

# 生物塑料聚(己二酸丁二酸二丁酯-2,5-呋喃二羧酸丁二醇酯)前体的酶催化合成

龚兰玉<sup>1,2</sup>, 马龙<sup>1</sup>, 朱蕾蕾<sup>2\*</sup>

1 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457

2 中国科学院天津工业生物技术研究所 低碳合成工程生物学重点实验室, 天津 300308

龚兰玉, 马龙, 朱蕾蕾. 生物塑料聚(己二酸丁二酸二丁酯-2,5-呋喃二羧酸丁二醇酯)前体的酶催化合成[J]. 微生物学报, 2024, 64(8): 2813-2822.

GONG Lanyu, MA Long, ZHU Leilei. Enzyme-catalyzed synthesis of precursor of the bioplastic poly(butylene adipate-co-butylene 2,5-furandicarboxylate)[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(8): 2813-2822.

**摘要:** 【目的】聚(己二酸丁二酸二丁酯-2,5-呋喃二羧酸丁二醇酯) [poly(butylene adipate-co-butylene 2,5-furandicarboxylate), PBAF]是一种可生物降解的呋喃基共聚酯塑料。化学合成 PBAF 的过程中, 寡聚片段聚合的随机性会生成嵌段共聚物、无规共聚物、交替共聚物等多种复杂聚合物, 从而影响生物塑料 PBAF 的质量。本研究以单体 2,5-呋喃二甲酸二甲酯(dimethyl furan-2,5-dicarboxylate, FDME)和 1,4-丁二醇(1,4-butanediol, BDO)为底物, 通过酶促反应合成双(4-羟基丁基)呋喃-2,5-二羧酸酯(bis-BDO ester), 为生物塑料 PBAF 提供可以进行可控聚合反应的生物塑料前体, 从而减少副产物生成的问题。【方法】在大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)中异源表达来源于嗜橡胶根瘤杆菌(*Rhizobacter gummiphilus*)的 RgPETase, 发现 RgPETase 对底物 FDME 和 BDO 具有一定的酰基转移酶活性。深入研究了合成双(4-羟基丁基)呋喃-2,5-二羧酸酯的反应条件的优化, 包括反应 pH、反应温度、底物兼溶剂 BDO 的含量和反应酶量。【结果】RgPETase 的最适反应 pH 值为 8.0, 底物兼溶剂 BDO 的最适含量为 30%, 最适反应温度区间为 25–30 °C。在最适条件下, 即反应温度为 30 °C 且酶浓度为 6 μmol/L 时, RgPETase 催化 10 mmol/L FDME 可产生(2.96±0.01) mmol/L 双(4-羟基丁基)呋喃-2,5-二羧酸酯。【结论】RgPETase 具有较好的酰基转移酶活性, 能通过酰基转移反应有效催化 FDME 生成双(4-羟基丁基)

资助项目: 国家重点研发计划(2023YFC3905000); 天津市合成生物技术创新能力提升行动项目(TSBICIP-IJCP-003, TSBICIP-BRFI-005)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2023YFC3905000) and the Tianjin Synthetic Biotechnology Innovation Capacity Improvement Action (TSBICIP-IJCP-003, TSBICIP-BRFI-005).

\*Corresponding author. E-mail: zhu\_ll@tib.cas.cn

Received: 2024-01-16; Accepted: 2024-04-18

呋喃-2,5-二羧酸酯, 为生物塑料 PBAF 前体的合成提供了一条绿色可持续的途径。

关键词: *RgPETase*; 酰基转移反应; 生物塑料; PBAF 前体

## Enzyme-catalyzed synthesis of precursor of the bioplastic poly(butylene adipate-co-butylene 2,5-furandicarboxylate)

GONG Lanyu<sup>1,2</sup>, MA Long<sup>1</sup>, ZHU Leilei<sup>2\*</sup>

1 School of Biological Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

2 Key Laboratory of Engineering Biology for Low-Carbon Manufacturing, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

**Abstract:** [Objective] Poly(butylene adipate-co-butylene 2,5-furandicarboxylate) (PBAF) is a biodegradable furan-based copolyester plastic. In the chemical synthesis of PBAF, the randomness of oligomer polymerization leads to the formation of complex polymers, such as block copolymers, random copolymers, and alternating copolymers. In this study, dimethyl furan-2,5-dicarboxylate (FDME) and 1,4-butanediol (BDO) were used as substrates to synthesize bis-BDO ester by enzymatic reaction to provide the bioplastic precursor for controllable polymerization and avoid complex by-products. [Methods] *RgPETase* from *Rhizobacter gummiphilus* was heterogeneously expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3). *RgPETase* exhibited acyltransferase activity for FDME and BDO. The reaction conditions including pH, temperature, content of BDO (as both substrate and solvent), and amount of enzyme for the synthesis of bis-BDO ester were optimized. [Results] The optimum reaction conditions of *RgPETase* were pH 8.0, BDO content of 30%, and reaction temperature within the range of 25–30 °C. Under the optimum conditions (30 °C and enzyme concentration of 6 μmol/L), *RgPETase* can catalyze 10 mmol/L FDME to produce (2.96±0.01) mmol/L bis-BDO ester. [Conclusion] *RgPETase* exhibits high acyltransferase activity and catalyzes the generation of bis-BDO ester from FDME via acyl transfer reaction under mild conditions, which provides a green and sustainable approach for synthesizing the precursor of PBAF.

**Keywords:** *RgPETase*; acyl transfer reaction; bioplastic; precursor of PBAF

塑料广泛应用于建筑材料、交通工具、服装和食品饮料包装等多个领域。随着全球塑料污染问题日趋严重,寻找替代传统塑料的可持续发展方案是当前科学研究和技术行业的热点问题<sup>[1]</sup>。在这一背景下,生物塑料的相关研究备受关注。生物塑料分为两类,一类是指可生物降解的塑

料,如聚 ε-己内酯(poly-ε-caprolactone, PCL)、聚丁二酸丁二醇酯[poly(butylene succinate), PBS];另一类是指可降解或不可降解的塑料,但单体由生物材料或可再生原料生产,如淀粉、纤维素和植物油<sup>[2-4]</sup>。生物塑料在功能上与合成塑料类似,因其具备可持续性,已成为当前研究的重点之一<sup>[5]</sup>。

目前, 全球生物塑料的生产能力仅为 400 万 t, 因此生物塑料的发展和增长空间很大<sup>[6]</sup>。

聚(己二酸丁二酸二丁酯-2,5-呋喃二羧酸丁二醇酯) [poly(butylene adipate-co-butylene 2,5-furandicarboxylate), PBAF]是由 2,5-呋喃二甲酸、己二酸、1,4-丁二醇共聚生成的可生物降解塑料<sup>[7]</sup>, 在合成 PBAF 的过程中, 己二酸酯(如己二酸二甲酯)与 1,4-丁二醇(1,4-butanediol, BDO)的反应比呋喃(甲基或乙基)酯更易发生, 这也导致生成不规则的聚合物副产物, 影响了 PBAF 的质量<sup>[8]</sup>。因此, 若预先合成更活泼的双(4-羟基丁基)呋喃-2,5-二羧酸酯(bis-BDO ester)来取代活性较低的呋喃(甲基或乙基)酯, 将有望使生物塑料 PBAF 的聚合过程更为均一和可控。研究发现, 混杂水解酶/酰基转移酶能催化酰基转移反应, 如酯化和酯交换等<sup>[9-10]</sup>。因此, 寻找能够在水相条件下催化酰基转移反应的酶催化剂是关键<sup>[11]</sup>。

研究发现来源于近平滑假丝酵母菌(*Candida parapsilosis*)的脂肪酶 CpLIP2 能够在水相中催化合成乙二醇、乙醇、正丙醇和异丙醇

的油酯<sup>[12]</sup>。来源于担子菌酵母菌(*Pseudozyma antarctica*)的脂肪酶 CAL-A 也具有酰基转移酶活性, 可在水相中合成脂肪酸甲酯或乙酯(生物燃料)<sup>[13-15]</sup>。单突变体(D122L)可以提高 CAL-A 的酰基转移酶活性, 使棕榈仁油与无水乙醇作用, 产生高达 95%的脂肪酸乙酯<sup>[16]</sup>。源于耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*)的酰基转移酶 MsAcT 能够在水相中催化伯醇进行酰基转移反应生成伯醇酯<sup>[17]</sup>。来源于嗜橡胶根瘤杆菌(*Rhizobacter gummiphilus*)的 RgPETase 具有酯键水解活性<sup>[18-19]</sup>, 目前尚无文献报道 RgPETase 具有酰基转移酶活性。如图 1 所示, 以单体 2,5-呋喃二甲酸二甲酯(dimethyl furan-2,5-dicarboxylate, FDME)和 1,4-丁二醇(BDO)为底物, 在 RgPETase 作用下通过酶促反应合成生物塑料前体双(4-羟基丁基)呋喃-2,5-二羧酸酯(bis-BDO ester)。5-(5-羟基戊酰基)呋喃-2-羧酸甲酯(Me BDO ester)和双(4-羟基丁基)呋喃-2,5-二羧酸酯(bis-BDO ester)是通过酰基转移反应生成的单酯化产物和双酯化产物, 5-(甲氧羰基)呋喃-2-羧酸(Me ester)是通过水解作用生成的水解产物。

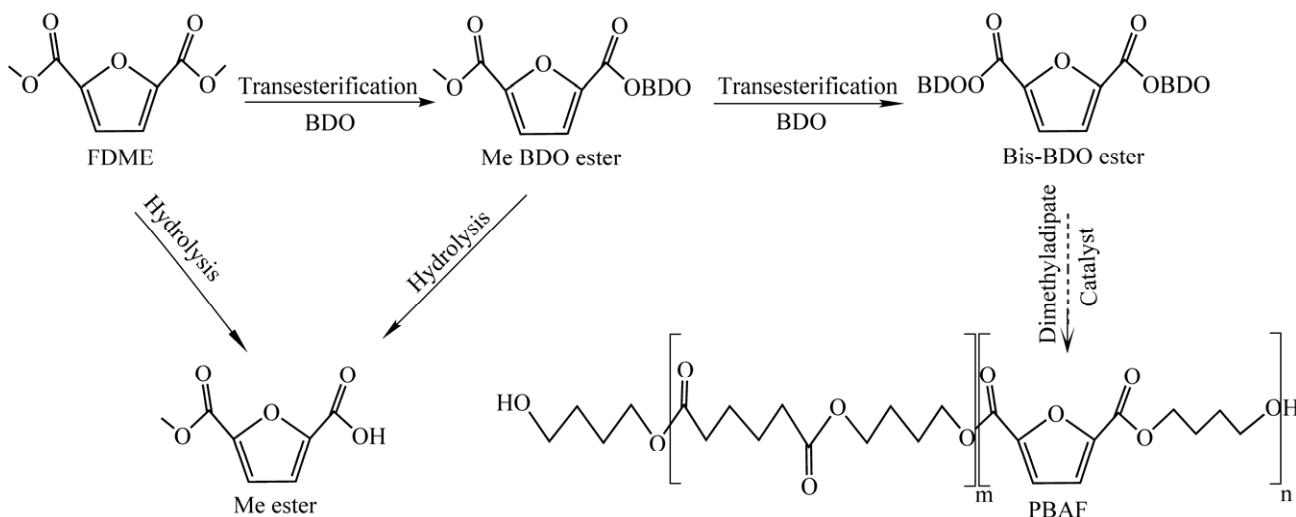


图 1 生物塑料 PBAF 前体双(4-羟基丁基)呋喃-2,5-二羧酸酯的酶促反应合成路线  
Figure 1 Enzymatic synthesis of bioplastic PBAF precursor bis-BDO ester.

# 1 材料与amp;方法

## 1.1 材料

### 1.1.1 菌株和质粒

菌株大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)和质粒 pET-22b(+)均由本实验室保存; 重组质粒 pET22b-RgPETase 委托苏州金唯智生物科技有限公司天津分公司合成, 本研究中 RgPETase 的序列信息与 Sagong 等<sup>[20]</sup>报道文献中的序列信息一致。

### 1.1.2 主要试剂

氨苄青霉素(ampicillin, Amp)购自北京兰博利德商贸有限公司; 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(isopropyl-β-D-thiogalactoside, IPTG)购自北京索莱宝科技有限公司; 质粒小提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; 1,4-丁二醇(1,4-butanediol, BDO)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 2,5-呋喃二甲酸二甲酯(dimethyl furan-2,5-dicarboxylate, FDME)购自深圳市益百顺科技有限公司。

## 1.2 RgPETase 的表达及纯化

将重组质粒 pET22b-RgPETase 转化至 *Escherichia coli* BL21(DE3)中, 涂布于 LB 平板上后过夜孵育, 挑取平板上的单克隆菌落至 LB 培养基中, 在 37 °C、220 r/min 条件下培养 16 h 得到种子液, 以体积分数 2%接种量转接至 500 mL LB 培养基中, 待  $OD_{600}$  为 0.6–0.8 时, 加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG, 20 °C 诱导表达 24 h。表达完成后, 4 °C、5 500 r/min 离心 40 min, 收集上清液得到粗酶液。

使用中空纤维微滤装置(0.45 μm 滤膜)将粗酶液过膜处理后, 再使用中空纤维超滤装置(5 kDa)浓缩至原体积的 10%–20%。0.22 μm 滤膜过膜处理后, 使用 AKTA 纯化仪和 5 mL HisTrap HP 层析柱纯化蛋白, A 液为含 300 mmol/L NaCl 的 50 mmol/L  $NaH_2PO_4$  缓冲液(pH 8.0), B 液为含 300 mmol/L NaCl 和 250 mmol/L 咪唑的 50 mmol/L

$NaH_2PO_4$  缓冲液(pH 8.0)。利用不同浓度咪唑梯度洗脱的方式得到纯化后的蛋白, 再使用 50 mL HiPrepTH 26/10 脱盐柱将纯酶液置换至 Tris-HCl 缓冲液(50 mmol/L, pH 8.0)中, 保存于–80 °C。

## 1.3 RgPETase 催化活性的测定

标准品标准曲线的配制: 标准品有 2,5-呋喃二甲酸二甲酯(FDME)、双(4-羟基丁基)呋喃-2,5-二羧酸酯(bis-BDO ester)、5-(5-羟基戊酰基)呋喃-2-羧酸甲酯(Me BDO ester)、5-(甲氧羰基)呋喃-2-羧酸(Me ester)。分别配制成 10 mmol/L 母液, 将其稀释至 50–1 000 μmol/L 的梯度标准溶液, 通过 HPLC 检测可得到标准品的标准曲线。

HPLC 检测条件: 采用高效液相色谱(Thermo UltiMate 3000), EF-C18 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为  $Na_2HPO_4$ - $NaH_2PO_4$  (pH 7.0, 20 mmol/L)缓冲液, 内含 30%–70%乙腈线性梯度液, 流速为 0.8 mL/min, 上样量为 10 μL, 检测波长为 260 nm。

RgPETase 催化活性的测定: 在含有 50% (体积分数) BDO 的 Tris-HCl (50 mmol/L, pH 8.0)缓冲液中, 将 1 μmol/L 纯酶与 10 mmol/L FDME 在 30 °C 条件下反应 24 h。加入等体积含有 25% 乙腈的缓冲液终止反应, 对样品进行稀释和过膜处理(0.22 μm 滤膜)后, 用于高效液相色谱分析。

## 1.4 反应 pH 的优化

测定不同 pH (5.0–10.0)条件下 RgPETase 对底物 FDME 的催化活性, 以总酯化产物产量作为判断最适 pH 的依据。实验所用缓冲液如下: Tris- $NaH_2PO_4$  (pH 5.0–6.0)、Tris-HCl (pH 7.0–8.5)、glycine-NaOH (pH 9.0–10.0)。在含有 50% (体积分数) BDO 的不同 pH 缓冲液中, 将 1 μmol/L 纯酶与 10 mmol/L FDME 在 30 °C 条件下反应 24 h。HPLC 检测方法同 1.3。

## 1.5 反应温度的优化

在含有 50% (体积分数) BDO 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0, 50 mmol/L)中, 将 1 μmol/L 纯酶与

10 mmol/L FDME 在不同温度(18、25、30、37 °C)下反应 24 h, 以测定 *RgPETase* 对底物 FDME 的催化活性。HPLC 检测方法同 1.3。

### 1.6 1,4 丁二醇(BDO)含量的优化

在 Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0, 50 mmol/L)中, 将 1 μmol/L 纯酶与 10 mmol/L FDME 在 25 °C 和 30 °C 条件下反应 24 h 以测定 BDO 的含量(体积分数)分别为 0、10、20、30、40、50、60、70、80、90 条件下时 *RgPETase* 对底物 FDME 的催化活性。HPLC 检测方法同 1.3。

### 1.7 酶浓度的优化

在含有 30% (体积分数) BDO 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0, 50 mmol/L)中, 测定不同浓度纯酶与 10 mmol/L FDME 在 30 °C 条件下反应 24 h 时对底物 FDME 的催化活性。HPLC 检测方法同 1.3。

### 1.8 反应时间对 *RgPETase* 催化活性的影响

在含有 30% (体积分数) BDO 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0, 50 mmol/L)中, 测定 10 μmol/L 纯酶与 10 mmol/L FDME 在 30 °C 条件下 0–24 h 的反应时间进程, 每隔 3 h 取一次样品, 测定不同时间段 *RgPETase* 对底物 FDME 的催化活性。HPLC 检测方法同 1.3。

## 2 结果与分析

### 2.1 *RgPETase* 的表达和纯化

根据图 2A 可知, 相比空质粒 pET-22b(+), 重组蛋白 pET22b-*RgPETase* 在 25–35 kDa 处有一条明显的蛋白条带, 其分子量约为 29.7 kDa, 与理论上的分子量大小一致。因此, *RgPETase* 在 *Escherichia coli* BL21(DE3)中成功分泌表达。

根据亲和层析原理, 使用镍柱以 30–250 mmol/L 咪唑浓度梯度洗脱蛋白, 得到单一且清晰的纯酶 *RgPETase* (图 2B)。

### 2.2 *RgPETase* 酰基转移酶活性的发现

根据图 3 可知, 30 °C 条件下 1 μmol/L *RgPETase* 与 10 mmol/L FDME 在含有 50% (体积

分数) BDO 的 Tris-HCl 缓冲液中反应 24 h 后, 生成了 bis-BDO 双酯和 Me BDO 单酯, 说明 *RgPETase* 能够催化 FDME 单酯化及双酯化, 生成链长可控的酯化产物 Me BDO 酯和 bis-BDO 酯。

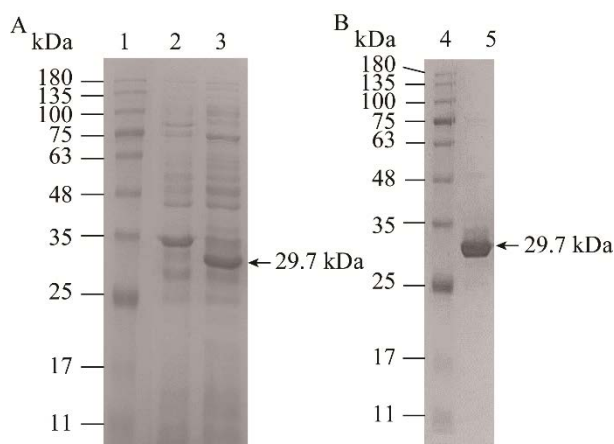


图 2 SDS-PAGE 分析 *RgPETase* 的分泌表达(A)及纯化(B)

Figure 2 The SDS-PAGE analysis of secretory expression (A) and purification (B) of *RgPETase*. 1, 4: Protein marker; 2: pET-22b(+); 3: pET22b-*RgPETase* crude enzyme; 5: pET22b-*RgPETase* eluted protein.

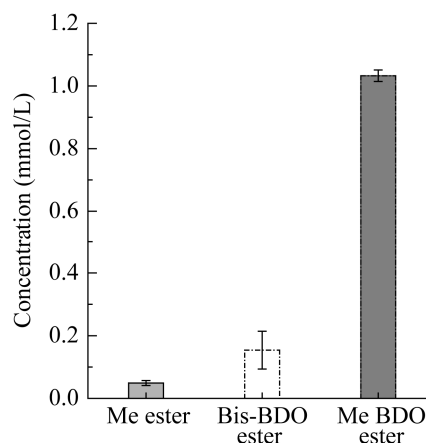


图 3 *RgPETase* 催化 FDME 生成 Me ester、bis-BDO ester、Me BDO ester 的活性分析

Figure 3 Activity analysis of *RgPETase* for the conversion of FDME to Me ester, bis-BDO ester and Me BDO ester. Bioconversion of 10 mmol/L FDME with 1 μmol/L *RgPETase* was performed in Tris-HCl buffer (50 mmol/L, pH 8.0) containing 50% (V/V) BDO at 30 °C for 24 h. The data was calculated with background deduction.

### 2.3 反应 pH 的优化

由图 4 可知, *RgPETase* 在碱性条件下更易发生酰基转移反应。随着 pH 的增加, 总酯化产物 (bis-BDO 双酯和 Me BDO 单酯) 的产量也缓慢增加, 在 pH 8.0 的缓冲条件下作用生成的总酯化产物产量达到最高。然而, 当 pH 值超过 8.0 后, 水解反应占主导作用, 主要生成水解产物 Me ester。因此, 选择 pH 8.0 作为最适 pH 进行后续实验。

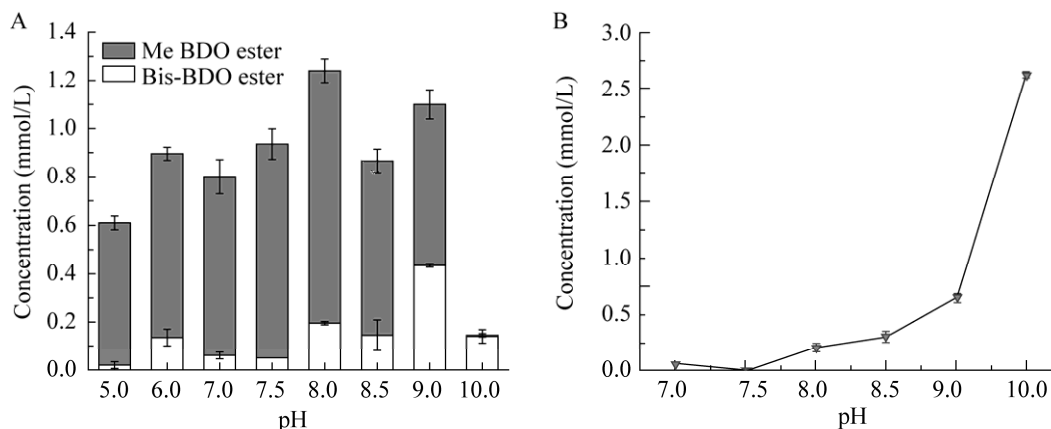


图 4 反应体系的 pH 对 *RgPETase* 催化活性的影响

Figure 4 The effect of pH of reaction system on the catalytic activity of *RgPETase*. Bioconversion of 10 mmol/L FDME with 1  $\mu\text{mol/L}$  *RgPETase* for acyl transfer products Me BDO ester and bis-BDO ester (A), and hydrolysis product Me ester was performed in buffer with different pH in presence of 50% (V/V) BDO at 30  $^{\circ}\text{C}$  for 24 h (B). The data was calculated with background deduction.

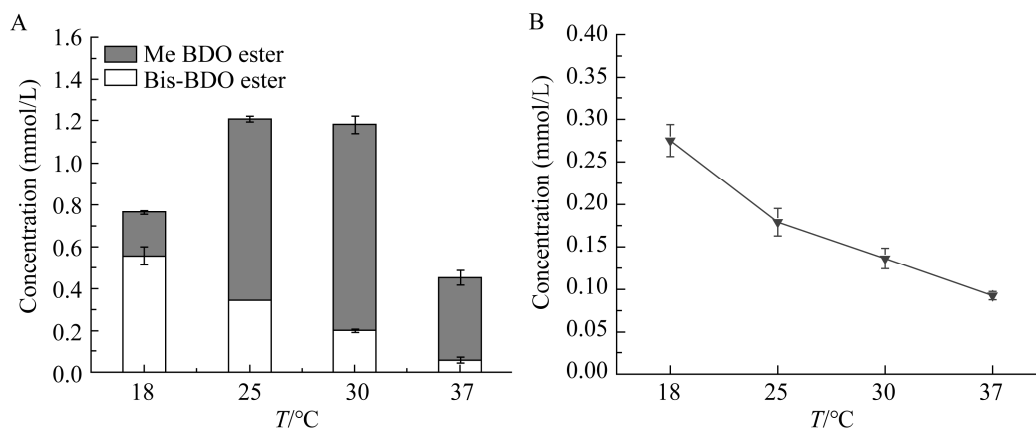


图 5 反应温度对 *RgPETase* 催化活性的影响

Figure 5 The effect of reaction temperature on the catalytic activity of *RgPETase*. Bioconversion of 10 mmol/L FDME with 1  $\mu\text{mol/L}$  *RgPETase* for acyl transfer products Me BDO ester and bis-BDO ester (A), and hydrolysis product Me ester was performed in Tris-HCl buffer (50 mmol/L, pH 8.0) containing 50% (V/V) BDO at 18  $^{\circ}\text{C}$ , 25  $^{\circ}\text{C}$ , 30  $^{\circ}\text{C}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  for 24 h (B). The data was calculated with background deduction.

总酯化产物产量作为评价最适温度的指标, 后续实验选择在 25 °C 或 30 °C 条件下进行。

### 2.5 1,4-丁二醇(BDO)含量的优化

如图 6 所示, 纯水相(不含 BDO)条件下只发生水解反应, 生成水解产物 Me ester。图 6A、6B 表明 25 °C 条件下 BDO 的含量(体积分数)为 30% 时, 可生成(2.95±0.01) mmol/L 双酯化产物 bis-BDO ester。图 6C、6D 表明 30 °C 条件下 BDO 的含量(体积分数)为 20% 时, 可生成(2.44±0.01) mmol/L 双酯化产物 bis-BDO ester。这表明需要在具有合适的水相与有机相条件下

才能发挥 *RgPETase* 的酰基转移酶活性, 从而实现酯交换生成酯化产物。

### 2.6 酶浓度的优化

由图 7 可知, 在含有 30% (体积分数) BDO 的反应体系中, 测定 30 °C 条件下不同浓度的 *RgPETase* 对底物 FDME 的催化活性, 发现酶浓度为 6 μmol/L 时, 双酯化产物 bis-BDO ester 的产量最高, 为(2.96±0.01) mmol/L。增加酶浓度可能促进单酯化产物 Me BDO ester 向双酯化产物 bis-BDO ester 转化, 这说明酶浓度是 *RgPETase* 发挥酰基转移酶活性的重要因素。

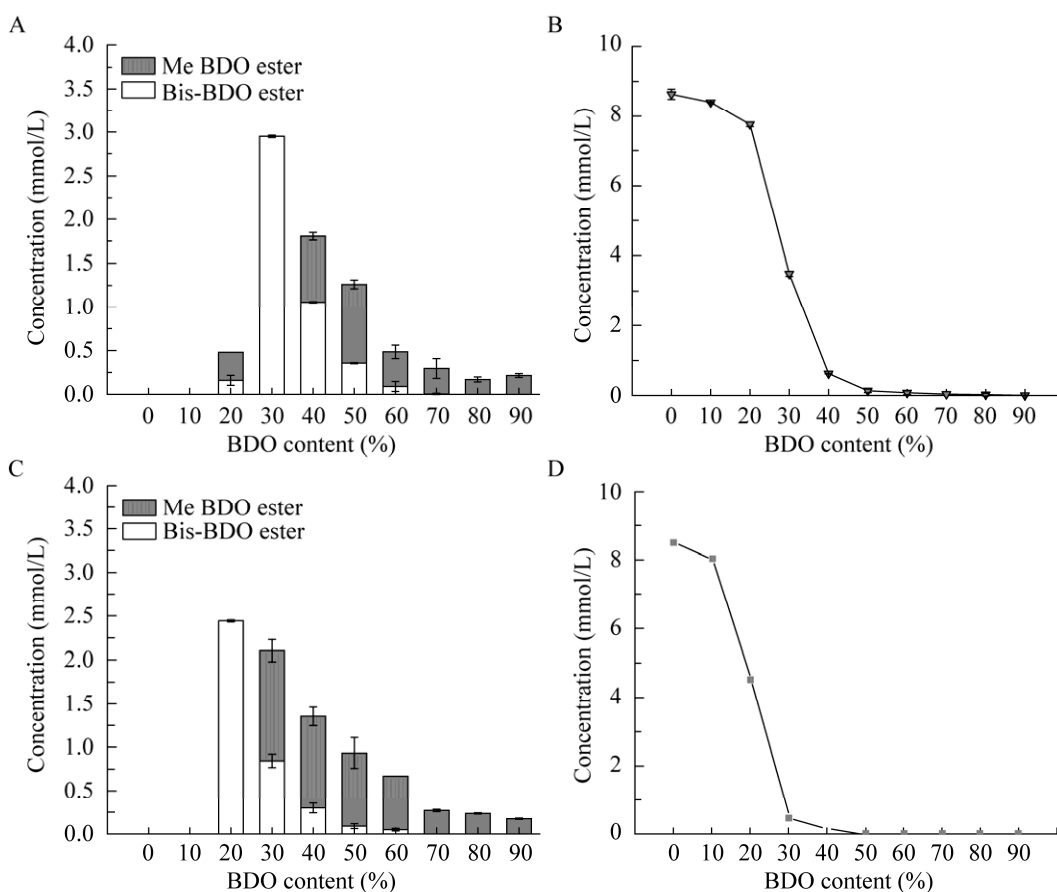


图 6 1,4-丁二醇(BDO)的含量对 *RgPETase* 催化活性的影响

Figure 6 The effect of the content of BDO on the catalytic activity of *RgPETase*. Bioconversion of 10 mmol/L FDME with 1 μmol/L *RgPETase* was performed for (A and C) acyl transfer products Me BDO ester and bis-BDO ester, and (B and D) hydrolysis product Me ester in Tris-HCl buffer (50 mmol/L, pH 8.0) containing different concentrations of BDO at 25 °C (A and B) or 30 °C (C and D) for 24 h. The data was calculated with background deduction.

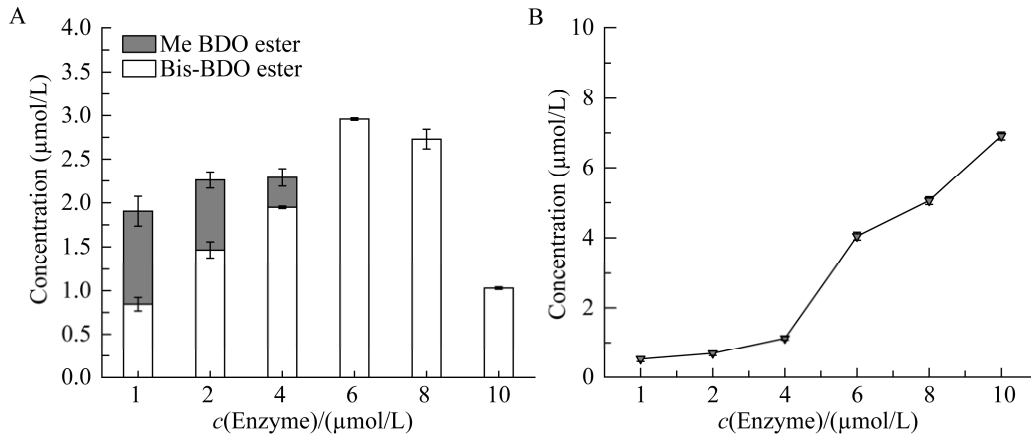


图7 酶浓度对 *RgPETase* 催化 FDME 转化为 Me ester、bis-BDO ester、Me BDO ester 的影响

Figure 7 The effect of enzyme concentration on the conversion of FDME to Me ester, bis-BDO ester and Me BDO ester with *RgPETase*. Bioconversion of 10 mmol/L FDME with different concentration *RgPETase* for (A) acyl transfer products Me BDO ester and bis-BDO ester, and (B) hydrolysis product Me ester was performed in Tris-HCl buffer (50 mmol/L, pH 8.0) containing 30% (V/V) BDO at 30 °C for 24 h. The data was calculated with background deduction.

## 2.7 反应时间对 *RgPETase* 催化活性的影响

如图8所示,在含有30% (体积分数) BDO和10 µmol/L纯酶的反应体系中,0–9 h时间段内,酯化产物 bis-BDO ester 和 Me BDO ester 的

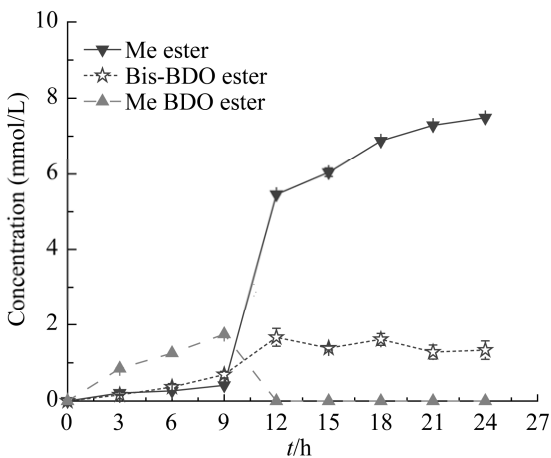


图8 反应时间对 *RgPETase* 催化 FDME 转化为 Me ester、bis-BDO ester、Me BDO ester 的影响

Figure 8 The effect of reaction time on the conversion of FDME to Me ester, bis-BDO ester and Me BDO ester with *RgPETase*. Bioconversion of 10 mmol/L FDME was performed with 10 µmol/L *RgPETase* in Tris-HCl buffer (50 mmol/L, pH 8.0) containing 30% (V/V) BDO at 30 °C. The data was calculated with background deduction.

产量随着反应时间的增加逐渐得到提升,反应时间超过9 h后,Me BDO ester一方面通过酰基转移反应转化为 bis-BDO ester,另一方面又通过水解反应转化为水解产物 Me ester,证实了 *RgPETase* 作用下,单酯化产物 Me BDO ester 可通过酰基转移反应转化为双酯化产物 bis-BDO ester。

## 3 讨论与结论

聚(己二酸丁二酸二丁酯-2,5-咪喃二羧酸丁二醇酯) (PBAF)是一种可生物降解的咪喃基共聚酯塑料。化学合成 PBAF 的过程中,寡聚片段聚合的随机性会生成嵌段共聚物、无规共聚物、交替共聚物等多种种类复杂聚合物,从而影响生物塑料 PBAF 的质量。本研究以单体 2,5-咪喃二甲酸二甲酯(FDME)和 1,4-丁二醇(BDO)为底物,通过酶促反应合成双(4-羟基丁基)咪喃-2,5-二羧酸酯(bis-BDO ester),为生物塑料 PBAF 提供可控的生物塑料前体。酶法合成的 bis-BDO 酯是与脂肪族单体(如乙酸二甲酯)进行化学催化共聚的非常有前景的生物塑料前体<sup>[12]</sup>,使后续生物塑料 PBAF 的聚合更均一并且更可控。混杂



水解酶/酰基转移酶因其能有效催化酰基转移反应来生成酯、硫酯和氨基甲酸酯等而引起人们的关注,是催化酰基转移反应的理想生物催化剂<sup>[10]</sup>。目前关于混杂水解酶/酰基转移酶的发现及研究较少,亟须发现这样的酶类。

目前国内外还没有关于 *RgPETase* 具有酰基转移活性的报道,本研究在大肠杆菌 BL21(DE3) 中异源表达了来源于 *Rhizobacter gummiphilus* 的 *RgPETase*,发现 *RgPETase* 除已报道的酯键水解活性<sup>[20]</sup>外,还具有将 FDME 和 BDO 转化为 bis-BDO 双酯和 Me BDO 单酯的酰基转移酶活性。我们进而通过优化反应体系的 pH 值、反应温度、BDO 的含量及酶浓度,提升将 FDME 转化为 bis-BDO 双酯和 Me BDO 单酯的转化率,进而减少水解副产物的生成。通过优化温度,确定 *RgPETase* 发挥酰基转移活性的适宜温度区间为 25–30 °C,较高的温度(37 °C)对 *RgPETase* 的酰基转移活性不利,影响双酯化产物 bis-BDO 酯的生成,因此酰基转移反应可能更适合在中等温度条件下进行。通过优化 BDO 的含量发现,*RgPETase* 在 30% BDO 的条件下表现对酰基转移活性的偏好性,在不含 BDO 的条件下,底物 FDME 只发生水解反应生成水解产物;BDO 含量超过 50%时,基本不影响水解产物 Me ester 的产量,但酯化产物 bis-BDO 双酯和 Me BDO 单酯的产量却明显减少,原因可能是增加有机溶剂 BDO 的浓度抑制了 *RgPETase* 的酶活。我们还发现 *RgPETase* 的酶浓度过高时(>8 μmol/L),反应更偏好于水解反应生成水解产物 Me ester,不利于酰基转移反应的进行。优化条件后,*RgPETase* 可催化 10 mmol/L FDME 产生 (2.96±0.01) mmol/L bis-BDO 酯,即 bis-BDO 酯的转化率能达 29.6%以上。本研究为 *RgPETase* 转化 FDME 为酯化产物 bis-BDO 酯的应用提供了方法,但与其他同源酶<sup>[12]</sup>如 PETase、TfH、

CalB 相比,*RgPETase* 的转化效率较低,后续可通过酶分子改造的方式提高 *RgPETase* 的活性,提高酯化产物 bis-BDO 酯的转化率。

## 参考文献

- [1] EPPS TH, KORLEY LTJ, YAN TW, BEERS KL, BURT TM. Sustainability of synthetic plastics: considerations in materials life-cycle management[J]. JACS Au, 2022, 2(1): 3-11.
- [2] TOKIWA Y, CALABIA BP, UGWU CU, AIBA S. Biodegradability of plastics[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2009, 10(9): 3722-3742.
- [3] BABU RP, O' CONNOR K, SEERAM R. Current progress on bio-based polymers and their future trends[J]. Progress in Biomaterials, 2013, 2: 8.
- [4] ATIWESH G, MIKHAEL A, PARRISH CC, BANOUB J, LE TAT. Environmental impact of bioplastic use: a review[J]. Heliyon, 2021, 7(9): 07918.
- [5] ROSENBOOM JG, LANGER R, TRAVERSO G. Bioplastics for a circular economy[J]. Nature Reviews Materials, 2022, 7: 117-137.
- [6] GEYER R, JAMBECK JR, LAW KL. Production, use, and fate of all plastics ever made[J]. Science Advances, 2017, 3(7): 1700782.
- [7] GANDINI A. Furans as offspring of sugars and polysaccharides and progenitors of a family of remarkable polymers: a review of recent progress[J]. Polymer Chemistry, 2010, 1(3): 245-251.
- [8] WU B, XU YT, BU ZY, WU LB, LI BG, DUBOIS P. Biobased poly(butylene 2,5-furandicarboxylate) and poly(butylene adipate-co-butylene 2,5-furandicarboxylate): from synthesis using highly purified 2,5-furandicarboxylic acid to thermo-mechanical properties[J]. Polymer, 2014, 55(16): 3648-3655.
- [9] MÜLLER H, TERHOLSEN H, GODEHARD SP, BADENHORST CPS, BORNSCHEUER UT. Recent insights and future perspectives on promiscuous hydrolases/acyltransferases[J]. ACS Catalysis, 2021, 11(24): 14906-14915.
- [10] ZAKS A, KLIBANOV AM. Enzymatic catalysis in organic media at 100 °C[J]. Science, 1984, 224(4654): 1249-1251.
- [11] PARISI D, RILEY C, SRIVASTAVA AS, MCCUE HV, JOHNSON JR, CARNELL AJ. PET hydrolysing enzymes catalyse bioplastics precursor synthesis under

- aqueous conditions[J]. *Green Chemistry*, 2019, 21(14): 3827-3833.
- [12] RIAUBLANC A, RATOMAHENINA R, GALZY P, NICOLAS M. Peculiar properties of lipase from *Candida parapsilosis* (Ashford) langeron and talice[J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1993, 70(5): 497-500.
- [13] JAN AH, DUBREUCQ E, DRONE J, SUBILEAU M. A glimpse into the specialization history of the lipases/acyltransferases family of CpLIP2[J]. *Biochimica et Biophysica Acta Proteins and Proteomics*, 2017, 1865(9): 1105-1113.
- [14] MÜLLER J, SOWA MA, DÖRR M, BORNSCHEUER UT. The acyltransferase activity of lipase CAL-A allows efficient fatty acid esters formation from plant oil even in an aqueous environment[J]. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2015, 117(12): 1903-1907.
- [15] MÜLLER J, SOWA MA, FREDRICH B, BRUNDIEK H, BORNSCHEUER UT. Enhancing the acyltransferase activity of *Candida antarctica* lipase A by rational design[J]. *Chembiochem*, 2015, 16(12): 1791-6.
- [16] BIERMANN U, BORNSCHEUER UT, FEUSSNER I, MEIER MAR, METZGER JO. Fatty acids and their derivatives as renewable platform molecules for the chemical industry[J]. *Angewandte Chemie*, 2021, 60(37): 20144-20165.
- [17] MESTROM L, CLAESSEN JGR, HANEFELD U. Enzyme-catalyzed synthesis of esters in water[J]. *ChemCatChem*, 2019, 11(7): 2004-2010.
- [18] DUAN S, ZHANG N, CHAO T, WU Y, WANG M. The structural and molecular mechanisms of type II PETases: a mini review[J]. *Biotechnology Letters*, 2023, 45: 1249-1263.
- [19] ZHENG M, LI Y, DONG W, ZHANG W, FENG S, ZHANG Q, WANG W. Depolymerase-catalyzed polyethylene terephthalate hydrolysis: a unified mechanism revealed by quantum mechanics/molecular mechanics analysis[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2022, 10(22): 7341-7348.
- [20] 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.