

· 综 述 ·

# 对苯二甲酸单羟乙酯水解酶结构与功能的研究进展

杨媚媛<sup>1</sup>, 樊芳芳<sup>1,2\*</sup>, 何灵娟<sup>1</sup>, 陈杰<sup>1</sup>, 王林泉<sup>1</sup>, 邱帅<sup>1</sup>, 吕常江<sup>1</sup>, 黄俊<sup>1\*</sup>

1 浙江科技大学 生物与化学工程学院 浙江省农业生物资源生化制造协同创新中心 浙江省农产品化学与生物加工技术重点实验室, 浙江 杭州 310023

2 厦门大学 化学化工学院 固体表面物理化学国家重点实验室, 福建 厦门 361005

杨媚媛, 樊芳芳, 何灵娟, 陈杰, 王林泉, 邱帅, 吕常江, 黄俊. 对苯二甲酸单羟乙酯水解酶结构与功能的研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(9): 2812-2830.

YANG Meiyuan, FAN Fangfang, HE Lingjuan, CHEN Jie, WANG Linquan, QIU Shuai, Lyu Changjiang, HUANG Jun. Advances in the structure and function of MHETase[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(9): 2812-2830.

**摘 要:** 聚对苯二甲酸乙二醇酯(polyethylene terephthalate, PET)作为目前广泛使用的塑料之一, 其废弃物对全球环境造成了严重污染。PET 降解酶(polyethylene terephthalate hydrolase, PETase)的发现为处理 PET 废弃物提供了一种绿色环保的途径。尽管 PETase 降解 PET 会产生中间产物, 抑制水解酶的进一步降解, 影响酶的催化效率, 但对苯二甲酸单羟乙酯水解酶[mono(2-hydroxyethyl) terephthalate hydrolase, MHETase]通过与 PETase 协同作用, 将 PETase 水解产生的中间产物 MHET 高效降解为乙二醇(ethylene glycol, EG)和对苯二甲酸(terephthalic acid, TPA)。MHETase 对 MHET 表现出极高的特异性, 是完全降解 PET 的关键酶。本文全面梳理了 MHETase 的三维结构、底物结合模式以及催化反应机理等, 介绍了该酶降解活性的结构特征和关键残基, 以及酶工程改造的研究进展。同时, 对基于 MHETase 支架结合 PETase 开发定制的酶促 PET 降解系统进行了展望, 为设计和开发更加高效的 PET 水解酶体系提供了参考。

**关键词:** 聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET); 对苯二甲酸单羟乙酯水解酶(MHETase); 双酶系统; 塑料降解; 生物降解

资助项目: 国家自然科学基金(22103071, 32201037); 浙江省“高层次人才特殊支持计划”科技创新领军人才项目(2022R52024)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (22103071, 32201037), and the Leading Talents in Science and Technology Innovation of Special Support Program for High-level Talents Program in Zhejiang Province (2022R52024).

\*Corresponding authors. E-mail: FAN Fangfang, fffan@zust.edu.cn; HUANG Jun, huangjun@zust.edu.cn

Received: 2023-11-17; Accepted: 2024-01-04

# Advances in the structure and function of MHETase

YANG Meiyuan<sup>1</sup>, FAN Fangfang<sup>1,2\*</sup>, HE Lingjuan<sup>1</sup>, CHEN Jie<sup>1</sup>, WANG Linquan<sup>1</sup>,  
QIU Shuai<sup>1</sup>, Lyu Changjiang<sup>1</sup>, HUANG Jun<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Key Laboratory of Chemical and Biological Processing Technology for Farm Products of Zhejiang Province, Zhejiang Provincial Collaborative Innovation Center of Agricultural Biological Resources Biochemical Manufacturing, School of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310023, Zhejiang, China

<sup>2</sup> State Key Laboratory of Physical Chemistry of Solid Surfaces, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China

**Abstract:** Polyethylene terephthalate (PET) is one of the widely used plastics, but its waste pollution has become a global environmental issue. The discovery of polyethylene terephthalate hydrolase (PETase) has provided a green and environmentally friendly approach for PET degradation. However, PETase produces intermediate products that inhibit the enzyme's further activity, leading to a decrease in enzyme efficiency. Mono(2-hydroxyethyl) terephthalate hydrolase (MHETase) works synergistically with PETase to further degrade the intermediate product MHET into ethylene glycol (EG) and terephthalic acid (TPA). MHETase exhibits extremely high specificity for MHET and is crucial for the complete degradation of PET. This article comprehensively reviews MHETase from various perspectives, including its three-dimensional structure, substrate binding, and catalytic mechanism. It demonstrates the structural features and key residues associated with the enzyme's degrading activity and discusses the progress in enzyme engineering modifications. Additionally, the study envisions the development of a two-enzyme PET degradation system by combining MHETase with PETase, aiming to provide valuable references for designing and developing more efficient PET hydrolytic enzyme systems.

**Keywords:** polyethylene terephthalate (PET); mono(2-hydroxyethyl) terephthalate hydrolase (MHETase); two-enzyme system; plastic degradation; biodegradation

聚对苯二甲酸乙二醇酯 (polyethylene terephthalate, PET) 是一种热塑性聚合物, 由对苯二甲酸 (terephthalic acid, TA) 和乙二醇 (ethylene glycol, EG) 在催化剂的作用下进行酯化反应制得<sup>[1]</sup>。由于 PET 具有低成本、高强度、强耐用和易加工等优点, 已被广泛应用于纺织业、产品包装、医疗设备、电子产品生产和建筑等领域<sup>[2-7]</sup>。从工业革命以来, 全球 PET 材料的消费量不断增长, 仅 2019 年全球塑料产

量就达到 3.68 亿 t, 并预计未来 20 年内产量会翻倍, 其中亚洲地区是全球最大的 PET 塑料消费市场<sup>[8-9]</sup>。然而, 随着 PET 塑料使用量的增加, PET 废弃物也急剧增加。作为芳香族聚酯化合物, PET 具有较高稳定性和难以被自然降解的特性, 从沙漠到农场、从山顶到深海、从热带森林到北极雪地, 都存在着塑料污染, 对动植物以及海洋系统造成了不可逆的危害<sup>[10-17]</sup>。长期以来, 人们已经开展了许多关于塑料回收

处理的工作,包括传统填埋、焚烧、化学回收等方法<sup>[18-20]</sup>。然而,传统的废弃物处理方法存在一些问题,例如填埋会造成土壤和水源的重金属污染,焚烧产生了大量二氧化碳以及有害的多环芳烃、二噁英和呋喃等有机卤素物质<sup>[21-22]</sup>,对人体免疫系统造成破坏。因此,需要寻求更有效的生物修复策略来降解日益增加的 PET 塑料垃圾<sup>[23-24]</sup>。近年来,由于生物降解 PET 具有作用条件温和、绿色环保、高安全性的特点,引起了广泛关注,并有望成为塑料降解的重要途径<sup>[25-27]</sup>。自然界中存在各种微生物,如细菌、真菌、藻类

等,能产生水解酶、过氧化物酶等一系列酶,已被证实能够成功降解各种塑料污染物<sup>[28-33]</sup>。

2005年,Müller等<sup>[34]</sup>首次报道了来源于褐色嗜热裂孢菌(*Thermobifida fusca*)的角质酶 Tfh 可以降解 PET 塑料,随后又陆续发现了多个 PET 塑料水解酶,PET 塑料的生物降解成为研究热点。2016年,日本科学家发现并分离得到了一株来源于大阪伊德氏杆菌(*Ideonella sakaiensis*) 201-F6 的新型细菌(图 1),这株细菌能够附着在 PET 的表面,最终将其降解成乙二醇(ethylene glycol, EG)和对苯二甲酸(terephthalic

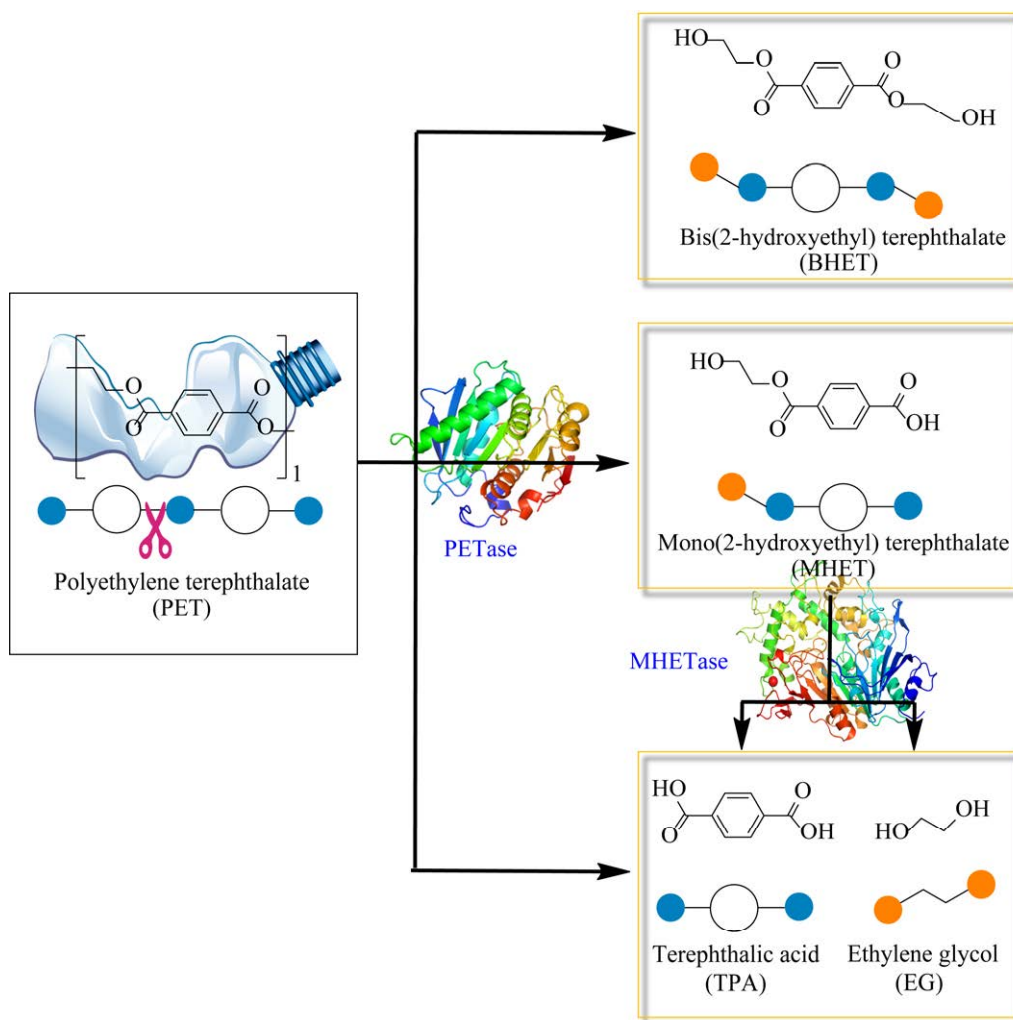


图 1 PETase 和 MHETase 协同作用降解 PET 的过程

Figure 1 The process of PET degradation by PETase and MHETase.

acid, TPA)这 2 种小分子有机物<sup>[35-36]</sup>, 该发现推动了 PET 生物降解工程的发展。2017 年, 中国科学院天津工业生物技术研究所郭瑞庭团队成功利用 X 射线晶体学技术, 首次解析了高分辨率的 *Is*PETase 以及其与产物类似物的复合体结构, 揭示了 PETase 维持高活性降解效率的分子基础<sup>[37]</sup>。该酶是人类发现的第一个通过自然进化过程产生的真正意义上的 PET 降解酶, 然而, 野生型的 *Is*PETase 活性有限且热稳定性较差。因此, 国内外的研究人员陆续对 *Is*PETase 展开了相关的理性设计改造, 获得了一系列突变体。韩国庆北国立大学 Kyung-Jin Kim 团队获得的 ThermoPETase, 有 3 个氨基酸突变体, 其  $T_m$  值提高了 8.8 °C, PET 降解能力提高了 14 倍<sup>[38]</sup>。中国科学院微生物研究所吴边团队基于新型蛋白质稳定性计算设计策略 (greedy accumulated strategy for protein engineering, GRAPE) 对 *Is*PETase 进行了稳定性改造, 获得了鲁棒性显著增强的重设计酶 DuraPETase, 其  $T_m$  值提高了 31 °C, PET 降解能力提高了 300 倍以上<sup>[39-40]</sup>。德克萨斯大学的 Alper 课题组通过神经网络机器学习构建了突变体 FAST-PETase, 对晶态和非晶态 PET 均能高效降解, 具有工业规模降解活性, 是目前最优异的突变体<sup>[41]</sup>。

PETase 的发现和设计改造为 PET 塑料的绿色循环利用提供了广阔的前景<sup>[42-46]</sup>, 但在降解过程中不断产生的对苯二甲酸单羟乙酯 [mono(2-hydroxyethyl) terephthalate, MHET]、对苯二甲酸双羟乙酯 [bis(2-hydroxyethyl) terephthalate, BHET] 等中间产物会通过疏水和阳离子- $\pi$  相互作用影响水解过程, 成为 PETase 的抑制剂, 从而对末端反应产物产生负面影响, 降低回收效率。特别是 MHET 强烈抑制了 *Is*PETase 的 PET 降解能力, 影响塑料的酶降解效率, 限制了酶降解的工业应用。为解决这一问题, 自然界的 *I. sakaiensis* 201-F6 细菌利用了

一个双酶系统, PETase 完成分解的第一步, 将 PET 降解成 MHET、BHET 等小片段, 然后再将降解后的这些小分子运入细胞内, 通过 MHETase 的协同作用进一步将 MHET 分解为结构相对简单的 EG 和 TPA 这 2 种有机物(图 1)<sup>[47-49]</sup>。MHETase 对 MHET 表现出极高的特异性, 是完全降解 PET 的关键酶。因此, 开发包含 MHETase 的双酶系统, 是 PET 的高效降解的有效途径之一。目前国内外的研究者们已通过双酶混合物或借助高交联方法、固定化基质将两酶融合来促进溶液中中间产物的降解, 提高单体的产量和纯度, 推动了酶降解 PET 的应用。2020 年 Knott 等<sup>[50]</sup>的研究发现, PETase 和 MHETase 双酶混合物分解 PET 的速度是 PETase 本身分解速度的 2 倍, 而且随着 2 种酶浓度的增加, 组分单体的含量也在增加, 只是目前尚未研究出 PETase 和 MHETase 的最佳比例; 在此基础上, 进一步利用柔性甘氨酸-丝氨酸连接子将 MHETase 的 C 末端与 PETase 的 N 末端共价连接, 两酶拼接成一条长链, 形成了一种新的超级酶, 降解无定型的 PET 时速度提高 3 倍, 表现明显优于单独的 PETase 和 MHETase。2022 年天津大学孙彦团队<sup>[51]</sup>设计了一种双酶级联催化系统, 将 2 种 DuraPETase 和 MHETase 酶通过 SpyTag/SpyCatcher 系统依次共固定在磷酸钙纳米晶体 (calcium phosphate nanocrystals, CaP) 上, 在 40 °C 时, 10 d 内该双酶体系对 PET 降解效率比游离的双酶系统提高了 6.1 倍, 在 50 °C 时也提高了 1.5 倍, 可以完全降解 PET。由此可见, MHETase 可能拥有一个前所未有的塑料降解酶支架, 对于 PET 塑料的酶降解, 建立一个强大的双酶系统可以有效地缓解产物抑制, 在成本和催化效率方面展现出巨大优势, 具有重要的工业前景。因此, 需要进一步深入开展 MHETase 的研究, 改善催化作用并扩大底物特异性, 显著促进 PET 聚合物的生物降解。本文

介绍了 MHETase 的晶体结构信息、底物结合模式、催化活性等,展示了该酶降解活性的关键残基和结构特征,详细阐述了酶工程改造和应用性能的研究进展,并对 MHETase 作为酶支架进行生物降解的研究进行了展望。

## 1 MHETase 以及 MHETase-like 的结构

目前,蛋白质结构数据库(Protein Data Bank, PDB)中共有 9 个关于 MHETase 的晶体结构,其中包含了 5 个 MHETase 与配体复合物的晶体结构。表 1 和表 2 分别总结了 MHETase 的晶体结构数据和活性数据。2019 年, Palm 等<sup>[52]</sup>首次解析出 *Is*MHETase 结构(分辨率: 2.0 Å, PDB 登录号: 6QG9)。MHETase 由 2 个结构域组成: 丝氨酸水解酶典型的  $\alpha/\beta$  水解酶结构域(MHETaseHyd)以及  $\alpha$  螺旋折叠结构的盖子结构域(MHETaseLid)(图 2)。由 Asp492-His528-Ser225 组

成的催化三联体以及由 Gly132-Glu226 主链酰胺氮原子组成的氧阴离子穴都位于  $\alpha/\beta$ -水解酶结构域(图 3A)<sup>[56]</sup>。MHETase 的盖子结构域位于  $\alpha/\beta$ -水解酶结构域折叠的  $\beta$  链 7 和  $\alpha$ -螺旋 15 之间,大约包含了 240 个残基,比其他  $\alpha/\beta$ -水解酶的盖子结构域平均多 140 个残基。该盖子结构域覆盖了活性位点,并容纳 1 个钙离子, Knott 等<sup>[50]</sup>通过分子动力学模拟明确了钙离子具有稳定盖子结构域的功能。

MHETase 的整体结构域类似于阿魏酰酯酶,特别是米曲霉(*Aspergillus oryzae*)的 2 种阿魏酰酯酶(FaeB, PDB 登录号: 3WMT 和 6G21)。它们具有一样的催化三联体组合(6QG9: S225-H528-D492; 3WMT: S203-H457-D417; 6G21: S169-H421-D381)和相似的氧阴离子穴残基(6QG9: Gly132-Glu226; 3WMT: G125; 6G21: G91),同时有一对二硫键(6QG9: C224-C529; 3WMT: C202-C528; 6G21:

表 1 *Is*MHETase 的晶体结构信息

Table 1 Information of crystal structure of *Is*MHETase

PDB code	Substrate	Structure of substrate	Resolution (Å)	Reference	Year
6QGA	MHETA		2.10	[52]	2019
6QGB	BA		2.20	[52]	2019
6QG9	None	None	2.05	[52]	2019
6QZ3	Fully occupied benzoic acid		1.60	[50]	2020
6QZ1	Partially occupied benzoic acid		1.70	[50]	2020
6QZ2	None	None	1.90	[50]	2020
6QZ4	None	None	1.80	[50]	2020
6JTT	BHET		2.51	[53]	2020
6JTT	MHET intermediate		2.51	[53]	2020
6JTU	None	None	2.10	[53]	2020

BA: Benzoic acid; MHETA: Mono(2-hydroxyethyl) terephthalate; BHET: Bis(2-hydroxyethyl) terephthalate; MHET intermediate: MHET forms an ester bond with Ser225.

C168-C422)连接了其附近包含有催化功能的 His 和 Ser 残基所在的 loop 区域,所有这些残基都位于水解酶结构域。因此,两者的整体结构相似,  $\alpha/\beta$ -水解酶结构域部分重叠较好,但 MHETase 的盖子结构域多了几个环结构(图 3A-3B)<sup>[57-58]</sup>。此外, MHETase 的催化三联体也与单宁酶叠加良好,一对二硫键将催化残基 Ser 和 His 固定在一起,这在单宁酶家族成员中是保守的(>80%)<sup>[50,56]</sup>,然而,两者的序列差异很大,盖子结构域具有明显不同的折叠(图 3A、

3C)<sup>[52,59]</sup>。PETase 与 MHETase 对比,同样具有高度相似的催化结构域,具有类似的催化三联体组合和催化结构域,但 PETase 酶具有高度极化的表面电荷,而 MHETase 则表现出更不均匀的酸性表面电荷分布。更重要的是, PETase 缺少覆盖活性位点的盖子结构域,因此底物结合的裂缝暴露在外,更有利于与大分子底物结合(图 3A、3D)。Knott 等<sup>[50]</sup>将 MHETase 的盖子结构域去掉,生成“无盖”MHETase,同时将 MHETase 中的残基段(Gly251-Thr472)替换

表 2 不同来源的 MHETase 及其 MHET 降解能力

Table 2 MHETase from different sources and their MHET degradation ability

Name	Source	Substrate	aa identity <sup>c</sup> (%)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_m$ ( $\mu$ mol/L)	$V_{max}$ ( $\mu$ mol/ (L·s))	$k_{cat}/K_m$ ( $\mu$ mol/ (L·s))	pH	Temperature (°C)	References	Year
MHETase <sup>WT</sup>	<i>Ideonella sakaiensis</i>	MHET	100.00	27.60± 2.60	23.17± 1.65	0.250 ± 0.050	2.17	6.0-9.5	10-44	[50]	2020
MHETase <sup>WT</sup>	<i>I.sakaiensis</i>	MHET	-	31.00± 0.80	7.30± 0.60	-	4.25	-	-	[35]	2016
Secreted-MHETase <sup>a</sup>	<i>I.sakaiensis</i>	MHET	-	7.61	3.77	0.011	2.02	-	-	[54]	2022
MHETase+Tip1 <sup>a</sup>	<i>I.sakaiensis</i>	MHET	-	7.27	17.10	0.018	0.43	-	-	[54]	2022
MHETase+Ccw12 <sup>a</sup>	<i>I.sakaiensis</i>	MHET	-	5.34	12.60	0.016	0.42	-	-	[54]	2022
MHETase+Cwp2 <sup>a</sup>	<i>I.sakaiensis</i>	MHET	-	4.62	11.18	0.014	0.41	-	-	[54]	2022
Lidless MHETase <sup>b</sup>	<i>I.sakaiensis</i>	MHET	-	0.05± 0.03	-	-	-	-	-	[50]	2020
Lidless MHETase <sup>b</sup>	<i>I.sakaiensis</i>	MHET	-	0.06± 0.03	-	-	-	-	-	[50]	2020
MHETase <sup>C224H/C529F</sup>	<i>Celeribacter manganoxidans</i>	MHET	46.90	80.87± 15.84	2 638.00± 797.00	2.952	0.03	6.5-9.0	10-60	[55]	2021
Mle046	<i>Saccharosporillum</i>	MHET	38.60	-	-	-	-	-	-	[55]	2020
Mle288	<i>Marinobacter</i>	MHET	31.00	-	-	-	-	-	-	[55]	2020
Mle267	<i>Pseudoceanicola</i>	MHET	29.30	-	-	-	-	-	-	[55]	2020

<sup>a</sup>: Loll-Krippleber et al<sup>[54]</sup> used *Saccharomyces cerevisiae*, a species utilized widely in bioindustrial fermentation processes, as a platform to develop a whole-cell catalyst expressing the MHETase enzyme. Different cell wall proteins (CWPs) were fused to MHETase to design chimeras, in which MHETase+Tip1, MHETase+Ccw12, and MHETase+Cwp2 showed better expression. The MHETase whole-cell catalyst has activity comparable to recombinant MHETase purified from *Escherichia coli*. <sup>b</sup>: The lidless MHETase was created by replacing the MHETase lid (Gly251-Thr472) with the seven-residue loop of PETase (Trp185-Phe191, PETase numbering). <sup>c</sup>: aa identity (%) was amino acid (aa) identity. -: This data is not listed in the references.

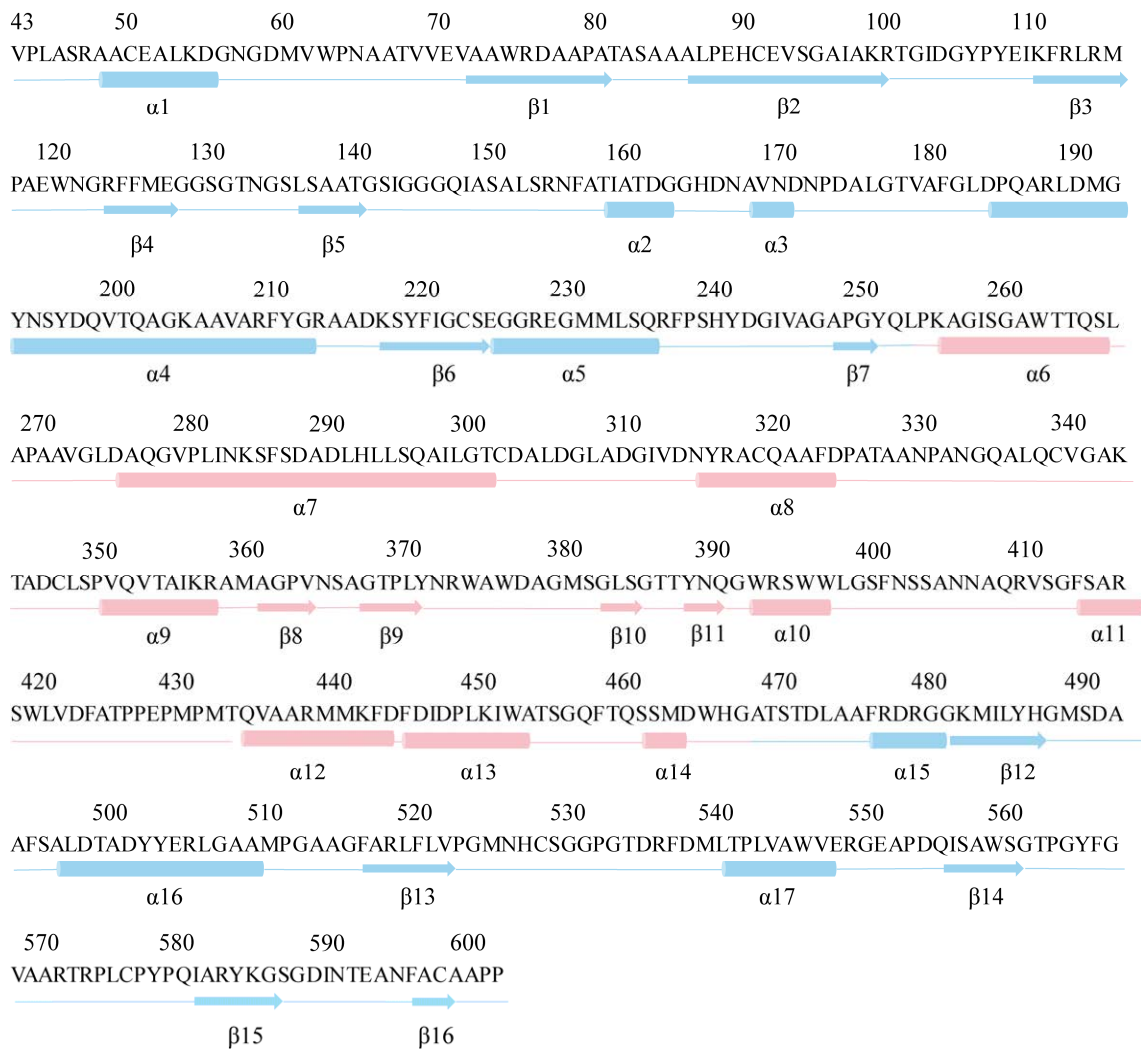


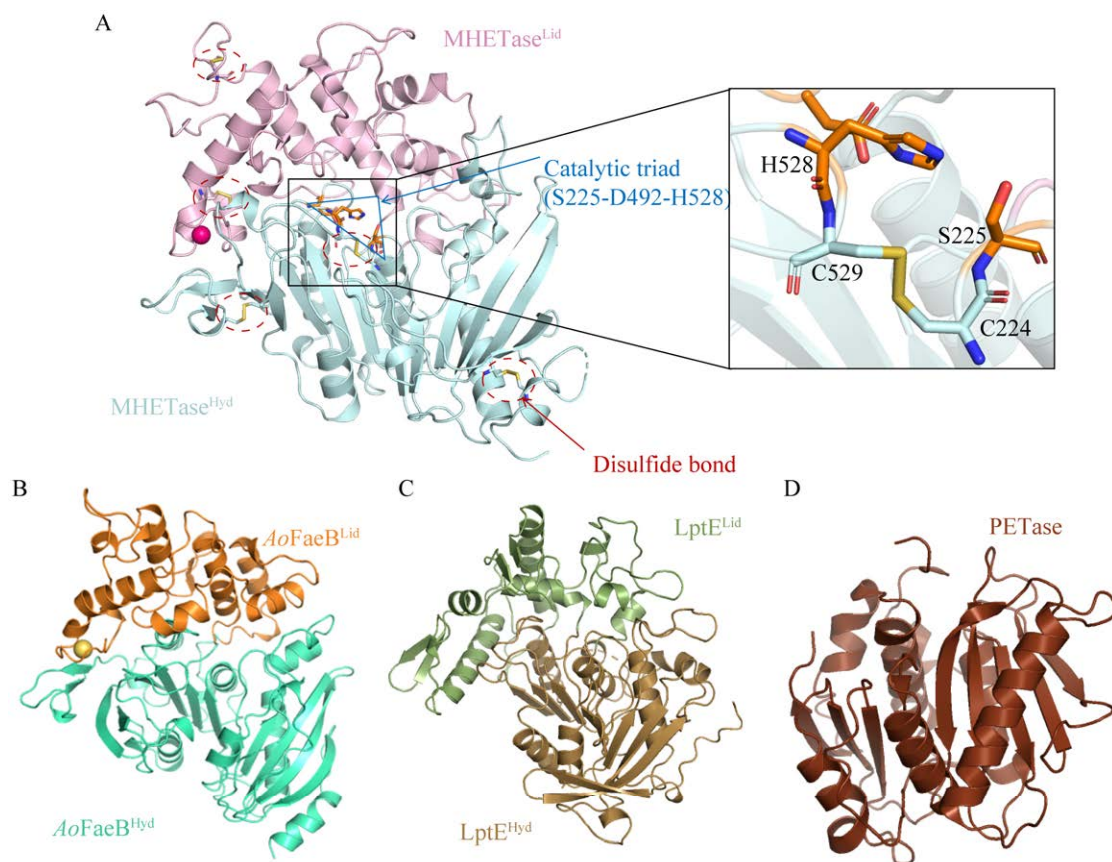
图2 MHETase的二级结构示意图  $\alpha/\beta$  水解酶结构域和盖子结构域分别用蓝色和红色标注

Figure 2 The secondary structure of MHETase. The  $\alpha/\beta$  hydrolase domain and the lid domain are marked in blue and red, respectively.

PETase的第七loop环(Trp185-Phe191)生成“有盖”PETase,进行对照实验,结果显示,“有盖”PETase具有了少量的MHET活性,“无盖”MHETase的MHET活性接近消失(表2)。此外,相比于PETase,MHETase是一个多二硫键体系,存在5对内部二硫键(Cys51-Cys92、Cys224-Cys529、Cys303-Cys320、Cys340-Cys348、Cys577-Cys599)。二硫键的存在有利于提高蛋白质的热稳定性,但Sagong等<sup>[53]</sup>的研究表明其 $T_m$ 只有50.61 °C,酶活性随着温度升高而增加,在44 °C之后迅速失活<sup>[52]</sup>,这可能

与其单体结构有关。由于盖子结构域的存在使该酶不能形成二聚体,并且盖子结构域的原子波动较大,导致体系整体热稳定性较低。MHETase的单体状态在家族酶中是独特的,因为已知所有结构相似的蛋白质,如*A. oryzae*的阿魏酸酯酶(AoFaeB, PDB登录号:3WMT),都是以二聚体的形式存在<sup>[53]</sup>。因此,在MHETase中覆盖了部分活性位点的盖子结构域对于底物结合以及酶催化都有重要影响,了解盖子结构域对MHETase单体状态以及热稳定性的影响将有助于更好地理解该酶的功能机制。





**图 3** 多种水解酶的结构对比 A: MHETase 的晶体结构(PDB 登录号: 6QG9), 包括  $\alpha/\beta$  水解酶结构域(蓝青色)和盖子结构域(玫红色), 其中二硫键和催化三联体分别用红色和蓝色虚框标注, C529-C224 二硫键区域的细节在右边方框内描述. B: AoFaeB (PDB 登录号: 3WMT). C: 单宁酰基  $\alpha/\beta$ -水解酶(PDB 登录号: 4J0K). D: PETase (PDB 登录号: 5XH3)的三维结构对比

Figure 3 Structural comparison of various hydrolases. A: The crystal structure of MHETase (PDB accession number: 6QG9), including the  $\alpha/\beta$  hydrolase domain (rose red) and the lid domain (blue-cyan), where the disulfide bond and catalytic triad are marked with red and blue dotted boxes, respectively, and the C529-C224 disulfide bond region is described in the right detail box. B: Structural comparison of AoFaeB (PDB accession number: 3WMT). C: Tanninyl  $\alpha/\beta$ -hydrolase (PDB accession number: 4J0K). D: PETase (PDB accession number: 5XH3).

德国莱布尼茨研究所的 Bařak Öztürk 团队<sup>[55]</sup>利用宏基因组学、宏转录组学、宏蛋白组学研究海洋微生物富集培养对芳香-脂肪共聚酯 [poly(butylene adipate-co-terephthalate), PBAT] 生物降解的过程中鉴定出了 6 种可能的 PETase 相似酶(similar to PETase enzymes-like, PETase-like)和 4 种可能的 MHETase 相似酶(similar to MHETase enzymes-like, MHETase-like), 分别具有降解

PBAT 及其中间产物的潜力。通过对宏基因组数据的挖掘, 发现 4 个编码 MHETase-like 酶(MHETase-like enzymes, Mles) 的基因, 与 IsMHETase 具有 29%–47% 的同源性(表 2), 其中 Mle046 具有最高的同源性。Mle046 不仅能降解 MHET, 而且可以降解另一种塑胶中间体 4-(4-羟基丁氧羰基)苯甲酸[4-(4-hydroxybutoxycarbonyl) benzoic acid, Bte]。IsMHETase 在 45 °C 以上时活



性迅速下降, 60 °C时酶几乎失活, 而 Mle046 是一种适应海洋条件的嗜温酶, 在 10–60 °C 的温度范围内仍保持相当高的活性。此外, Mle046 对 MHET 的转化率( $k_{cat}$ )远高于 MHETase 以及其他类似同源酶, 但由于其对 MHET 的亲和力较低, 因此 Mle046 的催化效率约为 *Is*MHETase 的 2.5%<sup>[60]</sup>。此外, 2022 年德国格赖夫斯瓦尔德大学韦韧团队<sup>[61]</sup>解析了来自 *T.fusca* PET 水解酶 TfCa 的晶体结构, 研究发现该酶同样具有 MHET 和 BHET 的活性; MHETase 由 1 个水解酶结构域和 1 个盖结构域组成, 而 TfCa 的整体结构分为了 1 个典型的  $\alpha\beta$  水解酶结构域和 2 个盖子结构域(lid A 和 B), 并且包含 1 个严格保守的催化三联体(S185-E319-H415)。该 TfCa 和其双突变体(TfCa<sup>169W/V376A</sup>)分别与 *Is*PETase 突变体(*Is*PETase PM)混合, 同样可以有效地促进酶催化的末端反应。这类 MHETase-like 酶的突变体有望在塑料回收相关生物技术中发挥巨大潜力。

## 2 MHETase 的底物结合模式

生物降解过程中, PET 塑料需要先结合在“结合口袋”, 该区域的形状、深度和空间亲疏水性决定了底物的结合程度, 进而影响酶的催化效率。2019 年, Palm 等<sup>[52]</sup>解析了 MHETA-MHETase 复合物的晶体结构, 显示底物位于水解酶结构域和盖子结构域之间。底物的苯环部分被盖子结构域的 Phe415、Leu254 和 Trp397 残基紧密包围, 底物游离羧酸盐的 2 个氧与盖子结构域的 Arg411、Ser416、Ser419 有稳定的氢键相互作用。如表 3 所示, 通过对突变体进行活性测定, 发现与底物羧酸官能团作用的关键残基突变将导致底物结合能力明显降低, 其中, 突变体 R411A 和 R411Q 几乎完全丧失了对天然底物 MHET 的转化能力。在

MHETase<sup>R411A\_S416G\_S419G</sup> 三突变体中, 底物羧酸盐的  $K_m$  进一步增加至野生型水平的约 1 000 倍, 可见底物识别强烈依赖于芳环以及 MHET 的羧酸酯功能。此外, 活性位点附近的残基 Phe415 因其侧链的旋转, 使得盖子结构域在底物结合时可能经历打开-关闭的结构变化。在无配体的结构中, MHETase 的盖子结构域处于开放状态, Phe415 的侧链指向远离活性位点的位置; 当底物结合位点后, 底物与 MHETase 之间的相互作用会促使残基 Phe415 的侧链发生旋转, 从而封闭活性位点<sup>[52]</sup>。同时, 作为门控残基的 Phe415 与底物之间 T 型的  $\pi$ - $\pi$  相互作用有利于稳定底物的结合(图 4A), 将该位点的苯丙氨酸突变为其他同源物中的丝氨酸会显著降低 MHETase 的水解活性<sup>[53]</sup>。与单宁酶和 PETase 相比, MHETase 与底物结合过程中的关键残基更多, 两者的结合更加紧密。

除了盖子结构域, 水解酶结构域的 Phe495 通过苯环的  $\pi$ - $\pi$  相互作用稳定底物, 在单宁酶家族中第 495 位残基常见的是异亮氨酸, Palm 等<sup>[52]</sup>研究发现将该 Phe495 突变为丙氨酸对活性有影响; Knott 等<sup>[50]</sup>也构建并评估了 F495I 突变体(表 4), 结果显示底物 MHET 转化率明显降低。底物的羰基氧原子与水解酶结构域 Gly132 和 Glu226 的氢原子形成氢键, 虽然该体系的催化三联体和氧阴离子穴都位于水解酶结构域, 但是底物特异性主要还是由盖子结构域决定。除了 MHET, MHET 的亚结构或者类似物如苯甲酸和烟酸也可以通过与 MHETase 盖子结构域的残基作用紧密结合。这表明 MHETase 具有一定的底物适应性, 深入理解底物结合特点和关键残基的作用, 有助于更高效地设计和改造 MHETase, 扩大底物特异性, 以提高其催化效率, 进一步推动塑料降解领域的研究和应用。

表 3 影响底物结合能力的 MHEase 突变位点

Table 3 MHEase mutation site that affects substrate binding ability

No.	Name	Substrate <sup>a</sup>	$K_m$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	Turnover rate of MpNPT (1/s)	Turnover rate of MHET (1/s)	References	Year
1	MHEase <sup>WT</sup>	MpNPT	0.36	13.64	11.07	[52]	2019
2	MHEase <sup>R411A</sup>	MpNPT	20.20	11.57	0.03	[52]	2019
3	MHEase <sup>R411Q</sup>	MpNPT	5.34	3.26	0.28	[52]	2019
4	MHEase <sup>S416A</sup>	MpNPT	0.26	10.35	10.10	[52]	2019
5	MHEase <sup>S416G</sup>	MpNPT	0.50	14.26	8.63	[52]	2019
6	MHEase <sup>S419G</sup>	MpNPT	0.48	17.40	8.40	[52]	2019
7	MHEase <sup>F415A</sup>	MpNPT	0.21	4.80	9.37	[52]	2019
8	MHEase <sup>F415H</sup>	MpNPT	0.52	13.34	18.05	[52]	2019
9	MHEase <sup>F495A</sup>	MpNPT	0.10	4.17	5.23	[52]	2019
10	MHEase <sup>R411A_S416A</sup>	MpNPT	338.00	4.38	0.00	[52]	2019
11	MHEase <sup>R411A_S416G</sup>	MpNPT	365.80	6.78	0.00	[52]	2019
12	MHEase <sup>R411A_S419G</sup>	MpNPT	32.60	6.80	0.00	[52]	2019
13	MHEase <sup>R411Q_S416A</sup>	MpNPT	212.50	6.02	0.00	[52]	2019
14	MHEase <sup>R411Q_S416G</sup>	MpNPT	94.50	5.02	0.00	[52]	2019
15	MHEase <sup>S416A_S419G</sup>	MpNPT	0.54	6.78	–	[52]	2019
16	MHEase <sup>R411A_S416G_S419G</sup>	MpNPT	1 056.86	7.12	–	[52]	2019

<sup>a</sup>: Palm et al<sup>[52]</sup> used MpNPT (mono-4-nitrophenyl terephthalate) as a chromogenic substrate for activity tests by spectrophotometry.

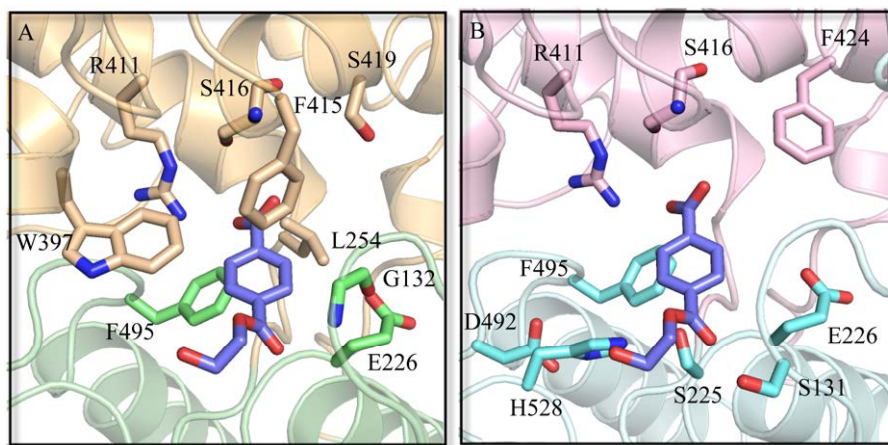


图 4 MHEase 中的关键残基 A: MHEase 中与底物结合相关的关键残基(其中黄色代表盖子结构域, 绿色代表水解结构域, 底物用紫色表示). B: 影响催化活性的关键残基(粉色是盖子结构域, 蓝色是水解结构域)

Figure 4 Key residues in MHEase. A: Key residues associated with substrate binding in MHEase hydrolase, where yellow represents the lid domain, green represents the  $\alpha/\beta$  hydrolase domain and the substrate is depicted in purple. B: Key residues affecting catalysis (pink represents the lid domain, blue represents the  $\alpha/\beta$  hydrolase domain).

### 3 MHETase 的催化降解机制

塑料结合至活性位点之后, 在酶的催化作用下发生降解。MHETase 的活性位点由亲核基团(Ser225)、起催化作用的酸基团(Asp492)和起活化作用的碱基团(His528)构成, 又称“催化三联体”, 其氨基酸序列和空间结构高度保守, 对底物中的碳氧双键进行亲核攻击催化底物的水解, 在催化反应中具有非常重要的作用, S225A 突变会直接导致 MHETase 失活。表 4 总结了 MHETase 以及与催化反应密切相关的突变体的动力学参数。由于催化反应过程中会产生

带负电荷(氧阴离子)的四面体中间产物, 因此活性中心形成氧阴离子穴(Gly132-Glu226), 2 个氨基酸的酰胺与底物的羰基氧之间形成氢键, 使水解过程中产生的四面体中间产物稳定存在。其中, MHETase 的 226 位谷氨酸位于丝氨酸水解酶中保守的“脂肪酶盒”区域<sup>[62]</sup>, 在单宁酶家族成员中常见的是苏氨酸和天冬酰胺, 但 MHETase 的 E226T 突变导致 MHET 活性降低约 50%<sup>[50]</sup>。此外, 在单宁酶家族的序列中, 约 90% 的 131 位残基是甘氨酸, 而在 MHETase 中是丝氨酸, 通过构建 MHETase<sup>S131G</sup> 突变体, 发现  $K_m$  值比野生型高了近 8 倍, 反应速率低至野生型的 3%<sup>[50]</sup>。此外,

表 4 影响 MHETase 催化 MHET 和 BHET 的突变位点

Table 4 MHETase mutation site that affects catalytic activity towards MHET and BHET

Name	Relative activity MHET (%)	Turnover rate of MHET (s <sup>-1</sup> )	Relatively activity BHET (%)	Turnover rate of BHET (s <sup>-1</sup> )	References	Year
MHETase <sup>WT</sup>	100.00	—	—	0	[50]	2020
MHETase <sup>WT</sup>	—	11.07	—	—	[52]	2019
MHETase <sup>WT</sup>	—	—	1.0	—	[53]	2020
MHETase <sup>F495A</sup>	—	5.23	—	—	[52]	2019
MHETase <sup>R411A</sup>	—	0.03	—	—	[52]	2019
MHETase <sup>R411Q</sup>	—	0.28	—	—	[52]	2019
MHETase <sup>R411K</sup>	43.76	—	1.7	—	[53]	2020
MHETase <sup>S416A</sup>	—	10.10	—	—	[52]	2019
MHETase <sup>S416G</sup>	—	8.63	—	—	[52]	2019
MHETase <sup>S419G</sup>	—	8.40	—	—	[52]	2019
MHETase <sup>F415A</sup>	—	9.37	—	—	[52]	2019
MHETase <sup>F415H</sup>	—	18.05	—	—	[52]	2019
MHETase <sup>F424H</sup>	2.99	—	—	—	[53]	2020
MHETase <sup>F424N</sup>	—	—	3.9	0.04 <sup>[50]</sup>	[53]	2020
MHETase <sup>F424V</sup>	—	—	3.0	—	[53]	2020
MHETase <sup>F424I</sup>	—	—	3.4	—	[53]	2020
MHETase <sup>S416A_F424N</sup>	14.31	—	10.2	0.13 <sup>[50]</sup>	[53]	2020
MHETase <sup>R411A_S416G</sup>	—	0.00	—	0.04	[52]	2019
MHETase <sup>R411K_F424N</sup>	19.12	—	8.7	—	[53]	2020
MHETase <sup>R411K_F424V</sup>	30.87	—	10.5	—	[53]	2020
MHETase <sup>R411K_F424I</sup>	33.68	—	11.1	—	[53]	2020
MHETase <sup>S419G_F424N</sup>	—	—	—	0.09	[52]	2019
MHETase <sup>R411K_S416A_F424I</sup>	24.78	—	15.3	—	[53]	2020
MHETase <sup>R411A_S416G_F424N</sup>	—	—	—	0.05	[52]	2019
MHETase <sup>R411A_S419G_S424N</sup>	—	—	—	0.12	[52]	2019
MHETase <sup>R411A_S416G_S419G</sup>	—	—	—	0.07	[52]	2019

Sagong 等<sup>[53]</sup>测定 MHET 水解活性发现, 残基 Arg411、Ser416、Phe424 的突变都会大大降低 MHET 的水解活性。综上所述, MHETase 活性受到多个关键残基的精密调控(图 4B), 包括催化三联体的 Ser225、底物结合和催化的关键残基 Phe495, 以及“脂肪酶盒”区域的 226 位等, 解析影响 MHETase 活性的关键残基对于该酶改造和挖掘具有重要意义。

为深入了解 MHETase 的解聚机理, 建立活性位点结构与活化能之间的关系, 研究者们运用分子动力学模拟和 QM/MM 等计算方法模拟了相关的降解过程。MHETase 是丝氨酸水解酶家族的一员, 具有该家族保守的催化三联体和氧阴离子穴, 该反应涉及酰化和脱酰化 2 个步骤。如图 5 所示, 在第一步酰化反应中, 当底物与水解酶结合时, 催化三联体的 Ser225 被 His528 去质子化, 激活的 Ser225 以亲核方式攻击底物 MHET 羰基碳, 释放乙二醇(EG)并形成

酰基-酶中间体(acyl-enzyme intermediate, AEI)。关于该酰化反应的自由能垒, 已有不同研究团队开展了相关研究。Knott 等<sup>[50]</sup>运用 QM/MM 2D 伞形采样, 沿着 MHET 羰基碳和 Ser225 之间形成的 C-O 键和断裂的 MHET C=O 酯键组合坐标计算获得的最小自由能路径(minimum free-energy path, MFEP), 预测该酰化自由能垒为(13.9±0.17) kcal/mol, 放热(5.2±0.04) kcal/mol; 而 Pinto 等<sup>[56]</sup>运用 QM/MM ONIOM 方法计算获得的包含质子转移到 His528 和 Ser225 亲核攻击的自由能垒为(9.42±0.13) kcal/mol, 低于前者的估计值(13.90±0.17) kcal/mol, 放热也更多(17.14±0.02) kcal/mol。这些结果表明第一步反应是一个放热的过程。在酰化反应结束后, 乙二醇分子很快离开活性位点, 扩散到溶剂中。同时, 乙二醇释放后, His528 第一溶剂层会出现 1 个水分子。在第二步脱酰化反应中, 该水分子被 His528 去质子化生成氢氧根离

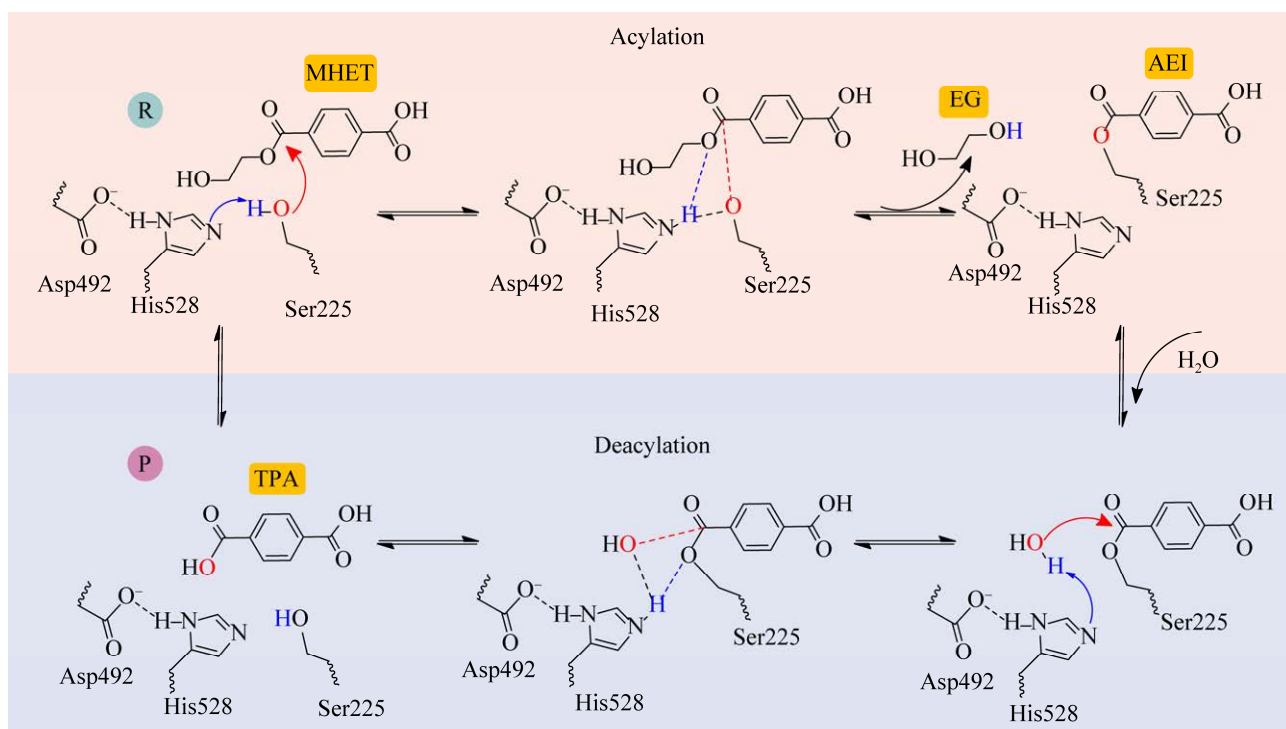


图 5 MHETase 的催化降解机制

Figure 5 Catalytic mechanism of MHETase.

子, 作为亲核试剂对酰基-酶中间体(AEI)的羰基碳原子进行亲核攻击, 生成 TPA 并释放。组氨酸 His528 在这一步中发挥了重要的作用, 通过使催化水分子去质子化并将该质子转移到丝氨酸的氧负离子来再生 Ser225, 从而进行另一个催化循环。关于第二步脱酰化反应的自由能垒, Knott 等<sup>[50]</sup>从 QM/MM 2D 伞形采样计算为  $(19.8 \pm 0.10)$  kcal/mol, Pinto 等<sup>[56]</sup>计算获得的能垒为  $(19.35 \pm 0.15)$  kcal/mol, 两者接近, 目前公认第二步脱酰化反应是整个催化反应的限速步骤。通过理论计算, 建立 MHETase 结构特征与能量势垒之间的相关性, 识别影响酶催化效率的关键因素, 能够为酶催化 PET 解聚机理提供支撑, 并为塑料解聚酶的理性改造提供新思路<sup>[46,63]</sup>。

## 4 MHETase 潜在的其他活性及酶工程改造

虽然已知 MHETase 对 MHET 分子具有水解活性, 2020 年 Sagong 等<sup>[53]</sup>解析了 MHETase 分别与 BHET 和共价中间体结合的复合物结构(分辨率: 2.51 Å, PDB 登录号: 6JTT), 令人意外地揭示了 MHETase 也存在 BHET 活性, 只是活性较弱(表 5)。在 BHET 结合的复合物结构中, BHET 的 TPA 部分和靠外的 EG 部分紧密嵌入由疏水残基(Leu254、Trp397、Phe415 和 Phe495)形成的口袋中。EG 部分的羰基氧原子与 Gly132 和 Glu226 的氮原子形成氢键, 同时 TPA 和 EG 之间的酯键位于催化残基 Ser225 附近。此外, BHET 朝内的 EG 部分主要通过极性相互作用稳定, 其羟基与 Leu254 和 Gly258 的主链形成氢键, 而与 TPA 部分之间的酯键氧原子与 Arg411 和 Ser416 的侧链形成氢键, 进一步稳定了与蛋白质的结合。

由此可见, MHETase 也可以作为 BHETase, 只是 MHETase 对 BHET 的水解活性明显低于对

MHET 的活性, 并且依赖于酶浓度。因此, 基于 BHET 结合复合物的分子认识, Sagong 等<sup>[53]</sup>开发了 2 种蛋白质工程策略来提高 MHETase 的 BHET 活性。首先, Arg411 残基与 MHET 的羧基形成盐桥, 当 BHET 用作底物时, 静电较小的赖氨酸可能比精氨酸更有利于稳定酯键。与 MHETase<sup>WT</sup> 相比, MHETase<sup>R411</sup> 突变体显示的活性增加了 1.7 倍; 其次, 在 MHETase 的复杂结构中, Phe424 残基位于内部底物结合位点并形成狭窄的底物结合口袋, 阻碍了 EG 部分的最佳结合, 因此, 通过用各种较小的残基来替换 Phe424 残基来使内部底物结合位点的空间更大, MHETase<sup>F424</sup> 突变体的活性也更高; 此外, 双突变 MHETase<sup>R411K\_F424N</sup>、MHETase<sup>R411K\_F424V</sup> 和 MHETase<sup>R411K\_F424I</sup> 对 BHET 的水解活性分别增加 8.7、10.5 倍和 11.1 倍; 添加 S416A 突变可以进一步增强对 BHET 水解活性, 三突变 MHETase<sup>R411K\_S416A\_F424I</sup> 突变体对 BHET 水解活性增加了 15.3 倍。同时, Palm 等<sup>[52]</sup>发现添加 S419 也可以进一步增强对 BHET 的水解活性, 说明 S416 和 S419 的突变都可以增强 R411/F424 双突变的水解活性, S416 和 S419 的突变增加了 R411 的柔性, 更加有利于 BHET 的结合。这些修饰揭示了该野生酶对 MHET 高酶活性和对 BHET 的低酶活性的结构原因。

除此之外, Sagong 等<sup>[53]</sup>以无定形 PET 膜为底物进行 MHETase 水解反应时发现, MHETase<sup>WT</sup> 和 MHETase<sup>R411K\_S416A\_F424I</sup> 突变体对未经 PETase 处理的 PET 膜都没有催化活性, 然而 MHETase<sup>WT</sup> 对 PETase<sup>S121A\_D186H\_R280A</sup> 处理的 PET 膜显示出了水解活性, MHETase<sup>R411K\_S416A\_F424I</sup> 突变体显示出更高的水解活性; 进一步的羧基标记实验发现并证实了 MHETase 具有水解带有末端 PET 膜的催化活性(exo-PETase), 不管是 TPA 末端还是 EG 末端, 并且 BHETase 活性与外切 PETase 活性(exo-PETase)密切相关(图 6)。基于结



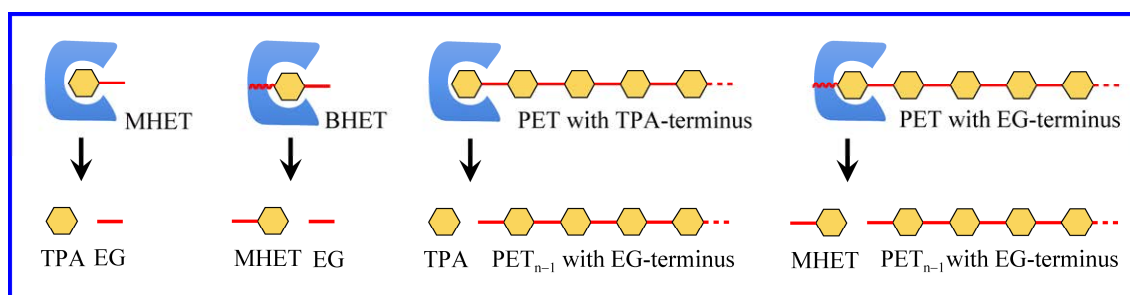


图 6 MHETase 潜在的活性功能示意图

Figure 6 Schematic diagram of MHETase active function.

构的酶工程表明, MHETase<sup>R411K\_S416A\_F424I</sup> 变体可以提高 MHETase 对 BHET 和 PET 薄膜的降解效率。

## 5 总结与展望

中国作为塑料生产和消费第一大国, 面临巨大的塑料废弃物处理压力。传统塑料在自然条件下极难分解, 对生态环境构成了严重的威胁, 塑料降解酶的发现为 PET 废弃物的降解处理与回收利用开辟了新的途径。近年来, 酶法解聚 PET 逐渐成为替代传统机械回收和化学塑料回收的新型 PET 塑料处理技术之一<sup>[64-66]</sup>。发展和应用 PET 塑料的酶降解是促进生态、经济与社会可持续发展的必然要求, 具有广阔的市场潜力和发展空间。PET 完全降解的主要产物乙二醇可以通过微生物的氧化途径形成更有价值的乙醛酸产品; 对苯二甲酸可用作生产可降解塑料的来源, 将塑料废弃物转化为增值或可持续的产品, 建立“塑料垃圾-解聚单体-高值化产品”产业, 实现低碳循环经济。MHETase 的底物特异性使其能够降解 PET 的中间产物 MHET, 是 PET 完全降解的关键酶, 也是实现 PET 降解产物生物再造的核心所在。

为了实现 PET 的完全高效降解, 需要关注以下几个潜在的突破口: (1) PET 水解酶的工业化应用要求酶具有较高的催化活性以及热稳定

性, 但目前 MHETase 的活性和热稳定性仍有待大幅提高, 而多二硫键结构和盖子结构域的存在是 MHETase 的关键特征, 剖析两者对 MHETase 单体结构以及热稳定性的影响将有助于更好地理解该酶的功能机制, 设计出有效的策略来提高 MHETase 的热稳定性; (2) 酶底物结合位置的关键残基以及钙离子区域的稳定性可能对酶的水解活性具有重要影响, 通过增强酶与底物的结合, 从而提高酶的催化活性; (3) 活性位点区域是工程塑料降解酶的热点, 酶活性位点和底物之间的相互作用是决定塑料解聚效率的关键因素。MHETase 中 BHETase 活性的发现以及对于 MHET 亚结构及类似物的潜在结合表明, 可以通过酶结构的改造拓宽底物范围, 增加其与不同底物结合的能力, 使其能够有效降解 PET 的其他中间产物, 充分发挥 MHETase 降低水解酶产物抑制的关键作用; (4) 开发塑料降解酶与 MHETase 的融合以产生双功能生物催化剂, 两者的协同作用可将低聚产物及时转化, 降低产物抑制同时生成更多的 TPA 产物, 但双酶体系中反应条件的控制需要进一步的深入研究, 酶降解的活性与外界条件息息相关, 探索两者适宜的配比、温度、浓度和结合方式等反应条件, 将有助于双酶体系的工业化应用进程, 或者探索高效的交联方法和固定化基质搭建两种酶的嵌合体。



目前,利用计算设计、定向改造等蛋白质工程技术结合多组学技术,深入挖掘 MHETase 的潜在价值具有重要意义<sup>[67-74]</sup>。从分子层面解析 MHETase 的生物降解机制,通过蛋白质工程提高酶的催化活性、热稳定性和底物特异性,合理地设计基于蛋白质结构特性和计算模拟结果来修饰目标蛋白质,创造更有效实用的 MHETase 变体,在提高热稳定性的同时拓宽底物范围,这对于提升 PET 水解酶的催化效率至关重要。因此,对 MHETase 底物特异性的结构表征和机制研究有待更深入的研究,这将为基于 MHETase 支架结合 PETase 开发定制的酶促 PET 降解系统提供有力支持。随着国家政策的推进、个人生活方式的改变以及科技水平的提升,PET 的回收将更加高效,塑料的生物降解与循环利用将迎来更好的机遇。

## REFERENCES

- [1] WEBB HK, ARNOTT J, CRAWFORD RJ, IVANOVA EP. Plastic degradation and its environmental implications with special reference to poly(ethylene terephthalate)[J]. *Polymers*, 2012, 5(1): 1-18.
- [2] 吴灿伟, 封彤波, 阎旭, 吴福信. 封套材料在军用装备封存包装中的应用及发展趋势[J]. *包装工程*, 2009, 30(9): 53-57.  
WU CW, FENG TB, YAN X, WU FX. Application and development trend of envelope materials in military equipment preservative packaging[J]. *Packaging Engineering*, 2009, 30(9): 53-57 (in Chinese).
- [3] 董文丽. 阻隔性包装材料及生产技术的应用发展[J]. *包装工程*, 2009, 30(10): 117-120.  
DONG WL. Application and development of barrier packaging materials and their production technologies[J]. *Packaging Engineering*, 2009, 30(10): 117-120 (in Chinese).
- [4] 贝荣华, 黄崇杏, 陈强, 李志嘉, 苏红霞, 王健. SiOx/PET 复合薄膜的力学性能及阻隔性能[J]. *包装工程*, 2017, 38(19): 57-62.  
BEI RH, HUANG CX, CHEN Q, LI ZJ, SU HX, WANG J. Mechanical properties and barrier properties of SiOx/PET composite films[J]. *Packaging Engineering*, 2017, 38(19): 57-62 (in Chinese).
- [5] BORNSCHEUER UT. Feeding on plastic[J]. *Science*, 2016, 351(6278): 1154-1155.
- [6] TOKIWA Y, CALABIA BP, UGWU CU, AIBA S. Biodegradability of plastics[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2009, 10(9): 3722-3742.
- [7] 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).
- [8] WALKER TR, FEQUET L. Current trends of unsustainable plastic production and micro(nano)plastic pollution[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2023, 160: 116984.
- [9] LEBRETON L, ANDRADY A. Future scenarios of global plastic waste generation and disposal[J]. *Palgrave Communications*, 2019, 5: 6.
- [10] GOMES TS, VISCONTE LLY, PACHECO EBAV. Life cycle assessment of polyethylene terephthalate packaging: an overview[J]. *Journal of Polymers and the Environment*, 2019, 27(3): 533-548.
- [11] MacLEOD M, ARP HPH, TEKMAN MB, JAHNKE A. The global threat from plastic pollution[J]. *Science*, 2021, 373(6550): 61-65.
- [12] SANTOS RG, MACHOVSKY-CAPUSKA GE, ANDRADES R. Plastic ingestion as an evolutionary trap: toward a holistic understanding[J]. *Science*, 2021, 373(6550): 56-60.
- [13] MÜLLER RJ, KLEEBERG I, DECKWER WD. Biodegradation of polyesters containing aromatic constituents[J]. *Journal of Biotechnology*, 2001, 86(2): 87-95.
- [14] LAMB JB, WILLIS BL, FIORENZA EA, COUCH CS, HOWARD R, RADER DN, TRUE JD, KELLY LA, AHMAD A, JOMPA J, HARVELL CD. Plastic waste associated with disease on coral reefs[J]. *Science*, 2018, 359(6374): 460-462.
- [15] WORM B, LOTZE HK, JUBINVILLE I, WILCOX C, JAMBECK J. Plastic as a persistent marine pollutant[J]. *Annual Review of Environment and Resources*, 2017, 42: 1-26.
- [16] 支睿, 卢艳波, 王敏, 李国辉, 邓禹. 生物可降解塑料单体二元羧酸的生物合成研究进展[J]. *生物工程学报*, 2023, 39(5): 2081-2094.  
ZHI R, LU YB, WANG M, LI GH, DENG Y. Recent progress in the biosynthesis of dicarboxylic acids, a

- monomer of biodegradable plastics[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(5): 2081-2094 (in Chinese).
- [17] 李秀华, 王自璞. PET 降解研究进展[J]. 塑料科技, 2011, 39(4): 110-114.  
LI XH, WANG ZY. Research progress on degradation of PET[J]. Plastics Science and Technology, 2011, 39(4): 110-114 (in Chinese).
- [18] 周星, 邢科, 方长青, 李亚光, 李梦尧, 宋婧. 包装废弃 PET 瓶的处理及再生资源化技术研究进展[J]. 包装学报, 2019, 11(3): 16-23.  
ZHOU X, XING K, FANG CQ, LI YG, LI MY, SONG J. Recent research progress in reclamation and recycling of waste PET bottles[J]. Packaging Journal, 2019, 11(3): 16-23 (in Chinese).
- [19] 许睿, 陈方, 丁陈君. 循环生物经济背景下我国塑料降解回收发展的机遇、挑战及建议[J]. 生物工程学报, 2023, 39(5): 1867-1882.  
XU R, CHEN F, DING CJ. Opportunities, challenges and suggestions for the development of plastic degradation and recycling under the context of circular bioeconomy[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(5): 1867-1882 (in Chinese).
- [20] 张宗豪, 何宏韬, 张旭, 郑爽, 郑陶然, 刘絮, 陈国强. 塑料的降解与可降解塑料——聚羟基脂肪酸酯的合成[J]. 生物工程学报, 2023, 39(5): 2053-2069.  
ZHANG ZH, HE HT, ZHANG X, ZHENG S, ZHENG TR, LIU X, CHEN GQ. The degradation of plastics and the production of polyhydroxyalkanoates (PHA)[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(5): 2053-2069 (in Chinese).
- [21] SINHA V, PATEL MR, PATEL JV. Pet waste management by chemical recycling: a review[J]. Journal of Polymers and the Environment, 2010, 18(1): 8-25.
- [22] RAGAERT K, DELVA L, van GEEM K. Mechanical and chemical recycling of solid plastic waste[J]. Waste Management, 2017, 69: 24-58.
- [23] YOSHIOKA T, SATO T, OKUWAKI A. Hydrolysis of waste PET by sulfuric acid at 150 °C for a chemical recycling[J]. Journal of Applied Polymer Science, 1994, 52(9): 1353-1355.
- [24] 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, 20(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, 20(2): 226-234 (in Chinese).
- [25] 覃伟洪, 杨志祥, 张海霞, 丁功涛. 聚对苯二甲酸乙二酯微生物降解研究进展[J]. 上海塑料, 2022, 50(2): 13-18.  
QIN WH, YANG ZX, ZHANG HX, DING GT. Research progress on microbial degradation of polyethylene terephthalate[J]. Shanghai Plastics, 2022, 50(2): 13-18 (in Chinese).
- [26] 刘彤瑶, 辛艺, 刘杏忠, 吴冰, 向梅春. 微生物降解塑料的研究进展[J]. 生物工程学报, 2021, 37(8): 2688-2702.  
LIU TY, XIN Y, LIU XZ, WU B, XIANG MC. Advances in microbial degradation of plastics[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021, 37(8): 2688-2702 (in Chinese).
- [27] 金琰, 蔡凡凡, 王立功, 宋超, 金文雄, 孙俊芳, 刘广青, 陈畅. 生物可降解塑料在不同环境条件下的降解研究进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(5): 1784-1808.  
JIN Y, CAI FF, WANG LG, SONG C, JIN WX, SUN JF, LIU GQ, CHEN C. Advance in the degradation of biodegradable plastics in different environments[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(5): 1784-1808 (in Chinese).
- [28] SHARMA B, DANGI AK, SHUKLA P. Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: a review[J]. Journal of Environmental Management, 2018, 210: 10-22.
- [29] 陈佳妮. 变废为宝: 利用活性污泥生产生物可降解塑料聚-3-羟基丁酸酯[J]. 生物工程学报, 2017, 33(12): 1934-1944.  
CHEN JN. From waste to treasure: turning activated sludge into bioplastic poly-3-hydroxybutyrate[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2017, 33(12): 1934-1944 (in Chinese).
- [30] 张彤, 刘盼, 王倩, 梁泉峰, 祁庆生. 降解石油基塑料的微生物及微生物菌群[J]. 生物工程学报, 2021, 37(10): 3520-3534.  
ZHANG T, LIU P, WANG Q, LIANG QF, QI QS. Degradation of petroleum-based plastics by microbes and microbial consortia[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021, 37(10): 3520-3534 (in Chinese).
- [31] 彭瑞婷, 夏孟丽, 茹家康, 霍毅欣, 杨宇. 聚氨酯塑料的微生物降解[J]. 生物工程学报, 2018, 34(9): 1398-1409.  
PENG RT, XIA ML, RU JK, HUO YX, YANG Y. Microbial degradation of polyurethane plastics[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2018, 34(9): 1398-1409 (in Chinese).

- [32] 张李婷, 张博, 许维东, 崔中利, 曹慧. 聚乙烯塑料生物降解研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(5): 1949-1962.  
ZHANG LT, ZHANG B, XU WD, CUI ZL, CAO H. Polyethylene biodegradation: current status and perspectives[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(5): 1949-1962 (in Chinese).
- [33] 袁英博, 周汶楷, 梁泉峰, 典龙阳, 苏田源, 祁庆生. 生物降解聚烯烃类塑料研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(5): 1930-1948.  
YUAN YB, ZHOU WK, LIANG QF, DIAN LY, SU TY, QI QS. Advances in biodegradation of polyolefin plastics[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(5): 1930-1948 (in Chinese).
- [34] MÜLLER RJ, SCHRADER H, PROFE J, DRESLER K, DECKWER WD. Enzymatic degradation of poly(ethylene terephthalate): rapid hydrolyse using a hydrolase from *T. fusca*[J]. Macromolecular Rapid Communications, 2005, 26(17): 1400-1405.
- [35] 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.
- [36] TANASUPAWAT S, TAKEHANA T, YOSHIDA S, HIRAGA K, ODA K. *Ideonella sakaiensis* sp. nov., isolated from a microbial consortium that degrades poly(ethylene terephthalate)[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016, 66(8): 2813-2818.
- [37] HAN X, LIU WD, HUANG JW, MA JT, ZHENG YY, KO TP, XU LM, CHENG YS, CHEN CC, GUO RT. Structural insight into catalytic mechanism of PET hydrolase[J]. Nature Communications, 2017, 8: 2106.
- [38] SON HF, 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.
- [39] SUN JY, CUI YL, WU B. GRAPE, a greedy accumulated strategy for computational protein engineering[M]. Methods in Enzymology. Amsterdam: Elsevier, 2021: 207-230.
- [40] 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, 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.
- [41] LU HY, DIAZ DJ, CZARNECKI NJ, ZHU CZ, KIM W, SHROFF R, ACOSTA DJ, ALEXANDER BR, COLE HO, ZHANG Y, LYND NA, ELLINGTON AD, ALPER HS. Machine learning-aided engineering of hydrolases for PET depolymerization[J]. Nature, 2022, 604(7907): 662-667.
- [42] 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, LEE WOODCOCK H, McGEEHAN JE, 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.
- [43] 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: 382.
- [44] 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, 4(6): 888-893.
- [45] 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, 33(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, 33(3): 106-112 (in Chinese).
- [46] CHEN LY, FAN FF, YANG MY, WANG LQ, BAI YS, QIU S, LYU CJ, HUANG J. Atomistic insight into the binding mode and self-regulation mechanism of IsPETase towards PET substrates with different polymerization degrees[J]. Physical Chemistry Chemical Physics, 2023, 25(27): 18332-18345.
- [47] MAITY W, MAITY S, BERA S, ROY A. Emerging roles of PETase and MHETase in the biodegradation of plastic wastes[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2021, 193(8): 2699-2716.
- [48] GRAF LG, MICHELS EAP, YEW Y, LIU WD, PALM GJ, WEBER G. Structural analysis of PET-degrading enzymes PETase and MHETase from *Ideonella sakaiensis*[M]. Methods in Enzymology. Amsterdam:

- Elsevier, 2021, 648: 337-356.
- [49] 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.
- [50] 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, LEE WOODCOCK H, 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.
- [51] CHEN K, DONG XY, SUN Y. Sequentially co-immobilized PET and MHET hydrolases *via* spy chemistry in calcium phosphate nanocrystals present high-performance PET degradation[J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 438: 129517.
- [52] PALM GJ, REISKY L, BÖTTCHER D, MÜLLER H, MICHELS EAP, WALCZAK MC, BERNDT L, WEISS MS, BORNSCHEUER UT, WEBER G. Structure of the plastic-degrading *Ideonella sakaiensis* MHETase bound to a substrate[J]. Nature Communications, 2019, 10: 1717.
- [53] SAGONG HY, SEO H, KIM T, SON HF, JOO S, LEE SH, KIM S, WOO JS, HWANG SY, KIM KJ. Decomposition of the PET film by MHETase using exo-PETase function[J]. ACS Catalysis, 2020, 10(8): 4805-4812.
- [54] LOLL-KRIPPLEBER R, SAJTOVICH VA, FERGUSON MW, HO B, BURNS AR, PAYLISS BJ, BELLISSIMO J, PETERS S, ROY PJ, WYATT HDM, BROWN GW. Development of a yeast whole-cell biocatalyst for MHET conversion into terephthalic acid and ethylene glycol[J]. Microbial Cell Factories, 2022, 21(1): 280.
- [55] MEYER-CIFUENTES IE, WERNER J, JEHMLICH N, WILL SE, NEUMANN-SCHAAL M, ÖZTÜRK B. Synergistic biodegradation of aromatic-aliphatic copolyester plastic by a marine microbial consortium[J]. Nature Communications, 2020, 11: 5790.
- [56] PINTO AV, FERREIRA P, NEVES RPP, FERNANDES PA, RAMOS MJ, MAGALHÃES AL. Reaction mechanism of MHETase, a PET degrading enzyme[J]. ACS Catalysis, 2021, 11(16): 10416-10428.
- [57] SULAIMAN S, YOU DJ, KANAYA E, KOGA Y, KANAYA S. Crystal structure and thermodynamic and kinetic stability of metagenome-derived LC-cutinase[J]. Biochemistry, 2014, 53(11): 1858-1869.
- [58] LENFANT N, HOTELIER T, VELLUET E, BOURNE Y, MARCHOT P, CHATONNET A. ESTHER, the database of the  $\alpha/\beta$ -hydrolase fold superfamily of proteins: tools to explore diversity of functions[J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(database issue): D423-D429.
- [59] REN B, WU MB, WANG Q, PENG XH, WEN H, MCKINSTRY WJ, CHEN QM. Crystal structure of tannase from *Lactobacillus plantarum*[J]. Journal of Molecular Biology, 2013, 425(15): 2737-2751.
- [60] MEYER-CIFUENTES IE, ÖZTÜRK B. Mle046 is a marine mesophilic MHETase-like enzyme[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 693985.
- [61] von HAUGWITZ G, HAN X, PFAFF L, LI Q, WEI HL, GAO J, METHLING K, AO YF, BRACK Y, MICAN J, FEILER CG, WEISS MS, BEDNAR D, PALM GJ, LALK M, LAMMERS M, DAMBORSKY J, WEBER G, LIU WD, BORNSCHEUER UT, et al. Structural insights into (tere)phthalate-ester hydrolysis by a carboxylesterase and its role in promoting PET depolymerization[J]. ACS Catalysis, 2022, 12(24): 15259-15270.
- [62] JAEGER KE, RANSAC S, DIJKSTRA BW, COLSON C, van HEUVEL M, MISSET O. Bacterial lipases[J]. FEMS Microbiology Reviews, 1994, 15(1): 29-63.
- [63] ZHANG ZY, LV JW, WANG Y, YU HL, GUO BL, ZHAI JH, WANG CJ, ZHAO Y, FAN FF, LUO W. Static binding and dynamic transporting-based design of specific ring-chain-ring acetylcholinesterase inhibitor: from galantamine to natural product[J]. Chemistry-a European Journal, 2023, 29(25): e202203363.
- [64] 赵彧瑾, 陈仔君, 赵晶晶, 苏婷婷, 王战勇. 聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)降解酶的研究进展[J]. 微生物学杂志, 2021, 41(6): 90-96.  
ZHAO YJ, CHEN ZJ, ZHAO JJ, SU TT, WANG ZY. Advanced in degradation enzyme of polyethylene terephthalate (PET)[J]. Journal of Microbiology, 2021, 41(6): 90-96 (in Chinese).
- [65] 赵之怡, 张国强, 刘琨, 李盛英. 聚对苯二甲酸乙二醇酯水解酶研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(5): 1998-2014.  
ZHAO ZY, ZHANG GQ, LIU K, LI SY. Advances in

- poly(ethylene terephthalate) hydrolases[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(5): 1998-2014 (in Chinese).
- [66] 卢艺, 韩瑞枝, SCHWANEBERG Ulrich, 季宇. 评论: 塑料结合模块促进聚对苯二甲酸乙二醇酯的酶法降解[J]. 生物工程学报, 2023, 39(5): 1883-1888.  
LU Y, HAN RZ, SCHWANEBERG U, JI Y. Commentary: polymer binding modules accelerate enzymatic degradation of poly(ethylene terephthalate)[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(5): 1883-1888 (in Chinese).
- [67] 曲戈, 朱彤, 蒋迎迎, 吴边, 孙周通. 蛋白质工程: 从定向进化到计算设计[J]. 生物工程学报, 2019, 35(10): 1843-1856.  
QU G, ZHU T, JIANG YY, WU B, SUN ZT. Protein engineering: from directed evolution to computational design[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2019, 35(10): 1843-1856 (in Chinese).
- [68] 孙璠原, 崔颖璐, 吴边. 合成生物学中蛋白质计算预测设计的应用与发展[J]. 生命科学, 2021, 33(12): 1436-1444.  
SUN JY, CUI YL, WU B. Application and development trend of computational protein prediction and design in synthetic biology[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2021, 33(12): 1436-1444 (in Chinese).
- [69] LIU CZ, LV N, SONG YL, DONG LJ, HUANG M, SHEN Q, REN GR, WU RB, WANG BJ, CAO ZX, XIE HJ. Interaction mechanism between zein and  $\beta$ -lactoglobulin: insights from multi-spectroscopy and molecular dynamics simulation methods[J]. Food Hydrocolloids, 2023, 135: 108226.
- [70] 曲戈, 赵晶, 郑平, 孙际宾, 孙周通. 定向进化技术的最新进展[J]. 生物工程学报, 2018, 34(1): 1-11.  
QU G, ZHAO J, ZHENG P, SUN JB, SUN ZT. Recent advances in directed evolution[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2018, 34(1): 1-11 (in Chinese).
- [71] SUN JY, WU B. Protein design with a machine-learned potential about backbone designability[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2022, 47(8): 638-640.
- [72] 崔颖璐, 吴边. 计算机辅助蛋白结构预测及酶的计算设计研究进展[J]. 广西科学, 2017, 24(1): 1-6.  
CUI YL, WU B. A brief overview of computational protein structure prediction and enzyme design[J]. Guangxi Sciences, 2017, 24(1): 1-6 (in Chinese).
- [73] 樊芳芳, 付玉状, 曹泽星. 酶催化过程的量子-经典力学研究进展[J]. 科学通报, 2021, 66(10): 1131-1143.  
FAN FF, FU YZ, CAO ZX. QM/MM study of the enzymatic catalysis[J]. Chinese Science Bulletin, 2021, 66(10): 1131-1143 (in Chinese).
- [74] CUI YL, WANG YH, TIAN WY, BU YF, LI T, CUI XX, ZHU T, LI RF, WU B. Development of a versatile and efficient C-N lyase platform for asymmetric hydroamination *via* computational enzyme redesign[J]. Nature Catalysis, 2021, 4(5): 364-373.

(本文责编 陈宏宇)