

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET



Marija R. Kokić

**Unapređenje biokatalitičke razgradnje
biopolimera poli(hidroksialkanoata) i
poli(mlečne kiseline)**

Doktorska disertacija

Beograd, 2026

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY



Marija R. Kokić

**Improvement of biocatalytic degradation of
poly(hydroxyalkanoates) and poly(lactic acid)
biopolymers**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2026

Članovi komisije

Dr Veselin Maslak, redovni profesor (predsednik komisije),
Hemijski fakultet,
Univerzitet u Beogradu

Dr Jasmina Nikodinović-Runić, naučni savetnik (mentor),
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,
Univerzitet u Beogradu

Dr Vladimir Beškoski, redovni profesor (mentor),
Hemijski fakultet,
Univerzitet u Beogradu

Dr Sanja Jeremić, naučni savetnik,
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,
Univerzitet u Beogradu

Dr Marija Lješević, viši naučni saradnik,
Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju,
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju,
Univerzitet u Beogradu

Datum: _____

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija je urađena u Grupi za ekobiotehnologiju i razvoj lekova, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu. Zahvaljujem se svim kolegama sa Instituta na pruženoj podršci i pomoći tokom rada.

Veliku zahvalnost dugujem mentorki dr Jasmini Nikodinović-Runić na pruženoj prilici da radim na aktuelnoj i meni posebno inspirativnoj temi. Zahvalna sam na prilici da kroz zajednički rad učim od izuzetne naučnice sa međunarodnim iskustvom, kao i na prilici da razvijam nova znanja i veštine, u istraživanju i van njega. Kroz ceo proces mnogo mi je značila njena otvorenost u komunikaciji sa mladim istraživačima i poverenje koje mi je pružala u samostalnom razvijanju ideja, bez kojih ovo iskustvo ne bi bilo isto.

Mentoru, prof. dr Vladimiru Beškoskom, zahvaljujem se na veoma lepoj saradnji, inspirativnim razgovorima o nauci, konstruktivnim sugestijama koje su unapredile ovu disertaciju, kao i na pomoći oko administrativnih obaveza na fakultetu.

Zahvaljujem se prof. dr Veselinu Maslaku na saradnji, posvećenosti i profesionalnom pristupu tokom izrade disertacije, kao i na pomoći u vezi sa administrativnim obavezama na fakultetu. Takođe, zahvaljujem se na sjajnim predavanjima iz organske hemije i znanju stečenom tokom studija, koje mi je mnogo puta pomoglo tokom izrade ove disertacije.

Zahvaljujem se dr Sanji Jeremić na posvećenom uvođenju u oblast istraživanja ove disertacije, kreativnosti, entuzijazmu i humoru koje je unosila u naš zajednički rad, a posebno na temeljnosti pri pregledanju disertacije i veoma korisnim sugestijama tokom njenog pisanja.

Zahvaljujem se dr Mariji Lješević na veoma lepoj saradnji i komunikaciji, pažljivom čitanju disertacije i smernicama koje su mi bile od velike pomoći tokom njenog pisanja.

Zahvaljujem se svim članovima Grupe za ekobiotehnologiju i razvoj lekova, Tatjani Ilić-Tomić, Sandri Vojnović, Jeleni Milovanović, Sanji Škaro Bogoević, Marijani Ponjavić, Dušanu Milivojeviću, Milici Ćirić, Ivani Aleksić Kitanović, Vuku Filipoviću, Jeleni Simić, Leni Pantelić, Brani Panteliću, Vukašinu Jankoviću, Milici Burović, Nikoli Radivojeviću, Maši Terzović i Milanu Slavkoviću na dobroj atmosferi, druženju i timskom radu na zajedničkim radovima i projektima.

Kolegincima i drugaricama Mileni Stevanović, Leni Pantelić i Ani Pantelić posebno se zahvaljujem na svim zajedničkim trenucima, smehu, razgovorima, savetima i podršci koji su mi mnogo značili i ulepšali ovaj period.

Zahvaljujem se prof. dr Aleksandri Maršavelski i prof. dr Nihan Celebi Olcum na inspirativnoj saradnji i prenetom znanju tokom studijskih boravaka u njihovim laboratorijama.

Hvala studentima i volonterima Nemanji Kutlešiću, Leni Stanković, Jeleni Dunji Dunjić i Mariji Radosavljević na entuzijazmu, kreativnosti i dobroj energiji tokom našeg zajedničkog rada.

Mom mužu Banetu zahvaljujem na svemu što nije moguće izreći u nekoliko redova ove zahvalnice. Zahvalna sam na svakoj reči podrške, veri u mene, deljenom entuzijazmu prema hemiji još od srednje škole, kao i na osloncu i miru koje mi je pružao na celom putu do ove disertacije i kroz sve što je ona donela.

Ovu disertaciju posvećujem svom dedi, koji je bio uz mene kada mi je to najviše značilo i koji bi danas bio najponosniji da je mogao da bude tu.

Unapređenje biokatalitičke razgradnje biopolimera poli(hidroksialkanoata) i poli(mlečne kiseline)

Sažetak

Zagađenje plastikom predstavlja jedan od najznačajnijih globalnih izazova za životnu sredinu, doprinoseći emisiji ugljen-dioksida i dugotrajnoj akumulaciji plastičnog otpada u ekosistemima. Bioplastika na bazi poli(hidroksioktanoata) (PHO) i poli(mlečne kiseline) (PLA) dugotrajno se akumulira u životnoj sredini, usled ograničene efikasnosti prirodne biorazgradnje i nedovoljno razvijenih strategija razgradnje. Razvoj enzimske depolimerizacija PHA i PLA može omogućiti ponovno iskorišćenje proizvoda razgradnje kao sirovina, doprinoseći cirkularnosti (bio)plastike.

Rezultati ove disertacije predstavljaju primenu dva model jedinjenja, izvedena iz monomera i dimera PHO, za razvoj brzog i kvantitativnog spektrofotometrijskog eseja za brzu i standardizovanu detekciju aktivnosti PHO-depolimeraza. Simulacije molekulske dinamike (SMD) identifikovale su ključne aminokiseline uključene u prepoznavanje PHO od strane PHO-depolimeraze iz *Pseudomonas fluorescens* GK13 (PfPHOaza): 3-hidroksioktanoil jedinice vezuju se u hidrofobnom džepu formiranom od Phe96, Phe125, Ile171 i Val230. Termostabilnost PfPHOaze unapređena je rekonstrukcijom predačkih sekvenci (*engl.* ASR), čime su dobijene varijante koje zadržavaju aktivnost do 75 °C.

Dodatno, istražena je prenamena komercijalne enzimske formulacije, Savinaze, iz industrije deterdženata, za depolimerizaciju PLA uzoraka potrošačkog kvaliteta, uz optimizaciju reakcionih uslova. Savinaza je efikasno razgradila različite PLA predmete, sa maksimalnom brzinom od 166 mg/(dan·mg enzima) za poklopac jednokratne čaše pri pH 8,5 i temperaturi od 42 °C. Mlečna kiselina identifikovana je kao glavni proizvod razgradnje. SMD identifikovale su Asn155 i Ser125 kao ključne ostatke za vezivanje PLA tetramera, pružajući uvid u specifičnost Savinaze prema PLA.

Ključne reči: Bioplastika, poli(hidroksialkanoati), poli(hidroksioktanoat), poli(mlečna kiselina), poli(laktid), biorazgradnja, biokataliza, enzimska razgradnja, PHA-depolimeraza, PHO-depolimeraza, PLA-depolimeraza, Savinaza, model-supstrati plastike, proteinsko inženjerstvo, rekonstrukcija predačkih sekvenci

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Biohemija

Improvement of biocatalytic degradation of poly(hydroxyalkanoates) and poly(lactic acid) biopolymers

Abstract

Plastic pollution is a pressing global environmental concern, driving increased carbon emissions and long-term accumulation of plastic waste in natural ecosystems. Bioplastics based on poly(hydroxyoctanoate) (PHO) and poly(lactic acid) (PLA) also persist in the environment due to the limited efficiency of natural biodegradation and insufficiently developed degradation strategies. The development of enzymatic depolymerization strategies for PHA and PLA may enable the reuse of degradation products as feedstocks, contributing to the circularity of (bio)plastics.

The results of this dissertation demonstrate the application of two model compounds, derived from PHO monomers and dimers, for the development of a rapid and quantitative spectrophotometric assay for rapid and standardized detection of PHO depolymerase activity. Molecular dynamics simulations (MDS) identified key amino acids involved in PHO recognition by the PHO depolymerase from *Pseudomonas fluorescens* GK13 (PfPHOase): 3-hydroxyoctanoyl units bind within a hydrophobic pocket formed by Phe96, Phe125, Ile171, and Val230. The thermostability of PfPHOase was improved through ancestral sequence reconstruction (ASR), yielding variants that retain activity up to 75 °C.

Additionally, the repurposing of the commercial enzyme formulation Savinase from the detergent industry for the depolymerization of consumer-grade PLA samples was investigated, with optimization of the reaction conditions. Savinase efficiently degraded various PLA items, reaching a maximum degradation rate of 166 mg/(day·mg enzyme) for a disposable cup lid at pH 8.5 and 42 °C. Lactic acid was identified as the main degradation product. MDS simulations identified Asn155 and Ser125 as key residues involved in PLA tetramer binding, providing insights into the PLA specificity of Savinase.

Keywords: Bioplastics, Poly(hydroxyalkanoates), Poly(hydroxyoctanoate), Poly(lactic acid), Poly(lactide), Biodegradation, Biocatalysis, Enzymatic degradation, PHA depolymerase, PHO depolymerase, PLA depolymerase, Savinase, Plastics-model compounds, Protein engineering, Ancestral sequence reconstruction

Scientific field: Chemistry

Scientific subfield: Biochemistry

Spisak skraćenica

AFM - Mikroskopija atomskih sila (*engl.* atomic force microscopy)

Amp - Ampicilin

APS - Amonijum-persulfat

ASR - rekonstrukcija predačkog gena (*engl.* ancestral sequence reconstruction)

BCA - Test sa bicinhoninskom kiselinom

CALB - Lipaza B iz *Candida antarctica*

Cam - Hloramfenikol

CFE - ukupan ćelijski ekstrakt (*engl.* cell-free extract)

CLSM - Konfokalna laserska skenirajuća mikroskopija (*engl.* confocal laser scanning microscopy)

DMA - Dinamička mehanička analiza

DNK - Dezoksiribonukleinska kiselina

DSC - Diferencijalno skenirajuća kalorimetrija

e-PHAaza - Ekstracelularna PHA-depolimeraza

FESEM - Skenirajuća elektronska mikroskopija sa emisionim izvorom polja (*engl.* field-emission scanning electron microscopy)

FTIR - Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (*engl.* Fourier transform infrared spectroscopy)

HDPE - Poli(etilen) visoke gustine (*engl.* high density poly(ethylene))

HiC - Kutinaza iz *Humicola insolens*

HPLC - Tečna hromatografija visokih performansi (*engl.* high-performance liquid chromatography)

IMAC - Imobilisana metal afinitetna hromatografija (*engl.* immobilized metal affinity chromatography)

i-PHAaza - Intracelularna PHA-depolimeraza

IPTG - Izopropil- β -D-1- tiogalaktopiranozid

KD - Katalitički domen

LA - Luria-Bertani agar

LB - Luria-Bertani tečna podloga

LCC - *engl.* Leaf-branch compost cutinase

LC-MS - Tečna hromatografija sa masenom spektrometrijom (*engl.* liquid chromatography - mass spectrometry)

LDPE - Poli(etilen) niske gustine (*engl.* low density poly(ethylene))

MAF - Mobilna amorfna faza

mcl-PHA - Poli(hidroksialkanoati) srednje dužine lanca (*engl.* medium chain length-polyhydroxyalkanoates)

MEGAWHOP - *engl.* The Megaprimer PCR of Whole Plasmids

Mw - Molekulska masa

Ni-NTA - Nikl-nitrilotrisirćetna kiselina *engl.* Ni-nitrilotriacetic acid

NMR - Nuklearna magnetna rezonanca

OD - Optička gustina (*engl.* optical density)

P(2HP) - Poli(2-hidroksipropanoat)

PA - Poli(amid)

PBAT - Poli(butilen-adipat-tereftalat)

PBS - Poli(butilen-sukcinat)

PCL - Poli(ϵ -kaprolakton) (*engl.* poly(ϵ -caprolactone))

PCR - Lančana reakcija polimeraze (*engl.* polymerase chain reaction)

PE - Poli(etilen)

PET - Poli(etilen-tereftalat)

PfPHOaza - PHO-depolimeraza iz *Pseudomonas fluorescens* GK13 (*Pseudomonas solani* GK13)

PGA - Poli(glikolna kiselina)

PHA - Poli(hidroksialkanoat)

PHB - Poli(3-hidroksibutirat)

PHBV - Kopolimer 3-hidroksibutirata sa 3-hidroksivaleratom

PHD - Poli(3-hidroksidekanoat)

PHO - Poli(3-hidroksioktanoat)

PHO-PHD - Poli(3-hidroksioktanoat-ko-3-hidroksidekanoat)

PLA - Poli(mlečna kiselina) (*engl.* poly(lactic acid))

PLLA - Poli(L-mlečna kiselina) (*engl.* poly(L-lactic acid))

PDLA - Poli(D-mlečna kiselina) (*engl.* poly(D-lactic acid))

pNP - *p*-nitrofenol

pNPB - *p*-nitrofenil-butirat

pNPO - *p*-nitrofenil-oktanoat

PP - Poli(propilen)

PS - Poli(stiren)

PUR - Poli(uretan)

PVA - Poli(vinil-alkohol)

PVC - Poli(vinil-hlorid) (*engl.* poly(vinyl chloride))

RAF - Rigidna amorfna faza

scl-PHA - Poli(hidroksialkanoati) kratkog lanca (*engl.* short chain length-polyhydroxyalkanoates)

SDS-PAGE - Natrijum-dodecilsulfat poliakrilamidna gel elektroforeza

SEC - Gel filtracija (*engl.* size exclusion chromatography)

SEM - Skenirajuća elektronska mikroskopija (*engl.* scanning electron microscopy)

SN - Supernatant

SVD - Supstrat-vezujući domen

TB - Bogata hranljiva podloga *engl.* Terrific broth

Tc - Temperatura kristalizacije

TEMED - N, N, N', N'-tetrametiletilendiamin

Tg - Temperature staklastog prelaza

TGA - Termogravimetrijska analiza

Tm - Temperatura topljenja

Tris - Tris(hidroksimetil)aminometan

WCA - Merenje kontaktnog ugla sa vodom

wt - *engl.* wild type

Xc - Stepen kristalnosti

XPS - X-ray fotoelektronska spektroskopija

XRD - X-ray difrakcija

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Pregled literature	3
2.1 Problemi plastičnog otpada	3
2.2 Enzimska i mikrobiološka razgradnja plastike – pregled i ključna saznanja	4
2.3 Biopolimeri kao alternativa konvencionalnoj plastici.....	7
2.4 Poli(hidroksialkanoati)	8
2.5 Poli(mlečna kiselina).....	9
2.6 Biokatalitička razgradnja plastike – mehanizam procesa i faktori koji utiču na efikasnost	10
2.6.1 Promena strukture polimera u zavisnosti od temperature i dalja promena biorazgradivosti polimera	12
2.7 PHA-depolimeraze	13
2.7.1 Metabolička funkcija i klasifikacija PHA-depolimeraza.....	13
2.7.2 Kinetički model dejstva PHA-depolimeraza	15
2.8 PLA-depolimeraze	17
2.9 Analitičke metode za praćenje i kvantifikaciju biokatalitičke razgradnje plastike	18
2.10 Proteinsko inženjerstvo za industrijsku primenu enzima	20
2.10.1 Racionalni dizajn	20
2.10.2 Dirigovana evolucija.....	21
2.10.3 Semi-racionalni dizajn	21
3. Ciljevi istraživanja	23
4. Materijal i metode	24
4.1. Materijal	24
4.1.1 Hemikalije	24
4.1.2 Bakterijski sojevi, plazmidi i prajmeri	25
4.1.3 Enzimi.....	30
4.1.4 Polimeri i PHO model jedinjenja (pNP-monomer i pNP-dimer)	30
4.2. Biokatalitička razgradnja PHA.....	31
4.2.1 Rekombinantna ekspersija PfPHOaze i LCC ^{ICCG}	31
4.2.2 Prečišćavanje PfPHOaze	32
4.2.3 Difuzioni test za praćenje poliesterazne aktivnosti PfPHOaze i drugih esteraza na biopolimerima.....	34
4.2.4 Spektrofotometrijski test esterazne aktivnosti sa hromogenim PHO monomerom i dimerom	35
4.2.5 Primena pNP-dimera za brzu detekciju PfPHOaze tokom prečišćavanja	35
4.2.6 Primena pNP-dimera za određivanje stabilnosti PfPHOaze.....	35

4.2.7 Modifikacija aktivnosti i stabilnosti PfPHOaze proteinskim inženjeringom	35
4.3. Biokatalitička razgradnja PLA	38
4.3.1 Priprema i karakterizacija PLA uzoraka.....	38
4.3.2 Enzimska razgradnja PLA	38
4.3.3 Određivanje monoesterazne aktivnosti Savinaze i Proteinaze K	39
4.3.4 HPLC i LC-MS analiza proizvoda nastalih enzimskom depolimerizacijom PLA	39
4.3.5 Difuzioni test za praćenje poliesterazne aktivnosti Savinaze na biopolimerima.....	39
4.3.6 Unapređenje adsorpcije Savinaze na površini PLA supstrata	39
4.3.7 Porozni nosači za orijentisanu i reverzibilnu imobilizaciju Savinaze	40
4.4. Bioinformatička i strukturna analiza proteina	40
4.5. Statistička analiza podataka	41
5. Rezultati i diskusija.....	42
5.1. Biokatalitička razgradnja PHA.....	42
5.1.1 Optimizacija uslova ekspresije PfPHOaze	42
5.1.2 Prečišćavanje PfPHOaze	44
5.1.3 Odabir enzima za testiranje specifičnosti PHO model jedinjenja na osnovu njihove aktivnosti na biopoliestrima	45
5.1.4 Spektrofotometrijski esej esterazne aktivnosti sa hromogenim PHO monomerom i dimerom (pNP-monomer i pNP-dimer).....	47
5.1.5 Kinetika hidrolize PHO model jedinjenja sa PfPHOazom.....	48
5.1.6 Molekulsko modelovanje interakcija PHO model jedinjenja i proizvoda njihove hidrolize sa PfPHOazom	49
5.1.7 Primena pNP-dimera kao hromogenog PHO model jedinjenja za brzu detekciju PfPHOaze tokom prečišćavanja.....	51
5.1.8 Primena pNP-dimera kao hromogenog PHO model jedinjenja za brzu detekciju PfPHOaze tokom testiranja temperaturne stabilnosti.....	52
5.1.9 Primena pNP-dimera kao hromogenog PHO model jedinjenja za detekciju PfPHOaze tokom testiranja stabilnosti u prisustvu deterdženata	53
5.1.10 Proteinsko inženjerstvo PfPHOaze za unapređenje razgradnje PHA.....	54
5.1.10.1 Dirigovana evolucija PfPHOaze	54
5.1.10.2 Konsenzus dizajn PfPHOaze	57
5.1.10.3 Rekonstrukcija predačkog gena (ASR) PfPHOaze	57
5.1.11 Uporedna analiza različitih pristupa proteinskog inženjerstva na primeru PfPHOaze	60
5.1.12 Detaljnija karakterizacija unapređenih varijanti PfPHOaze dobijenih pomoću ASR	62
5.1.12.1 Prečišćavanje unapređenih varijanti PfPHOaze dobijenih pomoću ASR.....	62
5.1.12.2 Ispitivanje termostabilnosti unapređenih varijanti PfPHOaze dobijenih pomoću ASR	63

5.1.12.3 Ispitivanje poliestarske supstratne specifičnosti unapređenih varijanti PfPHOaze dobijenih pomoću ASR.....	65
5.1.12.4 Ispitivanje pH optimuma unapređenih varijanti PfPHOaze dobijenih pomoću ASR....	67
5.1.12.5 Kinetika hidrolize PHO model jedinjenja unapređenim varijantama PfPHOaze dobijenih pomoću ASR.....	68
5.1.12.6 Identifikacija ključnih mutacija unapređenih varijanti PfPHOaze dobijenih pomoću ASR.....	69
5.2. Biokatalitička razgradnja PLA	73
5.2.1 Odabir enzima i optimizacija reakcionih uslova - određivanje temperaturnog i pH optimuma	73
5.2.2 Predtretman PLA za unapređenje biorazgradivosti	75
5.2.3 Ispitivanje uticaja kontrole reakcionog pH na efikasnost hidrolize PLA.....	76
5.2.4 Ispitivanje efikasnosti biokatalitičke depolimerizacije PLA proizvoda potrošačkog kvaliteta	77
5.2.5 Komparativna analiza efikasnosti Savinaze i Proteinaze K u depolimerizaciji PLA	80
5.2.6 Ispitivanje specifičnosti hidrolize i prepoznavanja PLA Savinazom u odnosu na druge biopoliestre	83
5.2.7 Ispitivanje pristupa za unapređenje adsorpcije Savinaze na biopoliestre i njenu orijentisanu imobilizaciju fuzijom sa SVD domenima PHA-depolimeraza.....	84
6. Zaključci	89
7. Literatura.....	91

1. Uvod

Kontinuirani porast akumulacije plastičnog otpada predstavlja jedan od najznačajnijih ekoloških izazova savremenog doba. Zbog svoje široke rasprostranjenosti, dugotrajnosti i perzistentnosti u životnoj sredini, plastika se danas smatra jednim od ključnih markera antropocena (1). Ambalažna industrija predstavlja najveći izvor plastičnog otpada, doprinoseći sa približno 44% ukupne količine generisanog plastičnog otpada (2,3). Iako su poslednjih godina uloženi značajni naponi ka smanjenju prekomerne upotrebe plastike i unapređenju sistema upravljanja otpadom, jednokratna plastika i dalje ostaje neophodna u brojnim primenama (4). Zbog toga je razvoj biopolimera kao alternativnih materijala koji kombinuju željena funkcionalna svojstva sa mogućnošću efikasnijeg upravljanja na kraju njihovog životnog ciklusa od ključnog značaja (5–7).

Poli(hidroksialkanoati) (PHA) i poli(mlečna kiselina) (PLA) izdvajaju se kao jedni od najznačajnijih biopolimera zahvaljujući njihovim fizičko-mehaničkim osobinama kojima mogu zameniti poli(propilen) (PP), poli(etilen) (PE), poli(stiren) (PS) i poli(etilen-tereftalat) (PET), proizvodnji iz obnovljivih izvora, biokompatibilnosti i potencijalu za biorazgradnju (8,9). PLA je trenutno najzastupljeniji biopolimer na industrijskoj skali, sa ~920000 tona proizvodnje tokom 2024. godine. Međutim, poli(hidroksioktanoat) (PHO) kao poli(hidroksialkanoat) srednje dužine lanca (mcl-PHA), i PLA mogu dugotrajno perzistirati u životnoj sredini usled neadekvatne zastupljenosti mikroorganizama i efikasnosti prirodnih enzima, kao i uslova u životnoj sredini neophodnih za njihovu razgradnju (5). Trenutno se navedeni biopolimeri razgrađuju industrijskim kompostiranjem pri temperaturi od 50 - 70 °C, a oslobođeni monomeri i oligomeri kao potencijalna sirovina za ponovnu proizvodnju polimera se tom prilikom trajno gube (10).

Nasuprot tome, enzimaska depolimerizacija biopolimera nudi mogućnost za dobijanje monomera visoke čistoće pri blagim reakcionim uslovima i uz visoku specifičnost enzima prema polimernom supstratu, što bi dodatno prevazišlo potrebu za razvrstavanjem plastičnog otpada (11,12). Dobijene hidroksikarboksilne kiseline mogu se koristiti kao polazne sirovine za ponovnu sintezu PHA i PLA sa očuvanim kvalitetom, čime enzimaska depolimerizacija predstavlja osnovu za razvoj cirkularne ekonomije bioplastike s obzirom na to da konvencionalno mehaničko recikliranje dovodi do smanjenja kvaliteta polimera, a plastika postaje neupotrebljiva nakon nekoliko ciklusa reciklaže (13,14). Kod PHA, fermentaciona proizvodnja visokog prinosa zahteva upotrebu glukoze kao izvora ugljenika što doprinosi ~50% ukupnoj proizvodnoj ceni PHA (15–17). Kod PLA, najčešće korišćena sirovina jeste kukuruzni skrob, čija proizvodnja zahteva obradive površine i predstavlja konkurenciju za primenu kukuruza kao prehrambene sirovine (18). Zbog toga razvoj efikasnih sistema za enzimsku regeneraciju monomera predstavlja važan korak i ka održivijoj proizvodnji bioplastike. Dodatno, oslobođene hidroksikarboksilne kiseline su vredne sirovine za farmaceutsku i kozmetičku industriju (19).

Istraživanja PET-depolimeraza rezultovala su razvojem efikasnih biokatalitičkih procesa za razgradnju PET plastike i ponovnu upotrebu regenerisanih monomera za novu polimerizaciju (20). Unapređena varijanta kutinaze izolovane metagenomski iz komposta (leaf-branch-compost cutinase, LCC), LCC^{ICCG}, omogućava depolimerizaciju 98 % PET plastike u toku 24 h (21). Na tom primeru se pokazalo da su povećanje termostabilnosti enzima i predtretman polimera ključni parametri za unapređenje efikasnosti enzimske razgradnje plastike. Za razliku od PET-depolimeraza, mcl-PHA-depolimeraze još uvek nisu razvijane za poboljšanu depolimerizaciju PHA otpada. Mcl-PHA su značajna grupa biopolimera zbog njihove potencijalne primene kao zamene za elastomerne materijale, uključujući i adhezive za koje postoji malo biorazgradivih alternativa (22,23). Međutim, standardizacija postojećih metoda karakterizacije PHA-depolimeraza za njihovu razgradnju otežana je zbog razlika u pripremi

polimera, koja utiče na različit stepen kristalnosti i dostupnosti površine polimera za enzimsku razgradnju (24). Dodatno, aktivnost PHA-depolimeraza najčešće se određuje semi-kvantitativnom metodom praćenja formiranja zone prosvetljenja u čvrstoj polimernoj emulziji. Kvantitativne metode, poput kombinacije pH-stat metode i HPLC analize, omogućavaju kvantifikaciju i identifikaciju oslobođenih kiselina, vremenski su zahtevne i ograničene u pogledu obrade velikog broja uzoraka i praćenja enzimske aktivnosti u realnom vremenu. U slučaju PLA-depolimeraza, napravljen je veći iskorak u istraživanju njihove primene u realističnim strategijama razgradnje PLA otpada, npr. prethodno je razvijena hipertermostabilna varijanta enzima koja je inkorporirana u PLA materijal radi ubrzane razgradnje PLA u uslovima kućnog komposta (25). Međutim, najefikasnije PLA-depolimeraze opisane u literaturi do danas nisu dostupne kao biokatalizatori na industrijskoj skali koja je potrebna za procesuiranje velikih količina PLA otpada. Proteinaza K je najbolje okarakterisana PLA-depolimeraza komercijalno dostupna na manjoj skali (26–28). Za razliku od Proteinaze K, komercijalno dostupna Savinaza se proizvodi na velikoj skali kao proteaza široke supstratne specifičnosti za uklanjanje proteinskih fleka u industriji deterdženata, te je zbog uspostavljene industrijske proizvodnje dobar kandidat za primenu u PLA razgradnji (29,30). Pored industrije deterdženata njen biotehnološki potencijal kao proteaze je demonstriran efikasnom razgradnjom vune iz mešavine vune sa PET plastikom čime je postignuta ekstrakcija PET-a visoke čistoće iz mešovitog otpada (31). Međutim, njena aktivnost kao PLA-depolimeraze ispitana je u sklopu pojedinačne komparativne studije sa drugim komercijalnim proteazama pri optimalnim uslovima definisanim za Proteinazu K kao do tada najefikasnije PLA-depolimeraze proteaznog tipa (32). Dodatno, efikasnost imobilisanih enzima za razgradnju PLA je malo istražena, iako njihova primena omogućuje jednostavno izdvajanje biokatalizatora i njegovu ponovnu upotrebu (33–35).

Predmet istraživanja ove disertacije je unapređenje enzimske razgradnje PHA i PLA kroz razvoj standardizovanih i kontinualnih metoda praćenja enzimske aktivnosti, proteinsko inženjerstvo i optimizaciju reakcionih uslova za razgradnju predmeta od bioplastike. Specifično, ispitan je potencijal primene manjih model supstrata kao potencijalnog rešenja za prevazilaženje problema standardizacije merenja aktivnosti mcl-PHA-depolimeraza, kao i ključni aminokiselinski ostaci odgovorni za prepoznavanje PHO pomoću PHO-depolimeraze iz *Pseudomonas fluorescens* GK13 i različite strategije proteinskog inženjerstva za unapređenje njene termostabilnosti. Takođe, ispitan je potencijal prenamene komercijalne Savinaze za efikasnu razgradnju PLA otpada kroz optimizaciju reakcionih uslova, predtretman polimera i ispitivanje razgradnje različitih PLA predmeta potrošačkog kvaliteta.

2. Pregled literature

2.1 Problemi plastičnog otpada

Plastični materijali su neizostavan deo današnjih tehnoloških sistema, kao i svakodnevnog života pojedinaca. Zahvaljujući hemijskoj inertnosti i stabilnosti, lakoći, fleksibilnosti, niskoj proizvodnoj ceni i širokom spektru fizičko-mehaničkih karakteristika u velikoj meri su zamenili materijale poput drveta, stakla, keramike i metala. Međutim, 98,5 % plastičnih materijala današnjice proizvodi se iz fosilnih sirovina (Slika 1), te pored iscrpljivanja fosilnih sirovina kao neobnovljivog resursa doprinosi i emisiji gasova sa efektom staklene bašte, čime podstiče globalno zagrevanje.

Globalna proizvodnja plastike je u kontinuiranom porastu, povećavši se sa približno 2 miliona tona 1950. godine na više od 500 miliona tona 2024. godine, uz procene da će se do 2060. godine gotovo utrostručiti (36). Tokom poslednje dve decenije proizvedeno je oko 80 % ukupne plastike, pri čemu se najveći udeo (44 %) koristi u ambalažnoj industriji, pretežno za proizvode za jednokratnu upotrebu (2,18,37). Pored toga, plastika ima široku primenu u građevinarstvu, tekstilnoj industriji, medicini, poljoprivredi i elektronici. Međutim, razvoj tehnologija za upravljanje plastičnim otpadom nije pratio ovako brz rast njene proizvodnje i primene, što je dovelo do kontinuirane akumulacije plastičnog otpada u životnoj sredini.

Trenutno upravljanje plastičnim otpadom zasniva se većinski na njegovom planskom odlaganju na deponije (~50%), praćeno spaljivanjem (19%), dok se manje od 10 % reciklira (Slika 1) (38,39). Mimo strategija upravljanja plastičnim otpadom, 22 % plastičnog otpada završava u životnoj sredini nekontrolisano. Procenjuje se da se do 2020. godine u okeanima akumuliralo približno 398 miliona tona plastičnog otpada (40,41).



Slika 1. Godišnja proizvodnja plastike u 2021. godini prema tipu polazne sirovine. Preuzeto i prilagođeno iz *Plastics – the Facts 2022*, Plastics Europe (<https://plasticseurope.org/>).

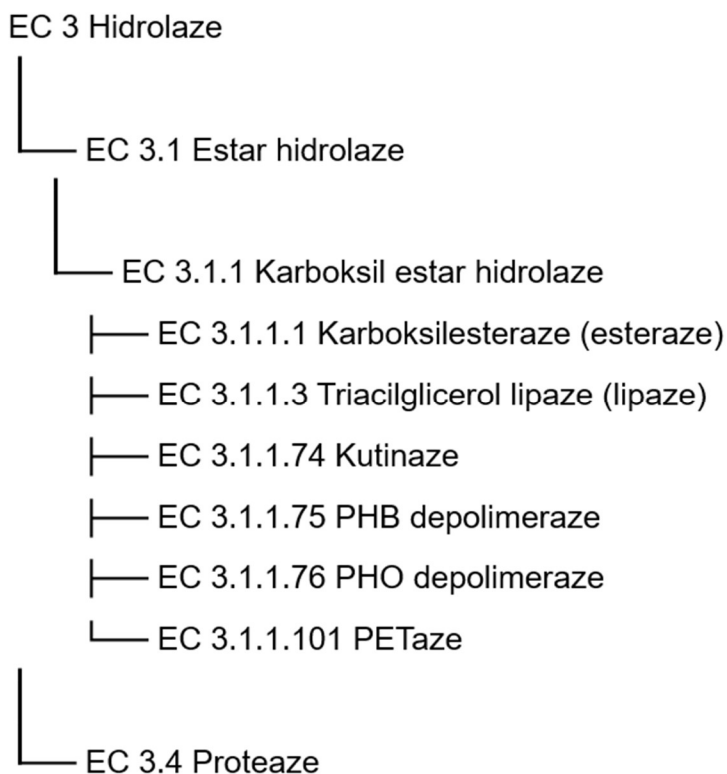
Spaljivanjem tone plastičnog otpada u životnu sredinu može se osloboditi 2,9 tona ugljen-dioksida (42). Dodatno, plastika izložena spoljnim uslovima vremenom se mehanički fragmentiše na mikroplastiku (dijametra <5 mm) i nanoplastiku (<5 nm). Mikroplastika koja ulazi u lanac ishrane može sadržati štetne aditive poput ftalata, poznatih endokrinih disruptora, ili prenositi teške metale i hidrofobna

poliaromatična jedinjenja adsorbovana iz spoljašnje sredine (43,44). Spaljivanjem plastičnog otpada oslobađaju se zagađujuće supstance koje doprinose globalnom zagrevanju, poput dioksina, furana, ugljen-monoksida, ugljen-dioksida, polihlorovanih bifenila (45). Spaljivanjem jedne tone plastičnog otpada oslobađa se oko 5-10 tona ugljen-dioksida (46). Nasuprot tome, reciklaža većine plastičnih materijala u upotrebi je niskoefikasna i energetska zahtevna, zbog visokih temperatura topljenja i odsustva hidrolizabilnih veza u strukturama poli(etilena) (*engl.* high density poly(ethylene), HDPE; *engl.* low density poly(ethylene), LDPE), poli(propilena) (PP), poli(vinil-hlorida) (*engl.* poly(vinyl chloride), PVC), poli(stirena) (PS), uz izuzetak poli(etilen-tereftalata) (PET), poli(uretana) (PU) i poli(amida) (PA) koji sadrže hidrolizabilne veze. Mehanička reciklaža predstavlja najčešći način recikliranja plastičnog otpada, ali je ograničena pogoršanjem fizičko-mehaničkih svojstava polimera nakon svakog ciklusa prerade (13). Nasuprot tome, hemijska reciklaža može prevazići taj problem, ali je primenljiva samo na ograničen broj polimera koji sadrže hidrolizabilne veze. Tako su od ukupno 54 miliona tona plastike proizvedene u Evropi 2023. godine, PE, PP, PVC i PS činili 50,7 % proizvodnje, dok su PET i PU, kao hidrolizabilna plastika pogodna za hemijsku reciklažu, činili svega 10,2 % (12).

Sve izraženiji ekološki problemi, zajedno sa očekivanom nestašicom fosilnih sirovina, podstakli su razvoj održivijih materijala i tehnologija upravljanja plastičnim otpadom. Posebnu pažnju poslednjih godina privlače biopolimeri, kao polimeri koji se proizvode iz obnovljivog izvora i/ili biorazgradivi polimeri. Od otkrića PS 1839. kao jednog od prvih sintetičkih polimera, do prve studije o akumuliranju plastičnog otpada u životnoj sredini je prošlo 133 godine (47,48). Tek sa razumevanjem srazmere dugoročnih posledica masovne proizvodnje i akumulacije konvencionalne plastike, alternativni polimeri postaju predmet intenzivnijeg interesovanja. Poli(3-hidroksibutirat) (PHB), mikrobiološki poliestar sa mehaničkim svojstvima sličnim PP otkriven 1926. godine. Dodatno, biokatalitička razgradnja konvencionalnih polimera pokazana je 1974. godine otkrićem gljive *Aureobasidium pullulans* sposobne za razgradnju poli(kaprolaktone) (*engl.* poly(ϵ -caprolactone), PCL), ali termin bioplastika upotrebljen je prvi put tek 1989. godine (49). Paralelno sa razvojem biopolimera, raste interesovanje za primenu enzima kao biokatalizatora u reciklaži i biodegradaciji (bio)polimera u skladu sa principima cirkularne ekonomije.

2.2 Enzimski i mikrobiološka razgradnja plastike – pregled i ključna saznanja

Biotehnološki pristup predstavlja perspektivnu i ekološki prihvatljiviju alternativu konvencionalnim metodama upravljanja plastičnim otpadom, zasnovanu na primeni mikroorganizama ili izolovanih enzima kao biokatalizatora za depolimerizaciju plastičnih materijala. Za razliku od hemijskih procesa, biokatalitička razgradnja odvija se pod blagim reakcijskim uslovima, uz manju potrošnju energije, visoku supstratnu specifičnost čime se omogućava selektivna depolimerizacija polimera i uz smanjenu upotrebu hemijskih reagensa te posledično manju količinu otpada nakon biokatalitičkog tretmana. Mikroorganizmi objedinjuju razgradnju plastičnog otpada do monomera ili oligomera sa njihovim katabolizmom i daljim hemijskim transformacijama do metaboličkih proizvoda od vrednosti, kao što su biosurfaktanti i biopolimeri. Nasuprot tome, enzimski razgradnja plastike nudi mogućnost regeneracije monomera visoke čistoće, bez dalje hemijske konverzije i njihovu dalju upotrebu kao vredne sirovine. Pregled enzima uključenih u razgradnju plastičnih materijala prikazan je na Slici 2.

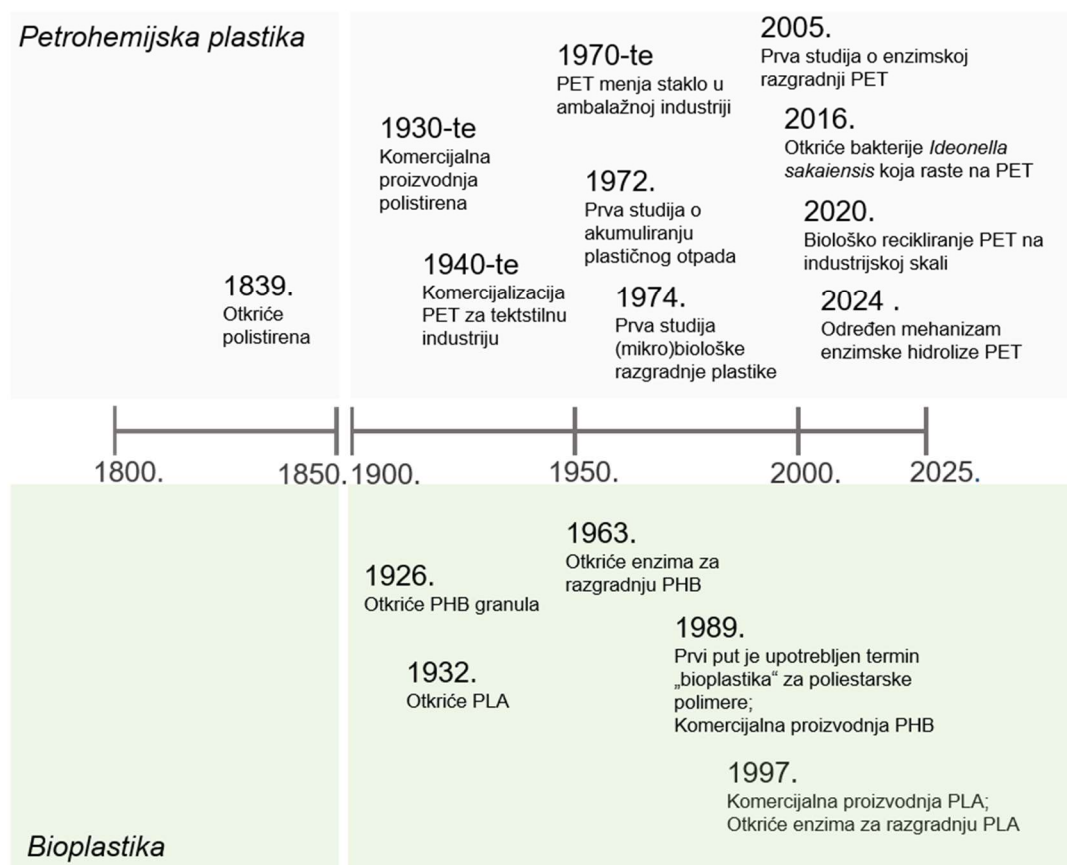


Slika 2. Pregled enzima uključenih u biokatalitičku razgradnju plastičnih materijala, grupisanih prema EC klasifikaciji. Iako su navedeni enzimi klasifikovani prema svojoj primarnoj metaboličkoj funkciji i aktivnosti prema prirodnim supstratima, izdvojeni su prema sposobnosti razgradnje polimera.

Najveći broj do sada opisanih enzima za razgradnju plastike pripada klasi hidrolaza (EC 3) i uključuje esteraze, lipaze, kutinaze, proteaze kao i PHA-depolimeraze koje su specijalizovane za razgradnju PHA kao prirodnog polimera. Nasuprot PHA-depolimerazama, aktivnost drugih klasa enzima na polimernim supstratima najčešće predstavlja proširenje njihove osnovne aktivnosti, poznate i kao katalitička promiskuitetnost enzima, u čijoj osnovi je sličnost hemijskih veza prisutnih u njihovim prirodnim supstratima i sintetičkim polimerima.

Razvoj procesa enzimske razgradnje PET je najproučeniji i najuspešniji primer enzimske razgradnje plastike, i iz tog primera mogu se identifikovati najznačajnije praktične strategije proizašle iz fundamentalnih istraživanja. Ubrzo nakon patentiranja PET-a 1941. godine i njegove ekspanzije u ambalažnoj industriji 1970-ih godina zamenjujući staklo zahvaljujući njegovoj lakoći, čvrstini i prozirnosti objavljena je i prva studija o akumuliranju plastičnog otpada u životnoj sredini. Prvi enzim za razgradnju PET, kutinaza poreklom iz *Thermobifida fusca*, otkriven je 2005. godine sa sposobnošću razgradnje preko 50 % mase filмова PET boce nakon 3 nedelje (50). Od tog perioda počinje pretraga za novim PET hidrolazama (PETazama) i paralelno sa tim razvoj njihovih unapređenih varijanti. Razvojem metagenomskog pristupa izolovane su dve ključne PETaze, LCC (*engl.* leaf-branch compost cutinase) i PHL7 (*engl.* polyester hydrolase Leipzig 7) 2014. i 2022. godine (51). Takođe, 2016. je pronađena bakterija koja može da asimiluje PET kao izvor ugljenika, zahvaljujući ekstracelularnoj IsPETazi koja depolimerizuje PET do oligomera koje ćelija potom usvaja i dalje metaboliše, dodatno otvarajući i prostor za mikrobiološku transformaciju plastičnog otpada u druge molekule (52). Tehnikama proteinskog inženjerstva razvijeno je nekoliko unapređenih PET hidrolaza, kroz unapređenje

termostabilnosti, katalitičke efikasnosti i adsorpcije enzima na površinu polimera (53). Razvijeno je nekoliko termostabilnih varijanti IsPETaze, uključujući FAST-PETazu, HotPETazu i DuraPETazu, dok su se najefikasnijim pokazale LCC^{ICCG} varijanta LCC, i PES-H1FY varijanta PHL7 (54). Među njima se LCC^{ICCG} pokazao kao enzim koji najviše odgovara industrijskim potrebama razgradnje PET otpada na velikoj skali, zbog visoke operacione stabilnosti i katalitičke efikasnosti na realističnim uzorcima PET-a visoke kristalnosti (20). Paralelno, mnogobrojna istraživanja iz oblasti nauka o materijalima pružila su saznanja o karakteristikama polimera koje doprinose njihovoj boljoj biodegradaciji. Porast u procentu kristalnosti (Xc) iznad 20 % rezultuje gubitkom aktivnosti većine opisanih PETaza. Kristalnost PET boce varira od dela boce, ali većinski je Xc iznad 25 % (55). Sva ova saznanja dovela su do prvog biološkog recikliranja PET na industrijskoj skali 2020. godine. Primenom LCC^{ICCG} na amorfizovanim PET bocama, čime je kristalnost polimera smanjena, postignuto je 98 % konverzije PET-a u monomere, tereftalnu kiselinu i etilen glikol, za 24 h što se translira u 50000 tona godišnje na velikoj skali (21). Dodatno, prečišćena tereftalna kiselina je iskorišćena za proizvodnju novog PET polimera, zatvarajući time ciklus recikliranja monomera. Nadalje, 2024. godine je opisan ceo mehanizam PETaze koji obezbeđuje fundamentalnu osnovu za dalji razvoj još efikasnijih biokatalizatora (56). Na Slici 3 prikazana su ključna otkrića u razvoju proizvodnje i biorazgradnje konvencionalnih polimera, sa posebnim osvrtom na PET, kao i paralelni razvoj trenutno komercijalno najzastupljenijih biopolimera, PLA i PHA.



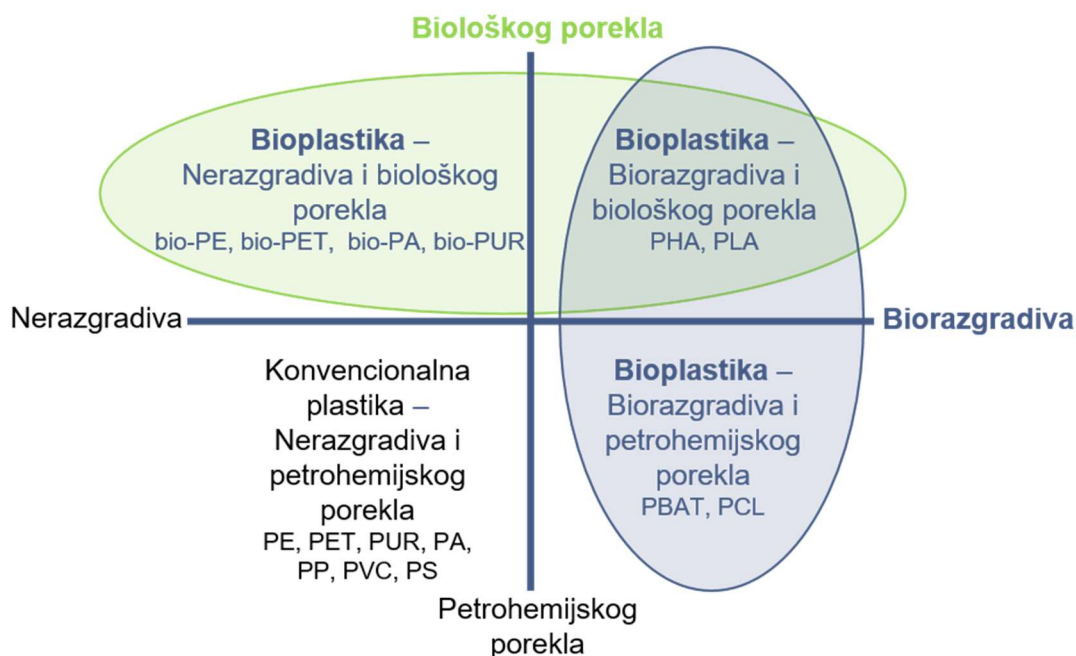
Slika 3. Pregled razvoja od plastike na bazi fosilnih sirovina (PS, PET) do bioplastike (PLA, PHA) i strategija njihove biorazgradnje. Slika adaptirana iz (57–60).

Primer PET plastike pokazuje da se enzimska razgradnja može industrijski skalirati, ali i da je njen pravovremen razvoj ključan za sprečavanje akumulacije plastičnog otpada u životnoj sredini, zbog

čega je neophodno identifikovati efikasne enzime pre masovne primene novih polimera, uključujući i bioplastiku. Niska termostabilnost enzima i njihova niska katalitička efikasnost predstavljaju glavna ograničenja primene prirodnih enzima u razgradnji plastičnog otpada na industrijskoj skali. Stoga su razvijene različite strategije za unapređenje njihove primene, uključujući proteinsko inženjerstvo u cilju povećanja stabilnosti, aktivnosti i supstratne specifičnosti enzima, kao i imobilizaciju, kojom se poboljšava stabilnost, omogućava višekratna i kontinuirana upotreba biokatalizatora i olakšava njegovo izdvajanje iz reakcione smeše.

2.3 Biopolimeri kao alternativa konvencionalnoj plastici

Termin bioplastika odnosi se na polimere biološkog porekla, biorazgradive polimere, kao i materijale koji objedinjuju obe karakteristike. Prema definiciji bioplastike, mogu se definisati tri kategorije bioplastike - biorazgradivi fosilni polimeri, nerazgradivi biopolimeri (drop-in polimeri) i biorazgradivi biopolimeri (Slika 4). U biorazgradive polimere poreklom iz fosilnih sirovina spadaju PCL, poli(butilen-adipat-tereftalat) (PBAT), poli(butilen-sukcinat) (PBS), poli(glikolna kiselina) (PGA) i poli(vinil-alkohol) (PVA), koji iako su sintetičkog porekla zbog hidrolizabilnih veza podležu biološkoj razgradnji. Nerazgradivi biopolimeri (drop-in polimeri), bio-PE, bio-PET, bio-PA i bio-PUR, su analozi fosilnih polimera koji se alternativno proizvode iz obnovljivih izvora, smanjujući njihov ugljenični otisak ali podjednako ne podležu biološkoj razgradnji kao ni polimeri poreklom iz fosilnih sirovina. Biorazgradivi biopolimeri obuhvataju poli(hidroksialkanoate) (PHA), poli(mlečnu kiselinu) (*engl.* poly(lactic acid), PLA) i bio-PBS kojima je zajednička proizvodnja iz obnovljivih izvora, i koji su biorazgradivi.



Slika 4. Klasifikacija plastike prema poreklu i podložnosti biološkoj razgradnji. Slika adaptirana iz (61).

Stoga, biorazgradivi biopolimeri, PHA i PLA, predstavljaju perspektivnu alternativu konvencionalnoj plastici, jer istovremeno omogućavaju održiviju proizvodnju i nude potencijalno rešenje za upravljanje plastičnim otpadom na kraju životnog ciklusa proizvoda (62). Međutim, biorazgradivost ne podrazumeva nužno spontanu i efikasnu razgradnju polimera u uslovima životne sredine na kraju njegovog životnog ciklusa. Za razliku od PHB, pojedini biorazgradivi polimeri, PLA i poli(3-

hidroksioktanoat) (PHO), ne podležu efikasnoj razgradnji u prirodnim uslovima, usled ograničene zastupljenosti odgovarajućih mikrobioloških populacija i neadekvatnih fizičko-hemijskih uslova životne sredine. Njihova biološka razgradnja odvija se isključivo u strogo kontrolisanim uslovima industrijskog kompostiranja.

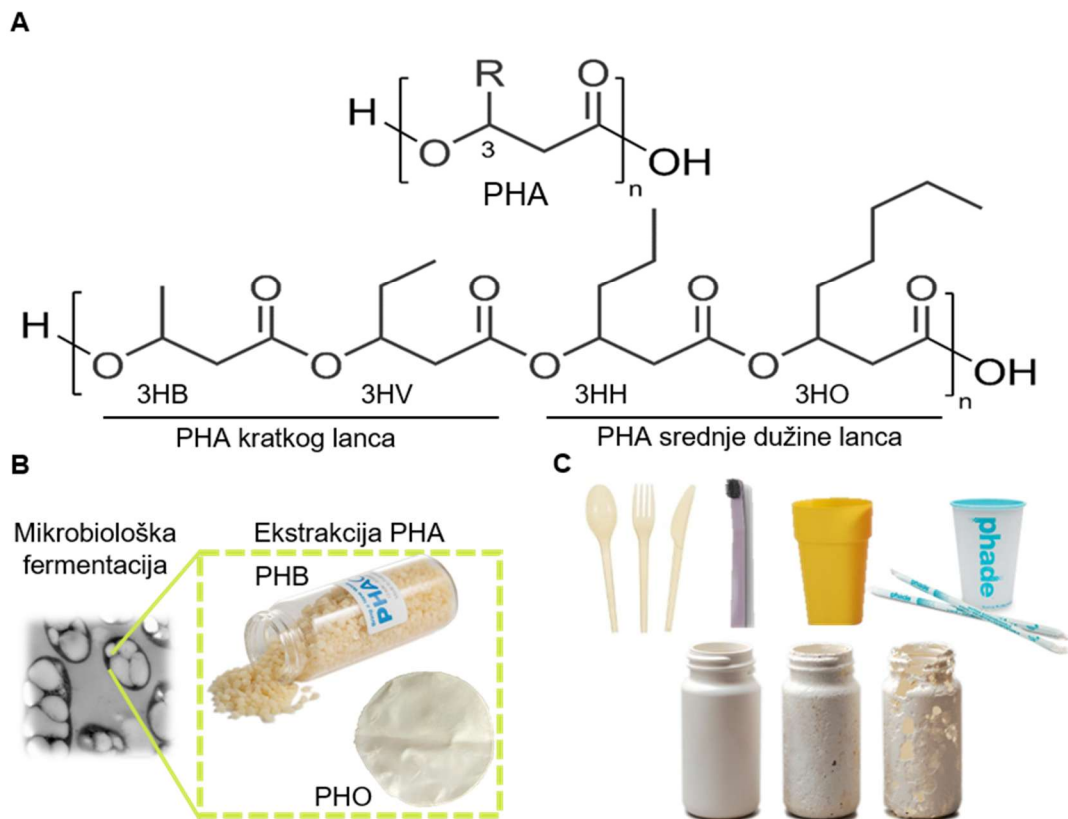
Uprkos navedenim prednostima, širu primenu bioplastike i dalje ograničavaju proizvodni kapaciteti i visoki troškovi proizvodnje. Biopolimeri se još uvek pretežno proizvode iz primarnog tipa biomase bogate fermentabilnim šećerima, poput kukuruza i šećerne trske, čija proizvodnja zahteva velike površine obradivog zemljišta, čime nastaje kompeticija između proizvodnje hrane i plastičnih materijala. Biomasa sekundarnog tipa, dobijena iz nejestivih biljnih ostataka i drugih bioloških otpadnih tokova, predstavlja održiviju alternativu, ali njena složenost povećava tehnološke zahteve i zahteva dodatan razvoj proizvodnog procesa. Dodatan izazov predstavlja integracija biorazgradivih polimera u postojeće sisteme upravljanja otpadom, budući da njihovo mešanje sa konvencionalnim plastičnim otpadom umanjuje efikasnost reciklaže. Industrijsko kompostiranje je trenutno jedino dostupna strategija uklanjanja bioplastike, uz gubitak monomera kao glavnog nedostatka, a novija istraživanja ukazuju da ovaj pristup takođe dovodi do oslobađanja mikroplastike u životnu sredinu usled nemogućnosti potpune kontrole procesa razgradnje na mikroskopskom nivou (10,63,64).

Stoga, PHB je primer biopolimera koji se razgrađuje u različitim uslovima životne sredine, zbog čega je opravdana njegova primena u proizvodima za jednokratnu upotrebu i za primene u kojima je oslobađanje materijala u životnu sredinu teško izbeći ili je sastavni deo njihove namene, kao što su ambalažni materijali, poljoprivredne malč folije, polimerne obloge semena i đubriva, geotekstili. Svi ostali tipovi bioplastike zahtevaju razgradnju u kontrolisanim uslovima kao što su industrijsko i kućno kompostiranje, ili enzimsko depolimerizacija u kontrolisanim uslovima. Sa druge strane, kroz višegodišnja istraživanja čak i za neke od konvencionalnih polimera (PET, PUR, PA) razvijen je proces biološke tj. enzimске razgradnje u kontrolisanim uslovima, iako se tradicionalno još uvek klasifikuju kao nerazgradivi. Razvoj plastičnih materijala sa dodatnim mogućnostima za biorazgradnju, bez obzira na poreklo, otvara put ka cirkularnoj ekonomiji plastike, čime bi se istovremeno smanjilo oslobađanje otpada u životnu sredinu i omogućilo efikasnije iskorišćenje resursa.

2.4 Poli(hidroksialkanoati)

Poli(hidroksialkanoati) (PHA) su poliestri 3-hidroksialkanskih kiselina i sastavni su deo mikrobiološkog metabolizma, služeći kao rezerva ugljenika i energije (Slika 5A) (65). Stoga se PHA proizvode mikrobiološkom fermentacijom iz obnovljivih izvora (Slika 5B), a razgrađuju prirodno zastupljenim PHA-depolimerazama (65,66). Takođe, struktura monomera koji ulaze u sastav PHA je raznovrsna (Slika 5A) i nudi mogućnost razvijanja čitave palete polimera, čime je moguće zameniti više tipova petrohemijske plastike (7). Trenutno se u komercijalne svrhe proizvodi poli(3-hidroksibutirat) (PHB) i kopolimer 3-hidroksibutanske kiseline sa 3-hidroksivalerijanskom kiselinom (PHBV), koji mogu zameniti PP i PE. Komercijalizaciji PHB-a doprineo je veliki broj mikroorganizama u prirodi koji ga sintetišu, kao i niža cena proizvodnje PHA kratkog lanca (scl-PHA) u poređenju sa PHA srednje dužine lanca (mcl-PHA). Kompanije koje proizvode PHA rasprostranjene su širom sveta, a među njima se ističu Metabolix (SAD), Tianan (Kina), Biomer (Nemačka), Kaneka (Japan), NaturePlast (Francuska) sa ciljem primene PHA za jednokratnu upotrebu (Slika 5C). Trenutno, proizvodni proces PHA zahteva upotrebu izvora ugljenika koji doprinose do 50 % ukupnoj ceni proizvodnje zbog čega je proizvodna cena PHA veća nego za petrohemijsku plastiku (7). Mnoga aktuelna istraživanja ispituju alternativne izvore ugljenika, poput otpada u obliku biljnih ulja (67,68), kako bi se omogućila ekspanzija PHA na tržištu. Zahvaljujući svojoj biorazgradivosti, biokompatibilnosti i netoksičnosti (letalna doza 3-hidroksibutanske kiseline je > 5000 mg/kg (69)) PHB nalazi primenu u industriji jednokratne ambalaže

za hranu i kao biorazgradivi nosači u biomedicini. Za razliku od PHB, poli(3-hidroksioktanoat) PHO se ne razgrađuje u uslovima životne sredine ali poseduje mogućnost biokatalitičke razgradnje u kontrolisanim uslovima (70).

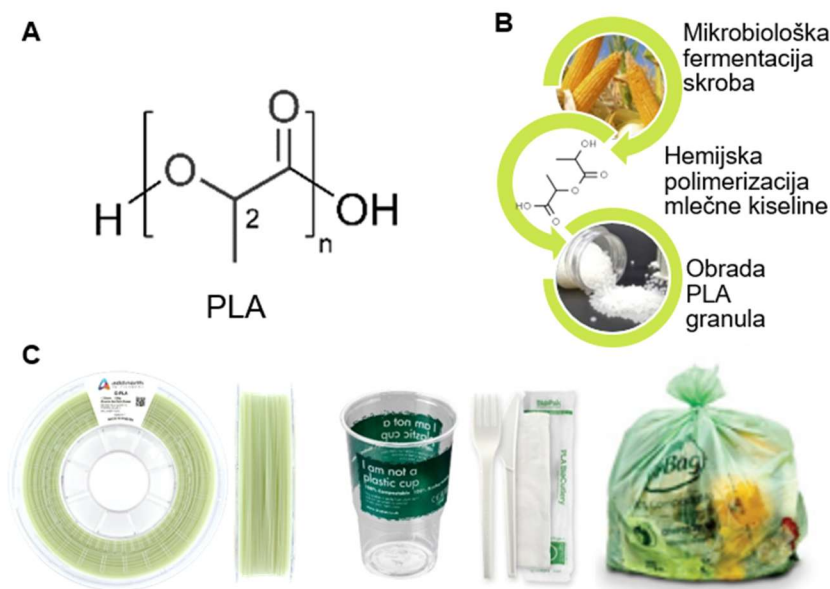


Slika 5. Poli(hidroksialkanoati) kao bioplastika: A) hemijska struktura, B) šematski prikaz proizvodnje i C) primeri biorazgradivih proizvoda od PHA za jednokratnu upotrebu.

2.5 Poli(mlečna kiselina)

Poli(mlečna kiselina) (PLA) je poliestar dobijen hemijskom polimerizacijom mlečne kiseline (2-hidroksipropanske kiseline) (Slika 6A), koja se dobija mikrobiološkom fermentacijom biomase kao obnovljivog izvora (Slika 6B) (71). Komercijalno dostupan PLA sadrži pretežno L-mlečnu kiselinu (>95 %) uz manji udeo D-mlečne kiseline (<5 %) (72). Mehanička, termalna, optička i barijerna svojstva PLA su slična svojstvima PET i PS (73), što ga čini biorazgradivom alternativom za oko 11,5 % plastike dobijene iz fosilnih izvora (74). PLA je najzastupljeniji polimer sa 24 % udela na tržištu bioplastike, zahvaljujući proizvodnoj ceni ispod 2 \$/kg, koja je uporediva sa cenom proizvodnje PS (75). Nalazi primenu u ambalažnoj industriji kao plastika za jednokratnu upotrebu i sve više se koristi u 3D štampi prototipova u vazduhoplovstvu, vojsci, medicini i građevinskoj industriji (Slika 6C) (74,76,77). Pored povoljnih mehaničkih svojstava uspehu PLA kao novom polimeru na tržištu dodatno je doprinela i promocija PLA kao biorazgradive alternative konvencionalnoj plastici (37). Biodegradacija PLA se odvija u kontrolisanim uslovima industrijskog komposta na temperaturama iznad 58 °C i visokoj vlažnosti, pri čemu se postiže razgradnja od 65 % do 80 % za 80 do 180 dana (78). U osnovi industrijskog kompostiranja su mikroorganizmi koji poseduju enzime za razgradnju PLA – PLA-depolimeraze - iako PLA nije prirodan polimer prisutan u njihovom metabolizmu. Međutim, infrastruktura za kompostiranje PLA je ograničena, njime se oslobađa mikroplastika, a monomer se nepovratno gubi (79). Za razliku od

kompostiranja, kontrolisana enzimsko razgradnja PLA može omogućiti ponovno iskorišćavanje oslobođenih monomera u procesu njegove repolimerizacije, u skladu sa principima cirkularne ekonomije.



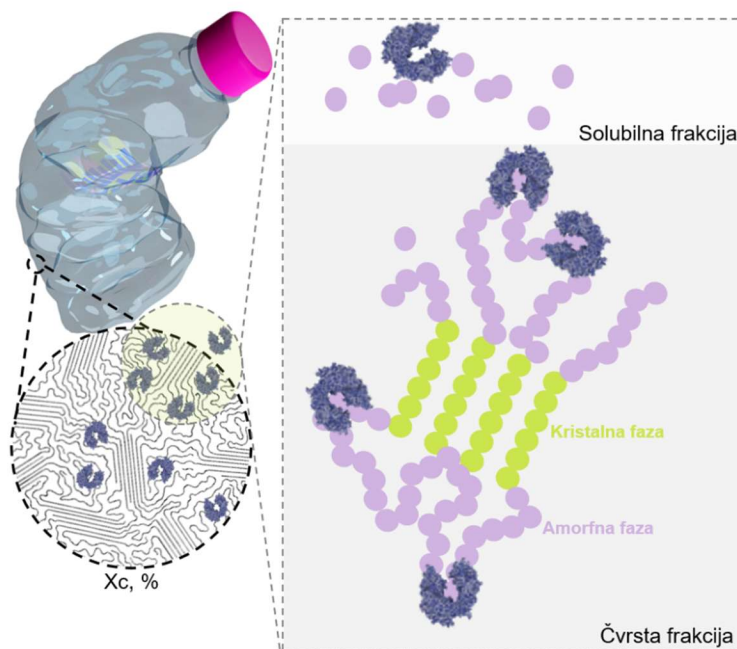
Slika 6. Poli(mlečna kiselina) kao bioplastika: A) hemijska struktura, B) šematski prikaz proizvodnje i C) primeri proizvoda od PLA za 3D štampu i jednokratnu upotrebu.

2.6 Biokatalitička razgradnja plastike – mehanizam procesa i faktori koji utiču na efikasnost

Mikrobiološka razgradnja plastike podrazumeva konverziju polimera do biomase, vode i ugljen-dioksida u aerobnim ili metana u anaerobnim uslovima. Mikrobiološka razgradnja plastike počiva na enzimskoj hidrolizi polimera do monomernih jedinica uglavnom pomoću više enzima (52). Pomoću ekstracelularnih enzima nesolubilni polimeri se prevode u solubilne oligomere ili monomere, koji se potom transportuju u ćeliju i pomoću intracelularnih enzima dalje transformišu kao izvor ugljenika za potrebe mikrobiološkog metabolizma.

Biokatalitički pristup razgradnje plastike može koristiti mikrobiološku ili enzimsku razgradnju. U slučaju mikrobiološke razgradnje plastike u životnoj sredini, efikasnost razgradnje je značajno uslovljena zastupljenošću mikrobioloških populacija, geohemijskim uslovima životne sredine (temperatura, pH), samim metabolizmom soja i njegovim interakcijama sa drugim mikroorganizmima u mikrobiološkoj populaciji. Nasuprot tome, mnogo veća efikasnost mikrobiološke razgradnje plastike se može postići u kontrolisanim uslovima u bioreaktoru. U tom slučaju, kao i u slučaju enzimске hidrolize, depolimerizacija do nisko-molekulskih vrsta (oligomera i monomera) je najsporiji korak, uslovljen prirodom enzima i karakteristikama polimera. Mikrobiološka razgradnja plastike u kontrolisanim uslovima nudi konverziju monomera plastike u druge vredne molekule, dok enzimska hidroliza nudi mogućnost ekstrakcije monomera i njihovu ponovnu primenu u polimerizaciji plastike (21).

Karakteristike polimera značajno utiču na brzinu enzimске razgradnje plastike. Plastični materijali poseduju semi-kristalnu strukturu, sa amorfim i kristalnim regionima u različitom odnosu u zavisnosti od uređenosti polimernih lanaca (Slika 7).



Slika 7. Šematski prikaz strukture semikristalnih polimera. Različitim bojama označeni su kristalni i amorfni regioni čvrste frakcije, koji se razlikuju po mobilnosti polimernih lanaca i, posledično, po podložnosti enzimskoj razgradnji. Istovremeno sa hidrolizom čvrste faze odvija se i hidroliza oslobođenih oligomera koji čine solubilnu frakciju.

Enzimaska razgradnja polimera se predominantno dešava u amorfnim regionima usled veće konformacione mobilnosti polimernih lanaca, čime je olakšano produktivno vezivanje za enzim neophodno za odvijanje katalitičke reakcije. Određene klase enzima poseduju supstrat-vezujući domen (SVD), kojim se trajno vezuju za polimerni supstrat produžavajući kontaktno vreme sa polimerom. Dodatno, SVD reorganizuje strukturu polimera čime olakšava proces produktivnog vezivanja supstrata i katalitičkog domena. Pored semikristalne strukture polimera, enzimaska hidroliza je ograničena dostupnošću površine polimera zbog čega dodirna površina plastike značajno utiče na brzinu razgradnje.

Na primeru PHA-depolimeraza, opisan je problem u poređenju efikasnosti različitih PHA-depolimeraza usled različite pripreme supstrata u zavisnosti od metode koja se koristi za određivanje aktivnosti. Veštački PHA se dobija suspendovanjem PHA u organskom rastvaraču i pravljenjem emulzije u vodenom rastvoru detergenta, pri čemu se u tom slučaju PHA nalazi u amorfnom obliku. Različita konformacija supstrata će dati različite vrednosti kinetičkih parametara za isti enzim, stoga se ni različiti enzimi ne mogu međusobno porediti pri različitim načinima pripreme supstrata koji variraju između različitih istraživačkih grupa. Konkretna predlog standardizacije enzimskih testova dao je Jendrossek ali ona ni do danas nije sprovedena u praksi (24). Za sistematično proučavanje PHB degradacije, neophodna je standardizacija procesuiranja PHA kako bi se svojstva polimera koja direktno utiču na biodegradaciju očuvala. Na primer, PHB-depolimeraza iz *M. algicola* degraduje PHB film (X_c 70 %) u tečnoj kulturi, ali ne i amorfni oblik PHB-a inkorporiranog u podlozi sa agarozom (80).

2.6.1 Promena strukture polimera u zavisnosti od temperature i dalja promena biorazgradivosti polimera

Struktura polimera je prvobitno opisivana dvofaznim modelom, koji obuhvata kristalne regione visoke uređenosti i niske mobilnosti polimernih lanaca, stabilizovane međumolekulskim interakcijama, i amorfne regione, koje karakteriše veća neuređenost i povećana segmentna mobilnost. Odnos ove dve frakcije definiše se kao stepen kristalnosti (X_c) i direktno korelira sa fizičko-mehaničkim svojstvima polimera, uključujući gustinu, tvrdoću, modul elastičnosti i otpornost na rastvarače. Međutim, pokazano je da pojedina svojstva polimera ne mogu biti u potpunosti objašnjena isključivo promenama odnosa kristalne i amorfne faze, što je dovelo do uvođenja trofaznog modela (81). Ovaj model, pored kristalne faze, razlikuje mobilnu amorfnu fazu (MAF) i rigidnu amorfnu fazu (RAF), pri čemu RAF predstavlja interfacijalnu frakciju sa visokom neuređenošću, ali smanjenom mobilnošću lanaca usled blizine kristalnih domena (82).

Za enzimsku razgradnju polimera ključna je dostupnost estarskih veza u konformaciji pogodnoj za hidrolizu u aktivnom mestu enzima. Zbog veće neuređenosti i mobilnosti lanaca, enzimska hidroliza se preferencijalno odvija u amorfnim regionima, što tokom procesa dovodi do relativnog povećanja stepena kristalnosti i progresivnog usporavanja dalje razgradnje. Kristalni regioni, usled svoje rigidnosti, sadrže estarske veze koje su manje dostupne za produktivno vezivanje enzima. Na primeru PET, pokazano je da većina PET hidrolaza preferencijalno vezuje polimerni lanac u *gauche* konformaciji, dok je u kristalnim domenima PET uglavnom prisutan u *trans* konformaciji; izuzetak predstavljaju inženjerske varijante IsPETaze dizajnirane za efikasno vezivanje *trans* konformacije (83).

Mobilnost polimernih lanaca je zavisna od temperature, te povišenje temperature povećava stepen neuređenosti amorfne frakcije i doprinosi unapređenju enzimске hidrolize. Termičko ponašanje polimera određeno je postojanjem karakterističnih faznih prelaza (60):

- Temperature staklastog prelaza (T_g), pri kojoj dolazi do povećanja mobilnosti amorfne faze i prelaza iz staklastog u gumoliko stanje;
- Temperature topljenja (T_m), na kojoj kristalni regioni prelaze u neuređeno stanje a polimer prelazi u rastopljeno stanje;
- Temperature kristalizacije (T_c), pri kojoj dolazi do formiranja kristalnih domena. Kristalizacija može nastupiti ne samo hlađenjem ispod T_m , već i tokom produženog temperiranja iznad T_g , usled povećane mobilnosti lanaca u amorfnoj fazi, što dovodi do rekristalizacije poznate i kao fizičko starenje polimera (45).

Promene strukture i dinamike polimera sa porastom temperature uslovile su da povećanje temperaturne stabilnosti enzima bude ključna strategija u proteinskom inženjeringu enzima za razgradnju plastike, omogućavajući efikasnu depolimerizaciju u uslovima povećane podločnosti polimera hidrolizi. Proces fizičkog starenja polimera na povišenim temperaturama predstavlja kompetitivan proces u odnosu na enzimsku razgradnju, jer ponovna formacija kristalnih domena smanjuje dostupnost hidrolizabilnih veza. Ovaj efekat može se ublažiti razvojem efikasnih biokatalizatora koji omogućavaju brzu depolimerizaciju pre rekristalizacije polimera.

2.7 PHA-depolimeraze

2.7.1 Metabolička funkcija i klasifikacija PHA-depolimeraza

Primećeno je da u pojedinim slučajevima dolazi do auto-hidrolize PHA granula unutar ćelija što je direktno vodilo otkriću enzima uključenih u katabolizam PHA. Sasvim očekivano, mikroorganizmi koji imaju mogućnost skladištenja PHA poseduju i enzimske sisteme za mobilisanje uskladištenog izvora ugljenika. Kasnije su otkriveni i mikroorganizmi koji su isključivo degraderi PHA. Metaboličko iskorišćenje PHA kao rezerve ugljenika započinje aktivnošću PHA-depolimeraza, koje regulisano degraduju polimerni niz do monomera. U pojedinim slučajevima, PHA-depolimeraze degraduju polimere do oligomera, a potom drugi enzimi do monomera (85). Ove biološke polimere mikroorganizmi proizvode kao rezerve ugljenika i energije prilikom rasta u stresnim uslovima sredine, usled ograničene dostupnosti izvora azota, magnezijuma, fosfora ili kiseonika, sa dostupnim izvorom ugljenika (65). Kada i izvor ugljenika postane ograničen u sredini u kojoj ćelije sa akumuliranim PHA rastu, otpočinje proces mobilizacije PHA (65,66).

PHA-depolimeraze pripadaju grupi hidrolaza, konkretno karboksil-estar-hidrolaza sa katalitičkom trijadom Ser-Asp-His karakterističnom za serin hidrolaze koje pripadaju superfamiliji α/β -hidrolaza (86). U daljem tekstu detaljnije je navedena pozicija PHA-depolimeraza u okviru šireg sistema klasifikacije enzima prema tipu reakcije koju katalizuju, kao i EC broj koji se prilikom te klasifikacije dodeljuje enzimima.

3. Hidrolaze

3.1 Katalizuju hidrolizu estarskih veza

3.1.1 Karboksil-estar-hidrolaze

3.1.1.75 PHB-depolimeraze specifične prema PHA kratkog lanca (C3-C5)

3.1.1.76 PHO-depolimeraze specifične prema PHA srednje dužine lanca (C6-C12)

Osnovna podela PHA-depolimeraza može se izvesti prema mestu ispoljavanja biološke aktivnosti, na osnovu čega se jasno razlikuju intracelularne PHA-depolimeraze (i-PHAaze) i ekstracelularne PHA-depolimeraze (e-PHAaze). U osnovi podele depolimeraza na ove dve klase se nalazi specijalizacija prema dve različite konformacije istog supstrata – nativne (amorfne) i denaturisane (semikristalne) konformacije PHA. Unutarćelijske depolimeraze degraduju endogeni, nativni PHA u cilju mobilizacije rezervi izvora ugljenika kod PHA produkujućih mikroorganizama. Ekstracelularne depolimeraze pokazuju afinitet ka degradaciji semikristalnog oblika PHA, u kakvom je on dostupan u spoljašnjoj sredini PHA neprodukujućim mikroorganizmima koji ga oportunistički koriste kao izvor ugljenika po njegovom oslobodanju iz PHA produkujućih bakterija (24). Ova podela važi u većini do sada poznatih i karakterisanih PHA-depolimeraza, uz nekoliko izuzetaka od kojih je najpoznatija i-PHAaza iz *Bacillus megaterium* koja pored očekivane sposobnosti razgradnje nativnih PHB granula pokazuje aktivnost i na semikristalnom PHB. Takođe, PHB-depolimeraza *P. Lemoignei* (PhaZ7) iako ekstracelularna, specifična je prema amorfnom PHB i nativnim PHB granulama.

S obzirom na to da su e-PHAaze zastupljenije u prirodi, one su više izolovane i karakterisane, pa se usled izobilja podataka javila potreba za njihovom daljom sistematizacijom i klasifikacijom. Dalja klasifikacija se bazira na strukturnim i katalitičkim svojstvima ovih enzima.

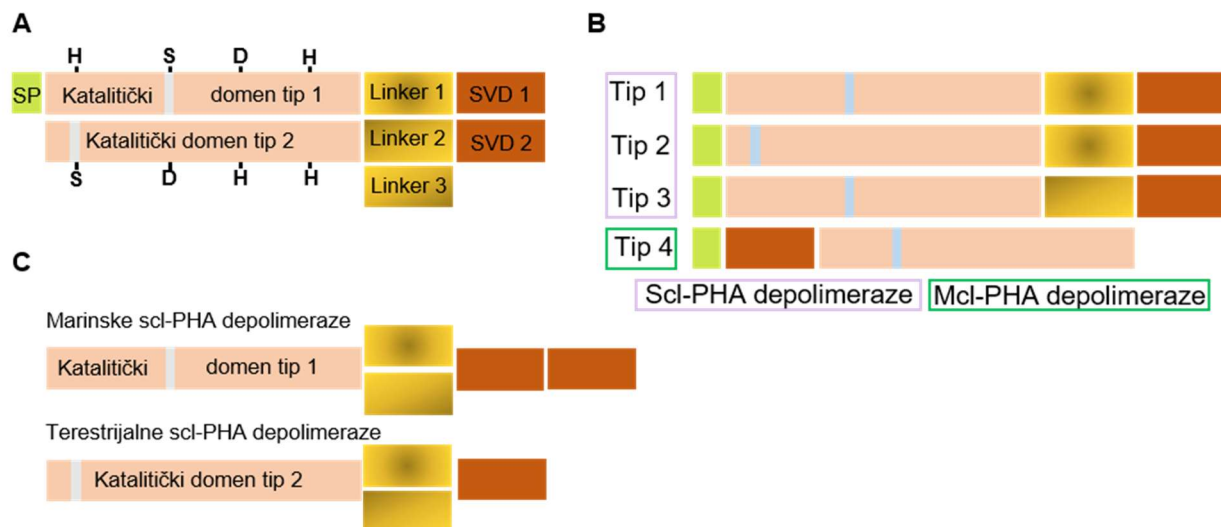
Po strukturnoj organizaciji, većina e-PHA-depolimeraza su multidomenski enzimi sačinjeni od signalnog peptida, N-terminalnog katalitičkog domena, kraćeg „linker“ regiona koji povezuje katalitički

domen sa C-terminalnim supstrat vezujućim domenom (SVD), koji je ujedno i poslednji funkcionalni domen (Slika 8A) (24,87). Slična domenska organizacija karakteriše e-PHAaze i i-PHAaze, uz izostajanje signalnog peptida kod i-PHAaza koji obezbeđuje eksport enzima preko ćelijske membrane.

- Katalitički domen (KD) se sastoji od 320-400 aminokiselina i sadrži pentapeptidnu sekvencu Gly-X1-Ser-X2-Gly karakterističnu za lipaze, gde X može biti bilo koja od prirodnih aminokiselina. Bočni ostatak serina (S) iz pentapeptidne sekvence formira katalitičku trijadu sa bočnim ostacima histidina (H) i aspartata (D). Ovakva struktura je karakteristična za mnoge enzime koji katalizuju heterogene reakcije degradacije nerastvornih supstrata, kao što su hitinaze, celulaze i ksilanaze. Katalitički domeni e-PHA-depolimeraza do sada karakterisanih mogu zauzeti jednu od dve konformacije, prema čemu se one dele na dva tipa. Konkretno, pozicija pentapeptidne sekvence svojstvene lipazama unutar KD je kriterijum njihove dalje podele. Centralna pozicija pentapeptida je svojstvena e-PHA-depolimerazama sa tipom katalitičkog domena 1/A, a pentapeptid pozicioniran bliže N-terminusu je svojstven e-PHA-depolimerazama sa tipom katalitičkog domena 2/B. Katalitički domen je zaslužan za usku supstratnu specifičnost e-PHA-depolimeraza. Ekstraćelijske depolimeraze se dele u dve klase u zavisnosti od dužine ugljeničnog niza monomera koji izgrađuju polimer (Slika 8B) (24). Scl-PHA-depolimeraze degraduju samo PHB i njegove kopoliestre (EC 3.1.1.75). Druga klasa su mcl-PHA-depolimeraze koje razgrađuju polimere C6-C14 3-hidroksialkanoata (EC 3.1.1.76). Za razliku od usko specifičnog KD, PHA vezujući domen poseduju široku supstratnu specifičnost, i adsorpcija se dešava i na tipu PHA koji neće biti hidrolizovani pomoću KD.
- Linker domen čini 50-100 aminokiselina i može biti različite strukture te se opisati kao treoninom bogat domen (Tre), domen srodan fibronektinu tipa III (Fn3), domen sa kadherinu-sličnom sekvencom (Kad). Fn3 sekvenca je opisana u mnogim eukariotskim matriksnim proteinima i prokariotskim polimer-hidrolizujućim proteinima kao što su hitinaze, celulaze, glukoamilaze. Ključna razlika je u tome što je postojanje ovog domena ključno za aktivnost e-PHB-depolimeraza - delecija linker regiona dovodi do gubitka sposobnosti hidrolize polimera, dok to nije slučaj kod hitinaza. U tom slučaju i dalje je očuvana sposobnost hidrolize PHA dimera, a supstitucija jednog tipa domena drugim ne narušava depolimeraznu aktivnost na polimeru. Iz navedenih eksperimentalnih observacija može se zaključiti da je ovaj region esencijalan za pravilno pozicioniranje katalitičkog domena u odnosu na supstrat vezujući domen.
- SVD se sastoji od 40 do 60 aminokiselina. Razlikuju se dva tipa SVD, prema broju konzerviranih cisteina u sekvenci. SVD pokazuje specifičnost za polimere hidroksikarboksilnih kiselina (PHB, PHO, PLA), ali ne i za hitin ili celulozu (88). Eksperimentalni podaci ukazuju da SVD specifično prepoznaje karbonilne grupe na površini polimera hidroksikarboksilnih kiselina u kombinaciji sa nespecifičnim hidrofobnim interakcijama. Specifičnost ovog domena se može iskoristiti za afinitetno prečišćavanje PHA-depolimeraza. Mutanti bez C-terminalnog domena ne poseduju depolimeraznu aktivnost, ali poseduju sposobnost hidrolize solubilnih estara (*p*-nitrofenil estara) (89). Fuzijom SVD PHA-depolimeraza sa drugim proteinskim domenima, kao što su maltoza-vezujući domen ili glutation-S-transferaza detektovana je adsorbovana aktivnost specifična za ove domene na PHA kao nosaču (88). Mehanistički PHB vezujući domen dovodi do povećane mobilnosti unutar polimernog niza, što stvara povoljne uslove za degradaciju (90).

Ekstracelularne PHA-depolimeraze mikroorganizama poreklom iz zemljišta i marinskih mikroorganizama dele opisanu strukturnu organizaciju, uz različitu raspodelu tipova linker domena koji

se mogu pronaći u ova dva tipa e-PHA-depolimeraza. Svojstvena karakteristika marinskih e-PHA-depolimeraza je prisustvo dva SVD (Slika 8C) (91).



Slika 8. Šematski prikaz domenske organizacije PHA-depolimeraza: A) pregled proteinskih domena PHA-depolimeraza, B) klasifikacija ekstracelularnih PHA-depolimeraza prema domenskoj organizaciji i C) razlike u domenskoj organizaciji marinskih i terestrijalnih scl-PHA-depolimeraza. Slika adaptirana iz (92–94).

Intracelularne PHA-depolimeraze poseduju sličnost sa e-PHAazama na globalnom proteinskom nivou, ali se razlikuju po odsustvu signalnog peptida. Većina i-PHA-depolimeraza u primarnoj aminokiselinskoj sekvenci ne poseduje homologiju sa e-PHA-depolimerazama. Objašnjenje nehomologije između dva tipa depolimeraza može se objasniti njihovom specijalizacijom prema različitim konformacijama PHA u unutarćelijskoj i spoljašnjoj sredini (87).

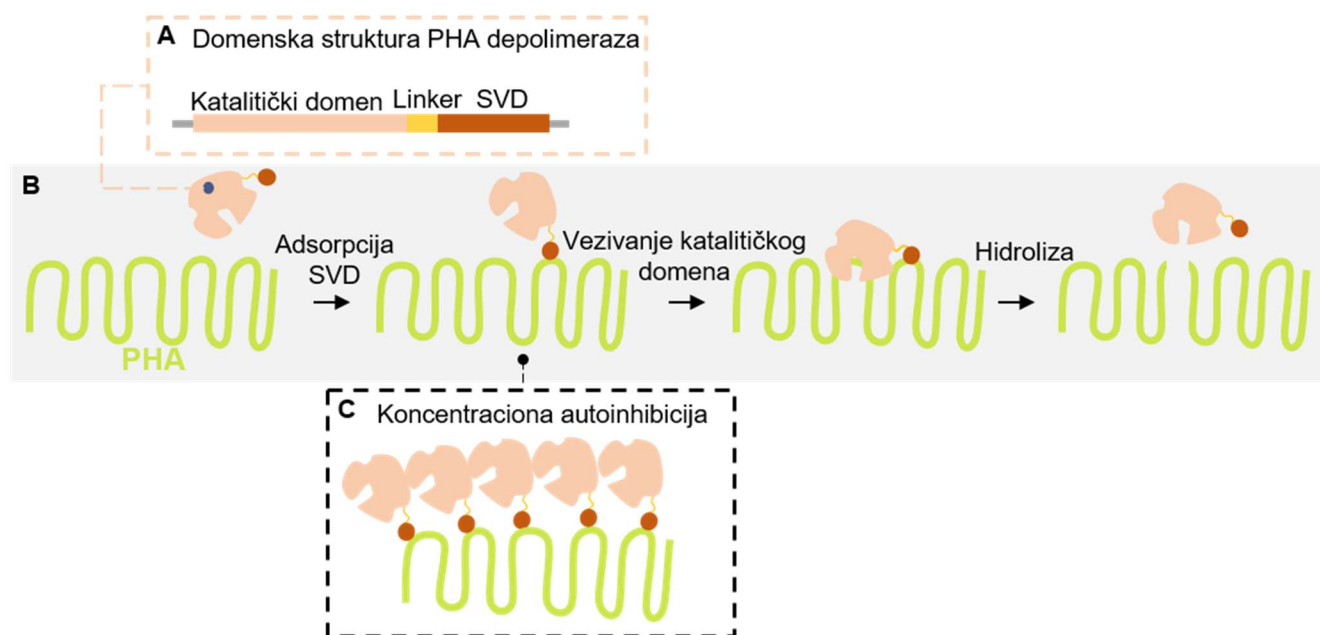
2.7.2 Kinetički model dejstva PHA-depolimeraza

Unutarćelijske depolimeraze mobilisu endogene PHA granule u trenucima nedostatka egzogenog izvora ugljenika. Mehanizam unutarćelijske degradacije PHB je manje izučen od ekstracelularne degradacije.

Na primeru e-PHA-depolimeraza opisana je kinetika enzimske degradacije PHA koja je složenija funkcija od Mihaelis Menteninog modela enzimskih reakcija. Glavni razlog tome je heterogena priroda katalize. PHA-depolimeraza se adsorbuje na površinu supstrata preko SVD i ovaj korak ograničava brzinu ukupne reakcije (Slika 9A, B). Adsorpcija enzima na polimer se dešava homogeno, na celoj površini PHA (93). Nakon vezivanja enzima i supstrata vođenog vodoničnim interakcijama i hidrofobnim efektom, odvija se hidroliza estarskih veza mehanizmom karakterističnim za serin hidrolaze: bočni ostatak serina iz katalitičke trijade nukleofilnim napadom na karbonilni ugljenik iz estarske veze polimera aktivira tu vezu za nukleofilni napad molekula vode, čime se završava reakcija hidrolize (Slika 9B). Nukleofilnost serina je omogućena efektom blizine bočnog ostatka histidina, a čije je protonovanje stabilizovano karboksilnom grupom aspartata.

Među PHA-depolimerazama postoji varijacija u vezama koje one preferencijalno hidrolizuju kada se vežu na površinu polimera, i hidrolazna aktivnost se može ispoljiti u vidu endo-, egzo- ili

kombinovanog načina hidrolize (93). Usled toga variraju i degradacioni proizvodi, koji mogu biti monomeri, dimeri, trimeri, kao i smeše oligomera sa monomerima.



Slika 9. Šematski prikaz mehanizma razgradnje PHA pomoću PHA-depolimeraza: A) domenska organizacija primarne strukture PHA-depolimeraza, koja uslovljava B) sekvencijalni proces razgradnje PHA, koji uključuje vezivanje PHA vezujućim domenom koji omogućava produktivno vezivanje katalitičkog domena kako bi se potom odvila hidroliza; i C) autoinhibiciju pri visokim koncentracijama enzima, usled zasićenja površine polimera vezujućim domenima, čime se onemogućava vezivanje katalitičkog domena i dalja hidroliza PHA. Slika adaptirana iz (22, 24).

U reakciji hidrolize ključnu ulogu igra kristalnost samog polimera (24). Hidroliza se pretežno odvija u strukturno neuređenim delovima polimera, amorfnim regionima, usled dovoljne fleksibilnosti supstrata koja omogućava produktivno vezivanje enzima (24). Iz istog razloga, hidroliza kristalnih regiona je sporiji proces. Supstrat-vezujući domen PHA-depolimeraza ima aktivnu ulogu u reorganizaciji uređenosti polimernih lanaca, kako pokazuju dinamičke studije sa katalitički inaktiviranom PHA depolimerazom, pri čemu se nakon adsorpcije enzima detektuju perturbacije polimernih lanaca (96). Brzina enzimske reakcije raste do maksimalne vrednosti sa porastom koncentracije enzima. Sa dostizanjem kritične koncentracije enzima, brzina reakcije počinje da opada. Ovaj efekat se naziva koncentraciona autoinhibicija, a objašnjava se veoma brojnom adsorpcijom molekula enzima preko pojedinačnih supstratnih domena na površini polimera, tako da KD adsorbovanih enzima ne mogu prići površini polimera i praktično su sterno inhibirani supstratnim domenima okolnih enzima, te reakcija hidrolize izostaje kao što je prikazano na Slici 9C (97). Interesantan efekat se ispoljio kod marinske PHA-depolimeraze koja je inicijalno posedovala dva SVD, te nakon gubitka jednog od ta dva domena zadobila prednost u degradaciji usled smanjene auto-inhibicije iako je to takođe rezultovalo smanjenjem ukupnog afiniteta vezivanja polimera (91).

Većina PHA-depolimeraza se sastoji od jednog polipeptidnog lanca, molekulske mase u opsegu od 40 do 90 kDa sa prosekom od 40-50 kDa. Većina enzima poseduje izoelektričnu tačku u baznoj sredini i pokazuje pH optimum između 7,5-9,8. Veliki broj je inhibiran redukujućim sredstvima i inhibitorima serin hidrolaza (diizopropilfluorofosfat). Većina ima veliki afinitet ka hidrofobnim materijalima, i

prečišćavanje uključuje hromatografiju na nepolarnoj koloni (87,90). Molekulske mase marinskih PHA-depolimeraza su prosečno veće od terestrijalnih PHA-depolimeraza zbog dodatnog SVD i kreću se u opsegu 60-70 kDa. Prosečne konstante vezivanja između supstrata i SVD marinskih PHA-depolimeraza su oko 5 puta manje od terestrijalnih koje se kreću oko 1,0 mL/ μ g. Otuda verovatno i proizilazi potreba za dva SVD u strukturi marinskih depolimeraza (92).

2.8 PLA-depolimeraze

Enzimska razgradnja PLA je prvi put otkrivena 1980. a Proteinaza K je prva identifikovana PLA-depolimeraza (98). S obzirom na to da je PLA sintetički polimer koji još uvek nije široko rasprostranjen, PLA depolimerazna aktivnost enzima izolovanih iz prirode se smatra promiskuitetnom enzimskom aktivnošću enzima razvijanih za različite primarne metaboličke funkcije (32,99,100). Od tada je okarakterisano mnogo drugih PLA-depolimeraza, obuhvatajući široku klasu enzima iz grupe hidrolaza sa različitim primarnim metaboličkim funkcijama:

3. Hidrolaze

3.1 Katalizuju hidrolizu estarskih veza

3.1.1 Karboksil-estar-hidrolaze (kutinaze, lipaze i esteraze)

3.4. Katalizuju hidrolizu peptidne veze (proteaze)

Kutinaze su fungalni enzimi za razgradnju kutina, prirodnog poliestra iz biljnih kutikula sa pokazanom aktivnošću na širem spektru poliestara uključujući i PLA (101). Takođe, i u slučaju proteaza je pokazana supstratna promiskuitetnost koja se ogleda u njihovoj sposobnosti da pored hidrolize peptidnih veza hidrolizuju i estarsku vezu (102,103). Svojstveno i za kutinaze/lipaze/esteraze i proteaze je deljeni serin katalitički mehanizam ali sa različitim stereohemijama katalitičkog mesta (100,104) koji im daje i različitu specifičnost prema PLA i drugim poliestrima. Zbog hiralne prirode mlečne kiseline kao monomera (105), PLA može da postoji u obliku poli(L-mlečne kiseline) (*engl.* poly(L-lactic acid), PLLA) i obliku poli(D-mlečne kiseline) (*engl.* poly(D-lactic acid), PDLA) stereoizomera. Na osnovu specifičnosti prema stereoizomerima PLA kao i aktivnosti prema drugim poliestrima, PLA-depolimeraze se klasifikuju u dve grupe:

EC 3.1.1.- PLA-depolimeraze tipa II (lipaze, kutinaze, esteraze) preferencijalno aktivnih na PDLA, obično poseduju i širu poliestersku specifičnost (PLLA, PET, PUR, PCL, PHB, PBS) (99,100)

EC 3.4.- PLA-depolimeraze tipa I (proteaze) usko specifične prema PLLA u poređenju sa PDLA, i specifične prema PLA kao poliestru u odnosu na sve druge polimere (100)

Klasifikacija PLA-depolimeraza prema primarnim supstratima i poliestrima kao sekundarnim supstratima pokazuje visok stepen konzistentnosti sa stereohemijskog aspekta, što ukazuje da je stereospecifičnost visoko konzervirano svojstvo ovih enzima. Specifičnost proteaza prema PLLA se objašnjava strukturnom homologijom L-mlečne kiseline sa L-aminokiselinama u proteinima (106).

Iz konteksta primene enzima za potrebe razgradnje PLA otpada, proteaze su od posebnog značaja jer su specifični za PLLA koji je najzastupljeniji tip PLA koji se komercijalno proizvodi (72,100). U studiji iz 2000. među 56 komercijalnih preparata proteaza Proteinaza K (EC 3.4.21.64) se pokazala kao daleko najefikasniji enzim u testiranim uslovima (50 °C, i pri optimalnom pH za svaki pojedinačni enzim), Savinaza (EC 3.4.21.62) kao drugi najbolji enzim je dostigla 50% aktivnosti Proteinaze K (32). Takođe, zbog veće zastupljenosti PLLA kao supstrata u inicijalnim studijama je identifikovano više

proteaznih PLA-depolimeraza, i proteazni tip PLA-depolimeraza je delovao efikasnije u odnosu na lipazni tip na PLLA kao supstratu (99,107,108). Dodatno, manjak komercijalnih preparata lipaza je takođe doprineo većem izučavanju proteaznog tipa PLA-depolimeraza. Stoga zbog visoke PLA depolimerazne aktivnosti i dostupnosti komercijalnog preparata, Proteinaza K je postala zlatni standard u studijama enzimske razgradnje PLA i do danas najbolje proučena PLA-depolimeraza.

S druge strane, kutinaze kao PLA-depolimeraze tipa II u poslednje vreme postaju sve značajnije zbog njihove široke poliesterazne aktivnosti, kako na PLLA i PDLA tako i na drugim biopolimerima (PCL, PHB, PBS) i na sintetičkim poliestrima (PET, PUR). Stoga, njihova upotreba ne bi zahtevala dalje razdvajanje plastičnog otpada na bazi poliestara u biokatalitičkom procesu depolimerizacije (109–111). Takođe, kutinaze su najefikasnija klasa enzima među PLA-depolimerazama, sa kutinazom iz *Cryptococcus* sp. S-2 kao trenutno najefikasnijim enzimom za PLA depolimerizaciju, koja je 550 puta aktivnija od Proteinaze K na svom temperaturnom optimumu od 30 °C (99). Takođe, lipaze aktivne na PLA, CRL iz *Candida rugosa* i CALB iz *Candida antarctica*, su se pokazale sporijim od kutinaza, FsC i HiC, zbog domena poklopca (101).

PLA-depolimeraze katalizuju hidrolizu terminalnih estarskih veza ("egzo" hidroliza) polimera oslobađajući mlečnu kiselinu kao monomer ili hidrolizu unutrašnjih estarskih veza ("endo" hidroliza) oslobađajući oligomere PLA (32,99,100). Većina PLA-depolimeraza razgrađuje PLA i *egzo* i *endo* hidrolizom dajući mlečnu kiselinu kao glavni proizvod hidrolize (112). PLA-depolimeraze se međusobno razlikuju prema brzini postizanja kompletne depolimerizacije PLA do mlečne kiseline, na koju utiče različita preferencijalna hidroliza oligomera veće ili manje dužine koja se može odrediti analizom hidrolitičkog profila enzima. PLA-depolimeraze specifične ka oligomerima veće dužine će dati dimer, trimer ili tetramer kao najzastupljenije oligomere, dok preferencijalna hidroliza oligomera manje dužine uglavnom daje PLA dimer.

Identifikacija efikasnih PLA-depolimeraza iz genomskih baza podataka je upravo i otežana njihovom širokom funkcionalnom klasifikacijom što zahteva pretragu heterogenih grupa sekvenci i značajno proširuje prostor pretraživanja.

2.9 Analitičke metode za praćenje i kvantifikaciju biokatalitičke razgradnje plastike

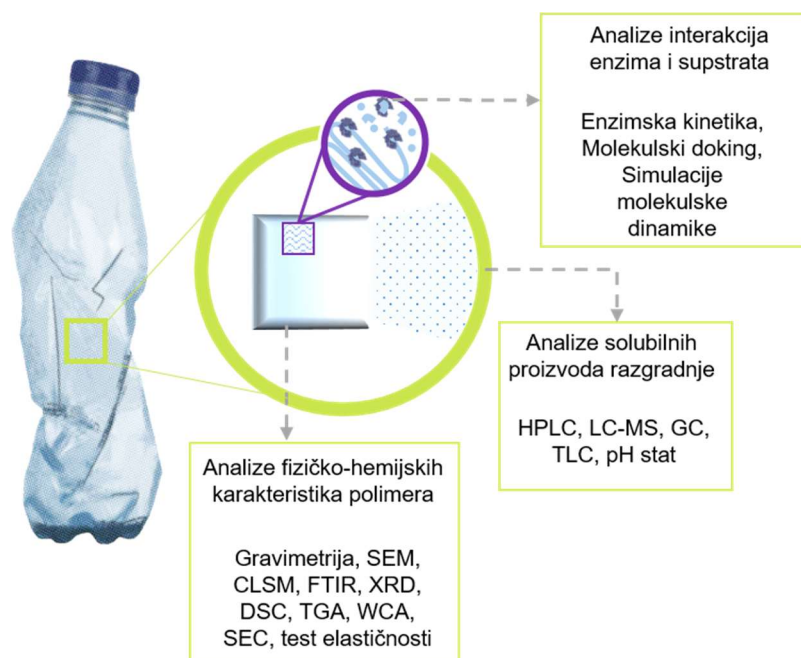
Tokom procesa depolimerizacije dolazi do promena u molekulskoj masi polimernih lanaca na površini materijala, što direktno utiče na mehanička svojstva plastike. Zbog toga, mehaničke karakteristike poput zatezne čvrstoće, termalna svojstva poput temperatura tranzicije (T_m , T_c i T_g) i stepen kristalnosti, kao i promena polarnosti površine predstavljaju jedan od prvih indikatora razgradnje. Adekvatne metode analize su prema tome, test zatezne čvrstoće, dinamička mehanička analiza (DMA), X-ray difrakcija (XRD), X-ray fotoelektronska spektroskopija (XPS), infracrvena spektroskopija (FTIR), diferencijalno skenirajuća kalorimetrija (DSC) i merenje kontaktnog ugla (WCA) (113). Međutim, ove metode ne omogućavaju kvantitativnu procenu stepena razgradnje.

Napretkom depolimerizacije moguće je pratiti smanjenje prosečne molekulske mase (M_w) polimera, za razliku od površinske enzimske hidrolize u ranoj fazi kada se smanjenje M_w teško može detektovati jer je kontaktna površina znatno manja od ukupne mase uzorka. Prosečna molekulska masa (M_w) polimera može se precizno odrediti tehnikama kao što su nuklearna magnetna rezonanca (NMR) i gel filtracija (*engl.* size exclusion chromatography, SEC). Hemijska priroda razgrađenih veza može se identifikovati FTIR spektroskopijom, dok se kvantifikacija funkcionalnih grupa na površini može sprovesti XPS analizom.

Kako se depolimerizacija progresivno odvija, u degradacioni medijum se oslobađaju prvi rastvorljivi produkti (oligomeri i monomeri), koji se mogu detektovati i kvantifikovati tečnom hromatografijom visokih performansi (*engl.* high-performance liquid chromatography, HPLC) i tečnom hromatografijom sa masenom spektrometrijom (*engl.* liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS), specifičnim biosenzorima ili metodom pH stata ukoliko se tokom razgradnje oslobađaju kiseline ili baze. Takođe, gubitak mase zaostalog polimera moguće je izmeriti gravimetrijski ili turbidimetrijski. Vizuelizacija razgradnje zaostalog polimera se postiže različitim tehnikama mikroskopije, kao što su skenirajuća elektronska mikroskopija (*engl.* scanning electron microscopy, SEM), konfokalna laserska skenirajuća mikroskopija (*engl.* confocal laser scanning microscopy, CLSM) i mikroskopija atomskih sila (*engl.* atomic force microscopy, AFM), ili praćenjem formiranja zone prosvetljenja u difuzionom testu enzimske aktivnosti u čvrstoj polimernoj emulziji.

U slučaju potpune mikrobiološke mineralizacije plastike, gde je polimer jedini izvor ugljenika, moguće je kvantifikovati produkciju CO₂ (u aerobnim) ili CH₄ (u anaerobnim uslovima) pomoću respirometrije i time indirektno proceniti ukupan stepen depolimerizacije i razgradnje.

Pregled analitičkih tehnika za praćenje razgradnje polimera je grafički prikazan na Slici 10.



Slika 10. Klasifikacija analitičkih tehnika za praćenje biokatalitičke razgradnje polimernih materijala prema analiziranoj fazi procesa.

Dodatno, za supstrate kompleksne strukture poput plastike mogu da se koriste model jedinjenja. Model jedinjenja su mali molekuli strukturno slični strukturnim motivima prisutnim u kompleksnim supstratima, a njihova primena pruža višestruke prednosti. Na primer, zahvaljujući jednostavnijoj strukturi omogućavaju jednoznačnu identifikaciju strukturnih motiva koje enzim preferencijalno prepoznaje u supstratu. Takođe, zbog viših nivoa strukturne organizacije polimera aktivnosti dva enzima testirana na istom tipu polimera nisu nužno direktno uporedive, zbog čega se javila potreba za standardizacijom testova enzimske aktivnosti (114). Standardizacija polimernih supstrata uključuje korišćenje materijala poznatog porekla i definisanih fizičko-hemijskih karakteristika, uz standardizaciju reakcionih uslova, kao ključne preduslove za pouzdano poređenje aktivnosti enzima i reproduktivnost rezultata između različitih studija (60). Na isti način, primena model jedinjenja, čija je struktura značajno

jednostavnija od strukture polimernih supstrata, može olakšati standardizaciju merenja aktivnosti enzima aktivnih na plastici. Dodatno, hidroliza polimera je spor proces upravo zbog rigidnosti plastike kao supstrata, dok su hemijske veze u malim molekulima lako dostupne. Tokom depolimerizacije plastike otežana je direktna kvantifikacija proizvoda hidrolize, usled slične apsorptivnosti polimera i proizvoda hidrolize, rasipanja svetlosti u prisustvu nerastvornih čestica plastike, kao i heterogene prirode proizvoda hidrolize (115,116). Nasuprot tome, male molekule obeležene hromoforom ili fluoroforom karakteriše strukturna jednostavnost i rastvorljivost u vodenim sistemima što omogućava direktnu kvantifikaciju enzimске aktivnosti tokom reakcije. Upotreba PET model jedinjenja značajno je ubrzala detekciju PETaza u odnosu na PET kao supstrat (117), kao i omogućila potvrdu preferencijalnog mesta hidrolize koristeći PET oligomere (118–120). Model jedinjenja su posebno korisna za karakterizaciju enzima aktivnih na PU, koje odlikuje vrlo varijabilna struktura usled raznovrnosti monomernih jedinica, uključujući i aromatična i alifatična jedinjenja, kao i prisustva različitih tipova hemijskih veza poput uretanskih i estarskih veza u istom polimeru (121). Model jedinjenja su korišćena i za karakterizaciju enzima aktivnih i na PA (116,120,122), silikonu (123), kao i lignolitičkih enzima usled velike strukturne kompleksnosti lignina (124).

2.10 Proteinsko inženjerstvo za industrijsku primenu enzima

Primena enzima prevazišla je mnoga ograničenja klasične katalize, omogućavajući brže, specifičnije i održivije procese pri blažim uslovima (niže temperature, vodena sredina), uz visok stepen čistoće proizvoda i stereoselektivnosti. Zbog ovih prednosti enzimi su našli široku primenu u industriji deterdženata, prehrambenoj, farmaceutskoj, kozmetičkoj, tekstilnoj i drugim industrijama. Nasuprot hemijskim katalizatorima, upotrebu enzima ograničavaju niža operaciona stabilnost, smanjena aktivnost u organskim rastvaračima, kraći vek aktivnosti i pojava inhibicije supstratom ili proizvodom. Potreba za prevazilaženjem ovih nedostataka podstakla je razvoj proteinskog inženjerstva, koje omogućava prilagođavanje enzima specifičnim procesnim uslovima, uključujući pH i temperaturne ekstreme, toleranciju na rastvarače i poboljšanu selektivnost. Prvi iskorak u proteinskom inženjerstvu omogućio je razvoj tehnologije rekombinantne DNK 1970-ih, čime je prvi put bilo moguće promeniti sekvence gena, a time i proteina kao njihovih produkata, a takođe i genetički kontekst gena od interesa čime je značajno olakšana proizvodnja proteina na većoj skali. U prvih 10 godina od otkrića, tehnologija rekombinante DNK je revolucionarizovala farmaceutsku industriju, a potom i druge industrijske sektore (125). Kontinuirani razvoj molekularne biotehnologije i dirigovane evolucije, čiji začeci datiraju iz 1978. godine (126), krunisan je Nobelovom nagradom za hemiju 2018. godine (127). Dirigovana evolucija je omogućila razvoj enzima bez opsežnih informacija o samom proteinu, primenjujući prirodne principe evolucije u ubrzanim laboratorijskim uslovima. Nasumične mutacije se uvode u strukturu gena, a potom se biblioteka varijanti gena pretražuje funkcionalnim testovima kako bi se identifikovali enzimi sa željenim svojstvima. Strategije proteinskog inženjerstva se razlikuju prema tome koliko informacija o proteinskoj strukturi i funkciji koriste u procesu dizajniranja novih biokatalizatora i klasifikuju na racionalni dizajn, dirigovanu evoluciju i semi-racionalni dizajn (128). U praksi, odabir određene strategije je vrlo često uslovljen i kapacitetom za testiranje svojstva enzima od interesa tehnikama visoke procesivnosti, pored dostupnosti informacija o strukturi i funkciji enzima.

2.10.1 Racionalni dizajn

Racionalni dizajn se zasniva na promeni specifičnih aminokiselina odabranih na osnovu opsežnih podataka o vezi strukture i funkcije enzima. Podaci o vezi strukture i funkcije se mogu dobiti na osnovu analize trodimenzionalne kristalne strukture enzima kokristalisanog sa supstratom, višestrukim poravnavanjem sekvenci (*engl.* multiple sequence alignment, MSA) enzimskih homologa ili primenom kompjuterskih metoda za simulaciju interakcija enzima i supstrata (molekulski doking, molekulska

dinamika) (129). Zbog fokusa na aminokiseline u blizini aktivnog i/ili vezivnog mesta, zanemarene su mutacije u udaljenim delovima proteina iako mogu biti vrlo značajne u proteinskom inženjerstvu (130). Ovo pogotovo postaje značajno za enzime koji razgrađuju supstrate visoke molekulske mase poput plastike, gde su i eksperimentalni i kompjuterski modeli često dobijeni sa analozima manjih molekulskih masa (131,132).

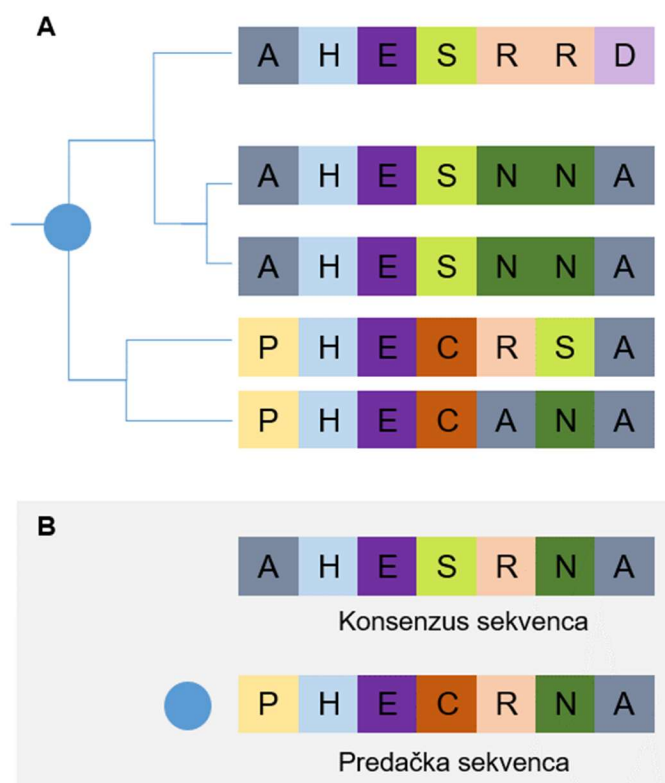
2.10.2 *Dirigovana evolucija*

Dirigovana evolucija podrazumeva simuliranje prirodnog procesa evolucije gena u ubrzanoj vremenskoj skali, uvođenjem nasumičnih mutacija u gen kojim je enzim kodiran (133). Kreirana DNK biblioteka se zatim pretražuje kako bi se identifikovale enzimске varijante sa unapređenim svojstvom od interesa primenom testova koji selektuju željenu funkciju. Proces može da se ponavlja u više ciklusa kako bi se određeno svojstvo enzima višestruko unapredilo. Nasumično uvođenje mutacija u gen moguće je postići njegovim umnožavanjem pomoću lančane reakcije polimeraze (*engl.* polymerase chain reaction, PCR) pod mutagenim uslovima (*engl.* error-prone PCR), čime se u okviru pojedinačnog gena nasumično supstituišu pojedinačni nukleotidi ili pomoću DNK šaflovanja (*engl.* DNA shuffling), kojim se fragmenti homolognih gena rekombinuju dajući nove genetičke kombinacije (134,135). S obzirom na veliki broj varijanti gena koje se ovim pristupom generišu, dirigovana evolucija veoma zavisi od testova enzimске aktivnosti sa visokom procesivnošću, što je posebno izazovno za nesolubilne supstrate poput plastike (136). S tim ciljem, najčešće se razvijaju testovi sa celim ćelijama koje ne zahtevaju složenu obradu svakog uzorka, a kao najefikasniji sistemi su se pokazali ćelijski testovi u kojima je rast i umnožavanje ćelija direktno zavisno od efikasnosti odabranog enzima (137). Glavni nedostatak ovog pristupa je što je svaka nasumična mutacija statistički verovatnije štetna ili neutralna, nego korisna (138), zbog čega je neophodno ograničiti učestalost mutacija na 1 do 2 po sekvenci čime se ograničava stepen unapređenja enzimskih varijanti. Dodatno, zbog degenerisanosti genetičkog koda, ista aminokiselinska supstitucija može nastati iz više nukleotidnih promena, pa nasumična mutageneza u dirigovanoj evoluciji generiše veliki broj sinonimnih varijanti zahtevajući pretraživanje velikog broja kolonija da bi se osigurala diverzifikacija gena, ali čak ni velike biblioteke ne obuhvataju sve moguće supstitucije na istoj poziciji jer se pojedinačne nukleotidne supstitucije ne prevode u svih 19 mogućih aminokiselinskih supstitucija na jednoj poziciji (139,140). U odsustvu strukturnih informacija, nasumična mutageneza pomoću mutagenog PCR je dobra osnova za identifikaciju značajnih aminokiselina i može obezbediti polazne informacije za semi-racionalni dizajn (141).

2.10.3 *Semi-racionalni dizajn*

Semi-racionalni dizajn kombinuje informacije o primarnoj sekvenci, trodimenzionalnoj strukturi i funkciji enzima sa prediktivnim kompjuterskim algoritmima za odabir značajnih aminokiselina i predviđanje unapređenih varijanti, čime se značajno smanjuje broj varijanti enzima koje je potrebno funkcionalno testirati. Dodatno, primenom mesto-zasićujuće mutageneze (*engl.* site-saturating mutagenesis) moguće je odabranu pojedinačnu aminokiselinu supstituisati sa svih mogućih 19 drugih aminokiselina (142). Najčešće korišćeni pristup za identifikaciju funkcionalno značajnih aminokiselina su filogenetske metode poput konsenzus dizajna i rekonstrukcije predačkog gena (*engl.* ancestral sequence reconstruction, ASR) (143). Obe metode koriste uporednu analizu homologa enzima od interesa višestrukim poravnavanjem sekvenci. Konsenzus dizajn na osnovu homolognih sekvenci identifikuje najzastupljenije (konsenzus) aminokiseline na svakoj poziciji i konstruiše konsenzus sekvencu gena. Varijante enzima u koje je uvedena konsenzus aminokiselina na poziciji u kojoj wild-type sekvenca odstupa od konsenzus sekvence često imaju unapređenu termostabilnost (oko 50% uvedenih konsenzus supstitucija povećava stabilnost enzima) (144). Rekonstrukcija predačkog gena

(ASR) ide korak dalje u uporednoj analizi homolognih sekvenci, analizirajući filogenetske odnose među savremenim homologima i primenjući statističke modele evolucije aminokiselina za predviđanje sekvenci koje odgovaraju hipotetičkim zajedničkim precima. ASR je u svojim začecima bio metodologija evolucione biologije, omogućivši proučavanje predačkih proteina iz izumrlih organizama (do ~3,5 milijardi godina starosti) (145,146). Predački proteini su dostizali termostabilnost i do 40 °C veću u odnosu na savremene mezofilne varijante (143), što je otvorilo put ka primeni ASR pristupa u proteinskom inženjerstvu za razvoj enzima sa unapređenom termostabilnošću (147), ali i aktivnošću (148), proširenom supstratnom specifičnošću (149) i unapređenom solubilnošću (150,151). Komparativne studije konsenzus dizajna i ASR su pokazale da ASR kao metoda daje veće unapređenje termostabilnosti proteina (152–154). Razlike između konsenzus dizajna i ASR su šematski prikazane na Slici 11. Na Slici 11A prikazane su polazne sekvence i njihova evolutivna povezanost, a na Slici 11B je prikazana razlika između rezultujuće konsenzus i predačke sekvence.



Slika 11. Šematski prikaz razlike u konstruisanju novih varijanti proteina primenom konsenzus dizajna i rekonstrukcije predačkog gena (ASR). Od A) istih polaznih sekvenci proteina prisutnih u prirodi, ove metode predviđaju B) različite varijante sa unapređenom stabilnošću.

Razvoj metoda mašinskog učenja (*engl.* machine learning, ML) dodatno je proširio mogućnosti semiracionalnog dizajna enzima, omogućavajući predviđanje potencijalno korisnih mutacija na osnovu informacija sadržanih u proteinskim sekvencama i 3D strukturama (155,156). ML obuhvata metode koje omogućavaju razvoj modela sposobnih da na osnovu dostupnih podataka identifikuju obrasce i daju predikcije bez potrebe za eksplicitnim definisanjem svih pravila. ML modeli uočavaju pravilnosti u podacima kroz proces optimizacije, pri čemu kvalitet i reprezentativnost ulaznih podataka imaju ključan značaj za pouzdanost dobijenih predviđanja.

3. Ciljevi istraživanja

U okviru ove disertacije definisani su sledeći opšti ciljevi za unapređenje procesa biokatalitičke razgradnje PHA i PLA:

1. Selekcija enzima za razgradnju biopolimera - Identifikacija i odabir enzima sa potencijalom za razgradnju PHA i PLA, na osnovu efikasnosti razgradnje i mogućnosti njihove komercijalne proizvodnje.
2. Odabir ekspresionog sistema i optimizacija uslova ekspresije odabranih enzima u komercijalno značajnim bakterijskim ćelijama za potrebe daljeg eksperimentalnog rada.
3. Razvoj sistema za praćenje enzimske i ćelijske aktivnosti - Uspostavljanje metodologije za praćenje aktivnosti enzima i ćelija na polimernim supstratima, kao i odabir i primena model jedinjenja za standardizovanu karakterizaciju polimer-degradijućih enzima.
4. Strukturna modifikacija enzima – kombinovanjem bioinformatičkog i eksperimentalnog pristupa, identifikacija ključnih aminokiselinskih ostataka odgovornih za specifično prepoznavanje i hidrolizu biopolimernih supstrata, kao i za stabilizaciju biokatalizatora u cilju dobijanja poboljšanih varijanti enzima.
5. Optimizacija biokatalitičkog procesa - Ispitivanje mogućnosti unapređenja efikasnosti razgradnje kroz predtretman polimernih supstrata i optimizaciju reakcionih uslova tokom enzimske hidrolize.

4. Materijal i metode

4.1. Materijal

4.1.1 Hemikalije

Spisak hemikalija, rastvarača i komercijalnih kitova korišćenih za eksperimentalni rad naveden je u Tabeli 1.

Tabela 1. Spisak korišćenih hemikalija, rastvarača i komercijalnih kitova

Hemikalija	Proizvođač
GeneMorph II Random Mutagenesis Kit QuickChange Lightning Site-directed Mutagenesis Kit	Agilent (Santa Klara, SAD)
Agar Ekstrakt kvasca Glukoza Trypton	Bio-Life (Milano, Italija)
Rastvor akrilamida/bis-akrilamida (30%, 29:1) Amonijum-persulfat (APS) Komercijalni gelovi za SDS-PAGE N, N, N', N'-tetrametiletilendiamin (TEMED)	Bio-Rad (Herkules, SAD)
Borna kiselina K ₂ HPO ₄ - kalijum-hidrogenfosfat	Carlo Erba (Kornaredo, Italija)
HCl - hlorovodonična kiselina	Macron Fine Chemicals (Radnor, SAD)
Agaroza Ampicilin - natrijumova so Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination Bug Buster Protein Extraction reagents CaCl ₂ - kalcijum-hlorid Etidijum-bromid Fe(III)NH ₄ -citrat - gvožđe(III)-amonijum-citrat Hloramfenikol Imidazol KCl - kalijum-hlorid Lizozim Mlečna kiselina N-Z amin <i>p</i> -nitrofenil-butirat (pNPB) <i>p</i> -nitrofenil-oktanoat (pNPO) <i>p</i> -nitrofenol (pNP) Rifampicin	Merck (Minhen, Nemačka)
NEBuilder HiFi DNA Assembly Cloning Kit	New England BioLabs (Masačusets, SAD)

1 kb DNA marker (250 - 10 000 bp)	NIPPON Genetics EUROPE
BlueStar Prestained Protein Markers (10 - 180 kDa)	(Tokio, Japan)
Triton-X-100	PlusOne (Draper, SAD)
Tween 20	
Ni-NTA agaroz	Qiagen (Venlo, Holandija)
Bromfenol plavo	
Coomassie Brilliant Blue R250 (CBB)	Serva (Hajdelberg, Nemačka)
Glicin	
Aceton	
Acetonitril	
Ditiotreitol (DTT)	
DNA Gel Loading Dye	
GeneJET Gel Extraction Kit, Taq DNA Polymerase PCR	
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	
Glicerol	
Hloroform	
Izopropil β -D-1-tiogalaktopiranozid (IPTG)	Thermo-Fisher Scientific
KH ₂ PO ₄ kalijum-dihidrogenfosfat	(Masačusets, SAD)
MgSO ₄ - magnezijum-sulfat	
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O - natrijum-dihidrogenfosfat monohidrat	
Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O - dinatrijum-hidrogenfosfat dodekahidrat	
NaCl – natrijum-hlorid	
natrijum-dodecilsulfat (SDS)	
NH ₄ Cl - amonijum-hlorid	
tris(hidroksimetil)aminometan (Tris)	
Laktoza	Torlak (Beograd, Srbija)

4.1.2 Bakterijski sojevi, plazmidi i prajmeri

Za potrebe kloniranja, održavanja plazmida i ekspresije rekombinantnih proteina korišćeni su različiti sojevi bakterije *Escherichia coli*. Sojevi *E. coli* XL-10-Gold, *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL, *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* ArcticExpress (DE3) i *E. coli* BL21-Gold(DE3)pLysS poručeni su od kompanije Agilent (Santa Klara, SAD). Sojevi *E. coli* SoluBL21 i *E. coli* LOBSTR dobijeni su od dr Aleksandre Maršavelski sa Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Zagrebu. Soj *E. coli* SHuffle T7 poručen je od kompanije New England Biolabs (Masačusets, SAD). Bakterijski sojevi *E. coli* korišćeni u ovom radu čuvani su u 20% glicerolu na -80°C . Za gajenje bakterijskih kultura ćelije su rutinski zasejavane na LB agar tokom 16 h, a pojedinačne kolonije su potom umnožavane u LB tečnoj podlozi na 37°C uz mešanje na rotirajućoj platformi pri brzini od 180 rpm. U cilju selekcije i održavanja plazmida u ćelijama *E. coli* u sve hranljive podloge su dodavani odgovarajući antibiotici.

Za ekspresiju i mutagenezu korišćen je plazmid pET-22b(+) sa genom za P₆PHOazu i njenih mutanata, dok su geni za CtPHBazu, LCC^{ICCG} i Savinazu u istom vektoru korišćeni za dalje kloniranje i ekspresiju. Konstrukti pET-22b(+) vektora sa svakim od gena čija je sekvenca prikazana u Tabeli 2 kupljeni su od GenScript BV (Holandija). Prajmeri korišćeni za amplifikaciju gena, uvođenje mutacija i proveru konstrukata prikazani u Tabeli 3 dizajnirani su u skladu sa eksperimentalnim potrebama i poručeni od Vivogen D.O.O. (Beograd, Srbija).

Tabela 2. Nazivi korišćenih gena i njihove sekvence

Gen	Sekvenca gena	Dužina gena (bp)
PfPHOaza	GCGAGCCGTTGCAGCGAACGTCCGCGTACCCTGCTGCGTCCGGC GGAAGTGAGCTGCAGCTACCAGAGCACCTGGCTGGACAGCGGT CTGGTTGGCCAGCGTAAGATCATTATCAAACCCCGCTGGGTAC CCCGCCGGCGGGTGGCTGGCCGGTGGTTCTGATCTACCAGGGC AGCTTCTTTCCGCTGAACGATTTTACGCTATCACAGCAACCTGCC GTTTGGTGGCTACTATGAAGGTAAACTGGTGCAAACCTGCTGG ACCACGGCTATGCGGTTATTGCGCCGAGCGCGCCGGCGGACCT GTTCTGGCAGACCAACATTCCGGGTCTGGCGCAAGCGTACGAG CTGAGCACCAGCTATGATTTCTGGGTAACTGCTGGCGGCGAT TGCGAGCGGTCACTTTGGTCCGCTGAACGCGCAGCGTCAATACG CGACCGGTATTAGCAGCGGTGGCTATAACACCAGCCGTATGGC TGTGAGCTTCCCGGGCAAGTTTCGTGCGCTGGCGGTTTACAGAGCG GTAGCTACGCGACCTGCAGCGGTCCGCTGTGCGTGGTTCCGGAC CAACTGCCGGCGGATCACCCGCCGACCCTGTTCTGCACGGTTT TGTGGACGCGGTGGTTCCGTGGTGGAGCATGGACCTGTACTATG ATCGTCTGCTGCACCAAGGTATTGAGACCGCGCGTTATACCGAA CCGCTGGGTGGCCATGAGTGGTTTGGCGGCGAGCCCGGGTAAAG TTCTGGCGTGGTTTAAACGCGACCCG	768
PfPHOaza-33	CCATGGCGAGCCGTTGCACCGAAACCAAACCGGCCTGACCGC GGATACCATTAGCTGCAGCTACCAGACCAAATATAACTGGATT GAAAGCGGCGCGGGTATTTATGTGCCGCGTGAAGTGCGTTATC AACTGCCGGAAGGTACCCCGCCGGCGGGTGGCTGGCCGGTGGT TGTGCTGTACCAGGGCAGCTTCTTTCCGGTGGAAGATTTCTGGC GTGCGGCGCCGAGCCAGAACATGCCGTTTGGTGGCTACTATGA AGTGAAACTGATTCAAAAAGTCTGGACAACCCGGCGGGCACC GGCAAAGGCTATGCGGTTATTGCGCCGGATGCGCCGGCGGCGG ATCGTGGCCTGCAGTTCTGGCAGACCAACGTGCCGGGTTTTGCG GCGGGCGTGTTTCCGTACAGCGCGAGCGCGGACTATCGTTTCT GACCAACCTGTTTGATGCGATTAAAGCGGGTCAGTTTGGCAGCG CGGGTCCGCTGAACGCGAACCCTCGTTACGCGACCGGTATTAG CAGCGGTGGCTATAACACCAGCCGTATGGCTGTGAGCTTCCCGG GCGCGAGCGAATTCGTGCGCTGGCGATTACAGAGCGCGAGCTA CGCGACCTGCAGCGGTCCGCTGTGCGTGGTTCCGGAAACCCTGC CGGCGAACCACCCGCCGACCCTGTTCTGCACGGTGCGGCGGA CCTGATTGTTCCGGTGTGGACCATGGAAAAATACTATGATCGTC TGAAAGATCAAGGTATTGAGACCGAACTGGTGGTGGAACCGGG CGCGGGCCATGAGTGGCTGGCGGAAAACCTGGCGCCGGAAGAA ATTCTGAACTGGTTTGATGCGCACCCGCTCGAG	857
PfPHOaza-36	CCATGGCGAGCCGTTGCACCGAAACCCGAAAACCGGCCTGAC CGCGGATACCATTAGCTGCAGCTACCAGACCAAATATAACTGG ATTGAAAGCGGCGCGGGTATTAGCGTGCAGCGTGAAGTGCGTT ATCAACTGCCGGAAGGTACCCCGCCGGCGGGTGGCTGGCCGGT GGTTGTGCTGTACCAGGGCAGCTTCTTTCCGGTGGAAGAACTTCT GGCGTGGCGGCGCGAGCCAGAACATGCCGTTTGGTGGCTACTA TAACGAAGTGAACTGATTAAAAAACTGCTGGACAGCCCGGCG GGCACCGGCAAGGCTATGCGGTTATTGCGCCGGAAGCGGCGA GCGCGGATCGTGGCTATCAGTTCTGGCAGACCAACGTGCCGGG TTTTGCGCCGGCGGGCGGCTGCACCGAAAACAAAGGCAGCGGC GTGGCGCCGTACGAGCTGAGCGCGGACTATCGTTTCTGACCAA CCTGTTTGATGCGATTAAAGCGGGTCAGTTTGGCAGCGGCTTTG GCGGTCCGCTGAACGCGAACCCTGTGACGCGACCGGTATTAG CAGCGGTGGCTATAACACCAGCCGTATGGCTGTGAGCTTCCCGG GCGGCAGCGGCAACGCGAGCGAATTCGTGCGCTGGCGATTCA	965

	GAGCGCGAGCTACGCGACCTGCAGCGGTCCGCTGTGCGTGGTT CCGGAACCCCTGCCGGCGAACCAACCCGCCGACCCCTGTTCTTGCA CGGTGCGGTGGACCTGGTGGTTCGCGTGTGGACCATGGAACGTT ACTATGATCGTCTGAAAGATCAAGGTATTGAGACCGTGGATTAT AGCCGTGGCCTGAAACTGCTGGGCGATACCCGTTGCGATGCGG AACTGGTGGTGGAAACCGGGCGCGGGCCATGAGTGGCTGGCGGA AAACCTGGCGCCGGAAGAAATTCTGAACTGGTTTGATGCGCAC CCGCGTCTCGAG	
PfPHOaza-37	CCATGGCGAGCCGTTGCACCGAAACCAAAACCGGCCTGACCGT GGATACCATTAGCTGCAGCTACCAGACCAAATATATTGAAGCG GGCGCGGGTATTCAGCGTGAAGTGAAATATCAACTGCCGGAAG GTACCCCGCCGGCGGGTGGCTGGCCGGTGGTTGTGATCTACCAG GGCAGCTTCTTTCCGGTGGAATTCAGCCGTAGCCAGAACATGCC GTTTGGTGGCTACTATGAAGTGAAACTGATTCAAAAACCTGCTGG ACAGCGGCTATGCGGTTATTGCGCCGAACGCGGCGGCGGACCT GTTCTGGCAGACCAACGTGCCGGGTTTTGCGGTGCCGTACGAGC TGAGCACCGACTATCGTTTCCTGACCAACCTGTTTGATGCGATT AAAGCGGGTCAGTTTGGTCCGCTGAACGCGAACCGTAAATACG CGACCGGTATTAGCAGCGGTGGCTATAACACCAGCCGTATGGC TGTGAGCTTCCCGGGCGAATTTTCGTGCGCTGGCGATTTCAGAGCG GTAGCTACGCGACCTGCAGCGGTCCGCTGTGCATTGTTCCGGAA ACCCTGCCGGCGAACCAACCCGCCGACCCGTGTTCTGCACGGTGC GGTGGACGTGGTGGTTCCGGTGTGGACCATGGAACGTTACTATG ATCGTCTGAAAGATCAAGGTATTGAGACCGAACTGTATGTGGA ACCGCTGGCGGGCCATGAGTGGTTTGCGGAAAGCCCGGAAAAA ATTCTGAACTGGTTTAACCAGCACCCGCTCGAG	773
PfPHOaza-38	CCATGGCGAGCCGTTGCACCGAAACCAAAACCGGCCTGCTGCC GAAAACCATTAGCTGCAGCTACCAGACCAAATGGATTGAAGCG GGCCCGGGTATTCAGCGTGAAGTGAAATATCAAGTGCCGGAAG GTACCCCGCCGGCGGGTGGCTGGCCGGTGGTTGTGATCTACCAG GGCAGCTTCTTTCCGGTGGAATTCAGCCGTAGCCAGAACATGCC GTTTGGTGGCTACTATGAAGTGAAACTGATTCAAAAACCTGCTGG ACAACGGCTATGCGGTTATTGCGCCGAACGCGGCGGCGGACCT GTTCTGGCAGACCAACGTGCCGGGTTTTGCGGTGGCGTACGAGC TGAGCACCGACTATCGTTTCCTGACCAACCTGTTTGATGCGATT AAAGCGGGTCAGTTTGGTCCGCTGAACCCGAACCGTAAATACG CGACCGGTATTAGCAGCGGTGGCTATAACACCAGCCGTATGGC TGTGAGCTTCCCGGGCGAATTTTCGTGCGCTGGCGATTTCAGAGCG GTAGCTACGCGACCTGCAGCGGTCCGCTGTGCATTGTTCCGGAA ACCCTGCCGGCGAACCAACCCGCCGACCCGTGTTCTGCACGGTTT TGTGGACGTGGTGGTTCCGTGGTGGACCATGGACCGTTACTATG ATCGTCTGAAAGATCAAGGTATTGAGACCGAACTGTATACCGA ACCGCTGGCGGGCCATGAGTGGTTTGCGGCGAGCCCGGAAAAA ATTCTGAACTGGTTTAACCAGCACCCGCTCGAG	773
PfPHOaza-39	CCATGGCGAGCCGTTGCACCGAAACCCCGAAAACCGGCCTGCT GCCGGCGACCATTAGCTGCAGCTACCAGACCACCTGGATTGAC AGCGGTGTGGTTGGCCAGCGTAAGGTGACCTATCAAGTGCCGC AGGGTACCCCGCCGGCGGGTGGCTGGCCGGTGGTTCTGATCTAC CAGGGCAGCTTCTTTCCGGTGAACGATTTTCAGCTATAGCAGCAA CATGCCGTTTGGTGGCTACTATGAAGGTAAACTGATTCAAAAAC TGCTGGACCACGGCTATGCGGTTATTGCGCCGAACGCGCCGGC GGACCTGTTCTGGCAGACCAACGTGCCGGGTTTTGCGCAAGCGT ACGAGCTGAGCACCGACTATCGTTTCCTGAGCAACGTGTTTGAT GCGATTAAAGCGGGTCAGTTTGGTCCGCTGAACCCGAACCGTC AATACGCGACCGGTATTAGCAGCGGTGGCTATAACACCAGCCG TATGGCTGTGAGCTTCCCGGGCGAATTTTCGTGCGCTGGCGATT AGAGCGGTAGCTACGCGACCTGCAGCGGTCCGCTGTGCGTGGT TCCGGAAACCTGCCGGCGGATCACCCGCCGACCCGTGTTCTGTC	779

	ACGGTTTTGTGGACGCGGTGGTTCCGTGGTGGACCATGGACCGT TACTATGATCGTCTGCTGGATCAAGGTATTGAGACCGCGCTGTA TACCGAACCGCTGGGTGGCCATGAGTGGTTTGCGGCGAGCCCG GATAAAATTCTGGCGTGGTTTAACCAGCACCCGCTCGAG	
PfPHOaza-40	CCATGGCGAGCCGTTGCACCGAAACCCGAAAACCCCTGCTGCT GCCGGCGAAAGTGAGCTGCAGCTACCAGACCACCTGGATTGAC AGCGGTGTGGTTGGCCAGCGTAAGGTGACCTATCAACTGCCGCT GGGTACCCCGCCGGCGGGTGGCTGGCCGGTGGTTCTGATCTACC AGGGCAGCTTCTTTCCGCTGAACGATTTACAGCTATCACAGCAAC ATGCCGTTTGGTGGCTACTATGAAGGTAAACTGATTCAAACCCCT GCTGGACCACGGCTATGCGGTTATTGCGCCGAGCGCGCCGGCG GACCTGTTCTGGCAGACCAACGTGCCGGGTCTGGCGCAAGCGT ACGAGCTGAGCACCGACTATGATTTCCCTGAGCAACGTGTTTGAT GCGATTGCGGCGGGTCAGTTTGGTCCGCTGAACCCGCAGCGTCA ATACGCGACCGGTATTAGCAGCGGTGGCTATAACACCAGCCGT ATGGCTGTGAGCTTCCCGGGCGAATTTTCGTGCGCTGGCGATTCA GAGCGGTAGCTACGCGACCTGCAGCGGTCCGCTGTGCGTGGTTC CGGAAAGCCTGCCGGCGGATCACCCGCCGACCCTGTTCCCTGCAC GGTTTTGTGGACGCGGTGGTTCCGTGGTGGACCATGGACCTGTA CTATGATCGTCTGCTGGATCAAGGTATTGAGACCGCGCTGTATA CCGAACCGCTGGGTGGCCATGAGTGGTTTGCGGCGAGCCCGGG TAAAAATTCTGGCGTGGTTTAACGCGCACCCGCTCGAG	779
PfPHOaza-41	CCATGGCGAGCCGTTGCAGCGAACGTCCGAAAACCCCTGCTGCT GCCGGCGAAAGTGAGCTGCAGCTACCAGAGCACCTGGATTGAC AGCGGTGTGGTTGGCCAGCGTAAGGTGATTTATCAAACCCCGCT GGGTACCCCGCCGGCGGGTGGCTGGCCGGTGGTTCTGATCTACC AGGGCAGCTTCTTTCCGCTGAACGATTTACCTATTATAGCAAC ATGCCGTTTGGTGGCTACTATGAAGGTAAACTGATTCAAACCCCT GCTGGACCACGGCTATGCGGTTATTGCGCCGAGCGCGCCGGCG GACCTGTTCTGGCAGACCAACATTCCGGGTCTGGCGCAAGCGTA CGAGCTGAGCACCGACTATGATTTCCCTGGGTAACGTGCTGGCGG CGATTGCGGCGGGTCACTTTGGTCCGCTGAACGCGCAGCGTCAA TACGCGACCGGTATTAGCAGCGGTGGCTATAACACCAGCCGTA TGGCTGTGAGCTTCCCGGGCAAGTTTCGTGCGCTGGCGATTGAG AGCGGTAGCTACGCGACCTGCAGCGGTCCGCTGTGCGTGGTTCC GGAAAGCCTGCCGGCGGATCACCCGCCGACCCTGTTCCCTGCAC GGTTTTGTGGACGCGGTGGTTCCGTGGTGGAGCATGGACCTGTA CTATGATCGTCTGCTGCACCAAGGTATTGAGACCGCGCGTTATA CCGAACCGCTGGGTGGCCATGAGTGGTTTGCGGCGAGCCCGGG TAAAAATTCTGGCGTGGTTTAACGCGCACCCGCTCGAG	779
LCC ^{ICCG}	AGCAACCCGTACCAGCGTGGTCCGAACCCGACCCGTAGCGCGC TGACCGCGGATGGTCCGTTACGCGTGGCGACCTATACCGTTAGC CGTCTGAGCGTGAGCGGCTTTGGTGGCGGTGTTATCTACTATCC GACCGGTACCAGCCTGACCTTCGGCGGTATTGCGATGAGCCCG GGTTACACCGCGGATGCGAGCAGCCTGGCGTGGCTGGGCCGTC GTCTGGCGAGCCACGGTTTCGTGGTTCTGGTGATCAACACCAAC AGCCGTTTGTACGGTCCGGATAGCCGTGCGAGCCAGCTGAGCG CGGCGCTGAACTATCTGCGTACCAGCAGCCGAGCGCGGTTCTGT GCGCGTCTGGATGCGAACCGTCTGGCGGTTGCGGGTCACAGCA TGGGCGGTGGCGGTACCCTGCGTATTGCGGAGCAAAACCCGAG CCTGAAAGCGGCGGTTCCGCTGACCCCGTGGCACACCGACAAA ACCTTTAACACCAAGCGTGCCGGTTCTGATTGTGGGTGCGGAGGC GGATACCGTGGCGCCGGTTAGCCAGCACGCGATTCCGTTCTACC AAAACCTGCCGAGCACACCCCGAAGGTGTATGTTGAACTGTG CAACGCGAGCCACATCGCGCCGAACAGCAACAACGCGGCGATC AGCGTTTACACCATAGCTGGATGAACTGTGGGTGGACAACG ATACCCGTTATCGTCAGTTCCCTGTGCAACGTTAACGACCCGGCG CTGTGCGATTTTCGTACCAACAACCGTCACTGCCAA	774

Savinaza	CATATGGCTCAAAGTGTACCCTGGGGAATATCAAGGGTGCAAG CGCCAGCAGCGCACAAACCGTGGCTTGACCGGTAGCGGCGTAAA AGTTGCGGTCTTGACACCGGTATTAGCACCCACCCGGATCTGA ACATTCGTGGTGGTGGAGCTTTGTTCCGGGTGAACCGAGCACC CAGGATGGTAATGGTCATGGTACGCACGTGGCGGGTACGATTG CGGCTCTGAACAACTCCATCGGCGTTTTAGGCGTGGCCCCTTCT GCGGAACTGTATGCTGTGAAGGTGCTGGGTGCGAGCGGTTCCG GTAGCGTTTCCAGTATCGCCCAGGGTTTGGAGTGGGCAGGGAA CAACGGC ATGCACGTGGCGAACCTGAGCCTGGGTTCCCCGAGCCCGTCTGC AACTCTGGAGCAGGCGGTTAATTCCGCTACTTCTAGAGGCGTCT TGGTTGTTGCGGCGAGCGGCAACAGCGGCGCTGGCAGCATCAG CTATCCGGCTCGTTATGCTAATGCGATGGCAGTTGGTGCCACCG ACCAGAATAACAACCGCGCATCGTTCAGCCAATACGGCGCGGG CTTGACATCGTGGCTCCGGGTGTGAACGTGCAAAGCACCTACC CGGGCTCTACGTACGCGTCCCTGAACGGCACCAGCATGGCAAC CCCGCATGTGGCGGGTGGCGCCGCGCTGGTTAAGCAGAAAAAT CCGTCTTGGTCAAATGTTCAAATTCGCAATCATCTGAAAAACAC CGCAACCTCGCTCGGCTCGACCAATCTTTACGGCAGCGGTCTCG TCAACGCTGAGGCAGCGACGCGTCTCGAG	819
CtPHBaza	GCGGTTCCGCTGGGCCAGTACAACATCGCGACCGACCAAATTA GCGTGAGCGGTCTGAGCAGCGGTGGCTTCATGGCGAACCGCT GGGCAACGCGTACAGCGCGAGCTTCATGGGTGTTGGCACCTTTG CGGCGGGTCCGTATATGTGCGCGGGTCTGAACAACTACACCGC GTGCATGTATAACGCGAGCATCAGCAGCGCGCAGCTGAACGCG ATGCAAAGCAGCATTGACAGCTACAGCAGCGCGGCGAGCATCG ATGCGAAGAGCCGTATTGCGGCGCAGAAAATCTACATTTTCACC GGCACCAGCGACTATACCGTGGGTCCGAACCTGACCGATGCGC TGCAGACCCAATACCTGAACAACGGTGTGCCGCAAGCGAACAT CGCGTATGTTAAACGTAGCGGTGCGGCGCATGTGCTGCCGACC GACTTTGATAGCAGCGGTAACAACGCGTGCAGCAGCAGCGCGA GCCCCGTACATTAGCAACTGCGGCTATGACGGTGCGAAAGCGGC GCTGACCCACTTCTACGGTGCGCTGAACCCGCGTAACGATGCGC CGGCGACCGGCAACTACATCGAGTTTAACCAGGCGAGCTATAC CAACGCGAACCCGATGGCGAGCACCGGTTGGCTGTATGTTCCG CAGAGCTGCGCGAGCGGTACCCAATGCCGTCTGCACGTGGTTCT GCACGGCTGCCAGCAAAGCACCGACAAGATTGGCGATAAATTC GTGCGTAACACCGGTTTTAGCCGTTGGGCGGACACCAACAACA TCATTGTGCTGTACCCGCGAGACCCAAGTTGATAACAACAACCGT AGCACCAGCAAAAAGCGGTAGCCTGGCGAACCCGAACGCGTGCT GGGACTGGATCGGCTGGTATGGTAACAACCTTCGCGCAGAAGAG CGGTGTTCAAATGACCGCGATTAAAGCGATGATCGATCGTATTG CGAGCGGTGCGGGTAGCGGTACCGGTGGCGGTAAACGGCGGTGG CAACCCGACCCAACCGGCGCTGGCGGCGCCGACCGGTCTGGGT GCGAGCGCGGCGACCAAGCAGCATGCAACTGGACTGGGCGC CGGTTACCAAGCGCGGAGCTACAACGTGTATCGTAACGGTAA CAAAGCGAACGCGCTGCCGTTAGCGCGACCAAGCTACGTTGAT GCGGCGCTGAGCCCGGCGACCAACTATAGCTGGACCGTGCGTG CGGTTGATGGTAACGGTGCGGAAAGCGCGGATAGCGCGGCGGT TAGCGCGAGCACCTGACCGGTAGCAACCCGGCGGGTACCTGC ACCACCGCGAGCAACTACGCGCACGTGCAGGCGAACCGTGCGT ATCAGCAAGGTGGCTACGCGTATGCGACCGCGAGCGGTCAGAA CATGGGTCTGTGGAACGTGTTCTACACCACCACCCTGAAGCAAA CCGGCAGCAACTACTATGTGATCGGTACCTGCCCCG	1461

Tabela 3. Nazivi korišćenih prajmera i njihove sekvence

Gen	Sekvenca
PfPHOaza_ampl_F: (5'-3')	TAATACCATGGCGAGCCGTTGCAG
PfPHOaza_ampl_R (5'-3')	TAATTCTCGAGCGGGTGCGCGTTA
Savinaza_pBE-S_F (5'-3')	CGCTCCATATGGCTCAAAGTGTACCCTGGG
Savinaza_pBE-S_R (5'-3')	ATCCTCGAGACGCGTCGCTG
Savinaza_fuzCtPHBaza_F (5'-3')	CGCTCCATATGGCTCAAAGTGTACCCTGGG
Savinaza_fuzCtPHBaza_R (5'-3')	TTATCAATAGTTATAATACGCGTCGCTGCCTCAG
Savinaza_fuzPfPHOaza_F (5'-3')	ATTATAACTATTGATAAAGCTCAAAGTGTACCCTGG
Savinaza_fuzPfPHOaza_R (5'-3')	ATCCTCGAGACGCGTCGCTG
PfPHOaza_fuzSav_F: (5'-3')	ATACATATGGCGAGCCGTTGCAGC
PfPHOaza_fuzSav_R (5'-3')	TTTATCAATAGTTATAATGCCACCAAACGGCAGGTT
CtPHBaza_fuzSav_F: (5'-3')	ATTATAACTATTGATAAATACGTTGATGCGGCGCTG
CtPHBaza_fuzSav_R (5'-3')	AATCTCGAGCGGGCAGGTACCGATCA

4.1.3 Enzimi

U eksperimentalnom radu korišćeni su komercijalni enzimi različitog porekla. Preparati imobilisane Savinaze 12 T i Alkalaze 2.4 L FG dobijene su od kompanije Novozymes (Kopenhagen, Danska) sa aktivnošću od 12 KNPU/g i 2,4 AU-A/g prema specifikacijama proizvođača. Proteinaza K sa aktivnošću od minimum 8 DMC-U/mg poručena je od kompanije Serva (Hajdelberg, Nemačka). Preparat lipaze B iz *Candida antarctica* (CALB), Lipozyme, sa aktivnošću 5000 LU/g poručen je od kompanije Novozymes (Kopenhagen, Danska). Imobilisana lipaza iz *Rhizomucor miehei* na nosaču Immobead 150 sa aktivnošću ≥ 300 U/g, kao i imobilisana lipaza iz *Pseudomonas cepacia* na nosaču Immobead 150 sa aktivnošću ≥ 900 U/g, poručene su od kompanije Merck (Minhen, Nemačka). Lipaza poreklom iz mlečne industrije od proizvođača Serowar PL (Ščećin, Poljska) dobijena je od dr Maciej Guzik sa Jerzy Haber instituta za katalizu i površinsku hemiju Poljske akademije nauka.

Za potrebe kloniranja korišćeni su restrikcioni enzimi NcoI i XhoI. Enzim NcoI (100000 U/mL) poručen je od kompanije New England Biolabs (Masačusets, SAD), dok je enzim XhoI (100000 U/mL) poručen od kompanije Thermo Fisher Scientific (Masačusets, SAD).

4.1.4 Polimeri i PHO model jedinjenja (pNP-monomer i pNP-dimer)

PHO, poli(3-hidroksioktanoat-ko-3-hidroksidekanoatom) (mol% 49:51) (PHO-PHD) i mešavina mcl-PHA C6:C8:C10:C12 (mol% 6:38:41:15) (mcl-PHA) su dobijeni iz kompanije Bioplastech (Dublin, Irska), dok je poli(3-hidroksiheptanoat-ko-3-hidroksinonanoatom) (mol% 30:70) (PHH-PHN) dobijen od dr Maciej Guzik sa Jerzy Haber instituta za katalizu i površinsku hemiju Poljske akademije nauka. PHB je kupljen od Biomera (Švalbah, Nemačka), a PCL od Merck (Minhen, Nemačka). PLA Ingeo 4043D iz NatureWorks (Mineapolis, SAD) korišćen je za pripremu filmova (a-Film) debljine 0,35 mm. hc-Film debljine 1 mm nabavljen je iz Pardam (Roudnice, Češka). Ekstrudovan PLA filament (e-Filament) je pripremljen od PLA Ingeo 3052D iz NatureWorks (Mw = 116 kDa, PDI = 1,83). Različiti delovi PLA čaše za jednokratnu upotrebu isečeni su u filmove dimenzija 1 cm x 1 cm za testiranje i ovi uzorci su označeni kao b-Čaša (donji deo) i l-Čaša (poklopac). Spisak komercijalnih PLA uzoraka i dobavljača je prikazan u Tabeli 4.

Tabela 4. Spisak korišćenih komercijalnih PLA uzoraka

Uzorak	Dobavljač
Slamčica	KingPack (https://kingpack.co.za)
3DP-Filament 1	3D republika (https://3drepublika.com/)
3DP-Filament 2	3D republika (https://3drepublika.com/)
3DP-Filament 3	3D republika (https://3drepublika.com/)
e-Filament	NatureWorks (PLA Ingeo 3052D)
a-Film	NatureWorks (PLA Ingeo 4043D)
b-Čaša	JuiceFactory (https://www.juicefactory.at/)
l-Čaša	JuiceFactory (https://www.juicefactory.at/)
t-Čaša	CHIC.MIC (https://haendler.chicmic.de/)
Kašičica	BioTable (https://biotable.it/)
PLA prah	NatureWorks (PLA Ingeo 4043D)
hc-Film	Pardam nanotechnology (https://www.pardam.cz/)
Kesa	Lidl

PHO model jedinjenja, pNP-monomer i pNP-dimer, sintetisana su u našoj laboratoriji na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu, od strane dr Jelene Milovanović, u saradnji sa dr Veselinom Maslakom sa Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (157).

4.2. Biokatalitička razgradnja PHA

4.2.1 Rekombinantna ekspresija *PfPHOaze* i *LCC^{ICCG}*

pET-22b(+) konstrukti *PfPHOaze* i njenih mutanata su transformisani radi ekspresije u *Escherichia coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL, a varijanta LCC (F243I/D238C/S283C/Y127G) u BL21(DE3). Transformanti su selektovani na Luria-Bertani agarnim (LA) pločama sa 100 µg/mL ampicilina (Amp₁₀₀) i 50 µg/mL hloramfenikola (Cam₅₀), a selektovane pojedinačne kolonije su dalje gajene tokom 16 h u Luria-Bertani (LB) tečnoj podlozi sa Amp₁₀₀ i Cam₅₀ za soj RIPL, odnosno samo Amp₁₀₀ za soj BL21(DE3).

Ekspresija za prečišćavanje *PfPHOaze* i njenih mutanata postignuta je na skali od 3 L u fermentoru (Bio4, EDF-5.4_1, Biotehniskais centrs AS, Riga, Letonija) inokulacijom 1 % (v/v) RIPL kulture u Terrific broth (TB) tečnu podlogu sa Amp₁₀₀ i Cam₅₀. Uslovi gajenja su bili 37 °C, pH 7,0, i brzina mešanja 400 rpm, sa približnim protokom vazduha od 0,55 vvm. Ekspresija heterolognog enzima je indukovana 1 mM izopropil β-D-1-tiogalaktopiranozidom (IPTG) nakon što je optička gustina (*engl.* optical density, OD) merena na 600 nm dostigla 0,5 i trajala je tokom narednih 5 sati. Ekspresija LCC^{ICCG} u soju BL21(DE3) izvedena je pri identičnim uslovima, ali na skali od 50 mL u flasku, 180 rpm. Tokom optimizacije rekombinantne ekspresije varirani su ekspresioni sojevi *E. coli*, korišćene podloge za indukciju, temperatura i vreme trajanja indukcije. U Tabeli 5 prikazan je sastav korišćenih mikrobioloških podloga.

Tabela 5. Sastav korišćenih mikrobioloških podloga

Komponenta	LA	LB	TB
Ekstrakt kvasca	5 g	5 g	24 g
Trypton	10 g	10 g	12 g
NaCl	10 g	10 g	-
Agar	15 g	-	-
Glicerol	-	-	4 mL (dodato nakon autoklaviranja)
K ₂ HPO ₄	-	-	1,25 g (dodato nakon autoklaviranja)
KH ₂ PO ₄	-	-	0,23 g (dodato nakon autoklaviranja)
Dejonizovana voda do	1 L	1 L	1 L

4.2.2 Prečišćavanje PfPHOaze

Pošto je PfPHOaza obeležena His-tagom, za prečišćavanje je izabrana imobilisana metal afinitetna hromatografija (*engl.* immobilized metal affinity chromatography, IMAC) na Ni-NTA (*engl.* Ni-nitrilotriacetic acid) koloni. Nakon rekombinantne produkcije enzima, ćelije su oborene centrifugiranjem na 5000 rpm, 4 °C tokom 20 min (Eppendorf centrifuga 5804, Hamburg, Nemačka). Nakon resuspendovanja u 50 mM fosfatnom puferu (pH 8,0) ćelije su lizirane na 4 °C korišćenjem Francuske prese na 10000 psi za PfPHOazu i ultrazvukom na 20 KHz sa 3x15 s pulsa (Soniprep 150, MSE Ltd., London, UK) za LCC^{ICCG}. Lizati su centrifugirani na 12000 rpm, 4 °C tokom 15 min kako bi se uklonili ćelijski ostaci, a dobijeni supernatant je dalje korišćen kao ukupan ćelijski ekstrakt (*engl.* cell-free extract, CFE). Natrijum-hlorid i imidazol su dodati u CFE do konačnih koncentracija od 300 mM i 5 mM, a pH je podešen na 8,0 (Tabela 6). Kolona je ekvilibrisana puferom za vezivanje (50 mM fosfatni pufer (pH 8,0), 300 mM natrijum-hlorid i 5 mM imidazol) pre inkubacije sa CFE na 4 °C u trajanju od 1 h. Za batch prečišćavanje, kolona je oprana sa ukupno 20 zapremina kolone (*engl.* column volume, CV) u 4 frakcije za svaki korak pranja. Kolona je od ostatka rastvora odvojen centrifugacijom na 2000 rpm tokom 5 min. Za hromatografsko prečišćavanje (CV 5 mL) korišćeno je 10 CV tokom ispiranja puferom za vezivanje i 5 CV za sve naredne korake elucije pri brzini protoka od 1 mL/min. Elucija rastućom koncentracijom imidazola je izvedena sa elucionim puferima 1 i 2 sa 50 mM i 100 mM imidazola. Sakupljane su frakcije od 0,5 mL. Čistoća frakcija je proverena tehnikom natrijum-dodecilsulfat poliakrilamidne gel elektroforeze (SDS-PAGE) sa 12,5 % (w/v) poliakrilamidnim gelom za razdvajanje (Tabela 7, 8, 9, 10). Čiste frakcije su spojene i dijalizovane naspram 50 mM fosfatnog pufera (pH 8,0) tokom 16 sati, 4 °C. Dijaliza pod istim uslovima je izvedena i između "batch" i hromatografskog prečišćavanja obe PfPHOaze. U zavisnosti od uslova ekspresije, dobijeni proteinski preparati nakon prečišćavanja na IMAC razlikovali su se u stepenu čistoće, te je za postizanje odgovarajuće čistoće bilo potrebno prečišćavanje proteina gel filtracijom na koloni Superdex 75 10/300 GL (Cytiva, Masačusets, SAD), prethodno ekvilibrisanoj 20 mM HEPES puferom (pH 7,5) koji je sadržao 100 mM KCl i 5 mM EDTA. Razdvajanje proteina zasnovano je na njihovoj molekulskoj masi pri protoku od 0,8 mL/min. Koncentracija proteina određena je standardnim testom sa bicinoninskom kiselinom (BCA).

Tabela 6. Sastav pufera korišćenih za prečišćavanje na IMAC koloni

Komponenta	Pufer za vezivanje	Elucioni pufer 1	Elucioni pufer 2
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	3,45 g	3,45 g	3,45 g
Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	9 g	9 g	9 g
NaCl	17,4 g	17,4 g	17,4 g
Imidazol	-	3,4 g	6,8 g
Dejonizovana voda do	1 L	1 L	1 L

Tabela 7. Sastav pufera za elektroforezu

Komponenta	10 x Pufer za elektroforezu	1M Tris-HCl pH 6,8 + 0,4% SDS	1M Tris-HCl pH 8,8 + 0,4% SDS
Tris	30,275 g	121 g	121 g
SDS	10 g	4 g	4 g
Glicin	144 g	-	-
Dejonizovana voda do	1 L	1 L	1 L

Tabela 8. Sastav gela za SDS-PAGE

Komponenta	4,5 % koncentrujući gel	12,5 % razdvajajući gel
30 % rastvor akrilamida/bis-akrilamida (29:1)	0,3 mL	2,5 mL
1 M Tris-HCl pH 6,8 + 0,4% SDS	0,5 mL	-
1 M Tris-HCl pH 8,8 + 0,4% SDS	-	1,5 mL
Dejonizovana voda	1,2 mL	2 mL
TEMED	2 µL	5 µL
10% APS	10 µL	30 µL

Tabela 9. Sastav 4 x pufer za uzorke (PUZ)

Komponenta	Količina
Tris pH 6,8	0,315 g
SDS	0,8 g
Glicerol	4 g
DTT	0,309 g
Brom-fenol plavo	40 mg
Dejonizovana voda do	10 mL

Tabela 10. Sastav boje za SDS-PAGE

Komponenta	Količina
CBB	0,125 g
Metanol	225 mL
Sirćetna kiselina	50 mL
Dejonizovana voda do	500 mL

4.2.3 Difuzioni test za praćenje poliesterazne aktivnosti PfPHOaze i drugih esteraza na biopolimerima

Razgradnja biopoliestara je testirana difuzionim esejem. Praćeno je nastajanje zone prosvetljenja na ploči sa suspendovanim polimerima: PHO, poli(3-hidroksioktanoat-ko-3-hidroksidekanoatom) (mol% 49:51) (PHO-PHD), poli(3-hidroksiheptanoat-ko-3-hidroksinonanoatom) (mol% 30:70) (PHH-PHN), mešavinom mcl-PHA C6:C8:C10:C12 (mol% 6:38:41:15) (mcl-PHA), PHB, PCL i PLA.

Finalna suspenzija biopoliestra u agarozu pripremljena je u 0,2 % (w/v) koncentraciji polimera, osim za PLA za koji je pripremljena koncentracija od 0,05 % (w/v). Polimeri su rastvoreni u odgovarajućem organskom rastvaraču do konačne koncentracije od 16 g/L i potom suspendovani u vodi. Suspenzija polimera je korišćena za dalje razblaživanje agaroze u natrijum-fosfatnom puferu (pH 8,0) do konačnih koncentracija od 1 % (w/v) agaroze i 50 mM pufera. Mcl-PHA i PCL su rastvoreni u acetonu. PCL je inkubiran na 50 °C do potpunog rastvaranja. Rastvor polimera u acetonu dodavan je kap po kap u zapreminu vode koja odgovara polovini konačne zapremine uz konstantno mešanje. Suspenzija mcl-PHA i PCL u vodi dobijena je uklanjanjem acetona pomoću vakuum uparivača. Suspenzija finog PHB praha u vodi je dobijena mešanjem tokom 4 h. PLA je rastvoren u hlorofomu, a hloroformski rastvor je dodat u zapreminu vode koja odgovara polovini konačne zapremine i sonifikovan pomoću ultrazvučne sonde Soniprep 150 (MSE Ltd., UK) na 20 kHz sa 3 impulsa od po 60 s. Hloroform je ispario inkubacijom dobijene emulzije na 90 °C tokom 20 min. Na kraju, suspenzije polimera su pomešane sa jednakom zapreminom 2 % (w/v) agaroze u 100 mM natrijum-fosfatnom puferu pH 8,0. Za testiranje enzimске aktivnosti, u polimernim pločama su napravljene rupe prečnika 6 mm u koje je dodato 50 µL rastvora enzima. Agarozne ploče su inkubirane na 37 °C tokom 24 h.

4.2.4 Spektrofotometrijski test esterazne aktivnosti sa hromogenim PHO monomerom i dimerom

Stok rastvori (100 mM) pNP-dimera, pNP-monomera i pNPO pripremljeni su u acetonitrilu i čuvani su na -20 °C. Iz stok rastvora je neposredno pre enzimskog esejja pripreman 0,3 mM rastvor supstrata u 50 mM fosfatnom puferu pH 8,0 sa 0,17 g/L SDS i 10 g/L Triton X-100. Reakcija je inicirana dodavanjem 25 µL rastvora enzima u 100 µL rastvora supstrata. Kontrola spontane hidrolize supstrata je uključivala 50 mM fosfatni pufer umesto rastvora enzima. Oslobođanje *p*-nitrofenola (pNP) praćeno je kontinualno na 405 nm tokom 10 min do 1 h u zavisnosti od enzimske aktivnosti na 40 °C koristeći Tecan Infinite 200 Microplate čitač (Tecan Group Ltd., Švajcarska). Koncentracija oslobođenog pNP je izračunata korišćenjem molarnog koeficijenta apsorpcije $\epsilon=18000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (12).

4.2.5 Primena pNP-dimera za brzu detekciju PfPHOaze tokom prečišćavanja

Aktivnost PfPHOaze tokom prečišćavanja koristeći IMAC praćena je opisanim metodama difuzionog testa sa PHO i spektrofotometrijski sa pNP-dimerom na pH 8,0. Testirano je 25 µL svake frakcije na 0,05 % (w/v) PHO na 37 °C tokom 16 h inkubacije, i sa 100 µL 0,3 mM pNP-dimera na 40 °C tokom 20 min.

4.2.6 Primena pNP-dimera za određivanje stabilnosti PfPHOaze

Rastvor enzima inkubiran je na 50 °C, 52 °C, 54 °C, 60 °C i 65 °C tokom 30 min, nakon čega su uzorci čuvani na ledu do merenja. Takođe, rastvor enzima je inkubiran 2 h sa dodatkom Tritona-X-100 ili Tween 20 u opsegu koncentracija 0,1-1 % (v/v) na 25 °C. Rezidualna aktivnost PfPHOaze testirana je dodatkom 20 µL uzorka enzima u 100 µL 0,3 mM pNP-dimera na 40 °C, pH 8,0. Paralelno, PHO degradujuća aktivnost iste količine enzima je testirana difuzionim esejem sa 0,05 % (w/v) PHO na pH 8,0 sa inkubacijom na 37 °C u toku 16 h.

4.2.7 Modifikacija aktivnosti i stabilnosti PfPHOaze proteinskim inženjeringom

Dirigovana evolucija

Za potrebe dirigovane evolucije, mutacije su nasumično uvedene u sekvencu gena PfPHOaze pomoću GeneMorph II Random Mutagenesis Kit-a. Kodonski optimizovan gen za PfPHOazu ukloniran u pET-22b(+) pomoću NcoI i XhoI restrikcionih enzima je umnožen pod mutagenim uslovima lančane reakcije polimeraze (*engl.* polymerase chain reaction, PCR) pomoću para specifičnih prajmera. Prema priručniku za korišćen kit promena od 1-4 aminokiseline odgovara promeni 2-7 nukleotida u sekvenci gena i postiže se umnožavanjem gena (2 ng/µL reakcije) tokom 30 ciklusa. U Tabeli 11 je prikazan sastav PCR smeše (epM1 dalje u tekstu), a u Tabeli 12 korišćeni PCR program. Korišćeni su PfPHOaza_ ampl_F i PfPHOaza_ ampl_R prajmeri čije sekvence su navedene u Tabeli 3.

Tabela 11. Sastav PCR smeše za nasumičnu mutagenezu gena za PfPHOazu (epM1)

Komponenta (koncentracija)	Zapremina na 25 μ L reakcije (Cfin)
dH ₂ O	19,3 μ L
10x Mutazyme II pufer	2,5 μ L
40 mM smeša dNTP	0,5 μ L (200 μ M svakog)
Forward prajmer (10 μ M)	0,85 μ L (2,5 ng/ μ L)
Reverse prajmer (10 μ M)	0,85 μ L (2,5 ng/ μ L)
Templatna DNK	0,5 μ L (2 ng/ μ L)
Mutazyme II DNK polimeraza (2,5 U/ μ L)	0,5 μ L (0,05 U/ μ L)

Tabela 12. PCR program za nasumičnu mutagenezu gena za PfPHOazu

Segment	Broj ciklusa	Temperatura	Vreme
1. Inicijalna denaturacija	1	95 °C	2 min
2. Amplifikacija (denaturacija, annealing, elongacija)	30	95 °C 51 °C 72 °C	30 s 30 s 1 minut
3. Finalna elongacija	1	72 °C	10 min

Prvobitan skrining epM1 na agarnoj ploči sa PHO nije dao nijednu aktivnu koloniju, na osnovu čega je pretpostavljeno da je stopa mutacija previsoka. Zbog toga su, sa identičnim protokolom kreirane dodatne dve mutagene biblioteke sa nižim stopama mutacija dodatkom veće količine gena finalne koncentracije 15 ng/ μ L (M3) i 10 ng/ μ L (M4). Cela zapremina svake PCR reakcije naneta je na agarozni gel radi pročišćavanja. PCR proizvodi sa odgovarajućom masom (779 bp) su izolovani iz gela pomoću GeneJET Gel Extraction Kit-a. Dobijene varijante gena za PfPHOazu su klonirane u pET-22b(+) vektor putem MEGAWHOP (*engl.* megaprimer PCR of whole plasmids) metode kloniranja koristeći QuickChange Lightning Site-directed Mutagenesis Kit. U Tabeli 13 je prikazan sastav PCR smeše, a u Tabeli 14 korišćeni PCR program.

Tabela 13. Sastav PCR smeše za MEGAWHOP kloniranje gena za PfPHO depolimerazu

Komponenta (koncentracija)	Zapremina na 25 μ L reakcije (Cfin)
dH ₂ O	18,8 μ L
10x Mutazyme II pufer	2,5 μ L
40 mM smeša dNTP	0,5 μ L (200 μ M svakog)
Prajmer: epM1 (33,28 ng/ μ L)	0,85 μ L (2,6 ng/ μ L)
Templatna DNK	0,5 μ L (3,2 ng/ μ L)
PfuUltra HF DNK polimeraza (2,5 U/ μ L)	0,5 μ L (0,05 U/ μ L)

Tabela 14. PCR program za MEGAWHOP kloniranje gena za PfPHOazu

Segment	Broj ciklusa	Temperatura	Vreme
1. Inicijalna denaturacija	1	98 °C	2 min
2. Amplifikacija (denaturacija, annealing, elongacija)	35	98 °C 55 °C 68 °C	30 s 30 s 4 min
3. Finalna elongacija	1	68 °C	10 min

Po završetku PCR reakcije templatna DNK koja nosi wild-type varijantu gena za PfPHOazu uklonjena je digestijom pomoću DpnI endonukleaze koja specifično digestuje metilovanu DNK. Transformacijom ultrakompetentnih ćelija *E. coli* XL-10-Gold metodom toplotnog šoka novosintetisanim plazmidima sa mutantima gena za PfPHOazu omogućena je *in vivo* cirkularizacija plazmida i njihovo umnožavanje. Kreirana mutantna biblioteka izolovana je iz XL-10-Gold ćelija gajenih preko noći u LB podlozi sa Amp₁₀₀ pomoću GeneJET Plasmid Miniprep Kit. Ultrakompetentne *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL ćelije su dalje transformisane radi funkcionalne ekspresije mutantne biblioteke PfPHOaze. Dobijene pojedinačne kolonije na LA pločama sa dodatkom Amp₁₀₀ i Cam₅₀ radi propagacije plazmida korišćene su za ispitivanje aktivnosti celih ćelija.

U prvom koraku funkcionalne pretrage mutantne biblioteke PfPHOaze, pojedinačne kolonije su gajene na agaroznoj ploči sa inkorporiranim PHO radi detekcije aktivnih varijanti enzima. Aktivne kolonije M3 i M4 mutantne biblioteke su sekvencirane. Dobijene genske sekvence su upoređene pomoću ClustalW softvera i identifikovane mutacije su translirane na proteinski nivo. Potom su ćelije sa potvrđenim mutacijama enzima testirane na razgradnju PHB-PHBV i PCL radi procene promene supstratne specifičnosti.

4.3. Biokatalitička razgradnja PLA

4.3.1 Priprema i karakterizacija PLA uzoraka

U Tabeli 15 opisane su dimenzije, početne mase i dobavljači svih testiranih uzoraka PLA. PLA Ingeo 4043D iz NatureWorks (Mineapolis, SAD) korišćen je za pripremu filmova (a-Film) debljine 0,35 mm. hc-Film debljine 1 mm nabavljen je iz Pardam-a (Roudnice, Češka). Ekstrudovan PLA filament (e-Filament) je pripremljen od PLA Ingeo 3052D iz NatureWorks ($M_w = 116$ kDa, PDI = 1,83). Različiti delovi PLA čaše za jednokratnu upotrebu isečeni su u filmove dimenzija 1 cm x 1 cm za testiranje i ovi uzorci su označeni kao b-Čaša (donji deo) i l-Čaša (poklopac). PLA poreklom iz čaše za višekratnu upotrebu debljine 2,45 mm je označen kao t-Čaša. Tri tipa PLA filamenata za 3D štampanje fiksnog radijusa isečeni su na komade dužine 1 cm (3DP-Filament). PLA uzorci pre i posle degradacije analizirani su pomoću infracrvene spektroskopije sa Furijeovom transformacijom (FTIR), diferencijalno skenirajuće kalorimetrije (DSC) i skenirajuće elektronske mikroskopije (FESEM).

Tabela 15. Karakteristike PLA uzoraka korišćenih u eksperimentima

Uzorak	Dimenzije (dužina x visina)	Debljina (mm)	Početna masa (mg)
Slamčica	1 cm × 6 mm	0,16	33
3DP-Filament 1	1 cm × 2,85 mm	2,85	80
3DP-Filament 2	1 cm × 2,95 mm	2,95	82
3DP-Filament 3	1 cm × 1,75 mm	1,75	30
e-Filament	1 cm × 1,2 mm	1,2	11
a-Film	1 cm × 1 cm	0,35	52
b-Čaša	1 cm × 1 cm	0,2	27
l-Čaša	1 cm × 1 cm	0,18	25
t-Čaša	1 cm × 1 cm	2,45	134
Kašičica	1 cm × 1 cm	0,6	83
PLA prah	<500 μm^a		33
hc-Film	1 cm × 1 cm	1	141
Kesa	4 cm × 4 cm	0,01	23

^a Prosečna veličina čestica

4.3.2 Enzimska razgradnja PLA

Reakcije razgradnje PLA inicirane su dodavanjem 1 mL rastvora enzima u 4 mL pufera sa PLA uzorkom. Svaka reakcija je izvedena u duplikatu. Početna masa svakog PLA uzorka je prikazana u Tabeli 15. Kontrolni uzorci sa inaktiviranim enzimom i bez enzima su takođe uključeni. Reakcije su inkubirane na 42 °C i 220 rpm i uzimani su alikvoti od 1 mL uz dodatak 1 mL svežeg rastvora enzima svake nedelje. Uzeti alikvoti su čuvani na -20 °C do HPLC i LC-MS analize. Opisana metodologija primenjena je tokom 4 nedelje. Da bi se odredili optimalni uslovi depolimerizacije PLA od strane Savinaze, reakcije su inkubirane na 30 °C, 35 °C, 40 °C, 42 °C, 47 °C i 50 °C i pH vrednostima 5,5, 7,0, 8,5, 10,0 i 11,0. Puferi korišćeni za određivanje optimalnog pH su natrijum-acetat (pH 5,5), natrijum-fosfat (pH 7,0), tris(hidroksimetil)aminometan (Tris) (pH 8,5) i natrijum-bikarbonat (pH 10,0 i 11,0) u koncentraciji od 0,1 M. Za testiranje razgradnje PLA potrošačkog kvaliteta tokom dve nedelje korišćen je isti sistem

postavke reakcija, uz zamenu reakcionog medijuma na svaka dva dana, kako bi se obezbedila kontrola pH i održala konstantna koncentracija enzima. Na osnovu određene esterazne aktivnosti sa pNP-butiratom (pNPB), Savinaza je pokazala približno 10 puta veću specifičnu aktivnost po masi enzima u odnosu na Proteinazu K, te je za poređenje njihove efikasnosti korišćena deset puta manja količina Savinaze (0,1 % (w/w)) u odnosu na Proteinazu K (1 % (w/w)), sa ciljem izjednačenja početne enzimске aktivnosti. Kinetika razgradnje PLA pomoću Savinaze i Proteinaze K praćena je uzimanjem alikvota od 1 mL nakon 1,5 h, 3 h i 24 h. Zarad merenja gubitka mase PLA, svaki PLA uzorak je ispran vodom tri puta i 70 % (v/v) etanolom, nakon čega je ostavljen da se osuši na vazduhu do konstantne mase. Izmereni gubitak mase je izražen kao % od početne mase uzorka.

4.3.3 Određivanje monoesterazne aktivnosti Savinaze i Proteinaze K

Esterazna aktivnost Savinaze i Proteinaze K testirana je na 25 °C dodavanjem 25 µL rastvora enzima (0,1 mg/mL) u 100 µL 1 mM pNPB u 0,1 M Tris puferu pH 8,5. Kontrolne reakcije spontane hidrolize supstrata su sadržale pufer umesto rastvora enzima, a uključene su i kontrole sa inaktiviranim enzimima, prethodno inkubiranim na 80 °C tokom 30 min. Sva merenja su izvedena u triplikatu. Koncentracija pNP je izračunata korišćenjem molarnog koeficijenta apsorpcije $\epsilon = 18000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Jedinica esterazne aktivnosti (1 U) definisana je kao 1 µmol pNP oslobođen u minuti pod opisanim uslovima testiranja. Specifična esterazna aktivnost (U/mg) je određena za komercijalne preparate Savinaze i Proteinaze K.

4.3.4 HPLC i LC-MS analiza proizvoda nastalih enzimskom depolimerizacijom PLA

Alikvoti PLA hidrolizata uzeti tokom PLA razgradnje dejstvom Savinaze i Proteinaze K pripremljeni su za HPLC i LC-MS analize dodatkom 50 µL 6 M HCl po 1 mL uzorka, nakon čega je rastvor centrifugiran na 12000 rpm u trajanju od 10 min (Eppendorf Centrifuge 5417 R). Odvojeni supernatanti su profiltrirani kroz 0,2 µm filter. Koncentracija mlečne kiseline u uzorcima kvantifikovana je korišćenjem kalibracione prave: $y = 11,26x + 0,0506$, $R^2 = 0,9999$. Relativna zastupljenost svakog HPLC pika izračunata je kao procenat površine pojedinačnog pika prema ukupnoj površini svih pikova. Karakteristični m/z pikovi 161, 89 i 45, pripisani dimeru mlečne kiseline, detektovani su u enzimskim hidrolizatima MS analizom u negativnom režimu jonizacije. Drugi PLA oligomeri nisu detektovani pri opisanim uslovima.

4.3.5 Difuzioni test za praćenje poliesterazne aktivnosti Savinaze na biopolimerima

Aktivnost Savinaze testirana je na PLA, PHB, PHO i PCL biopoliestarskim supstratima koristeći difuzioni test u kom se prati nastajanje zone prosvetljenja na agaroznoj ploči. Agarozne ploče sa suspenzijom polimera su pripremljene kao što je ranije opisano u 0,1 M Tris puferu (pH 8,5). U bunariće u agaroznoj ploči dodato je 40 µL suspenzije Savinaze 12T (3,3 mg/mL) u 0,1 M Tris puferu (pH 8,5). Agarozne ploče su potom inkubirane na 42 °C i nastanak zone prosvetljenja na različitim polimerima je praćen tokom 10 dana.

4.3.6 Unapređenje adsorpcije Savinaze na površini PLA supstrata

Gen za Savinaze i SVD regioni gena CtPHB depolimeraze i PfPHOaze su umnoženi specifičnim prajmerima koji na svojim krajevima imaju preklapajuće sekvence. Sekvence gena i prajmera su navedene u Tabeli 2 i 3. Gen za Savinazu umnožen je u tri različite reakcije sa 3 seta prajmera: Savinaza_pBE-S_F i Savinaza_pBE-S_R; Savinaza_fuzCtPHBaza_F i Savinaza_fuzCtPHBaza_R; Savinaza_fuzPfPHOaza_F i Savinaza_fuzPfPHOaza_R. Paralelno SVD PHA-depolimeraza su

umnoženi za fuziju sa genom za Savinazu sledećim prajmerima: PfPHOaza_fuzSav_F i PfPHOaza_fuzSav_R za PfPHOazu, a CtPHBaza_fuzSav_F i CtPHBaza_fuzSav_R za CtPHBazu. Pomoću PCR konstruisanih preklapajućih regiona na krajevima gena omogućeno je spajanje gena korišćenjem NEBuilder® HiFi DNA Assembly Cloning Kit-a. Prajmerima specifičnim za oba kraja fuzionisanih gena su dodatno umnožene fuzionisane sekvence. Urađena je dvostruka digestija fuzionisanih gena i pBE-S vektora enzimima NdeI/XhoI, a potom je urađena ligacija inserata sa vektorom.

4.3.7 Porozni nosači za orijentisanu i reverzibilnu imobilizaciju Savinaze

Mešavine PHB/PHO u odnosu 80/20 i 70/30 (400 mg) su rastvorene u 10 mL hloroforma mešanjem na magnetnoj mešalici tokom 1 h. Rastvor PHA je u više inkremenata nanošen na kocku šećera (1 cm x 1 cm x 1 cm), rotiranjem kocke kako bi se svaki dodati sloj osušio pre dodavanja nove količine rastvora. Višak hloroforma je uklonjen sušenjem kocke preko noći u digestoru. Šećer je ispran vodom, ostavljajući pore u materijalu PHA.

Za potrebe ispitivanja fizičko-hemijskih karakteristika mešavina PHB i PHO pripremljeni su tanki filmovi identičnog sastava izlivanjem hloroformskog rastvora u staklenu Petrijevu šolju. Mešavine PHB/PHO su upoređivane sa čistim PHB i PHO. Poroznost uzoraka je analizirana pomoću SEM, hidrofobnost materijala je određena merenjem kontaktnog ugla sa vodom, a kristalnost analizom difrakcije X-zraka (XRD).

4.4. Bioinformatička i strukturna analiza proteina

Predviđena 3D struktura PfPHOaza preuzeta je sa AlphaFold servera i eksperimentalno određena 3D struktura Savinaze (158) pripremljene su za molekulski doking i simulacije molekulske dinamike korišćenjem AMBER ff19SB polja sila. Za parametrizaciju PHO model jedinjenja (pNP-monomer, pNP-dimer, monomer, dimer) i PLLA model jedinjenja (dimera i tetramera) kao ligandada primenjeno je GAFF2 polje sila. Molekulski doking je izveden korišćenjem programa AutoDock Vina. Simulacije molekulske dinamike su izvedene u trajanju od 200 ns i u tri nezavisna ponavljanja za svaki enzim-supstrat par korišćenjem AMBER softverskog paketa. Gibsova slobodna energija vezivanja izračunata je primenom MM/GBSA metode. Vizuelne reprezentacije dobijenih struktura kreirane su korišćenjem programa PyMOL. Višestruko poravnanje (*engl.* multiple sequence alignment, MSA) proteinskih sekvenci izvršeno je pomoću programa CLUSTALW.

Rekonstrukcija predačkih sekvenci sprovedena je korišćenjem veb servera FireProtASR (<https://loschmidt.chemi.muni.cz/fireprotasr/>), koji rekonstruiše predačke proteinske sekvence primenom filogenetske inferencije i rekonstrukcije sekvenci metodom maksimalne verovatnoće. Korišćena je sekvenca PfPHOaze (UniProt pristupni broj Q51718), nakon uklanjanja predviđenog signalnog peptida dužine od 21 amino kiseline. Za eksperimentalnu validaciju odabrano je sedam predačkih varijanti označenih kao 41, 40, 39, 38, 37, 36 i 33, čija evoluciona udaljenost raste u odnosu na polazni (wild type) enzim navedenim redom. Step en sekvencione sličnosti između rekonstruisanih predačkih varijanti i wild-type enzima procenjen je korišćenjem parnih BLAST poravnanja sekvenci.

4.5. Statistička analiza podataka

Svi eksperimenti su izvedeni u triplikatu ili duplikatu. Za dobijene podatke izračunate su srednje vrednosti (SV) i standardne devijacije (SD), a rezultati su grafički predstavljeni kao $SV \pm SD$ pomoću programa Microsoft Excel. Statistička analiza dobijenih vrednosti izvedena je u istom programu pomoću dodatka DataAnalysis, primenenom analize varijanse (ANOVA), sa Tukey HSD testom za poređenje svih uzoraka unutar serije i Dunnett testom za poređenje mutanata sa wild-type enzimom (159,160). Nivo statističke značajnosti izražen je p-vrednošću, pri čemu su razlike smatrane statistički značajnim za $p < 0,05$. Statistička značajnost prikazana je na graficima, a značenje korišćenih simbola navedeno je u legendi ispod svakog grafika.

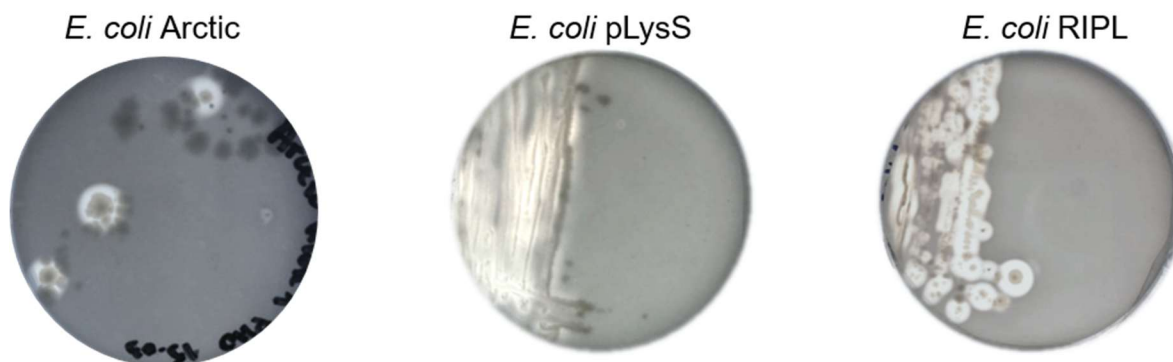
5. Rezultati i diskusija

5.1. Biokatalitička razgradnja PHA

Kao model enzim za unapređenje razgradnje mcl-PHA odabrana je PfPHOaza, prva i najbolje okarakterisana mcl-PHA-depolimeraza. Međutim, za razliku od PHB-depolimeraza, istraživanja koja se bave identifikacijom funkcionalno značajnih aminokiselinskih ostataka i proteinskim inženjerstvom mcl-PHA-depolimeraza i dalje su veoma ograničena.

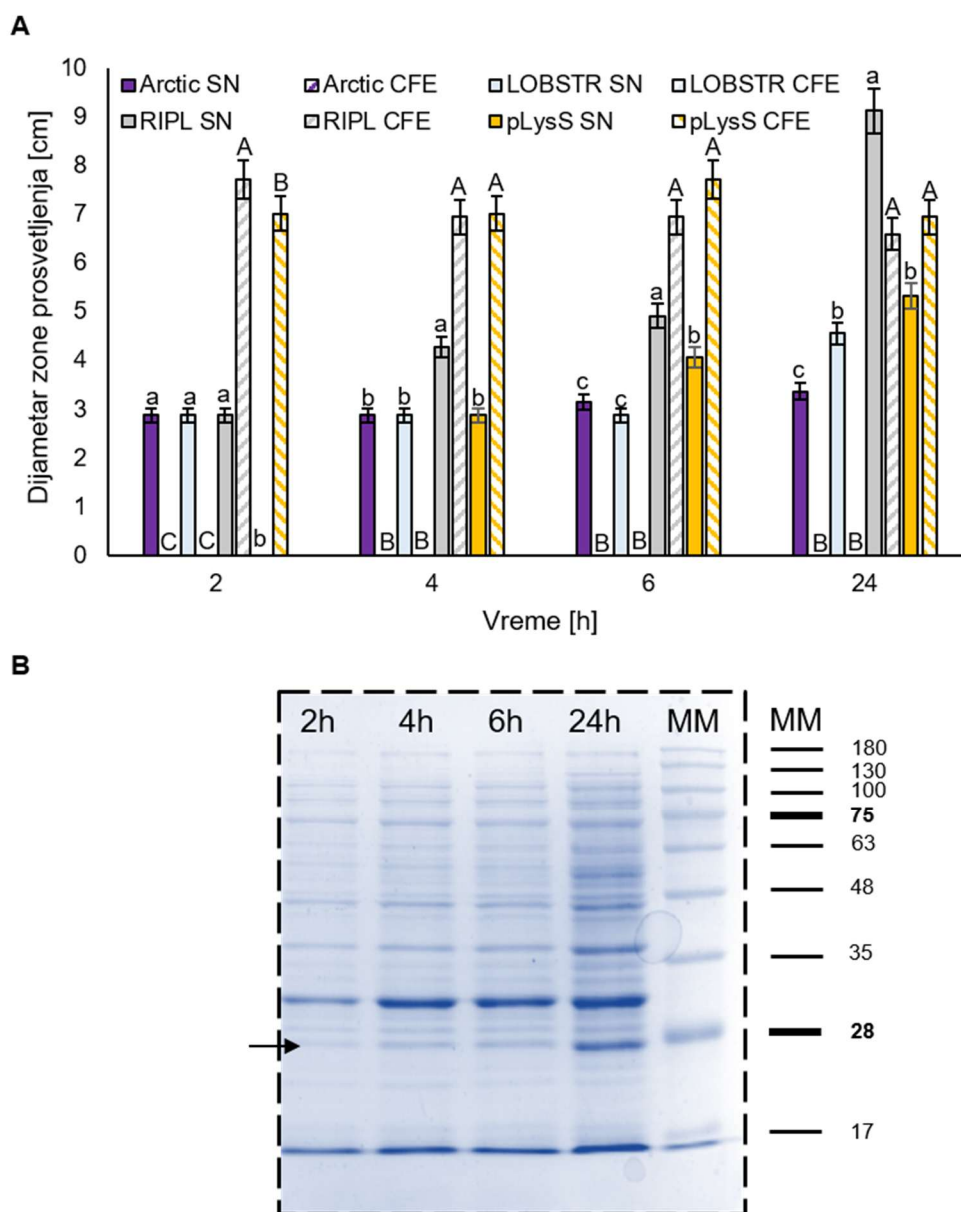
5.1.1 Optimizacija uslova ekspresije PfPHOaze

Ekspresija PfPHOaze bila je neophodna za obezbeđivanje dovoljne količine enzima za detekciju aktivnosti u dirigovanoj evoluciji i prečišćavanje na maloj skali. Osnovni soj *E. coli* BL21 ne produkuje PfPHOazu, ni pod različitim uslovima ekspresije (variranje temperature, dodatak glukoze) i karakteriše ga limitiran rast u LB tečnoj podlozi, gde po postizanju OD₆₀₀ 0,5 prestaje dalji ćelijski rast. Stoga su testirani dodatni sojevi *E. coli* poput *E. coli* BL21-Gold(DE3)pLysS, specijalizovan za potrebe ekspresije toksičnih proteina (Slika 12). Ujedno su testirani i *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL soj, optimizovan za ekspresiju gena sa retkim kodonima *E. coli*, kao i *E. coli* ArcticExpress (DE3)soj specijalizovan za ekspresiju na nižim temperaturama uz prisustvo šaperona koji usmeravaju zauzimanje native konformacije eksprimiranog proteina. Sličan skrining na LA ploči sa dodatkom polimera, IPTG-a i odgovarajućeg antibiotika je korišćen za pretraživanje biblioteke mutanata PHB-depolimeraze (161). Razgradnja polimera na čvrstim podlogama praćena je formiranjem zona prosvetljenja oko kolonija.



Slika 12. Odabir najboljeg soja *E. coli* za produkciju PfPHOaze u testu sa celim ćelijama na minimalnoj čvrstoj podlozi sa inkorporiranim 0,2 % (w/v) PHO i 1 mM IPTG.

Iz pojedinačnih kolonija koje su porasle na ampicilinu kao selekcionom markeru izolovani su plazmidi i sekvenciranjem je potvrđeno prisustvo gena za PfPHOazu, čak i kod kolonija Arctic soja koje nisu davale zone prosvetljenja (Slika 12). Razlika u nivou ekspresije je posledica razlika u efikasnosti ekspresije rekombinantnog enzima između pojedinačnih transformanata. Kako bi se detaljnije ispitao nivo ekspresije u aktivnim kolonijama, praćena je njegova promena tokom vremena u sojevima koji su dali zone prosvetljenja na Slici 12 kao i dodatnom LOBSTR soju u tečnoj LB podlozi u prvih 24 h produkcije na optimalnoj temperaturi gajenja i indukcije za svaki soj kako bi se detaljnije ispitao potencijal svakog soja za produkciju PfPHOaze (Slika 13).

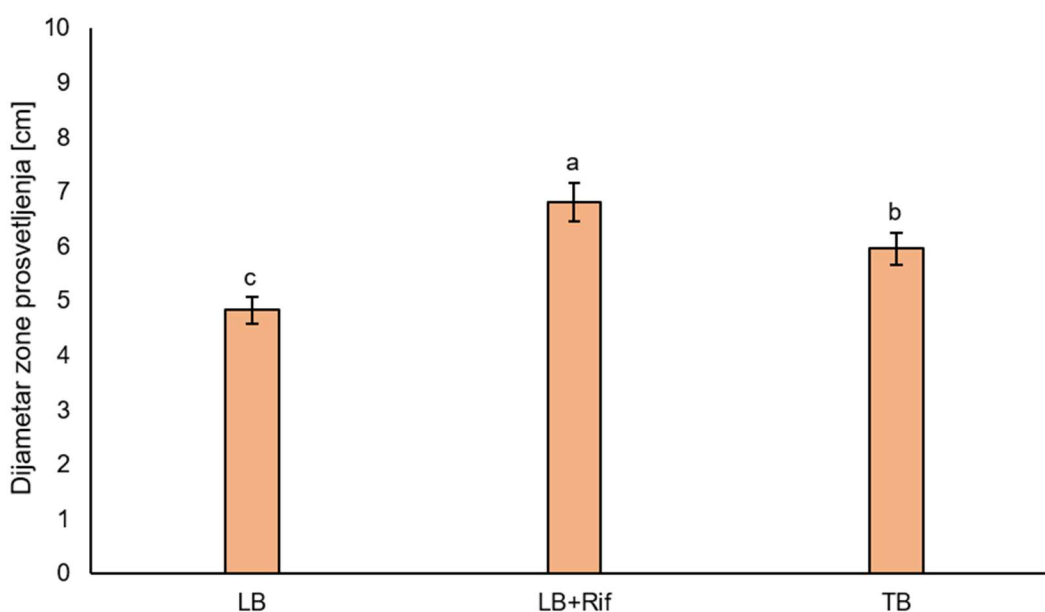


Slika 13. Praćenje produkcije PfPHOaze kroz vreme u tečnim kulturama odabranih sojeva *E. coli*. Praćena je A) aktivnost u testu razgradnje 0,2 % (w/v) PHO u 1% agarozu i 100 mM fosfatnom puferu pH 8,00 sa ćelijskim (CFE) i vanćelijskim (SN) frakcijama svake kulture; B) ekspresija enzima u ćelijskoj frakciji soja *E. coli* RIPL tehnikom SDS-PAGE i masa enzima je procenjena poređenjem sa molekulskim markerima (MM). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ SD za eksperimente izvedene u triplikatu ($n = 3$). Statistička analiza izvedena je primenom Tukey HSD testa. Srednje vrednosti označene različitim slovima statistički se značajno razlikuju ($p < 0,05$). Statističke razlike analizirane su između sojeva unutar svakog vremenskog intervala zasebno. Mala slova označavaju poređenje vrednosti u vanćelijskoj frakciji (SN), dok velika slova označavaju poređenje vrednosti u ćelijskoj frakciji (CFE).

Test sa celim ćelijama (Slika 13) kao i analiza distribucije enzima u SN i CFE (Slika 13A) pokazuju da RIPL soj najuspešnije eksportuje proizvedeni enzim u spoljašnju sredinu. Efikasan eksport enzima u spoljašnju sredinu je značajan za olakšano praćenje aktivnosti enzima na čvrstoj podlozi tokom dirigovane evolucije, a takođe može značajno olakšati postupak prečišćavanja, s obzirom da je broj

ekstracelularnih proteina *E. coli* značajno manji od intracelularnih. Dodatno, ovi rezultati su ukazali na potrebu da se indukcija sa 5 h produži na 24 h zarad većeg prinosa enzima. Slično našem rezultatu na Slici 13A, B, prethodna analiza aktivnosti na PHB plejtu iz literature je potvrđivala prisustvo aktivnih PHB-depolimeraza čak i kada je prinos enzima bio nedovoljan za detekciju pomoću SDS-PAGE (162).

Dalje je za odabrani *E. coli* RIPL soj ispitan potencijal optimizacije proizvodnje PfPHOaze variranjem sastava podloge (Slika 14). Poređeni su LB i TB kao bogate podloge, od čega je TB nutrijentima bogatija podloga, a dodatno je testirana ekspresija pri dodatku rifampicina. Rifampicin je inhibitor bakterijske RNK polimeraze, ali ne i T7 virusne RNK polimeraze kojom je regulisana transkripcija heterolognog gena na pET-22b(+) plazmidu (163,164). Tokom procesa indukcije pomoću IPTG, sa pET-22b(+) plazmida započinje se ekspresija T7 virusne RNK polimeraze, koja započinje transkripciju heterolognog gena. Stoga dodatak rifampicina 30 min nakon indukcije kada je eksprimirana T7 virusna RNK polimeraza favorizuje transkripciju heterolognog gena u odnosu na endogene *E. coli* protein kodirajuće gene pod regulacijom bakterijske RNK polimerazom čiji je rifampicin inhibitor.



Slika 14. Odabir podloge za gajenje *E. coli* RIPL soja za povećanje prinosa produkcije PfPHOaze. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ SD za eksperimente izvedene u triplikatu ($n = 3$). Statistička analiza izvedena je primenom Tukey HSD testa. Srednje vrednosti označene različitim slovima statistički se značajno razlikuju ($p < 0,05$).

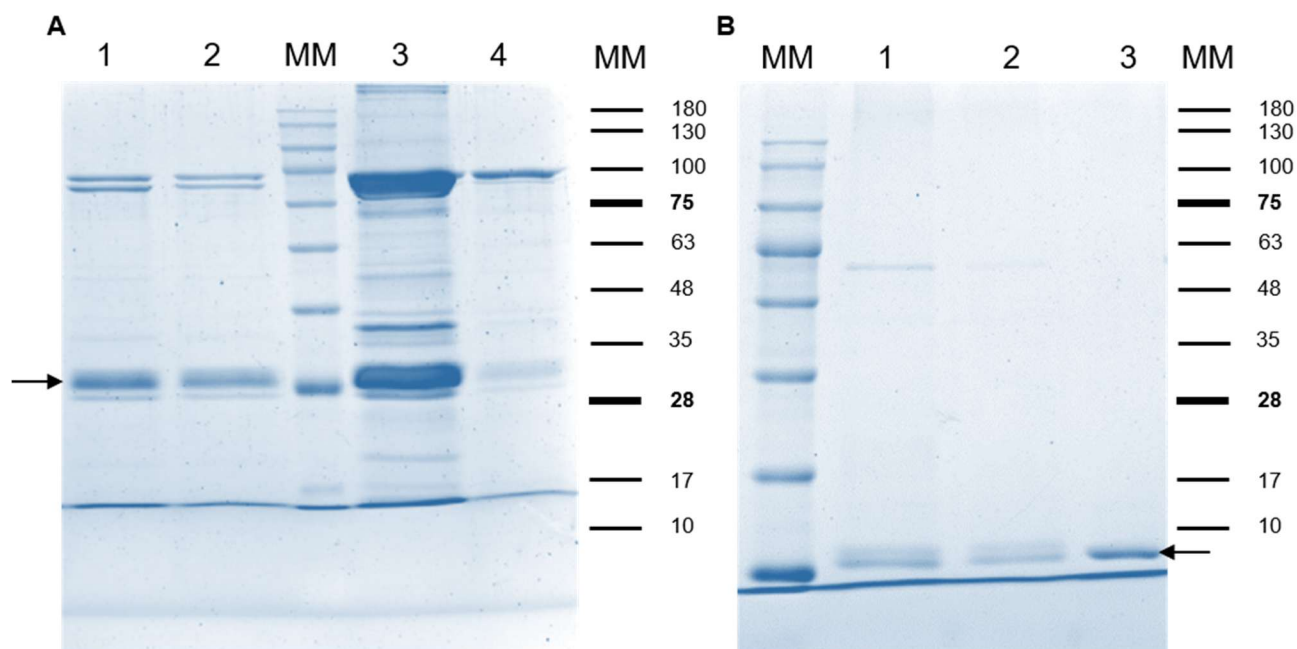
Na Slici 14 prikazane su aktivnosti frakcija nakon prečišćavanja PfPHOaze iz različitih podloga koristeći IMAC. Ekspresija PfPHOaze nakon 24 h indukcije u TB i LB sa dodatkom rifampicina je bolja u odnosu na ekspresiju u LB podlozi. Gajenje *E. coli* RIPL je testirano i u tačnoj minimalnoj podlozi ali je rezultovalo veoma sporim i varijabilnim rastom (od 1 do 3 dana do OD₆₀₀ 0,5). Kada je postignut rast od OD₆₀₀ 0,5 postignuta je i uspešna indukcija ekspresije, ali zbog velike varijabilnosti u rastu kulture, ova podloga nije pogodna za dalji rad.

5.1.2 Prečišćavanje PfPHOaze

Za potrebe procene uslova prečišćavanja velike količine enzima, produkcija PfPHOaze je skalirana na skalu od 3L u fermentoru, u TB kao optimalnoj podlozi. Vreme trajanja indukcije je ograničeno na 6 h, na osnovu prethodnog rezultata gde je pokazano da se tokom prvih 6 h većina

produkovano enzima zadržava unutar ćelija (Slika 13A), omogućujući lakše procesuiranje ćelijske mase u odnosu na 3L supernatanta za potrebe prečišćavanja na laboratorijskoj skali. Ćelije su lizirane i dobijeni CFE od 70 mL je prečišćen koristeći IMAC.

Protein se eluira pri koncentraciji imidazola od 50 mM, ali i na 100 mM pri čemu je stepen elucije drugih proteina iz CFE značajno manji pri 50 mM imidazolu (Slika 15A). ArnA protein *E. coli* je česta nečistoća nakon prečišćavanja CFE *E. coli* koristeći IMAC prisutna kao nečistoća i u našem uzorku (165), pri čemu se masa značajno razlike od mase PfPHOaze što omogućava njeno razdvajanje gel filtracijom. Gel filtracijom je postignuto prečišćavanje PfPHOaze do homogenosti, ali je velika količina enzima izgubljena tokom agregacije do koje je došlo prilikom neophodnog koraka koncentrovanja enzima pre gel-filtracije (Slika 15B).



Slika 15. Prečišćavanje heterologno proizvedene PfPHOaze koristeći A) IMAC, i B) gel hromatografiju. Brojevima 1-4 su označene različite frakcije dobijene nakon hromatografije, a sa MM je označen molekulski marker. Na slici A) frakcije 1 i 2 su dobijene nakon eluiranja sa 50 mM imidazolom, a 3 i 4 sa 100 mM imidazolom.

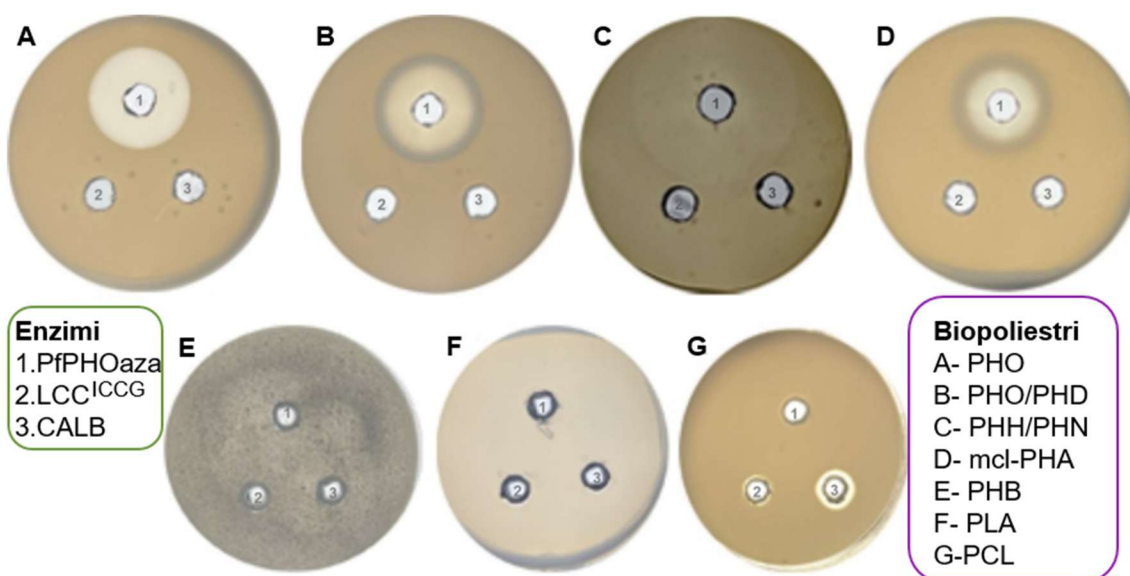
Tradicionalno, PHA-depolimeraze su prečišćavane kombinacijom hidrofobne hromatografije i gel hromatografije. PfPHOaza je prva okarakterisana mcl-PHA-depolimeraza prečišćena iz supernatanta *Pseudomonas fluorescens* GK13 hromatografijom na Octyl-Sefarozu i gel-filtracijom na Superiozi 12 (166). Kasnije su sličnim pristupom prečišćene i ekstracelularne mcl-PHA-depolimeraze iz *Pseudomonas alcaligenes* LB19, *Pseudomonas* sp. RY-1, *Pseudomonas alcaligenes* M4-7, *Pseudomonas luteola* M13-4, *Streptomyces roseolus* SL3, i *Streptomyces* sp. KJ-72 (167–171). PfPHOaza je dodatno prečišćena i specifičnom adsorpcijom na polipropilenskom nosaču Accurel MP-1000 sa kog je desorbovana sa 2-propanolom u prinosu od 58,7 % do homogene čistoće potvrđene SDS-PAGE analizom (172).

5.1.3 Odabir enzima za testiranje specifičnosti PHO model jedinjenja na osnovu njihove aktivnosti na biopoliestrima

Primena model jedinjenja omogućava direktno i brzo ispitivanje aktivnosti PHO-depolimeraza, nezavisno od složenosti i fizičko-hemijskih karakteristika polimernog supstrata, zahvaljujući povećanoj

dostupnosti estarskih veza za enzimsku hidrolizu i omogućavanju njenog brzog i kvantitativnog praćenja u model jedinjenjima. Kao prvi korak u ispitivanju specifičnosti PHO model jedinjenja (pNP-monomera i pNP-dimera sintetisanim u našoj laboratoriji (157) (Slika 17)) prema PHO-depolimerazama, za poređenje sa PfPHOazom odabrana su dva dodatna enzima iz klase esteraza. Enzim LCC^{ICCG} izabran je zbog sposobnosti hidrolize pNP-oktanoata (C8), strukturnog analoga pNP-monomera (pNP-3-hidroksioktanoat). Pored toga, LCC^{ICCG} pokazuje poliesteražnu aktivnost na PET, a slično kao i PfPHOaza u manjoj meri može da hidrolizuje PCL (21,173,174). Lipaza CALB odabrana je zbog sposobnosti hidrolize pNP-palmitata (C16), strukturnog analoga pNP-dimera, kao i zbog poliesteražne aktivnosti na PCL (175,176).

U literaturi su opisani optimalni uslovi za svaki od korišćenih enzima: PfPHOaza (pH 8,5 i 45 °C), LCC^{ICCG} (pH 8,5 i 60 °C) i lipaza CALB (pH 7,0 i 40 °C) (166,173,177,178). Zbog toga je enzimska hidroliza svih supstrata u ovoj studiji sprovedena pri pH 8,0 i 40 °C (Slika 16).

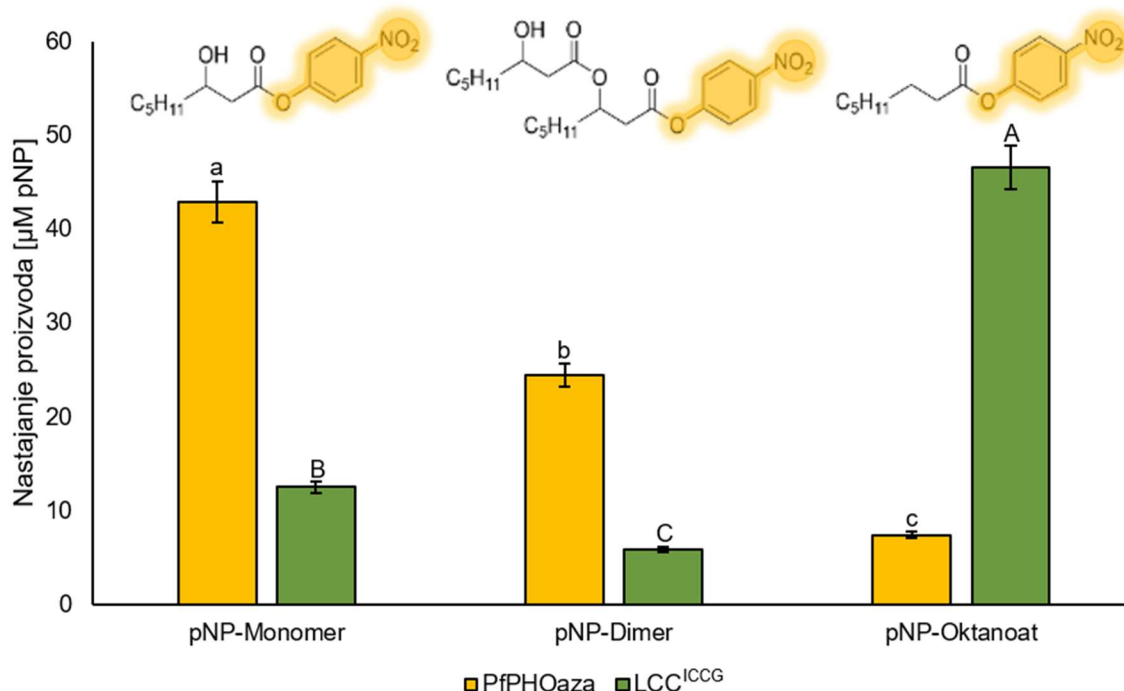


Slika 16. Difuzioni esej za ispitivanje poliesteražne aktivnosti odabranih enzima na biopoliestrima nakon 24 h.

Među testiranim enzimima, jedino je PfPHOaza pokazala aktivnost prema PHO i drugim mcl-PHA u difuzionom esej u 37 °C tokom 24 h (Slika 16A, B, C, D). Razgradnja PHO je bila najefikasnija, što se vidi po potpuno prozirnoj zoni koja ukazuje na potpunu hidrolizu PHO, kao i najvećem prečniku zone od 20 mm oko bunara prečnika 6 mm (Slika 16A). Kod PHH/PHN nije uočena potpuna prozornost, već zamućena zona većeg prečnika (32 mm), što može ukazivati na slabije vezivanje za enzim i parcijalnu hidrolizu PHA koje sadrže monomere sa neparnim brojem ugljenikovih atoma (Slika 16C). Kod mcl-PHA mešavine (mol% 6:38:41:15 za C6:C8:C10:C12) i PHO/PHD mešavine (mol% 49:51 za C8:C10), koje obe sadrže PHO i PHD u skoro ekvimolarnim odnosima, pojavile su se zone prečnika 15 mm i 19 mm, što korelira sa ukupnim sadržajem PHO/PHD (Slika 16B, D). Za PfPHOazu nije detektovana aktivnost prema PHB, PLA niti PCL, čak ni nakon 7 dana inkubacije (Slika 16E, F, G). Suprotno od specifičnosti PfPHOaze, LCC^{ICCG} i CALB su pokazali aktivnost isključivo prema PCL među svim testiranim biopoliesterima, uz formiranje zona prečnika 6 mm i 8 mm.

5.1.4 Spektrofotometrijski esej esterazne aktivnosti sa hromogenim PHO monomerom i dimerom (pNP-monomer i pNP-dimer)

Kako bi se procenila specifičnost PHO model jedinjenja, ispitane su relativne aktivnosti PfPHOaze, LCC^{ICCG} i lipaze CALB sa PHO model jedinjenjima (pNP-monomer i pNP-dimer), i upoređene sa komercijalno dostupnim esteražnim supstratom pNP-oktanoatom (Slika 17). Hidroliza estarske veze model jedinjenja može da se prati spektrofotometrijski usled oslobađanja *p*-nitrofenola, pri čemu pNP-monomer sadrži jednu, a pNP-dimer dve estarske veze od kojih se može pratiti hidroliza terminalne estarske veze.



Slika 17. Aktivnost PfPHOaze i LCC^{ICCG} sa 0,3 mM hromogenim supstratima nakon 20 min na 40 °C. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ SD za eksperimente izvedene u triplikatu ($n = 3$). Statistička analiza izvedena je primenom Tukey HSD testa. Srednje vrednosti označene različitim slovima statistički se značajno razlikuju ($p < 0,05$). Statističke razlike analizirane su između supstrata za svaki enzim zasebno.

PfPHOaza i LCC^{ICCG} su hidrolizovale sva tri supstrata dužine lanaca C8 i C16, za razliku od CALB koja ne pokazuje sposobnost njihove hidrolize tokom 1 h merenja, ali je u prethodnom eseju hidrolizovala pNPB dužine lanca C4.

PfPHOaza je hidrolizovala pNP-monomer i pNP-dimer 5,8 i 3,3 puta efikasnije u poređenju sa pNPO, što ukazuje da je interakcija ove klase enzima sa 3-hidroksi grupom ključna za specifično prepoznavanje supstrata (Slika 17). S druge strane, odsustvo 3-hidroksi grupe kod pNPO supstrata rezultuje njegovom značajno izraženijom hidrolizom od strane LCC^{ICCG} u odnosu na PHO model jedinjenja. Kako je prethodno prikazano, LCC^{ICCG} i CALB pokazuju poliesteražnu aktivnost isključivo na PCL, dok PfPHOaza pokazuje najnižu aktivnost prema PCL, sa PHO i PHD kao preferentnim supstratima (Slika 16). Stoga sledi da uvođenje 3-hidroksi grupe u nova model jedinjenja usmerava njihovu specifičnost ka esteražama koje razgrađuju mcl-PHA. Hidroliza PHO model jedinjenja ne

korelira sa poliesteražnom aktivnošću na PCL koju poseduju LCC^{ICCG} i CALB i koja je prethodno prijavljena za PfPHOaze.

Od dva PHO model jedinjenja, pNP-dimer se pokazao kao selektivniji kandidat za specifičnu detekciju poliesteražne aktivnosti na PHO zbog niže aktivnosti LCC^{ICCG} kao kontrolne esteraže na pNP-dimeru u odnosu na pNP-monomer (Slika 17). Hidroliza unutrašnje neobeležene estarske veze dimera se odvija sporo, kao što je prethodno pokazano tokom PHO razgradnje PfPHOazom u kojoj je glavni detektovan proizvod PHO dimer (172). Istovremeno sa specifičnom detekcijom, PHO model jedinjenja omogućavaju standardizovanu detekciju i poređenje aktivnosti različitih mcl-PHA-depolimeraza. Standardizacija predstavlja jedan od ključnih preduslova za pouzdanu procenu i međusobno poređenje aktivnosti enzima aktivnih na polimerima, jer varijabilnost u poreklu, sastavu i fizičko-hemijskim karakteristikama polimernih supstrata može značajno uticati na izmerenu enzimsku aktivnost i otežati reproduktivnost rezultata između različitih studija (24,60). U tom kontekstu, primena strukturno jednostavnih i definisanih PHO model jedinjenja omogućava kontrolisano merenje enzimске aktivnosti mcl-PHA-depolimeraza, smanjujući uticaj kompleksnosti i heterogenosti polimernog supstrata na rezultate merenja.

Zarad opisivanja mehanizma aktivnosti PfPHOaze, kao i procene inhibitornog potencijala PHO dimera, dodatno je sprovedena kinetička analiza hidrolize PHO model jedinjenja kao i analiza simulacija molekulske dinamike sa PHO model jedinjenjima.

5.1.5 Kinetika hidrolize PHO model jedinjenja sa PfPHOazom

Analiza kinetičkih parametara je urađena kako bi se odredilo da li je od PHO model jedinjenja pNP-monomer ili pNP-dimer specifičniji supstrat za PfPHOazu u poređenju sa komercijalno dostupnim pNPO (Tabela 16).

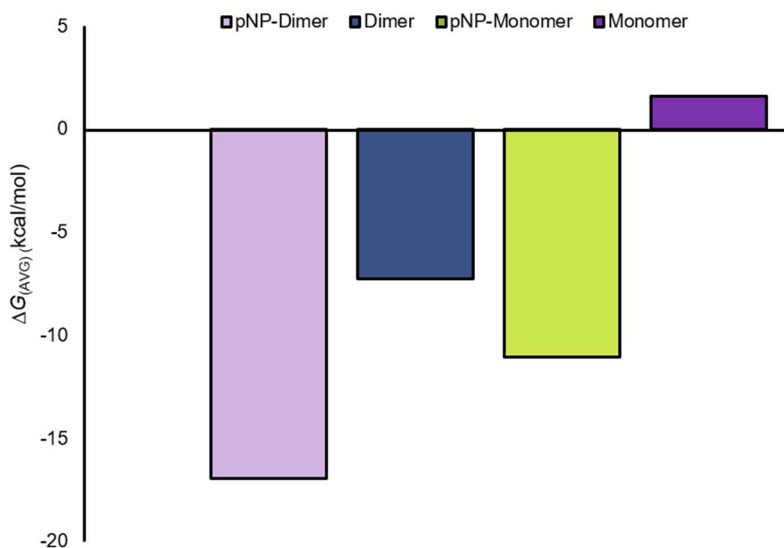
Tabela 16. Kinetički parametri PfPHOaze za pNP obeležena PHO model jedinjenja poređena sa komercijalno dostupnim pNP-oktanoatom na pH 8 i 40 °C

Enzim	pNPO			pNP-monomer			pNP-dimer		
	Km (μ M)	Vmax (μ M/s)	Kcat (1/s)	Km (μ M)	Vmax (μ M/s)	Kcat (1/s)	Km (μ M)	Vmax (μ M/s)	Kcat (1/s)
WT	434,91	2,52	0,28	34,95	1,46	0,16	158,55	1,76	0,20

Rezultati prikazani u Tabeli 16 ukazuju na to da je pNP-monomer među testiranim jedinjenjima najspecifičniji supstrat za detekciju aktivnosti PfPHOaze. Najniža Km vrednost od 34,95 μ M za pNP-monomer ukazuje na najveći afinitet vezivanja ovog jedinjenja za PfPHOazu. Takođe, pNP-dimer pokazuje drugi najbolji afinitet vezivanja sa Km od 158,55 μ M, nasuprot pNPO čiji Km iznosi 434,91 μ M. Ujedno ovo je prvi put da je Km vrednost za pNPO određena u optimalnim uslovima za PfPHOazu (pH 8, 40 °C) (166), nasuprot prethodno određenim Km vrednostima za pNPO od 60 μ M na pH 7,9 i 30 °C (166) i 190 μ M na pH 9,5 i 30 °C (172).

5.1.6 Molekulsko modelovanje interakcija PHO model jedinjenja i proizvoda njihove hidrolize sa PfPHOazu

U cilju izračunavanja Gibsove slobodne energije vezivanja pNP-dimera i pNP-monomera sprovedene su produktivne simulacije molekulske dinamike na osnovu najpovoljnije orijentacije pNP-obebeženih PHO model jedinjenja dobijene iz molekuskog dokinga (Slika 18). Uklanjanjem pNP grupe iz PHO model jedinjenja direktno je procenjen afinitet vezivanja PHO monomera i dimera za PfPHOazu.

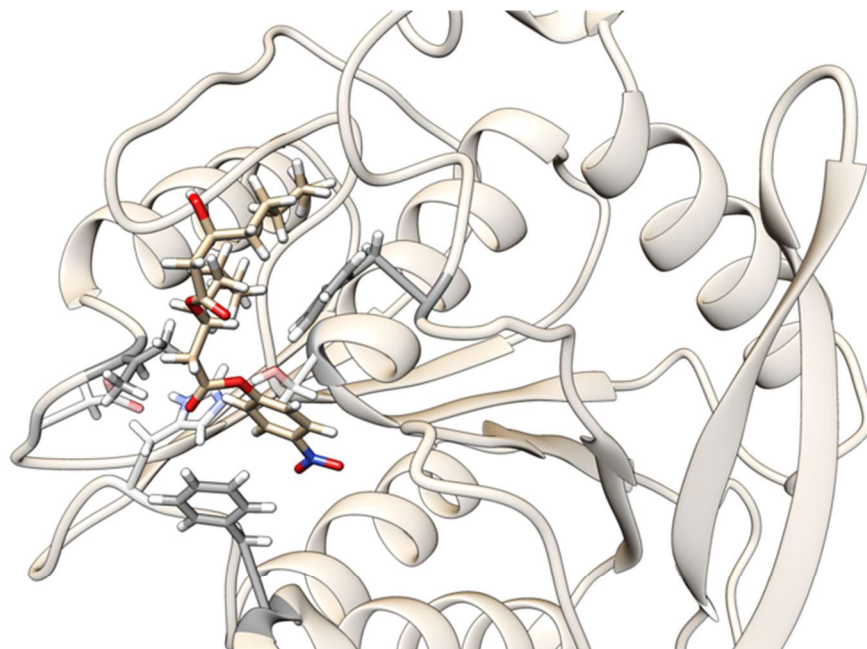


Slika 18. Slobodna energija vezivanja pNP-obebeženih PHO model jedinjenja i PHO monomera i dimera za PfPHOazu.

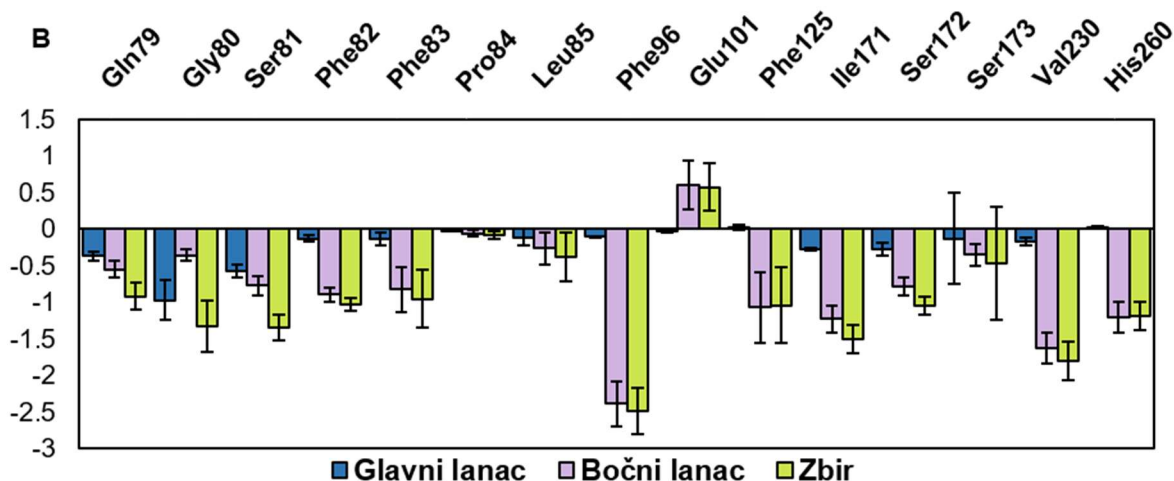
Dobijeni proračuni (Slika 18) pokazuju povoljnije vezivanje pNP-dimera ($\Delta G_{(AVG)} = -16,95$ kcal/mol) za enzim u poređenju sa pNP-monomerom ($\Delta G_{(AVG)} = -11,03$ kcal/mol). Međutim, PHO dimer koji nastaje kao proizvod hidrolize pNP-dimera pokazuje energetski povoljnije vezivanje za aktivno mesto ($\Delta G_{(AVG)} = -7,24$ kcal/mol), u odnosu na PHO monomer dobijen hidrolizom pNP-monomera ($\Delta G_{(AVG)} = 1,59$ kcal/mol). Sve tri replike simulacija su pokazale da se nakon hidrolize pNP-monomera, PHO monomer kao proizvod hidrolize oslobađa sa površine enzima. Ovo implicira da, iako je vezivanje pNP-monomera nešto manje specifično u poređenju sa pNP-dimerom, kinetika u stacionarnom stanju je brža jer disocijacija proizvoda nije ograničavajući korak u reakciji. Opisani rezultati simulacija molekulske dinamike pružaju molekulsko objašnjenje za eksperimentalno primećenu bržu hidrolizu pNP-monomera u poređenju sa pNP-dimerom pomoću PfPHOaze (Slika 17). Takođe, dobijeni rezultati se slažu sa literaturnim podatkom da se PHO dimer oslobađa kao glavni proizvod razgradnje PHO ovim enzimom, dok se monomer oslobađa u manjoj meri usled sporije dalje hidrolize dimera (172).

Simulacije molekulske dinamike pokazuju da 3-hidroksi grupa pNP-dimera interaguje sa karbonilnom grupom Ser182 sa 17 % zastupljenošću tokom MD simulacija, pri čemu je prosečna dužina interakcije 2,80 Å, a prosečna vrednost ugla 161,8°. Slično tome, 3-hidroksi grupa pNP-monomera ostvaruje interakciju sa karbonilnom grupom Ser60 sa 41 % zastupljenošću, prosečne dužine od 2,75 Å i prosečnog ugla od 155,3°. U slučaju oba jedinjenja, 3-hidroksioktanoil-grupe su specifično vezane za hidrofobnu brazdu koju čine Phe125 i Val230 (Slika 19A). Dekompozicijom doprinosa pojedinačnih aminokiselina pokazano je da su Phe104 i Val209 najznačajniji u vezivanju 3-hidroksioktanoil-grupe, dok Phe75 interaguje sa pNP grupom model jedinjenja (Slika 19B).

A



B



Slika 19. Analiza molekularnih interakcija PHO model jedinjenja sa PfPHOazom. A) Reprezentativna struktura najčešće zauzimate konformacije pNP-dimera u aktivnom mestu PfPHOaze na osnovu rezultata molekulske dinamike. Strukture bočnih ostataka katalitičke trijade enzima (Ser/His/Asp) su prikazane u beloj boji, dok su aminokiseline koje specifično interaguju sa pNP dimerom prikazane u sivoj boji. B) Dekompozicija doprinosa pojedinačnih aminokiselina u vezivanju pNP-dimera.

Poređenjem aminokiselinske sekvence PfPHOaze sa drugim ekstracelularnim mcl-PHA-depolimerazama poreklom iz *Pseudomonas alcaligenes* LB19 (UniProtKB ID: AY232717), *Pseudomonas alcaligenes* M4-7 (UniProtKB ID: AY370932) i *Pseudomonas luteola* M13-4 (UniProtKB ID: Q5U7P0), dobijena je sekvencna identičnost od 87 %, 73 % i 97 % (Slika 20). Rezultati pokazuju da su aminokiseline identifikovane kao ključne za interakciju sa PHO model jedinjenjima visoko konzervirane među mcl-PHA-depolimerazama. Stoga, identifikovane interakcije PfPHOaze sa PHO model jedinjenjima se mogu proširiti i na interakcije enzima sa PHO polimerom, što je značajno za buduće studije proteinskog inženjeringa usmerenog ka unapređenju enzimske razgradnje PHO.

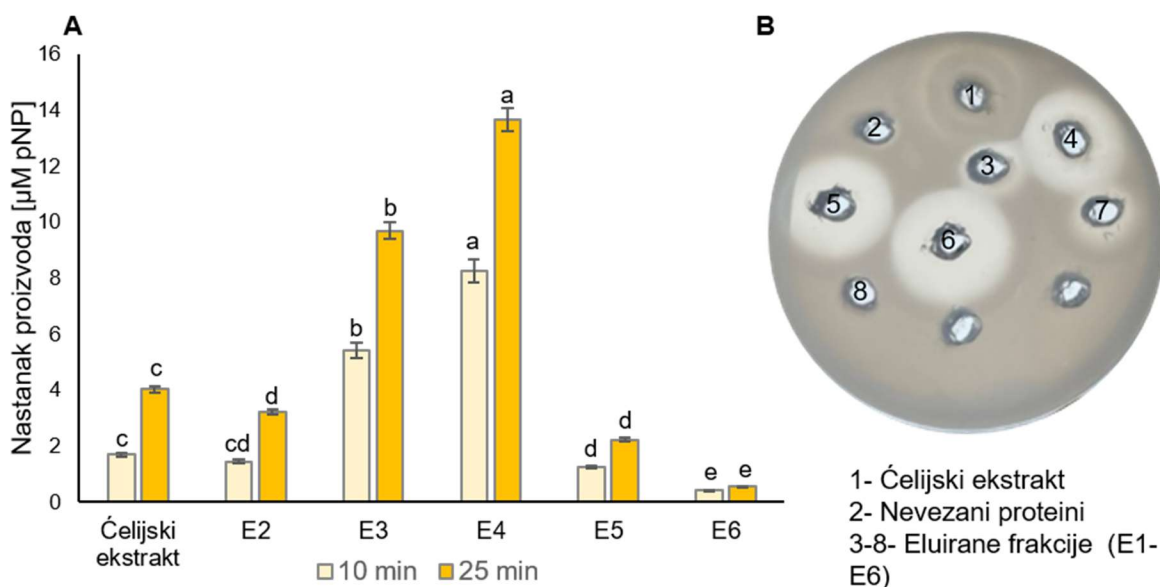
Konzervisane aminokiseline su identifikovane višestrukim poravnavanjem sekvenci (*engl.* Multiple Sequence Alignment, MSA) analizom PfPHOaze sa ekstracelularnim mcl-PHA-depolimerazama poreklom iz *Pseudomonas* sp. (Slika 20).

PfPHOdepolymerase	-----ASRCSERPRTLRLPAEVSCSYQSTWLD SGLVGQR
P.alcaligenesLB19	----MPLRTLLCGLLLAACLGEHALAASRC SERPRTLRLPAEVSCSYQSTWLD SGLVGQR
P.alcaligenesM4-7	----MLAPRSLLFCLLLFALPNAFADSRCSERAKTLLLPAKVSCSYKTTWID SGLIGAR
P.luteolaM13-4	MPSEGGGGVIIILSLTAIAGTAPALAASPCTERAKSLLLPGKISCSYRSTWIPSSISNR
	* **:::** *:::*****:::** * . . *
PfPHOdepolymerase	KIIYQTPLGTPPAGGWPVVLIYQGSFFPLNDFS YHSNLPFGGYEGKLVQNLLDHGYAVI
P.alcaligenesLB19	KIIYQTPLGTPPAGGWPVVLIYQGSFFPLNDFS YHGNLPFGGYEGKLVQALLDNGYAVI
P.alcaligenesM4-7	QVIYQAPLGTPPAGGWPVVLIYQGSFFPLNFTYYSNQPFGGYEGKLVRAALLDSGYAVI
P.luteolaM13-4	KVIYQLPSGTAPTGGWFPVLIYQGSFFPLNFTYYTDFPGGYEGRVVKTLENGYAVI
	::*** * **.*:*****:*****:~::~: . *****::~:~: ** : *****
PfPHOdepolymerase	APSAPADLFWQTNIPGLAQAYELSTDYDFLGNVLA AIASGHFGPLNAQRQYATGISSGGY
P.alcaligenesLB19	APSAPADLFWQTNIPGLAQAYELSTDYDFLGNVLA AIASGHFGPLNAQRQYATGISSGGY
P.alcaligenesM4-7	APSAPADLFWQTNIPGLAQAYELSTDYDFLGNVDAIASGHFGPLNSQRKYATGISSGGY
P.luteolaM13-4	APSAPADLFWHTNLPALASNYELSTDYTFLTNVFQAIDDGDFGLNGNRKYATGISSGGY
	*****::~:~.*. ***:*** ** *: ** .*.*****::~:*****
PfPHOdepolymerase	NTSRMAVSFPGRFRALAVQSGSYATCSGPLCVVPDQLPADHPPTLFLHGFVDVAVVFWWSM
P.alcaligenesLB19	NTSRMAVSFPGRFRALAVQSGSYATCSGPLCVVPDQLPADHPPTLFLHGFVDVAVVFWWSM
P.alcaligenesM4-7	NTSRMAVSFPQGFKALAIQSGSYATCSGPLCVVPDQLPADHXPTYFLHGFVDLTVFWWSM
P.luteolaM13-4	NTSRMAVSFPGEFKALAVQSGSYATCSGPVCSVPDELPA DHPPTYFLHGFVDLTVFWWSM
	*****::~:~.*:*****:~* ***:***** ** ***** .*****
PfPHOdepolymerase	DLYYDRLLHQGIETARYTEPLGGHEWFAASPGKVLAWFNAHP
P.alcaligenesLB19	DLYYDRLLHQGIETARYTEPLGGHEWFAASPSKVLAWFNAHP
P.alcaligenesM4-7	DLYYDRLLQQGIETARYTEPLGGHEWFAASPGKVLAWFNAHP
P.luteolaM13-4	DMYYDRLLYQNIPTGRYTKTTGGHEWFPA SAAKVLAWFNAYP
	*:***** *.* **.*:~ *****.*.*****::~:~*

Slika 20. Višestruko poravnavanje sekvenci (*engl.* MSA) PfPHOaze sa ekstracelularnim mcl-PHA depolimerazama poreklom iz *Pseudomonas* sp. Konzerviranost aminokiseline na svakoj poziciji označena je simbolom (*) za očuvanje identične aminokiseline, (:) za visoku konzerviranost supstituisane aminokiseline sa sličnim hemijskim i evolutivnim svojstvima, (.) za umerenu konzerviranost, dok pozicije bez oznake ukazuju na odsustvo konzerviranosti.

5.1.7 Primena pNP-dimera kao hromogenog PHO model jedinjenja za brzu detekciju PfPHOaze tokom prečišćavanja

Primenjivost pNP-dimera kao malog i specifičnog supstrata, za potrebe brze i specifične detekcije enzima sa PHO degradujućom aktivnošću, ispitana je tokom prečišćavanja PfPHOaze koristeći IMAC (Slika 21). Hromatografske frakcije su testirane sa pNP-dimerom i PHO polimerom.

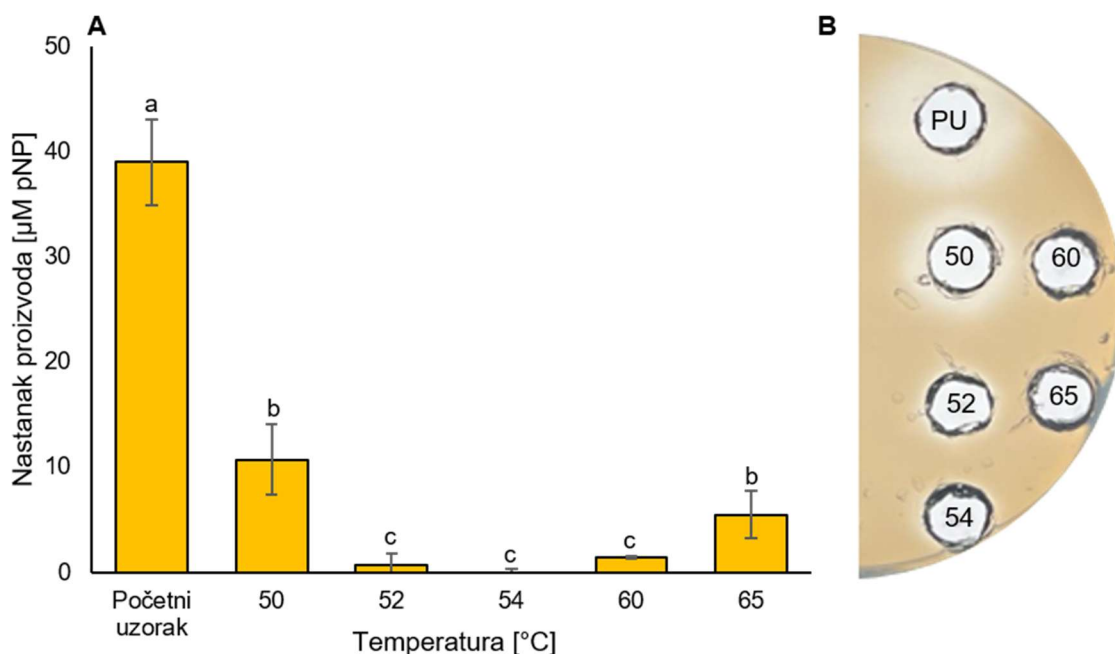


Slika 21. Detekcija aktivnosti PfPHOaze u hromatografskim frakcijama tokom prečišćavanja koristeći IMAC. Aktivnost je testirana praćenjem hidrolize A) 0,3 mM pNP-dimera tokom 20 min; B) 0,2 % (w/v) PHO emulzije u agarози tokom 16 h na 40 °C. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ SD za eksperimente izvedene u triplicatu ($n = 3$). Statistička analiza izvedena je primenom Tukey HSD testa. Srednje vrednosti označene različitim slovima statistički se značajno razlikuju ($p < 0,05$).

Test sa pNP-dimerom omogućava identifikaciju PHO-depolimerizujuće aktivnosti u roku od 10 min (Slika 21A), za razliku od PHO polimera za koji je bila potrebna inkubacija tokom 16 h (Slika 21B). Dobijen trend u aktivnosti frakcija sa pNP-dimerom korelira sa testom razgradnje PHO polimera.

5.1.8 Primena pNP-dimera kao hromogenog PHO model jedinjenja za brzu detekciju PfPHOaze tokom testiranja temperaturne stabilnosti

Primenjivost pNP-dimera u kvantitativnom određivanju PHO degradujuće aktivnosti ispitana je na primeru određivanja termalne stabilnosti PfPHOaze. Rezidualna aktivnost enzima određena je upotrebom pNP-dimera i PHO polimera kao supstrata (Slika 22). Na turbidimetrijsku kvantifikaciju razgradnje PHO pored brzine hidrolize katalitičkim domenom značajno utiče i proces adsorpcije enzima pomoću SVD, usled kompeticije dva domena PfPHOaze (44), a takve efekte je teško anulirati uključivanjem dodatnih kontrolnih reakcija. Ovo čini turbidimetrijski test posebno osetljivim na koncentraciju enzima, rezultujući autoinhibicijom enzima pri visokim koncentracijama. Stoga, mali supstrat čije je vezivanje ograničeno na aktivno mesto enzima može značajno pojednostaviti proces kvantifikacije enzimске aktivnosti.

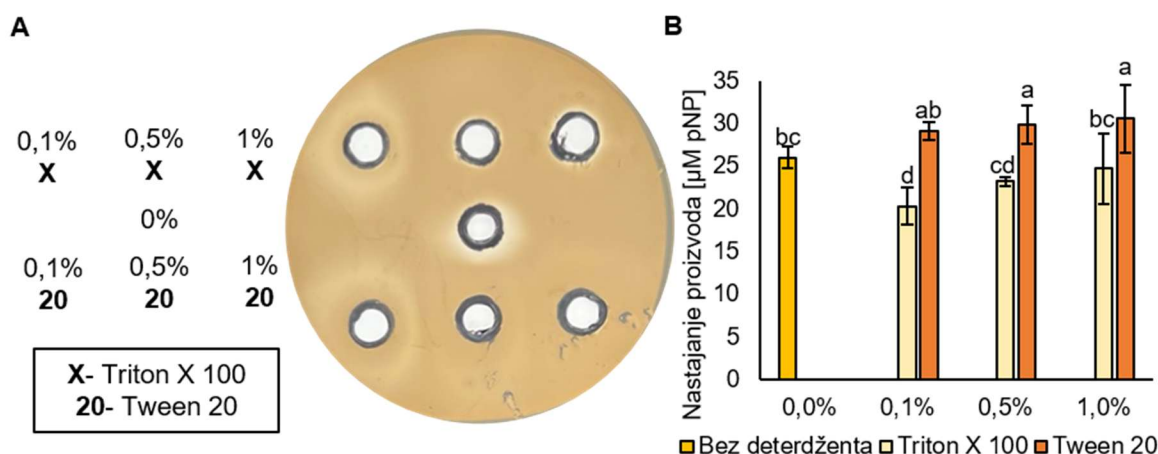


Slika 22. Određivanje temperaturne stabilnosti PfPHOaze sa A) 0,3 mM pNP-dimerom; B) 0,1% (w/v) PHO emulzijom u agarози. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ SD za eksperimente izvedene u triplicatu ($n = 3$). Statistička analiza izvedena je primenom Tukey HSD testa. Srednje vrednosti označene različitim slovima statistički se značajno razlikuju ($p < 0,05$). Na slici B) aktivnost početnog uzorka enzima pre inkubacije na povišenim temperaturama označena je sa PU.

Ubrzana kvantifikacija termičke stabilnosti PfPHOaze korišćenjem pNP-dimera takođe je postignuta (Slika 22A) naspram testa sa PHO polimerom (Slika 22B). Dodatno, testiranjem termičke stabilnosti PfPHOaze pomoću pNP-dimera čiji je T_m 72 °C, za razliku od PHO sa T_m 45 °C, omogućeno je direktno merenje stabilnosti enzima na temperaturama višim od 45 °C (166). Podaci dobijeni za termičku stabilnost PfPHOaze su u skladu sa prethodnim istraživanjima koja ukazuju na potpunu inaktivaciju enzima nakon nekoliko min inkubacije na 52 °C (42).

5.1.9 Primena pNP-dimera kao hromogenog PHO model jedinjenja za detekciju PfPHOaze tokom testiranja stabilnosti u prisustvu deterdženata

Veoma često je u literaturi prijavljen inhibitorni efekat čak i niskih koncentracija blagih deterdženata na PHA-degradiujuću aktivnost (172,179,180). Takođe, PfPHOaza je hidrofoban enzim za koji je prijavljena nespecifična adsorpcija na kolonu tokom prečišćavanja gel hromatografijom i na plastičnom laboratorijskom posuđu (166,172), i za koji kao i za ostale hidrofobne enzime postoji mogućnost za agregaciju pri višim koncentracijama u eksperimentalnim uslovima (181). Stoga, dodatak deterdženata može pomoći u eksperimentalnom radu sa ovom klasom enzima, ali istovremeno otežava praćenje enzimske aktivnosti na polimeru. Kako bi se utvrdilo da li deterdžent narušava interakciju sa polimerom ili potpuno denaturiše enzim, testiran je dodatak različitih koncentracija nejonskih deterdženata u preparat enzima, a zatim je upoređena aktivnost na PHO polimeru i pNP-dimeru (Slika 23).



Slika 23. Određivanje stabilnosti PfPHOaze nakon 2 h inkubacije na 25 °C u prisustvu nejonskih deterdženata sa A) 0,2 % (w/v) PHO emulzijom u agarози; B) 0,3 mM pNP-dimerom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD za eksperimente izvedene u triplicatu (n = 3). Statistička analiza izvedena je primenom Tukey HSD testa. Srednje vrednosti označene različitim slovima statistički se značajno razlikuju ($p < 0,05$).

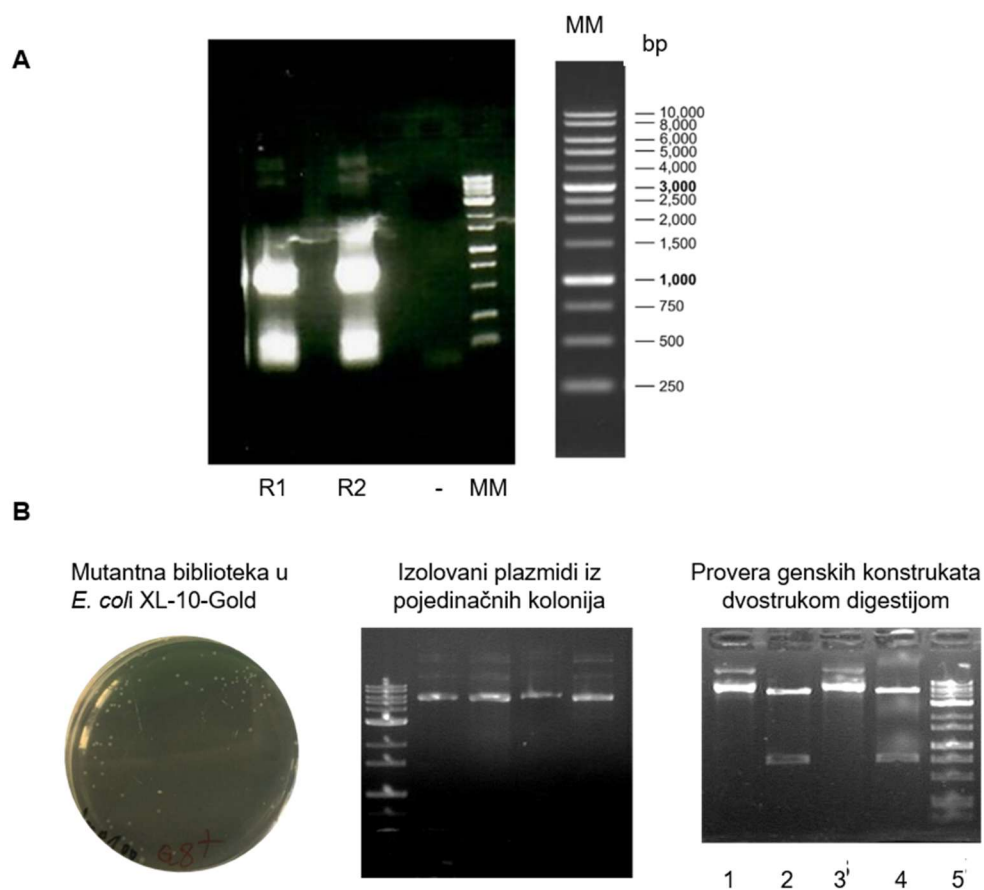
Aktivnost nije detektovana u testu sa polimerom pri koncentracijama deterdženata od 0,5 % (v/v) (Slika 23A), dok rezultati sa pNP-dimerom ukazuju da enzim zadržava aktivnost tokom 2 h inkubacije sa Tween-20 pri koncentraciji do 1 % (v/v) (Slika 23B). U prethodnoj literaturi već pri koncentracijama od 0,03% Triton-X-100 i 0,1 % SDS dolazi do potpune inaktivacije aktivnosti PfPHOaze na polimeru (172). Slično, mcl-PHA depolimeraza iz *Pseudomonas alcaligenes* LB19 je potpuno inaktivirana u prisustvu 0,05 % Triton-X-100 i 0,1 % Tween 80, dok su depolimeraze iz *Pseudomonas* sp. RY-1 i *Pseudomonas luteola* M13-4 inhibirane 80 % i 95 % sa 0,05 % i 0,1 % Triton-X-100 (167,170,171). Model jedinjenja mogu da se koriste za praćenje specifične aktivnosti mcl-PHA depolimeraza u prisustvu deterdženata.

5.1.10 Proteinsko inženjerstvo PfPHOaze za unapređenje razgradnje PHA

Proteinsko inženjerstvo PfPHOaze primenjeno je kao strategija za unapređenje razgradnje PHA kroz unapređenje stabilnosti i katalitičkih svojstava enzima modifikacijom njegove strukture. Potencijal za razvoj varijante PfPHOaze sa povećanom katalitičkom aktivnošću, stabilnošću ili supstratnom specifičnošću ispitan je za tri različita pristupa: dirigovanu evoluciju, konsenzus dizajn i rekonstrukciju predačkog gena (ASR).

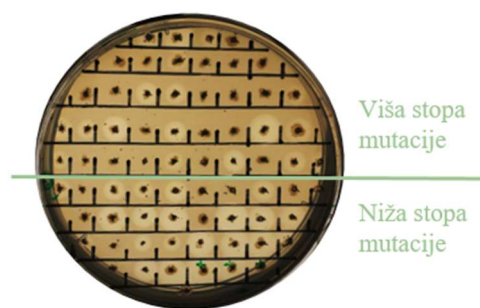
5.1.10.1 Dirigovana evolucija PfPHOaze

U gen koji kodira PfPHOaze uvedene su nasumične mutacije različitim stopama učestalosti (Slika 24), kako bi se obezbedio balans između dovoljne diverzifikacije sekvence mutantnih proteina i očuvanja njihove katalitičke aktivnosti.



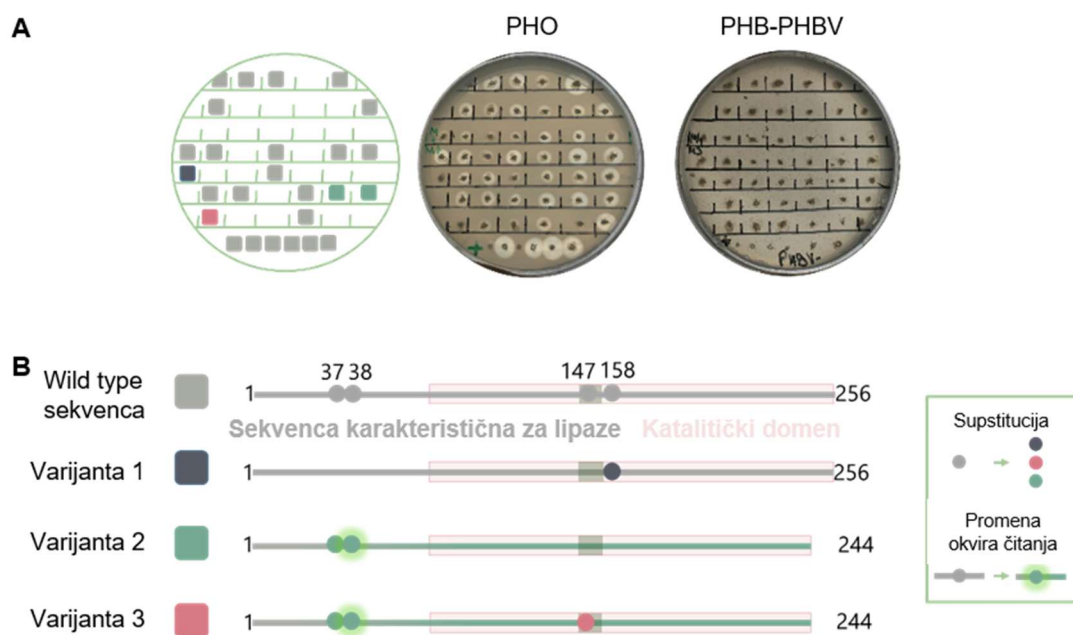
Slika 24. Priprema mutantne biblioteke sa nasumično uvedenim mutacijama u sekvencu gena za PfPHOazu. A) Agarozna gel elektroforeza nakon umnožavanja gena pod mutagenim uslovima PCR: R-PCR reakcija, (-)-Negativna kontrola, MM - DNK marker. B) Kloniranje mutiranih varijanti gena MEGAWHOP metodom u pET-22b(+) vektor, izolovanje umnoženih plazmida i potvrda dvostrukom digestijom XhoI i NcoI enzimima: 1-Plazmid 1 pre dvostruke digestije, 2-Plazmid 1 nakon dvostruke digestije, 3-Plazmid 2 pre dvostruke digestije, 4-Plazmid 2 nakon dvostruke digestije, 5- DNK marker.

Analiza agaroznom gel elektroforezom potvrdila je uspešno generisanje dve mutantne biblioteke gena PfPHOaze metodom nasumične mutageneze (Slika 24A), kao i njihovo kloniranje u ekspresioni vektor pET-22b(+) primenom metode MEGAWHOP (Slika 24B). Nakon transformacije u RIPL soj, mutantne biblioteke analizirane su esejem aktivnosti sa celim ćelijama radi određivanja stope mutacija (Slika 25).



Slika 25. Kvalitativno ispitivanje mutantne biblioteke PfPHOaze – visoka (epM1) naspram niske stope mutacija (M3 i M4).

Na osnovu veće zastupljenosti kolonija sa aktivnim varijantama enzima (Slika 25) dalje su funkcionalno pretražene dve biblioteke (M3 i M4) sa nižom stopom mutacija. Mutantna biblioteka je funkcionalno pretražena za ubrzanu razgradnju PHO, PHB-PHBV (Slika 26A) i PCL (podaci nisu prikazani). Plazmidi izolovani iz kolonija koje najbrže razgrađuju PHO su sekvencirani u regionu genskog inserta. Na Slici 26B prikazane su mutacije transilirane na nivo proteina.



Slika 26. Dirigovana evolucija PfPHOaze. A) Aktivnost PfPHOaze i njenih mutanata generisanih tehnikom nasumične mutageneze; B) šematski prikaz uvedenih mutacija u proteinskoj sekvenci PfPHOaze.

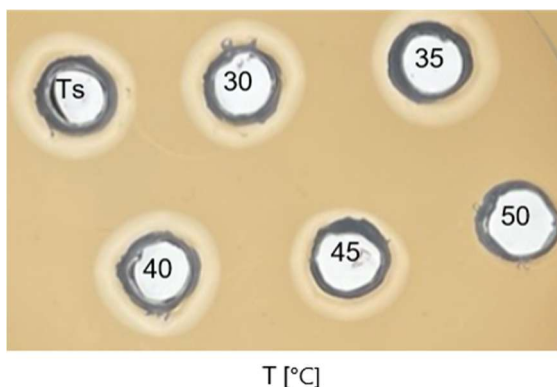
Od 20 sekvenciranih aktivnih kolonija samo Varijanta 2 sadrži mutaciju dok sve ostale nose wild-type gen (Slika 26A). Od dve sekvencirane neaktivne kolonije obe nose mutiran gen za PfPHOazu. Nijedna kolonija nema sposobnost razgradnje PHB-PHBV niti PCL supstrata, što potvrđuje literaturni podatak o specifičnosti PfPHOaze prema PHO supstratu. Jedini aktivni mutant koji je dobijen (Varijanta 2) nosi supstituciju I37S u SVD, kao i inserciju jednog nukleotida na poziciju 112 u genu što rezultuje promenom aminokiselinske sekvence od pozicije 38 (Slika 26B). Zadržavanje PHO degradujuće aktivnosti se može objasniti visokom sekvencnom sličnošću od 86 % sa wild-type proteinskom

sekvencom. Daljom pretragom mutantne biblioteke epM1 sa višom stopom mutacije među 55 kolonija pronađena su još 2 aktivna mutanta potvrđena sekvenciranjem.

U proteinskoj sekvenci dva neaktivna mutanta je došlo do supstitucije M158L i R147Q unutar katalitičkog domena. Aminokiseline na pozicijama 158 i 147 su visoko konzervisane među PHO-depolimerazama (Slika 20).

5.1.10.2 Konsenzus dizajn PfPHOaze

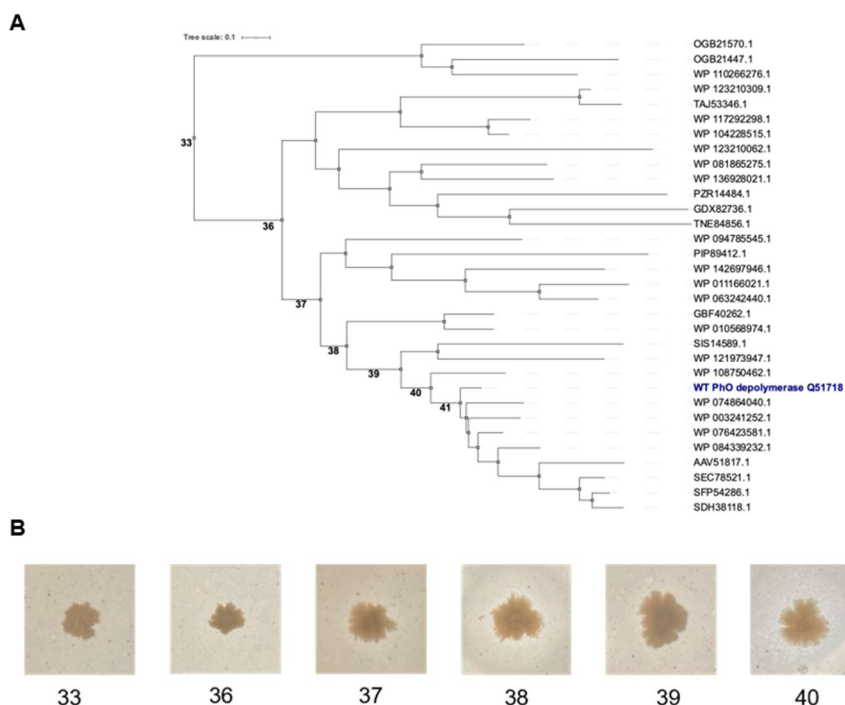
U cilju unapređenja enzimske razgradnje PHO, neophodno je identifikovati i testirati varijante enzima sa povećanom termostabilnošću i poboljšanom katalitičkom aktivnošću. Termostabilniji enzimi omogućavaju efikasniju razgradnju pri višim temperaturama na kojima je i mobilnost polimernih lanaca veća, što dodatno ubrzava degradaciju. U skladu sa tim primenjen je konsenzus dizajn i konstruisan je trostruki mutant PfPHOaze (PfPHOaze^{LLL}), čija je termostabilnost eksperimentalno ispitana. Temperaturna stabilnost PfPHOaze^{LLL} je smanjena, sa smanjenjem temperature inaktivacije mutanta na 45 °C (Slika 27) u poređenju sa 52 °C za wild-type PfPHOazu (Slika 22).



Slika 27. Određivanje temperaturene stabilnosti trostrukog mutanta PfPHOaze^{LLL} sa 0,1 % (w/v) PHO emulzijom u agarozu. Početni uzorak enzima je označen sa Ts, dok su ostali uzorci dobijeni inkubiranjem Ts 30 min na označenoj temperaturi.

5.1.10.3 Rekonstrukcija predačkog gena (ASR) PfPHOaze

Za rekonstrukciju predačkog gena (ASR) PfPHOaze korišćena je FireProt^{ASR} platforma za automatizovanu filogenetsku analizu homolognih proteinskih sekvenci i rekonstrukciju predačkih proteina sa ciljem identifikacije varijanti sa povećanom stabilnošću, širom supstratnom specifičnošću i unapređenim katalitičkim svojstvima (182). Korišćene aminokiselinske sekvence prikazane su u Tabeli 17. Filogenetsko stablo rekonstruisanih predačkih varijanti PfPHOaze pokazuje jasno razdvajanje predačkih varijanti u dve grupe (Slika 28A).



Slika 28. Rekonstrukcija predačkog gena (ASR) PfPHOaze. A) Filogenetsko stablo predačkih mutanata PfPHOaze; B) aktivnosti predačkih mutanata PfPHOaze testirana sa celim ćelijama na 0,2 % (w/v) PHO emulziji u 1 % agarozu, pH 8, 37 °C.

Varijante 39, 40 i 41 pokazuju najviši stepen očuvanosti wild-type sekvence redom kojim su navedene. To ukazuje na manji broj mutacija u navedenim varijantama koje čine donju grupu filogenetskog stabla u poređenju sa gornjom grupom koju čine varijante 33, 36, 37 i 38 (Slika 28A). Visoka evolutivna očuvanost sekvenci u donjoj grupi može ukazati na dobro očuvanje funkcije enzima, dok gornja grupa enzima pokazuje potencijal za funkcionalnu diverzifikaciju. Mutanti iz obe grupe (37, 38, 39, 40 i 41) su uspešno eksprimirani u *E. coli* RIPL i njihova aktivnost je potvrđena na nivou celih ćelija (Slika 28B). Mutanti 33 i 36 nisu dali zonu prosvetljenja ni nakon 15 dana inkubacije. Za svaki mutant testirano je po 15 kolonija, i time je isključena međukolonijska varijabilnost i obezbeđena reproduktivnost aktivnosti odabranih varijanti u daljim ispitivanjima. U daljem radu će eksperimentalno biti ispitana funkcionalna očuvanost rekonstruisanih predačkih varijanti PfPHOaze i ispitana razlika u aktivnosti, termostabilnosti i kinetičkim parametrima odabranih varijanti.

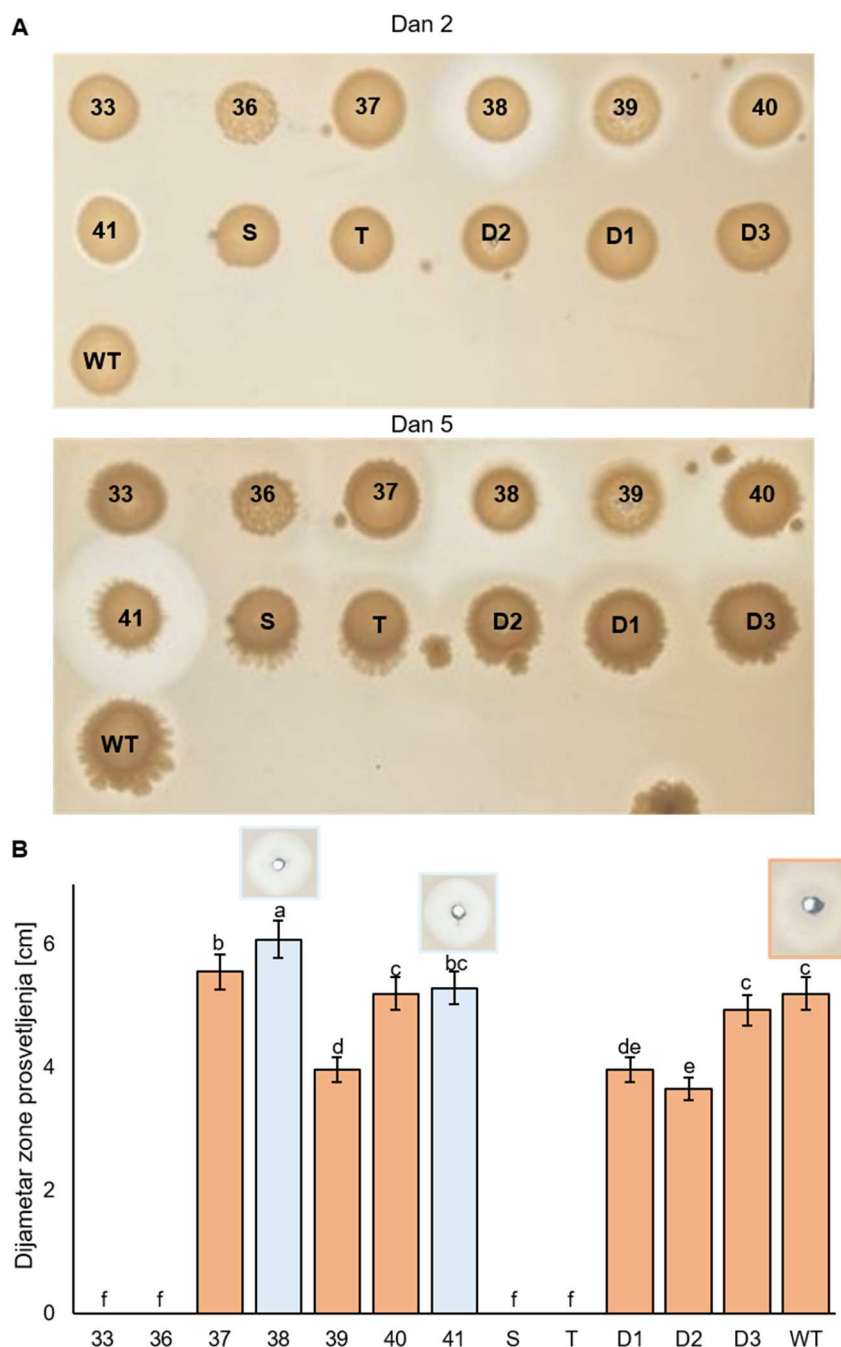
Tabela 17. Aminokiselinske sekvence rekonstruisanih predačkih varijanti PfPHOaze

PfPHOaza-33	MASRCTETKTGLTADTISCSYQTKYNWIESGAGIYVPREVRYQLPEGTPPAGGWPVV VLYQGSFFPVEDFWRAAPSQNMPFGGYEYVKKLIQKLLDNPA GTGKGYAVIAPDAPAA DRGLQFWQTNVPGFAAGVFPYSASADYRFLTNLFDAIKAGQFGSAGPLNANRRYATG ISSGGYNTSRMAVSFPGASEFRALAIQSASYATCSGPLCVVPETLPANHPPTLFLHGAA DLIVPVWTMEKYYDRLKDQGIETELVVEPGAGHEWLAENLAPEEILNWFD AHPLE
PfPHOaza-36	MASRCTETPKTGLTADTISCSYQTKYNWIESGAGISVQREVRYQLPEGTPPAGGWPVV VLYQGSFFPVENFWRAAASQNMPFGGYNEVKKLIKKLLDSPAGTGKGYAVIAPEAAS ADRGYQFWQTNVPGFAPAGGCTENKGSVPYELSADYRFLTNLFDAIKAGQFGSGF GGPLNANRLYATGISSGGYNTSRMAVSFPGGSGNASEFRALAIQSASYATCSGPLCVV PETLPANHPPTLFLHGAVDLVVPVWTMERYDRLKDQGIETVDYSRGLKLLGDTRCD AELVVEPGAGHEWLAENLAPEEILNWFD AHPRL E
PfPHOaza-37	MASRCTETKTGLTVDTISCSYQTKYIEAGAGIQREVKYQLPEGTPPAGGWPVVVIYQG SFFPVEFSRSQNMPFGGYEYVKKLIQKLLDSGYAVIAPNAAADLFWQTNVPGFAVPYEL STDYRFLTNLFDAIKAGQFGPLNANRKYATGISSGGYNTSRMAVSFPGEFRALAIQSG SYATCSGPLCIVPETLPANHPPTLFLHGAVDVVPVWTMERYDRLKDQGIETELYVE PLAGHEWFAESPEKILNWFNQHPLE
PfPHOaza-38	MASRCTETKTGLLPKTISCSYQTKWIEAGPGIQREVKYQVPEGTPPAGGWPVVVIYQG SFFPVEFSRSQNMPFGGYEYVKKLIQKLLDNGYAVIAPNAAADLFWQTNVPGFAVAYE LSTDYRFLTNLFDAIKAGQFGPLNPNRKYATGISSGGYNTSRMAVSFPGEFRALAIQSG SYATCSGPLCIVPETLPANHPPTLFLHGFVDVVPVWWTMDRYDRLKDQGIETELYT EPLAGHEWFAASPEKILNWFNQHPLE
PfPHOaza-39	MASRCTETPKTGLLPATISCSYQTTWIDSGVVGQRKVITYQVPQGTTPAGGWPVVLIY QGSFFPVNDFSYSNMPFGGYEYEGKLIQKLLDHGYAVIAPNAPADLFWQTNVPGFAQ AYELSTDYRFLSNVFD AIAAGQFGPLNPNRQYATGISSGGYNTSRMAVSFPGEFRALA IQSGSYATCSGPLCVVPETLPADHPPTLFLHGFVDVVPVWWTMDRYDRLLDQGIET ALYTEPLGGHEWFAASPKILAWFNQHPLE
PfPHOaza-40	MASRCTETPKTLLPAKVSCSYQTTWIDSGVVGQRKVITYQLPLGTPPAGGWPVVLIY QGSFFPLNDFSYSNMPFGGYEYEGKLIQKLLDHGYAVIAPSAPADLFWQTNVPGLAQ AYELSTDYDFLSNVFD AIAAGQFGPLNPNRQYATGISSGGYNTSRMAVSFPGEFRALA IQSGSYATCSGPLCVVPESLPADHPPTLFLHGFVDVVPVWWTMDLYDRLLDQGIET ALYTEPLGGHEWFAASPGKILAWFNAHPLE
PfPHOaza-41	MASRCSEPKTLLPAKVSCSYQSTWIDSGVVGQRKVIYQTPLGTPPAGGWPVVLIYQ GSFFPLNDFTYYSNMPFGGYEYEGKLIQKLLDHGYAVIAPSAPADLFWQTNIPGLAQAY ELSTDYDFLGNVLA AIAAGHFGPLNAQRQYATGISSGGYNTSRMAVSFPKGFRALAIQ SGSYATCSGPLCVVPESLPADHPPTLFLHGFVDVVPVWWSMDLYDRLLDQGIETAR YTEPLGGHEWFAASPGKILAWFNAHPLE

5.1.11 Usporedna analiza različitih pristupa proteinskog inženjerstva na primeru PfPHOaze

Očuvanost primarne funkcije PfPHOaze, odnosno hidrolize PHO polimera, analizirana je poređenjem rekonstruisanih predačkih varijanti PfPHOaze sa wild-type enzimom na osnovu brzine hidrolize PHO. Dodatno, očuvanje aktivnosti u mutantima dobijenim korišćenjem ASR pristupa proteinskog inženjerstva je upoređeno sa prethodno dobijenim mutantima primenom konsenzus dizajna i dirigovane evolucije.

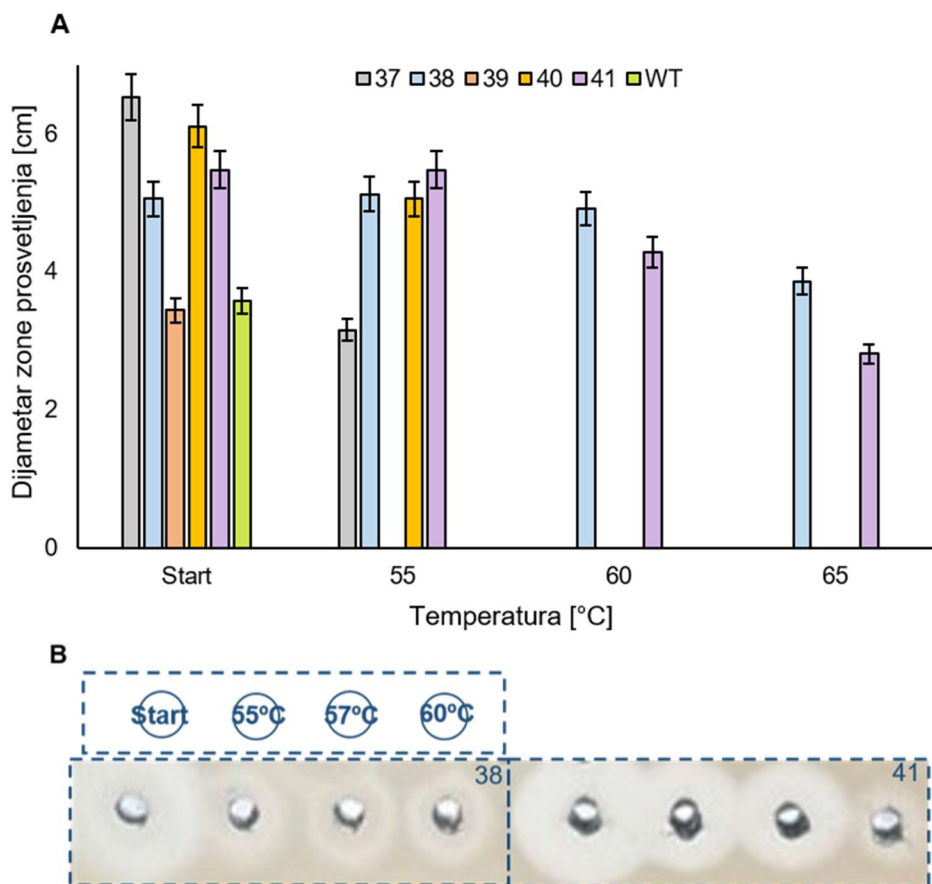
Analiza aktivnosti ujednačene količine celih ćelija kroz vreme, kao i neposredne aktivnosti njihovih lizata takođe ujednačenih po količini ćelija dala je uporedive rezultate (Slika 29A, B). Mutanti dobijeni ASR pristupom (33-41) pokazuju najveće očuvanje aktivnosti sa 5 aktivnih mutanata od 7 generisanih. Oba mutanta dobijena konsenzus pristupom imaju značajno smanjenu aktivnost, pri čemu je za trostruki mutant (T) prethodno potvrđena i smanjena termostabilnost (Slika 27). Tri aktivna mutanta dobijena dirigovanom evolucijom iz biblioteke od 55 mutanata nisu pokazala unapređenu aktivnost u odnosu na WT (Slika 29A, B). Nasuprot tome, 2 od 5 aktivnih mutanta dobijenih pomoću ASR pokazuju značajno povećanje aktivnosti u odnosu na WT dajući veći prečnik i intenzitet zone prosvetljenja (Slika 29A, B). Kao najaktivniji mutant izdvaja se varijanta 38, praćen varijantom 41, pri čemu obe varijante daju najveće i potpuno transparentne zone prosvetljenja, za razliku od drugih mutanata koji daju polu-transparentne zone prosvetljenja (Slika 29B). Statistička analiza uzima u obzir isključivo prečnik zone, što je dovelo do grupisanja manje aktivnih mutanata 37 i 40 zajedno sa najaktivnijim mutantima 38 i 41 (Slika 29A,B).



Slika 29. Poređenje aktivnosti mutantnih biblioteka dobijenih pomoću rekonstrukcije predačkog gena (33-41), konsenzus dizajna (S, T) i dirigovane evolucije (D1-D3). Na 0,2 % (w/V) PHO emulziji u agarozu praćena je A) aktivnost celih ćelija ujednačenih po OD₆₀₀, B) aktivnost CFE po ujednačenom OD₆₀₀. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD za eksperimente izvedene u triplicatu (n = 3). Statistička analiza izvedena je primenom Tukey HSD testa. Srednje vrednosti označene različitim slovima statistički se značajno razlikuju (p < 0,05).

Najaktivniji mutanti 38 i 41 dobijeni ASR pristupom pokazuju i najveće unapređenje termostabilnosti u poređenju sa ostalim mutantima (Slika 30A), zadržavajući aktivnost na temperaturama iznad 60 °C tokom 30 min inkubacije. Tokom ispitivanja aktivnosti varijanti PfPHOaze na PHO u difuzionom eseju uočene su razlike ne samo u prečniku, već i u intenzitetu zone prosvetljenja kao što je

prethodno prijavljeno u literaturi (90), što ukazuje na različit stepen hidrolize polimera (Slika 29A, 30B). Kako statistička analiza uzima u obzir isključivo prečnik zone, oslanjanje samo na ovaj test može dovesti do pristrasnosti pri izboru najaktivnijih mutanata. Stoga je nakon inicijalne selekcije najboljih mutanata za dalju statističku analizu i poređenje varijanti korišćen pNP-monomer kao model supstrat za PHO, uz potvrdu aktivnosti na PHO.

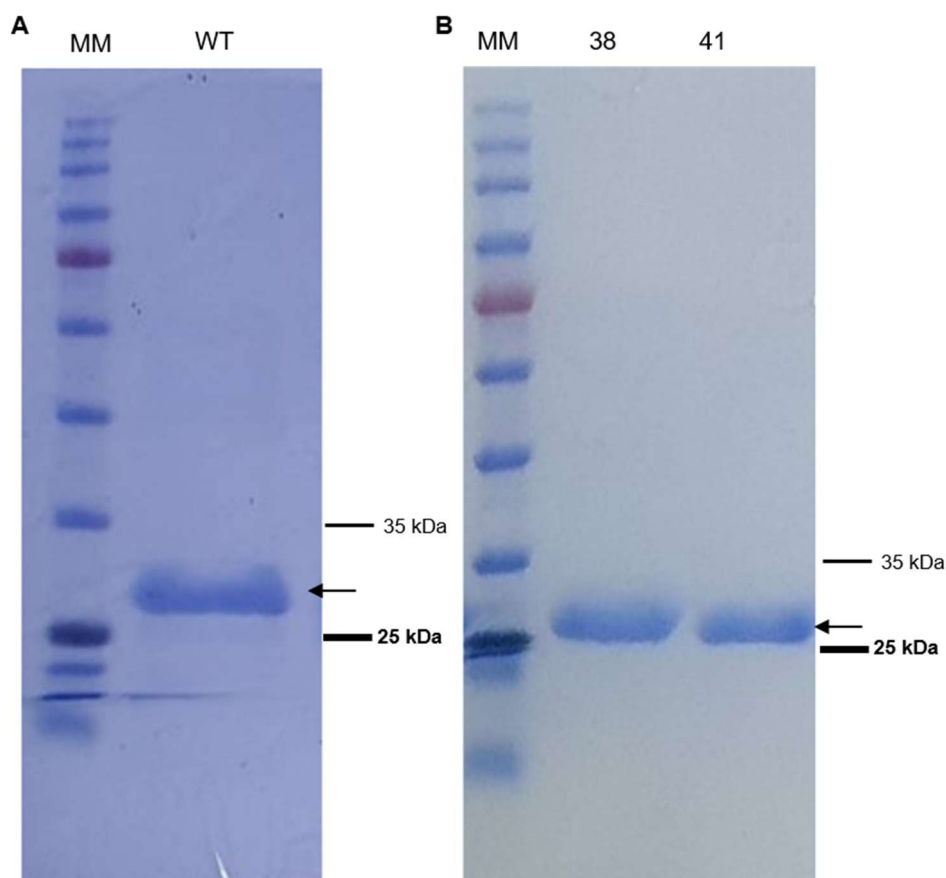


Slika 30. Poređenje termostabilnosti mutančnih biblioteka dobijenih pomoću rekonstrukcije predačkog gena (37-41), konsenzus dizajna (S, T) i dirigovane evolucije (D1-D3). Na 0,2 % (w/V) PHO emulziji u agarozu praćena je A) aktivnost CFE po ujednačenom OD₆₀₀ nakon inkubacije od 30 min na naznačenoj temperaturi. B) Poređenje termostabilnosti odabranih najstabilnijih varijanti PfPHOaze u užem temperaturnom opsegu. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ SD za eksperimente izvedene u triplikatu ($n = 3$). Statistička analiza nije urađena zbog razlika u intenzitetu zone prosvetljenja među mutantima, pored dijametra.

5.1.12 Detaljnija karakterizacija unapređenih varijanti PfPHOaze dobijenih pomoću ASR

5.1.12.1 Prečišćavanje unapređenih varijanti PfPHOaze dobijenih pomoću ASR

Unapređene predačke varijante PfPHOaze 38 i 41 su prečišćene paralelno sa wild-type enzimom za potrebe dalje karakterizacije. Prečišćavanje je postignuto korišćenjem IMAC. Na Slici 31 je prikazana čistoća krajnjih preparata WT (Slika 31A) i varijanti 38 i 41 (Slika 31B) analizirana pomoću SDS-PAGE.



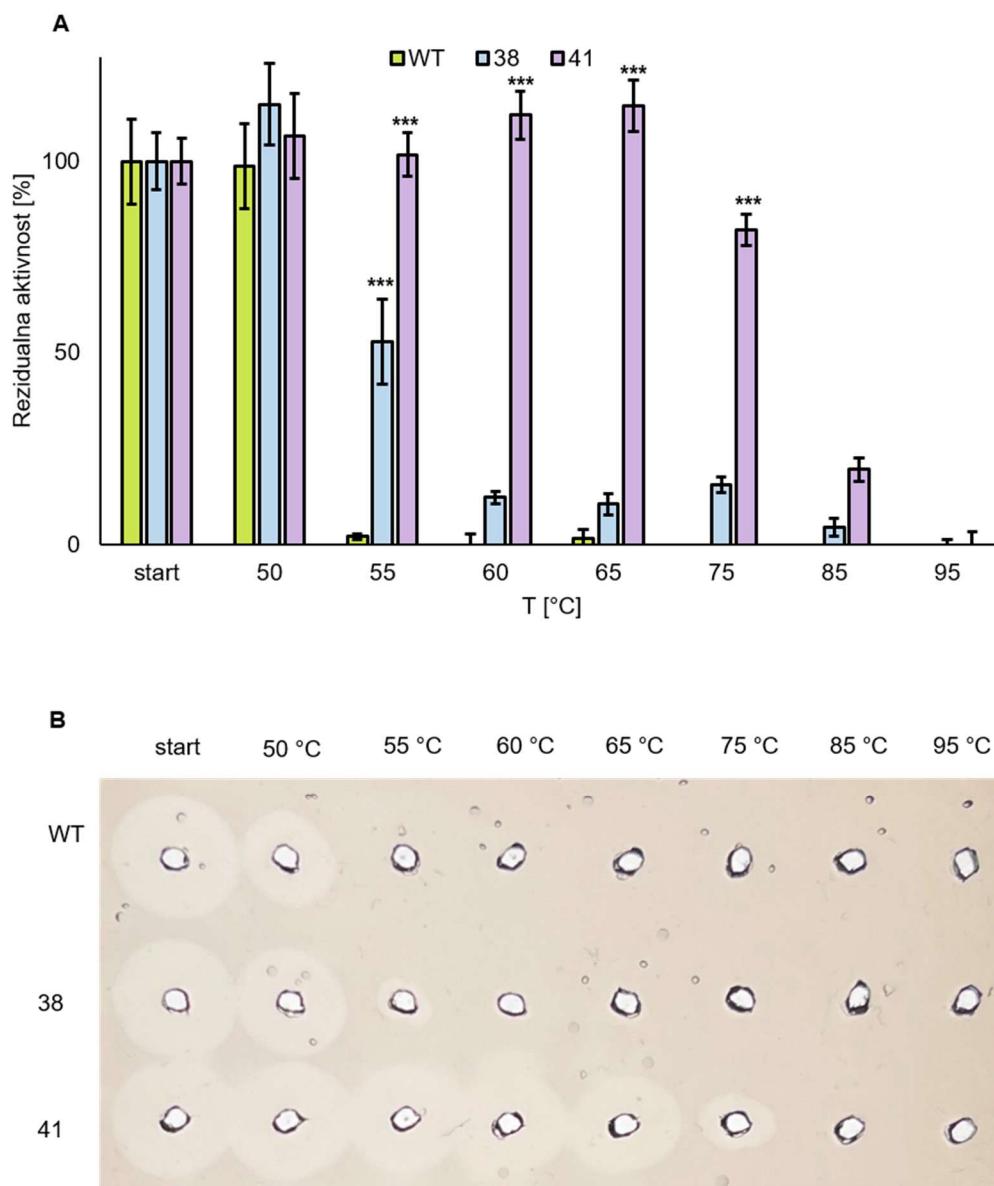
Slika 31. SDS-PAGE analiza čistoće preparata A) wild-type PfPHOaze i njenih predačkih varijanti B) 38 i 41 nakon prečišćavanja CFE koristeći IMAC.

Nakon prečišćavanja do visoke čistoće iz CFE dobijeno je 0,28 mg/L, 5 mg/L i 4,7 mg/L proteina za WT, 38 i 41. Visoka hidrofobnost PfPHOaze može doprineti smanjenoj rastvornoj ekspresiji i povećanoj sklonosti ka agregaciji, što dodatno može otežati prečišćavanje i dalju obradu proteina (97,166,172). Skor rastvorljivosti PfPHOaze i varijanti 38 i 41 iznosi 0,33, 0,39 i 0,32. Skor rastvorljivosti iznad 0,5 ukazuje na rastvorljivu ekspresiju, dok skor ispod 0,5 ukazuje na nerastvorljivu ekspresiju u bakteriji *E. coli*. Dobijeni rezultati su u skladu sa prethodno opisanim skorom rastvorljivosti od 0,5 za PHA depolimerazu iz *Comamonas testosteroni* 31A i 0,66–0,76 za PHA-depolimeraze iz *Cupriavidus* sp. T1, *Marinobacter algicola* DG893, *Pseudomonas stutzeri* i *Ralstonia* sp (162). Neke od strategija za dalje unapređenje ekspresije hidrofobnih proteina obuhvataju promenu ekspresionog sistema, korišćenje fuzionih partnera za povećanje solubilne ekspresije i koekspresiju molekularnih šaperona, čime se može povećati rastvorljivost i smanjiti agregacija proteina (183,184).

5.1.12.2 Ispitivanje termostabilnosti unapređenih varijanti PfPHOaze dobijenih pomoću ASR

Termostabilnost unapređenih varijanti 38 i 41 je poređena sa wild-type PfPHOaze. Prethodno je u literaturi opisano da PfPHOaza pokazuje temperaturni optimum na 40 - 45 °C (166,172), a potpuno se inaktivira nakon par min na 52 °C (166,172). Među drugim ekstracelularnim mcl-PHA-depolimerazama (167–171), depolimeraza iz *Pseudomonas alcaligenes* M4-7 pokazuje najslabiju termostabilnost sa potpunom inaktivacijom nakon 10 min na 52 °C i nešto niži temperaturni optimum od 35 °C. Mcl-PHA-depolimeraze iz *Pseudomonas alcaligenes* LB19 i *Pseudomonas* sp. RY-1 inaktiviraju se na 55 °C i 50 °C nakon 1 h. Najbolju termostabilnost pokazuje mcl-PHA-depolimeraza iz *Streptomyces* sp. KJ-72

inaktivira se nakon 1 h na 60 °C. Zbog toga je termostabilnost ispitivana merenjem rezidualne aktivnosti PfPHOaze i njenih unapređenih varijanti 38 i 41 nakon 30 min inkubacije na temperaturama u opsegu od 50 °C do 95 °C (Slika 32).



Slika 32. Određivanje temperaturene stabilnosti predačkih varijanti PfPHOaze 38 i 41 u poređenju sa wild-type enzimom (WT). Aktivnost prečišćenih enzima je testirana praćenjem hidrolize A) 0,3 mM pNPO; B) 0,2 % (w/v) PHO emulzije u agarози. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ SD za eksperimente izvedene u triplikatu ($n = 3$). Statistička analiza izvedena je primenom Dunnett testa. Statistički značajne razlike između mutanata i WT enzima označene su simbolima: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Prvi put je unapređena termostabilnost PfPHOaze proteinskim inženjerstvom, kao i cele klase mcl-PHA-depolimeraza. Prethodno je postignuta stabilizacija PfPHOaze imobilizacijom na polipropilenskom nosaču Accurel MP-1000 čime je termostabilnost unapređena sa potpune inaktivacije nakon par min na 52 °C na zadržavanje 58% i 10 % aktivnosti nakon 15 min na 55 °C i 60 °C (172). Slično, varijanta 38 zadržava 53 % i 12 % aktivnosti nakon 30 min na 55 °C i 60 °C (Slika 32A).

Varijanta 41 zadržava 82% i 19 % aktivnosti nakon 30 min na 75 °C i 85 °C, dok se potpuna inaktivacija postiže između 85 °C i 95 °C (Slika 32A,B).

Pomoću ASR pristupa termostabilnost mezofilne PfPHOaze je unapređena za ~30 °C čime se dostiže temperatura inaktivacije karakteristična za najtermofilnije PHA-depolimeraze zastupljene u prirodi do danas. PHB-depolimeraze iz *Thermus thermophilus* HB8 (Tt_{HB8}PHBaza) (185), *Lihuaxuella thermophila* (LtPHBaza) (186) i *Thermanaeromonas tohohensis* (TtPHBaza) (187) pokazuju sličan temperaturni optimum na 70 °C ali se značajno razlikuju u pogledu stabilnosti prilikom produžene inkubacije na povišenim temperaturama. Tt_{HB8}PHBaza zadržava 50 % i 45 % aktivnosti nakon 4 h inkubacije na 70 °C i 80 °C. LtPHBaza zadržava 88 % aktivnosti na 65 °C tokom 3 dana inkubacije, a potpuno se inaktivira na 78 °C. TtPHBaza pokazuje temperaturu topljenja (T_m) na 72 °C. Temperaturni optimum PHB-depolimeraze iz termofilne bakterije *Streptomyces* sp. MG je na 60 °C, ali se potpuno inaktivira nakon 15 min na 80 °C (188).

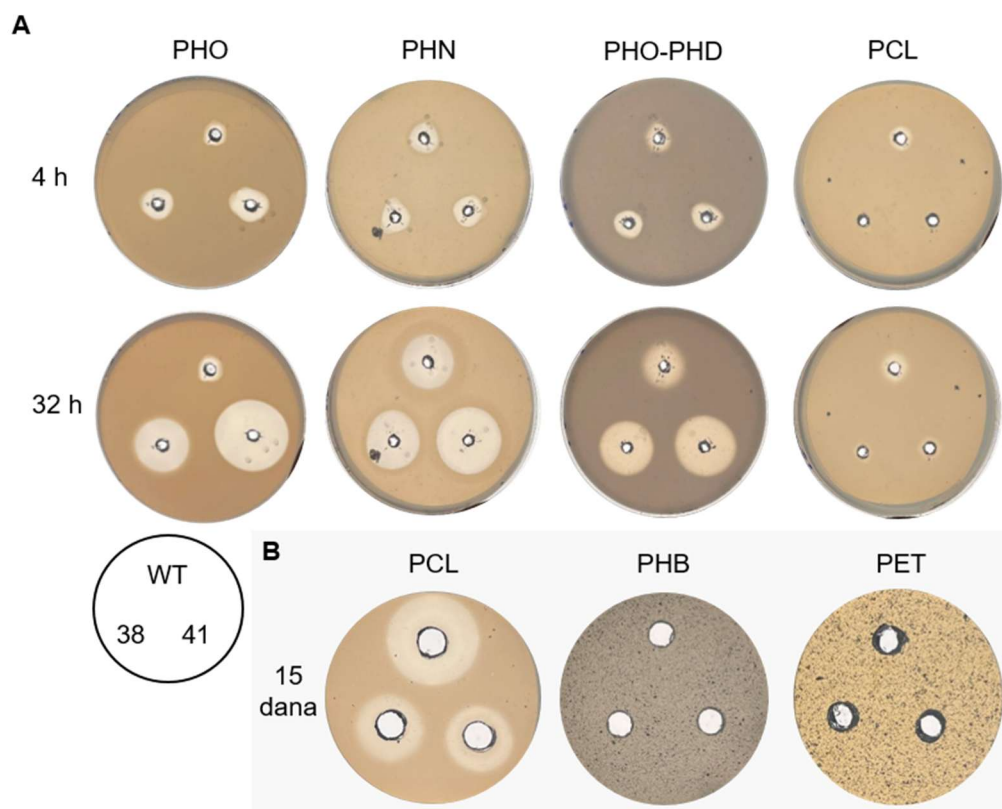
Slično dobijenom unapređenju stabilnosti PfPHOaze u ovom radu, proteinskim inženjerstvom PETaze razvijena je DuraPETaza, najtermostabilnija do sada opisana varijanta, kojoj je T_m povećan za 38,4 °C primenom kompjuterskog redizajniranja dostižući T_m od 83,5 °C (59,189). Mašinsko učenje, kao ASR-u srodan semiracionalan pristup, omogućilo je razvoj FAST-PETaze, koja je pokazala superiornu PET-hidrolitičku aktivnost u odnosu na DuraPETazu u rasponu od 30 °C do 50 °C, dok je aktivnost DuraPETaze veća pri temperaturama od 55 °C do 60 °C (156). ASR je pored enzima za razgradnju plastike takođe primenjen i na drugim klasama enzima, sa povećanjem T_m i do 35 °C u slučaju reduktaza karboksilnih kiselina (143).

Povećanje stabilnosti enzima često je praćeno smanjenjem njegove katalitičke aktivnosti, što ukazuje na postojanje kompromisa između stabilnosti i aktivnosti (*engl.* stability–activity trade-off) (190). Stabilizujuće mutacije mogu ograničiti fleksibilnost proteinske strukture neophodnu za efikasno vezivanje supstrata i katalizu, dok povećana fleksibilnost može doprineti većoj katalitičkoj aktivnosti i čak razvoju nove aktivnosti, ali istovremeno smanjiti stabilnost enzima (191,192). Zbog toga je dalje poređena aktivnost termostabilnih varijanti 38 i 41 sa wild-type PfPHOazom na širem spektru poliestarskih supstrata, kao i kinetički parametri hidrolize PHO model jedinjenja.

5.1.12.3 Ispitivanje poliestarske supstratne specifičnosti unapređenih varijanti PfPHOaze dobijenih pomoću ASR

U literaturi je opisana aktivnost PfPHOaze na PHO i PHO-PHD kopolimeru, nasuprot PHB, PHBV i njihovom kopolimeru (166). U manjoj meri PfPHOaza razgrađuje i PCL (174), kao i druge mcl-PHA-depolimeraze iz *Streptomyces roseolus* SL3 i *Pseudomonas alcaligenes* LB19 (193). Mcl-PHA-depolimeraza iz *Pseudomonas alcaligenes* M4-7 hidrolizuje PHO, PHN, PHPV ali ne PHB, PHBV i PCL (194). Mcl-PHA-depolimeraza iz *Pseudomonas* sp. RY-1 hidrolizuje PHO ili PHN, i takođe ne pokazuje aktivnost na scl-PHA (170). Vrlo uska supstratna specifičnost prema polimernim supstratima je karakteristika PHA-depolimeraza, uključujući i scl-PHA-depolimeraze koje pokazuju inverznu supstratnu specifičnost u odnosu na mcl-PHA-depolimeraze. Najproučenija scl-PHA-depolimeraza je PHB-depolimeraza iz *Ralstonia pickettii* T1 (RpPHBaza), prethodno klasifikovane i kao *Alcaligenes faecalis* T1 (161,195–197). RpPHBaza hidrolizuje PHB (P(3HB)), i analoge PHB i PLA sa izmenjenom pozicijom hidroksi grupe - P(4HB) i P(3HP) - dok se pomoću supstrat-vezujućeg domena vezuje i za PLA (P(2HP)) i PCL (P(6HH)), ali ih ne hidrolizuje (198). U komparativnoj studiji RpPHBaze sa PHB-depolimerazama poreklom iz *Pseudomonas stutzeri* i *Comamonas acidovorans*, sva tri enzima su takođe hidrolizovala PHB, P(4HB) i P(3HP), a nisu hidrolizovale PLA, PCL, PHO, iako su se intenzivno vezivale za površinu PLA (199). Za supstrat-vezujući domen (SVD) RpPHBaze brzina

adsorpcije se smanjuje sledećim redosledom: PLA > PHO > PS > PE, korelirajući sa gustinom karbonilnih grupa po jedinici površine polimera (200,201). Stoga, iako je specifičnost adsorpcije SVD za biopoliestre široka, uska specifičnost hidrolize PHA-depolimeraza potiče od arhitekture aktivnog mesta katalitičkog domena koji u slučaju scl-PHA-depolimeraza prepoznaje kraće bočne lance (C3-C5) sa pozicijom hidroksilne grupe na C3 ili C4, dok mcl-PHA-depolimeraze preferiraju duže bočne lance (C6-C14) sa pozicijama hidroksilnih grupa na C3 u slučaju mcl-PHA ili C6 u slučaju PCL. Na Slici 33 ispitana je poliesterazna aktivnost predačkih varijanti 38 i 41 u poređenju sa wild-type P_fPHOazom.



Slika 33. Ispitivanje poliesterazne aktivnosti predačkih varijanti P_fPHOaze 38 i 41 u poređenju sa wild-type enzimom (WT) u difuzionom eseju sa 0,2 % (w/v) emulzijom polimera u agarozu. Hidroliza polimera je praćena tokom A) 32 h sa 1,25 µg enzima za PHO, PHN, PHO-PHD i PCL; B) 15 dana sa 2,5 µg enzima za PCL, PHB i PET.

U skladu sa prethodnom literaturom, uska supstratna specifičnost P_fPHOaze je evolutivno visoko očuvana s obzirom na to da wild type kao i predačke varijante 38 i 41 pokazuju aktivnost na mcl-PHA kao što su PHO, PHN i PHD (Slika 33A), ali ne pokazuju aktivnost na scl-PHA poput PHB (Slika 33B). Takođe, P_fPHOaza kao i predačke varijante pokazuju sposobnost hidrolize PCL (Slika 33A, B). Smanjena aktivnost predačkih varijanti na PCL u poređenju sa wild-type enzimom ukazuje na evoluciju P_fPHOaze ka poboljšanom prihvatanju PCL kao supstrata (Slika 33A, B). Slično, primenom ASR na IsPETazi, pokazano je da je aktivnost na PET plastici kao supstratu prvobitno bila slabo izražena, sekundarna funkcija enzima, koja se evolutivno pojačavala postajući primarna funkcija ovog enzima (202). Primena ASR na druge klase enzima, poput enzima za razgradnju lignina i sintetičkih pesticida, je takođe pokazala da se evolucija novih katalitičkih aktivnosti enzima oslanja na već postojeće, manje izražene aktivnosti predačkih enzima (203). Evolutivno proširenje supstratne specifičnosti enzima nudi

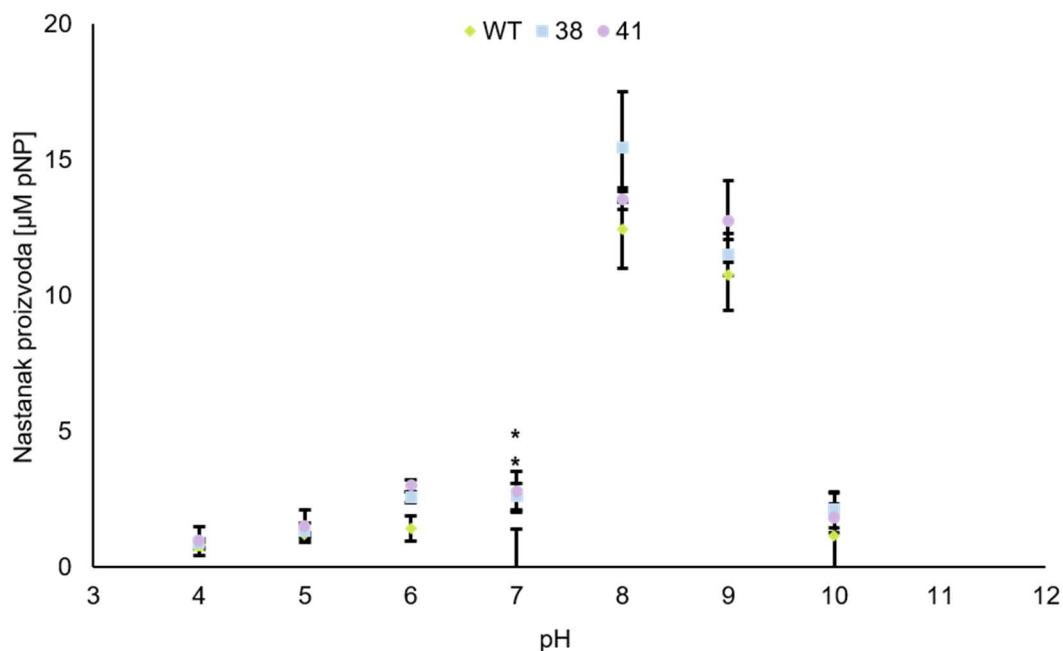
metaboličku prednost kojom mikroorganizmi mogu da koriste alternativne izvore ugljenika iz životne sredine (204), što bi u kontekstu mcl-PHA-depolimeraza omogućilo iskorišćenje većeg spektra mcl-PHA ili drugih prirodnih analoga PCL, poput kutina koji je široko rasprostranjen u otpadu biljnog porekla (205).

Iako je prethodno opisana vrlo niska aktivnost PfPHOaze na PET (206,207), naši rezultati ne pokazuju aktivnost na PET tokom 15 dana inkubacije sa 2,5 μg enzima, ni sa wild-type enzimom, a ni sa predačkim varijantama 38 i 41 (Slika 33B).

Predačke varijante 38 i 41 pokazuju unapređenu hidolizu mcl-PHA, s obzirom na to da se hidroliza mcl-PHA nastavlja sa produžetkom inkubacije u slučaju predačkih varijanti, a zaustavlja u slučaju wild type enzima (Slika 33A). Prethodno opisana unapređena termostabilnost obe varijante (Slika 33) može doprineti i povećanom poluživotu enzima tokom biokatalitičkog procesa (208,209). Takođe, promena u pH optimumu i stabilnosti enzima, kao i različiti kinetički parametri prepoznavanja i hidrolize supstrata, kao i osetljivosti na inhibiciju proizvodima hidrolize mogu biti neki od uzroka primećene razlike u kinetici hidrolize polimera.

5.1.12.4 Ispitivanje pH optimuma unapređenih varijanti PfPHOaze dobijenih pomoću ASR

Kako bi se utvrdilo da li razlike u kinetici hidrolize mcl-PHA između predačkih varijanti i wild-type enzima potiču od njihove različite osetljivosti na promene pH tokom reakcije ispitan je njihov pH optimum (Slika 34). Većina PHA-depolimeraza pokazuje optimalnu aktivnost u baznoj sredini i neaktivne su na nižim pH (162). Za mcl-PHA-depolimeraze poreklom iz *P. fluorescens* GK13, *Pseudomonas* sp. RY-1, *P. alcaligenes* LB19, *Pseudomonas alcaligenes* M4-7, *Pseudomonas luteola* M13-4 i *Streptomyces* sp. KJ-72 pH optimum je u vrlo uskom pH opsegu pH 8,5-9,0 (194).



Slika 34. Aktivnost predačkih varijanti PfPHOaze 38 i 41 u poređenju sa wild-type enzimom (WT) pri različitim pH sa 0,3 mM pNPO. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ SD za eksperimente izvedene u triplikatu ($n = 3$). Statistička analiza izvedena je primenom Dunnett testa. Statistički značajne razlike između mutanata i WT enzima označene su simbolima: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

PfPHOaza i predačke varijante 38 i 41 pokazuju statistički značajne razlike u izmerenoj aktivnosti na pH 7 u odnosu na WT (Slika 34). Stoga, razlika u osetljivosti na snižavanje pH tokom hidrolize pH može objasniti primećene razlike u kinetici hidrolize PHA (Slika 33A). Izmereni pH optimum za sva tri enzima je na pH 8,0 koristeći 0,1 M fosfatni pufer, i veća aktivnost u baznoj sredini u odnosu na kiselu sredinu je u skladu sa podacima u literaturi za PHA-depolimeraze (87,90).

5.1.12.5 Kinetika hidrolize PHO model jedinjenja unapređenim varijantama PfPHOaze dobijenih pomoću ASR

Da bi se ispitao efekat mutacija na vezivanje i brzinu konverzije supstrata analizirani su kinetički parametri unapređenih varijanti 38 i 41 u poređenju sa WT PfPHOazom (Tabela 18). Za analizu kinetičkih parametara korišćena su PHO model jedinjenja koja omogućavaju kvantitativno praćenje hidrolize pojedinačne estarske veze, konkretno pNP-monomer koji se u prethodnim eksperimentima istovremeno pokazao i kao specifičniji od pNP-dimera i komercijalno dostupnog pNPO supstrata.

Tabela 18. Kinetički parametri wild-type PfPHOaze i njenih ASR mutanata za pNP-PHO monomer

PfPHO Enzim	pNP-monomer			
	Km (μM)	Vmax ($\mu\text{M/s}$)	Kcat (1/s)	Kcat/Km (1/(s $\times$ μM))
WT	34,95	1,46	0,16	$4,57 \times 10^{-3}$
38	522,49	0,34	0,04	$7,66 \times 10^{-5}$
41	3528,5	1,69	0,19	$5,38 \times 10^{-5}$

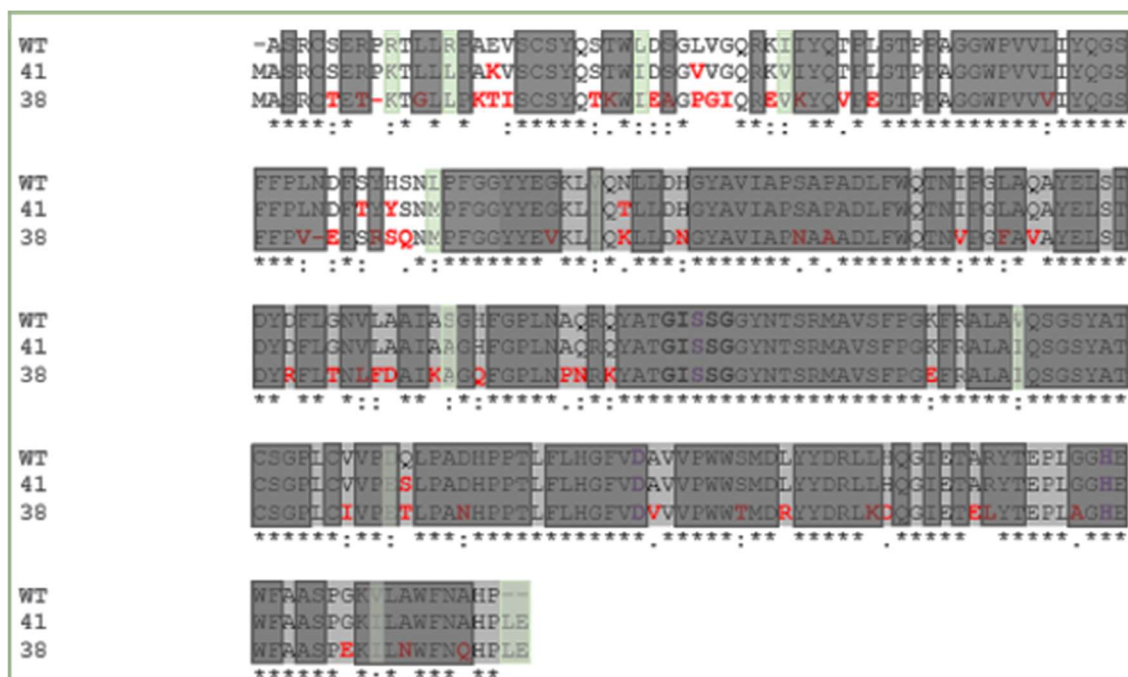
Varijanta 41 pokazuje povećanje Vmax sa 1,46 $\mu\text{M/s}$ na 1,69 $\mu\text{M/s}$, i smanjenje afiniteta vezivanja porastom Km sa 34,95 μM na 3528,5 μM u odnosu na WT (Tabela 18). Suprotno, varijanta 38 pokazuje smanjenje Vmax sa 1,46 $\mu\text{M/s}$ na 0,34 $\mu\text{M/s}$ i smanjenje afiniteta vezivanja porastom Km sa 34,95 μM na 522,49 μM . Opisane promene rezultuju smanjenom katalitičkom efikasnošću (Kcat/Km) varijanti 38 i 41 za dva reda veličine u odnosu na WT što rezultuje sporijom hidrolizom supstrata koja je u skladu sa prethodnim eksperimentima. Stoga se može zaključiti da su veće zone prosvetljenja na mcl-PHA sa produžetkom inkubacije varijanti 38 i 41 u odnosu na WT (Slika 33A) direktna posledica izmerene unapređene stabilnosti ovih varijanti (Slika 32, 34).

Tokom evolucije PfPHOaze došlo je do razvoja katalitičkih funkcija, povećanja katalitičke efikasnosti na PHO (Tabela 18, Slika 33A) i proširenja supstratne specifičnosti na PCL (Slika 33A, B), uz istovremeno smanjenje termostabilnosti enzima (Slika 32). Destabilizujuće mutacije koje su se akumulirale u wild-type PfPHOazi kroz njenu evoluciju od termostabilnih varijanti 38 i 41 dovele su do povećanja katalitičke efikasnosti i povećanja aktivnosti na PCL. Uočen trend je prethodno opisan kod različitih proteina i predstavlja široko poznat kompromis između stabilnosti i aktivnosti (*engl.* stability–activity trade-off) (190–192).

5.1.12.6 Identifikacija ključnih mutacija unapređenih varijanti PfPHOaze dobijenih pomoću

ASR

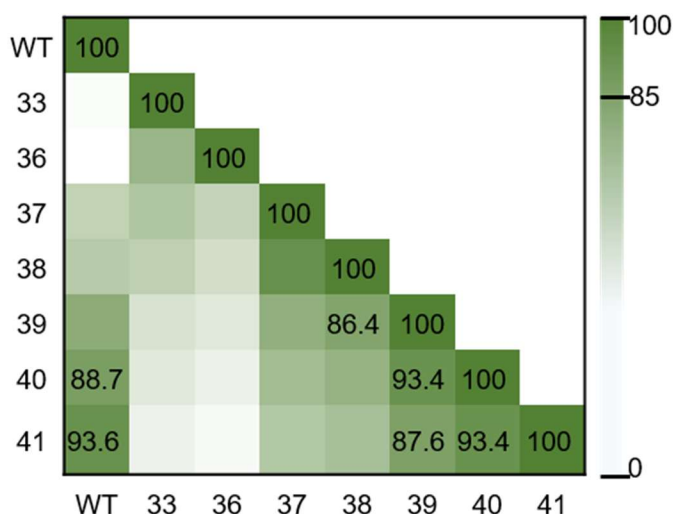
Poređenjem aktivnosti i termostabilnosti rekonstruisanih predačkih varijanti PfPHOaze moguće je identifikovati mutacije koje korelišu sa promenama u ovim svojstvima i identifikovati ključne mutacije za budući razvoj biokatalizatora za razgradnju mcl-PHA. U literaturi su do sada skoro bez izuzetka proučavane mutacije depolimeraza uključenih u razgradnju scl-PHA (197,210–214). S obzirom na to da su u našim eksperimentima mutanti dobijeni pomoću ASR dali najveće povećanje aktivnosti i termostabilnosti (Slika 29, 30), upoređena je sekvenca dve najviše unapređene predačke varijante 38 i 41 sa wild-type PfPHOazom kako bi se identifikovale zajedničke i jedinstvene mutacije u njima (Slika 35).



Slika 35. Višestruko poravnanje sekvenci (*engl.* MSA) wild-type PfPHOaze (WT) i njenih unapređenih predačkih varijanti 38 i 41 pomoću CLUSTALW. Visoko konzervirani regioni u sekvenci PfPHOaze su uokvireni tamno sivom bojom, dok je svetlo sivom bojom označen region katalitičkog domena. Aminokiseline koje čine katalitičku trijadu su podebljane ljubičastom bojom, a pentapeptidna sekvenca svojstvena lipazama je podebljana crnom bojom. Mutacije koje su zajedničke za obe predačke varijante su uokvirene zelenom bojom, a mutacije koje su jedinstvene za svaku varijantu su podebljane crvenom bojom. Konzerviranost aminokiselina na svakoj poziciji označena je simbolom (*) za očuvanje identične aminokiseline, (:) za visoku konzerviranost supstituisane aminokiseline sa sličnim hemijskim i evolutivnim svojstvima, (.) za umerenu konzerviranost, dok pozicije bez oznake ukazuju na odsustvo konzerviranosti.

Na Slici 35 se može uočiti da se od 18 mutacija prisutnih kod varijante 41, 5 mutacija nalazi u visoko konzerviranim regionima PfPHOaze (194), za razliku od varijante 38 kod koje je 25 mutacija od 70 mutacija u visoko konzerviranom regionu. Višestruko poravnanje sekvenci pokazalo je 12 zajedničkih mutacija, kao i 58 i 6 jedinstvenih mutacija za varijante 38 i 41 (Slika 35). Da bi se dalje ispitalo da li su zajedničke mutacije zaista svojstvene unapređenim varijantama, kao i da li su jedinstvene mutacije unapređenih varijanti zaista jedinstvene analizirana je njihova zastupljenost i u drugim

varijantama koje nisu pokazale unapređenje aktivnosti. Za odabir varijanti sa visokom sličnošću sekvenci sa unapređenim varijantama 38 i 41 korišćen je BLOSUM score poravnanja parova sekvenci u CLUSTALW. Na Slici 36 prikazana je matrica poravnanja parova sekvenci svih varijanti dobijenih pomoću ASR, sa istaknutim numeričkim vrednostima za skor veći od 85.



Slika 36. Analiza sličnosti aminokiselinskih sekvenci predačkih varijanti PfPHOaze dobijenih pomoću ASR izražena kao BLOSUM skor poravnanja za svaki par sekvenci tokom višestrukog poravnanja sekvenci (*engl.* MSA) koristeći CLUSTALW.

U skladu sa prethodnom MSA analizom wild-type PfPHOaze i unapređenih varijanti 38 i 41, kojom je pokazano da varijanta 38 ima znatno veći broj mutacija (70) nego varijanta 41 (18) (Slika 35), varijanta 41 daje visok stepen sličnosti sa WT, sa skorom identičnosti od 93,6, dok varijanta 38 ima niži stepen sličnosti sa WT, sa skorom identičnosti od 71 (Slika 36). Varijanta 39 daje skor identičnosti od 86,4 i 87,6 sa unapređenim varijantama 38 i 41, dok varijanta 40 daje skor identičnosti od 80,5 i 93,4 sa varijantama 38 i 41 (Slika 36). Za dalju analizu jedinstvenosti mutacija u unapređenim varijantama 38 i 41 poređene su sve sekvence sa skorom identičnosti iznad 85, te je urađena MSA analiza unapređene varijante 41 sa varijantama 39 i 40 koje nisu pokazale unapređenje aktivnosti (Slika 37), kao i unapređene varijante 38 sa varijantom 39 (Slika 38).

WT	-ASRCSERPRTLLRPAEVSCSYQSTWLDISGLVGQRKIIYQTPLGTPPAGGWFPVLIYQGS
41	MASRCSERPRTLLRPAKVCSCSYQSTWIDSGVVGQRKVYQTPLGTPPAGGWFPVLIYQGS
40	MASRCTETPKTLLLPKAVSCSYQTTWIDSGVVGQRKVYQLPLGTPPAGGWFPVLIYQGS
39	MASRCTETPKTGLLPATISCSYQTTWIDSGVVGQRKVYQVPQGTTPPAGGWFPVLIYQGS
	****:* *: * * * :*****:***:*****: * * *****
WT	FFFLNDFS YHSNLPFGGYEGKLVQNLLDHGYAVIAPSAPADLFWQTNPGLAQAYELST
41	FFFLNDFS YYSNMPFGGYEGKLIQTLLDHGYAVIAPSAPADLFWQTNPGLAQAYELST
40	FFFLNDFS YHSNMPFGGYEGKLIQTLLDHGYAVIAPSAPADLFWQTNVPGLAQAYELST
39	FFPVNDFS YSSNMPFGGYEGKLIQKLLDHGYAVIAPNAPADLFWQTNVPGLAQAYELST
	::* *:*****:*.*****:*****:***:*****
WT	DYDFLGNVLAALASGHFGPLNAQRQYATGISSGGYNTSRMAVSFPFGKFRALAIQSGSYAT
41	DYDFLGNVLAALAAAGHFGPLNAQRQYATGISSGGYNTSRMAVSFPFGKFRALAIQSGSYAT
40	DYDFLSNVFDAIAAGQGFGPLNPQRQYATGISSGGYNTSRMAVSFPGEFRALAIQSGSYAT
39	DYRFLSNVFDAIKAGQFGPLNPNRQYATGISSGGYNTSRMAVSFPGEFRALAIQSGSYAT
	** **.**: ** :*:*****:*****:*****:*****:*****
WT	CSGPLCVVPDQLPADHPPTLFLHGFVDVVPWWSMDLYDRLLHQGIETARYTEPLGGHE
41	CSGPLCVVPESLPADHPPTLFLHGFVDVVPWWSMDLYDRLLHQGIETARYTEPLGGHE
40	CSGPLCVVPESLPADHPPTLFLHGFVDVVPWWTMDLYDRLLDQGIETARYTEPLGGHE
39	CSGPLCVVPELTPADHPPTLFLHGFVDVVPWWTMDRYDRLLDQGIETARYTEPLGGHE
	*****: *****:*** *****.***** *****
WT	WFAASPGKVLAWFNAHE---
41	WFAASPGKILAWFNAHELE
40	WFAASPGKILAWFNAHELE
39	WFAASPDKILAWFNQHELE
	*****.*:***** **

Slika 37. Višestruko poravnavanje sekvenci (*engl.* MSA) wild-type PfPHOaze (WT) sa unapređenom predačkom varijantom 41 i njenim homolognim varijantama 39 i 40 dobijenim pomoću ASR koristeći CLUSTALW. Crvenom bojom su podebljane sve mutacije jedinstvene za varijantu 41 kada se ona poredi sa drugom unapređenom varijantom 38, a zelenom bojom su uokvirene njihove zajedničke mutacije. Iz obeleženog seta aminokiselina žutom bojom su uokvirene sve mutacije jedinstvene za unapređenu varijantu 41 nakon njenog poređenja sa varijantama 39 i 40 koje nisu pokazale unapređenu aktivnost. Konzerviranost aminokiselina na svakoj poziciji je označena simbolom (*) za očuvanje identične aminokiseline, (:) za visoku konzerviranost supstituiscane aminokiseline sa sličnim hemijskim i evolutivnim svojstvima, (.) za umerenu konzerviranost, dok pozicije bez oznake ukazuju na odsustvo konzerviranosti.

MSA analiza unapređene varijante 41 sa varijantama 39 i 40 (Slika 37) ističe da su S67T i H69Y mutacije označene žutom bojom jedinstvene za varijantu 41 koja pokazuje unapređenje aktivnosti i najveće povećanje termostabilnosti. S obzirom na to da su mutacije S67T i H69Y jedinstvene za varijantu 41 i kada se ona poredi sa varijantom 38 koja pokazuje manje povećanje termostabilnosti (Slika 35), ove dve mutacije su dobri kandidati za dalju *in silico* analizu ili ciljanu mutagenezu kako bi se ispitaio njihov efekat na termostabilnost PfPHOaze. Nasuprot tome, mutacije prethodno identifikovane kao zajedničke za termostabilnije i aktivnije varijante 38 i 41 (Slika 35), prisutne su i u varijantama 39 i 40 koje nisu pokazale poboljšanje aktivnosti/termostabilnosti (Slika 37). Zbog toga su daljom MSA analizom varijanti 38 i 39 upoređene samo mutacije jedinstvene za varijantu 38 (Slika 38), identifikovane na osnovu prethodne MSA analize varijante 38 sa varijantom 41 (Slika 35).

38	MASRC TET -KTGLLP TI SCSYQT WI EA GFGI QR EV KYQ VF ETPPAGGWFPVV VI YQGS
39	MASRCTETPKTGLLPATISCSYQTWIDSGVVGQRKVYQVFCGTPPAGGWFPVVLIIYQGS
WT	-ASRCSERPRTLRLPAEVSCSYQS W LDSGLVGQRKIIYQTPLGTPPAGGWFPVVLIIYQGS
	****:* : * * * :*****:****: * ** :*****:*****
38	FF FV - EFS RS QNMPFGGY EV KLIQ KLLD GYAVIAP NA ADLFWQTN VPGFA VAYELST
39	FFPVNDFSYSNMPFGGYEGKLIQKLLDGYAVIAPNAFADLFWQTNVPGFAQAYELST
WT	FFPLNDFSYSNLPFGGYEGKLVQNLLDGYAVIAPSAFADLFWQTNIPGLAQAYELST
	: :** .*:** ***:*****:*****:*.*****:***:*****
38	DY RFL NI FD AI KAG Q FGPL PNR YATGISSGGYNTSRMAVSFP GE FRALAIQSGSYAT
39	DYRFLSNVFDAIKAGQFGPLPNRQYATGISSGGYNTSRMAVSFPGEFRALAIQSGSYAT
WT	DYDFLSNVLAIASGHGFGPLNAQRQYATGISSGGYNTSRMAVSFPKGFRALAVQSGSYAT
	** ** *: : ** *:*****:*****:*****:*****:*****:*****
38	CSG PLC IV PE TL PA HP PTLFLHG FVD VVPFW TMDR YDRL KD QGIET LY TEPL AG HE
39	CSGPLCVVPETLPACHPPTLFLHGFDVVPFWWTMDRYDRLLDQGIETALYTEPLGGHE
WT	CSGPLCVVPDQLPACHPPTLFLHGFDVVPFWWSMDLYDRLHQGIETARYTEPLGGHE
	*****:***: ***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
38	WFAAS P E KIL N WFN QH P LE
39	WFAAS P E KIL AW FN QH P LE
WT	WFAAS P G KVL AW FN A H P--
	***** * ** * ** *

Slika 38. Višestruko poravnanje sekvenci (*engl.* MSA) wild-type PfPHOaze (WT) sa unapređenom predačkom varijantom 38 i njenom homolognom varijantom 39 dobijenom pomoću ASR koristeći CLUSTALW. Crvenom bojom su podebljane sve mutacije jedinstvene za varijantu 38 kada se ona poredi sa drugom unapređenom varijantom 41. Iz obeleženog seta aminokiselina žutom bojom su uokvirene sve mutacije jedinstvene za unapređenu varijantu 38 nakon njenog poređenja sa varijantom 39 sa kojom deli skor identičnosti od 87,6, a koja nije pokazala unapređenu aktivnost. Konzerviranost aminokiselina na svakoj poziciji je označena je simbolom (*) za očuvanje identične aminokiseline, (:) za visoku konzerviranost supstituisane aminokiseline sa sličnim hemijskim i evolutivnim svojstvima, (.) za umerenu konzerviranost, dok pozicije bez oznake ukazuju na odsustvo konzerviranosti.

Varijante 38 i 41 imaju sličnu aktivnost (Slika 33A) ali varijanta 38 pokazuje manje povećanje termostabilnosti u odnosu na varijantu 41 (Slika 32), zbog značajno povećane stope mutacija pri čemu je 25 od 70 mutacija zastupljeno u visoko konzerviranim regionima varijante 38 (Slika 35). MSA analiza varijante 38 sa varijantom 39 koja ne pokazuje unapređenje aktivnosti, pokazala je 29 jedinstvenih mutacija u sekvenci varijante 38 (Slika 38). Iako je broj mutacija po kojima se varijanta 38 i 39 razlikuju veliki, očigledno je da one kumulativno doprinose izmerenom povećanju aktivnosti varijante 38 u odnosu na varijantu 39 (Slika 29), kao i unapređenju termostabilnosti u manjoj meri za varijantu 38 u poređenju sa varijantom 41 (Slika 30).

5.2. Biokatalitička razgradnja PLA

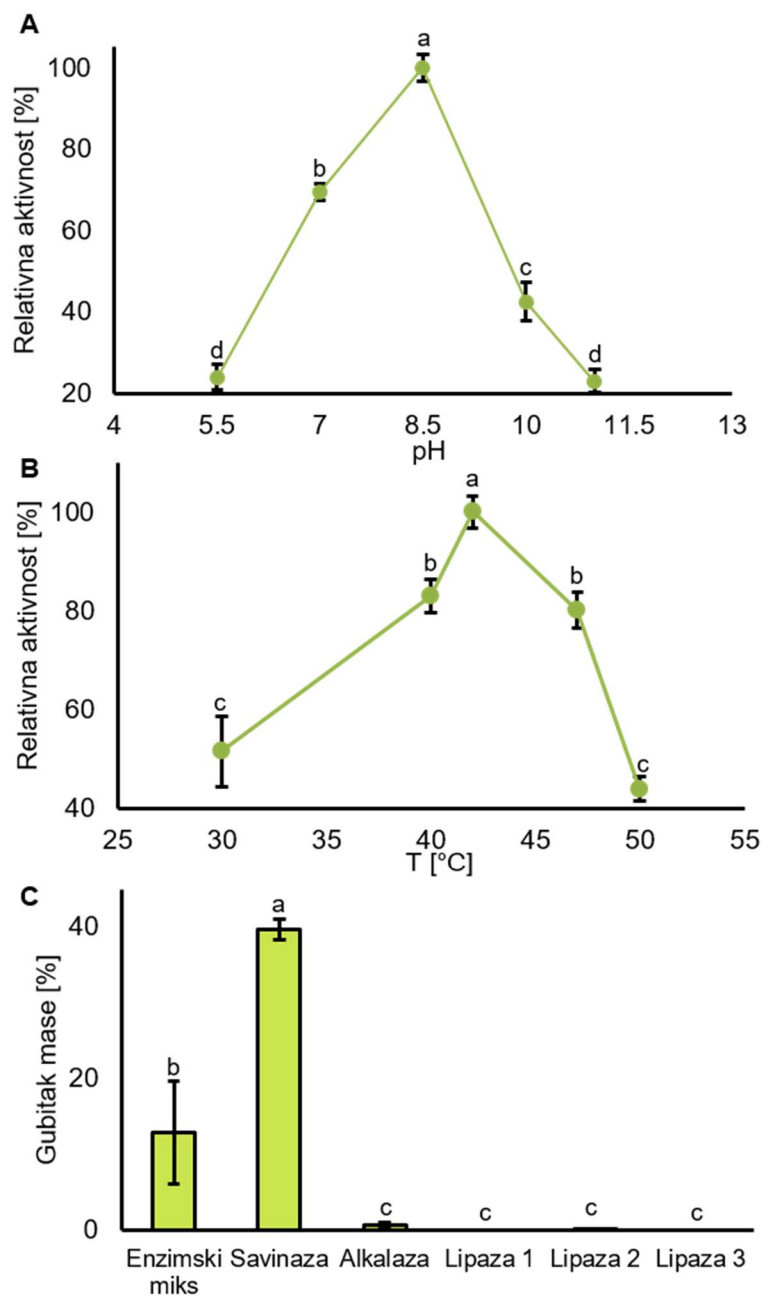
5.2.1 Odabir enzima i optimizacija reakcionih uslova - određivanje temperaturnog i pH optimuma

Komercijalni enzimi sa već uspostavljenom proizvodnjom na većoj skali, poput Savinaze koja se primenjuje u industriji deterdženata, su već dostupni na tržištu ali nisu dovoljno ispitani kao PLA-depolimeraze. Optimalni uslovi za razgradnju PLA pomoću Savinaze i drugih komercijalnih proteaza nisu određeni, a njihov potencijal za razgradnju PLA je okarakterisan na optimalnoj temperaturi za Proteinazu K od 50 °C (32). Kombinovanje proteaza sa lipazama nudi potencijal za razgradnju oba tipa PLA, i poli(L-mlečne kiseline) (*engl.* poly(L-lactic acid), PLLA) i poli(D-mlečne kiseline) (*engl.* poly(D-lactic acid), PDLA), zahvaljujući njihovoj visokoj specifičnosti prema različitim tipovima PLA, te je napravljen enzimski miks imobilisanog komercijalno dostupnog preparata Savinaze sa komercijalnim preparatima alkalaze i imobilisanim lipazama iz *Rhizomucor miehei* i *Pseudomonas cepacia*, kao i Serowar PL lipazom poreklom iz mlečne industrije.

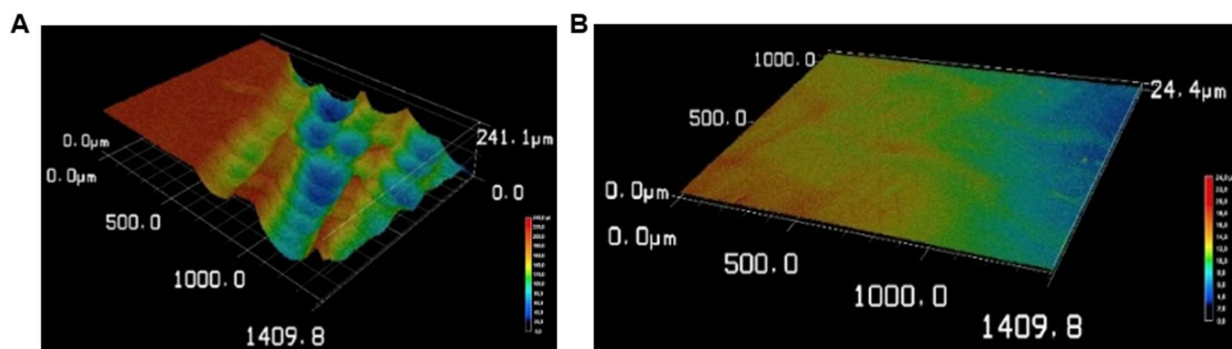
Savinaza razgrađuje PLA u širokom opsegu ispitivanih uslova (pH 7–10 i temperatura 30-50 °C), a optimalni uslovi za njenu aktivnost su pH 8,5 i 42 °C (Slika 39A, B). Ovi rezultati su u skladu sa literaturnim vrednostima za druge alkalne proteaze koje pokazuju aktivnost prema PLA pri pH vrednostima između 8-9 i temperaturama 37-60 °C (215). Stoga Savinaza pripada mezofilnim PLA-depolimerazama, što može doprineti smanjenju energetske potrošnje tokom procesa depolimerizacije PLA.

Savinaza postiže 2,25 puta veću degradaciju PLA u poređenju sa korišćenim enzimskim miksom i pokazuje veću efikasnost od svakog pojedinačnog enzima koji je ušao u sastav enzimskog miksa (Slika 39C). Primena samo Savinaze omogućila je smanjenje potrebne količine enzima za čak 200 puta u odnosu na enzimsku mešavinu. Na osnovu dobijenih rezultata, Savinaza je odabrana kao model enzim koji je u nastavku istraživanja korišćen za razvoj efikasnije biokatalitičke razgradnje PLA.

Proces degradacije PLA filma posredstvom Savinaze vizualizovana je konfokalnom laserskom skenirajućom mikroskopijom (*engl.* confocal laser scanning microscopy, CLSM) (Slika 40A, B). Uočena je postepena razgradnja površine PLA, koja počinje od ivica PLA filma sa udubljenjima dubine do 200 µm (Slika 40A). Nasuprot tome, film inkubiran samo u puferu zadržao je glatku površinu (Slika 40B).



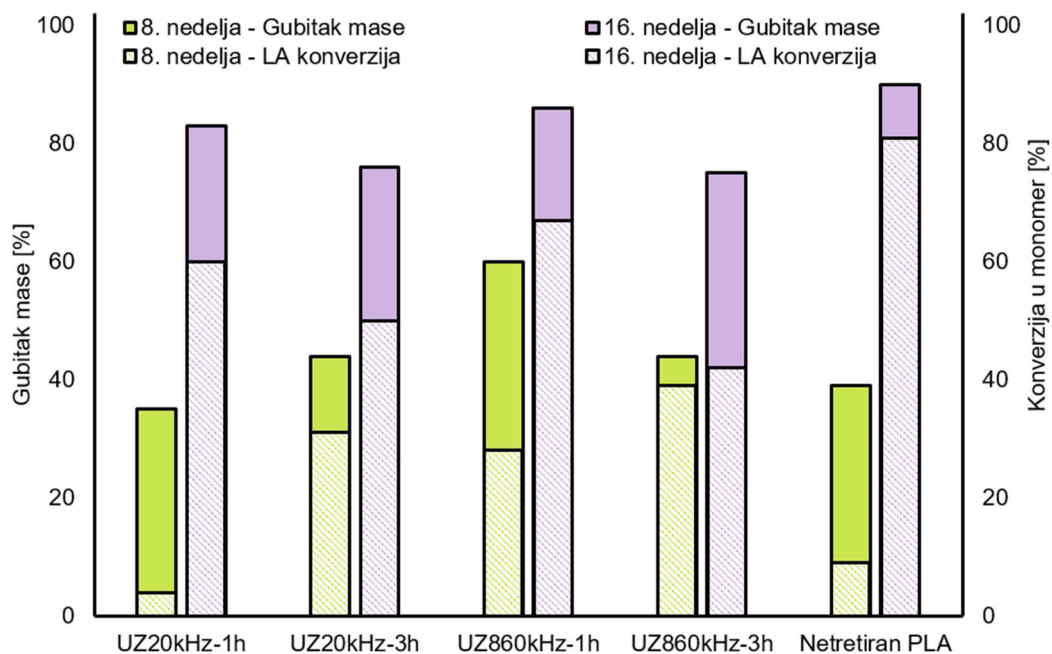
Slika 39. Degradacija PLA hc-Filma pomoću Savinaze u zavisnosti od A) reakcione pH; B) reakcione temperature; C) i pri poređenju efikasnosti Savinaze sa enzimskim miksom i sa pojedinačnim aktivnostima enzima uključenih u miks. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ SD za eksperimente izvedene u triplicatu ($n = 3$). Statistička analiza izvedena je primenom Tukey HSD testa. Srednje vrednosti označene različitim slovima statistički se značajno razlikuju ($p < 0,05$).



Slika 40. CLSM analiza površine PLA hc-Filmova nakon enzimске razgradnje: A) uzorak nakon enzimске hidrolize i B) kontrolni uzorak inkubiran u puferu bez enzima.

5.2.2 Predtretman PLA za unapređenje biorazgradivosti

Različitim predtretmanima polimera, koji mogu biti termalni ili netermalni, se može postići unapređenje biorazgradivosti polimera. Netermalni predtretmani zahtevaju manji utrošak energije što je posebno značajno na većoj skali i mogu se podeliti na fotodegradacione predtretmane poput ultraljubičastog (UV) zračenja, mehaničke predtretmane poput ultrazvuka velike snage ili mehaničkog usitnjavanja i oksidativne predtretmane poput tretmana plazmom, kao i njihove moguće kombinacije (216–218). Nekoliko studija je pokazalo da fotodegradacija UV zračenjem i mehaničko usitnjavanje imaju pozitivan efekat na biorazgradnju polimera, dovodeći do njihove površinske degradacije čime se aktivira inertni sloj površine polimera ili do povećanja površine dostupne za biorazgradnju (219–222). Takođe, prethodno je pokazano da nepredtretirani PLA ne podleže biorazgradnji u anaerobnim uslovima, za razliku od termalno i hemijski predtretiranog PLA tokom čije biorazgradnje nastaje biogas (223). Zbog toga je dalje ispitan uticaj predtretmana ultrazvukom kao netermalnog predtretmana na enzimsku razgradnju PLA (Slika 41).

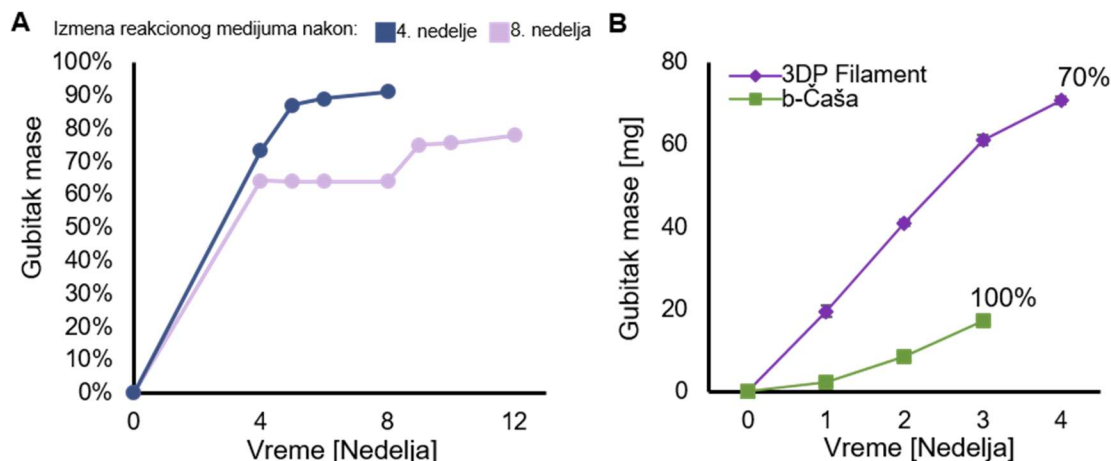


Slika 41. Gubitak mase (puna linija) PLA a-Filma pretretiranih ultrazvukom i njihova konverzija u monomer mlečne kiseline (šrafirano) tokom 8 i 16 nedelja razgradnje enzimskim miksom na pH 8,5 i 42 °C. Eksperiment je izveden u duplikatu (n = 2), zbog čega statistička analiza nije sprovedena.

Na Slici 41 prikazan je gubitak mase PLA a-Filma nakon 8 i 16 nedelja enzimske degradacije, zajedno sa količinom proizvedene mlečne kiseline izražene kao procenat odgovarajućeg gubitka mase za svaki metod predtretmana. Najefikasniji metod za aktivaciju degradacije PLA i konverziju u monomer mlečne kiseline je ultrazvuk frekvencije 860 kHz. U prvih 8 nedelja razgradnje, najbrže se razgrađuje uzorak tretiran ultrazvukom od 860 kHz tokom 1 h dostižući 60 % gubitka mase, dok je najveća konverzija u monomer mlečne kiseline od oko 40 % zabeležena kod uzorka tretiranog ultrazvukom od 860 kHz tokom 3 h. Nakon 16 nedelja, netretirani uzorak pokazuje razgradnju uporedivu sa tretiranim uzorcima od oko 90 % ukazujući na površinsku aktivaciju PLA tokom predtretmana, gde se nakon inicijalne razgradnje aktivirane površine ostatak polimera sporije razgrađuje. Rezultati ukazuju da je priroda primenjenih predtretmana prolazna i površinski ograničena, te nakon inicijalne aktivacije površine polimera i ubrzanja enzimske razgradnje dolazi do značajnog opadanja brzine enzimske hidrolize preostalog polimera.

5.2.3 Ispitivanje uticaja kontrole reakcionog pH na efikasnost hidrolize PLA

Tokom enzimske hidrolize PLA, efikasna kontrola pH predstavlja jedan od ključnih faktora, jer direktno utiče na aktivnost enzima i time na stabilnost i efikasnost procesa (224). S obzirom na to da se tokom razgradnje oslobađaju kiseli produkti koji mogu narušiti optimalne uslove reakcije, ispitana je regulacija pH putem izmene reakcionog medijuma i primenom dijalize (Slika 42).



Slika 42. Zavisnost biokatalitičke razgradnje PLA sa Savinazom od efikasnosti kontrole reakcionog pH. A) Tokom razgradnje hc-Filma PLA poređena je kinetika gubitka mase nakon zamene reakcionog medijuma nakon 4 i 8 nedelja. B) Kontinualna kontrola pH postignuta dijalizom reakcionog medijuma tokom razgradnje 3DP-Filamenta 1 i b-Čaše. Eksperimenti su izvedeni u duplikatu ($n = 2$), zbog čega statistička analiza nije sprovedena.

Rezultati pokazuju da je kontrola pH neophodna za postizanje kontinualne hidrolize PLA pomoću Savinaze za sva tri testirana PLA uzorka: hc-Film, 3DP-Filament 1 i b-Čašu (Slika 42A,B). Nakon četiri nedelje razgradnje PLA u istom reakcionom medijumu, proces razgradnje je zaustavljen, dok je nakon izmene reakcionog medijuma došlo do njegovog nastavka, kako prilikom izmene u četvrtoj, tako i nakon izmene u osmoj nedelji (Slika 42A). U eksperimentalnoj postavci korišćenoj u ovom radu, efikasna kontrola pH postignuta je dijalizom 5 mL reakcije razgradnje PLA prema 25 mL spoljašnjeg pufera, uz njegovu izmenu svakih 2 dana (Slika 42B).

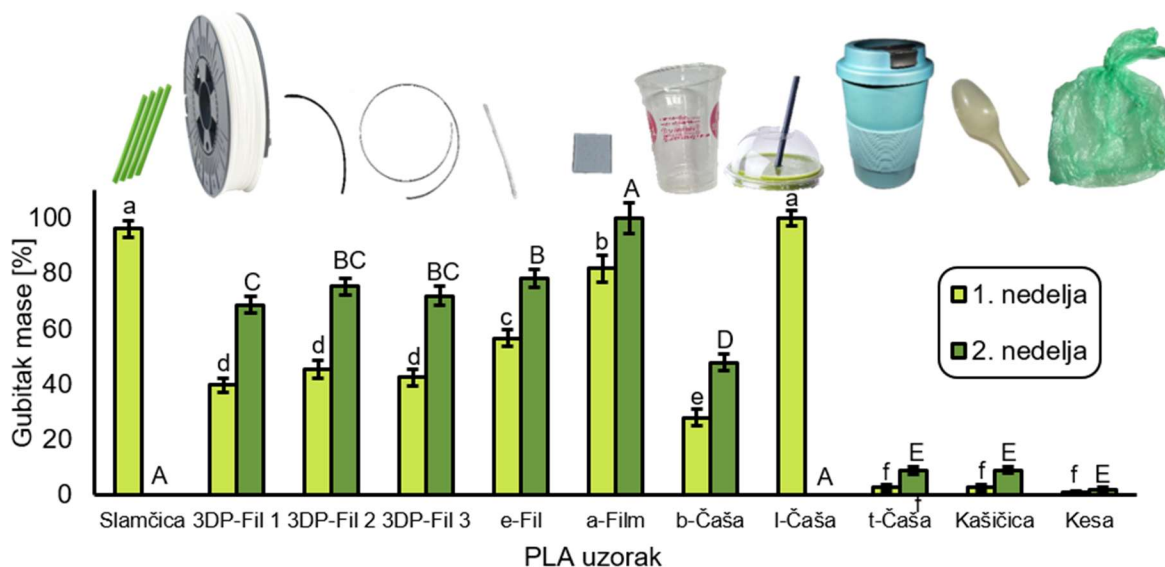
5.2.4 Ispitivanje efikasnosti biokatalitičke depolimerizacije PLA proizvoda potrošačkog kvaliteta

Uzevši u obzir da većina studija ispituje enzimsku razgradnju sprasjenih PLA materijala sa nepreciziranom kristalnošću, cilj ove studije bio je da se proceni efikasnost Savinaze u razgradnji PLA materijala sa aplikativnim karakteristikama iz PLA proizvoda potrošačkog kvaliteta. Termalna analiza svih korišćenih PLA materijala potrošačkog kvaliteta pre inkubacije sa enzimom je prikazana u Tabeli 19, a brzina razgradnje PLA proizvoda potrošačkog kvaliteta na Slici 43.

Tabela 19. Rezultati DSC analize komercijalnih PLA materijala korišćenih u studiji

Uzorak	T_m , °C ^a	ΔH_m , J/g ^b	X_c , % ^c	T_g , °C ^d	T_c , °C ^e	ΔH_c , J/g ^f
Slamčica	149,3	10,8	11,2	65,1	ND	ND
3DP-Filament 1	155,1	24,0	25,6	66,6	104,1	27,1
3DP-Filament 2	150,0	19,4	20,7	66,3	109,6	19,8
3DP-Filament 3	151,3	20,8	22,2	67,0	114,0	20,0
e-Filament	150,7	27,4	29,3	64,4	116,3	30,0
a-Film	153,9	6,8	7,30	66,0	119,8	8,50
b-Čaša	149,6	39,3	42,0	72,4	ND	ND
l-Čaša	150,0	21,4	22,9	66,6	109,8	20,2
t-Čaša	173,3	22,0	23,6	65,7	ND	ND
Kašičica	155,8	1,60	1,70	68,7	116,3	61,7
PLA prah	155,1	14,2	15,2	67,9	121,8	14,1
hc-Film	153,9	27,7	29,6	66,2	115,8	16,2
Kesa	156,4	1,2	1,28	60,3	ND	ND

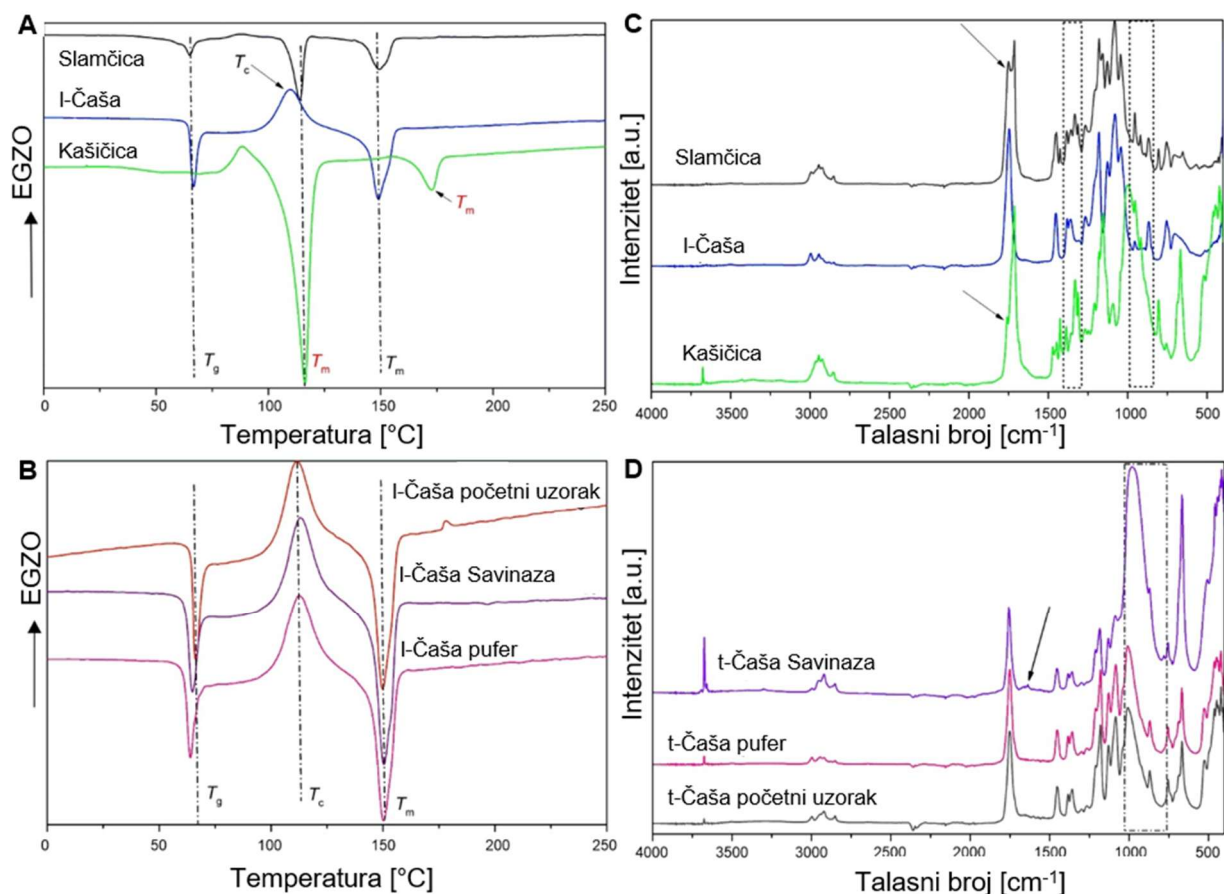
^a Temperatura topljenja, T_m ; ^b Entalpija topljenja, ΔH_m ; ^c Step en kristalnosti, X_c ; ^d Temperatura ostakljivanja, T_g ; ^e Temperatura kristalizacije, T_c ; ^f Entalpija kristalizacije, ΔH_c .



Slika 43. Biokatalitička razgradnja PLA uzoraka potrošačkog kvaliteta pomoću Savinaze (0,1 % (w/w)) na 42 °C i pH 8,5 tokom 2 nedelje. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ SD za eksperimente izvedene u triplicatu (n = 3). Statistička analiza izvedena je primenom Tukey HSD testa za svaku nedelju zasebno. Srednje vrednosti označene različitim slovima statistički se značajno razlikuju (p < 0,05).

Visoka efikasnost depolimerizacije pomoću Savinaze je pokazana na širokom spektru PLA supstrata potrošačkog kvaliteta. Svi testirani PLA materijali pokazali su gubitak mase u rasponu od 2 %, izmereno za višekratnu PLA čašu (t-Čaša) i kesu, do 100 % za poklopac čaše za jednokratnu upotrebu (l-Čaša) i PLA slamčicu u prvoj nedelji razgradnje (Slika 43). Uzorak l-Čaše (Xc 22,9 %) degradirao se najbrže postižući potpunu degradaciju za 6 dana, a nakon njega PLA slamčica (Xc 11,2 %) koja je izgubila 96 % mase u roku od 7 dana. Brzina njihove degradacije iznosila je 166 i 137 mg/(dan·mg Savinaze). U literaturi je pokazano da Proteinaza K postiže uporedivu brzinu razgradnje PLA filma (Xc nepoznat) od 142 mg/(dan·mg Proteinaze K) na 50 °C (32). HiC kutinaza je razgradila PLA prah (Xc 15,2 %) sa brzinom od 30,9 mg/(dan·mg HiC) na 55 °C uz periodično mehaničko mlevenje PLA (225). Kutinaza iz *Cryptococcus* sp. postiže potpunu degradaciju PLA praha (količina i Xc nepoznati) nakon 2,5 dana na 30 °C sa prijavljenom brzinom od 200 mg/(dan·mg kutinaze) (99). Višekratna čaša (t-Čaša), kašičica i kesa pokazale su najmanju podložnost razgradnji Savinazom u ispitivanim uslovima, što je verovatno posledica prisustva aditiva ili različitih površinskih obrada koje su sprečavale adsorpciju enzima i njegovo dejstvo. Stoga, razlike u enzimskoj degradaciji PLA u ovoj studiji naglašavaju važnost daljih istraživanja uticaja aditiva i mešanja PLA sa drugim materijalima na enzimsku razgradnju, kao preduslov za razvoj PLA materijala dizajniranih za degradaciju (226,227).

Termalnom i površinskom analizom ispitano je dejstvo prisustva/odsustva aditiva i/ili drugih polimera u strukturi PLA, i dodatno potvrđena enzimska razgradnja PLA (Slika 44, Tabela 20).



Slika 44. Termalna i površinska analiza odabranih komercijalno dostupnih PLA uzoraka. A) DSC analiza polaznih uzoraka PLA slamčice, l-Čaše i kašičice. B) DSC analiza l-Čaše pre i posle razgradnje sa Savinazom. C) FTIR analiza polaznih uzoraka PLA slamčice, l-Čaše i kašičice. D) FTIR analiza t-Čaše pre i posle razgradnje sa Savinazom.

Strukturne promene površine PLA materijala tokom razgradnje praćene su FTIR analizom (Slika 44). FTIR spektri svih uzoraka, osim slamčice i kašičice, ukazivali su na strukturu karakterističnu za čisti PLA, sa izraženim karakterističnim pikovima (228). Intenzivan pik na 1745 cm^{-1} pripisuje se vibraciji $\text{C}=\text{O}$ veza, dok se apsorpcioni pikovi na 2886 cm^{-1} pripisuju vibraciji CH_2 grupa, a na 1454 cm^{-1} i 1361 cm^{-1} asimetričnim i simetričnim vibracijama CH_3 grupa (229). Pikovi u oblasti od 1300 cm^{-1} do 1150 cm^{-1} se pripisuju vibracijama $\text{C}-\text{O}$ veza iz estarske grupe: a pri 1265 cm^{-1} i 1182 cm^{-1} se javlja savijanje $\text{C}-\text{O}$ i rastezanje $\text{CO}-\text{C}$ veze. U oblasti između 1000 cm^{-1} i 800 cm^{-1} , karakteristični pikovi na 962 cm^{-1} i 843 cm^{-1} pripisuju se vibracijama $\text{C}-\text{C}$ veza u amorfnoj fazi PLA (230). Dodatno, i DSC termogram l-Čaše pokazao je karakterističan termalni profil PLA, koji se nije menjao značajno tokom biorazgradnje, osim smanjenja T_g koje može ukazivati na smanjenje molekulske mase PLA (Slika 44A, B). Nasuprot tome, FTIR spektri slamčice i kašičice, zajedno sa DSC analizom (Slika 44A, C), ukazali su na prisustvo aditiva ili mešanje PLA sa drugim polimerom, s obzirom na prisustvo širokog pika u oblasti od 800 do 1000 cm^{-1} , dodatnog pika na 1750 cm^{-1} i pomeranje glavnog karbonilnog pika na 1715 cm^{-1} . Dodatno, u spektru PLA kašičice uočen je i izražen oštar pik na 670 cm^{-1} .

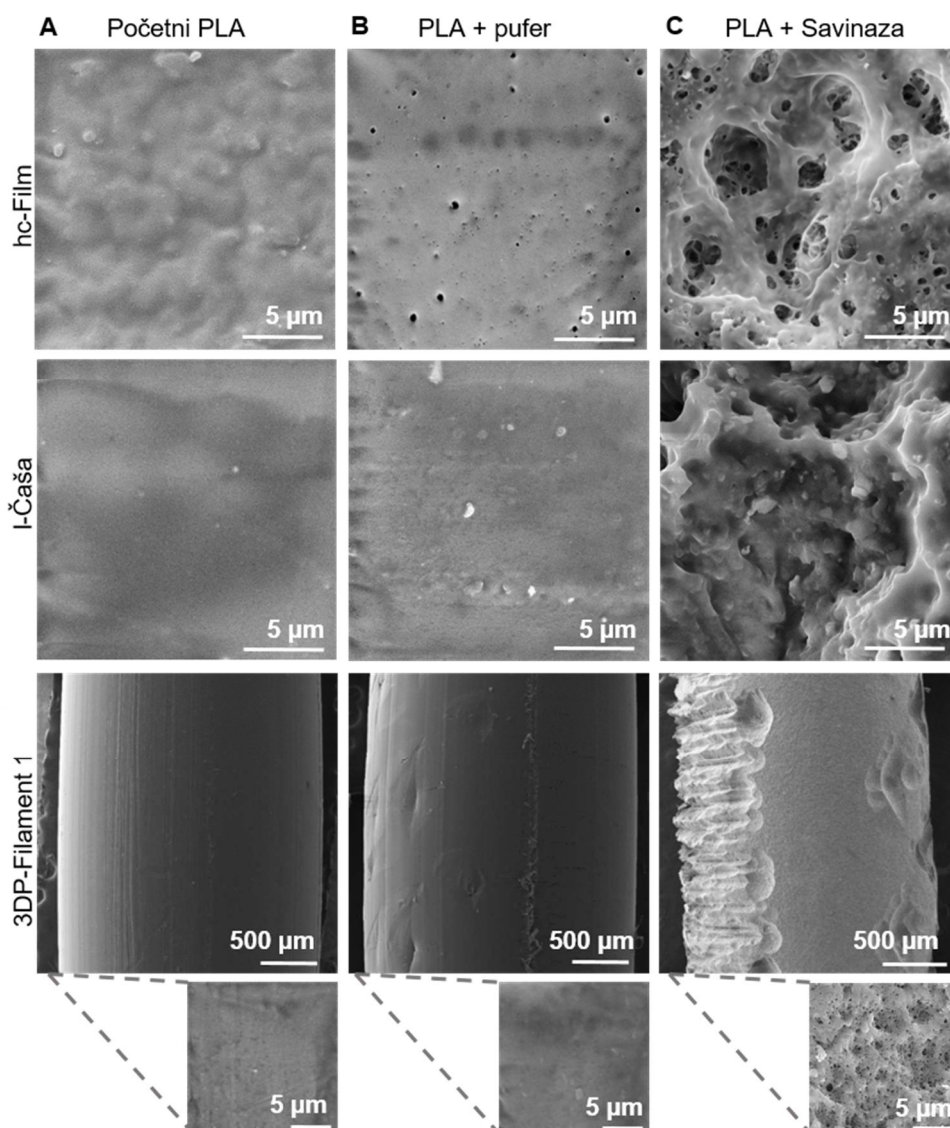
Uprkos malom gubitku mase (2,6 %) izmerenom za PLA uzorke t-Čaše, prema FTIR analizi primećene su strukturne promene. Za uzorke t-Čaše nakon enzimske razgradnje primećeno je širenje karakterističnog pika u oblasti od 800 do 1000 cm^{-1} (Slika 44D). Takođe, stepen kristalnosti se menjao i tokom hidrolitičke i enzimske razgradnje (Tabela 20).

Tabela 20. Rezultati DSC analize odabranih PLA uzoraka pre i nakon enzimske razgradnje

Uzorak	T_m , $^{\circ}\text{C}$	ΔH_m , J/g	X_c , %
l-Čaša početna	149,8	18,6	19,9
l-Čaša + pufer	150,0	17,5	18,7
l-Čaša + Savinaza	150,4	18,4	19,7
t-Čaša početna	173,3	22,0	23,6
t-Čaša + pufer	171,2	29,3	31,3
t-Čaša + Savinaza	170,4	29,9	31,9
hc-Film početna	153,9	27,7	29,6
hc-Film + pufer	158,9	39,6	42,3
hc-Film + Savinaza	158,8	31,5	33,7

Kako je PLA polukristalan polimer, povećanje X_c može se pripisati selektivnoj razgradnji amorfne faze, dok kristalni regioni ostaju stabilni, što dovodi do relativnog porasta kristalnosti (100).

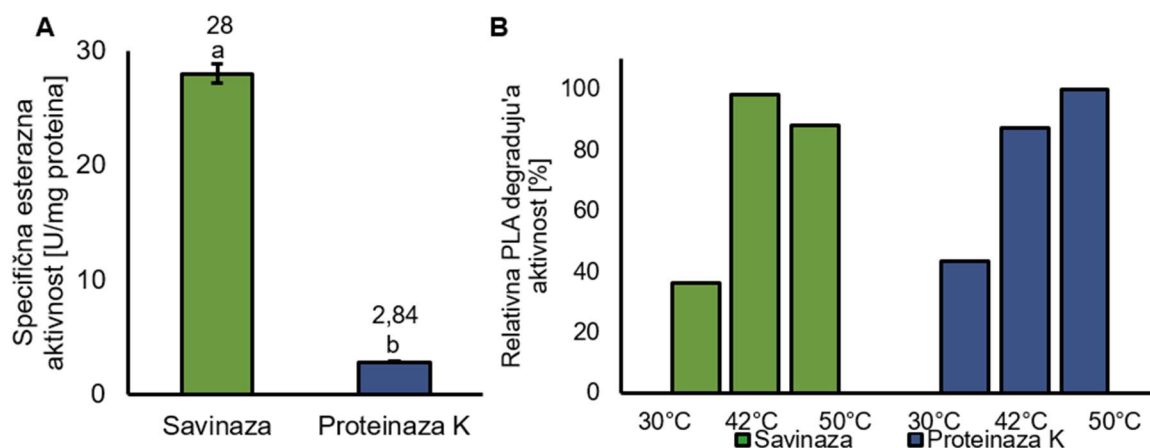
Morfološke promene PLA materijala nakon enzimske razgradnje pomoću Savinaze takođe su ispitivane pomoću FESEM (Slika 45). FESEM mikrografije su pružile jasan dokaz o biorazgradnji PLA uzoraka potrošačkog kvaliteta. Za odabrane PLA uzorke prikazane su reprezentativne SEM mikrografije: početni uzorak (Slika 45A), uzorak inkubiran u puferu (Slika 45B) i uzorak razgrađen Savinazom (Slika 45C). Početni PLA uzorci potrošačkog kvaliteta (l-Čaša i 3DP filament 1) pokazali su glatku morfologiju. Njihova površina je ostala gotovo nepromenjena nakon potapanja u pufer tokom 24 h – primećene su samo manje nepravilnosti i udubljenja – dok je kod uzoraka razgrađenih Savinazom primećena značajna dezintegracija površine. Kod hc-Filma koji je inkubiran 4 nedelje primećena je i abiotička hidroliza uzorka inkubiranog u puferu.



Slika 45. SEM analiza enzimske razgradnje PLA pomoću Savinaze. Promena u morfologiji PLA uzoraka potrošačkog kvaliteta potvrđena je poređenjem morfologije A) početnog uzorka PLA sa morfologijom uzorka nakon njegove B) inkubacije u puferu i C) inkubacije sa Savinazom.

5.2.5 Komparativna analiza efikasnosti Savinaze i Proteinaze K u depolimerizaciji PLA

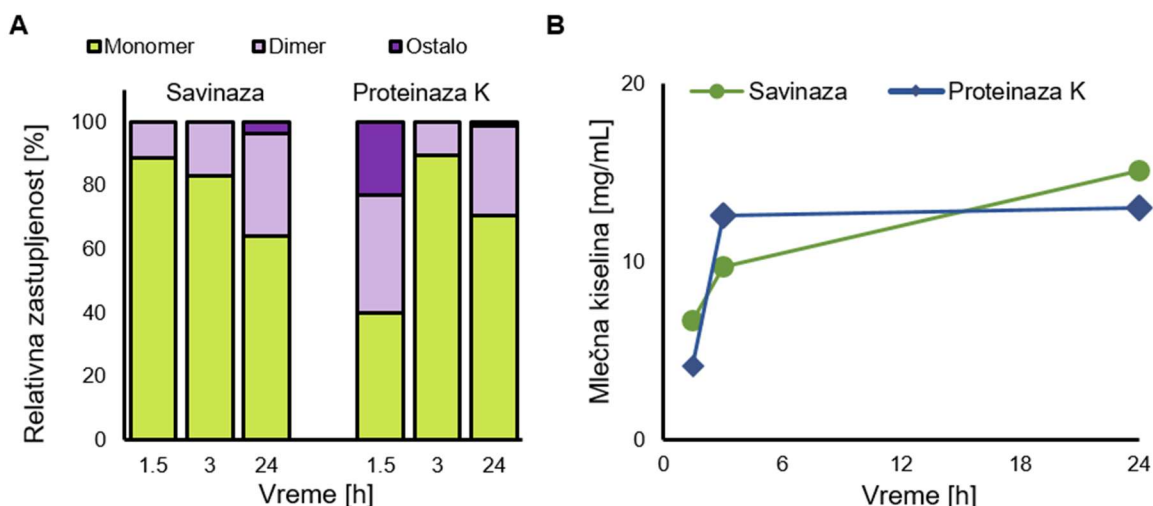
Hromogeni pNP-esteri karboksilnih kiselina su često korišćeni za određivanje monoesterazne aktivnosti esteraza, uključujući i one koje pripadaju PLA-depolimerazama tipa II (231). Do sada je objavljen mali broj studija o monoesteraznoj aktivnosti PLA-depolimeraza tipa I čija je primarna aktivnost proteolitička, pokazujući aktivnost Proteinaze K na pNP-acetatu i Savinaze na pNPB (232,233). U cilju proširivanja saznanja o dejstvu proteaza na monoestarske supstrate, kao i radi direktnog poređenja enzimske aktivnosti PLA-depolimeraza tipa I u razgradnji PLA kao poliestera, pNPB je korišćen za određivanje esterazne aktivnosti preparata Savinaze i Proteinaze K (Slika 46).



Slika 46. Poređenje efikasnosti Savinaze i Proteinaze K u hidrolitičkoj razgradnji PLA. A) Specifična esterazna aktivnost preparata PLA-depolimeraza proteaznog tipa određena na osnovu hidrolize monoestra - pNPB. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ SD za eksperimente izvedene u triplikatu ($n = 3$). Statistička analiza izvedena je primenom Tukey HSD testa. Srednje vrednosti označene različitim slovima statistički se značajno razlikuju ($p < 0,05$). B) Poliesterazna aktivnost na PLA ekvivalentnih koncentracija esteraznih jedinica Savinaze i Proteinaze K u zavisnosti od temperature. Eksperiment je izveden u duplikatu ($n = 2$), zbog čega statistička analiza nije sprovedena.

Specifična esterazna aktivnost preparata Savinaze je 10 puta veća od aktivnosti preparata Proteinaze K, kada se pNPB koristi kao supstrat (Slika 46A). Stoga, jednaka koncentracija esteraznih jedinica, postignuta korišćenjem 0,1 % (w/w) Savinaze i 1 % (w/w) Proteinaze K, je primenjena za poređenje efikasnosti navedenih enzima u razgradnji PLA u zavisnosti od temperature. Rezultati pokazuju da Savinaza postiže sličnu depolimerizaciju PLA na 42 °C kao i Proteinaza K na 50 °C (Slika 46B). Prethodno je prijavljeno da je među 56 komercijalnih preparata proteaza, Proteinaza K bila najefikasniji enzim za depolimerizaciju PLA, sa Savinazom na drugom mestu koja je postigla 50 % efikasnosti Proteinaze K (32). Međutim, testiranje je sprovedeno na 50 °C što je optimalna temperatura za Proteinazu K (224). Naši rezultati naglašavaju potrebu za poređenjem enzima na više različitih uslova.

Takođe, ujednačena koncentracija esteraznih jedinica Savinaze i Proteinaze K je upotrebljena zarad poređenja mehanizma hidrolitičkog dejstva oba enzima na PLA (Slika 47).

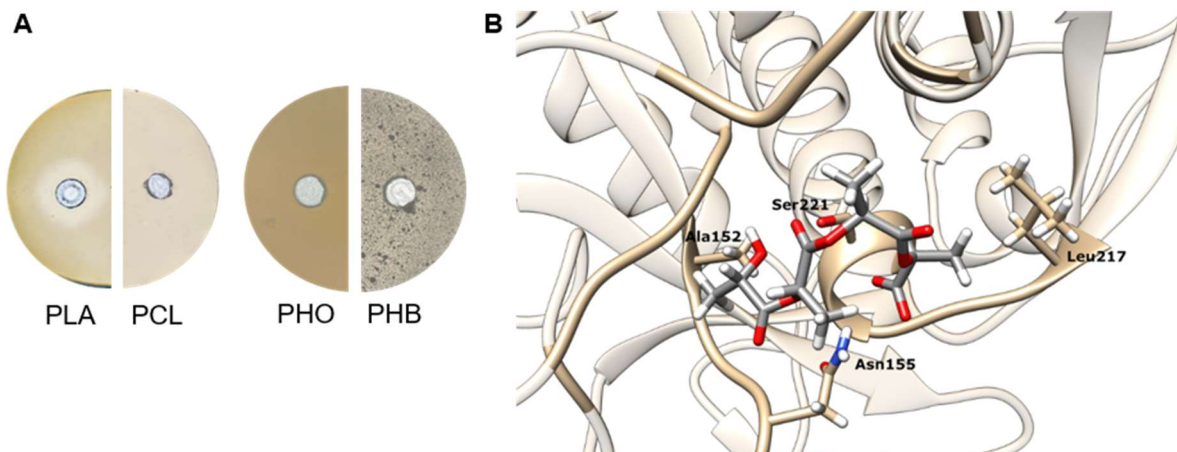


Slika 47. Mehanizam hidrolitičkog dejstva Savinaze na PLA u poređenju sa Proteinazom K. A) Relativna zastupljenost mlečne kiseline u odnosu na druge proizvode enzimske hidrolize PLA. B) Oslobođanje mlečne kiseline tokom 24 h hidrolize PLA pomoću 0,1 % (w/w) Savinaze i ekvivalentnih esteraznih jedinica Proteinaze K. Eksperimenti su izvedeni u duplikatu ($n = 2$), zbog čega statistička analiza nije sprovedena.

Monomer i dimer mlečne kiseline su detektovani kao glavni proizvodi razgradnje u reakcijama sa oba enzima, što potvrđuje efikasnost biokatalizatora u depolimerizaciji PLA zarad reciklaže monomera (Slika 47A). Savinaza i Proteinaza K oslobodili su 6,6 mg/mL i 4,1 mg/mL mlečne kiseline nakon 1,5 h, odnosno 15 mg/mL i 13 mg/mL nakon 24 h (Slika 47B), pokazujući različitu kinetiku oslobađanja mlečne kiseline. Najveća razlika u hidrolitičkom profilu primećena je tokom prvih 1,5 h, kada je monomer više nego dvostruko zastupljen među proizvodima hidrolize u slučaju Savinaze (89 % relativne zastupljenosti monomera) nego u slučaju Proteinaze K (40 % relativne zastupljenosti monomera). Tokom prvih 1,5 h hidrolize Savinazom od ostalih proizvoda oslobođeno je 11 % dimera, a Proteinazom K 37 % dimera i 23 % drugih oligomera (Slika 47A). Nakon 3 h, Proteinaza K konvertuje preostale oligomere u monomer (89 %) i dimer (11 %), postičući sličan profil kao Savinaza tokom 1,5 h i 3 h. Razlika u hidrolitičkom profilu može se objasniti trajnim zadržavanjem imobilisane Savinaze u rastvoru, čime se favorizuje nastajanje monomera od oslobođenih oligomera, dok je za Proteinazu K poznato da trajno adsorbuje na površinu PLA (26), te preferencijalno razgrađuje površinu polimera. Nakon 24 h, dimer je zastupljen kao proizvod hidrolize u slučaju oba enzima, dok su ostali oligomeri privremeni, što sugerise da se dimer razgrađuje sporije od drugih oligomera. Pojava monomera i oligomera ukazuje na to da i Savinazu i Proteinazu K karakteriše i endo- i egzo-tip hidrolize PLA, što je u skladu s delovanjem drugih PLA-depolimeraza (215).

5.2.6 Ispitivanje specifičnosti hidrolize i prepoznavanja PLA Savinazom u odnosu na druge biopoliestre

Savinaza je poznata kao proteaza široke supstratne specifičnosti, ali kao poliesteraza nije dovoljno okarakterisana zbog čega je dalje ispitana njena aktivnost na biopoliestrima (Slika 48).



Slika 48. Molekularna osnova prepoznavanja biopoliestara od strane Savinaze. A) Razgradnja biopoliestara na agarnim pločama nakon 10 dana inkubacije na 42 °C. B) Aktivno mesto Savinaze u kompleksu sa tetramerom L-mlečne kiseline.

Iako je Savinaza proteaza široke specifičnosti, kao poliesteraza pokazuje visoku selektivnost prema PLA. Korišćenjem difuzionog esaja potvrđeno je da Savinaza razgrađuje PLA, dok prema drugim biopoliestrima kao što su PCL, PHB i PHO ne pokazuje aktivnost tokom 10 dana inkubacije na 42 °C (Slika 48A). Za razliku od Savinaze kao PLA-depolimeraze tipa I, druge PLA-depolimeraze tipa II kao što su HiC (*engl. Humicola insolens* cutinase) i kutinaza poreklom iz *Cryptococcus sp.* mogu razgrađivati i druge poliestere (PET, PUR, PCL i PLA za HiC (234); PCL, PHB i PBS za kutinazu (99)). Visoka selektivnost koju Savinaza pokazuje prema polimernim supstratima je značajna zbog mogućnosti njene primene u procesu selektivne depolimerizacije PLA u mešanom plastičnom otpadu i plastičnim proizvodima. Slično, Savinaza je uspešno primenjena u selektivnoj depolimerizaciji vune u tekstilnim mešavinama PET plastike i vune, čime je izdvojen PET visoke čistoće u prinosu od preko 90 %, s obzirom da Savinaza ne razgrađuje PET (31).

Studija molekuskog dokinga pokazuje da su u specifično prepoznavanje PLA uključeni aminokiselinski ostaci Asn155, Ser125, Ala152 i Leu217 (Slika 48B). U aktivnom mestu Savinaze Asn155 ostvaruje energetski povoljnu interakciju sa karboksilatnom grupom unutar tetramera L-mlečne kiseline, dok karbonilna grupa iz peptidne veze Ser125 interaguje sa terminalnom hidroksilnom grupom tetramera. Bočni ostaci Ala152 i Leu217 interaguju sa terminalnim metil grupama na oba kraja tetramera L-mlečne kiseline. U opisanoj orijentaciji nukleofilni kiseonik iz Ser221 usmeren je prema karbonilnom ugljeniku estarske veze između druge i treće jedinice L-mlečne kiseline u tetrameru. Dobijeni model predviđa veći afinitet vezivanja Savinaze za tetramer L-mlečne kiseline ($\Delta G = -4,710$ kcal/mol) u odnosu na dimer ($\Delta G = -4,190$ kcal/mol), što ukazuje na preferenciju enzima prema dužim lancima PLA. Iako za dimer postoji uporediva slobodna energija vezivanja kao i za tetramer, većina predviđenih vezivnih položaja bili su neproduktivni – molekul dimera se udaljavao iz aktivnog mesta tokom simulacija molekulske dinamike. Identifikovan je jedan katalitički povoljan položaj u kom je nukleofilni atom kiseonika iz bočnog ostatka Ser221 udaljen 3,13 Å od karbonilnog ugljenika dimera i pri čemu slobodna energija vezivanja (ΔG) iznosi -4,033 kcal/mol. Rezultati molekulske dinamike su u skladu sa

eksperimentalnim podacima o sporijoj katalitičkoj konverziji dimera, što se ogleda u prolaznoj akumulaciji dimera mlečne kiseline kao produkta enzimske razgradnje PLA pomoću Savinaze (Slika 47). Nasuprot tome, za dimere PCL, PHB i PHO nije pronađena nijedna pozicija katalitičkog poravnanja između nukleofilnog serina (Ser221) i karbonilnog atoma estarskih veza. Dobijeni rezultati molekulske dinamike su u skladu sa dobijenim eksperimentalnim rezultatima o odsustvu hidrolize PCL, PHB i PHO od strane Savinaze. Ova neaktivnost potiče iz strukturnih razlika – PLA ima estarske veze koje podsećaju na peptidne veze u proteinima gde je jedna jedinica L-mlečne kiseline (C3) analogna L-alaninu, dok PCL sadrži duže (C6) i fleksibilnije ugljovodonične lance, a PHB i PHO imaju voluminozne bočne grupe. U zaključku, selektivnost Savinaze prema PLA proističe iz geometrije i stereohemije ovog polimera, koje podsećaju na peptidne veze u prirodnim supstratima ove proteaze. Budući da prethodne studije nisu ispitivale specifičnost Savinaze prema različitim biopolijesterima, niti njen mehanizam aktivnosti na PLA, rezultati molekuskog dokinga i molekulske dinamike su prvi rezultati koji identifikuju ključne interakcije različitih biopolimernih supstrata sa aktivnim mestom Savinaze čime dopunjuju dobijene eksperimentalne podatke.

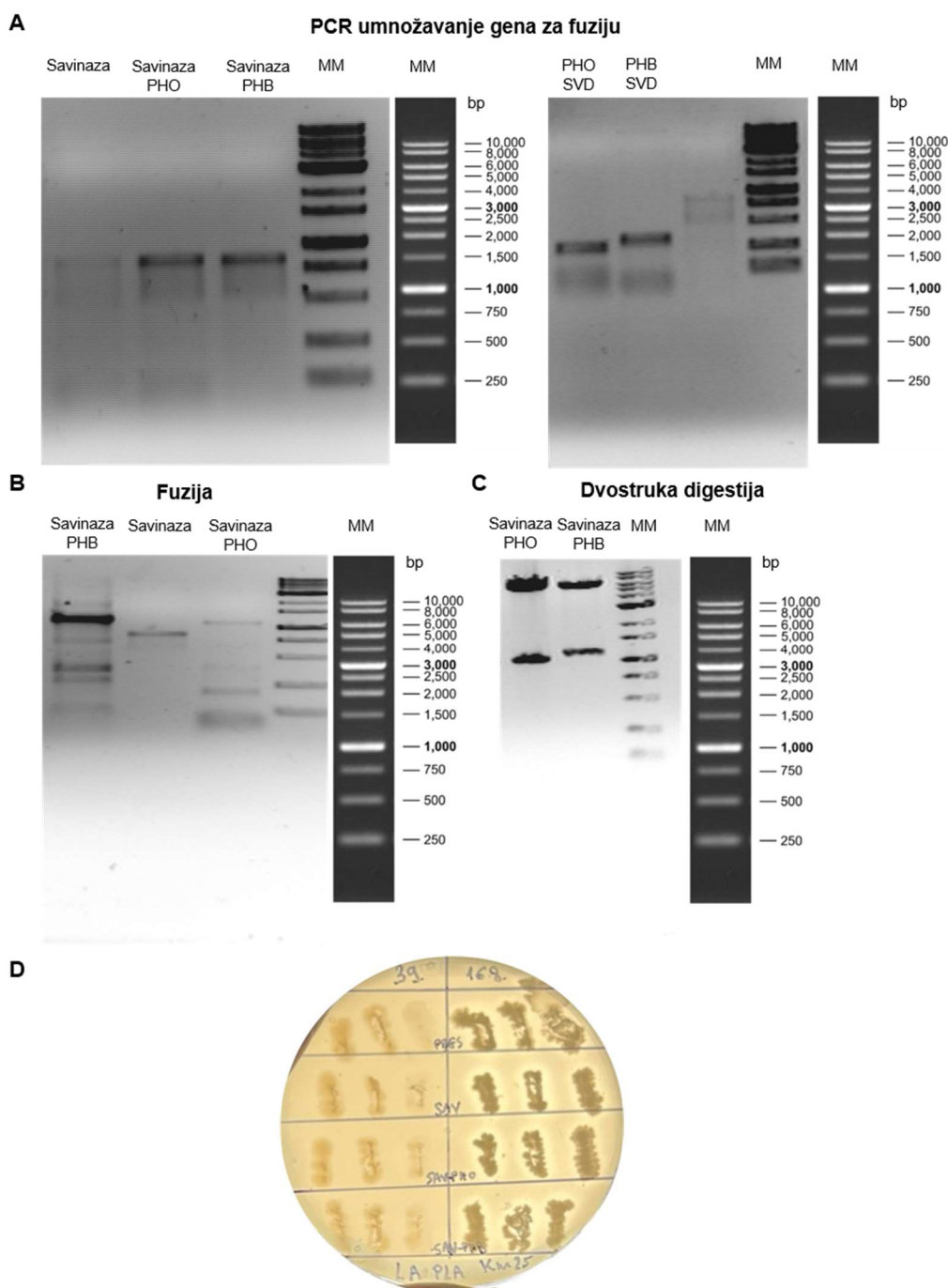
5.2.7 Ispitivanje pristupa za unapređenje adsorpcije Savinaze na biopolijestre i njenu orijentisanu imobilizaciju fuzijom sa SVD domenima PHA-depolimeraza

U literaturi je poznato da supstrat vezujući domen (SVD) PHB-depolimeraze iz *Ralstonia pickettii* T1 specifično prepoznaje i PLA pored PHA (198), zbog čega je Savinaza fuzionisana sa do sada neokarakterisanim SVD poreklom iz CtPHBaze i PfPHOaze. Na ovaj način moguće je meriti adsorpciju navedenih SVD praćenjem specifične PLA degradujuće aktivnosti Savinaze. Takođe, ukoliko se Savinaza adsorbuje pomoću SVD na površinu PLA može se produžiti kontaktno vreme Savinaze sa površinom PLA i unaprediti razgradnju PLA s obzirom da ona nema vezivni domen. Dodatno, uvođenje SVD u strukturu Savinaze može da omogući njenu orijentisanu adsorpciju na nosač od PHA čime se smanjuje gubitak aktivnosti enzima koja se obično dešava tokom imobilizacije nespecifičnom adsorpcijom ili kovalentnim vezivanjem za nosač.

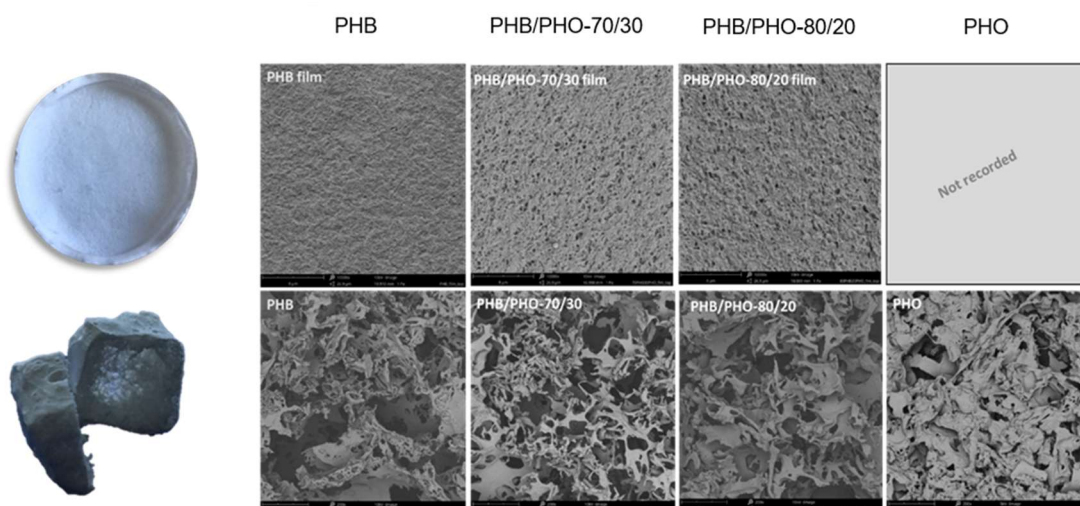
Prvi korak u kreiranju fuzija Savinaze, kao i njenog subkloniranja iz pET-22b(+) vektora u pBE-S vektor za ekspresiju u *Bacillus* sp. podrazumevao je umnožavanje gena PCR metodom, pri čemu su dobijeni fragmenti očekivanih veličina – 820 bp za Savinazu, 320 bp za SVD poreklom iz CtPHBaze i 250 bp za SVD poreklom iz PfPHOaze (Slika 49A). Prilikom umnožavanja gena PCR metodom korišćeni su specifično dizajnirani prajmeri kojima su na krajeve svakog gena uvedene homologne sekvence neophodne za međusobno spajanje gena za Savinazu sa genom za SVD poreklom iz PfPHOaze, odnosno sa genom za SVD domen poreklom iz CtPHBaze. Na Slici 49B prikazane su trake koje odgovaraju fuzijama Savinaze, Savinaza-PHBaza (1140 bp) i Savinaza-PHOaza (1070 bp), čije su dužine u skladu sa teorijskim zbirom veličina pojedinačnih genskih fragmenata koji ih sačinjavaju, dok WT Savinaza tretirana na isti način zadržava početnu dužinu od 820 bp, manju u odnosu na fuzije Savinaze što je u skladu sa odsustvom dodatog SVD domena. Daljim umnožavanjem pomoću PCR metode u sekvencu fuzija Savinaze uvodi se sekvenca za preklapanje sa pBE-S vektorom, čime je omogućena ligacija, a time i njihovo kloniranje u vektor za ekspresiju u *Bacillus* sp. Na Slici 49C prikazana su trake sa dužinama koje odgovaraju dužini pBE-S vektora (5938 bp) i fuzionih gena za Savinaza-PHBaza i Savinaza-PHOaza dobijenih nakon propagacije u *E. coli* XL10-Gold, izolacije i dvostruke digestije svakog konstrukta čime je finalno potvrđena uspešna konstrukcija rekombinantnih pBE-S plazmida sa insertima fuzionih gena. Funkcionalni test aktivnosti celih ćelija transformisanih generisanim konstruktima, prikazan na Slici 49D, pokazao je da ne postoji razlika u PLA depolimeraznoj aktivnosti ćelija koje nose generisane konstrukte Savinaze u poređenju sa kontrolnim ćelijama koje sadrže prazan vektor. Soj 168 potencijalno poseduje endogene PLA-depolimeraze, najverovatnije proteaznog tipa,

budući da su bakterije roda *Bacillus* poznate po produkciji različitih ekstracelularnih proteaza (235). Takođe, aktivnost enzima nije dobijena ni nakon prečišćavanja koristeći IMAC što je finalna potvrda da do ekspresije rekombinantnih enzima nije došlo čak ni u niskom prinosu pri testiranim uslovima. U daljem radu, optimizacija ekspresije može se postići optimizacijom korišćenih genskih kodona za domaćina *Bacillus* sp., zamenom signalnog peptida radi efikasnije sekrecije, kao i dodatkom reverzibilnog proteaznog inhibitora u medijum radi smanjenja endogene proteolitičke aktivnosti korišćenih sojeva *Bacillus* sp (236,237).

SEM mikrografija površine PHB filma (Slika 50) potvrđuje njegovu konzistentnu morfologiju bez pukotina i rupa. Po dodatku PHO javljaju se sitne pore na površini filmova. SEM mikrografije poroznih nosača potvrđuju uspešno formiranje pora većih dimenzija čime je značajno povećana dodirna površina nosača za imobilizaciju enzima.

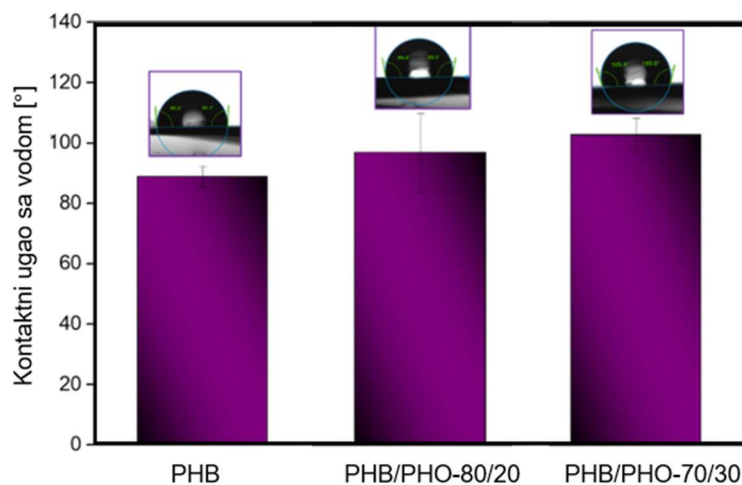


Slika 49. Kreiranje fuzija Savinaze i njihovo kloniranje i ekspresija u *Bacillus* sp.. Agaroznom elektroforezom potvrđeno je A) umnožavanje gena za Savinazu i SVD prajmerima koji uvode preklapajuće krajeve za njihovo međusobno spajanje; B) spajanje sekvenci Savinaze sa SVD regionima PHA-depolimeraza i kontrola polaznog gena Savinaze; C) uspešna konstrukcija i propagacija pBE-S plazmida koji nose gene za fuzione varijante Savinaze u *Escherichia coli* XL10-Gold nakon ligacije fuzionisanih gena sa pBE-S vektorom, transformacije bakterijskih ćelija, izolacije plazmidne DNK iz odabranih transformanata i dvostruke restrikcione digestije. D) Test PLA depolimerazne aktivnosti ćelija *Bacillus* sp. sojeva 39 i 168 transformisanih sa plazmidom koji kodira Savinazu, i njene fuzione varijante Savinaza-PHBaza i Savinaza-PHOaza.



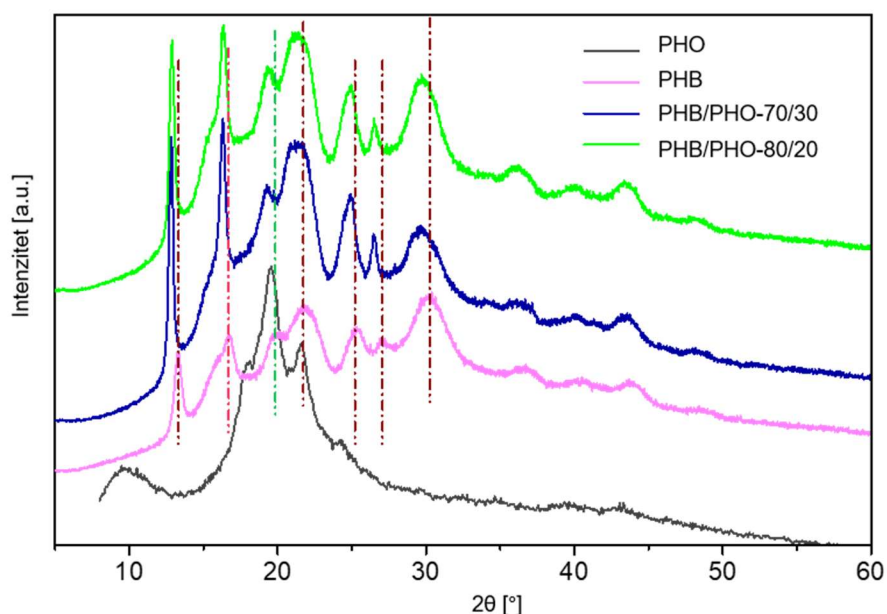
Slika 50. SEM mikrofotografije filmova (gore) i poroznih nosača (dole) od PHB, PHO i PHB/PHO smeša.

Kontaktni ugao sa vodom predstavlja jedan od najčešće korišćenih parametara za procenu površinske kvašljivosti i hidrofilno-hidrofobnih karakteristika polimernih materijala. Mešanje PHB sa PHO rezultira povećanjem kontaktnog ugla sa vodom sa 93° za čist PHB na 99° za PHB/PHO (80:20) i 105° za PHB/PHO (70:30) (Slika 51). Stoga, sa povećanjem sadržaja PHO povećava se hidrofobnost PHB/PHO materijala. Prethodne studije proteinskog inženjerstva PHB-depolimeraza pokazale su da povećanje hidrofobnosti SVD dovodi do poboljšane adsorpcije enzima (212,213,238), te se može pretpostaviti da povećana hidrofobnost nosača takođe može doprineti efikasnijoj imobilizaciji fuzija Savinaze sa SVD i očuvanju njene katalitičke aktivnosti.



Slika 51. Merenje kontaktnog ugla sa vodom za PHA filmove (PHB i smeša PHB/PHO).

Nakon mešanja PHB i PHO, pomeranje difrakcionih pikova PHB ka nižim vrednostima i povećanje njihovog intenziteta ukazuju na promene u dimenzijama kristalne rešetke ka većoj kristalnosti PHB, a time i poroznog nosača (Slika 52).



Slika 52. Difraktogram PHO, PHB i smeša PHB/PHO.

Iako enzimi znatno sporije razgrađuju kristalne regione polimera, pokazano je da kristalni regioni obezbeđuju strukturnu potporu i da su neophodni za vezivanje enzima (239,240). Sintetički dobijen amorfni PHB ne podleže enzimskoj razgradnji pomoću PHB-depolimeraza iz *Pseudomonas picketti* i *Pseudomonas lemoignei* zbog odsustva kristalnih domena koji su neophodni za vezivanje molekula enzima pomoću SVD, za razliku od njegove smeše sa bakterijskim PHB koji poseduje kristalne regione (239–241). U daljim istraživanjima biće ispitan uticaj variranja stepena kristalnosti, kao i hidrofobnosti PHA nosača na efikasnost adsorpcije SVD domena poreklom iz CtPHBaze i PfPHOaze u cilju odabira nosača sa najvećim kapacitetom za vezivanje enzima.

6. Zaključci

U skladu sa ciljevima ove teze, proučavano je unapređenje biokatalitičke razgradnje PHA i PLA korišćenjem PfPHOaze i Savinaze. PfPHOaza je odabrana kao prva i najbolje okarakterisana mcl-PHA-depolimeraza. Za razliku od PHB-depolimeraza, u literaturi i dalje nedostaju studije usmerene na identifikaciju ključnih aminokiselinskih ostataka odgovornih za katalizu i vezivanje supstrata, kao i istraživanja proteinskog inženjerstva mcl-PHA-depolimeraza. Savinaza je proučavana kao industrijski dostupan enzim koji se već primenjuje na velikoj skali u industriji deterdženata, a čiji potencijal kao PLA-depolimeraze nije dovoljno proučen nasuprot Proteinazi K, najčešće korišćenoj PLA-depolimerazi u studijama enzimske razgradnje PLA.

Rezultati ove disertacije pokazuju da se biokatalitička razgradnja mcl-PHA i PLA može značajno unaprediti kombinovanjem proteinskog inženjerstva, racionalnog dizajna model supstrata i optimizacije reakcionih uslova.

Uporednom primenom tri strategije proteinskog inženjerstva na PfPHOazi pokazano je da rekonstrukcija predačkog gena (ASR) predstavlja najefikasniji pristup za unapređenje termostabilnosti mcl-PHA-depolimeraza u odnosu na dirigovanu evoluciju i konsenzus dizajn, dok istovremeno uočen kompromis između katalitičke efikasnosti i termostabilnosti kod unapređenih varijanti potvrđuje opštiju zakonitost proteinske evolucije, prema kojoj sticanje nove ili poboljšane funkcije enzima često dolazi na račun njegove stabilnosti.

Upotreba PHO model supstrata, pNP-monomera i pNP-dimera, po prvi put u karakterizaciji PHA-depolimeraza, posebno je olakšala karakterizaciju PHA-depolimeraza kao klase multidomenskih enzima zbog čega je praćenje enzimske hidrolize PHA kao polimera složeniji proces nego u slučaju PLA i drugih polimera. Takođe, upotreba PHO model supstrata je omogućila detekciju specifične PHA degradujuće aktivnosti i u prisustvu deterdženata koji su neophodni u radu sa ovom klasom izrazito hidrofobnih proteina. Stoga, rezultati ove disertacije proširili su saznanja o značaju razvoja model supstrata u oblasti primene enzima za razgradnju plastičnog otpada, gde su model supstrati prevashodno primenjivani za potrebe olakšanog proučavanja mehanizma hidrolize polimernih supstrata i visoke procesivnosti enzimskih testova koji koriste supstrate rastvorne u vodenim sistemima.

Dobijeni rezultati pružili su nova saznanja o strukturi i evoluciji PfPHOaze sa Ser81, Phe125, Ile171 i Val230 identifikovanim kao ključnim aminokiselinama za specifično prepoznavanje PHO, dok je po prvi put pokazano da je sekundarna aktivnost PfPHOaze na PCL novijeg porekla.

Rezultati dobijeni sa Savinazom pokazuju da postojeći, industrijski već uspostavljeni biokatalizatori mogu biti prenamenjeni za efikasnu razgradnju PLA otpada i bez dodatnog proteinskog inženjerstva, čime se značajno skraćuje put od laboratorijskog istraživanja do praktične primene.

Optimalni uslovi i poliesterazna aktivnost Savinaze kao PLA-depolimeraze su po prvi put određeni prilikom izrade ove doktorske disertacije, čime je postignuta efikasna hidroliza PLA na pH 8,5 i 42 °C uz visoku specifičnost prema PLA polimeru, i izostanak hidrolize PCL, PHO, i PHB zahvaljujući aminokiselinskim ostacima Ser125, Ala152, Asn155 i Leu217.

Takođe, rezultati biorazgradnje potrošačkih uzoraka PLA pomoću Savinaze ističu da je način procesuiranja PLA polimera ključan korak u dizajniranju istinski biorazgradivih predmeta za jednokratnu upotrebu kao alternative plastici poreklom iz fosilnih goriva. Dodatno, rezultati ispitivanja potencijala predtretmana ultrazvukom pokazali su unapređenje brzine razgradnje PLA i konverziju u monomer mlečne kiseline pri mezofilnim uslovima na 42 °C.

Iako prinos prečišćene PfPHOaze u ovoj fazi istraživanja i dalje ograničava primenu na većoj skali, a ispitivanja razgradnje PLA su sprovedena na pojedinačnim potrošačkim uzorcima, a ne na realnom, mešovitom i heterogenom plastičnom otpadu, uspostavljeni model supstrati i standardizovani testovi aktivnosti predstavljaju osnovu za dalja istraživanja usmerena na povećanje prinosa ekspresije PfPHOaze, testiranje na kompleksnijim i mešovitim supstratima, kao i na eventualnu kombinovanu primenu PfPHOaze i Savinaze kao visoko-specifičnih depolimeraza u integrisanim procesima razgradnje mešovitog biopolimernog otpada.

7. Literatura

1. Porta R. Anthropocene, the plastic age and future perspectives. *FEBS Open Bio*. 2021;11(4):948–53. doi:10.1002/2211-5463.13122
2. Boschi A, Scieuzo C, Salvia R, Arias CF, Perez RP, Bertocchini F, et al. Beyond Microbial Biodegradation: Plastic Degradation by *Galleria mellonella*. *J Polym Environ*. 2024 May 1;32(5):2158–77. doi:10.1007/s10924-023-03084-6
3. Chen Y, Awasthi AK, Wei F, Tan Q, Li J. Single-use plastics: Production, usage, disposal, and adverse impacts. *Sci Total Environ*. 2021 Jan 15;752:141772. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.141772
4. Bank MS, Hansson SV. The Plastic Cycle: A Novel and Holistic Paradigm for the Anthropocene. *Environ Sci Technol*. 2019 Jul 2;53(13):7177–9. doi:10.1021/acs.est.9b02942
5. Narancic T, Verstichel S, Reddy Chaganti S, Morales-Gamez L, Kenny ST, De Wilde B, et al. Biodegradable Plastic Blends Create New Possibilities for End-of-Life Management of Plastics but They Are Not a Panacea for Plastic Pollution. *Environ Sci Technol*. 2018 Sep 18;52(18):10441–52. doi:10.1021/acs.est.8b02963
6. Ali SS, Abdelkarim EA, Elsamahy T, Al-Tohamy R, Li F, Kornaros M, et al. Bioplastic production in terms of life cycle assessment: A state-of-the-art review. *Environ Sci Ecotechnology*. 2023 Jul;15:100254. doi:10.1016/j.esec.2023.100254
7. Rosenboom JG, Langer R, Traverso G. Bioplastics for a circular economy. *Nat Rev Mater*. 2022 Feb;7(2):2. doi:10.1038/s41578-021-00407-8
8. Behera S, Priyadarshane M, Vandana, Das S. Polyhydroxyalkanoates, the bioplastics of microbial origin: Properties, biochemical synthesis, and their applications. *Chemosphere*. 2022 May 1;294:133723. doi:https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133723
9. Lors C, Leleux P, Park CH. State of the art on biodegradability of bio-based plastics containing polylactic acid. *Front Mater*. 2025 Jan 7;11. doi:10.3389/fmats.2024.1476484
10. Afshar SV, Boldrin A, Christensen TH, Corami F, Daugaard AE, Rosso B, et al. Disintegration of commercial biodegradable plastic products under simulated industrial composting conditions. *Sci Rep*. 2025 Mar 12;15(1):8569. doi:10.1038/s41598-025-91647-z
11. Wei R, Tiso T, Bertling J, O'Connor K, Blank LM, Bornscheuer UT. Possibilities and limitations of biotechnological plastic degradation and recycling. *Nat Catal*. 2020 Nov;3(11):11. doi:10.1038/s41929-020-00521-w
12. Liu X, Park H, Ackermann YS, Avérous L, Ballerstedt H, Besenmatter W, et al. Exploring biotechnology for plastic recycling, degradation and upcycling for a sustainable future. *Biotechnol Adv*. 2025 Jul 1;81:108544. doi:10.1016/j.biotechadv.2025.108544
13. Ogwu MC, Kosoe EA. Innovative Approaches to Recycling, Upcycling, and Downcycling for Sustainable Waste Management. *CleanMat*. 2025;2(3):242–61. doi:10.1002/clem.70013

14. Peng Y, Lu J, Fan L, Zhou J, Dong W, Jiang M. Enzymes offer a promising avenue for enhancing the competitiveness of biodegradable plastics in environmental restoration and the circular economy. *Waste Manag.* 2025 Mar 1;195:32–43. doi:10.1016/j.wasman.2025.01.040
15. Zytner P, Kumar D, Elsayed A, Mohanty A, Ramarao BV, Misra M. A review on polyhydroxyalkanoate (PHA) production through the use of lignocellulosic biomass. *RSC Sustain.* 2023 Dec 1;1(9):2120–34. doi:10.1039/d3su00126a
16. Favaro L, Basaglia M, Casella S. Improving polyhydroxyalkanoate production from inexpensive carbon sources by genetic approaches: a review. *Biofuels Bioprod Biorefining.* 2019;13(1):208–27. doi:10.1002/bbb.1944
17. Levett I, Bai X, Lant P, Laycock B, Brunner M, Pratt S. Technoeconomic analysis of extreme halophilic manufacture of polyhydroxyalkanoate bioplastics from sugar: Understanding cost sensitivity to feedstock price, fermentation performance and the extraction method. *Bioresour Technol.* 2026 Apr 1;445:134078. doi:10.1016/j.biortech.2026.134078
18. Erradhouani B, Coma V, Sonnemann G, Loubet P. Transition to bio-based plastic packaging reveals complex climate–biodiversity trade-offs. *Nat Commun.* 2026 Jan 31;17(1):3630. doi:10.1038/s41467-026-69016-9
19. Ren Q, Ruth K, Thöny-Meyer L, Zinn M. Enantiomerically pure hydroxycarboxylic acids: current approaches and future perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010 Jun 1;87(1):41–52. doi:10.1007/s00253-010-2530-6
20. Arnal G, Anglade J, Gavalda S, Tournier V, Chabot N, Bornscheuer UT, et al. Assessment of Four Engineered PET Degrading Enzymes Considering Large-Scale Industrial Applications. *ACS Catal.* 2023 Oct 20;13(20):13156–66. doi:10.1021/acscatal.3c02922
21. Tournier V, Topham CM, Gilles A, David B, Folgoas C, Moya-Leclair E, et al. An engineered PET depolymerase to break down and recycle plastic bottles. *Nature.* 2020 Apr 9;580(7802):216–9. doi:10.1038/s41586-020-2149-4
22. Elbahloul Y, Steinbüchel A. Large-scale production of poly(3-hydroxyoctanoic acid) by *Pseudomonas putida* GPo1 and a simplified downstream process. *Appl Env Microbiol.* 2009 Feb;75(3):643–51. doi:10.1128/aem.01869-08 PubMed Central PMCID: PMC2632139.
23. de Koning GJM, van Bilsen HMM, Lemstra PJ, Hazenberg W, Witholt B, Preusting H, et al. A biodegradable rubber by crosslinking poly(hydroxyalkanoate) from *Pseudomonas oleovorans*. *Polymer.* 1994 May 1;35(10):2090–7. doi:10.1016/0032-3861(94)90233-X
24. Jendrossek D. Peculiarities of PHA granules preparation and PHA depolymerase activity determination. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007 Apr;74(6):1186–96. doi:10.1007/s00253-007-0860-9 PubMed PMID: 17318541.
25. Guicherd M, Ben Khaled M, Guérault M, Nomme J, Dalibey M, Grimaud F, et al. An engineered enzyme embedded into PLA to make self-biodegradable plastic. *Nature.* 2024 Jul;631(8022):884–90. doi:10.1038/s41586-024-07709-1

26. 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*. 2005 Mar 1;6(2):850–7. doi:10.1021/bm049395v
27. Huang Q, Hiyama M, Kabe T, Kimura S, Iwata T. Enzymatic Self-Biodegradation of Poly(l-lactic acid) Films by Embedded Heat-Treated and Immobilized Proteinase K. *Biomacromolecules*. 2020 Aug 10;21(8):3301–7. doi:10.1021/acs.biomac.0c00759
28. Cao Y, Ma W, Chen S, Hao Y, Dong Q, Qian K, et al. Immobilization of Proteinase K into PLA for self-biodegradable. *Int J Biol Macromol*. 2025 Apr;304(Pt 2):140873. doi:10.1016/j.ijbiomac.2025.140873 PubMed PMID: 39952495.
29. Hasan F, Shah A, Javed S, Hameed A. Enzymes used in detergents: Lipases. *Afr J Biotechnol*. 2010 Aug 2;9.
30. Aaslyng D, Gormsen E, Malmos H. Mechanistic studies of proteases and lipases for the detergent industry. *J Chem Technol Biotechnol*. 1991;50(3):321–30. doi:10.1002/jctb.280500304
31. Boschmeier E, Mehanni D, Sedlmayr VL, Vetyukov Y, Mihalyi S, Quartinello F, et al. Recovery of pure PET from wool/PET/elastane textile waste through step-wise enzymatic and chemical processing. *Waste Manag Res*. 2024 Sep 20;0734242X241276089. doi:10.1177/0734242X241276089
32. Oda Y, Yonetsu A, Urakami T, Tonomura K. Degradation of Polylactide by Commercial Proteases. *J Polym Environ*. 2000 Jan 1;8:29–32. doi:10.1023/A:1010120128048
33. Takahashi S, Yoshimoto M. Proteinase K-Conjugated Liposomes as Stable Catalysts for Depolymerization of Poly(l -lactic acid) Plastics. *ACS EST Eng*. 2026 May 29;6. doi:10.1021/acsestengg.5c01099
34. López-Teijeiro A, Barreiro-Piñeiro N, Eibes G, Martínez-Costas J. Nearly complete depolymerization of untreated post-consumer plastic with an immobilized and reusable PET hydrolase. *J Hazard Mater*. 2025 Sep 5;495:138789. doi:10.1016/j.jhazmat.2025.138789
35. Zhang W, Wei X, Zhu B. High-Efficiency Biocatalytic Degradation of Polyethylene Terephthalate via Engineered Biopolymer-Immobilized Enzymes for Sustainable Plastic Recycling. *ACS Sustain Chem Eng*. 2025 Sep 29;13(38):15847–58. doi:10.1021/acssuschemeng.5c04115
36. Gazeau B, Minunno R, Zaman A, Shaikh F. Elevating Recycling Standards: Global Requirements for Plastic Traceability and Quality Testing. *Sustainability*. 2024 Jan;16(12):5122. doi:10.3390/su16125122
37. Chamas A, Moon H, Zheng J, Qiu Y, Tabassum T, Jang JH, et al. Degradation Rates of Plastics in the Environment. *ACS Sustain Chem Eng*. 2020 Mar 9;8(9):3494–511. doi:10.1021/acssuschemeng.9b06635
38. Geyer R, Jambeck JR, Law KL. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Sci Adv*. 2017 Jul 7;3(7):e1700782. doi:10.1126/sciadv.1700782

39. Kumar R, Verma A, Shome A, Sinha R, Sinha S, Jha PK, et al. Impacts of Plastic Pollution on Ecosystem Services, Sustainable Development Goals, and Need to Focus on Circular Economy and Policy Interventions. *Sustainability*. 2021 Jan;13(17):9963. doi:10.3390/su13179963
40. Hohn S, Acevedo-Trejos E, Abrams JF, Fulgencio de Moura J, Spranz R, Merico A. The long-term legacy of plastic mass production. *Sci Total Environ*. 2020 Dec 1;746:141115. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.141115 PubMed PMID: 32745856.
41. Howard GT. Biodegradation of polyurethane: a review. *Int Biodeterior Biodegrad*. 2002 Jun 1;Biodet.of Constr. Materials49(4):245–52. doi:10.1016/S0964-8305(02)00051-3
42. Shen M, Huang W, Chen M, Song B, Zeng G, Zhang Y. (Micro)plastic crisis: Un-ignorable contribution to global greenhouse gas emissions and climate change. *J Clean Prod*. 2020 May 1;254:120138. doi:10.1016/j.jclepro.2020.120138
43. Sax L. Polyethylene Terephthalate May Yield Endocrine Disruptors. *Environ Health Perspect*. 2010 Apr;118(4):445–8. doi:10.1289/ehp.0901253 PubMed PMID: 20368129; PubMed Central PMCID: PMC2854718.
44. Danso D, Chow J, Streit WR. Plastics: Environmental and Biotechnological Perspectives on Microbial Degradation. *Appl Environ Microbiol*. 2019 Sep 17;85(19):e01095-19. doi:10.1128/AEM.01095-19
45. Sheriff SS, Yusuf AA, Akiyode OO, Hallie EF, Odoma S, Yambasu RA, et al. A comprehensive review on exposure to toxins and health risks from plastic waste: Challenges, mitigation measures, and policy interventions. *Waste Manag Bull*. 2025 Sep 1;3(3):100204. doi:10.1016/j.wmb.2025.100204
46. Sharma B, Goswami Y, Sharma S, Shekhar S. Inherent roadmap of conversion of plastic waste into energy and its life cycle assessment: A frontrunner compendium. *Renew Sustain Energy Rev*. 2021 Aug 1;146:111070. doi:10.1016/j.rser.2021.111070
47. Carpenter EJ, Smith KL. Plastics on the Sargasso sea surface. *Science*. 1972 Mar 17;175(4027):1240–1. doi:10.1126/science.175.4027.1240 PubMed PMID: 5061243.
48. Demselben. Ueber den flüssigen Storax (*Styrax liquidus*). *Ann Pharm*. 1839;31(3):265–77. doi:10.1002/jlac.18390310306
49. Fields RD, Rodriguez F, Finn RK. Microbial degradation of polyesters: Polycaprolactone degraded by *P. pullulans*. *J Appl Polym Sci*. 1974;18(12):3571–9. doi:10.1002/app.1974.070181207
50. Müller RJ, Schrader H, Profe J, Dresler K, Deckwer WD. Enzymatic Degradation of Poly(ethylene terephthalate): Rapid Hydrolyse using a Hydrolase from *T. fusca*. *Macromol Rapid Commun*. 2005;26(17):1400–5. doi:10.1002/marc.200500410
51. Sulaiman S, Yamato S, Kanaya E, Kim JJ, Koga Y, Takano K, et al. Isolation of a novel cutinase homolog with polyethylene terephthalate-degrading activity from leaf-branch compost by using a metagenomic approach. *Appl Environ Microbiol*. 2012 Mar;78(5):1556–62. doi:10.1128/AEM.06725-11 PubMed PMID: 22194294; PubMed Central PMCID: PMC3294458.

52. Yoshida S, Hiraga K, Takehana T, Taniguchi I, Yamaji H, Maeda Y, et al. A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). *Science*. 2016 Mar 11;351(6278):1196–9. doi:10.1126/science.aad6359
53. Møller MS, Bleckert A, Jäckering A, Strodel B. Unraveling the relationship between PET surfaces and their hydrolases. *Trends Biochem Sci*. 2025 Aug;50(8):707–20. doi:10.1016/j.tibs.2025.05.002 PubMed PMID: 40484801.
54. Cui Y, Chen Y, Sun J, Zhu T, Pang H, Li C, et al. Computational redesign of a hydrolase for nearly complete PET depolymerization at industrially relevant high-solids loading. *Nat Commun*. 2024 Feb 15;15(1):1417. doi:10.1038/s41467-024-45662-9
55. Thomsen TB, Schubert S, Hunt CJ, Borch K, Jensen K, Brask J, et al. Rate Response of Poly(Ethylene Terephthalate)-Hydrolases to Substrate Crystallinity: Basis for Understanding the Lag Phase. *ChemSusChem*. 2023 Jul 7;16(13):e202300291. doi:10.1002/cssc.202300291
56. Chen S, Akram E, Qiao W, Zhang Y, Haider S, Cao Y. A Mechanistic Understanding of the Activity-Stability Trade-off in PETase. 2024. doi:10.1101/2024.06.09.598049
57. Gates EG, Crook N. The biochemical mechanisms of plastic biodegradation. *FEMS Microbiol Rev*. 2024 Sep 1;48(6):fuae027. doi:10.1093/femsre/fuae027
58. Shah AA, Hasan F, Hameed A, Ahmed S. Biological degradation of plastics: a comprehensive review. *Biotechnol Adv*. 2008;26(3):246–65. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.12.005 PubMed PMID: 18337047.
59. Wei R, von Haugwitz G, Pfaff L, Mican J, Et. A. Mechanism-Based Design of Efficient PET Hydrolases. *ACS Catal*. 2022. doi:10.1021/acscatal.1c05856
60. Wei R, Westh P, Weber G, Blank LM, Bornscheuer UT. Standardization guidelines and future trends for PET hydrolase research. *Nat Commun*. 2025 May 20;16(1):4684. doi:10.1038/s41467-025-60016-9
61. Shah M, Rajhans S, Pandya H, Mankad A. Bioplastic for future: A review then and now. *World J Adv Res Rev*. 2021 Feb 28;9:056–67. doi:10.30574/wjarr.2021.9.2.0054
62. Bhatia SK, Gurav R, Choi TR, Jung HR, Yang SY, Moon YM, et al. Bioconversion of plant biomass hydrolysate into bioplastic (polyhydroxyalkanoates) using *Ralstonia eutropha* 5119. *Bioresour Technol*. 2019 Jan 1;271:306–15. doi:10.1016/j.biortech.2018.09.122
63. Lara-Topete GO, Castanier-Rivas JD, Bahena-Osorio MF, Krause S, Larsen JR, Loge FJ, et al. Compounding one problem with another? A look at biodegradable microplastics. *Sci Total Environ*. 2024 Sep 20;944:173735. doi:10.1016/j.scitotenv.2024.173735
64. Costa P, Lackner M. Biodegradable Microplastics: Environmental Fate and Persistence in Comparison to Micro- and Nanoplastics from Traditional, Non-Degradable Polymers. *Macromol*. 2025 Jun;5(2):29. doi:10.3390/macromol5020029

65. Anderson AJ, Dawes EA. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol Rev.* 1990 Dec;54(4):450–72. PubMed PMID: 2087222; PubMed Central PMCID: PMC372789.
66. Volova TG, Kiselev EG, Shishatskaya EI, Zhila NO, Boyandin AN, Syrvacheva DA, et al. Cell growth and accumulation of polyhydroxyalkanoates from CO₂ and H₂ of a hydrogen-oxidizing bacterium, *Cupriavidus eutrophus* B-10646. *Bioresour Technol.* 2013 Oct;146:215–22. doi:10.1016/j.biortech.2013.07.070 PubMed PMID: 23934338.
67. Kourmentza C, Plácido J, Venetsaneas N, Burniol-Figols A, Varrone C, Gavala HN, et al. Recent Advances and Challenges towards Sustainable Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production. *Bioeng Basel Switz.* 2017 Jun 11;4(2):E55. doi:10.3390/bioengineering4020055 PubMed PMID: 28952534; PubMed Central PMCID: PMC5590474.
68. Surendran A, Lakshmanan M, Chee JY, Sulaiman AM, Thuoc DV, Sudesh K. Can Polyhydroxyalkanoates Be Produced Efficiently From Waste Plant and Animal Oils? *Front Bioeng Biotechnol.* 2020 Mar 17;8:169. doi:10.3389/fbioe.2020.00169 PubMed PMID: 32258007; PubMed Central PMCID: PMC7090169.
69. Holmes PA. Biologically Produced (R)-3-Hydroxy- Alkanoate Polymers and Copolymers. In: Bassett DC, editor. *Developments in Crystalline Polymers* [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 1988 [cited 2022 Sep 12]. p. 1–65. Available from: https://doi.org/10.1007/978-94-009-1341-7_1 doi:10.1007/978-94-009-1341-7_1
70. Narancic T, O'Connor KE. Plastic waste as a global challenge: are biodegradable plastics the answer to the plastic waste problem? *Microbiology.* 2019;165(2):129–37.
71. Castro-Aguirre E, Iñiguez-Franco F, Samsudin H, Fang X, Auras R. Poly(lactic acid)—Mass production, processing, industrial applications, and end of life. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016 Dec 15;PLA biodegradable polymers107:333–66. doi:10.1016/j.addr.2016.03.010
72. Tournier V, Duquesne S, Guillaumot F, Cramail H, Taton D, Marty A, et al. Enzymes' Power for Plastics Degradation. *Chem Rev.* 2023 May 10;123(9):5612–701. doi:10.1021/acs.chemrev.2c00644
73. Boey JY, Mohamad L, Khok YS, Tay GS, Baidurah S. A Review of the Applications and Biodegradation of Polyhydroxyalkanoates and Poly(lactic acid) and Its Composites. *Polymers.* 2021 Jan;13(10):10. doi:10.3390/polym13101544
74. Plastics Europe • Enabling a sustainable future [Internet]. [cited 2025 Mar 5]. Available from: <https://plasticseurope.org/>
75. Haider TP, Völker C, Kramm J, Landfester K, Wurm FR. Plastics of the Future? The Impact of Biodegradable Polymers on the Environment and on Society. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2019 Jan 2;58(1):50–62. doi:10.1002/anie.201805766 PubMed PMID: 29972726.
76. Balwada J, Samaiya S, Mishra RP. Packaging Plastic Waste Management for a Circular Economy and Identifying a better Waste Collection System using Analytical Hierarchy Process (AHP). *Procedia CIRP.* 2021 Jan 1;The 28th CIRP Conference on Life Cycle Engineering, March 10 – 12, 2021, Jaipur, India98:270–5. doi:10.1016/j.procir.2021.01.102

77. Mikula K, Skrzypczak D, Izydorczyk G, Warchoń J, Moustakas K, Chojnacka K, et al. 3D printing filament as a second life of waste plastics—a review. *Environ Sci Pollut Res*. 2021 Mar 1;28(10):12321–33. doi:10.1007/s11356-020-10657-8
78. Banerjee A, Borah A, Chah CN, Dhal MK, Madhu K, Katiyar V, et al. Decoding the complex interplay of biological and chemical factors in Polylactic acid biodegradation: A systematic review. *Int J Biol Macromol*. 2024 Dec;282(Pt 4):136956. doi:10.1016/j.ijbiomac.2024.136956 PubMed PMID: 39489234.
79. Ainali NM, Kalaronis D, Evgenidou E, Kyzas GZ, Bobori DC, Kaloyianni M, et al. Do poly(lactic acid) microplastics instigate a threat? A perception for their dynamic towards environmental pollution and toxicity. *Sci Total Environ*. 2022 Aug 1;832:155014. doi:10.1016/j.scitotenv.2022.155014
80. Martínez-Tobón DI, Gul M, Elias AL, Sauvageau D. Polyhydroxybutyrate (PHB) biodegradation using bacterial strains with demonstrated and predicted PHB depolymerase activity. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018 Sep;102(18):8049–67. doi:10.1007/s00253-018-9153-8 PubMed PMID: 29951858.
81. Chen H, Cebe P. Vittrification and Devitrification of Rigid Amorphous Fraction of PET during Quasi-Isothermal Cooling and Heating. *Macromolecules*. 2009 Jan 13;42(1):288–92. doi:10.1021/ma802104a
82. Wunderlich B. Reversible crystallization and the rigid–amorphous phase in semicrystalline macromolecules. *Prog Polym Sci*. 2003 Mar 1;28(3):383–450. doi:10.1016/S0079-6700(02)00085-0
83. Conformational Selection in Biocatalytic Plastic Degradation by PETase | ACS Catalysis [Internet]. [cited 2026 Jan 29]. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acscatal.1c05548>
84. Righetti MC. Amorphous Fractions of Poly(lactic acid). In: Di Lorenzo ML, Androsch R, editors. *Synthesis, Structure and Properties of Poly(lactic acid)* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2017 [cited 2026 Jan 29]. p. 195–234. (Advances in Polymer Science). Available from: http://link.springer.com/10.1007/12_2016_14 doi:10.1007/12_2016_14
85. Kobayashi T, Uchino K, Abe T, Yamazaki Y, Saito T. Novel intracellular 3-hydroxybutyrate-oligomer hydrolase in *Wautersia eutropha* H16. *J Bacteriol*. 2005 Aug;187(15):5129–35. doi:10.1128/JB.187.15.5129-5135.2005 PubMed PMID: 16030206; PubMed Central PMCID: PMC1196019.
86. Uefuji M, Kasuya K, Doi Y. Enzymatic degradation of poly[(R)-3-hydroxybutyrate]: secretion and properties of PHB depolymerase from *Pseudomonas stutzeri*. *Polym Degrad Stab*. 1997 Dec 1;58(3):275–81. doi:10.1016/S0141-3910(97)00058-X
87. Roohi, Zaheer MR, Kuddus M. PHB (poly-β-hydroxybutyrate) and its enzymatic degradation. *Polym Adv Technol*. 2018;29(1):30–40. doi:10.1002/pat.4126
88. Ohura T, Kasuya KI, Doi Y. Cloning and Characterization of the Polyhydroxybutyrate Depolymerase Gene of *Pseudomonas stutzeri* and Analysis of the Function of Substrate-Binding

- Domains. *Appl Environ Microbiol.* 1999 Jan;65(1):189–97. PubMed PMID: 9872779; PubMed Central PMCID: PMC91002.
89. Hiraishi T, Hirahara Y, Doi Y, Maeda M, Taguchi S. Effects of Mutations in the Substrate-Binding Domain of Poly[(R)-3-Hydroxybutyrate] (PHB) Depolymerase from *Ralstonia pickettii* T1 on PHB Degradation. *Appl Environ Microbiol.* 2006 Nov;72(11):7331–8. doi:10.1128/AEM.01187-06 PubMed PMID: 16963553; PubMed Central PMCID: PMC1636158.
 90. Jendrossek D, Handrick R. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. *Annu Rev Microbiol.* 2002;56:403–32. doi:10.1146/annurev.micro.56.012302.160838 PubMed PMID: 12213937.
 91. Sung CC, Tachibana Y, Kasuya K ichi. Characterization of a thermolabile poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from the marine bacterium *Shewanella* sp. JKCM-AJ-6,1 α . *Polym Degrad Stab.* 2016 Jul 1;129:212–21. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2016.04.022
 92. Suzuki M, Tachibana Y, Kasuya K ichi. Biodegradability of poly(3-hydroxyalkanoate) and poly(ϵ -caprolactone) via biological carbon cycles in marine environments. *Polym J.* 2021 Jan;53(1):1. doi:10.1038/s41428-020-00396-5
 93. Iwata T, Doi Y, Tanaka T, Akehata T, Shiromo M, Teramachi S. Enzymatic Degradation and Adsorption on Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] Single Crystals with Two Types of Extracellular PHB Depolymerases from *Comamonas acidovorans* YM1609 and *Alcaligenes faecalis* T1. *Macromolecules.* 1997 Sep 1;30(18):5290–6. doi:10.1021/ma970491g
 94. Handrick R, Reinhardt S, Kimmig P, Jendrossek D. The “Intracellular” Poly(3-Hydroxybutyrate) (PHB) Depolymerase of *Rhodospirillum rubrum* Is a Periplasm-Located Protein with Specificity for Native PHB and with Structural Similarity to Extracellular PHB Depolymerases. *J Bacteriol.* 2004 Nov;186(21):7243–53. doi:10.1128/jb.186.21.7243-7253.2004
 95. Wang D, Zou L, Jin Q, Hou J, Ge G, Yang L. Human carboxylesterases: a comprehensive review. *Acta Pharm Sin B.* 2018 Sep;8(5):699–712. doi:10.1016/j.apsb.2018.05.005 PubMed PMID: 30245959; PubMed Central PMCID: PMC6146386.
 96. Murase T, Suzuki Y, Doi Y, Iwata T. Nonhydrolytic fragmentation of a poly[(R)-3-hydroxybutyrate] single crystal revealed by use of a mutant of polyhydroxybutyrate depolymerase. *Biomacromolecules.* 2002 Apr;3(2):312–7. doi:10.1021/bm015604p PubMed PMID: 11888317.
 97. Mukai K, Yamada K, Doi Y. Kinetics and mechanism of heterogeneous hydrolysis of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] film by PHA depolymerases. *Int J Biol Macromol.* 1993 Dec;15(6):361–6. doi:10.1016/0141-8130(93)90054-p PubMed PMID: 8110658.
 98. Williams DF. Enzymic Hydrolysis of Polylactic Acid. *Eng Med.* 1981 Jan 1;10(1):5–7. doi:10.1243/EMED_JOUR_1981_010_004_02
 99. Masaki K, Kamini NR, Ikeda H, Iefuji H. Cutinase-Like Enzyme from the Yeast *Cryptococcus* sp. Strain S-2 Hydrolyzes Polylactic Acid and Other Biodegradable Plastics. *Appl Environ Microbiol.* 2005 Nov;71(11):7548–50. doi:10.1128/AEM.71.11.7548-7550.2005
 100. Kawai F, Nakadai K, Nishioka E, Nakajima H, Ohara H, Masaki K, et al. Different enantioselectivity of two types of poly(lactic acid) depolymerases toward poly(l-lactic acid) and

- poly(d-lactic acid). *Polym Degrad Stab.* 2011 Jul 1;96(7):1342–8. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2011.03.022
101. Murguiondo C, Barriuso J, Prieto A. Optimized enzymatic PLA hydrolysis by a recombinant fungal cutinase: A step towards a closed PLA cycle. *Int J Biol Macromol.* 2025 Jan 29;140482. doi:10.1016/j.ijbiomac.2025.140482
 102. Stauffer CE, Zeffren E. Concerning the Mechanism of Ester Hydrolysis by Proteases. *J Biol Chem.* 1970 Jul 10;245(13):3282–4. doi:10.1016/S0021-9258(18)62991-6 PubMed PMID: 5459630.
 103. Neurath H, Hartley BS. The hydrolysis of peptide and ester bonds by proteolytic enzymes. *J Cell Comp Physiol.* 1959;54(S1):179–202. doi:10.1002/jcp.1030540414
 104. Rosato A, Romano A, Totaro G, Celli A, Fava F, Zanaroli G, et al. Enzymatic Degradation of the Most Common Aliphatic Bio-Polyesters and Evaluation of the Mechanisms Involved: An Extended Study. *Polymers.* 2022 Jan;14(9):9. doi:10.3390/polym14091850
 105. de Albuquerque TL, Marques Júnior JE, de Queiroz LP, Ricardo ADS, Rocha MVP. Polylactic acid production from biotechnological routes: A review. *Int J Biol Macromol.* 2021 Sep 1;186:933–51. doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.07.074
 106. Reeve MS, McCarthy SP, Downey MJ, Gross RA. Polylactide stereochemistry: effect on enzymic degradability. *Macromolecules.* 1994 Jan 1;27(3):825–31. doi:10.1021/ma00081a030
 107. Hoshino A, Isono Y. Degradation of aliphatic polyester films by commercially available lipases with special reference to rapid and complete degradation of poly(L-lactide) film by lipase PL derived from *Alcaligenes* sp. *Biodegradation.* 2002 Apr 1;13(2):141–7. doi:10.1023/A:1020450326301
 108. Lim HA, Raku T, Tokiwa Y. Hydrolysis of polyesters by serine proteases. *Biotechnol Lett.* 2005 Apr;27(7):459–64. doi:10.1007/s10529-005-2217-8
 109. Computational design of an efficient and thermostable esterase for polylactic acid depolymerization. *Green Chem.* 2024 May 14;26(12):7268–79. doi:10.1039/d3gc04888h
 110. Sahu S, Kaur A, Khatri M, Singh G, Arya SK. A review on cutinases enzyme in degradation of microplastics. *J Environ Manage.* 2023 Dec 1;347:119193. doi:10.1016/j.jenvman.2023.119193
 111. Sui B, Wang T, Fang J, Hou Z, Shu T, Lu Z, et al. Recent advances in the biodegradation of polyethylene terephthalate with cutinase-like enzymes. *Front Microbiol.* 2023 Oct 2;14. doi:10.3389/fmicb.2023.1265139
 112. Stojanovski G, Bawn M, Locks A, Ambrose-Dempster E, Ward JM, Jeffries JWE, et al. Functional Enrichment and Sequence-Based Discovery Identify Promiscuous and Efficient Poly Lactic Acid Degrading Enzymes. *Environ Sci Technol.* 2025 May 6;59(17):8602–13. doi:10.1021/acs.est.4c07279
 113. Albertsson AC, Karlsson S. The influence of biotic and abiotic environments on the degradation of polyethylene. *Prog Polym Sci.* 1990 Jan 1;15(2):177–92. doi:10.1016/0079-6700(90)90027-X

114. Bell EL, Rosetto G, Ingraham MA, Ramirez KJ, Lincoln C, Clarke RW, et al. Natural diversity screening, assay development, and characterization of nylon-6 enzymatic depolymerization. *Nat Commun.* 2024 Feb 9;15(1):1217. doi:10.1038/s41467-024-45523-5
115. Wei R, Oeser T, Barth M, Weigl N, Lübs A, Schulz-Siegmund M, et al. Turbidimetric analysis of the enzymatic hydrolysis of polyethylene terephthalate nanoparticles. *J Mol Catal B Enzym.* 2014 May 1;ChemBioTec - a network for sustainable (bio)catalytic production103:72–8. doi:10.1016/j.molcatb.2013.08.010
116. Yew M, Yang Y, Wang Q, Zhu L. High-throughput screening strategies for plastic-depolymerizing enzymes. *Trends Biotechnol.* 2025 Jul 1;43(7):1550–65. doi:10.1016/j.tibtech.2024.12.008 PubMed PMID: 39843328.
117. Taxeidis G, Djapovic M, Nikolaivits E, Maslak V, Nikodinovic-Runic J, Topakas E. New Labeled PET Analogues Enable the Functional Screening and Characterization of PET-Degrading Enzymes. *ACS Sustain Chem Eng.* 2024 Apr 15;12(15):5943–52. doi:10.1021/acssuschemeng.4c00143
118. Thumarat U, Kawabata T, Nakajima M, Nakajima H, Sugiyama A, Yazaki K, et al. Comparison of genetic structures and biochemical properties of tandem cutinase-type polyesterses from *Thermobifida alba* AHK119. *J Biosci Bioeng.* 2015 Nov 1;120(5):491–7. doi:10.1016/j.jbiosc.2015.03.006
119. Pirillo V, Pollegioni L, Molla G. Analytical methods for the investigation of enzyme-catalyzed degradation of polyethylene terephthalate. *FEBS J.* 2021;288(16):4730–45. doi:10.1111/febs.15850
120. Heumann S, Eberl A, Pobeheim H, Liebminger S, Fischer-Colbrie G, Almansa E, et al. New model substrates for enzymes hydrolysing polyethyleneterephthalate and polyamide fibres. *J Biochem Biophys Methods.* 2006 Nov 30;Proceedings of the 8th International Symposium on Instrumental Analysis69(1):89–99. doi:10.1016/j.jbbm.2006.02.005
121. Pantelic B, Skaro Bogojevic S, Milivojevic D, Ilic-Tomic T, Lončarević B, Beskoski V, et al. Set of Small Molecule Polyurethane (PU) Model Substrates: Ecotoxicity Evaluation and Identification of PU Degrading Biocatalysts. *Catalysts.* 2023 Feb;13(2):278. doi:10.3390/catal13020278
122. Negoro S, Kato D ichiro, Ohki T, Yasuhira K, Kawashima Y, Nagai K, et al. Chapter Seventeen - Structural and functional characterization of nylon hydrolases. In: Weber G, Bornscheuer UT, Wei R, editors. *Enzymatic Plastic Degradation* [Internet]. Academic Press; 2021 [cited 2026 Jul 10]. p. 357–89. (Methods in Enzymology). Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687920303669> doi:10.1016/bs.mie.2020.11.004
123. He JZ, Lu Y, Jain N, Churchill DG, Wong LS. Evaluation of Fluorescence-Based Screening Assays for the Detection and Quantification of Silyl Hydrolase Activity. *ACS Omega.* 2024 Jul 9;9(27):29939–46. doi:10.1021/acsomega.4c05409
124. Rahmanpour R, Rea D, Jamshidi S, Fülöp V, Bugg TDH. Structure of *Thermobifida fusca* DyP-type peroxidase and activity towards Kraft lignin and lignin model compounds. *Arch Biochem Biophys.* 2016 Mar 15;594:54–60. doi:10.1016/j.abb.2016.02.019

125. Arbige MV, Shetty JK, Chotani GK. Industrial Enzymology: The Next Chapter. *Trends Biotechnol.* 2019 Dec;37(12):1355–66. doi:10.1016/j.tibtech.2019.09.010 PubMed PMID: 31679826.
126. Hutchison CA, Phillips S, Edgell MH, Gillam S, Jahnke P, Smith M. Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence. *J Biol Chem.* 1978 Sep 25;253(18):6551–60. doi:10.1016/S0021-9258(19)46967-6
127. Chowdhury R, Maranas CD. From directed evolution to computational enzyme engineering—A review. *AIChE J.* 2020;66(3):e16847. doi:10.1002/aic.16847
128. Singh R, Tiwari M, Singh R, Lee JK. From Protein Engineering to Immobilization: Promising Strategies for the Upgrade of Industrial Enzymes. *Int J Mol Sci.* 2013 Jan 10;14(1):1232–77. doi:10.3390/ijms14011232
129. Ali M, Ishqi HM, Husain Q. Enzyme engineering: Reshaping the biocatalytic functions. *Biotechnol Bioeng.* 2020;117(6):1877–94. doi:10.1002/bit.27329
130. Protein engineering: the potential of remote mutations | Biochemical Society Transactions | Portland Press [Internet]. [cited 2026 Jun 11]. Available from: <https://portlandpress.com/biochemsoctrans/article-abstract/47/2/701/219666/Protein-engineering-the-potential-of-remote?redirectedFrom=fulltext>
131. Han X, Liu W, Huang JW, Ma J, Zheng Y, Ko TP, et al. Structural insight into catalytic mechanism of PET hydrolase. *Nat Commun.* 2017 Dec 13;8(1):2106. doi:10.1038/s41467-017-02255-z
132. Chen CC, Han X, Ko TP, Liu W, Guo RT. Structural studies reveal the molecular mechanism of PETase. *FEBS J.* 2018;285(20):3717–23. doi:10.1111/febs.14612
133. Arnold FH. Directed evolution: Creating biocatalysts for the future. *Chem Eng Sci.* 1996 Dec 1;51(23):5091–102. doi:10.1016/S0009-2509(96)00288-6
134. Packer MS, Liu DR. Methods for the directed evolution of proteins. *Nat Rev Genet.* 2015 Jul;16(7):379–94. doi:10.1038/nrg3927
135. Stemmer WPC. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature.* 1994 Aug;370(6488):389–91. doi:10.1038/370389a0
136. Zhu B, Wang D, Wei N. Enzyme discovery and engineering for sustainable plastic recycling. *Trends Biotechnol.* 2022 Jan 1;40(1):22–37. doi:10.1016/j.tibtech.2021.02.008 PubMed PMID: 33676748.
137. Wu S, Xiang C, Zhou Y, Khan MSH, Liu W, Feiler CG, et al. A growth selection system for the directed evolution of amine-forming or converting enzymes. *Nat Commun.* 2022 Dec 3;13(1):7458. doi:10.1038/s41467-022-35228-y
138. Guo HH, Choe J, Loeb LA. Protein tolerance to random amino acid change. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jun 22;101(25):9205–10. doi:10.1073/pnas.0403255101 PubMed PMID: 15197260; PubMed Central PMCID: PMC438954.

139. Reetz MT, Kahakeaw D, Lohmer R. Addressing the Numbers Problem in Directed Evolution. *ChemBioChem*. 2008;9(11):1797–804. doi:10.1002/cbic.200800298
140. Wong TS, Wong TS, Roccatano* D, Schwaneberg U. Challenges of the genetic code for exploring sequence space in directed protein evolution. *Biocatal Biotransformation*. 2007 Jan 1;25(2–4):229–41. doi:10.1080/10242420701444280
141. Li A, Sheng Y, Cui H, Wang M, Wu L, Song Y, et al. Discovery and mechanism-guided engineering of BHET hydrolases for improved PET recycling and upcycling. *Nat Commun*. 2023 Jul 13;14(1):4169. doi:10.1038/s41467-023-39929-w PubMed PMID: 37443360; PubMed Central PMCID: PMC10344914.
142. Zheng L, Baumann U, Reymond JL. An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic Acids Res*. 2004 Jul 15;32(14):e115. doi:10.1093/nar/gnh110
143. Clifton BE, Kozome D, Laurino P. Efficient Exploration of Sequence Space by Sequence-Guided Protein Engineering and Design. *Biochemistry*. 2023 Jan 17;62(2):210–20. doi:10.1021/acs.biochem.1c00757
144. Porebski BT, Buckle AM. Consensus protein design. *Protein Eng Des Sel*. 2016 Jul 1;29(7):245–51. doi:10.1093/protein/gzw015
145. Akanuma S, Nakajima Y, Yokobori S ichi, Kimura M, Nemoto N, Mase T, et al. Experimental evidence for the thermophilicity of ancestral life. *Proc Natl Acad Sci*. 2013 Jul 2;110(27):11067–72. doi:10.1073/pnas.1308215110
146. Gaucher EA, Thomson JM, Burgan MF, Benner SA. Inferring the palaeoenvironment of ancient bacteria on the basis of resurrected proteins. *Nature*. 2003 Sep;425(6955):285–8. doi:10.1038/nature01977
147. Livada J, Vargas AM, Martinez CA, Lewis RD. Ancestral Sequence Reconstruction Enhances Gene Mining Efforts for Industrial Ene Reductases by Expanding Enzyme Panels with Thermostable Catalysts. *ACS Catal*. 2023 Feb 17;13(4):2576–85. doi:10.1021/acscatal.2c03859
148. Joho Y, Vongsouthi V, Spence MA, Ton J, Gomez C, Tan LL, et al. Ancestral Sequence Reconstruction Identifies Structural Changes Underlying the Evolution of Ideonella sakaiensis PETase and Variants with Improved Stability and Activity. *Biochemistry*. 2023 Jan 17;62(2):437–50. doi:10.1021/acs.biochem.2c00323
149. Hendrikse NM, Charpentier G, Nordling E, Syrén PO. Ancestral diterpene cyclases show increased thermostability and substrate acceptance. *FEBS J*. 2018;285(24):4660–73. doi:10.1111/febs.14686
150. Chisuga T, Takinami S, Liao Z, Karasawa M, Adachi N, Kawasaki M, et al. Ancestral sequence reconstruction as a tool for structural analysis of modular polyketide synthases. *Nat Commun*. 2025 Jul 25;16(1):6847. doi:10.1038/s41467-025-62168-0
151. Gonzalez D, Hiblot J, Darbinian N, Miller JC, Gotthard G, Amini S, et al. Ancestral mutations as a tool for solubilizing proteins: The case of a hydrophobic phosphate-binding protein. *FEBS Open Bio*. 2014 Jan 1;4:121–7. doi:10.1016/j.fob.2013.12.006

152. Okafor CD, Pathak MC, Fagan CE, Bauer NC, Cole MF, Gaucher EA, et al. Structural and Dynamics Comparison of Thermostability in Ancient, Modern, and Consensus Elongation Factor Tus. *Structure*. 2018 Jan 1;26(1). doi:10.1016/j.str.2017.11.018
153. Risso VA, Gavira JA, Gaucher EA, Sanchez-Ruiz JM. Phenotypic comparisons of consensus variants versus laboratory resurrections of Precambrian proteins. *Proteins Struct Funct Bioinforma*. 2014;82(6):887–96. doi:10.1002/prot.24575
154. Akanuma S, Iwami S, Yokoi T, Nakamura N, Watanabe H, Yokobori S ichi, et al. Phylogeny-Based Design of a B-Subunit of DNA Gyrase and Its ATPase Domain Using a Small Set of Homologous Amino Acid Sequences. *J Mol Biol*. 2011 Sep 16;412(2):212–25. doi:10.1016/j.jmb.2011.07.042
155. Kouba P, Kohout P, Haddadi F, Bushuiev A, Samusevich R, Sedlar J, et al. Machine Learning-Guided Protein Engineering. *ACS Catal*. 2023 Oct 13;13(21):13863–95. doi:10.1021/acscatal.3c02743
156. Lu H, Diaz DJ, Czarnecki NJ, Zhu C, Kim W, Shroff R, et al. Machine learning-aided engineering of hydrolases for PET depolymerization. *Nature*. 2022 Apr;604(7907):662–7. doi:10.1038/s41586-022-04599-z PubMed PMID: 35478237.
157. Nenadović M, Maršavelski A, Bogojević SŠ, Maslak V, Nikodinović-Runić J, Milovanović J. New model compounds for the efficient colorimetric screening of medium chain length polyhydroxyalkanoate (mcl-PHA) depolymerases reveal mechanism of activity. *Int J Biol Macromol*. 2024 Dec 1;283:137672. doi:10.1016/j.ijbiomac.2024.137672
158. Betzel C, Klupsch S, Papendorf G, Hastrup S, Branner S, Wilson KS. Crystal structure of the alkaline proteinase SavinaseTM from *Bacillus lentus* at 1.4 Å resolution. *J Mol Biol*. 1992 Jan 20;223(2):427–45. doi:10.1016/0022-2836(92)90662-4
159. Kitamoto H, Koitabashi M, Sameshima-Yamashita Y, Ueda H, Takeuchi A, Watanabe T, et al. Accelerated degradation of plastic products via yeast enzyme treatment. *Sci Rep*. 2023 Feb 10;13(1):2386. doi:10.1038/s41598-023-29414-1
160. Rusiecka O, Hryniewicz K, Trykowski G, Szewczyk R, Bernat P. Enzymatic biodegradation of poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT) microplastic by *Trichoderma harzianum* KKP534. *Int Biodeterior Biodegrad*. 2026 Jul 1;213:106370. doi:10.1016/j.ibiod.2026.106370
161. Hiraishi T, Hirahara Y, Doi Y, Maeda M, Taguchi S. Effects of mutations in the substrate-binding domain of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] (PHB) depolymerase from *Ralstonia pickettii* T1 on PHB degradation. *Appl Environ Microbiol*. 2006 Nov;72(11):7331–8. doi:10.1128/AEM.01187-06 PubMed PMID: 16963553; PubMed Central PMCID: PMC1636158.
162. Martínez-Tobón DI, Waters B, Elias AL, Sauvageau D. Streamlined production, purification, and characterization of recombinant extracellular polyhydroxybutyrate depolymerases. *MicrobiologyOpen*. 2020;9(4):e1001. doi:10.1002/mbo3.1001

163. Kuderová A, Nanak E, Truksa M, Brzobohatý B. Use of Rifampicin in T7 RNA Polymerase-Driven Expression of a Plant Enzyme: Rifampicin Improves Yield and Assembly. *Protein Expr Purif.* 1999 Aug 1;16(3):405–9. doi:10.1006/prep.1999.1079
164. Singh VK, Nain V, Phanindra MLV, Gothandapani S, Chhapekar SS, Sreevathsa R, et al. Rifampicin Increases Expression of Plant Codon-Optimized *Bacillus thuringiensis* δ -Endotoxin Genes in *Escherichia coli*. *Protein J.* 2022 Apr 1;41(2):327–36. doi:10.1007/s10930-022-10043-y
165. Andersen KR, Leksa NC, Schwartz TU. Optimized *E. coli* expression strain LOBSTR eliminates common contaminants from His-tag purification. *Proteins.* 2013 Nov;81(11):1857–61. doi:10.1002/prot.24364 PubMed PMID: 23852738; PubMed Central PMCID: PMC4086167.
166. Schirmer A, Jendrosseck D, Schlegel HG. Degradation of poly(3-hydroxyoctanoic acid) [P(3HO)] by bacteria: purification and properties of a P(3HO) depolymerase from *Pseudomonas fluorescens* GK13. *Appl Environ Microbiol.* 1993 Apr;59(4):1220–7. PubMed PMID: 8476295; PubMed Central PMCID: PMC202264.
167. Kim DY, Nam JS, Rhee YH. Characterization of an Extracellular Medium-Chain-Length Poly(3-hydroxyalkanoate) Depolymerase from *Pseudomonas alcaligenes* LB19. *Biomacromolecules.* 2002 Mar 1;3(2):291–6. doi:10.1021/bm010113q
168. Gangoit J, Santos M, Prieto MA, de la Mata I, Serra JL, Llama MJ. Characterization of a novel subgroup of extracellular medium-chain-length polyhydroxyalkanoate depolymerases from actinobacteria. *Appl Environ Microbiol.* 2012 Oct;78(20):7229–37. doi:10.1128/AEM.01707-12 PubMed PMID: 22865072; PubMed Central PMCID: PMC3457088.
169. Kim HJ, Kim DY, Nam JS, Bae KS, Rhee YH. Characterization of an extracellular medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoate) depolymerase from *Streptomyces* sp. KJ-72. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2003;83(2):183–9. doi:10.1023/a:1023395527073 PubMed PMID: 12785312.
170. Kim HM, Ryu KE, Bae KS, Rhee YH. Purification and characterization of extracellular medium-chain-length polyhydroxyalkanoate depolymerase from *Pseudomonas* sp. RY-1. *J Biosci Bioeng.* 2000 Jan 1;89(2):196–8. doi:10.1016/S1389-1723(00)88737-X
171. Rhee YH, Kim YH, Shin KS. Characterization of an extracellular poly(3-hydroxyoctanoate) depolymerase from the marine isolate, *Pseudomonas luteola* M13-4. *Enzyme Microb Technol.* 2006 Feb 1;38(3):529–35. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.07.006
172. Gangoit J, Santos M, Llama MJ, Serra JL. Production of chiral (R)-3-hydroxyoctanoic acid monomers, catalyzed by *Pseudomonas fluorescens* GK13 poly(3-hydroxyoctanoic acid) depolymerase. *Appl Environ Microbiol.* 2010 Jun;76(11):3554–60. doi:10.1128/AEM.00337-10 PubMed PMID: 20400568; PubMed Central PMCID: PMC2876462.
173. Makryniotis K, Nikolaivits E, Gkoutela C, Vouyiouka S, Topakas E. Discovery of a polyesterase from *Deinococcus maricopensis* and comparison to the benchmark LCCICCG suggests high potential for semi-crystalline post-consumer PET degradation. *J Hazard Mater.* 2023 Aug 5;455:131574. doi:10.1016/j.jhazmat.2023.131574

174. Makryniotis K, Nikolaivits E, Taxeidis G, Nikodinović-Runić J, Topakas E. Exploring the substrate spectrum of phylogenetically distinct bacterial polyesterases. *Biotechnol J*. 2024;e2400053.
175. Aris MH, Annuar MSM, Ling TC. Lipase-mediated degradation of poly- ϵ -caprolactone in toluene: Behavior and its action mechanism. *Polym Degrad Stab*. 2016 Nov 1;133:182–91. doi:<https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2016.08.015>
176. Fernandez-Lorente G, Palomo JM, Cabrera Z, Fernandez-Lafuente R, Guisán JM. Improved catalytic properties of immobilized lipases by the presence of very low concentrations of detergents in the reaction medium. *Biotechnol Bioeng*. 2007;97(2):242–50.
177. Jaeger KE, Kovacic F. Determination of lipolytic enzyme activities. *Pseudomonas Methods Protoc*. 2014;111–34.
178. Moreira K da S, de Oliveira ALB, de Moura Júnior LS, de Sousa IG, Cavalcante ALG, Neto FS, et al. Taguchi design-assisted co-immobilization of lipase A and B from *Candida antarctica* onto chitosan: Characterization, kinetic resolution application, and docking studies. *Chem Eng Res Des*. 2022;177:223–44.
179. Santos M, Gangoiti J, Keul H, Möller M, Serra JL, Llama MJ. Polyester hydrolytic and synthetic activity catalyzed by the medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoate) depolymerase from *Streptomyces venezuelae* SO1. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013 Jan;97(1):211–22. doi:10.1007/s00253-012-4210-1 PubMed PMID: 22695803.
180. Paloyan A, Tadevosyan M, Ghevondyan D, Khoyetsyan L, Karapetyan M, Margaryan A, et al. Biodegradation of polyhydroxyalkanoates: current state and future prospects. *Front Microbiol*. 2025 Feb 24;16:1542468. doi:10.3389/fmicb.2025.1542468 PubMed PMID: 40066265; PubMed Central PMCID: PMC11893044.
181. Dias IP, da Cunha RS, Masaki R, Todo Bom MA, Ramos EAS, dos Santos GJVP, et al. Controlling Protein Immobilization over Poly(3-hydroxybutyrate) Microparticles Using Substrate Binding Domain from PHA Depolymerase. *Biomacromolecules*. 2025 Apr 14;26(4):2529–39. doi:10.1021/acs.biomac.5c00010
182. Khan RT, Musil M, Stourac J, Damborsky J, Bednar D. Fully Automated Ancestral Sequence Reconstruction using FireProtASR [Internet]. doi:10.1002/cpz1.30
183. Asrat T, Jackman D, Booth V. Bacterial expression, purification and folding of exceptionally hydrophobic and essential protein: Surfactant Protein-B (SP-B). *PLOS One*. 2025 Apr 25;20(4):e0321446. doi:10.1371/journal.pone.0321446 PubMed PMID: 40279330; PubMed Central PMCID: PMC12027065.
184. Ahn SO, Lim HD, You SH, Cheong DE, Kim GJ. Soluble Expression and Efficient Purification of Recombinant Class I Hydrophobin DewA. *Int J Mol Sci*. 2021 Jul 22;22(15):7843. doi:10.3390/ijms22157843 PubMed PMID: 34360609; PubMed Central PMCID: PMC8345945.
185. Papanephytous CP, Pantazaki AA, Kyriakidis DA. An extracellular polyhydroxybutyrate depolymerase in *Thermus thermophilus* HB8. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2009 Jun;83(4):659–68. doi:10.1007/s00253-008-1842-2 PubMed PMID: 19214501.

186. Thomas GM, Quirk S, Huard DJE, Lieberman RL. Bioplastic degradation by a polyhydroxybutyrate depolymerase from a thermophilic soil bacterium. *Protein Sci Publ Protein Soc.* 2022 Nov;31(11):e4470. doi:10.1002/pro.4470 PubMed PMID: 36222314; PubMed Central PMCID: PMC9601781.
187. Quirk S, Thomas GM, Wallace LJ, Woody MJ, Peek ME, Lieberman RL. A multidomain hydrolase from the thermophile *Thermanaeromonas toyohensis* degrades high molecular mass forms of polyhydroxybutyrate. *Protein Sci.* 2025;34(8):e70223. doi:10.1002/pro.70223
188. Calabia BP, Tokiwa Y. A Novel PHB Depolymerase from a Thermophilic *Streptomyces* Sp. *Biotechnol Lett.* 2006. doi:10.1007/s10529-005-6063-5
189. Lu H, Diaz DJ, Czarnecki NJ, Zhu C, Kim W, Shroff R, et al. Deep learning redesign of PETase for practical PET degrading applications [Internet]. *bioRxiv*; 2021 [cited 2026 Jun 16]. p. 2021.10.10.463845. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.10.10.463845v1> doi:10.1101/2021.10.10.463845
190. Tokuriki N, Tawfik DS. Stability effects of mutations and protein evolvability. *Curr Opin Struct Biol.* 2009 Oct 1;Carbohydrates and glycoconjugates / Biophysical methods19(5):596–604. doi:10.1016/j.sbi.2009.08.003
191. Luo J, Song C, Cui W, Han L, Zhou Z. Counteraction of stability-activity trade-off of Nattokinase through flexible region shifting. *Food Chem.* 2023 Oct 15;423:136241. doi:10.1016/j.foodchem.2023.136241
192. Tokuriki N, Stricher F, Serrano L, Tawfik DS. How Protein Stability and New Functions Trade Off. *PLOS Comput Biol.* 2008 Feb 29;4(2):e1000002. doi:10.1371/journal.pcbi.1000002
193. Mohanan N, Wong MCH, Budisa N, Levin DB. Polymer-Degrading Enzymes of *Pseudomonas chloroaphis* PA23 Display Broad Substrate Preferences. *Int J Mol Sci.* 2023 Jan;24(5):4501. doi:10.3390/ijms24054501
194. Kim DY, Kim HC, Kim SY, Rhee YH. Molecular characterization of extracellular medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoate) depolymerase genes from *Pseudomonas alcaligenes* strains. *J Microbiol Seoul Korea.* 2005 Jun;43(3):285–94. PubMed PMID: 15995648.
195. Feng L, Wang Y, Inagawa Y, Kasuya K, Saito T, Doi Y, et al. Enzymatic degradation behavior of comonomer compositionally fractionated bacterial poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)s by poly(3-hydroxyalkanoate) depolymerases isolated from *Ralstonia pickettii* T1 and *Acidovorax* sp. TP4. *Polym Degrad Stab.* 2004 Apr 1;84(1):95–104. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2003.09.016
196. Matsumoto N, Fujita M, Hiraishi T, Abe H, Maeda M. Adsorption characteristics of P(3HB) depolymerase as evaluated by surface plasmon resonance and atomic force microscopy. *Biomacromolecules.* 2008 Nov;9(11):3201–7. doi:10.1021/bm800790q PubMed PMID: 18939805.
197. Tan LT, Hiraishi T, Sudesh K, Maeda M. Effects of mutation at position 285 of *Ralstonia pickettii* T1 poly[(R)-3-hydroxybutyrate] depolymerase on its activities. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014 Aug 1;98(16):7061–8. doi:10.1007/s00253-014-5660-4

198. Kasuya K ichi, Inoue Y, Doi Y. Adsorption kinetics of bacterial PHB depolymerase on the surface of polyhydroxyalkanoate films. *Int J Biol Macromol*. 1996 Jul 1;19(1):35–40. doi:10.1016/0141-8130(96)01097-5
199. K K, T O, K M, Y D. Substrate and binding specificities of bacterial polyhydroxybutyrate depolymerases. *Int J Biol Macromol*. 1999 May;24(4). doi:10.1016/s0141-8130(99)00046-x PubMed PMID: 10408639.
200. Yamashita K, Funato T, Suzuki Y, Teramachi S, Doi Y. Characteristic Interactions between Poly(hydroxybutyrate) Depolymerase and Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] Film Studied by a Quartz Crystal Microbalance. *Macromol Biosci*. 2003;3(11):694–702. doi:10.1002/mabi.200300004
201. Fujita M, Kobori Y, Aoki Y, Matsumoto N, Abe H, Doi Y, et al. Interaction between Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] Depolymerase and Biodegradable Polyesters Evaluated by Atomic Force Microscopy. *Langmuir*. 2005 Dec 1;21(25):11829–35. doi:10.1021/la051903e
202. Joho Y, Vongsouthi V, Spence MA, Ton J, Gomez C, Tan LL, et al. Ancestral Sequence Reconstruction Identifies Structural Changes Underlying the Evolution of Ideonella sakaiensis PETase and Variants with Improved Stability and Activity. *Biochemistry*. 2023 Jan 17;62(2):437–50. doi:10.1021/acs.biochem.2c00323
203. Copley SD. Setting the stage for evolution of a new enzyme. *Curr Opin Struct Biol*. 2021 Aug;69:41–9. doi:10.1016/j.sbi.2021.03.001 PubMed PMID: 33865035; PubMed Central PMCID: PMC8405452.
204. Jackson C, Toth-Petroczy A, Kolodny R, Hollfelder F, Et. A. Adventures on the Routes of Protein Evolution—In Memoriam Dan Salah Tawfik (1955–2021). *J Mol Biol*. 2022. doi:10.1016/j.jmb.2022.167462
205. Suzuki M, Tachibana Y, Kasuya K ichi. Biodegradability of poly(3-hydroxyalkanoate) and poly(ϵ -caprolactone) via biological carbon cycles in marine environments. *Polym J*. 2021 Jan;53(1):47–66. doi:10.1038/s41428-020-00396-5
206. Herrero Acero E, Ribitsch D, Steinkellner G, Gruber K, Greimel K, Eiteljoerg I, et al. Enzymatic Surface Hydrolysis of PET: Effect of Structural Diversity on Kinetic Properties of Cutinases from Thermobifida. *Macromolecules*. 2011 Jun 28;44(12):4632–40. doi:10.1021/ma200949p
207. Korpecka J, Heumann S, Billig S, Zimmermann W, Et. A. Hydrolysis of Cutin by PET-Hydrolases. *Macromol Symp*. 2010. doi:10.1002/masy.201051047
208. Qian H, Zhang C, Lu Z, Xia B, Bie X, Zhao H, et al. Consensus design for improved thermostability of lipxygenase from Anabaena sp. PCC 7120. *BMC Biotechnol*. 2018 Sep 20;18(1):57. doi:10.1186/s12896-018-0468-4 PubMed PMID: 30236091; PubMed Central PMCID: PMC6148764.
209. Lu M, Li Z, Zhuang H, Yang S, Zhao X, Shen H, et al. Dual Enhancement of Thermostability and Activity of Xylanase through Computer-Aided Rational Design.
210. Hermawan S, Jendrosseck D. Tyrosine 105 of Paucimonas lemoignei PHB depolymerase PhaZ7 is essential for polymer binding. *Polym Degrad Stab*. 2010 Aug 1;International Conference on Bio-

- based Polymers (ICBP 2009) “Ensuring A Sustainable Tomorrow”95(8):1429–35. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2010.01.002
211. Jendrossek D, Hermawan S, Subedi B, Papageorgiou AC. Biochemical analysis and structure determination of *Paucimonas lemoignei* poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase PhaZ7 muteins reveal the PHB binding site and details of substrate–enzyme interactions. *Mol Microbiol.* 2013;90(3):649–64. doi:10.1111/mmi.12391
 212. Hiraishi T, Komiya N, Matsumoto N, Abe H, Fujita M, Maeda M. Degradation and adsorption characteristics of PHB depolymerase as revealed by kinetics of mutant enzymes with amino acid substitution in substrate-binding domain. *Biomacromolecules.* 2010 Jan 11;11(1):113–9. doi:10.1021/bm900967a PubMed PMID: 20058938.
 213. Hiraishi T, Komiya N, Maeda M. Y443F mutation in the substrate-binding domain of extracellular PHB depolymerase enhances its PHB adsorption and disruption abilities. *Polym Degrad Stab.* 2010 Aug 1;International Conference on Bio-based Polymers (ICBP 2009) “Ensuring A Sustainable Tomorrow”95(8):1370–4. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2010.01.022
 214. Tan LT, Hiraishi T, Sudesh K, Maeda M. Directed evolution of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] depolymerase using cell surface display system: functional importance of asparagine at position 285. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013 Jun 1;97(11):4859–71. doi:10.1007/s00253-012-4366-8
 215. Shalem A, Yehezkeli O, Fishman A. Enzymatic degradation of polylactic acid (PLA). *Appl Microbiol Biotechnol.* 2024;108(1):413. doi:10.1007/s00253-024-13212-4 PubMed PMID: 38985324; PubMed Central PMCID: PMC11236915.
 216. Mat Yasin N, Akkermans S, Van Impe JFM. Enhancing the biodegradation of (bio)plastic through pretreatments: A critical review. *Waste Manag.* 2022 Aug 1;150:1–12. doi:10.1016/j.wasman.2022.06.004
 217. Sourkouni G, Kalogirou C, Moritz P, Gödde A, Pandis PK, Höfft O, et al. Study on the influence of advanced treatment processes on the surface properties of polylactic acid for a bio-based circular economy for plastics. *Ultrason Sonochem.* 2021 Aug 1;76:105627. doi:10.1016/j.ultsonch.2021.105627
 218. Kalogirou C, Höfft O, Gödde A, Papadimitriou N, Pandis PK, Argirusis C, et al. Assessing the Time Dependence of AOPs on the Surface Properties of Polylactic Acid. *J Polym Environ.* 2023 Jan 1;31(1):345–57. doi:10.1007/s10924-022-02608-w
 219. Vimala PP, Mathew L. Biodegradation of Polyethylene Using *Bacillus Subtilis*. *Procedia Technol.* 2016 Jan 1;International Conference on Emerging Trends in Engineering, Science and Technology (ICETEST - 2015)24:232–9. doi:10.1016/j.protec.2016.05.031
 220. Jeon HJ, Kim MN. Biodegradation of poly(l-lactide) (PLA) exposed to UV irradiation by a mesophilic bacterium. *Int Biodeterior Biodegrad.* 2013 Nov 1;85:289–93. doi:10.1016/j.ibiod.2013.08.013

221. Longieras A, Tanchette JB, Erre D, Braud C, Copinet A. Compostability of Poly(lactide): Degradation in an Inert Solid Medium. *J Polym Environ.* 2007 Jul 1;15(3):200–6. doi:10.1007/s10924-007-0061-8
222. Yang HS, Yoon JS, Kim MN. Dependence of biodegradability of plastics in compost on the shape of specimens. *Polym Degrad Stab.* 2005 Jan 1;87(1):131–5. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2004.07.016
223. Benn N, Zitomer D. Pretreatment and Anaerobic Co-digestion of Selected PHB and PLA Bioplastics. *Front Environ Sci.* 2018 Jan 4;5. doi:10.3389/fenvs.2017.00093
224. Cui L, Wang X, Szarka G, Hegyesi N, Wang Y, Sui X, et al. Quantitative analysis of factors determining the enzymatic degradation of poly(lactic acid). *Int J Biol Macromol.* 2022 Jun 1;209:1703–9. doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.04.121
225. Pérez-Venegas M, Frišćić T, Auclair K. Efficient Mechano-Enzymatic Hydrolysis of Polylactic Acid under Moist-Solid Conditions. *ACS Sustain Chem Eng.* 2023 Jul 10;11(27):9924–31. doi:10.1021/acssuschemeng.2c06847
226. Liparoti S, Iozzino V, Speranza V, Pantani R. Modulating poly(lactic acid) degradation rate for environmentally sustainable applications. *Waste Manag.* 2024 Mar 1;175:215–24. doi:10.1016/j.wasman.2024.01.004
227. Siracusa C, Lenzi L, Fabbri F, Ploszczanski L, Fabbri P, Morselli D, et al. Combined effect of glycerol/levulinic acid-based bioadditive on enzymatic hydrolysis and plasticization of amorphous and semi-crystalline poly(lactic acid). *J Vinyl Addit Technol.* 2025 Mar 18;1–17. doi:10.1002/vnl.22213
228. Solarz D, Witko T, Karcz R, Malagurski I, Ponjavic M, Levic S, et al. Biological and physiochemical studies of electrospun polylactid/polyhydroxyoctanoate PLA/P(3HO) scaffolds for tissue engineering applications. *RSC Adv.* 2023 Aug 4;13(34):24112–28. doi:10.1039/D3RA03021K
229. Enumo A, Gross IP, Saatkamp RH, Pires ATN, Parize AL. Evaluation of mechanical, thermal and morphological properties of PLA films plasticized with maleic acid and its propyl ester derivatives. *Polym Test.* 2020 Aug 1;88:106552. doi:10.1016/j.polymertesting.2020.106552
230. Siriprom W, Sangwaranatee N, Herman, Chantarasunthon K, Teanchai K, Chamchoi N. Characterization and analyzation of the poly (L-lactic acid) (PLA) films. *Mater Today Proc.* 2018 Jan 1;The 3rd International Conference on Applied Physics and Materials Applications (ICAPMA 2017), 31 May–2 June 20175(7, Part 1):14803–6. doi:10.1016/j.matpr.2018.04.009
231. Ma H, Khusnutdinova AN, Lemak S, Chernikova TN, Golyshina OV, Almendral D, et al. Polyesterase activity is widespread in the family IV carboxylesterases from bacteria. *J Hazard Mater.* 2025 Jan 5;481:136540. doi:10.1016/j.jhazmat.2024.136540
232. Nakashima K, Maruyama T, Kamiya N, Goto M. Homogeneous enzymatic reactions in ionic liquids with poly(ethylene glycol)-modified subtilisin. *Org Biomol Chem.* 2006 Sep 21;4(18):3462–7. doi:10.1039/b608920h PubMed PMID: 17036141.

233. Hosseini-Koupaei M, Shareghi B, Saboury AA, Davar F, Raisi F. The effect of spermidine on the structure, kinetics and stability of proteinase K: spectroscopic and computational approaches. *RSC Adv.* 2016 Nov 3;6(107):105476–86. doi:10.1039/C6RA20975K
234. Maurya A, Bhattacharya A, Khare SK. Enzymatic Remediation of Polyethylene Terephthalate (PET)–Based Polymers for Effective Management of Plastic Wastes: An Overview. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020 Nov 19;8:602325. doi:10.3389/fbioe.2020.602325 PubMed PMID: 33330434; PubMed Central PMCID: PMC7710609.
235. Contesini FJ, Melo RR de, Sato HH. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. *Crit Rev Biotechnol.* 2018 May;38(3):321–34. doi:10.1080/07388551.2017.1354354 PubMed PMID: 28789570.
236. Cai D, Rao Y, Zhan Y, Wang Q, Chen S. Engineering *Bacillus* for efficient production of heterologous protein: current progress, challenge and prospect. *J Appl Microbiol.* 2019;126(6):1632–42. doi:10.1111/jam.14192
237. Han Z, Ye C, Dong X, Chen C, Zou D, Huang K, et al. Genetic identification and expression optimization of a novel protease HapR from *Bacillus velezensis*. *Front Bioeng Biotechnol.* 2024 Mar 13;12. doi:10.3389/fbioe.2024.1383083
238. Vital-Vilchis I, Karunakaran E. Make it or break it: A review on PHA synthase and depolymerase proteins. *J Polym Environ.* 2025 Mar 1;33(3):1267–91. doi:10.1007/s10924-024-03474-4
239. Scandola M, Focarete ML, Adamus G, Sikorska W, Baranowska I, Świerczek S, et al. Polymer Blends of Natural Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and a Synthetic Atactic Poly(3-hydroxybutyrate). Characterization and Biodegradation Studies. *Macromolecules.* 1997 May 1;30(9):2568–74. doi:10.1021/ma961431y
240. Focarete ML, Ceccorulli G, Scandola M, Kowalczyk M. Further Evidence of Crystallinity-Induced Biodegradation of Synthetic Atactic Poly(3-hydroxybutyrate) by PHB-Depolymerase A from *Pseudomonas lemoignei*. Blends of Atactic Poly(3-hydroxybutyrate) with Crystalline Polyesters. *Macromolecules.* 1998 Dec 1;31(24):8485–92. doi:10.1021/ma981115e
241. Abe H, Matsubara I, Doi Y. Physical Properties and Enzymic Degradability of Polymer Blends of Bacterial Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] and Poly[(R,S)-3-hydroxybutyrate] Stereoisomers. *Macromolecules.* 1995 Feb 1;28(4):844–53. doi:10.1021/ma00108a007

Biografija

Marija Kokić rođena je 10.01.1997. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu školu i Dvanaestu beogradsku gimnaziju. Osnovne akademske studije biohemije na Hemijskom fakultetu pri Univerzitetu u Beogradu (UB) upisala je 2016. godine. Diplomirala je 2020. godine sa prosečnom ocenom 9,71 (devet i 71/100) i ocenom 10 (deset) na završnom radu „Producenti termostabilnih zeinaza iz izolata bakterija *Bacillus* sp“. Dobitnica je Dositejeve stipendije Fonda za mlade talente u 2020. godini. Master akademske studije biohemije na Hemijskom fakultetu (UB) upisuje i završava tokom školske 2020/21 sa prosečnom ocenom 9,88 (devet i 88/100) i ocenom 10 (deset) na završnom radu „Prečišćavanje i karakterizacija zein-degradijuće peptidaze iz *Bacillus* sp“. Iste godine dobija Specijalno priznanje Srpskog hemijskog društva za ostvaren uspeh u toku studija. Doktorske akademske studije biohemije upisuje školske 2021/22 godine na Hemijskom fakultetu (UB).

Od aprila 2022. godine zaposlena je kao istraživač pripravnik u Grupi za ekobiotehnologiju i razvoj lekova na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGGI) preko Petog poziva mladim istraživačima. Angažovana je na projektima: „BioICEP“ (EU-HE-870292), „Razvoj dvofaznog biotehnološkog procesa za unapređenu biorazgradnju polilaktata u životnoj sredini“ (Bilateralni projekat Republike Srbije i Nemačke), „EcoPlastiC“ (EU-HE-EIC-101046758), „BioPolyCycle“ (ANSO-CR-PP-2022-01), „Bio2PEs“ (EU-HE-EIC-101221903) i PHOBioDepolyIMPROVE (Bilateralni projekat Republike Srbije i Turske). Do sada je objavila 4 rada u međunarodnim časopisima (2 kao prvi autor iz teze) i 21 saopštenje na međunarodnim i nacionalnim skupovima. Dobitnica je godišnje nagrade IMGGI za Rad u časopisu sa najvećim IF u kom je doktorand/mladi istraživač iz IMGGI prvi autor.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: Марија Р. Кокић

Број индекса: ДБ10/2021

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Унапређење биокаталитичке разградње биополимера поли(хидроксиалканоата) и поли(млечне киселине)

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

У Београду,

Потпис аутора

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Марија Р. Кокић

Број индекса: ДБ10/2021

Студијски програм: Биохемија

Наслов рада:

Унапређење биокаталитичке разградње биополимера поли(хидроксиалканоата) и поли(млечне киселине)

Ментори: проф. др Владимир Бешкоски, др Јасмина Никодиновић-Рунић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду,

Потпис аутора

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Унапређење биокаталитичке разградње биополимера поли(хидроксиалканоата) и поли(млечне киселине)

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

У Београду,

Потпис аутора

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.