

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2020-087

合成生物学助力废弃塑料资源生物解聚与升级再造

钱秀娟¹, 刘嘉唯¹, 薛瑞¹, 刘豪杰¹, 闻小红¹, 杨璐¹, 徐安明¹, 许斌¹, 信丰学^{1,2}, 周杰^{1,2}, 董维亮^{1,2}, 姜岷^{1,2}¹ 南京工业大学生物与制药工程学院, 江苏 南京 211816; ² 南京工业大学材料化学工程国家重点实验室, 江苏 南京 211816)

摘要: 石油基合成塑料因高分子量、高疏水性及高化学键能等特性难以被生物降解, 在环境中不断累积, 由此导致的“白色污染”已经成为一个全球性环境问题。填埋和焚烧是目前塑料垃圾处置最简单、常用的方法, 但随之带来的是更为严重的环境二次污染问题。为解决这一问题, 开发绿色高效的废塑料资源回收利用技术, 从源头解决塑料污染, 成为发展塑料循环经济的关键。利用微生物/酶将塑料降解为寡聚体或单体, 或进一步转化为高值化学品, 因反应条件温和、不产生二次污染等优点将成为废塑料污染治理与资源化的新途径。本文详细介绍了废塑料生物解聚与转化方面的最新研究进展, 包括塑料降解微生物和酶的挖掘、混菌/多酶体系的设计与构建、塑料解聚机制, 以及塑料解聚物到化学品、能源、材料等高附加值产品的转化。然而, 废塑料生物降解过程中仍存在降解元件匮乏、降解效率低、降解物难以利用等技术瓶颈。随着合成生物学的快速发展, 利用高通量筛选、进化代谢、生物信息学等先进的生物技术, 解析降解关键酶的催化机制、定向设计与改造降解酶、研究混菌体系中菌株间互利共生关系与适配机制、设计并构建不同塑料降解物的代谢通路成为废塑料生物降解研究的重点方向。通过建立废塑料生物降解与高值化利用平台, 可为巨量的废塑料资源循环利用提供新的理论基础和关键技术, 为我国塑料循环经济发展提供经济、环保、可行的技术支撑。

关键词: 废塑料; 生物解聚; 生物转化; 混菌/多酶; 升级再造

中图分类号: Q812 **文献标志码:** A

Synthetic biology boosts biological depolymerization and upgrading of waste plastics

QIAN Xiujuan¹, LIU Jiawei¹, XUE Rui¹, LIU Haojie¹, WEN Xiaohong¹, YANG Lu¹, XU Anming¹, XU Bin¹, XIN Fengxue¹, ZHOU Jie^{1,2}, DONG Weiliang^{1,2}, JIANG Min^{1,2}¹College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, Jiangsu, China; ²State Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, Jiangsu, China)

Abstract: Characteristics of high molecular weight, high hydrophobicity and high chemical bond energy make petroleum-

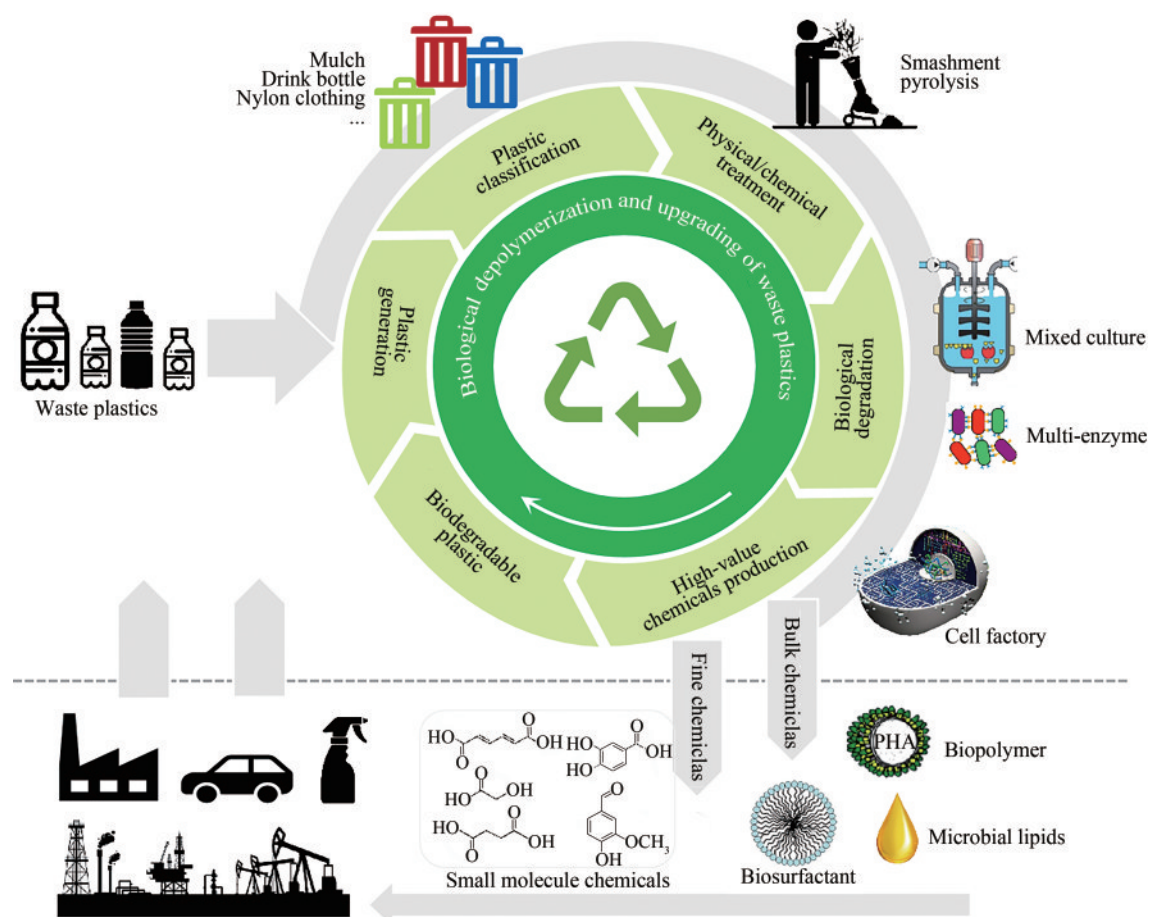
收稿日期: 2020-12-04 修回日期: 2021-02-11

基金项目: 国家自然科学基金国际(地区)合作与交流项目(31961133017); 国家重点研发计划“合成生物学”重点专项(2019YFA0905500); 国家自然科学基金(21978129, 22008115); 江苏省农业自主创新计划[CX(19)3104]; 江苏省研究生科研与实践创新计划(KYCX20_1100)

引用本文: 钱秀娟, 刘嘉唯, 薛瑞, 刘豪杰, 闻小红, 杨璐, 徐安明, 许斌, 信丰学, 周杰, 董维亮, 姜岷. 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

Citation: QIAN Xiujuan, LIU Jiawei, XUE Rui, LIU Haojie, WEN Xiaohong, YANG Lu, XU Anming, XU Bin, XIN Fengxue, ZHOU Jie, DONG Weiliang, JIANG Min. Synthetic biology boosts biological depolymerization and upgrading of waste plastics[J]. Synthetic Biology Journal, 2021, 2(2): 161-180

based synthetic plastics resist to abiotic and microbial degradation. "White pollution" caused by accumulated waste plastics in the environment has become a global challenge. Currently, landfill and incineration are the simplest and most commonly used methods for eliminating plastic wastes, given that only 20% of plastic wastes is recycled, but landfill and incineration cause more serious secondary hazards, such as pollution to groundwater, soil, air and ocean. Therefore, developing a green and efficient technology for recycling and reutilization plastic wastes is the key for solving plastic pollution, to boost a plastic recycling economy. Applications of microorganisms/enzymes to degrade plastics into oligomers or monomers, which can be further transformed into high-value added chemicals, have provided a new approach for such a purpose due to their mild and environmentally friendly processes. This article comprehensively reviews the development of biodepolymerization and biotransformation for waste plastics, including mining plastic degrading microorganisms and enzymes, designing and constructing microbial consortia/enzyme cocktails, analyzing of plastics depolymerization mechanism, and transforming plastics degradants into high value-added products, such as chemicals, energy products, and materials. However, the lack of degradation enzyme components, low degradation efficiency and difficulty for utilizing the degradants limit the development of waste plastics biogradation. With advances in synthetic biology, emerging technologies, such as high-throughput screening, evolutionary metabolism, and bioinformatics to analyze the catalytic mechanism of key degradation enzymes, orientedly designing and modification of degradation enzymes, study of the mutualism relationship and mechanism in the microbial consortia, constructing metabolic pathways for different plastic degradants, will open windows for waste plastics biodegradation, providing environmentally friendly, economically competitive and technically feasible technologies to develop circular economy for the re-utilization of waste plastics in China.



Keywords: waste plastics; biological depolymerization; biotransformation; microbial consortia/enzyme cocktails; re-utilization

塑料是重要的基础材料，为人类生产和生活带来了极大的便利。2019年，全球塑料产量达3.68亿吨，相比2018年增加900万吨^[1]。随着塑料应用领域的拓宽和使用量的急剧增加，废弃塑料不合理处置导致的“白色污染”问题已越来越被社会所关注。截至2018年，全球累计产量已超过90亿吨^[2]。而其中70%的塑料垃圾被填埋或者遗弃，11%被焚烧处理，只有19%的废塑料被回收利用^[3]。如图1所示，根据再生塑料资讯(CPRA)报道，2019年中国产生废塑料6300万吨，其中填埋量为2016万吨，占比32%；焚烧量1953万吨，占比31%；遗弃量为441万吨，占比7%；回收量为1890万吨，废塑料总体回收率为30%^[4]。此外，全球每年有约800万吨的塑料进入海洋，导致海洋动物吞食大量塑料微粒而死亡，这些塑料微粒甚至会通过海产品、海盐等途径富集到人体，最终威胁人类健康^[5-6]。

开发废弃塑料资源回收利用技术是解决“白色污染”问题的重要途径。当前回收塑料的处理方法主要有填埋、焚烧、再生利用和塑料油化^[7-8]。填埋法是处理废塑料的最常用方法，我国每年有约1400万吨的废旧塑料被填埋处理。然而废塑料在自然环境下很难被降解，塑料中的增塑

剂和添加剂渗出导致严重的土壤和水体污染；焚烧法可以回收大量的热量，且焚烧后的废旧塑料体积会减少90%以上。然而，焚烧产物除了CO₂和水外，还会产生多环芳烃化合物、酸性化合物等有害物质，造成严重的大气污染；再生利用法采用机械回收处理塑料废弃物，使其还原为类似的塑料产品进行循环使用。但是简单再生获得的塑料制品性能不高，且机械回收处理塑料废弃物需要耗费大量能源和人力资源，回收工艺复杂；塑料油化通过加热使塑料中的C—C键发生断裂，同时伴随着C—H键断裂，产生的自由基继续通过各种组合反应生成不同小分子烃类物质，为各种化工产品提供基础原料。但是，热解处理对塑料废弃物的清洁度、品质均匀性和化学试剂有较高要求，而实际回收过程中各种类型的塑料通常混合在一起，各批次的废塑料原料类型很难统一，这就对热解工艺、催化剂的实用性、活性和稳定性提出了很高的要求。综上所述，应用这些物理和化学方法对塑料的回收或是效率普遍偏低，或是回收过程是一种降级循环回收的路线(down-cycling)，经济性差，并且存在严重的环境二次污染问题。

回收手段的局限性成为限制塑料回收的主要

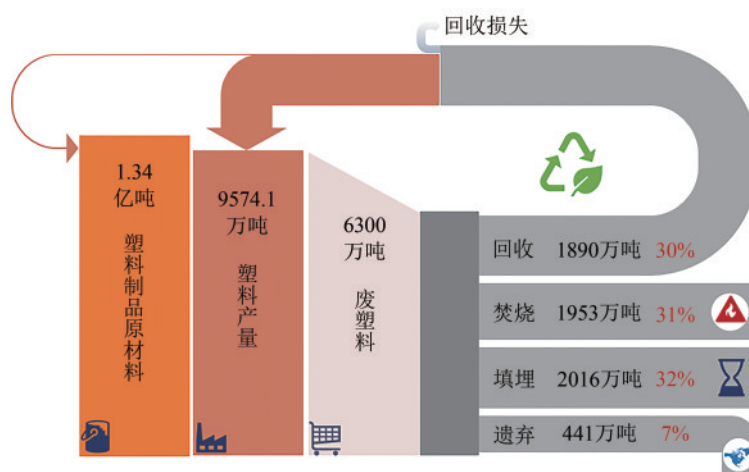


图1 2019年中国废塑料处理情况^[4]

Fig. 1 Fates for China's waste plastics in 2019^[4]

(According to 2019—2020 Development Report of China's Plastic Recycling Industry, in 2019, 134 million tons of primary plastic raw materials have been supplied in China, and the output of plastic products was 96 million tons. The generation of waste plastics was 63 million tons, of which 20 million tons went to landfill; 19 million tons was incinerated, 4 million tons was discarded, accounting for 30%, 32%, 31% and 7% of the total waste plastics, respectively. Only 19 million tons was recycled, accounting for 30% of the total plastics)

因素。近年来,探索塑料废弃物生物降解回收技术成为国内外研究的热点^[9-10]。利用合成生物学思想构建具有生物解聚功能的微生物或酶元件将塑料解聚为单体,反应条件温和,不产生二次污染,进一步利用合成生物学的技术策略搭建塑料解聚物到高附加值产品的生物转化线路,可实现废弃塑料资源的“升级再造”。因此,基于合成生物学技术组建的“生物解聚→生物降解→高值化生物转化”一体化生物回收过程,有望成为塑料废弃物回收处置的重要手段。本文综述了国内外关于塑料解聚微生物筛选、解聚酶挖掘与设计、塑料单体降解途径解析以及塑料降解物高值化生物炼制等方面的最新研究进展,以期为建立更加高效的“降塑再造”技术平台提供新的思路。

1 塑料生物解聚研究进展

根据分子组成及其结构的不同,塑料主要分为以下几种:聚烯烃[聚乙烯(PE)、聚丙烯(PP)]、聚氯乙烯(PVC)、聚苯乙烯(PS)、聚对苯二甲酸乙二酯(PET)、聚氨酯(PU)、聚乳酸(PLA)和聚羟基脂肪酸酯(PHA)等;根据解聚机制的不同,又可分为水解型塑料和非水解型塑料。

1.1 水解型塑料解聚微生物的筛选及解聚酶挖掘

水解型塑料主要指单体通过酯键聚合而成的高分子塑料,以PET、PU类为代表,该类聚合物的降解主要是通过断裂其内部的酯键来完成,其生物降解过程相对简单,目前已筛选获得来自于不同菌属的多种微生物对该类塑料具有降解效果,其降解途径也比较明确(表1)。

PET塑料是由对苯二甲酸和乙二醇通过酯键连接而成的高分子化合物,通常以无定形和半结晶的形式存在,主要用于饮料瓶等包装材料^[24]。微生物通过分泌一些胞外解聚酶,水解PET塑料中的酯键实现对聚合塑料的解聚,获得的小分子解聚物可被微生物进一步矿化为水和CO₂^[25]。结晶度是影响PET生物解聚的重要因素之一,结晶度越高,解聚难度越大。因此,研究人员通常采用无定形或低结晶度薄膜为模式底物,进行PET降解微生物的筛选和解聚特性的研究。目前报道的PET降解微生物主要包括腐皮镰孢菌(*F. solani*)^[11-12]、特异腐质霉(*H. insolens*)^[13]等,真菌和嗜热子囊菌(*T. fusca*)^[14-17]、绿色糖单孢菌(*S. viridis*)^[18]等放线菌(表1),但这些微生物大多只在PET表面进行降解改性,对实际PET塑料废弃物降解能力十分有限。2016年,Yoshida等^[19]分离出了一株细菌*I. sakaiensis* 201-F6,在30℃的条件下反

表1 水解型塑料降解微生物研究进展

Tab. 1 Microorganisms responsible for depolymerizing plastics through hydrolysis

塑料分类	降解菌	降解温度/℃	降解效果	文献
PET	<i>Fusarium solani</i>	30	PET纤维表面改性	[11-12]
	<i>Humicola insolens</i>	30	PET纤维表面改性	[13]
	<i>Thermobifida fusca</i>	30	PET纤维表面改性	[14-17]
	<i>Saccharomonospora viridis</i>	30	PET纤维表面改性	[18]
	<i>Ideonella sakaiensis</i> 201-F6	30	6周内能完全降解低结晶度PET薄膜	[19]
PU	<i>Aspergillus flavus</i> (ITCC 6051)	28±2	30 d降解60.6%聚酯型PU薄膜	[20]
	<i>Aspergillus tubingensis</i>	37	14 d降解聚酯型PU薄膜成碎片	[21]
	<i>Aspergillus</i> sp. strain S45	37	28 d降解20%聚酯型PU薄膜	[22]
	<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i> , <i>Cladosporium tenuissimum</i> , <i>Cladosporium asperulatum</i> , <i>Cladosporium montecillanum</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i>	25~30	21 d降解10%~65%聚酯型PU薄膜	[23]

应6周后,完全降解低结晶度PET薄膜,是目前已报道对PET降解效果最好的一株细菌。

因PET塑料具有较高的玻璃转化温度,直接利用酶在高温(60~70℃)条件下对PET进行解聚成为近年来研究的热点。目前已挖掘的具有PET解聚活性的酶元件种类较多,包括脂肪酶、酯酶和角质酶等,其中角质酶是目前研究较多的一种PET高效解聚酶^[26](表2)。*T. fusca* DSM43793来源的角质酶TfH在55℃催化条件下,3周内可使结晶度为10%的PET膜质量损失50%^[27];来自特异腐质霉*H. insolens*的角质酶HiC在70℃条件下96h内几乎可以完全降解低结晶度PET薄膜,是迄今报道酶活性最高且热稳定性最好的真菌来源聚酯水解酶^[28];来源于植物堆肥的角质酶LCC在70℃条件下,经24h催化可降解25%无定形PET薄膜,该酶与TfH聚酯水解酶具有一定的同源性^[29]。此外,来源于嗜热链霉菌(*Thermomyces insolens*)、南极假丝酵母(*Candida antarctica*)、曲霉属(*Aspergillus* sp.)的脂肪酶和来源于枝孢菌(*Cladosporium*和*Cladosporioides*)、格拉子囊菌热白丝菌(*Melanconium albomyces*)、柠檬青霉(*Penicillium citrinum*)的酯酶也对PET有一定解聚效果,但仅是增加了PET表面的亲水性并引起其表面形态变化。

PU塑料是由异氰酸酯、多元醇和扩链剂3种组分缩合而成的含有氨基甲酸酯键重复单元结构的聚合物。PU是一种半结晶的热固性塑料,其中异氰酸酯构成其结晶部分,称为PU的硬段,决定了PU塑料的硬度和拉伸强度;多元醇和扩链剂构

成其非结晶部分,称为PU的软段,决定了PU的弹性及延伸特性。PU的生物降解过程主要通过断裂其软段的酯键来完成解聚,因此,目前报道的具有PU降解能力的微生物大多是针对聚酯型PU的降解,聚醚型PU的降解微生物报道较少^[38]。镰刀菌属(*Fusarium* sp.)、弯孢菌属(*Curvularia* sp.)、枝霉属(*Cladosporium* sp.)、青霉菌属(*Penicillium* sp.)、芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)、假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)等多种微生物均被证实具有降解PU塑料能力,见表1。Álvarez-barragán等^[23]分离出6种*Cladosporium* sp.菌株,在两周内可降解75%~85%的水性PU(Impranil DLN),对聚酯型PU有着较高的降解水平;*Aspergillus* sp.是目前报道具有聚酯型PU降解能力的一类真菌,从垃圾堆土壤中分离出来的黄曲霉(*Aspergillus flavus*)可利用聚酯型PU薄膜作为唯一碳源,在30d内降解60.6%的聚酯型PU^[20];从固体废弃物倾倒点分离的*Aspergillus* sp. strain S45,在28d内可降解20%的聚酯型PU薄膜^[22];Khan等^[21]从垃圾场中分离出油曲霉(*Aspergillus tubingensis*),在含2%葡萄糖的无机盐液体培养基培养21d后,可将聚酯型PU薄膜降解成碎片。然而,关于利用这些微生物降解真实聚酯型PU废弃塑料研究还很少^[39]。

生物酶可以通过水解PU的酯键或脲键来实现对PU塑料的解聚,常见的酶种类有酯酶、脲酶和蛋白酶等^[40]。酯酶是目前降解PU塑料效果最优的酶,例如从毛单胞菌*Comamonas acidovorans* TB-35来源的酯酶PudA^[32-33],假单胞菌属来源的酯酶

表2 水解型塑料解聚酶挖掘

Tab. 2 Depolymerases responsible for plastics depolymerization through hydrolysis

塑料分类	降解底物	解聚酶来源	解聚酶	降解温度/℃	降解能力	文献
PET	饮料瓶	<i>Thermobifida fusca</i> DSM43793	TfH	55	21 d 质量损失 50%	[27]
	低结晶度(7%)PET 薄膜	<i>Humicola insolens</i>	HiC	70	96 h 重量损失 97%	[28]
	PET 薄膜	plant compost	LCC	70	24 h 重量损失 25%	[29]
	低结晶度(1.9%)PET 薄膜	<i>Ideonella sakaiensis</i> 201-F6	PETase	30	—	[29]
	低结晶度 PET 薄膜	<i>T. fusca</i> KW3	TfCut2	65~80	48 h 重量损失 12%	[30-31]
PU	Impranil DLN	<i>Comamonas acidovorans</i> TB-35	PudA	45	—	[32-33]
	Impranil DLN	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Pu1A	48	—	[34]
	Impranil DLN	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	PueA/PueB	65/60	—	[35-36]
	固体聚酯型 PU	<i>T. fusca</i> KW3	TfCut2	70	100 h 重量损失 1.9%	[37]
	固体聚酯型 PU	plant compost	LCC	70	100 h 重量损失 3.2%	[37]

PueA、PueB和PuaA^[35-36]。这些已经克隆的酯酶虽然可以有效解聚水性聚氨酯DLN，但对于真实的PU废弃物几乎没有效果。木瓜蛋白酶在37℃下处理PU薄膜1~6个月后，GPC和FTIR分析表明氨基甲酸酯键发生了一定程度的断裂^[41]； α -胰凝乳蛋白酶降解PU时，25℃反应10d后，其平均分子量也能降低30%以上^[42]。目前，关于脲酶降解PU的报道相对较少，Phua等^[41]发现脲酶（EC 3.5.1.5）对PU处理后，通过GPC、红外等分析发现其产生了降解，且主要归因于PU中脲键的水解。此外，Schmidt等^[37]发现角质酶LCC、TfCut2、Tcur1278和Tcur0390在降解PET塑料的同时，也表现出一定的聚酯型PU降解能力，在70℃条件下，经过100h的降解，PU塑料降解率达到0.3%~3.2%。

1.2 非水解型塑料降解微生物的筛选及解聚酶挖掘

非水解型塑料是指由烯烃类单体聚合而成的高分子塑料，以PE、PS类塑料为代表，其主链化学组成为烷基碳，C—C键惰性强、反应能垒高，导致其难以断裂，这也是该类塑料很难被微生物降解的重要原因^[43]。

研究人员已经分离出了一些可以降解PE类塑料的微生物，见表3。韩秋霞等^[44]从农田土壤中分离到一株可以改性PE膜为唯一碳源的*Aspergillus niger* M6，30d对PE膜质量损失达20%；Balasubramanian等^[45]从印度马纳尔湾的塑料废物堆放场中分离出15株高密度PE塑料降解细菌，其中*Arthrobacter* sp. GMB5和*Pseudomonas* sp. GMB7可以在30d内分别降解12%和15%的PE

薄膜；Tribedi等^[49]从土壤中富集分离得到一株降解低密度PE的假单胞菌*Pseudomonas* sp. AKS2，可在45d使PE的质量损失达4%~6%。同样在农田废弃地膜中富集分离出了红球菌*Rhodococcus* sp. C208可实现以每周0.86%的速率降解PE塑料薄膜^[50]。

关于PS塑料降解的微生物报道相对较少，Eisaku等^[51]首次从土壤中分离出来了5株可以降解PS的微生物，包括黄单胞菌属（*Xanthomonas* sp.）、鞘氨醇杆菌属（*Sphingobacterium* sp.）和芽孢杆菌属（*Bacillus* sp.）等；此外，季荣等^[48]将*Penicillium variable* CCF3219应用于臭氧氧化预处理后的¹⁴C标记的PS薄膜，在16周内将其几乎完全矿化成CO₂和水。近年来，利用昆虫肠道微生物菌群降解聚烯烃类塑料发展迅速。杨军等^[46, 52]发现印度谷螟幼虫（*Plodia interpunctella* Hübner）可以啃食PE薄膜，从其肠道内分离出2株能够降解PE的细菌：*Enterobacter asburiae* YT1和*Bacillus* sp. YP1。同时，该团队还发现黄粉虫（the larvae of *Tenebrio molitor* Linnaeus）对PS薄膜有一定的降解能力，并进一步从其肠道中分离出1株PS降解菌*Exiguobacterium* sp. YT2，该菌株可以在60d内降解7.4%PS^[47]。在未来研究中，昆虫肠道微生物菌群将为聚烯烃类塑料高效降解微生物的挖掘提供重要的筛选来源。

参与PE、PS等非水解型塑料生物降解过程的酶种类很多，如漆酶、锰过氧化物酶（MnP）、木质素过氧化物酶（LiP）和烷烃羟化酶（AH）等均被证实对预处理后的非水解型塑料有一定降解效果^[53]。在Cu²⁺存在的条件下，PE塑料经*Rhodococcus ruber* C208来源的漆酶处理后，PE塑

表3 非水解型塑料降解微生物分离研究进展

Tab. 3 Microorganisms responsible for plastics depolymerization through non-hydrolysis pathways

塑料分类	降解底物	降解菌	降解温度/°C	降解效果	文献
PE	改性PE膜	<i>Aspergillus niger</i> M6	28	30 d质量损失20%	[44]
	高密度PE	<i>Arthrobacter</i> sp. GMB5	30	30 d质量损失12%	[45]
	高密度PE	<i>Pseudomonas</i> sp. GMB7	30	30 d质量损失15%	[45]
	低密度PE薄膜	<i>Enterobacter asburiae</i> YT1	30	60 d质量损失6.1%±0.3%	[46]
	低密度PE薄膜	<i>Bacillus</i> sp. YP1	30	60 d质量损失10.7%±0.2%	[46]
PS	PS泡沫	Mealworms (the larvae of <i>Tenebrio molitor</i> Linnaeus)	30	30 d质量损失31.0%±1.7%	[47]
	PS薄膜	<i>Exiguobacterium</i> sp. YT2	30	60 d质量损失7.4%±0.4%	[47]
	PS薄膜	<i>Penicillium variable</i>	24	16周内能矿化完	[48]

料中羰基量显著增加,聚合物的重均分子量 (M_w) 和平均分子量 (M_n) 分别降低了 20% 和 15%,且氧化和断裂的部位都发生在 PE 膜的非结晶区^[54]; *Trametes versicolor* 来源的漆酶在 1-羟基苯并三唑的介导下加速了对 PE 膜的降解速率^[55]。烷基羟化酶家族的烷烃羟化酶可通过碳氢化合物的氧化末端或亚末端实现对其降解^[56]; 在大肠杆菌 BL21 中外源表达 *Pseudomonas* sp. E4 来源的 AH 编码基因 *alkB*, 37 °C 培养 80 d, 可将 20% 的低分子量 PE 转化为 CO₂^[57]。进一步整合 *P. aeruginosa* E7 的 AH 催化系统 (包括烷烃单加氧酶、红色素和红色素还原酶), 工程菌 BL21 降解 PE 的效率提升到 30%^[58]。目前, 关于 PS 解聚酶的报道只有来自木质素脱色细菌 *Azotobacter beijerinckii* HM121 的非血红素氢醌过氧化物酶, 其可在两相系统 (二氯甲烷-水) 中降解不溶性 PS, 当过氧化氢和四甲基氢醌存在时, PS 可在 5 min 内被降解为水溶性小分子产物^[59] (表 4)。

2 塑料解聚酶的设计与改造

目前, 塑料解聚酶元库存在催化效率低、稳定性差、表达量低等问题, 限制了塑料解聚酶的规模化生产与应用。利用理性设计、定向改造等蛋白质工程技术方法, 有望提高塑料解聚酶的活性、稳定性和特异性。

2.1 提高酶的热稳定性

玻璃转化温度是影响塑料生物降解的重要因素之一, 在玻璃转化温度下, PET 塑料的非晶态部

分具有更高的柔性, 从而更易被酶接触并发生解聚。PET 的玻璃转化温度在 65 °C 左右, 因此要求解聚酶具有较强的耐热性能^[61]。二价金属离子 (Ca²⁺ 和 Mg²⁺) 能够将聚酯水解酶 TfCut2 的熔点温度提高 10.8~14.1 °C, 从而提高其热稳定性, 改造酶在 65 °C、48 h 处理条件下对半结晶 PET 的水解效率提高到 12.9%^[17]。通过在 TfCut2 中引入二硫键, 使其熔点温度提高了 25 °C, 半失活温度提高了 17 °C, 该酶突变体在 70 °C、48 h 处理条件下, 可解聚 25% PET 薄膜, 其催化效率较原始酶提高了一倍^[16]。此外, 法国图卢兹大学的 Marty 团队^[62] 通过引入二硫键取代 LCC 金属离子结合位点附近的氨基酸残基, 将 LCC 的熔点温度提高了 9.8 °C, 从而提高了其对 PET 塑料的降解效率。因此, 增强酶的热稳定性能够有效提高酶对塑料底物的催化效率。

2.2 增大酶的底物结合口袋

通过改造酶的催化中心以促进酶与底物的结合是提升酶催化效率最常用的策略之一^[63]。若能扩大底物结合口袋, 使得塑料大分子更容易进入酶的催化中心, 将提高塑料降解酶的催化活性。Araújo 等^[11] 对 FsC 角质酶的活性中心附近的氨基酸进行突变, 利用丙氨酸替代方法扩大了底物结合口袋, 突变体 Leu182Ala 和 Leu81Ala 对 PET 纤维的水解活性分别提高了 4 倍和 5 倍; 近期, 法国图卢兹大学的 Marty 团队^[62] 通过调控 LCC 的底物结合口袋与 PET 底物的吻合度确定影响酶催化效率的关键氨基酸残基, 通过排列组合改变催化凹槽内的所有氨基酸残基, 其中 F243I 和 F243W 表面的“凹槽”与 PET 最容易嵌合, 突变体可显著提

表 4 非水解型塑料解聚酶元件挖掘研究进展

塑料分类	降解底物	解聚酶来源	解聚酶	降解温度/°C	降解能力	文献
PE	氧化后的低密度 PE	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> MTCC-787	LiP/MnP	37	15 d 内降解 70%	[60]
	低分子量 PE 粉末	<i>Pseudomonas</i> sp. E4	alkB	37	80 d 内降解 20%	[57]
	低分子量 PE 粉末	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> E7	AH 系统	37	80 d 内降解 30%	[58]
PS	PS	<i>Azotobacter beijerinckii</i> HM121	非血红素氢醌过氧化物酶	30	5 min 内水解 PS 转化为水溶性产物	[59]

高酶催化效率。在此基础上,进一步引入二硫键取代金属离子结合位点附近的氨基酸残基以提高酶的热稳定性,最终获得的酶突变体可在10 h内解聚90%以上的瓶级PET,这是迄今为止报道的最高效的PET解聚酶。

2.3 强化酶与底物的可及性

聚合物表面的疏水性特性,使得解聚酶表面的亲水基团无法有效地吸附到聚合物表面,即降低了酶与底物的可及性。若能在PET解聚酶中引入疏水结合模块,将增加酶与底物的可及性。Ribitsch等^[64]将PET角质酶Thc_Cut1和两种木霉疏水蛋白HFB4和HFB7进行融合,获得的融合酶对PET的水解效率提高了16倍以上。Ribitsch等^[65]通过在PET角质酶Thc_Cut1中引入两种疏水性蛋白酶:分别来自于*Hypocrea jecorina*的纤维二糖水解酶CBM和来自于*Alcaligenes faecalis*的聚羟基链烷酸解聚酶PBM,获得的融合酶对PET的水解活性提高了3.8倍。同样,Gamerith等^[66]在*Nocardia farcinica*的聚酰胺酶PA中引入了来自于*A. faecalis*的聚羟基链烷酸解聚酶PBM,融合酶PA_PBM水解聚合物的活性较PA提高了3倍。因此,增加酶与底物的可及性是提高解聚酶对疏水性聚合物水解活性的有效策略。另外,通过增加酶分子底物结合口袋的疏水性,促进疏水性塑料聚合物与酶吸附结合从而提高酶的催化效率,是强化酶与底物可及性的另一种方法。例如,Silva等^[67]通过设计双突变Gln132Ala/Thr101Ala来增加角质酶Tfu_0883底物结合口袋的疏水性,突变体对PET纤维的降解活性提高了1.6倍。

2.4 减少酶的产物抑制

PET在水解之后,会产生对苯二甲酸双酯(BHET)、对苯二甲酸单酯(MHET)、对苯二甲酸(TPA)和乙二醇(EG)这些降解单体,其中BHET和MHET会竞争性地结合到PET水解酶的底物结合位点,进而抑制PET酶的解聚活性。针对这一问题,Wei等^[68]对TfCut2的第62位的氨基酸残基进行了突变,得到的G62A突变体无法与MHET相互作用,该酶对MHET的结合常数降低

到原来的2/11,对PET的降解效率提高了2.7倍。Carniel等^[69]通过组合*C. antarctica*的脂肪酶CalB与HiC,可消除PET解聚产物MHET的积累,双酶体系对PET的降解效率较单酶催化系统提高了7.7倍;Barth等^[70]建立了固定化双酶体系(TfCa-TfCut2和TfCa-LCC)对PET进行降解,其中TfCa用于水解中间产物BHET和MHET,与单酶处理相比,双酶的协同作用使得BHET和MHET的生产量分别增加了91%和104%,提高了PET的降解效率。

3 塑料降解物的高值化生物炼制

建立从塑料降解物到有用化学品的生物转化技术体系,不仅能推动循环经济发展,还能有效节约石油、天然气等不可再生资源,减少温室气体排放,保护生态环境。然而废塑料结构复杂、分类难度大、降解物多样,要想实现塑料降解物的高值化生物炼制,解聚过程需要化学方法和生物方法并用。无论是通过生物还是化学策略解聚获得的塑料单体,在明确降解所得的小分子单体或寡聚物后,定向挖掘可以利用这些小分子化合物的微生物,解析其降解路径,并利用合成生物学技术,设计与构建塑料降解物到高值化学品的合成途径,有望建立“降塑再造”的废弃塑料资源循环经济。

3.1 塑料降解物生物利用途径解析

结构的复杂与解聚条件的差异导致塑料降解物成分多样,主要包括有机酸、有机醇、芳香类化合物以及脂肪烃化合物,针对这几种塑料单体的生物利用过程,国内外研究者已经开展了大量研究,并取得了阶段性突破。

3.1.1 有机酸类塑料降解物

(1) 己二酸 PU等塑料的降解物之一,其代谢途径在不动杆菌(*Acinetobacter*)中已被解析^[71]。如图2所示,己二酸首先在琥珀酰CoA转移酶(DcaIJ)的催化下形成己二酰CoA,紧接着在酰基CoA脱氢酶(DcaA)的催化下生成5-羧基-

2-戊烯酰 CoA，随后被烯酰 CoA 水合酶 (DcaE) 催化生成 3-羟基己二酰 CoA，然后在 3-羟基己二酰 CoA 脱氢酶 (DcaH) 作用下生成 3-酮基己二酰 CoA，最后在酰基 CoA 硫解酶 (DcaF) 的催化下生成琥珀酰 CoA 和乙酰 CoA，进而进入 TCA 循环，用于细胞的生长和代谢。

(2) 6-羟基己酸 存在于 PU 塑料的降解物中，如图 2 所示，6-羟基己酸可被微生物胞内的 6-羟基己酸脱氢酶 (ChnD) 和 6-氧己酸脱氢酶 (ChnE) 两步催化转化为己二酸，然后通过上述己二酸降解途径，最终形成琥珀酰 CoA 和乙酰 CoA 进入 TCA 循环^[72]。

3.1.2 有机醇类塑料降解物

(1) 乙二醇 PET、PU 等塑料的解聚产物之一，近年来，利用恶臭假单胞菌 (*P. putida*) 等土壤微生物转化乙二醇合成更高价值的乙醇酸、乙醛酸、鼠李糖酯等生物化学品受到广泛关注^[73]。如图 3 (a) 所示，在恶臭假单胞菌 *P. putida* KT2440 中，乙二醇首先在周质吡咯并喹啉酮 (PQQ) 依赖性醇脱氢酶 (PedE、PedH) 的催化下转化为乙醇醛，紧接着在胞质醛脱氢酶 PP_0545 和 PedI 的作用下生成乙醇酸，继而在膜锚定的乙醇酸

氧化酶 GlcDEF 的作用下生成乙醛酸。生成的乙醛酸可以通过两种方式进入 TCA 循环：①在异柠檬酸裂解酶 (AceA) 的作用下与丁二酸缩合形成异柠檬酸进入 TCA 循环；②在苹果酸合成酶 (GlcB) 的作用下与乙酰 CoA 缩合形成苹果酸，进入 TCA 循环^[74]。然而，在路径①中，异柠檬酸转化为丁二酸的过程中伴随着两分子 CO₂ 的脱除，因此，乙二醇提供的两分子的碳元素无法进入中心代谢供给细胞生长；在路径②中，乙酰 CoA 的不足制约了乙醛酸进一步转化为苹果酸进入中心代谢。因此，*P. putida* KT2440 无法利用乙二醇作为唯一碳源进行生长^[74]。而在 *P. putida* JM37 中存在另一条乙二醇代谢通路，乙醛酸可以通过乙醛酸羧化酶 (Gcl) 催化生成酒石酸半醛，紧接着在羟基丙酮酸异构酶 (Hyi) 和酒石酸酯半醛还原酶 (GlxR) 的作用下生成甘油酸，进而转化为 2-磷酸甘油酸进入糖酵解途径，并最终进入 TCA 循环^[74]。因此，*P. putida* JM37 可以在以乙二醇为唯一碳源的培养基上良好生长。通过对乙二醇代谢路径中各基因元件的表达与转录水平进行全面考察发现，Gcl 和 GlxR 是乙二醇利用过程的关键节点，同时表达 Gcl 和 GlxR 的恶臭假单胞菌实现了在以乙二醇为唯一

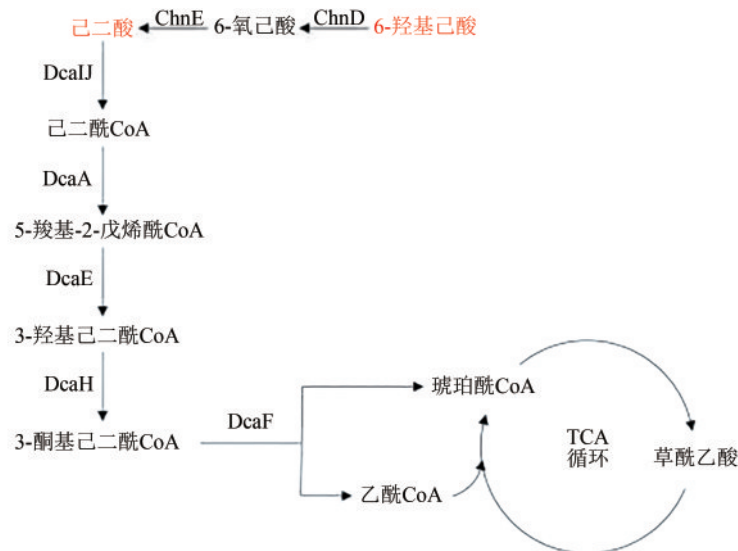


图 2 有机酸类塑料单体 (己二酸和 6-羟基己酸等) 的生物降解途径

(途径涉及的关键酶: DcaI—琥珀酰 CoA 转移酶; DcaA—酰基 CoA 脱氢酶; DcaE—烯酰 CoA 水合酶;

DcaH—3-羟基己二酰 CoA 脱氢酶; DcaF—酰基 CoA 硫解酶; ChnD—6-羟基己酸脱氢酶; ChnE—6-氧己酸脱氢酶)

Fig. 2 Biological degradation pathway for plastics from organic acid based monomers (adipic acid, 6-hydroxyhexanoic acid, etc.)

(Key enzymes in metabolic pathway: DcaI—succinyl-CoA transferase; DcaA—acyl-CoA dehydrogenase; DcaE—enoyl-CoA hydratase;

DcaH—3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase; DcaF—acyl-CoA thiolase; ChnD—6-hydroxyhexanoate dehydrogenase; ChnE—6-oxohexanoate dehydrogenase)

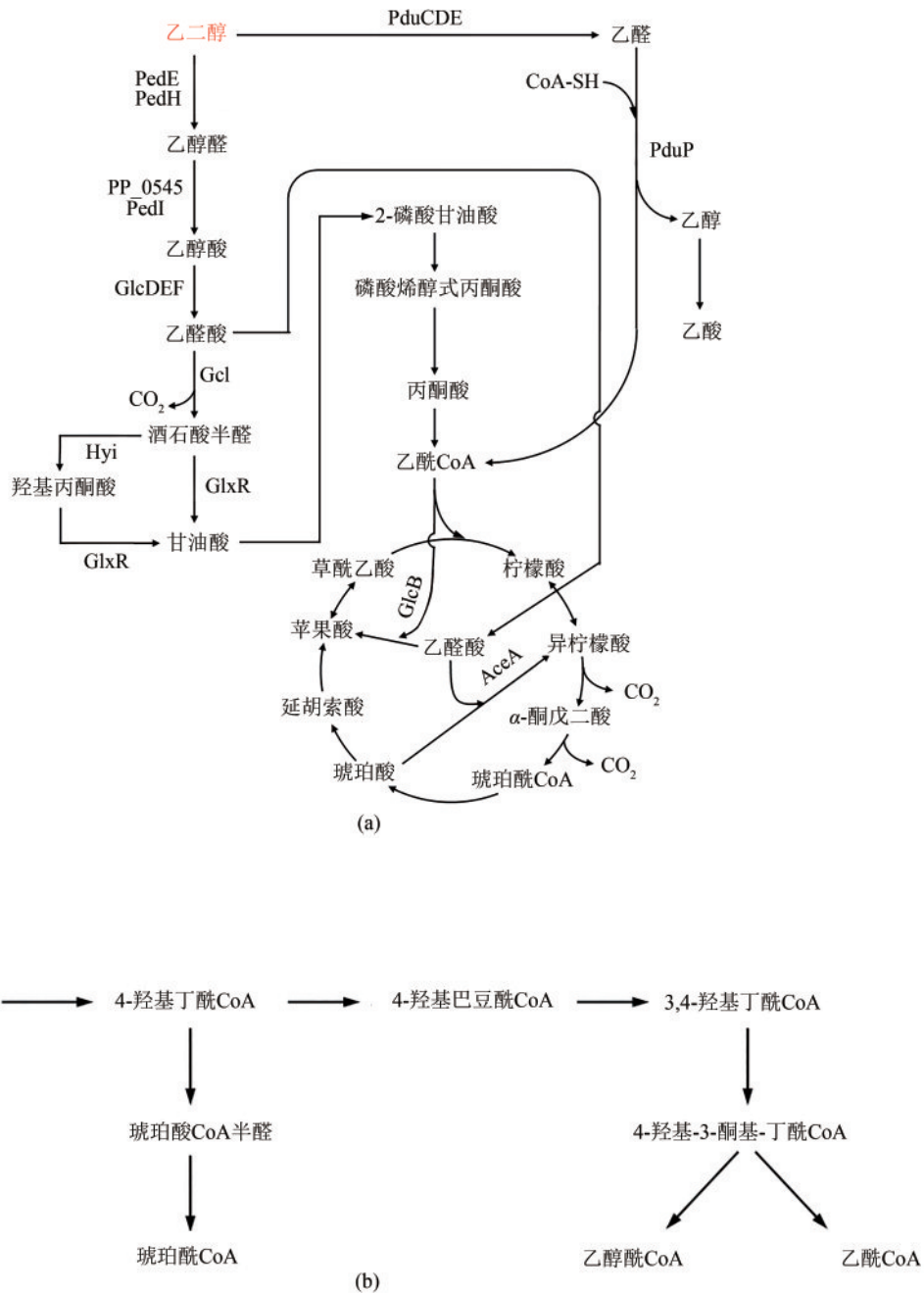


图3 有机醇类塑料单体（乙二醇和1,4-丁二醇等）的生物降解途径

（途径涉及的关键酶：PedE, PedH—醌依赖性醇脱氢酶；PP_0545和PedI—醛脱氢酶；GlcDEF—乙醇酸氧化酶；Gcl—乙醛酸羧化酶；Hyi—羟基丙酮酸异构酶；GlxR—酒石酸酯半醛还原酶；AceA—异柠檬酸裂解酶；GlcB—苹果酸合成酶；PduP—丙醛脱氢酶）

Fig. 3 Biological degradation pathway for plastic from organic alcohol based monomers (ethylene glycol, 1,4-butanediol, etc.)

(Key enzymes in metabolic pathway: PedE, PedH—quinoprotein alcohol dehydrogenase; PP_0545 and PedI—aldehyde dehydrogenase; GlcDEF—glycolate oxidase; Gcl—glyoxylate carboxylase; Hyi—hydroxypyruvate isomerase; GlxR—artronate semialdehyde reductase; AceA—iscitrate lyase; GlcB—malate synthase; PduP—propionaldehyde dehydrogenase)

碳源的培养基上的快速生长^[73]。此外，在产乙酸木杆菌 (*Acetobacterium woodii*) 中，Trifunović 等^[75]发现 *pdu* 基因簇编码的丙二醇脱水酶 (PduCDE) 和 CoA 依赖的丙醛脱氢酶 (PduP)，除

了可以催化 1,2-丙二醇和 2,3-丁二醇的降解外，还可以催化乙二醇脱水形成乙醛，并进一步转化为乙酰 CoA 和乙醇。生成的乙酰 CoA 被转化为乙酸，并通过底物水平磷酸化过程生成 ATP。乙醇则部分

被氧化为乙酸，产生的还原当量用于 Wood-Ljungdahl 通路固定 CO_2 合成乙酸。

(2) 1,4-丁二醇 PU 的主要降解产物之一。*P. putida* KT2440 可以在以 1,4-丁二醇为唯一碳源的培养基中生长，但其生长速率非常缓慢。通过适应性进化可以提高 KT2440 对于 1,4-丁二醇的利用效率。基于此，Li 等^[76] 通过对突变菌株进行基因组测序以及蛋白组学分析，解析了 1,4-丁二醇的生物降解路径。如图 3 (b) 所示，1,4-丁二醇首先被氧化为 4-羟基丁酸，这一步主要由 PP_2674-2680 *ped* 基因簇编码的高表达脱氢酶催化完成。生成的 4-羟基丁酸可通过以下 3 条途径进行下一步的代谢：①进一步经 *ped* 基因簇编码的脱氢酶催化氧化为琥珀酸；②经 *acyl-CoA* 合成酶 *AcsA1* (PP_4487) 活化和 *acyl-CoA* 催化为琥珀酰 CoA；③通过 β -氧化转化为乙醇酰 CoA 和乙酰 CoA^[76]。目前，只有第 3 条路径得以确证，琥珀酸合成途径和琥珀酰 CoA 合成途径有待进一步证实。

3.1.3 芳香类塑料降解物

(1) 对苯二甲酸 PET 的另一重要降解物。转化对苯二甲酸合成更高价值的芳香族化合物可提高 PET 塑料制品循环使用的经济性。丛毛单胞菌 (*Comamonas* sp.)^[77]、戴尔福特菌 (*Delftia tsuruhatensis*)^[78]、红球菌 (*Rhodococcus* sp.)^[79] 等微生物都可以在以对苯二甲酸为唯一碳源的培养基上生长代谢。如图 4 (a) 所示，对苯二甲酸在微生物胞内的降解途径为：对苯二甲酸经 1,2-双加氧酶 (TphAabc) 和 1,2-二羟基-3,5-环己二烯-1,4-二羧酸酯脱氢酶 (TphB) 两步作用生成重要

中间产物原儿茶酸^[80]。原儿茶酸是一种简单的酚酸，可进一步转化合成没食子酸、邻苯三酚、黏康酸和香草酸等高价芳香化合物，或用于合成鼠李糖酯、PHA 等重要生物制品。水溶性差，发酵底物浓度低是制约对苯二甲酸作为发酵底物的瓶颈之一。针对这一问题，Kenny 等^[81] 采用对苯二甲酸与甘油共底物用于 *P. putida* GO16 培养发酵，PHA 的生产强度达到 108.8 mg/(L·h)。

(2) 2,4-二氨基甲苯 PU 等塑料的一种解聚物。2020 年，Espinosa 等^[82] 从塑料垃圾场土壤中分离获得一株可以利用 PU 降解寡聚物与 2,4-二氨基甲苯为碳/氮源进行生长的假单胞菌 *Pseudomonas* TDA1，通过基因组学分析，初步提出了 2,4-二氨基甲苯的降解路径。如图 4 (b) 所示，2,4-二氨基甲苯的甲基基团经氧化、脱羧和脱氨后形成 4-氨基邻苯二酚，4-氨基邻苯二酚可能以二元醇的形式转化为 4-氨基-2-羟基黏康酸，并通过类似儿茶酸的代谢途径进行进一步降解转化。未来，需对预测代谢途径中的相关基因进行蛋白质组学与转录组学方面的全面分析，并考察代谢中间物的分布与通量变化，从而准确绘制 2,4-二氨基甲苯的降解路径。

3.1.4 脂肪烃类塑料降解物

PE、PP、PVC 等塑料制品经热解法处理后可获得多种小分子的脂肪烃。脂肪烃的代谢途径在自然界中广泛存在。在假丝酵母 (*Candida* sp.)、解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 等真核微生物中，脂肪烃首先被内质网上 CYP52 家族的单加氧酶 P450 氧化为脂肪醇，脂肪醇随后在内质网或过

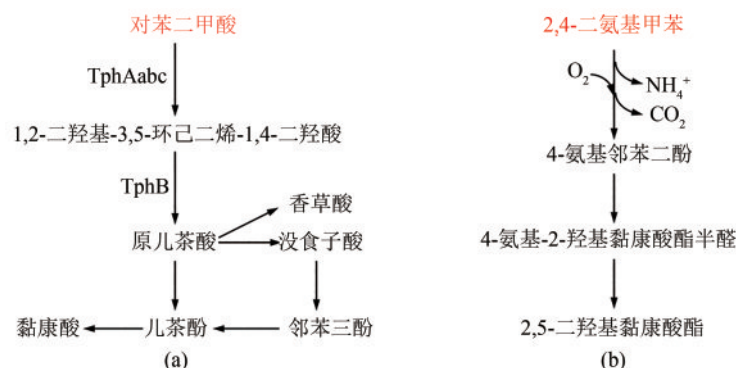


图 4 芳香类塑料单体 (对苯二甲酸和 2,4-二氨基甲苯等) 的生物降解途径

(途径涉及的关键酶: TphAabc—对苯二甲酸 1,2-双加氧酶; TphB—1,2-二羟基-3,5-环己二烯-1,4-二羧酸酯脱氢酶)

Fig. 4 Biological degradation pathway for plastics from aromatic monomers (terephthalic acid, 2,4-diaminotoluene, etc.)

(Key enzymes in metabolic pathway: TphAabc—TPA 1,2-dioxygenase; TphB—1,2-dihydroxy-3,5-cyclohexadiene-1,4-dicarboxylate dehydrogenase)

氧化物酶体被氧化为脂肪醛，并进一步氧化为脂肪酸。脂肪酸经酰基 CoA 催化生成脂酰 CoA，脂酰 CoA 或用于三酰甘油的合成，或在过氧化物酶体经 β -氧化完全氧化为乙酰 CoA 进入中心代谢途径^[83]。

对于苯系的脂肪烃而言，其降解路径主要有开环和侧链氧化两种方式，如图5所示。开环降解报道不多，主要存在于红球菌中^[84]；苯乙烯的芳环首先被苯乙烯双加氧酶（SDO）羟基化生成苯乙烯顺式乙二醇，再经顺式乙二醇脱氢酶（CGDH）进一步氧化形成3-乙炔基邻苯二酚，进而转化为丙酮酸进入中心代谢。开环路径无特异性，可以作用于所有包含苯环结构的物质。侧链乙烯基的氧化途径是苯乙烯的主要降解路径，广泛存在于 *Pseudomonas* sp.^[85]、*Corynebacterium* sp.^[86]、*Rhodococcus* sp.^[87] 等微生物中。苯乙烯经过苯乙烯单加氧酶（SMO）、氧化苯乙烯异构酶（SOI）和苯乙醛脱氢酶（PAALDH）等酶作用转化生成苯乙醛。苯乙醛进一步完成羟基化后，通过 β -氧化过程生成乙酰 CoA 进入 TCA 循环或转化为

PHA。此外，苯乙烯氧化中间物苯乙酸还可以为苯乙醇和苯乙胺等高价化学品的合成提供重要前体物质^[88]。

3.2 塑料降解物合成高值化学品的路径设计与构建

PHA 是多数细菌胞内碳源和能源的储备物，因其可完全生物降解，被认为是可替代传统塑料的新型生物材料。近年来，利用塑料降解物为底物合成PHA受到广泛关注。2011年，Jasmina等^[89]利用 *P. putida* CA-3 转化苯乙烯获得了 3.36 g/L 的PHA产出，建立了芳香族环境污染物降解与脂肪族PHA合成的独特联系，为PS塑料的循环利用提供了可行的方向。进一步，以低密度的PE粉末为底物，经过 21 d 的生物转化，Sen等^[90]利用 *Cupriavidus necator* H6 积累了细胞干重3.18%的短链PHA，这也是直接降解PE材料并进行生物化合物合成的首次报道。此外，发现恶臭假单胞菌 *P. putida* GO16、*P. putida* GO19 和弗雷德里克假单胞菌 *Pseudomonas frederiksbergensis* GO23 在降解PET的同时可积累一定量的中等长度PHA，其中GO16

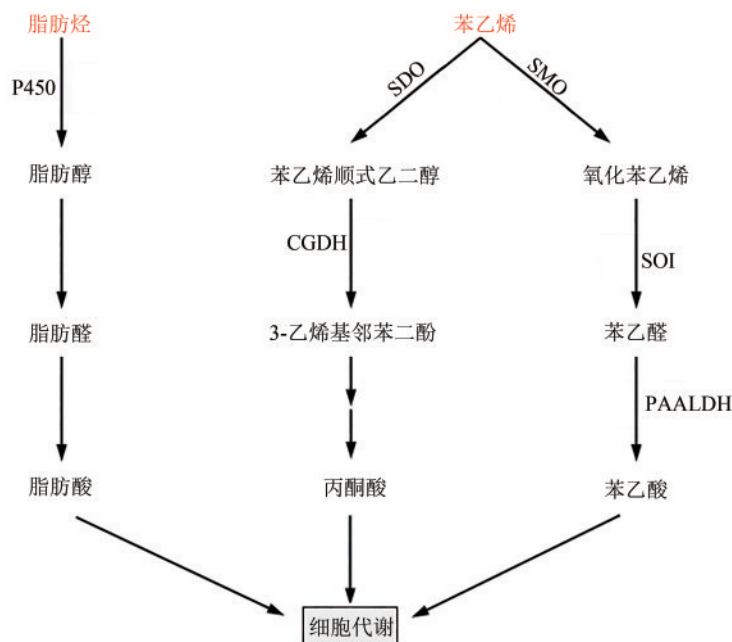


图5 脂肪烃类塑料单体的生物降解途径

(途径涉及的关键酶：P450—单加氧酶P450；SDO—苯乙烯双加氧酶；SMO—苯乙烯单加氧酶；CGDH—顺式乙二醇脱氢酶；SOI—氧化苯乙烯异构酶；PAALDH—苯乙醛脱氢酶)

Fig. 5 Biological degradation pathway for plastics from aliphatic hydrocarbon monomers

(Key enzymes in metabolic pathway: P450—monooxygenase P450; SDO—styrene dioxygenase; SMO—styrene monooxygenase; CGDH—*cis*-ethylene glycol dehydrogenase; SOI—styrene oxide isomerase; PAALDH—phenylacetaldehyde dehydrogenase)

和GO19积累PHA的速率可达到8.4 mg/(L·h)^[91]。

表面活性剂可以乳化水性介质中的疏水性物质，从而增加细胞对疏水性物质的利用度。因此，PE、PP、PVC等塑料经热解获得的疏水性脂肪烃等疏水性底物常用于表面活性剂的合成研究。例如，沙门菌*Renibacterium salmoninarum* 27BN可利用正十六烷为唯一碳源生长并积累鼠李糖酯，鼠李糖酯的分泌又能进一步促进十六烷的利用^[92]。值得一提的是，鼠李糖酯的合成与PHA共用R-3-羟基链烷酸前体库，因此，许多具有同化塑料降解物合成PHA的微生物也具有合成鼠李糖酯的潜力^[93]。

油脂是微生物体内能量存在的主要物质，产油微生物可转化脂肪烃类塑料降解物合成并积累油脂。*Y. lipolytica* strain 78-003可直接利用PP塑料热裂解混合物（主要包含脂肪醇、烷烃和烯烃），细胞生物量达2.34 g/L，油脂含量达细胞干重的23%，底物到细胞转化率达0.13 g/g，其中油脂收率为0.03 g/g底物^[94]。

芳香类化合物是苯系塑料降解物进行高值化生物再造的首选去向。Hee等^[80]通过在大肠杆菌内外源表达来自*Comamonas* sp. E6的TphAabc和TphB，获得工程菌株HBH-1，首先实现苯二甲酸到原儿茶酸的转化。进一步，以原儿茶酸为前体，Hee等又进行了一系列高价值芳香类化学品的合成研究。首先，通过外源表达来自*P. putida* KT2440的对羟基苯甲酸酯羟化酶（PobA），大肠杆菌*Escherichia coli* GA-1可以转化原儿茶酸合成1.4 mmol/L没食子酸，转化率达40.1%。为消除没食子酸单菌合成中辅因子失衡问题，Hee等将没食子酸的合成途径分成两个模块：原儿茶酸合成模块（PCA-1）和没食子酸合成模块（HBH-2）。在最优菌株接种情况下，系统转化原儿茶酸合成没食子酸的转化率达92.5%。运用同样的策略，通过在没食子酸合成菌株GA-1中外源表达没食子酸脱羧酶（LpdC），工程菌PG-1a可以实现32.7%对苯二甲酸到邻苯三酚的转化。为解决此转化过程中副产物儿茶酚的积累，Hee等构建另一条以儿茶酸为中间物的邻苯三酚合成途径：原儿茶酸经脱羧形成邻苯二酚，再经过酚羟化酶（PhKLMNOPQ）的作用生成邻苯三酚。通过混合培养儿茶酸合成

菌株与邻苯三酚合成菌株，最终对苯二甲酸转化合成邻苯三酚的产量达到0.6 mmol/L，是单菌培养的3倍。运用同样的策略，Hee等还完成了对苯二甲酸到黏康酸和香草酸的合成，这些成果为PET降解物的高值回收提供了宝贵经验。

许多塑料降解物或其降解中间代谢物具有细胞毒性，严重抑制了细胞的生长和产物的合成。例如，中间代谢物乙醇醛与乙二醛是乙二醇代谢过程的重要中间产物，4 mmol/L乙醇醛和7.5 mol/L乙二醛便可完全抑制恶臭假单胞菌的生长^[73]。加快醛类物质到对应毒性较弱的醇或者酸的转化，是降低醛类物质毒性的常用策略。基于此，Franden等^[73]通过过量表达乙醇酸氧化酶GlcDEF，减少了乙醇醛的积累，使*P. putida*工程菌MFL114，可以耐受2 mol/L（约124 g/L）乙二醇，并最终消耗0.5 mol/L（31 g/L）乙二醇生成细胞干重32.19%的PHA。

塑料降解物成分多样，单一微生物往往无法实现其完全降解。采用多细胞混合培养技术，针对性地选用功能微生物，或可加速塑料降解物的生物炼制过程。PU塑料的降解单体主要是己二酸、乙二醇、1,4-丁二醇和异氰酸酯[甲苯-2,4-二异氰酸酯（2,4-TDI）或4,4'-二苯基甲烷二异氰酸酯（4,4'-MDI）]，异氰酸酯进一步衍生转化为2,4-甲苯二胺。基于此，研究人员首先鉴定并构建了聚氨酯单体的降解微生物^[95]：据报道，拜氏不动杆菌*Acinetobacter beijngii* ADP1具有很好的己二酸降解能力，通过克隆其己二酸降解关键阅读框dac（dcaAKIJP）并外源表达于*P. putida* KT2440，工程菌株*P. putida* KT2440 A12.1p获得了在己二酸为碳源的培养基快速生长的能力；突变菌株*P. putida* KT2440 B10.1和工程菌*P. putida* KT2440ΔgclR ΔPP_2046 ΔPP_2662：:14d分别可以降解1,4-丁二醇和乙二醇。研究发现，2,4-甲苯二胺表现出严重的细胞毒性，同时也影响了聚氨酯水解体系中其他单体的生物利用效率。因此，研究人员利用石蜡油和二(2-乙基己基)磷酸（D2EHPA）作为溶剂和反应性萃取剂（助溶剂），对聚氨酯水解体系进行了TDA萃取去除。在pH4的情况下，TDA的去除效率达到了93%。在此条件下，通过混合培养*P. putida* KT2440 A12.1p、*P. putida* KT2440 B10.1

和 *P. putida* KT2440 Δ gclR Δ PP_2046 Δ PP_2662: : 14d, 实现了混菌体系对体系其余塑料单体的完全转化。进一步, 通过在己二酸、1,4-丁二醇和乙二醇降解的3个恶臭假单胞菌中外源表达鼠李糖酯合成关键基因 *RhIA* 和 *RhIB*, 实现了聚氨酯塑料单体到鼠李糖酯的增殖生物再造。

4 展 望

近年来, 国内外研究人员开展了各种废塑料降解微生物资源筛选和关键酶元件的挖掘改造工作, 在PET等聚酯型塑料的酶法解聚与催化机制方面取得了令人瞩目的重要突破^[19, 62, 96-97], CARBIOS公司宣布将在法国化学谷建设PET塑料酶法回收的工业示范工程, 建立从PET废弃物降解到单体利用的完整工业链, 预计年利用能力在5万吨到10万吨之间 (<https://www.hbmedia.info/petplanet/2020/07/17/carbios-launched-construction-of-industrial-demonstration-plant-for-the-enzymatic-pet-recycling/?s=>)。这些成果充分证明了基于合成生物学的生物解聚技术将是实现废弃塑料资源循环利用的有效途径。然而, 废弃塑料种类多、成分复杂, 除了PET塑料之外的其他废弃塑料的生物解聚仍然面临着降解菌种/酶匮乏、解聚机制不明晰、降解体系效率低、降解物难以高效利用等一系列瓶颈问题亟待突破。

(1) 非水解型塑料的生物氧化机制 非水解型塑料(聚乙烯、聚丙烯、聚氯乙烯、聚苯乙烯等)的市场占有率达到60%以上, 其化学结构含有丰富的惰性C—C主链并且不含其他活性官能团, 这导致该类塑料可以抵抗生物酶的袭击, 仅能通过高能氧化反应断裂^[98]。目前, 昆虫及其肠道微生物对非水解型塑料的解聚作用已有一些成功报道, 但生物解聚效率相对较低, 且涉及其降解过程的生物氧化酶和催化机制尚需要进一步明确^[46-47, 99-102]。聚乙烯和直链烷烃的单体结构相同, 推测它们的生物降解机制也类似, 烷烃羟化酶/单加氧酶(AIkB)被认为是参与降解聚乙烯的候选酶^[103]; 而木质素分解酶(如LMSs)对于芳香族结构降解是有效的, 可能是潜在的芳香族塑料聚苯乙烯的降解者^[104]。鉴于此, 基于烷烃羟化酶/单

加氧酶和木质素分解酶的分子催化机制, 结构导向“自下而上”的生物氧化酶从头设计方法可能比“自上而下”的昆虫降解更适合揭示非水解型塑料的生物氧化机制。

(2) 塑料解聚酶的高效异源表达 塑料解聚酶制剂的高效低成本制备是实现塑料生物法降解产业化示范应用的关键。目前塑料解聚酶在大肠杆菌、毕赤酵母、枯草芽孢杆菌等宿主中的可溶性表达水平普遍较低, 细菌来源PETase可溶性表达量为6.3 mg/L, 真菌来源角质酶TfCa可溶性表达量为41.6 mg/L。宏基因组来源聚酯水解酶LCC可溶性表达量约为40 mg/L。漆酶、过氧化物酶、P450酶等氧化还原酶的表达量更低。塑料解聚酶在异源表达过程中, 当溶质-溶质(蛋白质-蛋白质)相互作用强烈于溶质-溶剂(蛋白质-缓冲液)相互作用时, 蛋白质之间相互作用力(静电作用力、疏水作用力等)加强导致蛋白质聚集是影响其高效表达的重要因素^[105-108]。随着合成生物技术的发展, 通过蛋白质工程提高蛋白质的胶体和结构稳定性^[109-110]、翻译后修饰工程提高蛋白质的糖基化程度^[105, 111]将有望从源头上为塑料解聚酶聚集问题提供一种有效的解决方案。

(3) 混合塑料解聚多酶/混菌体系构建 针对结构复杂的塑料(例如PU)或者混合塑料, 单一的降解微生物/酶往往难以实现有效降解, 为减轻单一微生物的代谢压力, 可以将降解过程分成多个不同的过程来完成。细菌 *Ideonella sakaiensis* 201-F6就是通过分泌高活性PETase和MHETase协同作用使PET得到充分的降解^[62]; Chen等^[112]基于极端嗜热混菌堆肥技术也实现了活性污泥中混合微塑料的原位生物降解。在废弃碳资源降解领域多酶/混菌降解体系已经取得了良好的效果, 例如木质纤维素生物降解等^[113]。与木质纤维素相比, 塑料的疏水性和结晶程度更高、抗生物降解能力更强^[114], 因此在获取多种塑料降解微生物和降解元件的基础上, 设计并构建高效、稳定的多酶/混菌体系, 针对不同类型塑料组成定向调控多酶/混菌体系动态变化, 将是塑料生物解聚重点突破的方向。

(4) 塑料降解物高值化生物炼制途径 建立“塑料垃圾-解聚单体-高值化产品”的生物利用途

径, 不仅能推动塑料产业循环经济发展, 还能有效节约天然资源, 减少温室气体排放, 保护生态环境。欧盟早在2015年就启动了针对塑料生物降解和高值化利用项目-欧盟地平线2020塑料生物降解及利用项目P4SB (from plastic waste to plastic value using *Pseudomonas putida* synthetic biology), 打通了以PET塑料单体乙二醇/对苯二甲酸和PUR塑料单体丁二醇/己二酸合成生物可降解塑料PHA和生物表面活性剂鼠李糖酯的技术路线^[73, 76, 115-116], 形成了一支国际塑料降解领域顶尖的研究团队 (<https://www.p4sb.eu/>)。然而, 现有的高值化生物炼制途径效率仍然较低^[117], 设计并构建高效的塑料单体降解途径和同化途径, 并调控两条途径之间及与底盘细胞之间的适配性, 真正实现“降塑再造”, 推动循环经济发展, 合成生物技术将发挥重要作用。

鉴于“白色污染”与废弃塑料资源浪费问题的严重性, 我国“十三五”科技计划高度重视塑料生物降解与转化利用研究。国家自然科学基金委与欧盟委员会于2019年在“塑料降解微生物菌群”方向共同资助了2项高强度国际(地区)合作与交流项目并开展实质性合作研究, “合成塑料降解转化微生物菌群”项目由山东大学祁庆生教授和爱尔兰阿斯隆理工学院Margaret Brennan Fournet教授作为负责人 (<https://www.bioicep.eu/>), “废塑料资源高效生物降解转化的关键科学问题与技术”项目由南京工业大学姜岷教授和亚琛工业大学Lars M. Blank教授作为负责人 (<https://www.mix-up.eu/>)。同年, 科技部又在国家重点研发计划“变革性技术关键科学问题”和“合成生物学”重点专项中分别部署了“合成塑料解聚酶的定向进化工程及应用”和“活性污泥人工多细胞体系构建与应用”两个指南方向, 江南大学吴敬教授和中科院微生物研究所刘双江研究员分别获得2个项目的资助。2020年, 在刚刚发布的国家重点研发计划“绿色生物制造”重点专项2021年度指南征求意见稿中, 对塑料生物降解关键技术也进行了布局。2020年是上述塑料生物降解相关项目的启动实施之年, 相信随着合成生物技术发展并在塑料生物降解转化过程的广泛应用, 我国在废弃塑料资源的生物法降解转化方向将取得令人振奋的研究进展。

参 考 文 献

- [1] PLASTICSEUROPE. Plastics—the Facts 2020. An analysis of European plastics production, demand and waste data[R]. Brussels: Plastics Europe, Association of Plastic Manufacturers, 2020.
- [2] AMIRKHANIAN S. Utilization of scrap plastics in asphalt binders[M]// PACHECO-TORGAL F, AMIRKHANIAN S, WANG Hao, et al. Eco-efficient pavement construction materials. Sawston, Cambridge: Woodhead Publishing, 2020.
- [3] 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.
- [4] 中国物资再生协会再生塑料分会. 中国再生塑料行业发展报告2019—2020 [R]. 北京:中国物资再生协会再生塑料分会, 2020. China National Resources Recycling Association. 2019—2020 Development report of China plastic recycling industry[R]. Beijing: China National Resources Recycling Association, 2020.
- [5] JAMBECK J R, GEYER R, WILCOX C, et al. Plastic waste inputs from land into the ocean[J]. Science, 2015, 347(6223): 768-771.
- [6] LAMBERT S, WAGNER M. Characterisation of nanoplastics during the degradation of polystyrene[J]. Chemosphere, 2016, 145: 265-268.
- [7] 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 Xinjia, LIU Boyang, WANG Ming, et al. Progress in pyrolysis of waste plastics and refining of waste plastic oil[J]. Industrial Catalysis, 2019, 27(2): 31-34.
- [8] GEYER R, JAMBECK J R, LAW K L. Production, use, and fate of all plastics ever made[J]. Science Advances, 2017, 3(7): e1700782.
- [9] IWATA T. Biodegradable and bio-based polymers: future prospects of eco-friendly plastics[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2015, 54(11): 3210-3215.
- [10] SIVAN A. New perspectives in plastic biodegradation[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2011, 22(3): 422-426.
- [11] 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.
- [12] NIMCHUA T, EVELEIGH DE, SANGWATANAROJ U, et al. Screening of tropical fungi producing polyethylene terephthalate-hydrolyzing enzyme for fabric modification[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2008, 35(8): 843-850.
- [13] RONKVIST S Å, XIE Wenchun, LU Wenhua, et al. Cutinase-catalyzed hydrolysis of poly(ethylene terephthalate)[J]. Macro-

- molecules, 2009, 42(14): 5128-5138.
- [14] KLEEBERG I, HETZ C, KROPPESTEDT R M, et al. Biodegradation of aliphatic-aromatic copolyesters by *Thermomonospora fusca* and other thermophilic compost isolates[J]. Applied & Environmental Microbiology, 1998, 64(5): 1731-1735.
- [15] 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, 2010, 26(17): 1400-1405.
- [16] THEN J, WEI Ren, 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]. FEBS Open Bio, 2016, 6(5): 425-432.
- [17] THEN J, WEI Ren, 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.
- [18] HU Xiaoping, OSAKI S, HAYASHI M, et al. Degradation of a terephthalate-containing polyester by *Thermophilic Actinomyces* and *Bacillus Species* derived from composts[J]. Journal of Polymers and the Environment, 2008, 16(4): 103-108.
- [19] YOSHIDA S, HIRAGA K, TAKEHANA T, et al. A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate) [J]. Science, 2016, 351(6278): 1196-1199.
- [20] MATHUR G, PRASAD R. Degradation of polyurethane by *Aspergillus flavus* (ITCC 6051) isolated from soil[J]. Applied Biochemistry & Biotechnology, 2012, 167(6): 1595-1602.
- [21] KHAN S, NADIR S, SHAH Z U, et al. Biodegradation of polyester polyurethane by *Aspergillus tubingensis*[J]. Environmental Pollution, 2017, 225(1): 469-480.
- [22] OSMAN M, SATTI SM, LUQMAN A, et al. Degradation of polyester polyurethane by *Aspergillus* sp. strain S45 isolated from soil[J]. Journal of Polymers and the Environment, 2018, 26(1): 301-310.
- [23] ÁLVAREZ-BARRAGÁN J, DOMÍNGUEZ-MALFAVÓN L, VARGAS-SUÁREZ M, et al. Biodegradative activities of selected environmental fungi on a polyester polyurethane varnish and polyether polyurethane foams[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(17): 5225-5235.
- [24] WEBB H K, ARNOTT J, CRAWFORD R J, et al. Plastic degradation and its environmental implications with special reference to poly(ethylene terephthalate) [J]. Polymers, 2012, 5(1): 1-18.
- [25] MÜELLER R J. Biological degradation of synthetic polyesters — enzymes as potential catalysts for polyester recycling [J]. Process Biochemistry, 2006, 41(10): 2124-2128.
- [26] 李江华, 刘龙, 陈晟, 等. 角质酶的研究进展[J]. 生物工程学报, 2009, 25(12): 1829-1837.
- LI Jianghua, LIU Long, CHEN Sheng, et al. Advances in cutinase research[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2009, 25(12): 1829-1837.
- [27] KLEEBERG I, WELZEL K, VANDENHEUVEL J, et al. Decker. Characterization of a new extracellular hydrolase from *Thermobifida fusca* degrading aliphatic-aromatic copolyesters [J]. Biomacromolecules, 2005, 6: 262-270.
- [28] FEDER D. Humicola insolens cutinase; a novel catalyst for polymer synthesis reactions[D]. New York: Polytechnic Institute of New York University, 2013.
- [29] SULAIMAN S, YOU Dong-Ju, KANAYA E, et al. Crystal structure and thermodynamic and kinetic stability of metagenome-derived LC-cutinase[J]. Biochemistry, 2014, 53(11): 1858-1869.
- [30] CHEN Sheng, SU Lingqia, BILLIG S, et al. Biochemical characterization of the cutinases from *Thermobifida fusca*[J]. Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic, 2010, 63(3/4): 121-127.
- [31] ACERO E H, 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.
- [32] AKUTSU Y, NAKAJIMA-KAMBE T, NOMURA N, et al. Purification and properties of a polyester polyurethane-degrading enzyme from *Comamonas acidovorans* TB-35[J]. Applied & Environmental Microbiology, 1998, 64(1): 62-67.
- [33] NOMURA N, SHIGENO-AKUTSU Y, NAKAJIMA-KAMBE T, et al. Cloning and sequence analysis of a polyurethane esterase of *Comamonas acidovorans* TB-35[J]. Journal of Fermentation & Bioengineering, 1998, 86(4): 339-345.
- [34] RUIZ C, HOWARD G T. Nucleotide sequencing of a polyurethanase gene (*puaA*) from *Pseudomonas fluorescens*[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 1999, 44(2/3): 127-131.
- [35] STERN R V, HOWARD G T. The polyester polyurethanase gene (*pueA*) from *Pseudomonas chlororaphis* encodes a lipase[J]. FEMS Microbiology Letters, 2000, 185(2): 163 - 168.
- [36] HOWARD G T, CROTHER B, VICKNAIR J. Cloning, nucleotide sequencing and characterization of a polyurethanase gene (*pueB*) from *Pseudomonas chlororaphis*[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2001, 47(3): 141-149.
- [37] SCHMIDT J, WEI Ren, OESER T, et al. Degradation of polyester polyurethane by bacterial polyester hydrolases[J]. Polymers, 2017, 9(2): 65.
- [38] MAHAJAN N, GUPTA P. New insights into the microbial deg-

- radation of polyurethanes[J]. RSC Advances, 2015, 5(52): 41839-41854.
- [39] MAGNIN A, POLLET E, PHALIP V, et al. Evaluation of biological degradation of polyurethanes[J]. Biotechnology Advances, 2020, 39: 107457.
- [40] 彭瑞婷, 夏孟丽, 茹家康, 等. 聚氨酯塑料的微生物降解[J]. 生物工程学报, 2018, 34(9): 1398-1409.
- PENG Ruiting, XIA Mengli, RU Jiakang, et al. Microbial degradation of polyurethane plastics[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2018, 34(9): 1398-1409.
- [41] PHUA S K, CASTILLO E, ANDERSON J M, et al. Biodegradation of a polyurethane in vitro[J]. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2010, 21(2): 231-46.
- [42] CAMPIÑEZ M D, AGUILAR-DE-LEYVA Á, FERRIS C, et al. Study of the properties of the new biodegradable polyurethane PU (TEG-HMDI) as matrix forming excipient for controlled drug delivery[J]. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2013, 39(11): 1758-1764.
- [43] 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 Ying, YIN Chaofan, YUE Wenlong, et al. Microbial degradation of petroleum-based plastics[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2019, 35(11): 2092-2103.
- [44] 韩秋霞, 王庆昭, 张萌. 改性PE膜的生物可降解性研究[J]. 塑料工业, 2009, 37(10): 48-51.
- HAN Qiuxia, WANG Qingzhao, ZHANG Meng. Study on biodegradability of modified PE film[J]. China Plastics Industry, 2009, 37(10): 48-51.
- [45] BALASUBRAMANIAN V, NATARAJAN K, HEMAMBIKA B, et al. High-density polyethylene (HDPE)-degrading potential bacteria from marine ecosystem of Gulf of Mannar, India [J]. Letters in Applied Microbiology, 2010, 51(2): 205-211.
- [46] YANG Yu, YANG Jun, WU Weimin, et al. Biodegradation and mineralization of polystyrene by plastic-eating mealworms (I): Chemical and physical characterization and isotopic tests[J]. Environmental Science & Technology, 2015, 49(20): 12080-12086.
- [47] YANG Yu, YANG Jun, WU Weimin, et al. Biodegradation and mineralization of polystyrene by plastic-eating mealworms (II): Role of gut microorganisms[J]. Environmental Science & Technology, 2015, 49(20): 12087-12093.
- [48] TIAN Lili, KOLVENBACH Boris, CORVINI Nora, et al. Mineralisation of ¹⁴C-labelled polystyrene plastics by *Penicillium variabile* after ozonation pre-treatment[J]. New Biotechnology, 2017, 38: 101-105.
- [49] Tribedi P, Sil A K. Low-density polyethylene degradation by *Pseudomonas* sp. AKS2 biofilm. Environmental Science and Pollution Research, 2013, 20(6): 4146 - 4153.
- [50] Gilan I, Hadar Y, Sivan A. Colonization, biofilm formation and biodegradation of polyethylene by a strain of *Rhodococcus ruber*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 65(1): 97-104.
- [51] OIKAWA E, LINN KT, ENDO T, et al. Isolation and characterization of polystyrene degrading microorganisms for zero emission treatment of expanded polystyrene[J]. Environmental Engineering Research, 2003, 40: 373-379.
- [52] YANG Yu, YANG Jun, WU Weimin, et al. Evidence of polyethylene biodegradation by bacterial strains from the guts of plastic-eating waxworms[J]. Environmental Science & Technology, 2014, 48(23): 13776-13784.
- [53] WEI Ren, ZIMMERMANN W. Microbial enzymes for the recycling of recalcitrant petroleum-based plastics: how far are we?[J]. Microbial Biotechnology, 2017, 10(6): 1308-1322.
- [54] SANTO M, WEITSMAN R, SIVAN A. The role of the copper-binding enzyme-laccase-in the biodegradation of polyethylene by the actinomycete *Rhodococcus ruber*[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2013, 84: 204-210.
- [55] FUJISAWA m, HIRAI H, NISHIDA T. Degradation of polyethylene and Nylon-66 by the laccase-mediator system[J]. Journal of Polymers & the Environment, 2001, 9(3): 103-108.
- [56] ROJO F. Enzymes for aerobic degradation of alkanes[M]// TIMMIS K N. Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. Berlin: Springer, 2010.
- [57] YOON Moongyung, JEON Hyunjeong, KIM Malnam. Biodegradation of polyethylene by a soil bacterium and *AlkB* cloned recombinant cell[J]. Journal of Bioremediation & Biodegradation, 2012, 3(4): 8.
- [58] JEON Hyunjeong, KIM Malnam. Functional analysis of alkane hydroxylase system derived from *Pseudomonas aeruginosa* E7 for low molecular weight polyethylene biodegradation[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2015, 103: 141-146.
- [59] NAKAMIYA K, SAKASITA G, OOI T, et al. Enzymatic degradation of polystyrene by hydroquinone peroxidase of *Azotobacter beijerinckii* HM121[J]. Journal of Fermentation & Bioengineering, 1997, 84(5): 480-482.
- [60] IYOSHI Y, TSUTSUMI Y, NISHIDA T. Polyethylene degradation by lignin-degrading fungi and manganese peroxidase[J]. Journal of Wood Science, 1998, 44(3): 222-229.
- [61] ALVES N M, MANO J F, BALAGUER E, et al. Glass transition and structural relaxation in semi-crystalline poly(ethylene terephthalate): a DSC study[J]. Polymer, 2002, 43(15): 4111-4122.
- [62] TOURNIER V, TOPHAM C M, GILLES A, et al. An engi-

- neered PET depolymerase to break down and recycle plastic bottles[J]. *Nature*, 2020, 580(7802): 216-219.
- [63] WEI Ren, OESER T, BARTH M, et al. Turbidimetric analysis of the enzymatic hydrolysis of polyethylene terephthalate nanoparticles[J]. *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*, 2014, 103: 72-78.
- [64] RIBITSCH D, ACERO E H, 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.
- [65] RIBITSCH D, YEBRA AO, ZITZENBACHER S, et al. Fusion of binding domains to *Thermobifida cellulolytica* cutinase to tune sorption characteristics and enhancing PET hydrolysis[J]. *Biomacromolecules*, 2013, 14(6): 1769 - 177.
- [66] GAMERITH C, ACERO E H, PELLIS A, et al. Improving enzymatic polyurethane hydrolysis by tuning enzyme sorption[J]. *Polymer Degradation and Stability*, 2016, 132: 69-77.
- [67] SILVA C, DA Shi, SILVA N, et al. Engineered *Thermobifida fusca* cutinase with increased activity on polyester substrates[J]. *Biotechnology Journal*, 2011, 6(10): 1230-1239.
- [68] WEI Ren, 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.
- [69] 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.
- [70] 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.
- [71] PARKE D, GARCIA M A, ORNSTON L N. Cloning and genetic characterization of *dca* genes required for β -oxidation of straight-chain dicarboxylic acids in *Acinetobacter* sp. strain ADP1[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(10): 4817-4827.
- [72] CHOI Jun-Ho, KIM Tae-Kang, KIM Young-Mog, et al. Cloning and characterization of a gene cluster for cyclohexanone oxidation in *Rhodococcus* sp. TK6[J]. *Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2006, 16(4): 511-518.
- [73] FRANZEN M A, JAYAKODY L N, LI Wing-Jin, et al. Engineering *Pseudomonas putida* KT2440 for efficient ethylene glycol utilization[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 48: 197-207.
- [74] MUCKSCHEL B, SIMON O, KLEBENSBERGER J, et al. Ethylene glycol metabolism by *Pseudomonas putida*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(24): 8531-8539.
- [75] TRIFUNOVIĆ D, SCHUCHMANN K, MULLER V. Ethylene glycol metabolism in the acetogen *Acetobacterium woodii*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2016, 198(7): 1058-1065.
- [76] LI Wing-Jin, NARANCIC T, KENNY S T, et al. Unraveling 1, 4-butanediol metabolism in *Pseudomonas putida* KT2440[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 382.
- [77] SASOH M, MASAI E, ISHIBASHI S, et al. Characterization of the terephthalate degradation genes of *Comamonas* sp. strain E6[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(3): 1825-1832.
- [78] SHIGEMATSU T, YUMIHARA K, UEDA Y, et al. Purification and gene cloning of the oxygenase component of the terephthalate 1, 2-dioxygenase system from *Delftia tsuruhatensis* strain T7[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 220(2): 255-260.
- [79] CHOI Ki Young, KIM Dockyu, SUL Woo Jun, et al. Molecular and biochemical analysis of phthalate and terephthalate degradation by *Rhodococcus* sp. strain DK17[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 252(2): 207-213.
- [80] KIM Hee Taek, KIM Jae Kyun, CHA Hyun Gil, et al. Biological valorization of poly(ethylene terephthalate) monomers for upcycling waste PET[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2019, 7(24): 19396-19406.
- [81] KENNY S T, RUNIC J N, KAMINSKY W, et al. Development of a bioprocess to convert PET derived terephthalic acid and biodiesel derived glycerol to medium chain length polyhydroxyalkanoate[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 95(3): 623-633.
- [82] ESPINOSA M J C, BLANCO A C, SCHMIDGALL T, et al. Toward biorecycling: isolation of a soil bacterium that grows on a polyurethane oligomer and monomer[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 404.
- [83] TENAGY, PARK Jun Seok, IWAMA R, et al. Involvement of acyl-CoA synthetase genes in *n*-alkane assimilation and fatty acid utilization in yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. *FEMS Yeast Research*, 2015, 15(4): fov031.
- [84] PATRAUCHAN M A, FLORIZONE C, EAPEN S, et al. Roles of ring-hydroxylating dioxygenases in styrene and benzene catabolism in *Rhodococcus jostii* RHA1[J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(1): 37-47.
- [85] PARK Mi-So, BAE Jong-Won, HAN Ju-Hee, et al. Characterization of styrene catabolic genes of *Pseudomonas putida* SN1 and construction of a recombinant *Escherichia coli* containing styrene monooxygenase gene for the production of (*S*)-styrene

- oxide[J]. *Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2006, 16(7): 1032-1040.
- [86] ITOH N, YOSHIDA K, OKADA K. Isolation and identification of styrene-degrading *Corynebacterium* strains, and their styrene metabolism[J]. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 1996, 60(11): 1826-1830.
- [87] TODA H, ITOH N. Isolation and characterization of styrene metabolism genes from styrene-assimilating soil bacteria *Rhodococcus* sp. ST-5 and ST-10[J]. *Journal of Bioscience & Bioengineering*, 2012, 113(1): 12-19.
- [88] OELSCHLÄGEL M, ZIMMERLING J, TISCHLER D. A review: the styrene metabolizing cascade of side-chain oxygenation as biotechnological basis to gain various valuable compounds[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 490.
- [89] NIKODINOVIC-RUNIC J, CASEY E, DUANE G F, et al. Process analysis of the conversion of styrene to biomass and medium chain length polyhydroxyalkanoate in a two-phase bioreactor[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2011, 108(10): 2447-2455.
- [90] SEN S K, RAUT S. Microbial degradation of low density polyethylene (LDPE): a review[J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2015, 3(1): 462-473.
- [91] KENNY S T, RUNIC J N, KAMINSKY W, et al. Up-cycling of PET (polyethylene terephthalate) to the biodegradable plastic PHA (polyhydroxyalkanoate)[J]. *Environmental Science & Technology*, 2008, 42(20): 7696-7701.
- [92] CHRISTOVA N, TULEVA B, LALCHEV Z, et al. Rhamnolipid biosurfactants produced by *Renibacterium salmoninarum* 27BN during growth on *n*-hexadecane[J]. *Ztschrift Für Naturforschung C*, 2004, 59(1/2): 70-74.
- [93] ABDEL-MAWGOUD A M, LEPINE F, DEZIEL E. A stereospecific pathway diverts β -oxidation intermediates to the biosynthesis of rhamnolipid biosurfactants[J]. *Chemistry & Biology*, 2014, 21(1): 156-164.
- [94] MIHRETEAB M, STUBBLEFIELD B A, GILBERT E S. Microbial bioconversion of thermally depolymerized polypropylene by *Yarrowia lipolytica* for fatty acid production[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(18): 7729-7740.
- [95] CATUR UTOMO RN, LI Wing-Jin, TISO T, et al. Defined microbial mixed culture for utilization of polyurethane monomers[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2020, 8(47): 17466-17474.
- [96] PALM G J, REISKY L, BÖTTCHER D, et al. Structure of the plastic-degrading *Ideonella sakaiensis* MHEase bound to a substrate[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 1717.
- [97] 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, 155: E4350-E4357.
- [98] INDERTHAL H, TAI Siew Leng, HARRISON S T L. Non-hydrolyzable plastics - an interdisciplinary look at plastic bio-oxidation[J]. *Trends in Biotechnology*, 2021, 39(1): 12-23.
- [99] YANG Shanshan, BRANDON A M, FLANAGAN J C A, et al. Biodegradation of polystyrene wastes in yellow mealworms (larvae of *Tenebrio molitor* Linnaeus): factors affecting biodegradation rates and the ability of polystyrene-fed larvae to complete their life cycle[J]. *Chemosphere*, 2018, 191: 979-989.
- [100] BRANDON A M, GAO Shuhong, TIAN Renmao, et al. Biodegradation of polyethylene and plastic mixtures in mealworms (larvae of *Tenebrio molitor*) and effects on the gut microbiome[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(11): 6526-6533.
- [101] PENG Boyu, SU Yiming, CHEN Zhibin, et al. Biodegradation of polystyrene by dark (*Tenebrio obscurus*) and yellow (*Tenebrio molitor*) mealworms (Coleoptera: Tenebrionidae)[J]. *Environmental Science & Technology*, 2019, 53(9): 5256-5265.
- [102] KONG Hyun Gi, KIM Hyun Ho, CHUNG Joon-hui, et al. The *Galleria mellonella* hologenome supports microbiota-independent metabolism of long-chain hydrocarbon beeswax[J]. *Cell Reports*, 2019, 26(9): 2451-2464.e5.
- [103] JEON Hyun Jeong, KIM Mal Nam. Comparison of the functional characterization between alkane monooxygenases for low-molecular-weight polyethylene biodegradation[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2016, 114: 202-208.
- [104] GUAN Zhengbing, LUO Quan, WANG Haoran, et al. Bacterial laccases: promising biological green tools for industrial applications[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2018, 75: 3569-3592.
- [105] SHIRKE A N, WHITE C, ENGLAENDER J A, et al. Stabilizing leaf and branch compost cutinase (LCC) with glycosylation: mechanism and effect on PET hydrolysis[J]. *Biochemistry*, 2018, 57(7): 1190-1200.
- [106] NICOUD L, OWCZARZ M, AROSIO P, et al. A multiscale view of therapeutic protein aggregation: a colloid science perspective[J]. *Biotechnology Journal*, 2015, 10(3): 367-378.
- [107] MAJHI P R, GANTA R R, VANAM R P, et al. Electrostatically driven protein aggregation: β -lactoglobulin at low ionic strength[J]. *Langmuir*, 2006, 22(22): 9150-9159.
- [108] JIANG Liguao, CAO Siqin, CHEUNG P Pak-Hang, et al. Real-time monitoring of hydrophobic aggregation reveals a critical role of cooperativity in hydrophobic effect[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 15639.

- [109] KAMAL M Z, AHMAD S, MOLUGU T R, et al. *In vitro* evolved non-aggregating and thermostable lipase: structural and thermodynamic investigation[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2011, 413(3): 726-741.
- [110] MATSUI D, NAKANO S, DADASHIPOUR M, et al. Rational identification of aggregation hotspots based on secondary structure and amino acid hydrophobicity[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 9558.
- [111] SHENTAL-BECHOR D, LEVY Y. Effect of glycosylation on protein folding: a close look at thermodynamic stabilization [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(24): 8256-8261.
- [112] CHEN Zhi, ZHAO Wenqi, XING Ruizhi, et al. Enhanced *in situ* biodegradation of microplastics in sewage sludge using hyperthermophilic composting technology[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2019, 384: 121271.
- [113] SOLOMON K V, HAITJEMA C H, HENSKE J K, et al. Early-branching gut fungi possess a large, comprehensive array of biomass-degrading enzymes[J]. *Science*, 2016, 351(6278): 1192-1195.
- [114] CHEN Chunchi, DAI Longhai, MA Lixin, et al. Enzymatic degradation of plant biomass and synthetic polymers[J]. *Nature Reviews Chemistry*, 2020, 4(3): 114-126.
- [115] ESCAPA I F, GARCÍA J L, BÜHLER B, et al. The polyhydroxyalkanoate metabolism controls carbon and energy spillage in *Pseudomonas putida*[J]. *Environmental Microbiology*, 2012, 14(4): 1049-1063.
- [116] WIERCKX N, PRIETO M A, POMPOSIELLO P, et al. Plastic waste as a novel substrate for industrial biotechnology[J]. *Microbial Biotechnology*, 2015, 8(6): 900-903.
- [117] RU Jiakang, HUO Yixin, YANG Yu. Microbial degradation

and valorization of plastic wastes[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 442.



通讯作者: 董维亮(1988—),男,博士,教授,研究方向为环境污染物的生物降解与转化利用。

E-mail: dwl@njtech.edu.cn



通讯作者: 姜岷(1972—),男,博士,教授,研究方向为废弃碳资源利用人工多细胞体系设计与构建。

E-mail: jiangmin@njtech.edu.cn



第一作者: 钱秀娟(1992—),女,博士,博士后,研究方向为代谢工程及合成生物学。

E-mail: xiujuanqian@njtech.edu.cn