

# Metaloproteini i sintetski enzimi kao potencijalna rješenja antropogenih polucija

---

**Kožić, Matej**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2021**

*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:217:282510>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-23**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijски odsjek

Matej Kožić

Student 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# **Metaloproteini i sintetski enzimi kao potencijalna rješenja antropogenih polucija**

## **Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za opću i anorgansku kemiju

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Ivica Đilović

Zagreb, 2021.



Datum predaje prve verzije Završnog rada:

13. srpnja 2021

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

24. rujna 2021.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Ivica Đilović

Potpis:



## Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME .....	2
2.1. Sintetski enzimi .....	2
2.2. PETaza .....	15
2.3. Diskusija.....	21
§ 3. ZAKLJUČAK .....	23
§4. LITERATURNI IZVORI .....	24



## § Sažetak

Enzimi su građevni dio života, i kataliziraju reakcije koje bi inače bile prespore (ako bi se uopće događale). Razvoj tehnologije otvorio je vrata manipulaciji tih biokatalizatora, a u ovom radu se istražuje način i opseg te manipulacije. Pokušat će se odgovoriti na pitanje ima li biokatalitički pristup potencijala biti rješenje antropogenih onečišćenja poput plastične polucije, i zagađenja otpadom od agresivnih industrijskih oksidansa i drugih reagensa. Na početku opisana je metoda genetskog sklapanja (engl. *genetic fusion*), te potanko istraženi enzimski sklopovi nikotinamid adenin dinukleotid oksidaze i alkohol dehidrogenaze (NOX-ADH) koji su pokazali povećanu aktivnost ADH jedinice uslijed povećane dostupnosti kofaktora potrebnog za reakciju.<sup>1,2</sup> Ti NOX-ADH sklopovi su zadržali enantioselektivnost, dokazujući kako sklapanje nije imalo utjecaja na smatanje i aktivnost zasebnih domena.<sup>2</sup> Kao druga metoda pripreme sintetskih enzima razmatrani su metalni afinitetni privjesci koji omogućavaju izmjenu funkcije privjeska i/ili enzima.<sup>3</sup> Na enzim papain vezani su metalni afinitetni privjesci (engl. *metal affinity label*, mAL) koji provode hidrogeniranje ketona. Slobodni, u reakciji tvore racemat, dok u ansamblu s enzimom pokazuju enantioselektivnost.<sup>3</sup> Za kraj poglavlja o metodama ukratko je opisana usmjerena evolucija, kao alternativni pristup pripravi biokatalizatora sa specifičnim djelovanjem.<sup>1,2</sup> U zadnjem dijelu opisana je PETaza, enzim iz porodice kutinaza, te ispitana njena djelotvornost razgradnje polietilen tereftelata (PET) i polietilen furanoata (PEF). Pripravljeni mutant je pokazao veću katalitičku moć od enzima divljeg tipa. Autori su zaključili kako metodu treba poboljšati kako bi bila industrijski iskoristiva, no pokazuje potencijala.<sup>4</sup> Finalno, zaključeno je kako sintetska biokataliza, iako mlado polje sa svojim manama i ograničenjima, ima potencijala promijeniti načine na koje provodimo trenutne postupke i omogućiti provedbu sasvim novih reakcija i postupaka poput razgradnje PET-a, PEF-a, i drugih aromatskih poliestera.<sup>4</sup>



## § 1. UVOD

Kameno doba je, smatra se, trajalo u periodu od prije 2,5 milijuna do 3000 godina p. n. e. Završilo je otkrićem načina manipulacije metala, i posljedičnim ulaskom čovječanstva u brončano doba.<sup>9</sup> Od tada, kako je rasla populacija naše vrste tako je i tehnologija na našem raspolaganju rasla u kompleksnosti. U današnjem dobu na raspolaganju su nam alati i metode za rukovanjem samom organomašinerijom koja sudjeluje u životnim procesima, enzimima.

Enzimi su biokatalizatori, što znači da ubrzavaju i omogućavaju kemijske reakcije koje bi bez njih bile prespore (ako se ne bi uopće događale), a sastavljeni su od dugog niza aminokiselina povezanih peptidnom vezom. Aminokiseline su kemijske vrste s amino skupinom, karboksilnom skupinom, i bočnim ogrankom na atomu ugljika; te ih kao takvih u prirodi može biti efektivno beskonačno. Usprkos tome, samo maleni skup aminokiselina tvori proteine živog svijeta, i tih proteinogenih aminokiselina je poznato 22.<sup>8</sup> Poznavajući njihova svojstva, sastav, te strukture koje tvore kada se smotaju u enzim, moguće je selektivno provesti promjene kako bi ciljano izmijenili aktivnost enzima. Te promjene uključuju spajanje enzima s drugim enzimom kako bi dobili infrastrukturu za kaskadnu reakciju na jednom mjestu, ili pak pretvorba enzima u skelet koji mijenja svojstvo odabrane umjetne kemijski aktivne skupine koju smo fiksirali na enzim.<sup>1-3</sup> Takve ideje korištenja sintetskih biokatalizatora imaju potencijala smanjiti korištenje opasnih reagensa zahvaljujući svojstvu enzima da funkcioniraju u fiziološkim uvjetima.<sup>1</sup> Nadalje, biokatalitički pristup otvara vrata provedbi sasvim novih reakcija<sup>1</sup> kakve bi mogle imati veliki utjecaj na borbu čovjeka protiv raznih izazova današnjice poput gomilanja plastičnog otpada.

Od svojeg nastanka, plastika se proširila u skoro svaki kutak kako ljudskog života, tako i planeta Zemlje. Iako od neusporedive korisnosti, polietilen teraftalat (PET) u današnjem svijetu predstavlja izuzetno veliki problem baš zbog tog svojstva otpornosti i „neuništivosti“ koja ga čine primamljivim materijalom za pripremu skoro svega što danas tvori svakodnevicu.<sup>4</sup> Taj sintetski polimer nakuplja se u okolišu gušeći ekosustave, s posebnim destruktivnim utjecajima na morske ekosustave, te je bitno poduzeti odlučne mjere sanacije što prije. U svjetlu nedavnih napredaka u polju sintetske biokatalize, poput karakterizacije enzima koji uspijeva depolimerizirati PET,<sup>4</sup> u ovom će se radu pokušati odgovoriti na pitanje: „Ima li sintetska biokataliza nade postati rješenje određenih antropogenih onečišćenja?“

## § 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

### 2.1. Sintetski enzimi

U prvom dijelu rada istražiti će se tri metode pripreme sintetskih enzima. Zbog njihovih respektivnih prednosti i mana njihovo razumijevanje je neophodno kako bismo sagledali širu sliku stadija u kojemu se nalazi polje sintetske biokatalize. Jasno je kako odabir metode manipulacije enzimom igra ključnu ulogu u dobivanju dobrih rezultata.

#### 2.1.1. Genetsko sklapanje (GS)

Prigodan način sprezanja dva enzima je metodom genetskog sklapanja (engl. *genetic*, GF). Pristup se temelji na umetanju gena za jedan enzim neposredno prije ili poslije gena za drugi. Iz takvog genetskog materijala translacijom dolazi do nastanka jediničnog polipeptidnog lanca koji u sebi sadrži dva enzima spojena kovalentnom (peptidnom) vezom. U slučaju uspjeha takav se polipeptid smata u dvije zasebne podjedinice gdje svaka vrši svoju ulogu neometana drugom. Time nastaju enzimski sklopovi (ili enzimске fuzije) koji u nekim slučajevima pokazuju veće katalitičke aktivnosti od individualnih koekspresiranih enzima zahvaljujući mehanizmima poput kanaliziranja supstrata, i kraćeg vremenu života često nestabilnih intermedijera. Te prednosti ovu metodu čine posebice dobrim odabirom za kaskadne reakcije, koje se mogu provoditi *in vivo* ili *in vitro* samo s jednim polifunkcionalnim enzimskim sklopom.<sup>1</sup>

Druga potencijalno izuzetno korisna primjena enzimskih sklopova je ugrađivanje podjedinice za recikliranje kofaktora. Kofaktor nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH), neophodan za funkcioniranje mnogih oksidoreduktaza, je veoma skup reagens i pronalaženje načina za efikasno recikliranje istog je neophodno kako bi biokatalitičke metode našle primjenu na industrijskoj skali.<sup>1</sup>

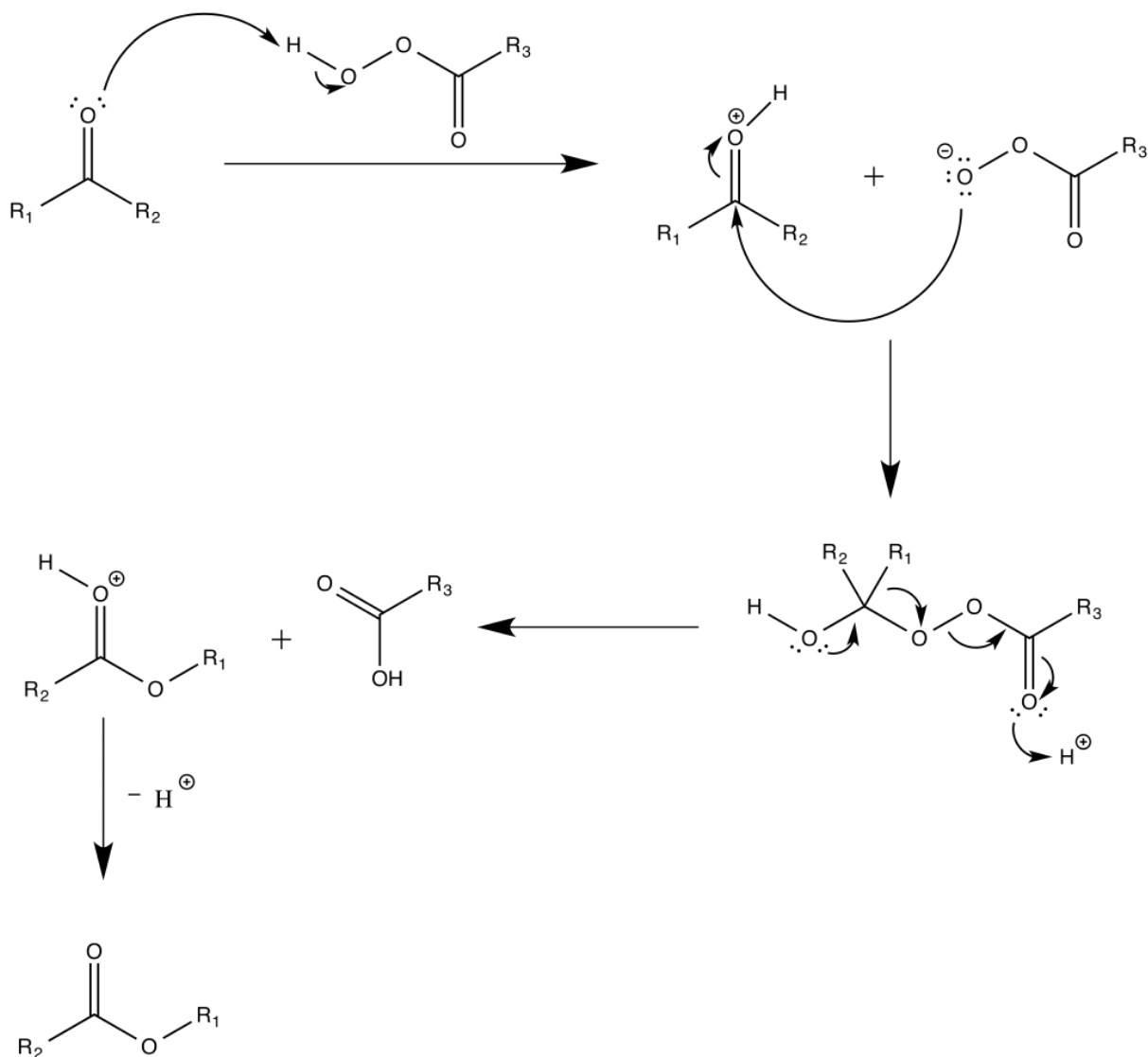
#### 2.1.1.1. Pregled enzimskih sklopova

Kako bi ispitali aktivnost sintetskih bifunkcionalnih enzimskih sklopova F. S. Aalbers i M. W. Fraaije proučavali su reakcije sklopova Baeyer-Villigerove monooksigenaze<sup>i</sup> (BMVO)

---

<sup>i</sup> Iz molekuskog kisika ugrađuju jedan atom kisika na ciljanu molekulu.

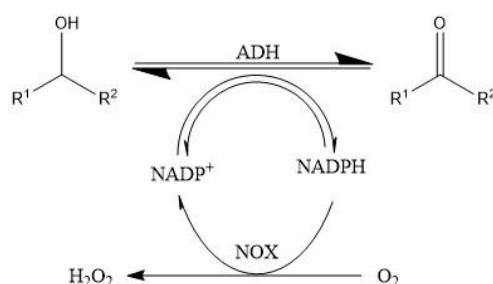
s NADPH-oksidadom (NOX). BMVO-e kataliziraju pretvorbe ketona u estere ili laktone u blagim fiziološkim uvjetima, često stereospecifično. Njihov mehanizam se temelji na kofaktoru FAD (flavin adenin dinukleotid) koji se reducira s NADPH što dalje omogućava redukciju karbonilne skupine ketona (slika 1).<sup>1</sup>



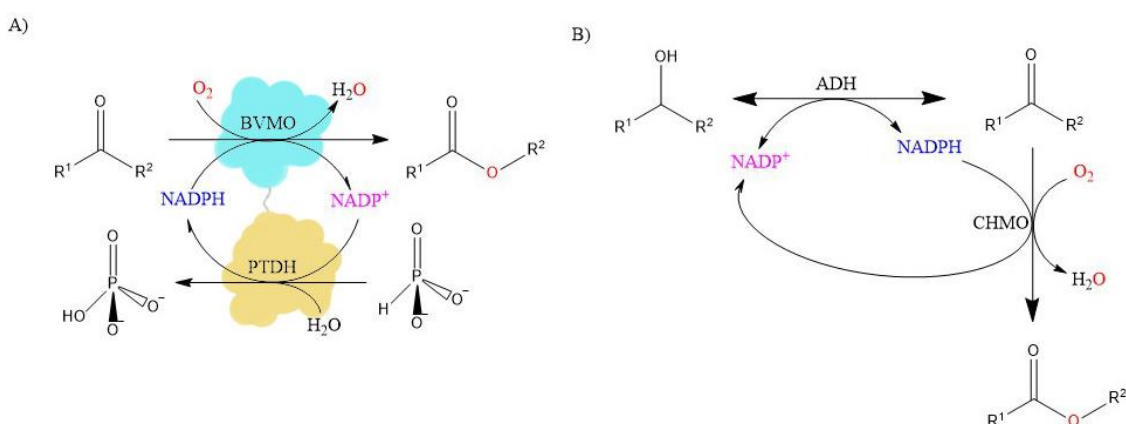
**Slika 1.** Baeyer-Villigerova oksidacija je reakcija kojom iz ketona, uz prisustvo peroksida ili peroksiseline, nastaje ester ili lakton (ciklički ester, koji nastaje iz cikličkog ketona). (preuzeto s [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Baeyer-Villiger\\_Oxidation\\_Reaction\\_Mechanism.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Baeyer-Villiger_Oxidation_Reaction_Mechanism.png) 12.7.21).

Nakon svake reakcije FAD-a, NADP<sup>+</sup> kofaktor je potrebno regenerirati kako bi opet mogao reducirati FAD. Jedan od načina redukcije je s dodatnim enzimom koji oksidira lako dostupan „žrtveni“ supstrat, tako prevodeći NADP<sup>+</sup> u NADPH. Kao primjer toga autori su ispitali bifunkcionalni enzim PTDH-BMVO (fosfit dehidrogenaza spojena s BVMO), koji je pokazao dobru ekspresiju, te s malim količinama fosfita i NADPH mogao je kontinuirano katalizirati

Baeyer-Villigerovu oksidaciju. Enzim je djelovao i u koncentracijama  $\text{NADP}^+$  nativnim za stanicu, bez dodatka dodatnog kofaktora. Kao enzimi koji putem „žrtvenog supstrata“ regeneriraju  $\text{NADPH}$  mogu se koristiti glukoza-dehidrogenaze (GD), fosfit dehidrogenaza (PTDH) ili slični enzimi čiji su supstrati jeftini i lako dostupni. Drugi pristup regeneracije  $\text{NADPH}$  koji ne zahtijeva „žrtveni supstrat“ počinje s alkoholom. Alkohol dehidrogenaza (ADH) iskoristi  $\text{NADP}^+$  kako bi prevela alkohol u keton, time tvoreći  $\text{NADPH}$  i keton. Oni dalje idu u ciklus BVMO (slike 2 i 3). Takvi ADH-BVMO sklopovi pokazali su veću aktivnost i obrtni broj od zasebno ekspresiranih enzima, što svjedoči u korist korištenja genetskog sklapanja za unapređenje biokatalitičkih postupaka.<sup>1</sup>



**Slika 2.** Alkohol dehidrogenaza – Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat ( $\text{NADP}^+$ ) oksidaza, ADH-NOX sklop. ADH za reakciju prevođenja molekule alkohola u molekulu aldehida ili ketona troši  $\text{NADP}^+$  kofaktor prevodeći ga u  $\text{NADPH}$ . On zatim biva oksidiran u enzimu NOX koristeći molekulu kisika, pri čemu nastaje vodikov peroksid. Ovakav ansambl omogućava efikasno recikliranje skupog kofaktora za oksidaciju alkohola na stereospecifičan način koji se može regulirati odabirom pogodnog ADH enzima. Budući da se za cijenu molekuskog kisika alkohol prevodi u aldehyd/keton i vodikov peroksid, ovakav sklop ima sumarnu reakciju alkohol oksidaze.<sup>2</sup>



**Slika 3. A)** Sklop BVMO-a i PTDH-a, gdje PTDH regenerira  $\text{NADPH}$  iz  $\text{NADP}^+$  koristeći fosfitni ion. BVMO zatim koristi novonastali  $\text{NADPH}$  kako bi proveo svoju reakciju. **B)** Samostojeća kaskadna reakcija koja se može postići stvaranjem sklopa alkohol dehidrogenaze s cikloheksan monoooksigenazom (CHMO). Alkohol dehidrogenaza prevodi alkohol u keton, pri tome reducirajući kofaktor  $\text{NADP}^+$  koji se odmah nakon koristi za prevođenje novonastalog ketona u završni produkt Baeyer-Villigerove oksidacije, ester ili lakton.<sup>1</sup>

### 2.1.1.2. Spojnice i redosljed sklopa

Prilikom spajanja sekvenci dvaju enzima moguće je umetnuti sekvencu koja će nakon translacije predstavljati aminokiselinsku spojnicu dvaju enzima (engl. *linker*). Uloga spojnice pokazala se većom od pukog konektora dvaju enzima. Kao što odabir redosljeda enzima (A-B ili B-A) nije proizvoljan, odabir spojnice (ili njeno izostavljanje) može imati kritične posljedice na aktivnost enzimskog sklopa. Efekti redosljeda ne moraju biti drastični, kao što je primjer kod PTDH-BVMO i BVMO-PTDH sklopa gdje dolazi do retencije aktivnosti u oba slučaja; dok pak pogrešan odabir redosljeda kod nekih sklopova dovodi do kompletnog gubitka aktivnosti uslijed nemogućnosti pravilnog smatanja ili drugih možebitnih smetnji.<sup>1</sup>

Kod odabira prikladne spojnice potrebno je na umu imati njena svojstva fleksibilnosti i rigidnosti, hidrofobnosti i hidrofilitnosti, te duljine. Jasno je kako svojstva spojnice ovise o odabiru aminokiselina koje ju sačinjavaju, pa je tako spojnica bogata glicinom fleksibilna; dok je ona od aminokiselina koje češće tvore  $\alpha$ -zavojnice poput alanina i lizina čvrsta i rigidna.<sup>1</sup>

Kako svojstva spojnice utječe na okolinu enzima te njegovu rotaciju i položaj u odnosu na drugi enzim, odabir pogodne spojnice je izuzetno bitan. Iz tog su razloga sastavljene biblioteke spojnice koje mogu navesti na prigodan odabir, no one nisu potpune i preporučeno je provesti testove potencijalno pogodnih spojnica budući da trenutno ne postoji konsenzus oko njihove duljine i sastava. Jedini konsenzus je da ovisi od slučaja do slučaja. Usprkos tome, često korištena spojnica koja je generalno siguran odabir je spojnica bogata glicinom. Takva fleksibilna spojnica omogućava neometano smatanje enzima i konformacijske promjene koje igraju bitne uloge u katalitičkoj aktivnosti. Izostavljanje spojnice generalno vodi do lošijih rezultata od umetanja glicinom bogate spojnice.<sup>1</sup>

### 2.1.1.3. Sklop alkohol dehidrogenaza – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat oksidaza (ADH-NOX)

U svrhu upoznavanja s procesom pripreme umjetno spojenih enzima u ovom poglavlju potanko ćemo istražiti rad koji se bavi pripravom sklopa alkohol dehidrogenaza – NADPH-oksidaza (ADH-NOX).<sup>2</sup> Alkohol dehidrogenaze su korisna klasa enzima koja stereoselektivno vrše oksidacije alkohola, i ekološki su prihvatljiva alternativa inače agresivnim kemikalijama koje se koriste kao katalizatori spomenutih oksidacija. Iz tog su razloga ovakva rješenja primamljiva industriji. Zbog visoke cijene NADPH i NADH kofaktora, osmisliti način za efikasnu reciklažu istih je neophodno kako bi enzimska biokataliza bila isplativa na industrijskoj razini, te su iz tog razloga ovakva istraživanja od velike važnosti.<sup>2</sup>

ADH reakcije uključuju oksidirani NAD(P)<sup>+</sup> kao elektron-akceptor, s kojim prevode alkohol u aldehid ili keton. Nakon reakcije, reducirani kofaktor je potrebno regenerirati kako bi ADH

ponovo mogao prevesti alkohol u keton/aldehid. Regeneracija NAD(P)H može se postići s NAD(P)H-oksidadom (NOX), koja tipično sadrži flavinski kofaktor (FAD) koji efikasno dovodi do oksidacije NAD(P)H koristeći molekularni kisik. Nusprodukt te reakcije je molekula vodikovog peroksida ako je u pitanju tip 1 NOX; ili molekula vode ako je u pitanju tip 2 NOX. Drugi tip flavinskog enzima je Baeyer-Villigerova monooksigenaza (BVMO) koja veže molekulu kisika i NAD(P)H kako bi katalizirala oksidaciju. Nakon vezanja NAD(P)H i molekule kisika te tvorbe peroksiflavin intermedijera, može doći do reakcije „odvajanja“ (engl. *uncoupling*) gdje se peroksiflavin vraća u oksidirano stanje, tvoreći vodikov peroksid i ispuštajući oksidirani NAD(P)<sup>+</sup>. Mutirani tip BVMO-a, fenilacetone monooksigenaza (PAMO, engl. *phenylacetone monooxygenase*) koji ima visoku stopu reakcija odvajanja uspješno se ponaša kao NOX. Takav mutant, C65D PAMO, koji je usporedive stabilnosti kao divlji tip s temperaturom mekšanja od 60 °C, dobar je odabir oksidaze za recikliranje skupog kofaktora.<sup>2</sup>

Kao NOX korišten je C65D PAMO mutant, a kao ADH ispitana su tri tipa enzima koja za svoje funkcioniranje ovise o NAD(P)H: R-selektivna *LbADH* iz *Lactobacillus brevis*; *TbADH* iz *Thermoanaerobacter brockii*; te komercijalno dostupni ADHA. Prijašnja istraživanja su pokazala kako kratkolančane dehidrogenaze gube aktivnost kao N-terminalni sklopovi (ADH-NOX, C-kraj ADH-a spojen na N-kraj NOX-a), moguće prouzročeno smetnjama u smatanju trimernih/tetramernih struktura. Iz tog razloga, enzimi *LbADH* i ADHA spojeni su kao C-terminalni enzimi (NOX-L, odnosno, NOX-A) kako bi im se zadržala aktivnost. *TbADH* je spojen kao N-kraj (T-NOX). Sva tri sklopa (Tablica 1), NOX-L, NOX-A, i T-NOX; pripravljena su s N-terminalnom His-oznakom radi lakšeg rukovanja.<sup>2</sup>

**Tablica 1:** Pripravljene sklopove ADH-NADPH-oksidaza. Komercijalno dostupne ADHA i *LbADH* spojene su kao N-terminalni enzimi na C65D PAMO mutant koji služi kao NADPH-oksidaza (NOX-A, odnosno, NOX-L), dok je *TbADH* spojen kao C-kraj (T-NOX). U sva tri NOX-ADH sklopa korištene su iste spojnice.<sup>2</sup>

Enzim	N-kraj	Spojnic	C-kraj	<i>M<sub>w</sub></i> [kDa]
NOX-A	C65D PAMO	SGSAAG	ADHA	90,3
NOX-L	C65D PAMO	SGSAAG	<i>LbADH</i>	90,5
T-NOX	<i>TbADH</i>	SGSAAG	C65D PAMO	101,4

Razina ekspresije sklopa u *E. coli* nakon pripreme, kloniranja, te transformacije; bila je usporediva ekspresiji individualnih enzima. Afinitetnom kromatografijom dobiveno je 40-150 mg sklopova po litri kulture. Autori navode kako je došlo do potpune redukcije flavinskog kofaktora tokom ekspresije sklopova, čiji je mogući uzrok veći oksidativni stres tijekom ekspresije. Kako bi se on oksidirao nazad u korisnu formu, inkubiran je s kalijevim heksacijanoferatom(III), nakon čega je pročišćen gel-filtracijom. Provjera oksidiranosti FAD-a provedena je mjerenjem UV/Vis spektara koji su različiti za reducirani i za oksidirani oblik.<sup>2</sup>

Kako bi ispitili primjenjivost sklopova autori su u puferu proveli test konverzije cikloheksanola u cikloheksanon s NOX-A. Inicijalni rezultati su postigli tek 32 do 76 % konverzije, moguće iz razloga što dolazi do nakupljanja vodikova peroksida koji dovodi do smanjenja aktivnosti i deaktivacije enzima. Druga potencijalna ruta komplikacije je gubitak kofaktora FAD iz NOX-a. Iz tih su razloga dodani aditivi FAD, katalaza (koja uklanja vodikov peroksid), te kombinacija obaju. Rezultati su prikazani u tablici 2, i iz njih je jasno vidljivo kako dodatak obaju aditiva značajno poboljšava reakciju dovodeći konverziju do 95 %. Isto je vidljivo kako je veći problem gubitak FAD-a, nego nakupljanje vodikova peroksida, jer je samo adicijom FAD-a došlo do povećanja aktivnosti do 93 % što je veći skok u odnosu na samo uklanjanje vodikova peroksida, iako ne značajno više.<sup>2</sup>

**Tablica 2.** Utjecaj dodanih aditiva na stopu konverzije NOX-A enzima. Dodatak FAD-a i katalaze rezultirao je najvećim skokom stope konverzije, iako su i pojedinačni aditivi bitno povisili istu. TTN (engl. *total turnover number*), količina supstrata koju svaki pojedinačni enzimski sklop prevede u produkt.<sup>ii,2</sup>

Enzim	Aditiv	Konverzija [%]	TTN (enzim)	TTN (kofaktor)
NOX-A	-	75	39 500	395
NOX-A	FAD	93	46 500	465
NOX-A	katalaza	89	44 500	445
NOX-A	FAD + katalaza	95	47 500	475

Mehanizam djelovanja katalaze je taj da uklanja vodikov peroksid što sprječava štetu tijekom vezanja kisika za regeneraciju NOX-a; a mehanizam koji uzrokuje povećanje stabilnosti (a time i aktivnosti) sklopova dodatkom FAD-a, je što NOX lakše ostaje u holo-formi (kada na sebe ima vezan kofaktor). Zbog značajnih povišenja u aktivnosti aditivi su dodavani u svim sljedećim testovima.<sup>2</sup>

Kao supstrat za provjeru aktivnosnih parametara odabran je cikloheksanol, te su ispitani individualni enzimi pored dobivenih sklopova. Rezultati su prikazani u tablici 3.<sup>2</sup>

---

<sup>ii</sup> Reakcijski uvjeti iznosili su: 50 mmol dm<sup>-3</sup> cikloheksanola (supstrat), 1 μmol dm<sup>-3</sup> NOX-A sklopa, 40 mmol dm<sup>-3</sup> Tris-HCl (vrijednost pH od 8,5), 100 μmol dm<sup>-3</sup> NADP<sup>+</sup>, 64 h pri 24 °C, 500 rpm grijana centrifuga. Aditivi: 10 μmol dm<sup>-3</sup> FAD, 1000 μmol min<sup>-1</sup> katalaze.

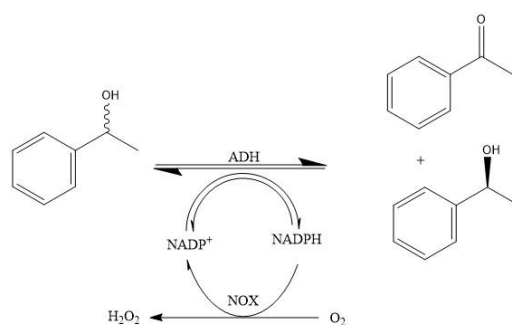
**Tablica 3.** Kinetički parametri NOX-ADH sklopova.<sup>iii</sup> Vidljiva je retencija katalitičke aktivnosti ADH enzima u njihovim sklopovima, s time da je ADHA pokazala poduplavanje u obrtnom broju, dok se on malo smanjio u *TbADH* sklopi. U NOX-A i NOX-L sklopovima nije došlo do značajne promjene obrtnog broja NADPH oksidaze, dok se on smanjio u T-NOX sklopu. Za primijetiti je kako je došlo do velikog porasta  $K_m$  broja za NADPH u NOX-A sklopu. Sve promjene su razmjerno malene i za zaključiti je kako je enzimski sklop zadržao katalitičku aktivnost individualnih podjedinica.<sup>2</sup>

Enzim	Oksidacija cikloheksanola			Oksidacija NADPH		
	$k_{cat}$ [ $s^{-1}$ ]	$K_m$ [mmol $dm^{-3}$ ]	$k_{cat}/K_m$ [ $s^{-1} mmol^{-1} dm^3$ ]	$k_{cat}$ [ $s^{-1}$ ]	$K_m$ [ $\mu mol dm^{-3}$ ]	$k_{cat}/K_m$ [ $s^{-1} mmol^{-1} dm^3$ ]
NOX	-	-	-	5,0	3,5	1 400
ADHA	0,26	19	14	-	-	-
NOX-A	0,56	10	56	5,1	27	190
<i>LbADH</i>	2,2	31	71	-	-	-
NOX-L	2,0	29	69	4,4	5,8	760
<i>TbADH</i>	8,3	3,7	2200	-	-	-
T-NOX	5,7	5,8	980	2,8	5,7	490

Vidljivo je kako su kinetički parametri dobivenih sklopova usporedivi s individualnim enzimima, što ukazuje da ni u jednom slučaju nije došlo do značajnih gubitka katalitičke aktivnosti. Katalitička efikasnost može se izraziti kao  $k_{cat}/K_m$ , tako da porastom te vrijednosti raste stopa katalize. Prema tome, vidimo kako su sva tri sklopa izgubila na aktivnosti NOX podjedinice u odnosu na individualni NOX. Na drugu ruku, NOX-A i NOX-L pokazuju usporedivu efikasnost nativnom pripadajućem ADH enzimu, dok T-NOX pokazuje katalitičku aktivnost dva puta manju od izvornog ADH. Budući da se radi o enzimima te malenim koncentracijama, promjene od 1,5 do 2 puta unutar granica prihvatljivog i autori zaključuju kako genetsko sklapanje nije imala značajnijih negativnih utjecaja na aktivnosti individualnih enzima. Sljedeći test kao supstrat koristio je racemičnu smjesu 1-feniletanola (slika 4), koji je dodan kako bi ispitao utjecaj kiralnosti na dobivene sklopove. Budući da *TbADH* ne katalizira reakciju 1-feniletanola, testovi su vršeni samo nad NOX-L i NOX-A. Rezultati su prikazani u tablici 4.<sup>2</sup>

<sup>iii</sup> Kinetički su parametri su određeni mjerenjem apsorbancije pri 340 nm nad 5-10 različitih koncentracija, s dva ili tri mjerenja. Za mjerenje stope oksidacije alkohola uvjeti su iznosili 20 mmol  $dm^{-3}$   $K_3PO_4$ , s vrijednosti pH od 7,5; pri temperaturi od 25 °C; dok je za oksidaciju NADPH korišteno 50 mmol  $dm^{-3}$  otopina Tris-HCl s vrijednost pH od 8,0, pri 25 °C.





**Slika 4.** Shematski prikaz ukupne reakcije NOX-ADH sklopa. ADH koristi racemičnu smjesu 1-feniletanola, te kao produkt daje acetofenon i (*R*)-1-feniletanol ili (*S*)-1-feniletanol. NADP<sup>+</sup> preveden u NADPH reakcijom ADH-a, biva pretvoren nazad u NADP<sup>+</sup> u NOX-u koristeći molekulu kisika i otpuštajući molekulu vodikovog peroksida.<sup>2</sup>

**Tablica 4.** Sumarni rezultati ispitivanja katalitičke aktivnosti NOX-ADH sklopova, koji pokazuju kako je najveću stopu konverzije imao NOX-L nad cikloheksanolom, a najmanju NOX-L nad racematom 1-feniletanola. Najveću aktivnost nad racematom 1-feniletanola pokazao je NOX-A. Za primijetiti je kako su produkti racemične smjese 1-feniletanola isključivo jedan enantiomer, što pokazuje da sklapanje s NOX-om nije utjecalo na enantioselektivnost enzima.<sup>iv,2</sup>

Supstrat	Enzim	Konverzija [%]	ee [%]	TTN (enzim)	TTN (kofaktor)
Cikloheksanol	NOX-A	95	-	31 666	475
	NOX-L	99	-	33 000	495
	T-NOX	69	-	23 000	345
<i>rac</i> -1-feniletanol	NOX-A	94	99 ( <i>R</i> )	31 333	470
	NOX-L	50	99 ( <i>S</i> )	16 666	250

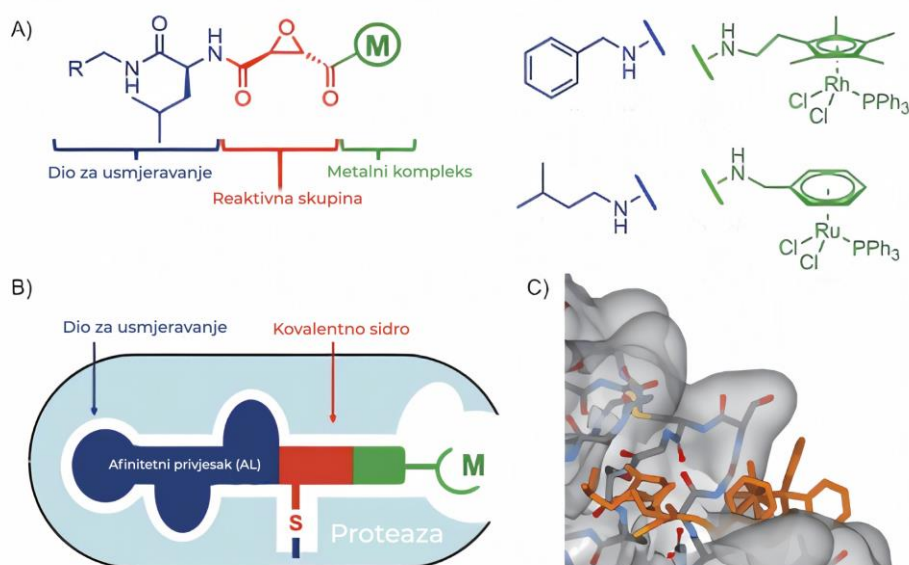
NOX-L se iskazao visokom enantioselektivnosti 1-feniletanola, karakterističnom za nativni *Lb*ADH, i njegov produkt bio je 99 % (*S*)-1-feniletanol. To je izvrstan rezultat koji još jednom ukazuje na neometanost individualnog enzima sklapanjem, što je kritičan preduvjet za ikakve korisne sklopove. Autori zaključuju kako je genetsko sklapanje rezultiralo enzimom koji ima visoku stopu obrta obaju testiranih supstrata, što je obećavajuće za primjenu multifunkcionalne biokatalize u industriji.<sup>2</sup>

<sup>iv</sup> Reakcijski uvjeti su uključivali 50 mmol dm<sup>-3</sup> supstrata, 1,5 μmol dm<sup>-3</sup> sklopa enzima, 50 mmol dm<sup>-3</sup> Tris-HCl pufera s vrijednosti pH od 8,5; 100 μmol dm<sup>-3</sup> NADP<sup>+</sup>, tokom 64 h pri temperaturi od 24 °C, i okretajima od 500 rpm. Temeljem podataka prijašnjih ispitivanja, kao aditiv dodan je FAD koncentracije 10 μmol dm<sup>-3</sup> i 1000 μmol min<sup>-1</sup> katalaze. Dodatno, u reakcije sa 1-feniletanolom dodan je 2 % dimetil sulfoksid (DMSO).

### 2.1.2. Metalno konjugirani afinitetni privjesci

Drukčiji pristup pripravi umjetnih enzima uključuje pripravu spojeva koji sadrže reakcijski metalni centar, i funkcijske skupine preko kojih se taj „privjesak“ veže na enzim. Takvim pristupom moguća je direktna manipulacija aktivnog centra enzima. Trenutna primjena takvih ansambala sastoji se od farmaceutika, sonda za molekularno slikanje, kontrastnih agensa, elektrokemijskih biosenzora, te alata za ispitivanje metaloproteina. Pored toga, metalno konjugirani privjesci obećavajući su za sintezu umjetnih metaloenzima i metaloproteina s katalitičkim svojstvima kakva nisu nađena u prirodi. Metaloenzimi imaju potencijal proširiti opseg reakcija koje podliježu biokatalizi, te su kao takvi od velike važnosti industriji koja bi se bavila time. Budući da je zadnja stavka unutar opsega ovog rada, posebno ćemo istražiti rad koji se bavi korištenjem metalno konjugiranih afinitetnih privjesaka za postizanje enantioselektivnosti sintetskih metaloenzima.<sup>3</sup>

Kao pogodna metoda sprezanja enzima s umjetnim afinitetnim privjeskom pokazala se metoda usmjerenog vezanja (engl. *site-directed anchoring*), gdje se pripreve privjesci s prostetičkim skupinama koje se ponašaju kao kofaktor. Takav umjetni privjesak se zatim veže na ciljano mjesto enzima, tako tvoreći hibridni enzim sa sintetskim privjeskom. Druga metoda pripreve organometalnih enzimskih hibrida (OMEH) se temelji na spajanju umjetne skupine kovalentnim putem na ciljani dio enzima. U promatranom radu autori su metalne afinitetne privjeske (engl. *metal affinity label*, mAL) spajali kovalentnim putem na aktivno mjesto enzima interakcijama koje aktivno mjesto enzima postiže s jednim inhibitorom. Pripravljene i testirane su akiralne katalitičke aktivne metalne komplekse koji su zatim spajani na proteaza-specifičnu aktivnu grupu koja stvara kovalentnu vezu s aktivnim centrom, te peptidni rep koji specificira rotaciju i položaj vezanog mAL-a. Shematski prikaz spoja vidljiv je na slici 5.<sup>3</sup>

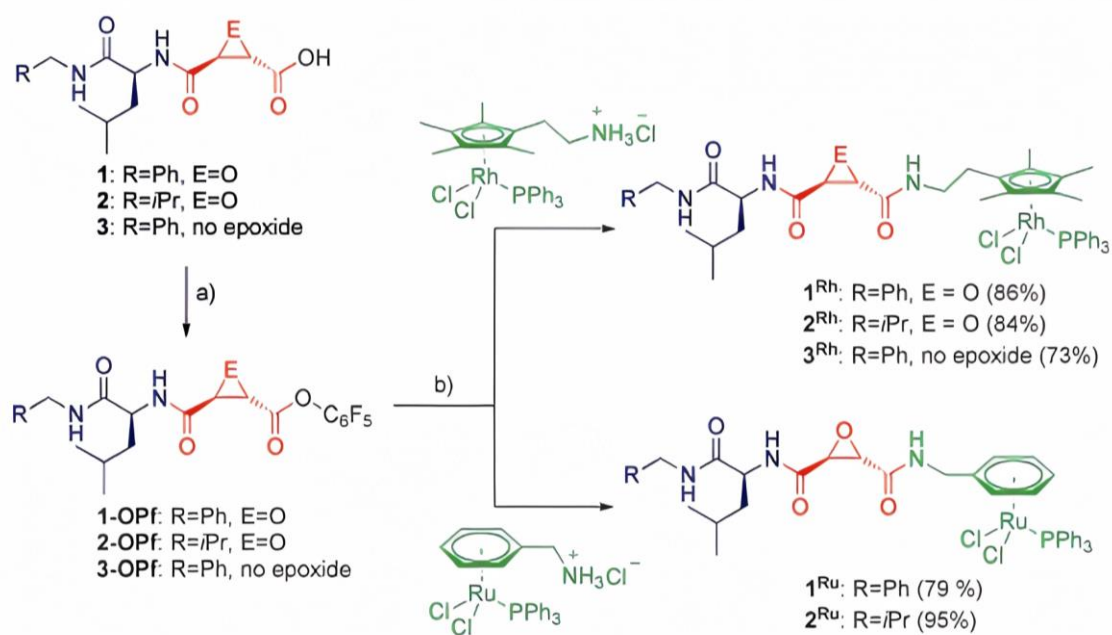


**Slika 5:** **A)** Shematski prikaz metalno-konjugiranog afinitetnog privjeska (mAL-a), koji se sastoji od djela za prepoznavanje i orijentiranje u enzimu (engl. *recognition element*), djela koje tvori kovalentnu vezu s enzimom (engl. *reactive group*), i katalitički aktivnog metalnog kompleksa. Vidljiva je relativna jednostavnost struktura orijentacijskog elementa, i „polu-sendviča“ metalnih kompleksa rodija i rutenija. **B)** Shematski prikaz usmjerenog vezanja mAL-a u aktivno mjesto proteaze koristeći konstrukciju opisanu pod A). **C)** Model 2<sup>Rh</sup>@Papaina koji prikazuje mjesto vezanja mAL-a i poziciju metalnog centra u aktivnom mjestu proteaze.<sup>3</sup> Preuzeto i prilagođeno od: T. Reiner, D. Jantke, A. N. Marziale, A. Raba, J. Eppinger, *ChemistryOpen* **2** (2013), 50–54.

Sa ciljem testiranja hidrogeniranja ketona, autori su odabrali cisteinsku proteazu iz roda papain. Razlog tog odabira je što navedenu obitelj proteaza inhibiraju derivati epoksisukcinil estera mehanizmom S-alkiliranja koje vrši aktivno mjesto enzima nad epoksidnom grupom. To omogućava umetanje katalitički aktivnih mAL-ova na jednostavan i efektivan način. Odabrani mAL-ovi, sastavljeni od atoma rodija ili rutenija u „polusendviču“ (slika 5), konjugirani su s enzimom jednostavnom inkubacijom kako bi stvorili organometalni<sup>v</sup> enzimski hibrid (OMEH). U tu su svrhu ispitana tri različita mAL-a, dva metalna kompleksa (Rh i Ru), i dvije cisteinske proteaze: papain i bromelain.<sup>3</sup>

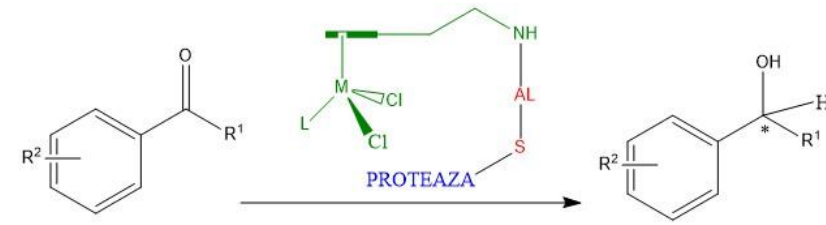
Kako bi odredili aktivnost dobivenih OMEH-a ispitivana je reakcija hidrogeniranja ketona, budući da su šesteročlani arenski kompleksi rutenija dobri katalizatori takvih reakcija. Testirani su afinitetni markeri **1**, **2**, i **3** (slika 6); u kombinaciji sa Ru i Rh; usađeni u papain i bromelain. Eksperimentalni dio sastojao se od 2,2,2-trifluoroacetofenona kao supstrata, i svježe pripremljenih OMEH-a, i dovodom vodika pod tlakom. Rezultati su prikazani u tablici 5.<sup>3</sup>

<sup>v</sup> Organometalni spojevi su spojevi u kojima je atom ili ion metala kovalentno povezan s atomom ugljika.



**Slika 6.** Sinteza i sastav korištenih mAL-ova. Privjesci su konstruirani od skeleta kojem se mijenjaju supstituenti. a) pentafluorofenol (1,5 ekv), PS-*N-N'*-dicikloheksilkarbodiimid (3 ekv), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C, 8h b) metalni kompleks (1 ekv), Et<sub>3</sub>N (4,5 ekv), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0,5 h. <sup>3</sup> Preuzeto i prilagođeno od: T. Reiner, D. Jantke, A. N. Marziale, A. Raba, J. Eppinger, *ChemistryOpen* **2** (2013), 50–54.

**Tablica 5.** Rezultati ispitivanja aktivnosti hidrogeniranja ketona različitih OMEH-a. Najveći prinos iskazao je  $1^{\text{Rh}}$ @papain pri parcijalnom tlaku vodika od 75 bar. Promjena metalnog centra iz Rh u Ru za taj OMEH u istim uvjetima rezultirala je smanjenjem aktivnost za faktor od dva. Za uočiti je kako su slobodni mAL-ovi davali racemat, dok su OMEH-ovi rezultirali 60:40 omjerom *R/S* enantiomera.<sup>vi 3</sup>



Uzorak	Katalizator	<i>t</i> [h]	<i>p</i> <sub>vodik</sub> [bar]	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Prinos [%]	e.r. ( <i>R/S</i> )
1	$1^{\text{Rh}}$ @Papain	96	75	H	CF <sub>3</sub>	89	62:38
2	$1^{\text{Rh}}$ @Papain	65	25	H	CF <sub>3</sub>	81	62:38
3	$1^{\text{Ru}}$ @Papain	96	75	H	CF <sub>3</sub>	44	60:40
4	$1^{\text{Ru}}$ @Papain	65	25	H	CF <sub>3</sub>	19	63:37
5	$1^{\text{Ru}}$ @Bromel.	96	75	H	CF <sub>3</sub>	44	40:60
6	$1^{\text{Ru}}$ @Bromel.	65	25	H	CF <sub>3</sub>	12	61:59
7	$2^{\text{Rh}}$ @Papain	65	35	H	CF <sub>3</sub>	41	60:40
8	$3^{\text{Ru}}$ + Papain	65	25	H	CF <sub>3</sub>	27	49:51
9	$1^{\text{Rh}}$	65	25	H	CF <sub>3</sub>	4	52:48
10	$1^{\text{Ru}}$	65	25	H	CF <sub>3</sub>	5	50:50
11	$3^{\text{Rh}}$	65	25	H	CF <sub>3</sub>	4	52:40
12	$1^{\text{Rh}}$ @Papain	96	75	<i>o</i> -F	CH <sub>3</sub>	12	65:35
13	$1^{\text{Rh}}$ @Papain	96	75	<i>p</i> -CF <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	16	73:27
14	$1^{\text{Rh}}$ @Papain	96	75	<i>p</i> -Cl	CH <sub>3</sub>	19	82:18

<sup>vi</sup> Reakcijski uvjeti: 20 mmol dm<sup>-3</sup> ketona, omjer ketona i katalitičkog metalnog centra 100:1, DTT 0,95 mmol dm<sup>-3</sup>, 12,4 % DMSO, fosfatni pufer 125 mmol dm<sup>-3</sup> s vrijednosti pH od 6,5 i 40 °C. Iskorištenje je određeno <sup>19</sup>F NMR spektroskopijom, zahvaljujući odabiru CF<sub>3</sub> kao R<sup>2</sup>.

Vidljiv je veliki skok u prinosu mAL-a vezanih na enzim, u odnosu na slobodnu vrstu. Uz to, vezanjem na enzim postignuta je enantioselektivnost, dok je slobodni mAL proizvodio racemat. Takvi rezultati postignuti su zahvaljujući činjenici što u dobivenim OMEH-ima proteaza oponaša ulogu asimetričnog liganda na metalnom centru koji olakšava i ubrzava kiralne reakcije koje su asimetrične po prirodi. Regulacija stereospecifičnosti postigla se mijenjanjem dijelova sustava, pa je tako  $1^{Rh}$ @Papain rezultirao sa 60 % *R* produktom dok je promjenom metalnog centra produkt  $1^{Ru}$ @Papaina bio 60 % *S*-produkt. To demonstrira veliku snagu OMEH-a, u tome što zahvaljujući modularnosti sustava možemo krojiti biokatalizator prema našoj potrebi. Nadalje, priprema i uporaba OMEH-a može se olakšati stvaranjem biblioteka znanih metalnih afinitetnih privjesaka što bitno može olakšati proces inkorporacije ovakve tehnologije.<sup>3</sup>

### 2.1.3. Usmjerena evolucija

Genetsko sklapanje i metalno konjugirani afinitetni privjesci nisu jedine metode pripreme sintetskih enzima. Jedna rutinski korištena metoda koja se u pristupu fundamentalno razlikuje od dvije prethodno spomenute zasniva se na heuristici koje smo mi ljudi produkt, evoluciji. Kroz urođenu tendenciju živih organizama da se prilagođavaju aktualnom pejzažu bioinženjeri ciljanim mijenjanjem tog pejzaža bakterije mogu navesti da se kroz nekoliko generacija krenu adaptirati za te uvjete. To prati promjena u djelovanju enzima, koji time krenu obnašati funkcije koje su direktan rezultat bioinženjerske manipulacije. Kako enzime proizvodi bakterija (npr. *Escherichia coli*, kao često korištena bakterijska vrsta) enzim je moguće pripremiti umnažanjem prethodno pripravljene kolonije koja pokazuje željenu aktivnost.<sup>12</sup>

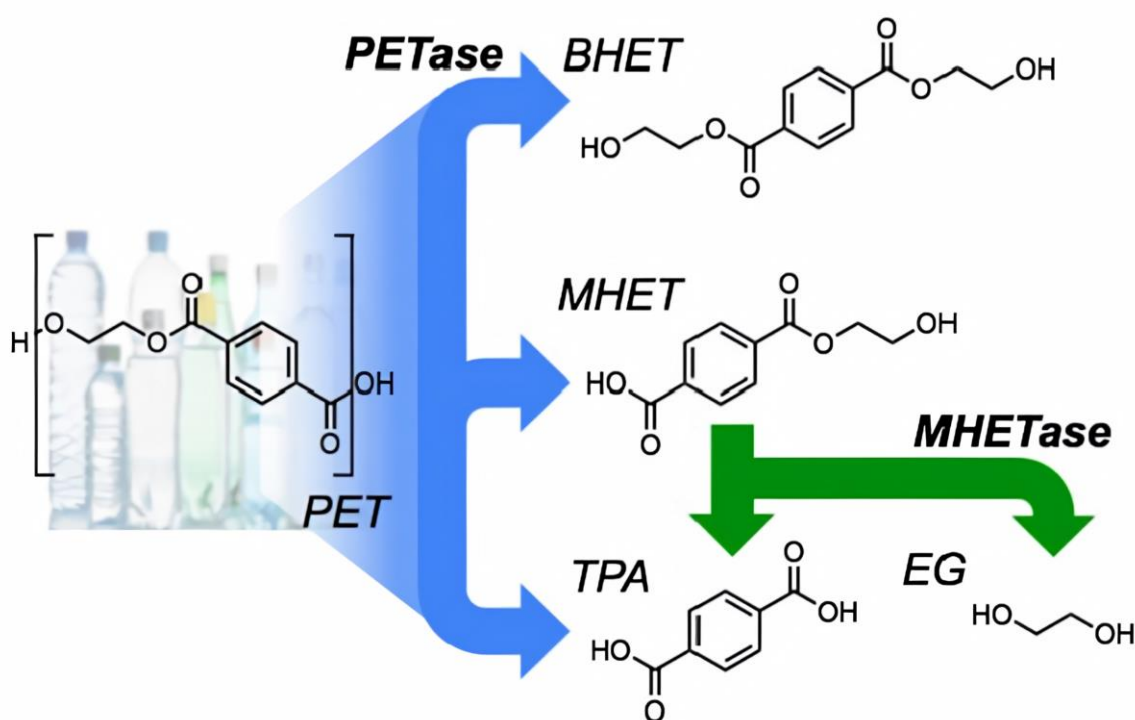
Dobar primjer snage usmjerene evolucije je eksperiment kojim se hidrolitička proteaza koja inače gubi aktivnost u visokim koncentracijama dimetilformamida (DMF) usmjerenom evolucijom adaptirala da u uvjetima od 60 % DMF-a funkcionira jednako efektivno kao divlji tip u odsutnosti DMF-a. Takav porast u aktivnosti od 256 puta postignut je nasumičnim mutacijama i probiranjem najuspješnijih kandidata u povećavajućim koncentracijama DMF-a.<sup>12</sup> Ovaj pristup nije ograničen na usko područje oko reakcija nativnim za enzime. Primjer toga su sintetski enzimi koji kataliziraju sasvim nove reakcije koje nisu nađene u prirodi, poput stvaranja ciklopropanskih prstenova visoke napetosti. Kemičari takve spojeve mogu dobivati koristeći anorganske katalizatore poput prijelaznih metala, no otkriveno je kako slične reakcije promoviraju proteini s hemske željezo. Usmjerenom evolucijom i pogodnim supstratima enzimi koji inače obnašaju druge funkcije pretvoreni su u efikasne katalizatore reakcija poput stvaranja *cis*-ciklopropanona, prekursora za antidepresiv levomilnacipran. Za izdvojiti su još i eksperimenti kojima su dobiveni enzimi koji s visokom učinkovitosti kataliziraju stvaranje kemijskih veza nepoznatih u prirodi (ali regularno pripremljenih u laboratoriju) poput ugljik-silicij, ili ugljik-bor.<sup>12</sup>

Budući da težak dio posla otpada na evoluciju, objašnjenje promjena koje su dovele do porasta aktivnosti još uvijek nije jasna. Kako navodi autorica članka, prekrasna stvar inženjeringa evolucijom je što rezultati dolaze prvo; a razumijevanje može, a i ne mora doći kasnije.<sup>12</sup>

## 2.2. PETaza

Jedna potencijalno obećavajuća metoda sanacije antropogenog onečišćenja plastikom temelji se na sposobnosti djelovanju bakterije *Ideonella sakaiensis*, koja uspijeva rasti na PET-u (polietilen terftalatu zahvaljujući lučenju enzima koji razgrađuje PET, PETaze). S namjerom boljeg razumijevanja tog enzima i mogućnosti potencijalnih modifikacija nad istim, te odgovaranjem na pitanje je li taj biokatalizator moguće rješenje polucije plastikom; ovo poglavlje namijenjeno je pregledu rada koji se bavi ovim enzimom.<sup>4</sup>

Za depolimerizaciju PET-a potrebno je pocijepati esterske veze, no reagensi koji to postižu su skupi i neisplativi na velikoj skali. Iz tog je razloga ovaj biokatalitički pristup, vođen evolucijom mikroorganizama koji se prilagođavaju antropocenskom pejzažu, obećavajući kao pristupačno rješenje. Enzim koji je karakteriziran u sklopu spomenutog rada<sup>4</sup> pripada obitelji kutinaza i lipaza, odnosno enzima koji kataliziraju hidrolizu kutina i lipida. Kutin je polimer koji gradi kutikulu (tanka površinska kožica organizma, npr. biljke), te je voskasti polimer sastavljen od C18 ili C16 masnih kiselina poput 16-hidroksipalmitinske kiseline, 9,16-dihidroksipalmitinske kiseline u slučaju C16 obitelji, ili 18-hidroksioleinske i 9,10-epoksi-18-hidroksistearinske i 9,10,18-trihidroksistearinske kiseline u slučaju C18 obitelji.<sup>6</sup> Autori navode kako PETaza zbog sposobnosti cijepanja visoko kristaličnog PET, ima potencijala cijepati cijeli niz sličnih sintetskih poliestera. Struktura PETaze određena je difrakcijom sinkrotronskog zračenja pri visokoj rezoluciji, te je uspoređena sa strukturama poznatih kutinaza. Na temelju, pripravili su mutant PETazu koja mutacijom na aktivnom centru pokazuje poboljšanu sposobnost razgradnje kristaličnog PETa zahvaljujući većem afinitetu enzima za vezanja supstrata. To poboljšanje u aktivnosti istraženo je molekulskom dinamikom.<sup>4</sup>

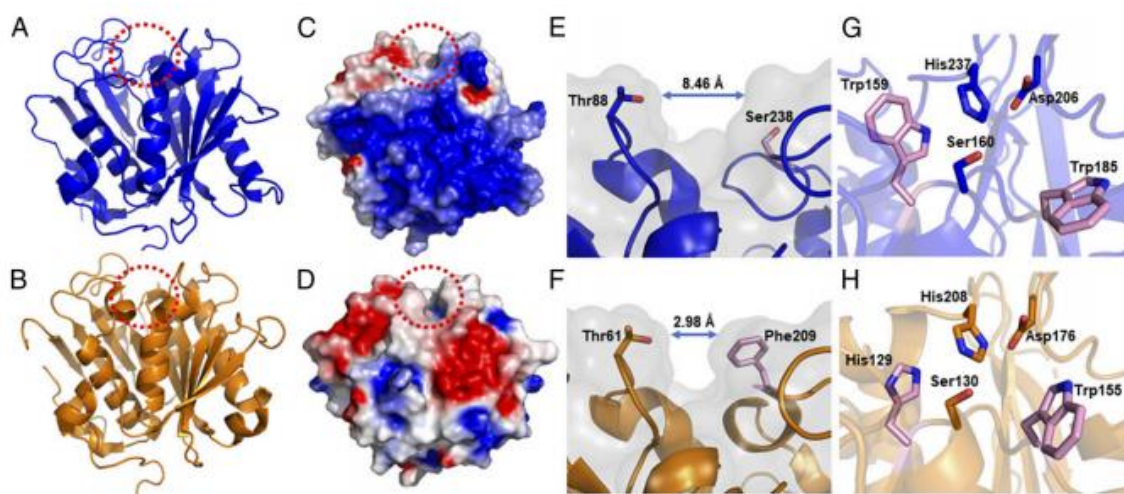


**Slika 7.** Shematski prikaz razgradnje polietilen teraftalata PETazom. Produkti razgradnje su bis(2-hidroksietil) teraftalat (BHET), mono(2-hidroksietil) teraftalat (MHET) i teraftalat (TPA). MHETaza može prevesti MHET i TPA u etan-1,2-diol (eten glikol, EG).<sup>4</sup> Preuzeto i prilagođeno prema: H. P. Austina, M. D. Allena, *et al.*, *P. Natl. Acad. Sci. USA* **115** (2019) E4350–E4357.

### 2.2.1. Karakterizacija PETaze

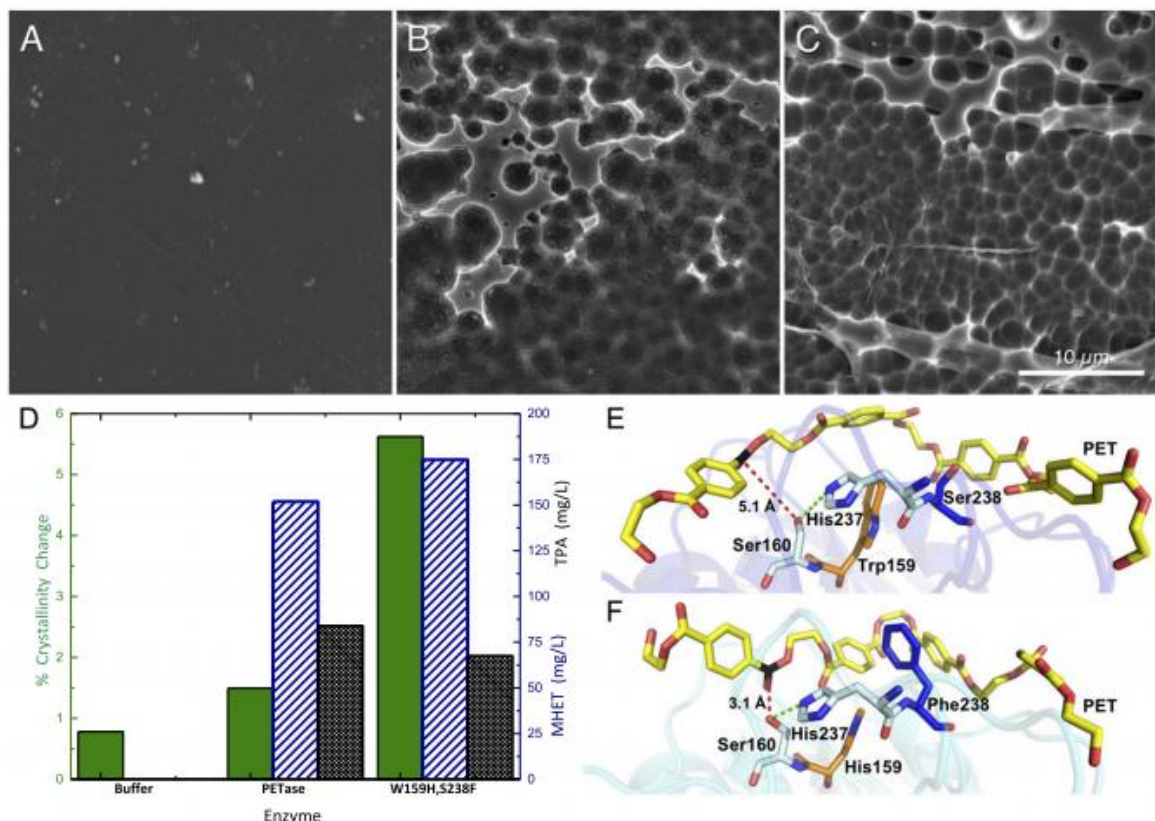
Ustanovljeno je da PETaza pripada superporodici  $\alpha/\beta$ -hidrolaza, kojima je zajednička trodimenzijska struktura koja se sastoji od osam  $\beta$ -lanaca i šest  $\alpha$ -zavojnica (slika 8). Površina PETaze je jako polarizirana dok obično kutinaze imaju neutralniju izoelektričnu točku. Druga velika razlika između PETaze i klasičnih kutinaza je, zaključuju autori, puno širi otvor aktivnog mjesta PETaze koji omogućava prihvatanje semiaromatičnih poliesterâ. Otvore PETaze je na najširem djelu trostruko veći od otvora kutinaze bakterije *Thermobifida fusca*. Takva velika razlika u otvoru postiže se promjenom fenilalanina u serin. Taj podatak svjedoči o tome kako je moguće uzrokovati velike promjene u tercijarnoj strukturi enzima, pa tako i njegovoj aktivnosti, s malim promjenama u primarnoj strukturi. Aktivno mjesto sastoji se od katalitičke trijade karakteristične za obitelj kutinaza, te u karakteriziranoj PETazi to predstavlja Ser160, Asp206 i His237. Njen mehanizam reakcije koji je očuvan kroz porodicu kutinaza, pa je tako prisutan i u PETazi, se zasniva na nukleofilnom serinu u hidrofobnoj okolini ostalih aminokiselina aktivnog mjesta (slika 8).<sup>4</sup>





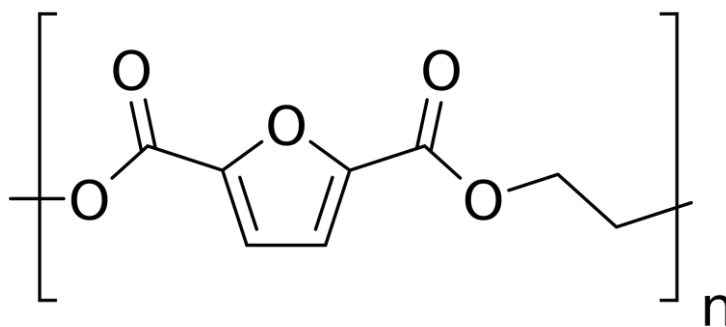
**Slika 8.** **A)** Prikaz trodimenzijske struktura PETaze, pri rezoluciji 0,92 Å; gdje je otvor aktivnog mjesta koji se nalazi na gornjem djelu enzima označen crvenom iscrtanom kružnicom. **B)** Slika kutinaze bakterija *T. fusca*. Vidljivo je kako su strukture izuzetno slične, sa zamjetnom razlikom u veličini otvora aktivnog mjesta. **C)** Distribucija elektrostatskog potencijala PETaze po njenoj površini dostupnoj otapalu, u usporedbi s kutinazom (**D**). Crveno predstavlja kiselo, bijelo neutralno, i plavo bazično. Primjetna je značajna razlika u raspodjeli naboja, s površinom PETaze koja je većinski bazična, u usporedbi sa kutinazom koja ima lokalizirane otoke bazičnosti i kiselosti koji sumarno daju relativno neutralnu površinu. **E)** Pogled aminokiselinskih ostataka koji sačinjavaju otvor aktivnog mjesta PETaze označenog crvenom iscrtanom linijom. Širina otvora odgovara udaljenosti između Thr86 i Ser238. **F)** Odgovarajuću užu otvor kutinaze bakterije *T. fusca*. U ovom slučaju širina otvora odgovara udaljenosti Phe209, što je posljedica promjene primarne strukture PETaze u odnosu na kutinazu. **G)** Poblizi prikaz katalitičke trijade PETaze, His237, Ser160, i Asp206 (plavi štapići). Trp159 i Trp155 (ružičasti štapići) odgovaraju metama ciljanog mutiranja za stvaranje mutanta koji se iskazao većom aktivnosti u razgradnji PET-a, od divljeg tipa. **H)** Prikaz aktivnog mjesta kutinaze, s vidljivom katalitičkom trijadom koja je zadržana i u PETazi.<sup>4</sup> Preuzeto i prilagođeno prema: *P. Natl. Acad. Sci. USA* **115** (2019) E4350-E4357.

Kako bi provjerili utjecaj veličine otvora aktivnog mjesta na razgradnju PET-a, autori su mutirali PETazu kako bi bila više nalik kutinazi. Očekujući smanjenje u aktivnosti uslijed suženja otvora aktivnog mjesta, testirali su njenu moć razgradnje PET-a kristaličnosti od 14,8 %. Budući da se PET sastoji od lanaca polimera, tokom njegove formacije dijelovi se mogu formirati s međusobno paralelnim lancima tako tvoreći lokalne kristalične regije s gušće pakiranim lancima; dok ostali dijelovi bivaju amorfni i „rahlji“.<sup>10</sup> Kao referenca, navode autori, gazirana pića dolaze u pakiranjima s kristaličnosti od 15,7 %. Ustanovljeno je kako PETaze uzrokuju eroziju na plastici, i smanjuju kristaličnost. Na iznenađenje autora, mutirana PETaza iskazala se većom redukcijom kristaličnosti i razgradnji PET-a u odnosu na divlji tip (slika 9). Takvo poboljšanje u aktivnosti može se objasniti aromatskim interakcijama supstrata s Phe238. To dodatno stabilizira i pozicionira karbonilni atom PET-a koji je na povoljnoj udaljenosti od Ser160 koji biva deprotoniran od His237, te Asp206 koji prihvaća i prenosi proton dalje.<sup>4</sup>



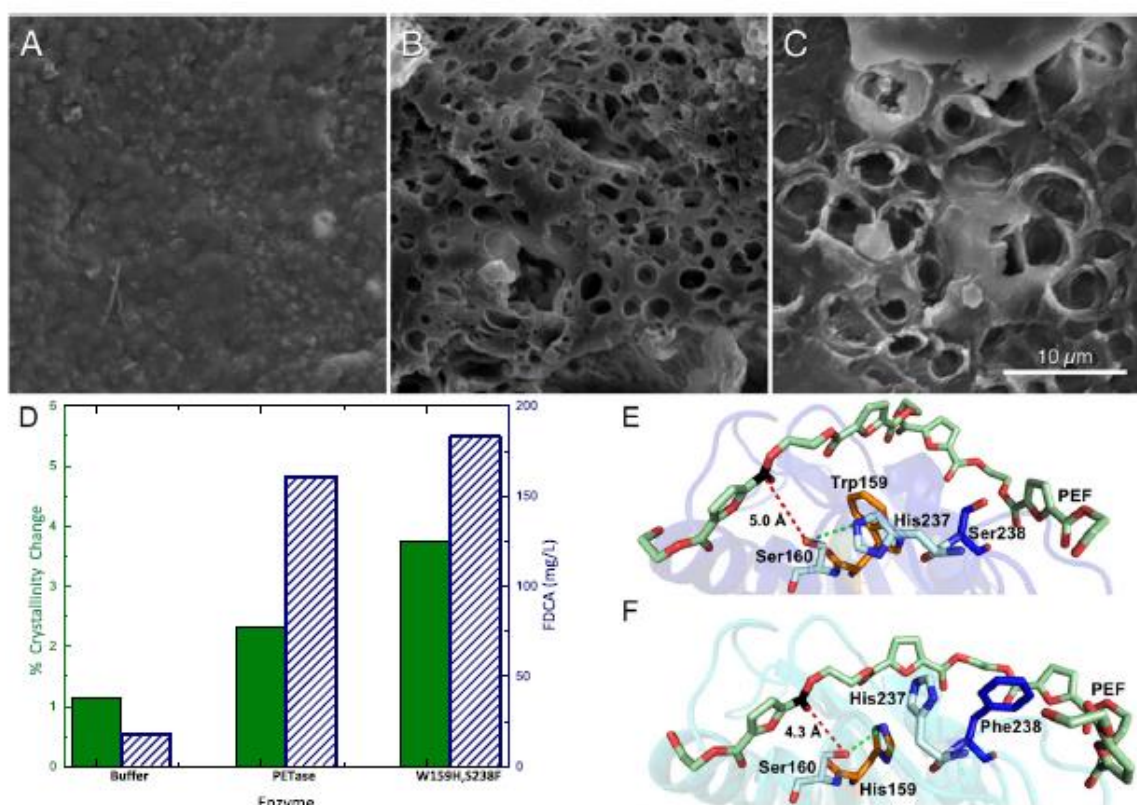
**Slika 9.** **A)** PET uzorak u puferu, kontrolna skupina, bez PETaze. **B)** PET uzorak nakon inkubacije s divljim tipom PETaze. Vidljiva erozija površine i narušavanje integriteta. **C)** PET uzorak nakon inkubacije sa sintetskim mutantom PETaze. Vidljiv viši stupanj erozije površine i degradacije, nego kao kod divljeg tipa.<sup>vii</sup> **D)** postotak promjene kristalichnosti (zeleni stupac), i prinos produkta reakcije (plavi iscertani stupac – MHET, crni stupac – TPA) nakon 96 h inkubacije s puferom, divljim tipom PETaze, i mutantom PETaze. **E)** Predviđeni mehanizam vezanja PET-a u divlji tip PETaze. Vidljivo je kako PET ulazi u aktivno mjesto pogodno usmjeren za napad nukleofilne hidroksilne grupe Ser160 na crno označeni atom ugljika PET-a (crvena iscertana linija). His237 vrši deprotonaciju Serina (zeleno iscertana linija). **F)** Prikaz aktivnog mjesta mutantna PETaze. Mutant ostvaruje veću aktivnost preko  $\pi$ -interakcija PET-a s Phe238 jer mutacija His159 u Trp omogućava PET polimeru da uđe dublje u otvor aktivnog mjesta.<sup>4</sup> Preuzeto i prilagođeno prema: H. P. Austina, M. D. Allena, *et al.*, *P. Natl. Acad. Sci. USA* **115** (2019) E4350–E4357.

<sup>vii</sup> Period inkubacije iznosio je 96 h, s koncentracijom PETaze od 50 nmol dm<sup>-3</sup> u fosfatnom puferu s vrijednosti pH od 7,2.



**Slika 10:** polietilen 2,5-furandikarboksilat, PEF. Kemijski analog PET-a. Preuzeto s [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Polyethylene\\_furanoate.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Polyethylene_furanoate.svg), 12. srpnja 2021.

Jedna od alternativa PET-u koja se nudi kao biorazgradivija verzija plastike, je PEF (slika 10). U sklopu studija autori su pripravili uzorke PEF-a, te ispitali divlji tip PETaze i mutanta. Zaključili su kako je PETaza jače aktivna na PEF-u, nego PET-u. Rezultati su prikazani na slici 11.<sup>4</sup>



**Slika 11.** **A)** Kontrolni uzorak PEF-a, inkubiran samo u puferu. **B)** PEF uzorak nakon inkubacije s divljim tipom PETaze. Vidljiva znatna erozija površine i narušavanje integriteta strukture. **C)** PEF uzorak nakon inkubacije s mutantom PETaze. Veći stupanj erozije površine i razgradnje nego u slučaju divljeg tipa PETaze, i PET-a (slika 9).<sup>viii</sup> **D)** Postotak promjene kristalčnosti (zeleni stupac) kontrolnog uzorka, uzorka nakon inkubacije divljim tipom PETaze, i inkubacije mutantom PETaze. Kao i u slučaju PET-a, kristalčnost PEF-a se znatno smanji nakon inkubacije sa enzimima. Plavi iscrtani stupac predstavlja koncentracije produkta reakcije razgradnje PEF-a. **E)** Prikaz predviđenog mjesta vezanje supstrate PEF na aktivno mjesto divljeg tipa PETaze. Karbonilni atom ugljika PEF-a je na povoljnoj udaljenosti od nukleofilne hidroksilne skupine katalitički aktivnog Ser160 (crvena iscrtana linija). His237 vrši deprotonaciju Ser160 (zeleno iscrtana linija). **F)** Prikaz vezanja PEF-a u aktivno mjesto mutanta PETaze. PEF s aktivnim mjestom mutanta ostvaruje interakcije različite u odnosu na PEF i divlji tip PETaze. His237 biva rotiran dalje od Ser160, i umjesto aromatskih interakcija kao u slučaju PET-a, stvaraju se vodikove veze između mutiranog His159 i PEF-a. Slično kao s PET-om, Phe238 ostvaruje hidrofobne interakcije s furanskim prstenom PEF polimera, što pridonosi boljem pristajanju PEF-a u aktivno mjesto mutiranog enzima, u odnosu na divlji tip.<sup>4</sup> Preuzeto i prilagođeno prema: H. P. Austina, M. D. Allena, *et al.*, *P. Natl. Acad. Sci. USA* **115** (2019) E4350–E4357.

<sup>viii</sup> Slike su slikane nakon inkubacije od 96 h, sa 50 nmol dm<sup>-3</sup> PETaza s vrijednosti pH fosfatnog pufera od 7,2.

### 2.3. Diskusija

Pored razvijanja same biokatalitičke organomašinerije u vidu sintetskih enzima, potrebno je razviti infrastrukturu koja bi omogućavala primjenu opisanih metoda na velikoj skali. Glavnu prepreku predstavlja visoka cijena, kako kofaktora tako i enzima,<sup>1,2</sup> te je za očekivati kako se sva eventualna rješenja moraju dičiti visokom efikasnosti. Primjerice, primamljiva metoda rukovanja sintetskim biokatalizatorima je kromatografija s enzimima imobiliziranim na stacionarnoj fazi<sup>5</sup>. Ideja ulijevanja reaktanata na jedan kraj kromatografske kolone, te dobivanje produkta iz drugog zvuči jako primamljivo, no nije bez svojih mana (primjerice: retencija enzima na krutoj fazi, promjena uvjeta reakcije zbog stacionarne faze, smanjenje dostupne površine.). To je koncept koji se već koristi, i među primjenama reaktora s enzimima imobiliziranim na stacionarnoj fazi ističu se čišćenje, razdvajanje kiralnih enantiomera, biokataliza, te istraživanje utjecaja malih molekula poput modulatora na proteine.<sup>5</sup> Genetsko sklapanje i metalni afinitetni privjesci bi mogli otvoriti nove puteve fiksacije enzima na stacionarnu fazu. Ako poznajemo enzim i sintetske dijelove kojim ga modificiramo, lakše je skrojiti stacionarnu fazu koja će davati najbolje rezultate. Pored toga, zahvaljujući modularnosti sustava napreci imaju mogućnost translahirati se dalje od originalnih reakcija, kao primjer: dobar NOX i pripadajuća spojnice mogu raditi u sklopu s raznim ADH-ima svaki sa svojim enantiospecifičnim produktom/reaktantom;<sup>2</sup> ili kako PETaza cijepa PET, PEF, i druge aromatske poliestere<sup>4</sup>. Ovakve, i druge slične metode mogu omogućiti efektivno korištenje sintetskih enzima na većim skalama, i njihov daljnji razvitak; jer ipak je industriji isplativost među najbitnijim parametrima.

Iz prijašnjih poglavlja da se zaključiti kako je biokataliza sintetski modificiranim enzimima uistinu jedno obećavajuće mlado polje, no u ranoj fazi razvoja. Alati na raspolaganju bioinženjera i dalje su sa znatnim ograničenjima, raspon modifikacija je malen, biblioteke mAL-ova i spojnice su nepotpune, i svi mehanizmi koji oblikuju interakcije poput utjecaja spojnice i utjecaja redosljed sklopa enzima nisu u potpunosti razjašnjeni.<sup>1-3</sup> Kako je sintetska biokataliza mlado područje, dostupne modifikacije ograničene su na usko područje oko prirodnih funkcija divljih enzima koji bivaju modificirani; a razvijene metode još nisu na razini industrijskih standarda koji bi bili monetarno isplativi.<sup>1-4</sup> U 2019.-toj M. L. Desrousseaux i H. Texler sa suradnicima su uspjeli, s poboljšanom PETazom, doći do hidrolizne efikasnosti od 90 % depolimerizacije PET-a do monomera (tijekom 10 h, s 3 mg enzima po gramu PET-a).<sup>11</sup> Uz to, pokazali su kako enzimski depolimeriziran PET pokazuje identična svojstva petrokemijskom PET-u, što osigurava da biokatalitički pristup može pridonijeti cirkularnoj ekonomiji PET-a u vidu da produkti enzimske reciklaže bivaju korišteni za pripremu novog materijala.<sup>11</sup> Budućnost će pokazati isplativost ovakvog postupka.

Razvojem tehnologije, širenjem kolektivnog znanja, i razvojem robusnijih metoda rukovanja i priprave sintetskih biokatalizatora mnogi od gore navedenih nedostataka mogu se korigirati. Tako, kao primjer, za širenje biblioteka spojnice i mAL-ova postoje dva pristupa. Prvi je

eksperimentalni, koji uključuje pripravu i ispitivanje različitih spojnica i/ili mAL-ova, kako bi im se ustanovila svojstva i karakteristike ponašanja usred sprezanja s različitim enzimima. Drugi se zasniva na teoretskoj osnovi, i uključuje provedbu računalnih simulacija.<sup>3</sup> Budući da ne uključuje skupe reagense i posljedično cijena neuspjeha nije toliko visoka, računalni pristup danas zvuči primamljivo. Za očekivati je kako će njen razvitak igrati veliku ulogu u razvoju ove tehnologije i njenoj prilagodbi na industrijske skale.

Važnost ovakvog biokatalitičkog pristupa koji može biti netoksičan<sup>1</sup>, ili manje toksičan od konvencionalnih industrijskih reagensa, leži (između ostalog) u činjenici da korištenjem netoksičnih reagensa umjesto toksičnih (poput teških metala, organskih otapala.) zaustavljamo taj dotok zagađenja. Pored toga, biokatalitički pristup ima potencijala otvoriti vrata novim pristupima koji su efikasniji, jeftiniji, i zagađuju manje; ili sasvim novim reakcijama poput razgradnje PET-a do etilen-glikola<sup>4</sup>. Tu važnost prepoznala je i Europska Unija, i to pokazala financirajući projekt ROBOX (*„ROBOX: Expanding the industrial use of Robust Oxidative Biocatalysts for the conversion and production of alcohols*), koji nastoji proširiti industrijsku primjenjivost biokatalitičkih pristupa oksidacije. Iz tog projekta potječu izvori o pregledu genetskog sklapanja i NOX-ADH sklopova.<sup>1,2</sup> ROBOX cilja smanjiti cijenu biokatalitičkog pristupa oksidacije do 50 %, energetske potrošnje do 60 %, kemijsku potrošnju do 16 % i emisije stakleničkih plinova do 50 %.<sup>7</sup> To su svakako ambiciozni ciljevi, i nema sumnje kako je zanimljivo vrijeme za biti dio biokemijske zajednice. Vrijeme će pokazati opravdanost i doseg ovih predviđanja i ciljeva.

### § 3. ZAKLJUČAK

U prvom poglavlju pregledana je metoda genetskog sklapanja, te potanko istraženi NOX-ADH enzimski sklopovi koji su pokazali povećanu aktivnost ADH jedinice uslijed dostupnosti kofaktora potrebnog za reakciju, koji lako biva recikliran sa NOX jedinicom. Spojeni bifunkcionalni enzim PTDH-BMVO pokazao je dobru ekspresiju, te s malim količinama fosfita i NADPH mogao je kontinuirano katalizirati Baeyer-Villigerovu oksidaciju. Enzim je funkcionirao i u koncentracijama NADP<sup>+</sup> nativnim za stanicu, bez dodatka dodatnog kofaktora, dokazujući snagu koja leži u „ugrađenom recikliranju“.<sup>1</sup> NOX-ADH sklopovi su zadržali enantioselektivnost, dokazujući kako sklapanje nije imalo utjecaja na smatanje i aktivnost individualnih funkcionalnih domena. Nakon toga, razmatrani su metalni afinitetni privjesci koji omogućavaju izmjenu funkcije enzima u koji se umeću na temelju poznavanja njegove strukture.<sup>2</sup> Na enzim papain vezani su mAL-ovi temeljeni na metalima Rh i Ru koji provode hidrogeniranje ketona. Slobodni, u reakciji tvore racemat, dok u ansamblu s enzimom iskazuju enantioselektivnost.<sup>3</sup> Kratko je pregledana treća metoda, usmjerena evolucija, kao pristup koji se temelji na *in vivo* promjenama koje su odgovor organizma na uvijete koje diktira kemičar.<sup>12</sup> Za kraj, opisana je PETaza, enzim iz porodice kutinaza, te ispitana njena djelotvornost razgradnje PET-a i PEF-a; te napravljen mutant koji je pokazao veću katalitičku moć od divljeg tipa. Autori su zaključili kako metodu treba poboljšati kako bi bila iskoristiva, potencijalno spregnuti s drugim (npr. mehaničko usitnjavanje materijala.), i da razumijevanje ovog mehanizma pruža platformu za daljnje razumijevanje i razvitak potencijalno moćnijih metoda.<sup>4</sup>

Polje sintetske biokatalize je mlado, i u razvitku. Iako sa svojim manama i ograničenjima, ima potencijala promijeniti načine na koje se provode već izvježbani postupci poput oksidacija farmaceutika,<sup>7</sup> a i otvoriti vrata sasvim novim postupcima poput razgradnje PET-a<sup>4</sup> i sl. Projekti poput ROBOX-a igraju kritičnu ulogu u tom razvitku, te će vrijeme pokazati pravu njihovu isplativost. Sa svim izazovima s kojima je čovječanstvo suočeno, razvitak novih i inovativnih pristupa starim i novim kemijskim/industrijskim postupcima je neophodan; a sintetska biokataliza ima potencijala donijeti žarko potrebnu pozitivnu promjenu.

## §4. LITERATURNI IZVORI

1. F. S. Aalbers, M. W. Fraaije, *ChemBioChem* **20** (2019)20-28.
2. F. S. Aalbers, M. W. Fraaije, *ChemBioChem* **20** (2019)51-56.
3. T. Reiner, D. Jantke, A. N. Marziale, A. Raba, J. Eppinger, *ChemistryOpen* , **2** (2013) 50–54.
4. H. P. Austina, M. D. Allena, B. S. Donohoeb, N. A. Rorrerc, F. L. Kearnsd, R. L. Silveirab, B. C. Pollardd, G. Dominicke, R. Dumanf, K. El Omarif, V. Mykhaylykf, A. Wagnerf, W. E. Michenerc, A. Amoreb, M. S. Skafe, M. F. Crowleyb, A. W. Thornea, C. W. Johnsonc, H. L. Woodcockd, J. E. McGeehana, G. T. Beckhamc, *P. Natl. Acad. Sci. USA* **115** (2019) E4350–E4357.
5. T. R. Besanger, R. J. Hodgson, J. R. A. Green, J. D. Brennan, *Analytica Chimica Acta*, **564** (2006) 106 – 115.
6. <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/cutin>, pristupljeno 12. srpnja 2021.
7. <https://h2020robox.eu/> pristupljeno 12. srpnja 2021.
8. [https://dbpedia.org/page/Proteinogenic\\_amino\\_acid](https://dbpedia.org/page/Proteinogenic_amino_acid) pristupljeno 12. srpnja 2021.
9. <https://www.history.com/news/prehistoric-ages-timeline> pristupljeno 12. srpnja 2021.
10. B. Demirel, A. Yaraş, H. Elçiçek, *Journal of Balikesir University Institute of Science and Technology*, **13** (2011) 26-35.
11. V. Tournier, C. M. Topham, A. Gilles *et al.*, *Nature* **580** (2020) 216-219.
12. F. H. Arnold, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **58** (2019) 14420-14426.