(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 114891768 B
(45)授权公告日 2024.09.24

(21)申请号 202210724621.9
(22)申请日 2017.07.12
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114891768 A
(43)申请公布日 2022.08.12
(30)优先权数据
16305899.3 2016.07.12 EP
(62)分案原申请数据
201780051442.0 2017.07.12
(73)专利权人 卡比奥斯公司
地址 法国圣博齐尔
(72)发明人 V•图尼尔 H•特谢尔
M-L•德鲁索 C•托珀姆
I•安德烈 S•巴比
S•迪奎斯内 A•马蒂
(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256
专利代理师 孟凡宏 谢燕军
(51)Int.Cl.
C12N 9/18(2006.01)
C12N 15/55(2006.01)
C08J 11/10(2006.01)
C08L 67/02(2006.01)
(56)对比文件
WO 2012099018 A1,2012.07.26
审查员 冷千里

权利要求书1页 说明书17页
序列表2页

(54)发明名称

新酯酶及其用途

(57)摘要

本发明涉及新的酯酶,更具体地涉及与SEQ ID N°1的酯酶相比具有改进的活性的酯酶变体及其用于降解含聚酯材料如塑料制品的用途。本发明的酯酶特别适用于降解聚对苯二甲酸乙二醇酯和含有聚对苯二甲酸乙二醇酯的材料。

CN 114891768 B

1.一种酯酶变体,其在Y92G/N/P/Q/T的位置上具有氨基酸取代,其中所述位置参考SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列编号,和与SEQ ID NO:1的酯酶相比表现出增加的聚酯降解活性。

2.一种核酸,其编码权利要求1所定义的酯酶变体。

3.一种表达盒或载体,其包含权利要求2所述的核酸。

4.一种宿主细胞,其包含权利要求2所述的核酸或权利要求3所述的表达盒或载体,其中所述宿主细胞不是植物细胞。

5.一种组合物,包含根据权利要求1所定义的酯酶变体,或根据权利要求4所述的宿主细胞或其提取物。

6.一种生产酯酶的方法,包括:

(a)在适于表达编码所述酯酶的核酸的条件下培养根据权利要求4所述的宿主细胞;和

(b)从细胞培养物回收所述酯酶。

7.降解包含至少一种聚酯的塑料制品的方法,包括:

(a)使塑料制品与根据权利要求1所述的酯酶或根据权利要求4所述的宿主细胞或根据权利要求5所述的组合物接触;和

(b)回收单体和/或低聚物。

8.根据权利要求7所述的方法,其中所述塑料制品包含选自以下的至少一种聚酯:聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)、聚对苯二甲酸丙二醇酯(PTT)、聚对苯二甲酸丁二醇酯(PBT)、聚对苯二甲酸异山梨酯(PEIT)、聚乳酸(PLA)、聚羟基链烷酸酯(PHA)、聚丁二酸丁二醇酯(PBS)、聚丁二酸己二酸丁二酯(PBSA)、聚己二酸对苯二甲酸丁二酯(PBAT)、聚呋喃乙酸酯(PEF)、聚己内酯(PCL)、聚(己二酸乙二醇酯)(PEA)、聚萘二甲酸乙二醇酯(PEN)和这些材料的掺合物/混合物。

9.根据权利要求7或8所述的方法,其中所述塑料制品包含聚对苯二甲酸乙二醇酯。

10.根据权利要求7或8所述的方法,其中步骤(a)在20℃-90℃的温度下进行。

11.根据权利要求7或8所述的方法,其中步骤(a)在60℃-70℃的温度下进行。

新酯酶及其用途

[0001] 本申请是申请日为2017年7月12日、申请号为201780051442.0、发明名称为“新酯酶及其用途”的发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及新的酯酶,更具体地涉及与亲本酯酶相比具有改进的活性的酯酶及其用于降解含聚酯材料如塑料制品的用途。本发明的酯酶特别适用于降解聚对苯二甲酸乙二醇酯和含有聚对苯二甲酸乙二醇酯的材料。

背景技术

[0003] 酯酶能够催化各种聚合物(包括聚酯)的水解。在这种情况下,酯酶已经在许多工业应用中显示出有希望的效果,包括作为洗碗和洗衣应用的洗涤剂、作为用于处理生物质和食品的降解酶、作为环境污染物去毒中的生物催化剂或用于处理纺织工业中的聚酯织物。同样地,使用酯酶作为降解酶来水解聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)是特别令人感兴趣的。实际上,PET用于众多技术领域,例如用于制造服饰、地毯或以热固性树脂形式用于制造包装材料或汽车塑料制品或其他部件,并且填埋场中的PET积累变成与日俱增的生态问题。

[0004] 在酯酶中,角质酶,也称为角质水解酶(EC 3.1.1.74),是特别令人感兴趣的。已经从各种真菌(P.E.Kolattukudy in″Lipases″、Ed.B.Borg-stróm and H.L.Brockman、Elsevier 1984、471-504)、细菌和植物花粉中鉴定了角质酶。最近,宏基因组学方法已经鉴定了其他酯酶。

[0005] 酶促降解被认为是减少这种塑料废物积累的令人感兴趣的解决方案。实际上,酶可以加速含聚酯材料尤其是塑料制品的水解,甚至达到单体水平。此外,水解产物(即单体和低聚物)可以作为合成新聚合物的材料再循环。

[0006] 在这种情况下,已经鉴定了几种酯酶作为候选降解酶。例如,已发表了几种豌豆根腐镰孢菌(Fusarium solani pisi)的酯酶变体(Appl.Environm.Microbiol.64、2794-2799、1998;Proteins:Structure,Function and Genetics 26,442-458,1996)。

[0007] 然而,仍然需要具有改进活性的酯酶,以允许具有更高效率的方法,从而提高生物聚酯降解方法的竞争力。

发明概述

[0008] 本发明提供了与亲本或野生型酯酶相比表现出增加的活性的新的酯酶变体。这些酯酶在降解塑料材料和产品(例如含PET的塑料材料和产品)的过程中特别有用。更具体地,本发明提供了具有SEQ ID N°1所示氨基酸序列的酯酶的变体,其对应于Sulaiman等Appl Environ Microbiol.2012Mar描述的宏基因组衍生的角质酶的氨基酸序列的氨基酸36-293或SwissProt中氨基酸序列参考G9BY57的氨基酸36-293。

[0009] 在这方面,本发明的一个目的是提供一种酯酶,其(i)与SEQ ID N°1所示的全长氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%的同一性,和(ii)在选自以下的位置

上具有至少一个取代:F208、T157、T176、S65、G53、A121、V170、S223、P58、A62、A64、L67、A68、N85、T86、R89、D91、P93、R96、G128、M131、G133、G134、L152、T153、P154、H156、A178、P179、H183、S206、A209、P210或N211,其中所述位置参考SEQ ID N°1所示的氨基酸序列编号,和(iii)与SEQ ID N°1的酯酶相比表现出增加的聚酯降解活性。

[0010] 更具体地,本发明的酯酶在选自以下的位置上包含至少一个取代:F208、T157、T176、G53、A121、V170、S65或N211。

[0011] 根据一个具体实施方案,与SEQ ID N°1相比,本发明的变体酯酶在选自以下的位置上包含至少一个取代或取代的组合:G53L、S65T、A121R/W、T157E/Q/N/G、V170I、T176H/N/Q、F208W/I/L/G/S/N/A/R/T、N211Q、F208W+V170I、Y92P+F208L、Y92P+F208W、T176H+F208W、V170I+A121S、V170I+A121S+S223A、F208W+T157Q、F208W+T157N、F208W+T157S、F208W+S65T、F208W+T157E、F208W+D203C+S248C、F208I+D203C+S248C。

[0012] 根据一个具体实施方案,除了一个或多个上列取代之外,酯酶还在选自G59、Y60、T61、D63、S66、F90、Y92、H129、G132、W155和V177的位置上包含至少一个取代。有利地,额外的取代选自Y60M/F、T61M/V、D63N/Q、S66H、F90W和Y92G/N/P/Q/T。

[0013] 在另一个具体实施方案中,酯酶包含至少一个选自Y60M、T61M/V、D63N/Q、S66H、F90W和Y92G/N/P/Q/T的取代。

[0014] 在另一个具体实施方案中,酯酶变体在选自以下的位置上包含至少两个取代:G53、P58、G59、Y60、T61、A62、D63、A64、S65、S66、L67、A68、N85、T86、R89、F90、D91、Y92、P93、R96、A121、G128、H129、M131、G132、G133、G134、L152、T153、P154、W155、H156、T157、V170、T176、V177、A178、H183、S206、F208、A209、P210、S223和N211。

[0015] 本发明的另一个目的是提供编码本发明酯酶的核酸。本发明还涉及包含所述核酸的表达盒或表达载体,以及包含所述核酸、表达盒或载体的宿主细胞。

[0016] 本发明进一步的目的是提供一种生产本发明酯酶的方法,包括:

[0017] (a)在适于表达编码酯酶的核酸的条件下培养根据本发明的宿主细胞;和可选地

[0018] (b)从细胞培养物回收所述酯酶。

[0019] 本发明还涉及降解包含至少一种聚酯的塑料制品的方法,包括:

[0020] (a)使塑料制品与根据本发明的酯酶或宿主细胞接触,从而降解塑料制品;和可选地

[0021] (b)回收单体和/或低聚物。

[0022] 发明详述

[0023] 定义

[0024] 通过参考以下定义将最好地理解本公开。

[0025] 本文中,术语“肽”、“多肽”、“蛋白质”、“酶”是指通过肽键连接的氨基酸链,而不管形成所述链的氨基酸的数量。本文中,氨基酸根据以下命名法由它们的单字母或三字母代码表示:A:丙氨酸(Ala);C:半胱氨酸(Cys);D:天冬氨酸(Asp);E:谷氨酸(Glu);F:苯丙氨酸(Phe);G:甘氨酸(Gly);H:组氨酸(His);I:异亮氨酸(Ile);K:赖氨酸(Lys);L:亮氨酸(Leu);M:甲硫氨酸(Met);N:天冬酰胺(Asn);P:脯氨酸(Pro);Q:谷氨酰胺(Gln);R:精氨酸(精氨酸);S:丝氨酸(Ser);T:苏氨酸(Thr);V:缬氨酸(Val);W:色氨酸(Trp)和Y:酪氨酸(Tyr)。

[0026] 术语“酯酶”是指根据酶命名法属于分类为EC 3.1.1的一类水解酶的酶,其催化酯水解成酸和醇。术语“角质酶”或“角质水解酶”是指根据酶命名法分类为EC 3.1.1.74的酯酶,其能够催化由角质和水生产角质单体的化学反应。

[0027] 术语“野生型蛋白质”或“亲本蛋白质”可互换使用,并且是指天然存在的多肽的非突变形式。在本案中,亲本酯酶是指具有SEQ ID N°1所示氨基酸序列的酯酶。

[0028] 因此,术语“突变体”和“变体”可互换使用,是指衍生自SEQ ID N°1且在一个或多个(例如,几个)位置处包含修饰或改变,即取代、插入和/或缺失并具有聚酯降解活性的多肽。可以通过本领域熟知的各种技术获得变体。特别地,用于改变编码野生型蛋白质的DNA序列的技术的实例包括但不限于定点诱变、随机诱变和合成寡核苷酸构建。

[0029] 本文所用的与位置或氨基酸有关的术语“修饰”或“改变”是指与野生型蛋白质的氨基酸相比,特定位置处的氨基酸已被修饰。

[0030] “取代”是指一个氨基酸残基被另一个氨基酸残基取代。优选地,术语“取代”是指由另一个氨基酸残基替换一个氨基酸残基,所述另一个氨基酸残基选自天然存在的20个标准氨基酸残基、天然存在的稀有氨基酸残基(例如羟脯氨酸、羟赖氨酸、别羟基赖氨酸、6-N-甲基赖氨酸、N-乙基甘氨酸、N-甲基甘氨酸、N-乙基天冬酰胺、别异亮氨酸、N-甲基异亮氨酸、N-甲基缬氨酸、焦谷氨酰胺、氨基丁酸、鸟氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸)和通常是合成的非天然存在的氨基酸残基(例如环己基-丙氨酸)。优选地,术语“取代”是指由另一个选自天然存在的20个标准氨基酸残基(G、P、A、V、L、I、M、C、F、Y、W、H、K、R、Q、N、E、D、S和T)替换一个氨基酸残基。符号“+”表示取代的组合。在本文件中,以下术语用于表示取代:L82A表示亲本序列的第82位氨基酸残基(亮氨酸,L)变为丙氨酸(A)。A121V/I/M表示亲本序列的第121位氨基酸残基(丙氨酸,A)被下列氨基酸之一取代:缬氨酸(V)、异亮氨酸(I)或甲硫氨酸(M)。取代可以是保守或非保守取代。保守取代的实例是在以下组内进行:碱性氨基酸(精氨酸、赖氨酸和组氨酸)、酸性氨基酸(谷氨酸和天冬氨酸)、极性氨基酸(谷氨酰胺、天冬酰胺和苏氨酸)、疏水性氨基酸(蛋氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、半胱氨酸和缬氨酸)、芳族氨基酸(苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸)和小氨基酸(甘氨酸、丙氨酸和丝氨酸)。

[0031] 与氨基酸有关的术语“缺失”是指氨基酸已被去除或不存在。

[0032] 术语“插入”是指添加一个或多个氨基酸。

[0033] 除非另有说明,否则本申请公开的位置参考SEQ ID N°1所示的氨基酸序列编号。

[0034] 如本文所用,术语“序列同一性”或“同一性”是指两个多肽序列之间的匹配(相同的氨基酸残基)的数目(或以百分比%表示的分数)。通过在对齐时比较序列来测定序列同一性,以便最大化重叠和同一性,同时最小化序列空位。具体地,序列同一性可以根据两个序列的长度使用许多数学全局或局部对齐算法中的任何一种来测定。优选使用在全长上最佳地对齐序列的全局对齐算法(例如Needleman和Wunsch算法;Needleman和Wunsch,1970)来对齐相似长度的序列,而优选使用局部对齐算法(例如Smith和Waterman算法(Smith和Waterman,1981)或Altschul算法(Altschul等,1997;Altschul等,2005))来对齐基本上不同长度的序列。用于测定氨基酸序列同一性百分比的对齐可以以本领域技术范围内的各种方式实现,例如,使用互联网网站如http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/或http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/上可获得的公共可用计算机软件。本领域技术人员可以确定用于测量对齐的适当参数,包括在所比较的序列的全长上实现最大对齐所需的任何算

法。为了本文的目的,%氨基酸序列同一性值是指使用成对序列对齐程序EMBOSS Needle产生的值,其使用Needleman-Wunsch算法产生两个序列的最佳全局对齐,其中所有检索参数被设置为默认值,即评分矩阵=BLOSUM62,空位开放=10,空位延长=0.5,末端空位罚分=错误,末端空位开放=10以及末端空位延长=0.5。

[0035] “蛋白质构象”或“晶体结构”是指蛋白质的三维结构。

[0036] 术语“重组”是指通过基因工程产生的核酸构建体、载体、多肽或细胞。

[0037] 如本文所用,术语“表达”是指涉及多肽产生的任何步骤,包括但不限于转录、转录后修饰、翻译、翻译后修饰和分泌。

[0038] 术语“表达盒”表示核酸构建体,其包含编码区,即本发明的核酸,和调控区,即包含一个或多个可操作地连接的控制序列。

[0039] 如本文所用,术语“表达载体”是指包含本发明的表达盒的DNA或RNA分子。优选地,表达载体是线性或环状双链DNA分子。

[0040] “聚合物”是指化合物或化合物的混合物,其结构由通过共价化学键连接的多个单体(重复单元)组成。在本发明的上下文中,术语聚合物包括天然或合成聚合物,由单一类型的重复单元(即均聚物)或不同重复单元的混合物(即共聚物或杂聚物)组成。根据本发明,“低聚物”是指含有2至约20个单体的分子。

[0041] 在本发明的上下文中,“含聚酯材料”或“含聚酯产品”是指包含至少一种结晶、半结晶或完全无定形形式的聚酯的产品,例如塑料制品。在一个具体实施方案中,含聚酯材料是指由至少一种塑料材料制成的任何物品,例如塑料片、管、棒、型材(profile)、模型(shape)、膜、大块等,其包含至少一种聚酯,和可能的其他物质或添加剂,如增塑剂、矿物或有机填料。在另一个具体实施方案中,含聚酯材料是指适用于制造塑料制品的熔融或固体状态的塑料化合物或塑料制剂。

[0042] 在本说明书中,“聚酯”包括但不限于聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)、聚对苯二甲酸丙二醇酯(PTT)、聚对苯二甲酸丁二醇酯(PBT)、聚对苯二甲酸异山梨酯(PEIT)、聚乳酸(PLA)、聚羟基链烷酸酯(PHA)、聚丁二酸丁二醇酯(PBS)、聚丁二酸己二酸丁二酯(PBSA)、聚己二酸对苯二甲酸丁二酯(PBAT)、聚呋喃乙酸酯(PEF)、聚已内酯(PCL)、聚(已二酸乙二醇酯)(PEA)、聚萘二甲酸乙二醇酯(PEN)和这些聚合物的掺合物/混合物。

[0043] 具有改进的活性的新酯酶

[0044] 本发明提供了具有改进活性的新酯酶。更具体地,本发明人设计了具有用于工业方法的优异性质的新型酶。为了改进酯酶在可以进行塑料制品的工业降解的条件下的活性,本发明人开发了衍生自SEQ ID N°1的酯酶的新酯酶,其显示出高于该亲本酯酶的活性。本发明的酯酶特别适用于降解含PET的塑料制品。与SEQ ID N°1的酯酶相比,本发明的酯酶表现出增加的比活性和/或增加的吸附在聚合物上的能力。有趣的是,发明人鉴定了特定的氨基酸残基,其旨在与蛋白质的晶体结构中的聚合物基质接触,所述蛋白质的晶体结构可以被有利地修饰以促进基质与蛋白质的接触,从而增加聚合物的吸附和/或蛋白质在该聚合物上的活性。

[0045] 因此,本发明的一个目的是提供一种酯酶,其(i)与SEQ ID N°1所示的全长氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%的同一性,(ii)与SEQ ID N°1相比包含至少一个氨基酸修饰,和(iii)与SEQ ID N°1的酯酶相比表现出增加的聚酯降解活性。

[0046] 在本发明的上下文中,术语“活性增加”或“降解活性增加”是指与SEQ ID N°1的酯酶相比,酶降解塑料制品或材料(更特别是含聚酯塑料制品或材料)的能力增加。这种增加通常为约1倍、2倍、3倍、4倍、5倍或更多倍。尤其是,酯酶变体的聚酯降解活性比SEQ ID N°1的酯酶的聚酯降解活性高至少10%、优选至少20%、50%、100%、200%、300%或更高。

[0047] 根据本领域本身已知的方法,本领域技术人员可以评估蛋白质的活性。例如,可以通过测量特定的酯酶活性率、测量特定聚酯的解聚活性率、测量降解分散在琼脂板中的固体聚酯化合物的速率、或测量特定聚酯在反应器中的解聚活性率来评估活性。

[0048] 在本发明的上下文中,术语“比活性”或“降解比活性”表示当将含聚酯的塑料制品与降解酶,例如根据本发明的酯酶接触时,在适当的温度、pH和缓冲条件下释放低聚物和/或单体的初始速率。例如,PET水解的比活性对应于在水解曲线的线性部分中测定的水解的PET的μmol/min或产生的当量TA的mg/小时和每mg酶。

[0049] 根据本领域本身已知的方法,本领域技术人员可以评估蛋白质吸附在基质上的能力。例如,可以由包含本发明的酯酶的溶液测量蛋白质含量或残余酯酶活性、残余聚酯的解聚活性、分散在琼脂板中的固体聚酯化合物的残余降解,或反应器中残余聚酯的解聚活性,其中酯酶预先在其中不会发生酶促反应的合适的条件下与底物一起孵育。

[0050] 在一个具体实施方案中,与SEQ ID N°1的酯酶相比,本发明的变体具有改进的热稳定性和增加的聚酯降解活性。

[0051] 在本发明的上下文中,术语“增加的热稳定性”是指与SEQ ID N°1的酯酶相比,酶在高温下,特别是在50℃-90℃的温度下,抵抗其化学和/或物理结构变化的能力增加。这种增加通常为约1倍、2倍、3倍、4倍、5倍或更多倍。特别地,与SEQ ID N°1的酯酶相比,本发明的酯酶可以表现出增加的熔化温度(Tm)。在本发明的上下文中,熔化温度是指所考虑的一半蛋白质/酶群体被展开或错误折叠的温度。通常,与SEQ ID N°1的酯酶的Tm相比,本发明的酯酶显示出Tm增加约1℃、2℃、3℃、4℃、5℃、10℃或更高。

[0052] 特别地,与SEQ ID N°1的酯酶相比,本发明的酯酶在50℃-90℃的温度下可具有增加的半衰期。此外,在这样的温度下,与SEQ ID N°1的酯酶相比,本发明的酯酶可表现出更高的降解活性。

[0053] 根据本领域本身已知的方法,本领域技术人员可以评估蛋白质的热稳定性。例如,可以通过使用圆二色性分析蛋白质折叠来评估热稳定性。或者或另外,可通过在不同温度下孵育后测量酶的残余酯酶活性和/或残余聚酯解聚活性来评估热稳定性。还可以评估在不同温度下进行多轮聚酯解聚测定的能力。快速且有价值的测试可以包括通过晕圈直径测量评估酶在不同温度下孵育后降解分散在琼脂板中的固体聚酯化合物的能力。优选地,进行差示扫描荧光测定(DSF)以评估蛋白质/酶的热稳定性。更具体地,DSF可用于量化蛋白质的热变性温度的变化,从而测定其熔化温度(Tm)。在本发明的上下文中,除非特别指出,否则使用在实验部分中描述的DSF测量Tm。在本发明的上下文中,用在相同条件下(例如pH、聚酯的性质和量等)测量的Tm进行Tm的比较。

[0054] 本发明的酯酶可包括如下公开的一种或几种修饰。

[0055] 根据本发明,所述酯酶是SEQ ID N°1酯酶的变体,其与SEQ ID N°1所示的全长氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%的同一性,且在选自以下的位置上具有至少一个取代:G53、P58、A62、A64、S65、L67、A68、N85、T86、R89、D91、P93、R96、A121、G128、

M131、G133、G134、L152、T153、P154、H156、T157、V170、T176、A178、P179、H183、S206、F208、A209、P210、N211或S223,其中所述位置参考SEQ ID N°1所示的氨基酸序列编号。

[0056] 根据本发明,靶向的氨基酸可以被19个其他氨基酸中的任何一个取代。

[0057] 优选地,酯酶变体在选自以下的位置包含至少一个取代:G53、A62、A64、S65、A68、N85、T86、R89、A121、T157、V170、T176、S206、F208、N211、S223。

[0058] 更优选地,酯酶变体在选自以下的位置包含至少一个取代:G53、S65、A121、T157、V170、T176、F208或N211。

[0059] 在一个具体实施方案中,酯酶变体在选自以下的位置包含至少一个取代:G53L、S65T、A121R/W、T157E/Q/N/G、V170I、T176H/N/Q、F208W/I/L/G/S/N/A/R/T和N211Q。优选地,酯酶变体在选自F208W/I/L的位置包含至少一个取代。在一个优选的实施方案中,酯酶变体包含至少取代F208W。在另一个优选的实施方案中,酯酶变体包含至少取代F208I。

[0060] 在一个具体实施方案中,除了至少一个上述取代之外,酯酶变体还在选自G59、Y60、T61、D63、S66、F90、Y92、H129、G132、W155和V177的位置上包含至少一个额外的取代。优选地,一个或多个额外的取代选自Y60M/F、T61M/V、D63N/Q、S66H、F90W和Y92G/N/P/Q/T。

[0061] 或者或另外,至少一个额外的取代选自A121S、T157S或S223A。

[0062] 在另一个具体的实施方案中,与SEQ ID N°1相比,酯酶变体在选自以下的位置上包含至少一个取代,尤其单个取代:Y60、G53、T61、A62、D63、S65、S66、F90、Y92、A121、H129、T157、T176、V170、V177、F208、N211,且其中所述取代不同于Y60A/F、T61A/G、A62G/S、D63T/R、S66A、F90A/R/Y、Y92A、H129W和V177A。优选地,酯酶包含选自Y60M、T61M/V、D63N/Q、S66H、F90W和Y92G/N/P/Q/T的一个或多个取代。在另一个具体的实施方案中,酯酶包含选自Y60M、T61M/V、D63N/Q、S66H、F90W和Y92G/N/P/Q/T的单个取代。

[0063] 根据一个具体实施方案,变体包含选自D63N/Q的至少一个取代。

[0064] 根据一个具体实施方案,变体包含选自Y92G/N/P/Q/T的至少一个取代,优选Y92P。

[0065] 在另一个具体的实施方案中,酯酶变体在选自D63、A64、A68、N85、R89、W155、T176、S206、F208或N211的位置包含至少一个取代。

[0066] 在另一个具体的实施方案中,酯酶变体在选自以下的位置包含至少两个取代:G53、P58、G59、Y60、T61、A62、D63、A64、S65、S66、L67、A68、N85、T86、R89、F90、D91、Y92、P93、R96、A121、G128、H129、M131、G132、G133、G134、L152、T153、P154、W155、H156、T157、V170、T176、V177、A178、H183、S206、F208、A209、P210、S223和N211。

[0067] 在另一个具体的实施方案中,酯酶变体在选自以下的位置包含至少两个取代:G53、Y60、T61、D63、S65、S66、F90、Y92、A121、T157、V170、T176、V177、F208、S223和N211。

[0068] 优选地,酯酶变体在选自以下的位置包含至少两个取代:S65、Y92、A121、T157、V170、T176、F208和S223。

[0069] 根据一个具体实施方案,变体包含至少由F208W+V170I组成的取代的组合。

[0070] 根据一个具体实施方案,变体包含至少由Y92P+F208L组成的取代的组合。

[0071] 根据一个具体实施方案,变体包含至少由Y92P+F208W组成的取代的组合。

[0072] 根据一个具体实施方案,变体包含至少由T176H+F208W组成的取代的组合。

[0073] 根据一个具体实施方案,变体包含至少由V170I+A121S组成的取代的组合。

[0074] 根据一个具体实施方案,变体包含至少由V170I+A121S+S223A组成的取代的组合。

[0075] 根据一个具体实施方案,变体包含至少由F208W+T157Q组成的取代的组合。

[0076] 根据一个具体实施方案,变体包含至少由F208W+T157N组成的取代的组合。

[0077] 根据一个具体实施方案,变体包含至少由F208W+T157S组成的取代的组合。

[0078] 根据一个具体实施方案,变体包含至少由F208W+S65T组成的取代的组合。

[0079] 根据一个具体实施方案,变体包含至少由F208W+T157E组成的取代的组合。

[0080] 在一个具体实施方案中,本发明的酯酶变体包含如上所列的一个或几个修饰和/或突变。

[0081] 具有改进的活性和热稳定性的新酯酶

[0082] 本发明的另一个目的是提供与SEQ ID N°1的酯酶相比表现出增加的聚酯降解活性和增加的热稳定性的新酯酶。

[0083] 本发明的另一个目的是提供一种酯酶,其(i)与SEQ ID N°1所示的全长氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%的同一性,(ii)与SEQ ID N°1相比包含至少一个氨基酸修饰,和(iii)与SEQ ID N°1的酯酶相比表现出增加的热稳定性和增加的活性。

[0084] 有利地,变体包含选自T61M、Y92G/P、F208W、Y92P+F208W、和F208W+V170I的至少一个取代,并且与SEQ ID N°1的酯酶相比表现出增加的热稳定性和增加的活性。

[0085] 有利地,参考SEQ ID N°1,酯酶变体包含至少一个如上公开的突变和选自D203C+S248C位置的至少一个额外的取代。有利地,变体包含至少一个选自F208W+D203C+S248C或F208I+D203C+S248C的取代,并且与SEQ ID N°1的酯酶相比表现出增加的热稳定性和增加的活性。

[0086] 变体的聚酯降解活性

[0087] 本发明的一个目的是提供具有酯酶活性的新型酶。在一个具体实施方案中,本发明的酶进一步表现出角质酶活性。

[0088] 在一个具体实施方案中,本发明的酯酶具有聚酯降解活性,优选聚对苯二甲酸乙二醇酯降解活性。

[0089] 在另一个具体实施方案中,本发明的酯酶还具有PBAT降解活性。

[0090] 有利地,本发明的酯酶变体至少在20℃-90℃的温度范围内,优选40℃-80℃,更优选50℃-70℃,甚至更优选60℃-70℃,甚至更优选65℃表现出聚酯降解活性。在一个具体实施方案中,本发明的酯酶变体在70℃下表现出聚酯降解活性。在一个具体实施方案中,聚酯降解活性仍可在60℃-90℃的温度下测量。

[0091] 在一个具体实施方案中,与SEQ ID N°1的酯酶相比,本发明的酯酶变体在给定温度,更特别地,在40℃-80℃,更优选在50℃-70℃,甚至更优选在60℃-70℃,甚至更优选在65℃的温度下具有增加的聚酯降解活性。在一个具体实施方案中,酯酶变体在65℃下的聚酯降解活性比SEQ ID N°1的酯酶的聚酯降解活性高至少5%、优选至少10%、20%、50%、100%、200%、300%或更高。在一个具体实施方案中,酯酶变体在65℃下的聚酯降解活性比SEQ ID N°1的酯酶的聚酯降解活性高至少10%、优选至少20%、50%、100%、200%、300%或更高。

[0092] 在一个具体实施方案中,本发明的酯酶变体至少在5-11的pH范围内,优选在6-9的pH范围内,更优选在pH至6.5-9的范围内,甚至更优选在6.5-8的pH范围内显示出可测量的酯酶活性。

[0093] 核酸、表达盒、载体、宿主细胞

[0094] 本发明的另一个目的是提供编码如上定义的酯酶的核酸。

[0095] 如本文所用,术语“核酸”、“核酸序列”、“多核苷酸”、“寡核苷酸”和“核苷酸序列”可互换使用,并且是指脱氧核糖核苷酸和/或核糖核苷酸的序列。核酸可以是DNA(cDNA或gDNA)、RNA或两者的混合物。它可以是单链形式或双链形式或两者的混合物。它可以是重组、人造和/或合成来源,并且它可以包含修饰的核苷酸,包括例如修饰的键、修饰的嘌呤或嘧啶碱基、或修饰的糖。本发明的核酸可以是分离或纯化形式,并且可以通过本领域本身已知的技术制备、分离和/或操作,例如cDNA文库的克隆和表达、扩增、酶促合成或重组技术。核酸也可以通过如Belousov(1997)Nucleic Acids Res.25:3440-3444所述的众所周知的化学合成技术在体外合成。

[0096] 本发明还包括在严格条件下与编码如上定义的酯酶的核酸杂交的核酸。优选地,这种严格条件包括在2×SSC/0.1%SDS中在约42℃下孵育杂交过滤器约2.5小时,然后在1×SSC/0.1%SDS中在65℃下洗涤过滤器4次,每次15分钟。所使用的方案在Sambrook等的参考文献中描述。(Molecular Cloning:a Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Press、Cold Spring Harbor N.Y.(1988))and Ausubel(Current Protocols in Molecular Biology(1989))。

[0097] 本发明还包括编码本发明酯酶的核酸,其中所述核酸的序列或至少一部分所述序列已经使用优化的密码子使用进行了工程改造。

[0098] 或者,可以从根据本发明的酯酶的序列推导出根据本发明的核酸,并且可以根据核酸应转录的宿主细胞来调整密码子使用。这些步骤可以根据本领域技术人员熟知的方法进行,其中一些描述于Sambrook等(Sambrook等,2001)的参考手册中。

[0099] 本发明的核酸可以进一步包含额外的核苷酸序列,例如调控区,即可以用于在选定的宿主细胞或系统中引起或调控多肽表达的启动子、增强子、沉默子、终止子、信号肽等。

[0100] 本发明进一步涉及表达盒,其包含与一个或多个控制序列可操作地连接的根据本发明的核酸,所述控制序列指导所述核酸在合适的宿主细胞中的表达。通常,表达盒包含与一个或多个控制序列例如转录启动子和/或转录终止子可操作地连接的根据本发明的核酸或由其组成。控制序列可包括被用于表达编码本发明酯酶的核酸的宿主细胞或体外表达系统识别的启动子。启动子含有介导酶表达的转录控制序列。启动子可以是在宿主细胞中显示转录活性的任何多核苷酸,包括突变、截短和杂合启动子,并且可以从编码与宿主细胞同源或异源的细胞外或细胞内多肽的基因获得。控制序列也可以是转录终止子,其被宿主细胞识别以终止转录。终止子与编码酯酶的核酸的3’末端可操作地连接。在宿主细胞中有功能的任何终止子可用于本发明。通常,表达盒包含与转录启动子和转录终止子可操作地连接的根据本发明的核酸或由其组成。

[0101] 本发明还涉及包含如上定义的核酸或表达盒的载体。

[0102] 术语“载体”是指用作将重组遗传物质转移到宿主细胞中的介质的DNA分子。载体的主要类型是质粒、噬菌体、病毒、粘粒和人工染色体。载体本身通常是由插入物(异源核酸序列、转基因)和作为载体“骨架”的较大序列组成的DNA序列。将遗传信息转移到宿主的载体的目的通常是在靶细胞中分离、繁殖或表达插入物。称为表达载体(表达构建体)的载体特别适合于在靶细胞中表达异源序列,并且通常具有驱动编码多肽的异源序列表达的启动

子序列。通常,存在于表达载体中的调控元件包括转录启动子、核糖体结合位点、终止子和任选存在的操纵子。优选地,表达载体还包含用于宿主细胞中自主复制的复制起点、选择标记、有限数量的有用的限制酶位点和高拷贝数的可能性。表达载体的实例是克隆载体、修饰的克隆载体、特定设计的质粒和病毒。在不同宿主中提供合适的多肽表达水平的表达载体是本领域熟知的。载体的选择通常取决于载体与待引入载体的宿主细胞的相容性。

[0103] 本发明的另一个目的是提供包含如上所述的核酸、表达盒或载体的宿主细胞。因此,本发明涉及根据本发明的核酸、表达盒或载体用于转化、转染或转导宿主细胞的用途。载体的选择通常取决于载体与其必须引入的宿主细胞的相容性。

[0104] 根据本发明,宿主细胞可以以瞬时或稳定的方式转化、转染或转导。将本发明的表达盒或载体引入宿主细胞中,使得盒或载体维持为染色体整合子或自我复制的染色体外载体。术语“宿主细胞”还包括由于在复制过程中发生突变而与亲本宿主细胞不同的亲本宿主细胞的任何后代。宿主细胞可以是用于产生本发明变体的任何细胞,例如原核细胞或真核细胞。原核宿主细胞可以是任何革兰氏阳性或革兰氏阴性细菌。宿主细胞也可以是真核细胞,例如酵母、真菌、哺乳动物、昆虫或植物细胞。在一个具体实施方案中,宿主细胞选自大肠杆菌(Escherichia coli)、芽孢杆菌属(Bacillus)、链霉菌属(Streptomyces)、木霉属(Trichoderma)、曲霉属(Aspergillus)、酿酒酵母属(Saccharomyces)、毕赤酵母属(Pichia)或耶氏酵母属(Yarrowia)。

[0105] 可以通过本领域技术人员已知的任何方法将根据本发明的核酸、表达盒或表达载体引入宿主细胞,例如电穿孔、缀合、转导、感受态细胞转化、原生质体转化、原生质体融合、生物射弹“基因枪”转化、PEG介导的转化、脂质辅助转化或转染、化学介导的转染、醋酸锂介导的转化、脂质体介导的转化。

[0106] 任选地,可以将多于一个拷贝的本发明的核酸、盒或载体插入宿主细胞中以增加变体的产生。

[0107] 在一个具体实施方案中,宿主细胞是重组微生物。本发明确实允许工程改造具有改进的降解含聚酯材料的能力的微生物。例如,本发明的序列可用于补充已知能够降解聚酯的真菌或细菌的野生型菌株,以改进和/或增加菌株能力。

[0108] 生产酯酶变体

[0109] 本发明的另一个目的是提供生产本发明的酯酶变体的方法,包括表达编码酯酶的核酸并任选地回收酯酶。

[0110] 特别地,本发明涉及产生本发明酯酶的体外方法,包括(a)使本发明的核酸、盒或载体与体外表达系统接触;(b)回收产生的酯酶。体外表达系统是本领域技术人员公知的并且是可商购的。

[0111] 优选地,生产方法包括

[0112] (a)在适于表达核酸的条件下培养包含编码本发明酯酶的核酸的宿主细胞;并且可选地

[0113] (b)从细胞培养物回收所述酯酶。

[0114] 有利地,宿主细胞是重组芽孢杆菌属、重组大肠杆菌、重组曲霉属、重组木霉属、重组链霉菌属、重组酿酒酵母属、重组毕赤酵母属或重组解脂耶氏酵母(Yarrowia lipolytica)。

[0115] 使用本领域已知的方法在适于产生多肽的营养培养基中培养宿主细胞。例如,可以通过摇瓶培养,或在合适的培养基和允许表达和/或分离酶的条件下在实验室或工业发酵罐中进行小规模或大规模发酵(包括连续、分批、补料分批或固态发酵)培养细胞。在合适的来自商业供应商或根据公开的组合物(例如,在美国典型培养物保藏中心的目录中)制备的营养培养基中进行培养。

[0116] 如果酯酶被分泌到营养培养基中,则可以直接从培养物上清液回收酯酶。相反,可以从细胞裂解物或在透化后回收酯酶。可以使用本领域已知的任何方法回收酯酶。例如,可以通过常规方法,包括但不限于收集、离心、过滤、提取、喷雾干燥、蒸发或沉淀,从营养培养基回收酯酶。任选地,酯酶可以通过本领域已知的各种方法部分或完全纯化,包括但不限于色谱法(例如,离子交换、亲和性、疏水、色谱聚焦和尺寸排除)、电泳程序(例如,制备型等电聚焦)、差异溶解度(例如,硫酸铵沉淀)、SDS-PAGE或提取,以获得基本上纯的多肽。

[0117] 酯酶可以以纯化形式单独使用或与其它酶组合使用,以催化含聚酯材料(例如含聚酯的塑料制品)的降解和/或再循环中涉及的酶促反应。酯酶可以是可溶形式,也可以是固相。特别地,它可以与细胞膜或脂质囊泡结合,或与合成支持物例如玻璃、塑料、聚合物、过滤器、膜,以例如珠、柱、板等形式结合。

[0118] 组合物

[0119] 本发明的另一个目的是提供包含本发明的酯酶或宿主细胞的组合物。在本发明的上下文中,术语“组合物”包括任何种类的包含本发明酯酶的组合物。在一个具体实施方案中,酯酶是分离的或至少部分纯化的形式。

[0120] 组合物可以是液体或干燥的,例如为粉末形式。在一些实施方案中,组合物是冻干物。例如,组合物可包含酯酶和/或编码本发明酯酶的重组细胞或其提取物,以及任选的赋形剂和/或试剂等。合适的赋形剂包括生物化学中常用的缓冲剂;用于调节pH的试剂;防腐剂,例如苯甲酸钠、山梨酸钠或抗坏血酸钠;保守剂、保护剂或稳定剂,如淀粉、糊精、阿拉伯树胶、盐、糖例如山梨醇、海藻糖或乳糖、甘油、聚乙二醇、聚乙二醇、聚丙二醇、丙二醇;螯合剂如EDTA;还原剂;氨基酸;载体如溶剂或水溶液等。本发明的组合物可以通过将酯酶与一种或多种赋形剂混合而获得。

[0121] 本发明的组合物可以包含按重量计0.1%-99.9%,优选0.1%-50%,更优选0.1%-30%,甚至更优选0.1%-5%的本发明的酯酶和按重量计0.1%-99.9%,优选50%-99.9%,更优选70%-99.9%,甚至更优选95%-99.9%的赋形剂。优选的组合物包含按重量计0.1-5%的本发明酯酶。

[0122] 在一个具体实施方案中,组合物可以进一步包含表现出酶活性的其他多肽。例如取决于待降解的含聚酯材料的性质和/或组合物中含有的其它酶/多肽,本领域技术人员可以容易地调整本发明的酯酶含量。

[0123] 在一个具体实施方案中,本发明的酯酶与一种或多种赋形剂一起溶解在水性介质中,所述赋形剂尤其是能够稳定或保护多肽免于降解的赋形剂。例如,本发明的酯酶可以最终与其他组分,例如甘油、山梨醇、糊精、淀粉、二醇如丙二醇、盐等一起溶于水中。然后可以干燥所得混合物以获得粉末。干燥这种混合物的方法是本领域技术人员公知的,包括但不限于冻干、冷冻干燥、喷雾干燥、超临界干燥、向下通风蒸发、薄层蒸发、离心蒸发、输送干燥、流化床干燥、滚筒干燥或其任何组合。

[0124] 在另一个具体实施方案中,本发明的组合物包含至少一种表达本发明酯酶的重组细胞或其提取物。“细胞提取物”表示从细胞获得的任何部分,例如细胞上清液、细胞碎片、细胞壁、DNA提取物、酶或酶制剂或通过化学、物理和/或酶处理从细胞衍生的任何制剂,其基本上不含活细胞。优选的提取物是酶活性提取物。本发明的组合物可包含一种或多种本发明的重组细胞或其提取物,和任选的一种或几种另外的细胞。

[0125] 在一个具体实施方案中,该组合物包含表达和分泌本发明酯酶的重组微生物的冻干培养基或由其组成。在一个具体实施方案中,粉末包含本发明的酯酶和稳定量/增溶量的甘油、山梨醇或糊精如麦芽糖糊精和/或环糊精、淀粉、二醇如丙二醇和/或盐。

[0126] 本发明酯酶的用途

[0127] 本发明的另一个目的是提供使用本发明的酯酶在需氧或厌氧条件下降解和/或回收含聚酯材料(例如由聚酯制成或含有聚酯的塑料制品)的方法。本发明的变体酯酶特别适用于降解包含PET的塑料制品。

[0128] 因此,本发明的一个目的是本发明的酯酶、或相应的重组细胞或其提取物、或组合物在用于酶促降解含聚酯材料如含PET材料中的用途。

[0129] 本发明的另一个目的是提供一种用于降解包含至少一种聚酯的塑料制品的方法,其中塑料制品与本发明的酯酶或宿主细胞或组合物接触,从而降解塑料制品。有利地,含聚酯材料的聚酯被解聚成单体和/或低聚物。

[0130] 在降解方法的一个实施方案中,降解至少一种聚酯以产生可再聚合的单体和/或低聚物,其有利地被回收以便重复使用。

[0131] 在一个实施方案中,含聚酯材料的聚酯完全降解。

[0132] 在一个具体实施方案中,塑料制品包含至少一种选自以下的聚酯:聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)、聚对苯二甲酸丙二醇酯(PTT)、聚对苯二甲酸丁二醇酯(PBT)、聚对苯二甲酸异山梨酯(PEIT)、聚乳酸(PLA)、聚羟基链烷酸酯(PHA)、聚丁二酸丁二醇酯(PBS)、聚丁二酸己二酸丁二酯(PBSA)、聚己二酸对苯二甲酸丁二酯(PBAT)、聚呋喃乙酸酯(PEF)、聚己内酯(PCL)、聚(己二酸乙二醇酯)(PEA)、聚萘二甲酸乙二醇酯(PEN)和这些材料的掺合物/混合物,优选聚对苯二甲酸乙二醇酯。在一个优选的实施方案中,含聚酯材料包含PET,且回收至少单体如单乙二醇或对苯二甲酸,和/或低聚物如对苯二甲酸甲基-2-羟乙酯(MHET)、对苯二甲酸双(2-羟乙基)酯(BHET)、苯甲酸2-羟基乙酯(HEB)和对苯二甲酸二甲酯(DMT)例如用于再循环或甲烷化。

[0133] 本发明还涉及由含聚酯材料制备单体和/或低聚物的方法,包括将含聚酯材料暴露于本发明的酯酶,或相应的重组细胞或其提取物,或组合物,和任选地回收单体和/或低聚物。本发明的方法特别适用于制备选自单乙二醇和对苯二甲酸的单体,和/或选自对苯二甲酸甲基-2-羟乙酯(MHET)、对苯二甲酸双(2-羟乙基)酯(BHET)、苯甲酸2-羟基乙酯(HEB)和对苯二甲酸二甲酯(DMT)的低聚物。

[0134] 降解含聚酯材料所需的时间可根据含聚酯材料本身(即塑料制品的性质和来源、其组成、形状等)、所用酯酶的类型和含量以及各种工艺参数(即温度、pH、其他试剂等)而变化。本领域技术人员可以容易地使工艺参数适应含聚酯材料。

[0135] 有利地,降解方法在20℃-90℃,优选在40℃-80℃,更优选在50℃-70℃,更优选在60℃-70℃,甚至更优选在65℃的温度下实施。在另一个具体实施方案中,降解方法在70℃

下实施。更一般地,温度保持低于灭活温度,其对应于酯酶失活和/或重组微生物不再合成酯酶的温度。特别是,温度保持低于含聚酯材料中聚酯的玻璃化转变温度(Tg)。更具体地,该方法以连续方式并在酯酶可以使用数次和/或再循环的温度下实施。

[0136] 有利地,降解方法在pH为5-11,优选pH为6-9,更优选pH为6.5-9,甚至更优选pH为6.5-8下实施。

[0137] 在一个具体实施方案中,可以在与酯酶接触之前将含有聚酯材料进行预处理,以在物理上改变其结构,从而增加聚酯和本发明变体之间的接触表面。

[0138] 任选地,可以依次或连续回收由解聚产生的单体和/或低聚物。取决于起始的含聚酯材料,可以回收单一类型的单体和/或低聚物或几种不同类型的单体和/或低聚物。

[0139] 可以使用所有合适的纯化方法进一步纯化回收的单体和/或低聚物,并以可再聚合的形式进行调节。纯化方法的实例包括汽提法、通过水性溶液分离、蒸汽选择性冷凝、生物过程后的介质过滤和浓缩、分离、蒸馏、真空蒸发、萃取、电渗析、吸附、离子交换、沉淀、结晶、浓缩和酸添加脱水和沉淀、纳滤、酸催化剂处理、半连续模式蒸馏或连续模式蒸馏、溶剂萃取、蒸发浓缩、蒸发结晶、液/液萃取、加氢、共沸蒸馏法、吸附、柱层析、简单真空蒸馏和微滤,组合或不组合。

[0140] 然后可再聚合单体和/或低聚物可再用于例如合成聚酯。有利地,将相同性质的聚酯再聚合。然而,可以将回收的单体和/或低聚物与其他单体和/或低聚物混合,以便例如合成新的共聚物。或者,回收的单体可用作化学中间体,以产生新的目标化合物。

[0141] 本发明还涉及含聚酯材料的表面水解或表面官能化的方法,包括将含聚酯材料暴露于本发明的酯酶、或相应的重组细胞或其提取物、或组合物。本发明的方法特别适用于增加聚酯材料的亲水性或吸水性。这种增加的亲水性可能在纺织品生产、电子和生物医学应用方面特别令人感兴趣。

[0142] 本发明的另一个目的是提供一种含聚酯材料,其中包括本发明的酯酶和/或表达和分泌所述酯酶的重组微生物。在一个具体实施方案中,这种含聚酯材料可以是塑料化合物。因此,本发明的一个目的是提供包含本发明酯酶和/或重组细胞和/或组合物或其提取物;和至少一种聚酯的塑料化合物。在优选的实施方案中,聚酯是PET。

具体实施方式

[0143] 实施例1-酯酶的构建、表达和纯化

[0144] -构建

[0145] 使用质粒构建pET26b-LCC-His产生酯酶变体。该质粒在于克隆在NdeI和XhoI限制性位点之间的编码SEQ ID N°1的酯酶的基因,该基因被优化用于大肠杆菌表达。根据供应商的建议使用了两个定点诱变试剂盒,以产生酯酶变体:来自Agilent的QuikChange II定点诱变试剂盒和QuikChange Lightning多定点诱变试剂盒(Santa Clara、California、USA)。

[0146] -酯酶的表达和纯化

[0147] 在50mL LB-Miller培养基或ZYM自诱导培养基(Studier等、2005-Prot.Exp.Pur.41、207-234)中连续使用菌株Stellar™(Clontech、California、USA)和大肠杆菌One Shot® BL21 DE3(Life technologies、Carlsbad、California、USA)进行克隆和重

组表达。在16℃下使用0.5mM异丙基β-D-1-硫代半乳糖吡喃糖苷(IPTG,Euromedex,Souffelweyersheim,France)进行LB-Miller培养基中的诱导。通过在Avanti J-26XP离心机(Beckman Coulter,Brea,USA)中离心(8000rpm,10℃下20分钟)终止培养。将细胞悬浮于20mL Talon缓冲液(Tris-HCl 20mM,NaCl 300mM,pH 8)中。然后通过FB 705超声波仪(Fisherbrand,Illkirch,France)在2分钟内对细胞悬浮液进行超声处理,其中振幅为30%(2秒ON和1秒OFF循环)。然后进行离心步骤:在Eppendorf离心机中在11000rpm,10℃下30分钟。收集可溶性级分并进行亲和层析。该纯化步骤用Talon® Metal Affinity Resin(Clontech、CA、USA)完成。用补充有咪唑的Talon缓冲液梯度进行蛋白质洗脱。将纯化的蛋白质用Talon缓冲液透析,然后根据制造商的指示(Lifescience Bio-Rad,France)使用Bio-Rad蛋白质测定法定量,并在+4℃下储存。

[0148] 实施例2-评估酯酶的活性

[0149] 测定酯酶的比活性,并与SEQ ID N°1的酯酶的比活性比较。

[0150] 已经使用了多种方法来评估比活性:

[0151] (1)基于pNP-丁酸酯水解的比活性;

[0152] (2)基于PET水解的比活性;

[0153] (3)基于固态下聚酯降解的比活性;

[0154] (4)基于反应器中PET水解的比活性。

[0155] 2.1 pNP-丁酸酯水解

[0156] 将20μL蛋白质溶液与175μL 0.1M磷酸钾缓冲液(pH8.0)和5μL pNP-丁酸酯(在2-甲基-2-丁醇中40mM)混合。酶促反应在30℃下搅拌进行15分钟,并通过微孔板分光光度计(Versamax,Molecular Devices,Sunnyvale,CA,USA)获得405nm处的吸光度。在水解曲线的线性部分测定比活性(初始速度表示为释放的pNP的μmol/min/mg酶),并用于比较野生型酯酶的活性和变体的活性。

[0157] 2.2 PET水解

[0158] 称取100mg无定形PET并将其引入100mL玻璃瓶中。在Talon缓冲液(Tris-HCl 20mM,NaCl 0.3M,pH8)中分别制备0.02或0.03mg/mL的1mL酯酶制剂(作为参照对照)或变体制剂,并引入玻璃瓶中。最终,添加49mL 0.1M磷酸钾缓冲液(pH8)。

[0159] 通过在Max Q 4450孵育箱(Thermo Fisher Scientific,Inc.Waltham,MA,USA)中以65℃和150rpm孵育每个玻璃瓶开始解聚。

[0160] 通过在最初24小时期间的不同时间进行的取样,并通过超高效液相色谱(UHPLC)分析测定解聚反应的初始速率,以每小时产生的当量TA的mg表示。如有必要,将样品稀释于pH8的0.1M磷酸钾缓冲液中。然后,将150μL甲醇和6.5μL HCl 6N添加到150μL样品或稀释液中。在0.45μm注射器过滤器上混合并过滤后,将样品加载到UHPLC上以监测对苯二甲酸(TA)、MHET和BHET的释放。使用的色谱系统是Ultimate 3000UHPLC系统(Thermo Fisher Scientific,Inc.Waltham,MA,USA),包括泵模块、自动进样器、25℃恒温的柱温箱和240nm的UV检测器。使用的柱是Discovery®HSC18HPLC柱(150×4.6mm,5μm,配备有预柱,Supelco,Bellefonte,USA)。使用1mM H2SO4中的MeOH梯度(30%-90%)以1mL/min分离TA、MHET和BHET。注射量为20μL样品。根据商业TA和BHET和内部合成的MHET制备的标准曲线以

与样品相同的条件测量TA、MHET和BHET。在水解曲线的线性部分中测定PET水解的比活性(mg当量TA/小时/mg酶)。当量TA对应于测量的TA和测量的MHET和BHET中包含的TA的总和。

[0161] 2.3固态下聚酯的降解

[0162] 将20μL酶制剂置于包含PET的琼脂平板产生的孔中。通过溶解500mg溶于HFIP中的PET来制备琼脂平板,并将该培养基倒入250mL水溶液中。在52℃下蒸发HFIP后,将溶液与包含3%琼脂的0.2M磷酸钾缓冲液(pH8)以v/v混合。使用约30mL的混合物制备每种多用途盘(omnitray)并在4℃下储存。

[0163] 2-4小时后,在60℃或65℃下测量并比较通过野生型酯酶和变体降解聚酯而形成的晕圈的直径。

[0164] 2.4反应器中PET水解

[0165] 用5g无定形PET和100mL含有2.5-5mg酯酶的10mM磷酸钾缓冲液(pH8)启动Minibio 500生物反应器(Applikon Biotechnology B.V.,Delft,The Netherlands)。使用船用叶轮将搅拌设定为250rpm。通过浸入外部水浴将生物反应器恒温为65℃。通过添加3M KOH将pH调节至8。通过BioXpert软件V2.95监测不同参数(pH、温度、搅拌、添加碱)。定期取样500μL反应介质。

[0166] 如实施例2.2中所述,通过HPLC测定TA、MHET和BHET的含量。使用65℃恒温的Aminex HPX-87K柱(Bio-Rad Laboratories,Inc,Hercules,California,United States)测定EG的含量。洗脱液为K_2HPO_4 5mM,以0.6mL.min^{-1}。注射量为20μL。使用折射计监测乙二醇。

[0167] 基于给定时间的摩尔浓度(TA+MHET+BHET)与初始样品中包含的TA总量的比例,或基于给定时间的摩尔浓度(EG+MHET+2x BHET)与初始样品中包含的EG总量的比例来计算水解百分比。比活性对应于降解比速率,并且计算为每小时和每mg酶总释放的当量TA的mg或每小时和每mg酶总当量EG的mg。

[0168] 本发明的酯酶变体的比较的降解比活性如表1所示。SEQ ID N°1的酯酶的降解比活性用作参照并被认为是100%降解活性。如实施例2.2所公开的测量降解活性(mg当量TA/小时/mg酶)。

[0169] 表1:本发明酯酶变体的比活性

[0170]

本发明变体	比活性
D63N	147%
D63Q	139%
F90W	112%
F208I	156%
F208L	133%
F208W	143%
N211Q	112%
S65T	118%
S66H	113%
T157E	114%
T157G	116%
T157N	132%
T157Q	124%
T176H	128%
T176N	110%
T176Q	144%
T61M	121%
T61V	130%
Y92G	120%
Y92N	112%
Y92P	177%

[0171]

Y92Q	155%
Y92T	126%
Y60M	128%
G53L	153%
A121R	132%
A121W	147%
V170I	141%
F208G	111%
F208S	112%
F208N	114%
F208A	143%
F208R	121%
F208T	130%
F208W + V170I	128%
Y92P + F208L	118%
Y92P + F208W	116%
T176H + F208W	111%
V170I + A121S	111%
V170I + A121S + S223A	114%
F208W + T157Q	134%
F208W + T157N	137%
F208W + T157S	129%
F208W + S65T	189%
F208W + T157E	145%
F208W + D203C + S248C	123%
F208I + D203C + S248C	133%

[0172] 实施例3-评估本发明的酯酶变体的活性和热稳定性

[0173] 评估本发明酯酶变体的热稳定性并与SEQ ID N°1的酯酶的热稳定性比较。

[0174] 差示扫描荧光法(DSF)用于估计热稳定性。

[0175] DSF用于通过测定其熔化温度(Tm,即一半蛋白质群体展开的温度)来评估野生型蛋白质和变体的热稳定性。制备浓度为14μM(0.4mg/mL)的蛋白质样品,并储存在由20mM Tris HCl(pH 8.0)、300mM NaCl组成的缓冲液A中。首先将DMSO中的SYPRO orange染料5000x储备溶液在水中稀释至250x。将蛋白质样品加载到白色透明96孔PCR板(Bio-Rad cat#HSP9601)上,其中每个孔包含25μl的终体积。每孔中蛋白质和SYPRO Orange染料的最终浓度分别为5μM(0.14mg/ml)和10X。每孔加载的体积如下:15μL缓冲液A、9μL 0.4mg/mL蛋白质溶液和1μL 250x Sypro Orange稀释溶液。然后用光学质量密封带密封PCR板,并在室温下以2000rpm旋转1分钟。然后使用CFX96实时PCR系统进行DSF实验,所述系统设置为使用450/490激发和560/580发射滤光片。将样品以1.1℃/min的速率从25℃加热至100℃。每0.3℃进行单次荧光测量。通过对Boltzmann方程进行曲线拟合来测定熔化温度。

[0176] 然后基于它们的Tm值比较野生型蛋白质和变体。由于来自不同生产的相同蛋白质的实验之间的高重现性,0.8℃的ΔTm被认为对于比较变体是显著的。Tm值对应于至少2次测量的平均值。

[0177] 本发明的酯酶变体的比较的降解比活性和热稳定性如表2所示。SEQ ID N°1的酯酶的降解比活性用作参照并被认为是100%降解活性。根据实施例2.2测量降解比活性(mg当量TA/小时/mg酶)。热稳定性表示为Tm值(根据实施例3测量),且括号中显示与SEQ ID N°1的酯酶的Tm相比增加的Tm。

[0178] 表2:本发明酯酶的比活性和Tm

[0179]

本发明变体	降解比活性	本发明变体的 Tm

[0180]

F208W	143%	85.90°C +/- 0.17°C (+1.20°C)
Y92P	177%	85.80°C +/- 0.00°C (+1.10°C)
T61M	121%	87.40°C +/- 0.17°C (+2.70°C)
Y92G	120%	87.00°C +/- 0.00°C (+2.30°C)
Y92P + F208W	116%	86.60°C +/- 0.17°C (+1.90°C)
F208W + V170I	128%	85.80°C +/- 0.00°C (+1.10°C)
F208W + D203C + S248C	123%	94.80°C +/- 0.00°C (+10.10°C)
F208I + D203C + S248C	133%	90.90°C +/- 0.00°C (+6.20°C)

序列表

<110> 卡比奥斯公司

<120> 新酯酶及其用途

<130> B2280

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 258
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 酯酶

<400> 1

[0001]

Ser Asn Pro Tyr Gln Arg Gly Pro Asn Pro Thr Arg Ser Ala Leu Thr
1 5 10 15

Ala Asp Gly Pro Phe Ser Val Ala Thr Tyr Thr Val Ser Arg Leu Ser
20 25 30

Val Ser Gly Phe Gly Gly Gly Val Ile Tyr Tyr Pro Thr Gly Thr Ser
35 40 45

Leu Thr Phe Gly Gly Ile Ala Met Ser Pro Gly Tyr Thr Ala Asp Ala
50 55 60

Ser Ser Leu Ala Trp Leu Gly Arg Arg Leu Ala Ser His Gly Phe Val
65 70 75 80

Val Leu Val Ile Asn Thr Asn Ser Arg Phe Asp Tyr Pro Asp Ser Arg
85 90 95

Ala Ser Gln Leu Ser Ala Ala Leu Asn Tyr Leu Arg Thr Ser Ser Pro
100 105 110

Ser Ala Val Arg Ala Arg Leu Asp Ala Asn Arg Leu Ala Val Ala Gly
115 120 125

His Ser Met Gly Gly Gly Gly Thr Leu Arg Ile Ala Glu Gln Asn Pro
130 135 140

Ser Leu Lys Ala Ala Val Pro Leu Thr Pro Trp His Thr Asp Lys Thr
145 150 155 160

Phe Asn Thr Ser Val Pro Val Leu Ile Val Gly Ala Glu Ala Asp Thr
165 170 175

[0002] Val Ala Pro Val Ser Gln His Ala Ile Pro Phe Tyr Gln Asn Leu Pro
180 185 190

Ser Thr Thr Pro Lys Val Tyr Val Glu Leu Asp Asn Ala Ser His Phe
195 200 205

Ala Pro Asn Ser Asn Asn Ala Ala Ile Ser Val Tyr Thr Ile Ser Trp
210 215 220

Met Lys Leu Trp Val Asp Asn Asp Thr Arg Tyr Arg Gln Phe Leu Cys
225 230 235 240

Asn Val Asn Asp Pro Ala Leu Ser Asp Phe Arg Thr Asn Asn Arg His
245 250 255

Cys Gln