

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ - ХЕМИЈСКИ ФАКУЛТЕТ НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Образложење предлога теме докторске дисертације кандидаткиње Марије Ненадовић, мастер биохемичара

Молим Наставно-научно веће Универзитета у Београду - Хемијског факултета да одобри израду докторске дисертације под радним насловом:

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

1. Научна област: Хемијске науке

Ужа научна област: Биохемија

2. Предмет научног истраживања

Предмет истраживања ове докторске дисертације је ензимска разградња биополимера поли(хидроксиалканоата) (ПХА) и поли(млечне киселине) (ПЛА), као одрживијих алтернатива пластици произведеној из фосилних горива. Ови материјали су све присутнији на тржишту, а њихова биоразградња након употребе још увек није довољно проучена. Захваљујући својству наведених биополимера да подлежу биокаталитичкој разградњи, у оквиру ове дисертације ће бити испитано неколико различитих стратегија да се она унапреди. У првој фази истраживања биће одабрано неколико ефикасних ензима за разградњу ПХА и ПЛА и они ће бити хетерологно произведени у бактеријским ћелијама за даљи рад. У другој фази истраживања, техникама протеинског инжењеринга (диригована еволуција и семи-рационални дизајн протеина) структура одабраних ензима ће бити измењена како би се добили бољи биокатализатори. Модел једињења за испитиване биополимере ће бити испитана са сврхом стандардизације поступка карактеризације различитих варијанти ензима. У трећој фази истраживања ће бити испитан потенцијал за унапређење поступка биокаталитичке разградње биополимера кроз оптимизацију реакционих параметара и предтретман полимерних супстрата.

3. Основне хипотезе

Анализе процењују произведену количину пластике до 2017. године на 8300 милиона тона од чега је око 9% рециклирано, 12% спаљено а остатак се трајно акумулира у животној средини [1]. Додатан проблем представља потреба за њеном континуираном производњом из фосилних горива као необновљивог ресурса. Једна од стратегија у решавању проблема производње и уклањања пластике из животне средине је прелазак на употребу нове генерације пластике на бази биополимера - биопластике. Биопластика на бази биополимера ПХА и ПЛА се производи из обновљивих ресурса уз високо очување физичко-механичких карактеристика петрохемијске пластике, нудећи решење очекиваног проблема ограничене доступности фосилних горива [2]. Подједнако важно као и развој нових материјала је упоредно развијање поступка њиховог уклањања из животне средине, након употребе. Са тог аспекта ПХА и ПЛА су значајни биополимери због подложности биокаталитичкој разградњи помоћу хидролитичког арсенала ензима идентификованог у природи. Високоспецифични ензими за разградњу ПХА - ПХА деполимеразе, саставни су део бактеријског метаболизма, док су за разградњу ПЛА идентификоване различите кутиназе, липазе и посебно ефикасне, протеазе [3,4]. Међутим,

ензими заступљени у природи су неефикасни за потребе уклањања акумулираног пластичног отпада из животне средине обзиром да су се развијали за потребе ћелијског метаболизма, чија је скала неупоредиво мања у односу на скалу акумулирања пластичног отпада. Додатно, разградња у природи значајно варира од услова средине и заступљености микробиолошке популације. Из наведених разлога биодеградација у животној средини је још увек веома спор процес, а у случају ПЛА неопходни су услови индустријског компостирања [5].

Унапређени ензими се могу применити у контролисаним условима биотехнолошког поступка за разградњу, па чак и рециклирање пластике [6]. Предност биотехнолошког рециклирања пластике у односу на хемијско и механичко рециклирање се огледа у високој специфичности ензима као катализатора, чиме је могуће превазићи постојећа ограничења у разврставању мешовитог пластичног отпада. Додатно, разградња на нижим температурама употребом ензима је у складу са еколошким принципима, а производи разградње су високе оптичке чистоће и могу се даље употребити у складу са принципима циркуларне економије.

Основна хипотеза ове дисертације је да биокаталитички поступак разградње ПХА и ПЛА може бити унапређен. Данас је услед напретка у области протеинског инжењерства могуће извести убрзану лабораторијску еволуцију ензима за различите биотехнолошке потребе [7]. Одабрани ензими за разградњу ПХА и ПЛА присутни у природи ће бити употребљени као полазна матрица за развој ензима са потенцијалом за технолошку примену у биоремедијацији пластичног отпада. Посебно важни су пробоји у протеинском инжењерингу и биоинформатици који омогућавају унапређивање ензима за које још увек није одређена тродимензионална структура, попут ПХО деполимераза. Диригованом еволуцијом и биоинформатичком анализом AlphaFold предвиђене тродимензионалне структуре ензима може се унапредити функција ове класе ензима [8]. Додатан проблем упоредне анализе карактеристика ове класе ензима услед варијабилности поступка припремања полимера могао би бити олакшан употребом структурно једноставнијих модел једињења за њихову стандардизовану карактеризацију [9]. Кристална структура полимера додатно отежава процес ензимске катализе, која може бити превазиђена са предтретманом полимера па ће у овој докторској дисертацији даље бити проучени економски и еколошки одрживији не-термички претретмани [10].

4. Циљеви истраживања и очекивани резултати

Главни циљ тезе

Циљ ове докторске дисертације је проширивање досадашњег знања о механизму активности хидролитичких ензима на биополимерним супстратима, као и даље унапређење биотехнолошког поступка разградње биополимера за потребе њиховог даљег рециклирања или биотрансформисања.

Специфични циљеви тезе

1. Одабир ензима за разградњу одабраних биополимера (ПХО и ПЛА) према ефикасности разградње биополимера и потенцијала за комерцијалну производњу.
2. Одабир експресионог система и оптимизација услова експресије одабраних ензима у бактеријским ћелијама од комерцијалног значаја за потребе даљег експерименталног рада.
3. Успостављање система за праћење ензимске и ћелијске активности на полимерним супстратима, као и новим модел једињењима чији ће потенцијал за стандардизовану карактеризацију полимер-деградујућих ензима бити испитан.
4. Модификације структуре ензима комбиновањем биоинформатичког и експерименталног приступа на основу којих ће бити идентификоване кључне аминокиселине за специфично препознавање и хидролизу биополимерних супстрата, као и за стабилизацију биокатализатора.
5. Испитивање потенцијала за унапређење биокаталитичког процеса кроз претретман полимера и оптимизацију реакционих услова током ензимске разградње полимера.

Очекивани резултати

Први очекивани резултат ове докторске дисертације је идентификација природно заступљених ензима најпогоднијих за развој биокаталитичког поступка разградње поли(хидроксиалканоата) и поли(млечне киселине). Потом ће бити систематизовани подаци о потенцијалу за производњу одабраних ензима у различитим комерцијално значајним бактеријским сојевима, као и оптимални услови гајења одабраних сојева за постизање највише продукције ензима у тим експресионим системима.

Важан део резултата ове тезе чини валидација примене биополимерних модел једињења у процесу карактеризације ензимских варијанти. Ови резултати у најширем смислу доприносе проширивању тренутног знања о употреби модел једињења за карактеризацију ензима који разграђују полимере, а које је неопходно за развој стандардизованих система карактеризације ензима са применом у биоремедијацији пластичног отпада. У ужем смислу, резултати добијени на структурно једноставнијим модел супстратима могу додатно олакшати једнозначну идентификацију кључних аминокиселина за високо-специфично препознавање биополимера. Молекулско-динамичком симулацијом интеракција модел једињења са ензимима биће идентификоване значајне аминокиселине у околини каталитичког центра укључене у специфично препознавање биополимера, чији ће значај потом бити и експериментално испитан.

Претрага библиотеке насумичних ензимских мутаната, креиране техником дириговане еволуције ће резултовати каталитички унапређеним варијантама ензима за разградњу биополимера. Даљим секвенцирањем одабраних мутаната на генском нивоу ће бити идентификоване значајне аминокиселине за процес разградње биополимера. Биоинформатичким анализама примарне секвенце одабраних ензима и њихових хомолога биће предвиђене структурне варијанте са унапређеном стабилношћу, а потом ће најбоље предвиђене варијанте ензима бити и експериментално испитане. Структурне варијанте ензима добијене комбиновањем мутација које позитивно доприносе активности и стабилности ензима техником место-специфичне мутагенезе могле би довести до убрзане разградње биополимера са продуженом стабилношћу биокатализатора, у складу са потребама процеса за биокаталитичко рециклирање или биотрансформацију биополимера.

Поред проучавања ефикасности биокаталитичког процеса разградње биополимера у зависности од структуре ензима, ова докторска дисертација ће пружити нова сазнања о утицају структуре биополимерних супстрата на брзину процеса разградње. Биће пријављени подаци о ефикасности не-термичких предтретмана биополимера, који су од интереса услед њихове исплативости за подизање на већу скалу. Додатно, биће описан утицај реакционих услова на биокаталитичку разградњу биополимера, на основу чега ће потом бити дефинисани оптимални реакциони услови.

5. Методе истраживања

Молекуларно-биолошке методе:

- Ланчана реакција полимеразе (PCR) за умножавање гена од интереса, као и место-специфичну и насумичну мутагенезу гена;
- Изоловање и пречишћавање плаزمида, и пречишћавање PCR производа;
- Агарозна електрофореза за проверу успешности клонирања гена;
- Сангерово секвенцирање гена за идентификацију и потврђивање уведених мутација.

Микробиолошке методе:

- Методе гајења бактеријских ћелија;
- Метода топлотног шока за трансформацију бактеријских ћелија;
- Експресија рекомбинантних протеина;
- Методе разарања микробиолошких ћелија за потребе екстракције ензима.

Биохемијске методе:

- Ензимска рестрикција и лигација ДНК молекула за извођење и проверавање успешности клонирања;
- Хроматографско пречишћавање протеина;
- Натријум-додецил сулфат полиакриламид гел електрофореза (SDS-PAGE) за анализу протеинских фракција.

Аналитичке методе:

- УВ/ВИС спектрофотометрија за одређивање концентрације ДНК и протеина, мерење оптичке густине бактеријских суспензија и мерење оптичке густине полимерних суспензија током праћења ензимске активности.

Методе карактеризације и праћења разградње полимера:

- Течна хроматографија високих перформанси (HPLC) за праћење настанка мономерних киселина током ензимских реакција;
- Скенирајућа електронска микроскопија (SEM) за визуелизацију морфологије биополимера током ензимске разградње;
- Конфокална ласерска скенирајућа микроскопија (CLSM) за квантитативну карактеризацију топографије полимера током ензимске разградње;
- Мерење контактнoг угла са водом за одређивање хидрофобности полимера током предтретмана биополимера и ензимске разградње;
- Дифузиони тест са инкорпорираним полимером у агарозном гелу за праћење ензимске разградње.

Биоинформатичке алатке/методе:

- Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) за претраживање хомологних протеинских/ДНК секвенци;
- Clustal Omega за упоређивање примарних секвенци протеина/ДНК;
- AlphaFold за предикцију тродимензионалне структуре протеина;
- AmberTools23 за симулацију молекулске-динамике;
- PyMol, Visual Molecular Dynamics, Chimera за визуелизацију протеинских структура.

6. Списак стручне литературе која ће се користити

1. Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science advances*, 3(7), e1700782. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782>.
2. Naser, A. Z., Deiab, I., & Darras, B. M. (2021). Poly(lactic acid) (PLA) and polyhydroxyalkanoates (PHAs), green alternatives to petroleum-based plastics: a review. *RSC advances*, 11(28), 17151–17196. <https://doi.org/10.1039/d1ra02390j>
3. Zhou, W., Bergsma, S., Colpa, D. I., Euverink, G. W., & Krooneman, J. (2023). Polyhydroxyalkanoates (PHAs) synthesis and degradation by microbes and applications towards a circular economy. *Journal of environmental management*, 341, 118033. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.118033>
4. Zaaba, N.F., & Jaafar, M. (2020). A review on degradation mechanisms of polylactic acid: Hydrolytic, photodegradative, microbial, and enzymatic degradation. *Polymer Engineering and Science*, 60, 2061-2075.
5. Narancic, T., & O'Connor, K. E. (2019). Plastic waste as a global challenge: are biodegradable plastics the answer to the plastic waste problem?. *Microbiology (Reading, England)*, 165(2), 129–137. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000749>
6. Tournier, V., & Marty, A. (2020). An engineered PET depolymerase to break down and recycle plastic bottles. *Nature*, 580(7802), 216–219. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2149-4>
7. Cheng, F., Zhu, L., & Schwaneberg, U. (2015). Directed evolution 2.0: improving and deciphering enzyme properties. *Chemical communications (Cambridge, England)*, 51(48), 9760–9772. <https://doi.org/10.1039/c5cc01594d>

8. Jumper, J., & Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>

9. Jendrossek D. (2007). Peculiarities of PHA granules preparation and PHA depolymerase activity determination. *Applied microbiology and biotechnology*, 74(6), 1186–1196. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0860-9>

10. Ciuffi, B., Fratini, E., & Rosi, L. (2024). Plastic Pretreatment: The key for efficient enzymatic and biodegradation processes. *Polymer Degradation and Stability*. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2024.110698>