



聚对苯二甲酸乙二醇酯水解酶 *IsPETase* 及其应用展望

魏漪, 肖云杰, 杨海涛, 王泽方*

天津大学生命科学学院, 天津 300072

魏漪, 肖云杰, 杨海涛, 王泽方. 聚对苯二甲酸乙二醇酯水解酶 *IsPETase* 及其应用展望[J]. 微生物学报, 2023, 63(1): 15-29.
WEI Yi, XIAO Yunjie, YANG Haitao, WANG Zefang. Polyethylene terephthalate hydrolase *IsPETase* and its application prospect[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(1): 15-29.

摘要: 随着生物技术的迅速发展, 酶解法作为一种绿色可持续的聚对苯二甲酸乙二醇酯 (polyethylene terephthalate, PET)回收处理方案, 有望解决全球范围内废弃 PET 带来的环境污染问题。众多 PET 水解酶中, 来自 *Ideonella sakaiensis* 的 PETase 因其对 PET 底物的高特异性成为当下研究的热点。基于对酶的结构和功能的深刻理解, 本文总结了近年来 PETase 的工程改造进展, 以提高酶的降解活性、热稳定性和对底物的吸附性; 介绍了 PETase 的分泌表达策略、细胞表面展示技术, 以及 PETase 与 MHETase 双酶系统的应用; 最后, 我们对塑料生物降解领域存在的挑战及可能的解决途径进行了展望, 这些工作将为促进聚合物生物降解的实际应用提供参考。

关键词: 聚对苯二甲酸乙二醇酯; 生物降解; PETase; 蛋白质工程; 酶工程

Polyethylene terephthalate hydrolase *IsPETase* and its application prospect

WEI Yi, XIAO Yunjie, YANG Haitao, WANG Zefang*

School of Life Sciences, Tianjin University, Tianjin 300072, China

Abstract: As biotechnology advances, biodegradation of polyethylene terephthalate (PET) has emerged as an attractive strategy, promising to reduce the environmental burden caused by

资助项目: 国家自然科学基金(31970048)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31970048).

*Corresponding author. Tel: +86-22-27403906, E-mail: zefangwang@tju.edu.cn

Received: 2022-04-11; Accepted: 2022-05-09; Published online: 2022-06-30

waste PET. Among many PET hydrolases, PETase from *Ideonella sakaiensis* has become a hot research topic owing to high specificity to PET substrate. Based on the structure and function of PETase, this review summarized modifications of this enzyme in recent years to improve the degradation activity, thermostability, and adsorption of the enzyme. Moreover, we also introduced the secretory expression systems and the cell surface display of PETase, as well as the application of the PETase together with MHETase. Finally, we summed up the challenges in and possible solutions to plastic biodegradation. This study is expected to provide a reference for promoting the practical application of polymer biodegradation.

Keywords: polyethylene terephthalate (PET); biodegradation; PETase; protein engineering; enzyme engineering

塑料在现代社会中发挥着重要作用,广泛应用于包装、建筑、纺织、运输、电子设备以及工业机械等方面,也应用在人们日常生活的方方面面,极大地改变了人类的生活方式^[1]。但随着塑料产品的大量使用和消费,越来越多的塑料废品在环境中积累,已经对全球的生态环境造成了严重的破坏,给人类健康也带来了严重威胁^[2]。近年来,环保意识的提高激发了人们对塑料回收技术和方案的探索,不仅是为了处理越来越多的塑料废物,还为了减少塑料合成对石油资源的依赖。

众多种类塑料之中,聚对苯二甲酸乙二醇酯(polyethylene terephthalate, PET)是一种以对苯二甲酸(terephthalic acid, TPA)和乙二醇(ethylene glycol, EG)为单体的聚合物。因其重量轻、绝缘性好、强度和透明度高、热性能高、耐化学腐蚀等优良性能,成为应用最广泛的聚酯塑料之一,年消费量超过3亿t,约占世界塑料总产量的13%^[3]。并且,PET也是世界上回收最广泛的包装材料。早期的PET回收策略通常包括物理和化学法,但由于性能损失、二次污染和高能耗成本等问题,2类方法都未得到广泛应用^[4-6]。

生物法是近年来兴起的一种新型PET降解回收技术,通过生物实体(如微生物,即细菌、真菌和海洋微藻),或酶的作用分解这类有机物质^[1-2]。生物法的优点包括温和的工艺

条件、相对较低的能量输入、不需要危险化学品试剂和昂贵的机械,使其成为一个非常有前景的选择。重要的是,PET主链中具有可水解的化学键——酯键,使其更容易被生物降解;其他塑料如聚乙烯(polyethylene, PE)、聚苯乙烯(polystyrene, PS)、聚丙烯(polypropylene, PP)和聚氯乙烯(polyvinyl chloride, PVC)主链中高度稳定的C-C键缺乏水解性,因此其生物降解受到阻碍,必须进行预氧化或预处理才能进一步解聚^[7]。

1 PET水解酶——PETase

近些年的研究表明,一些微生物已经进化到可以产生多种能够降解和加工PET的水解酶,包括脂肪酶、酯酶、羧酸酯酶和角质酶等^[8-12]。然而,大多数PET水解酶对PET的底物特异性太低,转化率也较低^[10,13]。2016年研究人员发现了一种能高效降解PET的细菌菌株*Ideonella sakaiensis*,同时也报道了该菌分泌的具有PET降解作用的水解酶——PETase,该酶可以将PET水解为双(2-羟基乙基)对苯二甲酸(bis(2-hydroxyethyl) terephthalate, BHET)、单(2-羟基乙基)对苯二甲酸[mono(2-hydroxyethyl) terephthalate, MHET]和TPA(图1)^[14]。在常温(30℃)和pH 7.0的条件下,*Is*PETase对PET薄膜和BHET的活性分别是先前已鉴定的酶

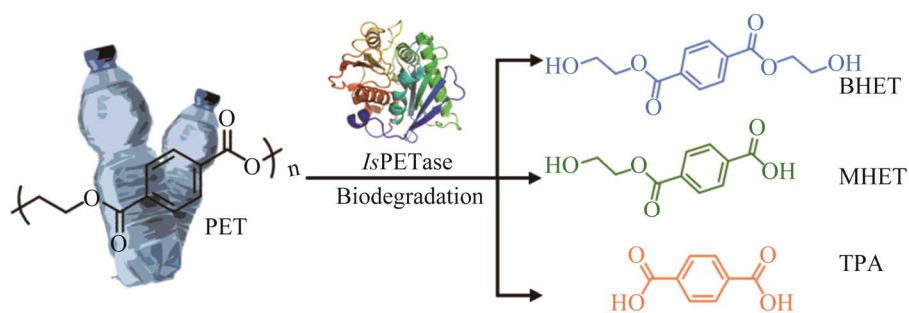


图 1 PETase 降解 PET 的示意图^[14]

Figure 1 Schematic diagram of PETase degradation of PET^[14].

TfH、LCC 和 FsC 的 120.0、5.5 和 88.0 倍；对高度结晶的商用瓶源 PET 的活性比其他 PET 水解酶至少提高了约 20 倍；并且 *IsPETase* 只专一性降解 PET，而不降解其他聚酯类塑料^[14]。

从 2016 年发现 PETase 至今，已有多个课题组报道了 PETase 的三维结构^[15-19]，国内外也已有较多报道对 PETase 的结构与功能进行了综述^[20-21]。该酶为典型的 α/β -水解酶折叠构象，结构中心的 β -折叠(β 1-9)被 α -螺旋(α 1-7)包围。催化三联体 S160-H237-D206 在同源 PET 水解酶中严格保守，其中 Ser160 作为亲核试剂，催化酸 His237 和催化碱 Asp206 组成电荷中继系统。

相比于其他 PET 水解酶，PETase 的独特之处在于：(1) PETase 有高度极化的表面电荷，导致其等电点(pI)为 9.6，而同源角质酶的表面分布着大量酸性和碱性残基的小斑块，使其 pI 更中性^[18]。(2) 在活性位点方面，与 *Thermobifida fusca* 角质酶相比，在 PETase 中观察到活性位点的口袋相对加宽，意味着 PETase 更适合容纳像 PET 这样的长链大分子聚酯^[22-23]。例如 PETase 口袋附近的 Ser238 的较小侧链有利于 PET 大分子进入催化中心，而角质酶的对位位置是空间位阻大得多的 Phe 残基^[17]。(3) PETase 中形成 2 个二硫键(DS1 和 DS2)。特异性 DS1(Cys203-Cys239)位于活性位点附近，连接

分别含有催化酸(D206)和催化碱(H237)的 β 7- α 5 和 β 8- α 6 环，与催化三联体的完整性有关^[24-25]。此外，DS1 还促进了 β 8- α 6 环的灵活性，PETase 中的 β 8- α 6 环比其他同源酶长 3 个残基，因此形成了一个扩展的结合位点，为 PET 的结合提供了改进的柔性和更大的空腔^[16,23]。(4) 催化三联体附近的 Ser214 是一个关键的氨基酸取代，可以允许 Trp185 的“摆动”，从而提供了更宽更灵活的底物结合口袋；而在角质酶中，由于 His184 和 Trp155 侧链之间的面对面堆积作用，不允许这种灵活的“摆动”^[15]。

为了阐明 PETase 的底物结合模式，Han 等^[15]解析了 PETase 与配体 2-羟乙基甲基对苯二甲酸酯(2-hydroxyethyl methyl terephthalate, HEMT)和对硝基苯酚(p-nitrophenol, pNP)结合后的复合物结构。其中 HEMT 的行为类似于底物类似物，结合在催化位点处(图 2A)。HEMT 的酯氧原子与 H237 侧链形成氢键，羰基氧原子与氧阴离子洞残基 M161 和 Y87 的主链 NH 基团形成氢键，苯环与 W185 形成边对面堆积，其他残基提供疏水相互作用。配体 pNP 同样位于第一个苯环结合位点，但位置比 HEMT 离活性位点远约 2.3 Å，并且旋转约 36°，与 W185 形成面对面堆叠(图 2B)。配体 pNP 的结合模式与产物更类似。

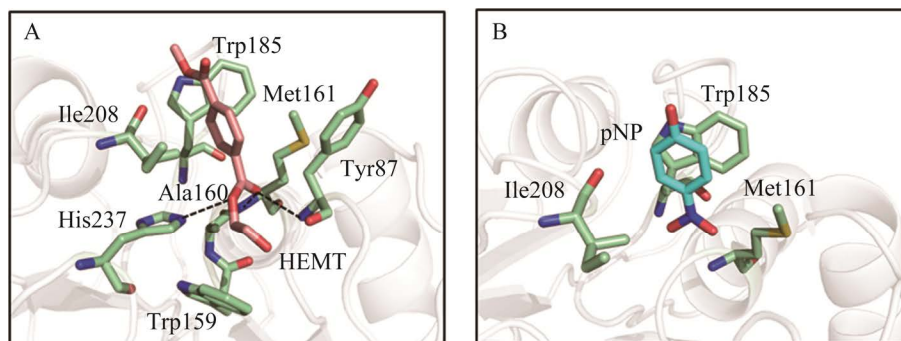


图 2 *IsPETase*^{R132G/S160A} 与配体的复合物结构^[15]

Figure 2 The complex structure of *IsPETase*^{R132G/S160A} and ligands^[15]. Detailed interaction network in complex structures of *IsPETase*^{R132G/S160A} with ligands (A) HEMT (PDB: 5XH3) and (B) pNP (PDB: 5XH2). Ligands and amino acid residues are shown in sticks; Distances less than 3.5 Å are indicated by dashed lines.

在另一项工作中, Joo 等^[16]通过分子对接预测了 PETase 与含有 4 个 MHET 分子的底物类似物 2-HE(MHET)₄[(2-hydroxyethyl-(monohydroxyethyl terephthalate)₄]的结构模型。三联体残基 Ser160 作为亲核试剂作用于酯键的羰基碳原子。底物结合位在酶表面上形成一个长而浅的疏水性“L”形口袋(图 3)。亚位点 I 和亚位点 II 分别能够结合 1 个和 3 个 MHET 基团。亚位点 I 中 Tyr87 和 Met161 组成氧阴离子洞, 负责稳定四面体中间体的氧阴离子^[17-18], Trp185 残基与第一个苯环形成面对面堆积, Met161 和 Ile208 通过分别在亚位点 I 的底部和侧面提供疏水表面来帮助第一个 MHET 的结合。亚位点 II 形成的口袋比亚位点 I 更长、更浅, 进一步分为 IIa、IIb 和 IIc 三部分。亚位点 II 与底物分子之间结合主要由疏水相互作用介导和稳定, 在亚位点 IIc 中也有极性作用的参与。

除了分子对接之外, 近些年已经开发出其他计算策略来引导我们提出 PET 水解酶的催化机制, 例如利用分子动力学模拟(molecular dynamics, MD)可以对酶催化反应中原子的运动和热力学进行解释, 帮助我们理解 PETase 的催化机理^[26-27]。并且, MD 还可以提供由 PET 的结合诱导的酶结构构象变化的动态信息, 以及酶对与位点结合的底物的选择性和亲和力^[28-29]。

因此, 计算和实验研究相结合所带来的重大进步以及尚在开发的计算工具中蕴含的巨大潜力鼓励我们优先考虑这些领域的研究, 从而为 PET 水解酶突变体的合理设计研究提供了依据。

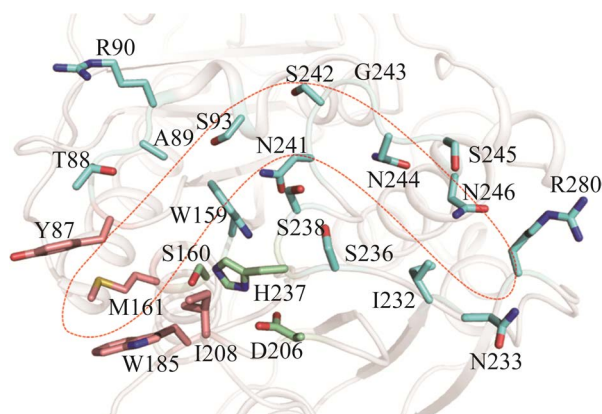


图 3 *IsPETase* 中底物结合位点(PDB: 5XJH)^[16]

Figure 3 Substrate binding site in *IsPETase* (PDB: 5XJH)^[16]. The residues of the substrate binding site are shown with sticks; The red dotted line represents the substrate binding pocket.

2 PETase 的蛋白质工程

到目前为止, 虽然 PET 的生物降解具有诸多优势, 但由于 PET 水解酶的催化效率和热稳定性等方面存在明显不足, 导致目前 PET 水解酶的周转率不足以用于工业应用^[30]。即使是对

高结晶度 PET 表现出特异性的 *Is*PETase, 也被认为具有相对较低的催化活性^[31]。随着 PET 水解酶的晶体结构和催化机制的阐明, 许多不同的研究小组一直致力于将酶的结构与功能联系起来, 人们总结了大量与 PET 水解活性相关的关键特征, 可作为筛选更多潜在酶的标准^[23,32]。如今, 通过蛋白质工程对酶进行修饰, 可能会提供更多机会来产生具有高活性、特异性、稳定性、耐热性以及可重复使用性的新型酶, 推动 PET 水解酶的工业应用^[33-34]。

2.1 底物结合口袋改造

酶和底物之间的识别和结合是发挥水解活性的关键步骤。PET 水解酶的活性口袋必须有足够的空间来容纳大分子底物。Liu 等^[24]提出, PETase 的宽底物结合口袋对于其出色的降解高结晶度 PET 的能力至关重要。有趣的是, Austin 等^[18]将 PETase 中 2 个活性位点残基突变为角质酶中的保守氨基酸(S238F/W159H)后, 尽管观察到结合口袋的缩小, 但因突变后的

Phe238 与底物之间增强的芳香族相互作用, PET 降解活性反而得到提高。这表明虽然 PETase 已在富含 PET 的环境中得到进化, 但其底物结合口袋并没有完全优化, 仍具有提升的潜力。许多课题组已经开展了对 PETase 的定点突变研究, 以发现对其催化起重要作用的氨基酸残基(表 1)。

Joo 等^[16]发现, Arg280 由于其正电荷和略微突出的结构, 似乎阻碍了底物结合位点的延伸。当 Arg280 突变为侧链较小的 Ala 后, 突变体 *Is*PETase^{R280A} 的活性在 18 h 内增加了 1.2 倍, 在 36 h 内增加了 1.3 倍。Ma 等^[35]针对 *Is*PETase 底物结合口袋周围 6 个关键残基, 使用侧链较小或更疏水的氨基酸进行替换, 以提高酶对底物的结合能力。结果显示, 与野生型相比, R61A、L88F 和 I179F 突变体的活性分别增加了 1.4、2.1 和 2.5 倍。Liu 等^[24]利用定点诱变设计了一系列 *Is*PETase 突变体, 将位于底物结合口袋中的 Trp159 突变为丙氨酸或组氨酸时有效提高了酶活性; 以及用丙

表 1 改善降解活性的 PETase 的定点突变体

Table 1 Site-directed mutants of PETase with improved degradation activity

Mutation	PET substrate	Degradation activity ^a	Assay conditions	Reference
Y87A	Drinking bottle	3.1	30 °C, pH 9, 48 h	[24]
	Commercial PET film	0.4 (18 h); 0.5 (36 h)	30 °C, pH 9, 18/36 h	[16]
	PET film	0.1 (TPA); 0.8 (MHET)	30 °C, pH 9, 42 h	[15]
R90A	Biaxially oriented PET film	1.4	30 °C, pH 8.5, 48 h	[35]
L117F	Biaxially oriented PET film	2.1	30 °C, pH 8.5, 48 h	[35]
W159A	Drinking bottle	1.3	30 °C, pH 9, 48 h	[24]
	Commercial PET film	0.2 (18 h); 0.2 (36 h)	30 °C, pH 9, 18/36 h	[16]
	PET film	0.1 (TPA); 0.2 (MHET)	30 °C, pH 9, 42 h	[15]
W159H	Drinking bottle	2.4	30 °C, pH 9, 48 h	[24]
	Commercial PET film	0.5 (18 h); 0.6 (36 h)	30 °C, pH 9, 18/36 h	[16]
	PET film	0.1 (TPA); 0.1 (MHET)	30 °C, pH 9, 42 h	[15]
I208F	Biaxially oriented PET film	2.5	30 °C, pH 8.5, 48 h	[35]
A209I	Drinking bottle	1.3	30 °C, pH 9, 48 h	[24]
S214H	Drinking bottle	1.9	30 °C, pH 9, 48 h	[24]
S238F/W159H	PET film	2.7	30 °C, pH 7.2, 96 h	[18]
R280A	Commercial PET film	1.2 (18 h); 1.3 (36 h)	30 °C, pH 9, 18/36 h	[16]

a: Ratio of value of the PET degradation activity of the PETase mutant to that of the wild type.

氨酸取代 Tyr87 残基(氧阴离子洞残基),使活性提高了 3.1 倍。Chen 等^[36]通过 PETase 的结构分析鉴定了独特的氨基酸 S214 和 I218,并指出它们与 W185 摆动和 $\beta 6$ - $\beta 7$ 环柔性有关,有助于增加底物结合口袋灵活性。综上所述,合理设计已被证明是有利的工具以提高酶的活性,但其效果还远远达不到实际应用中对酶活的要求。

除了用以改善催化效率,修饰底物口袋以扩大其底物范围也是具有前景的工作^[32]。通常认为 *Is*PETase 只能专一性水解 PET 底物。然而,在对酶催化中心的改造工作中发现了 3 个突变体(S93M、W159F 和 N241F),它们具有很强的水解萘酯的能力^[19]。*Is*PETase^{S238F/W159H}能够高效降解聚(乙烯-2,5-呋喃二甲酸酯)[poly(ethylene 2,5-furandicarboxylate), PEF]^[18]。此外,一种热稳定突变体不仅能有效降解 PET 膜,而且对聚对苯二甲酸丁二醇酯(polybutylene terephthalate, PBT)和聚 2,6-萘二甲酸乙二醇酯

[poly(ethylene 2,6-naphthalate), PEN]具有广泛的水解能力^[37]。这些结果表明, *Is*PETase 在塑料替代品的降解方面也有着巨大的发展潜力。

2.2 热稳定性改造

高结晶度 PET 的结构紧密、链迁移率低,导致骨架酯键的水解性极低,是限制其生物降解的最大阻碍之一。随着反应温度的增加,聚合物链会在高温下波动,使得 PET 链的柔性增加,能够增加它们对酶的可及性,从而增加 PET 底物和酶活性中心结合的概率^[38-39]。2020 年, Tournier 等^[40]发表了一项关于工程 LCC 突变体的突破性研究,他们通过将结合位点进行饱和突变并叠加组合,得到 4 种变体(ICCG、ICCM、WCCG 和 WCCM)将 T_m 提高了 13.4 °C。最终突变体能够在 72 °C、10 h 内以工业相关规模将 90%以上的非晶化 PET 解聚成单体。受此启发,越来越多的具有高热稳定性的 PETase 突变体被筛选或者改造出来(表 2)。

表 2 引起改进的热稳定性的 PETase 突变位点

Table 2 PETase mutation sites leading to improved thermostabilities

Mutation	Molecular mechanism	$\Delta T_m / ^\circ\text{C}$	Reference
P181A	Hydrogen bond	0.5	[41]
S121E	Hydrogen bond	7.21	[41]
D186H	Hydrophobic interaction		
N246D	Salt bridge	(S121E/D186H/N246D) 11	[42]
N233C/S282C	Disulfide bond	14.1±1.3	[43]
W159H	Hydrogen bond	31	[37]
T140D	Hydrogen bond		
I168R/S188Q	Hydrogen bond, salt bridge		
A180I	Hydrophobic interaction		
R280A	Hydrophobic interaction		
S214H/L117F/Q119Y	π - π interaction		
G165A	Conformational entropy		
W159H/F229Y	Hydrogen bond, salt bridge	10.4	[44]
K95N/F201I	-	5.1	[45]
P181V	Hydrogen bond	(HotPETase) 34.4	[46]
S214Y	π - π interaction		
N233C/S282C	Disulfide bond		

—: None.

Son 等^[41]基于结构发现 *IsPETase* 的 $\beta 6$ - $\beta 7$ 连接环的 B 因子值相对较高, 是结构中最灵活的区域之一, 而同源酶 *TfCut2* 中的对应区域形成了相当稳定的结构, 位于环上的 His156 残基与 $\alpha 2$ 螺旋上的 Asp94 残基之间形成氢键 (图 4)。因此, Son 等^[41]设计生成了 *IsPETase*^{S121E/D186H} 突变体, 通过引入氢键来增加 $\beta 6$ - $\beta 7$ 连接环的稳定性, 结果证明形成水介导的氢键, 使突变体的 T_m 值比 *IsPETase*^{WT} 高了 7.21 °C。

Son 等^[42]在以上突变的基础上又进一步设计, 其中 *IsPETase*^{N246D} 变体表现出活性增加了

2.6 倍, 并且热稳定性增强。晶体结构证明, 带负电荷的 N246D 残基和带正电荷的 Arg280 残基形成强烈结合的盐桥, 使得热稳定性增加, 并且盐桥改变了 Arg280 的构象, 显示了一个扩展的亚位点 IIc, 进一步增加了底物的结合空间以及结合能力, 从而提升了降解活性 (图 5)。

Zhong-Johnson 等^[43]根据 Oda 等^[38]的研究, 将 *IsPETase* 中与角质酶突变体 Cut190* (Cut190^{S226P/R228S}) 的 Asp250 和 Glu296 对应的残基 N233 和 S282 突变为半胱氨酸, 预测能够在 $\beta 8$ 和 $\beta 9$ 之间形成一个二硫键。实验结果表明

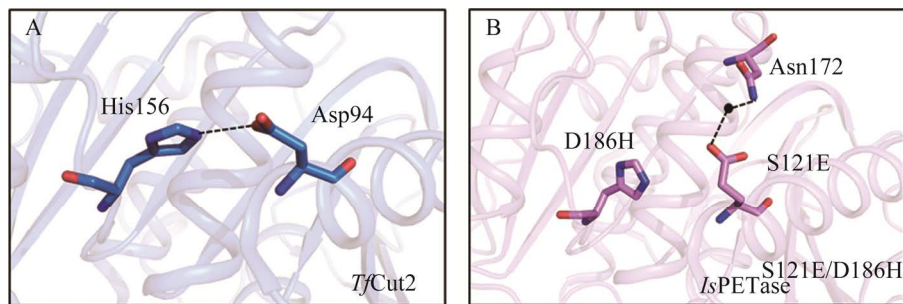


图 4 与 *TfCut2* (A) 和 *IsPETase*^{S121E/D186H} (B) 的 $\beta 6$ - $\beta 7$ 连接环稳定性相关的残基^[41]

Figure 4 Residues associated with the stability of the $\beta 6$ - $\beta 7$ loop of *TfCut2* (A) and *IsPETase*^{S121E/D186H} (B)^[41]. *TfCut2* (PDB: 4CG1) and *IsPETase*^{S121E/D186H} (PDB: 6IJ4) are shown with blue and pink colored cartoon models, respectively; Amino acids at the mutated site are shown with sticks; Hydrogen bonds are shown in black dashed lines represent; Black sphere represents the water molecule.

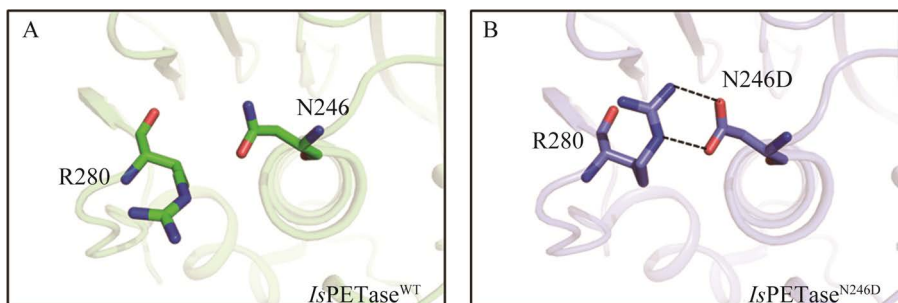


图 5 *IsPETase*^{WT} (A) 和 *IsPETase*^{N246D} (B) 的局部结构比较^[42]

Figure 5 Comparison of local structures of *IsPETase*^{WT} (A) and *IsPETase*^{N246D} (B)^[42]. *IsPETase*^{WT} (PDB: 5XJH) and *IsPETase*^{N246D} (PDB: 6KUO) are shown with green and slate colored cartoon models, respectively; Arg280, Asn246 residues are shown as sticks; Salt bridges between residues are indicated by black dashed lines.

这一突变体的热稳定性提高了(14.1±1.3) °C。最终突变体 *IsPETase*^{R280A/S121E/D186H/N233C/S282C} 的 T_m 值比野生型高 21.3 °C，催化速率提高了 5–7 倍。

算法的高速发展提高了人们对生物分子结构和功能的操纵能力。Cui 等^[37]引入了一种蛋白质工程的贪婪累积策略(GRAPE)，以最大限度地减少实验工作，同时最大限度地探索基因突变集之间的可加性和协同效应。通过筛选获得最佳命中(DuraPETase, M10)，其热稳定性显著增强(T_m 值为 77 °C； $\Delta T_m=31$ °C)，对半结晶 PET 具有良好的降解性能，并在温和条件下大大提高了长期存活率，酶促反应可以在 37 °C 条件下持续 10 d，降解量超过 300 倍。

Meng 等^[44]开发了一个网络工具 Premuse，将两两比对、序列加权、位置特异性氨基酸概率(PSAP)计算和首选突变选择相结合，根据序列进化预测突变。最终得到突变 W159H 和 F229Y 的 T_m 值分别比野生型高 6.8 °C 和 3.6 °C。*IsPETase*^{W159H/F229Y} 的 T_m 值为 61.2 °C，提高了 10.4 °C。在 40 °C 孵育 24 h 后，*IsPETase*^{W159H/F229Y} 释放的化合物总浓度比野生型释放的增加了 40 倍。

Brott 等^[45]使用易错 PCR 技术，基于 *IsPETase* 的耐热三重突变体(*IsPETase*^{R280A/S121E/D186H}，TM)生成了一个突变体库，通过筛选获得 4 种 T_m 值更高的变体。最有希望的 *IsPETase*TM^{K95N/VF201I} 突变体 T_m 值比原突变体高 5 °C。尽管这种突变体在较低的温度下对 PET 的活性略低，但其热稳定性的提高使其在高达 60 °C 的反应温度下成为更活跃的 PET 水解酶。他们还将其与之前报道的优秀 *IsPETase* 突变体结合，实现了更高的热稳定性与降解活性。

最近，曼彻斯特大学 Bell 等^[46]建立了一个自动化的高通量定向进化平台，他们以耐热突变体 *IsPETase*^{S121E/D186H/R280A}(*IsPETase*^{TS})^[41]作为工程的起点，通过提高反应温度和延长反应时

间在各轮中逐渐增加进化压力。在 6 轮进化后得到了最耐热和最活跃的变体 HotPETase，包含了 21 个突变：3 个来自起始蛋白质模板，2 个来自二硫键(N233C-S282C)的合理引入，以及定向进化发现的 16 个。HotPETase 的 T_m 为 82.5 °C，可在 PET 的玻璃化转变温度下工作，是迄今为止 *IsPETase* 衍生物中最高的。

3 PETase 的高效表达系统

由于在野生菌株中，PETase 的表达水平不足以满足大规模生物降解的需求。因此，有必要开发利用模式微生物的重组表达系统，以使酶蛋白高水平表达且易于使用。此外，PET 作为高分子聚合物，不能进入细胞，因此将 PET 水解酶高效表达达到细胞外以用于实际应用得到了广泛的研究^[6,34]。目前，一些微生物如细菌、真菌和海洋微藻已被应用于 PETase 的重组表达^[3]。

3.1 分泌表达系统

选择最佳信号肽是一种常用的改进异源 PET 水解酶分泌的策略。一项研究将来自大肠杆菌的 Sec 依赖性和 SRP 依赖性信号肽分别与 PETase 相融合，其中 SP LamB 和 PETase 成功产生了 6.2 mg/L 的 PETase^[47]。另一项研究则通过随机诱变获得了进化的信号肽 PelB (G58A)，在大肠杆菌中使 PETase 的分泌量提高了 1.7 倍^[48]。Cui 等^[49]通过将 SP 信号肽增强子 B1 融合到常用 SP(PelB)的 N 端，使 *IsPETase* 的分泌效率大幅度提高了 62 倍。一种枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 168 在其天然信号肽双精氨酸信号肽(signal peptide, SP)的指导下能够将 PETase 分泌到培养基中，而双精氨酸易位(Tat)复合物的失活使 PETase 的分泌量提高了 3.8 倍^[50]。

此外，有研究人员分别在巴斯德毕赤酵母和大肠杆菌中表达了 PETase，发现由于毕赤酵

母的蛋白质半衰期保护机制, 从酵母中生产的酶的活性高于在大肠杆菌中表达的酶^[36]。另有报道发现, 一种光合微藻 *Phaeodactylum tricornutum* 经改造后能够分泌 PETase, 并且这种 PETase 能够有效降解不同的底物, 在 30 °C 甚至中温温度 (21 °C) 发挥活性^[51]。Kim 等^[52]改造了一种绿藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 能够生产 PETase, 它可以在 4 周内 30 °C 下完全降解 PET。

3.2 细胞表面展示

酶的细胞表面展示是设计全细胞催化剂的一种有前途的策略, 可以克服酶分泌效率低下和细胞质毒性的瓶颈, 从而简化生产程序和下游工艺。与游离酶相比, 表面展示技术不仅能够避免复杂的纯化步骤, 而且可以重复使用, 解决了环境因素影响下酶活性降低, 甚至酶失活的难题^[53]。

本课题组开发了一种酵母表面展示 PETase 的全细胞生物催化剂, 以克服天然 IsPETase 对高结晶度 PET 的低酶活性^[54-55]。我们将 IsPETase 基因序列构建入工程毕赤酵母细胞, 使用酵母细胞壁内的内源性糖基磷脂酰肌醇

(glycosylphosphatidylinositol, GPI) 蛋白为锚定蛋白, 通过灵活的连接序列将酶锚定在细胞表面 (图 6)。实验证明, 这种全细胞生物催化剂对高结晶度 PET 的转化率较野生型 PETase 提高了约 36 倍, 并且验证了 pH 稳定性和热稳定性的提高, 体系可以重复使用 7 次而没有明显的活性损失, 这种方法为高效的生物循环提供了一种有前途的途径。

此外, Heyde 等^[56]最近提出了一种使用大肠杆菌 BL21(DE3) 对 PETase 变体进行表面展示表达的方法, 他们通过 LppOmpA 跨膜锚定蛋白与 PETase 相连, 以与细胞表面暴露的纳米抗体结合的绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 信号来测量总表面展示的蛋白质。该程序提供了一个便利的筛选平台, 可以整合到高通量筛选系统中实现快速和简单的活性读数, 从而快速筛选新型 PETase 变体。然而, 目前的这些全细胞催化剂策略与一些仅在高温下起作用的 PET 水解酶不兼容。因此, 目前也有一些研究开发用于展示耐热酶的嗜热表达系统^[57]。

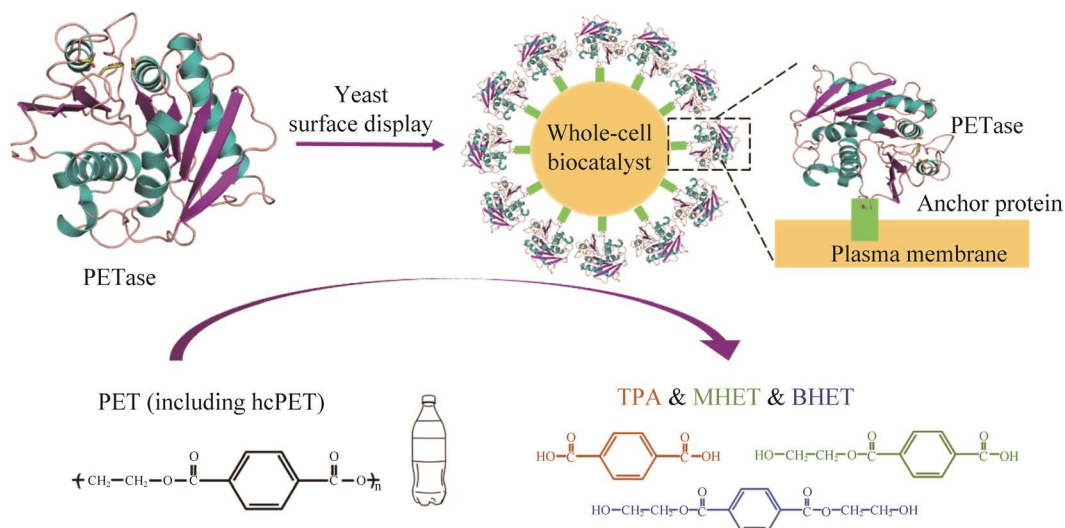


图 6 酵母表面展示 PETase 系统示意图^[55]

Figure 6 Schematic diagram of yeast surface display PETase system^[55].

4 提高 PETase 的底物可及性

PET 本质上是一种疏水性材料, 表面润湿性差。而酶促 PET 水解是一种表面侵蚀过程, 水(作为溶剂和反应物)和生物催化剂都不能渗透进入聚合物的内部, 所以只能获得有限数量的表面酯键^[26]。这意味着酶对 PET 表面的亲和力非常重要, 因此吸附成为水解 PET 的关键过程。

为了克服这个过程中的局限性, 常常添加一些辅助分子来介导 PET 水解酶与底物的结合。表面活性剂是一种两亲分子, 能够与 PET 表面相互作用, 带负电的头部基团将朝向水相, 并将 PET 表面转化为带电表面。Furukawa 等^[58]通过研究表明, 用阴离子表面活性剂预孵育 PET 膜, 可将 PETase 活性提高 120 倍。疏水蛋白是一种两亲性蛋白质, 可以在亲水-疏水界面上自组装后逆转表面的性质。Puspitasari 等^[59-60]分别用疏水蛋白 RolA 和 HGFI 预处理 PET 表面, 从而使酶更容易接触和攻击表面, 从而使水解 PET 的重量损失从大约 18% 增加到 34%。本课题组同样尝试将吸附和酶解的过程有机统一起来。我们在酵母细胞表面展示 PETase 的基础上实现了疏水蛋白 HFBI 和 PETase 的共展示, 实验结果表明疏水蛋白的自组装可以控制 PETase 在 PET 表面的吸附行为, 并为 PETase 提供良好的亲水环境, 可极大提高酶的催化效率^[61]。

此外, 与添加辅助分子不同, 将两亲模块与 PET 水解酶进行融合表达是一种更具成本效益和前景的方法。Dai 等^[62]在 PETase 的 C 末端添加了几个可以粘附到疏水性聚合物表面的聚合物结合结构域, 例如纤维素结合结构域(carbohydrate binding modules, CBM)、聚(3-羟基丁酸酯)结合结构域(polyhydroxyalkanoate

depolymerase binding modules, PBM)和疏水蛋白(HFB4)。这些结构域的存在可以改善酶与 PET 表面的结合, 并使得酶的水解活性提高了约 86%。值得注意的是, 空间分布在融合结构中十分重要, 当结合结构域连接到 PETase 的 N 端时, 这种效应消失。

5 PETase 与 MHETase 双酶系统

MHET 和 BHET 是众所周知的 PET 降解中间体, 它们会抑制 PET 水解酶催化的解聚效率。其中 MHET 作为 PETase 降解 PET 的主要产物, 对 PETase 的活性具有较强的抑制作用。因此, *I. sakaiensis* 产生了独特的 MHETase 以减少产物抑制, 它可以与 PETase 高度协同将 PET 薄膜有效转化为单体。Knott 等^[63]建立了一种嵌合双酶系统, 其中 MHETase 通过不同长度的甘氨酸-丝氨酸接头(8、12 或 20 个氨基酸残基)与 PETase 相连, 从而使 PET 降解效率至少提高了 2.8 倍。而连接 PETase 的 C 端和 MHETase 的 N 端的嵌合结构则不能表达蛋白。另一项工作中, Qi 等^[64]用 2 种可以分别分泌 PET 水解酶(PETase)和对苯二甲酸单羟乙酯水解酶(MHETase)的工程化枯草芽孢杆菌构建了 2 种微生物联合体。微生物联合体的降解效率显著提高, 可在 24 h 内完全降解 2 g/L BHET, 并可以在 7 d 内降解 13.6% (重量损失)的 PET 薄膜。

6 应用展望

随着塑料行业的持续快速发展, 巨大的生产能力和低效的回收导致了一个全球性的挑战, 大多数塑料制品无法进入到闭环回收利用。生物回收和生物升级循环是当前塑料回收最有希望的解决方案, 其中要克服的一个挑战是处

理不同塑料的组合, 因为任何酶并不对所有塑料底物都具有活性^[65]。多酶系统的设计将是一个有前途的领域, 目前中国已经与欧洲合作开发使用酶混合物进行塑料降解的项目^[66]。另一种方法是通过微生物联合体对塑料进行工业降解^[64,67]。目前, 微生物群落已被证明可降解聚氨酯(polyurethane, PU)、聚乙烯(polyethylene, PE)、聚丙烯(polypropylene, PP)和聚氯乙烯(polyvinyl chloride, PVC)等材料^[68-70]。这些结果突出了人工微生物菌群在塑料生物降解中的潜力。

同时, 新型微生物聚酯水解酶的发现和高活性变体的构建仍然是开发塑料废物生物催化回收工艺的关键挑战。随着基因组测序和转录组工具的发展, 越来越多的遗传资源被上传到公共数据库中。为了克服功能性微生物或酶筛选的瓶颈, 目前已经开发了各种高通量筛选技术, 其中一种微流控荧光激活液滴分选技术(fluorescence-activated droplet sorting, FADS), 开辟了快速获得用于生物降解的新型微生物和酶的可能性, 还允许筛选随机诱变和定向进化的突变体, 具有出色的通量、灵敏度和特异性, 具有广泛的应用前景^[71]。

另一个挑战也应该包括在讨论中, 即聚合物降解产物的再利用可能性, 特别是对于各种增值产品的转化和生产^[72]。Kim等^[73]发明了一种 One-Pot 工艺, 他们利用甜菜碱催化剂将聚合物的酶解与糖酵解过程结合起来, 将产物 TPA 和 EG 分别生物转化为高价值产品原儿茶酸(protocatechuic acid, PCA)和乙醇酸(glycolic acid, GLA)。Werner等^[74]在恶臭假单胞菌 KT2440 中进行了 4 次连续的代谢工程工作, 将 PET 和 BHET 串联化学解构和生物降解升级为一种具有性能优势的产品 β -酮己二酸(β -ketoadipic acid, β KA)。这些研究有望在未来改善废弃塑料的循环利用、升级和价值化。

最后, 我们迫切需要安全无毒的化石燃料塑料替代品。据估计, 全球化石燃料总产量的近 8%被用作原材料或为塑料制造提供能源, 导致了大量温室气体排放^[7]。可生物降解塑料和生物塑料(包括由可生物降解聚合物组成的塑料)是化石燃料塑料的有希望的替代品, 前者更容易被微生物降解, 例如聚羟基链烷酸酯(polyhydroxyalkanoates, PHA)、聚丙内酯(polypropiolactone, PPL)、聚(ϵ -己内酯)(polycaprolactone, PCL)、聚(L-乳酸)(polylactic acid, PLA)等^[75]; 而后者可以通过酶催化反应轻松生产, 包括 2,5-呋喃二甲酸二乙酯(diethyl furan 2,5-dicarboxylate)和间苯二甲酸二乙酯(diethyl isophthalate, DEIP)等^[72]。这些替代方案将有效减少塑料合成对化石燃料的需求, 可以为人类和其他生物实现安全和可持续的环境。

参考文献

- [1] DHANRAJ ND, HATHA AAM, JISHA MS. Biodegradation of petroleum based and bio-based plastics: approaches to increase the rate of biodegradation[J]. Archives of Microbiology, 2022, 204(5): 258.
- [2] SOONG YHV, SOBKOWICZ MJ, XIE DM. Recent advances in biological recycling of polyethylene terephthalate (PET) plastic wastes[J]. Bioengineering: Basel, Switzerland, 2022, 9(3): 98.
- [3] LALDINPUII Z, LALHMANGAIHZUALA S, PACHUAU Z, VANLALDINPUIA K. Depolymerization of poly(ethylene terephthalate) waste with biomass-waste derived recyclable heterogeneous catalyst[J]. Waste Management: New York, N Y, 2021, 126: 1-10.
- [4] 杜灿, 于岸弘, 张颖, 高月, 刘倍汐, 叶慧敏, 孔亮. PET 塑料降解微生物的研究进展[J]. 广东化工, 2022(5): 82-83, 114.
DU C, YU AH, ZHANG Y, GAO Y, LIU BX, YE HM, KONG L. Research progress of PET plastic degrading microorganisms[J]. Guangdong Chemical Industry, 2022(5): 82-83, 114 (in Chinese).
- [5] 靳小平, 朱玉方, 徐卉桐, 谭煜, 买买提江·依米提, 何明宇. 废弃塑料降解与回收再利用研究进展[J]. 工程塑料应用, 2021(9): 139-144.

- JIN XP, ZHU YF, XU HT, TAN Y, YIMIT M, HE MY. Research progress on degradation and recycling of waste plastics[J]. *Engineering Plastics Application*, 2021(9): 139-144 (in Chinese).
- [6] SAMAK NA, JIA Y, SHARSHAR MM, MU T, YANG M, PEH S, XING J. Recent advances in biocatalysts engineering for polyethylene terephthalate plastic waste green recycling[J]. *Environment International*, 2020, 145: 106144.
- [7] WEI R, Zimmermann W. Microbial enzymes for the recycling of recalcitrant petroleum-based plastics: how far are we?[J]. *Microbial Biotechnology*, 2017, 10(6): 1308-1322.
- [8] URBANEK AK, KOSIOROWSKA KE, MIROŃCZUK AM. Current knowledge on polyethylene terephthalate degradation by genetically modified microorganisms[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021, 9: 771133.
- [9] 石利霞, 高松枫, 朱蕾蕾. PET 水解酶的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2020, 36(10): 226-236.
SHI LX, GAO SF, ZHU LL. Research advance in polyethylene terephthalate hydrolytic enzymes[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2020, 36(10): 226-236 (in Chinese).
- [10] 姜杉, 苏婷婷, 王战勇. 聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)生物降解进展[J]. *塑料*, 2021(4): 90-95.
JIANG S, SU TT, WANG ZY. Progress in biodegradation of polyethylene terephthalate (PET)[J]. *Plastics*, 2021(4): 90-95 (in Chinese).
- [11] KAWAI F, KAWABATA T, ODA M. Current knowledge on enzymatic PET degradation and its possible application to waste stream management and other fields[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(11): 4253-4268.
- [12] CARR CM, CLARKE DJ, DOBSON ADW. Microbial polyethylene terephthalate hydrolases: current and future perspectives[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 571265.
- [13] 刘欣悦, 崔颖璐. PET 塑料废弃物及微塑料生物降解与转化的研究现状与展望[J]. *生物加工过程*, 2022(2): 226-234.
LIU XY, CUI YL. Biodegradation and conversion of polyethylene terephthalate (PET) wastes and microplastics: a review[J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2022(2): 226-234 (in Chinese).
- [14] YOSHIDA S, HIRAGA K, TAKEHANA T, TANIGUCHI I, YAMAJI H, MAEDA Y, TOYOHARA K, MIYAMOTO K, KIMURA Y, ODA K. A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate)[J]. *Science*, 2016, 351(6278): 1196-1199.
- [15] HAN X, LIU W, HUANG JW, MA J, ZHENG Y, KO TP, XU L, CHENG YS, CHEN CC, GUO RT. Structural insight into catalytic mechanism of PET hydrolase[J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1): 2106.
- [16] JOO S, CHO IJ, SEO H, SON HF, SAGONG HY, SHIN TJ, CHOI SY, LEE SY, KIM KJ. Structural insight into molecular mechanism of poly(ethylene terephthalate) degradation[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 382.
- [17] FECKER T, GALAZ-DAVISON P, ENGELBERGER F, NARUI Y, SOTOMAYOR M, PARRA LP, RAMÍREZ-SARMIENTO CA. Active site flexibility as a hallmark for efficient PET degradation by *I. sakaiensis* PETase[J]. *Biophysical Journal*, 2018, 114(6): 1302-1312.
- [18] AUSTIN HP, ALLEN MD, DONOHOE BS, RORRER NA, KEARNS FL, SILVEIRA RL, POLLARD BC, DOMINICK G, DUMAN R, EL OMARI K, MYKHAYLYK V, WAGNER A, MICHENER WE, AMORE A, SKAF MS, CROWLEY MF, THORNE AW, JOHNSON CW, WOODCOCK HL, MCGEEHAN JE, BECKHAM GT. 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.
- [19] LIU CC, SHI C, ZHU SJ, WEI RS, YIN CC. Structural and functional characterization of polyethylene terephthalate hydrolase from *Ideonella sakaiensis*[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2019, 508(1): 289-294.
- [20] CHEN CC, HAN X, KO TP, LIU W, GUO RT. Structural studies reveal the molecular mechanism of PETase[J]. 2018, 285(20): 3717-3723.
- [21] 靳玉瑞, 李爱秀, 张力. 一种新型 PET 水解酶的结构与催化机制研究进展[J]. *中国塑料*, 2019(3): 106-112.
JIN YR, LI AX, ZHANG L. Progress of the structure and catalytic mechanism of one new PET hydrolase[J]. *China Plastics*, 2019(3): 106-112 (in Chinese).
- [22] SHIRKE AN, WHITE C, ENGLAENDER JA, ZWARYCZ A, BUTTERFOSS GL, LINHARDT RJ, GROSS RA. Stabilizing leaf and branch compost cutinase (LCC) with glycosylation: mechanism and effect on PET hydrolysis[J]. *Biochemistry*, 2018, 57(7): 1190-1200.
- [23] BERSELLI A, RAMOS MJ, MENZIANI MC. Novel pet-degrading enzymes: structure-function from a computational perspective[J]. *Chembiochem*, 2021, 22(12): 2032-2050.
- [24] LIU B, HE L, WANG L, LI T, LI C, LIU H, LUO Y, BAO

- R. Protein crystallography and site-direct mutagenesis analysis of the poly(ethylene terephthalate) hydrolase PETase from *Ideonella sakaiensis*[J]. *Chembiochem*, 2018, 19(14): 1471-1475.
- [25] 李秀, 杨海涛, 王泽方. 聚对苯二甲酸乙二醇酯降解酶的研究进展[J]. *微生物学报*, 2019, 59(12): 2251-2262.
LI X, YANG HT, WANG ZF. Advance in polyethylene terephthalate degrading enzyme[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59(12): 2251-2262 (in Chinese).
- [26] WEI R, von HAUGWITZ G, PFAFF L, MICAN J, BADENHORST CPS, LIU WD, WEBER G, AUSTIN HP, BEDNAR D, DAMBORSKY J, BORNSCHEUER UT. Mechanism-based design of efficient PET hydrolases[J]. *ACS Catalysis*, 2022, 12(6): 3382-3396.
- [27] JERVES C, NEVES RPP, RAMOS MJ, da SILVA S, FERNANDES PA. Reaction mechanism of the PET degrading enzyme PETase studied with DFT/MM molecular dynamics simulations[J]. *ACS Catalysis*, 2021, 11(18): 11626-11638.
- [28] da COSTA CHS, DOS SANTOS AM, ALVES CN, MARTÍ S, MOLINER V, SANTANA K, LAMEIRA J. Assessment of the PETase conformational changes induced by poly(ethylene terephthalate) binding[J]. *Proteins*, 2021, 89(10): 1340-1352.
- [29] GUO BY, VANGA SR, LOPEZ-LORENZO X, SAENZ-MENDEZ P, ERICSSON SR, FANG Y, YE XC, SCHRIEVER K, BÄCKSTRÖM E, BIUNDO A, ZUBAREV RA, FURÓ I, HAKKARAINEN M, SYRÉN PO. Conformational selection in biocatalytic plastic degradation by PETase[J]. *ACS Catalysis*, 2022, 12(6): 3397-3409.
- [30] DANSO D, CHOW J, STREIT WR. Plastics: environmental and biotechnological perspectives on microbial degradation[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(19): e01095-e01019.
- [31] HIRAGA K, TANIGUCHI I, YOSHIDA S, KIMURA Y, ODA K. Biodegradation of waste PET[J]. *EMBO Reports*, 2020, 21(2): e49826.
- [32] KAN Y, HE L, LUO Y, BAO R. *Is*PETase is a novel biocatalyst for poly(ethylene terephthalate) (PET) hydrolysis[J]. *Chembiochem*, 2021, 22(10): 1706-1716.
- [33] TANIGUCHI I, YOSHIDA S, HIRAGA K, MIYAMOTO K, KIMURA Y, ODA K. Biodegradation of PET: current status and application aspects[J]. *ACS Catalysis*, 2019, 9(5): 4089-4105.
- [34] GAO R, PAN H, LIAN J. Recent advances in the discovery, characterization, and engineering of poly(ethylene terephthalate) (PET) hydrolases[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2021, 150: 109868.
- [35] 马渊, 姚明东, 李炳志, 丁明珠, 何博, 陈思, 周晓, 元英进. 通过蛋白质工程提高聚对苯二甲酸乙二醇酯水解酶的活性[J]. *工程*, 2018(6): 888-893.
MA Y, YAO MD, LI BZ, DING MZ, HE B, CHEN S, ZHOU X, YUAN YJ. Enhanced poly(ethylene terephthalate) hydrolase activity by protein engineering[J]. *Engineering*, 2018(6): 888-893 (in Chinese).
- [36] CHEN CC, HAN X, LI X, JIANG PC, NIU D, MA LX, LIU WD, LI SY, QU YY, HU HB, MIN J, YANG Y, ZHANG LL, ZENG W, HUANG JW, DAI LH, GUO RT. General features to enhance enzymatic activity of poly(ethylene terephthalate) hydrolysis[J]. *Nature Catalysis*, 2021, 4(5): 425-430.
- [37] CUI YL, CHEN YC, LIU XY, DONG SJ, TIAN YE, QIAO YX, MITRA R, HAN J, LI CL, HAN X, LIU WD, CHEN Q, WEI WQ, WANG X, DU WB, TANG SY, XIANG H, LIU HY, LIANG Y, HOUK KN, WU B. Computational redesign of a PETase for plastic biodegradation under ambient condition by the GRAPE strategy[J]. *ACS Catalysis*, 2021, 11(3): 1340-1350.
- [38] ODA M, YAMAGAMI Y, INABA S, OIDA T, YAMAMOTO M, KITAJIMA S, KAWAI F. 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.
- [39] THOMSEN TB, HUNT CJ, MEYER AS. Influence of substrate crystallinity and glass transition temperature on enzymatic degradation of polyethylene terephthalate (PET)[J]. *New Biotechnology*, 2022, 69: 28-35.
- [40] TOURNIER V, TOPHAM CM, GILLES A, DAVID B, FOLGOAS C, MOYA-LECLAIR E, KAMIONKA E, DESROUSSEAU ML, TEXIER H, GAVALDA S, COT M, GUÉMARD E, DALIBEY M, NOMME J, CIOCI G, BARBE S, CHATEAU M, ANDRÉ I, DUQUESNE S, MARTY A. An engineered PET depolymerase to break down and recycle plastic bottles[J]. *Nature*, 2020, 580(7802): 216-219.
- [41] SON H, CHO IJ, JOO S, SEO H, SAGONG HY, CHOI SY, LEE SY, KIM KJ. Rational protein engineering of thermo-stable PETase from *Ideonella sakaiensis* for highly efficient PET degradation[J]. *ACS Catalysis*, 2019, 9(4): 3519-3526.
- [42] SON HF, JOO S, SEO H, SAGONG HY, LEE SH, HONG H, KIM KJ. Structural bioinformatics-based protein engineering of thermo-stable PETase from

- Ideonella sakaiensis*[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2020, 141: 109656.
- [43] ZHONG-JOHNSON EZL, VOIGT CA, SINSKEY AJ. An absorbance method for analysis of enzymatic degradation kinetics of poly(ethylene terephthalate) films[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 928.
- [44] MENG X, YANG L, LIU H, LI Q, XU G, ZHANG Y, GUAN F, ZHANG Y, ZHANG W, WU N, TIAN J. Protein engineering of stable *IsPETase* for PET plastic degradation by Premuse[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 180: 667-676.
- [45] BROTT S, PFAFF L, SCHURICHT J, SCHWARZ JN, BÖTTCHER D, BADENHORST CPS, WEI R, BORNSCHEUER UT. Engineering and evaluation of thermostable *IsPETase* variants for PET degradation[J]. *Engineering in Life Sciences*, 2022, 22(3/4): 192-203.
- [46] BELL EL, SMITHSON R, KILBRIDE S, FOSTER J, HARDY FJ, RAMACHANDRAN S, TEDSTONE AA, HAIGH SJ, GARFORTH AA, DAY PJR, LEVY C, SHAVER MP, GREEN AP. Directed evolution of an efficient and thermostable PET depolymerase[J]. *Nature Catalysis*, 2022, 5(8): 673-681.
- [47] SEO H, KIM S, SON HF, SAGONG HY, JOO S, KIM KJ. Production of extracellular *PETase* from *Ideonella sakaiensis* using sec-dependent signal peptides in *E. coli*[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2019, 508(1): 250-255.
- [48] SHI LX, LIU HF, GAO SF, WENG YX, ZHU LL. Enhanced extracellular production of *IsPETase* in *Escherichia coli* via engineering of the *pelB* signal peptide[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(7): 2245-2252.
- [49] CUI LP, QIU YM, LIANG Y, DU CJ, DONG WL, CHENG C, HE BF. Excretory expression of *IsPETase* in *E. coli* by an enhancer of signal peptides and enhanced PET hydrolysis[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 188: 568-575.
- [50] HUANG X, CAO LC, QIN ZM, LI SF, KONG W, LIU YH. Tat-independent secretion of polyethylene terephthalate hydrolase *PETase* in *Bacillus subtilis* 168 mediated by its native signal peptide[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(50): 13217-13227.
- [51] MOOG D, SCHMITT J, SENGER J, ZARZYCKI J, REXER KH, LINNE U, ERB T, MAIER UG. Using a marine microalga as a chassis for polyethylene terephthalate (PET) degradation[J]. *Scientific Reports*, 2019, 18(1): 171.
- [52] KIM JW, PARK SB, TRAN QG, CHO DH, CHOI DY, LEE YJ, KIM HS. Functional expression of polyethylene terephthalate-degrading enzyme (*PETase*) in green microalgae[J]. *Microbial Cell Factories*, 2020, 19(1): 97.
- [53] SERRA S, de SIMEIS D. Use of *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 53103) as whole-cell biocatalyst for the regio- and stereo-selective hydration of oleic, linoleic, and linolenic acid[J]. *Catalysts*, 2018, 8(3): 109.
- [54] 陈卓芝. 高效降解高结晶度 PET 的全细胞催化系统的构建与应用[D]. 天津: 天津大学硕士学位论文, 2020.
- CHEN ZZ. Construction and application of whole-cell catalytic system for degradation of high-efficiency and high-crystallinity PET[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University, 2020 (in Chinese)
- [55] CHEN Z, WANG Y, CHENG Y, WANG X, TONG S, YANG H, WANG Z. Efficient biodegradation of highly crystallized polyethylene terephthalate through cell surface display of bacterial *PETase*[J]. *The Science of the Total Environment*, 2020, 709: 136138.
- [56] HEYDE SAH, ARNLING BÅÅTH J, WESTH P, NØRHOLM MHH, JENSEN K. Surface display as a functional screening platform for detecting enzymes active on PET[J]. *Microbial Cell Factories*, 2021, 20(1): 93.
- [57] YAN F, WEI R, CUI Q, BORNSCHEUER UT, LIU YJ. Thermophilic whole-cell degradation of polyethylene terephthalate using engineered *Clostridium thermocellum*[J]. *Microbial Biotechnology*, 2021, 14(2): 374-385.
- [58] FURUKAWA M, KAWAKAMI N, ODA K, MIYAMOTO K. Acceleration of enzymatic degradation of poly(ethylene terephthalate) by surface coating with anionic surfactants[J]. *ChemSusChem*, 2018, 11(23): 4018-4025.
- [59] PUSPITASARI N, TSAI SL, LEE CK. Fungal hydrophobin *RoA* enhanced *PETase* hydrolysis of polyethylene terephthalate[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2021, 193(5): 1284-1295.
- [60] PUSPITASARI N, TSAI SL, LEE CK. Class I hydrophobins pretreatment stimulates *PETase* for monomers recycling of waste PETs[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 176: 157-164.
- [61] 王泽方, 杨海涛, 陈卓芝, 程莹莹, 王雪, 童善惟, 侯宇佳. 细胞表面共展示 PET 分解酶和疏水蛋白的重组毕赤酵母. 中国: CN106497963B. 2019-09-06.
- [62] DAI L, QU Y, HUANG JW, HU Y, HU H, LI S, CHEN CC, GUO RT. Enhancing PET hydrolytic enzyme activity by fusion of the cellulose-binding domain of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*[J]. *Journal*

- of Biotechnology, 2021, 334: 47-50.
- [63] KNOTT BC, ERICKSON E, ALLEN MD, GADO JE, GRAHAM R, KEARNS FL, PARDO I, TOPUZLU E, ANDERSON JJ, AUSTIN HP, DOMINICK G, JOHNSON CW, RORRER NA, SZOSTKIEWICZ CJ, COPIÉ V, PAYNE CM, WOODCOCK HL, DONOHOE BS, BECKHAM GT, MCGEEHAN JE. 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.
- [64] QI XH, MA Y, CHANG HC, LI BZ, DING MZ, YUAN YJ. Evaluation of PET degradation using artificial microbial consortia[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 778828.
- [65] VERSCHOOR JA, KUSUMAWARDHANI H, RAM AFJ, de WINDE JH. Toward microbial recycling and upcycling of plastics: prospects and challenges[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 821629.
- [66] BALLERSTEDT H, TISO T, WIERCKX N, WEI R, AVEROUS L, BORNSCHEUER U, O'CONNOR K, FLOEHR T, JUPKE A, KLANKERMAYER J, LIU L, de LORENZO V, NARANCIC T, NOGALES J, PERRIN R, POLLET E, PRIETO A, CASEY W, HAARMANN T, SARBU A, et al. MIXed plastics biodegradation and UPcycling using microbial communities: EU Horizon 2020 project MIX-UP started January 2020[J]. Environmental Sciences Europe, 2021, 33(1): 99.
- [67] 祁庆生. 解塑再用-中欧合作项目“合成塑料降解转化微生物菌群”介绍[J]. 生物工程学报, 2021(10): 3411-3413. QI QS. Plastics biodegradation and recycling-the introduction of China-Europe cooperation project “Synthetic microorganism communities for plastic degradation and transformation”[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021(10): 3411-3413 (in Chinese).
- [68] SKARIYACHAN S, TASKEEN N, KISHORE AP, KRISHNA BV, NAIDU G. Novel consortia of enterobacter and pseudomonas formulated from cow dung exhibited enhanced biodegradation of polyethylene and polypropylene[J]. Journal of Environmental Management, 2021, 284: 112030.
- [69] KANG D, JACQUIOD S, HERSCHEND J, WEI S, NESME J, SØRENSEN SJ. Construction of simplified microbial consortia to degrade recalcitrant materials based on enrichment and dilution-to-extinction cultures[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 3010.
- [70] BLAIR EM, DICKSON KL, O'MALLEY MA. Microbial communities and their enzymes facilitate degradation of recalcitrant polymers in anaerobic digestion[J]. Current Opinion in Microbiology, 2021, 64: 100-108.
- [71] QIAO Y, HU R, CHEN D, WANG L, WANG Z, YU H, FU Y, LI C, DONG Z, WENG YX, DU W. Fluorescence-activated droplet sorting of PET degrading microorganisms[J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 424(pt b): 127417.
- [72] TAMOOR M, SAMAK NA, JIA YP, MUSHTAQ MU, SHER H, BIBI M, XING JM. Potential use of microbial enzymes for the conversion of plastic waste into value-added products: a viable solution[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 777727.
- [73] KIM DH, HAN DO, IN SHIM K, KIM JK, PELTON JG, RYU MH, JOO JC, HAN JW, KIM HT, KIM KH. One-pot chemo-bioprocess of PET depolymerization and recycling enabled by a biocompatible catalyst, betaine[J]. ACS Catalysis, 2021, 11(7): 3996-4008.
- [74] WERNER AZ, CLARE R, MAND TD, PARDO I, RAMIREZ KJ, HAUGEN SJ, BRATTI F, DEXTER GN, ELMORE JR, HUENEMANN JD, PEABODY GLV, JOHNSON CW, RORRER NA, SALVACHÚA D, GUSS AM, BECKHAM GT. Tandem chemical deconstruction and biological upcycling of poly(ethylene terephthalate) to β -keto adipic acid by *Pseudomonas putida* KT2440[J]. Metabolic Engineering, 2021, 67: 250-261.
- [75] URBANEK AK, MIROŃCZUK AM, GARCÍA-MARTÍN A, SABORIDO A, de la MATA I, ARROYO M. Biochemical properties and biotechnological applications of microbial enzymes involved in the degradation of polyester-type plastics[J]. Biochimica et Biophysica Acta Proteins and Proteomics, 2020, 1868(2): 140315.