋白序列进行结构模拟和分子对接, 其底物结合口袋位于蛋白表面, 且凹槽较大(图 1A), 有利于大分子底物结合, 对其克隆表达和应用研究。

经 *Nco* I 单酶切后的重组质粒 pET-28a(+)-*Tu* 大小为 6 036 bp, 大小符合预期, 且测序验证正确, 获得了 pET-28a(+)-*Tu* 重组质粒(图 1B)。

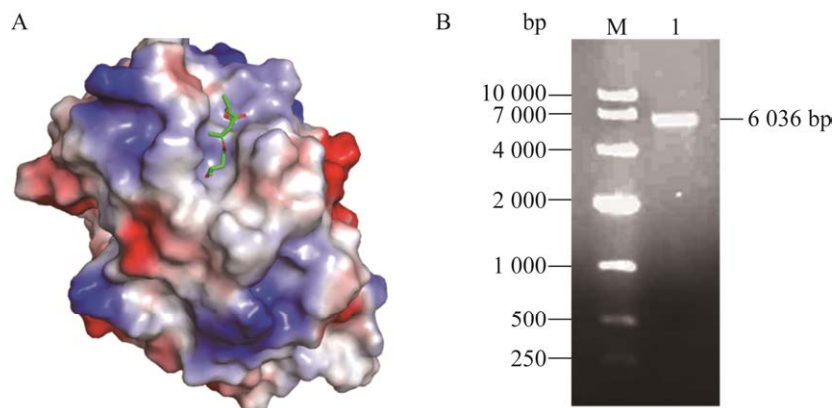


图 1 TumPHAD 的分子对接和基因克隆 A: TumPHAD 的表面电位和分子对接. B: TumPHAD 的基因酶切验证. M: Marker; 1: *Nco* I 酶切质粒

Figure 1 Molecular docking and gene cloning of TumPHAD. A: Surface potential and molecular docking of TumPHAD. B: Gene digestion validation of TumPHAD. M: Marker; 1: Single enzyme digestion of plasmid by *Nco* I.

## 2.2 TumPHAD 表达和纯化

对 TumPHAD 的基因序列分析可知, 其编码的蛋白理论分子量为 27.6 kDa。对粗酶进行纯化, 收集 150 mmol/L 的洗脱液进行浓缩。图 2 为重组蛋白 TumPHAD 的 SDS-PAGE 分析结果。经过纯化之后能够得到单一的条带, 分子量大小与预期结果相符, 且条带单一无杂带, 说明已经获得纯度较高的 TumPHAD, 比活为 15.1 U/mg。

## 2.3 TumPHAD 酶学性质测定

在工业生产中酶的性质对应用具有很大的影响, 对 TumPHAD 的酶学性质进行分析, 结果如图 3 所示。研究结果表明 TumPHAD 的最适温度为 40 °C, 在 35–45 °C 范围内的相对酶

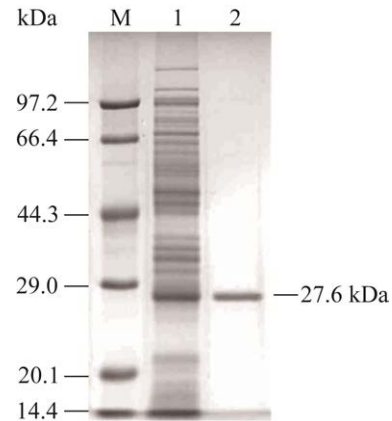


图 2 TumPHAD 的表达与纯化 M: Marker; 1: TumPHAD 粗酶; 2: TumPHAD 纯酶

Figure 2 Expression and purification of TumPHAD. M: Marker; 1: Crude TumPHAD; 2: Purified TumPHAD.

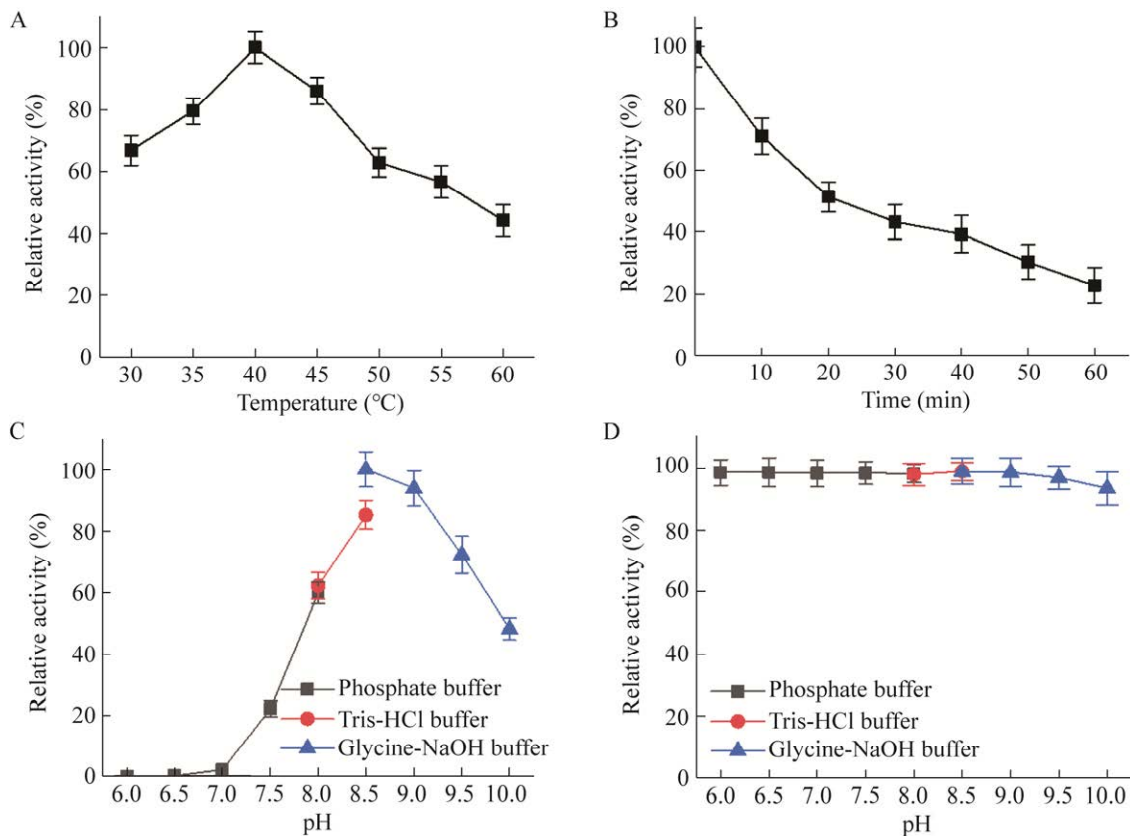


图 3 TumPHAD 的酶学性质 A: 最适温度. B: 50 °C 的稳定性. C: 最适 pH. D: 24 h 的 pH 稳定性  
Figure 3 Enzymatic properties of TumPHAD. A: Optimum temperature. B: Stability at 50 °C. C: Optimum pH. D: The 24-hour pH stability.

活均能达到 70%以上(图 3A); 在 50 °C 条件下其半衰期仅为 20 min, 热稳定性较差(图 3B); 最适 pH 为 8.5, 在 pH 8.5–9.5 范围内酶活均能达到 70%以上(图 3C); 在 pH 6.0–10.0 范围内的 24 h 的 pH 稳定性较高, 酶活均在 90%以上(图 3D)。上述结果表明 TumPHAD 的最适温度仅为 40 °C, 且在 50 °C 条件下的半衰期仅为 20 min 左右, 这远远达不到实际应用的要求, 因此后续对野生型 TumPHAD 进行了热稳定性改造, 以提高其最适温度和热稳定性。

## 2.4 TumPHAD 的 RMSF 分析及突变位点设计

为探究影响 TumPHAD 热稳定性的区域, 对其进行分子动力学模拟分析 RMSF, 结果如图 4 所示, 结果表明 24–30、34–44、101–113、226–243 位点范围内的氨基酸残基柔性较大, 根据 Disulfide by Design 2 预测, 选取能够在区域内位点和区域外位点之间形成二硫键的突变体组合: T28C/A93C、A37C/P104C、E42C/D110C、E188C/V240C、A190C/V240C 和 G228C/G253C。

## 2.5 TumPHAD 的二硫键突变体构建及热稳定性测定

根据表 1 引物构建单突变 T28C、A37C、

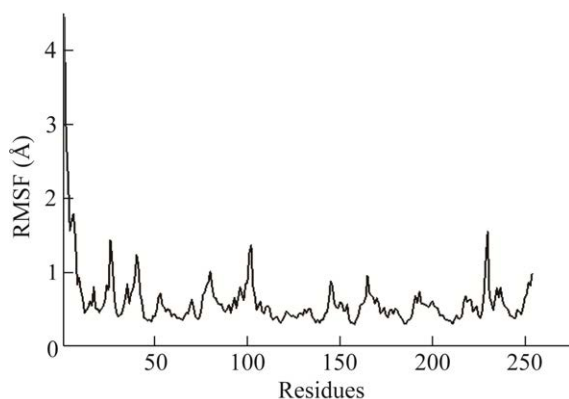


图 4 TumPHAD 的 RMSF 分析结果  
Figure 4 RMSF analysis of TumPHAD.

E42C、V240C 及 G228C, 测序成功后, 分别叠加 A93C、P104C、D110C、E188C、A190C、G253C (V240C 有 2 种组合) 获得突变体 T28C/A93C、A37C/P104C、E42C/D110C、E188C/V240C、A190C/V240C 和 G228C/G253C。测序成功后, 在 *E. coli* BL21(DE3) 中表达, 在 50 °C 条件下测定粗酶稳定性(图 5), 结果表明 E188C/V240C 的半衰期为 8 min 左右, E42C/D110C 的半衰期为 17 min 左右、G228C/G253C 的半衰期为 10 min 左右, A37C/P104C 的半衰期为 13 min 左右, E42C/D110C 的半衰期为 17 min 左右, 均低于野生型酶。A190C/V240C 在 40 min 仍未达到半衰期。

## 2.6 突变体 A190C/V240C 酶学性质测定

对突变体 A190C/V240C 进行表达和纯化, 其粗酶的表达和纯化效果与野生型 TumPHAD 一致(图 6), 突变体 A190C/V240C 的比活为 15.3 U/mg, 与野生型接近。随后测定其酶学性质, 结果如图 7 所示。最适温度为 60 °C, 在

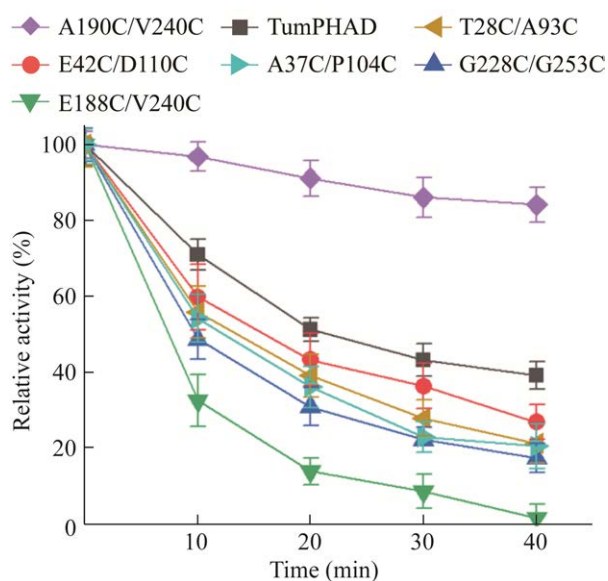
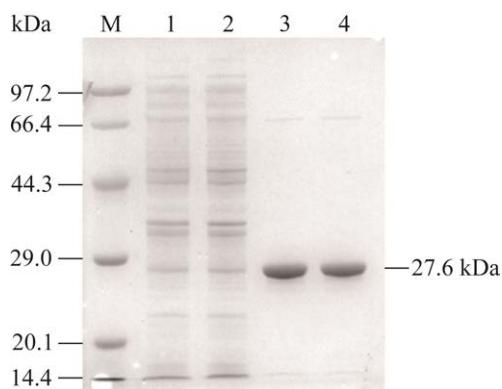


图 5 TumPHAD 及其突变体 50 °C 的稳定性  
Figure 5 Stability of TumPHAD and its mutants at 50 °C.





**图 6** TumPHAD 和突变体 A190C/V240C 的表达和纯化 M: Marker; 1: 1.0 mg/mL TumPHAD 粗酶; 2: 1.0 mg/mL 突变体 A190C/V240C 粗酶; 3: 1.0 mg/mL TumPHAD 纯酶; 4: 1.0 mg/mL A190C/V240C 纯酶

Figure 6 Expression and purification of TumPHAD and mutant A190C/V240C. M: Marker; 1: 1.0 mg/mL crude TumPHAD; 2: 1.0 mg/mL crude A190C/V240C; 3: 1.0 mg/mL purified TumPHAD; 4: 1.0 mg/mL purified A190C/V240C.

40–65 °C范围内的相对酶活均能达到 70%以上(图 7A); 50 °C条件下半衰期为 7 h, 是野生型的 21 倍(图 7B), 最适温度和热稳定性相比于野生型有明显提升, 最适 pH 为 9.0, 在 pH 8.0–9.5 范围内酶活均能达到 70%以上(图 7C); 在 pH 6.0–9.5 范围内的 24 h 的 pH 稳定性较高, 为 90%以上(图 7D); 最适 pH 相比于野生型酶略微提高, pH 稳定性相比于野生型酶略有下降, 但在 pH 在 8.0–9.0 使用, 不影响其实际应用效果。

突变体与野生型相比, 最适 pH 由 8.5 变为 9.0, 这导致了双突变体更耐受偏碱的环境, 因此在 pH 8.5–10.0 的环境中稳定性提高。此外, 双突变体发生最适 pH 偏移也是比较有趣的, 这可能和活性中心关键氨基酸的解离平衡有关。TumPHAD 是典型的 Ser 水解酶, 亲核进攻的氨基酸残基 Ser120 的解离平衡改变与最

适 pH 的偏移有关。值得注意的是, Ser120 与关键氨基酸 His194 存在一个氢键, His194 起到转移及平衡 Ser120 电荷的作用。His194 和二硫键突变位点之一 A190C 位于同一 loop, 双突变形成的二硫键(图 8A)可能增加 His194 与 Ser120 之间的距离, 分子动力学模拟结果也证明了这一判断(图 8B)。当 His194 与 Ser120 距离较远时, 质子转移能力变弱, 需要偏碱的环境达到平衡电荷的作用, 这是双突变体最适 pH 升高的主要原因。

## 2.7 降解 PHB 的效果评价

### 2.7.1 FTIR 测定 PHB 降解

比较突变体 A190C/V240C 与野生型 TumPHAD 对 PHB 的降解能力, 并使用 FTIR 分析 PHB 被不同酶处理前后的官能团变化情况。PHB 经 TumPHAD 和 A190C/V240C 降解 6 h 后, 对残留底物进行适当处理, 使用 FTIR 检测官能团变化。与对照相比, PHB 经过酶降解后在  $3\ 350\ \text{cm}^{-1}$  波长处产生 -OH 吸收峰, 在  $1\ 652\ \text{cm}^{-1}$  处产生新的 -C=O 吸收峰, 且 A190C/V240C 降解后的残留底物峰高变化程度比经 TumPHAD 降解更加明显(图 9), 这表明 PHB 在反应后被酶降解, 且 A190C/V240C 对 PHB 的降解效果优于 TumPHAD。

### 2.7.2 HPLC 测定 3-HB 的生成量

将 3-HB 标准液稀释成 6.633、4.975、3.317、1.658 g/L 4 个不同浓度并使用 HPLC 对其进行检测, 结果显示 3-HB 的出峰时间为 13.45 min, 且峰面积与浓度呈正比。以不同浓度 3-HB 为横坐标, 样品的峰面积为纵坐标, 绘制 3-HB 标准曲线。回归直线方程为  $y=929.55x$ ,  $R^2=0.998\ 5$ 。使用 HPLC 测定野生型(图 10A)及突变体(图 10B)在不同处理时间后体系中 3-HB 的浓度, 通过 3-HB 在体系中的总含量计算 PHB 降解率(图 10C)。TumPHAD 对 PHB 降解 2 h

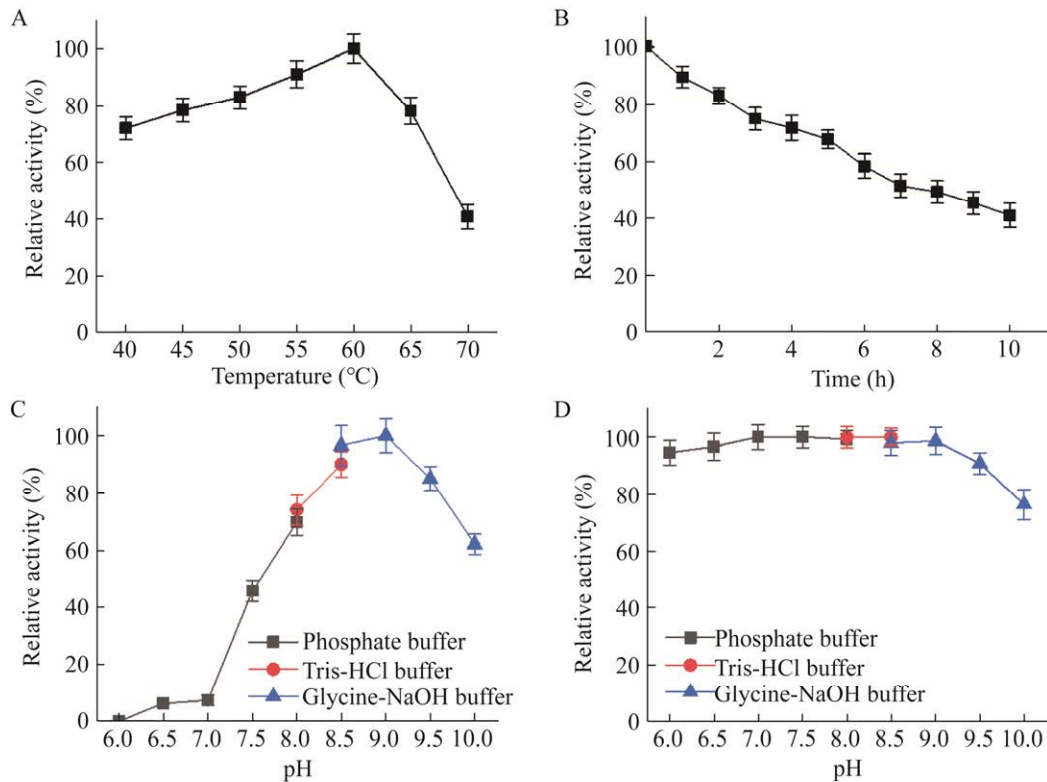


图7 突变体 A190C/V240C 的酶学性质 A: 最适温度. B: 50 °C 的稳定性. C: 最适 pH. D: 24 h 的 pH 稳定性

Figure 7 Enzymatic properties of mutant A190C/V240C. A: Optimum temperature. B: Stability at 50 °C. C: Optimum pH. D: The 24-hour pH stability.

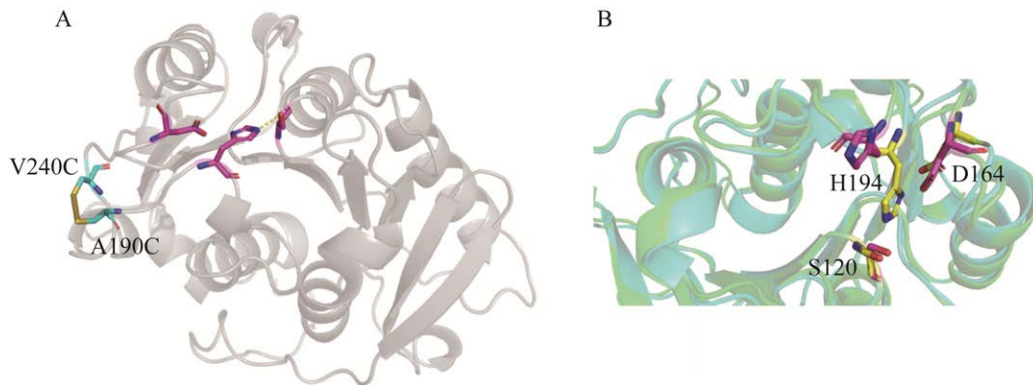


图8 突变体 A190C/V240C 结构和突变前后结构对比 A: 紫色部分是催化三联体; 蓝色部分是突变位点; 黄色部分是新形成的二硫键; B: 野生型的蛋白结构以蓝色显示, 其中黄色部分是催化三联体; 突变体的蛋白结构以绿色显示, 其中紫色部分是催化三联体

Figure 8 The structure of A190C/V240C and the comparison of structures before and after mutation. A: The purple part is the catalytic triplet; The blue part is the mutation site; The yellow part is the newly formed disulfide bond. B: The structure of the wild type is shown in blue, where the yellow part is the catalytic triplet; The structure of the mutant is shown in green, where the purple part is the catalytic triplet.

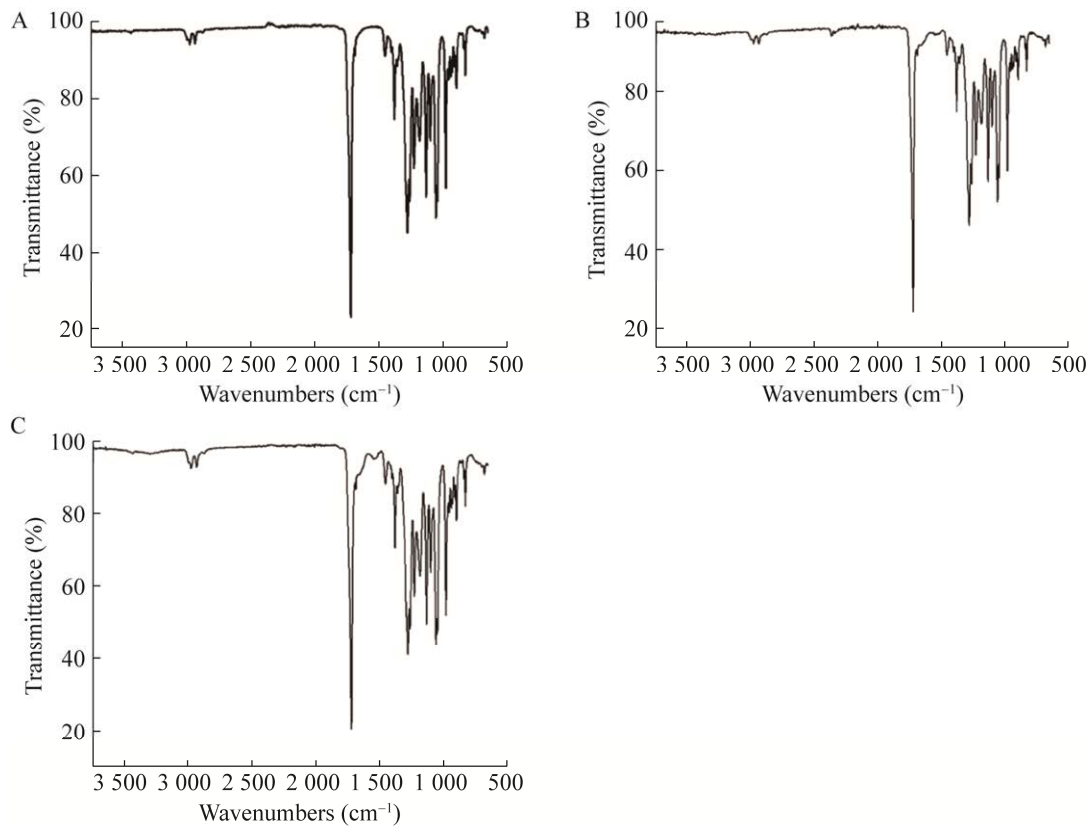


图9 PHB降解前后官能团分析 A: 降解前的PHB官能团. B: 经TumPHAD降解后的PHB官能团. C: 经突变体A190C/V240C降解后的PHB官能团

Figure 9 Functional group changes of PHB before and after degradation. A: PHB functional groups before degradation. B: PHB functional groups after degradation by TumPHAD. C: PHB functional groups after degradation by mutant A190C/V240C.

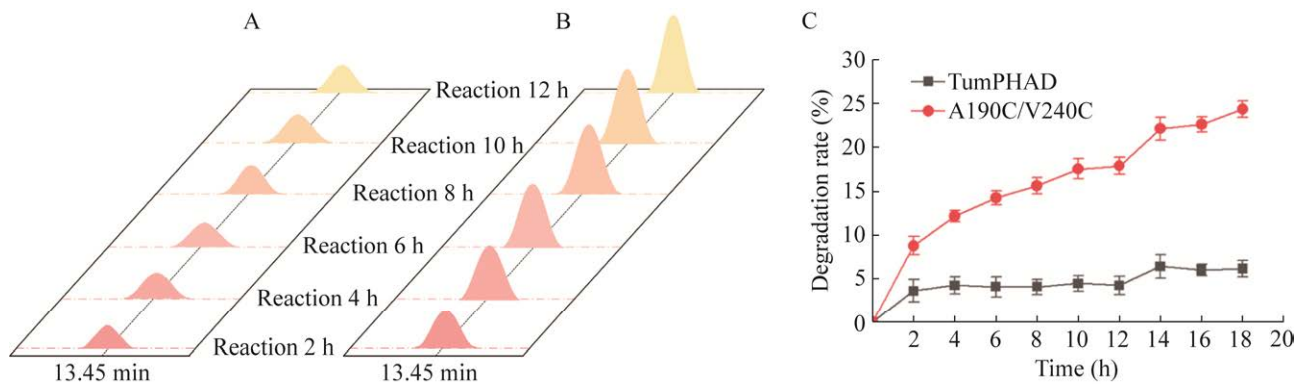


图10 3-HB的产量和PHB的降解率 A: TumPHAD降解过程中3-HB的生成量. B: 突变体A190C/V240C降解过程中3-HB的生成量. C: PHB的降解率

Figure 10 Production of 3-HB and degradation rate of PHB. A: Production of 3-HB during TumPHAD degradation. B: Production of 3-HB during A190C/V240C degradation. C: The degradation rate of PHB.

后, 降解率约为 4.0%, 反应 4-12 h 降解率保持不变, 在第 12 小时补加新酶液后, 降解率增加, 表明热稳定性是制约 TumPHAD 降解 PHB 的重要因素。A190C/V240C 对 PHB 降解 2 h 后, 降解率约为 8.5%, 反应 12 h 时降解率约为 17.5%, 随着时间延长, 3-HB 生成量不断增加, 表明二硫键的引入提高了酶的热稳定性, 对 PHB 的降解效果也显著提升。在第 12 小时补加新酶液之后, 3-HB 生成速率显著提高, 后期研究可考虑进一步提升 TumPHAD 及 A190C/V240C 热稳定性。已报道的来源于拟青霉菌(*Paecilomyces* sp.) 1407 的 PHB 降解酶<sup>[17]</sup>在反应 6 d 后可将 PHB 降解 30%, 与其相比 A190C/V240C 优势明显。

### 3 结论

本研究对来源于 *T. umbrina* 的 TumPHAD 进行了克隆表达及纯化, 测定其酶学性质, 随后通过理性设计方法引入二硫键以提高其热稳定性, 并对降解 PHB 的性能进行分析。TumPHAD 的比活为 15.1 U/mg, 最适 pH 为 8.5, 最适温度为 40 °C, 50 °C 的半衰期为 20 min。通过将 TumPHAD 的 190 位点及 240 位点引入半胱氨酸以形成二硫键的方式构建突变体 A190C/V240C, 其比活为 15.3 U/mg; 最适 pH 由 8.5 变为 9.0; 最适温度由 40 °C 变为 60 °C; 50 °C 条件下半衰期由 20 min 变为 7 h, 是野生型的 21 倍。在 50 °C 条件下, 进行 PHB 降解效果评价。使用 FTIR 对 TumPHAD 和突变体 A190C/V240C 酶解处理后的 PHB 粉末进行分析, 发现在 1 652  $\text{cm}^{-1}$  和 3 350  $\text{cm}^{-1}$  波长处产生 -C=O 和 -OH 吸收峰, 且突变体 A190C/V240C 酶解产物吸收峰高于野生型, 表明 PHB 得到降解且突变体 A190C/V240C 对 PHB 降解效果更明显。使用 HPLC 对 TumPHAD 和 A190C/V240C 降解 PHB 生成的 3-HB 含量进行检测, 并计算 PHB 的降解率。

突变体 A190C/V240C 的 2 h 降解率约为 8.5%, 是 TumPHAD 的 2.1 倍; 12 h 降解率约为 17.5%, 是 TumPHAD 的 3.8 倍。突变体 A190C/V240C 具有耐高温、热稳定性好和 PHB 降解效率高的特点, 在此基础上进一步提高其热稳定性或催化效率, 有望应用于 PHB 降解和 3-HB 回收, 对生态环境保护具有重要意义。

### REFERENCES

- [1] STEINBUCHER A. Perspectives for biotechnological production and utilization of biopolymers: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoate biosynthesis pathways as a successful example[J]. *Macromol Biosci*, 2001, 1(1): 1-24.
- [2] REINECKE F, STEINBUCHER A. *Ralstonia eutropha* strain H16 as model organism for PHA metabolism and for biotechnological production of technically interesting biopolymers[J]. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2009, 16(1/2): 91-108.
- [3] KIM MN, LEE BY, LEE IM, LEE HS, YOON JS. Toxicity and biodegradation of products from polyester hydrolysis[J]. *Journal of Environmental Science and Health Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 2001, 36(4): 447-463.
- [4] SHIVAKUMAR S. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) depolymerase from *Fusarium solani* Thom[J]. *Journal of Chemistry*, 2013, 2013: 1-9.
- [5] ROOHI, ZAHEER MR, KUDDUS M. PHB (poly- $\beta$ -hydroxybutyrate) and its enzymatic degradation[J]. *Polymers for Advanced Technologies*, 2018, 29(1): 30-40.
- [6] AKHLAQ S, SINGH D, MITTAL N, SRIVASTAVA G, SIDDIQUI S, AHMAD FARIDI S, SIDDIQUI MH. Polyhydroxybutyrate biosynthesis from different waste materials, degradation, and analytic methods: a short review[J]. *Polymer Bulletin*, 2022, 5(5): 1-33.
- [7] MCADAM B, FOURNET MB, MCDONALD P, MOJICEVIC M. Production of polyhydroxybutyrate (PHB) and factors impacting its chemical and mechanical characteristics[J]. *Polymers*, 2020, 12(12): 2908.
- [8] MARTA S, JOANA G, HELMUT K, MARTIN M, SERRA JUAN L, LLAMA MARÍA J. Polyester

- hydrolytic and synthetic activity catalyzed by the medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoate) depolymerase from *Streptomyces venezuelae* SO1[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(1): 211-22.
- [9] LI F, YU D, LIN XM, LIU DB, XIA HM, CHEN S. Biodegradation of poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) by a new *Penicillium oxalicum* strain DSYD05-1[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2012, 28(10): 2929-2935.
- [10] MARTÍNEZ V, de SANTOS PG, GARCÍA-HIDALGO J, HORMIGO D, PRIETO MA, ARROYO M, dela MATA I. Novel extracellular medium-chain-length polyhydroxyalkanoate depolymerase from *Streptomyces exfoliatus* K10 DSMZ 41693: a promising biocatalyst for the efficient degradation of natural and functionalized mcl-PHAs[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99: 9605-9615.
- [11] GARCÍA-HIDALGO J, HORMIGO D, ARROYO M, dela MATA I. Novel extracellular PHB depolymerase from *Streptomyces ascomycinicus*: PHB copolymers degradation in acidic conditions[J]. PLoS One, 2013, 8(8): e71699.
- [12] SHINOZAKI Y, MORITA T, CAO XH, YOSHIDA S, KOITABASHI M, WATANABE T, SUZUKI K, SAMESHIMA-YAMASHITA Y, NAKAJIMA-KAMBE T, FUJII T, KITAMOTO HK. Biodegradable plastic-degrading enzyme from *Pseudozyma antarctica*: cloning, sequencing, and characterization[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(7): 2951-2959.
- [13] IYER S, SHAH R, SHARMA A. Purification of *Aspergillus fumigatus* (Pdf1) poly(beta-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase using a new, single-step substrate affinity chromatography method: characterization of the PHB depolymerase exhibiting novel self-aggregation behavior[J]. Journal of Polymers and the Environment, 2000, 8(4): 197-203.
- [14] HAN JS, KIM MN. Purification and characterization of extracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Penicillium simplicissimum* LAR13[J]. Journal of Microbiology, 2002, 40: 20-25.
- [15] JUNG KH, DO YOUNG K, SIK NJ, SOOK BK, HA RY. Characterization of an extracellular medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoate) depolymerase from *Streptomyces* sp. KJ-72[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2003, 83(2): 183-9.
- [16] HANDRICK R, REINHARDT S, KIMMIG P. The "intracellular" poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase of *Rhodospirillum rubrum* is a periplasm-located protein with specificity for native PHB and with structural similarity to extracellular PHB depolymerases[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(21): 7243-7253.
- [17] LI F, GUO ZQ, WANG N, XIA HM, LIU DB, CHEN S. Biodegradation of poly(3-hydroxybutyrate)-derived polymers with different 4-hydroxybutyrate fractions by a novel depolymerase from *Paecilomyces* sp. 1407[J]. Polymer Degradation and Stability, 2019, 159: 107-115.

(本文责编 郝丽芳)