

# 酯酶 Est824 生物信息学分析及对塑化剂 DEHP 降解研究

管梓然<sup>1</sup> 曾晓晖<sup>1\*</sup> 林潇潇<sup>1</sup> 林传钟<sup>1</sup>

广州市花都区人民医院, 广东广州, 510000;

**摘要:** [目的]为更好预测酯酶 Est824 潜在功能及其对塑化剂降解性能。[方法]本文利用生物信息学分析工具对酯酶 Est824 进行系统分析, 并利用 HPLC 检测酯酶 Est824 对 DEHP 是否具有降解效果。[结果]酯酶 Est824 是一个新的酯酶, 不属于目前已报道的十八个酯酶/脂肪酶家族中的任何一个家族。此外, HPLC 结果显示, 酯酶 Est824 能够在 12 h 内对 DEHP 进行完全降解。[结论] 酯酶 Est824 是一个新型的酯酶, 并且该酯酶能够有效快速降解塑化剂 DEHP, 本研究为酯酶 Est824 将来实际应用于生态环境治理提供一定的参考价值。

**关键词:** 酯酶; 生物信息学; 塑化剂降解

**DOI:**10.69979/3041-0673.25.03.040

目前, 人们都是依据各种酯类水解酶的发现先后将新的酶按家族顺序归类, 例如 EstD 归类为第 X 家族、LipG 归类为 XI 家族、LipEH166 归类为 XII 家族和 Est30 归类为 XVIII 家族等等, 到目前为止已经扩增到 18 个酯类水解酶家族<sup>[1-2]</sup>。本文利用生物信息学分析工具对 Est824 蛋白结构信息进行分析, 根据相应的结果分析其具体的蛋白性质。

此外, 目前已有研究邻苯二甲酸酯类物质可以通过酯酶进行相应降解<sup>[3-5]</sup>。并有研究表明邻苯二甲酸酯类会随着时间推移溶入到环境中, 对人体造成不良影响, 所以减少邻苯二甲酸酯在环境中的污染显得至关重要<sup>[6]</sup>。邻苯二甲酸二酯 (dis (2-ethylhexyl) phthalate, DEHP) 是邻苯二甲酸酯类化合物中最普通和使用最广泛的塑化剂, 由于 DEHP 与塑料及其制品成分分子之间的连接并不是十分稳定, 从而 DEHP 易对人体或环境造成损害<sup>[7-8]</sup>。本文利用高效液相色谱法 (HPLC) 检测 Est824 对塑化剂 DEHP 的降解效果, 为日后将酯酶 Est824 广泛应用于环境治理等领域奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

酯酶 Est824 基因是实验室在新疆土壤微生物宏基因组文库筛选所得 (NCBI 登录号: MN062363), 实验室已将该基因与表达载体 pET-28a (+) 相连接, 成功在大肠杆菌 (*E. coli*) BL21 (DE3) 中表达, 并保存于 4℃ 备用。DEHP (分析纯级别), 购自于阿拉丁公司; 乙腈、乙酸乙酯、无水硫酸钠 (均为分析纯级别), 购自于天津大茂化学试剂厂。SPD-10A 高效液相色谱仪及 RF-10A xL 检测器, 日本岛津公司。

### 1.2 Est824 的生物信息学分析

利用 MEGA 7 软件对 Est824 蛋白进行系统分析, 采用邻接法 (NJ) 构建系统进化树。

### 1.3 粗酶液的制备

取经实验室培养的重组菌株菌液 4 mL, 于 4℃, 12 000 rpm 中离心 15 min, 弃上清, 加入 1 mL 无菌去离子水重悬菌体, 在冰浴条件下, 130 W 功率 (工作 3 s, 间歇 2 s) 超声破碎菌液 20 min, 然后于 4℃, 12000 rpm 离心 15 min, 上清即为粗酶液。

### 1.4 酯酶 Est824 降解 DEHP 实验方法

#### 1.4.1 标准品溶液的制备

精密称定 DEHP 标准品 50.18 mg 至 50 mL 的容量瓶中, 加乙腈溶液定容至刻度, 摇均匀, 然后精量 1 mL 溶液于 25 mL 容量瓶中, 用乙腈溶液定容至刻度, 摇匀, 即得 (每一毫升中含 0.0401 mg DEHP 标准品)。

#### 1.4.2 供试品溶液的制备

取 DEHP 标准品, 约 0.2 g, 置于 1000 mL 容量瓶, 加入适量乙腈使其溶解, 并稀释至刻度线。在 40℃ 下, 取 200  $\mu$ L 配制后的 DEHP 溶液, 分别与 400  $\mu$ L 粗酶液和 400  $\mu$ L Tris-HCl 溶液混合反应, 反应结束后加 100  $\mu$ L 1 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> HCl 终止反应, 加入等体积乙酸乙酯萃取 (回收上层乙酸乙酯), 加入适量无水硫酸钠除去全部水分, 5 min, 12000 rpm 离心后转移乙酸乙酯 (上层) 至新离心管, 50℃ 下蒸发至乙酸乙酯全部挥发, 加入 1 mL 乙腈溶液重溶, 用 0.22  $\mu$ m 的有机微孔滤膜滤过, 备用。

#### 1.4.3 色谱条件

色谱柱: Inertsil® ODS-3 (4.6 $\times$ 150 mm, 5  $\mu$ m; 日本岛津); 流动相: 磷酸水溶液/乙腈 (15: 85, v/v); 流速: 1.0 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>; 检测波长: 220 nm; 柱温: 25℃; 进样量: 10  $\mu$ L。

#### 1.4.4 专属性考察

取不含 DEHP 的阴性对照品与的供试品 (含 DEHP) 溶液各 10  $\mu$ L, 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤后, 分别注入色谱

仪, 验证是否干扰 DEHP 的测定。

#### 1.4.5 DEHP 线性关系考察

分别配制出浓度分别 0.0201 mg·mL<sup>-1</sup>、0.0402 mg·mL<sup>-1</sup>、0.0603 mg·mL<sup>-1</sup>、0.0804 mg·mL<sup>-1</sup>、0.1 mg·mL<sup>-1</sup>、0.1206 mg·mL<sup>-1</sup> 的 DEHP 溶液, 各进样 10 μL。利用 HPLC 检测不同浓度条件下对应的峰面积, 以峰面积作为纵坐标, 浓度作为横坐标, 绘制峰面积与浓度之间的标准曲线, 从而可以利用峰面积与浓度关系计算降解率。

#### 1.4.6 加标回收率实验

取同一已知浓度的 DEHP 供试品 (不含酶液) 各 6 份, 分别加入对等量的 DEHP 标准品, 制备供试品溶液后, 在本实验拟定的色谱条件下连续进样 6 次, 记录色谱图, 计算平均加样回收率。

#### 1.4.7 DEHP 的含量检测

分别制备不同反应时间的 DEHP 供试品溶液, 反应时间设置为 0 h、3 h、6 h 和 12 h, 各进样 6 次, 在本实验拟定的色谱条件下测出平均剩余浓度并计算降解率。根据公式 1 计算降解率:

$$\text{降解率} = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100\% \quad (\text{式 } 1)$$

其中, A<sub>0</sub> 代表加入 DEHP 起始浓度; A<sub>1</sub> 降解后的剩余浓度。

## 2 结果与分析

### 2.1 Est824 的生物信息学分析结果

在 NCBI 中下载与 Est824 蛋白相似度较高的五个氨基酸序列, 利用 Clustal X 软件进行多序列比对。结果如图 1 所示, Est824 与 *Aspergillus nidulans* 来源的酯酶序列 (登录号: Q5ATJ7.1) 相似性最高, 具有 32.73% 的相似性。此外, Est824 氨基酸序列中含有典型的保守结构域为 Gly117-Xxx-Ser119-Xxx-Gly121 和催化三联体 Ser119-Asp170-His228。运用 MEGA 7.0 软件, 将 Est824 的氨基酸序列与目前已报道的十八个典型的酯类水解酶家族的序列进行聚类分析, 并构建系统进化树。结果如图 2 所示, Est824 与已知的十八个酯酶/脂肪酶家族的序列上存在较大的差异, 它并不归属于十八个家族中的任何一个家族, 说明 Est824 是一个新的酯酶。

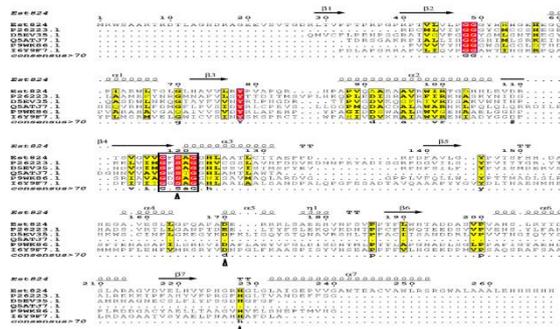


图 1 Est824 多序列比对分析

Fig.1 Multiple amino-acid sequence alignment of Est824

注: 保守基序用黑色大方框标出, 催化位点用空心三角形表示。

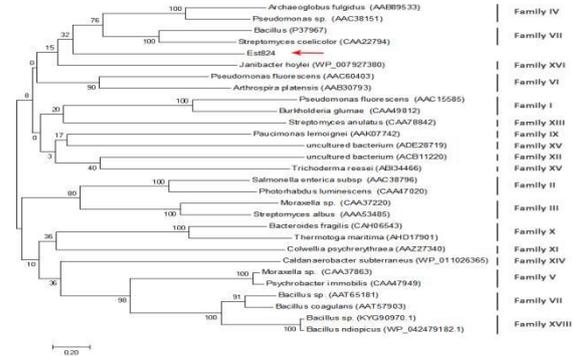


图 2 Est824 氨基酸序列进化树分析

Fig.2 Phylogenetic tree analysis of Est824

### 2.2 酯酶 Est824 降解 DEHP 实验结果

#### 2.2.1 专属性考察结果

从图 3 可知, 在色谱条件下检测, DEHP 的供试品溶液呈现单一峰形, 无其他组分干扰, 表明该方法专属性良好。

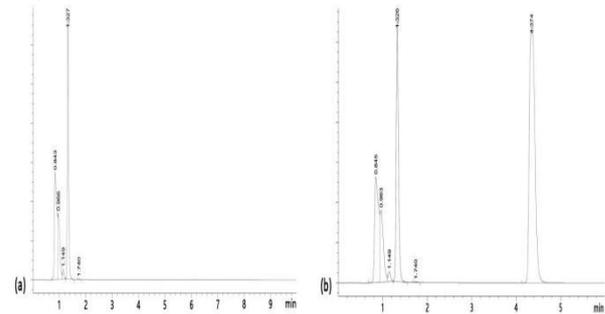


图 3 (a) 阴性对照; (b) DEHP 供试品

Fig.3 (a) Negative control; (b) DEHP test product

#### 2.2.2 线性关系考察结果

以 DEHP 标准品溶液浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 结果表明线性关系良好。线性回归方程、线性范围和相关系数 (R<sup>2</sup>) 见表 1。

表 1 DEHP 线性回归方程

Table 1 Linear regression equations of DEHP

样品名称	回归方程	浓度范围 /mg·mL <sup>-1</sup>	R <sup>2</sup>
DEHP	y = 140763x + 49.933	0.0201-0.120 6	0.9998

#### 2.2.3 加样回收试验结果

结果表明, 测得 DEHP 的平均回收率分别为 97.4%,

RSD%为1.77%,所测得结果不超过规定的平均回收率85%~120%范围,且RSD%不超过规定范围(RSD%=2%)表明该方法可行(表2)。

表2 加样回收试验结果

Table 2 Sample recovery test results

测试样品名	供试品浓度/ mg·mL <sup>-1</sup>	加标量/mg	测定结果 浓度/ mg·mL <sup>-1</sup>	回收率/%	平均值/%	RSD %
DEHP	0.0205	0.020	0.0391	96.54	97.4	1.77
	0.0208	0.020	0.0389	95.34		
	0.0211	0.020	0.0402	97.81		
	0.0210	0.020	0.0398	97.07		
	0.0204	0.020	0.0408	100.99		
	0.0213	0.020	0.0399	96.61		

### 2.2.7 DEHP 的含量检测结果

如表3所示,利用HPLC检测不同反应时间后的DEHP剩余含量,由表可以看出塑化剂DEHP随着时间的增加,其含量也随之下降,说明酯酶Est824对DEHP有降解效果。并且在反应时间为12h时,基本检测不出含有DEHP,说明酯酶Est824具有完全降解DEHP的能力。

表3 不同反应时间的DEHP含量测定

Table 3 Detection of DEHP contents with reaction time

测试样品名	反应时间/h	平均剩余浓度/ mg·mL <sup>-1</sup>	降解率/%	RSD%
DEHP	0	0.0395	0	1.71
	3	0.0220	44.30	1.03
	6	0.0089	77.47	1.21
	12	0	100	0

### 3 讨论

相较于非生物降解的方法,来源于微生物的酯酶对DEHP的降解具有高效、无二次污染等优势。但是,由于目前已报道的具有降解DEHP能力的酯酶的酶学性质存在缺陷。故本文利用实验室前期获的一个酯酶,对其进行了生物信息学分析和邻苯二甲酸酯类降解效果研究。

本研究利用生物信息学分析工具对Est824蛋白进行生物学信息预测并分析,发现该蛋白质中含有典型的酯酶保守结构域为Gly117-Xxx-Ser119-Xxx-Gly121和

催化三联体Ser119-Asp170-His228。Est824的氨基酸序列与目前已报道的十八大酯类水解酶家族的序列进行聚类分析,发现其不属于其中任一家族,说明本文所述酯酶Est824是一种新型酯酶。

随着人们对塑化剂的日益关注,近年来酯酶对塑化剂降解研究也逐渐增加,如Huang Han等人<sup>[5]</sup>报道的酯酶GoEst15,能够在144h内可对100mM DEHP完全降解;Xu You等人<sup>[6]</sup>报道的 $\alpha/\beta$ 水解酶,在60h内将初始200mg/L的DEHP降解54.3%。通过HPLC检测Est824对DEHP降解效果,发现酯酶Est824能够在12h内对DEHP进行完全降解,与上述酶相比较,Est824在降解时间和程度上都具有明显优势。

### 4 结论

本研究通过生物信息学分析工具发现Est824是一种新型酯酶,并利用HPLC检测酯酶Est824对塑化剂DEHP的降解效果,发现该酯酶能够快速完全地对塑化剂DEHP进行降解。因此,本研究对深入研究酯酶Est824提供了生物信息学研究基础,并且为治理环境污染物提供一些可行手段。

本研究由广州市花都区人民医院院内科研基金项目(2024B01)资助。

### 参考文献

- [1] Venegas FA, Koutaniemi S, Langeveld SMJ, et al. Carbohydrate esterase family 16 contains fungal hemicellulose acetyl esterases (HAEs) with varying specificity [J]. *NBiotecnol.* 2022, 25(70): 28-38.
- [2] Dilokpimola, Verkerk B, Li X, et al. Screening of novel fungal Carbohydrate Esterase family 1 enzymes identified three novel dual feruloyl/acetyl xylan esterases. *FEBS Lett* [J]. 2022, 596(15): 1932-1943.
- [3] 王文华, 李秀婷, 徐友强, 等. 不动杆菌来源酯键水解酶生物信息学分析及PAEs降解机理[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(03): 31-42.
- [4] Park JM, Kang CH, Won SM, et al. Characterization of a Novel Moderately Thermophilic Solvent-Tolerant Esterase Isolated From a Compost Metagenome Library [J]. *Front Microbiol.* 2020, 10: 3069.
- [5] 邱佳容, 朱梦磊, 张良清, 等. 邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP)的细菌生物降解[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2023, 50(11): 2623-2635.
- [6] 梁浩花, 陶红, 王亚娟, 等. 一株邻苯二甲酸二丁酯和邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯降解菌的筛选鉴定与降解特性[J]. *浙江农业学报*, 2019, 31(07): 1145-1153.