

Nghiên cứu thiết kế và biểu hiện gene mã hóa enzyme MHETase trong *E. coli*

Đinh Thị Hoa¹, Lê Thị Thu Hồng², Lê Minh Trí¹, Phạm Kiên Cường¹, Tô Lan Anh^{1*}

¹Viện Khoa học và Công nghệ quân sự, Số 17 Hoàng Sâm, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam;

²Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Số 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam.

*Tác giả liên hệ: lananh9422@gmail.com

Nhận bài: 04/9/2024; Hoàn thiện: 02/11/2024; Chấp nhận đăng: 15/11/2024; Xuất bản: 06/12/2024.

DOI: <https://doi.org/10.54939/1859-1043.j.mst.FEE.2024.280-285>

TÓM TẮT

Với tốc độ sản xuất và tiêu thụ nhựa polyethylene terephthalate (PET) rộng rãi trong nhiều lĩnh vực của đời sống, điều này dẫn tới lượng rác có nguồn gốc từ PET thải ra môi trường ngày càng gia tăng, ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe của con người cũng như các sinh vật sống khác. Hiện nay, các giải pháp xử lý nhựa an toàn, bền vững và thân thiện với môi trường nhận được nhiều sự quan tâm của các quốc gia trên thế giới điển hình như phương pháp phân hủy sinh học sử dụng vi sinh vật tự nhiên hay enzyme có khả năng phân hủy nhựa. Trong nghiên cứu này, gene mã hóa enzyme MHETase- enzyme đóng vai trò quan trọng tham gia vào quá trình phân hủy nhựa PET đã được thiết kế và biểu hiện thành công trong vi khuẩn *E. coli* BL21(DE3). Chúng tái tổ hợp mang plasmid pET22b(+)-MHETase được nuôi cấy biểu hiện trong môi trường LB chứa Ampicillin 100 µg/mL, protein ngoại bào được thu nhận sau 48 giờ cảm ứng bởi IPTG 0,1 mM ở 30 °C. Kết quả phân tích bằng phương pháp Western-blotting và điện di protein SDS-PAGE cho thấy, enzyme MHETase được biểu hiện có trọng lượng phân tử khoảng 63 kDa. Enzyme MHETase tái tổ hợp được thu nhận sau khi tủa muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ có hoạt độ 85,88 U/mL. Các kết quả trên cho thấy tiềm năng đầy hứa hẹn của enzyme MHETase trong xử lý chất thải nhựa.

Từ khóa: Chất thải nhựa; MHETase; Enzyme phân hủy nhựa; Polyethylene terephthalate (PET); Protein tái tổ hợp.

1. MỞ ĐẦU

Mỗi năm, khoảng 82 tấn nhựa PET được sản xuất với ứng dụng chủ yếu là các sản phẩm bao bì đóng gói [1], mặc dù vậy, mức độ xử lý nhựa PET sau sử dụng còn rất hạn chế. Hiện nay, để xử lý, nhựa thường được phân loại và tái chế, đốt hoặc chôn lấp. Tuy nhiên, các công nghệ về tái chế nhựa chưa được chú trọng phát triển nên tỷ lệ nhựa được xử lý là rất thấp. Đồng thời, quá trình đốt nhựa lại tiêu tốn nhiều năng lượng và tạo ra các chất gây ô nhiễm thứ cấp trong không khí. Do đó, việc nghiên cứu và áp dụng các biện pháp xử lý mới, an toàn và thân thiện với môi trường như sử dụng enzyme phân hủy nhựa đang trở thành xu hướng tiềm năng của thế giới.

Enzyme phân hủy nhựa được sử dụng với vai trò là chất xúc tác, giúp bẻ gãy các mạch carbon dài và giải phóng các sản phẩm trao đổi chất thân thiện với môi trường [2]. Cho đến nay, nhiều enzyme thủy phân PET đã được biết như esterases, lipases hoặc cutinases, trong đó, enzyme cutinases chiếm chủ yếu. Một số cutinase có thể phân rã PET có nguồn gốc từ vi sinh vật như *Thermobifida fusca*, *Fusarium solanipisi* và *Thermobifida cellulosilytica* đã được phát hiện [3, 4]. Tuy nhiên, những cutinase này chỉ có khả năng phân hủy PET ở một mức độ nhất định với điều kiện nhiệt độ khoảng 50 °C, và hầu như không hiệu quả khi xử lý ở nhiệt độ bình thường. Năm 2016, Yosida và cộng sự đã phát hiện ra 02 enzyme phân hủy nhựa PET hiệu quả thành các đơn phân ở nhiệt độ từ 20 - 40 °C từ vi khuẩn *Ideonella sakaiensis* 201-F6 là poly(ethylene terephthalate) hydrolase (PETase, EC 3.1.1.101) và mono-(2-hydroxyethyl) terephthalate hydrolase (MHETase, EC 3.1.1.102) [5]. Enzyme PETase phân cắt mạch dài polymer PET thành các sản phẩm trung gian như MHET, BHET, trong khi đó, MHETase xúc tác thủy phân MHET tạo sản phẩm cuối là TPA và EG. Hiện nay, hướng nghiên cứu nhận được sự quan tâm của rất nhiều các nhà khoa học là sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử hiện đại nhằm tạo ra enzyme tái tổ hợp mang những đặc tính ưu việt trong quá trình xúc tác [5-7], đồng thời giúp chủ động trong quá

trình sản xuất và tạo lượng lớn enzyme. Tại Việt Nam, theo tìm hiểu, hiện nay chưa có công trình nghiên cứu nào biểu hiện enzyme MHETase tái tổ hợp. Do đó, trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành thiết kế trình tự gene mã hóa, biểu hiện và thu nhận enzyme MHETase trong hệ biểu hiện *E. coli* làm cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo với định hướng ứng dụng enzyme MHETase tái tổ hợp trong xử lý chất thải nhựa PET.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu, thiết bị, hóa chất

2.1.1. Vật liệu

Chúng vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3) (Invitrogen) trong bộ sưu tập chủng giống Phòng Kỹ thuật Di truyền, Viện Công nghệ sinh học/Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam; plasmid pET22b(+); plasmid pET22b(+)-MHETase được tổng hợp từ hãng Genscript (Mỹ); màng thấm tích loại muối 10K MWCO 16 mm (Thermo Scientific, Mỹ), kháng thể đơn dòng kháng His-tag nguồn gốc từ chuột (Invitrogen, Mỹ), kháng thể kháng IgG của chuột gắn enzyme peroxidase (Sigma, Mỹ).

2.1.2. Thiết bị

Tủ âm lạnh (Mettler, Đức), máy ly tâm lạnh Digicen 21R (Orto Alresa, Tây Ban Nha), máy điện di và chuyển màng Western-blot (Clever Scientific, Anh), hệ thống HPLC (Agilent Technologies, Mỹ), cân phân tích (Precisa, Mỹ), máy khuấy từ gia nhiệt (Cole Palmer, Mỹ).

2.1.3. Hóa chất

IPTG, MHET, Tris base, Tween 20 và các hóa chất khác nguồn gốc từ hãng Sigma, Merck.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Thiết kế vector pET22b(+) mang gene mã hóa enzyme MHETase

Trình tự amino acid của enzyme MHETase trên GenBank mã GAP38911.1 được sử dụng để xác định trình tự gene với các codon tối ưu cho quá trình biểu hiện trong vi khuẩn *E. coli* sử dụng phần mềm OptimumGene™ Optimization Analysis (hãng GeneScript, Mỹ). Các chỉ số được đánh giá mức độ phù hợp của mã bộ ba bao gồm chỉ số phù hợp codon (CAI), tỉ lệ G-C, sự phân bố tỷ lệ phần trăm các mã bộ ba. Sau đó, trình tự gene được bổ sung thêm trình tự mã hóa tín hiệu tiết LamB và trình tự điểm cắt của hai enzyme *NdeI* và *XhoI* vào 2 đầu đoạn gene. Cấu trúc gene mã hóa MHETase sau thiết kế được đưa vào vector pET22b(+) và đặt tổng hợp nhân tạo bởi hãng Genscript (Mỹ).

2.2.2. Biểu hiện và thu nhận enzyme MHETase trong vi khuẩn *E. coli*

Plasmid pET22b(+)-MHETase được biến nạp vào tế bào *E. coli* BL21 (DE3) bằng phương pháp sốc nhiệt và sàng lọc trên môi trường thạch LB chứa kháng sinh Ampicillin 100 µg/mL (LBA) [8]. Các khuẩn lạc phát triển trên môi trường chọn lọc tiếp tục được thu nhận và nuôi cấy qua đêm ở điều kiện 37 °C, lắc 200 vòng/phút. Sau đó, dịch nuôi cấy được chuyển sang môi trường LBA mới đến khi OD đạt 0,6 - 0,8 thì tiến hành cảm ứng IPTG 0,1 mM tại 30 °C. Sau 48 giờ cảm ứng biểu hiện, dịch protein ngoại bào được thu nhận bằng cách ly tâm 5000 vòng/phút trong 5 phút. Protein nội bào và protein ngoại bào của các chủng tái tổ hợp được phân tích bằng điện di SDS-PAGE 12,6% [9] để xác định khả năng biểu hiện enzyme MHETase. Để thu nhận enzyme thô, dịch protein ngoại bào của chủng biểu hiện được tủa muối (NH₄)₂SO₄ đến nồng độ cuối 50%. Enzyme MHETase được phát hiện bằng phương pháp Western-blotting với kháng thể đơn dòng kháng 6x His-tag [10].

2.2.3. Khảo sát một số điều kiện sinh tổng hợp enzyme MHETase của chủng biểu hiện

Trong nghiên cứu này, nồng độ chất cảm ứng IPTG và thời gian cảm ứng được khảo sát để đánh giá ảnh hưởng đến khả năng tổng hợp enzyme của chủng biểu hiện. Cụ thể, khuẩn lạc của

chủng *E. coli* BL21 tái tổ hợp được nuôi cấy biểu hiện ở 30 °C tại nồng độ IPTG lần lượt là 0,05 mM; 0,1 mM; 0,2 mM, 0,3 mM. Dịch ngoại bào được thu nhận tại các thời điểm sau 5 giờ, 12 giờ, 24 giờ, 48 giờ cảm ứng và xác định hoạt tính enzyme MHETase để lựa chọn điều kiện thích hợp nhất cho quá trình biểu hiện.

2.2.4. Xác định hoạt độ enzyme MHETase

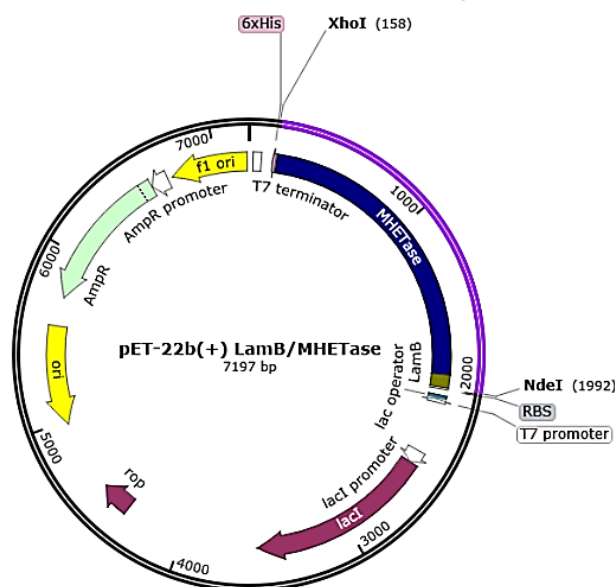
Hoạt độ enzyme MHETase được đánh giá qua sự phân hủy cơ chất MHET tạo sản phẩm TPA được xác định bằng phân tích HPLC [5-7]. Trong nghiên cứu này, mẫu dịch ngoại bào chủng *E. coli* BL21 biểu hiện MHETase trước và sau tủa muối (NH₄)₂SO₄ (ký hiệu M_T, M_S) được sử dụng cho phản ứng xác định hoạt độ. Mẫu đối chứng (ĐC) có thành phần tương tự nhưng enzyme được bổ sung sau khi dừng phản ứng. Một đơn vị hoạt độ (U) của enzyme MHETase được xác định là lượng enzyme cần thiết xúc tác tạo ra 1 μmol TPA trong thời gian 1 phút ở điều kiện thí nghiệm.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thiết kế vector pET22b(+) mang gene mã hóa enzyme MHETase để biểu hiện trong vi khuẩn *E. coli*

Dựa trên trình tự acid amin của enzyme MHETase, trình tự gene được thiết kế với codon sử dụng tối ưu cho vi khuẩn *E. coli*. Kết quả cho thấy, trình tự nucleotide mã hóa MHETase được thiết kế có chỉ số CAI là 0,96. Đặc biệt, 85% số codon được sử dụng với tần số 91 – 100% và không có codon nào mà tần số sử dụng trong *E. coli* dưới 70%. Như vậy, trình tự gene mã hóa enzyme MHETase được sử dụng có mã bộ ba phù hợp cho quá trình biểu hiện *E. coli*.

Dựa trên nghiên cứu của Hogyun Seo (2019), trình tự signal peptide LamB được thiết kế bổ sung vào trình tự gene mã hóa enzyme MHETase với mục đích tăng hiệu quả biểu hiện, enzyme tiết trực tiếp ra ngoài môi trường mà không cần trải qua phá tế bào [11]. Bên cạnh đó, trình tự điểm cắt của hai enzyme *NdeI* và *XhoI* cũng được bổ sung vào 2 đầu đoạn gene. Vector pET22b(+) được lựa chọn là vector biểu hiện với gene chọn lọc kháng Ampicillin và promoter T7 (hình 1).

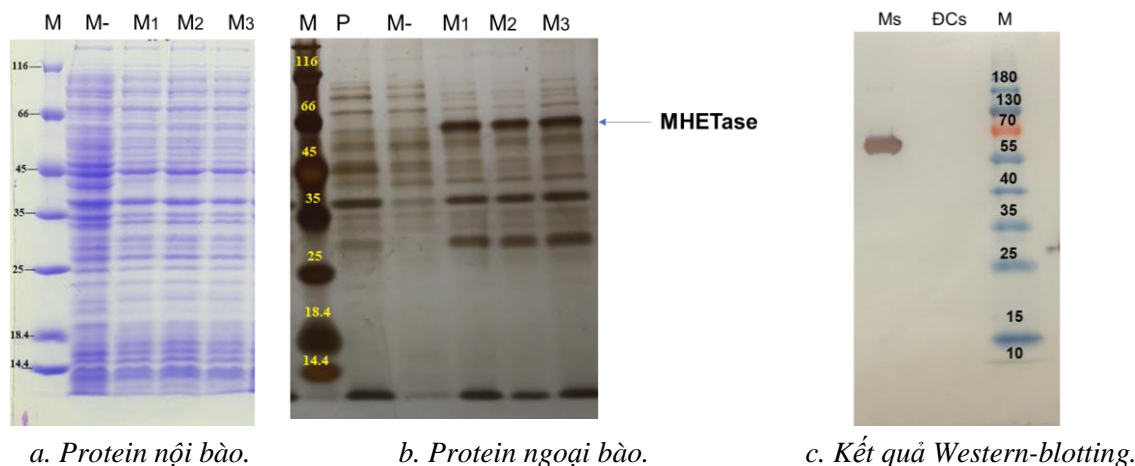


Hình 1. Cấu trúc vector biểu hiện pET22b(+)-MHETase.

3.2. Biểu hiện enzyme MHETase trong vi khuẩn *E. coli*

03 dòng tế bào *E. coli* BL21 (DE3) biến nạp thành công plasmid pET22b(+)-MHETase được nuôi cấy biểu hiện trong môi trường LBA cảm ứng bằng IPTG 0,1 mM, nhiệt độ cảm ứng 30 °C. Protein ngoại bào và protein nội bào của các chủng được thu nhận sau 5 giờ và phân tích bằng điện

di SDS-PAGE để phát hiện sự có mặt của enzyme tái tổ hợp. Kết quả trên hình 2a cho thấy, protein nội bào của chủng đối chứng và chủng biểu hiện MHETase không có sự khác nhau nhiều giữa các băng protein. Trong khi đó, đối với protein ngoại bào (hình 2b), có sự khác biệt rõ ràng giữa chủng biểu hiện và đối chứng, đặc biệt, băng protein có kích thước khoảng 63 kDa chỉ xuất hiện ở chủng mang plasmid pET22b(+)-MHETase mà không xuất hiện ở mẫu đối chứng và mẫu biểu hiện PETase. Như vậy, bước đầu có thể khẳng định đã biểu hiện được thành công gene mã hóa enzyme MHETase trong tế bào *E. coli* BL21 (DE3).



a. Protein nội bào.

b. Protein ngoại bào.

c. Kết quả Western-blotting.

Hình 2. Kết quả điện di SDS-PAGE protein tổng số và phân tích bằng Western-blotting dịch ngoại bào của chủng biểu hiện MHETase.

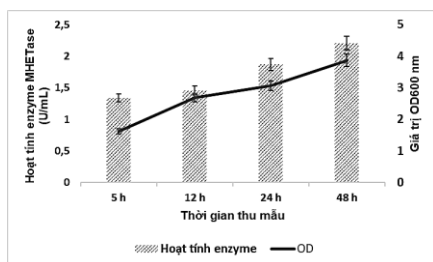
Chú thích: M: Thang protein chuẩn; M-: Mẫu đối chứng; M₁₋₃: Mẫu biểu hiện MHETase; P: Mẫu biểu hiện PETase; DC_s, M_s: Mẫu đối chứng và mẫu biểu hiện MHETase sau tua.

Để khẳng định chắc chắn sự có mặt của enzyme MHETase trong dịch ngoại bào chủng biểu hiện, protein tái tổ hợp (gắn đuôi His-tag – đóng vai trò là kháng nguyên) sẽ được phát hiện trên màng PVDF dựa trên khả năng liên kết đặc hiệu với kháng thể đơn dòng kháng His-tag bằng phương pháp Western-blotting. Kết quả cho thấy có phản ứng dương tính và đặc hiệu với kháng thể kháng His-tag ở mẫu dịch ngoại bào chủng biểu hiện MHETase khi xuất hiện duy nhất 01 băng protein đậm có kích thước khoảng 63 kDa, trong khi đó, dịch ngoại bào của chủng đối chứng không xuất hiện băng protein nào sau khi phủ màng với cơ chất TMB (hình 2c). Kết quả này khẳng định đã biểu hiện thành công enzyme MHETase ngoại bào với kích thước tương đương kích thước trong nghiên cứu của Yoshida và cộng sự (2016) [5]. Việc bổ sung signal peptide LamB tạo điều kiện thuận lợi trong việc thu nhận enzyme cũng như phân hủy cơ chất PET do polyme này có khối lượng phân tử lớn khó di chuyển vào nội bào [13].

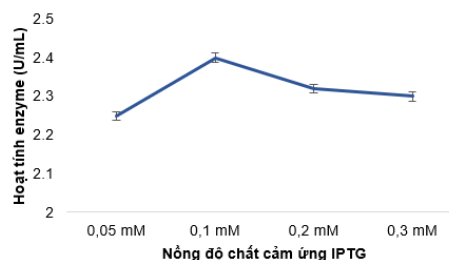
3.3. Khảo sát một số điều kiện biểu hiện enzyme MHETase

Khả năng sinh trưởng và hoạt tính enzyme trong dịch ngoại bào của chủng biểu hiện đều tăng theo thời gian, cao nhất tại 48 giờ sau khi cảm ứng với hoạt độ enzyme đạt 2,21 U/mL (hình 3). Trong nhiều nghiên cứu biểu hiện gene mã hóa enzyme MHETase tái tổ hợp sử dụng hệ biểu hiện *E. coli*, protein tái tổ hợp được thu nhận trong khoảng thời gian 24-48 giờ sau khi cảm ứng [11, 12].

Đối với nồng độ chất cảm ứng IPTG, hoạt độ của enzyme MHETase có xu hướng giảm khi tăng nồng độ IPTG > 0,1 mM, cao nhất tại nồng độ IPTG 0,1 mM với giá trị là 2,4 U/mL (hình 4). Điều đó cho thấy, tại giá trị IPTG > 0,1 mM, chất cảm ứng dư thừa có thể đã ức chế khả năng sinh trưởng của chủng biểu hiện dẫn tới giảm hiệu suất tổng hợp enzyme. Từ các kết quả khảo sát, trong nghiên cứu này, enzyme MHETase tái tổ hợp được biểu hiện tốt tại nhiệt độ 30 °C với nồng độ chất cảm ứng 0,1 mM và thời gian nuôi cấy sau cảm ứng là 48 giờ. Trong một số nghiên cứu khác, chất cảm ứng IPTG với nồng độ 0,1 mM cũng được sử dụng trong quá trình biểu hiện enzyme [11, 13].



Hình 3. Mật độ tế bào và hoạt tính enzyme MHETase của chủng biểu hiện thu nhận ở các thời điểm khác nhau.



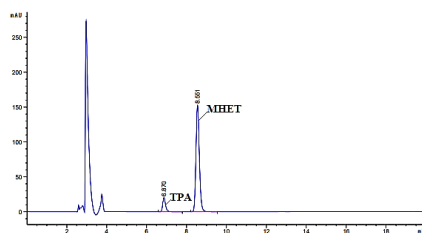
Hình 4. Ảnh hưởng của nồng độ chất cảm ứng đến hoạt tính enzyme MHETase.

3.4. Xác định hoạt độ enzyme MHETase

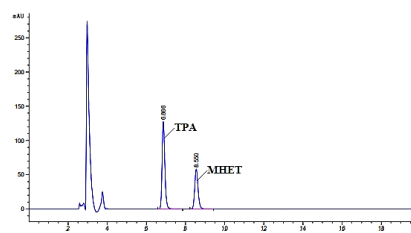
Hoạt độ của mẫu dịch protein ngoại bào chủng *E. coli* BL21 (DE3) biểu hiện MHETase trước và sau khi rửa muối được xác định lần lượt là 2,29 U/mL và 85,88 U/mL (bảng 1). Trong công trình của nhóm tác giả Dini Achnafani và cộng sự (2023), hoạt độ enzyme MHETase biểu hiện trong *E. coli* đạt 0,4015 U/mL [14].

Bảng 1. Xác định hoạt tính enzyme MHETase thu nhận bằng phương pháp rửa muối ($(NH_4)_2SO_4$.

Mẫu	Diện tích peak (mAU.s)	Hàm lượng TPA tạo thành	Hoạt độ enzyme (U/mL)
M _T	805,88	0,57	2,29
M _S	1248,13	0,85	85,88



a. Trước phản ứng.



b. Sau phản ứng 3 phút.

Hình 5. Kết quả phân tích HPLC sản phẩm phản ứng giữa MHETase sau rửa với cơ chất MHET.

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, enzyme MHETase tái tổ hợp đã được biểu hiện ngoại bào thành công ở chủng vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3) mang plasmid pET22b(+)-MHETase trong môi trường LBA ở nhiệt độ 30 °C, nồng độ IPTG 0,1 mM, thu nhận sau 48 giờ cảm ứng. Enzyme MHETase có kích thước khoảng 63 kDa được phân tích bằng phương pháp Western-blotting và điện di SDS-PAGE. Hoạt độ của enzyme sau khi thu nhận bằng phương pháp rửa muối ($(NH_4)_2SO_4$ ở nồng độ 50% là 85,88 U/mL được xác định bằng phân tích HPLC sản phẩm TPA tạo thành khi thực hiện phản ứng giữa enzyme và cơ chất MHET. Những kết quả này là cơ sở thực hiện các nghiên cứu tiếp theo để nâng cao hoạt tính và độ ổn định của enzyme trong quá trình phân hủy nhựa PET trong thực tế.

Lời cảm ơn: Công trình được hỗ trợ về kinh phí của Đề tài cấp Viện Công nghệ mới/Viện KH-CN quân sự năm 2023: “Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử để phân lập và biểu hiện enzyme tái tổ hợp có khả năng giảm thiểu ô nhiễm môi trường do chất thải nhựa” và sự hỗ trợ về nguyên liệu, trang thiết bị thí nghiệm thuộc Phòng Kỹ thuật di truyền, Viện Công nghệ sinh học/Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. J. Qiu et al., “A comprehensive review on enzymatic biodegradation of polyethylene terephthalate,” Environmental Research, Vol. 240, Part. 2 (2024).

- [2]. J. Kaushal et al., "Recent insight into enzymatic degradation of plastics prevalent in the environment: A mini - review," *Cleaner Engineering and Technology*, (2021).
- [3]. M. N. Issac et al., "Effect of microplastics in water and aquatic systems," *Environmental Science and Pollution Research* Vol. 28, No. 16, pp 19544-19562, (2021).
- [4]. N. F. S. Khairul Anuar et al., "An Overview into Polyethylene Terephthalate (PET) Hydrolases and Efforts in Tailoring Enzymes for Improved Plastic Degradation," *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 23, No. 20. (2022).
- [5]. S. Yoshida et al., "A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate)," *Science*, Vol. 351, No. 6278, pp. 1196-1199, (2016).
- [6]. G. J. Palm et al., "Structure of the plastic-degrading *Ideonella sakaiensis* MHETase bound to a substrate," *Nature Communications*, Vol. 10, (2019).
- [7]. H. Y. Sagong et al., "Decomposition of the PET Film by MHETase Using Exo-PETase Function," *ACS Catal.*, Vol. 10, No. 8, pp. 4805-4812, (2020).
- [8]. A. Froger et al., "Transformation of Plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method," *J. Vis. Exp.*, (2007).
- [9]. U. K. Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4," *Nature*, (1970).
- [10]. R. A. Daniel et al., "Role of penicillin-binding protein PBP 2B in assembly and functioning of the division machinery of *Bacillus subtilis*," *Mol. Microbiol.*, Vol. 35, No. 2, (2000).
- [11]. H. Seo et al., "Production of extracellular PETase from *Ideonella sakaiensis* using secdependent signal peptides in *E. coli*," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 508, No. 1, pp. 250–255, (2019).
- [12]. L. Shi et al., "Enhanced extracellular production of IsPETase in *Escherichia coli* via engineering of the *pelB* signal peptide," *J. Agric. Food Chem.*, (2021).
- [13]. L. Cui et al., "Excretory expression of IsPETase in *E. coli* by an enhancer of signal peptides and enhanced PET hydrolysis," *Int. J. Biol. Macromol.*, Vol. 188, pp. 568–575, (2021).
- [14]. D. Achrafani et al., "Cloning and Expression Analysis of Synthetic MHETase Gene under Mutated *pelB* Signal Sequence in *Escherichia coli* BL21 (DE3)," *AIP Conference Proceedings*, Vol. 2972, No. 1, (2023).

ABSTRACT

Construction and expression of gene coding MHETase in *E. coli*

*Polyethylene terephthalate (PET) is a type of synthetic plastic widely used in many applications, especially packaging production. With the increasing production, consumption rates, and a short life cycle, the abundant amount of waste from PET plastic in the environment seriously affects human health as well as other living organisms. Currently, plastic treatment solutions that are safe, sustainable, and environmentally friendly have received much attention, especially biodegradation methods using natural microorganisms or enzymes for plastic treatment. To date, PETase and MHETase are two enzymes that have been studied with great potential in PET plastic degradation. In this study, we have successfully designed and expressed the gene encoding the enzyme MHETase using the *E. coli* BL21(DE3) expression system. The recombinant strain harboring the plasmid pET22b(+)-MHETase was cultured in LB medium containing 100 µg/mL Ampicillin, and extracellular protein was collected after 48 hours with the induction of 0.1 mM IPTG and cultivation at 30 °C. The results of the analysis by Western-blotting and SDS-PAGE protein electrophoresis showed that the expressed MHETase had a molecular weight of about 63 kDa, which is equivalent to the theoretical molecular weight. The specific activity of recombinant MHETase enzyme obtained by precipitation of (NH₄)₂SO₄ salt was 85.88 U/mL. These results show the potential of MHETase enzyme for application in the degradation of PET plastic waste.*

Keywords: Plastic waste; MHETase; Plastic-degrading enzyme; Polyethylene terephthalate (PET); Recombinant protein.