

· 环境生物技术 ·

基于结构改造来源于大阪伊德氏杆菌 201-F6 的 PET 水解酶

陈纯琪¹, 韩旭², 刘卫东², 马立新¹, 刘珂³, 郭瑞庭¹

1 湖北大学 生命科学学院 省部共建生物催化与酶工程国家重点实验室 工业生物技术湖北省重点实验室 生物资源绿色转化湖北省协同创新中心, 湖北 武汉 430062

2 中国科学院 天津工业生物技术研究所, 天津 300308

3 华中师范大学 生命科学学院 遗传调控与整合生物学湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430079

陈纯琪, 韩旭, 刘卫东, 等. 基于结构改造来源于大阪伊德氏杆菌 201-F6 的 PET 水解酶. 生物工程学报, 2021, 37(9): 3268-3275.

Chen CC, Han X, Liu WD, et al. Structure-based engineering of PET hydrolase from *Ideonella sakaiensis*. Chin J Biotech, 2021, 37(9): 3268-3275.

摘要: 聚对苯二甲酸乙二醇酯 (Polyethylene terephthalate, PET) 塑料是由对苯二甲酸 (Terephthalic acid, TPA) 和乙二醇 (Ethylene glycol, EG) 通过酯键聚合而成的高分子聚合物, 具有性质稳定、不易分解等特点, 目前已成为广泛使用的一种聚酯, 然而大量产生的 PET 废弃物同时也造成严重的环境污染。2016 年, 一种有效降解 PET 的 PET 水解酶在大阪伊德氏杆菌 201-F6 中被鉴定发现 (命名为 *IsPETase*), 且多个 *IsPETase* 结构已被解析。为了设计获得 PET 降解效率更高的 *IsPETase*, 针对底物结合位点 II c 区的天冬氨酸 233 (N233) 残基进行了多种突变测试, 酶活性检测实验表明, 用丙氨酸替代 N233 可以提高 *IsPETase* 的性能, 尤其是结合 R280A 突变后, *IsPETase* 活性增加更为显著。此外, 解析了 *IsPETase* N233A 突变体的 X 射线晶体结构。*IsPETase* N233A 突变体与 *IsPETase* 野生型整体结构相似, 但丙氨酸取代 N233 后增加了底物识别位点 II 末端的空间结构, 推测因此增加了 *IsPETase* 的活性。这些结果为进一步基于结构改造 PET 水解酶提供了新的线索。

关键词: 聚对苯二甲酸乙二醇酯, 聚对苯二甲酸乙二醇酯水解酶, 降解, X 射线晶体结构, N233 突变体

Received: October 5, 2020; **Accepted:** January 5, 2021

Supported by: National Key Research and Development Program of China (No. 2019YFA0706900), National Natural Science Foundation of China (No. 31800662).

Corresponding authors: Ke Liu. Tel: +86-27-67862703; E-mail: keliu2015@mail.cnu.edu.cn

Rey-Ting Guo. Tel: +86-27-88664297; E-mail: guoreyting@hubu.edu.cn

国家重点研发计划 (No. 2019YFA0706900), 国家自然科学基金 (No. 31800662) 资助。

Structure-based engineering of PET hydrolase from *Ideonella sakaiensis*

Chunqi Chen¹, Xu Han², Weidong Liu², Lixin Ma¹, Ke Liu³, and Rey-Ting Guo¹

¹ Hubei Collaborative Innovation Center for Green Transformation of Bio-Resources, Hubei Key Laboratory of Industrial Biotechnology, State Key Laboratory of Biocatalysis and Enzyme Engineering, School of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, Hubei, China

² Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

³ Hubei Key Laboratory of Genetic Regulation and Integrative Biology, School of Life Sciences, Central China Normal University, Wuhan 430079, Hubei, China

Abstract: Polyethylene terephthalate (PET) is a synthetic polymer consisting of ester bond-linked terephthalate and ethylene glycol. Tremendous amounts of PET have been produced and majority of them enters terrestrial and marine environment as wastes, posing serious threats to the global ecosystems. In 2016, a PET hydrolase from a PET-assimilating bacterium *Ideonella sakaiensis* was reported and termed as *IsPETase*. This enzyme outperforms other PET-hydrolyzing enzymes in terms of its PET hydrolytic activity at ambient temperature, thus holds a great promise for PET biodegradation. In order to improve *IsPETase* activity, we conducted structure-based engineering to modify the putative substrate-binding tunnel. Among the several variants to the N233 residue of *IsPETase*, we discovered that the substitution of N233 with alanine increases its PET hydrolytic activity, which can be further enhanced when combined with a R280A mutation. We also determined the X-ray crystal structure of the *IsPETase* N233A variant, which shares nearly identical fold to the WT protein, except for an open end of subsite II. We hypothesized that the smaller side chain of N233A variant might lead to an extended subsite II for PET binding, which subsequently increases the enzymatic activity. Thus, this study provides new clues for further structure-based engineering of PETase.

Keywords: PET, *IsPETase*, degradation, X-ray crystal structure, N233 variants

塑料制品给人类生活带来生活便利的同时也严重威胁着全球的生态系统。聚对苯二甲酸乙二酯 (Polyethylene terephthalate, PET) 塑料是由对苯二甲酸 (Terephthalic acid, TPA) 和乙二醇 (Ethylene glycol, EG) 通过酯键聚合而成的高分子聚合物, 具有性质稳定、不易分解等特点, 目前已成为广泛使用的一种聚酯^[1], 但同时是造成白色污染的主要原因^[2-3]。目前对 PET 废弃物的处理方法主要包括填埋、焚烧以及回收再利用。填埋和焚烧虽然最为简单, 但产生的废气废水会对环境造成二次污染。利用生物法 (酶降解或者微生物降解) 可以将 PET 降解成小分子, 然后被回收再利用, 因此是最理想的处理方法^[4-7]。在过去的十几年中, 科学家已经发现酯酶、脂肪酶和角质酶等具有降解 PET 的能力^[4-5], 证明了 PET 生物降解的可能性。生化性质分析发现这些

酶都属于丝氨酸水解酶家族, 但 PET 并不是它们的天然底物, 所以降解活力很低^[8]。定点突变、添加金属离子等方法也被用来尝试提高这些酶的活性, 但结果并不理想^[9-12]。

2016年, Yoshida 等分离出了能够以 PET 为唯一碳源的大阪伊德氏杆菌 *Ideonella sakaiensis* 201-F6^[13]。这株细菌能够分泌 PET 水解酶 (后命名为 *IsPETase*) 到胞外, 通过水解 PET 产生单-(2-羟乙基) 对苯二甲酸 (MHET)、TPA 和羟乙基 (bis-2) TPA (BHET), 这些小分子随后进入细胞进行代谢^[13]。前期, 我们及其他团队先后报道了 *IsPETase* 高分辨率的晶体结构^[14-19]。晶体结构显示, *IsPETase* 与典型的角质酶具有近 50% 的蛋白质序列相似性, 同属于 α/β 水解酶超家族, 都具有经典的 α/β 水解酶折叠以及由丝氨酸 (S160)-组氨酸 (H237)-天冬氨酸 (D206) 构成的催化三

联体 (Catalytic triad) 结构, 而底物坐落于蛋白质表面的一个浅凹槽内(图 1A)^[14,17]。尽管与典型角质酶的序列与结构高度相似, 但 *IsPETase* 展现了其特有的结构特征, 例如典型角质酶具有一对非常保守的二硫键 (DS2, 图 1A), 而在 *IsPETase* 中, 除了此保守二硫键外, 在活性中心附近多了一对 DS1 (图 1A)。结构显示 DS1 连接着一段 *IsPETase* 特有的 loop 区域, 突变 DS1 的 C203 或 C239 氨基酸残基将导致 *IsPETase* 水解 PET 的效率显著降低^[14]。上述信息为进一步研究 *IsPETase* 的催化机理以及其后续的酶活性改造奠定了重要的基础。

除单独的 *IsPETase* 晶体结构外, 我们同时报道了 *IsPETase* 识别底物/产物的复合体晶体结构^[14]。

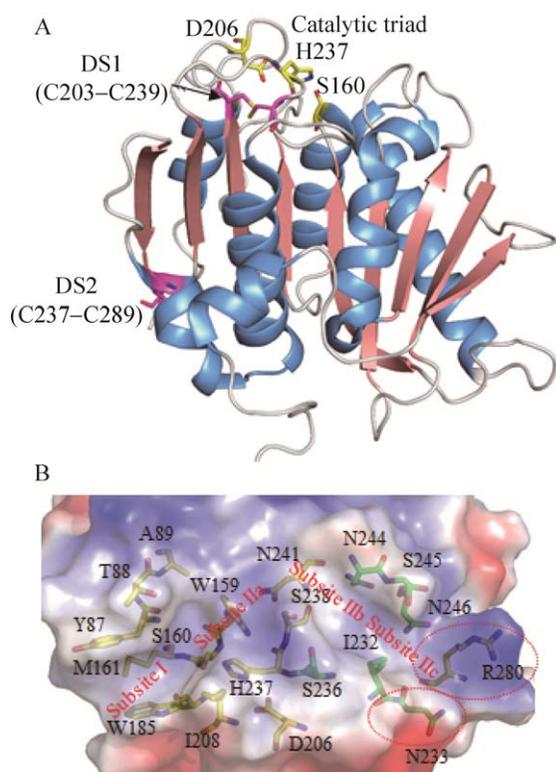


图 1 *IsPETase* 的结构特点

Fig. 1 The structure of *IsPETase*. (A) A cartoon model (PDB code 5xg0). The catalytic triad and disulfide bridges are shown as sticks, and colored as yellow and amaranth, respectively. (B) The substrate binding residues of *IsPETase*.

复合体结构显示催化三联体附近的第 185 位色氨酸 (W185) 的侧链可以识别 PET 的 MHET 基团。基于这些信息, Joo 等进行了分子对接分析, 并预测 *IsPETase* 表面有一个长而浅的通道可以容纳结合底物 PET, 随后他们将 W185 附近区域命名为第 I 底物结合位点, 向后延伸为第 II 号位点; 而 II 号位点又可以分为 II a、II b 及 II c 三个 MHET 基团结合区。利用突变实验他们发现位于 II c 位点最末端的精氨酸残基 280 (R280) 突变为短侧链氨基酸残基丙氨酸后, 可以增加底物 PET 识别通道的宽度进而提高了 *IsPETase* 的降解活性^[17]。

自我们解析 *IsPETase* 的结构后, 本团队一直致力于对 *IsPETase* 的改造, 希望能够获得活性更高、催化条件更广泛的 PET 水解酶。本研究基于前期 R280A 的研究结果, 针对 *IsPETase* 的 II c 结合区进行了深入探索。基于结构分析, 我们发现 R280 相对的天冬酰胺 233 (N233) 可能是改善酶活性的关键氨基酸残基, 因此在本文中我们系统地研究了 N233 突变成为不同氨基酸后的 *IsPETase* 酶活性, 并且成功解析了酶活表现较优的 *IsPETase* N233A 突变体的晶体结构。随后, 基于结构揭示了 *IsPETase* N233A/R280A 双突变体呈现较高的 PET 降解活性的分子机理。

1 材料与方法

1.1 基因克隆

以构建好的野生型大阪伊德氏杆菌 201-F6 *IsPETase* (GenBank 登录号: GAP38373.1) (GENE ray Biotech Co., Shanghai, China) 重组 pET32a 载体为模板, 通过使用 QuickChange 定点诱变试剂盒 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) 构建突变体。其中, 突变体 PCR 产物与 *Dpn* I 孵育 (New England Biolabs, Hitchin, UK) 以消化原始 DNA 模板。随后, 突变体质粒分别转化至大肠杆菌 XL1-Blue 中, 经测序确认突变后利用大肠杆菌进行表达。

1.2 蛋白质表达纯化

将 *IsPETase* 野生型和突变体质粒转化大肠杆菌 BL21 *trxB* (DE3) 细胞, 并利用 LB 培养基于 37 °C 培养至 OD_{600} 约为 0.8, 随后降温至 16 °C 并利用 0.6 mmol/L 异丙基 β -D-硫代半乳糖吡喃糖苷 (IPTG) 诱导 24 h。次日, 离心收集细胞, 利用含有 25 mmol/L Tris-HCl、150 mmol/L NaCl 和 20 mmol/L 咪唑 (pH 7.5) 的溶液重悬细胞, 然后进行高压破碎。17 000 \times g 高速离心 1 h 去除细胞碎片, 获得的上清液通过 FPLC 系统 (GE, Healthcare) 进行蛋白质纯化, 并利用 TEV 蛋白酶去除 His 标签。获得的混合物再次通过 Ni-NTA 柱纯化后, 浓缩至 30 mg/mL 进行酶活性测定和结晶筛选。

1.3 酶活性测定

根据之前我们报道的酶活测定方法检测 *IsPETase* 野生型和突变体降解 PET 的活性^[14]。分别将 3 mg/mL 底物 PET 薄膜与 10 μ g/mL *IsPETase* 野生型或各种突变体蛋白质加入含有 50 mmol/L 甘氨酸-NaOH (pH 9.0) 的反应体系中, 反应混合物在 30 °C、800 r/min 振荡下反应 18 h, 随后在 85 °C 淬灭反应 10 min。产物利用 HPLC 系统以及 C18 柱在流动相为 20%–80% 甲醇的磷酸缓冲液条件下进行分析。每个独立实验中, 每个样品进行 3 次平行反应。数据分析中, 以野生型的产物量为百分之百, 其他样品的活力则以百分比来表示。

1.4 *IsPETase* N233A 突变体蛋白质的结晶实验

N233A 突变体蛋白质利用包括 Crystal Screen、Crystal Screen 2、Crystal Screen Cryo、Crystal Screen Lite、MembFac、Natrix、Index、SaltRx 和 SaltRx 2 等 Hampton Research Crystal Screen 的 768 种不同条件进行晶体初筛。将 1 μ L 蛋白质溶液与 1 μ L 晶体筛选储液在 96 孔 Cryschem 板 (Hampton Research) 中混合, 利用坐滴式蒸气扩散法在 25 °C 条件下进行结晶实验。最终 N233A 蛋白质晶体在含有 17% PEG8000、0.2 mol/L 醋酸钙和 0.1 mol/L 次甲砷酸

钠的溶液中获得。

1.5 N233A 突变体蛋白质的结构解析

在晶体数据收集之前, 将晶体浸泡在含有 20% PEG8000、0.2 mol/L 醋酸钙、0.1 mol/L 次甲砷酸钠和 10% 甘油的冷冻保护剂中, 并迅速利用液氮冷冻保存。蛋白质晶体的 X 射线衍射数据利用台湾同步辐射研究中心 (NSRRC, 台湾新竹) 的 BL15A1 和 TPS05A 线站进行收集。收集数据使用 HKL-2000 程序进行衍射图像处理^[20], 使用 PHENIX 和 COOT 构建模型^[21–22], 最终结构利用 PHENIX 和 Refmac5 进行修正^[23]。所有结构图使用 PyMOL 程序 (<http://pymol.sourceforge.net/>) 呈现。

2 结果与分析

2.1 *IsPETase* 突变体设计思路

2018 年, Joo 等通过分子对接预测了 *IsPETase* 结合含有 4 个 PET 分子的类似物 2-HE(MHET)₄ (2-hydroxyethyl-(monohydroxyethyl terephthalate)₄) 的结构模式。*IsPETase* 识别 2-HE (MHET)₄ 的结合位点可分为 I 和 II 两部分, 分别结合了 1 个和 3 个 MHET 基团。位点 I 主要由 Y87、W185、M161 和 I208 残基组成, 而位点 II 由 T88、A89、W159、I232、N233、S236、S238、N241、N244、S245、N246 和 R280 等多个氨基酸残基组成一个窄而狭长的槽状结构 (图 1B)^[17]。

通过晶体结构和酶活性实验分析发现, 识别位点 II 末端的 R280 残基突变为短侧链的丙氨酸后提高了 *IsPETase* 的活性^[17,24]。基于结构分析发现, 虽然 R280 残基远离 *IsPETase* 的活性中心, 但 R280 突变为丙氨酸后, 精氨酸的长侧链消失, 致使结合位点 II 末端由原来的正电荷凸起位点变为了疏水性的非凸起位点, 进而减少了 *IsPETase* 结合底物的空间位阻, 增加了 *IsPETase* 酶活性^[17]。进一步分析发现, R280 残基对面的 N233 侧链为一个较长的亲水性基团。因此我们猜测改变 N233 这个亲水侧链可能有助于扩展底物的结合空间,

或者改变 233 位的氨基酸侧链性质可能会改变底物结合力,进而提升 *IsPETase* 的降解能力。因此,我们对 N233 进行了不同突变,基于酶活性检测分析了其改造结果。此外,我们同时构建了含有 R280A 和 N233A 双突变的 *IsPETase*,希望能够进一步提高 *IsPETase* 的水解效率。

2.2 N233 突变体的酶活性测定

我们首先构建了 *IsPETase* N233 不同的突变体,包括含有短侧链的 N233G、N233A、N233C 和 N233S 突变体,以及带电 N233D、N233E、N233H、N233R 和芳香族 N233F、N233Y 和 N233W 等突变体。不同突变体与底物 PET 反应后进行产物 MHET 和 TPA 的含量测定。酶活实验显示,相比较于野生型 *IsPETase*,N233 各种突变体生成 MHET 的产量没有明显变化(图 2A),并且突变体 N233C、N233H 和 N233W 产生的 MHET 的量下降了约 50%。另一方面,我们发现 N233G、N233A、N233S、N233E、N233R 和 N233W 突变体能够增加产物 TPA 的产量(图 2A),但当 N233 突变为其他氨基酸如 C、D、H 和 F 时,显著降低了 TPA 的产量(图 2A)。在上述突变体中,我们发现 N233A 突变体产生 TPA 的量比野生型高

出 1 倍,因此 *IsPETase* N233A 突变体的水解活性增加尤为明显(图 2A)。

根据以上结果,我们进一步构建了 N233A/R280A 双突变体,并测定其降解 PET 的能力。有趣的是,PET 水解产物分析表明 N233A/R280A 双突变体同时增加了 MHET 和 TPA 的产量(图 2B)。综合上述结果,我们发现 R280A/N233A 双突变体能够有效改善 *IsPETase* 的活性。

2.3 N233A 突变体蛋白质的结构解析

为了更好地解释 N233A 和 R280A/N233A 突变体促进 *IsPETase* 活性的分子机理,我们随后进行了蛋白质结晶实验,并最终获得解析了分辨率为 1.9 Å 的 N233A 突变体晶体结构(表 1)。结构显示 N233A 突变体蛋白质同样具有经典的 α/β -水解酶折叠结构以及 S160-H237-D206 催化三联体活性中心(图 3A)。相比较 *IsPETase* 野生型的结构,N233A 突变体结构没有明显差异(RMSD 为 0.145 Å)(图 3B)。但在 N233A 突变体中,我们发现丙氨酸代替 N233 后虽然没有改变突变体结构的表面电荷分布,由天冬酰胺变为短侧链且不带电的丙氨酸,可能减弱了底物结合的空间位阻作用、增加了结合位点的疏水性,使底物能够更好地进入催化裂隙(图 3C-D)。

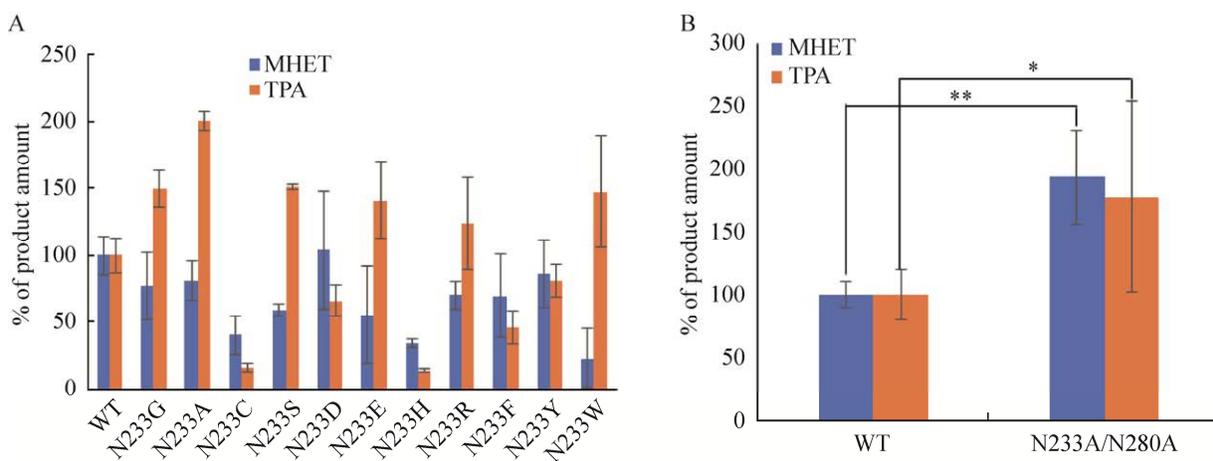


图 2 *IsPETase* N233 突变体降解 PET 的活性分析

Fig. 2 Analysis of the PET hydrolytic activity of *IsPETase* N233 variants. (A) Hydrolytic activities of *IsPETase* and its N233 variants. (B) Hydrolytic activities of *IsPETase* and its N233A/R280A variant. ** $P < 0.001$ compared with WT MHET, and * $P < 0.05$ compared with WT TPA.

表 1 晶体衍射数据收集和模型优化参数
Table 1 Data collection and refinement statistics of N233A variant

PDB code	7CQB
Data collection	
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Unit cell	
<i>a</i> (Å)	51.065
<i>b</i> (Å)	51.246
<i>c</i> (Å)	84.806
$\alpha/\beta/\gamma$ (°)	90/90/90
Resolution (Å)	25–1.86 (1.93–1.86)
Unique reflections	19 219 (1 892)
Redundancy	6.3 (6.4)
Completeness (%)	99.3 (99.9)
Average <i>I</i> / σ (<i>I</i>)	25.3 (4.2)
CC 1/2	0.995 (0.933)
Refinement	
No. of reflections	19 170 (1 395)
$R_{\text{work}}^{\text{[a]}}$ (95 % of data)	0.142 (0.198)
$R_{\text{free}}^{\text{[a]}}$ (5 % of data)	0.192 (0.262)
r.m.s.d. bonds (Å)	0.010
r.m.s.d. angles (°)	1.493
Dihedral angles	
Most favored (%)	98.1
Allowed (%)	1.9
Disallowed (%)	0
No. of non-H atoms/average B (Å ²)	
Protein	1 919/21.16
Water	233/32.48

^[a] Values in parentheses are for highest-resolution shell.

虽然没有获得 R280A/N233A 突变体的晶体结构,通过结构模拟我们发现 N233A/R280A 双突变体中丙氨酸的短侧链可能进一步拓展了 *Is*PETase 结合位点 II 末端的疏水性结合槽结构

(图 3E–F),使其能够更好地容纳识别底物。因此,上述结果解释了为什么 N233A 以及 N233A/R280A 突变体可以促进 *Is*PETase 活性,增加了底物 MHET 或/和 TPA 的产量。

3 讨论

基于 *Is*PETase 晶体结构,前期研究已对 *Is*PETase 降解 PET 的过程进行推测阐述,并且针对影响 *Is*PETase 活性的关键氨基酸进行了研究^[14,25]。*Is*PETase 底物结合位点可分为结合一个 MHET 基团的位点 I 以及识别 3 个 MHET 基团的位点 II。在水解过程中, PET 在 *Is*PETase 作用下先降解为 MHET 和 TPA, MHET 将会进一步被 MHETase 降解为 TPA 和 EG。前期 Yoshida 等的研究表明, *Is*PETase 降解 PET 薄膜过程中也会产生较多的 TPA^[13]。本实验中, *Is*PETase N233A 对于 TPA 的产量增加较为明显,这与 R280A 突变体的结果相类似^[17]。我们推测可能是由于 N233A 和 R280A 突变位点位于底物位点 II 的末端,促进了 MHET 基团降解为 TPA,但具体的原因还需要进一步研究。除了已报道的结合位点的氨基酸残基改造, N244、S245 和 N246 三个残基位于一个长的链状结构(图 1B),被认为对于固定识别底物具有重要的作用,其对 *Is*PETase 的活性影响还有待研究。

除了对 *Is*PETase 的结构进行改造,目前针对影响其活性的一些物理因素也有报道。例如,一定浓度的盐和甘油可以增强 *Is*PETase 降解 PET 的能力,而低浓度的有机溶剂或去污剂能够降低 *Is*PETase 的活性。此外, Liu 等也对 *Is*PETase 活性的最适温度和溶剂 pH 等进行了研究^[26]。因此,除了改变酶活性中心或底物识别位点的关键氨基酸残基外,还可以通过物理方法对 *Is*PETase 的活性进行优化。在后期的 *Is*PETase 酶活研究改造中,可以采用蛋白质结构及物理因素优化相结合的方式更有效地改善 *Is*PETase 降解 PET 的活性。

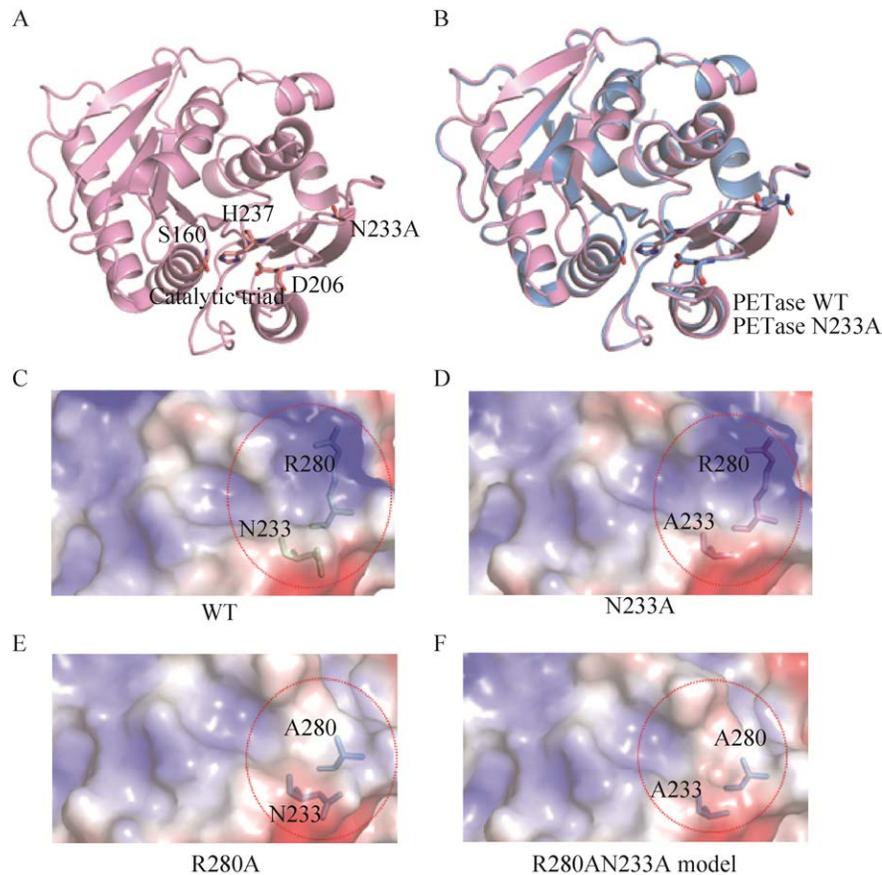


图3 *IsPETase* N233A 突变体蛋白质的结构特点

Fig. 3 The structural characteristics of *IsPETase* N233A variant. (A) The crystal structure of *IsPETase* N233A variant presented as a cartoon model. The catalytic triad and N233A residues of *IsPETase* are shown as sticks. (B) Structure comparison of *IsPETase* WT (blue) with N233A (pink). (C) to (F) Electrostatic potential surface presentation of substrate binding site II in *IsPETase* WT and its different variants. The residues R280, N233 and their mutants are shown as sticks. The electrostatic potential surface change in *IsPETase* and its variants are indicated with dotted circles.

REFERENCES

- [1] Webb HK, Arnott J, Crawford RJ, et al. Plastic degradation and its environmental implications with special reference to poly (ethylene terephthalate). *Polymers*, 2013, 5(1): 1-18.
- [2] Forrest SA, Holman L, Murphy M, et al. Citizen science sampling programs as a technique for monitoring microplastic pollution: results, lessons learned and recommendations for working with volunteers for monitoring plastic pollution in freshwater ecosystems. *Environ Monit Assess*, 2019, 191(3): 172.
- [3] 许楹, 殷超凡, 岳纹龙, 等. 石油基塑料的微生物降解. *生物工程学报*, 2019, 35(11): 2092-2103.
- [4] Xu Y, Yin CF, Yue WL, et al. Microbial degradation of petroleum-based plastics. *Chin J Biotech*, 2019, 35(11): 2092-2103 (in Chinese).
- [5] Wei R, Oeser T, Zimmermann W. Synthetic polyester-hydrolyzing enzymes from thermophilic actinomycetes. *Adv Appl Microbiol*, 2014, 89: 267-305.
- [6] Chen S, Tong X, Woodard RW, et al. Identification and characterization of bacterial cutinase. *J Biol Chem*, 2008, 283(38): 25854-25862.
- [6] 杨宇. 塑料的生物分解: 关键问题及进展//中国生物工程学会第二届青年科技论坛暨首届青年工作委员会学术年会论文集. 广州: 中国生物工程学

- 会, 2017.
- [7] 王小丹. 环境中可被生物降解的聚酯塑料的酶降解机制的理论研究[D]. 济南: 山东大学, 2019.
Wang XD. Theoretical study on the mechanism of enzyme degradation of biodegradable polyester plastics in environment. Jinan: Shangdong University, Master thesis, 2019 (in Chinese).
- [8] De Castro AM, Carniel A, Junior JN, et al. Screening of commercial enzymes for poly ethylene terephthalate (PET) hydrolysis and synergy studies on different substrate sources. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2017, 44(6): 835-844.
- [9] Acero EH, Ribitsch D, Dellacher A, et al. Surface engineering of a cutinase from *Thermobifida cellulositytica* for improved polyester hydrolysis. *Biotechnol Bioeng*, 2013, 110(10): 2581-2590.
- [10] Ribitsch D, Hromic A, Zitzenbacher S, et al. Small cause, large effect: structural characterization of cutinases from *Thermobifida cellulositytica*. *Biotechnol Bioeng*, 2017, 114(11): 2481-2488.
- [11] Then J, Wei R, Oeser T, et al. Ca²⁺ and Mg²⁺ binding site engineering increases the degradation of polyethylene terephthalate films by polyester hydrolases from *Thermobifida fusca*. *Biotechnol J*, 2015, 10(4): 592-598.
- [12] Then J, Wei R, Oeser T, et al. A disulfide bridge in the calcium binding site of a polyester hydrolase increases its thermal stability and activity against polyethylene terephthalate. *FEBS Open Bio*, 2016, 6(5): 425-432.
- [13] Yoshida S, Hiraga K, Takehana T, et al. A bacterium that degrades and assimilates poly ethylene terephthalate. *Science*, 2016, 351(6278): 1196-1199.
- [14] Han X, Liu WD, Huang JW, et al. Structural insight into catalytic mechanism of PET hydrolase. *Nat Commun*, 2017, 8: 2106.
- [15] Chen CC, Han X, Ko TP, et al. Structural studies reveal the molecular mechanism of PETase. *FEBS J*, 2018, 285(20): 3717-3723.
- [16] Austin HP, Allen MD, Donohoe BS, et al. Characterization and engineering of a plastic-degrading aromatic polyesterase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(19): E4350-E4357.
- [17] Joo S, Cho IJ, Seo H, et al. Structural insight into molecular mechanism of poly ethylene terephthalate degradation. *Nat Commun*, 2018, 9: 382.
- [18] Fecker T, Galaz-Davison P, Engelberger F, et al. Active site flexibility as a hallmark for efficient PET degradation by *I. sakaiensis* PETase. *Biophys J*, 2018, 114(6): 1302-1312.
- [19] Liu B, He LH, Wang LP, et al. Protein crystallography and site-direct mutagenesis analysis of the poly ethylene terephthalate hydrolase PETase from *Ideonella sakaiensis*. *ChemBioChem*, 2018, 19(14): 1471-1475.
- [20] Otwinowski Z, Minor W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol*, 1997, 276: 307-326.
- [21] Adams PD, Afonine PV, Bunkoczi G, et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2010, 66(2): 213-221.
- [22] Emsley P, Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2004, 60(12 Pt 1): 2126-2132.
- [23] Murshudov GN, Skubák P, Lebedev AA, et al. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2011, 67(4): 355-367.
- [24] Son HF, Cho IJ, Joo S, et al. Rational protein engineering of thermo-stable petase from *Ideonella sakaiensis* for highly efficient PET degradation. *ACS Catal*, 2019, 9(4): 3519-3526.
- [25] Ma Y, Yao MD, Li BZ, et al. Enhanced poly ethylene terephthalate hydrolase activity by protein engineering. *Engineering*, 2008, 4(6): 888-893.
- [26] Liu CC, Shi C, Zhu SJ, et al. Structural and functional characterization of polyethylene terephthalate hydrolase from *Ideonella sakaiensis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 508(1): 289-294.

(本文责编 郝丽芳)