

聚对苯二甲酸酯降解酶的分子改造技术进展研究

朱孟宇¹, 戈钧^{1,2,3*}

(1. 清华大学化学工程系 / 工业生物催化教育部重点实验室, 北京 100084; 2. 绿色生物制造全国重点实验室, 北京 100084; 3. 清华大学合成与系统生物学研究中心, 北京 100084)

摘要: 塑料污染已成为全球性的环境挑战, 其中, 聚对苯二甲酸乙二醇酯 (PET) 作为应用最广泛的合成塑料之一, 其高效降解技术的开发对推动塑料废弃物管理和资源化利用至关重要。近年来, 研究表明, 以 PET 降解酶为核心的生物催化降解策略可实现 PET 废弃物的闭环处理。因此, PET 降解酶的性能优化已成为该领域的研究重点。本文系统解析了 PET 降解酶与底物之间的相互作用机制, 在此基础上, 从定向进化、半理性设计、理性设计和机器学习驱动设计四个方面, 综述了 PET 降解酶的分子改造技术进展, 特别强调了机器学习在 PET 降解酶分子改造中的重要作用, 并分析了当前研究面临的重要挑战, 包括 PET 降解酶在低温条件下催化活性不足, 限制了其在堆肥等低温环境中的应用; PET 降解酶对高结晶度 PET 的解聚效率较低, 难以满足工业化降解需求。针对上述问题, 机器学习与酶工程深度融合是未来发展的重要趋势, 从而加速高效 PET 降解酶的开发, 突破生物降解技术的产业化瓶颈, 推动绿色循环经济的高质量发展。

关键词: PET; 生物降解; PET 降解酶; 定向进化; 理性设计; 机器学习

中图分类号: Q-1 **文献标识码:** A

Molecular Engineering of PET-Degrading Enzymes: Opportunities and Challenges

Zhu Mengyu¹, Ge Jun^{1,2,3*}

(1. Key Lab of Industrial Biocatalysis, Ministry of Education/Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 2. State Key Laboratory of Green Biomanufacturing, Beijing 100084, China; 3. Center for Synthetic and Systems Biology, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Plastic pollution has become a pressing global environmental challenge. Polyethylene terephthalate (PET), one of the most widely used synthetic polymers, represents a major contributor to this problem. The development of efficient PET degradation strategies is therefore critical for advancing waste management and resource recovery. Recent studies have demonstrated that biocatalytic approaches, centered on PET-degrading enzymes, can enable closed-loop recycling of PET. As a result, the optimization of PET-degrading enzymes has become a central focus of research in this field. The interaction mechanisms between PET-degrading enzymes and their substrates have been elucidated, providing the foundation for diverse strategies in molecular engineering. Advances have been achieved through directed evolution, semi-rational design, rational design, and more recently, machine-learning-driven approaches. Notably, machine learning has emerged as a transformative tool that accelerates the design of enzymes with enhanced catalytic performance. Despite these advances, major challenges remain. Current PET-degrading enzymes display insufficient activity

收稿日期: 2025-06-27; 修回日期: 2025-08-25

通讯作者: *戈钧, 清华大学化学工程系教授, 研究方向为酶催化与合成生物制造; E-mail: junge@mail.tsinghua.edu.cn

资助项目: 中国工程院咨询项目“我国化工新材料绿色低碳发展战略研究”(2024-XBZD-09); 国家重点研发计划项目(2023YFA0913600); 国家自然科学基金项目(22425803)

本刊网址: ssc.ae.engineering.org.cn

at low temperatures, limiting their utility in settings such as composting. Moreover, the depolymerization efficiency against highly crystalline PET remains low, hindering industrial-scale application. The convergence of machine learning and enzyme engineering is expected to be a key direction for overcoming these barriers, enabling the development of robust and efficient biocatalysts. Such progress would help break through the bottlenecks in the industrialization of PET biodegradation and promote the transition toward a sustainable circular economy.

Keywords: polyethylene terephthalate; biodegradation; PET-degrading enzymes; directed evolution; rational design; machine learning

一、前言

塑料作为20世纪最具变革性的合成材料之一,凭借其轻质耐用、成本低及可塑性强等特性,被广泛应用于食品包装、医疗器械和电子元件等领域,深刻重塑了现代社会的生产和消费模式。全球塑料年产量已超过 4×10^8 t^[1],预计到2040年将达到 6.7×10^8 t^[2]。与此同时,塑料聚合物稳定的共价键网络和疏水性表面使其极难被降解,由此带来了塑料污染问题。据统计,每年被丢弃的塑料高达 3×10^8 t。自1950年以来,环境中累积的塑料垃圾超过 5×10^9 t,主要以微塑料的形式存在,广泛地存在于海洋、土壤和空气中,而且已经渗入到了我们的日常生活中,给人类健康带来了严重的威胁^[3]。

聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)是全球范围内应用最广泛的塑料之一^[4]。它是由对苯二甲酸(TPA)和乙二醇(EG)聚合而成的热塑性聚酯,表现出优秀的机械和热性能,被广泛应用于包装瓶、机械设备和薄膜等领域,具有庞大的市场需求,约占塑料市场份额的10%^[5]。此外,PET的结构特征也决定了其具有较高的化学惰性和抗自然降解性,这给生态环境带来了巨大负担^[6,7]。因此,PET废弃物的处理至关重要。

目前,PET废弃物的处理方法主要有三种:填埋、焚烧和回收再利用。其中直接填埋和焚烧处理虽然操作简便,但在处理过程中会产生大量的有毒有害物质,造成二次污染。相比之下,回收再利用更为绿色环保。回收方法主要分为物理法、化学法和生物法。其中物理法回收面临原料适应性差、性能发生不可逆衰减和二次污染的风险;化学法回收成本较高,有经济性制约,还会出现能耗和排放问题。使用基于PET降解酶的生物法进行PET废弃物的回收,能够有效缓解上述问题。目前已经报道了多种可用于降解PET的生物酶,主要通过催化PET分子中酯键的水解实现解聚,包括脂肪酶(EC 3.1.1.3)、角质酶(EC 3.1.1.74)、羧酸酯酶(EC 3.1.1.1)和

芳香酯酶(EC 3.1.1.2)^[8,9]。这些酶能够将PET废弃物水解为小分子单体,进而用于重新合成PET或制备其他高附加值化学品,从而推动PET循环经济体系的构建,响应我国绿色可持续发展战略。因此,PET降解酶成为了PET闭环回收和高值化处理的关键“芯片”。

PET降解酶有望实现PET废弃物的原位降解和绿色回收,具有广阔的工业应用潜力。然而在PET降解酶的实际应用中,面临酶活力不足、降解不充分和酶易失活等问题,这制约了生物法在PET塑料降解回收领域的产业化应用。因此,酶分子的性能优化成为PET降解酶产业化的核心技术瓶颈与关键突破方向。本文聚焦PET降解酶的改造,系统综述PET降解酶的催化机理与酶工程改造策略,重点介绍近年来PET降解酶的改造方法。进而以PET降解酶为例,展望生物降解回收塑料技术的发展方向,并探讨该领域面临的挑战,为PET降解酶的分子改造及我国生物降解回收塑料领域的理论研究与产业化应用提供参考。

二、PET结构与酶解机制

(一) PET的结构概述

深入了解PET的分子结构是提升PET降解效率的重要基础。PET的合成主要经历了两个工艺阶段(见图1)^[10]:第一阶段,TPA与EG通过酯交换反应生成对苯二甲酸双羟乙酯(BHET);第二阶段,BHET单体及其低聚物通过缩聚反应形成线性聚合物。其中,酯键是PET生物解聚过程中酶催化水解的主要作用位点。因此,在PET生物降解过程中,BHET、TPA和EG可作为关键产物用于PET的循环合成。

根据不同的生产工艺,PET可形成具有不同摩尔质量及结晶度的材料,其结晶度通常在2%~40%,常被用作衡量其结构差异的关键指标^[11]。在PET的生物酶解过程中,温度是影响反应速率与降

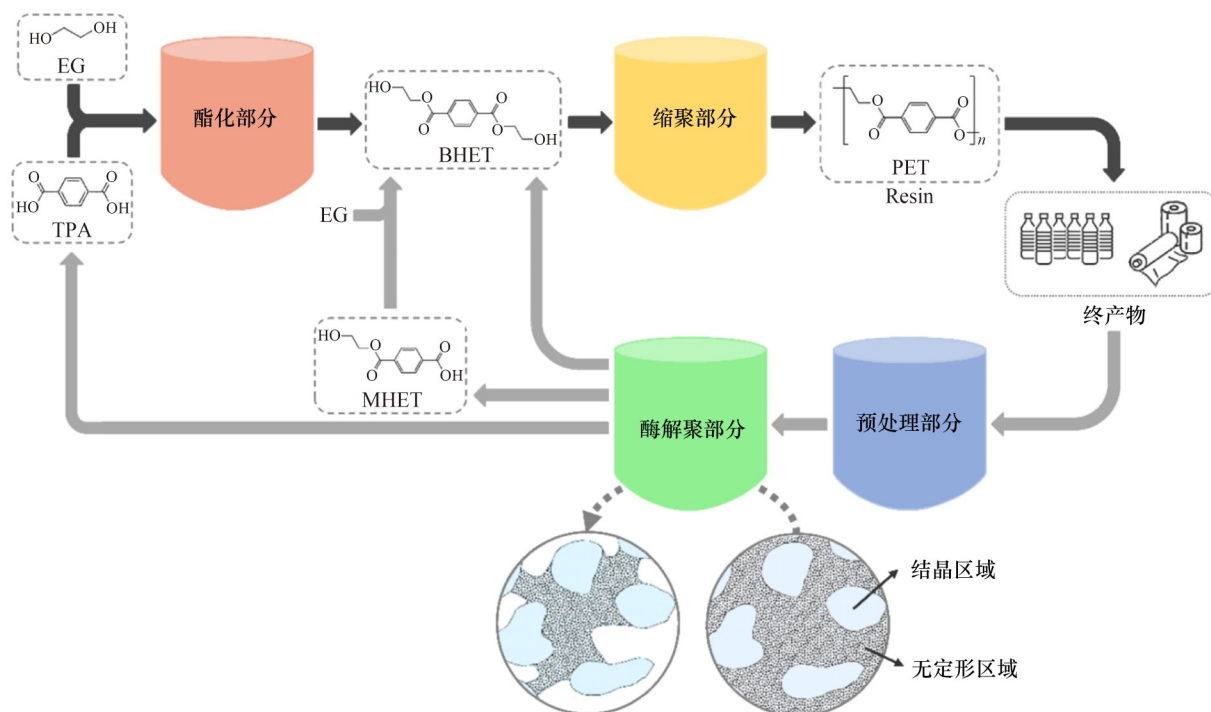


图1 PET合成、酶解聚和再合成过程的示意图

注: MHET为对苯二甲酸乙二醇酯; Resin为树脂。

解效率的关键因素。一方面,由于PET酶解主要发生在材料表面,温度过低会降低聚酯链迁移率,从而限制酶促反应速率;另一方面,若酶解温度过高(超过PET的玻璃化转化温度),则易诱导PET热结晶,且其结晶速率随温度升高而加快^[12],从而增加PET的降解难度。因此,需要设置合适的酶解温度,以平衡链迁移率和晶体的热诱导生成。针对上述问题,当前研究主要聚焦于以下技术路径。

在接近且略低于玻璃化转化温度(70℃)的条件下进行PET的酶解反应,可以在避免PET发生热诱导结晶的同时,提高酶促反应速率。然而,在接近70℃这个相对较高温度条件下进行酶解反应,需要解决酶热失活的问题。此外,尽管相对较高温度可以加速PET废弃物的解聚速率,但相应的高能耗在一定程度上限制了其工业化应用。因此,研究者同样关注PET降解酶在相对较低温度(30~50℃)下的应用,提升其催化活性,满足在堆肥条件下使用PET降解酶降解PET的需求。然而,在相对较低温度下,PET链迁移速率受限,导致底物可及性降低,使得生物酶解效率降低。随着人工智能(AI)技术的快速发展,以计算推理分析为核心的新方法正在突破传统的酶工程瓶颈,加速了酶进化景观

图的路径优化,使得PET生物解聚技术更加智能化和精准化。

(二) PET降解酶的催化机制

1. PET降解酶的分类与结构特征

PET降解酶主要分为常温酶和嗜热酶两大类。由于在高温下PET链迁移率高,更容易和酶接触,因此在各自最佳反应条件下,嗜热酶的降解效率通常高于常温酶。然而,从环境友好性和经济性的角度来看,常温酶反应条件温和、能耗较低,具有更广阔的工业应用前景。对常温酶进行优化改造,提高其在温和条件下的催化效率,从而促进PET废弃物的高效降解。来源于*Ideonella sakaiensis* 201-F6的IsPETase是常温酶代表,它能够在温和条件(30℃)下降解PET,在18h内生成0.3mmol降解产物^[12]。IsPETase凭借其温和高效的PET解聚能力而受到广泛关注。Lu等借助机器学习对IsPETase进行酶性改造,获得了一株在30~50℃之间表现出优秀催化性能的突变体FAST-PETase,其可以在一周内对51种未经处理的不同热成型产品实现完全降解,并开发出基于FAST-PETase的PET闭环回收方法,证明了其在工业规模上进行酶促塑料回收的可

行性^[13]。从枝叶堆肥中分离出的 LC-cutinase (LCC) 是典型的嗜热酶, 能够在 70 °C 下作用 48 h, 实现 95% 的 PET 解聚。Tournier 等人通过蛋白质工程改造 LCC, 获得突变体 ICCG, 其热稳定性和催化活性显著提升, 可在 72 °C、9.3 h 内实现 90% 的 PET 解聚^[14]。

截至目前, 研究人员已分离并鉴定出多种具有 PET 降解活性的酶 (见表 1)。PET 降解酶来源广泛, 主要包括细菌、真菌, 以及通过宏基因组学技术从未培养微生物中鉴定出的新酶。其中宏基因组挖掘技术在解析生态系统中微生物群落的生物及遗

传多样性方面展现出巨大潜力。尤其是借助 AI 技术, 可以构建高效的算法系统, 以深度挖掘宏基因组数据库, 并进行多组学功能注释分析。目前, 研究人员已从宏基因组中筛选并鉴定出多种具有显著 PET 降解活性的酶, 包括 Ple628^[15]、Ple629^[15]、LCC^[16]、PES-H1^[17]等。PET 降解酶来源的多样性表明, 微生物在提供适应不同环境条件及多种应用需求的生物催化剂方面具有巨大的潜力, 为 PET 的生物降解提供了丰富的酶学资源。

此外, 根据 PET 降解酶的核心序列特征, 可将其划分为 I 型、II 型 (含 IIa 和 IIb 亚型) 及特殊 I* 型

表 1 报道的部分 PET 降解酶相关信息

酶	来源	底物	反应条件	降解能力	参考文献
T/H	<i>Thermobifida fusca</i> DSM43793	PET 薄膜	55 °C	底物质量损失 54%	[18]
Tcur_1278	<i>Thermomonospora curvata</i> DSM43183	PET 纳米颗粒	50~55 °C	降解率为 3.3×10 ⁻³ /min	[19]
BSEstB	<i>Bacillus subtilis</i> 493-11	PET 纤维	30 °C	生成 1.1 μM MHET 和 1.9 μM TPA	[20]
IsPETase	<i>Ideonella sakaiensis</i> 201-F6	低结晶度 PET 薄膜 (结晶度为 1.9%)	30 °C	0.3 mmol 降解产物	[21]
ThermoPETase	由 IsPETase 进化而来	PET	30 °C	酶活性是 IsPETase 的 1.74 倍	[22]
DuraPETase	由 IsPETase 进化而来	PET 纳米塑料 (2 g/L)	37 °C	完全降解	[13]
SbPETase	<i>Schlegelella brevitalea</i> <i>sp.nov.</i>	PET 薄膜 (结晶度为 10%)	30 °C	表现出和 IsPETase 相近的降解活性	[23]
CALB	<i>Candida antarctica</i>	无定形 PET	37 °C	生成 BHET 产物	[24]
LCC	Metagenomic	PET 薄膜 (结晶度为 7%)	70 °C	底物质量损失 95%	[25]
ICCG	由 LCC 进化而来	PET 薄膜	72 °C	降解率为 90%	[14]
BhrPETase	<i>Bacterium</i> HR29	PET 粉末 (结晶度为 11%)	70 °C	生成 0.17 mmol/L BHET、3.66 mmol/L MHET 和 2.47 mmol/L TPA	[26]
TurboPETase	由 BhrPETase 进化而来	PcPET	65 °C	降解率为 98.25%	[27]
PET2	Metagenomic	PET 纳米颗粒	90 °C	降解率为 50%	[23]
PHL7 (PES-H1)	Metagenomic	PET 薄膜	70 °C	降解率接近 100%	[28]
DmPETase	<i>Deinococcus maricopensis</i>	PET (结晶度为 40%)	50 °C	生成 30.3 μg/mg 的可溶性产物	[29]
PES-H1	Metagenomic	PET 薄膜 (结晶度为 5%~7%)	70 °C	降解率接近 100%	[28]
FAST-PETase	由 IsPETase 进化而来	PET 瓶 (9 g)	50 °C	完全降解	[13]
Mipa-P	<i>M. pattaloongensis</i>	PET	40 °C	降解效果优于 IsPETase	[30]
Mipa-PM19	由 Mipa-P 进化而来	PET	50~70 °C	降解率高于 90%	[30]
Kubu-P	<i>K. buriramensis</i>	PET	70 °C	降解率约为 20%	[30]
Kubu-PM12	由 Kubu-P 进化而来	PET	70 °C	降解率超过 90%	[30]

三大类^[31]。三大类酶的特征差异如表2所示。

以典型IIb型 *Is*PETase (PDB: 6ANE)^[32]与I型 *Tf*Cut2 (PDB: 4CG1)^[33]的结构对比为例(见图2),二者均呈现典型的 α/β 水解酶折叠构象,并具有保守的催化三联体(Ser-Asp-His)和氧阴离子孔。具体而言:① *Is*PETase催化三联体为Ser¹³³-Asp¹⁷⁹-His²¹⁰,其具备DS1(Cys¹⁷⁶-Cys²¹²)和DS2(Cys²⁴⁶-Cys²⁶²)双二硫键系统^[34]。② *Tf*Cut2的催化三联体为Ser¹³⁰-Asp¹⁷⁶-His²⁰⁸,仅保留DS2(Cys²⁴¹-Cys²⁵⁹)^[30]。

值得注意的是,DS2作为此类酶的共有特征,通过连接C端与末端环区维持酶结构刚性;该二硫键与催化中心的空间距离(>15 Å)表明其不直接

参与催化过程^[30]。而DS1是 *Is*PETase所特有的、靠近催化中心(<5 Å)的二硫键;分子动力学模拟显示,其动态柔性直接影响催化三联体的构象稳定性。DS1的相关突变会使催化三联体不稳定,导致酶活性接近完全丧失^[29]。此外,经研究发现^[35],从 *Burkholderiales*中分离的 *Bb*PET酶虽与IIb型酶具有相似的PET降解活性,但其N端的143个氨基酸的延伸结构赋予其更高的热稳定性,使熔解温度(*T*_m)值提升了8.5 °C。这一发现为后续分子工程改造提供了新的结构模板。

2. PET降解酶的界面作用机制

PET降解酶通过表面吸附启动催化过程^[36],然

表2 基于核心序列特征的PET降解酶分类

分类	二硫键系统	延伸环结构	保守基序 Gly-x ₁ -Ser-x ₂ -Gly 中 x ₁ 残基
I型	仅C端DS1	缺失	组氨酸
II型	DS1+DS2双二硫键	存在	色氨酸
I*型	无二硫键	存在	色氨酸

注: DS1表示C端的二硫键; DS2表示其他位置的二硫键。

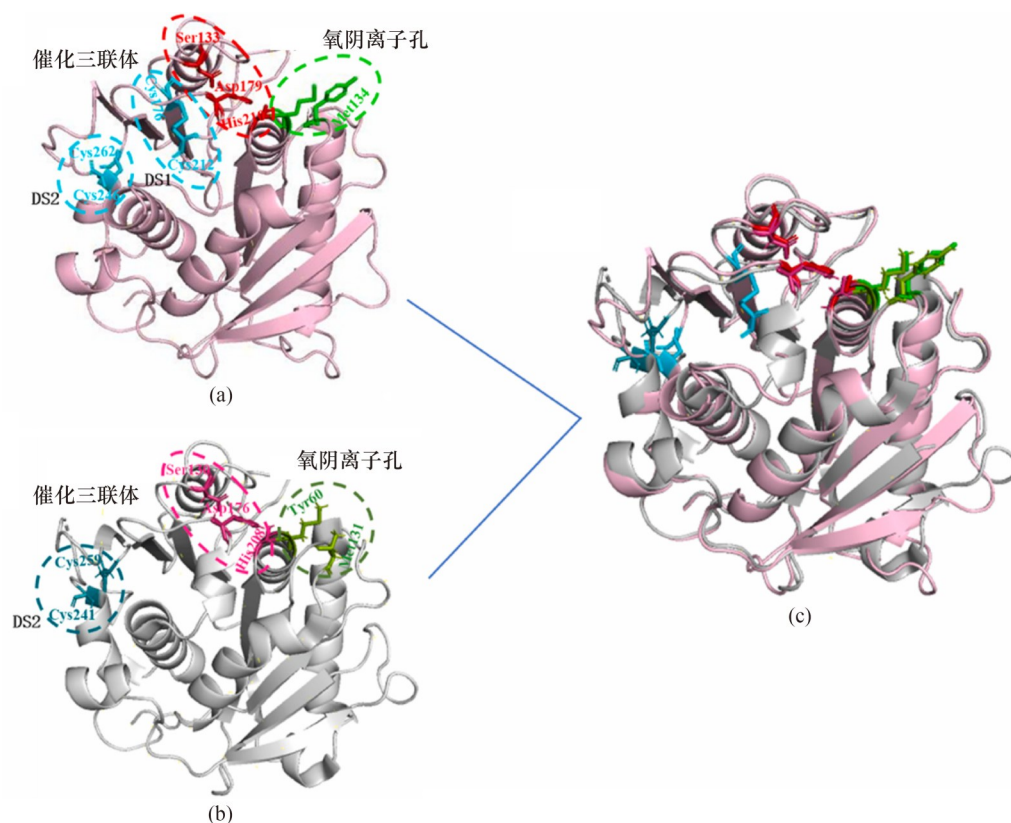


图2 *Is*PETase (PDB: 6ane)与 *Tf*Cut2 (PDB: 4cg1)三维结构对比

注: (a) *Is*PETase整体结构,主链以浅粉色显示,催化三联体(Ser¹³³-Asp¹⁷⁹-His²¹⁰,红色棒状模型)、氧阴离子孔(Tyr⁶⁰-Met¹³⁴,绿色棒状模型)及二硫键DS1(Cys¹⁷⁶-Cys²¹²,蓝色棒状模型)、DS2(Cys²⁴⁶-Cys²⁶²,蓝色棒状模型)空间分布特征;(b) *Tf*Cut2结构特征,主链以浅灰色显示,催化三联体(Ser¹³⁰-Asp¹⁷⁶-His²⁰⁸)、氧阴离子孔(Tyr⁶⁰-Met¹³⁴)及二硫键DS2(Cys²⁴¹-Cys²⁵⁹);(c)基于主链C α 原子的结构叠加(RMSD=1.8 Å),突显IIb型与I型酶在催化口袋的几何参数差异。

而PET的高疏水性（接触角 $\theta=85^\circ$ ）显著阻碍了酶与底物的结合^[37]。研究表明，PET降解酶缺乏特异性底物结合域，其初始吸附主要依赖催化中心附近的疏水区域^[38]。在 $IsPETase$ 中，活性位点附近的Trp¹⁵⁸呈现动态构象转换（A/B/C型），其中B型构象能够通过 π - π 堆叠作用稳定酶-PET之间的疏水结合，而在其他同源酶中，该位点通常固定于C型构象^[32]。 $IsPETase$ 所表现出的这一新型疏水结合模式不仅有助于其与PET的结合，还能够促进降解产物的有效释放，因而表现出较高的酶解效率。

3. PET降解酶的催化反应路径

PET降解酶大多属于 α/β 水解酶超家族，其催化中心由丝氨酸（Ser）-组氨酸（His）-天冬氨酸（Asp）组成，形成典型的亲核-组氨酸催化三联体。以 $IsPETase$ 为例，其PET降解过程遵循经典的酰基转移机制（见图3），包含酰基化与脱酰基化两个阶段。

（1）酰基化阶段。PET底物与酶结合后，连接苯环的羰基键定位于催化三联体的Ser附近，触发亲核反应。此时，His被Asp极化，形成电荷转移网络，并进一步极化Ser的羟基，使其对PET羰基键发起亲核攻击，从而形成酰基酶四面体中间体（该中间体由Met-Tyr形成的氧阴离子孔稳定）。随后，酰基酶四面体中间体分解，生成酰基-酶复合物并释放EG。研究人员借助量子力学/分子力学组合方法（QM/MM）发现 $IsPETase$ 和LCC具有统一的PET降解机制^[39]。

（2）脱酰基化阶段。水分子对酰基-酶复合物进行亲核攻击，形成另一个四面体中间体（由Met-Tyr稳定）。该中间体分解后，释放TPA，同时PET降解酶恢复游离状态，完成催化循环。在整个过程中，催化三联体中的Asp和His通过电荷中继网络介导质子转移，并激活Ser羟基^[40-43]。尽管PET降解酶的催化反应机制已基本阐明，但仍存在以下关键问题：①酶-底物分子相互作用机制不明。PET降解酶-PET底物复合物晶体结构难以被解析出来，导致两者之间的相互作用机制尚不明晰，这会限制以结构分析为导向的PET降解酶的进化研究。②高结晶区降解瓶颈。高结晶度PET因分子排列紧密，难以被酶降解，成为限制PET绿色循环经济产业化的主要瓶颈。目前，PET降解酶解聚高结晶区域的关键影响因素尚不明确，亟需深入研究。

③动态催化调控缺失。在PET降解酶的动态催化过程中，一些关键残基构象的变化机制尚未明晰，这限制了精准酶工程改造的可行性。

未来研究可以结合冷冻电镜技术（分辨率 $<2\text{ \AA}$ ）和QM/MM模拟，以系统揭示限速步骤的原子级作用机制，为理性设计高性能工程酶奠定理论基础。

三、PET降解酶分子改造技术进展

针对PET降解酶在工业应用中催化活力不足的问题，研究人员基于蛋白质工程策略，使用定向进化、半理性设计、理性设计和机器学习驱动设计进行PET酶分子改造，以提升其催化性能，从而推动基于生物酶法的PET高效回收与绿色循环利用。

（一）定向进化

1859年，达尔文便在《物种起源》中写道进化是生命的标志。1978年，Michael Smith首次提出定点突变的概念，即通过位点饱和和突变对蛋白质进行定向改造，从而开启了蛋白质定向进化的分子改造研究^[44]。但受限于当时基因工程技术的发展水平，直到20世纪90年代，Frances H. Arnold才将定向进化概念成功应用于实践，并取得了显著成效，从而推动了该领域的迅速发展。

定向进化是一种非理性酶进化方法，旨在模拟自然选择，通过基因诱变引入遗传多样性，并结合高通量筛选进行迭代循环，以筛选出具有特定功能的突变体（见图4）^[45]。随着基因工程技术的不断发展，定向进化逐渐与饱和突变、易错聚合酶链式反应（PCR）和DNA混编等方法相结合，有效推动了定向进化技术的实践和发展。定向进化的主要优势在于无需了解酶蛋白精确的结构-功能关系，即可实现对酶蛋白进行分子改造。然而，该方法也存在一定的局限性，例如：筛选工作量大、实验周期长、进化特异性低且易陷入局部最优解，这些问题限制了其在蛋白质工程中的广泛应用。针对这些问题，高通量筛选技术及自动化实验平台的开发，为定向进化的优化提供了新的方向，有望突破其应用瓶颈，进一步提升酶蛋白的改造效率。在PET降解酶的分子改造研究中，研究人员利用定向进化策略对 $IsPETase$ 进行分子改造，并开发了一种基于荧光检测的高通量筛选方法，显著加速了突变体筛选过

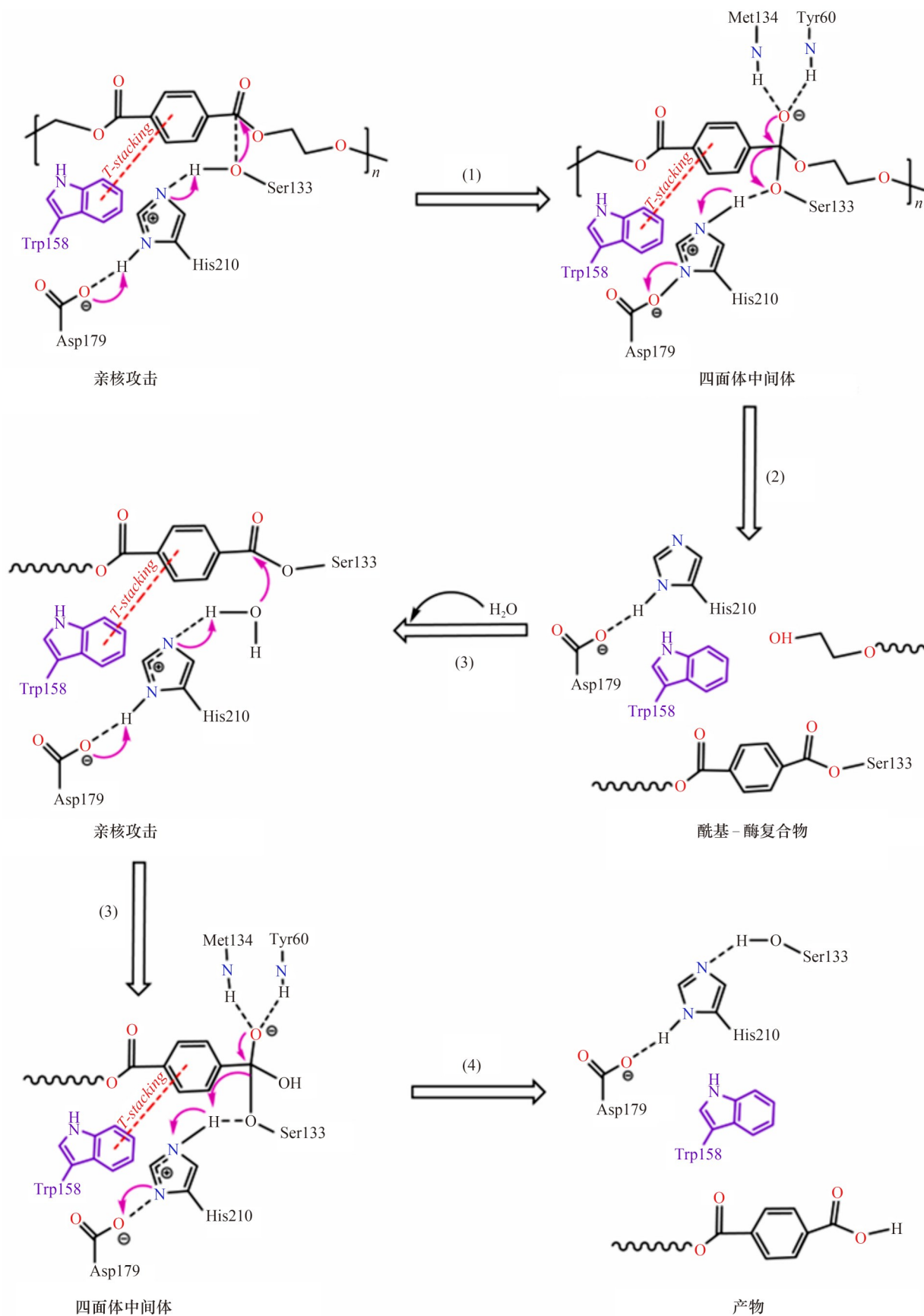


图3 PET降解酶催化反应的分子机制

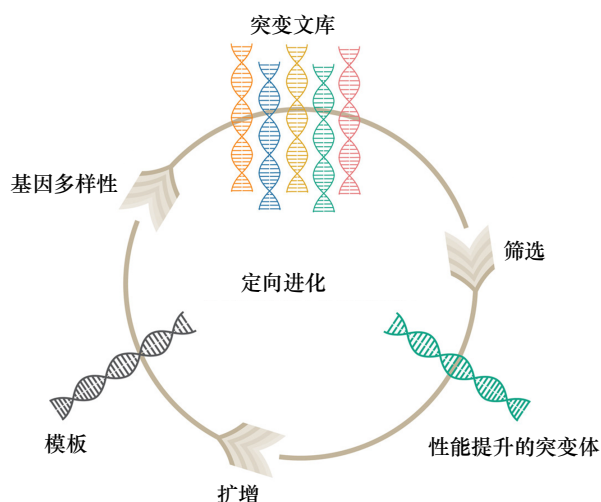


图4 定向进化的原理

程。最终获得的突变体 *DepoPETase* 在中温条件下表现出优异的 PET 降解性能^[46]。

随着 AI 技术的快速发展，定向进化在酶进化研究中的应用日益广泛。定向进化可生成大规模的突变体数据集，为机器学习模型的训练提供序列突变体-功能映射关系，即蛋白质适应度景观图。通过构建“定向进化-机器学习-湿实验验证”的智能迭代系统，可加速酶的优化进程，实现智能化酶进化^[47,48]。

尽管 PET 降解酶已被广泛研究，但由于 PET 具有较高的分子量和柔性，其与 PET 降解酶形成的复合物晶体结构解析仍然极为困难。此外，PET 分子与酶蛋白间存在复杂的疏水相互作用，进一步增加了解析酶-底物结合机制的难度。因此，不依赖精确结构信息的定向进化策略，为 PET 降解酶的分子改造提供了一种可行方案。研究人员使用定向进化，通过板清除测定筛选了 49 000 个分子进行克隆，最终获得了 *IsPETase* 的优势突变体 K95N/F201I。该突变体的 T_m 和最适温度 (T_{opt}) 分别提高了 5 °C 和 6 °C，显示出定向进化在 PET 降解酶改造中的应用潜力^[49]。此外，研究人员以 *IsPETase* 和 *SbPETase* 作为 DNA shuffling 的起始基因，并结合信号肽 *PeIB* 和大肠杆菌素释放蛋白 *Kil*，建立了高效的 PET 降解酶分泌系统，优化了高通量筛选流程。最终筛选出催化活性提升约三倍的突变体 *IsPETaseS139T*^[50]。

高通量筛选技术的成熟和发展显著推动了定向进化在 PET 降解酶分子改造领域的应用。此外，将

机器学习集成到定向进化的工作流程，可借助计算筛选和智能组合库的构建，提升突变体的筛选效率，从而加速酶分子改造的进程^[51-53]。

(二) 半理性设计

半理性设计是酶工程领域的重要策略，介于理性设计和定向进化之间。该方法结合结构生物学和计算生物学的预测，精准识别酶蛋白的关键靶点，并通过饱和突变在有限实验量下优化目标酶性能。相比于完全随机的定向进化，半理性设计既保留了理性设计的精准性与可控性，又兼具非理性设计的灵活性，从而实现更高效、精准且可控的 PET 降解酶性能优化。研究人员基于解析得到的 PES-H1 和 PES-H2 两种 PET 降解酶的晶体结构，借助分子动力学模拟和计算建模，对参与底物结合的关键残基进行饱和诱变；最终获得的最佳突变体 L92F/Q94Y 在 72 °C 下的催化活性提升了 3.4 倍^[54]。此外，研究人员通过分子对接和酶接触表面分析，确定了 PET 降解酶 LCC 中的 11 个关键位点，并在位点特异性饱和诱变后，筛选出最佳突变体 ICCG，其在生物反应器中 9.3 h 内高效解聚了 90% 的 PET^[44]。

(三) 理性设计

理性设计不同于基于随机突变的定向进化策略，其核心在于对酶结构-功能关系进行精准解析，并借助计算分析方法靶向识别酶的“进化热点”，实现对酶功能的精准“定制”^[55]。尽管定向进化在 PET 降解酶分子改造方面取得了重要进展，但其主要挑战在于建立高效的筛选平台，通过高通量筛选方法精准识别目标表型。然而筛选具备理想性能的酶蛋白通常需要构建大规模突变文库，伴随着繁重的工作量，而理性设计可在一定程度上缓解这一瓶颈，提高酶进化效率。

理性设计在很大程度上依赖于对酶构象的深入理解。随着 X 射线衍射和冷冻电镜等蛋白质结构解析技术的发展，越来越多的蛋白质结构被解析。然而，已解析的酶蛋白结构数量仍然有限，这限制了理性设计的进一步发展。近年来，蛋白质结构建模和计算机模拟技术的快速发展，为理性设计提供了强大助力^[56]。其中，Google DeepMind 团队开发的 AlphaFold 显著提升了蛋白质结构建模的准确性^[57]，即使对于同源序列较少的酶仍能展现出优秀的建模

效果，为基于结构分析的理性设计奠定了坚实基础。理性设计通过分析蛋白质的结构-功能关系，结合酶的催化机制，精准识别并优化关键活性位点，并利用定点突变的方法构建小而精的突变文库，从而显著降低酶库构建与筛选的工作量，提高改造效率。

在具体应用方面，研究人员利用同源建模方法获得 PET 降解酶 PET2 的结构，并深入研究其结构-功能关系及底物结合亲和力；通过引入表面正电荷以优化酶的结构稳定性和吸附性能，最终获得的最佳突变体 PET2-7M 在 68 °C 下的 PET 降解性能提升了 6.8 倍^[58]。酶-底物相互作用机制的解析也是理性设计的重要方向。研究人员基于 PET 晶体结构，通过动态分子对接技术模拟酶与底物的结合过程，系统分析其动态构象变化及结合亲和力，精准识别出 PET 降解酶中的关键突变位点，结合虚拟突变计算完成酶的优化改造，最终筛选得到的最佳突变体 LCC-A2 在 78 °C 下 3.3 h 内即可降解超过 90% 的 PET，表现出较高的水解效率^[59]。

尽管 PET 降解酶的理性设计具有高效性、可预测性和可控性等优势，但仍面临诸多挑战，包括酶结构的复杂性、底物识别机制的不确定性以及计算精度的局限性。这些因素使得理性设计在优化 PET 降解酶的稳定性、催化效率和底物适应性等方面仍存在困难。为了解决这些问题，未来的 PET 降解酶理性设计需要结合更先进的计算工具和实验策略。例如，整合分子动力学模拟、量子化学计算与 AI 算法，以提高突变预测的准确性；结合高通量筛选技术，加速突变体的筛选过程。通过多学科交叉融合，PET 降解酶的理性设计有望在环境保护和塑料污染治理方面发挥更为关键的作用。

(四) 机器学习驱动设计

酶蛋白的设计空间极为庞大且分布稀疏，在特定生物环境（如特定宿主、生理温度和 pH 条件）下，具备目标功能的序列仅占所有可能序列的极小比例。尽管定向进化在理论上能够遍历整个序列空间，但实际操作中受限于巨大的实验筛选工作量，导致难以全面实施。相比之下，理性设计依赖于对酶构象的深入理解及计算技术的发展，能够在一定程度上提高改造效率。然而，受限于现有计算方法的精度，理性设计可能存在预测偏差，或导致优化过程陷入适应度景观的局部最优解。因此，酶分子改造面临的重要挑战在于如何在适应度景观中有效缩小搜索范围，构建可计算、可验证的优化空间。

近年来，AI 尤其是机器学习的快速发展正在重塑酶分子改造策略。机器学习能够从大规模数据中提取关键特征，解析蛋白质序列与结构之间复杂的映射关系，从而构建适应度景观并显著提升酶分子改造的效率。此外，随着算法的优化、计算能力的提升和数据资源（测序、筛选和酶蛋白数据库）的不断完善，机器学习在酶蛋白设计中的应用潜力进一步增强。根据酶蛋白的表示方式、训练数据的类型及模型学习的概率分布，当前酶蛋白设计中的机器学习模型主要可分为以下三类^[60]（见图 5）：

1. 基于序列的模型

在纯序列模型中，通过训练大量的蛋白质序列，模型可以隐式学习序列模式，并在一定程度上反映生化约束，从而生成具有类似生物特性的序列。随着深度学习和自然语言处理技术的发展，蛋白质语言模型，如掩码语言建模^[61-64]、自回归建模^[65-67]和序列到序列^[68]等框架，被广泛应用于生成和优化新的酶蛋白序列，以提升对酶蛋白家族多样

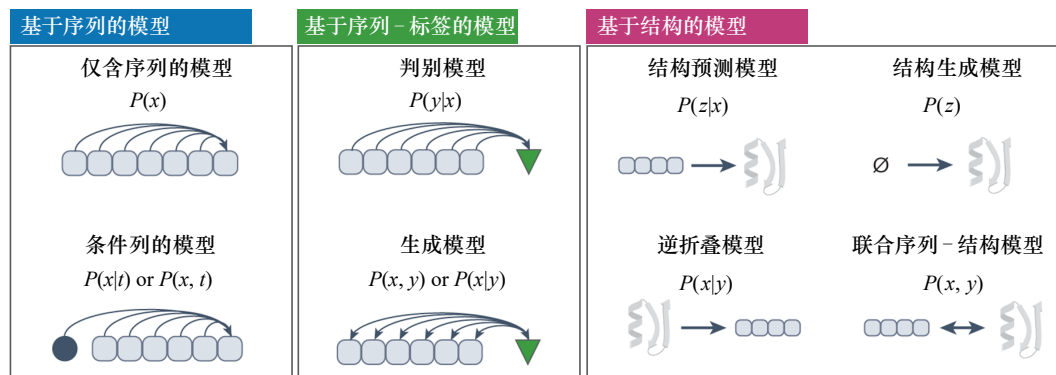


图5 酶蛋白设计模型的类型

性的建模能力。此外，通过在序列数据中引入基因注释、酶分类号等附加信息，可以进一步提升对生成序列特性的控制^[69]。

2. 基于序列-标签的模型

当目标酶蛋白的功能标签数据量充足时，可用于训练判别式监督学习模型，其中功能标签数据通常来源于高通量测序、定向进化实验及突变数据库等。为降低过拟合风险，通常采用轻量级模型^[52,70,71]，以确保监督学习模型能够高效预测候选突变体的表型，从而优化实验筛选流程。研究人员结合定向进化与理性设计策略，构建高质量序列-标签数据集，并基于该数据集训练了针对转氨酶催化活性预测的机器学习模型；该模型显著提高了针对转氨酶催化活性的预测准确性，从而辅助酶的性能改造^[72]。

3. 基于结构的模型。

基于结构的模型主要包括以下四种：① 结构预测模型。基于蛋白质一级序列 x 预测其对应的三维结构 z 。② 结构生成模型。采用生成对抗模型(GAN)^[73]、变分自编码器VAE^[74]或扩散模型^[75-77]直接学习三维结构的概率分布 $P(z)$ ，从头生成蛋白质结构。③ 逆折叠模型。学习序列-结构关系 $P(x|z)$ ，即通过已知三维结构 z 预测最适合的酶蛋白序列 x ，通常采用图神经网络(GNNs)对蛋白结构进行编码。④ 联合序列-结构模型。学习酶蛋白序列 x 与结构 z 之间的联合概率分布 $P(x,z)$ ，如蛋白质“幻觉”^[78-80]和蛋白质修补技术^[79]。

此外，结构生成模型通常与序列-结构模型结合，从而实现酶蛋白的从头生成。

机器学习的快速发展极大推动了酶蛋白的“智能”设计，尤其在塑料降解领域展现出巨大潜力。其中，在机器学习的助力下，PET降解酶的催化效率得到了显著提升，并且相关研究仍在持续推进。例如，传统蛋白质工程方法难以同时兼顾酶整体稳定性与酶活之间的进化权衡，而深度学习神经网络能够在全局范围内优化酶的功能。基于此，使用三维自监督卷积神经网络(CNN)学习氨基酸局部化学微环境，并将预测的稳定性适配概率分布映射到蛋白质的全序列结构中，最终获得了具有优秀PET降解性能的FAST-PETase，该酶能够在50℃条件下高效解聚商品化PET瓶^[13]。此外，通过联用Transformer模型和GRAPE计算策略，对来源于细菌HR29的水解酶BhrPETase进行“智能”重塑；

优化后的突变体TurboPETase能够在8h内完全解聚高底物负载(200 g·kg⁻¹)的PET废弃物。为进一步评估其工业应用潜力，该研究还将反应体系扩大至7.5 L反应器规模。在放大试验中，TurboPETase同样在8h内实现了约98%的解聚率，表明其具有高效的PET降解效率，展现出优秀的可扩展性与产业化前景^[27]。

总体而言，定向进化以模拟自然选择为基础，通过引入随机突变并结合高通量筛选，即使在不了解酶结构与功能之间精确关系的情况下，也能显著提升酶的性能；而半理性设计则在此基础上引入结构生物学和计算预测工具，聚焦关键氨基酸位点进行饱和突变，在保留一定随机性的同时显著提高了筛选效率。理性设计则依赖对酶构象变化与催化机制的深入理解，通过精准的定点突变实现对酶功能的“量身定制”。近年来，随着可用数据的积累与算法的发展，机器学习驱动的设计策略能够基于海量序列-功能数据，在广阔的适应度景观中高效预测优质突变组合，极大加速了酶改造的迭代速度。因此，将高通量筛选、结构预测与机器学习相结合，整合多种策略的优势，已成为PET降解酶等工业用酶改造的重要发展方向。通过合理联用不同策略，能够实现优势互补，显著提升酶的催化性能。如联合使用理性设计和机器学习方法，将IsPETase高效突变体FAST-PETase-N212A的催化活性进一步提升近1.5倍^[81]。

四、PET降解酶分子改造的发展建议

在全球绿色低碳循环经济的推动下，PET降解酶的分子改造成为解决塑料污染问题的关键技术突破口。然而，在实际应用中，该领域仍面临重要挑战：在温和条件下实现PET的高效解聚，以降低传统高温降解工艺的能耗和环境负担；提高酶对高结晶度PET的降解能力，以适应不同类型PET废弃物的回收需求。针对这些难题，未来研究需深度融合机器学习技术，优化PET降解酶的性能，从而加速PET生物降解技术的产业化进程。

(一) 机器学习驱动的高效PET降解酶设计

在堆肥等温和条件下降解PET废弃物，不仅符合绿色化学与循环经济理念，还能降低传统高温解

聚工艺对能源的依赖。然而，在低温条件下PET链迁移率下降，导致酶-底物结合效率较低，使得传统常温酶（如IsPETase）催化活性受限。另一方面，虽然有些PET降解酶（如ICCG）在相对较高温度下具有较高活性，但高温处理不仅能耗高，还会导致PET结晶度增加，反而增加酶解难度。因此，开发兼具高活性与低温适应性的PET降解酶具有重要意义。传统的酶定向进化策略多依赖于单一进化路径及大量实验试错，存在效率低、成本高等局限。相比之下，机器学习方法能够基于现有酶学数据库，智能构建酶的适应度景观，精准预测潜在的高效突变体，从而显著加速酶分子的优化过程。未来研究可进一步结合自动化实验平台，借助机器学习模型实现快速评估与迭代优化，提高低温高效PET降解酶的预测准确性。

尽管机器学习已在PET降解酶的优化上取得显著进展，但仍面临诸多挑战。一方面，可用于模型训练的酶工程数据规模有限，难以满足模型的学习需求。另一方面，现有数据集中往往缺乏负向突变样本，导致数据分布不均，可能引入预测偏差。此外，不同研究采用的PET降解酶活性测定方法存在差异，造成数据标准化与整合困难，进而影响机器学习的建模质量。

针对上述问题，未来研究可从实验操作与模型计算两方面协同推进。从实验操作角度来看，应建立统一、规范的PET降解酶酶学性质评价标准，主动构建包含正、负样本的平衡数据集，以支持更稳健的模型训练。同时，依托高通量筛选技术和自动化实验平台，加快高质量数据的积累，提高模型的训练精度。从模型计算角度来看，一方面，需要探索适用于小数据集的创新型机器学习算法，并结合迁移学习策略，将大型数据集中学到的知识迁移至小型数据集，以增强模型的预测能力；另一方面，机器学习可结合传统的计算机辅助酶进化方法，如联用分子模拟，对酶的稳定构象及罕见的催化构象进行采样，以提高模型预测的准确性与可靠性。

（二）高结晶度PET降解的酶工程策略

PET废弃物普遍含有大量的高结晶度区域，其表面结构致密且疏水性强，限制了与液相中PET降解酶的有效接触，显著降低了酶分子对PET表面反应位点的可及性^[12]。因此，提升PET降解酶对高结

晶度PET的解聚能力，是实现PET塑料绿色循环利用的关键技术突破口。该方向可以从两个方面展开：一是聚焦于PET降解酶，通过结构优化提升PET降解酶的催化性能；二是借助物理或化学方法对PET底物进行预处理，降低其结晶度，从而协同增强高结晶度PET废弃物的酶解效果。

在PET降解酶的结构优化方面，需要深入解析酶与PET底物的界面相互作用机制，围绕酶与底物的疏水结合、动态催化与特异性识别等方面对PET降解酶进行结构优化。

1. 疏水结合域的智能强化

PET的高度疏水性限制了PET降解酶的初始吸附能力。可利用深度学习模型（如3D-CNN）分析酶表面疏水斑块的分布模式，以指导突变体设计。例如，可利用迁移学习策略，将脂肪酶底物结合域的疏水特性迁移至PET降解酶，以增强其对高结晶PET的初始结合能力，提高酶-底物相互作用效率。

2. 基于动态催化机制的活性中心优化

采用QM/MM模拟解析PET链解聚的能量屏障，并借助生成式人工智能（如扩散模型）预测突变体，以优化局部链段柔性，提高降解效率。例如，在酶活性中心附近引入芳香族残基（如Trp/Tyr），利用 π - π 堆叠作用暂时性“软化”PET结晶区，提高底物可及性，从而增强PET降解酶的解聚能力。

3. 结晶区特异性识别模块开发

通过对比分析不同PET降解酶对高结晶PET表现出的降解差异，以识别驱动结晶区解聚的关键结构域（如 β -螺旋、疏水斑块）和功能热点（如 π - π 堆叠残基）。进一步结合GNNs（如ProteinMPNN）与结构预测工具（如AlphaFold），协同设计嵌合酶，以优化对高结晶PET的特异性识别能力，提高PET降解酶的催化降解效率。

值得注意的是，在PET降解酶结构优化的基础上，联用物理或化学方法对PET底物进行预处理以降低其结晶度，可显著提升对高结晶度PET废弃物的酶解效率。研究表明，将PET材料研磨至1 mm粒径可显著降低其结晶度，并使酶促产物TPA的浓度提高16.1倍^[82]；室温碱处理也能有效降低PET结晶度并改善酶的可及性，从而使酶解产物浓度提升约10倍^[83]。

综上，未来PET降解酶的分子改造应聚焦两个

核心技术难题：一是提升温和条件下的水解效率，二是突破对高结晶度PET的降解瓶颈。针对前者，需建立统一的酶学评价标准，构建全面的涵盖正、负样本的数据集，并依托高通量筛选平台扩大数据规模，为机器学习提供高质量训练样本。在此基础上，探索适用于小样本条件的创新算法与迁移学习策略，并辅以分子模拟与传统计算设计方法，以提升对高活性、低温适应性突变体的预测与筛选效率。对于高结晶度PET的降解难题，应从酶与底物界面吸附到动态解聚全过程入手，借助深度学习优化疏水结合域设计，结合QM/MM模拟与生成式人工智能优化解聚路径，并运用GNNs等工具构建可特异性识别高结晶区的功能模块，从而显著提高PET降解酶在高结晶PET降解中的催化性能。

借助分子改造提升PET降解酶的降解效率是推动其产业化应用的关键路径。在此基础上，还需着力降低酶的使用成本，如提升PET降解酶在异源宿主中的表达量、实现酶的固定化与循环使用，加快PET废弃物的生物降解与绿色循环利用进程。目前，PET瓶及制品主要依赖物理方法进行回收，但该方法涉及切断、粉碎和加热熔化等加工过程，易造成再生PET材料性能下降，杂质残留难以清除等问题，属于降级利用。相比之下，基于PET降解酶的生物回收法能够将PET解聚为单体小分子，这些单体可以重新聚合成高性能的PET制品，实现闭环循环。发展并推广基于PET降解酶的生物回收技术，将显著提升PET废弃物的循环利用效率，为构建塑料可持续治理体系提供关键技术支撑。

利益冲突声明

本文作者在此声明不存在任何利益冲突或财务冲突。

Received date: June 27, 2025; **Revised date:** August 25, 2025

Corresponding author: Ge Jun is a professor from Department of Chemical Engineering, Tsinghua University. His major research fields include enzyme catalysis and synthetic biology. E-mail: junge@mail.tsinghua.edu.cn

Funding project: Chinese Academy of Engineering project “Research on the Green and Low Carbon Development Strategy of New Chemical Materials in China” (2024-XBZD-09); National Key Research and Development Program of China (2023YFA0913600); The National Natural Science Foundation of China Project (22425803)

参考文献

[1] Cowger W, Willis K A, Bullock S, et al. Global producer responsi-

- bility for plastic pollution [J]. *Science Advances*, 2024, 10(17): eadj8275.
- [2] He Y H, Deng X L, Jiang L, et al. Current advances, challenges and strategies for enhancing the biodegradation of plastic waste [J]. *Science of the Total Environment*, 2024, 906: 167850.
- [3] Marfella R, Prattichizzo F, Sardu C, et al. Microplastics and nanoplastics in atheromas and cardiovascular events [J]. *New England Journal of Medicine*, 2024, 390(10): 900–910.
- [4] Austin H P, Allen M D, Donohoe B S, et al. Characterization and engineering of a plastic-degrading aromatic polyesterase [J]. *PNAS*, 2018, 115(19): E4350–E4357.
- [5] Melchor-Martínez E M, Macías-Garbett R, Alvarado-Ramírez L, et al. Towards a circular economy of plastics: An evaluation of the systematic transition to a new generation of bioplastics [J]. *Polymers*, 2022, 14(6): 1203.
- [6] Carter L M, MacFarlane C E, Karlock S P, et al. Increased cytoplasmic expression of PETase enzymes in *E. coli* [J]. *Microbial Cell Factories*, 2024, 23(1): 319.
- [7] Geyer R, Jambeck J R, Law K L. Production, use, and fate of all plastics ever made [J]. *Science Advances*, 2017, 3(7): e1700782.
- [8] 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.
- [9] Gao R, Pan H J, Lian J Z. Recent advances in the discovery, characterization, and engineering of poly(ethylene terephthalate) (PET) hydrolases [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2021, 150: 109868.
- [10] Carniel A, de Abreu Waldow V, de Castro A M. A comprehensive and critical review on key elements to implement enzymatic PET depolymerization for recycling purposes [J]. *Biotechnology Advances*, 2021, 52: 107811.
- [11] Maurya A, Bhattacharya A, Khare S K. Enzymatic remediation of polyethylene terephthalate (PET)—Based polymers for effective management of plastic wastes: An overview [J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 602325.
- [12] Thomsen T B, Almdal K, Meyer A S. Significance of poly(ethylene terephthalate) (PET) substrate crystallinity on enzymatic degradation [J]. *New Biotechnology*, 2023, 78: 162–172.
- [13] Lu H Y, Diaz D J, Czarnecki N J, et al. Machine learning-aided engineering of hydrolases for PET depolymerization [J]. *Nature*, 2022, 604(7907): 662–667.
- [14] Tournier V, Topham C M, Gilles A, et al. An engineered PET depolymerase to break down and recycle plastic bottles [J]. *Nature*, 2020, 580(7802): 216–219.
- [15] Meyer Cifuentes I E, Wu P, Zhao Y P, et al. Molecular and biochemical differences of the tandem and cold-adapted PET hydrolases Ple628 and Ple629, isolated from a marine microbial consortium [J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022, 10: 930140.
- [16] Sulaiman S, Yamato S, Kanaya E, et al. Isolation of a novel cutinase homolog with polyethylene terephthalate-degrading activity from leaf-branch compost by using a metagenomic approach [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(5): 1556–1562.

- [17] Zimmermann W, Wei R, Hille P, et al. New polypeptides having a polyester degrading activity and uses thereof: EP3517608A1 [P/OL]. 2019-07-31[2025-06-10]. <https://xueshu.baidu.com/user-center/paper/show?paperid=144j0eb02w5p0gd0594q0jc0gc327086>.
- [18] Müller R J, Schrader H, Profe J, et al. Enzymatic degradation of poly(ethylene terephthalate): Rapid hydrolyse using a hydrolase from *T. fusca* [J]. *Macromolecular Rapid Communications*, 2005, 26(17): 1400–1405.
- [19] Chertkov O, Sikorski J, Nolan M, et al. Complete genome sequence of *Thermomonospora curvata* type strain (B9) [J]. *Standards in Genomic Sciences*, 2011, 4(1): 13–22.
- [20] Ribitsch D, Heumann S, Trotscha E, et al. Hydrolysis of polyethyleneterephthalate by p-nitrobenzylesterase from *Bacillus subtilis* [J]. *Biotechnology Progress*, 2011, 27(4): 951–960.
- [21] Yoshida A, Okutsu I, Hamanaka I. Endoscopic tarsal tunnel syndrome surgery using the Universal Subcutaneous Endoscope system [J]. *Asia-Pacific Journal of Sports Medicine, Arthroscopy, Rehabilitation and Technology*, 2016, 3: 1–5.
- [22] Son H, Cho I J, Joo S, et al. Rational protein engineering of thermo-stable PETase from *ideonella sakaiensis* for highly efficient PET degradation [J]. *ACS Catalysis*, 2019, 9(4): 3519–3526.
- [23] Danso D, Schmeisser C, Chow J, et al. New insights into the function and global distribution of polyethylene terephthalate (PET)-degrading bacteria and enzymes in marine and terrestrial metagenomes [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(8): e02773–17.
- [24] de Castro A M, Carniel A. A novel process for poly(ethylene terephthalate) depolymerization *via* enzyme-catalyzed glycolysis [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2017, 124: 64–68.
- [25] Shirke A N, White C, Englaender J A, et al. Stabilizing leaf and branch compost cutinase (LCC) with glycosylation: Mechanism and effect on PET hydrolysis [J]. *Biochemistry*, 2018, 57(7): 1190–1200.
- [26] Xi X X, Ni K F, Hao H L, et al. Secretory expression in *Bacillus subtilis* and biochemical characterization of a highly thermostable polyethylene terephthalate hydrolase from bacterium HR29 [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2021, 143: 109715.
- [27] Cui Y L, Chen Y C, Sun J Y, et al. Computational redesign of a hydrolase for nearly complete PET depolymerization at industrially relevant high-solids loading [J]. *Nature Communications*, 2024, 15: 1417.
- [28] Sonnendecker C, Oeser J, Richter P K, et al. Low carbon footprint recycling of post-consumer PET plastic with a metagenomic polyester hydrolase [J]. *ChemSusChem*, 2022, 15(9): e202101062.
- [29] Makryniotis K, Nikolaivits E, Gkountela C, et al. Discovery of a polyesterase from *Deinococcus maricopensis* and comparison to the benchmark LCC^{CCG} suggests high potential for semi-crystalline post-consumer PET degradation [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2023, 455: 131574.
- [30] Seo H, Hong H, Park J, et al. Landscape profiling of PET depolymerases using a natural sequence cluster framework [J]. *Science*, 2025, 387(6729): eadp5637.
- [31] Tournier V, Duquesne S, Guillaumot F, et al. Enzymes' power for plastics degradation [J]. *Chemical Reviews*, 2023, 123(9): 5612–5701.
- [32] Fecker T, Galaz-Davison P, Engelberger F, et al. Active site flexibility as a hallmark for efficient PET degradation by *I. sakaiensis* PETase [J]. *Biophysical Journal*, 2018, 114(6): 1302–1312.
- [33] Roth C, Wei R, Oeser T, et al. Structural and functional studies on a thermostable polyethylene terephthalate degrading hydrolase from *Thermobifida fusca* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(18): 7815–7823.
- [34] Qiu J R, Chen Y X, Zhang L Q, et al. A comprehensive review on enzymatic biodegradation of polyethylene terephthalate [J]. *Environmental Research*, 2024, 240: 117427.
- [35] Sagong H Y, Kim S, Lee D, et al. Structural and functional characterization of an auxiliary domain-containing PET hydrolase from *Burkholderiales* bacterium [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 429: 128267.
- [36] Wei R, Oeser T, Barth M, et al. Turbidimetric analysis of the enzymatic hydrolysis of polyethylene terephthalate nanoparticles [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2014, 103: 72–78.
- [37] Araújo R, Silva C, O'Neill A, et al. Tailoring cutinase activity towards polyethylene terephthalate and polyamide 6, 6 fibers [J]. *Journal of Biotechnology*, 2007, 128(4): 849–857.
- [38] Wei R, Oeser T, Zimmermann W. Synthetic polyester-hydrolyzing enzymes from thermophilic actinomycetes [J]. *Advances in Applied Microbiology*, 2014, 89: 267–305.
- [39] Zheng M N, Li Y W, Dong W L, et al. Depolymerase-catalyzed polyethylene terephthalate hydrolysis: A unified mechanism revealed by quantum mechanics/molecular mechanics analysis [J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2022, 10(22): 7341–7348.
- [40] Joo S, Cho I J, Seo H, et al. Structural insight into molecular mechanism of poly(ethylene terephthalate) degradation [J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 382.
- [41] Shi D D, Arnaut O, Bi W L, et al. Severe radiation necrosis refractory to surgical resection in patients with melanoma and brain metastases managed with ipilimumab/nivolumab and brain-directed stereotactic radiation therapy [J]. *World Neurosurgery*, 2020, 139: 226–231.
- [42] Buller A R, Townsend C A. Intrinsic evolutionary constraints on protease structure, enzyme acylation, and the identity of the catalytic triad [J]. *PNAS*, 2013, 110(8): E653–E661.
- [43] Han X, Liu W D, Huang J W, et al. Structural insight into catalytic mechanism of PET hydrolase [J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 2106.
- [44] Hutchison C A, Phillips S, Edgell M H, et al. Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1978, 253(18): 6551–6560.
- [45] Trevizano L M, Venter R Z, de Rezende S T, et al. Thermostability improvement of *Orpinomyces* sp. xylanase by directed evolution [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2012, 81: 12–18.
- [46] Shi L X, Liu P, Tan Z J, et al. Complete depolymerization of PET wastes by an evolved PET hydrolase from directed evolution [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2023, 62(14): e202218390.
- [47] Jiang K Y, Yan Z Q, Di Bernardo M, et al. Rapid in silico directed

- evolution by a protein language model with EVOLVEpro [J]. *Science*, 2025, 387(6732): eadr6006.
- [48] Chen L, Zhang Z H, Li Z H, et al. Learning protein fitness landscapes with deep mutational scanning data from multiple sources [J]. *Cell Systems*, 2023, 14(8): 706–721.
- [49] Brott S, Pfaff L, Schuricht J, et al. Engineering and evaluation of thermostable IsPETase variants for PET degradation [J]. *Engineering in Life Sciences*, 2022, 22(3/4): 192–203.
- [50] Wang X T, Song C Y, Qi Q S, et al. Biochemical characterization of a polyethylene terephthalate hydrolase and design of high-throughput screening for its directed evolution [J]. *Engineering Microbiology*, 2022, 2(2): 100020.
- [51] Wittmann B J, Johnston K E, Wu Z, et al. Advances in machine learning for directed evolution [J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2021, 69: 11–18.
- [52] Yang K K, Wu Z, Arnold F H. Machine-learning-guided directed evolution for protein engineering [J]. *Nature Methods*, 2019, 16(8): 687–694.
- [53] Wang Y J, Xue P, Cao M F, et al. Directed evolution: Methodologies and applications [J]. *Chemical Reviews*, 2021, 121(20): 12384–12444.
- [54] Pfaff L, Gao J, Li Z S, et al. Multiple substrate binding mode-guided engineering of a thermophilic PET hydrolase [J]. *ACS Catalysis*, 2022, 12(15): 9790–9800.
- [55] Nezhad N G, Raja Noor Zaliha Raja Abd Rahman, Normi Y M, et al. Recent advances in simultaneous thermostability-activity improvement of industrial enzymes through structure modification [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 232: 123440.
- [56] Damborsky J, Brezovsky J. Computational tools for designing and engineering enzymes [J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2014, 19: 8–16.
- [57] Abramson J, Adler J, Dunger J, et al. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3 [J]. *Nature*, 2024, 630(8016): 493–500.
- [58] Nakamura A, Kobayashi N, Koga N, et al. Positive charge introduction on the surface of thermostabilized PET hydrolase facilitates PET binding and degradation [J]. *ACS Catalysis*, 2021, 11(14): 8550–8564.
- [59] Zheng Y, Li Q B, Liu P, et al. Dynamic docking-assisted engineering of hydrolases for efficient PET depolymerization [J]. *ACS Catalysis*, 2024, 14(5): 3627–3639.
- [60] Notin P, Rollins N, Gal Y, et al. Machine learning for functional protein design [J]. *Nature Biotechnology*, 2024, 42(2): 216–228.
- [61] Meier J, Rao R, Verkuil R, et al. Language models enable zero-shot prediction of the effects of mutations on protein function [R]. New York: The 35th International Conference on Neural Information Processing Systems, 2021.
- [62] Lin Z M, Akin H, Rao R, et al. Evolutionary-scale prediction of atomic-level protein structure with a language model [J]. *Science*, 2023, 379(6637): 1123–1130.
- [63] Rives A, Meier J, Sercu T, et al. Biological structure and function emerge from scaling unsupervised learning to 250 million protein sequences [J]. *PNAS*, 2021, 118(15): e2016239118.
- [64] Yang K K, Fusi N, Lu A X. Convolutions are competitive with transformers for protein sequence pretraining [J]. *Cell Systems*, 2024, 15(3): 286–294.e2.
- [65] Madani A, Krause B, Greene E R, et al. Large language models generate functional protein sequences across diverse families [J]. *Nature Biotechnology*, 2023, 41(8): 1099–1106.
- [66] Ferruz N, Schmidt S, Höcker B. ProtGPT2 is a deep unsupervised language model for protein design [J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 4348.
- [67] Alley E C, Khimulya G, Biswas S, et al. Unified rational protein engineering with sequence-based deep representation learning [J]. *Nature Methods*, 2019, 16(12): 1315–1322.
- [68] Elnaggar A, Heinzinger M, Dallago C, et al. ProtTrans: Toward understanding the language of life through self-supervised learning [J]. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 2022, 44(10): 7112–7127.
- [69] Brandes N, Ofer D, Peleg Y, et al. ProteinBERT: A universal deep-learning model of protein sequence and function [J]. *Bioinformatics*, 2022, 38(8): 2102–2110.
- [70] Heinzinger M, Elnaggar A, Wang Y, et al. Modeling aspects of the language of life through transfer-learning protein sequences [J]. *BMC Bioinformatics*, 2019, 20(1): 723.
- [71] Stärk H, Dallago C, Heinzinger M, et al. Light attention predicts protein location from the language of life [J]. *Bioinformatics Advances*, 2021, 1(1): vbab035.
- [72] Menke M J, Ao Y F, Bornscheuer U T. Practical machine learning-assisted design protocol for protein engineering: Transaminase engineering for the conversion of bulky substrates [J]. *ACS Catalysis*, 2024, 14(9): 6462–6469.
- [73] Anand N, Eguchi R, Huang P S. Fully differentiable full-atom protein back-bone generation [R]. New Orleans: The International Conference on Learning Representations (ICLR) Workshops: DeepGenStruct, 2019.
- [74] Eguchi R R, Choe C A, Huang P S. Ig-VAE: Generative modeling of protein structure by direct 3D coordinate generation [J]. *PLoS Computational Biology*, 2022, 18(6): e1010271.
- [75] Watson J L, Juergens D, Bennett N R, et al. *De novo* design of protein structure and function with RFdiffusion [J]. *Nature*, 2023, 620(7976): 1089–1100.
- [76] Ingraham J B, Baranov M, Costello Z, et al. Illuminating protein space with a programmable generative model [J]. *Nature*, 2023, 623(7989): 1070–1078.
- [77] Wu K E, Yang K K, van den Berg R, et al. Protein structure generation *via* folding diffusion [J]. *Nature Communications*, 2024, 15: 1059.
- [78] Anishchenko I, Pellock S J, Chidyausiku T M, et al. *De novo* protein design by deep network hallucination [J]. *Nature*, 2021, 600(7889): 547–552.
- [79] Wang J, Lisanza S, Juergens D, et al. Scaffolding protein functional sites using deep learning [J]. *Science*, 2022, 377(6604): 387–394.
- [80] Wicky B I M, Milles L F, Courbet A, et al. Hallucinating symmetric protein assemblies [J]. *Science*, 2022, 378(6615): 56–61.
- [81] Li X, Huang J W, Ning Z Y, et al. Combined approaches to en-

- hance the *Pichia pastoris*-expressed PET hydrolase [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 320: 145862.
- [82] Kosiorowska K E, Moreno A D, Iglesias R, et al. Streamlining biological recycling of poly(ethylene terephthalate) via pre-treatment methods [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2024, 193: 105842.
- [83] Giraldo-Narcizo S, Guenani N, Sánchez-Pérez A M, et al. Accelerated polyethylene terephthalate (PET) enzymatic degradation by room temperature alkali pre-treatment for reduced polymer crystallinity [J]. ChemBioChem, 2023, 24(1): e202200503.