

# Enzimi za razgradnju sintetskih poliestera

---

**Bukovec, Adrian**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:601085>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-18**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijски odsjek

Adrian Bukovec

Student 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# Enzimi za razgradnju sintetskih poliestera

## Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Aleksandra Maršavelski

Zagreb, 2023.



Datum predaje prve verzije Završnog rada:

30. lipnja 2023.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

08. rujna 2023.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Aleksandra Maršavelski

Potpis:



# Sadržaj

<b>§ SAŽETAK.....</b>	<b>VII</b>
<b>§ 1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1. Sintetski polimeri .....	1
1.2. Enzimski katalizirana sinteza poliestera .....	2
1.3. Prirodna razgradnja sintetskih polimera .....	3
<b>§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME.....</b>	<b>4</b>
2.1. Enzimski katalizirana razgradnja poliestera .....	4
2.1.1. Mehanizam razgradnje sintetskih polimera .....	4
2.1.2. Mehanizam razgradnje aromatskih poliestera (PET-a).....	5
2.2. Enzimi koji kataliziraju razgradnju sintetskih poliestera .....	6
2.2.1. $\alpha/\beta$ hidrolaze.....	7
2.3. Enzimi za razgradnju poli(etilen-tereftalat)-a .....	8
2.3.1. Kutinaza .....	8
2.3.2. PET-aza.....	9
2.3.3. Hidrolaze iz <i>Thermobifida fusca</i> te <i>Thermomonospora curvata</i> .....	12
2.3.4. Strategije poboljšanja aktivnosti enzima.....	13
2.4. Enzimi za razgradnju polilaktične kiseline .....	14
2.4.1. Proteinaza K.....	16
2.4.2. Kutinaze za razgradnju PLA.....	17
<b>§ 3. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>18</b>
<b>§ 4. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>XIX</b>



## § Sažetak

Plastika u modernom dobu jedan je od najraširenijih materijala te se koristi u razne svrhe. S plastikom se susrećemo svakodnevno u obliku vrećica, omota, raznih aparata i alata te zbog njene nerazgradivosti ili jako spore razgradnje, plastika predstavlja velik ekološki problem. Iako je i sam proces proizvodnje plastike ekološki neprihvatljiv, još veću opasnost za biosferu predstavljaju ogromne količine odbačene plastike. Iz godine u godinu, tone i tone plastike završavaju u našim šumama, poljima te oceanima što znatno ugrožava biljke i životinje koje obitavaju na tim područjima.

Razmatrani su razni načini za smanjivanje otpadne plastike, no standardnim fizikalno-kemijskim metodama nije pronađena metoda za ekološki prihvatljivu razgradnju sintetskih polimera poput polietilena (PE), poli(etilen-tereftalat)-a (PET), poliuretana (PU), polistirena (PS), polipropilena (PP) te polivinil klorida (PVC) koji sačinjavaju veliku većinu otpadne plastike. Kako bi se ovi polimeri razgradili na siguran način za okoliš razmatraju se biokemijski te mikrobiološki načini razgradnje. Pronađeni su mikroorganizmi koji pokazuju mogućnost enzimski katalizirane razgradnje sintetičkih polimera. Enzimi takvih organizama su izolirani te okarakterizirani kako bi se pronašao enzim koji bi efikasno razgradio gore navedene polimere.

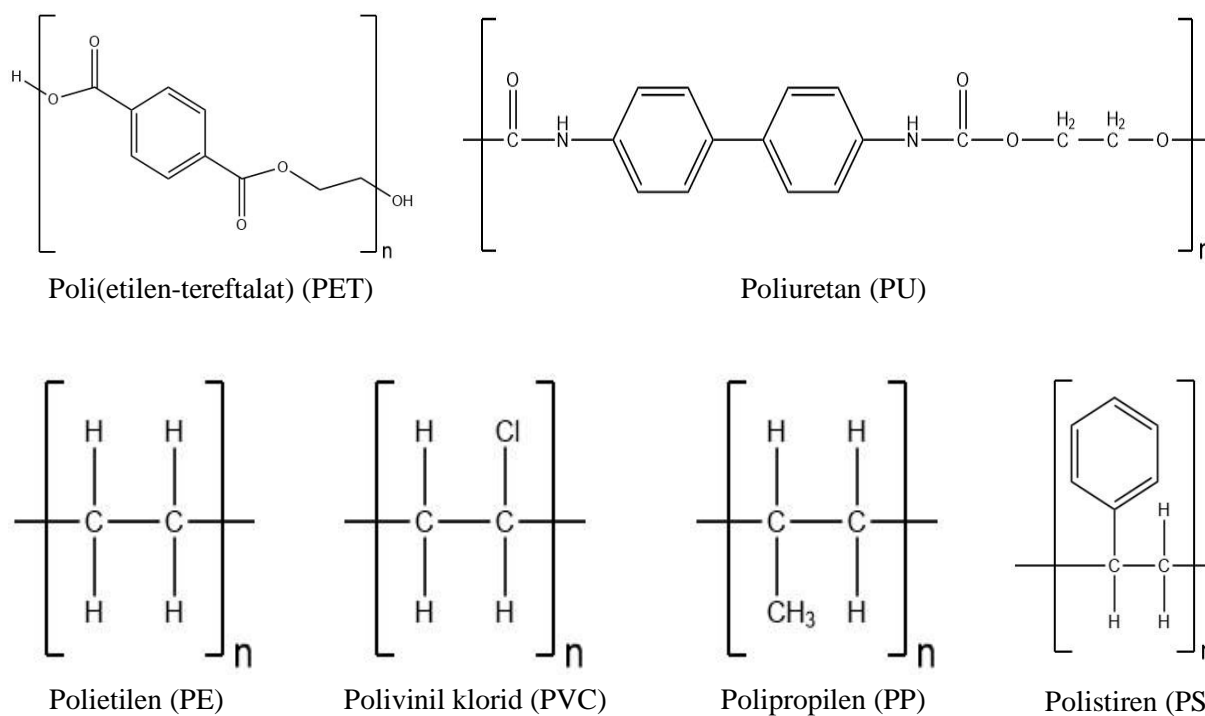


## § 1. UVOD

### 1.1. Sintetski polimeri

Plastiku možemo podijeliti na bioplastiku te na fosilnu plastiku s obzirom na početnu sirovinu. Jedna od razlika tih plastika je veća biorazgradivost bioplastika naspram fosilnih plastika. Naime, bioplastici poput polihidroksialkanoata (PHA) te polilaktične kiseline (PLA) potrebno je tek nekoliko mjeseci pa do nekoliko godina da se razgradi 50% mase (vrijeme poluraspada), dok je fosilnim plastikama potrebno najmanje desetak pa sve do nekoliko stotina godina.<sup>1</sup> Iako su bioplastike ekološki prihvatljivije zbog proizvodnog procesa te biorazgradivosti i dalje se najviše koriste fosilne plastike zbog veće čvrstoće, izdržljivosti te jeftine proizvodnje.<sup>2</sup>

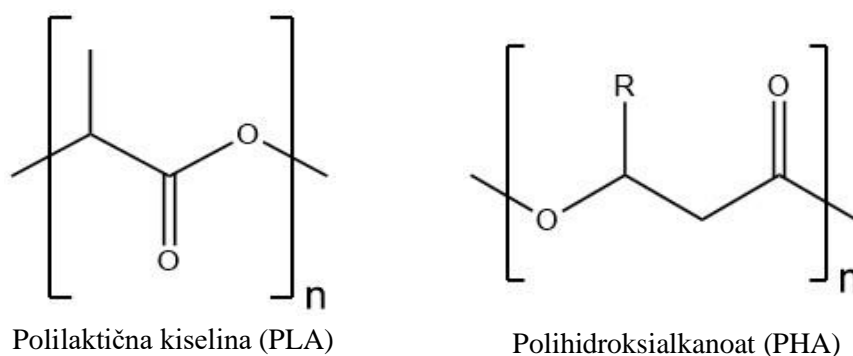
Fosilnu plastiku možemo dalje podijeliti prema građi na polimere sa potpuno ugljičnim skeletom te na polimere sa esterskim vezama u glavnim lancima te bočnim ograncima. PET i PU spadaju u aromatske poliestere, dok PE, PP, PS i PVC spadaju u polimere sa potpuno ugljičnim skeletom kao što je vidljivo sa slike 1. Heteroatomi te bočni ogranci dodatno



Slika 1. Strukture sintetskih polimera fosilnog porijekla (Strukture napravljene pomoću ChemDraw softvera)

stabiliziraju ove polimere preko vodikovih veza te interakcija slaganja (engl. stacking interactions) što se znatno odražava na jačinu materijala koje oni grade te konačno na njihovu biorazgradivost koja se još dodatno smanjuje dodatkom raznih primjesa poput antioksidansa te stabilizatora.<sup>3</sup>

Bioplastika za sada čini jedan manji dio proizvodnje, no lagano se počinje sve više koristiti kao ekološki prihvatljivija alternativa za plastike fosilnog porijekla. Da bi polihidroksialkanoati te polilaktična kiselina uspješno zamijenili fosilne plastike potrebno je unaprijediti izdržljivost te upotrjebljivost tih poliestera, a da se pritom ne izgubi njihova biorazgradivost i da se smanji cijena proizvodnje ovakvih poliestera. PLA te PHA su oboje alifatski poliesteri kao što je vidljivo sa slike 2.



Polilaktična kiselina (PLA)

Polihidroksialkanoat (PHA)

*Slika 2. Strukture najčešćih poliestera bio porijekla (Strukture napravljene pomoću ChemDraw softvera)*

PLA se može dobiti polimerizacijom monomera laktične kiseline, no najzastupljeniji način dobivanja je polimerizacijom otvaranja prstena laktida, dimera laktata.<sup>4</sup> PHA sintetiziraju enzimi mikroorganizama koji koriste ove poliestere kao skladišni oblik ugljika. Zbog velikog broja različitih monomernih podjedinica, polihidroksialkanoati predstavljaju najveću skupinu prirodnih polimernih estera.<sup>5,6</sup>

## 1.2. Enzimski katalizirana sinteza poliestera

Kako bi se proces proizvodnje ekološki prihvatljivijih oblika plastike unaprijedio, počele su se istraživati i biokemijske metode sinteze. Naime, enzimski katalizirane sinteze poliestera imaju mnoge prednosti naspram tradicionalne sinteze koja uključuje metalne katalizatore te organska otapala. Enzimi koji provode sintezu pri blagim, vodenim uvjetima predstavljaju zelenu alternativu, a uz to strogo su regio i stereo specifični što otvara vrata za ciljanu ugradnju funkcionalnih skupina na specifična predodređena mjesta.

Kao najčešći biološki katalizatori se koriste enzimi esteraze, transferaze te oksidoreduktaze. Iako esteraze inače u vodenim uvjetima kataliziraju hidrolitičko cijepanje esterskih veza, u organskim otapalima pokazuju obrnutu aktivnost te kataliziraju reakcije esterifikacije i transesterifikacije. Najčešće korišten te najbolje okarakteriziran enzim kod sinteze poliestera je lipaza B iz *Candida antarctica* (CALB).<sup>7</sup>

Dva se mehanizma najčešće koriste kod sinteze poliestera koji grade bioplastiku, a to su polikondenzacija estera te polimerizacija otvaranjem prstena (ring-opening polymerisation, ROP). Oba mehanizma uključuju nastanak acil-enzim kompleksa na kojeg alkohol vrši nukleofilni napad, a nastali ester ponovno stupa u ciklus pri čemu dolazi do elongacije. Kombiniranjem ta dva mehanizma te inkubacijom pri različitim temperaturama uz odvođenje nusprodukata osigurava se kontinuirana kondenzacija sve većih poliestera u funkcionalne strukture. Kako bi se poboljšala svojstva dobivenih polimera oni podliježu enzimski kataliziranim modifikacijama koje doprinose funkcionalizaciji. Te modifikacije mogu uključivati vezanje dobivenih poliestera na neke prirodne polimere poput celuloze ili vezanje više sintetskih poliestera zajedno u svrhu da se postigne zamišljeni učinak.<sup>5,7</sup>

### 1.3. Prirodna razgradnja sintetskih polimera

Zbog konstantne potrebe za jeftinim i čvrstim materijalima poput plastike, velike količine otpada se nakupljaju iz godine u godinu što predstavlja velik ekološki problem zbog slabe biorazgradivosti ovih polimera. Standardni načini razgradnje ovih materijala u prirodi se dijele na fizikalne, kemijske te biološke. Fizikalne promjene uzrokovane nekim mehaničkim trošenjem fragmentiraju i usitnjavaju čestice plastike, a zatim kemijskim i biološkim procesima se one oksidativno te hidrolitički razgrađuju. Kako bi se ovi procesi nesmetano odvijali poželjan je stalan dotok svjetla i kisika što uvijek nije dostupno.

Velike količine plastike završavaju u morima i oceanima, što predstavlja problem jer to dodatno usporava razgradnju zbog nedostupnosti kisika te slabog dopiranja svjetla. Uz to, bitan faktor je i temperatura. Za neke stabilnije poliestere potrebna je jako visoka temperatura kako bi razgradnja napredovala što je gotovo nemoguće postići u prirodnim uvjetima. Primjer takvog polimera je polietilen za čiju razgradnju bez prisutnosti sunčeve svjetlosti trebaju temperature preko 100 °C, a bez sunčeve svjetlosti i kisika je potrebno i preko 350 °C.<sup>1,8</sup>

## § 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

### 2.1. Enzimski katalizirana razgradnja poliestera

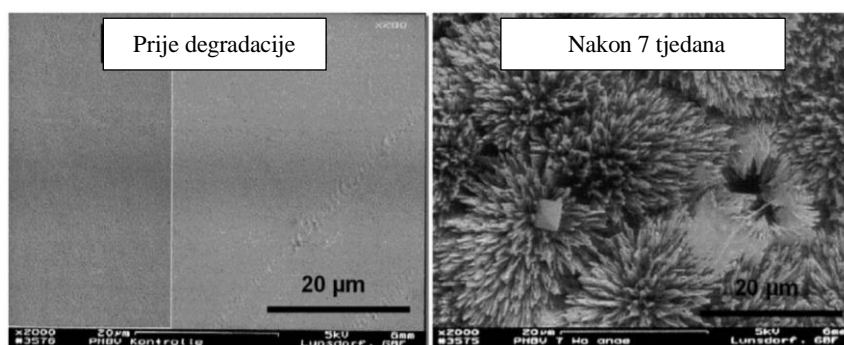
Proizvodnja biorazgradivih materijala koji bi zamijenili fosilnu plastiku samo je jedan korak prema održivoj budućnosti. Kako bi se riješio problem štetnog utjecaja plastike na okoliš potrebno je zbrinuti velike količine otpadne plastike koja narušava ekološku ravnotežu u ekosustavu. Za rješenje ovog problema pažnja se okrenula prema mikroorganizmima koji su pokazali sposobnost razgrađivanja sintetskih alifatskih polimera, a ponajprije aromatskih poliestera zbog njihove iznimno slabe biorazgradivosti.

Poli(etilen-tereftalat) (PET) se dugo vremena smatrao biološki nerazgradivim, no pronađeni su i organizmi koji pokazuju mogućnost razgradnje aromatskih poliestera poput PET-a.

#### 2.1.1. *Mehanizam razgradnje sintetskih polimera*

Kod polimera sa potpuno ugljičnim skeletom poput PE-a, PP-a, PS-a te PVC-a imamo oksidativnu degradaciju koja najčešće zahtjeva UV radijaciju te kisik. Temperatura također ima bitnu ulogu. Pri povišenim temperaturama mobilnost polimernih lanaca se povećava te oni postaju lakše dostupni vanjskim utjecajima. Razgradnja ovih polimera započinje ili djelovanjem mikroorganizama koji se nalaze u odlagalištima ili vanjskim utjecajima poput ultraljubičastog zračenja čime se oksidiraju polimerni lanci te nastaju karbonilne skupine. Mikroorganizmi se zatim vežu na površinu plastike te površinskom erozijom cijepaju polimere u manje fragmente koje potom mogu unijeti u organizam. Zbog veličine te kompleksne strukture polimernih lanaca mikroorganizmi luče ekstracelularne enzime koji oksidativnim cijepanjem dugih polimernih lanaca daju karboksilne kiseline različitih molarnih masa. Zbog svoje veličine enzimi mogu samo površinskom erozijom skidati sloj po sloj materijala pri čemu teže razgradivi elementi zaostaju, a na površini se stvaraju kompleksne strukture kao što je

prikazano na slici 3. Karboksilne kiseline nastale fragmentacijom, kada im se dovoljno reducira masa bivaju asimilirane u stanicu gdje podliježu  $\beta$ -oksidaciji.<sup>3,9</sup>



Slika 3. Poli(hidroksibutirat-co-hidroksivalerat)(PHBV) inkubiran s anaerobnim mikroorganizmom (*Clostridium*) pri 35°C (ilustracija preuzeta i prilagođena prema ref. 3)

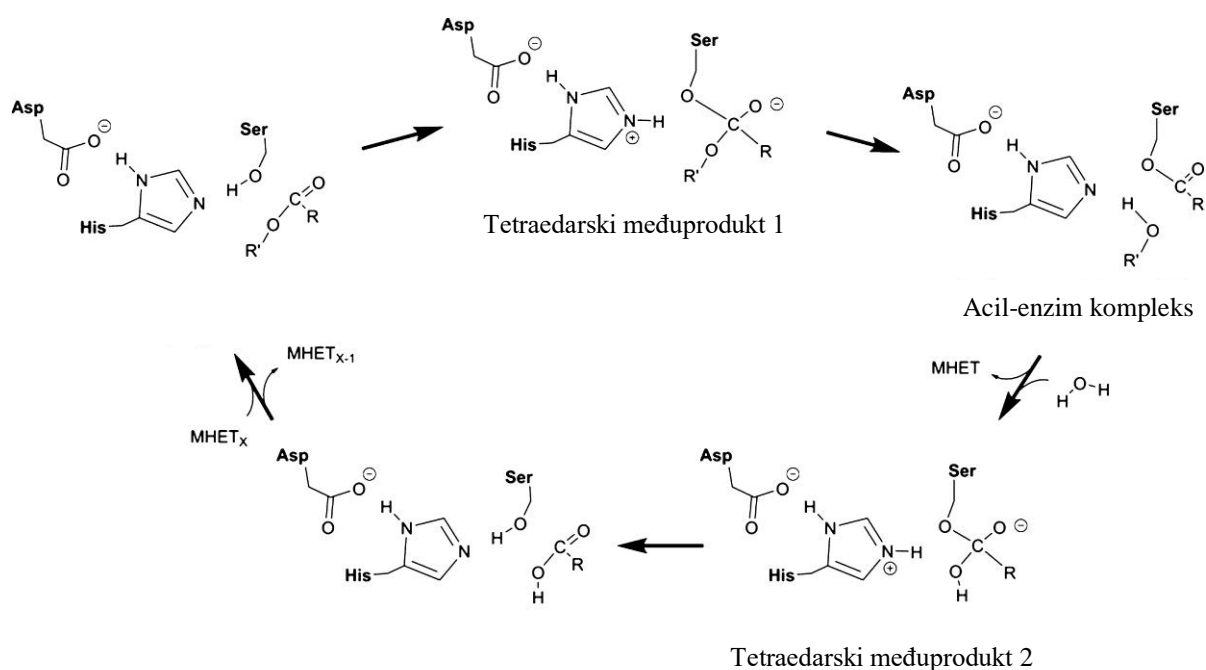
Poliesteri poput PET-a te PU-a zbog heteroatoma u glavnom lancu pokazuju dodatnu stabilnost. Njihova razgradnja se najčešće odvija foto-oksidativnim putem ili hidrolizom što rezultira otpuštanjem manjih fragmenata sa karboksilnim skupinama na krajevima. Temperatura također igra bitnu ulogu u njihovoj razgradnji. Zbog njihove kristalne strukture potrebna je jako visoka temperatura kako bi polimerni lanci postali dostupni enzimu što stvara problem zbog velike nestabilnosti većine enzima pri povišenim temperaturama.<sup>3,9</sup>

### 2.1.2. Mehanizam razgradnje aromatskih poliesteri (PET-a)

PET je poliester sastavljen od više mono(2-hidroksietil)-tereftalata (MHET) povezanih esterskim vezama. Najčešći mehanizmi enzimske razgradnje PET-a uključuju hidrolitičko cijepanje esterskih veza kojima su povezane MHET podjedinice što daje slobodan mono(2-hidroksietil)-tereftalat te ponekad kao sekundarni produkti mogu nastati male količine bis(2-hidroksietil)-tereftalata (BHET) te tereftalna kiselina (TPA). Zasebni enzimi zatim kataliziraju hidrolizu BHET-a u MHET te zatim daljnjom razgradnjom MHET-a nastaju TPA te etilen glikol (EG) koji se mogu uključiti u metaboličke puteve stanice te bivaju korišteni kao kataboliti ili anaboliti u metaboličkim reakcijama.<sup>3</sup>

Enzimi poput PET-aza te kutinaza spadaju u serinske proteaze te dijele istu katalitičku trijadu; Ser-His-Asp, a pokazalo se da ovi enzimi mogu depolimerizirati PET sa dovoljnom specifičnošću te efikasnošću. Uz katalitičku trijadu ovi enzimi koriste isti mehanizam za hidrolizu polimernih lanaca poli(etilen-tereftalata) koji se odvija u 4 koraka te ide preko dva tetraedarska međuprodukta.

U prvom koraku histidin deprotonira serin koji onda vrši nukleofilan napad na esterski ugljik polimernog lanca pri čemu nastaje prvi tetraedarski međuprodukt. Nastali nestabilni međuprodukt zatim deprotonira histidin, odnosno protonira se prvi izlazni produkt te nastaje stabilni acil-enzim kompleks, a sa katalitičkog mjesta izlazi molekula monohidroksietilen tereftalata ili skraćeni fragment PET lanca (na slici 4 obilježen kao R'-O-H). U trećem koraku u aktivno mjesto ulazi molekula vode te ju histidin deprotonira pri čemu nastaje jak nukleofil. Nastali hidroksidni ion zatim vrši nukleofilni napad na karbonilni ugljikov atom acil-enzim kompleksa te nastaje drugi tetraedarski međuprodukt. Zatim u konačnom koraku, druga molekula MHET-a, odnosno ostatak pocijepane molekule PET-a je otpušten (na slici 4 obilježen kao R''-COOH), a deprotonirani serinski ostatak uzima proton sa histidina pri čemu se aktivno mjesto enzima regenerira te je spremno za slijedeći katalitički ciklus. Opisani mehanizam je slikovno prikazan na slici 4.<sup>10</sup>



Slika 4. Pretpostavljeni mehanizam hidrolize PET-a (Ilustracija preuzeta i prilagođena prema ref. 9 )

## 2.2. Enzimi koji kataliziraju razgradnju sintetskih poliestera

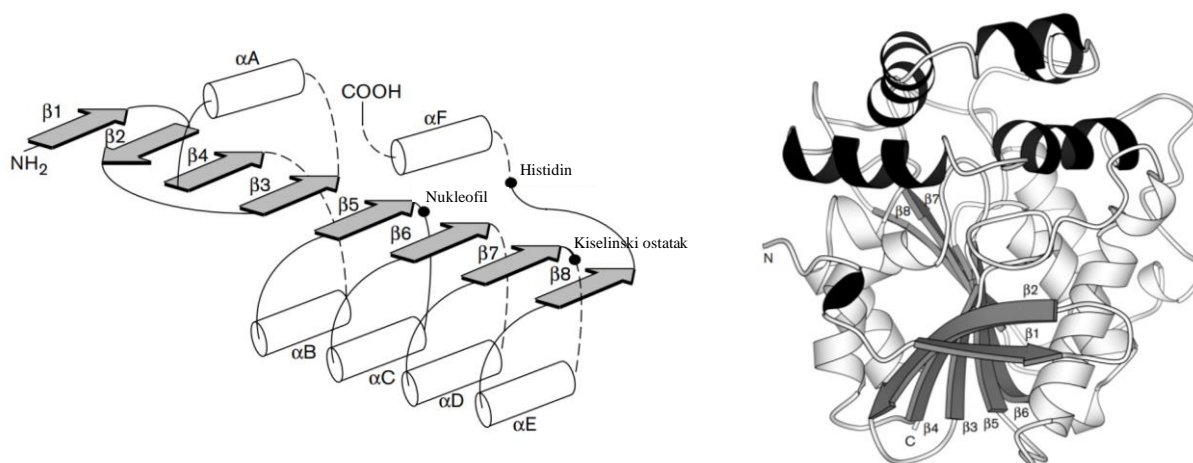
U posljednje vrijeme velik interes je usmjeren prema mikroorganizmima koji su pokazali da mogu razgraditi polimerne lance PET plastike te koristiti produkte razgradnje kao izvor ugljika i energije. Kako bi se plastika mogla razgrađivati na industrijskoj razini potrebno je još napretka

u ovom polju, no ovi mikroorganizmi predstavljaju dobru početnu točku iz koje se može doći do ekološki i ekonomski prihvatljivog načina zbrinjavanja plastičnog otpada.

Pokazalo se da najviše potencijala ima nekolicina bakterijskih vrsta poput; *Ideonella sakaiensis*, *Thermobifida fusca*, *Thermobifida alba*, *Pseudomonas aestusnigri*, te neke gljive poput; *Fusarium*, *Humicola*, *Candida antarctica*, *Penicillium sp.* Svi ovi organizmi posjeduju enzime koji pokazuju mogućnost hidrolize PET plastike te su to hidrolaze karboksilnih estera koje spadaju u skupinu  $\alpha/\beta$  hidrolaza.<sup>11,12</sup>

### 2.2.1. $\alpha/\beta$ hidrolaze

$\alpha/\beta$  hidrolaze predstavljaju skupinu enzima koji sadrže evolucijski očuvanu tercijarnu domenu koja se sastoji od osam  $\beta$ -nabranih ploča okruženih  $\alpha$ -zavojnica. Ovakav raspored sekundarnih motiva predstavlja stabilnu strukturu koja služi za izgradnju aktivnog mjesta koje se sastoji od evolucijski očuvane trijade koja se sastoji od nukleofila, kiselnog ostatka te apsolutno očuvanog histidina (slika 5).



Slika 5. Shematski prikaz  $\alpha/\beta$  domene gdje su označene lokacije katalitičkih mjesta, a  $\beta$ -nabrane ploče su označene strelicama i  $\alpha$ -zavojnice cilindrima dok je crtkanom linijom označeno područje mogućih umetaka (lijevo). Trodimenzionalni model strukture A. radiobacter AD1 epoksid hidrolaze sa svijetlo označenim očuvanim dijelovima domene, a tamno označenim poklopcem (desno). (Ilustracija preuzeta i prilagođena prema ref. 11)

Dijelovi strukture su čvršće očuvani, poput 8  $\beta$ -nabranih ploča koje grade aktivno mjesto, dok se fleksibilniji dijelovi domene mogu razlikovati za nekoliko aminokiselina pa sve do cijelih domena. Moguće su razno razne varijacije u cjelovitoj strukturi, ali da bi se enzim mogao svrstati u skupinu  $\alpha/\beta$  hidrolaza mora sadržavati 8  $\beta$ -nabranih ploča te katalitičku trijadu. Odličan primjer toga su lipaze, one uz očuvane dijelove  $\alpha/\beta$  domene imaju dodatnu domenu

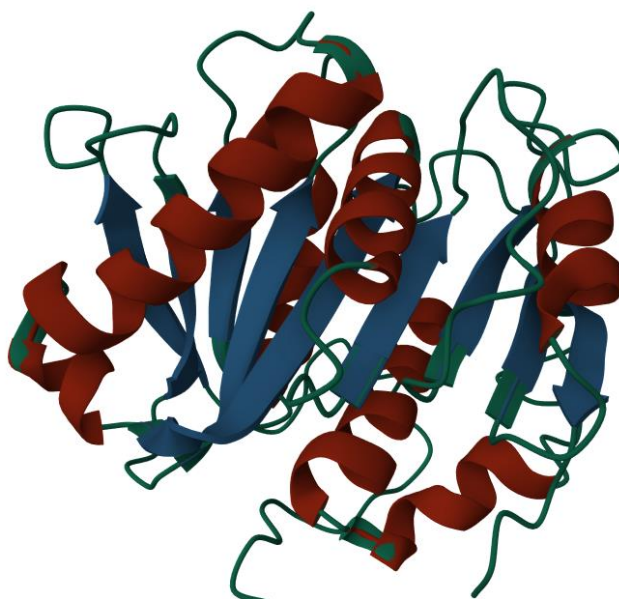
koja funkcionira kao poklopac koji služi za regulaciju aktivnosti. Prilikom aktivacije enzima, konformacijske promjene dovode do otvaranja poklopca i izlaganju aktivnog mjesta mediju u kojem se nalazi čime se omogućuje vezanje supstrata.

Uz katalitičku trijadu, velika većina enzima ove skupine ima očuvane aminokiselinske sljedove koji definiraju poziciju oksianionske rupe te hidrofobnog džepa koji služe za pozicioniranje supstrata u aktivno mjesto te za stabilizaciju međuprodukata reakcija koje ti enzimi kataliziraju.<sup>13</sup>

## 2.3. Enzimi za razgradnju poli(etilen-tereftalat)-a

### 2.3.1. Kutinaza

Kutinaze su enzimi čija je primarna funkcija razgradnja kutina, prirodnog polimera koji se nalazi u biljkama. Ovi enzimi spadaju u  $\alpha/\beta$  hidrolaze te im se struktura sastoji od devet  $\beta$ -nabranih ploča te osam  $\alpha$ -zavojnica sa karakterističnom Ser-His-Asp katalitičkom trijadom. Kao karakteristično strukturno obilježje imaju disulfidni most između Cys241 te Cys249 što im povećava stabilnost, iako glavni doprinos stabilnosti ovog enzima naspram drugih čini broj intermolekulskih vodikovih veza. Aktivno mjesto im je otvoreno te prima širok spektar supstrata no najbolje je prilagođeno kutinu (slika 6.). Naime, kutinaze su prvo okarakterizirane



Slika 6. Trodimenzionalna struktura kutinaze iz *T. fusca* (Slika napravljena pomoću vizualizacije integrirane u RCSB PDB bazi (<https://www.rcsb.org/>); PDB ID: 4CG3 (ref. 10))



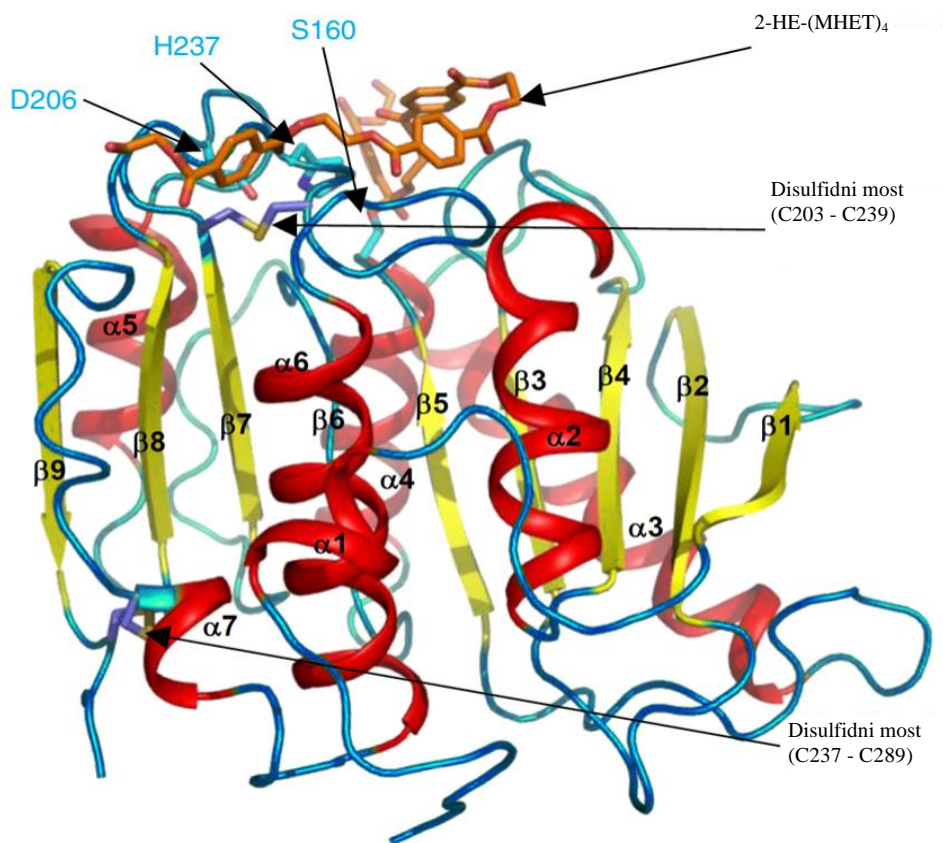
u biljnim patogenima koji koriste ovaj enzim kako bi probili kutinski sloj na površini biljke te je tako inficirali.<sup>11</sup>

Zbog svojeg aktivnog mjesta niske specifičnosti te stabilnosti pri višim temperaturama, kutinaze su pridobile na pažnji kao izvrsni kandidati za razgradnju aromatskih poliestera. Iznimnu termostabilnost te mogućnost razgradnje PET plastike pokazuju kutinaze izolirane iz metagenoma komposta lišća i granja kao i više bakterijskih i gljivičnih vrsta poput termofilnih aktinomiceta (*Thermobifida fusca*, *Thermobifida cellulosilytica*, *Saccharomonospora viridis*) te termofilnih gljiva poput *Humicola insolens* što ih čini izvrsnim kandidatima za mikrobiološku degradaciju plastičnog otpada.<sup>6,12,14</sup> Problem kod razgradnje PET plastike jest njen visoki kristalinitet što znatno umanjuje mobilnost polimernih lanaca te tako otežava pozicioniranje lanca u aktivno mjesto enzima. Kako bi se mobilnost lanaca povećala potrebna je temperatura blizu temperature mekšanja određenog polimernog lanca što je za PET visoke kristalnosti otprilike 75-80 °C na zraku, odnosno 65-70 °C u vodi.<sup>3</sup> Kutinaze izolirane iz navedenih termofilnih bakterija te gljiva pokazuju velik postotak aktivnosti pri temperaturama većim od 50 °C zbog čega su pridobile na pažnji. Od njih najviše potencijala ima kutinaza iz *Saccharomonospora viridis* (Cut190) koja je izolirana iz metagenoma komposta. Iako ovaj enzim posjeduje veliku aktivnost pri visokim temperaturama i dalje se gubi aktivnost blizu temperature mekšanja PET polimernih lanaca. Uvođenjem mutacija, stabilnost ove kutinaze se može znatno povećati te je uspješno dobivena kutinaza Cut190 sa temperaturom mekšanja ( $T_m$ ) od 82 - 85 °C. Prilagođavanjem još nekih dodatnih uvjeta poput pH te koncentracije  $Ca^{2+}$  iona zapažena je još veća aktivnost te količina produkata hidrolize. Velik utjecaj na hidrolizu ima i aktivna površina pri čemu se povećanjem površine supstrata povećava i postotak degradacije. Isto tako sastav medija u kojem se odvijaju reakcije ima važnu ulogu, te se uvođenjem glicerola ili etilen glikola također povećava aktivnost enzima.<sup>15,16</sup>

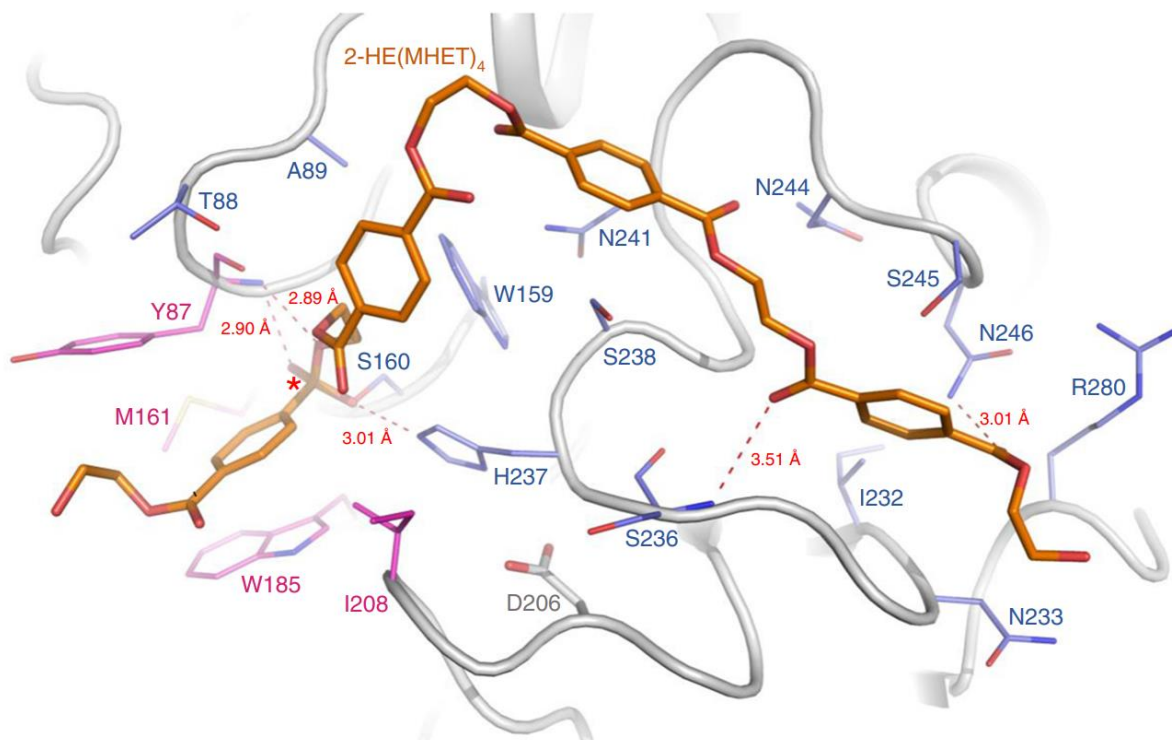
### 2.3.2. PET-aza

Još jedan enzim koji pokazuje sposobnost hidrolizirati PET polimerne lance otkriven je kod bakterije *Ideonella sakaiensis* te je prikladno imenovan PET-azom (*IsPET-aza*). Isto kao i prije spomenute kutinaze, ovaj enzim također spada u skupinu  $\alpha/\beta$  hidrolaza te mu se tercijska struktura sastoji od devet  $\beta$ -nabranih ploča te sedam  $\alpha$ -zavojnica. Kao i većina enzima u ovoj skupini, PET-aza također ima očuvanu katalitičku trijadu Ser-His-Asp u aktivnom mjestu. Uz

katalitičku trijadu, opažena je i oksianionska rupa koju formiraju dušikovi atomi tirozina i metionina. Kristalizacijom ovog enzima u kompleksu sa polimerom 2-hidroksietil-(monohidroksietil tereftalata)<sub>4</sub> (2-HE-(MHET)<sub>4</sub>) određena je struktura veznog mjesta. Polimer sjeda u plitak usjek oblika slova „L“ na površini enzima pri čemu jedna MHET podjedinica sjeda u prvi, kraći i dublji usjek dok ostale tri podjedinice sjedaju u dulji i plići usjek. Kod veznog mjesta prve podjedinice benzenski prsten sjeda u hidrofobni džep kojeg formiraju tirozin i triptofan pri čemu se ostvaruju  $\pi - \pi$  interakcije sa ligandom. U dužem usjeku, ostatak polimera je uglavnom vezan hidrofobnim interakcijama (Slika 7 i 8).<sup>17</sup>



Slika 7. Trodimenzionalna struktura IsPET-aze u kompleksu sa 2-hidroksietil-(monohidroksietil tereftalatom)<sub>4</sub> (Ilustracije preuzete i obrađene prema ref. 17)

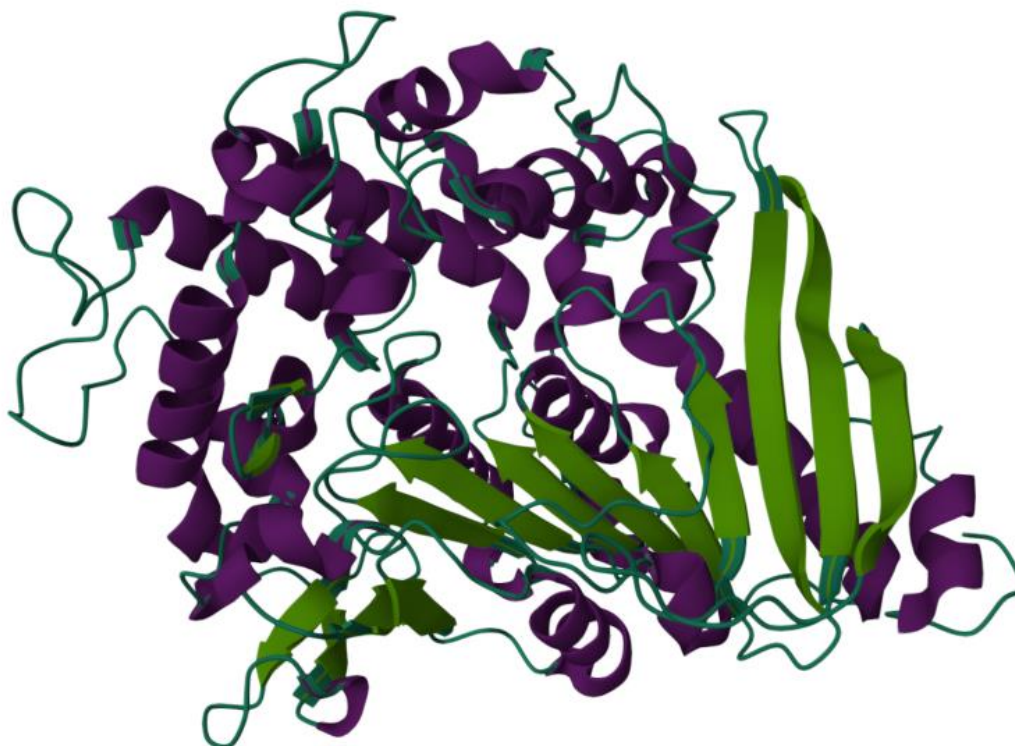


Slika 8. Struktura veznog mjesta supstrata sa označenim aminokiselinskim ostacima koji tvore interakcije sa supstratom (dolje) (Ilustracije preuzete i obrađene prema ref. 17)

Iako posjeduje jednu disulfidnu vezu više od kutinaza, to se znatno ne odražava na termostabilnost ovog enzima već ove dvije disulfidne veze imaju funkciju u formiranju aktivnog mjesta te povećavaju efikasnost vezanja PET lanaca što omogućava ovom enzimu usporedivu razgradnju PET-a pri 30 °C sa kutinazama koje PET razgrađuju pri temperaturi od 50 – 70 °C. <sup>6,11</sup>

Mehanizam razgradnje poliesterskih lanaca kod PET-aze analogan je mehanizmu razgradnje kod kutinaza tako da je glavni produkt MHET, dok se kao sekundarni produkti mogu dobiti BHET te TPA. U bakteriji *Ideonella sakaiensis* pronađen je još jedan enzim koji radi paralelno s PET-azom, a glavni supstrat mu je MHET kojega razgrađuje do TPA te etilen glikola (EG) s dovoljno velikom specifičnošću po čemu je dobio ime MHET-aza. Uz razgradnju MHET-a ovaj enzim je pokazao i mogućnost razgradnje BHET-a što je ključno za potpunu razgradnju PET polimera. Iako je aktivno mjesto visoke specifičnosti za MHET, ciljanom mutagenезom uspješno je pripremljen enzim sa dovoljno velikom specifičnošću i za BHET. MHET-aza također spada u skupinu  $\alpha/\beta$  hidrolaza te kao dodatnu domenu posjeduje velik

poklopac koji osigurava specifičnost enzima, ali ima i katalitičku ulogu zbog optimalnog razmještaja katalitičke trijade koja se djelomično nalazi na poklopcu (Slika 9.).<sup>11,18</sup>



Slika 9. Struktura enzima MEHT-aze iz bakterije *Ideonella sakaiensis* (Slika napravljena pomoću vizualizacije integrirane u RCSB PDB bazi (<https://www.rcsb.org/>); PDB ID: 6QZ3 (ref. 18))

### 2.3.3. Hidrolaze iz *Thermobifida fusca* te *Thermomonospora curvata*

Proučavanjem enzima iz termofilnih aktinomiceta, okarakterizirana je hidrolaza koju *Thermobifida fusca* izlučuje za ekstracelularnu degradaciju poliestera. Izlučena hidrolaza (TfH) je termofilni enzim te joj je optimalna temperatura 65 °C što je dovoljno blizu temperaturi mekšanja PET plastike. Zanimljiva karakteristika ovog enzima je mogućnost razgradnje netopivih poliestera te topivih fragmenata koji se dobiju cijepanjem esterskih veza u polimernom lancu što objedinjuje karakteristike lipaza i esteraza. Termostabilnost te široka specifičnost ovog enzima omogućava razgradnju PET-a na razini usporedivoj s PET-azom te kutinazama zbog čega je TfH izvrstan kandidat za daljnje modifikacije u nadi da se uspije dobiti enzim ili koktel enzima potrebnih za industrijsku razgradnju te recikliranje otpadne plastike.<sup>9</sup>

*Thermomonospora curvata* je također bakterija koja spada u termofilne aktinomicete te pokazuje optimalan rast pri 50 °C. Iz nje su također izolirane i okarakterizirane hidrolaze sa potencijalom za degradaciju sintetskih poliestera. Enzimi Tcur1278 te Tcur0390 spadaju u  $\alpha/\beta$

hidrolaze te imaju zajedničku katalitičku trijadu sa PET-azom te kutinazama. Pokazuju optimalnu aktivnost pri blago alkalnim uvjetima sa pH = 8,5 te pri temperaturi od 50 – 55 °C. Zbog sličnosti sa kutinazom iz *T. fusca* predstavljaju dobru početnu točku za ciljanu mutagenezu sa ciljem povećanja termostabilnosti kao i katalitičke aktivnosti.<sup>19</sup>

#### 2.3.4. Strategije poboljšanja aktivnosti enzima

Svi gore navedeni enzimi u svojim izvornim verzijama divljeg tipa ne predstavljaju velik značaj u degradaciji PET plastike jer nisu dovoljno termostabilni ili aktivno i vezno mjesto nisu specifični za vezanje željenog supstrata ili dolazi do inhibicije produktima. Usprkos nedostacima ovi enzimi imaju mnogo potencijala da ciljanim promjenama u strukturi postanu bolje prilagođeni cijepanju polimernih lanaca PET plastike. Jedan od glavnih načina u optimizaciji aktivnosti enzima pri višim temperaturama je ciljanja mutageneza kojom se uvode stabilizirajuće interakcije poput vodikovih veza ili disulfidnih mostova. Ovim postupkom je unaprijeđena IsPET-aza te uvođenjem 10 mutacija dobivena je DuraPET-aza čija je termostabilnost bila drastično poboljšana što se vidjelo iz povećanja temperature mekšanja enzima za 31 °C ( $T_m = 71$  °C). Daljnjom mutagenezom dobivena je HotPET-aza koja posjeduje još veću termostabilnost ( $T_m = 82,5$  °C) te pokazuje najbolju aktivnost od svih PET-aza.<sup>6</sup> Kao dobra početna točka pokazala se i kutinaza Cut190 iz *Saccharomonospora viridis* koja je ciljanom mutagenezom sedam aminokiselina te delecijom tri aminokiseline postigla  $T_m = 82,7$  °C te postotak degradacije viši od 90% nakon tri dana inkubacije na 65 °C.<sup>6,15</sup>

Uz mutagenezu, obećavajuće rezultate dala je i glikozilacija. Kutinaza iz metagenoma komposta lišća (LCC) je gubila aktivnost pri povišenim temperaturama iako je njen  $T_m = 86$  °C. Utvrđeno je da dolazi do gubitka aktivnosti zbog agregacije enzima pri povišenoj temperaturi što se spriječilo glikozilacijom. Glikozilirana LCC kutinaza pokazivala je povećanu aktivnost i termostabilnost.<sup>6</sup>

Uz modifikacije enzima, dobar način povećanja degradacije PET plastike je dodatak površinski aktivnih tvari. Za IsPET-azu čija je površina pozitivno nabijena, dodavanjem negativno nabijene aktivne tvari poboljšalo je vezanje enzima za površinu plastike i samim time i aktivnost. S druge strane, kutinaza iz *Thermobifide fusca* ima negativno nabijenu površinu pa dodatak pozitivno nabijene površinske tvari dovodi do povećanja aktivnosti enzima. Također,

za veću efikasnost degradacije, vitalnu ulogu ima i aktivna površina supstrata. Usitnjavanjem plastične folije u prah postignut je dva puta veći postotak degradacije u istom vremenu.<sup>6,15</sup>

Inhibicija PET-aza produktima razgradnje također predstavlja velik problem. Kako bi se problem riješio pažnja se usmjerava na enzime koji pokazuju mogućnost razgradnje MHET-a. U ovu svrhu se najčešće koristi IsMHET-aza koja MHET razgrađuje na etilen glikol te tereftalnu kiselinu. Kod enzima divljeg tipa dolazi do usklađene razgradnje PET-a te MHET-a gdje oba enzima funkcioniraju zasebno jedan od drugoga. Kako bi se ta usklađenost poboljšala formiraju se dvo-enzimski sustavi u kojima je PET-aza kovalentno vezana svojim N-krajem za C-kraj MHET-aze što dovodi do povećane razgradnje PET-a naspram slobodnim enzimima. Još jedna metoda smanjenja inhibicije je ciljana mutageneza veznog mjesta za MHET čime se utjecaj inhibitora minimizira.<sup>6,18</sup>

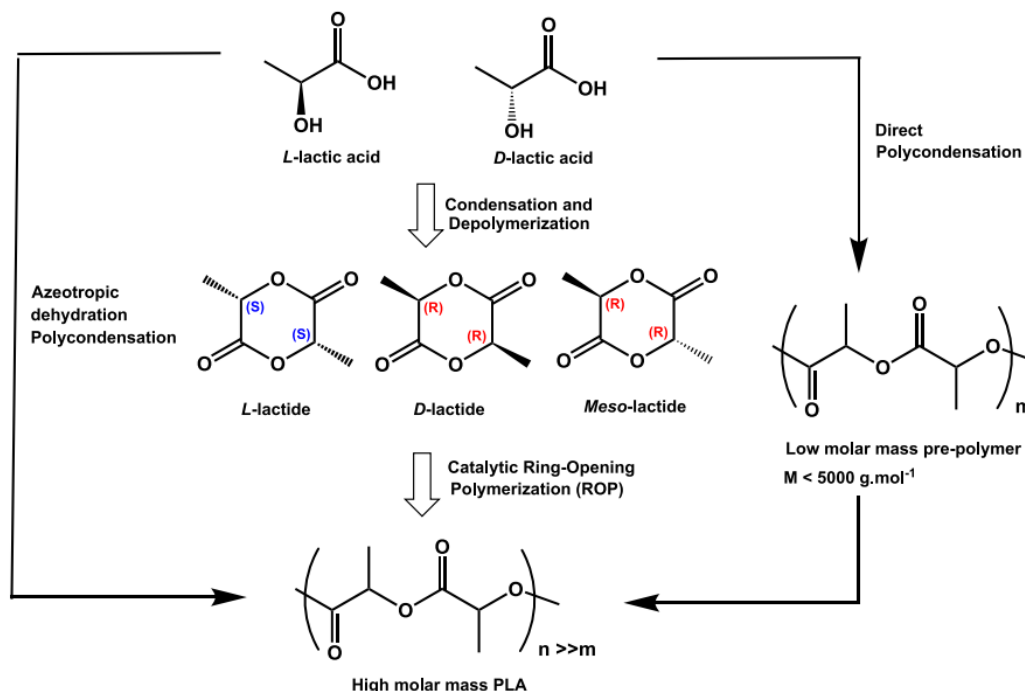
## 2.4. Enzimi za razgradnju polilaktične kiseline

S obzirom na negativni utjecaj fosilne plastike na ekologiju, svijet se okrenuo plastici dobivenoj iz ekološki prihvatljivih resursa. Prva takva plastika koja je u širokoj upotrebi je polilaktična kiselina (PLA). Njena proizvodnja kreće od laktične kiseline koja je dobivena iz obnovljivih resursa biljnog porijekla poput škroba iz krumpira ili kukuruza te šećera iz šećerne trske. Mliječnim vrenjem biomase dobiva se laktična kiselina koja dalje stupa u reakcije polikondenzacije pri čemu se mogu dobiti poliesteri laktične kiseline molarnih masa do 500 kg/mol.<sup>4,6,20</sup>

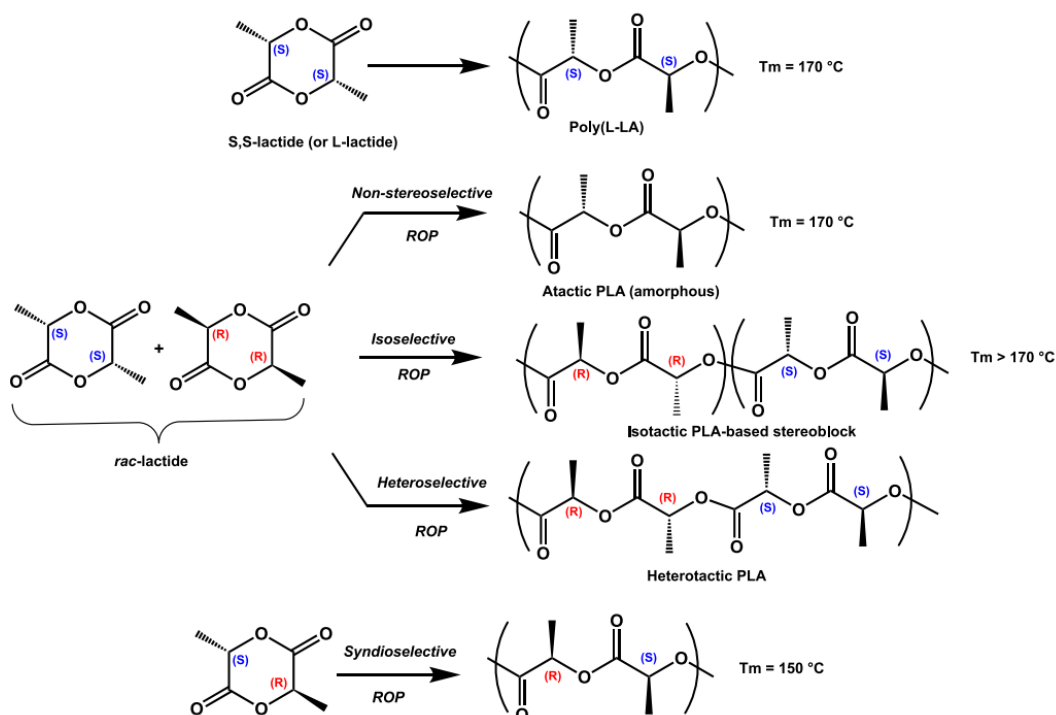
Glavna karakteristika ovog poliestera je njegova biorazgradivost te biokompatibilnost zbog čega je dobio na popularnosti u medicini kao način dostave lijekova te za izradu implantata, a biorazgradivost je važan faktor u kontroli količine plastičnog otpada pa je tako većina biorazgradivih vrećica izrađena od polilaktične kiseline. Iako je razgradnja puno brža naspram brzine razgradnje plastika iz fosilnih izvora, ona je i dalje relativno spora pa su velik interes pridobili mikroorganizmi koji pokazuju mogućnost razgradnje PLA kako bi se recikliranje i zbrinjavanje polilaktične kiseline dodatno poboljšalo.<sup>1</sup>

Kod mikrobiološke razgradnje bitnu ulogu ima enantioselektivnost mikroorganizama. Laktična kiselina dolazi u dva enantiomerna oblika, odnosno postoji (S)- i (L)-laktična kiselinu zbog čega nastali polijester može biti različitog enantiomernog sastava. Stvari se dodatno kompliciraju kod polimerizacije otvaranjem prstena (engl. ring-opening polymerisation, ROP)

u kojoj sudjeluje laktid, ciklički dimer laktične kiseline. Kod laktida imamo tri dijastereoizomera, (L)-, (D)- te meso-laktid što usložava konačni sastav poliestera polimljične kiseline. (Slika 10. i 11.)<sup>6,20</sup>



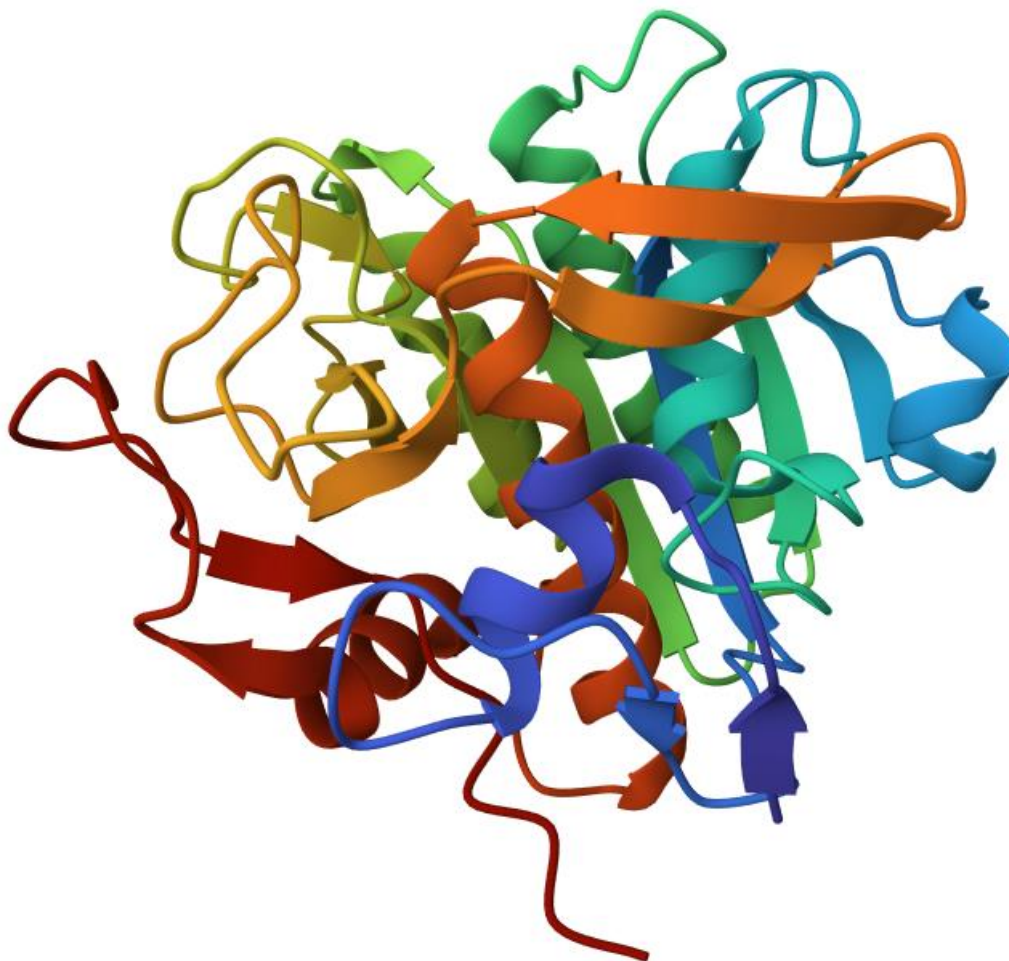
Slika 10. Prikaz mogućih načina polikondenzacije laktične kiseline u PLA (Ilustracija preuzeta i prilagođena prema ref. 20)



Slika 11. Moguće strukture PLA stereospecifičnom sintezom iz laktidona (Ilustracija preuzeta i prilagođena prema ref. 20)

### 2.4.1. Proteinaza K

Velik interes u enzimski kataliziranoj razgradnji polilaktične kiseline usmjeren je na enzim proteinazu K. Ona je serinska proteaza sa karakterističnom Ser-His-Asp katalitičkom trijadom lociranoj na ravnoj plohi inače globularnog proteina (Slika 12.). Ovaj enzim ima dosta široku supstratnu specifičnost što ga čini idealnim za komercijalne svrhe i samim time se pokazao kao idealan kandidat za razgradnju polilaktične kiseline.<sup>21</sup>



Slika 7. Struktura proteinaze K iz *Tritirachium album limber* (Slika napravljena pomoću vizualizacije integrirane u RCSB PDB bazi (<https://www.rcsb.org/>); PDB ID: 1IC6 )

Od promatranih enzima za razgradnju PLA, proteinaza K se pokazala najboljom no samo u određenim situacijama. Naime, ovaj enzim se pokazao dosta stereospecifičnim što u slučaju PLA predstavlja problem. Provedena istraživanja pokazala su da proteinaza K uopće nije sposobna razgraditi PLA sagrađen od (D)- diastereoizomera, dok je zabilježena snažna aktivnost prema PLA sagrađenog od (L)- diastereoizomera. Ova specifičnost je problematična



jer je većina PLA plastike sačinjena od jednakih udjela (D)- i (L)- izomera čime se dobije termostabilan stereokompleks.<sup>6,20,21</sup>

Iako ovo predstavlja veliko ograničenje za primjenu proteinaze K, ona i dalje može djelovati na veze između dva (L)- monomera laktične kiseline, kao i na veze između (D)- i (L)- monomera laktične kiseline što je iz statističkog pogleda čini dobrim kandidatom za razgradnju PLA plastike.<sup>20,22</sup>

#### 2.4.2. Kutinaze za razgradnju PLA

Kutinaze smo već spominjali kod razgradnje PET-a, no one su zbog svojeg širokog spektra mogućih supstrata na koje djeluju pokazale kao dobra alternativa za razgradnju poliestera laktične kiseline. Jedno bitno svojstvo kutinaza je što nisu stereoselektivne poput proteinaze K. Ovo svojstvo ih čini idealnima za industrijsko zbrinjavanje i reciklažu PLA jer se djelovanjem kutinaze na ovaj polimer dobiva dosta skup monomer (D)-laktične kiseline. Izdvajanjem i pročišćavanjem, ovaj monomer se može ponovno koristiti u sintetske svrhe što je jako bitno za smanjivanje cijene proizvodnje PLA.<sup>4,20,22</sup>

Najviše potencijala kod razgradnje polilaktične kiseline imaju enzimi pronađeni u metagenomu komposta. Ti enzimi su izolirani, pročišćeni i ispitani te se pokazalo da su za razgradnju polilaktične kiseline najviše zaslužne kutinaze iz *T. cellulosilytica*, *T. fusca* i *S. viridis*. Isto kao i kod PET plastike pokazale su se iznimno učinkovitima pri razgradnji velikih polimera za što je najviše zaslužno njihovo široko aktivno mjesto koje omogućuje vezanje enzima na površinu navedenih makromolekula što drugim enzimima predstavlja veliku prepreku i tako ih ograničava.<sup>23</sup>

### § 3. ZAKLJUČAK

Plastika u modernom dobu predstavlja nezamjenjiv materijal koji svoju ulogu nalazi u svakom aspektu našeg života. Njena biološka inertnost, čvrstoća, svestranost i cijena čine je idealnom za široku upotrebu pa tako se godišnje proizvedu ogromne količine plastike. Velik problem kod tolike količine plastike je i velika količina otpada. Jedan dio se reciklira, drugi se zbrine i deponira, no ostatak se nakuplja u šumama i oceanima što predstavlja velik ekološki problem. Kako bi se plastika mogla zbrinuti na ekološki i ekonomski prihvatljiv način posegnulo se za mikrobiološkim metodama razgradnje. Opaženo je da neki mikroorganizmi posjeduju mogućnost korištenja polimernih lanaca koji sačinjavaju plastiku kao izvor ugljika za rast. Proučavanjem tih organizama pronađeni su enzimi koji pokazuju mogućnost degradacije polimernih lanaca pri blagim uvjetima pH i temperature što ih čini izvrsnim kandidatima za pronalazak ekološki i ekonomski prihvatljivog načina zbrinjavanja otpadne plastike. Daljnjim modifikacijama ovih enzima lagano se dolazi do toga da se enzimski katalizirana razgradnja plastike može dići i na industrijsku razinu gdje bi se plastika razgradila na ekološki siguran način te dala produkte koji dalje pronalaze korist u kemijskoj industriji.

## § 4. LITERATURNI IZVORI

1. Chamas, A *et al.* Degradation Rates of Plastics in the Environment. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering* 8, 3494–3511 (2020).
2. Gironi, F & Piemonte, V. Bioplastics and petroleum-based plastics: Strengths and weaknesses. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization and Environmental Effects* 33, 1949–1959 (2011).
3. Mohanan, N, Montazer, Z, Sharma, PK, & Levin, DB. Microbial and Enzymatic Degradation of Synthetic Plastics. *Frontiers in Microbiology* 11, (2020).
4. Madhavan Nampoothiri, K, Nair, NR, & John, RP. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. *Bioresource Technology* 101, 8493–8501 (2010).
5. Li, Z, Yang, J, & Loh, XJ. Polyhydroxyalkanoates: Opening doors for a sustainable future. *NPG Asia Materials* 8, (2016).
6. Tournier, V *et al.* Enzymes' Power for Plastics Degradation. *Chemical Reviews* 123, 5612–5701 (2023).
7. Hevilla, V, Sonseca, A, Echeverría, C, Muñoz-Bonilla, A, & Fernández-García, M. Enzymatic Synthesis of Polyesters and Their Bioapplications: Recent Advances and Perspectives. *Macromolecular Bioscience* 21, (2021).
8. Barnes, DKA, Galgani, F, Thompson, RC, & Barlaz, M. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364, 1985–1998 (2009).
9. Mueller, RJ. Biological degradation of synthetic polyesters-Enzymes as potential catalysts for polyester recycling. *Process Biochemistry* 41, 2124–2128 (2006).
10. Boneta, S, Arafet, K, & Moliner, V. QM/MM Study of the Enzymatic Biodegradation Mechanism of Polyethylene Terephthalate. *Journal of Chemical Information and Modeling* 61, 3041–3051 (2021).
11. Khairul Anuar, NFS *et al.* An Overview into Polyethylene Terephthalate (PET) Hydrolases and Efforts in Tailoring Enzymes for Improved Plastic Degradation. *International Journal of Molecular Sciences* 23, (2022).
12. Srikanth, M, Sandeep, TSRS, Sucharitha, K, & Godi, S. Biodegradation of plastic polymers by fungi: a brief review. *Bioresources and Bioprocessing* 9, (2022).
13.  *$\alpha/\beta$  Hydrolase Fold Enzymes Nardini And Dijkstra 733*
14. Roth, C *et al.* Structural and functional studies on a thermostable polyethylene terephthalate degrading hydrolase from *Thermobifida fusca*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98, 7815–7823 (2014).
15. Kawai, F *et al.* Efficient depolymerization of polyethylene terephthalate (PET) and polyethylene furanoate by engineered PET hydrolase Cut190. *AMB Express* 12, (2022).
16. Wei, R, Oeser, T, & Zimmermann, W. in *Advances in Applied Microbiology* 89, 267–305 (Academic Press Inc., 2014).
17. Joo, S *et al.* Structural insight into molecular mechanism of poly(ethylene terephthalate) degradation. *Nature Communications* 9, (2018).
18. Knott, BC *et al.* Characterization and engineering of a two-enzyme system for plastics depolymerization. doi:10.1073/pnas.2006753117/-/DCSupplemental

19. Wei, R *et al.* Functional characterization and structural modeling of synthetic polyester-degrading hydrolases from *Thermomonospora curvata*. *AMB Express* 4, 1–10 (2014).
20. Kawai, F. Polylactic acid (PLA)-degrading microorganisms and PLA depolymerases. in ACS Symposium Series 1043, 405–414 (American Chemical Society, 2010).
21. Yamashita, K, Kikkawa, Y, Kurokawa, K, & Doi, Y. Enzymatic degradation of poly(L-lactide) film by proteinase K: Quartz crystal microbalance and atomic force microscopy study. *Biomacromolecules* 6, 850–857 (2005).
22. Li, S, Tenon, M, Garreau, H, Braud, C, & Vert, M. *Enzymatic Degradation Of Stereocopolymers Derived From L-, Dl-And Meso-Lactides*
23. Kitadokoro, K *et al.* Structural insights into the unique polylactate-degrading mechanism of *Thermobifida alba* cutinase. *FEBS Journal* 286, 2087–2098 (2019).