



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116981725 A

(43) 申请公布日 2023. 10. 31

(21) 申请号 202280016531.2

(22) 申请日 2022.02.25

(30) 优先权数据

10-2021-0026729 2021.02.26 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.08.23

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2022/002784 2022.02.25

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/182196 KO 2022.09.01

(71) 申请人 高丽大学校产学协力团

地址 韩国首尔

(72) 发明人 金京宪 金东玄 金在均 韩东吴

(74) 专利代理机构 北京东方亿思知识产权代理  
有限责任公司 11258  
专利代理师 蒋桂梅

(51) Int.Cl.  
C08J 11/10 (2006.01)

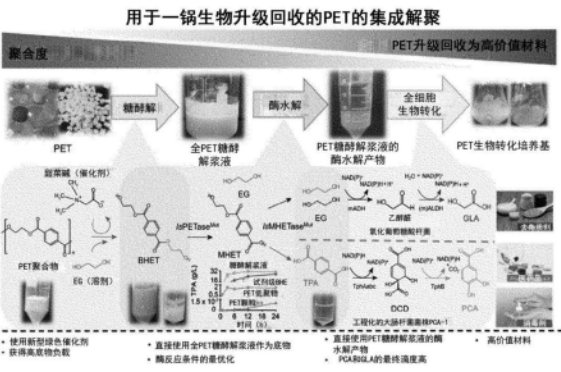
权利要求书1页 说明书14页  
序列表4页 附图15页

(54) 发明名称

用于回收聚对苯二甲酸乙二醇酯 (PET) 的  
PET化学和生物集成降解方法

(57) 摘要

本发明涉及用于回收PET的PET化学和生物集成降解方法,更具体地,本发明提供了通过PET的化学预处理过程、使用酶的TPA和EG生产过程以及将TPA和EG分别转化为PCA和GLA的过程来生产高价值产品的PET升级回收技术。



1. 一种使用糖醇解作为工艺将聚对苯二甲酸乙二醇酯 (PET) 解聚成低聚物的方法, 其中甜菜碱充当催化剂。

2. 一种由聚对苯二甲酸乙二醇酯 (PET) 生产高价值化合物的方法, 所述方法包括:

在存在甜菜碱作为催化剂的情况下通过PET糖醇解来生产双(2-羟乙基)对苯二甲酸酯 (BHET);

通过酶水解经由单(2-羟乙基)对苯二甲酸酯 (MHET) 将所生产的BHET解聚成对苯二甲酸和乙二醇; 以及

在存在生物催化剂的情况下通过生物转化将所述对苯二甲酸转化为原儿茶酸 (PCA), 或

通过发酵将所述乙二醇转化为乙醇酸 (GLA)。

3. 根据权利要求1或2所述的方法, 其中所述PET糖醇解通过在存在乙二醇溶剂的情况下施加微波来进行。

4. 根据权利要求2所述的方法, 其中所述BHET通过IsPETase水解成MHET, 并且所述MHET通过IsMHETase水解成对苯二甲酸和乙二醇。

5. 根据权利要求4所述的方法, 其中所述IsPETase由SEQ ID NO:1表示的碱基序列组成, 并且所述IsMHETase由SEQ ID NO:2表示的碱基序列组成。

6. 根据权利要求2所述的方法, 其中使用表达对苯二甲酸1,2-双加氧酶和1,2-二羟基-3,5-环己二烯-1,4-二羧酸脱氢酶的微生物作为生物催化剂来进行对苯二甲酸生物向原儿茶酸的转化。

7. 根据权利要求2所述的方法, 其中使用乙二醇发酵微生物来进行乙二醇的发酵, 所述乙二醇发酵微生物包括选自以下项组成的组的一种或多种: 氧化葡萄糖酸杆菌 (G. oxydans)\_KCCM 40109、乙二醇梭菌和恶臭假单胞菌。

## 用于回收聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)的PET化学和生物集成降解方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及用于回收聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)的PET的化学和生物集成解聚方法。

### 背景技术

[0002] 构成聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)的主要单元是通过酯键交联的对苯二甲酸(TPA)和乙二醇(EG)的聚酯。有三种已知的回收PET的主要方法。第一种方法是通过焚烧和热解的能量回收方法,并且该方法被普遍使用,但具有不期望的副产物、二氧化碳和化学品以及低效率的缺点。第二种方法是用于通过粉碎和重熔生产二次塑料的物理回收,并且具有质量降低的缺点。上述两种方法是低利用率方法,因此结果的值低。第三种方法是化学回收,其取决于溶剂。当使用水时,其为水解,当使用胺时,其为氨解,当使用醇时,其为醇解,并且当使用二醇时,其为糖醇解。然而,该方法也需要苛刻的条件,因此难以在工业规模上应用。此外,由于化学回收的最初目的是获得高纯度的单体从而再次制备纯塑料,因此需要用于获得单体的分离和纯化过程。该方法具有比常规塑料生产过程在经济上效率低的缺点。

[0003] PET的生物回收仍处于早期阶段。该方法的优点在于,由于PET可以通过生物转化而转化为高价值产品,因此PET升级回收是可能的。然而,仅使用酶难以水解PET,使得实际应用困难。因此,为了促进酶水解,必须通过引入用于PET的化学预处理过程来产生酶优选的底物。因此,重要的是找到适用于生物过程的化学预处理过程。此外,必须使用合适的菌株将酶水解产物转化为高价值平台化学品。

[0004] 相关现有技术文献

[0005] 专利文献

[0006] 韩国未审查专利申请号10-2020-0119213

### 发明内容

[0007] 技术问题

[0008] 本发明涉及提供有效的化学-生物集成方法,该方法能够使用聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)的组分作为资源来生产高价值产品,以有效地使PET升级回收。

[0009] 建立集成方法需要三件事情。首先,酶优选的底物必须通过引入用于PET的化学预处理过程来生产,其次,用于生物转化的底物(即,对苯二甲酸和乙二醇)必须使用酶有效地生产。第三,所生产的对苯二甲酸和乙二醇必须分别良好地转化为高价值产物原儿茶酸(PCA)和乙醇酸(GLA)。

[0010] 首先,作为用于PET的第一化学预处理过程,使用采用乙二醇的糖醇解,并且糖醇解通常使用乙二醇溶剂和金属催化剂。然而,使用金属催化剂可能不仅对环境而且对随后的生物过程具有不利影响。其次,使用水解酶将通过糖醇解分解为低聚物的PET分解为对苯

二甲酸和乙二醇。此时产生的对苯二甲酸是降低酶水解条件的pH的二羧酸,结果,酶活性被抑制,这是对产生高浓度产物的障碍。

[0011] 因此,为了解决上述问题,在本发明中,将PET分解为低聚物的化学预处理过程使用乙二醇(EG)作为溶剂、甜菜碱作为环境友好的催化剂,然后,通过选择酶水解中合适的缓冲剂浓度和pH,防止了由于TPA的影响导致的酶水解条件的pH降低。此外,使用其中插入了具有用于将TPA转化为PCA的转化相关基因的重组质粒的重组大肠杆菌(E.coli),并使用具有将EG转化为GLA的转化途径的氧化葡萄糖酸杆菌(*Gluconobacter oxydans*) (G.oxydans) KCCM 40109。通过使用细菌的这种转化方法诸如全细胞转化,快速获得了高浓度和高产率的产物。此外,所有过程中的底物都原样使用先前过程的产物,因此没有额外的纯化过程。

[0012] 技术方案

[0013] 为了解决上述问题,本发明人使用将PET分解为低聚物的化学预处理过程,并且该过程使用乙二醇(EG)作为溶剂、甜菜碱作为环境友好的催化剂,并且使用PET水解酶(IsPETase)和单(2-羟乙基)对苯二甲酸酯(MHET)水解酶(IsMHETase)将PET低聚物水解为TPA和EG。之后,使用其中插入了具有用于将TPA转化为PCA的转化相关基因的重组质粒的重组大肠杆菌,并使用具有将EG转化为GLA的转化途径的氧化葡萄糖酸杆菌KCCM 40109。这是使用细菌的转化方法,并且使用全细胞转化快速获得了高浓度和高产率的产物。此外,所有过程中的底物都原样使用先前过程的产物,因此没有额外的纯化过程。

[0014] PET是一种聚合物,其中成百上千个作为小分子单元的“单体”像链一样缠绕在一起。由于PET难以自然分解,PET被焚烧或掩埋,导致各种环境问题。已经开发了使用酶诸如PET酶将PET解聚成单体的方法,但是这些酶具有长的解聚时间并且引起少量的解聚。当在用酶解聚PET之前使用乙二醇将PET分解成低聚物时,相同量的PET可以分解为更大量的单体。此外,证实了当使用乙二醇将PET糖酵解成低聚物时,可以使用“甜菜碱”作为催化剂。甜菜碱是具有阳离子和阴离子两者的“两性离子”,并且在动物、植物和微生物暴露于环境胁迫诸如渗透压、高温和脱水时制备。已证实甜菜碱使乙二醇能够容易地断裂PET的键合链,有助于低聚物分离。

[0015] 此外,就有效性而言,作为比较当经历或不经历使用乙二醇和甜菜碱将PET形成低聚物的过程时产生的单体的量的结果,证实了通过将PET转化为低聚物的过程产生的单体的量大于当从一开始就使用酶分解PET时产生的单体的量。此外,甜菜碱具有无需每次都使用分离中间副产物的过程的优点,因为当低聚物形成单体时,甜菜碱不影响所用的酶。

[0016] 因此,本发明提供了使用糖酵解作为工艺将PET解聚成低聚物的方法,其中甜菜碱充当催化剂。

[0017] 此外,本发明提供了由PET生产高价值化合物的方法,该方法包括:

[0018] 在存在甜菜碱作为催化剂的情况下通过PET糖酵解来生产双(2-羟乙基)对苯二甲酸酯(BHET);

[0019] 通过酶水解经由单(2-羟乙基)对苯二甲酸酯(MHET)中间体将所生产的BHET解聚成对苯二甲酸和乙二醇;以及

[0020] 在存在生物催化剂的情况下通过生物转化将对苯二甲酸转化为原儿茶酸,或

[0021] 通过发酵将乙二醇转化为乙醇酸(图1)。

[0022] 在该方法中,将PET解聚成低聚物的糖酵解可以通过使用甜菜碱作为催化剂在乙

二醇溶剂中施加微波来进行。具体地,糖酵解可以以1:3至20的摩尔比(PET:EG)使用相对于PET底物的0.1至1重量%(催化剂/PET,w/w比)的甜菜碱在190℃下进行10分钟至2小时。在具体的实施方式中,当糖酵解以1:4的摩尔比(PET:EG)使用相对于PET底物的0.5重量%(催化剂/PET,w/w比)的甜菜碱在190℃下进行1小时时,BHET的产率是最高的。

[0023] 通过PET糖酵解产生的BHET通过PET酶(IsPETase)水解成MHET,并且MHET可以通过单(2-羟乙基)对苯二甲酸酯(MHET)水解酶(IsMHETase)水解成对苯二甲酸和乙二醇。

[0024] 分别水解PET的低聚物BHET和MHET的IsPETase和IsMHETase可以是野生型或突变型。野生型IsPETase和IsMHETase可以分别由SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4所表示的碱基序列组成。在本发明的示例性实施方案中,使用突变型IsPETase和IsMHETase作为酶,其中突变型IsPETase(IsPETase<sup>Mut</sup>)可以由SEQ ID NO:1表示的碱基序列组成,并且突变型IsMHETase(IsMHETase<sup>Mut</sup>)可以由SEQ ID NO:2表示的碱基序列组成。

[0025] 可以使用表达对苯二甲酸1,2-双加氧酶和1,2-二羟基-3,5-环己二烯-1,4-二羧酸(DCD)脱氢酶的微生物作为生物催化剂来进行对苯二甲酸至原儿茶酸的生物转化。对苯二甲酸(TPA)1,2-双加氧酶将TPA转化为DCD,而DCD脱氢酶将DCD转化为PCA。TPA 1,2-双加氧酶和DCD脱氢酶可以衍生自丛毛单胞菌属(*Comamonas* sp.)E6,并且编码基因的名称分别是TphAabc和TphB。酶可以使用NADH和NADPH作为辅因子。根据本发明的一个实施方案,为了从PET水解产物TPA获得PCA,表达TphAabc和TphB的微生物可以用作生物催化剂。

[0026] 本文所用的术语“生物催化剂”是指参与对苯二甲酸的生物转化的酶,并且与表达该酶的微生物组合使用。该酶可以通过以包含编码基因的重载体的形式导入宿主细胞来表达。

[0027] 可以使用乙二醇发酵微生物来进行乙二醇的发酵,该乙二醇发酵微生物包括选自由以下项组成的组的一种或多种:氧化葡萄糖酸杆菌KCCM 40109、乙二醇梭菌(*Clostridium glycolicum*)和恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)。

[0028] 之后,最终产物原儿茶酸可以通过生物转化而转化为一种或多种选自由以下项组成的组的高价值化合物:没食子酸、焦棓酚、儿茶酚、粘康酸和香草酸。在韩国未审查专利申请号10-2020-0119213A中公开了与其相关的详细的生物转化方法。

[0029] 有利效果

[0030] 根据本发明的技术,提出了一种用于PET升级回收的新型、有效且经济的化学-生物集成方法。在此,使用本发明的方法,在化学和生物过程之间不需要额外的分离和纯化过程,并且最后,平台化学品PCA和GLA可以由PET以高浓度和高产率生产。

## 附图说明

[0031] 图1是用于生产PET升级回收中使用的平台化学品的化学-生物集成方法的总体示意图。

[0032] 图2是使用甜菜碱作为催化剂证实PET糖酵解产物的结果。(A)是使用甜菜碱的PET糖酵解的示意图。(B)是通过傅里叶变换红外光谱法(FT-IR)测量使用甜菜碱作为催化剂获得的PET糖酵解产物的结果。作为对照,在反应之前测量PET糖酵解混合物,并且在反应之后测量从PET糖酵解产物获得的纯化材料以及BHET标准品。(C)是在反应之后通过FT-IR测量从PET糖酵解混合物获得的低聚物的结果。作为对照,在反应之前,使用PET塑料颗粒。(D)是

使用气相色谱-质谱法 (GC/MS) 的 PET 糖醇解产物和 BHET 标准品的总离子流色谱图 (TIC) 结果。(E) 是 PET 糖醇解产物的质谱。(F) 是 BHET 标准品的质谱。(G) 是在反应之后通过核磁共振波谱法 (NMR) 从获得自 PET 糖醇解混合物的纯化材料以及 BHET 标准品测量的  $1D^1H$  谱结果。(H) 是在反应之后通过核磁共振光谱法 (NMR) 从获得自 PET 糖醇解混合物的纯化材料以及 BHET 标准品测量的  $1D^{13}C$  谱结果。

[0033] 图3显示了 PET 聚合物与 EG 和甜菜碱之间相互作用的预测结构, 以及通过密度泛函理论 (DFT) 分析比较相互作用能级的结果。

[0034] 图4是使用甜菜碱作为催化剂的 PET 糖醇解的预测机制。(A) 是 PET 聚合物与 EG 和甜菜碱之间最稳定的相互作用结构, 通过 DFT 分析证实。(B) 是当甜菜碱作为基于结构的催化剂时 PET 糖醇解的预测机制的示意图。

[0035] 图5显示了野生型酶和突变型酶之间酶活性的比较。(A) 是比较野生型 PET 酶 ( $IsPETase^{wild}$ ) 和突变型 PET 酶 ( $IsPETase^{Mut}$ ) 之间对于 PET 颗粒的温度与酶活性的结果。(B) 是比较野生型单 (2-羟乙基) 对苯二甲酸酯 (MHET) 水解酶 ( $IsMHETase^{wild}$ ) 和突变型单 (2-羟乙基) 对苯二甲酸酯 (MHET) 水解酶 ( $IsMHETase^{Mut}$ ) 之间对于单 (2-羟乙基) 对苯二甲酸酯 (MHET) 的温度与酶活性的结果。

[0036] 图6是使用 PET 糖醇解产物作为底物的酶水解条件的优化结果。(A) 是比较包括甜菜碱在内的各种重金属离子对  $IsPETase^{Mut}$  和  $IsMHETase^{Mut}$  的抑制作用的结果。(B) 是根据酶相对于底物的量测量  $IsPETase^{Mut}$  和  $IsMHETase^{Mut}$  的初始速率的结果。(C) 是测量在酶水解条件下使用 50mM 磷酸钠缓冲液 (pH 8) 并且 PET 糖醇解产物作为底物用不同接种量的  $IsPETase^{Mut}$  和  $IsMHETase^{Mut}$  获得的产物 TPA 的结果。(D) 是当在 50mM 磷酸钠缓冲液 (pH 8) 中添加不同 TPA 浓度时, 通过使用 pH 试纸视觉上显示 pH 值来确认 50mM 磷酸钠缓冲液的缓冲能力的结果。(E) 是通过 pH 测量  $IsPETase^{Mut}$  的相对活性的结果。(F) 是在 (C) 的结果中当酶接种量为 9.0U/L 时使用 pH 试纸确认 pH 变化的结果。(G) 是测量在酶水解条件下以 50mM 至 1M 添加 bicine-NaOH 缓冲液 (pH 8) 并且  $IsPETase^{Mut}$  和  $IsMHETase^{Mut}$  的各自接种量为 2.3U/L 时获得的产物 TPA 随时间变化的结果。(H) 是当在酶水解条件下使用 1M bicine-NaOH 缓冲液 (pH 8) 并且 BHET 用作底物时在反应之前和之后的产物的 HPLC 分析结果。使用 BHET、MHET 和 TPA 作为标准品。(I) 是当在酶水解条件下使用 1M Tris-HCl 缓冲液 (pH 8) 并且 BHET 用作底物时在反应之前和之后的产物的 HPLC 分析结果。使用 BHET、MHET 和 TPA 作为标准品。(J) 是测量当在酶水解条件下使用 1M bicine-NaOH 缓冲液 (pH 8) 并且 PET 糖醇解产物用作底物并且接种不同量的  $IsPETase^{Mut}$  和  $IsMHETase^{Mut}$  时获得的产物 TPA 随时间变化的结果。(K) 是测量当在酶水解条件下使用 1M bicine-NaOH 缓冲液 (pH 8)、不同浓度的 PET 糖醇解产物用作底物并且相应的酶接种量为 2.3U/L 时获得的产物 TPA 随时间变化的结果。(L) 显示了在 (K) 结果中在 12 小时时添加的 PET 和 BHET 底物的产率。(M) 是使用 PET 颗粒、从 PET 糖醇解获得的低聚物、PET 糖醇解产物和 BHET 作为底物的酶活性的比较。

[0037] 图7是使用酶水解产物作为底物的全细胞转化的结果。(A) 是 TPA 生物合成为 PCA 的途径的示意图。(B) 是测量当使用 TPA 标准品和酶水解产物作为底物、重组大肠杆菌作为菌株进行全细胞转化时获得的产物 PCA 和底物 TPA 随时间变化的结果。(C) 是产生的 PCA 相对于消耗的 TPA 的产率。(D) 是 EG 生物合成为 GLA 的途径的示意图。(E) 是当使用 EG 标准品和酶水解产物作为底物、氧化葡萄糖酸杆菌用作菌株进行全细胞转化时, 测量产物 GLA 和底物 EG 随

时间变化的结果。(F)是产生的GLA相对于消耗的EG的产率。

### [具体实施方式]

[0038] 在下文中,将参考实施例进一步详细地描述本发明,但是本发明的范围不受以下建议的实施例的限制。

[0039] <实施例1>使用甜菜碱作为催化剂的PET糖醇解

[0040] 为了建立经济且有效的PET升级回收过程,需要化学PET解聚过程。然而,考虑到用于环境友好且可持续的PET升级回收的化学-生物集成方法,重要的是确保化学过程的结果不会不利地影响随后的生物过程。常规的PET糖醇解方法主要使用重金属催化剂。使用金属催化剂可能对集成方法的生物过程具有不利影响并且具有不利的环境影响,因此糖醇解在使用甜菜碱代替金属催化剂的微波消解系统中进行。具体地,使用甜菜碱作为催化剂使3.5至11.5g的颗粒状PET和特定量的EG在190℃下反应30至120分钟。为了保持反应条件,使用具有热电偶和磁力搅拌器功能的微波消解器(Milestone, Shelton, CT),并且在专用于微波消解器的100mL反应容器中进行反应。

[0041] 为了确定甜菜碱的糖醇解效果,首先,优化底物的输入量。糖醇解通过以1:3、1:4、1:5、1:6、1:10或1:20的摩尔比(PET:EG)将0.5%(催化剂/PET, w/w比)甜菜碱添加到PET底物和EG溶剂中在190℃下进行30分钟。这里,产生了主要产物BHET和副产物MHET。通过液相色谱法测量BHET和MHET浓度。结果,证实了在对应于PET:EG摩尔比为1:5的底物输入条件下获得了最高产率。然而,考虑到最终产物的浓度,证实了在对应于PET:EG摩尔比为1:4的底物输入条件下产率甚至更高。该结果是基于考虑到过程效率和经济可行性,对应于PET:EG摩尔比为1:4的底物输入条件是最佳的,该条件可以获得高浓度产物。因此,选择对应于PET:EG摩尔比为1:4的底物输入条件,并确立进一步的条件(表2)。

[0042] 为了确认对甜菜碱的输入量的催化效果,添加对应于0%、0.1%、0.5%、1%(催化剂/PET, w/w比)的甜菜碱,并且在190℃下进行糖醇解30分钟。结果,证实了添加对应于0.5%(催化剂/PET, w/w比)的甜菜碱的条件是最佳的。因此,选择该条件,并确立进一步的条件(表2)。

[0043] 接下来,为了确认糖醇解反应时间的影响,在190℃下在30、60、90和120分钟的各种反应时间条件下进行反应。结果,证实了60分钟是最佳条件。最后,在包括对应于PET:EG摩尔比为1:4的底物输入的糖醇解条件下,以0.5%(催化剂/PET, w/w比)添加甜菜碱,并且在190℃下加热60分钟,获得58.7%的产率,以及368.6g/L BHET和32.8g/L MHET的浓度。之后,在生物过程中,将在上述条件下产生的PET糖醇解产物用作底物(表2)。

[0044] 另外,与使用1,5,7-三氮杂双环[4.4.0]癸-5-烯(TBD)(其是用于常规PET的糖醇解的已知代表性有机催化剂)的情况相比,作为在相同条件下使用甜菜碱和TBD作为催化剂的结果,证实可以比使用甜菜碱的情况以更高的产率获得BHET(表2)。

[0045] 为了分析使用甜菜碱作为催化剂的PET糖醇解产物,进行高效液相色谱法(HPLC)分析。HPLC分析条件如下。使用C18柱(OpitmaPak C18-51001546, 5μm, 150mm×4.6mm)作为色谱柱,并且在分析期间将柱温度保持在25℃。使用两种流动相A和B,其中A是0.1%三氟乙酸的蒸馏水溶液,B是甲醇。在以1mL/min的流速分析27分钟期间,流动相B的比例在0至2分钟时保持在5%,并且流动相B的比例在2至18分钟时从5%变为57%。在18至22分钟时,流动

相B的比例从57%变为5%。最后,在22至27分钟时,流动相B的比例保持在5%。使用紫外/可见光检测器在254nm的波长处进行色谱分析。

[0046] 结果,图2A是使用甜菜碱作为催化剂的PET糖醇解的示意图,直观显示了实际分析之前和之后的变化。参考图2B,对PET糖醇解之前的混合物、PET糖醇解产物、从PET糖醇解产物获得的水溶性材料以及BHET标准品进行傅里叶变换红外光谱法(FT-IR)。由于EG的羟基在PET糖醇解之前用作混合物中的溶剂,因此可以在波数3050至3600 $\text{cm}^{-1}$ 之间鉴定出宽峰。对于PET糖醇解产物,可以在波数3436 $\text{cm}^{-1}$ 处鉴定出新的羟基峰。这是由PET糖醇解新形成的羟基引起的。对于从PET糖醇解产物获得的纯化材料和BHET标准品,在波数3436 $\text{cm}^{-1}$ 处鉴定出尖峰。比较每个样品的分析结果,可以看出,因为在PET糖醇解产物的波数3436 $\text{cm}^{-1}$ 处显示尖峰,所以使用甜菜碱通过PET糖醇解产生BHET。在图2C中,对通过用蒸馏水洗涤PET颗粒和PET糖醇解产物获得的沉淀物(低聚物)进行FT-IR。在沉淀物样品的波数3387 $\text{cm}^{-1}$ 附近可以看到宽峰。这指示羟基,并且在PET颗粒样品的情况下,由于末端的比例相对于分子长度低,因此不能鉴定出羟基峰。因此,可以看出PET通过使用甜菜碱的PET糖醇解而分解。为了确认PET糖醇解的主要产物是否是BHET,使用GC/MS测量PET糖醇解产物和BHET标准品。首先,对于GC/MS,衍生过程如下。将溶解在甲醇中的PET糖醇解产物和BHET标准品离心10分钟。随后,使用Speed Vac将20 $\mu\text{L}$ 上清液脱水。对于衍生,将10 $\mu\text{L}$  4% (w/v) O-甲基羟胺盐酸盐的吡啶溶液添加到脱水样品中,并在30 $^{\circ}\text{C}$ 下反应90分钟。之后,添加45 $\mu\text{L}$  N-甲基-N-(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺,并在37 $^{\circ}\text{C}$ 下进一步反应30分钟。在此,对于分析,使用附接有RTX-5Si1 MS (30m $\times$ 0.25mm i.d., 25 $\mu\text{m}$ 膜厚度,Resteck) 柱的Agilent 7890A GC/5975C MSD系统。柱温度首先在150 $^{\circ}\text{C}$ 保持1分钟,以20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至330 $^{\circ}\text{C}$ ,然后保持5分钟。使用不分流方法分析1 $\mu\text{L}$ 样品。根据图2D的总离子流色谱法(TIC)结果,证实了PET糖醇解产物的峰对应于BHET峰。图2E和图2F分别显示了PET糖醇解产物和BHET标准品的质谱。此外,对PET糖醇解产物和BHET标准品进行核磁共振(NMR)。将两种样品溶解在二甲基亚砷中。通过实验和使用Bruker Avance II光谱仪在298K和900MHz下的测量进行分析。结果,根据图2G的 $1\text{D}^1\text{H}$ 谱和图2H的 $1\text{D}^{13}\text{C}$ 谱,证实了PET糖醇解产物和BHET标准品是相同的。

[0047] <实施例2>使用甜菜碱作为催化剂的PET糖醇解的密度功能分析以及甜菜碱的催化机制

[0048] 在其中甜菜碱、EG和PET聚合物混合的PET糖醇解的情况下,本发明人试图理解这三种材料如何相互作用,并由此鉴定甜菜碱的催化机制。在图3中,提出了可以预测甜菜碱、EG和PET聚合物位于何处的六个模型,并且通过DFT分析证实了模型之间最稳定的相互作用是什么。在使用Jaguar (Gaussian) 软件推导预测模型的气相能量之后,选择图3的F模型,其是最稳定的模型。证实了其他五个模型具有高于F模型的相对能量。因此,可以看出图3的F模型是最优选的,并且甜菜碱、EG和PET聚合物之间的位置是已知的。

[0049] 之后,参考图4A,测定图3的F模型的甜菜碱-EG、EG-PET聚合物和PET聚合物-甜菜碱之间的相互作用键和距离。在F模型的相互作用结构中,与其他相互作用结构相比,PET聚合物、甜菜碱和EG通过氢键紧密连接。通过甜菜碱的PET解聚机制示于图4B中。甜菜碱的阳离子部分与PET聚合物的酯基的羰基氧相互作用。因此,PET聚合物的酯基中的碳变成阳离子。然后,EG的羟基中的氧攻击PET聚合物的酯基中的阳离子碳。因此,甜菜碱、EG和PET聚合物形成四面体中间体。在此,甜菜碱的羧基吸引EG的羟基中的氢,从而攻击PET聚合物的酯

基中的阳离子碳。因此,EG的羟基中的氢更容易分离。EG的羟基中的氢被分离,甜菜碱的阳离子部分和PET聚合物的酯基中的羰基氧之间的键断裂,再次形成羰基。接着,酰氧键断裂,PET聚合物的一条链随之断开。最后,PET聚合物的酯基的一侧被用作溶剂的EG替代。该反应进行无数次,产生最终产物BHET。

[0050] <实施例3>能够解聚PET糖醇解产物的酶的制备

[0051] 可以如表1中证实分解PET的酶。在2016年发现衍生自能分解PET的大阪堺菌(*Ideonella sakaiensis*)的IsPETase和IsMHETase之前,已知脂肪酶和角质酶是分解PET的酶。由于这些酶不特异性地分解PET,因此它们的活性低。然而,IsPETase和IsMHETase具有特异性解聚PET的活性。然而,它们的野生型仅具有比先前已知的酶更高的活性,但与其他回收方法相比仍具有更低的活性,因此它们难以应用于该过程。最近,已经鉴定了IsPETase和IsMHETase的结构,并且已经研究了用于增加活性的突变型IsPETase和IsMHETase。因此,在本研究中,使用突变型IsPETase<sup>Mut</sup>和IsMHETase<sup>Mut</sup>(表2),而不是野生型酶。将每个基因序列进行密码子优化并连接至pET28a载体的NdeI和XhoI位点,构建pET28a\_IsPETase<sup>Mut</sup>和pET28a\_IsMHETase<sup>Mut</sup>质粒。将这些质粒转化到大肠杆菌DH5α中。

[0052] 为了过表达由此获得的基因,对大肠杆菌BL21(DE3)(其是用于蛋白质表达的宿主)进行转化。使用含有40mg/L卡那霉素的Luria-Bertani(LB)培养基在37℃下培养BL21(DE3)\_pET28a\_IsPETase<sup>Mut</sup>直至600nm吸光度达到0.5。为了诱导蛋白质表达,添加0.5mM IPTG,并将诱导温度设定为16℃,使蛋白质以水溶性形式过表达18小时。培养后,通过离心收集细胞,使用20mM Tris-HCl缓冲液(pH 7.4)解离,并使用超声波仪破碎。通过以8,000g离心,获得上清液。使用HisTrap柱(GE Healthcare,Piscataway,USA)纯化所得重组蛋白。为了纯化,使结合缓冲液(20mM磷酸钠缓冲液,500mM NaCl,20mM咪唑,pH 7.4)流过柱。接着,使通过离心获得的上清液流过。最后,使洗脱缓冲液(20mM磷酸钠缓冲液,500mM NaCl,300mM咪唑,pH 7.4)流过,从而在洗脱缓冲液上获得纯化的IsPETase<sup>Mut</sup>。使用Amicon超离心过滤器(10,000MW截止值;Millipore,Billerica,MA,USA)浓缩纯化的蛋白,并使用二辛可宁酸(BCA)蛋白质测定试剂盒(Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA)测量蛋白质浓度。通过8% SDS-PAGE测定表达的IsPETase<sup>Mut</sup>为28.6kDa。

[0053] 使用含有40mg/L卡那霉素的LB培养基在37℃下培养BL21(DE3)\_pET28a\_IsMHETase<sup>Mut</sup>直至600nm吸光度达到0.5。为了诱导蛋白质表达,添加0.5mM IPTG,并将诱导温度设定为16℃,使蛋白质过表达16小时。这里,重组蛋白作为不溶性蛋白过量表达。培养后,通过离心收集细胞,用8M尿素和20mM Tris-HCl缓冲液(pH 7.4)解离,并使用超声波仪破碎。由于8M尿素的影响,聚集的蛋白质溶解在液体部分中。通过再次以8,000g离心,获得上清液。使用HisTrap柱(GE Healthcare,Piscataway,USA)纯化该重组蛋白。为了纯化,使结合缓冲液(8M尿素,20mM磷酸钠缓冲液,500mM NaCl,20mM咪唑,pH 7.4)流过柱。然后使通过离心获得的上清液流过。最后,使洗脱缓冲液(8M尿素,20mM磷酸钠缓冲液,500mM NaCl,300mM咪唑,pH 7.4)流过,从而在洗脱缓冲液上获得纯化的IsMHETase<sup>Mut</sup>。通过透析,去除洗脱缓冲液中的8M尿素以重新折叠聚集的IsMHETase<sup>Mut</sup>,从而获得活性IsMHETase<sup>Mut</sup>。对于IsMHETase<sup>Mut</sup>,使用二辛可宁酸(BCA)蛋白质测定试剂盒(Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA)测量蛋白质浓度。使用8% SDS-PAGE测定表达的IsMHETase<sup>Mut</sup>为62.8kDa。

[0054] <实施例4>使用PET糖醇解产物作为底物通过水解酶反应优化高浓度TPA和EG生产

[0055] 进行酶实验以确认本文所用的IsPETase<sup>Mut</sup>和IsMHETase<sup>Mut</sup>是否比先前报道的IsPETase<sup>Wild</sup>和IsMHETase<sup>Wild</sup>具有更高的活性和耐热性。使用10mg PET颗粒作为底物和500nM酶在含有50mM磷酸钠(pH 8)的500μL缓冲液中进行IsPETase的实验,并使用5g/LMHET作为底物和1500nM酶在含有50mM磷酸钠(pH 8)的500μL缓冲液中进行IsMHETase的实验。

[0056] 反应温度为35、40、45和50℃。反应分别进行48小时和30分钟后,将酶反应产物在甲醇中稀释,以25,188g离心10分钟,随后通过高效液相色谱法(HPLC)分析上清液。因此,如图5A和图5B所示,在较高的温度条件下,显示出较高的活性。在40℃的温度条件下,证实了IsPETase<sup>Mut</sup>表现出最高的活性。此外,在40℃和45℃下,证实了IsMHETase<sup>Mut</sup>具有最高的活性。

[0057] 为了确认在常规PET糖醇解中使用的金属催化剂以及甜菜碱(其是在本研究所选择的环境友好的催化剂)是否可以酶水解具有抑制作用,使用甜菜碱、Ca<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、pb<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>和Li<sup>+</sup>各自1mM进行IsPETase<sup>Mut</sup>和IsMHETase<sup>Mut</sup>酶实验。在包括2.3U/L酶浓度、各自2.5mg底物BHET和MHET、50mM磷酸钠缓冲液(pH 8)和500μL体积的条件下进行实验。在40℃下进行反应15分钟后,将所有样品在甲醇中稀释并以25,188g离心10分钟,随后通过高效液相色谱法(HPLC)分析上清液。结果,参照图6A,与其他金属催化剂不同,证实了甜菜碱对IsPETase<sup>Mut</sup>和IsMHETase<sup>Mut</sup>酶反应没有抑制作用。因此,使用甜菜碱的PET糖醇解产物可以用于酶水解。

[0058] 为了测定酶在酶水解反应条件下相对于底物的最佳输入量,在不同的酶输入条件下进行酶水解反应,并确认初始速率。IsPETase<sup>Mut</sup>和IsMHETase<sup>Mut</sup>酶反应条件包括10g/L BHET和5g/LMHET作为底物、50mM磷酸钠缓冲液(pH 8)和500μL体积。IsPETase<sup>Mut</sup>的输入量范围为50至400nmol/g BHET,IsMHETase<sup>Mut</sup>的输入量范围为300至900nmol/g MHET。在40℃下进行反应10分钟后,将所有样品在甲醇中稀释并以25,188g离心10分钟,随后通过高效液相色谱法(HPLC)分析上清液。结果,在图6B中,证实了每种酶的初始速率。基于此,1单位(U)的IsPETase<sup>Mut</sup>被定义为在pH 8的条件下在40℃下每分钟从BHET产生MHET(100μmol)的酶的量,1单位(U)的IsMHETase<sup>Mut</sup>被定义为在pH 8的条件下在40℃下每分钟从MHET产生TPA(100μmol)的酶的输入量。

[0059] 基于所定义的酶输入量,使用其中使用甜菜碱的作为底物的PET糖醇解产物进行水解酶反应。因此,在不浪费酶的情况下证实了IsPETase<sup>Mut</sup>和IsMHETase<sup>Mut</sup>酶相对于底物的有效输入量。反应条件包括包含10g/L BHET的PET糖醇解产物作为底物、50mM磷酸钠缓冲液(pH 8)以及500μL体积。在40℃下进行反应6小时、30分钟、1小时、3小时和6小时后,将样品在甲醇中稀释并以25,188g离心10分钟,并随后通过高效液相色谱法(HPLC)分析上清液。结果,在图6C中,当酶输入量为2.3U/L和4.5U/L时,与9.0U/L相比,证实了产物TPA的量低。随着反应的进行,预期pH降低并且酶活性由于产物TPA的影响而丧失。首先,为了确认在酶水解反应条件下由于TPA的影响pH有多低,在50mM磷酸钠缓冲液(pH8)的条件下以0至10g/L的浓度添加TPA。结果,在图6D中,用pH计测量所有样品的pH并用pH试纸目视确认。随着TPA浓度从0g/L增加至4g/L,pH从8.00降低至5.47。之后,将pH保持在5.35至5.39,直到TPA浓度达到10g/L。因此,证实了使用在酶水解反应条件下产生的TPA,pH变得有多低。

[0060] 接着,为了检查各pH的IsPETase<sup>Mut</sup>酶活性,用50mM浓度的乙酸钠、磷酸钠、bicine-NaOH、Tris-HCl和甘氨酸-NaOH在pH 5-9的条件下进行IsPETase<sup>Mut</sup>酶反应。酶反应条件包括

10g/L BHET、2.3U/L酶和500 $\mu$ L反应体积。在40℃下进行反应1小时后,将样品在甲醇中稀释并以25,188g离心10分钟,随后通过HPLC分析上清液。结果,在图6E中,在pH 5.5的条件下,相对于pH 7.0,证实了相对活性降低至19.5%。基于图6D和图6E的结果,证实了在酶水解中,随着产物TPA的增加,酶水解条件的pH降低,并且由于低pH的影响,IsPETase<sup>Mut</sup>酶的活性急剧降低。

[0061] 再次,在图6C中,在9.0U/L的实验条件下,pH随时间的变化用pH试纸直观显示,并且也在图6F中用pH试纸的每pH标准色显示。在反应30分钟时,证实了产生了5.5g/L TPA,并且参考图6D和图6E,可以看出IsPETase<sup>Mut</sup>酶的活性降低。在2.3U/L和4.5U/L的实验条件下,少量的产物TPA是由酶活性的降低所致。因此,证实了pH能力是酶水解条件中的重要因素。

[0062] 接下来,在包括50至1,000mM bicine-NaOH缓冲液(pH 8)、包含10g/L BHET的PET糖酵解产物作为底物以及500 $\mu$ L体积的条件下进行酶水解。IsPETase<sup>Mut</sup>酶和IsMHETase<sup>Mut</sup>酶的输入量各自为2.3U/L。结果,在图6G中,可以证实,随着bicine-NaOH缓冲液(pH 8)的浓度增加,产物TPA随时间增加。随着酶水解条件的pH能力增加,可以看出产物TPA的pH降低效果降低,从而使酶的活性保持在所保持的pH。

[0063] 此外,通过证实在高pH条件下对酶活性没有抑制作用,可以看出在酶水解条件下高浓度的缓冲液是必需的。在本研究中,600mM磷酸钠缓冲液、1M bicine-NaOH缓冲液和1M Tris-HCl缓冲液可以在水解酶反应条件下进行实验制备。对于pH能力,使用能够满足高pH条件的bicine-NaOH缓冲液和Tris-HCl缓冲液。因此,在包括10g/L BHET作为底物、输入量为2.3U/L的IsPETase<sup>Mut</sup>酶和IsMHETase<sup>Mut</sup>酶、500 $\mu$ L体积以及1M bicine-NaOH缓冲液(pH 8)或1M Tris-HCl缓冲液(pH 8)作为缓冲液的反应条件下进行酶水解。在40℃下进行反应6小时后,将样品在甲醇中稀释并以25,188g离心10分钟,随后通过HPLC分析上清液。结果,在图6H中,通过色谱法证实了在1M bicine-NaOH缓冲液(pH 8)条件下的反应结果,在图6I中,通过色谱法证实了在1M Tris-HCl缓冲液(pH8)条件下的反应结果。在图6H中的反应之后,可以证实实现了底物BHET至TPA的100%转化。然而,在图6I的反应之后的样品中,证实了产生了未知的峰,表明BHET没有100%转化为TPA。因此,在酶水解中使用的缓冲液确立为1M bicine-NaOH缓冲液(pH 8)。

[0064] 接下来,在与图6C相同的条件下进行酶水解,不同的是使用1M bicine-NaOH缓冲液(pH 8)作为缓冲液。结果,在图6J中,证实了用2.3U/L、4.5U/L和9.0U/L的酶输入量从反应3小时产生的产物TPA的量是相似的。因此,可以看出即使当相对于底物的酶输入量设定为2.3U/L而不是9.0U/L时,酶水解也平稳地进行,这表明通过使用适当的酶输入量可以减少酶的浪费。因此,确立了随后酶水解的条件,其中酶输入量为2.3U/L。

[0065] 为了设计有效且经济的过程,通过一个酶水解反应获得高浓度和高产率的产物是有利的。因此,通过尽可能地增加底物的浓度,在短时间内以高浓度获得作为酶水解产物的TPA。反应条件包括包含10至50g/L BHET的PET糖酵解产物作为底物、500 $\mu$ L的体积、输入量为2.3U/L的IsPETase<sup>Mut</sup>酶和IsMHETase<sup>Mut</sup>酶以及1M bicine-NaOH缓冲液(pH 8)。在40℃下进行反应12小时后,将样品在甲醇中稀释并以25,188g离心10分钟,随后通过HPLC分析上清液。结果,在图6K中,当使用包含10至40g/L BHET的PET糖酵解产物作为底物时,产物TPA的生产量增加,但是当使用包含50g/L BHET的PET糖酵解产物作为底物时,证实了在反应后12小时,产物TPA的生产量与其中PET糖酵解产物包含40g/L BHET的底物条件没有差异。因此,

当使用包含50g/L BHET的PET糖醇解产物作为底物时,可以看出本研究中酶水解的1M bicine-NaOH缓冲液(pH 8)的条件不能缓冲产生的TPA的酸度,因此pH下降并且酶活性被抑制。

[0066] 在图6L中,对于图6K的底物的每种输入量条件计算12小时样品的产率。左Y轴表示实际获得的TPA的产率相对于与初始添加的PET相比的理论TPA的产率。右Y轴表示实际获得的TPA的产率相对于与初始添加的BHET相比的理论TPA的产率。结果,当使用包含50g/L BHET的PET糖醇解产物作为底物时,证实了与底物的其他输入量相比产率显著降低。考虑到图6K中每种底物输入量的TPA浓度和图6L中每种底物输入量的TPA产率,在最有效的条件(当底物输入量是包含BHET的PET糖醇解产物的底物输入量为40g/L时)下确立了酶水解。随后,使用在上述条件下获得的酶水解产物作为全细胞转化的底物,所述全细胞转化是一个生物过程。

[0067] 当比较图6L的左右Y轴时,可以看出比输入BHET的量更多的TPA作为产物产生。据此,虽然使用甜菜碱作为催化剂的PET糖醇解的主要产物是BHET,但是不能通过液相色谱法测量的部分预期是具有相对短的链长度的低聚物,而不是聚合物。为了确认这一点,用各种底物进行酶水解。作为底物,使用20mg PET颗粒、20mg通过用蒸馏水洗涤PET糖醇解产物获得的沉淀物(低聚物)、40g/L BHET以及包含40g/L BHET的PET糖醇解产物。体积为500 $\mu$ L, IsPETase<sup>Mut</sup>酶和IsMHETase<sup>Mut</sup>酶各自的输入量为2.3U/L,并使用1M bicine-NaOH缓冲液(pH 8)。在40℃下进行反应24小时后,将样品在甲醇中稀释并以25,188g离心10分钟,随后通过HPLC分析上清液。结果,在图6M中,证实了产物TPA的浓度以聚合度降低的顺序增加(PET颗粒>通过用蒸馏水洗涤PET糖醇解产物获得的沉淀物(低聚物)>BHET>PET糖醇解产物)。据此,可以看出链长度比聚合物越短,反应速率越快。此外,因为通过用蒸馏水洗涤PET糖醇解产物获得的沉淀物(低聚物)的TPA生产率高于PET颗粒的TPA生产率并且低于PET糖醇解产物和BHET的TPA生产率,所以实验证实了在使用甜菜碱作为催化剂的PET糖醇解产物中,不能通过液相色谱法测量的部分是具有相对短的链长度的低聚物,而不是聚合物。

[0068] <实施例5>能够将酶水解产物作为底物转化为平台化学品的菌株的制备

[0069] 图7A是能够将酶水解产物作为底物转化为用于将TPA转化为PCA的平台化学品的菌株的示意图。TPA至PCA的转化分两步进行。首先通过TphAabc酶将TPA转化为1,2-二羟基-3,5-环己二烯-1,4-二羧酸酯(DCD)。在此,NAD(P)H一起作用,从而产生NAD(P)<sup>+</sup>。通过TphB酶将DCD转化为PCA。在此,NAD(P)<sup>+</sup>一起作用,从而产生NAD(P)H和CO<sub>2</sub>。因此,为了将TPA转化为PCA,必须将其中分别插入了TphAabc基因和TphB基因的重组质粒转化到表达菌株中。将TphAabc基因克隆到pKE112质粒中。用限制酶KpnI和HindIII切割TphAabc基因和pKE112质粒,然后将它们连接以构建pKE112-TphAabc。同样,将TphB基因克隆到pKM212质粒中。用限制酶EcorI和KpnI切割TphB基因和pKM212质粒,然后将它们连接以构建pKM212-TphB。将两种质粒都转化到大肠杆菌XL1-Blue中。构建的菌株是图7A的工程化的大肠杆菌菌株PCA-1。

[0070] 图7D是将EG转化为GLA的示意图。EG至GLA的转化分两步进行。首先使用mADH酶将EG转化为乙醇醛。在此,NAD(P)<sup>+</sup>一起作用,从而产生NAD(P)H和H<sup>+</sup>。使用(m)ALDH酶将乙醇醛转化为GLA。在此,NAD(P)<sup>+</sup>和H<sub>2</sub>O一起作用,从而产生NAD(P)H和H<sup>+</sup>。氧化葡萄糖酸杆菌具有各种类型的多元醇脱氢酶,其可以氧化多种糖和糖醇。因此,为了将EG转化为GLA,使用菌株氧化葡萄糖酸杆菌(KCCM 40109)。该菌株是图7D的氧化葡萄糖酸杆菌。

[0071] <实施例6>酶水解产物作为底物的高浓度和高产率的全细胞转化为平台化学品

[0072] PCA是使用工程化的大肠杆菌菌株PCA-1 (其是如上所述构建的菌株) 通过酶水解产物的全细胞转化而产生的, GLA是使用氧化葡萄糖酸杆菌通过酶水解产物的全细胞转化而产生的。

[0073] 首先, 为了生产PCA, 制备工程化的大肠杆菌菌株PCA-1。制备过程如下。将菌株在含有50 $\mu$ g/mL氨苄青霉素和40 $\mu$ g/mL卡那霉素的5mL LB培养基中预培养。将培养物在37 $^{\circ}$ C下在200rpm的条件下培养过夜。将预培养物接种到2.8L烧瓶中的1L含50mg/L氨苄青霉素和40mg/L卡那霉素的LB培养基中。将其在37 $^{\circ}$ C、200rpm条件下培养直至600nm吸光度达到0.5。此时, 以0.5mM接种IPTG并在16 $^{\circ}$ C和200rpm下孵育18小时, 诱导重组质粒的基因过表达。通过在4 $^{\circ}$ C以4,000g离心20分钟收集过表达基因的细胞。用100mM磷酸钠缓冲液(pH 6.5)洗涤收集的细胞。将收集的细胞接种到100mL烧瓶中的含有20g/L甘油的8mL MR培养基中用于全细胞转化。MR培养基的成分由6.7g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、4.0g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、0.8g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.8g/L柠檬酸、10mg/L硫胺-HCl和5mL的痕量金属溶液组成。痕量金属溶液的成分由5.46g/L  $\text{FeSO}_4$ 、1.51g/L  $\text{CaCl}_2$ 、1.23g/L  $\text{ZnSO}_4$ 、0.34g/L  $\text{MnSO}_4$ 、0.64g/L  $\text{CuSO}_4$ 、0.09g/L  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 和0.01g/L  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 组成。向反应培养基中添加酶水解产物以具有4.5g/L的TPA浓度。此外, 作为阳性对照, 在相同条件下添加TPA标准品以具有5.7g/L的浓度。结果, 在图7B中, 证实了TPA减少和PCA产生的时间依赖性趋势。在全细胞转化的32小时, 证实了使用酶水解产物作为底物的全细胞转化和使用TPA标准品作为底物的全细胞转化均完成。最后, 在使用酶水解产物作为底物的全细胞转化中, 产生3.8g/L PCA。在图7C中, 产率表示为产生的PCA的摩尔数相对于降低的TPA的摩尔数。大肠杆菌PCA-1菌株将PET水解产物中的4.5g/L TPA转化为3.8g/L PCA, 其中摩尔产率为90.4% (mol/mol), 这优于试剂级TPA转化为PCA的结果。

[0074] 接下来, 为了生产GLA, 制备氧化葡萄糖酸杆菌(KCCM 40109)。制备过程如下。将菌株在5mL由20g/L山梨醇、20g/L酵母抽提物、5g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、2g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 和5g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 组成的培养基中预培养。将培养物在30 $^{\circ}$ C和200rpm下培养过夜。在2.8L烧瓶中在相同条件下将预培养物接种到1L培养基中。将其在30 $^{\circ}$ C和200rpm下孵育24小时。随后, 通过在4 $^{\circ}$ C以4,000g离心20分钟收集细胞。在相同条件下将收集的细胞接种到100mL烧瓶中的10mL培养基中用于全细胞转化。向反应培养基中添加酶水解产物以具有30.6g/L的EG浓度。此外, 作为阳性对照, 在相同条件下添加EG标准品以具有34.4g/L的浓度。结果, 在图7B中, 证实了EG减少和GLA产生的时间依赖性趋势。在全细胞转化的21小时, 证实了使用酶水解产物和EG标准品作为底物的全细胞转化完成。最后, 在使用酶水解产物作为底物的全细胞转化中, 产生31.4g/L GLA。在图7C中, 产率表示为产生的GLA的摩尔数相对于降低的EG的摩尔数。当使用氧化葡萄糖酸杆菌作为全细胞催化剂时, PET水解产物中30.6g/L EG转化为31.4g/L GLA, 其中摩尔产率为91.6% (mol/mol), 这优于试剂级EG转化为GLA的结果(90.1% (mol/mol))。据此, 证实了可以在化学-生物集成方法中由PET聚合物生产高浓度和高产率的PCA和GLA。

[0075] 表1. 各种类型的PET酶(PETase)对PET衍生的底物的活性比较

| 底物                     | 酶                                                                                   | 微生物  | pH  | 温度<br>(°C) | 时间<br>(小时) | TPA 滴度<br>或 (TPA 、<br>MHET 和<br>BHET 的总<br>数) | 参考                   |
|------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------|-----|------------|------------|-----------------------------------------------|----------------------|
| PET 糖醇<br>解全浆液         | <i>IsPETase</i> <sup>S121E/D186H/R280A</sup><br>, <i>IsMHETase</i> <sup>W397A</sup> | 大阪堺菌 | 8.0 | 40         | 12         | 186.7 mM                                      | 本 研<br>究             |
| PET 糖醇<br>解低聚物<br>的低聚物 | <i>IsPETase</i> <sup>S121E/D186H/R280A</sup><br>, <i>IsMHETase</i> <sup>W397A</sup> | 大阪堺菌 | 8.0 | 40         | 3          | 9.9 mM                                        | 本 研<br>究             |
| PET 颗粒                 | <i>IsPETase</i> <sup>S121E/D186H/R280A</sup><br>, <i>IsMHETase</i> <sup>W397A</sup> | 大阪堺菌 | 8.0 | 40         | 24         | 61.7 μM                                       | 本 研<br>究             |
| [0076] PET 膜           | <i>IsPETase</i> <sup>Wild</sup>                                                     | 大阪堺菌 | 7.0 | 30         | 18         | (0.3 mM)                                      | <i>Yoshida</i><br>等人 |
| PET(饮料<br>瓶织物)         | <i>IsPETase</i> <sup>Y58A</sup>                                                     | 大阪堺菌 | 9.0 | 30         | 20         | 21 nM(54.0<br>nM)                             | Liu<br>等人            |
| PET 膜                  | <i>IsPETase</i> <sup>R280A</sup>                                                    | 大阪堺菌 | 9.0 | 30         | 36         | 15.7 μM(31.9<br>μM)                           | Joo<br>等人            |
| PET 膜                  | <i>IsPETase</i> <sup>S121E/D186H/R280A</sup>                                        | 大阪堺菌 | 9.0 | 40         | 72         | 37.6<br>μM(120.9<br>μM)                       | Son<br>等人            |
| PET 试样                 | <i>IsPETase</i> <sup>W159H/S238F</sup>                                              | 大阪堺菌 | 7.2 | 30         | 96         | 0.8 mM(1.2<br>mM)                             | Austi<br>n 等<br>人    |
| PET 膜                  | <i>IsPETase</i> <sup>S214H/I168R/W159H<br/>/S188Q/R280A/A180I/G165A/Q119</sup>      | 大阪堺菌 | 9.0 | 40         | 240        | (3.4 mM)                                      | Cui<br>等人            |

Y/L117F/T140D

|                       |                                  |                                                                                                                      |     |                         |    |           |                         |
|-----------------------|----------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-------------------------|----|-----------|-------------------------|
| PET 膜                 | <i>IsPETase</i> <sup>1179F</sup> | 大阪堺菌                                                                                                                 | 8.5 | 30                      | 48 | 6.4 mM    | Ma<br>等人                |
| PET 膜                 | 水解酶(TfH)                         | 褐色嗜热<br>裂孢菌<br>( <i>Thermobi<br/>fida fusca</i> )                                                                    | 7.0 | 30                      | 18 | (<0.1 mM) | Yoshi<br>da 等<br>人      |
| PET 膜                 | 角质酶(LCC)                         | 叶枝堆肥                                                                                                                 | 7.0 | 30                      | 18 | (<0.1 mM) | Yoshi<br>da 等<br>人      |
| PET 膜                 | 角质酶(FsC)                         | 茄病镰刀<br>菌<br>( <i>Fusarium<br/>solani</i> )                                                                          |     |                         |    | (<0.1 mM) | Yoshi<br>da 等<br>人      |
| 无定形<br>PET            | 角质酶(FsC)                         | 茄病镰刀<br>菌                                                                                                            | 8.0 | 30                      | 96 | 0.9 mM    | Verto<br>mme<br>等人      |
| PET 织物                | 水解酶(Tfu <sup>Q132A/T101A</sup> ) | 褐色嗜热<br>裂孢菌<br>特异腐质<br>霉<br>( <i>Humicola<br/>insolens</i> )<br>, 南极假<br>丝酵母<br>( <i>Candida<br/>antarctica</i><br>) | 7.5 | 60                      | 48 | 19.3 mM   | Silva<br>等人             |
| 来自回收<br>装置的<br>PET 薄片 | 角质酶(HiC), 脂肪酶<br>(CALB)          |                                                                                                                      | 7.0 | 60 至<br>37 <sup>1</sup> | 24 | 13.6 mM   | de<br>Castr<br>o 等<br>人 |

|        |                                |                           |                         |    |         |                         |
|--------|--------------------------------|---------------------------|-------------------------|----|---------|-------------------------|
| [0078] | 无定形角质酶(HiC), 脂肪酶<br>PET (CALB) | 特异腐质<br>霉, 南极 7.0<br>假丝酵母 | 60 至<br>37 <sup>1</sup> | 24 | 60.0 mM | de<br>Castr<br>o 等<br>人 |
|        |                                |                           |                         |    |         |                         |

[0079] <sup>1</sup>酶水解包括在60℃下与HiC酶反应3小时,以及在37℃下与CALB酶反应21小时。

[0080] 表2

| [0081] | 催化剂 | 输入   | 温度   | EG (g) (或<br>PET/EG,<br>mol/mol) | 催化剂<br>(mg) (或<br>催化剂<br>/PET, 重<br>量%) | 反应<br>时间<br>(分<br>钟) | BHET<br>和<br>MHET<br>的收集<br>产率<br>(%) <sup>a</sup> | BHET<br>的滴<br>度<br>(g/L) | MHET<br>的滴度<br>(g/L) |
|--------|-----|------|------|----------------------------------|-----------------------------------------|----------------------|----------------------------------------------------|--------------------------|----------------------|
|        | 甜菜碱 | (g)  | (°C) |                                  |                                         |                      |                                                    |                          |                      |
| [0081] |     | 11.5 | 190  | 11.14 (1:3)                      | 57.5 (0.5)                              | 30                   | 34.6                                               | 256.8                    | 24.9                 |
|        |     | 10.0 | 190  | 12.92 (1:4)                      | 无 <sup>b</sup>                          | 30                   | 16.8                                               | 117.1                    | N.D. <sup>c</sup>    |
|        |     | 10.0 | 190  | 12.92 (1:4)                      | 10.0 (0.1)                              | 30                   | 26.6                                               | 185.3                    | N.D.                 |
|        |     | 10.0 | 190  | 12.92 (1:4)                      | 50.0 (0.5)                              | 30                   | 52.3                                               | 330.6                    | 27.6                 |
|        |     | 10.0 | 190  | 12.92 (1:4)                      | 100.0 (1)                               | 30                   | 42.4                                               | 286.9                    | 6.8                  |
|        |     | 10.0 | 190  | 12.92 (1:4)                      | 50.0 (0.5)                              | 60                   | 58.7                                               | 368.6                    | 32.8                 |
|        |     | 10.0 | 190  | 12.92 (1:4)                      | 50.0 (0.5)                              | 90                   | 55.1                                               | 341.2                    | 35.1                 |
|        |     | 10.0 | 190  | 12.92 (1:4)                      | 50.0 (0.5)                              | 120                  | 53.8                                               | 313.8                    | 50.4                 |
|        |     | 9.0  | 190  | 14.54 (1:5)                      | 45.0 (0.5)                              | 30                   | 52.7                                               | 307.6                    | 21.6                 |
|        |     | 8.0  | 190  | 15.50 (1:6)                      | 40.0 (0.5)                              | 30                   | 51.6                                               | 268.3                    | 19.1                 |
|        |     | 6.0  | 190  | 19.37 (1:10)                     | 30.0 (0.5)                              | 30                   | 49.8                                               | 189.8                    | 6.7                  |
|        |     | 3.5  | 190  | 22.60 (1:20)                     | 17.5 (0.5)                              | 30                   | 37.2                                               | 81.3                     | 2.9                  |
|        | TBD | 10.0 | 190  | 12.92 (1:4)                      | 50.0 (0.5) <sup>d</sup>                 | 60                   | 55.1                                               | 328.4                    | 45.9                 |

[0082] <sup>a</sup>BHET和MHET的产率 = (BHET和MHET的浓度(g/L)) × (总反应体积(L)) / (来自输入PET的BHET和MHET的理论最大含量(g))。 <sup>b</sup>没有使用催化剂。 <sup>c</sup>未检测。 <sup>d</sup>TBD用作糖醇解的催化剂以比较甜菜碱和有机催化剂的催化剂性能。

|       |                                                                     |     |
|-------|---------------------------------------------------------------------|-----|
| <110> | 高丽大学校产学协力团                                                          |     |
| <120> | 用于回收聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)的PET化学和生物集成降解方法                                  |     |
| <130> | X21U13C0206                                                         |     |
| <150> | KR 10-2021-0026729                                                  |     |
| <151> | 2021-02-26                                                          |     |
| <160> | 4                                                                   |     |
| <170> | KoPatentIn 3.0                                                      |     |
| <210> | 1                                                                   |     |
| <211> | 804                                                                 |     |
| <212> | DNA                                                                 |     |
| <213> | 人工序列 (Artificial Sequence)                                          |     |
| <220> |                                                                     |     |
| <223> | IsPETase_mut                                                        |     |
| <400> | 1                                                                   |     |
|       | catatgcaga ccaatccgta tgcgcgtggc ccgaatccga ccgcggcgag cctggaagcg   | 60  |
|       | agcgcgggtc cgtttaccgt gcgtagcttt accgtgagcc gtccgagcgg ttatggtgcg   | 120 |
|       | ggtaccgttt actatccgac caacgcgggt ggcaccgtgg gtgcgatcgc gattgttccg   | 180 |
|       | ggttataccg cgcgtcagag cagcatcaaa tgggtggggtc cgcgctctggc gagccacggt | 240 |
|       | ttcgtgggta tcaccattga caccaacagc accctggatc agccggaaag ccgtagcagc   | 300 |
|       | cagcaaatgg cggcgctgcg tcaagttgcg agcctgaacg gtaccagcag cagcccgatc   | 360 |
|       | tacggcaagg tggacaccgc gcgtatgggc gttatggggt ggagcatggg tggcggtggc   | 420 |
|       | agcctgatta gcgcggcgaa caaccgagc ctgaaagcgg cggcgccgca agcgccgtgg    | 480 |
|       | catagcagca ccaacttcag cagcgtgacc gttccgacct tgatctttgc gtgcgagaac   | 540 |
|       | gacagcattg cgccggtgaa cagcagcgcg ctgccgatct acgatagcat gagccgtaac   | 600 |
|       | gcgaagcagt tcctggaaat taacggtggc agccacagct gcgcgaacag cggtaacagc   | 660 |
|       | aaccaagcgc tgattggcaa gaaaggtgtt gcgtggatga aacgttttat ggacaacgat   | 720 |
|       | acccggtata gcacctttgc gtgcgaaaat ccgaatagca ccgcggtgag cgacttccgt   | 780 |
|       | accgcgaact gcagctaact cgag                                          | 804 |
| <210> | 2                                                                   |     |
| <211> | 1767                                                                |     |
| <212> | DNA                                                                 |     |
| <213> | 人工序列 (Artificial Sequence)                                          |     |
| <220> |                                                                     |     |
| <223> | IsMHETase_mut                                                       |     |
| <400> | 2                                                                   |     |
|       | catatgggtg gtggtagcac cccgctgccg ctgccgcaac aacaaccgcc gcaacaggag   | 60  |
|       | ccgccgccgc cgccggttcc gctggcgagc cgcgcggcgt gcgaggcgct gaaggatggc   | 120 |
|       | aacggtgaca tgggtgtggc gaacgcggcg accgtggttg aagttgcggc gtggcgtgat   | 180 |

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| gcggcgccgg cgaccgcgag cgcggcggcg ctgccggagc actgcgaagt gagcgggtgcg | 240  |
| atcgcggaagc gtaccggcat tgacggttac ccgtatgaga tcaaatttcg tctgcgtatg | 300  |
| ccggcggagt ggaacggccg tttctttatg gaaggtggca gcggtaccaa cggtagcctg  | 360  |
| agcgcggcga ccggtagcat cggtagcggt cagattgcga gcgcgctgag ccgtaacttt  | 420  |
| gcgaccattg cgaccgatgg cggtcacgac aacgcggtga acgataacct ggatgcgctg  | 480  |
| ggtaccgttg cgttcggtct ggacccgcaa gcgcgtctgg acatgggcta caacagctat  | 540  |
| gatcaggtta cccaagcggg caaggcggcg gttgcgcgtt tctacggtcg tgcggcggac  | 600  |
| aaaagctatt ttatcggtg cagcgagggc ggtcgtgagg gtatgatgct gagccagcgt   | 660  |
| ttcccgagcc attatgatgg tattgtggcg ggtgcgccgg gttatcaact gccgaaggcg  | 720  |
| ggcattagcg gtgcgtggac caccgaaagc ctggcgccgg cggcggtggg cctggacgcg  | 780  |
| caaggtgttc cgctgattaa caaaagtttt agcgacgcgg atctgcacct gctgagccag  | 840  |
| gcgatcctgg gtacctgcga tgcgtggtgac ggctggcggt atggtattgt tgacaactat | 900  |
| cgtgcgtgcc aagcggcggt tgatccggcg accgcggcga acccggcgaa cggtcaggcg  | 960  |
| ctgcaatgcg ttggtgcgaa aaccgcggac tgcctgagcc cgggtgcaggt taccgcgac  | 1020 |
| aaacgtgcga tggcgggtcc ggttaacagc gcgggtacct cgctgtacaa ccgttgggcg  | 1080 |
| tgggatgcgg gtatgagcgg tctgagcgg accacctata accagggtg gcgttccgcg    | 1140 |
| tggctgggta gcttcaacag cagcgcaaac aacgcgaac gtgtgagcgg ttccagcgcg   | 1200 |
| cgtagctggc tgggtgactt cgcgaccccg ccggaaccga tgccgatgac ccaggttgcg  | 1260 |
| gcgcgtatga tgaagttcga ctttgatata gaccgctga aaatttgggc gaccagcggc   | 1320 |
| cagttcacc aaagcagcat ggattggcat ggtgcgacca gcaccgatct ggcggcggtt   | 1380 |
| cgtgaccgtg gcggtaaaaat gatcctgtat catggtatga gcgatgcggc gttcagcgcg | 1440 |
| ctggataccg cggactacta tgaacgtctg ggtgcggcga tgccgggtgc ggcgggtttc  | 1500 |
| gcgcgtctgt ttctggttcc gggtatgaac cattgcagcg gcggtccggg taccgatcgt  | 1560 |
| tttgacatgc tgaccccgct ggttgcgtgg gttgagcgtg gtgaagcgcc ggatcaaate  | 1620 |
| agcgcggtga gcggtacccc gggttacttc ggtgtggcgg cgcgtacccg tccgctgtgc  | 1680 |
| ccgtatccgc aaattgcgcg ttacaagggc agcggtgaca tcaataccga agcgaacttt  | 1740 |
| gcgtgcgcgg cgcggccgta actcgag                                      | 1767 |
| <210> 3                                                            |      |
| <211> 801                                                          |      |
| <212> DNA                                                          |      |
| <213> 人工序列 (Artificial Sequence)                                   |      |
| <220>                                                              |      |
| <223> IsMHETase_wt                                                 |      |
| <400> 3                                                            |      |
| catatgcaaa caaaccccta tgctcggggc cccaacccta cagccgcttc attggaagct  | 60   |
| agcgccggtc cgtttaccgt acgtcattt acggtgagcc ggcctagtgg ttatggtgcg   | 120  |
| gggaccgtgt attaccctac aaatgccggc ggtactgtgg gcgcaattgc gatcgtgccg  | 180  |
| ggctataccg cgcgtcagtc gtctattaaa tggtggggcc cacgttttagc atcacacgga | 240  |
| tttgtagtca ttactattga caccaacagt acgcttgatc agccgtcatc tcgatccagt  | 300  |

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| cagcagatgg ccgcgctgag acaagttgcg tctctcaatg gcacgagcag ctcaccgata  | 360  |
| tacggtaaag ttgatactgc acgtatgggg gttatgggat ggtccatggg cggtaggcgc  | 420  |
| tctctaataca gtgccgcgaa taatccgtcg ctgaaagctg cagcaccgca ggccccatgg | 480  |
| gatatgttca ctaacttctc atcggtcacc gtaccaacgc tgatatattgc ttgcgaaaat | 540  |
| gacagtattg ccccggtcaa ttcgtccgct ttaccgatct atgatagcat gtcacgcaat  | 600  |
| gcgaagcaat ttttgagat taatggtgga tccattctt gtgctaatac cggaataagc    | 660  |
| aatcaagcgc ttatcggcaa gaaaggcgtt gcatggatga aacgcttcat ggataatgat  | 720  |
| acgaggtact ccacattcgc ctgtgaaaat ccaaacagca cacgagtttc tgactttcgt  | 780  |
| accgccaatt gcagtctcga g                                            | 801  |
| <210> 4                                                            |      |
| <211> 1767                                                         |      |
| <212> DNA                                                          |      |
| <213> 人工序列 (Artificial Sequence)                                   |      |
| <220>                                                              |      |
| <223> IsMHETase_wt                                                 |      |
| <400> 4                                                            |      |
| catatgggtg gtggtagcac cccgctgccg ctgccgcaac aacaaccgcc gcaacaggag  | 60   |
| ccgccgccgc cgccggttcc gctggcgagc cgcgcgcggt gcgaggcgct gaaggatggc  | 120  |
| aacggtgaca tgggtgtggc gaacgcggcg accgtggttg aagttgcggc gtggcgtgat  | 180  |
| gcggcgccgg cgaccgcgag cgcgcgggcg ctgccggagc actgcgaagt gagcgggtgcg | 240  |
| atcgcgaaagc gtaccggcat tgacggttac ccgtatgaga tcaaatttcg tctgcgtatg | 300  |
| ccggcggagt ggaacggccg tttctttatg gaaggtggca gcggtaccaa cggtagcctg  | 360  |
| agcgcgcgca ccggtagcat cggtagcggt cagattgcga gcgcgctgag ccgtaacttt  | 420  |
| gcgaccattg cgaccgatgg cggtcacgac aacgcggtga acgataacc ggatgcgctg   | 480  |
| ggtaccgttg cgttcggctt ggaccgcaa gcgcgtctgg acatgggcta caacagctat   | 540  |
| gatcaggtta cccaagcggg caaggcggcg gttgcgcgtt tctacggtcg tgcggcggac  | 600  |
| aaaagctatt ttatcggctg cagcgagggc ggtcgtgagg gtatgatgct gagccagcgt  | 660  |
| ttcccagacc attatgatgg tattgtggcg ggtgcgccgg gttatcaact gccgaaggcg  | 720  |
| ggcattagcg gtgcgtggac caccctaaagc ctggcgccgg cggcggtggg cctggacgcg | 780  |
| caaggtgttc cgctgattaa caaaagtttt agcgacgcgg atctgcacct gctgagccag  | 840  |
| gcgatcctgg gtacctgcga tgcgctggac ggctggcggt atggtattgt tgacaactat  | 900  |
| cgtgcgtgcc aagcgcggtt tgatccggcg acccgggcga acccgggcga cggtcaggcg  | 960  |
| ctgcaatgcg ttggtgcgaa aaccgcggac tgctgagcc cgggtgcaggc taccgcgac   | 1020 |
| aaacgtgcga tggcggttcc ggttaacagc gcgggtaccc cgctgtacaa ccgttgggcg  | 1080 |
| tgggatgcgg gtatgagcgg tctgagcgg accacctata accagggtg gcgttctctg    | 1140 |
| tggctgggta gcttcaacag cagcgcgaa aacgcgcaac gtgtgagcgg ttccagcgcg   | 1200 |
| cgtagctggc tggttgactt cgcgaccccg ccggaaccga tgccgatgac ccaggttgcg  | 1260 |
| gcgcgtatga tgaagttcga ctttgatata gaccgcgtga aaatttgggc gaccagcggc  | 1320 |
| cagttcaccc aaagcagcat ggattggcat ggtgcgacca gcaccgatct ggcggcgttt  | 1380 |

---

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| cgtgaccgtg gcggtaaaat gacacctgtat catggtatga gcgatgcggc gttcagcgcg | 1440 |
| ctggataccg cggactacta tgaacgtctg ggtgcggcga tgccgggtgc ggcgggtttc  | 1500 |
| gcgcgtctgt ttctggttcc gggatatgaac cattgcagcg gcggtccggg taccgatcgt | 1560 |
| tttgacatgc tgaccccgct ggttgcgtgg gttgagcgtg gtgaagcgcc ggatcaaadc  | 1620 |
| agcgcgtgga gcggtacccc gggttacttc ggtgtggcgg cgcgtacccg tccgctgtgc  | 1680 |
| ccgtatccgc aaattgcgcg ttacaagggc agcggtgaca tcaataccga agcgaacttt  | 1740 |
| gcgtgcgcgg cgccgccgta actcgag                                      | 1767 |



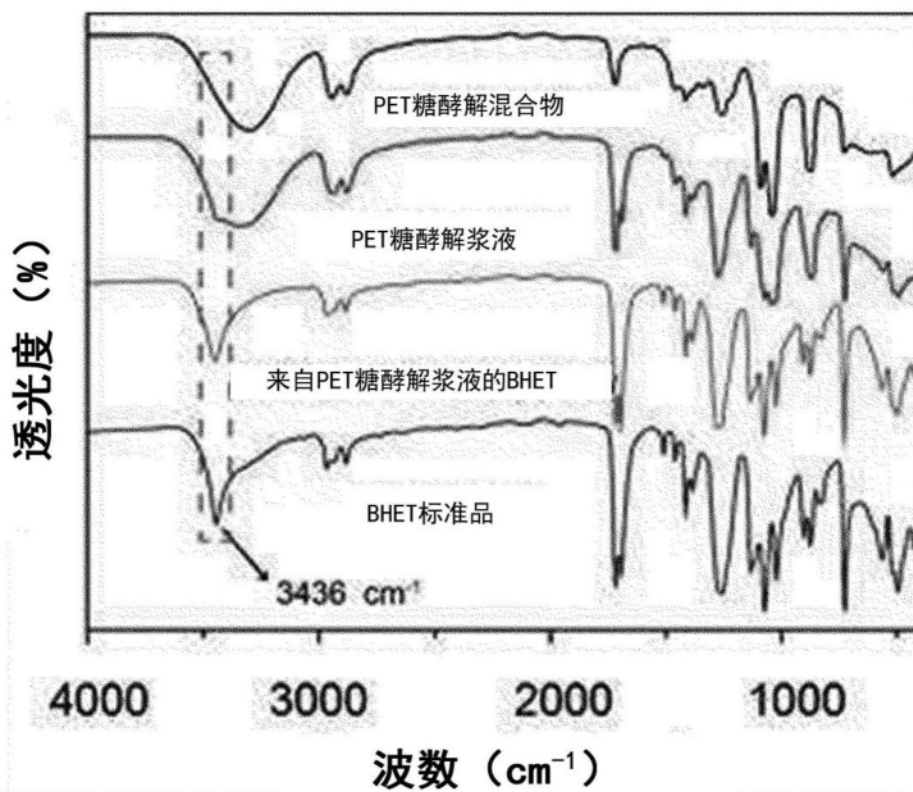


图2b

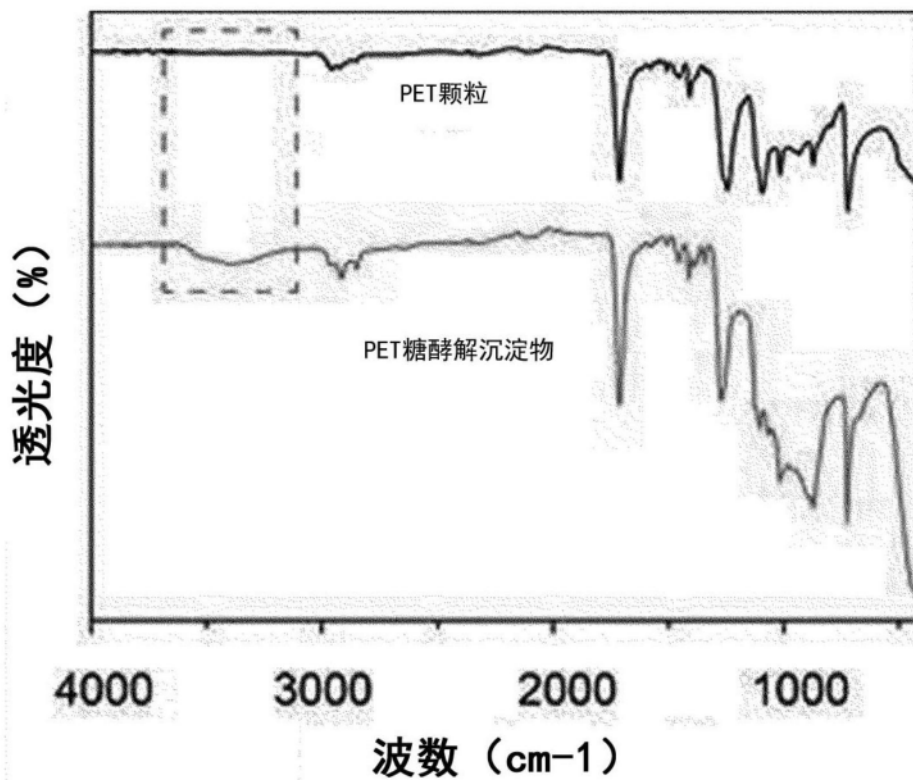


图2c

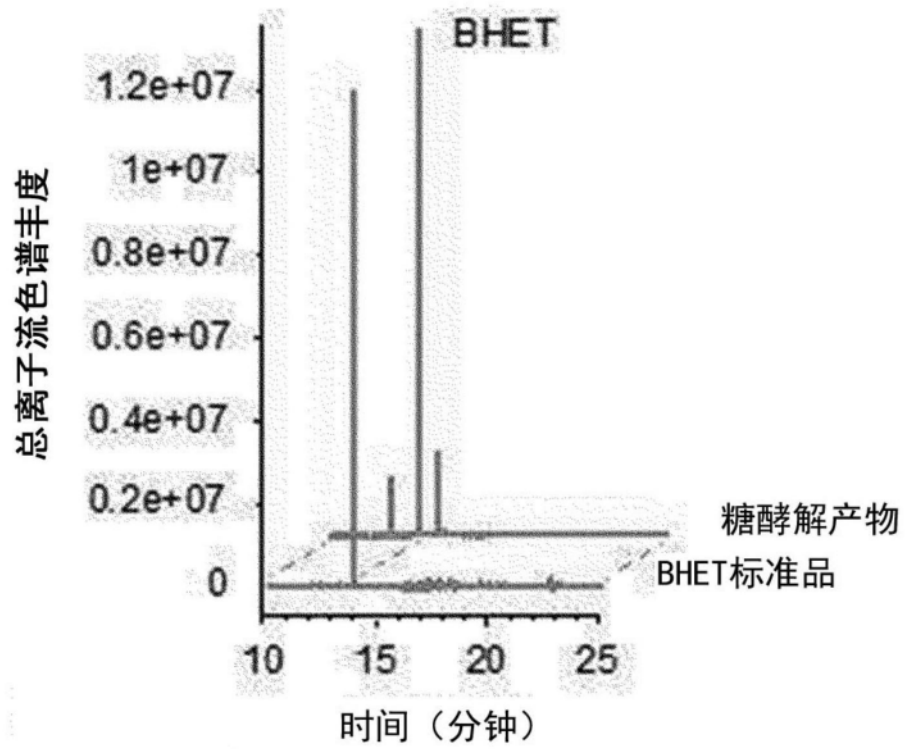


图2d

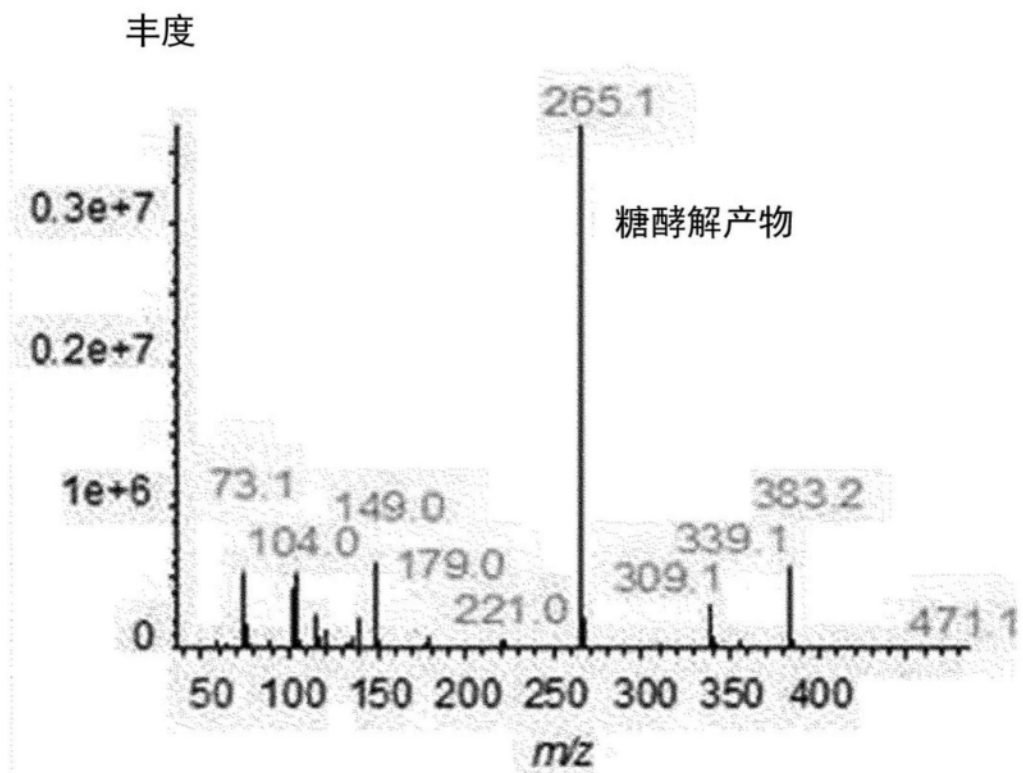


图2e

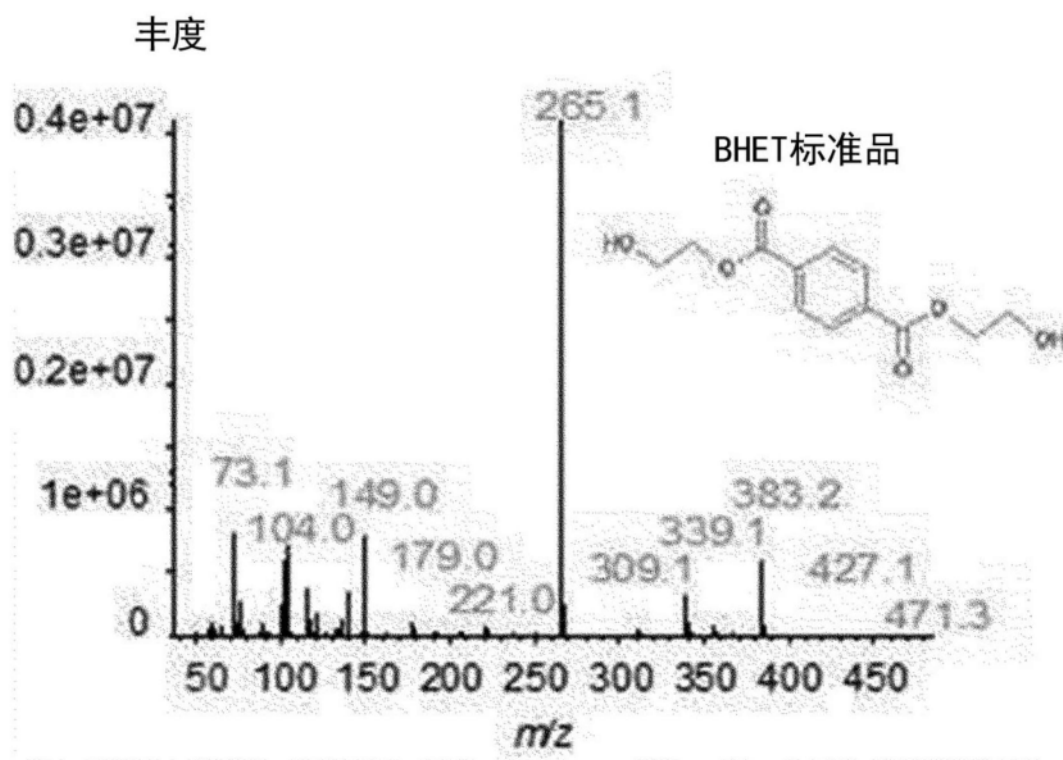


图2f

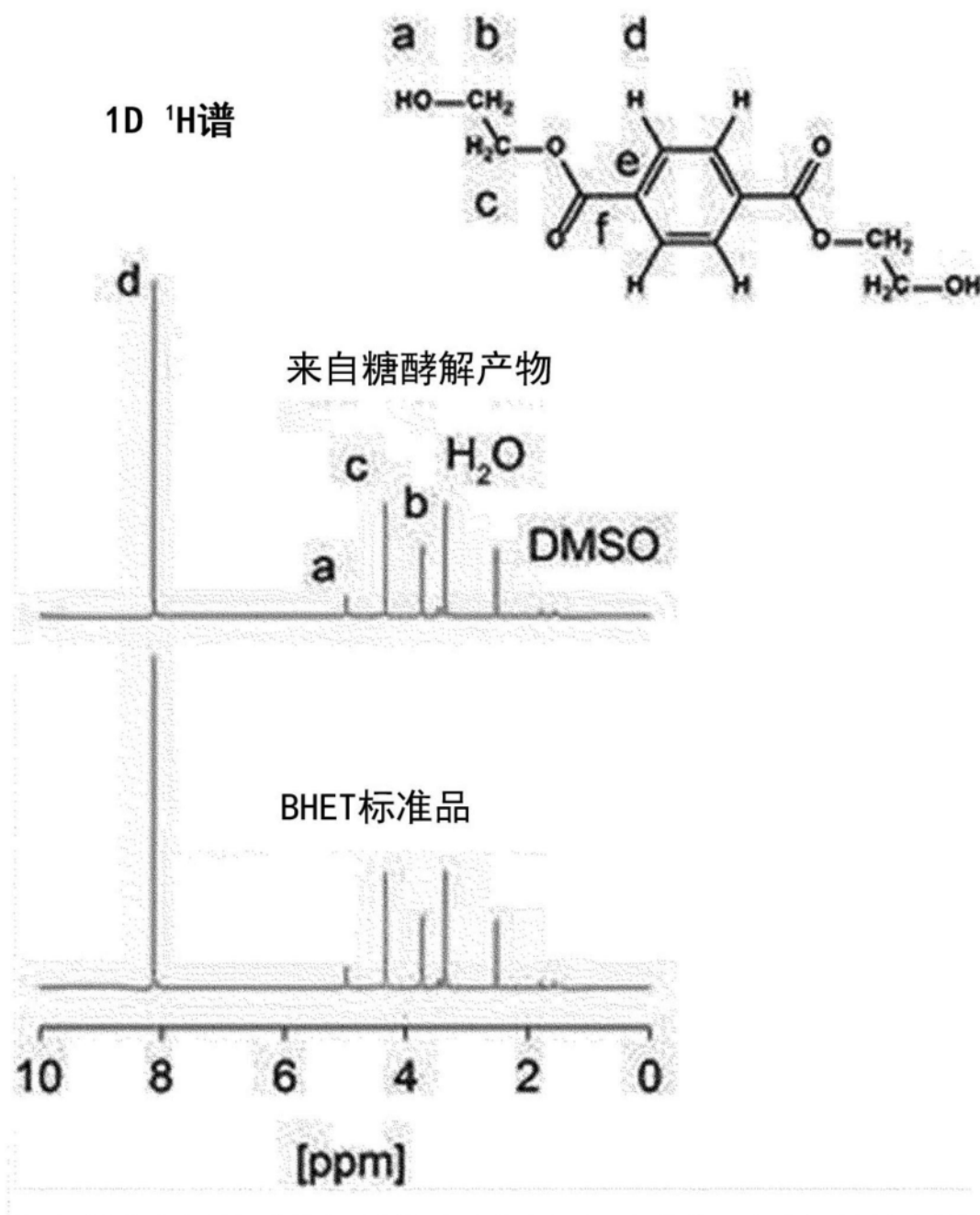


图2g

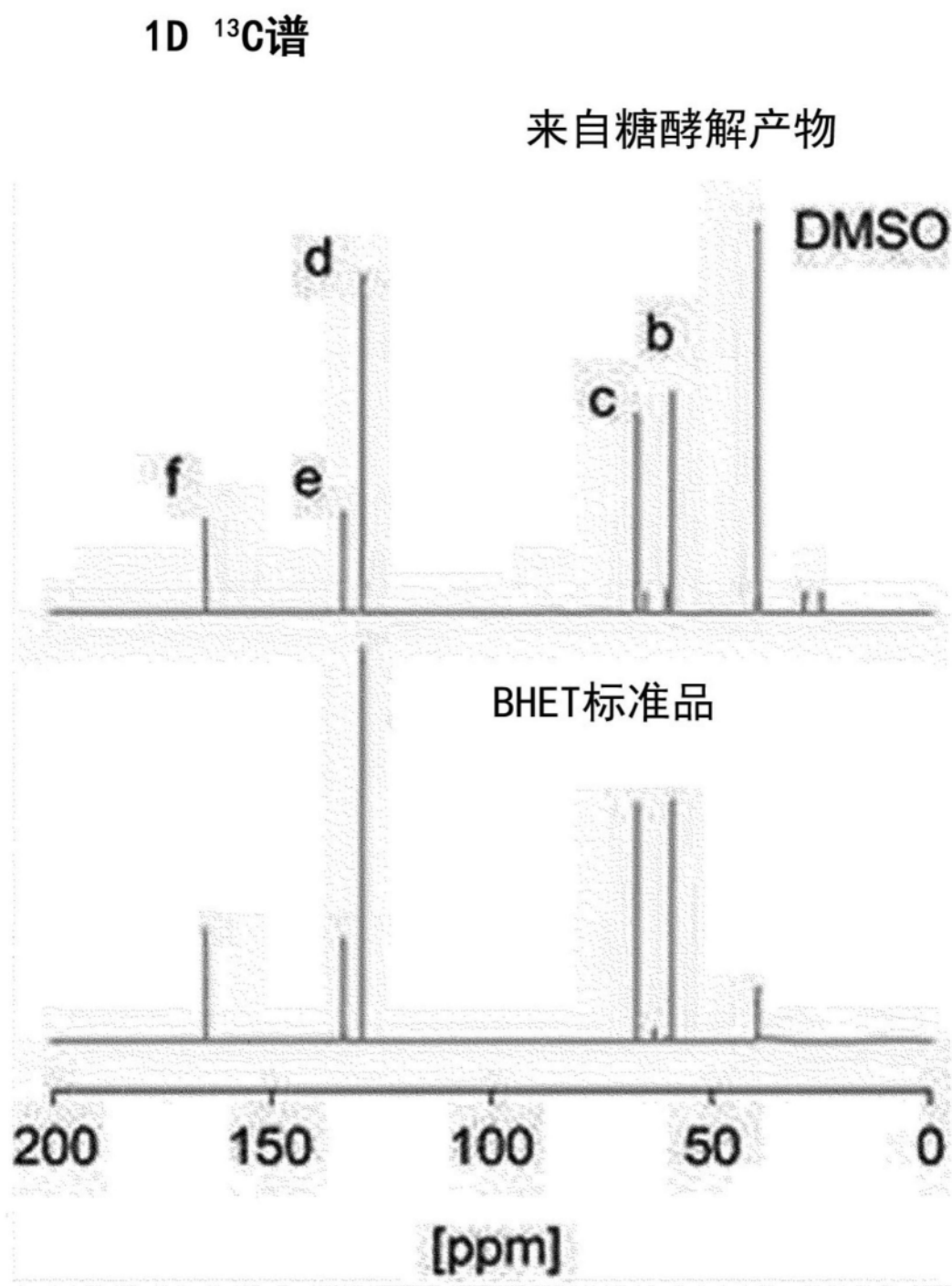


图2h

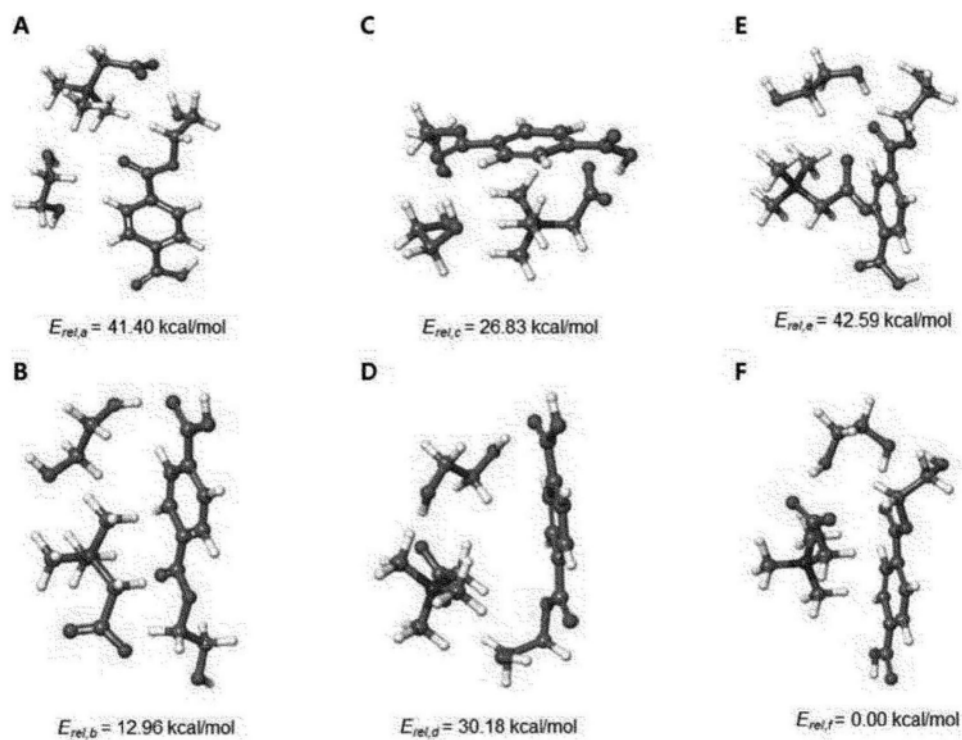


图3

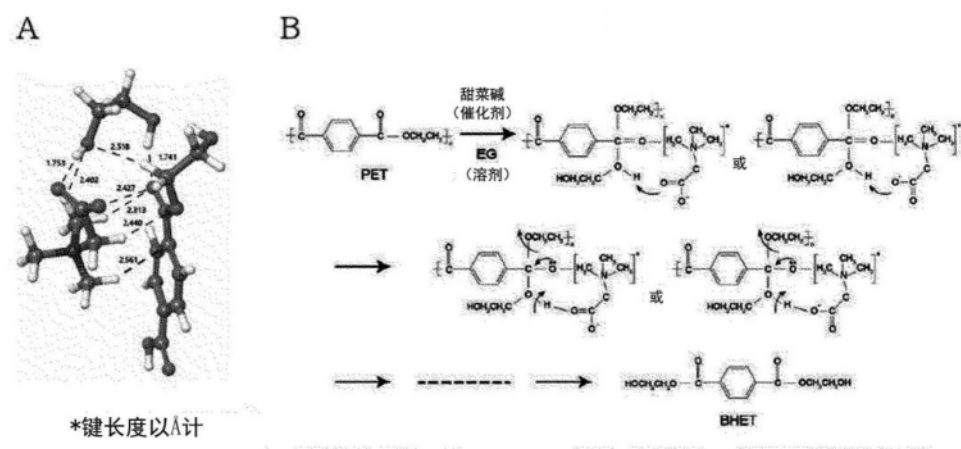


图4

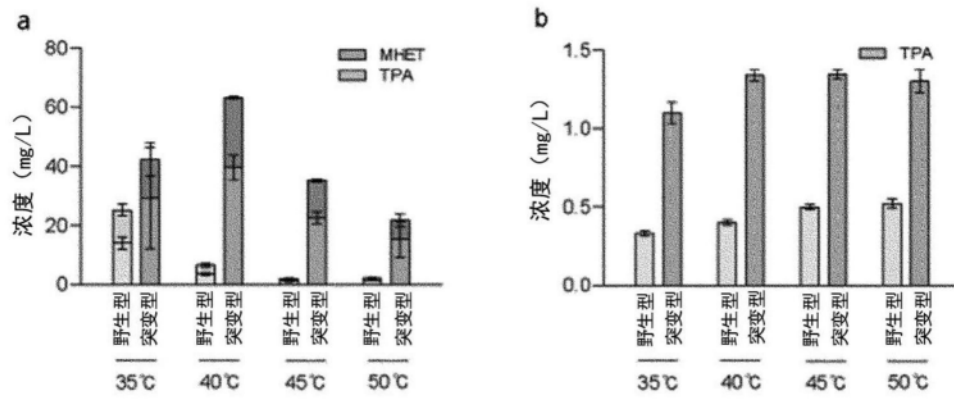


图5

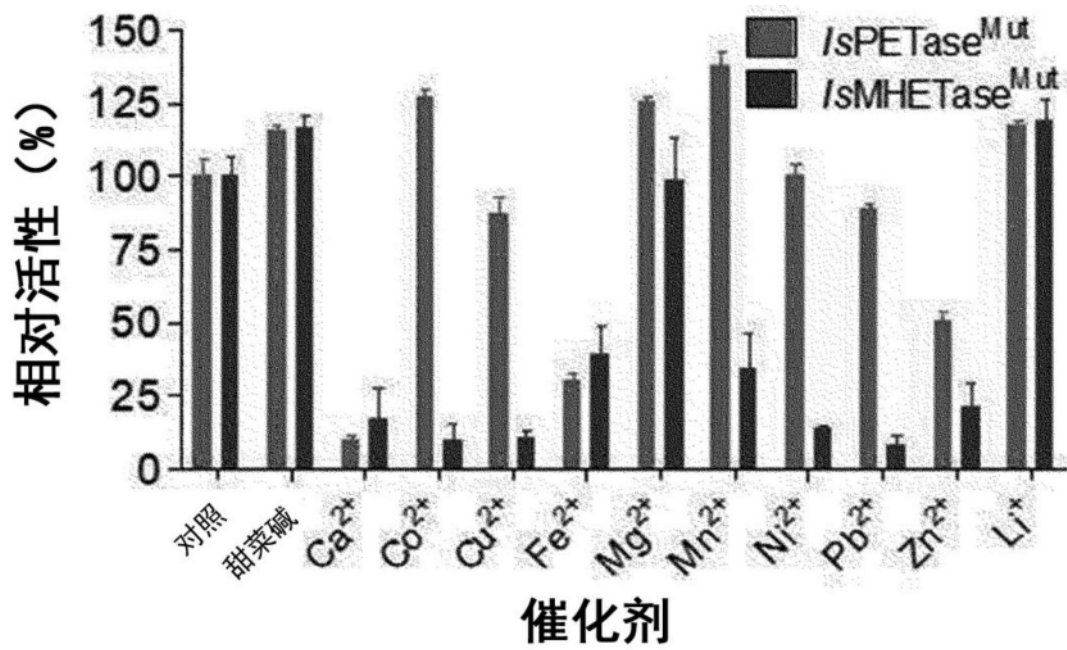


图6a

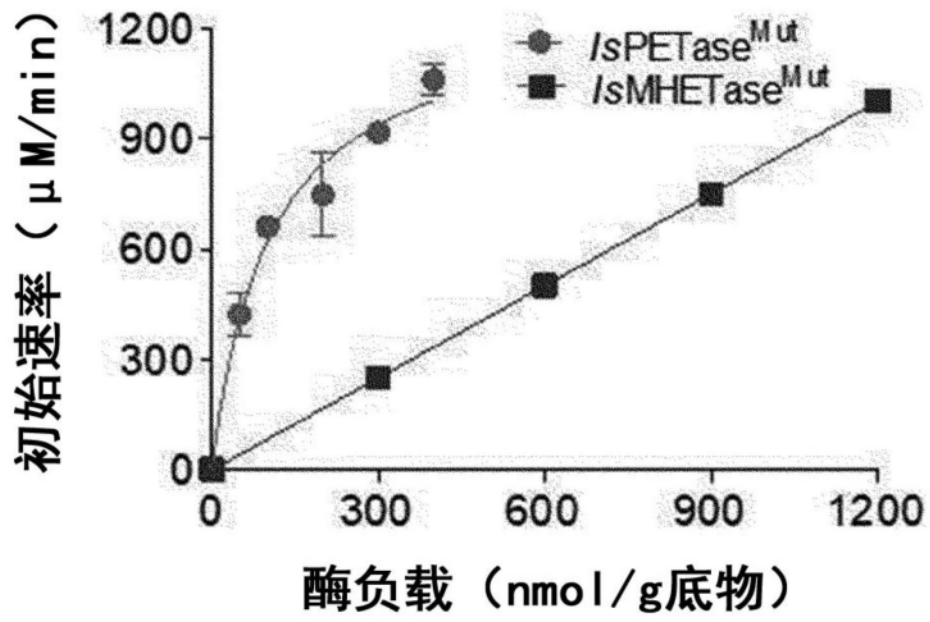


图6b

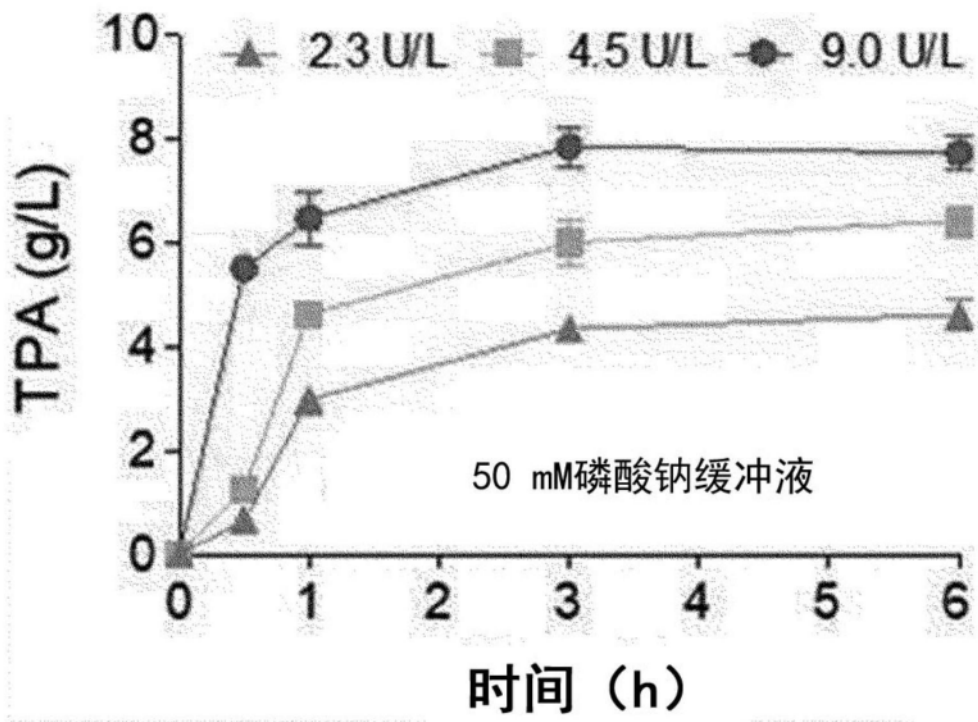


图6c

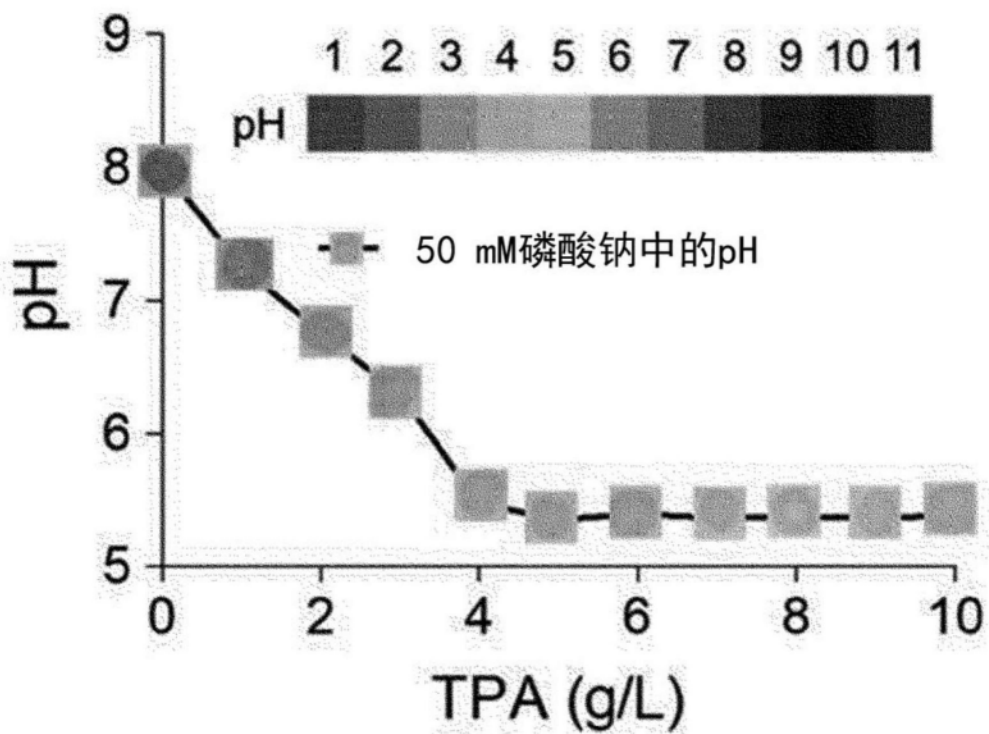


图6d

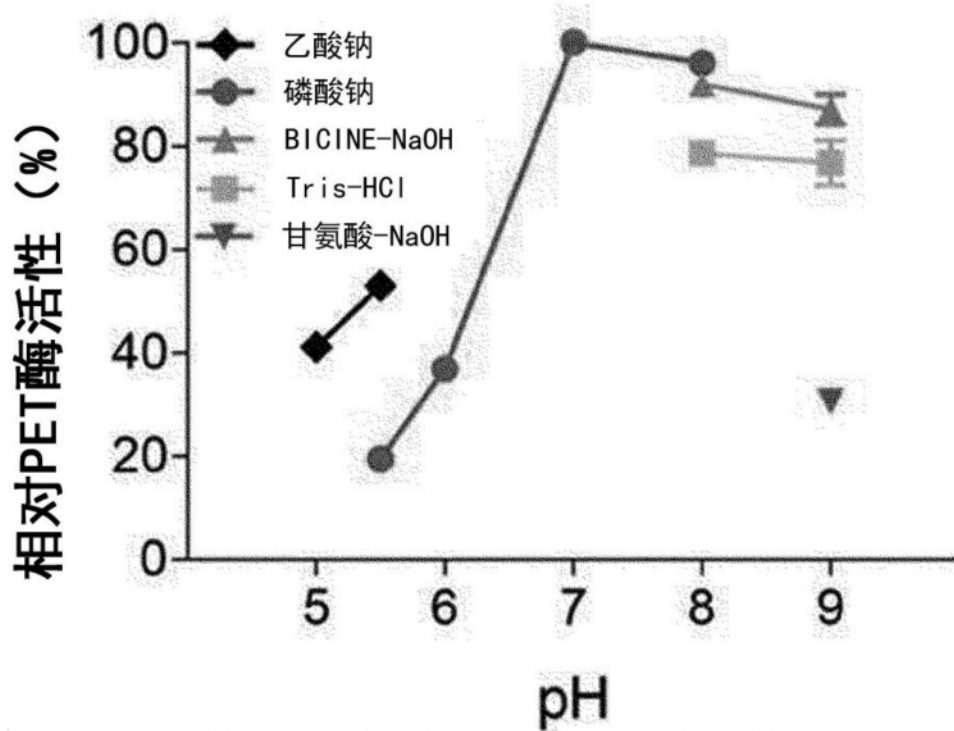


图6e

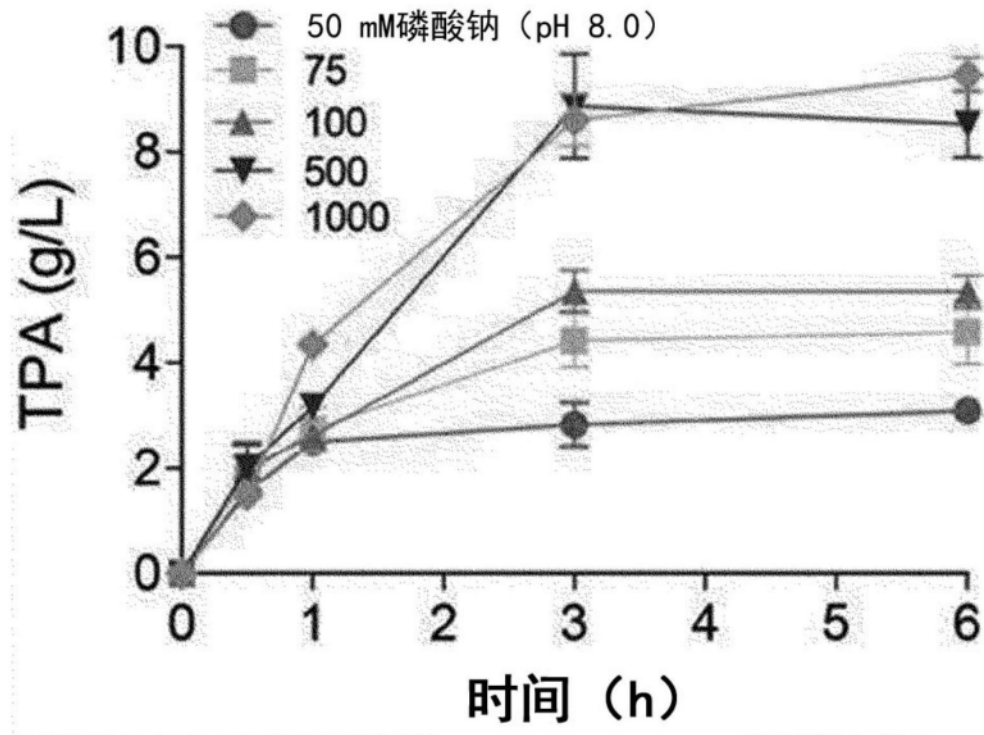


图6f

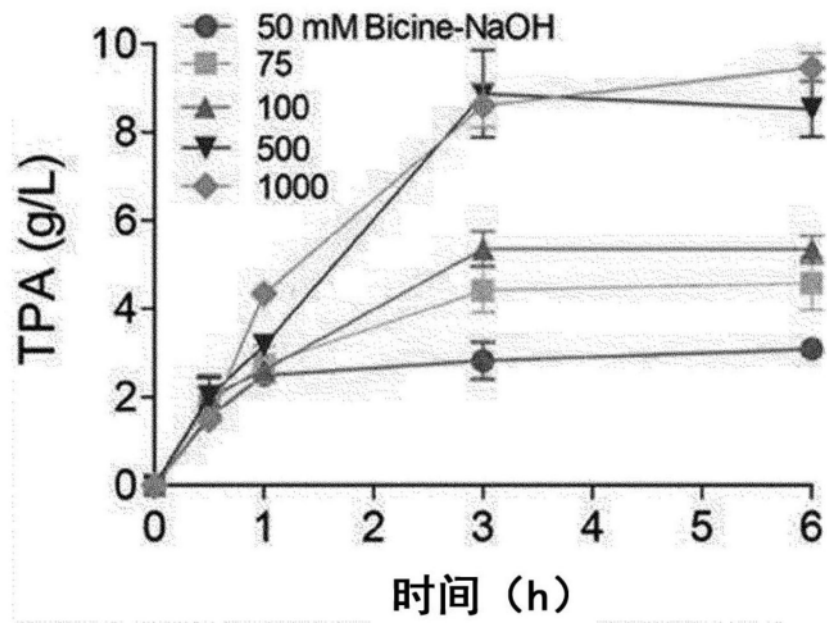


图6g

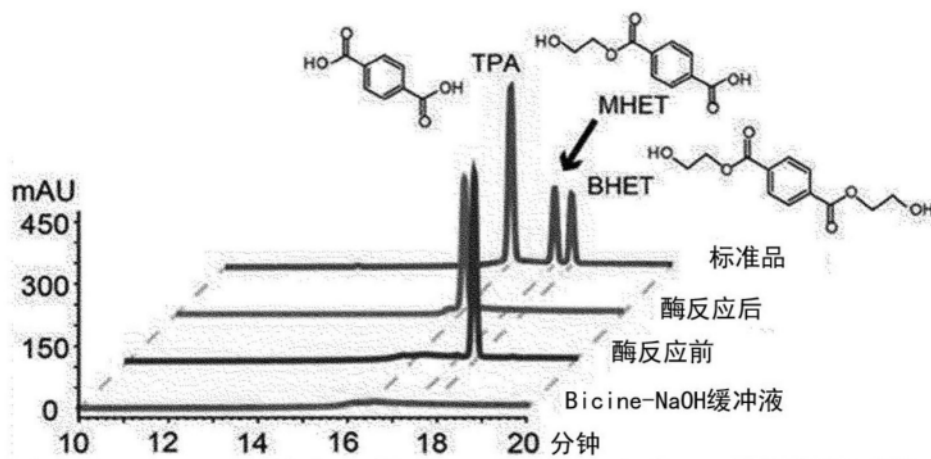


图6h

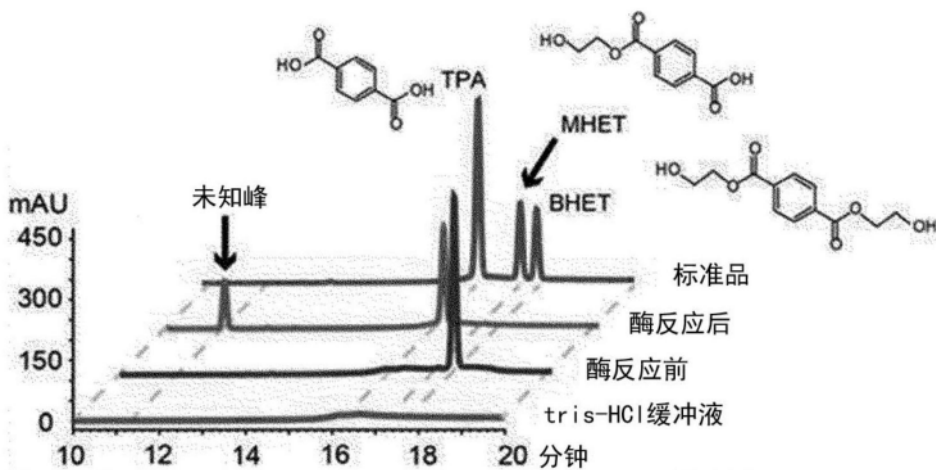


图6i

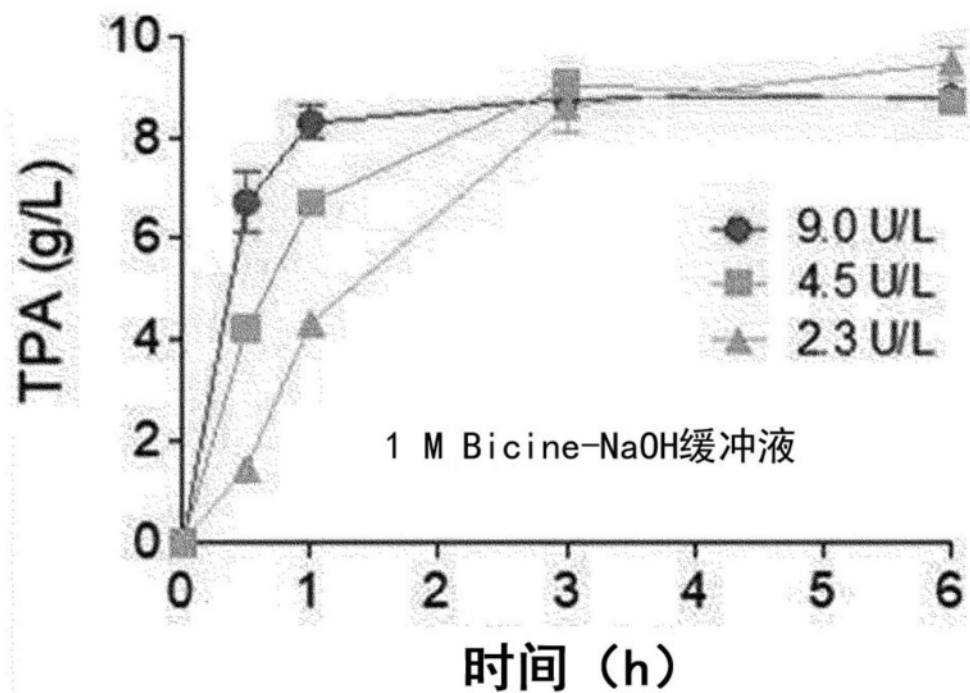


图6j

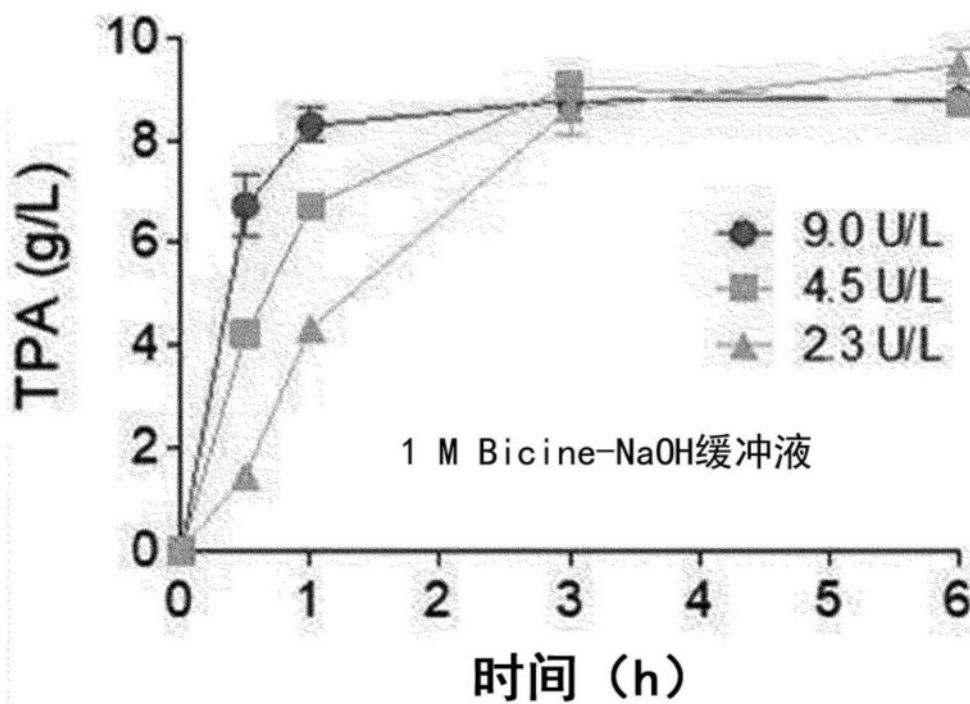


图6k

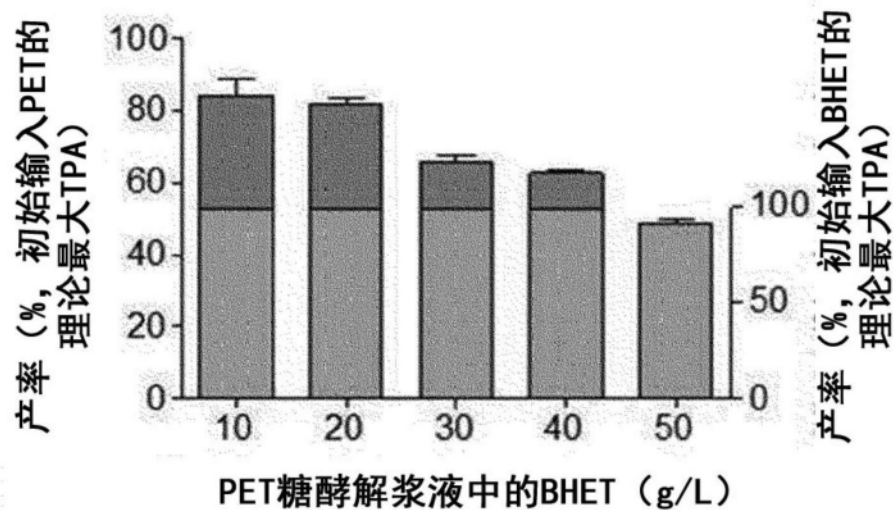


图61

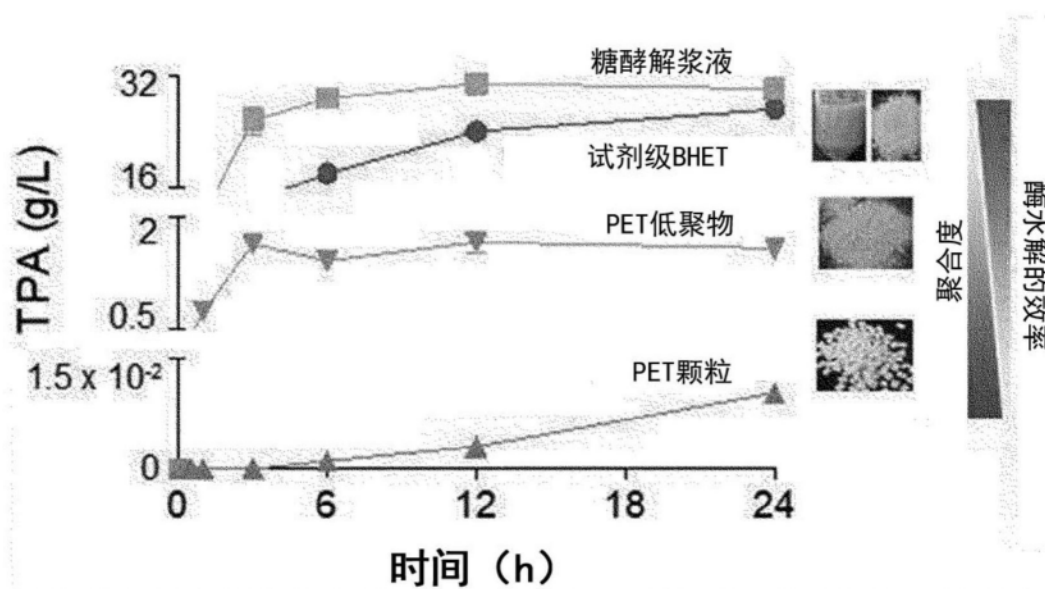


图6m

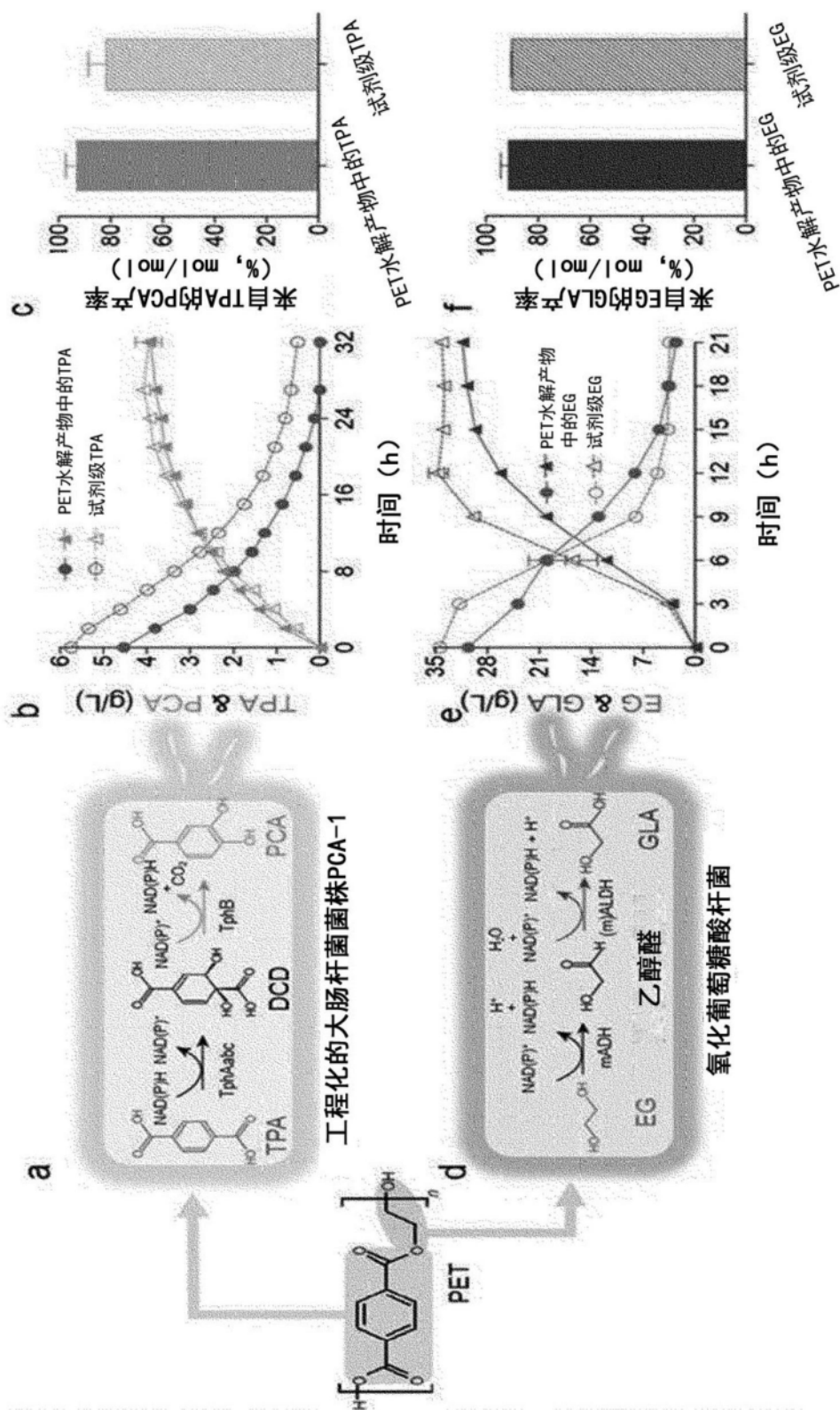


图7