

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2021-089

现代生物技术推动塑料中聚对苯二甲酸乙二酯绿色降解的研究进展

李磊^{1,2}, 高鑫², 齐宏斌², 李超², 路福平^{1,2,3}, 毛淑红^{1,2,3}, 秦慧民^{1,2,3}

(¹ 工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津 300457; ² 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457; ³ 工业酶国家工程实验室, 天津 300457)

摘要: 聚对苯二甲酸乙二酯 (PET) 因其耐用、可塑性强、安全性好等特点而广泛应用于食品包装和服装产业等领域, 同时由于疏水性强、结晶度高等原因难以被微生物或酶降解利用, 造成 PET 废弃物的不断积累, 带来严重的环境和社会问题。部分高质量的 PET 净片可以再用到食品包装中, 但绝大多数废弃 PET 通过常规的机械回收方法被降级利用, 不能做到绿色高效回收。因此, 解决“白色污染”, 探索安全高效的生物降解方法成为急需攻克的重大研究课题。本文以石油基塑料的现状为背景, 以 PET 的生物降解为切入点, 综述了 PET 的生物降解研究现状, 以宏基因组学、蛋白质组学为基础, 重点总结了微生物和新酶基因的挖掘方法, 并通过结构分析, 以追溯不同来源的 PET 降解酶特性, 利用定向改造和智能计算策略提高酶特性以及 PET 的降解效率。在改造降解酶的同时, 探索对 PET 原材料的可降解性改良, 提出了“双向改造”的思想。塑料降解酶新酶挖掘与工程改造、多酶催化体系开发以及塑料的可持续性能的改良等领域将成为塑料绿色降解的主流趋势, 其为探索 PET 高效生物降解提供了新思路。

关键词: 聚对苯二甲酸乙二酯; 基因挖掘方法; PET 生物降解; 定向改造; 智能计算策略

中图分类号: Q816 文献标志码: A

Research progress of modern biotechnology-promoted green degradation of polyethylene terephthalate in plastics

LI Lei^{1,2}, GAO Xin², QI Hongbin², LI Chao², LU Fuping^{1,2,3}, MAO Shuhong^{1,2,3}, QIN Huimin^{1,2,3}

(¹Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology of the Ministry of Education, Tianjin 300457, China; ²College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China; ³National Engineering Laboratory for Industrial Enzymes, Tianjin 300457, China)

Abstract: Polyethylene terephthalate (PET) has been widely used in the food packaging and clothing industries due to its good durability, high plasticity, and safety. However, PET is difficult to be degraded by microorganisms or

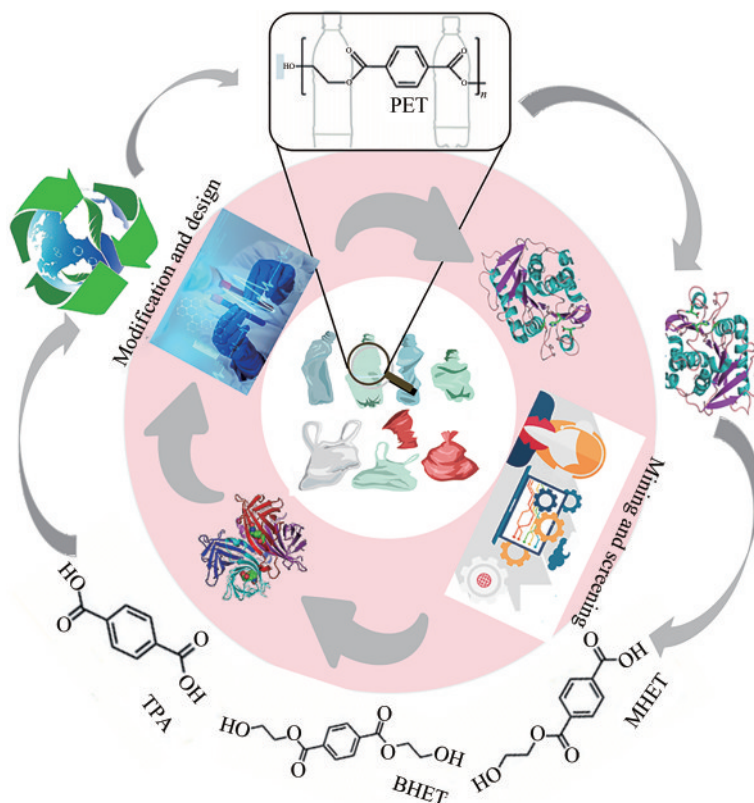
收稿日期: 2021-09-01 修回日期: 2022-02-17

基金项目: 天津市自然科学基金 (18JCYBJC9140)

引用本文: 李磊, 高鑫, 齐宏斌, 李超, 路福平, 毛淑红, 秦慧民. 现代生物技术推动塑料中聚对苯二甲酸乙二酯绿色降解的研究进展[J]. 合成生物学, 2022, 3(4): 763-780

Citation: LI Lei, GAO Xin, QI Hongbin, LI Chao, LU Fuping, MAO Shuhong, QIN Huimin. Research progress of modern biotechnology-promoted green degradation of polyethylene terephthalate in plastics[J]. Synthetic Biology Journal, 2022, 3(4): 763-780

enzymes due to its high hydrophobicity and high crystallinity, which has led to severe environmental and social problems globally. Some of the high-quality PET can be reused in food packaging, but the majority of waste PET is downgraded through conventional mechanical recycling ways and cannot be recycled in a green and efficient manner. The proportion of recycled plastics that relies on recycling and green degradation is decreasing year by year, and only a small percentage of plastic can be recycled, accounting for 17.6% of annual plastic use. Thus, exploring a safe and efficient biodegradation for plastic to solve “white pollution” has become a major research issue that needs to be pursued urgently. Herein, this paper reviews the current status of research on PET biodegradation, focusing on the mining methods of microbes and genes encoding novel enzyme based on macrogenomics and proteomics. The characteristics and mechanism of plastic-degrading enzymes from different sources were elucidated through an analysis of the crystal structures. Importantly, the activity and degradation efficiency of the plastic-degrading enzymes were improved by directed evolution and smart-computing strategy. This provides insights into the structural modification of plastic-degrading enzymes and introduces some frontier research fields. The idea of “two-direction modification” is proposed to improve the degradability for PET raw materials using modifying degradation enzymes. Furthermore, new enzymes mining and modification for plastic degradation, the development of multi-enzyme catalytic system and the improvement of sustainable performance of plastic will significantly stimulate the new ideas for exploring efficient biodegradation of PET in the future.



Keywords: polyethylene terephthalate; gene mining methods; biodegradation; directed modification; smart-computing strategy

塑料类产品是人类生产和生活的必需品，为人类的日常生活带来了诸多便利，因其成本低、

绝缘性好、可塑性强等优点被广泛使用。由于人类对塑料的需求急剧上升，在过去25年里，全球

塑料产量翻了两倍^[1]。Borrelle 等对 173 个国家的塑料使用进行定量评估, 2016 年全球废弃塑料量有 1900 万~2300 万吨, 到 2030 年预计达到 5300 万吨/年^[2]。同时, 国内塑料的生产与处理情况亦日益严重, 2020 全年塑料丢弃量高达 3840 万吨(图 1)。由于不合理处置, 大多数的塑料垃圾被倾倒在陆地和海洋中。早在 21 世纪初, 塑料就占到海洋垃圾的 60%~80%, 某些地区甚至高达 90%~95%^[3]。显然“白色污染”已经成为一种全球的威胁, 严重影响到全球海洋及生态系统。此外, 废弃在陆地上的塑料暴露在氧气和强烈的阳光下, 经过衰变和裂解会形成微塑料, 被鸟类和鱼类误食后, 通过食物链被人体摄入从而带来极大的危害^[4]。

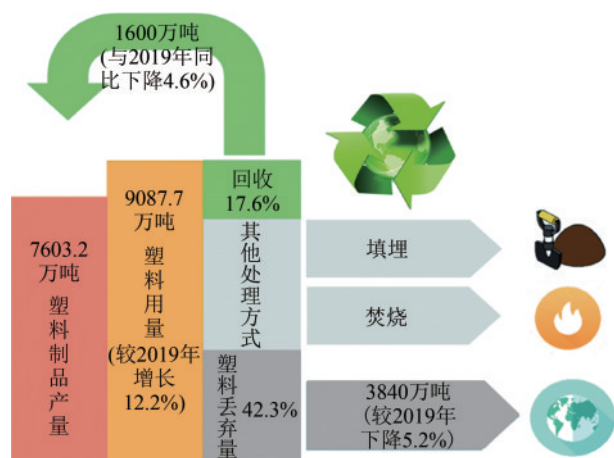


图 1 2020 年中国塑料生产及处理情况

Fig. 1 Plastic production and processing in China in 2020

(The data in the figure come from the National Bureau of Statistics. In 2020, the output of plastic products in China was 76.032 million tons, and the consumption of plastics was 90.877 million tons. Compared with 2019, this was a 12.2% increase. Plastic waste was 38.4 million tons. Green recycling accounts for 17.6% of the total waste)

从塑料加工生产的原材料来看, 由天然或者生物大分子组成的高聚物可作为天然塑料, 这类塑料虽然能被微生物降解, 但是占比较小^[5], 仅占塑料市场的 25%~30% 左右; 另一类是单体经聚合反应形成的高分子聚合物合成塑料, 这类塑料种类繁多、广泛应用于各个领域, 但很难被降解。塑料产品中使用较为广泛的聚对苯二甲酸乙二醇酯 (polyethylene terephthalate, PET), 是由对苯二甲酸二甲酯与乙二醇酯交换或以对苯二甲酸与乙二醇酯化先合成对苯二甲酸双羟乙酯, 再经缩聚反

应形成, 属于结晶型饱和聚酯, 根据所用领域的不同对 PET 结晶度调整; 2013 年全球产量高达 5600 万吨^[6]。因其成本低、耐用性好以及优良的食品包装性能, PET 成为最受欢迎的塑料之一, 全球有一半以上的合成纤维和塑料瓶属于 PET。PET 塑料的骨架上存在芳香化合物对苯二甲酸 (TPA) 难以被降解, 因此, PET 塑料的回收方式及有效降解成为其绿色发展的卡脖子问题。

传统的 PET 处理的方法主要包括填埋、回收、焚烧、化学降解等^[7-8], 还会造成降级使用、工艺复杂、二次污染大等问题, 利用新兴的合成生物学技术手段探索塑料的生物降解能避开这些缺点, 通过代谢将其转化为水、二氧化碳、生物质等进入地球循环系统; 20 多年来, 对 PET 生物降解的研究一直是全球热门问题^[5]。大多数可生物降解的塑料都是聚酯塑料, 尽管 PET 主链中含有对苯二甲酸酯以及 PET 的半结晶性质会影响自身降解, 但在利用生物降解方面潜力依然很大。利用微生物代谢或者多酶级联反应将 PET 解聚成单体, 同时也可进一步反应生成高附加值产品; 通过对酶元件和新型改良 PET 材料利用计算机模拟进行“双向改造”, 达到预期的降解效果。本文重点综述了包括宏基因组学在内的多种酶的筛选与挖掘方法、PET 的双向改造以及相关酶的计算机智能设计与改造情况, 同时还总结了降解 PET 的微生物和酶的研究进展。

1 塑料降解微生物及新酶基因筛选与挖掘方法

过去几十年间用于挖掘微生物和新酶基因的常规培养方法一直被沿用, 利用该方法发现了迄今大多数的塑料降解酶, 但这种方法限制了挖掘新的塑料降解酶的筛选速度^[9-12]。首先选取环境样本, 在塑料作为唯一碳源的培养基中富集培养, 分离出可利用塑料的功能性菌株, 再进行全基因组测序和基因文库构建, 然后通过克隆筛选, 选出可降解塑料的优良微生物菌株, 并鉴定相关酶系, 进行序列比对追溯其同源性, 最后对该微生物改良驯化或对酶进行表征 [图 2(b)]^[13]。但这种

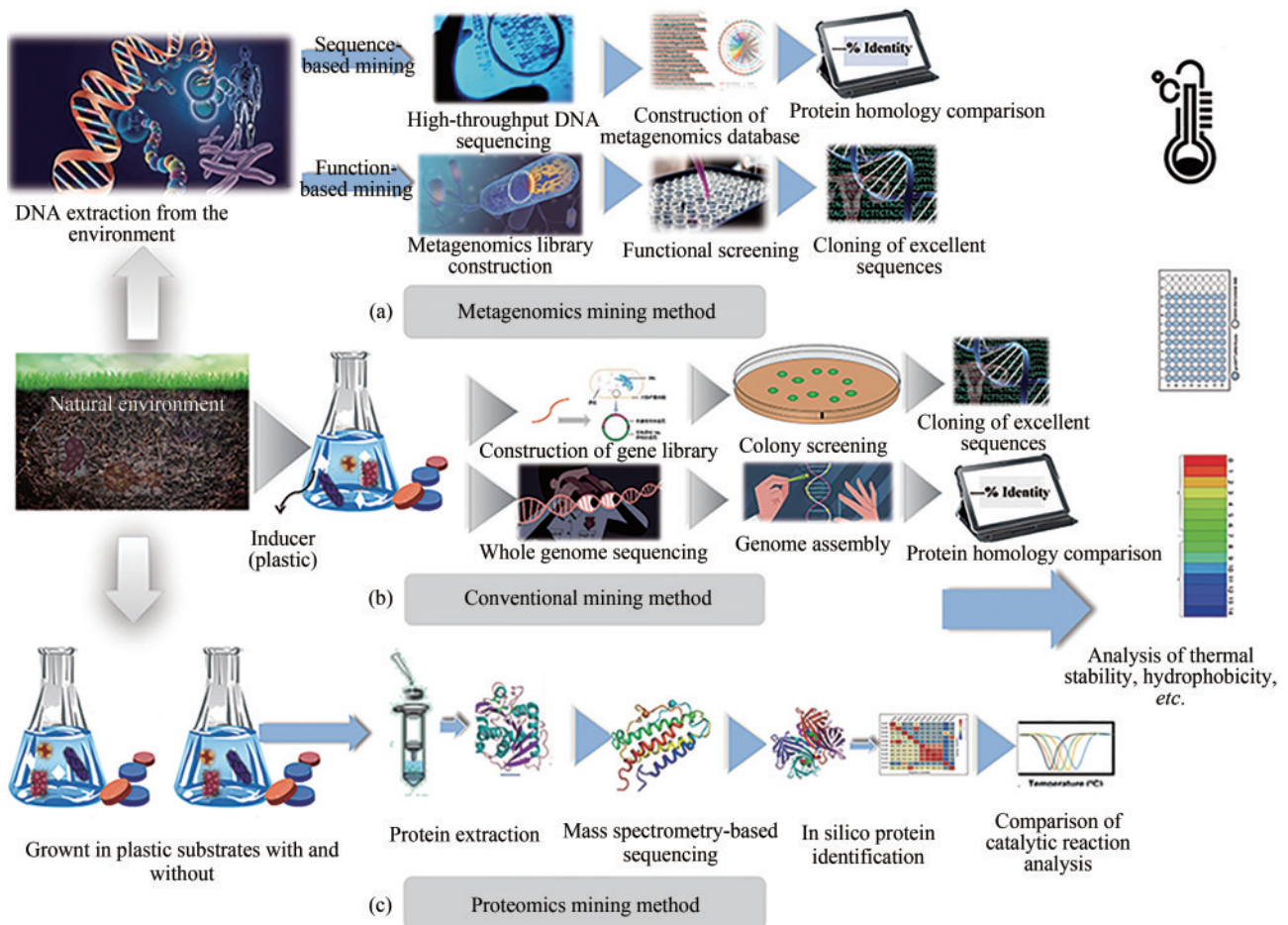


图2 塑料降解酶筛选与挖掘方法

Fig. 2 Schematic diagram of screening and mining methods for plastic-degrading enzymes

方法限制了挖掘新的塑料降解酶的筛选速度，据估计地球上只有不到1%的微生物被培养，大数据时代新型挖掘方法的综合利用改变了这一现状，大大拓宽了塑料降解酶的筛选范围^[14]。

1.1 宏基因组学方法

近年来，宏基因组学方法已经成为探索微生物的有力工具，这是一种在基因组水平上分析微生物群落的方法，从污染环境中识别和筛选宏基因组在宏基因组研究中至关重要；宏基因组学方法的使用有助于从环境样本中发现新基因，对功能和系统发育基因进行大规模表征，以及分离以前未培养但无处不在群体的成员，提高了研究微生物群落及其复杂性和动态的分辨率，以揭示其遗传潜力和功能多样性^[15-16]。应用该技术手段，现已从多种宏基因组样本中筛选出很多能编码降

解各种类型塑料的基因 [图2(a)]。

在利用宏基因组学方法筛选过程中，通常以序列为基础或者以功能为基础进行筛选，以序列为基础的筛选是通过对生物信息数据库中的序列同源性以及功能基因比较来筛选目的基因^[17]，但是已知的塑料降解酶生物信息数据库的大小和功能基因标注的水平缺陷限制了筛选和挖掘；序列同源性的水平只能作为参考，并不能保证两种降解酶活性的相似性，需要通过对其功能和酶学性质的表征来验证，也可能会因为序列相似性较差而遗漏一些新的塑料降解酶^[18]。Sulaiman等^[19]以序列为基础从放线菌的宏基因组文库中发现了一种叶枝堆肥-角质酶（LCC），在pH 8.0、50 °C条件下，其活性很高，并得出了嗜热放线菌是PET水解酶最有前途的微生物来源的结论。LCC不仅可以作为理解PET降解酶分子机制的良好模型，而且还可能适用于表面改良和PET降解。

Gaytán 等^[20]从垃圾填埋场衍生的宏基因组中检索到了许多与编码具有降解聚氨酯 (PU) 塑料活性的已知酶的基因序列相似的基因序列。

以功能为基础筛选时从基因文库出发查找所需表型并检测其活性, 在挖掘新酶方面远超前于序列筛选, 挖掘全新的酶基因组时, 这些酶的序列与现有的同源酶差异较大, 因此高通量筛选方法将会大大提高筛选速率^[21-22]。替代表达系统可用于确保功能性酶表达, 例如具有二硫键的塑料降解酶的功能性表达不适合在普通大肠杆菌中构建, 需要在毕赤酵母中构建^[23]。质粒文库因其覆盖范围小不适合功能筛选, 而基因文库的规模和覆盖范围在功能筛选方面起重要作用。此外, 噬菌体来源的基因文库筛选的有毒塑料降解酶不仅有利于在大肠杆菌中异源表达, 而且有利于酶学性质的表征。Danso 等^[24]使用 hiddenMarkov 模型算法, 从宏基因组数据库中对 504 个可能的 PET 水解酶候选基因进行挖掘, 筛选出 4 种候选酶, 并异源表达验证了这些酶的功能, 最后筛选出 PET 水解酶 (PET2), 证实了这种算法的有效性。通过从堆肥中构建宏基因组文库, 筛选并异源表达了新型酯酶 EstC7, EstC7 表现出突出的活性和对聚己二酸/对苯二甲酸丁二酯 (PBAT) 芳香酯键水解的强烈偏好, 这也说明从极端自然生态系统的微生物中挖掘新型水解酶的巨大潜力^[25]。

宏基因组样本来源在塑料降解酶的挖掘中起着决定性作用, 这些样本中的微生物构成了用于生物修复的巨大酶库, 其中绝大多数的微生物存在于高度复杂的生态系统中^[26]。通过对全球海陆环境的宏基因组进行分析, 发现编码 PET 水解酶的基因分布广泛, 但具有低频性, 说明此类 PET 水解酶在环境中自然进化较慢。相比于自然环境, 在聚合物含量高的地方发现塑料降解酶的概率更大, Mayumi 等^[27]利用靶向宏基因组学筛选降解酶, 将微生物在塑料产品中孵育, 分离出酶学性质好的解聚酶。Jacquin 等^[28]提出了塑料圈“plastisphere”的概念, 即: 微生物在这里适者生存, 利用环境即可筛选。但此类基因文库还需进一步开发。最近, 科学家将宏基因组学挖掘方法与¹³C 同位素标记法共用, 可以直接研究酶或微生物对塑料的降解过程^[29]。

1.2 蛋白质组学

蛋白质组学可以对蛋白质直接检测和量化表达, 在广泛的微生物种群中用于生物技术应用的新酶挖掘方面表现出巨大潜力^[30]。Schneider 等^[31]利用蛋白质组学对真菌产生的生物降解酶进行定性和定量分析, 揭示真菌和细菌在垃圾分解过程中的各自作用; 蛋白质组学在生物聚合物降解酶挖掘中的可行性已经被证明, 激发了研究者应用蛋白质组学挖掘生物降解酶的动力。利用蛋白质组学挖掘塑料降解酶首先将微生物置于含有塑料的培养基里生长, 因为塑料可以不同程度地诱导功能微生物表达具有塑料水解活性的酶, 蛋白质组学之所以广泛用于塑料降解酶的挖掘是由于相关微生物和塑料一起孵育时, 会刺激塑料降解酶的表达^[32]; 然后微生物培养产生的蛋白质被提取并消化成小肽进行测序, 利用生物信息学分析进行蛋白质鉴定, 由于塑料无法进入微生物体内, 参与解聚的酶需要释放到体外, 所以胞外蛋白是塑料降解酶筛选的主要目标; 最后对筛选的目标酶进行结构解析、酶动力学表征等 [图 2(c)]; Tesei 等^[33]把 PBAT 作为黑色真菌 (*Knufia chersonesos*) 的唯一碳源, 对分泌类聚酯酶进行筛选, 蛋白质组学揭示了多种组成型表达的蛋白质, 并对蛋白质进行功能分析和结构预测。Zadjelovic 等^[34]利用蛋白质组学对营养缺乏的海洋微生物进行筛选, 发现了有生物降解能力的 α/β 水解酶, 这种酯酶的异源过表达证明了水解天然和合成聚酯的非凡能力。通过对假产碱假单胞菌 (*Pseudomonas pseudoalcaligenes*) 分泌蛋白进行蛋白质组学筛选鉴定, 发现了新型酯酶 PpEst, 这是首次利用蛋白质组学筛选鉴定 PBAT 降解酶的报告^[35]。Jhong 等^[36]在抗微生物肽 (AMP) 的挖掘中, 从大规模转录组和蛋白质组数据出发, 为 AMP 提供全面的功能和物理化学分析, 通过对 AMP 数据库中 AMP-蛋白质相互作用的信息的分析、“神秘”区域检测的抗菌效力分析、AMP 目标物种的注释以及转录组和蛋白质组数据集进行检测, 以期对 AMP 进行功能分析和发现新抗菌药物。这些研究为蛋白质组学挖掘塑料降解酶提供了坚实的理论研究基础和重要参考。

由于生物信息学数据库规模的局限性以及高

纯度蛋白质提取困难, 利用蛋白质组学从复杂环境样品中挖掘塑料降解酶仍然具有挑战性; 尽管近年来蛋白质组学引导的塑料降解酶挖掘被广泛应用, 但该挖掘方法仍然处于起步阶段, 目前所有的报道都是对单微生物的诱导培养。

2 塑料降解酶与微生物的研究现状

PET是通过酯键聚合而成的水解型塑料, 但由于产品的结晶程度不同, 对其内部酯键的水解难易程度也不同^[37]; 现已筛选出多种具有降解PET性能的微生物和酶, 微生物分泌的胞外解聚酶对酯键进行水解, 把PET降解成小分子聚合物, 然后被微生物进一步分解成水和二氧化碳。酶对PET降解时, 要考虑5个因素: ①最适反应温度最好超过玻璃化温度(T_g); ②吸水性与温度、结晶度和聚合物链的取向高度相关; ③结晶度; ④聚合物链的取向是否有序; ⑤表面拓扑结构, 这取决于聚合物链的结晶度和取向。一些来自真菌和放线菌的脂肪酶、酯酶^[38]以及角质酶^[39]被报道, 这些酶具有水解非晶态PET及修饰PET膜表面的功能, 酯酶作用于短链酰基酯, 角质酶作用于中链酰基酯(高达 $C_8 \sim C_{10}$), 而脂肪酶作用于中长链酰基酯。

2.1 角质酶

天然或合成的脂肪族聚酯产品如PET、对苯二甲酸丁二醇酯-己二酸共聚物(BAT)在室温下可被各种酯键水解酶水解, Müller等^[40]首次报道了PET可被聚酯酶水解的可能。真菌角质酶包括来自植物病原菌、非植物病原真菌以及放线菌的角质酶, Kleeberg等^[41]首次纯化了来自真菌和嗜热子囊菌(*Thermobifida fusca*)的蛋白, 该酶可以解聚BAT, 并确定了蛋白的氨基酸序列。随后Baker等^[42]对聚酯降解进行研究, 发现角质酶在聚酯的水解中起着重要作用。胡小平等^[43]从嗜热芽孢杆菌属中分离出聚脂酶, 并且从嗜热菌(*Thermobifida alba* AHK119)中克隆出一个新的角质酶, 由两个串联角质酶基因组成。Ribitsch等^[44]从*T. alba* DSM43185克隆出角质酶; 此外, Acero等^[45]在嗜

热菌(*Thermobifida cellulolytica* DSM44535)里发现了编码角质酶(Tc_Cut1、Tc_Cut2)的基因, 其蛋白质的氨基酸序列与此前在*T. fusca* NTU22中发现的角质酶Tfu_0883和Tfu_0882相同, 科研人员还测定了角质酶的活性, Tc_Cut1的活性大于Tc_Cut2, 在50℃下, Tc_Cut1对37%结晶度的PET水解作用可以持续120h。迄今为止报道的所有嗜热菌属都存在串联角质酶基因, 虽然同源性较高, 但活性差异很大, 即便是来源于不同种属的角质酶基因也有很高的同源性, 角质酶的起源种属可能是嗜热菌属, 拥有聚酯降解性角质酶的种属在传代过程中不断进化从而产生了差异。特异腐质菌(*Humicola insolens*) (HiC)、门多萨假单胞菌(*Pseudomonas mendocina*)和腐皮镰孢菌(*Fusarium solani*)来源的角质酶被用来催化低结晶度的PET, HiC在70℃下反应96h转化率可达到100%, 而另外两种酶在50℃下就会失活^[46]。绿圆跳虫(*Sminthurus viridis* AHK190)来源的角质酶(Cut190)突变体Cut190/Q138A (Cut190/S226P/R228S/Q138A)在65℃下反应15h可将结晶度为14.1%的PET超纤维完全水解^[47]; 包括HiC在内的很多角质酶已经被报道有水解结晶度较大PET的能力, 这说明高结晶度的PET有被水解的潜力。来源于植物堆肥的角质酶LCC在70℃条件下催化24h, 可降解25%无定形PET薄膜, LCC与TfH聚酯水解酶有一定的同源性^[48], 而*T. fusca* DSM43793来源的角质酶TfH在55℃条件下催化3周, 可使结晶度为10%的PET膜质量损失50%^[49](表1)。角质酶的独特性质取决于这些蛋白质结构缺乏覆盖在活性位点的盖子, 所以活性位点经常暴露在溶液中, PET水解是聚合物链的灵活性和角质酶结构相互作用的结果。

2.2 酯酶与脂肪酶

酯酶是与对硝基苯酚(*p*-NP)的短链酰基酯表现出更高的活性的一类酶, 被认为优先水解PET的非定形区域, 结晶度的增加会限制聚合物链的摆动, 并降低酶对聚合物链攻击概率; Ribitsch等^[50]从嗜盐耐热双歧杆菌(*Thermobifida halotolerans* DSM44931)发现了可降解PET的酯酶, 可在

表1 PET降解酶研究进展

Tab. 1 Research progress of PET degrading enzymes

降解塑料类型	降解酶来源	降解酶名称	最佳降解温度/°C	文献
PET	Fosmid基因文库	LCC	50	[19]
	<i>Sphagnum magellanicum</i>	EstC7	50	[25]
	<i>Thermobifida alba</i> AHK119	Est119	45~55	[43]
	<i>T. alba</i> DSM43185	Tha_Cut1	88.7	[44]
	<i>T. cellulositytica</i> DSM44535	Tc_Cut1	50	[45]
	<i>Humicola insolens</i>	HiC	70	[46]
	<i>Sminthurus viridis</i> AHK190	Cut190	65	[47]
	<i>T. fusca</i> DSM43793	TfH	55	[49]
	<i>T. halotolerans</i> DSM44931	Thh_Est	50	[50]
	<i>T. insolens</i>	pulA	80	[51]
	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	TLL	37	[53]
	<i>Acidovorax delafieldii</i> BS-3	PETase	30	[55]
	<i>Ideonella sakaiensis</i> 201-F6	IsPETase	30	[56]
	<i>T. fusca</i> KW3	TfCut2	70	[95]

50 °C条件下与PET相互作用，并且与放线菌来源的角质酶有高度同源性。嗜热链霉菌 (*Thermobifida insolens*) 产生一种分子量大约为20~21 kDa的脂肪酶在pH 8.5、80 °C下展现出最大活性，该酶的活性位点由Ser140、Asp195和His208组成，*T. insolens*的结构与*F. solani*的酶有较高的同源性^[51-52]。嗜热丝状真菌的脂肪酶由269个氨基酸组成，分子量为31.7 kDa，其蛋白结构已经被解^[53]。米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 产生的脂肪酶被对苯二甲酸双酯 (BHET) 诱导后，可水解对苯二甲酸二乙酯 (DP)，并且提高该酶对PET的亲合力^[54]。

2.3 PET水解酶

PET水解酶与许多来自非嗜热细菌的水解酶 (PET降解能力尚未见报道) 具有65%以上的序列同源性，其中来自德氏嗜酸菌 (*Acidovorax delafieldii* BS-3) 的解聚酶显示出最高同源性 (82%)^[55]。Yoshida等^[56]将*Ideonella sakaiensis*在结晶度为1.9%的PET上进行培养，可在30 °C下生长40 d，并从中克隆出PET水解酶 (PETase) 基因，PETase与放线菌来源的角质酶有45%~53%的氨基酸序列相同，*I. sakaiensis*来源的PETase (IsPETase) 在迄今为止报道的所有PET降解酶中在温和条件

下具有最高的PET降解活性，在30 °C下仅需3周即可完全降解PET，但其低热稳定性限制了有效和实用的PET酶促降解能力。

尽管PET降解酶类的挖掘和研究处于刚刚起步阶段，但是在晶体解析催化机理方面发展却很迅速，目前已经有多类酶的结构被解析，在定向改造方面发挥了极大的作用。科研人员已经对*I. sakaiensis*来源的PETase晶体结构进行了报道，PETase属于典型的 α/β -水解酶折叠类型，包含1个扭曲的中央 β -折叠，由9个 β -链组成，中间夹有6个 α -螺旋，经过与其他角质酶的同源性比对，发现PETase的催化三联体为S131-H242-D177，PETase的活性口袋比其他角质酶的更宽，所以PET可以轻易进入PETase的活性位点，科研人员还对底物结合和催化机制进行了研究^[57-59]。郭瑞庭等通过对PETase晶体结构与底物和产物类似物复合体的结构分析，发现PETase中W156在同源酶对应位点是高度保守的，而PETase的W156可以展现出多个摆动构象，185位点的残基会影响W156自身的灵活性，进而影响底物结合模式^[60]；此外还分析了PETase与底物和产物类似物的结合，推动了对PETase反应机理的理解，PET主要通过疏水相互作用与口袋结合，PET的羰基位于催化中心，其中O原子面向氧阴离子孔，W156处于B构象 (S185) 时可为PET的TPA部分提供T堆积力，通过发生经

典水解反应, 连续形成酰基酶中间体, 水分子进行第2次亲核攻击以裂解酯键, 其余苯甲酸基与W156发生较强的 π 堆叠作用, 底物被分解并最终从活性中心释放出来。Perz等^[61]从肉毒梭菌(*Clostridium botulinum* ATCC3502)克隆了两个编码酯酶(Cbotu_EstA、Cbotu_EstB)的基因, 而且还得到了酶Cbotu_EstA的晶体结构。晶体结构的解析在同源性的追溯方面也意义重大, *T. alba* AHK119来源的Est119角质酶晶体结构被解析, 科研人员将Est119序列与水解角质的酯酶进行比对分析, 发现芳香聚酯酶属于角质酶家族^[62]。Est119还与链霉菌(*Streptomyces exfoliates*)来源的脂肪酶结构进行比对分析, 通过结构比对发现Est119是一种 α/β 水解酶, 9条 β 链被8条 α 螺旋包围, 并发现该酶是一种没有盖子的角质酶。通过对晶体结构分析, 还可以得到辅因子对活性及其空间构象的影响; *S. viridis* AHK190来源的角质酶突变体Cut190-S176A与 Ca^{2+} 结合后得到非活性形式的晶体结构, 分析Cut190的底物识别机制, 并且通过突变分析了 Ca^{2+} 的作用; Ca^{2+} 在第1位点(Ser76、Ala78、Phe81和Asn133)的结合是Cut190独有的, 这直接关系到酶的激活与否, 但第2位点(Glu220、Asp250和Glu296)的结合在Est119和其他角质酶中很常见, 影响着酶的热稳定性^[63-64]。Bollinger等发现并解析了能降解PET的聚酯水解酶(PE-H), 该酶为 α/β 水解酶折叠类型, 中间由9条 β 链组成,

两侧有7个 α 螺旋, PE-H中有两个二硫键, 连接C214-C251和C258-C302, 该结构在II型PET降解酶中较为常见, 高度保守的残基S171、D217、H249构成了PE-H的催化三联体^[65]。

2.4 塑料降解微生物的鉴定

Yoshida等^[56]从环境中的PET上筛选出*I. sakaiensis* 201-F6, 该菌可以把PET作为碳源和能源物质, 生成无害的TPA和乙二醇(EG)。*Fusarium oxysporum*和*F. solani*是可以生长在含有PET的培养基中的丝状真菌, 但是研究者并没有对其生长水平进行检测^[66-67]。De Castro团队^[68]对环境中降解PET的微生物筛选时, 发现*H. insolens*具有很好降解PET的潜能, 并且与南极假丝酵母协同作用比单独使用转化效率高2.2倍。*Streptomyces scabies*中的基因*sub1*编码的蛋白可降解PET生成TPA, 在添加Triton后其活性明显增强, 且37℃下至少稳定20d^[69]。Farzi等^[70]评估了链霉菌属对PET的降解和动力学表征, 利用GC-MS分析了生物降解过程(图3)。在海洋微生物*Pseudomonas aestusnigri* VGXO14^T基因组中鉴定出的新型羧酸酯水解酶有聚酯降解能力, 可在30℃下对无定形PET降解^[65]。Beaulieu等^[71]筛选的*S. scabies*具有显著的稳定性和降解PET的能力。此外, *P. citrinum*、*T. reesei*以及*B. cepacia*被鉴定出也具有降解PET的能力^[72-74](表2)。

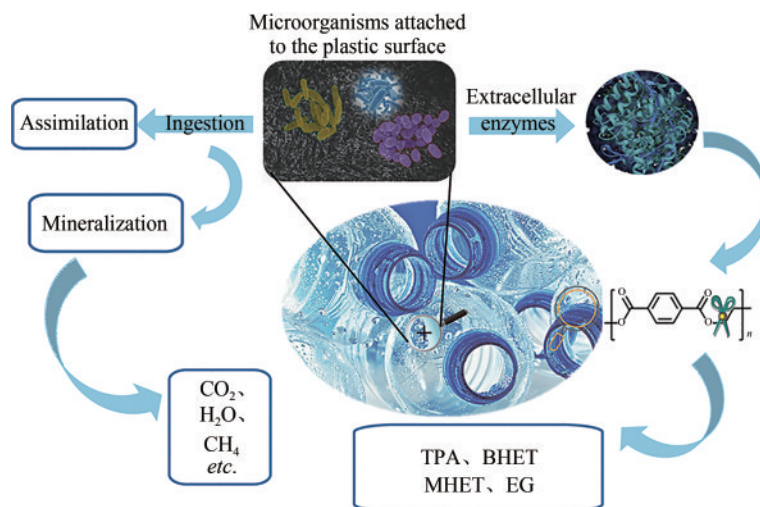


图3 微生物降解PET过程

Fig. 3 Process of microbial PET degradation

表2 PET降解微生物研究进展
Tab. 2 Research progress of microorganisms in PET degradation

降解塑料类型	微生物名称	最适降解温度/°C	文献
PET	<i>Aspergillus oryzae</i> CCUG33812	30	[54]
	<i>Clostridium botulinum</i> ATCC3502	50	[61]
	<i>Pseudomonas aestusnigri</i> VGXO14 ^T	30	[65]
	<i>Fusarium oxysporum</i>	30	[66]
	<i>Fusarium solani</i>	30	[67]
	<i>Streptomyces scabies</i>	37	[71]
	<i>Penicillium citrinum</i>	30	[72]
	<i>Trichoderma reesei</i>	37	[73]
	<i>Burkholderia cepacia</i>	37	[74]
	<i>Candida antarctica</i>	60	[80]

3 双向改造

塑料工业应用的目的是让降解最大化、污染最小化，双向改造基于工业应用的思想，对可塑性降解酶和可降解塑料进行同步改造，以期获得高效产品。在双向改造过程中，不仅可以从酶制剂自身出发对自身进行改造和设计，还可以在保证塑料产品适用性的前提下，对其原材料进行绿色设计，从而达到工业应用的要求。

3.1 PET降解酶的改造升级

塑料降解酶因稳定性差、催化效率低等原因限制了其规模化生产与应用^[75-77]，通过利用包括人工智能、同源模拟、液滴微流控在内的现代生物技术、半理性设计、随机突变等来克服PET降解酶现存的这些弊端，也可应用多酶共固定化、级联反应技术来提高产率，使其应用于规模化生产。

3.1.1 PET降解酶的传统改良方法

利用基因随机突变和重组方法对酶进行定向进化，然后与酶理性修饰方法相结合，通过各种组合选择出适合的方法来避免定向进化和理性设计的限制，液滴微流控的技术手段极大提高了随机突变筛选效率；全细胞催化、金属离子的存在、共固定化以及多酶级联反应^[78]等方面在提高PET降解酶活性也有积极作用。

杜文斌等开发了一种荧光液滴分选（FADS）

管道，可用于对PET降解微生物或酶的高通量筛选，也可广泛用于发现新的PET降解微生物和各种环境中的酶以及定向进化^[79]。通过利用定点诱变对嗜热细菌*T. fusca*来源的角质酶基因进行基因修饰，获得的双重突变体G132A/T101A改善了酶的疏水性和底物结合位点，使得突变体催化PET的活性大大提高^[80]。对*Fusarium solanipisi*来源的角质酶（FsC）进行基因改造时，利用丙氨酸替代活性中心位点附近的氨基酸残基，扩大了底物结合口袋，突变体FsC-L81A对PET的水解活性提高了5倍^[81]。王泽方等把PETase导入到毕赤酵母中进行表达，再分泌到细胞表面进行全细胞催化，发现PETase的催化效率是游离酶的36倍，且pH和热稳定性都有显著提高^[82]。Carniel等^[83]发现南极假丝酵母脂肪酶（CALB）和角质酶（HiC）共同存在情况下会促进PET水解，双酶级联反应会加速PET的水解生成TPA。

金属离子的添加会影响酶的热稳定性，尽管在 α -淀粉酶中已经探索了Ca²⁺诱导酶的热稳定性和活性，但对降解PET角质酶的机制仍然知之甚少。Miyakawa等^[84]首次发现了降解PET角质酶中Ca²⁺对于酶结构稳定性和活性的影响，并对*S. viridis* AHK190来源的角质酶突变体Cut190-S226P进行研究，研究了Ca²⁺结合以及自由态下的突变体结构，并发现了该突变体较好的热稳定性。Sulaiman等^[48]也发现了在添加了Ca²⁺和Mg²⁺后，这些角质酶的活性和热稳定性增加。向聚酯水解酶TfH、BTA2、Tfu_0882、Tf_Cut1和Tf_Cut2添加Ca²⁺、Mg²⁺时，这些聚酯水解酶的熔点温度提高了10.8~14.1 °C^[85]。在*Clostridium botulinum*来源的酯酶（Cbotu_EstA）中发现了与Zn²⁺结合相关的结构域，并发现该结构域附近的残基突变不会改变锌的结合能力，如突变体Cbotu_EstA-S199A不仅没有改变锌的结合能力，反而催化活性提高了7倍^[86]。科研人员分析了不同的二价阳离子（Zn²⁺、Mn²⁺和Mg²⁺）对聚酯水解酶Cut190与Ca²⁺相比的活性和热稳定性的影响，发现Zn²⁺可以很容易地取代Ca²⁺，但Cut190在Zn²⁺存在下的酶活性非常低^[87]。除金属离子外，磷酸根离子也可以提高PET降解酶的热稳定性^[40]。

3.1.2 基于PET降解酶结构的改造

在所有对酶修饰的措施中,从酶结构解析基础上进行改造以提高其活性的研究较为普遍;Austin等^[88]将PETase的结构与*T. fusca*来源的角质酶结构进行比对,发现PETase结合位点附近存在多个裂隙,会影响底物与酶的结合,将PETase两个活性位点残基突变为角质酶中保守的结合裂隙氨基酸残基,缩小了PETase结合位点的裂隙大小,从而改善了PET的降解[图4(a)]。Son等^[89]基于结构生物信息学对*I. sakaiensis*来源的IsPETase进行蛋白质工程改造,通过使用分子对接把IsPETase与4种PETase进行比对,获得使Loop环结构更稳定的三重突变体S121E/D186H/R280A,该酶的熔点温度提高了8.81℃,PET降解活性在40℃下提高了14倍;他们继续对IsPETase结构进行优化,获得四重突变体S121E/D186H/S242T/N246D,该突变体较野生型相比底物结合位点得到了优化,在37℃下,突变体的活性比野生型提高58倍^[90]。Maurer等^[91]从*T. cellulolytica*来源的角质酶(Thc_Cut1)结构出发进行改造,拓展了Thc_Cut1的底物谱,使得该酶可以解聚人工尼龙和聚酰胺。

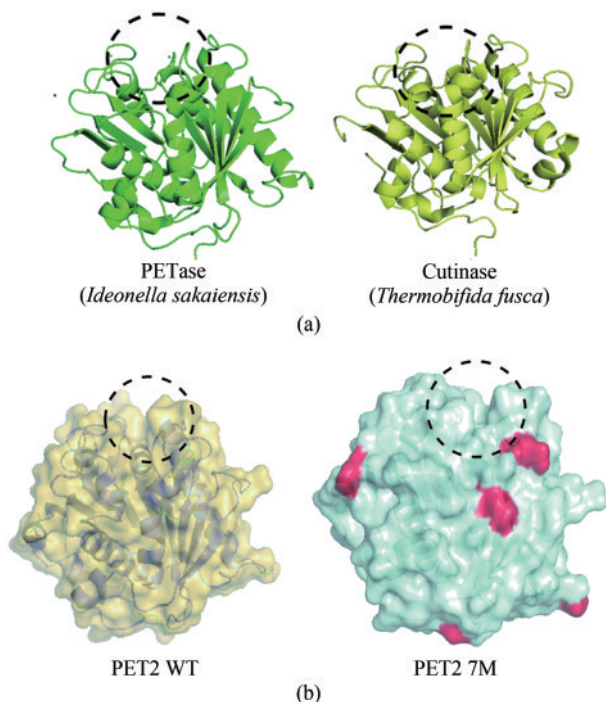


图4 PET降解酶基于结构的改造

Fig. 4 Structure-based modification of PET degrading enzyme

通过对结构进行改造是提高酶热稳定性的一种方法。Nakamura等^[92]利用同源模拟工具对PET降解酶PET2的结构进行比对,最终发现对表面电荷进行修饰突变成带正电荷的氨基酸、添加二硫键以及提高骨架稳定性,可以使PET2 7M(7重突变体)的熔点温度从69℃提高到75.7℃[图4(b)]。Marty等使用分子对接和酶表面分析来研究底物结合模式,最后发现把二硫键加入LCC中去取缔金属离子结合位点附近的氨基酸残基,使得LCC的熔点温度提高了9.8℃^[93]。将二硫键引入到聚酯水解酶Tf_Cut2催化位点附近,Tf_Cut2的熔点温度提高了25℃,半失活温度提高了17℃,并且在70℃处理48h,该酶的催化效率较原来提高了1倍^[94]。在PET降解酶中引入疏水蛋白来改变酶的结构以及酶与底物的结合能力已经被广泛应用于这类研究中。Ribitsch等^[95]把水解PET的角质酶与疏水蛋白融合来改变活性中心的构象,疏水蛋白是一种可以改变表面物理化学性质的小真菌蛋白,可以显著提高角质酶对PET的水解水平,说明偶联疏水蛋白或者两性分子可以提高酶分子疏水性。孙岩等对PETase进行了广泛的分子模拟来分析酶的结构转化和酶与底物的相互作用,把活性位点附近的残基突变成谷氨酸和赖氨酸,会改变酶的表面电荷分配,使得其活性位点附近的疏水性增大,从而提高了底物与酶的结合效率^[96]。刘兵等^[97]将PETase的结构与*F. solani*来源的角质酶进行催化三联体位点结构的比对分析,发现BHET对PETase的催化三联体存在明显竞争,利用PETase与BHET的分子对接证实了以上观点,提供了PETase改造的理论研究基础。Ren等^[98]通过利用分子模拟工具比对*T. fusca* KW3来源的Tf_Cut2和LCC结构,把第62位的氨基酸换成LCC对应的氨基酸残基,发现Tf_Cut2-G62A与对苯二甲酸单酯(MHET)结合效率大大降低,水解PET的活性提高了2.7倍;因为PET降解酶除了会与PET结合外,该类酶的水解产物BHET和MHET也会与PET竞争酶的活性中心,从而抑制PET降解。郭瑞庭团队^[60]解析了一种来自PET消耗型微生物*I. sakaiensis*的新型PETase以及与底物和产物类似物复合体的结构。通过结构分析,诱变和活性测量,提出了底物结合模式,并阐明了对催化

至关重要的特征，为PETase在塑料生物转化中的进一步工程设计和应用提供指导。

3.1.3 PET降解酶的人工智能设计

近年来，大数据时代人工智能的发展，很大程度上减少了实验重复操作的工作量，并且比传统的方法更加高效、准确；计算机稳定性设计方法在过去的20年里从选择性地解决边际稳定性的某些方面的方法开始，发展到现在更加全面，人工智能设计通过将系统发育分析与原子设计相结合，在保持蛋白质主要分子活性的同时，溶解性、热稳定性和抗聚集性也有了显著改善^[99]。

尽管在氨基酸序列的从头设计方面取得了重大突破，但当前的计算机蛋白质设计仍存在明显的局限性，为了克服这些短板，需要计算模型来补充当前的模型和实验工具来为理论提供广泛的反馈。刘海燕等开发了一种用于蛋白质设计的神经网络能量函数模型，补充和完善了已有模型的缺点^[100]。Guerois等^[101]开发了一种计算机算法——FOLDEF，可以快速定量估计蛋白质和蛋白质复合物稳定性的相互作用，该能量函数使用最少的计算资源，因此可以很容易地用于蛋白质设计算法以及蛋白质结构和折叠途径预测领域。Meng等开发了一种新的突变设计工具——Premuse，用来整合基于自然序列进化的首选突变序列比对和定量选择，使用Premue对*I. sakaiensis* 201-F6来源的IsPETase进行计算，最后从1486个同源序列中筛选出双点突变体W159H/F229Y，在40℃下，PET的降解活性增加了近40倍^[102]。崔颖璐等^[103]设计了一个蛋白质工程的贪婪累积策略——GRAPE，利用聚类算法和贪婪算法优点，大幅规避了不同突变位点间的负协同作用，短时间内最大限度地探索序列空间叠加路径，提高了来自*I. sakaiensis*的PETase的热稳定性，通过聚类分析结合计算得出有益突变的贪婪积累，重新设计出一种变体DuraPETase，该突变体的表观熔融温度较野生型提高31℃，可以在温和条件下将2 g/L微塑料完全生物降解为水溶性产物。Marty团队利用计算机辅助酶工程技术，对PET水解酶LCC重新设计，实现了在不到10 h的时间内将酶催化的PET解聚，提高了90%的转化率^[93]。Knott等^[104]从对苯二甲酸单酯水解酶（MHETase）的结构、生化和生物

信息学的方法出发，利用计算机分析MHETase与PETase的协同作用，研究了该酶体系对PET的催化级联反应，发现双酶体系下的水解效率比只有PETase存在情况下提高了3倍，这给双酶PET降解系统提高了研究方向。科研人员通过动力学模拟和分子分层计算方法（ONIOM）分析了MHETase的催化机制，利用高理论水平和广泛抽样的结合生成了稳健的计算预测，这些信息可以更详细了解MHETase催化功能以及开发更高活性的突变体^[105]。

智能计算已经发展到以原子级精度进行从头设计各种结构的地步，迄今为止，几乎所有的蛋白质工程都涉及对天然蛋白质的修饰^[106]（图5）。一系列的计算设计模型在实验中展现出极大利好，在蛋白质改造领域拥有广阔前景。

3.2 PET原材料的绿色设计

塑料制品因耐用而被广泛使用，但自身降解也变成极大的挑战，绝大多数塑料即使被降解后也逃离不了被填埋的命运，号称可“生物降解”塑料最后也和普通塑料一样降解不彻底，最后也被填埋进入生态环境，给人类健康带来隐患。Xu等为了制造出真正可降解、不留隐患的塑料，所以直接将能降解塑料的聚酯酶作为原料，添加到塑料生产的过程中，将数十亿个被包裹起来的酶与塑料树脂珠进行混合，用于塑料生产，只要加上水和热量，这些酶就会发挥功效降解塑料，说明通过使用具有活性位点暴露在表面的酶来设计酶-保护剂-聚合物的复合物是可行的^[107]。利用这一技术所生产出的新型塑料，98%可降解成小分子，且不会产生微塑料等对环境有害的物质。通过把合成PET的石油基原材料TPA、EG等转变成生物质来源的原料，最后合成生物PET（Bio-PET），不仅减少了对原始PET的依赖，也提高了Bio-PET降解率。目前已知的途径都不能利用中间体直接生产TPA，但是有科学家提出莽草酸途径可用于生产对甲苯甲酸，随后将其转化为TPA^[108]。更加可持续、环保的原材料木质素可以作为原料，利用生物乙醇途径生产Bio-PET的原材料^[109]。Lee等^[110]还发现利用对二甲苯可实现TPA的生物合

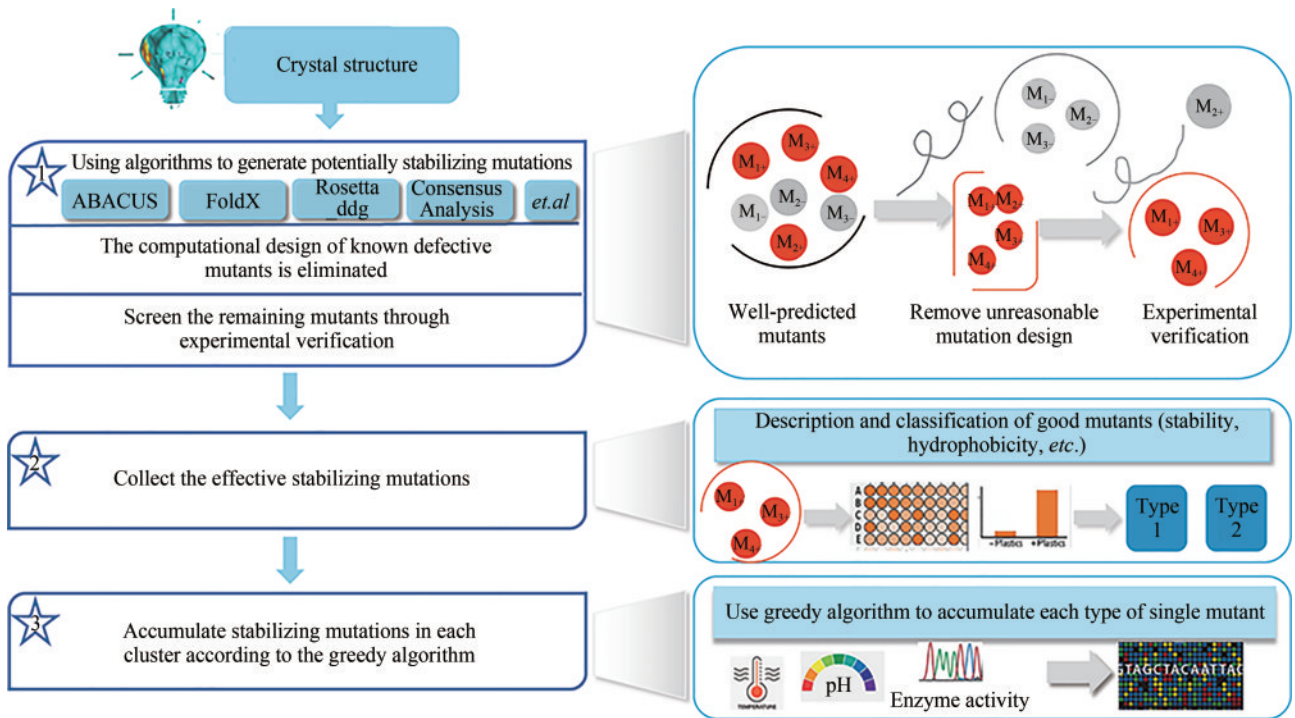


图5 智能计算策略

Fig. 5 Schematic diagram of smart-computing strategy

成。EG占Bio-PET聚合物重量的30%，很多科学家利用微生物从可再生植物原料中获得了EG^[111]；和TPA一样，EG也能利用生物质直接获得，可以通过纤维素脱水、木糖醇氢解和废弃秸秆加氢而形成^[112]。科研人员利用塑料薄膜A（30%淀粉、70%塑料和添加剂）和塑料薄膜B（95%以上塑料、少量添加剂）作为底物研究黄粉虫（yellow meal worms）对改良塑料的降解，发现A类塑料在25 d内被完全降解^[113]；Ganesan等应用酶嵌入聚合物的表面浇注方法，把南极念珠菌脂肪酶包埋在塑料薄膜中，嵌入了2%~8%重量脂肪酶的聚己内酯（PCL）塑料薄膜，随着脂肪酶含量和孵育天数的增加，塑料薄膜的失重增加^[114]。通过将薄膜分割成更小的碎片，加速嵌入酶降解的速度，这可作为微塑料生物降解的模型实验，具有特定嵌入酶和包埋法生产的各种可生物降解塑料将有助于解决全球环境问题，这些方法也可以为PET的绿色设计所借鉴。

4 前景与展望

近年来，科研人员发现了许多可降解PET的

酶和微生物，在PET的酶法降解与催化机制方面取得了重大进展^[115-117]，合成生物学和蛋白质工程的快速发展为发现、表征和修饰PET降解酶提供了一系列强大的工具，包括Toulouse White Biotechnology（TWB）在内的多家公司已经具备完整的PET降解工业链。尽管降解技术和资源发展迅猛，但聚酯水解酶对PET的有效水解仍然为生物催化PET废物回收技术的进一步发展提出了许多挑战，现存许多问题还有待突破：PET水解酶只能水解非晶体部分，而对于晶体部分的水解效率极低，所以还无法降解高结晶度的产品；从PET塑料到高附加值产品高效转化的代谢路径还有待构建，另外还有一系列问题需进一步解决。

（1）开发新型PET聚酯水解酶筛选方法：目前基于琼脂平板的筛选方法灵敏度和通量相对较低，所以需要开发高效的高通量筛选方法来更高效和准确地识别新的塑料降解酶，如液滴微流控的分选手段极大推动了新酶挖掘和突变体的筛选，这一技术手段的更新将有望从源头上解决高晶体产品的降解工作；人工智能在挖掘微生物和酶方面也有很大潜能，以Python爬虫为代表，目前，该应用主要集中在公众热点问题的分析中，但这

一技术的优点使得 Python 网络爬虫在文献分析中显现出巨大优势。这一技术手段无疑将为塑料降解微生物及新酶基因筛选与挖掘提供重要的参考价值。

(2) PET 聚酯水解酶结构-功能关系解析: 因为对塑料降解酶的结构与功能的理解相对缺乏, 所以现在的很多合理的设计方法都是经验性的, 精确预测突变位点还很困难, 计算机辅助模拟和人工智能的发展可能会对酶结构-功能关系的认识不断增加, 有望以更具预测性和精确性的方式指导 PET 聚酯水解酶的改造工作。

(3) 多酶催化/全细胞催化体系构建: PET 在被降解过程中会产生 BHET 和 MHET 等中间产物, 会与 PET 竞争酶的底物结合位点, 影响酶的降解效率, 发展多酶级联反应和共固定化技术不仅可以做到高效降解, 还可以在酶的循环利用方面取得重大突破; 全细胞体系的构建可以很大程度上提高降解酶的 pH 和稳定性, 寻找合适的宿主微生物在应对工业塑料降解环境中发挥高效降解将有很大前景。

(4) 构建高附加值产品转化代谢路径: 因为塑料结构复杂和解聚条件差异性等原因导致解聚产物众多从而产生二次污染, 现有技术还不能做到 PET 绿色回收, 建立高附加值产品转化代谢路径不仅可以做到保护生态环境, 而且能带动经济循环发展, 通过定向挖掘可以利用解聚产物的微生物, 如何应用合成生物学构建合适的代谢路径, 将有望做到真正的零污染、高回收。

(5) 可降解塑料的研发创新: 现行塑料降解条件苛刻、降解过程复杂等诸多因素影响降解效果, 尤其是对于高结晶度的产品, 在不改变实用性的前提下, 寻找合适的方式向塑料中添加碳源等添加剂、基于仿生思想设计新型可降解塑料在此后的塑料降解研究中也可作为一个探索方向。

(6) 其他方面的创新突破: 目前 PET 降解酶可在大肠杆菌、毕赤酵母等宿主中进行可溶性表达, 但是 PETase 等水解酶异源表达水平还较低, 利用现代生物技术克服异源表达中蛋白质之间的相互作用有望突破这一瓶颈; 利用传统的物理化学诱变手段来筛选具有特殊功能的塑料降解菌也是一个研究方向; 此外, 可以开发对 PET 的预处理方式来改善提高降解效率。

参 考 文 献

- [1] FEIL A, PRETZ T. Mechanical recycling of packaging waste[M]. Plastic Waste and Recycling. Amsterdam: Elsevier, 2020: 283-319.
- [2] BORRELLE S B, RINGMA J, LAW K L, et al. Predicted growth in plastic waste exceeds efforts to mitigate plastic pollution[J]. Science, 2020, 369(6510): 1515-1518.
- [3] MOORE C J. Synthetic polymers in the marine environment: a rapidly increasing, long-term threat[J]. Environmental Research, 2008, 108(2): 131-139.
- [4] TEUTEN E L, SAQUING J M, KNAPPE D R U, et al. Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences, 2009, 364(1526): 2027-2045.
- [5] 许楹, 殷超凡, 岳纹龙, 等. 石油基塑料的微生物降解[J]. 生物工程学报, 2019, 35(11): 2092-2103.
XU Y, YIN C F, YUE W L, et al. Microbial degradation of petroleum-based plastics[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2019, 35(11): 2092-2103.
- [6] CATHERINE, NOVELLI. Rethinking the future of plastics [J]. Waste Management World, 2016, 17(1): 15-15.
- [7] GEYER R, JAMBECK J R, LAW K L. Production, use, and fate of all plastics ever made[J]. Science Advances, 2017, 3(7): e1700782.
- [8] 魏鑫嘉, 刘博洋, 王鸣, 等. 废塑料裂解及塑料油精制研究进展[J]. 工业催化, 2019, 27(2): 31-34.
WEI X J, LIU B Y, WANG M, et al. Progress in pyrolysis of waste plastics and refining of waste plastic oil [J]. Industrial Catalysis, 2019, 27(2): 31-34.
- [9] GU J D. Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2003, 52(2): 69-91.
- [10] LEAHY J G, COLWELL R R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment[J]. Microbiological Reviews, 1990, 54(3): 305-315.
- [11] SATTI S M, SHAH A A. Polyester-based biodegradable plastics: an approach towards sustainable development[J]. Letters in Applied Microbiology, 2020, 70(6): 413-430.
- [12] STEFFAN R. Consequences of microbial interactions with hydrocarbons, oils, and lipids: biodegradation and bioremediation[M]. Cham: Springer International Publishing, 2018.
- [13] TANIGUCHI I, YOSHIDA S, HIRAGA K, et al. Biodegradation of PET: current status and application aspects[J]. ACS Ca-

- talysis, 2019, 9(5): 4089-4105.
- [14] ZHU B T, WANG D, WEI N. Enzyme discovery and engineering for sustainable plastic recycling[J]. Trends in Biotechnology, 2022, 40(1): 22-37.
- [15] CARDENAS E, TIEDJE J M. New tools for discovering and characterizing microbial diversity[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2008, 19(6): 544-549.
- [16] DEVARAPALLI P, KUMAVATH R N. Metagenomics—a technological drift in bioremediation[M]// SHIOMI N. Advances in bioremediation of wastewater and polluted soil. IntechOpen, 2015.
- [17] SANKARA SUBRAMANIAN S H, BALACHANDRAN K R S, RANGAMARAN V R, et al. RemeDB: tool for rapid prediction of enzymes involved in bioremediation from high-throughput metagenome data sets[J]. Journal of Computational Biology: a Journal of Computational Molecular Cell Biology, 2020, 27(7): 1020-1029.
- [18] MÜLLER C A, PERZ V, PROVASNEK C, et al. Discovery of polyesters from moss-associated microorganisms[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017, 83(4): e02641-e02616.
- [19] SULAIMAN S, YAMATO S, KANAYA E, et al. Isolation of a novel cutinase homolog with polyethylene terephthalate-degrading activity from leaf-branch compost by using a metagenomic approach[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(5): 1556-1562.
- [20] GAYTÁN I, SÁNCHEZ-REYES A, BURELO M, et al. Degradation of recalcitrant polyurethane and xenobiotic additives by a selected landfill microbial community and its biodegradative potential revealed by proximity ligation-based metagenomic analysis[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 10: 2986.
- [21] HAJIGHASEMI M, TCHIGVINTSEV A, NOCEK B, et al. Screening and characterization of novel polyesters from environmental metagenomes with high hydrolytic activity against synthetic polyesters[J]. Environmental Science & Technology, 2018, 52(21): 12388-12401.
- [22] WEINBERGER S, BEYER R, SCHÜLLER C, et al. High throughput screening for new fungal polyester hydrolyzing enzymes[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 554.
- [23] URBANEK A K, MIROŃCZUK A M, GARCÍA-MARTÍN A, et al. Biochemical properties and biotechnological applications of microbial enzymes involved in the degradation of polyester-type plastics[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, 2020, 1868(2): 140315.
- [24] DANSO D, SCHMEISSER C, CHOW J, et al. New insights into the function and global distribution of polyethylene terephthalate (PET)-degrading bacteria and enzymes in marine and terrestrial metagenomes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(8): e02773-e02717.
- [25] KANG C H, OH K H, LEE M H, et al. A novel family VII esterase with industrial potential from compost metagenomic library[J]. Microbial Cell Factories, 2011, 10: 41.
- [26] UFARTÉ L, LAVILLE É, DUQUESNE S, et al. Metagenomics for the discovery of pollutant degrading enzymes[J]. Biotechnology Advances, 2015, 33(8): 1845-1854.
- [27] MAYUMI D, AKUTSU-SHIGENO Y, UCHIYAMA H, et al. Identification and characterization of novel poly(DL-lactic acid) depolymerases from metagenome[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 79(5): 743-750.
- [28] JACQUIN J, CHENG J G, ODOBEL C, et al. Microbial ecotoxicology of marine plastic debris: a review on colonization and biodegradation by the "plastisphere"[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 865.
- [29] SANDER M, KOHLER H P E, MCNEILL K. Assessing the environmental transformation of nanoplastic through ¹³C-labelled polymers[J]. Nature Nanotechnology, 2019, 14(4): 301-303.
- [30] STURMBERGER L, WALLACE P W, GLIEDER A, et al. Synergism of proteomics and mRNA sequencing for enzyme discovery[J]. Journal of Biotechnology, 2016, 235: 132-138.
- [31] SCHNEIDER T, GERRITS B, GASSMANN R, et al. Proteome analysis of fungal and bacterial involvement in leaf litter decomposition[J]. Proteomics, 2010, 10(9): 1819-1830.
- [32] BISWAS R, SARKAR A. 'Omics' tools in soil microbiology: the state of the art[M]// Advances in soil microbiology: recent trends and future prospects. Springer, 2018: 35-64.
- [33] TESEI D, QUARTINELLO F, GUEBITZ G M, et al. Shotgun proteomics reveals putative polyesters in the secretome of the rock-inhabiting fungus *Knufia chersonesos*[J]. Scientific Reports, 2020, 10: 9770.
- [34] ZADJELOVIC V, CHHUN A, QUARESHY M, et al. Beyond oil degradation: Enzymatic potential of *Alcanivorax* to degrade natural and synthetic polyesters[J]. Environmental Microbiology, 2020, 22(4): 1356-1369.
- [35] WALLACE P W, HAERNVALL K, RIBITSCH D, et al. PpEst is a novel PBAT degrading polyesterase identified by proteomic screening of *Pseudomonas pseudoalcaligenes*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(6): 2291-2303.
- [36] JHONG J H, CHI Y H, LI W C, et al. dbAMP: an integrated re-

- source for exploring antimicrobial peptides with functional activities and physicochemical properties on transcriptome and proteome data[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 47(D1): D285-D297.
- [37] 钱秀娟, 刘嘉唯, 薛瑞, 等. 合成生物学助力废弃塑料资源生物解聚与升级再造[J]. *合成生物学*, 2021, 2(2): 161-180.
QIAN X J, LIU J W, XUE R, et al. Synthetic biology boosts biological depolymerization and upgrading of waste plastics[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2021, 2(2): 161-180.
- [38] RONKVIST Å M, XIE W C, LU W H, et al. Cutinase-catalyzed hydrolysis of poly(ethylene terephthalate)[J]. *Macromolecules*, 2009, 42(14): 5128-5138.
- [39] FEUERHACK A, ALISCH-MARK M, KISNER A, et al. Biocatalytic surface modification of knitted fabrics made of poly(ethylene terephthalate) with hydrolytic enzymes from *Thermobifida fusca* KW3b[J]. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2008, 26(5):357-364.
- [40] MÜLLER R J, SCHRADER H, PROFE J, et al. Enzymatic degradation of poly(ethylene terephthalate): rapid hydrolyse using a hydrolase from *T. fusca*[J]. *Macromolecular Rapid Communications*, 2005, 26(17): 1400-1405.
- [41] KLEEBERG I, WELZEL K, VANDENHEUVEL J, et al. Characterization of a new extracellular hydrolase from *Thermobifida fusca* degrading aliphatic-aromatic copolyesters[J]. *Biomacromolecules*, 2005, 6(1): 262-270.
- [42] BAKER P J, POULTNEY C, LIU Z Q, et al. Identification and comparison of cutinases for synthetic polyester degradation[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93(1): 229-240.
- [43] HU X P, THUMARAT U, ZHANG X, et al. Diversity of polyester-degrading bacteria in compost and molecular analysis of a thermoactive esterase from *Thermobifida alba* AHK119[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87(2): 771-779.
- [44] RIBITSCH D, ACERO E H, GREIMEL K, et al. Characterization of a new cutinase from *Thermobifida alba* for PET-surface hydrolysis[J]. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2012, 30(1): 2-9.
- [45] ACERO H E, RIBITSCH D, STEINKELLNER G, et al. Enzymatic surface hydrolysis of PET: effect of structural diversity on kinetic properties of cutinases from *Thermobifida*[J]. *Macromolecules*, 2011, 44(12): 4632-4640.
- [46] RONKVIST Å M, XIE W C, LU W H, et al. Cutinase-catalyzed hydrolysis of poly(ethylene terephthalate)[J]. *Macromolecules*, 2009, 42(14): 5128-5138.
- [47] ODA M, YAMAGAMI Y, INABA S, et al. Enzymatic hydrolysis of PET: functional roles of three Ca²⁺ ions bound to a cutinase-like enzyme, Cut190*, and its engineering for improved activity[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(23): 10067-10077.
- [48] SULAIMAN S, YOU D J, KANAYA E, et al. Crystal structure and thermodynamic and kinetic stability of metagenome-derived LC-cutinase[J]. *Biochemistry*, 2014, 53(11): 1858-1869.
- [49] KLEEBERG I, WELZEL K, VANDENHEUVEL J, et al. Characterization of a new extracellular hydrolase from *Thermobifida fusca* degrading aliphatic-aromatic copolyesters[J]. *Biomacromolecules*, 2005, 6(1): 262-270.
- [50] RIBITSCH D, HERRERO ACERO E, GREIMEL K, et al. A new esterase from *Thermobifida halotolerans* hydrolyses poly(ethylene terephthalate (PET) and polylactic acid (PLA) [J]. *Polymers*, 2012, 4(1): 617-629.
- [51] RUIZ C, HOWARD G T. Nucleotide sequencing of a polyurethanase gene (*puA*) from *Pseudomonas fluorescens*[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 1999, 44(2/3): 127-131.
- [52] ANDERSEN B K, BORCH K, ABO M, et al. Method of treating polyester fabrics: US5997584[P]. 1999-12-07.
- [53] FERNANDEZ-LAFUENTE R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: uses and prospects as an industrial biocatalyst[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2010, 62(3/4): 197-212.
- [54] WANG X, LU D, JÖNSSON L J, et al. Preparation of a PET-hydrolyzing lipase from *Aspergillus oryzae* by the addition of bis (2-hydroxyethyl) terephthalate to the culture medium and enzymatic modification of PET fabrics[J]. *Engineering in Life Sciences*, 2008, 8(3): 268-276.
- [55] UCHIDA H, SHIGENO-AKUTSU Y, NOMURA N, et al. Cloning and sequence analysis of poly(tetramethylene succinate) depolymerase from *Acidovorax delafieldii* strain BS-3[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2002, 93(2): 245-247.
- [56] YOSHIDA S, HIRAGA K, TAKEHANA T, et al. A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate) [J]. *Science*, 2016, 351(6278): 1196-1199.
- [57] YANG Y, YANG J, JIANG L. Comment on "A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate)"[J]. *Science*, 2016, 353(6301): 759.
- [58] FECKER T, GALAZ-DAVISON P, ENGELBERGER F, et al. Active site flexibility as a hallmark for efficient PET degradation by *I. sakaiensis* PETase[J]. *Biophysical Journal*, 2018, 114(6): 1302-1312.
- [59] JOO S, CHO I J, SEO H, et al. Structural insight into molecu-

- lar mechanism of poly(ethylene terephthalate) degradation[J]. Nature Communications, 2018, 9: 382.
- [60] HAN X, LIU W D, HUANG J W, et al. Structural insight into catalytic mechanism of PET hydrolase[J]. Nature Communications, 2017, 8: 2106.
- [61] PERZ V, BAUMSCHLAGER A, BLEYMAIER K, et al. Hydrolysis of synthetic polyesters by *Clostridium botulinum* esterases[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2016, 113(5): 1024-1034.
- [62] KITADOKORO K, THUMARAT U, NAKAMURA R, et al. Crystal structure of cutinase Est119 from *Thermobifida alba* AHK119 that can degrade modified polyethylene terephthalate at 1.76 Å resolution[J]. Polymer Degradation and Stability, 2012, 97(5): 771-775.
- [63] NUMOTO N, KAMIYA N, BEKKER G J, et al. Structural dynamics of the PET-degrading cutinase-like enzyme from *Saccharomonospora viridis* AHK190 in substrate-bound states elucidates the Ca²⁺-driven catalytic cycle[J]. Biochemistry, 2018, 57(36): 5289-5300.
- [64] INABA S, KAMIYA N, BEKKER G J, et al. Folding thermodynamics of PET-hydrolyzing enzyme Cut190 depending on Ca²⁺ concentration[J]. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 2019, 135(5): 2655-2663.
- [65] BOLLINGER A, THIES S, KNIPEPS-GRÜNHAGEN E, et al. A novel polyester hydrolase from the marine bacterium *Pseudomonas aestusnigri*-structural and functional insights[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 114.
- [66] NIMCHUA T, EVELEIGH D E, SANGWATANAROJ U, et al. Screening of tropical fungi producing polyethylene terephthalate-hydrolyzing enzyme for fabric modification[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2008, 35(8): 843.
- [67] NIMCHUA T, PUNNAPAYAK H, ZIMMERMANN W. Comparison of the hydrolysis of polyethylene terephthalate fibers by a hydrolase from *Fusarium oxysporum* LCH I and *Fusarium solani* f. sp. *pisi*[J]. Biotechnology Journal, 2007, 2(3): 361-364.
- [68] DE CASTRO A M, CARNIEL A, NICOMEDES JUNIOR J, et al. Screening of commercial enzymes for poly(ethylene terephthalate) (PET) hydrolysis and synergy studies on different substrate sources[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2017, 44(6): 835-844.
- [69] JABLOUNE R, KHALIL M, BEN MOUSSA I E, et al. Enzymatic degradation of *p*-nitrophenyl esters, polyethylene terephthalate, cutin, and suberin by Sub1, a suberinase encoded by the plant pathogen *Streptomyces scabies*[J]. Microbes and Environments, 2020, 35(1): ME19086.
- [70] FARZI A, DEHNAD A, FOTOUHI A F. Biodegradation of polyethylene terephthalate waste using *Streptomyces* species and kinetic modeling of the process[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2019, 17: 25-31.
- [71] BEAULIEU C, SIDIBÉ A, JABLOUNE R, et al. Physical, chemical and proteomic evidence of potato suberin degradation by the plant pathogenic bacterium *Streptomyces scabies*[J]. Microbes and Environments, 2016, 31(4): 427-434.
- [72] LIEBMINGER S, EBERL A, SOUSA F, et al. Hydrolysis of PET and bis-(benzoyloxyethyl) terephthalate with a new poly-esterase from *Penicillium citrinum*[J]. Biocatalysis and Bio-transformation, 2007, 25(2/3/4): 171-177.
- [73] KONTKANEN H, SALOHEIMO M, PERE J, et al. Characterization of *Melanocarpus albomyces* steryl esterase produced in *Trichoderma reesei* and modification of fibre products with the enzyme[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 72(4): 696-704.
- [74] HEUMANN S, EBERL A, POBEHEIM H, et al. New model substrates for enzymes hydrolysing polyethyleneterephthalate and polyamide fibres[J]. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 2006, 69(1/2): 89-99.
- [75] KIKKAWA Y, FUJITA M, ABE H, et al. Effect of water on the surface molecular mobility of poly(lactide) thin films: an atomic force microscopy study[J]. Biomacromolecules, 2004, 5(4): 1187-1193.
- [76] KAWAI F, ODA M, TAMASHIRO T, et al. A novel Ca²⁺-activated, thermostabilized polyesterase capable of hydrolyzing polyethylene terephthalate from *Saccharomonospora viridis* AHK190[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(24): 10053-10064.
- [77] KAZA S, YAO L C, BHADA-TATA P, et al. What a waste 2.0: a global snapshot of solid waste management to 2050[M]. Washington: World Bank Group, 2018.
- [78] BARTH M, HONAK A, OESER T, et al. A dual enzyme system composed of a polyester hydrolase and a carboxylesterase enhances the biocatalytic degradation of polyethylene terephthalate films[J]. Biotechnology Journal, 2016, 11(8): 1082-1087.
- [79] QIAO Y X, HU R, CHEN D W, et al. Fluorescence-activated droplet sorting of polyethylene terephthalate degrading enzymes[J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 424:127417.
- [80] SILVA C, DA S, SILVA N, et al. Engineered *Thermobifida fusca* cutinase with increased activity on polyester substrates[J]. Biotechnology Journal, 2011, 6(10): 1230-1239.

- [81] ARAÚJO R, SILVA C, O'NEILL A, et al. Tailoring cutinase activity towards polyethylene terephthalate and polyamide 6,6 fibers[J]. *Journal of Biotechnology*, 2007, 128(4): 849-857.
- [82] CHEN Z Z, WANG Y Y, CHENG Y Y, et al. Efficient biodegradation of highly crystallized polyethylene terephthalate through cell surface display of bacterial PETase[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 709: 136138.
- [83] CARNIEL A, VALONI É, NICOMEDES J, et al. Lipase from *Candida antarctica* (CALB) and cutinase from *Humicola insolens* act synergistically for PET hydrolysis to terephthalic acid[J]. *Process Biochemistry*, 2017, 59: 84-90.
- [84] MIYAKAWA T, MIZUSHIMA H, OHTSUKA J, et al. Structural basis for the Ca²⁺-enhanced thermostability and activity of PET-degrading cutinase-like enzyme from *Saccharomonospora viridis* AHK190[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(10): 4297-4307.
- [85] THEN J, WEI R, OESER T, et al. Ca²⁺ and Mg²⁺ binding site engineering increases the degradation of polyethylene terephthalate films by polyester hydrolases from *Thermobifida fusca*[J]. *Biotechnology Journal*, 2015, 10(4): 592-598.
- [86] BIUNDO A, REICH J, RIBITSCH D, et al. Synergistic effect of mutagenesis and truncation to improve a polyesterase from *Clostridium botulinum* for polyester hydrolysis[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 3745.
- [87] SENG A, HANTANI Y, BEKKER G J, et al. Metal binding to cutinase-like enzyme from *Saccharomonospora viridis* AHK190 and its effects on enzyme activity and stability[J]. *The Journal of Biochemistry*, 2019, 166(2): 149-156.
- [88] AUSTIN H P, ALLEN M D, DONOHOE B S, et al. Characterization and engineering of a plastic-degrading aromatic polyesterase[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(19): E4350-E4357.
- [89] SON H F, CHO I J, JOO S, et al. Rational protein engineering of thermo-stable PETase from *Ideonella sakaiensis* for highly efficient PET degradation[J]. *ACS Catalysis*, 2019, 9(4): 3519-3526.
- [90] SON H F, JOO S, SEO H, et al. Structural bioinformatics-based protein engineering of thermo-stable PETase from *Ideonella sakaiensis*[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2020, 141: 109656.
- [91] BIUNDO A, SUBAGIA R, MAURER M, et al. Switched reaction specificity in polyesterases towards amide bond hydrolysis by enzyme engineering[J]. *RSC Advances*, 2019, 9(62): 36217-36226.
- [92] NAKAMURA A, KOBAYASHI N, KOGA N, et al. Positive charge introduction on the surface of thermostabilized PET hydrolase facilitates PET binding and degradation[J]. *ACS Catalysis*, 2021, 11(14): 8550-8564.
- [93] TOURNIER V, TOPHAM C M, GILLES A, et al. An engineered PET depolymerase to break down and recycle plastic bottles[J]. *Nature*, 2020, 580(7802): 216-219.
- [94] THEN J, WEI R, OESER T, et al. A disulfide bridge in the calcium binding site of a polyester hydrolase increases its thermal stability and activity against polyethylene terephthalate[J]. *Biochemistry & Molecular Biology*, 2016, 6(5): 425-32.
- [95] RIBITSCH D, HERRERO ACERO E, PRZYLUCKA A, et al. Enhanced cutinase-catalyzed hydrolysis of polyethylene terephthalate by covalent fusion to hydrophobins[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(11): 3586-3592.
- [96] CHEN K, HU Y, DONG X Y, et al. Molecular insights into the enhanced performance of EKylated PETase toward PET degradation[J]. *ACS Catalysis*, 2021, 11(12): 7358-7370.
- [97] LIU B, HE L H, WANG L P, et al. Protein crystallography and site-direct mutagenesis analysis of the poly(ethylene terephthalate) hydrolase PETase from *Ideonella sakaiensis*[J]. *Chembiochem*, 2018, 19(14): 1471-1475.
- [98] REN W, OESER T, SCHMIDT J, et al. Engineered bacterial polyester hydrolases efficiently degrade polyethylene terephthalate due to relieved product inhibition[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2016, 113(8): 1658-1665.
- [99] HUANG Q Y, HIYAMA M, KABE T, et al. Enzymatic self-biodegradation of poly (L-lactic acid) films by embedded heat-treated and immobilized proteinase K[J]. *Biomacromolecules*, 2020, 21(8): 3301-3307.
- [100] HUANG B, XU Y, HU X H, et al. A backbone-centred energy function of neural networks for protein design[J]. *Nature*, 2022, 602(7897): 523-528.
- [101] GUEROIS R, NIELSEN J E, SERRANO L. Predicting changes in the stability of proteins and protein complexes: a study of more than 1000 mutations[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2002, 320(2): 369-387.
- [102] MENG X X, YANG L X, LIU H Q, et al. Protein engineering of stable IsPETase for PET plastic degradation by Premuse[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 180: 667-676.
- [103] CUI Y L, CHEN Y C, LIU X Y, et al. Computational redesign of a PETase for plastic biodegradation under ambient condition by the GRAPE strategy[J]. *ACS Catalysis*, 2021, 11(3): 1340-1350.
- [104] KNOTT B C, ERICKSON E, ALLEN M D, et al. Characterization and engineering of a two-enzyme system for plastics depolymerization[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(41): 25476-25485.
- [105] PINTO A V, FERREIRA P, NEVES R P P, et al. Reaction

- mechanism of MHETase, a PET degrading enzyme[J]. ACS Catalysis, 2021, 11(16): 10416-10428.
- [106] HUANG P S, BOYKEN S E, BAKER D. The coming of age of de novo protein design[J]. Nature, 2016, 537(7620): 320-327.
- [107] DELRE C, JIANG Y F, KANG P, et al. Near-complete depolymerization of polyesters with nano-dispersed enzymes[J]. Nature, 2021, 592(7855): 558-563.
- [108] OSTERHOUT R E, BURGARD A P, PHARKYA P, et al. Microorganisms and methods for the biosynthesis of aromatics, 2, 4-pentadienoate and 1,3-butadiene: US8715957 [J]. 2012.
- [109] GRAGLIA M, KANNA N, ESPOSITO D. Lignin refinery: towards the preparation of renewable aromatic building blocks[J]. ChemBioEng Reviews, 2015, 2(6): 377-392.
- [110] LUO Z W, LEE S Y. Biotransformation of *p*-xylene into terephthalic acid by engineered *Escherichia coli*[J]. Nature Communications, 2017, 8: 15689.
- [111] SALUSJÄRVI L, HAVUKAINEN S, KOIVISTOINEN O, et al. Biotechnological production of glycolic acid and ethylene glycol: current state and perspectives[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(6): 2525-2535.
- [112] PANG J F, ZHENG M Y, WANG A Q, et al. Catalytic hydrogenation of corn stalk to ethylene glycol and 1,2-propylene glycol[J]. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2011, 50(11): 6601-6608.
- [113] 张可, 胡芮绮, 蔡珉敏, 等. 黄粉虫取食和消化降解PE塑料薄膜的研究[J]. 化学与生物工程, 2017, 34(4): 47-49.
ZHANG K, HU R Q, CAI M M, et al. Degradation of plastic film containing polyethylene(PE) by yellow meal worms[J]. Chemistry & Bioengineering, 2017, 34(4): 47-49.
- [114] KHAN I, NAGARJUNA R, DUTTA J R, et al. Enzyme-embedded degradation of poly(ϵ -caprolactone) using lipase-derived from probiotic *Lactobacillus plantarum*[J]. ACS Omega, 2019, 4(2): 2844-2852.
- [115] CHEN X Q, GUO Z Y, WANG L, et al. Directional-path modification strategy enhances PET hydrolase catalysis of plastic degradation[J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 433: 128816.
- [116] PALM G J, REISKY L, BÖTTCHER D, et al. Structure of the plastic-degrading *Ideonella sakaiensis* MHETase bound to a substrate[J]. Nature Communications, 2019, 10: 1717.
- [117] LU H, DIAZ DJ, CZARNECKI NJ, et al. Machine learning-aided engineering of hydrolases for PET depolymerization[J]. Nature, 2022, 604(7907) :662-667.



通讯作者: 毛淑红(1977—),女,博士,教授。研究方向为微生物催化转化。
E-mail: shuhongmao@tust.edu.cn



通讯作者: 秦慧民(1980—),男,博士,教授。研究方向为酶制剂的结构与功能研究。
E-mail: huiminqin@tust.edu.cn



第一作者: 李磊(1996—),男,硕士研究生。研究方向为酶工程与合成生物学。
E-mail: lilei20190520@163.com