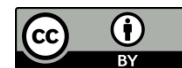


Обзорная статья

УДК 67.08, 504.054, 579.26

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-2-238-253>



Перспективы переработки пластиковых отходов на основе полиэтиленгликольтерефталата с применением живых систем (обзор)

Денис Владимирович Белов, Сергей Николаевич Беляев

Институт прикладной физики РАН,

г. Нижний Новгород, Российская Федерация

Автор, ответственный за переписку: Белов Денис Владимирович, belov.denbel2013@yandex.ru

Аннотация. В последние годы биodeградация полиэтиленгликольтерефталата стала играть важную роль в решении проблемы загрязнения окружающей среды пластиковыми отходами. В данном обзоре обобщена новейшая информация о различных микроорганизмах, способных к биodeградации полиэтиленгликольтерефталата. Подробно изучены механизмы ферментативных реакций гидролиза полиэтиленгликольтерефталата и строение ферментов биodeградации. В обзоре рассмотрены существующие проблемы промышленной реализации метода биodeградации полиэтиленгликольтерефталата и высказаны некоторые соображения по продвижению соответствующих технологий утилизации отходов на основе полиэтиленгликольтерефталата. Биodeградация является привлекательным современным методом экологически чистого и эффективного удаления отходов пластмасс. Актуальность данной темы объясняется тем, что еще не разработаны технологии, позволяющие в коммерческих масштабах утилизировать полиэтиленгликольтерефталат путем биodeградации. В этой области проводится большое количество исследований, очевидно, что разработка рентабельных и высоко технологичных процессов биodeградации – это вопрос времени. Будущие достижения в этой области будут основаны на стратегиях синтетической биологии и метаболической инженерии. Их целью станет конструирование искусственных микробных консорциумов и модифицирование микробных гидролаз полиэтиленгликольтерефталата, нацеленных на более полную биodeградацию и биоконверсию полиэтиленгликольтерефталата и других сложных полимеров.

Ключевые слова: полиэтиленгликольтерефталат, переработка отходов, биodeградация, *Thermobifida fusca*, гидролаза, кутиназа, *Ideonella sakaiensis*, биоремедиация, терефталевая кислота, этиленгликоль, ПЭТаза (PETase), МГЭТаза (MHETase), рециклинг

Для цитирования: Белов Д. В., Беляев С. Н. Перспективы переработки пластиковых отходов на основе полиэтиленгликольтерефталата с применением живых систем (обзор) // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2022. Т. 12. N 2. С. 238–253. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-2-238-253>.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Review article

Prospects for recycling plastic waste based on polyethylene glycol terephthalate using living systems (a review)

Denis V. Belov, Sergey N. Belyaev

Institute of Applied Physics of the RAS,

Nizhny Novgorod, Russian Federation

Corresponding author: Denis V. Belov, belov.denbel2013@yandex.ru

Abstract. In recent years, the biodegradation of polyethylene glycol terephthalate has become an important direction in solving the problem of environmental pollution with plastic waste. This review generalizes the latest data on various microorganisms capable of biodegrading polyethylene glycol terephthalate. The mechanisms of enzymatic reactions of polyethylene glycol terephthalate hydrolysis and the structure of bio-

degradation enzymes are elucidated. Challenges to the industrial implementation of polyethylene glycol terephthalate biodegradation are considered along with proposals on the promotion of appropriate waste disposal technologies. Biodegradation comprises a promising method for the environmentally friendly and efficient disposal of waste plastics. So far, no commercial biodegradation technologies for recycling polyethylene glycol terephthalate have been developed. This area is attracting increased research attention, which is expected to result in the appearance of cost-effective and high-tech biodegradation processes. Future advances are likely to be based on synthetic biology and metabolic engineering strategies capable of constructing artificial microbial consortia and modifying microbial polyethylene glycol terephthalate hydrolases aimed at a more complete biodegradation and bioconversion of polyethylene glycol terephthalate and other complex polymers.

Keywords: polyethylene glycol terephthalate, waste disposal, biodegradation, *Thermobifida fusca*, hydrolase, cutinase, *Ideonella sakaiensis*, bioremediation, terephthalic acid, ethylene glycol, PETase, MHETase, recycling

For citation: Belov D. V., Belyaev S. N. Prospects for recycling plastic waste based on polyethylene glycol terephthalate using living systems (a review). *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2022;12(2):238-253. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-2-238-253>.

ВВЕДЕНИЕ

В современном мире широко распространены синтетические полимеры и материалы на их основе. С точки зрения экологии они представляют глобальную проблему, являясь самыми многочисленными загрязнителями окружающей среды. Большинство полимеров и пластмасс, в частности полиэтиленгликольтерефталат (ПЭТ), представляют собой цунамический и постоянно растущий риск для фауны и флоры как на суше, так и в воде. Основной проблемой является устойчивость полимерных материалов к деградации и естественному разложению и, как следствие, постоянно нарастающая экологическая нагрузка на все экосистемы. Например, огромную проблему представляет загрязнение пластмассами морской среды. Находясь в морской среде, пластмассы быстро колонизируются разнообразными микроорганизмами, называемыми пластисферой. Как и микроорганизмы биопленок, члены пластисферы выполняют множество различных функций, в том числе участвуют в биоразложении пластика. Однако в естественной среде этот процесс длителен.

Сейчас, как никогда, можно наблюдать постоянно возрастающее давление антропогенного воздействия человека на природу. К настоящему времени на планете скопилось около 6,5 млрд тонн различных пластиковых отходов. При сохранении современных тенденций производства пластика и обращения с переработанными пластиковыми отходами уже к 2050 году это количество возрастет до 12 млрд тонн¹.

Производство пластмасс стало незаменимым для современного общества благодаря их невероятной универсальности в сочетании с низкими производственными затратами. Одновременно с

этим менее чем за сто лет это производство нанесло серьезный ущерб экологии и биосфере Земли. Признано, что синтетические пластмассы представляют собой серьезную угрозу глобального загрязнения, особенно морских экосистем, из-за их сверхдлительного срока естественного разложения.

В этой связи разработка и внедрение технологий переработки постпотребительского ПЭТ (POSTC-PET) представляет собой важнейшую современную междисциплинарную задачу [1].

В настоящее время на практике используются три метода борьбы с отходами пластмасс: захоронение, сжигание и переработка. Захоронение и сжигание отходов приводят к выбросу в окружающую среду опасных вторичных загрязнителей. Рециркуляция полимеров решает определенные экологические проблемы первых двух методов, однако этот процесс является малоэффективным, ограниченным низкой стоимостью сбора и переработки отходов, невысоким качеством получаемого вторичного полимера. В связи с этим биodeградация ПЭТ привлекает все больше внимания как экологически чистая альтернатива другим методам переработки отходов, что является эффективным методом контроля загрязнения пластиком. Процесс требует умеренной температуры, небольшого энергопотребления, несложного аппаратного оформления процесса. Продукты биodeградации ПЭТ могут быть легко встроены в существующие технологические линии.

Полиэтиленгликольтерефталат – это термопластик, представитель класса полиэфиров, который известен под разными названиями: полиэтилентерефталат, ПЭТ, ПЭТФ, лавсан, майлар и др. (рис. 1).

¹В поисках пластика. Как Greenpeace в России и люди по всей стране изучали пластиковый мусор на берегах морей, рек и озер: отчет Greenpeace о пластиковом загрязнении берегов водных объектов в России. 2020. 43 с. [Электронный ресурс]. URL: <https://greenpeace.ru/wp-content/uploads/2020/03/Greenpeace-plastic-pollution-report.pdf> (19.06.2022).

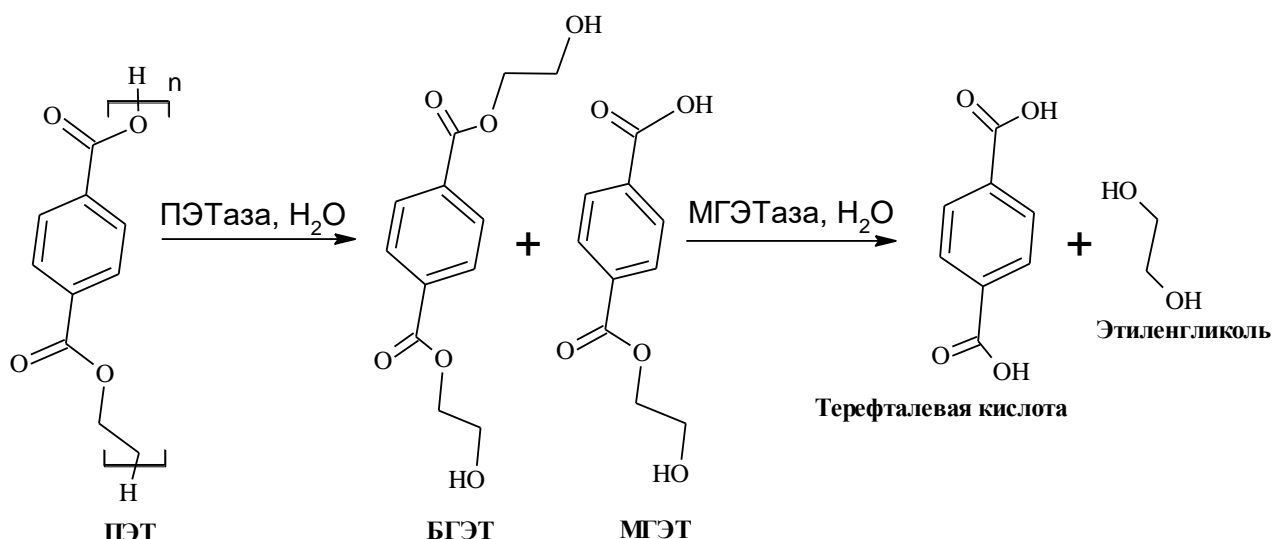


Рис. 1. Схема процесса биодegradации полиэтилентерефталата и продукты его биоразложения

Fig. 1. PET biodegradation process and its biodegradation products

ПЭТ является продуктом реакции поликонденсации этиленгликоля с терефталевой кислотой или ее диметилowym эфиром. По внешнему виду представляет собой в аморфном состоянии твердое, бесцветное и прозрачное вещество, в кристаллическом состоянии – белое, непрозрачное вещество, которое при нагревании до температуры стеклования переходит в прозрачное состояние и остается в нем при резком охлаждении. Будучи конструкционным материалом ПЭТ прочен, износостоек, проявляет свойства диэлектрика. Физические свойства ПЭТ: плотность 1,37–1,46 г/см³, температура размягчения 245 °С, температура плавления 260 °С, температура стеклования 70 °С, температура разложения 350 °С.

Вещество нерастворимо в воде и большинстве органических растворителей, однако неустойчиво к кетонам, сильным кислотам и щелочам. В России полиэтилентерефталат используется главным образом для изготовления пластиковых емкостей и в первую очередь одноразовых пластиковых бутылок. В меньшей степени этот полиэфир применяется для переработки в волокно и пленку. Во всем мире большая часть ПЭТ идет на производство нитей и волокон [1].

ТРАДИЦИОННЫЕ СПОСОБЫ ПЕРЕРАБОТКИ ОТХОДОВ ПЭТ

Способы переработки отходов полиэтилентерефталата можно разделить на три основные группы: механические, физико-химические и химические. Основным механическим способом переработки отходов ПЭТ является измельчение. Такая переработка позволяет получить порошкообразные материалы и крошку для последующего литья под давлением. При переработке этим способом ПЭТ-тары получают «флексy» (от англ. flakes – хлопья), качество которых определяется степенью загрязнения материала

и содержанием в нем других полимеров (полипропилена, поливинилхлорида и др.).

Физико-химические методы переработки отходов ПЭТ классифицируют следующим образом: деструкция отходов с целью получения мономеров или олигомеров, пригодных для получения волокна и пленки; плавление отходов для получения изделий экструзией или литьем под давлением, гранулята и агломерата; переосаждение из растворов с получением порошков для последующего нанесения покрытий; получение композиционных материалов; химическая модификация для производства материалов с новыми свойствами.

Среди химических способов переработки отходов на основе ПЭТ можно упомянуть гидролиз, метанолиз (взаимодействие с метиловым спиртом), гликолиз (взаимодействие с гликолями), аминолиз (взаимодействие с аминами), аммонолиз (взаимодействие с аммиаком) и др. [2].

Полиэтилентерефталат, используемый в производстве одноразовых бутылок, одежды, упаковки и ковровых покрытий, устойчив к каталитической или биологической деполимеризации из-за ограниченной доступности сложноэфирных связей. Промышленный способ деполимеризации ПЭТ с помощью химических веществ, способных расщеплять сложноэфирные связи, может быть реализован, но на сегодняшний день это не оправдано экономически из-за сравнительной дешевизны первичного ПЭТ. Кроме того, наличие множества ароматических фрагментов делает полимерную молекулу полиэтилентерефталата жесткой и химически инертной по отношению к гидролизу [3].

Известна технология разложения ПЭТ в гидrolитических и фотолитических условиях, которые являются основными процессами разложения, протекающими в естественной среде. Одна-

ко полного понимания механизма с идентификацией ключевых промежуточных продуктов, образующихся в ходе деградации ПЭТ, пока нет [4].

Термомеханический способ переработки требует больших затрат энергии. К тому же механические свойства пластика в процессе его термомеханической переработки значительно ухудшаются [5]. Часть пластиковых отходов (не менее 10–12%) сжигается, однако подобная утилизация имеет негативные последствия для окружающей среды. Утилизация ПЭТ производится управляемым сжиганием при температуре не менее 850 °С.

Перечисленные выше условия в итоге приводят к накоплению пластиковых отходов в окружающей среде. Если не будут найдены экономически и технологически оправданные пути переработки полимерных отходов, накопление пластика приведет к ужасающим последствиям. Ежегодно пластиковое загрязнение является причиной гибели около 1 млн морских птиц, а также 100 000 тыс. морских млекопитающих и черепах [6]. В настоящее время считается, что почвы могут представлять собой еще больший концентратор пластика. Поскольку микропластик может легко вымываться в грунтовые воды и загрязнять другие водные ресурсы, считается, что эта проблема затрагивает организмы во всей экосистеме планеты [7].

Становится все более очевидным, что в ответ на накопление пластика в биосфере микробы приспосабливают, настраивают и развивают свои ферментные системы и катаболические пути для частичного разложения искусственного пластика и использования его в качестве источника углерода и энергии. Для того чтобы помочь решить надвигающуюся экологическую угрозу, создаваемую искусственными синтетическими пластиками, микромир бактерий предлагает свои эволюционно опосредованные механизмы, которые являются многообещающими отправными точками для промышленной биотехнологии и синтетической биологии.

АГЕНТЫ БИОХИМИЧЕСКОЙ ДЕГРАДАЦИИ ПЭТ

Ферменты бактерий. Свойства, которые делают ПЭТ незаменимым и универсальным материалом, также наделяют его опасной устойчивостью к биоразложению, что способствует сохранению и накоплению его в окружающей среде. Высокая стабильность основной цепи полимера, а также его кристалличность и гидрофобность поверхности являются одними из основных факторов, ограничивающих естественное разрушение этого пластика [6, 8, 9].

Почвенная палочковидная аэробная грамположительная бактерия *Thermobifida fusca* способна к росту и размножению при высоких температурах, оптимально существует при 55 °С в

широком диапазоне pH (4–10). Бактерия способна формировать эндогенные споры. Она является деструктором клеточных стенок мертвых растений. При помощи ферментов она разрушает полимеры клеточных стенок, кроме лигнина и пектина. Естественная среда обитания *T. fusca* – компостные кучи, городские мусорные свалки. С помощью своего ферментативного аппарата *T. fusca* может разрушать пластмассы, поэтому эта бактерия представляет интерес как перспективный объект для исследований.

Изначально из бактерий *T. fusca* был выделен ряд целлюлаз и подробно изучено их строение, каталитические механизмы, пути регулирования каталитической активности [10, 11]. Важность изучения биохимии и биотехнологии целлюлаз, понимание их каталитических механизмов открывают ряд перспектив в производстве топлива из биомассы.

Термофильная бактерия *T. fusca* является продуцентом ферментов для гидролиза ПЭТ. Многочисленными исследованиями было показано, что штаммы *T. fusca* продуцируют гидролазы ВТА-1 (TfH) и ВТА-2, кутиназы TfCut1 и TfCut2 (ЕС 3.1.1.74), липазы Tfu_0882 и Tfu_0883 (ЕС 3.1.1.3). Гидролазы *T. fusca* ВТА-2, Tfu_0882, TfCut1, TfCut2 и TfH были оценены на предмет их способности к разложению аморфной (некристаллической) пленки из ПЭТ. Инкубация с участием этих 5 ферментов при температуре от 55 до 65 °С в течение 48 ч приводила к потере массы пленки до 4, 5, 11, 12 и 14% соответственно. Было показано, что TfCut2 достигают 25% потери веса пленки при температурных условиях 65–80 °С в течение 48 ч и 45% после 50 ч инкубации при 65 °С [12, 13].

Гидролазы ПЭТ, являясь универсальными полиэстеразами, могут гидролизовать не только ПЭТ, но и другие полиэфиры. Кроме того, термостабильность гидролаз технологически выгодна с точки зрения их применения в сочетании с высокими температурами при переработке ПЭТ, что увеличивает скорость реакции [14]. Большинство ПЭТ-гидролаз содержат С-концевую дисульфидную связь, которая отвечает за обеспечение термической и кинетической стабильности [15].

Бактериальные ферменты, представляющие интерес для гидролиза ПЭТ, не ограничиваются ферментами, полученными из термофильной бактерии *T. fusca*; известны и другие примеры: эстераза из *Bacillus subtilis*, кутиназа из *Pseudomonas mendocina*, липаза из *Burkholderia*.

Фермент кутиназа TfCut2 был охарактеризован структурно и функционально. Были проанализированы его структурные фрагменты, ответственные за специфичность. Фермент TfCut2 имеет стандартную α/β -гидролазную складку, каталитическая триада Ser 130–His 208–Asp 176 обнаружена в щели на поверхности фермента. Термостабильность TfCut2 объясняется присутствием дисульфидного мостика между остатками

Cys 241 и Cys 259 [16].

В 2020 году [17] из морской бактерии *Pseudomonas aestusnigri* был выделен фермент, названный РЕ-Н, и идентифицирован как карбоксилэстераза (ЕС 3.1.1.1), способный разлагать сложные полиэфиры. В частности, была доказана его гидролитическая способность по отношению к ПЭТ. РЕ-Н гидролизует аморфную пленку ПЭТ при 30 °С с выделением промежуточного продукта – моно(2-гидроксиэтил)терефталевой кислоты (МГЭТ). В его структуре была найдена каноническая α/β -гидролазная складка. Этот фермент имел высокую гомологию с известными полиэстеразами.

С момента открытия ПЭТ-гидролазы из *T. fusca* в 2005 году были исследованы новые ПЭТ-гидролазы и их доступность для технологий переработки отходов ПЭТ. В настоящее время известно большое количество термофильных гидролаз, которые можно использовать для переработки отходов ПЭТ. В отличие от ферментативного гидролиза аморфного ПЭТ, механизм ферментативного гидролиза кристаллического ПЭТ еще до конца не выяснен.

Ферменты микроскопических грибов. Кутиназы грибов также проявляют активность по отношению к ПЭТ в качестве субстрата, причем представители родов *Fusarium* и *Humicola* являются наиболее важными источниками этих ферментов [18]. Например, активность кутиназы из *Fusarium solani* (FsC) и *Humicola insolens* (HiC) была оценена на образцах ПЭТ разной степени кристалличности [19]. Было показано, что кутиназы в 10 раз более активны в отношении ПЭТ с низкой кристалличностью. Водорастворимые продукты разложения состояли исключительно из терефталевой кислоты и этиленгликоля.

Микроскопические грибы *Aspergillus oryzae*, *Candida antarctica* и *Penicillium citrinum* являются продуцентами ферментов, которые также были исследованы на активность в отношении ПЭТ [9].

Открытие микроорганизмов, способных разрушать синтетические макромолекулы, дает большие надежды на прогресс в биоремедиации (комплекс методов очистки вод, грунтов и атмосферы с использованием метаболического потенциала микроорганизмов, грибов, растений, насекомых, червей и других живых систем).

История вопроса. Группа японских исследователей из Технологического института Киото и Университета Кейо предложила три стратегии, которые можно было бы использовать для биоремедиации и биологической переработки отходов ПЭТ вместе с другими возможными потенциальными приложениями, включая биоконверсию, переработку микропластика и деградацию микрогранул [20].

Первая стратегия основана на микробном консорциуме, состоящем из бактерий, простей-

ших и дрожжеподобных клеток. Они были выделены после обширного скрининга проб из окружающей среды на наличие микроорганизмов, разлагающих ПЭТ. Были проверены сточные воды, активный ил, почва и отложения с территории, окружающей завод по переработке отходов тары из ПЭТ [20]. Оказалось, что микробный консорциум как разлагает ПЭТ, так и ассимилирует продукты разложения до CO₂ и H₂O [21]. Этот консорциум живых организмов обладал прекрасной адгезионной способностью к пленке ПЭТ и вызывал значительные изменения в ее морфологии, вплоть до разрушения пленки. В составе консорциума были идентифицированы более 20 типов бактерий, для некоторых были охарактеризованы их индивидуальные роли в процессе разложения: *Bacillus megaterium* создает биопленку на поверхности пленки ПЭТ; *Rhizopus* sp. действует внутри биопленки, расщепляя сложноэфирные связи полимера ПЭТ с образованием БГЭТ (бис(2-гидроксиэтил)терефталат); *Pseudomonas* sp. разлагает БГЭТ на мономеры – терефталевую кислоту и этиленгликоль, а *Pigmentiphaga* sp. и *Mycobacterium* sp. ассимилируют их.

Из консорциума был выделен штамм бактерий *Ideonella sakaiensis* 201-F6, который составил основу второй стратегии деградации [22]. Эта бактерия оказалась ПЭТ-литической, и ее рост на питательной среде, содержащей ПЭТ, был намного выше, чем на контрольной среде без ПЭТ [20]. При выращивании бактерии в жидкой питательной среде были обнаружены продукты гидролиза ПЭТ, что доказало способность *I. sakaiensis* полностью разлагать и ассимилировать ПЭТ (использовать ПЭТ в качестве основного источника энергии и углерода) [23]. Причем скорость деградации ПЭТ бактерией была примерно в два раза выше, чем у микробного консорциума, из которого она была изолирована.

Таким образом, бактерия *Ideonella sakaiensis* 201-F6 вырабатывает два гидролитических фермента класса гидролаз, которые катализируют деградацию ПЭТ с образованием мономеров. Затем мономеры, являясь для бактерии единственным источником углерода, катаболизируются ею до простых молекул [20] (рис. 2).

Бактерии *Ideonella sakaiensis* – это вид грамотрицательных аэробных неспорообразующих бактерий палочковидной формы из группы протеобактерий. Клетки подвижны и несут полярный жгутик. Они содержат цитохромоксидазу и каталазу. Бактерии были обнаружены в ходе скрининга образцов почвы, воды и ила, взятых из мест утилизации и переработки бутылок, состоящих из ПЭТ, в городе Сакаи (Япония). Есть мнение, что этот микроорганизм эволюционировал в почвах, содержащих ПЭТ. Первые результаты исследований были опубликованы в 2016 году [6].

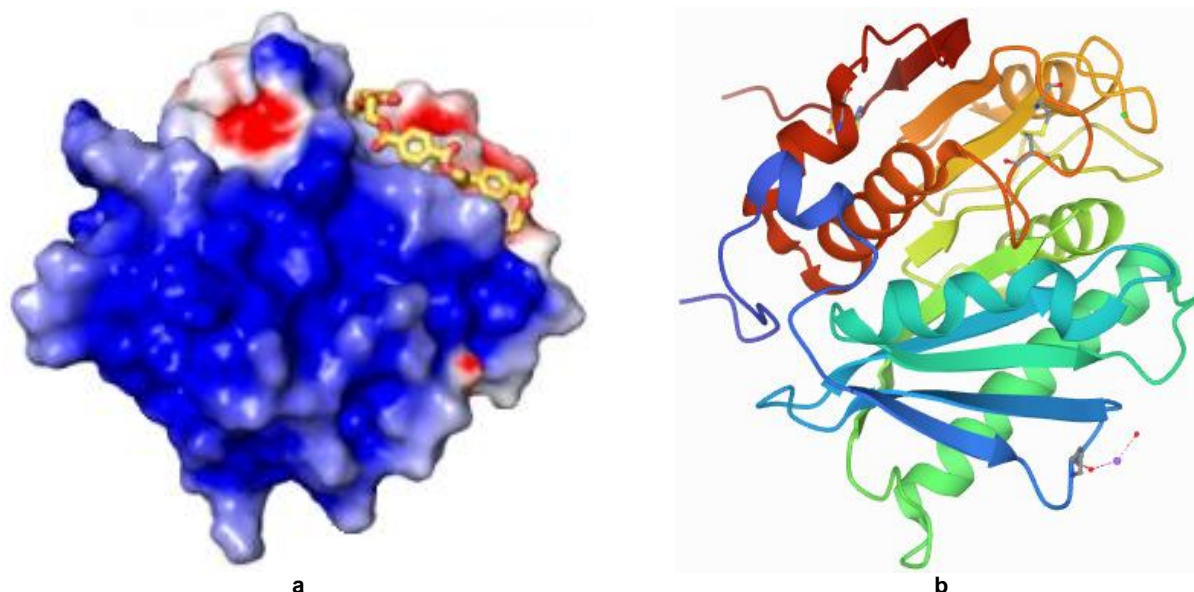


Рис. 2. Модель строения ПЭТаза (а); кристаллическая структура (б) ПЭТаза из *Ideonella sakaiensis* [27]

Fig. 2. Model of PETase structure (a); crystal structure of PETase from *Ideonella sakaiensis* (b) [27]

Последний подход основан на использовании новых ферментов, идентифицированных у бактерии *I. sakaiensis*. В ее геноме была расшифрована аминокислотная последовательность, имеющая 51% идентичности с геномом бактерии *Thermobifida fusca* (TfH), обладающей ПЭТ-гидролазной активностью [20]. Соответствующий рекомбинантный белок высвобождает продукты разложения ПЭТ в водную среду, а пленка ПЭТ демонстрирует кратерообразные ямки при воздействии фермента. Фермент бактерии *I. sa-kaiensis* подобно кутиназе был назван Poly(ethylene terephthalate)hydrolase, или IsPETase (ПЭТаза). Позже было показано, что его активность в отношении гидролиза ПЭТ превосходит таковую уже известных к тому времени гидролитических ферментов ПЭТ, в частности бактерии *T. fusca* (TfH), кутиназы гриба *F. solani* (FsC) [24] и LC-кутиназы (LCC) [25]. Ферменты оценивали по их активности в отношении способности разрушать пленку и кристаллический ПЭТ. Было определено, что активность IsPETase в сотни раз выше активности TfH, LCC и FsC [21]. Однако необходимо учитывать, что IsPETase хорошо работает при умеренных температурах, тогда как остальные ферменты активны при более высоких температурах, являясь термофильными. Эффективность и специфичность IsPETase в отношении гидролиза ПЭТ сделали ее многообещающим кандидатом для новых стратегий биodeградации ПЭТ.

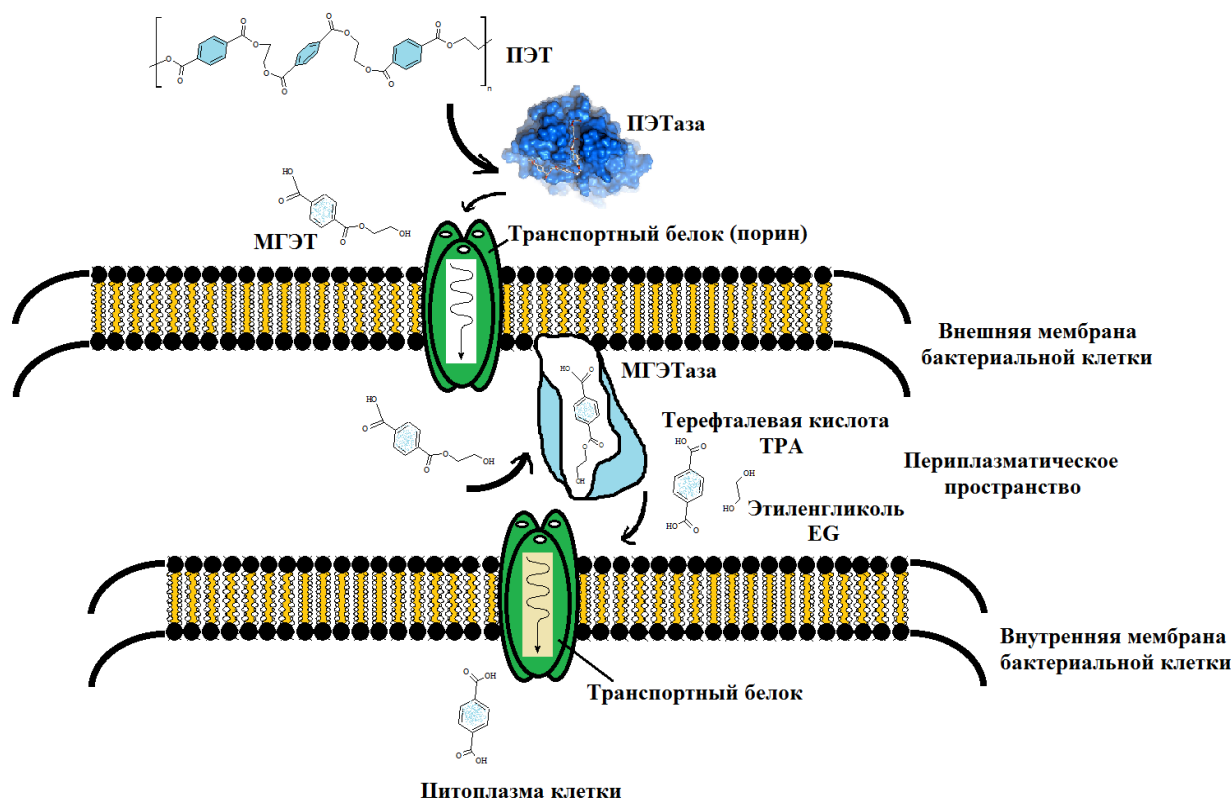
МЕХАНИЗМ БИОДЕГРАДАЦИИ ПЭТ

В ответ на накопление пластика в биосфере микробы развивают способность использовать синтетические полимеры в качестве источников углерода и энергии. Бактерия *Ideonella sakaiensis* секретирует 2-ферментную систему для разло-

жения ПЭТ на составляющие его мономеры. Клетки бактерий, выделенных с поверхности пленки из ПЭТ, прикрепляются к ней и соединяются друг с другом с помощью ворсинок. Возможно, они участвуют в транспорте ферментов, разлагающих ПЭТ. Под действием бактериальных ферментов пленка из ПЭТ разрушается и полностью разлагается через 6 недель при температуре 30 °C [21].

Предполагаемый механизм разрушения ПЭТ бактериями *Ideonella sakaiensis* таков: вначале внеклеточный термолабильный фермент ПЭТ гидролаза, или ПЭТаза (poly(ethylene terephthalate) hydrolase, PETase), деполимеризует ПЭТ до основного продукта – моно(2-гидроксиэтил)терефталевой кислоты, или МГЭТ (mono-(2-hydroxyethyl)terephthalic acid, MHET), и побочного продукта – бис(2-гидроксиэтил)терефталевой кислоты, или БГЭТ (bis-(2-hydroxyethyl) terephthalic acid, BHET). Фермент моно(2-гидроксиэтил)терефталат гидролаза (МГЭТаза), или mono(2-hydroxyethyl) terephthalate hydrolase (MHETase), расщепляет МГЭТ до этиленгликоля (ethylene glycol, EG) и терефталевой кислоты (terephthalic acid, TPA), подвергая гидролизу сложноэфирную связь МГЭТ. Это второй фермент пути разложения ПЭТ (рис. 3) [26].

Моно(2-гидроксиэтил)терефталевая кислота подвергается гидролизу МГЭТазой до этиленгликоля и терефталевой кислоты, которая доставляется в бактериальную клетку посредством специального белка-переносчика и последовательно катаболизируется до протокатеховой кислоты. После чего специальная 3,4-диоксигеназа разрушает ароматическое кольцо протокатеховой кислоты [21].



Метаболический путь гидролиза ПЭТ бактерией *I. sakaiensis* включает следующие стадии: внеклеточная ПЭТаза гидролизует ПЭТ с образованием МГЭТ в качестве основного продукта. Побочным продуктом является терефталевая кислота (ТРА). Затем продукты гидролиза ПЭТ транспортируются в периплазматическое пространство через белок внешней мембраны (порин). Фермент МГЭТаза как липопротейн, заякоренный на внешней мембране, гидролизует МГЭТ до ТРА и этиленгликоля (ЕГ). Затем молекула ТРА попадает в цитоплазму клетки через белок-переносчик ТРА, связанный с ТРА-связывающим белком. ТРА интегрируется в цикл трикарбоновых кислот через протокатеховую кислоту, а ЕГ метаболизируется через глиоксиловую кислоту

The metabolic pathway of PET hydrolysis by the bacterium *I. sakaiensis* includes the following stages: extracellular PETase hydrolyzes PET with the formation of MGET as the main product. Terephthalic acid (TPA) is the by-product. PET hydrolysis products are then transported to the periplasmic space through the outer membrane protein (porin). The enzyme MGETase, as a lipoprotein anchored to the outer membrane, hydrolyzes MGET to TPA and ethylene glycol (EG). The TPA molecule then enters the cell cytoplasm via a TPA transporter protein coupled to a TPA-binding protein. TPA is integrated into the citric acid cycle via protocatechuic acid, while EG is metabolized via glyoxylic acid

Рис. 3. Схематическое представление действия ферментов на полиэтиленгликольтерефталат

Fig. 3. Schematic representation of enzymes effect on PET

ХАРАКТЕРИСТИКА ДВУХФЕРМЕНТНОЙ СИСТЕМЫ ДЕПОЛИМЕРИЗАЦИИ ПЭТ

Комиссией по ферментам (Enzyme Commission, EC) Международного биохимического союза ферментам ПЭТазе и МГЭТазе были присвоены новые номера – 3.1.1.101 и 3.1.1.102 соответственно.

ПЭТазы – это ферменты класса эстераз, которые катализируют гидролиз ПЭТ до МГЭТ [8]. Первая ПЭТаза была выделена из штамма бактерий *I. sakaiensis* 201-F6 [27] (рис. 4).

ПЭТаза (IsPETase) действует внеклеточно, сначала превращая ПЭТ в олигомеры (в основном МГЭТ), затем гидролизаты ПЭТ транспортируются белком внешней мембраны (например, порином) в периплазматическое пространство и далее гидролизуются МГЭТазой до мономеров ПЭТ (см. рис. 3).

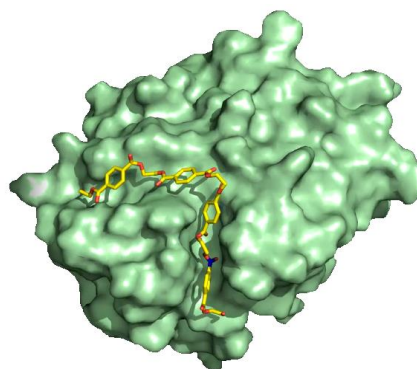


Рис. 4. Схематическое расположение участка полимерной цепи полиэтиленгликольтерефталата в активном центре фермента ПЭТазы [29]

Fig. 4. Schematic location of the PET polymer chain section in the active center of the PETase enzyme [29]

Изучение кристаллической структуры ПЭТаза методом длинноволновой рентгеновской кристаллографии позволило выявить некоторые схожие черты с ферментами кутиназой (ЕС 3.1.1.74) и липазой (ЕС 3.1.1.3). Кутиназа принадлежит к семейству эстераз класса гидролаз, которые гидролизуют сложноэфирные связи в молекулах природных полиэфиров типа кутина, образуемого на поверхности листьев растений для их защиты. Кутиназа является гликопротеином, способным высвобождаться в окружающую среду (экзофермент). Липаза – это фермент семейства эстераз, катализирующий гидролиз жиров. По сравнению с гомологичными кутиназами ПЭТаза сохраняет предковую α/β -гидролазную складку, но содержит более доступную для субстрата щель в активном центре. За счет мутации 2-х консервативных остатков аминокислот и сужения щели связывания в активном сайте кутиназы можно ожидать приобретение ферментом способности к разложению ПЭТ. Вероятно, схожий эволюционный механизм оптимизации структуры активного центра ПЭТаза происходил в среде, содержащей большое количество ПЭТ, что способствовало развитию способности разлагать полимер [28].

Как было отмечено выше, ПЭТаза унаследовала классическую α/β -гидролазную складку с центром, состоящим из восьми β -цепей и шести α -спиралей [29].

ПЭТаза имеет достаточно близкую идентичность с бактериальными кутиназами. Однако ПЭТаза, в отличие от них, обладает более широкой щелью в активном центре, которая необходима для размещения молекул ароматических полиэфиров.

В активном центре ПЭТаза сохраняется хорошо изученная каталитическая триада, характерная для липаз и кутиназ. Она включает аминокислотные остатки Ser 160, Asp 206 и His 237. Каталитические остатки располагаются на петлях, причем нуклеофильный серин занимает высоко консервативное положение, образуя структурный мотив «нуклеофильный локоть». ПЭТаза имеет две дисульфидные связи, одна из которых примыкает к активному сайту, а другая – к С-концу белка. Дисульфидные связи важны для стабилизации структуры активного центра ПЭТаза.

Фермент имеет базовую структуру, напоминающую другие ферменты, гидролизующие ПЭТ, с укладкой α/β -гидролазы и каталитической триадой нуклеофил–His–кислота. Семейство α/β -сериновых гидролаз демонстрирует каталитический механизм, основанный на нуклеофильной атаке сложноэфирной связи субстрата остатком серина [20]. Ковалентный тетраэдрический интермедиат, образованный в результате связывания серина с карбонильной группой сложного эфира, стабилизируется двумя водородными связями с аминокислотными остатками расположенной рядом «оксианионной дыры», сформиро-

ванной остатками Tyr 87 и Met 161 [30]. Складка IsPETase состоит из 9 β -цепей, которые образуют скрученную центральную конформацию β -листа, окруженную 6-ю α -спиралями, остатки Ser 160–His 237–Asp 206 создают каталитическую триаду [8, 13].

В отличие от TfCut2 и LCC, IsPETase демонстрирует заметно более широкий активный центр и имеет удлиненную щель для связывания субстрата, которая состоит из 2-х участков (I и II). Четыре остатка МГЭТ связываются в субсайтах I, IIa, IIb и IIc [31]. На участке расщепления I происходит разрыв сложноэфирной связи (рис. 5).

Фермент также имеет дополнительную дисульфидную связь в своем активном центре. IsPETase обладает следующими отличительными особенностями [20]:

- в субсайте II IsPETase пара остатков Trp 159–Ser 238 обеспечивает достаточное пространство, необходимое для связывания субстрата. Ширина кармана связывания субстрата является решающей для эффективного гидролиза кристаллического ПЭТ [32];

- IsPETase имеет вытянутую соединительную петлю из 3-х аминокислотных остатков: Ser 245, Asn 246 и Gln 247, которые создают дополнительное место для связывания ПЭТ;

- фермент IsPETase имеет 2 дисульфидные связи. Ранее изученные кутиназы обладают только одной дисульфидной связью. Эта дополнительная дисульфидная связь соединяет α - и β -петли, содержащие каталитическую триаду, а также отвечает за более высокую гибкость активного центра. Эта гибкость позволяет IsPETase приспосабливаться к жесткости субстрата ПЭТ без нарушения структурной целостности фермента. Удаление дисульфидной связи приводит к снижению активности и ослаблению каталитической триады [13, 33].

Структура МГЭТаза была определена в 2019 году [26]. Этот фермент также принадлежит к суперсемейству α/β -гидролаз. Согласно классификации в базе данных ESTHER, МГЭТаза относится к семейству танназ [34]. Предполагается, что МГЭТаза представляет собой липопроtein, который, вероятно, закреплен на внешней мембране [21]. МГЭТаза расщепляет МГЭТ до этиленгликоля и терефталевой кислоты. Фермент состоит из 2-х доменов: гидролитический домен содержит каталитические остатки Ser 225, His 528 и Asp 492; домен крышки составляет большую часть остатков сайта связывания субстрата, имеет субстратную специфичность. Крышка МГЭТаза имеет решающее значение для гидролиза МГЭТ [36] (рис. 6).

Было показано, что «бескрышечный» мутант МГЭТаза не катализировал соответствующую реакцию [35].

Сердцевинный домен фермента МГЭТаза похож на такой же домен фермента ПЭТаза, за-

крытый крышечным доменом. Моделирование каталитического маршрута предсказывает, что МГЭТаза следует каноническому 2-ступенчатому механизму серингидролазы.

На основании биохимических экспериментов было обнаружено, что МГЭТаза функционирует как экзо-ПЭТаза, гидролизует МГЭТ. Предполага-

ется, что МГЭТаза играет несколько ролей в биодегradации ПЭТ, обладая не только функцией гидролиза МГЭТ, но и гидролизует БГЭТ [37]. Доказано, что деацилирование под действием МГЭТаза является лимитирующей стадией работы фермента.

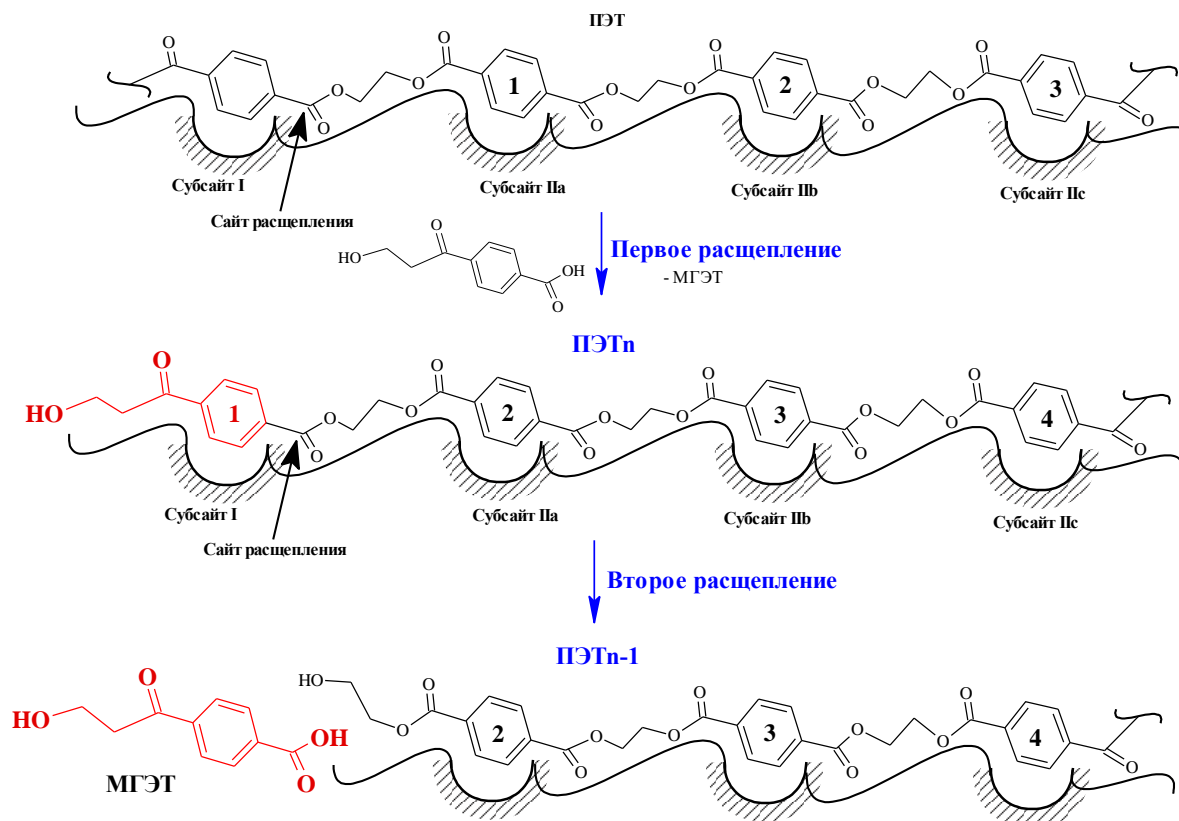


Рис. 5. Способ связывания субстрата с ПЭТазой и схема гидролиза полиэтиленгликольтерефталата [20]

Fig. 5. Method of binding the substrate with PETase and the scheme of PET hydrolysis [20]

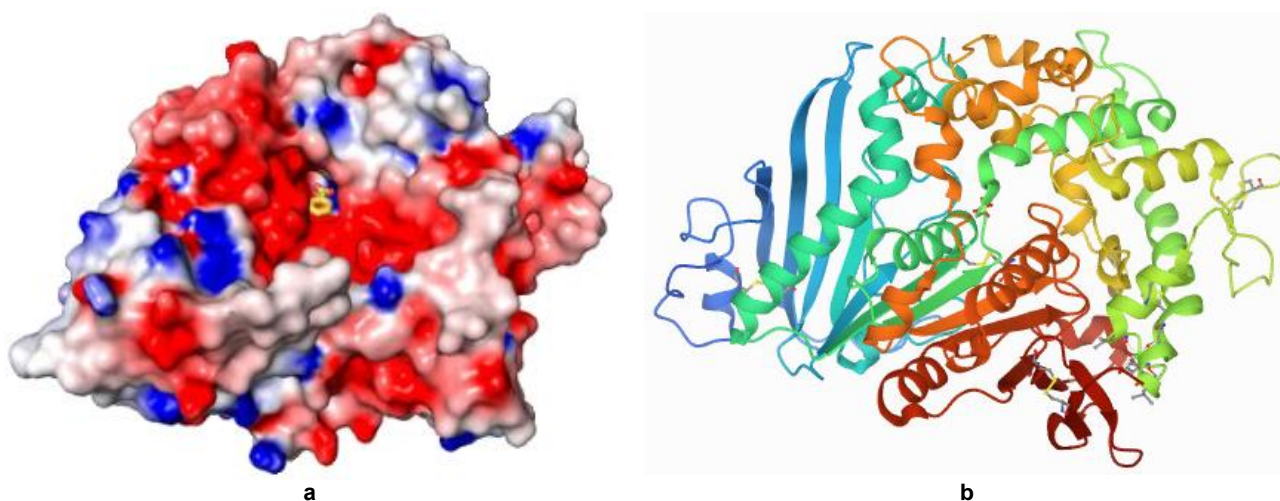


Рис. 6. Модель строения МГЭТаза (а); структура МГЭТаза из *Ideonella sakaiensis* (b) [36]

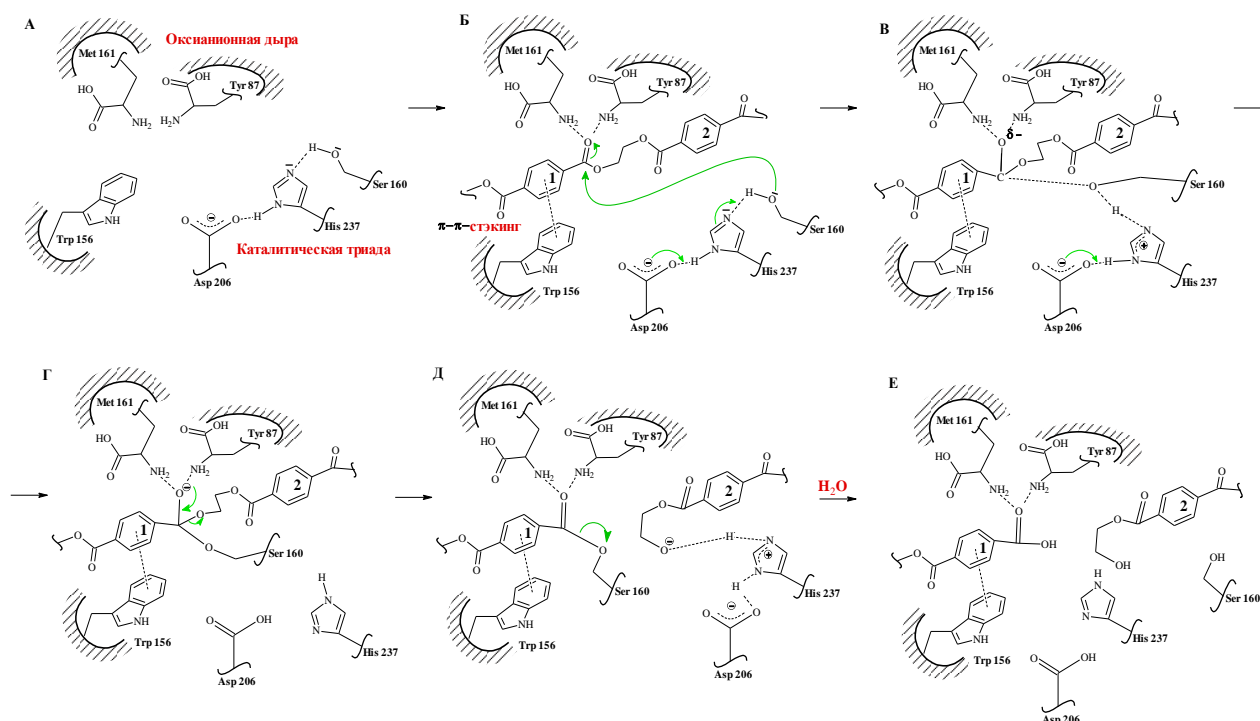
Fig. 6. Model of MHETase structure (a); structure of MHETase from *Ideonella sakaiensis* (b) [36]

БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МЕХАНИЗМА РАБОТЫ ФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМ РАЗЛОЖЕНИЯ ПЭТ

После структурного и биохимического анализа фермента IsPETase был предложен подробный молекулярный механизм действия этого фермента [13, 31]. Для изучения режима связывания субстрата с ферментом в модели ковалентной стыковки для имитации работы ПЭТ была выбрана молекула, состоящая из 4-х остатков МГЭТ, названная 2-HE(MHET)₄. В каталитическом центре остаток Ser 160 каталитической триады (Ser 160–His 237–Asp 206) функционирует как ковалентный нуклеофил, действие которого направлено на карбонильный атом углерода сложноэфирной связи. Аминокислотные остатки Trp 87 и Met 161 образуют оксианионную дыру,

которая стабилизирует тетраэдрический промежуточный продукт реакции. Это стимулирует образование в сайте связывания субстрата длинной неглубокой гидрофобной щели. 1-й фрагмент ПЭТ связан с субсайтом I, тогда как 2, 3 и 4-й фрагменты размещены в субсайте II (рис. 7).

Связывание опосредуется и стабилизируется за счет гидрофобных, полярных и π-π-взаимодействий. Молекула ПЭТ связывается с секретрируемой IsPETase в гидрофобной щели таким образом, что сложноэфирная связь располагается ближе к нуклеофильному остатку Ser 160. Это позволяет расщеплять одну сложноэфирную связь, разрывая молекулу ПЭТ и приводя к 2-м цепям ПЭТ с разными окончаниями (ТРА-конец и EG-конец), которые затем расщепляются до мономеров МГЭТ [13].



А – Апо-форма фермента: карман для связывания субстрата пуст, остаток Trp 156 демонстрирует различные конформации; Б – связывание с макромолекулой субстрата (ПЭТ). ПЭТ закрепляется в щели связывания субстрата. Карбонильная группа субстрата размещается в активном центре, сложноэфирная связь готова к гидролизу. Первое бензольное кольцо переходного состояния ПЭТ взаимодействует с остатком Trp 156 (π-π-стэкинг); В – образование тетраэдрического переходного состояния; Г – ковалентное связывание с остатком серина, образование промежуточного ацил-фермента (АЕИ); Д – образование тетраэдрического интермедиата; Е – остаток Trp 156 заставляет поворачиваться фрагмент макромолекулы с остатком терефталевой кислоты и размещаться параллельно плоскостям ароматических циклов. Выход продуктов гидролиза – терефталевой кислоты и этиленгликоля – из зоны катализа в активном центре фермента

А – Apo-form of the enzyme: the substrate-binding pocket is empty and the Trp 156 residue shows different conformations; Б – binding to the substrate macromolecule (PET). PET is fixed in the substrate binding slot. The carbonyl group of the substrate is placed in the active site and the ester bond is ready for hydrolysis. The first benzene ring of the PET macromolecule interacts with the Trp 156 residue (π-π stacking); В – formation of a tetrahedral transition state; Г – covalent binding to a serine residue, formation of an intermediate acyl-enzyme (AEI); Д – formation of a tetrahedral intermediate; Е – the residue Trp 156 causes the fragment of the macromolecule with the terephthalic acid residue to rotate and be placed parallel to the planes of aromatic cycles. The release of hydrolysis products – terephthalic acid and ethylene glycol – from the catalysis zone in the active site of the enzyme

Рис. 7. Схема механизма гидролиза полиэтиленгликольтерефталата ферментом ПЭТазой

Fig. 7. Mechanism of PET hydrolysis by the PETase enzyme

Считается, что остаток Трп 156, который находится рядом с каталитическим центром, играет важную роль в связывании субстрата ПЭТ. Высококонсервативный остаток Трп 156 демонстрирует 3 различные конформации. Фермент сначала образует неглубокую поверхностную щель, внутри которой имеет место конформационное «колебание» остатка Трп 156. Затем, главным образом посредством гидрофобных взаимодействий, субстрат ПЭТ связывается с ферментом своей карбонильной группой, расположенной в каталитическом центре, в частности атомом кислорода, обращенным к оксианионной дыре, в то время как индольное кольцо Трп 156 взаимодействует с ароматической частью (остатком терефталевой кислоты) ПЭТ. Остаток Трп 156 должен находиться в В-конформации, чтобы обеспечить Т-образное укладывание фрагмента ТРА макромолекулы ПЭТ. После чего происходит последовательное образование промежуточного ацил-фермента (Acyl-Enzyme Intermedi-

ate, AEI) и разрыв сложноэфирной связи при нуклеофильной атаке молекулой воды (гидролитическая реакция). Молекула ТРА образует широкую плоскую поверхность и склонна к сильному π-стэкингу взаимодействию с остатком Трп 156. Гидролиз ПЭТ облегчается за счет слабого взаимодействия между его ароматическими фениленовыми звеньями и близлежащими гидрофобными аминокислотными остатками фермента. Затем продукт поворачивается и высвобождается из каталитического центра после взаимодействия карбоксильной группы кислоты с Трп 156 [38].

Точный способ связывания ПЭТ и лежащий в основе механизм гидролиза ПЭТ кутиназой требует дальнейшего изучения, поскольку структура ПЭТ сильно отличается от субстратов кутиназы, таких как кутин [13, 39]. Деятельность обоих ферментов дает представление о системе 2-ферментного механизма деполимеризации ПЭТ [35]. На рис. 8 приведена схема механизма действия МГЭТаза.

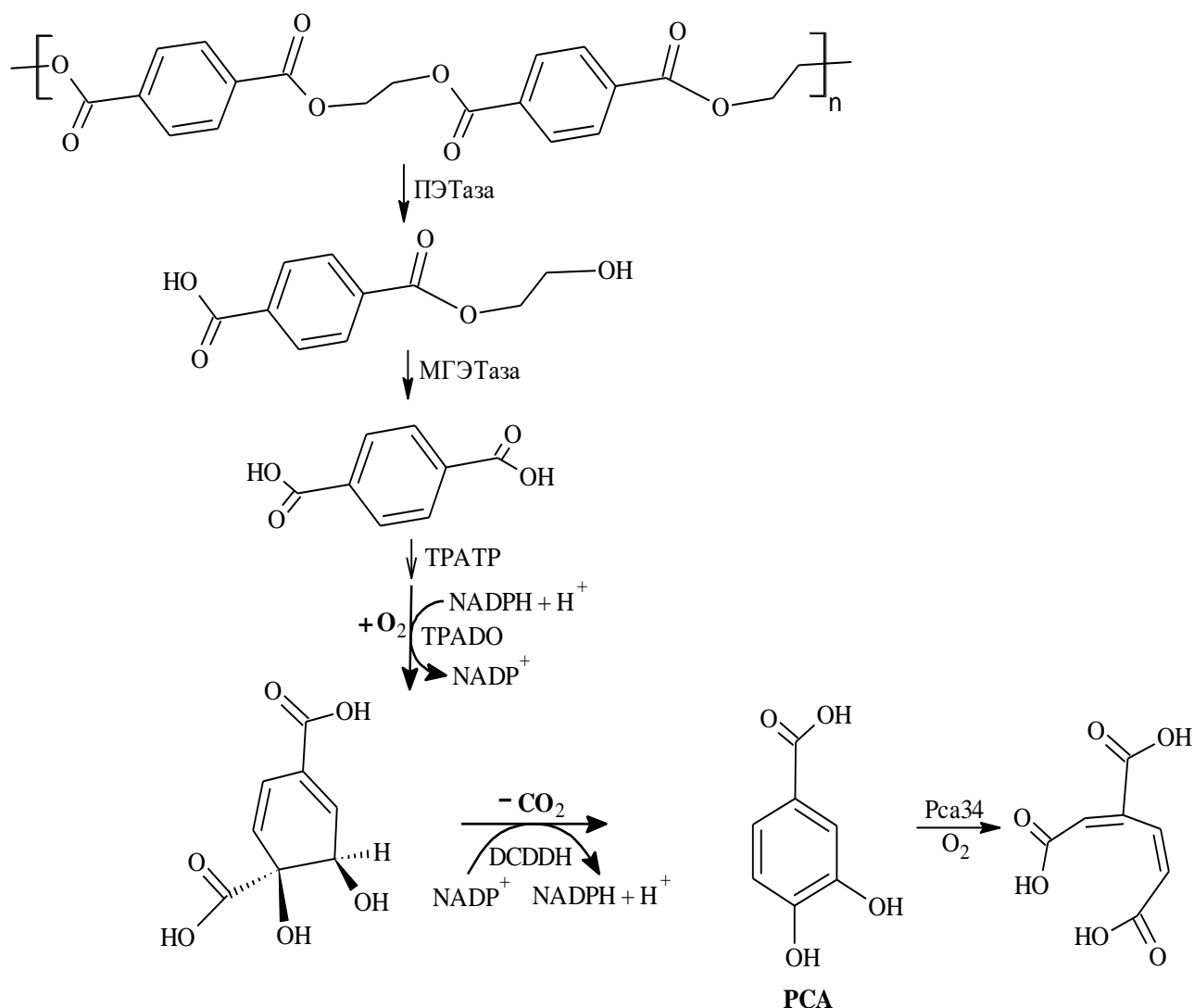


Рис. 8. Прогнозируемый ход конечного пути деградации полиэтилентерефталата [7]

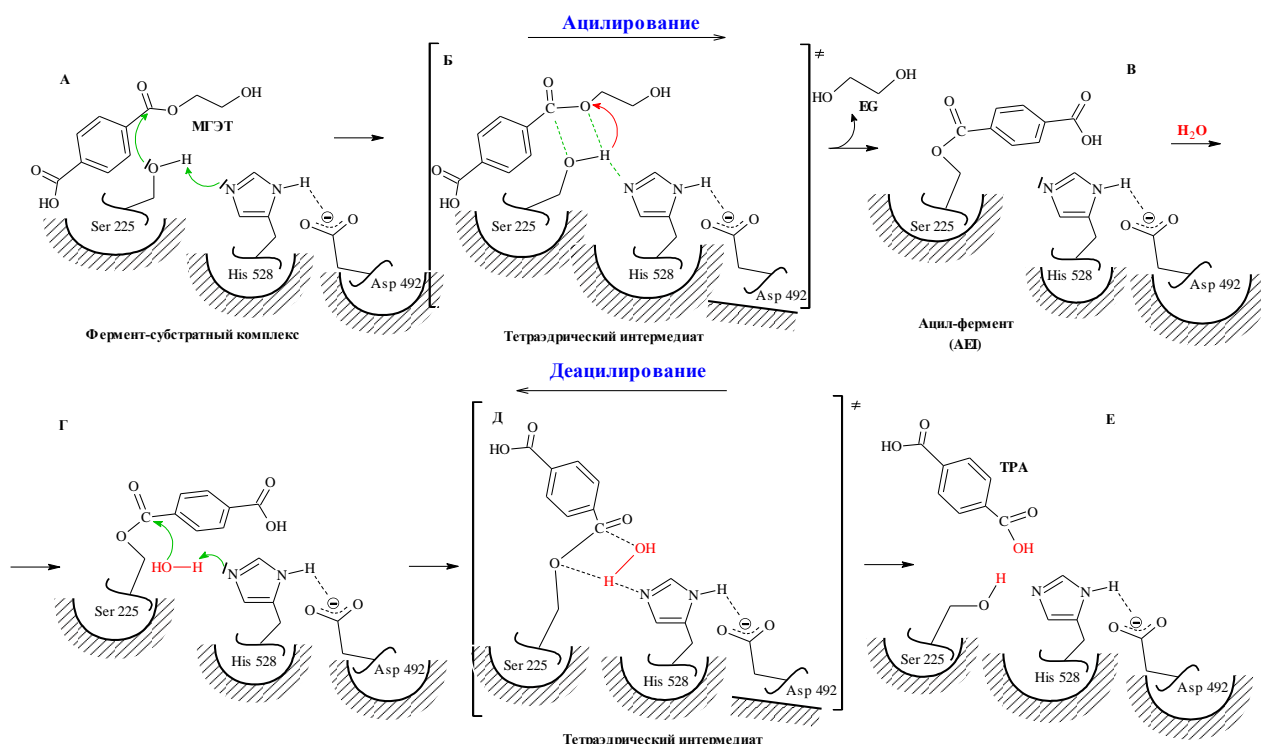
Fig. 8. Predicted path of the final path of PET degradation [7]

Серингидролазы катализируют 2-стадийную реакцию, включающую образование промежуточного ацил-фермента АЕИ (стадия ацилирования), который высвобождается на 2-й стадии (стадия деацилирования). При ацилировании каталитический серин (Ser 225) депротонируется с помощью His 528, активируя его для нуклеофильной атаки на карбонильный атом углерода МГЭТ, высвобождая этиленгликоль (EG) и образуя промежуточный ацил-фермент (АЕИ). Расчеты методами молекулярной динамики показали, что после отщепления от МГЭТ молекула этиленгликоля EG покидает активный сайт фермента. Молекула EG связывается водородной связью с остатком His 528 в течение ~100 пс, затем выходит из активного центра и в течение 1 нс переходит в раствор. Важным наблюдением послужило то, что стадия деацилирования протекает без участия молекул EG в активном центре фермента. Это обеспечивает больший доступ для молекул воды к заряженному остатку His 528 для дальнейшего протекания процесса деацилирования. Аминокислотный остаток His 528 играет

ту же роль, что и в ацилировании, каталитически депротонируя воду и перенося этот протон на остаток Ser 225, регенерируя его для следующего каталитического цикла (рис. 9).

Деацилирование включает нуклеофильную атаку молекулы воды на промежуточный ацил-фермент АЕИ, высвобождая молекулу терефталевой кислоты (TPA). Высказано предположение, что TPA впоследствии входит в цикл трикарбоновых кислот через протокатеховую кислоту, а EG катаболизируется в этом цикле через глиоксиловую кислоту [39].

Внеклеточная ПЭТаза гидролизует ПЭТ с образованием МГЭТ в качестве основного продукта. Липопротеин МГЭТаза гидролизует МГЭТ до TPA и EG. Далее TPA переносится белком-транспортером (TPATP) и катаболизируется под действием TPA-1,2-дигидрокси-3,5-циклогексадиен-1,4-дикарбоксилатдегидрогеназы (DCDDH). Полученная протокатеховая кислота (PCA) расщепляется PCA-3,4-дигидрокси-3,5-циклогексадиен-1,4-дикарбоксилатдегидрогеназой (Pca34) по бензольному кольцу (см. рис. 8) [21].



Каталитический механизм действия МГЭТаза представлен двумя стадиями. Ацилирование, куда входят: А – реагенты, Б – переходное состояние и В – продукт ацилирования, в котором His 528 переносит протон от Ser 225 к отщепляющейся молекуле этиленгликоля (EG). В стадии деацилирования (Г–Е) остаток His 528 играет аналогичную роль и восстанавливает каталитический серин, передавая протон от молекулы воды к Ser 225, высвобождая молекулу терефталевой кислоты (TPA)

The catalytic mechanism of MGETase action is represented by two stages. Acylation, which includes: A – reagents, Б – transition state, and В – acylation product, in which His 528 transfers a proton from Ser 225 to the cleaved ethylene glycol (EG) molecule. In the deacylation step (Г–Е), His 528 plays a similar role and reduces the catalytic serine, transferring a proton from a water molecule to Ser 225, releasing a terephthalic acid (TPA) molecule

Рис. 9. Схема ферментативного механизма разложения моно(2-гидроксиэтил)терефталевой кислоты

Fig. 9. Enzymatic mechanism of MHET decomposition

ПЕРСПЕКТИВЫ МЕТОДА

Открытие бактерии *Ideonella sakaiensis* создает предпосылки для развития биоремедиации – технологии переработки отходов с использованием живых организмов. Было высказано предложение о необходимости ускорить процесс, встроив выявленные гены, участвующие в разложении пластика, в быстро размножающуюся бактерию *Escherichia coli*.

Чтобы проверить, как работают два белка вместе, ПЭТ обработали только ПЭТазой и ПЭТазой в смеси с МГЭТазой. Оказалось, что пленка разлагается быстрее при наличии обоих ферментов. Кроме того, химерный белок, состоящий из остатков обоих ферментов, работает лучше, чем каждый из них в отдельности, как при переработке ПЭТ, так и при расщеплении МГЭТ.

В настоящее время широко применяются инструменты генетической и белковой инженерии для увеличения способности микроорганизмов и их ферментов к деградации ПЭТ [6]. Например, методы рекомбинантной ДНК сделали возможным экспрессию генов деградации полимерных веществ в организм, который более подходит для получения ферментов. Это позволяет получать большое количество фермента для его дальнейшего изучения и применения. Диапазон субстратов и их активность могут быть дополнительно увеличены с использованием таких технологий, как сайт-направленный мутагенез. Использование белковой инженерии для изменения или модификации аминокислотной последовательности белка может привести к повышению активности и устойчивости препаратов к условиям реакции [14, 41].

Рост знаний в этом направлении будет способствовать дальнейшему развитию биологического способа вторичной переработки пластиковых отходов, содержащих ПЭТ.

ПРОМЫШЛЕННАЯ РЕАЛИЗАЦИЯ МЕТОДА

Открытие ферментной системы, способной к биodeградации ПЭТ, является большим толчком на пути к разработке технологии биорециклирования синтетических полимеров. В настоящее время предлагается технология утилизации отходов ПЭТ, связанная с ферментативной деполимеризацией ПЭТ, а также с регенерацией и рекуперацией продуктов гидролиза. В промышленных условиях ферментативный гидролиз полиэтилентерефталата предлагается реализовывать по следующей принципиальной схеме [41]. Расчетное количество измельченного ПЭТ смешивается с необходимым количеством воды и ферментным препаратом, полученным на основе модифицированного фермента кутиназы (*leaf-branch compost cutinase*, LCC), который был выделен из бактерий листовного компоста. Гидролиз должен проводиться при температуре около 70 °С в слабощелочной среде (pH = 8), которая

создается добавлением гидроксида натрия. После деполимеризации 90% ПЭТ в расчете от его исходного количества процесс останавливают путем снижения температуры в реакторе до нормальной и отделяют центрифугированием твердый остаток непрореагировавшего полимера. Жидкая фаза представляет собой смесь этиленгликоля и терефталата натрия. Ввиду малой растворимости терефталевой кислоты в воде (0,0019 г/100 г H₂O) ее можно выделить из водного раствора натриевой соли обработкой раствором серной кислоты. После этого терефталевую кислоту можно отделить центрифугированием и очистить перекристаллизацией [42]. Терефталевая кислота может быть вновь использована для получения ПЭТ. Из оставшегося водно-солевого раствора можно выделить этиленгликоль, например, диализом с ионообменными мембранами. Для этих целей подойдут катионообменные и анионообменные мембраны на основе сополимеров стирола и дивинилбензола.

Разработка промышленных биокатализаторов разложения ПЭТ открывает большие возможности для биоконверсии и «зеленых» технологий переработки отходов, содержащих ПЭТ. Существует острая необходимость в новых стратегиях повышения стабильности, каталитической активности, возможности повторного использования биокатализаторов разложения ПЭТ. К настоящему времени достигнут определенный прогресс в подходах ферментной биоинженерии, используемых для получения новых биокатализаторов ПЭТ, выяснения молекулярного механизма их действия, улучшения их каталитических характеристик [43].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Способность разлагать полимеры до исходных мономеров важна для их последующего повторного использования с целью производства новых продуктов, что является важнейшим техническим достижением, необходимым для создания замкнутого цикла материалов [44]. Полная деполимеризация ПЭТ до мономеров может быть осуществима при использовании бактерий *I. sakaiensis* с ее ферментной системой, состоящей из 2-х ферментов: МГЭТазы и ПЭТазы.

Ферментативное разрушение устойчивых природных полимеров, таких как целлюлоза и хитин, осуществляется в природе под действием комплекса ферментов, секретлируемых микробами. Например, грибковые системы деполимеризации целлюлозы обычно содержат множество ферментов (например, целлюлазы), которые действуют непосредственно на твердые полимерные субстраты посредством межфазных ферментных механизмов, и дополнительные ферменты (например, β-глюкозидазы), которые превращают солюбилизированные промежуточные соединения в мономерные составляющие

(например, гидролиз целлобиозы до глюкозы). Учитывая, что естественные микробные системы эволюционировали в течение миллионов лет для оптимального разложения устойчивых полимеров, возможно, что почвенная бактерия *I. sakaiensis* развила способность использовать кристаллический полиэфирный субстрат посредством 2-ферментной системы.

Таким образом, разработка мультиферментных систем и комплексов, предназначенных для деполимеризации смешанных полимерных отходов, является весьма перспективной областью для продолжения исследований.

Несомненно, что дополнительной модификацией структур белков можно добиться повыше-

ния эффективности биоразложения ПЭТ. Это подчеркивает необходимость дальнейшего изучения взаимосвязей структура–активность в вопросе науки и технологии биоразложения синтетических полиэфиров.

Необходимо продолжать изучать возможные механизмы действия и структурные особенности ключевых ферментов, участвующих в микробном гидролизе ПЭТ, применять технологии геномной и белковой инженерии для получения ферментов, способных разрушать ПЭТ, и оценивать способность этих ферментов работать в практических условиях с целью создания промышленных технологий переработки ПЭТ по типу замкнутого цикла.

REFERENCES

1. Awaja F., Pavel D. Recycling of PET. *European Polymer Journal*. 2005;41(7):1453-1477. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2005.02.005>.
2. Sinha V. K., Patel M. R., Patel J. V. Pet Waste management by chemical recycling. *Journal of Polymers and the Environment*. 2010;18(1):8-25. <https://doi.org/10.1007/s10924-008-0106-7>.
3. Marten E., Müller R.-J., Deckwer W.-D. Studies on the enzymatic hydrolysis of polyesters. II. Aliphatic–aromatic copolyesters. *Polymer Degradation and Stability*. 2005;88(3):371-381. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2004.12.001>.
4. Sang T., Wallis C. J., Hill G., Britovsek J. P. G. Polyethylene terephthalate degradation under natural and accelerated weathering conditions. *European Polymer Journal*. 2020;136:109873. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.109873>.
5. Ragaert K., Delva L., Van Geem K. Mechanical and chemical recycling of solid plastic waste. *Waste Management*. 2017;69:24-58. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.07.044>.
6. Jaiswal S., Sharma B., Shukla P. Integrated approaches in microbial degradation of plastics. *Environmental Technology & Innovation*. 2019;17:100567. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100567>.
7. Song Y., Cao C., Qiu R., Hu J., Liu M., Lu S. Uptake and adverse effects of polyethylene terephthalate microplastics fibers on terrestrial snails (*Achatina fulica*) after soil exposure. *Environmental Pollution*. 2019;250:447-455. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.04.066>.
8. Liu C., Shi C., Zhu S., Wei R., Yin C.-C. Structural and functional characterization of polyethylene terephthalate hydrolase from *Ideonella sakaiensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2018;508(1):289-294. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.11.148>.
9. Kawai F., Kawabata T., Oda M. Current knowledge on enzymatic PET degradation and its possible application to waste stream management and other fields. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2019;103:4253-4268. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09717-y>.
10. Vuong V. T., Wilson B. D. Engineering *Thermobifida fusca* cellulases: catalytic mechanisms and improved activity. *Proteomics Research Journal*. 2010;4(1-2):21-37. <https://www.researchgate.net/publication/233752023>.
11. Gomez del Pulgar E. M., Saadeddin A. The cellulolytic system of *Thermobifida fusca*. *Critical Reviews in Microbiology*. 2013;40(3):236-247. <https://doi.org/10.3109/1040841x.2013.776512>.
12. Wei R., Zimmermann W. Biocatalysis as a green route for recycling the recalcitrant plastic polyethylene terephthalate. *Microbial Biotechnology*. 2017;10:1302-1307. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12714>.
13. Carr C. M., Clarke D. J., Dobson A. D. W. Microbial polyethylene terephthalate hydrolases: current and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*. 2020;11:571265. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.571265>.
14. Kawai F., Kawabata T., Oda M. Current state and perspectives related to the polyethylene terephthalate hydrolases available for biorecycling. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2020;8:8894-8908. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c01638>.
15. Then J., Wei R., Oeser T., Gerdts A., Schmidt J., Barth M., 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;6:425-432. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12053>.
16. Roth C., Wei R., Oeser T., Then J., Föllner C., Zimmermann W., et al. Structural and functional studies on a thermostable polyethylene terephthalate degrading hydrolase from *Thermobifida fusca*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2014;98:7815-7823. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5672-0>.
17. Bollinger A., Thies S., Knieps-Grünhagen E., Gertzen C., Kobus S., Höppner A., et al. A novel polyester hydrolase from the marine bacterium *Pseudomonas aestusnigri* – structural and functional insights. *Frontiers in Microbiology*. 2020;11(114). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00114>.

18. Danso D., Chow J., Streit W. R. Plastics: microbial degradation, environmental and biotechnological perspectives. *Applied and Environmental Microbiology*. 2019;85:01095-1019. <https://doi.org/10.1128/AEM.01095-19>.
19. Ronkvist A., Xie W., Lu W., Gross R. A. Cutinase-catalyzed hydrolysis of poly(ethylene terephthalate). *Macromolecules*. 2009;42:5128-5138. <https://doi.org/10.1021/ma9005318>.
20. Taniguchi I., Yoshida S., Hiraga K., Miyamoto K., Kimura Y., Oda K. Biodegradation of PET: current status and application aspects. *ACS Catalysis*. 2019;9(5):4089-4105. <https://doi.org/10.1021/acscatal.8b05171>.
21. Yoshida S., Hiraga K., Takehana T., Taniguchi I., Yamaji H., Maeda Y., et al. A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). *Science*. 2016;351(6278):1196-1199. <https://doi.org/10.1126/science.aad6359>.
22. Tanasupawat S., Takehana T., Yoshida S., Hiraga K., Oda K. *Ideonella sakaiensis* sp. nov., isolated from a microbial consortium that degrades poly(ethylene terephthalate). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2016;66:2813-2818. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001058>.
23. Bornscheuer U. T. Feeding on plastic. *Science*. 2016;351(6278):1154-1155. <https://doi.org/10.1126/science.aaf2853>.
24. Silva C. M., Carneiro F., O'Neill A., Fonseca L. P., Cabral J. S., Guebitz G., et al. Cutinase – a new tool for biomodification of synthetic fibers. *Journal of Polymer Science. Part A – Polymer Chemistry*. 2005;43:2448-2450. <https://doi.org/10.1002/pola.20684>.
25. Sulaiman S., Yamato S., Kanaya E., Kim J.-J., Koga Y., Takano K., et al. Isolation of a novel cutinase homolog with polyethylene terephthalate-degrading activity from leaf-branch compost by using a metagenomic approach. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012;78:1556-1562. <https://doi.org/10.1128/aem.06725-11>.
26. Palm G. J., Reisky L., Böttcher D., Müller H., Michels E. A. P., Walczak M. C., et al. Structure of the plastic-degrading *Ideonella sakaiensis* MHETase bound to a substrate. *Nature Communications*. 2019;10(1):1717. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09326-3>.
27. Liu C. C., Shi C., Zhu S., Wei R., Yin C. C. Crystal structure of PETase from *Ideonella sakaiensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2019;508:289-294. <https://doi.org/10.2210/pdb6ILW/pdb>.
28. Austin H. P., Allen M. D., Donohoe B. S., Rorrer N. A., Kearns F. L., Silveira R. L., et al. Characterization and engineering of a plastic-degrading aromatic polyesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018;115(19):E4350-E4357. <https://doi.org/10.1073/pnas.1718804115>.
29. Furukawa M., Kawakami N., Tomizawa A., Miyamoto K. Efficient degradation of poly(ethylene terephthalate) with *Thermobifida fusca* cutinase exhibiting improved catalytic activity generated using mutagenesis and additive-based approaches. *Scientific Reports*. 2019;9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52379-z>.
30. Chen S., Su L., Chen J., Wu J. Cutinase: characteristics, preparation, and application. *Biotechnology Advances*. 2013;31:1754-1767. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.09.005>.
31. Joo S., Cho I. J., Seo H., Son H. F., Sagong H.-Y., Shin T. J., et al. Structural insight into molecular mechanism of poly(ethylene terephthalate) degradation. *Nature Communications*. 2018;9(382):1-12. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02881-1>.
32. Liu B., He L., Wang L., Li T., Li C., Liu H., et al. Protein crystallography and site-direct mutagenesis analysis of the poly (ethylene terephthalate) hydrolase petase from *Ideonella sakaiensis*. *ChemBioChem*. 2018;19:1471-1475. <https://doi.org/10.1002/cbic.201800097>.
33. Fecker T., Galaz-Davison P., Engelberger F., Narui Y., Sotomayor M., Parra L. P., et al. Active site flexibility as a hallmark for efficient PET degradation by *I. sakaiensis* PETase. *Biophysical Journal*. 2018;114:1302-1312. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.02.005>.
34. Renault L., Nègre V., Hotelier T., Cousin X., Marchot P., Chatonnet A. New friendly tools for users of ESTHER, the database of the α/β -hydrolase fold superfamily of proteins. *Chemico-Biological Interactions*. 2005;157-158:339-343. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.10.100>.
35. Knott B. C., Erickson E., Allen M. D., Gado J. E., Graham R., Kearns F. L., et al. Characterization and engineering of a two-enzyme system for plastics depolymerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020;117(41):25476-25485. <https://doi.org/10.1073/pnas.2006753117>.
36. Allen M. D., Johnson C. W., Knott B. C., Beckham G. T., McGeehan J. E. Structure of MHETase from *Ideonella sakaiensis*. *Biotechnology and Biological Sciences Research Council*. 2020;117:25476-25485. <https://doi.org/10.2210/pdb6QZ4/pdb>.
37. Sagong H.-Y., Seo H., Kim T., Son H. F., Joo S., Lee S. H., et al. Decomposition of the PET film by MHETase using exo-PETase function. *ACS Catalysis*. 2020;10:4805-4812. <https://doi.org/10.1021/acscatal.9b05604>.
38. Chen C. C., Han X., Ko T. P., Liu W., Guo R. T. Structural studies reveal the molecular mechanism of PETase. *FEBS Journal*. 2018;285:3717-3723. <https://doi.org/10.1111/febs.14612>.
39. Han X., Liu W., Huang J.-W., Ma J., Zheng Y., Ko T.-P., et al. Structural insight into catalytic mechanism of PET hydrolase. *Nature Communications*. 2017;8:1-7. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02255-z>.
40. Mückschel B., Simon O., Klebensberger J., Graf N., Rosche B., Altenbuchner J., et al. Ethylene glycol metabolism by *Pseudomonas putida*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012;78:8531-8539. <https://doi.org/10.1128/aem.02062-12>.

41. Tournier V., Topham C. M., Gilles A., David B., Folgoas C., Moya-Leclair E. An engineered PET depolymerase to break down and recycle plastic bottles. *Nature*. 2020;580:216-219. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2149-4>.

42. Sheehan R. J. Terephthalic acid, dimethyl terephthalate, and isophthalic acid. In: *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*. Wiley; 2011. https://doi.org/10.1002/14356007.a26_193.pub2.

43. Samak N. A., Jia Y., Sharshar M. M., Mu T.,

Yang M., Peh S., et al. Recent advances in biocatalysts engineering for polyethylene terephthalate plastic waste green recycling. *Environment International*. 2020;145:1-18. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106144>.

44. Sheldon R. A., Norton M. Green chemistry and the plastic pollution challenge: towards a circular economy. *Green Chemistry*. 2020;22(19):6310-6322. <https://doi.org/10.1039/D0GC02630A>.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Д. В. Белов,

к.х.н., доцент, старший научный сотрудник,
Институт прикладной физики РАН,
603950, г. Нижний Новгород, ул. Ульянова, 46,
Российская Федерация,
belov.denbel2013@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7190-0477>

С. Н. Беляев,

младший научный сотрудник,
Институт прикладной физики РАН,
603950, г. Нижний Новгород, ул. Ульянова, 46,
Российская Федерация,
serg_belyaev@bk.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2346-9103>

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

*Все авторы прочитали и одобрили
окончательный вариант рукописи.*

Информация о статье

Поступила в редакцию 27.05.2022.
Одобрена после рецензирования 08.06.2022.
Принята к публикации 15.06.2022.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Denis V. Belov,

Cand. Sci. (Chemistry),
Institute of Applied Physics of the RAS,
46, Ul'yanov St., 603950, Nizhny Novgorod,
Russian Federation,
belov.denbel2013@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7190-0477>

Sergey N. Belyaev,

Junior Researcher,
Institute of Applied Physics of the RAS,
46, Ul'yanov St., 603950, Nizhny Novgorod,
Russian Federation,
serg_belyaev@bk.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2346-9103>

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests
regarding the publication of this article.

*The final manuscript has been read
and approved by all the co-authors.*

Information about the article

The article was submitted 27.05.2022.
Approved after reviewing 08.06.2022.
Accepted for publication 15.06.2022.