



# 基于磷脂酶水解圈定向筛选高效聚对苯二甲酸乙二醇酯降解酶

徐翰<sup>1,2,3</sup>, 蔡忆梅<sup>1,2,3</sup>, 陈晓倩<sup>1,2,3</sup>, 黄青松<sup>1,2,3</sup>, 吴敬<sup>1,2,3</sup>, 陈晟<sup>1,2,3\*</sup>, 颜正飞<sup>1,2,3\*</sup>

1 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

2 江南大学食品科学与资源挖掘全国重点实验室, 江苏 无锡 214122

3 江南大学教育部食品安全国际合作联合实验室, 江苏 无锡 214122

徐翰, 蔡忆梅, 陈晓倩, 黄青松, 吴敬, 陈晟, 颜正飞. 基于磷脂酶水解圈定向筛选高效聚对苯二甲酸乙二醇酯降解酶[J]. 微生物学报, 2024, 64(3): 745-754.

XU Han, CAI Yimei, CHEN Xiaoqian, HUANG Qingsong, WU Jing, CHEN Sheng, YAN Zhengfei. Screening of efficient PET-degrading enzymes based on hydrolysis circle of phospholipase[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(3): 745-754.

**摘要:** 【目的】目前自然环境中聚对苯二甲酸乙二醇酯(polyethylene terephthalate, PET)废弃物的积累严重威胁生态健康, 因此 PET 的降解问题已成为全球性的热点问题。生物酶法降解 PET 技术以其绿色环保而备受关注, 但天然 PET 降解酶的催化活性普遍偏低, 亟待进一步定向改造。现阶段定向进化为快速提高 PET 降解酶催化性能提供了可能, 其中筛选方法是成功获得高性能突变体的关键所在。本研究旨在提出一种新型高效灵敏的筛选方法并应用于褐色喜热裂孢菌(*Thermobifida fusca*)来源角质酶 Tfu-0883 的定向改造, 以期快速获得 PET 降解活性提高的突变体。【方法】基于易错 PCR 构建突变体文库, 涂布于卵黄磷脂平板, 以水解圈的大小作为筛选指标获得 PET 降解活性提高的突变体; 对突变体进行酶学定性并筛选出潜在的分子改造位点, 最终获得高性能突变体。

【结果】从卵黄磷脂平板中挑取水解圈直径最大的单菌落, 即突变体 H10(N2D/D94H/A149E), 其 PET 降解能力是野生型的 1.5 倍, 最适温度与 pH 分别为 60 °C 和 8.0。突变体 H10 中第 2 位和第 149 位氨基酸残基远离底物结合凹槽, 其突变会导致酶蛋白稳定性下降; 第 94 位氨基酸残基则位于底物结合凹槽附近, 由负电荷氨基酸 Asp 突变为正电荷氨基酸 His, 有利于吸附在带负电荷的 PET 表面, 是突变体 H10 降解能力提升的关键因素; 随后将野生型的第 94 位氨基酸残基 Asp 分别突变为 His 及同为正电荷且空间位阻更小的 Lys 和 Arg, 突变体 D94H、D94K 和 D94R 对 PET 降解能力均有提升, 其中, 突变体 D94K 降解 PET 能力是野生型的 3.6 倍。【结论】本研究基于磷脂酶水解圈构

资助项目: 国家重点研发计划(2019YFA0706900); 国家自然科学基金(42307279)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2019YFA0706900) and the National Natural Science Foundation of China (42307279).

\*Corresponding authors. E-mail: CHEN Sheng, chensheng@jiangnan.edu.cn; YAN Zhengfei, zhengfeiyan@jiangnan.edu.cn

Received: 2023-07-30; Accepted: 2023-10-10; Published online: 2023-10-19

建了一种新的 PET 降解酶定向筛选方法，以此获得了降解活性提高的突变体，并证实角质酶 Tfu-0883 第 94 位氨基酸残基位点具有提升其 PET 降解活性的潜在能力。

关键词：定向进化；PET 降解；水解圈；热稳定性；分子改造

## Screening of efficient PET-degrading enzymes based on hydrolysis circle of phospholipase

XU Han<sup>1,2,3</sup>, CAI Yimei<sup>1,2,3</sup>, CHEN Xiaoqian<sup>1,2,3</sup>, HUANG Qingsong<sup>1,2,3</sup>, WU Jing<sup>1,2,3</sup>, CHEN Sheng<sup>1,2,3\*</sup>, YAN Zhengfei<sup>1,2,3\*</sup>

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

2 State Key Laboratory of Food Science and Resources, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 International Joint Laboratory on Food Safety, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

**Abstract:** [Objective] Since the accumulation of polyethylene terephthalate (PET) waste causes a major threat to the health of the natural environment, the degradation of PET has become a global hot issue. Enzymatic degradation of PET has garnered considerable attention because of its eco-friendly properties. However, due to the low catalytic activity, natural PET-degrading enzymes remain to be modified according to specific needs. Directed evolution enables the rapidly enhancement of the catalytic activities of PET-degrading enzymes, in which screening methods are the key for obtaining high-performance mutants. This study develops a novel, efficient, and sensitive screening method and applies it to direct modification of *Thermobifida fusca* cutinase Tfu-0883 to obtain the mutants with improved PET-degrading activity. [Methods] A mutant library constructed by error-prone PCR was coated on phospholipid plates. The mutant with improved PET-degrading activity was screened out based on the size of the hydrolytic circle. The enzymatic properties of the mutant were determined, and the rational modification sites were identified. Finally, a forward mutant was obtained. [Results] The single colony with the largest hydrolysis circle, mutant H10 (N2D/D94H/A149E), was selected from the phospholipid plate, with the PET-degrading activity 1.5 times that of the wild type. The mutant H10 exhibited the best performance at 60 °C and pH 8.0. The residues at positions 2 and 149 in the mutant H10 were distantly located from the substrate-binding groove, and any mutation in the residues would result in decreased enzyme stability. The residue at position 94 was situated near the substrate-binding groove, where it underwent a change from negatively charged Asp to positively charged His. This alteration facilitated adsorption onto the negatively charged PET surface and played a crucial role in enhancing the degradation ability of mutant H10. With the wild type as a template, the 94th amino acid residue was mutated to His, Lys, and Arg, which possess positive charges but exhibit reduced steric hindrance. The mutants D94H, D94K, and D94R all exhibited enhanced PET-degrading

ability. Notably, among these mutants, D94K demonstrated a 3.6-fold higher rate of PET degradation than the wild type. **[Conclusion]** We developed a method for screening PET-degrading enzymes based on the phospholipase cycle and obtained the mutants with enhanced PET-degrading activity. The 94th residue of the cutinase Tfu-0883 is demonstrated as the first to possess the potential for enhancing the PET-degrading activity.

**Keywords:** directed evolution; PET degradation; hydrolysis circle; thermostability; molecular modification

聚对苯二甲酸乙二醇酯 (polyethylene terephthalate, PET)是由对苯二甲酸(terephthalic acid, TPA)和乙二醇(ethylene glycol, EG)缩聚而成的聚酯塑料,占据了合成塑料总量的70%以上<sup>[1]</sup>。PET废弃物广泛分布于土壤与江河湖海,时刻威胁着生态环境,已成为较严峻的环境问题之一。废PET塑料常用的处理方法有填埋和焚烧,不但侵占土地资源、还会二次污染土壤、水以及大气环境。目前生物法降解PET技术因其绿色环保而备受关注,其中酶法以其高效性而受到越来越多学者的青睐<sup>[2]</sup>。Ronkvist等发现酯酶和角质酶可断裂PET主链上的酯键,促使PET断裂并降解<sup>[3]</sup>。Sulaiman等从落叶堆肥中发现一种角质酶(leaf-branch compost cutinases, LCC),在70 °C、24 h可降解25%的PET<sup>[4]</sup>。随后PET降解酶陆续被鉴定,如热裂溶纤维素菌(*Thermobifida cellulosilytica*)来源的角质酶TcCut1和TcCut2<sup>[5]</sup>、弯曲高温单胞菌(*Thermomonospora curvata*)来源的角质酶Tcur1278和Tcur0390<sup>[6]</sup>、大阪堺菌(*Ideonella sakaiensis*)来源的PETase<sup>[7]</sup>及食油微杆菌(*Microbacterium oleivorans*)JWG-G2来源的Lip<sub>19.8</sub><sup>[8]</sup>。

现阶段天然PET降解酶往往存在催化活性低的问题,故定向改造提升其催化强度已迫在眉睫。定向进化是集随机突变和高效筛选为一体的酶分子改造技术,然而最大瓶颈在于缺乏高效、敏感的筛选方法<sup>[9]</sup>。因此,选择合适的筛选方法是快速获得优势突变体的关键所在。常见的筛选

方法有琼脂平板、96微孔板、微流控和流式筛选法<sup>[10]</sup>。Shi等设计了一种对苯二甲酸双(2-羟乙基)酯衍生物[bis(2-hydroxyethyl) terephthalate, BHET-OH],其被PETase水解即可生成带有荧光信号的TPA-OH,基于此筛选到的高荧光突变体DepoPETase表现出优异的PET降解性能<sup>[11]</sup>。Liu等提出双荧光高通量筛选(high-throughput screening, HTS)方法用于PETase的定向进化,即在96孔板中包埋淬灭荧光探针的PET膜及酶的荧光蛋白标记,实现产物与酶的高通量检测,最终获得6个突变体,其PET降解活性较野生型PETase提高了1.3–4.9倍<sup>[12]</sup>。然而,这种将单细胞的基因型与表型偶联往往需要精密的芯片及复杂的仪器设备,成本较高且操作周期长,不利于大规模推广<sup>[10]</sup>。

前期研究发现褐色喜热裂孢菌(*Thermobifida fusca*)来源的角质酶Tfu-0883具有磷脂酶活性<sup>[13]</sup>,其磷脂酶活力与PET降解能力呈正相关。因此,本研究以角质酶Tfu-0883突变体D204C/E253C(2M)为初始模板<sup>[14]</sup>,利用易错PCR构建突变体文库,涂布于卵黄磷脂平板,以水解圈的大小作为筛选指标,获得性能优异的PET降解酶,这为PET降解酶的定向改造提供了一种新的筛选方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和试剂

*Escherichia coli* BL21(DE3)以及pET-24a(+)\_2M质粒均为本实验室保藏。无定型PET膜(结晶度

7.6%)购自顾特服剑桥有限公司;对苯二甲酸(terephthalic acid, TPA)购自 Sigma-Aldrich (上海);卵黄乳液购自海博生物公司(青岛);质粒提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;蛋白质快速凝胶电泳试剂盒(SDS-PAGE)购自上海碧云天生物技术有限公司;其他常用试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。

## 1.2 培养基及缓冲液

LB 液体培养基(g/L): NaCl 10.0, 酵母粉 5.0, 蛋白胨 10.0。卵黄磷脂筛选培养基: LB 液体培养基添加 2% (质量体积分数)的琼脂粉和 2% (质量体积分数)的卵黄乳液。TB 液体培养基(g/L): 甘油 5.0, 蛋白胨 12.0, 酵母粉 24.0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.3,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  12.5。不同 pH 的磷酸盐缓冲液: 100 mmol/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (用 100 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  调 pH 分别到 6.0、7.0、8.0 和 9.0)。

## 1.3 酶活性测定

采用 Ramrakhiani 等的方法以磷脂酰乙醇胺为底物测定磷脂酶活性<sup>[15]</sup>。采用 Billig 等的方法以对硝基苯丁酸酯(*p*-nitrophenylbutyrate, *p*NPB)为底物测定酯酶活性<sup>[16]</sup>。

## 1.4 蛋白浓度测定

采用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度<sup>[17]</sup>。

## 1.5 角质酶突变体文库的构建

参照冯慧玲等的方法<sup>[18]</sup>, 以 pET-24a(+)\_2M 质粒为模板, 通过易错 PCR 获得 2M 基因突变片段; 再通过全质粒大引物 PCR (megaprimer PCR of whole plasmid, Megawhop) 将其与 pET24a(+)载体连接, 并利用 *Dpn* I 酶过夜消除模板; 消化后的 PCR 产物经化学转化法导入 *Escherichia coli* BL21(DE3)感受态细胞中, 构建重组菌, 形成突变体文库。

## 1.6 卵黄磷脂水解圈初筛

上述重组菌涂布于终浓度为 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  卡那霉素及 0.1 mmol/L 诱导剂 IPTG 的卵黄磷脂筛选培养基, 于 37 °C 条件下培养 24 h, 观察单菌落

及其形成的水解圈大小, 水解圈直径大于野生型的突变体即为正向突变体。

## 1.7 正向突变体的制备与 PET 降解验证

取正向突变体的单菌落接入 5 mL LB 液体培养基(含 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  卡那霉素), 于 37 °C、200 r/min 培养过夜, 以 5%的接种量转接至 TB 培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 2–3 h 后, 加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG, 25 °C、200 r/min 培养 24 h。4 °C、8 000 r/min 离心获得上清液, 并通过镍柱纯化获得纯酶。取 5 mg 纯酶和 100 mg PET 混合加入 35 mL 100 mmol/L pH 8.0 磷酸盐缓冲液中, 在 60 °C、200 r/min 条件下反应 96 h, 取上清进行 HPLC 分析。

## 1.8 HPLC 分析

取反应液 1 mL, 12 000 r/min 离心 8 min, 上清液经 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤进行 HPLC 检测。HPLC 色谱柱为 Welch Ultimate XB-C18, 流动相为色谱级甲醇和 1% (质量体积分数)的乙酸水溶液按 35:65 (体积比)混合, 流速为 0.5 mL/min, 在 240 nm 处对降解产物 TPA 进行定量分析。

## 1.9 降解率的计算

通过做出标准溶液浓度与峰面积的标准曲线进而对样品中的 TPA 进行定量检测。PET 的降解率按如下公式进行计算:

$$\text{PET降解率(\%)} = \frac{m_1 \times M}{166.131 \times m_0} \times 100$$

式中,  $m_1$  代表 TPA 质量(mg); M 是 PET 单元的相对分子质量; 166.131 为 TPA 的相对分子质量;  $m_0$  代表 PET 初始质量(mg)。

## 2 结果与分析

### 2.1 筛选方法的建立及应用

基于前期获得的角质酶 Tfu-0883 突变体<sup>[19]</sup>, 经检测发现其对 PET 降解的活性与其磷脂酶活性呈正相关, 同时, 磷脂酶可在卵黄磷脂平板上形成水解圈(图 1A)。因此以磷脂酶水解圈大

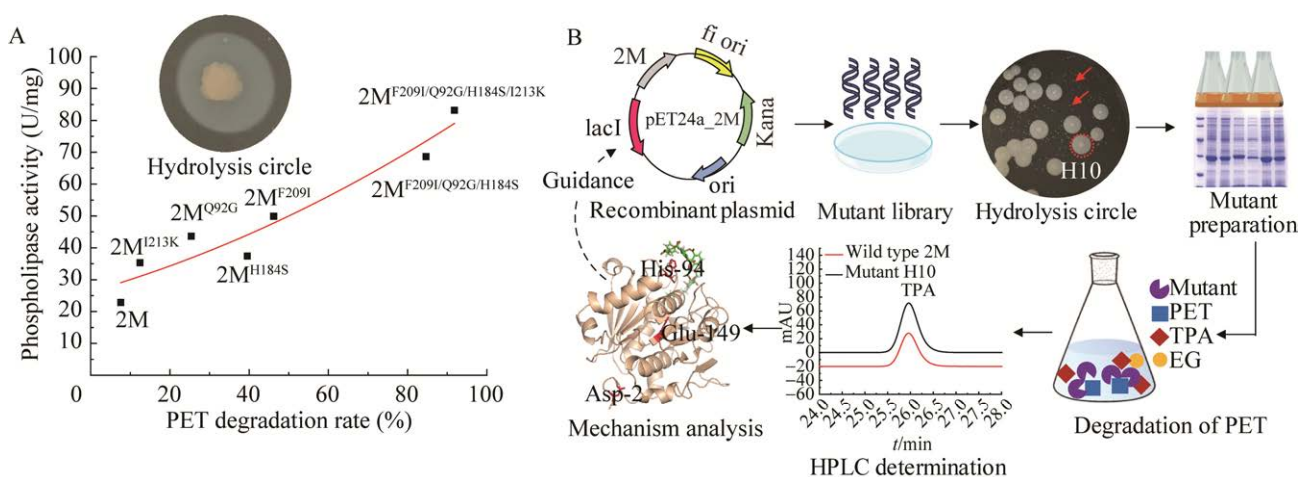


图 1 PET 降解酶定向改造的筛选方法示意图

Figure 1 Scheme of screening method for directed evolution of PET-degrading enzymes. A: Relationship between PET degradation activity of cutinase and its phospholipase activity. B: Scheme of directed evolution of cutinase. Mutation libraries of cutinase were generated *via* epPCR and were screened by phospholipid plates. The improved mutants were obtained by determination of hydrolysis circle and estimated in PET degradation by analysis of released monomers. Finally, the degradation mechanism has been elucidated which provides guideline for rational design reversely.

小为指标, 构建出 PET 降解酶快速筛选方法(图 1B)。相对于现有的 96 微孔板、液滴微流控等多级多轮筛选方法, 本筛选方法在获得单菌落的同时即完成了筛选工作, 其操作过程简单高效。将易错 PCR 构建的突变体文库并涂布于卵黄磷脂平板, 37 °C 培养 24 h。相对于野生型 2M (0.52 cm), 选取水解圈直径最大(1.02 cm)的单菌落, 即突变体 H10(N2D/D94H/A149E)。突变体 H10 在 96 h 内可降解 11.2% 的 PET 膜, 是野生型 2M 的 1.5 倍。

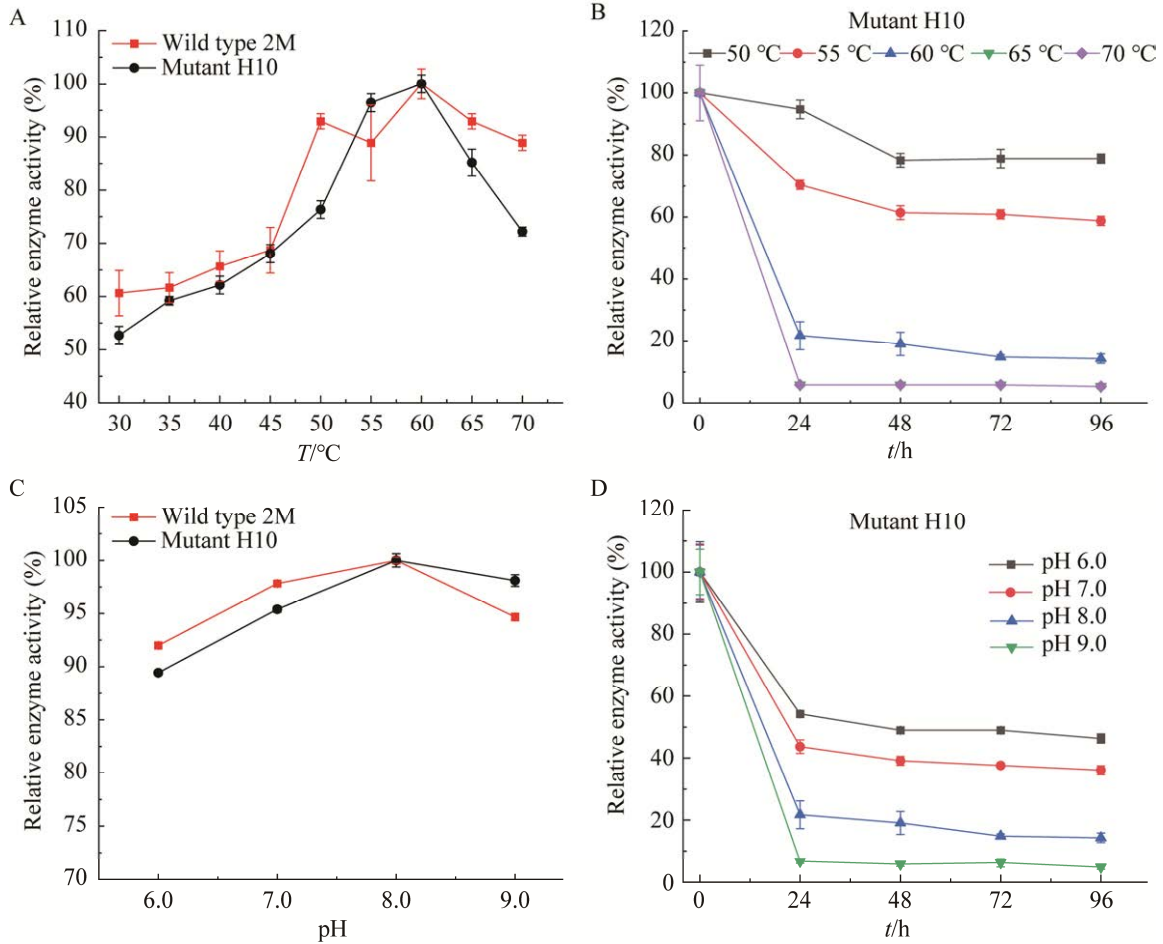
## 2.2 突变体 H10 酶学性质分析

结果表明, 突变体 H10 最适温度为 60 °C, 当高于 60 °C 时, 其酶活开始下降, 在 70 °C 时相对酶活为最高酶活的 70% (图 2A)。在 50 °C 和 55 °C 下, 突变体 H10 酶活半衰期大于 96 h; 60 °C 条件下温浴 24 h, 突变体 H10 相对酶活下降至起始酶活的 20%, 然后维持在一个较低的范围内; 而当温度高于 65 °C 时突变体 H10 酶活迅速下降(图 2B)。如图 2C 所示, 突变体 H10 在 pH

6.0–9.0 条件下均表现出催化活性, 其最适 pH 为 8.0。突变体 H10 在 pH 6.0–9.0 条件下温浴 96 h 酶活下降趋势一致, 温浴 24 h 后酶活迅速下降然后维持在较低的范围内, 其中突变体 H10 在 pH 6.0 的条件下温浴酶活下降幅度较小, 在 pH 9.0 的条件下温浴酶活下降幅度大(图 2D)。

## 2.3 突变体 H10 催化机制的解析

突变体 H10 与 PET 五聚体配体的分子对接结果如图 3A 所示, 仅第 94 位氨基酸残基位点位于酶底物结合凹槽附近, 该残基位点由带负电荷的 Asp 突变为带正电荷的 His, 有利于吸附在带负电荷的 PET 表面, 从而提高其对 PET 的降解能力。与野生型 2M (4.3 Å) 相比, 突变体 H10 的催化残基丝氨酸(Ser)与底物 PET 分子中酯键上碳原子的距离仅为 3.7 Å, 此亲核进攻距离更短且集中, 更加有利于催化残基 Ser 的亲核攻击, 形成酰基-酶中间体, 提高突变体的降解能力(图 3B)。突变体 H10 在均方根偏差(root mean



**图 2** 温度和 pH 对突变体 H10 酶活及稳定性的影响

Figure 2 Effects of temperature and pH on the activity (A and C) and stability (B and D) of mutant H10. The maximal activity was taken as 100%. Each test was repeated three times in parallel, and the data was expressed as “mean±standard deviation (SD)”.

square deviation, RMSD)的 10 ns 后波动变大且明显(图 3C), 表明突变体 H10 的稳定性低于野生型 2M。经均方根波动(root mean square deviation, RMSF)分析发现, 突变体 H10 的第 2 位和第 149 位的 RMSF 比野生型 2M 分别提升 5.866 7 Å 和 0.004 3 Å, 这可能是导致突变体 H10 稳定性下降的主要因素(图 3D)。为了验证上述推测, 在野生型 2M 上分别构建出第 2 位和第 149 位氨基酸残基双突变体(N2D/A149E)和第 94 位氨基酸

残基单突变体(D94H)。突变体 N2D/A149E 的热稳定性显著低于突变体 D94H, 分别在 60、65 °C 与 pH 8.0、9.0 下温浴 96 h 后酶活下降至初始酶活的 40% 以下(图 3E)。而突变体 D94H 在 50–65 °C 温浴 96 h 后酶活仍未到达半衰期, 且突变体 D94H 在 pH 6.0–9.0 的条件下温浴 96 h 后相对酶活均在初始酶活的 70% 以上。相较而言, 突变体 D94H 的热稳定性与 pH 稳定性显著优于突变体 H10 和突变体 N2D/A149E (图 3F)。

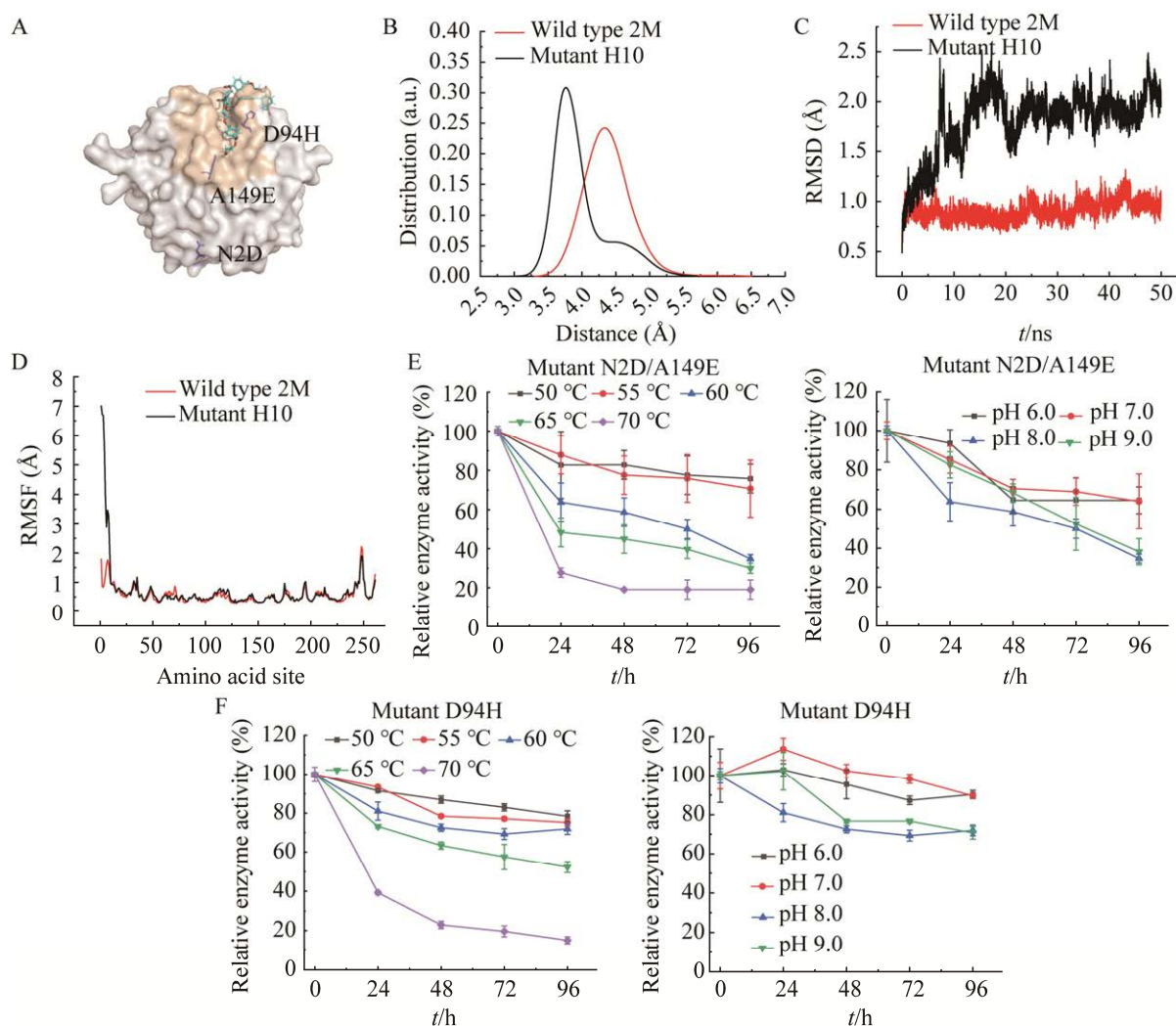


图 3 突变体 H10 催化机制的解析

Figure 3 Catalytic mechanism analysis of mutant H10. A: Molecular docking between mutant H10 and 5PET. B: The distance between the oxygen atom of the catalytic amino (Ser) of mutant H10 and wild type 2M and the carbon atom of the ester bond of PET. C: RMSD of mutant H10. D: RMSF of mutant H10. E: Effects of temperature and pH on the stability of mutant N2D/A149E. F: Effects of temperature and pH on the stability of mutant D94H. Each test was repeated three times in parallel, and the data was expressed as “mean±standard deviation (SD)”.

#### 2.4 突变体 H10 突变位点功能验证

综上所述, 突变体 H10 的第 2 位和第 149 位氨基酸残基的改变影响蛋白整体稳定性, 而第 94 位氨基酸残基则是使突变体 H10 降解能力有所提升的关键因素。截至目前, 国内外尚未有文献报道角质酶 Tfu-0883 的第 94 位氨基酸残基位点是提升其 PET 降解性能的潜在位点。为进一步验证该猜测, 将野生型 2M 第 94 位氨基酸残基分别突变为正电荷氨基酸残基 His、Arg 和

Lys, 即突变体 D94H、D94K 和 D94R。如图 4A、4B 所示, 突变体 D94H、D94K 和 D94R 对 PET 降解能力较野生型 2M 有显著提升。突变体 D94H 对 PET 降解效率最低, 其原因可能是 His 残基在 pH 8.0 条件下解离程度小, 所带正电荷较少。而突变体 D94K 的降解效率最高, 96 h 可降解 18% 的 PET, 其速率是野生型的 3.6 倍。进一步研究发现, 突变体 D94K 的 RMSD 和 RMSF 与野生型 2M 类似, 其稳定性并未有明显下降(图 4C、4D)。

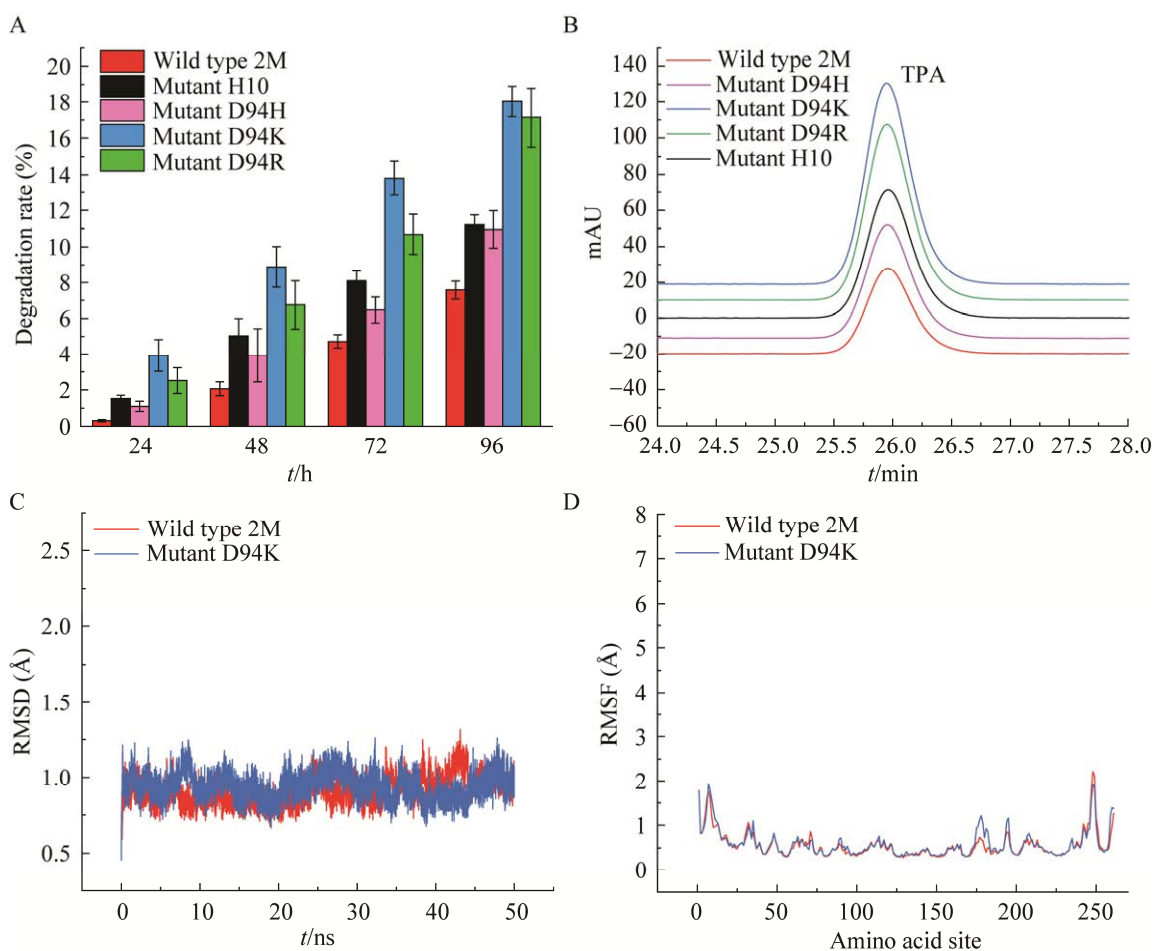


图 4 第 94 位氨基酸残基位点对 PET 降解的影响

Figure 4 Effect of the 94th amino acid residue site on PET degradation. A: PET degradation analysis by different mutants. B: HPLC analysis curves of hydrolysates by using different mutants. C: RMSD of mutant D94K. D: RMSF of mutant D94K. Error bars represent the standard deviation of three independent experiments.

### 3 讨论与结论

本研究以 *T. fusca* 角质酶 Tfu-0883 对 PET 降解活性与其磷脂酶活性的正相关性为基础,以卵黄磷脂平板水解圈为准则,构建出 PET 降解酶定向改造的高效筛选方法。相对于现有的 96 微孔板、液滴微流控等多级多轮筛选方法,本筛选方法更为简单高效,可在获得单菌落的同时完成筛选工作,在极短的时间内可获得 PET 降解活性提高的突变体 H10,其亲核攻击的距离从野生型 2M 的约 4.3 Å 减少到 3.7 Å,说明亲核攻击

距离的缩短是导致突变体 H10 催化效率提高的一个重要原因。PETase 催化残基 Ser130 中氧原子与 PET 苯环相连的羰基上的碳原子之间的亲核攻击距离同样是影响其降解效率的关键因素<sup>[20]</sup>。Chen 等获得的角质酶突变体 4Mz,亲核攻击距离从野生型的 4.6 Å 减少到 3.8 Å,其 PET 降解能力是野生型的 30 倍<sup>[19]</sup>。突变体 H10 第 2 位和第 149 位氨基酸残基的双突变,可能是通过削弱酶的刚性,使蛋白稳定性下降。Ge 等发现 PETase 蛋白结构维持在一定刚性范围,可通过减小 PET 分子链嵌入酶底物结合凹槽的空间位阻以有效



提高 PET 降解效率<sup>[21]</sup>。Sun 等也发现氨基酸骨架呈刚性有利于形成并维持酶蛋白质空间结构稳定,而结合凹槽的灵活性则是其结合和释放底物所必需的<sup>[22]</sup>。

本研究发现角质酶 Tfu-0883 的第 94 位氨基酸残基位点是影响 PET 降解性能的关键位点。将底物结合凹槽附近的第 94 位氨基酸残基突变成正电荷氨基酸残基,有利于突变体吸附在带负电荷的 PET 表面,增强 PET 降解能力,这与 Sagong 等发现嗜软根杆菌(*Rhizobacter gummiphilus*)来源的 PET 降解酶底物结合凹槽给予正电荷修饰可显著提高 PET 的降解率的结论相一致<sup>[23]</sup>。Nakamura 等也发现 PETase 降解 PET 的能力明显优于其他酶的关键在于其酶蛋白表面整体多为正电荷<sup>[24]</sup>。本研究获得的最优突变体 D94K 能够以 0.036 mg/(h·mg)的速率降解 PET,高于野生型 2M [0.010 mg/(h·mg)]及南极念珠菌(*Candida antarctica*)来源的 CaL [4.76×10<sup>-4</sup> mg/(h·mg)]<sup>[25]</sup>,但低于目前文献报道最优 PET 降解酶 ICCG [30 mg/(h·mg)]<sup>[26]</sup>。本研究发现的新改造位点(如第 94 位氨基酸残基位点)也可叠加到现有优势突变体上,进一步提升其 PET 降解能力。

本研究基于磷脂酶水解圈构建的筛选方法,可为 PET 降解酶定向改造提供了一种新的筛选思路。以野生型 2M 为模板,能够在短时间内可获得 PET 降解活性提高的酶突变体 N2D/D94H/A149E。首次发现 94 位残基位点的突变能够影响突变体的 PET 降解活性,最终获得 PET 降解速率是野生型 3.6 倍的突变体 D94K。

## 参考文献

- [1] GEYER R, JAMBECK JR, LAW KL. Production, use, and fate of all plastics ever made[J]. *Science Advances*, 2017, 3(7): e1700782.
- [2] 周剑桥, 黄青松, 李娟, 金昶序, 陈晓倩, 吴敬, 颜正飞. 一株嗜热聚对苯二甲酸乙二醇酯降解菌的分离及其降解特性解析[J]. *微生物学报*, 2023, 63(7): 2822-2834.
- [3] ZHOU JQ, HUANG QS, LI J, JIN CX, CHEN XQ, WU J, YAN ZF. Isolation and characterization of a thermophilic PET-degrading bacterium[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(7): 2822-2834 (in Chinese).
- [3] RONKVIST ÅM, XIE WC, LU WH, GROSS RA. Cutinase-catalyzed hydrolysis of poly(ethylene terephthalate)[J]. *Macromolecules*, 2009, 42(14): 5128-5138.
- [4] SULAIMAN S, YAMATO S, KANAYA E, KIM JJ, KOGA Y, TAKANO K, KANAYA S. Isolation of a novel cutinase homolog with polyethylene terephthalate-degrading activity from leaf-branch compost by using a metagenomic approach[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(5): 1556-1562.
- [5] HERRERO ACERO E, RIBITSCH D, STEINKELLNER G, GRUBER K, GREIMEL K, EITELJOERG I, TROTSCHA E, WEI R, ZIMMERMANN W, ZINN M, CAVACO-PAULO A, FREDDI G, SCHWAB H, GUEBITZ G. Enzymatic surface hydrolysis of PET: effect of structural diversity on kinetic properties of cutinases from *Thermobifida*[J]. *Macromolecules*, 2011, 44(12): 4632-4640.
- [6] WEI R, OESER T, THEN J, KÜHN N, BARTH M, SCHMIDT J, ZIMMERMANN W. Functional characterization and structural modeling of synthetic polyester-degrading hydrolases from *Thermomonospora curvata*[J]. *AMB Express*, 2014, 4(1): 1-10.
- [7] 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.
- [8] YAN ZF, WANG L, XIA W, LIU ZZ, GU LT, WU J. Synergistic biodegradation of poly(ethylene terephthalate) using *Microbacterium oleivorans* and *Thermobifida fusca* cutinase[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(11): 4551-4560.
- [9] CHENG F, ZHU LL, SCHWANEBERG U. Directed evolution 2.0: improving and deciphering enzyme properties[J]. *Chemical Communications*, 2015, 51(48): 9760-9772.
- [10] 杨建花, 苏晓岚, 朱蕾蕾. 高通量筛选系统在定向改造中的新进展[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(7): 2197-2210.
- [10] YANG JH, SU XL, ZHU LL. Advances of

- high-throughput screening system in reengineering of biological entities[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(7): 2197-2210 (in Chinese).
- [11] SHI LX, LIU P, TAN ZJ, ZHAO W, GAO JF, GU Q, MA HW, LIU HF, ZHU LL. Complete depolymerization of PET wastes by an evolved PET hydrolase from directed evolution[J]. *Angewandte Chemie (International Ed in English)*, 2023, 62(14): e202218390.
- [12] LIU K, XU ZP, ZHAO ZY, CHEN YX, CHAI YT, MA L, LI SY. A dual fluorescence assay enables high-throughput screening for poly(ethylene terephthalate) hydrolases[J]. *ChemSusChem*, 2023, 16(5): e202202019.
- [13] 宿玲恰. 重组 *Thermobifida fusca* 角质酶的高效胞外表达及其分子机制[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2013.
- SU LQ. High-efficient extracellular expression of recombinant *Thermobifida fusca* cutinase and its molecular mechanism[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2013 (in Chinese).
- [14] 朱方剑. 二硫键理性设计提高 *Thermobifida fusca* 角质酶热稳定性研究[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2020.
- ZHU FJ. Study on rational design of disulfide bonds to improve thermal stability of *Thermobifida fusca* cutinase[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2020 (in Chinese).
- [15] RAMRAKHIANI L, CHAND S. Recent progress on phospholipases: different sources, assay methods, industrial potential and pathogenicity[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2011, 164(7): 991-1022.
- [16] 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.
- [17] BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1/2): 248-254.
- [18] 冯慧玲, 李春梅, 吴振芳, 陈惠. 易错 PCR 技术提高黑曲霉 N25 植酸酶活力的研究[J]. *生物技术通报*, 2010(10): 226-230.
- FENG HL, LI CM, WU ZF, CHEN H. Increasing activity of phytase from *Aspergillus niger* N25 by error-prone PCR[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2010(10): 226-230 (in Chinese).
- [19] CHEN XQ, GUO ZY, WANG L, YAN ZF, JIN CX, HUANG QS, KONG DM, RAO DM, WU J. Directional-path modification strategy enhances PET hydrolase catalysis of plastic degradation[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 433: 128816.
- [20] HAN X, LIU WD, HUANG JW, MA JT, ZHENG YY, KO TP, XU LM, CHENG YS, CHEN CC, GUO RT. Structural insight into catalytic mechanism of PET hydrolase[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 2106.
- [21] GE BK, HU GM, CHEN CM. Plastic bioconversion: reaction mechanism of PETases[J]. *Chinese Journal of Physics*, 2021, 73: 331-339.
- [22] SUN ZT, LIU Q, QU G, FENG Y, REETZ MT. Utility of B-factors in protein science: interpreting rigidity, flexibility, and internal motion and engineering thermostability[J]. *Chemical Reviews*, 2019, 119(3): 1626-1665.
- [23] SAGONG HY, SON HF, SEO H, HONG H, LEE D, KIM KJ. Implications for the PET decomposition mechanism through similarity and dissimilarity between PETases from *Rhizobacter gummiphilus* and *Ideonella sakaiensis*[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 416: 126075.
- [24] NAKAMURA A, KOBAYASHI N, KOGA N, IINO R. Positive charge introduction on the surface of thermostabilized PET hydrolase facilitates PET binding and degradation[J]. *ACS Catalysis*, 2021, 11(14): 8550-8564.
- [25] 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.
- [26] TOURNIER V, TOPHAM CM, GILLES A, DAVID B, FOLGOAS C, MOYA-LECLAIR E, KAMIONKA E, DESROUSSEAU ML, TEXIER H, GAVALDA S, COT M, GUÉMARD E, DALIBEY M, NOMME J, CIOCI G, BARBE S, CHATEAU M, ANDRÉ I, DUQUESNE S, MARTY A. An engineered PET depolymerase to break down and recycle plastic bottles[J]. *Nature*, 2020, 580(7802): 216-219.