

基于结构信息的 MHET 降解酶挖掘及温和温度下的酶级联塑料降解

刘欣悦^{1,2}, 耿文超^{3,4}, 孙璿原², 陈泽华², 崔颖璐^{2*}, 吴边^{2*}

1 中国科学技术大学生命科学与医学部, 安徽 合肥 230027

2 中国科学院微生物研究所 微生物资源前期开发国家重点实验室 中国科学院微生物生理与代谢工程重点实验室, 北京 100101

3 南开大学化学学院, 天津 300071

4 中国科学院天津工业生物技术研究所 中国科学院系统微生物工程重点实验室, 天津 300308

刘欣悦, 耿文超, 孙璿原, 陈泽华, 崔颖璐, 吴边. 基于结构信息的 MHET 降解酶挖掘及温和温度下的酶级联塑料降解[J]. 生物工程学报, 2024, 40(3): 773-785.

LIU Xinyue, GENG Wenchao, SUN Jinyuan, CHEN Zehua, CUI Yinglu, WU Bian. Structure motif guided mining of MHET hydrolase and development of a two-enzyme cascade for plastics depolymerization at mild temperature[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(3): 773-785.

摘要: 聚对苯二甲酸乙二醇酯(polyethylene terephthalate, PET)的不规范使用和处置造成了严重的生态污染。酶法降解是一种环境友好的解决 PET 污染的方法。对苯二甲酸单(2-羟乙基)酯[mono(2-hydroxyethyl) terephthalate, MHET]是 PET 降解过程中的具有竞争性抑制效果的中间产物, 可由 MHET 降解酶催化水解。本研究采用生物信息学方法, 结合序列和结构信息, 发现了一种 MHET 水解酶, *BurkMHETase*。酶学性质研究表明该酶的最适 pH 和最适温度分别为 7.5 和 40 °C, 在 pH 7.5–10.0、30–45 °C 条件下相对稳定; 以 MHET 为底物测定动力学参数 k_{cat} 为 $(24.2 \pm 0.5) s^{-1}$, K_m 为 $(1.8 \pm 0.2) \mu mol/L$, 具有与目前最高效的 *IsMHETase* 相似的 k_{cat} 值和更高的底物亲和力。*BurkMHETase* 与 PET 降解酶 *IsPETase* 联用能够改善 PET 薄膜的降解效果。结构分析和突变实验表明, *BurkMHETase* 可能已经进化出特定的结构特征来催化 MHET 的水解。对于 MHET 降解酶, 在 495 位为芳香族氨基酸以及活性部位或远端氨基酸间的协同相互作用对于 MHET 水解活性似乎是必需的。因此, *BurkMHETase* 有潜力应用于 PET 双酶降解系统, 而所使用的生物信息学方法可以用来高效挖掘新的 MHET 降解酶。

关键词: 聚对苯二甲酸乙二醇酯; 塑料生物降解; 酶挖掘; 丝氨酸水解酶

资助项目: 国家重点研发计划(2018YFA0901600); 国家自然科学基金(31822002, 22201299); 生物资源计划(KFJ-BRP-009); 中国科学院前沿科学重点研究计划(ZDBS-LY-SM014)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFA0901600), the National Natural Science Foundation of China (31822002, 22201299), the Biological Resources Programme (KFJ-BRP-009), and the Key Research Program of Frontier Sciences from the Chinese Academy of Sciences (ZDBS-LY-SM014).

*Corresponding authors. E-mail: WU Bian, wub@im.ac.cn; CUI Yinglu, cuiyinglu@im.ac.cn

Received: 2023-05-12; Accepted: 2023-07-10

Structure motif guided mining of MHET hydrolase and development of a two-enzyme cascade for plastics depolymerization at mild temperature

LIU Xinyue^{1,2}, GENG Wenchao^{3,4}, SUN Jinyuan², CHEN Zehua², CUI Yinglu^{2*}, WU Bian^{2*}

1 Department of Life Sciences and Medicine, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, Anhui, China

2 CAS Key Laboratory of Microbial Physiological and Metabolic Engineering, State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

3 College of Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China

4 CAS Key Laboratory of Systems Microbial Biotechnology, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

Abstract: The utilization of polyethylene terephthalate (PET) has caused significant and prolonged ecological repercussions. Enzymatic degradation is an environmentally friendly approach to addressing PET contamination. Hydrolysis of mono(2-hydroxyethyl) terephthalate (MHET), a competitively inhibited intermediate in PET degradation, is catalyzed by MHET degrading enzymes. Herein, we employed bioinformatic methods that combined with sequence and structural information to discover an MHET hydrolase, *BurkMHETase*. Enzymatic characterization showed that the enzyme was relatively stable at pH 7.5–10.0 and 30–45 °C. The kinetic parameters k_{cat} and K_m on MHET were $(24.2 \pm 0.5)/s$ and $(1.8 \pm 0.2) \mu mol/L$, respectively, which were similar to that of the well-known *IsMHETase* with higher substrate affinity. *BurkMHETase* coupled with PET degradation enzymes improved the degradation of PET films. Structural analysis and mutation experiments indicated that *BurkMHETase* may have evolved specific structural features to hydrolyze MHET. For MHET degrading enzymes, aromatic amino acids at position 495 and the synergistic interactions between active sites or distal amino acids appear to be required for MHET hydrolytic activity. Therefore, *BurkMHETase* may have substantial potential in a dual-enzyme PET degradation system while the bioinformatic methods can be used to broaden the scope of applicable MHETase enzymes.

Keywords: polyethylene terephthalate; plastic biodegradation; enzyme mining; serine hydrolase

合成简单、成本低、耐用性高和/或透明度高的塑料给现代生活带来了极大的便利^[1-3]。然而,随之而来的是大量不可降解的塑料废物出现在生态系统中,携带各种有毒化学物质,对生态环境造成持久和深层的伤害^[4]。聚对苯二甲酸乙二醇酯(polyethylene terephthalate, PET)是应用最广泛的聚酯塑料之一,尤其在纺织和包装行业。生态友好型的生物降解是解决 PET 废料污

染的理想处理方法。过去 20 年的研究已发现,酯酶、脂肪酶和角质酶在较高温度下产生了理想的降解效果,实现了高效生物催化降解 PET^[5-13]。但它们的实际应用需要大量能源,且不能用于降解难以收集的塑料废物,如污水中的微塑料。因此,开发在温和的温度条件下的 PET 酶降解具有重要价值。酶水解 PET 的主要降解产物包括对苯二甲酸(terephthalic acid, TPA)、乙二醇

(ethylene glycol, EG)、对苯二甲酸单(2-羟乙基)酯[mono(2-hydroxyethyl) terephthalate, MHET]和对苯二甲酸双(2-羟乙基)酯[bis(2-hydroxyethyl) terephthalate, BHET]^[14-15]。由于 PET 降解是一个异相催化过程, PET 降解酶对可溶性中间产物的亲和力高于不溶性 PET。水解过程中释放的降解中间物(BHET 和 MHET)是 PET 降解酶的竞争性抑制剂。酶催化过程的动力学分析表明, PET 水解酶效率的限速步骤是 MHET 水解为 TPA^[16-17]。

2016 年, Yoshida 等分离出一种新的细菌大阪伊德氏杆菌(*Ideonella sakaiensis*) 201-F6, 能够以 PET 为主要能源和碳源, 在 30 °C 下生长^[13]。这种细菌利用双酶级联系统将 PET 解聚为 TPA 和 EG, 其中 *IsPETase* 将 PET 裂解为 BHET 和 MHET, 而产物 MHET 被 *IsMHETase* 催化水解, 生成 TPA 和 EG。*IsMHETase* 可用于降解 PET 降解过程中产生的 MHET, 有助于提高 PET 生物降解应用中的降解效率。然而, 尽管生物降解 PET 的研究已有近 20 年, *IsMHETase* 是唯一高效催化 MHET 水解的酶。*IsMHETase* 属于单宁酶家族, 水解其他脂肪族或芳香族酯类的活性低于该家族的其他酶, 而对 MHET 表现出高度的底物特异性^[13]。虽然已有实验表征 *IsMHETase*, 但远未理解 MHET 降解酶序列、结构和功能之间的关系。目前仅通过多序列比对分析确定了 2 个活性低很多的 MHET 降解酶同系物^[18]。通过酶挖掘探索, 不仅有可能发现更好的 MHET 降解酶, 而且有助于了解 *IsMHETase* 的催化机制。由于蛋白质的结构和功能密切相关, 结构特征已被广泛引入酶的挖掘中^[19-20]。例如, 在以前的研究中, 通过结合序列和结构分析, 报道了一个具有互补底物选择性、完全覆盖了天然 L-氨基酸的转氨酶工具箱^[21]。

本研究利用生物信息学方法, 根据 *IsMHETase* 的序列和结构信息, 挖掘具有降解

MHET 潜力的酶。结果发现了一种来自伯克霍尔德菌科细菌(*Burkholderiaceae* bacterium)的 MHET 降解酶, 即 *BurkMHETase*, 其与 *IsMHETase* 具有相似的高效 MHET 降解活性, 为这一相对罕见的酶类增加了一个新成员。对 *BurkMHETase* 的基础酶学性质进行了表征, 并与 PET 降解酶联用降解 PET 薄膜, 提升了 PET 降解效果, 确定其可以用于构建 PET 降解双酶系统。此外, 对关键残基的结构分析和定点突变, 加强了对 MHET 降解酶催化作用的理解, 有助于后续挖掘出更多活跃的 MHET 降解酶。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌(*Escherichia coli*) C41 和 BW25113 购自北京天根生化有限公司, 挖掘到的基因由安徽通用生物系统有限公司合成。

1.1.2 主要试剂和仪器

2×Primer STAR 酶购自北京 TaKaRa 公司; *Dpn* I 酶购自 New England Biolabs 公司; 质粒小提试剂盒购自北京天根生化科技有限公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司; MHET 购自河南阿尔法化工有限公司; PET 薄膜购自上海顾特服贸易有限公司。

高通量多功能读板仪, 购自上海帝肯贸易有限公司; HisTrap 亲和柱及 HiPrep 26/10 脱盐柱, 购自 GE 公司; 超滤浓缩管、C18 色谱柱, 购自北京绿百草生物科技有限公司; 蛋白纯化仪, 购自上海永联生物科技有限公司; 高效液相色谱仪, 购自岛津仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学挖掘

以 *IsMHETase* (NCBI 登录号: WP_054022745.1) 作为模板序列, 在 Mgnify^[22]、nr^[23] 和 UniRef90^[24] 数据库中搜索, *E*-value 阈值设置为

0.001, 获取每个数据库中前 1 000 条最相似的序列。去除冗余序列后, 使用 Biopython 中的序列比较模块, 根据限制的氨基酸位点筛选同源序列, 选择候选序列进行下一步的表达验证。

1.2.2 重组表达载体构建

根据大肠杆菌的密码子偏好性对基因序列进行密码子优化, 其中 *BurkMHETase* 基因被克隆到 pBAD 载体的 *Nco* I 和 *Xho* I 位点之间, 其他序列被插入到 pET-21a 载体的 *Nde* I 和 *Xho* I 位点之间, 在 C 端添加上 6×His-tag 标签, 以便于后续镍柱纯化。

1.2.3 同源蛋白表达和纯化

将含目的基因的 pET-21a 载体转化至 *E. coli* C41, 涂布在含 50 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 平板上, 37 °C 培养过夜。然后将这些菌株培养在 250 mL 含 90 μg/mL 氨苄青霉素的 2YT 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 培养。当 OD_{600} 达到 0.6–0.8 时, 加入终浓度为 90 μg/mL 的异丙基硫代-β-半乳糖苷诱导, 20 °C 培养 20 h。*BurkMHETase* 使用 *E. coli* BW25113 感受态细胞, 用 20% 的 L-阿拉伯糖诱导表达。8 000 r/min、4 °C 离心 10 min 收集菌体, 用 15 mL 缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl、300 mmol/L NaCl、10 mmol/L 咪唑, pH 8.0)重悬。35% 功率超声破碎约 15 min 后, 获得均一、清澈状态的菌液。14 000 r/min、4 °C 离心 40 min 收集上清, 用 0.22 μm 滤膜过滤。将过滤后的上清转移至 HisTrap HP 柱中, 洗涤缓冲液为 20 mmol/L Tris-HCl、300 mmol/L NaCl、45 mmol/L 咪唑(pH 8.0)。除去杂蛋白后, 增加缓冲液中的咪唑量, 洗脱目标蛋白。再将洗脱下的蛋白转移至 HiPrep 26/10 脱盐柱, 使用保存缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, pH 7.5)对其脱盐。用 50 kDa 的超滤管浓缩洗脱的蛋白后, 储存在保存缓冲液中。用 SDS-PAGE 检测纯化蛋白分子量和纯度, BCA

蛋白测定方法检测蛋白浓度。

1.2.4 同源蛋白酶活测定

以 MHET 为底物, 利用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)检测 TPA 的产生来测定同源酶的活性。反应在 30 °C, 含 45 mmol/L 磷酸钠、90 mmol/L 氯化钠、10% (体积分数)二甲基亚砜、1 mmol/L MHET、5 nmol/L 酶的缓冲液(pH 7.5)中进行^[18], 检测 2 h 内的酶活性。通过向在 10 μL 反应液中加入 20 μL 二甲基亚砜来终止反应。使用 HPLC 在 260 nm 处定量分析 TPA 浓度。反应物由 30% 溶剂 A (乙腈)和 70% 溶剂 B (0.1% 体积分数甲酸的水溶液)组成的流动相分离, 流速为 0.8 mL/min, 每次 10 μL 进样。每分钟释放 1 μmol TPA 的酶量被定义为一个单位(U)的 MHET 降解酶活性。

1.2.5 pH 和温度对 *BurkMHETase* 活性的影响

配制 45 mmol/L 柠檬酸钠, pH 4.0–6.0; 45 mmol/L 磷酸钠, pH 6.0–8.0; 45 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0–9.0; 45 mmol/L 甘氨酸-NaOH, pH 9.0–10.0 缓冲液, 按照方法 1.2.4 在 30 °C 下测定 *BurkMHETase* 的酶活。在最适 pH, 45 mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH 7.5)中反应, 温度范围设置为 20–55 °C, 按方法 1.2.4 测定 *BurkMHETase* 的酶活。将酶活最高者设定为 100%。

1.2.6 金属离子对 *BurkMHETase* 活性的影响

在含有 1 mmol/L MHET 和 0.5 mmol/L 或 5 mmol/L 金属离子($CoCl_2$, $MgCl_2$, $NiSO_4$, $CaCl_2$, $ZnSO_4$, $FeSO_4$, $CuSO_4$, $MnCl_2$)的 45 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5)中, 按方法 1.2.4 在 30 °C 下检测金属离子对 *BurkMHETase* 活性的影响。以不加金属离子的对照样品计算相对活性。

1.2.7 *BurkMHETase* 的动力学参数测定

在 pH 7.5、30 °C 下, 以不同浓度(2.5–100 μmol/L)的 MHET 为底物, *BurkMHETase* 浓

度为 0.2 nmol/L, 按方法 1.2.4 测定 12 min 内 *BurkMHETase* 的酶活。利用 Origin 2022b 按 Michaelis-Menten 方程进行非线性拟合计算动力学参数。

1.2.8 双酶联用降解 PET 效果测定

将直径为 8 mm 的圆形商业 PET 薄膜(结晶度为 7%)作为底物, 加入不同量的 *IsPETase*, 在总体积为 500 μ L 的 45 mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH 7.5)中于 30 $^{\circ}$ C 下反应。通过测量 1 h 的产物量来确定该条件下的最大 *IsPETase* 酶载量。然后, 在最大 *IsPETase* 酶量下进行双酶联用。将 *IsPETase*: MHET 降解酶(*BurkMHETase* 或 *IsMHETase*)按 10:1 添加量混合后, 在 30 $^{\circ}$ C 下反应, 按方法 1.2.4 检测 PET 薄膜的降解情况。

1.2.9 单点突变构建突变体

PCR 反应体系: 10 μ L 2 \times Primer STAR,

0.8 μ L 质粒 DNA, 1.5 μ L 上游和下游引物(表 1), 加 ddH₂O 补充至 20 μ L。PCR 程序为: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 共 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。添加 *Dpn* I 在 37 $^{\circ}$ C 下消化模板 DNA。将 PCR 产物转化到 *E. coli* DH5 α , 由天一辉远公司测序后, 获得目标质粒。

2 结果与分析

2.1 MHET 降解酶的挖掘

根据 *IsMHETase* 的晶体结构和突变实验^[18,25-26], 该酶是丝氨酸水解酶, 有一个由 S225-H528-D492 组成的催化三联体。*IsMHETase* 对底物的识别强烈依赖于 MHET 的苯环和羧基。位于 MHET 苯环两侧的 F415 和 F495 是通过疏水接触结合底物的关键, 能够通过 π -叠加作用从而稳定 MHET 的苯环结构^[25-26]。R411 和 S416 可以与 MHET

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')
G145R-F	GCGACCGGAAGTATCCGTGGCGGTCAGATCGCC
G145R-R	GATACTTCCGGTCGCCGCTGAGAGAGAGCC
M192Q-F	CAGGCACGCTTAGACCAGGGCTACAACCTCTAT
M192Q-R	GTCTAAGCGTGCCTGGGGATCGAGACCAAA
S260A-F	CCGAAGGCCGGAATTGCGGGCGCGTGGACCACC
S260A-R	AATTCCGGCCTTCGGCAACTGATATCCCGGT
R418S-F	ATCTGGTTTCTCAGCGTCTAGCTGGCTGGTGGA
R418S-R	CGCTGAGAAACCAGATACACGTTGTGCGTT
D423L-F	CGGAGCTGGCTGGTGTCTGTTTGCTACCCCGCCG
D423L-R	CACCAGCCAGCTCCGCGCTGAGAAACCAGA
R145G-F	GCACTGGGCGATCTGGGTGGTAGTCATGCAAGC
R145G-R	CAGATCGCCAGTGCCGACTCAGAACGCC
Q192M-F	ATCCGCAGGCACGTCTGGATATGGGCTATAATGCATATG
Q192M-R	ATCCAGACGTGCCTGCGGATCCATGCCAAAACCTCAC
A260S-F	CCGAAAGCCGGTATTAGCGGTGGTTGGACCACC
A260S-R	AATACCGGCTTTCGGCAGCTGATAACCCGG
S418R-F	AATGGCTTTAGCGCCGCAGTTGGCTGGTGCTG
S418R-R	GGCGCTAAAGCCATTCACGCGCTGTGCA
L423D-F	AGTAGTTGGCTGGTGGATTTTGCAACCCCGCCGG
L423D-R	CACCAGCCAACACTGGCGCTAAAGCCATT

的羧基形成氢键,所有已报道的 R411-S416 的 *IsMHETase* 双突变体水解活性都很小,推测两者可能在 MHET 的结合中发挥重要作用^[25]。据此,限制 *IsMHETase* 的同源物应该具有 S225-H528-D492 催化三联体,在 415 位和 495 位有不带电的芳香族氨基酸 F、Y 或 W,411 位有碱性氨基酸 R 或 K,416 位有带羟基的氨基酸 S 或 T(图 1)。

基于上述原则筛选到 4 条序列,分别是来自假食酸菌属(*Pseudacidovorax* sp.)的序列(NCBI 登录号:MBP6895731.1)、硫氧基单胞菌(*Comamonas thiooxydans*)的序列(NCBI 登录号:WP_034389536.1)、氢噬胞菌属(*Hydrogenophaga* sp. PML113)的序列(NCBI 登录号:WP_083293388.1)和 Burkholderiaceae bacterium 的序列(*BurkMHETase*, NCBI 登录号:MBP8102505.1),与 *IsMHETase* 的序列相似性分别为 99%、82%、73%和 68%。其中,来自 *C. thiooxydans* 和 *Hydrogenophaga* sp. PML113 的同源物已被确定具有催化 MHET 的降解活性^[18]。该搜索方法成功地获得了已有表征的活性酶,表明所发现的其他序列具有进一步的研究价值。之后,为了扩大候选序列的多样性,并研究 415 位和 495 位对活性的重要性,放宽了同时对 415 位和 495 位的芳香族氨基酸的限制,从获

得的序列中随机选择了 5 个序列(表 2)。AlphaFold2 预测的结构表明,这些酶都采用了典型的 α/β -水解酶的折叠方式,有 1 个催化中心和 1 个主要由 α -螺旋组成的盖子结构域,与 *IsMHETase* 有相似的整体结构和关键位点。

2.2 同源蛋白的表达纯化及活性测定

对候选序列进行重组表达和纯化,以进行后续实验表征。将目标基因片段克隆到 pET-21a 或 pBAD 载体中,在 C 末端融合 His₆ 标签,并在 *E. coli* C41 或 BW25113 中表达。使用 HisTrap HP 柱纯化后得到可溶性蛋白,测定其催化 MHET 的水解效率。除了来自酸杆菌(*Acidobacteria*)和耐林丹鞘氨醇盒菌(*Sphingopyxis lindanitolerans*)的同源蛋白未表现明显的 MHET 降解活性外,其余与 *IsMHETase* 具有高序列一致性的酶,即来自 *Pseudacidovorax* sp.、*C. thiooxydans*、*Hydrogenophaga* sp. PML113、慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium* sp.) dw_78、亚硫酸盐杆菌属(*Sulfitobacter* sp.) HI0023 和新鞘氨醇菌属(*Novosphingobium* sp.) MBES04 的同源蛋白都具有 MHET 降解活性(2.2–20.2 U/mg)(表 2)。特别是 *BurkMHETase* (分子量 62.4 kDa)(图 2A),表现出与 *IsMHETase* 相似的 MHET 降解活性(23.3 U/mg),这表明结合序列和结构信息的生物信息学方法可以快速有效地获得具有目标

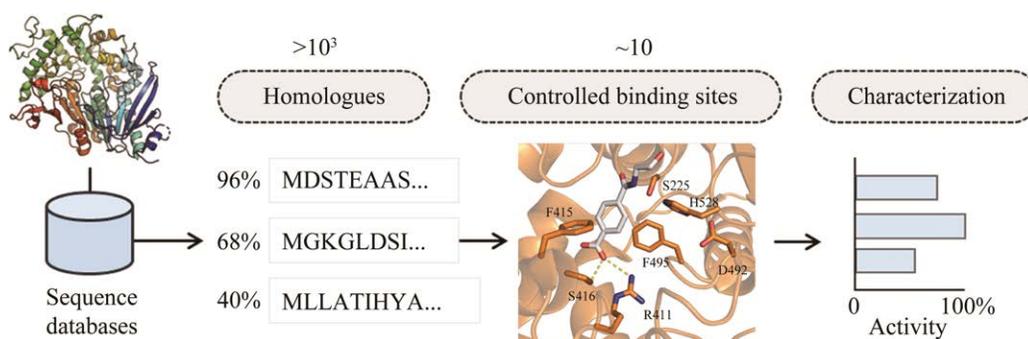


图 1 MHET 降解酶的挖掘流程图

Figure 1 Mining of MHET degrading enzymes.

表 2 所挖掘的酶的活性

Table 2 The specific activities of the mined enzymes

No.	Accession ID in the NCBI	Organism	Identity to <i>IsMHETase</i> (%)	Restricted site				Enzyme activity at 30 °C (U/mg)
				411	415	416	495	
<i>IsMHETase</i>	WP_054022745.1	<i>Ideonella sakaiensis</i> 201-F6	100	R	F	S	F	22.7
1	MBP6895731.1	<i>Pseudacidovorax</i> sp.	99	R	F	S	F	20.2
2	WP_034389536.1	<i>Comamonas thiooxydans</i>	82	R	F	S	F	15.0
3	WP_083293388.1	<i>Hydrogenophaga</i> sp. PML113	73	R	F	S	F	3.3
4	MBP8102505.1	Burkholderiaceae bacterium	68	R	F	S	F	23.3
5	WP_213773718.1	<i>Bradyrhizobium</i> sp. dw_78	57	R	A	S	F	3.8
6	KZY02578.1	<i>Sulfitobacter</i> sp. HI0023	47	K	L	S	F	2.2
7	GAM06779.1	<i>Novosphingobium</i> sp. MBES04	40	R	F	S	H	4.1
8	MXY23288.1	<i>Acidobacteria</i> bacterium	36	R	F	S	L	n.r.
9	WP_106000063.1	<i>Sphingopyxis lindanitolerans</i>	34	R	F	S	I	n.r.

n.r.: No reaction (the formation of TPA was below the detection limit of high-performance liquid chromatography analysis).

活性的酶，并大大减少了实验工作量。此外，这种基于结构特征的同源物序列搜索可以发现与野生型仅有 40% 序列一致性的功能序列。因此，该方法可以避免仅根据序列相似性排序筛选序列所造成的对潜在功能序列的忽视。

2.3 *BurkMHETase* 的表征

2.3.1 不同 pH 和温度对 *BurkMHETase* 的影响

按照酶活测定方法在 30 °C 下测定了 pH 对蛋白质活性的影响。如图 2B 所示，在相同 pH 条件下，磷酸盐缓冲液更适合 *BurkMHETase* 对 MHET 的催化反应。该酶在 pH 7.5 时显示出最佳活性，在 pH 为 7.0–10.0 时活性超过最大活性的 80%。与 *IsMHETase* 在 pH 6.0 时仍表现出高活性不同^[25]，当 pH 值低于 7.0 时，*BurkMHETase* 的活性迅速下降。

在最适 pH 7.5 下研究了温度对 *BurkMHETase* 活性的影响。结果表明(图 2C)，*BurkMHETase* 在 30–45 °C 时较稳定，酶的活性能保持在 70% 以上。*BurkMHETase* 在 30 °C 下具有比 *IsMHETase* 更高的活性^[25]，这有利于它在低温下与中温 PET 降解酶 *IsPETase* 结合。当温度上

升至 45 °C 以上，酶活迅速下降为最大活性的 25%。所以 *BurkMHETase* 的最适温度确定为 40 °C。

2.3.2 金属离子对 *BurkMHETase* 的影响

二价金属离子可能通过与氨基酸残基协调改变蛋白质结构，从而对催化效率产生积极或消极的影响。单宁酶家族中的大多数酶可以被 Mg^{2+} 激活，而 *BurkMHETase* 没有表现出这种现象^[27-32]。如图 2D 所示，在 0.5 mmol/L 浓度下， Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 对 *BurkMHETase* 的活性影响较小，仅有少量抑制作用，仍保留了 86%–96% 的活性。而 5 mmol/L 的 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 对 *BurkMHETase* 有一定的抑制作用，使其活性分别下降至初始活性的 19%、69%、76%。

对于难以收集的大量塑料垃圾，如污水中的微塑料，在室温下进行原位降解是一种更实用、更有前途的处理方法。考虑到环境中二价金属的浓度远低于 0.5 mmol/L^[33]，上述表征结果表明，*BurkMHETase* 在温和条件下降解环境微塑料方面很有前景。

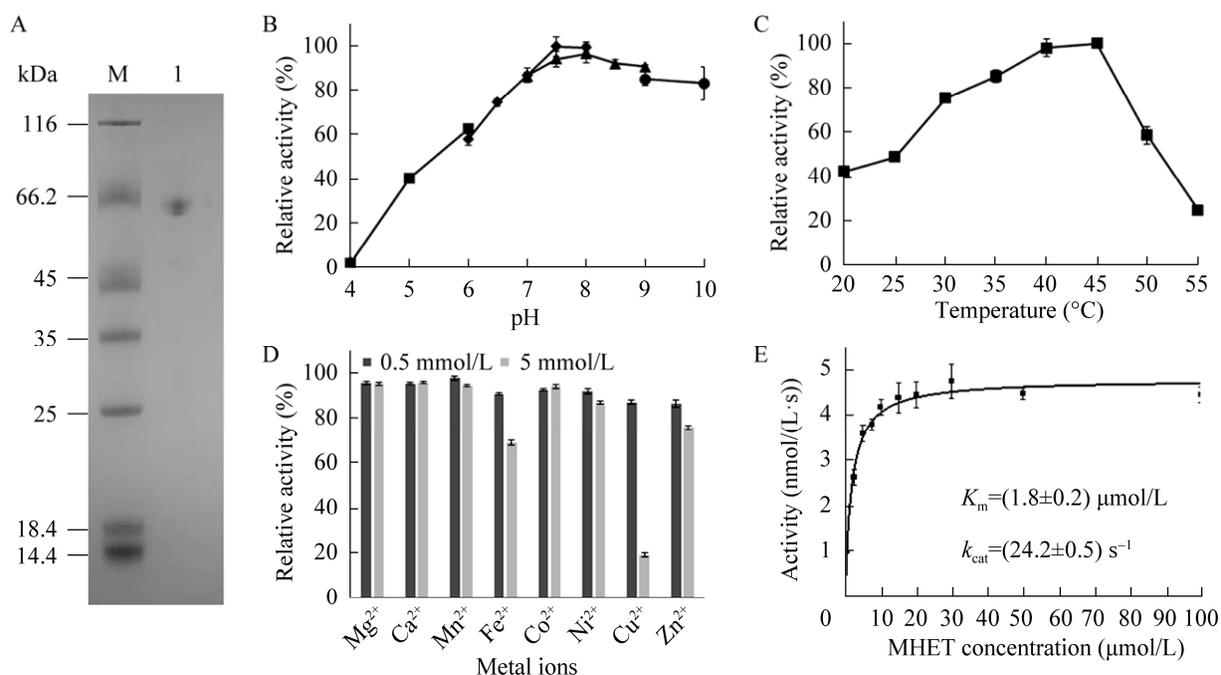


图2 *BurkMHETase* 的酶学特性

Figure 2 Enzymatic properties of *BurkMHETase*. A: SDS-PAGE analysis of *BurkMHETase* (62.4 kDa). M: Marker; Lane 1: *BurkMHETase*. B: Relative enzyme activity of *BurkMHETase* at different pH at 30 °C in citrate buffer (squares; pH 4.0–6.0), phosphate buffer (diamonds; pH 6.0–8.0), Tris-HCl buffer (triangles; pH 7.0–9.0), and glycine-NaOH buffer (circles; pH 9.0–10.0). C: Relative enzyme activity of *BurkMHETase* in 45 mmol/L phosphate buffer (pH 7.5) at different temperatures. D: Relative enzyme activity of *BurkMHETase* in the presence of different metal ions. E: Michaelis-Menten kinetics curve of 0.2 nmol/L *BurkMHETase* at 30 °C and pH 7.5. The standard deviation of the three replicates was shown by error bars.

2.3.3 *BurkMHETase* 的动力学参数

因计划将 *BurkMHETase* 在温和的条件下与 *IsPETase* 联合使用降解 PET，所以在 30 °C 和 pH 7.5 条件下，以不同浓度 MHET 为底物反应，测定了其动力学参数。如图 2E 所示，*BurkMHETase* 催化的 MHET 水解过程符合 Michaelis-Menten 方程。使用 Origin 2023b 软件非线性拟合计算出 *BurkMHETase* 的 K_m 和 k_{cat} 值分别为 $(1.8 \pm 0.2) \mu\text{mol/L}$ 和 $(24.2 \pm 0.5) \text{s}^{-1}$ 。*BurkMHETase* 具有与 *IsMHETase* 相似的催化活性和 k_{cat} 值，但 K_m 值比已报道的 *IsMHETase* 的 K_m 值 ($7.3 \mu\text{mol/L}$) 低^[13]，这表明 *BurkMHETase* 对 MHET 有着更高的结合亲和力。

2.4 *BurkMHETase* 与 *IsPETase* 联用降解 PET

由于 *BurkMHETase* 可以有效地催化 MHET 的水解，随后研究了 *BurkMHETase* 与 *IsPETase* 联用降解 PET 的情况。由于 PET 的降解是一个非均相反应，PET 上的酶可进入的位点是有限的^[34]。先使用结晶度为 7% 的商业 PET 薄膜，确定反应体系中最大 *IsPETase* 酶负荷为 $35 \mu\text{g/mL}$ 。按照 10:1 的添加量将 *IsPETase* 与 *IsMHETase* 或 *BurkMHETase* 联合使用。从结果可知(图 3)，MHET 降解酶的添加催化了反应中产生的 MHET 的完全水解。当与 *IsPETase* 联用时，*BurkMHETase* 对 PET 的降解效率显示出与 *IsMHETase* 相似的改善效果，可以用于构建双酶 PET 降解系统。

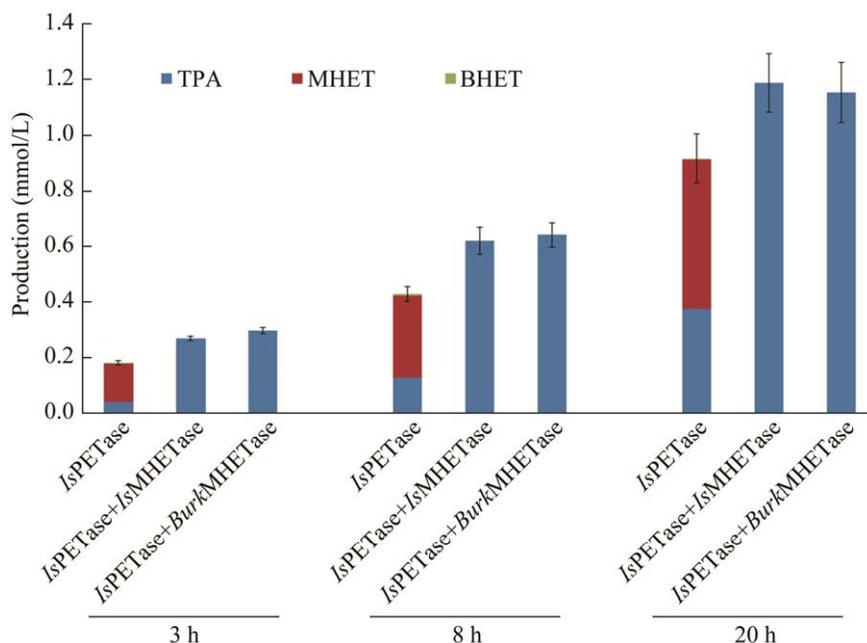


图 3 双酶联用降解 PET

Figure 3 Dual-enzyme degradation of PET. Depolymerization performance of PET in the presence of different enzymes at 30 °C. The concentrations of *IsPETase* and MHET-degrading enzyme (*BurkMHETase* or *IsMHETase*) were 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 3.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. The standard deviation of the three replicates was shown by error bars.

2.5 *IsMHETase* 与同源蛋白的结构功能分析

通过比较 *BurkMHETase* 的 AlphaFold2 预测结构和 *IsMHETase* 的晶体结构(PDB ID: 6JTT)来进行结构分析。除了个别柔性区域外,两者的主链结构几乎完全重合。分析底物结合位点 8.0 Å 以内的局部结构, *BurkMHETase* 的活性位点与 *IsMHETase* 的活性位点高度相似,但在 *IsMHETase* 的 G145、M192、S260、R418、D423 位点处有差异。随后定点突变了 *BurkMHETase* 和 *IsMHETase*, 把 145、192、260、418 位和 423 位的残基分别突变为对方的残基(图 4A)。

IsMHETase 的突变体 G145R、M192Q、S260A 和 D423L 的活性约下降了 10%以上(图 4B), 这表明 *IsMHETase* 的 145、192、260、423 位的原始残基可能对于保持高活性有着重要作用。与 *IsMHETase* 类似, 5 个 *BurkMHETase* 的突变体的降解活性也都有所降低。因此, 这些位置

对 MHET 水解活性的作用是相互依赖的, 只适用于特定的骨架结构, 并不单纯由某一特定的氨基酸决定。在 *IsMHETase* 和 *BurkMHETase* 中, 这 5 个位点处的氨基酸在水解 MHET 过程中可能会存在协同影响作用或者会与离活性部位更远的氨基酸存在相互作用。

分子动力学模拟研究^[35]表明, *IsMHETase* 可以在封闭和开放形式之间发生构象变化。与封闭构象相比, 在开放构象中 M192 的氢键占比明显降低。因此, 推测 M192Q 突变会与 T133 和 N134 产生 2 个新的氢键(图 5A), 这可能限制了局部构象的变化。此外, *IsMHETase* 存在 12 个在开放和封闭形式的氢键网络调节中起着关键作用的氨基酸位点(S136、S138、T179、P186、D198、F415、A417、D446、P449、W453、Q461 和 D465)。而值得注意的是, *BurkMHETase* 的这 12 个氨基酸中, 有 6 个

位置与 *IsMHETase* 不同(图 5B), 这可能会导致氢键网络的重塑。这部分解释了为什么从 *IsMHETase* 转移到 *BurkMHETase* 的突变会导致酶活性的降低。

IsMHETase 与配体的晶体结构显示, F415 表现出两种不同的构象, 其中 F415 和 R418 之间的阳离子- π 相互作用, 与 F415 和配体形成的 π - π 相互作用竞争。然而, 在 *BurkMHETase* 中, 在这个位置是一个 Ser 残基而不是 Arg 残基, 这使得 F415 与配体可以形成更稳定的 π - π

相互作用, 从而降低了 *BurkMHETase* 的 K_m 值(图 6A)。此外, 来自 *Novosphingobium* sp. MBES04 的同源蛋白, 在 495 位拥有 Phe 到 His 的突变, 仍然表现出明显 MHET 的水解活性, 这可能是由于在 495 位需要一个能产生共轭作用的基团来稳定反应过程中的电子离域(图 6B)。因此, *BurkMHETase* 的结构功能分析表明, 有必要进一步研究其动态变化, 才能够全面了解导致这种高特异性的配体-酶相互作用的原因。

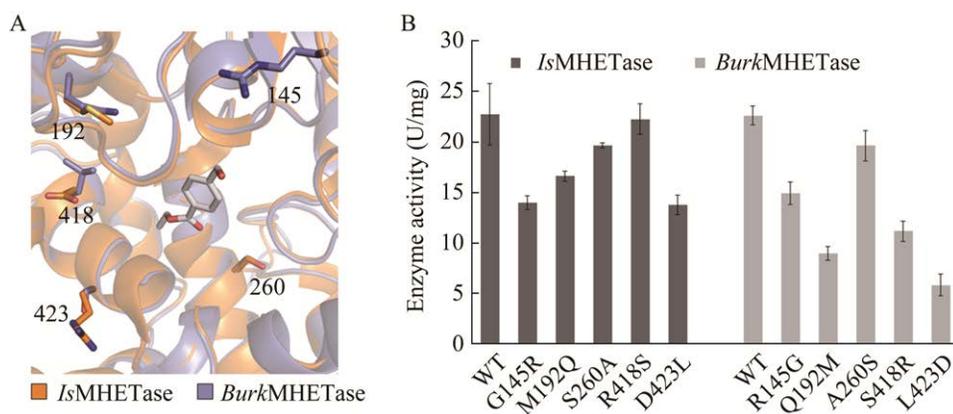


图 4 *IsMHETase* 与 *BurkMHETase* 的结构分析及突变体活性

Figure 4 Structural analysis and the activity of mutants of *IsMHETase* and *BurkMHETase*. A: Comparison of the active site structures of *IsMHETase* and *BurkMHETase*. B: Comparison of the activity of wild-types and mutants of *IsMHETase* and *BurkMHETase*. Error bars showed standard deviation of three replicates.

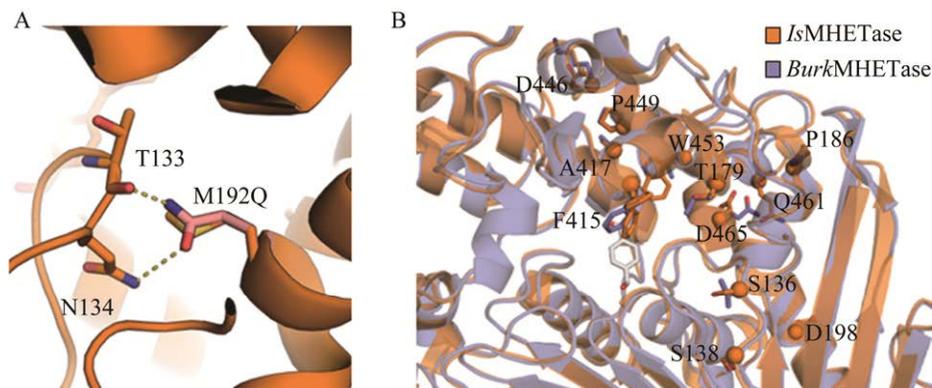


图 5 *IsMHETase* 的 192 位氨基酸及氢键网络

Figure 5 The 192-position amino acid and hydrogen bonding network of *IsMHETase*. A: Carbon atoms in the mutated Q192 were highlighted in pink. Hydrogen bonds shown in yellow dashed lines. B: $C\alpha$ and side chain atoms of key residues of MHETases in the H-bond network shown as spheres and sticks, respectively.

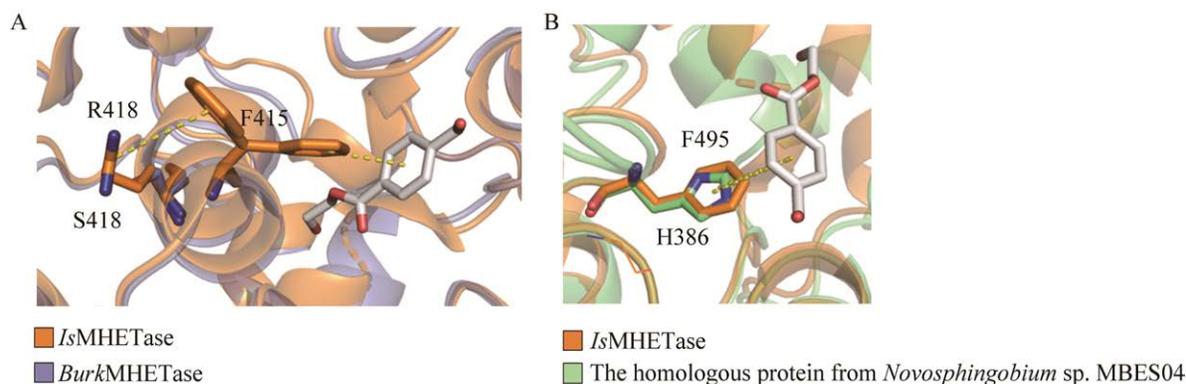


图 6 *IsMHETase* 与同源蛋白的局部结构对比

Figure 6 Comparison of the local structures of *IsMHETase* and homologous proteins. A: Comparison of the structures of *IsMHETase* and *BurkMHETase*. B: Comparison of the structures of *IsMHETase* and the homologous protein from *Novosphingobium* sp. MBES04.

3 讨论与结论

PET 塑料废物的堆积给全球塑料污染治理带来了巨大的挑战。不会造成二次污染、成本低的生物降解作为绿色环保的回收处理方式具有广阔的前景。2016年发现的 *IsPETase* 和 *IsMHETase* 双酶体系为温和条件下 PET 微塑料降解带来了新的契机。高效水解 MHET 的 *IsMHETase* 能快速解除 MHET 对 PET 水解酶的竞争性抑制作用,但目前确认这是唯一一个特异性 MHET 降解酶,对其结构功能关系仍需深入了解。本研究利用 *IsMHETase* 的序列和结构分析来挖掘 MHET 降解酶。挖掘出的 *BurkMHETase* 在低温下高效催化 MHET 降解,为相对稀缺的 MHET 降解酶家族提供了一个成员,并能与 *IsPETase* 联用有效加速 PET 的降解。

基础酶学表征显示,该酶在 pH 7.5、40 °C 下展示出最佳活性,在低温下有着较好的活性。5 mmol/L 的 Cu^{2+} 强烈抑制 *BurkMHETase* 的催化活性,但在环境金属离子浓度下基本无影响。此外, MHET 的苯环结构与附近氨基酸的

π - π 相互作用,可能导致 *BurkMHETase* 对 MHET 具有更高的底物亲和力。定点突变实验显示,495 位的能产生共轭作用的氨基酸对于 MHET 水解活性是必需的。MHET 结合口袋中的大多数位置是保守的,或强烈依赖于蛋白质中其余位置的氨基酸残基。这加深了对 *IsMHETase* 催化作用的结构基础认识,并有助于后续探索 MHET 降解酶的进化、结构和功能的研究。

BurkMHETase 可以有效地催化 MHET 的水解,因此, *Burkholderiaceae* bacterium 可能含有一种降解 PET 的酶。这种细菌的基因组值得探索,以确定是否存在新的在低温条件下有活性的 PET 降解酶。由于 MHET 水解酶的底物降解是一个非静态的过程,因此,后续应更加注重对该酶的动态分析或协同研究,这可能有助于识别出更多活跃的 MHET 水解酶。此外,在实验室条件下, *BurkMHETase* 可以通过双酶联用来降解 PET。然而, PET 大多存在于现实环境中的污水和海水中。因此,可以通过模拟这些水环境进行后续研究,以促进实际应用。

REFERENCES

- [1] ABOU-ZEID DM, MÜLLER RJ, DECKWER WD. Degradation of natural and synthetic polyesters under anaerobic conditions[J]. *Journal of Biotechnology*, 2001, 86(2): 113-126.
- [2] AL HOSNI AS, PITTMAN JK, ROBSON GD. Microbial degradation of four biodegradable polymers in soil and compost demonstrating polycaprolactone as an ideal compostable plastic[J]. *Waste Management*, 2019, 97: 105-114.
- [3] LEBRETON L, ANDRADY A. Future scenarios of global plastic waste generation and disposal[J]. *Palgrave Communications*, 2019, 5: 6.
- [4] SINGH N, HUI D, SINGH R, AHUJA IPS, FEO L, FRATERNALI F. Recycling of plastic solid waste: a state of art review and future applications[J]. *Composites Part B: Engineering*, 2017, 115: 409-422.
- [5] TOKIWA Y, SUZUKI T. Hydrolysis of polyesters by lipases[J]. *Nature*, 1977, 270(5632): 76-78.
- [6] NECHWATAL A, BLOKESCH A, NICOLAI M, KRIEG M, KOLBE A, WOLF M, GERHARDT M. A contribution to the investigation of enzyme-catalysed hydrolysis of poly(ethylene terephthalate) oligomers[J]. *Macromolecular Materials and Engineering*, 2006, 291(12): 1486-1494.
- [7] 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.
- [8] BILLIG S, OESER T, BIRKEMEYER C, ZIMMERMANN W. Hydrolysis of cyclic poly(ethylene terephthalate) trimers by a carboxylesterase from *Thermobifida fusca* KW3[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87(5): 1753-1764.
- [9] 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.
- [10] RONKVIST ÅM, XIE WC, LU WH, GROSS RA. Cutinase-catalyzed hydrolysis of poly(ethylene terephthalate)[J]. *Macromolecules*, 2009, 42(14): 5128-5138.
- [11] SULAIMAN S, YOU DJ, KANAYA E, KOGA Y, KANAYA S. Crystal structure and thermodynamic and kinetic stability of metagenome-derived LC-cutinase[J]. *Biochemistry*, 2014, 53(11): 1858-1869.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] KANELLI M, VASILAKOS S, NIKOLAIVITS E, LADAS S, CHRISTAKOPOULOS P, TOPAKAS E. Surface modification of poly(ethylene terephthalate) (PET) fibers by a cutinase from *Fusarium oxysporum*[J]. *Process Biochemistry*, 2015, 50(11): 1885-1892.
- [15] 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.
- [16] BARTH M, OESER T, WEI R, THEN J, SCHMIDT J, ZIMMERMANN W. Effect of hydrolysis products on the enzymatic degradation of polyethylene terephthalate nanoparticles by a polyester hydrolase from *Thermobifida fusca*[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2015, 93: 222-228.
- [17] BÅÅTH JA, BORCH K, JENSEN K, BRASK J, WESTH P. Comparative biochemistry of four polyester (PET) hydrolases[J]. *ChemBioChem*, 2021, 22(9): 1627-1637.
- [18] KNOTT BC, ERICKSON E, ALLEN MD, GADO JE, GRAHAM R, KEARNS FL, PARDO I, TOPUZLU E, ANDERSON JJ, AUSTIN HP, DOMINICK G, JOHNSON CW, RORRER NA, SZOSTKIEWICZ CJ, COPIÉ V, PAYNE CM, WOODCOCK HL, DONOHOE BS, BECKHAM GT, MCGEEHAN JE. Characterization and engineering of a two-enzyme system for plastics depolymerization[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(41): 25476-25485.
- [19] FINN RD, BATEMAN A, CLEMENTS J, COGGILL P, EBERHARDT RY, EDDY SR, HEGER A, HETHERINGTON K, HOLM L, MISTRY J,

- SONNHAMMER ELL, TATE J, PUNTA M. Pfam: the protein families database[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(D1): D222-D230.
- [20] SILLITOE I, LEWIS TE, CUFF A, DAS S, ASHFORD P, DAWSON NL, FURNHAM N, LASKOWSKI RA, LEE D, LEES JG, LEHTINEN S, STUDER RA, THORNTON J, ORENGO CA. CATH: comprehensive structural and functional annotations for genome sequences[J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(D1): D376-D381.
- [21] LI T, CUI XX, CUI YL, SUN JY, CHEN YC, ZHU T, LI CJ, LI RF, WU B. Exploration of transaminase diversity for the oxidative conversion of natural amino acids into 2-ketoacids and high-value chemicals[J]. *ACS Catalysis*, 2020, 10(14): 7950-7957.
- [22] MITCHELL AL, ALMEIDA A, BERACOCHEA M, BOLAND M, BURGIN J, COCHRANE G, CRUSOE MR, KALE V, POTTER SC, RICHARDSON LJ, SAKHAROVA E, SCHEREMETJEW M, KOROBENNIKOV A, SHLEMOV A, KUNYAVSKAYA O, LAPIDUS A, FINN RD. MGnify: the microbiome analysis resource in 2020[J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(D1): D570-D578.
- [23] LI WZ, KONDRATOWICZ B, MCWILLIAM H, NAUCHE S, LOPEZ R. The annotation-enriched non-redundant patent sequence databases[J]. *Database*, 2013, 2013: bat005.
- [24] LADUNGA I. Finding homologs to nucleotide sequences using network BLAST searches[J]. *Current Protocols in Bioinformatics*, 2002, Chapter 3: Unit 3.3.
- [25] PALM GJ, REISKY L, BÖTTCHER D, MÜLLER H, MICHELS EAP, WALCZAK MC, BERNDT L, WEISS MS, BORNSCHEUER UT, WEBER G. Structure of the plastic-degrading *Ideonella sakaiensis* MHETase bound to a substrate[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 1717.
- [26] SAGONG HY, SEO H, KIM T, SON HF, JOO S, LEE SH, KIM S, WOO JS, HWANG SY, KIM KJ. Decomposition of the PET film by MHETase using exo-PETase function[J]. *ACS Catalysis*, 2020, 10(8): 4805-4812.
- [27] MUKHERJEE G, BANERJEE R. Effects of temperature, pH and additives on the activity of tannase produced by a co-culture of *Rhizopus oryzae* and *Aspergillus foetidus*[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2006, 22(3): 207-212.
- [28] BENIWAL V, KUMAR A, GOEL G, CHHOKAR V. A novel low molecular weight acido-thermophilic tannase from *Enterobacter cloacae* MTCC 9125[J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2013, 2(2): 132-137.
- [29] FARAG AM, HASSAN SW, EL-SAYS AM, GHANEM KM. Purification, characterization and application of tannase enzyme isolated from marine *Aspergillus nomius* GWA5[J]. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 2018, 12(4): 1939-1949.
- [30] CHAITANYAKUMAR A, ANBALAGAN M. Expression, purification and immobilization of tannase from *Staphylococcus lugdunensis* MTCC 3614[J]. *AMB Express*, 2016, 6(1): 89.
- [31] KAR B, BANERJEE R, BHATTACHARYYA BC. Effect of additives on the behavioural properties of tannin acyl hydrolase[J]. *Process Biochemistry*, 2003, 38(9): 1285-1293.
- [32] CHHOKAR V, SANGWAN M, BENIWAL V, NEHRA K, NEHRA KS. Effect of additives on the activity of tannase from *Aspergillus awamori* MTCC9299[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2010, 160(8): 2256-2264.
- [33] BRENNECKE D, DUARTE B, PAIVA F, CAÇADOR I, CANNING-CLODE J. Microplastics as vector for heavy metal contamination from the marine environment[J]. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 2016, 178: 189-195.
- [34] 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.
- [35] PENG X, LU CL, PANG J, LIU Z, LU DN. A distal regulatory strategy of enzymes: from local to global conformational dynamics[J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2021, 23(39): 22451-22465.

(本文责编 郝丽芳)