

# 宏基因组来源的酯酶酶学性质 及对邻苯二甲酸酯的降解\*

刘艳艳<sup>1</sup>, 刘孝龙<sup>2</sup>, 赵萌<sup>1</sup>, 范新炯<sup>1,3</sup>

1. 安徽医科大学基础医学院, 安徽合肥 230032;
2. 中国科学技术大学化学与材料科学学院, 安徽合肥 230026;
3. 中山大学生命科学学院, 广东广州 510275)

**摘要:** 邻苯二甲酸酯 (PAEs) 是一类全球性的重要环境污染物。找到广谱高效降解 PAEs 且具有良好的环境适应性的降解酶尤为重要。利用宏基因组学技术, 从土壤中克隆出一种新型酯酶基因 *est924*, 与已报道的来源于 *Synechococcus* sp. CC9311 的 alpha/beta-水解酶同源性最高, 为 62.42%。特异性扩增酯酶基因 *est924*, 与质粒载体 pET-41a (+) 连接, 然后将重组质粒转化入大肠杆菌 BL21 (DE3) 中进行异源表达, 获得重组酯酶 Est924, 并研究其酶学性质和对 PAEs 的降解作用。研究表明该酶是一个具有良好稳定性和环境适应性的耐碱酯酶, 并对邻苯二甲酸二甲酯 (DMP)、邻苯二甲酸二乙酯 (DEP)、邻苯二甲酸二丙酯 (DPrP)、邻苯二甲酸二丁酯 (DBP)、邻苯二甲酸二戊酯 (DPP) 以及邻苯二甲酸二己酯 (DnHP) 等多种 PAEs 均具有较好的降解活性。因此, 酯酶 Est924 对 PAEs 污染环境具有巨大的修复潜能。

**关键词:** 酯酶; 邻苯二甲酸酯; 宏基因组学

**中图分类号:** Q815 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2020) 06-0041-10

## The enzymatic properties of esterase from metagenomic sources and the degradation of phthalates

LIU Yanyan<sup>1</sup>, LIU Xiaolong<sup>2</sup>, ZHAO Meng<sup>1</sup>, FAN Xinjiong<sup>1,3</sup>

1. School of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032, China;
2. School of Chemistry and Materials Science,  
University of Science and Technology of China, Hefei 230032, China;
3. School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

**Abstract:** Phthalate esters (PAEs) are a kind of important global environmental pollutants. It is particularly important to find a broad spectrum of enzymes that degrade PAEs efficiently and have good environmental adaptability. A novel esterase gene *est924* was cloned from microorganisms in soil by metagenomic technique, with the highest homology of 62.42% to the reported alpha/beta-hydrolase derived from *Synechococcus* sp. cc9311. The gene encoding *est924* was obtained by PCR amplification, the recombinant plasmid was obtained by ligating the plasmid pET-41a (+) with *est924*. Then, the recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) for heterologous expression, and the recombinant esterase

\* 收稿日期: 2020-03-29

基金项目: 国家自然科学基金 (31400680); 校企合作项目 (0108034202); 安徽省高校自然科学研究重点项目 (KJ2019A0273); 省级大学生创新创业项目 (20810366039)

作者简介: 刘艳艳 (1995年生), 女; 研究方向: 酶工程与生物转化; E-mail: liuyanyan995@163.com

通信作者: 范新炯 (1985年生), 女; 研究方向: 酶工程与生物转化; E-mail: fanxinjiong@126.com

Est924 was obtained. The enzymatic properties of Est924 and its efficiency to degrade PAEs were studied. The results showed that Est924 obtained in this study was a new alkali-resistant esterase and had good degradation activities to dimethyl phthalate (DMP), diethyl phthalate (DEP), dipropyl phthalate (DPrP), dibutyl phthalate (DBP), diamyl phthalate (DPP) and dihexyl phthalate (DnHP). Therefore, Est924 has a great potential for PAEs bioremediation.

**Key words:** esterase; phthalate; metagenomics

邻苯二甲酸酯 (phthalates esters, PAEs) 是塑料工业生产中的一种增塑剂和软化剂, 用来提高塑料的弹性和柔韧性, 因此被广泛应用于工业塑料产品和消费品中, 如农药、润滑剂、橡胶、建筑材料、医疗器材、化妆品、餐具、儿童玩具等, 其在塑料制品中的添加量高达 20%~50%<sup>[1-2]</sup>。全球每年 PAEs 的使用量约 1.8 亿 t, 而且这一数据可能会持续增长<sup>[3-5]</sup>。在塑料中, PAEs 与塑料基质以非共价的形式结合, 因此在塑料产品的生产、使用和废弃处理过程中, PAEs 很容易从塑料产品中释放出来进入环境<sup>[6]</sup>。PAEs 在我国水资源和土壤环境中检出率较高, 长江、黄河和松花江等河流的多处水域受到 PAEs 的污染, 其浓度超出国家规定的饮用水标准限值<sup>[7]</sup>。大量研究表明, PAEs 的残留直接影响动植物的生长, 同时在动植物体内蓄积, 通过食物链转移到人体, 危害人类的健康<sup>[5]</sup>。PAEs 作为一种环境内分泌干扰物, 还可以通过消化、呼吸系统和皮肤等多种途径进入人体, 在人体内蓄积, 并对人体造成伤害<sup>[8]</sup>。多项研究表明, 长期接触 PAEs 可诱导胎儿死亡、癌症发生、肝脏功能和肾脏功能损伤<sup>[9]</sup>。也能够导致雄性生殖毒性, 主要体现为促黄体生成素 (LH)、睾酮、卵泡刺激素 (FSH) 等激素水平的改变, 精子质量降低, 严重的会导致睾丸癌<sup>[10-11]</sup>。产前接触 PAEs 会影响母体甲状腺激素和性激素的分泌, 同时其可能导致妊娠期高血压子痫及妊娠期糖尿病等疾病的发生、发展<sup>[12-15]</sup>。所以, 有必要寻找消除 PAEs 污染物的有效途径。

生物降解是去除环境中 PAEs 的主要途径, 具有高效、低成本和环境安全等特点<sup>[16]</sup>。生物降解途径是通过酯酶逐步脱酯化反应, 先生成相应的邻苯二甲酸单酯, 然后生成邻苯二甲酸<sup>[17]</sup>。近些年通过基因组文库法、基因组或转录组测序及注释分析等方法克隆出了水解 PAEs 的酯酶, 但是数量并不多。来源于芽孢杆菌 HJ14 的酯酶 EstZ1 对邻苯二甲酸二乙酯 (DEP) 有降解作用<sup>[18]</sup>; *Sulfobacillus acidophilus* DSM10332 中的 PAEs 酯酶 EstS1、

来源于废水生物膜的宏基因组文库的酯酶 DphB 以及克隆于 *Camelimonas* sp. M11 的酯酶均不能水解毒性更大的邻苯二甲酸二甲酯 (DMP)<sup>[19-21]</sup>; 来源于 *Picrophilus torridus* 的 PAEs 酯酶 EstPt1 和 *Acinetobacter* sp. LMB-5 的酯酶 Est\_3563 对邻苯二甲酸二丁酯 (DBP) 有降解作用<sup>[22-23]</sup>; 从土壤宏基因组文库中克隆 FAEs 酶 BDS4 能水解 DMP、DEP、DBP, 对邻苯二甲酸二丙酯 (DPrP) 以及其它中长侧链的 PAEs 无降解作用<sup>[24]</sup>; 从 *Bacillus velezensis* SYBC H47 中克隆的酯酶 BaCEs04 能够水解 DMP、DEP、DPrP、DBP, 但是不能降解邻苯二甲酸二戊酯 (DPP)、邻苯二甲酸二己酯 (DnHP)<sup>[25]</sup>。上述酯酶能够水解邻苯二甲酸二烷基酯生成相应的单酯, 但大多数酶对 PAEs 的降解谱较窄。来源于 *Acinetobacter* sp. M673 的酯酶能够水解 DMP、DEP、DPrP、DBP、DPP、DnHP 等多种 PAEs 为相应的单酯, 底物谱较广, 最适 pH 为 7.5, 但在碱性 pH 中耐受性较差<sup>[26]</sup>。现阶段所筛选到的酯酶最适 pH 多在 7.5 ~ 8.0 范围内, 虽然酯酶 EstZ1 和酯酶 EstPt1 最适 pH 超过 8.0, 但是只能降解一种 PAEs<sup>[18, 23]</sup>。因此, 筛选具有广谱 PAEs 降解活性和良好环境适应性的酯酶具有重要意义。

本研究构建土壤宏基因组文库, 利用功能筛选方法, 从中克隆新的酯酶基因, 并对其进行异源表达, 研究其酶学性质, 以期获得广谱 PAEs 降解活性和良好环境适应性的新酯酶, 为有效修复 PAEs 污染环境奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 化学品和材料** 对硝基苯酚酯均购自 Sigma 公司 (美国); T<sub>4</sub> DNA 连接酶、限制性核酸内切酶、DNA 聚合酶和低相对分子质量蛋白质标品购自 TaKaRa (中国, 大连) 并根据制造商的推荐使用; E. Z. N. A<sup>®</sup> Plasmid Mini Kit 和 E. Z. N. A<sup>®</sup> Gel Extraction Kit 购自 OMEGA (美国); 三丁酸甘油酯、罗丹明 B、PAEs (DMP、DEP、DPrP、

DBP、DPP、DnHP)、氨苄青霉素钠 (AMP)、异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (IPTG)、硫酸卡那霉素 (Kana) 和 5-溴-4-氯-3-吡啶- $\beta$ -D-半乳糖苷 (X-gal) 购自 Aladdin (中国, 上海); 蛋白纯化试剂盒 (His·Bind® Purification Kit) 购于 Novagen 公司 (德国); 胰蛋白胨、酵母提取物购于 OXOID 公司 (英国); 引物合成和基因测序由华大基因完成; 除另有说明外, 其它化学品和试剂均为分析级, 并从商业来源购买。

### 1.1.2 培养基的制备

1) LB 培养基 (g/L): 胰蛋白胨 10.0 g、酵母提取物 5.0 g、NaCl 10.0 g, 调 pH 至 7.0 并定容至 1 L, 121 °C 灭菌 20 min。

2) LB 固体培养基 (g/L): 胰蛋白胨 10.0 g、酵母提取物 5.0 g、NaCl 10.0 g, 加入  $w$  为 1.5%~2% 的琼脂粉, 调 pH 至 7.0, 定容至 1 L, 121 °C 灭菌 20 min。

3) 酯酶筛选培养基: LB 固体培养基中加入 100  $\mu$ g/mL AMP (或 100  $\mu$ g/mL Kana)、0.1 mmol/L IPTG、0.1% (V/V) 三丁酸甘油酯和 0.1 mg/mL 罗丹明 B。

1.1.3 细菌菌株和质粒 使用 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  和 *E. coli* BL21 (DE3) (本实验室保存) 作为分子克隆的宿主。pUC118 (TaKaRa) 和 pET-41a (+) (Novagen) 分别用于构建宏基因组文库和基因表达。

1.1.4 实验仪器 Multiskan Go 全波长酶标仪 (Thermo)、PCR 扩增仪 (Bio-Rad)、恒温摇床 (上海智诚生物有限公司)、隔水式电热恒温培养箱 (上海一恒科学仪器有限公司)、电热恒温水槽 (上海精宏实验设备有限公司)、移液器 (Eppendorf)、蛋白电泳仪 (北京六一生物科技有限公司)、核酸电泳仪 (北京六一生物科技有限公司)、超声破碎仪 (Sonic)、超净工作台 (苏州净化设备有限公司)、立式压力蒸汽灭菌器 (合肥华泰集团股份有限公司)。

## 1.2 方法

1.2.1 宏基因组文库的构建和筛选 按参考文献 [27] 的方法提取 DNA, 将提取的总 DNA 用 *Bam*H I 不完全酶切, 回收 3~8 kb 大小的片段并连接到 pUC118 载体中, 然后将连接产物转入到宿主 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 将转化产物涂布到酯酶筛选培养基 (含终质量浓度为 100  $\mu$ g/mL 的 AMP) 上, 37 °C 培养过夜。含有酯酶基因的阳性克隆菌能够水解培

培养基中的三丁酸甘油酯, 在菌落周围形成透明圈, 罗丹明 B 可使透明圈清晰可见。因此, 挑出具有明显透明圈的单克隆, 进一步测试其对对硝基苯酚乙酸酯 (*p*-NPC2) 的水解能力, 确定有活性的阳性克隆进行测序。利用 NCBI 提供的 ORF Finder 进行开放阅读框 (open reading frame, ORF) 搜索, 利用 NCBI 提供的 BLAST 程序进行数据库同源搜索。用 ClustalX 软件分析了氨基酸序列相关酶的保守基序。

1.2.2 酯酶基因的克隆、表达和纯化 通过 PCR 从 pUC118 重组质粒中扩增目的基因 *est924*。在 PCR 引物中引入 *Bam*H I 和 *Hind* III 限制性酶切位点, 引物序列为: Forward: 5'-TTATTGGATC-CATGCCCAGCCAACAGCTCGC-3' (下划线部分为 *Bam*H I 酶切位点); Reverse: 5'-ATCCAAGCTTC-TAGCCGTGCTTGCGCACGAA-3' (下划线部分为 *Hind* III 酶切位点)。PCR 程序为: 98 °C, 3 min; 98 °C, 30 s, 63 °C, 30 s, 72 °C, 30 s, 30 个循环; 72 °C, 10 min。

将扩增产物以  $w=1%$  的琼脂糖凝胶电泳, 利用 E. Z. N. A® Gel Extraction Kit 回收目的片段。纯化后的目的片段经 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切后与经同种酶处理的 pET-41a (+) 载体连接, 并转入 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞, 涂布于酯酶筛选培养基 (100  $\mu$ g/mL Kana), 37 °C 培养过夜。阳性克隆接种于 LB 液体培养基 (含 100  $\mu$ g/mL Kana) 中, 37 °C、190 r/min 条件下, 恒温过夜培养。再以 1/100 的接种量将活化的菌液转接到 LB 液体培养基 (含 100  $\mu$ g/mL Kana) 中, 37 °C、200 r/min 振荡培养 2~3 h, 当  $A_{600}$  在 0.5~0.6 时, 加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG 于 30 °C 诱导表达 8 h。收集菌体超声波破碎, 12 000 r/min 离心 5 min 获得粗酶液。用 Ni-NTA 纯化目的蛋白, 加入  $\varphi=50%$  甘油, -20 °C 保存备用。采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳法 (SDS-PAGE) 测定变性蛋白的相对分子质量, 并用考马斯亮蓝染色以确定其相对分子质量的大小 [28]。利用 BCA 蛋白定量测定纯化蛋白浓度。

1.2.3 底物特异性 依据 Fan 等 [27] 研究方法, 使用酯酶/脂肪酶的通用底物 *p*-NPC2、对硝基苯酚丁酸酯 (*p*-NPC4)、对硝基苯酚己酸酯 (*p*-NPC6)、对硝基苯酚辛酸酯 (*p*-NPC8)、对硝基苯酚癸酸酯 (*p*-NPC10)、对硝基苯酚月桂酸酯 (*p*-NPC12)、对硝基苯酚棕榈酸酯 (*p*-NPC16) 等研究 *Est924* 的底物特异性。以 pH 7.0、100 mmol/L 的磷酸钾缓冲

液配制 100 mmol/L 的底物工作液, 用于检测 Est924 对不同碳链长度的底物的水解特性。底物与酶在 55 °C 反应 5 min 后, 反应液在 405 nm 波长下测定 *A* 值。最高酶活性计为 100%, 以相对酶活性对底物作图, 以确定底物特异性。

**1.2.4 最适温度** 将适量的重组酯酶 Est924 与 100 mmol/L 的 *p*-NPC4 为底物混合, 分别置于 20、30、40、50、55、60 和 65 °C 的温度下孵育 5 min 后, 在 405 nm 波长下测定 *A* 值, 以确定最适温度。最高酶活性计为 100%, 以相对酶活性对温度作图。

**1.2.5 最适 pH** 首先配制不同 pH 的缓冲液, 然后配制不同 pH 的 *p*-NPC4 工作液 (pH 6.47 ~ 9.18)。将适量的重组酯酶 Est924 与不同 pH 的底物工作液在 55 °C 下反应 5 min 后, 在 405 nm 波长下测定 *A* 值, 以确定最适 pH。最高酶活性计为 100%, 以相对酶活性对 pH 作图。

**1.2.6 温度稳定性** 将适量的酯酶在 25、30、40、45、50 °C 等水浴中孵育, 不同时间取样。以 *p*-NPC4 为底物, 55 °C 下反应 5 min 后, 反应液在 405 nm 波长下测定 *A* 值, 测定其剩余酶活性。以未经热处理的初始酶活定义为 100%, 以相对酶活性对温度作图, 以评估酶的热稳定性。

**1.2.7 pH 稳定性** 通过浓缩菌体进行超声波破碎以减少缓冲液本身对 pH 的影响。适量的重组酯酶 Est924 在不同 pH 的 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 缓冲液中, 30 °C 水浴孵育, 不同时间进行取样。以 *p*-NPC4 为底物, 55 °C 下反应 5 min 后, 反应液在 405 nm 波长下测定 *A* 值, 测定其剩余酶活性。以未经处理的酶活性定义为 100%, 以相对酶活性对 pH 作图, 以确定其 pH 稳定性。

**1.2.8 生化试剂对重组酯酶 Est924 的影响** 在酶液中加入终浓度为 1 mmol/L 金属离子 (MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、KCl、MnCl<sub>2</sub>、CoCl<sub>2</sub>、AlCl<sub>3</sub>、CrCl<sub>2</sub>、FeCl<sub>3</sub>、EDTA) 和终浓度为 1% (V/V) 的有机溶剂 (Tween-80、Triton X-100)。0 °C 放置 24 h 后, 以 *p*-NPC4 为底物, 55 °C 下反应 5 min, 反应液在 405 nm 波长下测定 *A* 值, 测定其剩余酶活性。以未经生化试剂处理的酶活性定义为 100%。评估金属离子和有机溶剂对酶活性的影响。

**1.2.9 重组酯酶 Est924 对邻苯二甲酸酯的降解能力** 根据 Huang 等<sup>[29]</sup> 方法, 检测重组酯酶 Est924 对邻苯二甲酸酯的降解能力。反应体系 1 mL, 包括: 1.6 μL 的 PAEs (DMP、DEP、DPrP、DBP、

DPP、DnHP) 溶解于 50 μL 二甲基亚砷 (DMSO)、100 μL 粗酶液、848.4 μL pH 7.0 (10 mmol/L) Tris-HCl 缓冲液。以不加酶液为对照, 在 45 °C 反应 3 h 后, 用等体积的乙酸乙酯进行萃取。取适量萃取液点于硅胶板上, 进行薄层层析 (TLC) 检测。展层剂为: 石油醚: 乙酸乙酯: 冰乙酸 (体积比为 20:1:0.5)。展层结束后取出硅胶板, 并在 235 nm 紫外灯下观察。

## 2 结果

### 2.1 宏基因组文库的构建和筛选

从约 12 000 个克隆子的土壤宏基因组文库中, 筛选获得了一个在酯酶筛选培养基上产生水解透明圈的阳性菌。对测序结果分析, 发现一个 924 bp 大小的酯酶基因, 并命名为 *est924*, 序列见附加材料 1。该基因编码由 307 个氨基酸残基构成的蛋白, 此蛋白与已报道的来源于 *Synechococcus* sp. CC9311 的 alpha/beta-水解酶具有最高同源性 (62.42%), 与来源于未培养微生物的酯酶 (QCQ29100.1) 具有 49.51% 的同源性。将 Est924 与已报道的 PAEs 水解酶多序列比对分析, 结果如图 1 所示, 发现编码的蛋白中存在典型的催化三元组: 位于保守基序 G-X-S-X-G 中心的活性位点丝氨酸 (S152)、保守的天冬氨酸 (D253) 和组氨酸 (H279)。

### 2.2 酯酶基因的克隆、表达和纯化

以 *p*-UC118 重组质粒为模板, 经 PCR 扩增得到一个大小 924 bp 的基因片段, 大小与预期一致。以 pET-41a (+) 为载体、*E. coli* BL21 (DE3) 为宿主菌构建重组菌。重组菌诱导表达后的蛋白利用 Ni-NTA 分离纯化, SDS-PAGE 电泳检测纯化后蛋白, 如图 2 所示, 箭头指示目的蛋白, 已去除绝大多数的杂蛋白。目的蛋白的相对分子质量为 58 320, 其中包含 24 550 的融合标签, 与预测的蛋白相对分子质量相符。

### 2.3 重组酯酶 Est924 的酶学性质表征

**2.3.1 底物特异性** 选用酯酶/脂肪酶的通用底物研究 Est924 的底物特异性, 结果见图 3。在所检测的对硝基苯酚酯中, 重组酯酶 Est924 对 *p*-NPC4 的活性最高, *p*-NPC2、*p*-NPC6、*p*-NPC8 活性分别为 *p*-NPC4 的 50%、20%、14%, 对 *p*-NPC10、*p*-NPC12、*p*-NPC16 几乎没有活性。说明酯酶的最适底物为 *p*-NPC4, 更适合降解短链至中链的对硝基苯酚酯。以 *p*-NPC4 为底物时, 该酶的  $K_m$  和  $V_{max}$  分别为 77 μmol·L<sup>-1</sup> 和 6 μmol·L<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>。

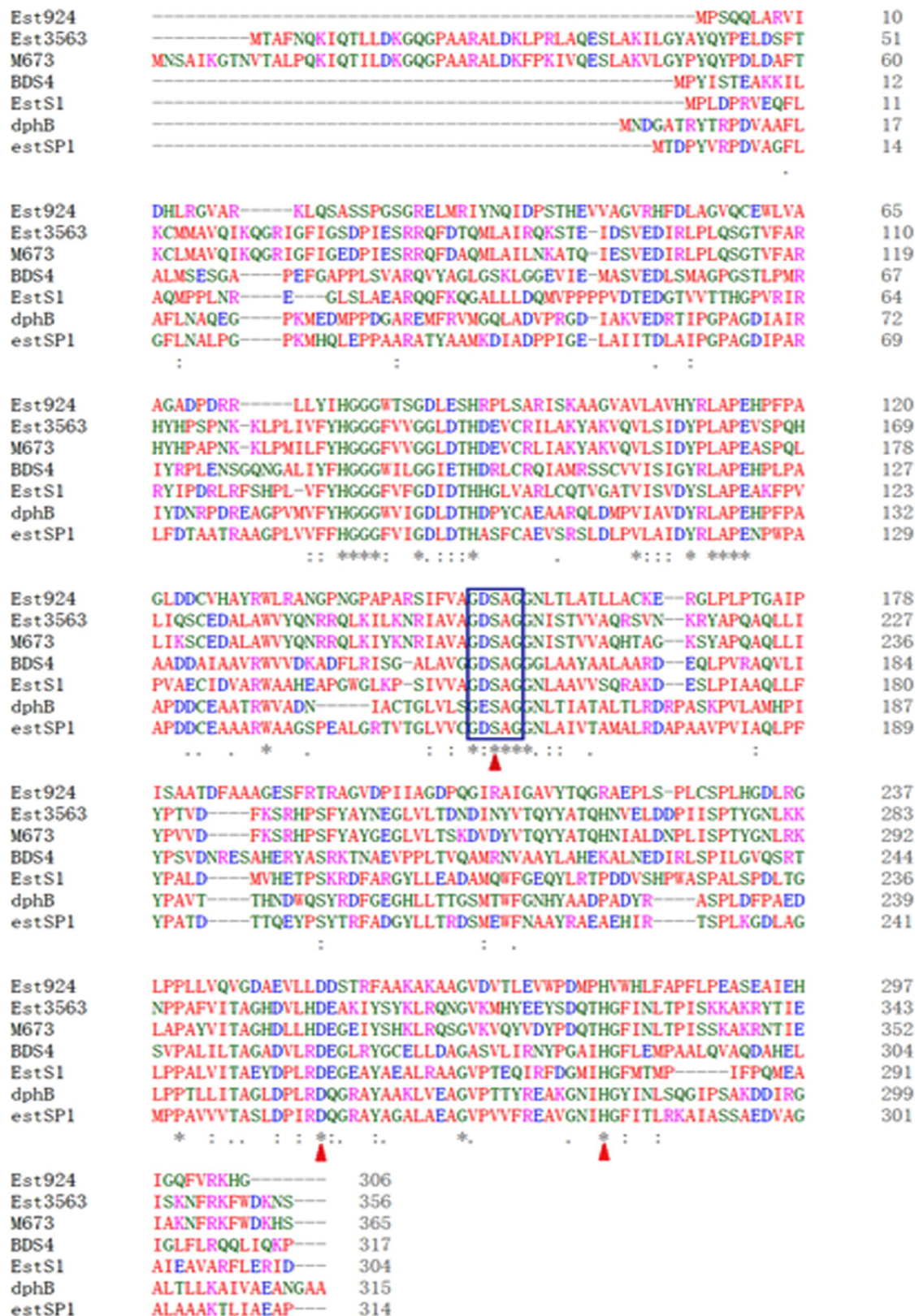


图 1 Est924 的多序列比对分析

Fig. 1 Multiple sequence alignment of Est924

包含 G-X-S-X-G 保守基序的部分氨基酸序列和已报道的 PAEs 水解酶的多重比对推定催化三元组残基。除 Est924(本研究)外,其他蛋白序列均来自 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。按照排列顺序所比较的氨基酸序列的登录号为: QEY02338、JQ478494、KC438416、WP\_037492848、AEW03609、AWR93191 以及本文研究的 Est924。框起来的部分是活性丝氨酸位点周围的保守基序 G-X-S-X-G, 三角形表示活性位点

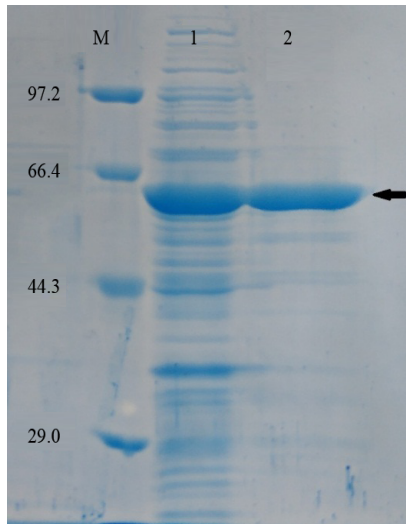


图2 重组蛋白Est924的SDS-PAGE鉴定

Fig. 2 SDS-PAGE electrophoresis of esterase protein  
箭头所指出重组蛋白Est924; M: 低相对分子质量标准蛋白 (TaKaRa); 1: 纯化前的重组蛋白Est924; 2: 纯化后的重组蛋白Est924

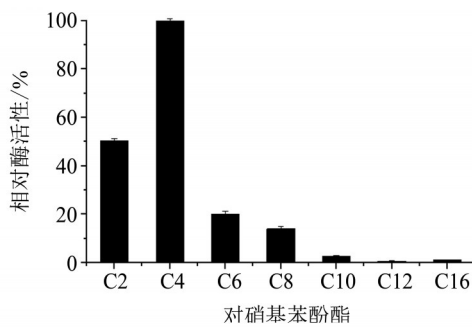


图3 重组蛋白Est924的底物特异性

Fig. 3 Substrate specificity of Est924

**2.3.2 最适温度** 在20、30、40、50、55、60、65℃下测定温度对酯酶Est924活性的影响, 结果见图4。随着温度的升高, 酯酶活性逐渐升高, 当温度超过55℃时, 酯酶活性下降, 说明其最适温度为55℃。在30~60℃温度范围内, 相对酶活性均在60%以上, 说明该酶具有很好的温度适应性。

**2.3.3 最适反应pH** 在pH 6.47~9.18的范围内, 以p-NPC4为底物, 测定酯酶的最适反应pH, 结果见图5。重组酯酶Est924在pH 8.34时活性最高, 在pH 7.38~9.18的范围内, 相对酶活在80%以上, 表明该酶在中性至碱性条件下有很好的适应性。

**2.3.4 温度稳定性** 将酯酶Est924在25、30、40、45、50℃分别保温不同的时间, 以评估其热

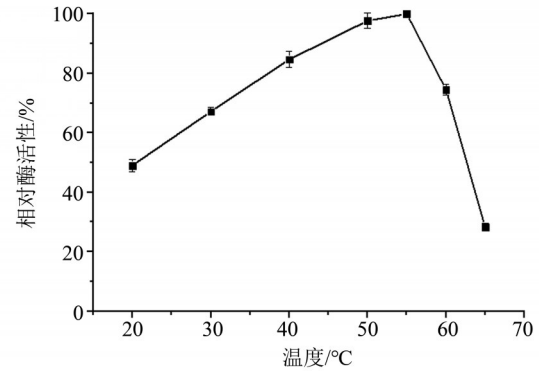


图4 温度对重组酯酶Est924活性的影响

Fig. 4 Effect of temperature on activity of Est924

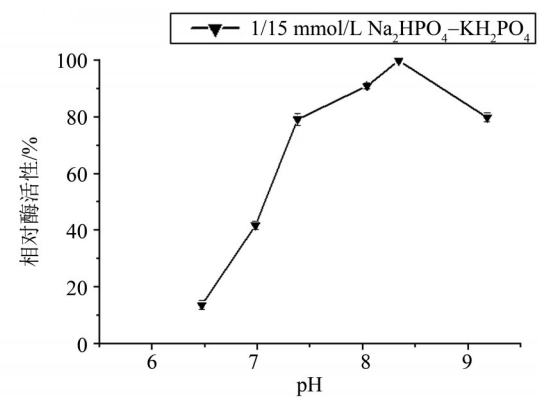


图5 pH对重组酯酶Est924活性的影响

Fig. 5 Effect of pH on activity of Est924

稳定性, 结果见图6。重组酯酶Est924在25℃和30℃处理24h后, 保留80%以上的活性, 说明酯酶在30℃以下十分稳定; 在40℃孵育12h后仍保留约50%的酶活性。以上表明该酶在中低温条件下具有较好的热稳定性。但50℃时酶活性下降较明显, 热处理2h的剩余酶活性为20%。

**2.3.5 pH稳定性** 重组酯酶Est924在不同pH (6.47~9.18) 缓冲液中处理不同的时间后检测剩余酶活性, 以此确定pH对酯酶稳定性的影响, 结果见图7。pH 6.47时, 孵育5h酯酶活性下降到50%左右; pH 6.98时, 12h酯酶活性下降至初始的70%左右; 在pH 7.38~9.18的范围内, 24h仍保留70%以上的初始活性。说明此酶在碱性条件下具有良好的稳定性, 能够很好的适应pH的变化, 是一种耐碱性酯酶。

**2.3.6 生化试剂对重组酯酶Est924的影响** 酶促反应速率会受化学物质的影响。表1的结果显示, 多数金属离子对Est924表现为不同程度的抑制作用,  $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $K^+$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Al^{3+}$ 、 $Cr^{2+}$ 等的活性分别为80.1%、90.2%、86.2%、68.4%、

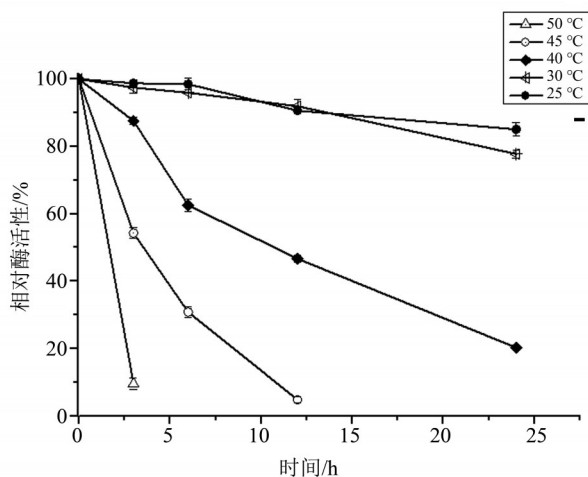


图6 温度对重组酯酶 Est924 稳定性的影响

Fig. 6 Effect of temperature on stability of Est924

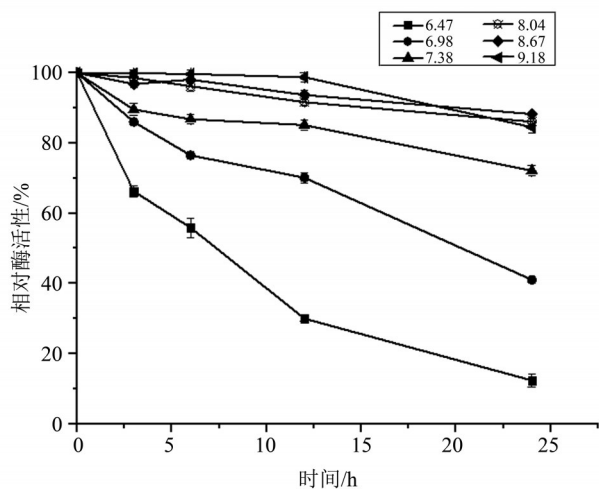


图7 pH对重组酯酶 Est924 稳定性的影响

Fig. 7 Effect of pH on stability of Est924

31.3%、64.1%、78.2%。 $\text{Fe}^{3+}$  以及表面活性剂 Tween-80 和 Triton X-100 等对 Est924 有不同程度的激活作用, 酶活性分别为 127.2%、107.1% 和 140.0%。金属螯合剂 EDTA 对酯酶 Est924 表现为激活作用, 说明酯酶 Est924 是非金属酶, 其催化活性不依赖于金属离子。

#### 2.4 重组酯酶 Est924 对邻苯二甲酸酯的降解能力

以 DMP、DEP、DPrP、DBP、DPP、DnHP 为底物来研究酯酶对 PAEs 降解作用, TLC 结果如图 8 所示。图中对照组条带为 PAEs, 条带的明暗代表着 PAEs 量的多少。实验组 5、7、9 中 PAEs 条带已基本消失, DPrP、DBP 和 DPP 基本被降解完全; 实验组 1 和 3 中 PAEs 条带明显变淡。以上结果表明重组酯酶 Est924 对 DMP、DEP、DPrP、DBP 和 DPP 具有很好的降解能力。实验组 11 中 PAEs 条带

表1 生化试剂对酯酶 Est924 活性的影响

Table 1 Effect of the various chemical reagents on activity of Est924

生化试剂	相对酶活性/%
None	100.0±0.3
$\text{Fe}^{3+}$	127.2±1.0
$\text{Mg}^{2+}$	80.1±0.8
$\text{Ca}^{2+}$	90.2±0.6
$\text{K}^+$	86.2±2.1
$\text{Co}^{2+}$	31.3±0.8
$\text{Mn}^{2+}$	68.4±2.6
$\text{Al}^{3+}$	64.1±1.1z
EDTA	109.0±2.0
$\text{Cr}^{2+}$	78.2±1.0
Tween-80	107.1±0.9
Triton X-100	140.0±0.8

与对照组 12 相比变淡, 但还比较明显, 说明该酶对 DnHP 的降解能力较弱。仔细观察实验组发现, 在 1、3、5、7、9 的 PAEs 条带下方、点样点上方位置, 有新条带产生, 而在对照组中没有。推测, 新条带是 PAEs 经水解后产生的单酯, 重组酯酶 Est924 对邻苯二甲酸酯的降解作用是通过逐步脱酯化反应实现的。

### 3 讨论

邻苯二甲酸酯是一类全球性的重要环境污染物。其中, 短链烷基酯 (C1~C4) 的溶解度比长链同系物高, 毒性更大<sup>[30]</sup>。美国环保局 (EPA) 将邻苯二甲酸二 (2-乙基己基) 酯 (DEHP)、邻苯二甲酸正二辛酯 (DOP)、邻苯二甲酸丁基苄基酯 (BBP)、DBP、DEP、DMP 等 6 种 PAEs 列为优先控制的有毒污染物, 中国环境监测总站将 DEP、DMP 和 DOP 等 3 种 PAEs 列为优先控制污染物<sup>[31]</sup>。因此, 找到广谱高效降解 PAEs 且具有良好环境适应性的降解酶尤为重要。

本研究利用宏基因组技术从土壤中挖掘出新酯酶 Est924, 并研究了其酶学性质以及对环境污染物 PAEs 的生物降解。通过对 Est924 进行序列分析, 推测活性位点与丝氨酸、天冬氨酸和组氨酸形成的催化三联体有关, 同时在活性丝氨酸位点周围含有典型的保守五肽结构 G-X-S-X-G, 这说明 Est924 属于酯酶家族。底物特异性结果显示, 重组酯酶 Est924 对 *p*-NPC4 的活性最高, 对 *p*-

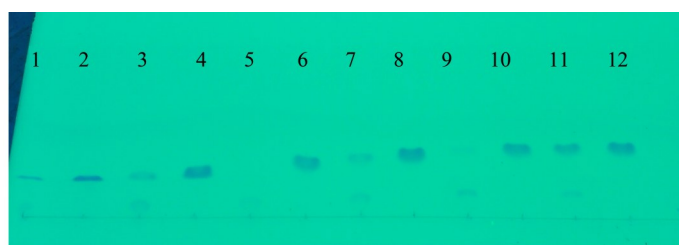


图8 TLC分析Est924对邻苯二甲酸酯的降解能力

Fig. 8 PAEs degradation ability analysis of Est924 by TLC

1, 3, 5, 7, 9, 11 分别为 DMP、DEP、DPrP、DBP、DPP、DnHP 分解实验组；

2, 4, 6, 8, 10, 12 分别为 DMP、DEP、DPrP、DBP、DPP、DnHP 分解对照组

1, 3, 5, 7, 9 and 11 were DMP, DEP, DPrP, DBP, DPP and DnHP decomposition experimental group, respectively;

2, 4, 6, 8, 10 and 12 were DMP, DEP, DPrP, DBP, DPP and DnHP decomposition control group, respectively

NPC2的活性为50%，对*p*-NPC6和*p*-NPC8活性非常低，而当碳链长度大于10时几乎没有活性，这与酯酶作用底物的碳链长度小于10具有一致性<sup>[32]</sup>。重组酯酶Est924的最适温度为55℃，在30~60℃温度范围内，相对酶活性均在60%以上；该酶在25℃和30℃处理24h后，保留80%以上的活性，在40℃孵育12h后仍保留约50%的酶活性。这表明该酶具有很好的温度适应性和较好的热稳定性。重组酯酶Est924在pH 8.34时活性最高，在pH 7.38~9.18的范围内，相对酶活在80%以上；在pH 7.38~9.18的环境下处理24h，仍保留70%以上的酶活性。这表明该酶是一个耐碱酶，且在中性至碱性条件下有很好的适应性。研究重组酯酶Est924对PAEs的降解能力发现，该酶对DMP、DEP、DPrP、DBP和DPP均具有很好的降解能力。以上研究数据证明，重组酯酶Est924是一个具有良好稳定性和环境适应性的耐碱酯酶，且对PAEs的降解具有广谱的底物特异性。

目前，也有降解PAEs碱性酯酶的报道，它们与Est924有着32%以上的同源性，基本的酶学性质有一些相似之处。其中EstZ1在pH 7.0~9.5的范围内维持50%以上的活性，对DEP有降解作用，对其它PAEs无水解作用<sup>[18]</sup>；EstPt1是一个耐热碱性酯酶，最适温度高达85℃，有着良好的热稳定性，但只有水解DBP的数据<sup>[23]</sup>；酯酶EstSP1的最适pH(9.0)高于酯酶Est924，能很好的耐受有机溶剂(甲醇和DMSO)，最适温度为40℃，在25℃下处理2h，酶活性下降为初始的37%，稳定性较差<sup>[33]</sup>。近些年，克隆的能降解PAEs的酯酶/脂肪酶数量还不多。来源于*Nocardia erythropolis*的脂肪

酶，其最适pH为8.6，在pH 7.0~8.0范围稳定，能分解大多数PAEs，底物谱较广，但其氨基酸序列未报道<sup>[34]</sup>。DphB是一种冷适应酶，最适温度为10℃，能催化DPrP、DBP、DPP的水解<sup>[20]</sup>。克隆于*Camelimonas* sp. M11的酯酶是一种金属酶，不能水解DMP，当pH大于8.0时该酶几乎没有活性<sup>[19]</sup>。BDS4是一个对PAEs和阿魏酸酯均具有降解作用的酯酶，能水解3种短链PAEs<sup>[24]</sup>；BaCEs04最适温度为60℃，高于酯酶Est924，在pH 5.5~8.0范围内稳定，只能水解PAEs(C1~C4)到相应的单酯<sup>[25]</sup>。来源于*Acinetobacter* sp. M673的酯酶<sup>[26]</sup>与Est924底物谱类似，该酶最适反应pH为7.5，当pH值超过6.0和9.0时，酶活性急剧下降。酯酶GoEst15具有广谱的底物特异性，能够水解几乎所有的PAEs，在pH 7.5~8.0条件下处理不到2h，几乎失活，在40℃活性迅速下降<sup>[29]</sup>，其pH和温度稳定性有待提高。

值得注意的是，现阶段所报道的酯酶多水解PAEs的一个酯键，生成单酯；仅有个别酶能水解两个酯键，如GoEst15能将PAEs水解为相应的单酯，与GoEstM1共表达后将单酯水解为邻苯二甲酸<sup>[29]</sup>；从*Bacillus* sp. K91基因组克隆了一个酯酶基因*CarEW*能水解邻苯二甲酸二异丁酯(DIBP)的两个酯键生成邻苯二甲酸<sup>[35]</sup>。本文Est924具有良好的酶学性质，但其对PAEs的降解机制需要继续深入研究。后续我们将利用突变技术对Est924定向改造，获得更优良的突变酶，同时阐述其对PAEs的降解机理，从而获得更好的应用前景和理论研究基础。

## 参考文献:

- [1] HORN O, NALLI S, COOPER D, et al. Plasticizer metabolites in the environment [J]. *Water Research*, 2004, 38(17): 3693–3698.
- [2] 陈永山, 骆永明, 章海波, 等. 设施菜地土壤酞酸酯污染的初步研究[J]. *土壤学报*, 2011, 48(3): 516–523.  
CHEN Y S, LUO Y M, ZHANG H B, et al. Preliminary study on pollution of greenhouse soils[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2011, 48(3): 516–523.
- [3] WANG J, LUO Y M, TENG Y, et al. Soil contamination by phthalate esters in Chinese intensive vegetable production systems with different modes of use of plastic film [J]. *Environmental Pollution*, 2013, 180: 265–273.
- [4] 曹龙, 张朝升, 陈秋丽, 等. 邻苯二甲酸酯的环境污染和生态行为及毒理效应研究进展[J]. *生态毒理学报*, 2018, 13(2): 34–46.  
CAO L, ZHANG C S, CHEN Q L, et al. Advances in research on environmental pollution, ecological behavior and toxicological effects of phthalates[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2018, 13(2): 34–46.
- [5] HE L, GIELEN G, BOLAN N S, et al. Contamination and remediation of phthalic acid esters in agricultural soils in China: a review [J]. *Agronomy for Sustainable Development*, 2015, 35(2): 519–534.
- [6] LI J L, ZHANG J F, YADAW M P, et al. Biodegradability and biodegradation pathway of di-(2-ethylhexyl) phthalate by *Burkholderia pyrrocinia* B1213[J]. *Chemosphere*, 2019, 225: 443–450.
- [7] WANG F, XIA X H, SHA Y J. Distribution of phthalic acid esters in Wuhan section of the Yangtze River, China [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2008, 154(1/2/3): 317–324.
- [8] SU P H, CHEN J Y, LIN C Y, et al. Sex steroid hormone levels and reproductive development of eight year old children following in utero and environmental exposure to phthalates [J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e102788.
- [9] CHOPRA V, HARLEY K, LAHIFF M, et al. Association between phthalates and attention deficit disorder and learning disability in U. S. children, 6–15 years[J]. *Environmental Research*, 2014(128): 64–69.
- [10] 高海涛. 邻苯二甲酸酯经口暴露致大鼠雄性生殖毒性的研究[D]. 南京: 东南大学, 2017.  
GAO H T. Effects of PAEs on male reproductive toxicity in rats after oral exposure [D]. Nanjing: Southeast University, 2017.
- [11] 周万灏, 贾孟春. 环境内分泌干扰物对男性生殖的影响[J]. *国外医学(计划生育/生殖健康分册)*, 2006(3): 174–177.  
ZHOU W H, JIA M C. Effects of environmental endocrine disruptors on male reproduction[J]. *Foreign Medical Sciences (Family Planning/Reproductive Health Fascicle)*, 2006(3): 174–177.
- [12] HUANG P C, TSAI C H, LIANG W Y, et al. Early phthalates exposure in pregnant women is associated with alteration of thyroid hormones [J]. *PLoS One*, 2016, 11(7): e159398.
- [13] YAO H Y, HAN Y, GAO H, et al. Maternal phthalate exposure during the first trimester and serum thyroid hormones in pregnant women and their newborns [J]. *Chemosphere*, 2016, 157: 42–48.
- [14] CANTONWINE D E, MEEKERJ D, FERGUSON K K, et al. Urinary concentrations of bisphenol a and phthalate metabolites measured during pregnancy and risk of preeclampsia [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2016, 124(10): 1651–1655.
- [15] ROBLEDO C A, PECK J D, STONER J, et al. Urinary phthalate metabolite concentrations and blood glucose levels during pregnancy [J]. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 2015, 218(3): 324–330.
- [16] FAN S H, WANG J H, YAN Y C, et al. Excellent degradation performance of a versatile phthalic acid esters degrading bacterium and catalytic mechanism of mono-alkyl phthalate hydrolase [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(9): 1–16.
- [17] LUO H Z, WU R Y, CHOW R K K, et al. Purification and characterization of an intracellular esterase from a *Fusarium* species capable of degrading dimethyl terephthalate [J]. *Process Biochemistry*, 2012, 47(5): 687–693.
- [18] 彭政, 丁俊美, 杨云娟, 等. 来源于芽孢杆菌HJ14耐热酯酶的克隆表达、酶学性质及降解邻苯二甲酸二乙酯研究[J]. *微生物学报*, 2016, 56(12): 1932–1943.  
PENG Z, DING J M, YANG Y J, et al. Cloning, heterologous expression and characterization of a thermostable esterase from *Bacillus* sp. HJ14 for diethyl-phthalate degradation [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(12): 1932–1943.
- [19] ZHANG X Y, FAN X, QIU Y J, et al. Newly identi-

- fied thermostable esterase from *Sulfobacillus acidophilus*: properties and performance in phthalate ester degradation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(22): 6870–6878.
- [20] JIAO Y Y, CHEN X, WANG X, et al. Identification and characterization of a cold-active phthalate esters hydrolase by screening a metagenomic library derived from biofilms of a wastewater treatment plant[J]. PLoS One, 2013, 8(10): e75977.
- [21] XU C, ZHANG X L, YU Y, et al. Biodegradation of an endocrine-disrupting chemical di-n-butyl phthalate by newly isolated *Camelimonas* sp. and enzymatic properties of its hydrolase[J]. Biodegradation, 2015, 26(2): 171–182.
- [22] 杜晓韵, 张兴群, 张晓彦. *Picophilus torridus* 嗜热酯酶的克隆表达及性质研究[J]. 食品与药品, 2019, 21(3): 169–173.
- DU X Y, ZHANG X Q, ZHANG X Y. Cloning, expression and characterization of thermophilic esterase from *Picophilus torridus*[J]. Food and Drug, 2019, 21(3): 169–173.
- [23] FANG Y, ZHANG S L, WANG J, et al. Biodegradation of phthalate esters by a newly isolated *Acinetobacter* sp. strain LMB-5 and characteristics of its esterase[J]. Pedosphere, 2017, 27(3): 606–615.
- [24] WU S L, NAN F, JIANG J W, et al. Molecular cloning, expression and characterization of a novel feruloyl esterase from a soil metagenomic library with phthalate-degrading activity[J]. Biotechnology Letters, 2019, 41(8/9): 995–1006.
- [25] HUANG L, MENG D, TIAN Q P, et al. Characterization of a novel carboxyl-esterase from *Bacillus velezensis* SYBC H47 and its application in degradation of phthalate esters[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2019, 129(5): 588–594.
- [26] WU J, LIAO X B, YU F B, et al. Cloning of a dibutyl phthalate hydrolase gene from *Acinetobacter* sp. strain M673 and functional analysis of its expression product in *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(6): 2483–2491.
- [27] FAN X J, LIU X L, HUANG R, et al. Identification and characterization of a novel thermostable pyrethroid-hydrolyzing enzyme isolated through metagenomic approach[J]. Microbial Cell Factories, 2012, 11:33.
- [28] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227(5259).
- [29] HUANG H, ZHANG X, CHEN T, et al. Biodegradation of structurally diverse phthalate esters by a newly identified esterase with catalytic activity toward Di(2-ethylhexyl) phthalate[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(31): 8548–8558.
- [30] VAMSEE K C, PHALE P S. Bacterial degradation of phthalate isomers and their esters[J]. Indian Journal of Microbiology, 2008, 48(1): 19–34.
- [31] WANG J L, YE Y C, WU W Z. Comparison of di-n-methyl phthalate biodegradation by free and immobilized microbial cells[J]. Biomedical and Environmental Sciences: BES, 2003, 16(2): 126–132.
- [32] KIM Y H, KWON E J, KIM S K, et al. Molecular cloning and characterization of a novel family VIII alkaline esterase from a compost metagenomic library[J]. Biochem Bioph Res Co, 2010, 393(1):45–49.
- [33] HONG D K, JANG S, LEE C. Gene cloning and characterization of a psychrophilic phthalate esterase with organic solvent tolerance from an Arctic bacterium *Sphingomonas glacialis* PAMC 26605[J]. Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic, 2016, 133: 337–345.
- [34] KURANE R, SUZUKI T, FUKUOKA S. Purification and some properties of a phthalate ester hydrolyzing enzyme from *Nocardia erythropolis*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1984, 20(6): 378–383.
- [35] DING J M, WANG C F, XIE Z R, et al. Properties of a newly identified esterase from *Bacillus* sp. K91 and its novel function in diisobutyl phthalate degradation[J]. PLoS One, 2015, 10(3): e119216.

(责任编辑 张冰)