

# Primjena ChatGPT-a u biotehnologiji: razgradnja plastike metaloenzimima

---

Jakuš, Katja

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:483706>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija**

**Katja Jakuš**  
0058219487

**Primjena ChatGPT-a u biotehnologiji: razgradnja plastike  
metaloenzimima**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Biotehnologija 3

**Mentor:** prof. dr. sc. Tonči Rezić

**Zagreb, 2024.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

**Primjena ChatGPT-a u biotehnologiji: razgradnja plastike metaloenzimima**

**Katja Jakuš, 0058219487**

## **Sažetak:**

Metaloenzimi su velika skupina enzima koji se ističu zbog svoje selektivnosti i blagih reakcijskih uvjeta. Zbog svoje sposobnosti razgradnje kristaličnih, u vodi netopivih biljnih polimera, pretpostavlja se da modificirani metaloenzimi mogu katalizirati razgradnju plastike. Ova pretpostavka polazi od činjenice da su strukture plastike i kristaličnih polimera vrlo slične. S obzirom na brz razvoj, veliku popularnost i širinu primjene umjetne inteligencije, može se pretpostaviti i primjena u proučavanju enzimske razgradnje plastike. Cilj ovog rada je ispitati mogućnost ChatGPT-a u analizi tematike vezane uz enzimsku razgradnju plastike pomoću LPMO metaloenzima. ChatGPT pružio je opsežne, racionalne odgovore na sva postavljena pitanja. Ipak, ovako dobivene informacije potrebno je dodatno provjeriti jer odgovori koje ChatGPT pruža nisu potpuno pouzdani.

**Ključne riječi:** metaloenzimi, plastika, umjetna inteligencija, ChatGPT, litička polisaharidna monoksigenaza

**Rad sadrži:** 33 stranice, 2 slike, 3 tablice, 39 literaturnih navoda, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

**Mentor:** prof. dr. sc. Tonči Rezić

**Datum obrane:** 17. lipnja 2024.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering  
Laboratory for Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Malting and Brewing  
Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Biotechnology

**The application of ChatGPT in biotechnology: plastic degradation by metalloenzymes**

**Katja Jakuš, 0058219487**

**Abstract:**

Metalloenzymes are a large group of enzymes known for their selectivity and mild reaction conditions. Due to their ability to degrade crystalline, water-insoluble plant polymers, modified metalloenzymes are hypothesized to catalyse plastic degradation. This hypothesis stems from the similarity between the structures of plastic and crystalline polymers. Considering the rapid development, popularity, and broad applications of artificial intelligence, it is reasonable to assume that it can be applied to research of enzymatic plastic degradation. The aim of this study is to question the ability of ChatGPT to answer questions related to enzymatic plastic degradation using LPMO metalloenzymes. ChatGPT provided comprehensive, easily understandable responses to all posed questions. Yet, the information acquired in this way needs further verification as the answers provided by ChatGPT are not entirely reliable.

**Keywords:** metalloenzymes, plastic, artificial intelligence, ChatGPT, lytic polysaccharide  
monoxygenase

**Thesis contains:** 33 pages, 2 figures, 3 tables, 39 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

**Mentor:** Tonči Rezić, PhD, Full Professor

**Thesis defended:** June 17, 2024

## Sadržaj

1.UVOD .....	1
2.TEORIJSKI DIO .....	2
2.1..METALOENZIMI .....	2
2.1.1. KLASIFIKACIJA I PODRIJETLO LITIČKIH POLISAHARIDNIH MONOOKSIGENAZA .....	3
2.1.2. STRUKTURA I AKTIVNOST LPMO ENZIMA.....	4
2.2. MODUL VEZANJA ZA UGLJIKOHIDRATE.....	6
2.2.1. ULOGA CBM MODULA U REAKCIJAMA KATALIZIRANIM LPMO ENZIMIMA .....	6
2.3. PRIMJENA CBM MODULA U VEZANJU LPMO ENZIMA NA PLASTIKU.....	8
2.3.1 PLASTIKA I NJENA RAZGRADNJA.....	8
2.3.2. VEZANJE ENZIMA NA PLASTIKU POMOĆU CBM MODULA .....	9
2.3.3. MOGUĆNOST RAZGRADNJE PLASTIKE METALOENZIMIMA .....	10
2.4. UMJETNA INTELIGENCIJA.....	11
2.4.2. PRIMJENA CHATGPT-A U BIOTEHNOLOGIJI.....	11
2.4.3. PRIMJENA CHATGPT-A U ZAŠTITI OKOLIŠA.....	15
2.4.4. PRIMJENA CHATGPT-A U ISTRAŽIVANJU POTENCIJALA RAZGRADNJE PLASTIKE LPMO ENZIMIMA.....	18
3.ZAKLJUČCI .....	25
4.POPIS LITERATURE .....	26

## 1. UVOD

Metaloenzimi su skupina enzima u čijoj strukturi se nalazi atom metala nužan za njihovu strukturnu stabilnost i katalitičku aktivnost. Litičke polisaharidne monooksigenaze, skraćenog naziva LPMO, su metaloenzimi u čijem se aktivnom mjestu nalazi dvovalentni atom bakra. LPMO enzimi kataliziraju razgradnju polisaharida, a ističu se zbog sposobnosti razgradnje kristaličnih, teško razgradivih polimera netopivih u vodi, odnosno celuloze, škroba i hitina (Rieder i sur., 2021). Sastavni dio LPMO enzima su moduli vezanja za ugljikohidrate, odnosno CBM (od engleskog naziva 'carbohydrate-binding module), pomoćnih domena čija je uloga povećanje afiniteta enzima za vezanje supstrata (Forsberg i sur., 2018). Zbog strukturne sličnosti plastike i celuloze pretpostavlja se da bi metaloenzimi, pa tako i LPMO, mogli sudjelovati u enzimskoj razgradnji plastike te da se afinitet enzima prema plastici može povećati moduliranjem CBM domena (Ru i sur., 2020).

Primjenu u daljnjem istraživanju ove problematike mogla bi imati umjetna inteligencija, odnosno strojno učenje i obrada strojnog jezika, koji omogućavaju prikupljanje velikog broja informacija i stvaranje logičkih poveznica između istih. Zbog svoje popularnosti te široke i jednostavne primjene, ChatGPT se ističe u odnosu na ostale modele obrade strojnog jezika (Deng i Lin, 2020). Umjetna inteligencija, kao i ChatGPT, nalaze primjenu u biotehnologiji, posebno u disciplinama koje se temelje na pohrani velikog broja podataka te njihovoj analizi i usporedbi, na primjer pronalaženje novih bioaktivnih spojeva, proteomika, genomika i farmakokinetika. Provedena su brojna istraživanja čiji je cilj bio odrediti mogućnosti korištenja ChatGPT-a u različitim granama biotehnologije te je utvrđen potencijal primjene ChatGPT-a, no sve na ovaj način dobivene informacije potrebno je dodatno provjeriti.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1 METALOENZIMI

Metaloenzimi su velika skupina metaloproteina te se smatraju jednim od najefikasnijih prirodnih biokatalizatora s aspekta njihove aktivnosti i selektivnosti, te su aktivni u vrlo blagim, prirodnim uvjetima. Karakterizira ih atom metala koji se nalazi u strukturi ovih enzima, najčešće u aktivnom mjestu. Spomenuti atom metala često ima ulogu Lewisove kiseline te je nužno da ima odgovarajući naboj, redoks potencijal, raspored elektrona u orbitalama i geometrijsku strukturu. Promjene geometrijske strukture atoma metala nakon transfera elektrona moraju biti minimalne. Primjer ovakvih metaloenzima su hidrolaze koje u svojoj strukturi imaju jedan ili dva atoma metala čija je uloga aktivacija supstrata ili nukleofila, što je najčešće molekula vode ili hidroksidni ion. Nakon aktivacije slijedi nukleofilni napad, odnosno najvažniji korak reakcije. Većina ovakvih enzima u svojoj strukturi ima dvovalentni atom cinka, a zastupljeni su i atomi magnezija, mangana, kalcija, kobalta i nikla. Iako ovi atomi imaju jednak naboj te stupaju u interakcije s aminokiselinama putem istog mehanizma, zbog različitog promjera i atomskog broja zamjena atoma metala prisutnog u strukturi enzima izazvat će inhibiciju, inaktivaciju ili promjenu tijeka reakcije (Valdez i sur., 2014).

Neki metaloenzimi kao kofaktore koriste hem u čijem se središtu nalazi atom željeza, a uloge hema uključuju transfer elektrona, prijenos molekularnog kisika te sama kataliza. Ispunjenje ovih uloga moguće je jer atom željeza u središtu hema prijenosom elektrona može prelaziti iz dvovalentnog u trovalentni oblik. Većina enzima u čijem se aktivnom mjestu nalazi željezo katalizira kemijske reakcije transformacije. Mnoge oksidaze, uz atom željeza, u svom aktivnom mjestu imaju i atom bakra. Osim u sklopu molekule hema, samostalni atom željeza može biti sastavni dio aktivnog mjesta enzima. Metaloenzimi ovakve strukture većinom kataliziraju reakcije oksidacije za čije je odvijanje nužan molekularni kisik, pri čemu je uloga željeza aktivacija kisika. Kod metaloenzima u čijoj se strukturi nalazi bakar razlikuju se enzimi u čijem aktivnom mjestu postoji jedan, dva ili više atoma bakra. Reakcije oksidativne deaminacije najčešće su katalizirane enzimima u čijoj je strukturi prisutan jedan atom bakra. Jednovalentan atom bakra nužan je za redukciju molekule kisika,  $O_2$ , do molekule vodikovog peroksida,  $H_2O_2$ , pri čemu bakar prelazi u dvovalentni oblik. Za odvijanje ovog koraka reakcije nužan je tirozinski ostatak aktivnog mjesta enzima koji tvori intermedijarnu strukturu s dvovalentnim atomom bakra i molekulom kisika. Ako metaloenzim sadrži dva atoma bakra, oni se u aktivnom mjestu nalaze u obliku dimera, a pritom su oba atoma bakra dodatno povezana s tri tirozinska ostatka. Prema teorijskom modelu, iako molekule vodikovih kationa,  $H^+$ , slobodno ulaze i izlaze iz kompleksa, oni nisu nužni za odvijanje reakcije ako se u okruženju atoma bakra nalaze aminokiseline s bazičnim pobočnim ogrankom. Ovakav model karakterističan je za metaloenzime u čijoj se strukturi nalaze dva atoma bakra. Metaloenzimi

u čijoj se strukturi nalazi više od dva atoma bakra kataliziraju različite redoks reakcije, kao što je oksigenaza koja katalizira posljednji korak denitrifikacije – redukciju dušikovog oksida do dvoatomne molekule dušika. Ovaj enzim je homodimer, a oba monomera sadrže po dva atoma bakra u svojoj strukturi. Od ostalih metaloenzima ističu se: nitrogenaza čija aktivnost je ovisna o atomu molibdena, metil-koenzim reduktaza u čijoj je strukturi atom nikla te metaloenzimi čiji kofaktor je kobalamin. Kobalamin, poznatiji pod imenom vitamin B<sub>12</sub>, sadrži heksakoordiniran, trovalentan atom kobalta niskog spina koji tvori veze s četiri atoma dušika (Blomberg i sur., 2014).

Razlog široke primjene metaloenzima je mogućnost promjene tijekom reakcije zamjenom atoma metala, a korištenje metoda enzimskog inženjerstva omogućava promjenu i poboljšanje katalitičke sposobnosti enzima. Korištenjem abiotičkih metalnih kofaktora moguće je usmjeriti reakciju da se odvija na način koji nije opažen u prirodi (Roelfes, 2019). S obzirom na to da različiti metalni ioni stvaraju veze s različitim aminokiselinskim ostatcima i da aktivno mjesto nema uvijek odgovarajuću konformaciju, zamjena metala u aktivnom mjestu metaloenzima nije uvijek moguća te je potrebno uvesti promjene u samu strukturu enzima (Lin, 2017). Umjetni metaloenzimi mogu se sintetizirati i *de novo*, odnosno konstrukcijom polipeptidnog lanca korištenjem 20 prirodnih aminokiselina, pri čemu slijed aminokiselina nije povezan ni s jednim enzimom pronađenim u prirodi. Ovako sintetiziran polipeptidni lanac mora tvoriti stabilnu trodimenzionalnu strukturu u kojoj se nalazi funkcionalno aktivno mjesto sa sposobnošću vezanja odgovarajućeg metalnog iona. Izbor metala ovisi o reakciji koju sintetizirani metaloenzim provodi, te se u aktivno mjesto enzima može vezati kovalentnim ili nekovalentnim interakcijama. *De novo* sintetizirani enzimi uspješno se koriste pri provođenju reakcija oksidacije, redukcije, aminacije i transformacije. Kako bi *de novo* sintetizirani metaloenzim bio kompatibilan na tržištu, odgovarajući polipeptidni lanac mora biti jednostavan za sintezu u većim količinama te dostupan po razumnoj cijeni, enzim mora biti jednostavan za rukovanje te mora provoditi reakciju pri visokim koncentracijama supstrata, odnosno ne smije biti podložan inhibiciji supstratom (Rosati i Roelfes, 2010).

Iako većina u prirodi prisutnih enzima u svojoj strukturi ne sadrži ione metala, ako je njihovo aktivno mjesto odgovarajuće konformacije ono može vezati ione metala, a vezanje atoma metala se postiže različitim metodama enzimskog i proteinskog inženjerstva. Inkorporacija iona metala u strukturu enzima promijenit će aktivnost tog enzima te ovakav postupak predstavlja još jednu mogućnost sinteze umjetnih metaloenzima (Lin, 2017).

### 2.1.1. Klasifikacija i podrijetlo litičkih polisaharidnih monooksigenaza

Litičke polisaharidne monooksigenaze su metaloenzimi u čijem se aktivnom mjestu nalazi atom bakra. Nakon otkrića enzima 2010. godine, njegova primjena, kao i mehanizmi



djelovanja, intenzivno se istražuju. LPMO enzimi sudjeluju u razgradnji polisaharida, kao što su hemiceluloza, ksilan, beta-glukan te ksiloglukan. Ipak, važnost enzima očituje se njegovom sposobnošću da razgradi teško razgradive, u vodi netopive polisaharide kristaličnih struktura, kao što su celuloza, škrob i hitin (Rieder i sur., 2021).

Litičke polisaharidne monooksidaze spadaju u enzime aktivne na kompleksne ugljikohidrate i glikokonjugate, odnosno u bazu CAZy (skraćena engleskog naziva 'carbohydrate-active enzyme database'). Unutar spomenute baze, klasificirani su u grupe na temelju pomoćne aktivnosti (eng. auxiliary activities, skraćeno AA). Sedam grupa LPMO enzima uključuje: AA9, AA10, AA11, AA13, AA14, AA15 te AA16, a pronađeni su u gljivama, bakterijama, jednostaničnim i višestaničnim algama te životinjama, dakle gotovo svim carstvima živog svijeta (tablica 1).

**Tablica 1.** Pregled grupa LPMO, njihovog podrijetla i supstrata

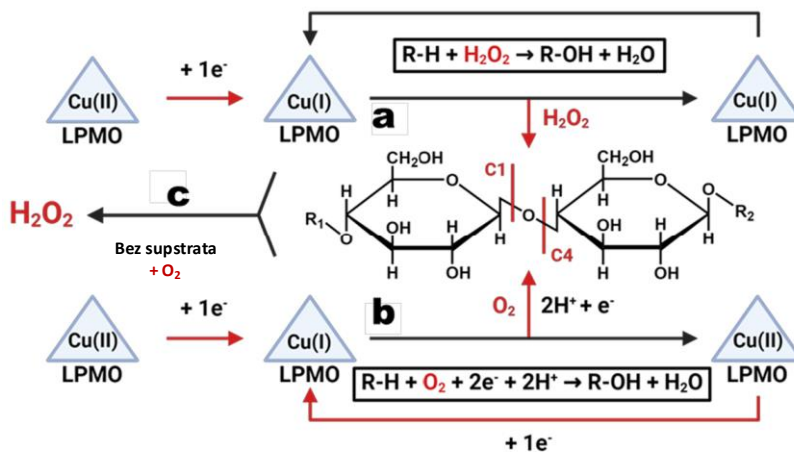
Grupa enzima	Podrijetlo	Supstrati	Literatura
AA9	Carstvo gljiva	Celuloza, ksilan, ksiloglukan, oligomeri celuloze	Manavalan i sur., 2021
AA10	Carstvo gljiva, bakterije, virusi	Celuloza, hitin	Manavalan i sur., 2021
AA11	Carstvo gljiva	Hitin	Manavalan i sur., 2021
AA13	Carstvo gljiva, koljeno Ascomycota	Škrob	Manavalan i sur., 2021
AA14	Dikariotske gljive	Teško razgradiv ksilan	Manavalan i sur., 2021
AA15	Alge, insekti	Hitin, celuloza	Manavalan i sur., 2021
AA16	Carstvo gljiva, razred Oomycota	Celuloza	Manavalan i sur., 2021

Dok su pojedine grupe enzima pronađene u filogenetski udaljenim rodovima, neke su specifične samo za jedan rod. Bez obzira u kojoj od navedenih grupa se nalaze, svi LPMO imaju vrlo sličnu strukturu i sličan mehanizam djelovanja, a supstrati na koje djeluju su različiti (tablica 1) (Manavalan i sur., 2021).

### 2.1.2. Struktura i aktivnost LPMO enzima

Karakteristika litičkih polisaharidnih monooksigenaza je dvovalentni atom bakra koji se nalazi u središtu aktivnog mjesta enzima, dok se samo aktivno mjesto nalazi u središtu ravne površine, što ga čini izloženim utjecajima okoline. Ovakva pozicija aktivnog mjesta nije uobičajena. S obzirom na to da je aktivno mjesto enzima identično kod svih skupina LPMO, za regio selektivnost, specifičnost prema supstratu i djelotvornost enzima odgovorni su aminokiselinski ostatci veznog mjesta (Forsberg i sur., 2018). Atom bakra stupa u interakciju s dva histidinska ostatka putem tri različita atoma dušika, od kojih se dva nalaze u

imidazolnom prstenu aminokiselina te s jednim amino-terminalnim dušikom (Ipsen i sur., 2021). U svim grupama LPMO enzima primijećena je značajna sličnost same strukture enzima. Osnovna struktura enzima je piramidalnog oblika koju čini nekoliko  $\beta$ -nabranih ploča tzv. iskrivljene sendvič strukture, međusobno povezanih promjenjivim brojem  $\alpha$ -uzvojnica (Forsberg i sur., 2018). Primijećeno je da LPMO ima veći afinitet prema supstratu, odnosno odgovarajućem polisaharidu, kada je atom bakra u aktivnom mjestu reduciran, što upućuje na činjenicu da redukcija bakra, uz pripremu enzima za katalizu, ima ulogu i u usmjeravanju enzima prema supstratu te povećanju vjerojatnosti uspješnog odvijanja reakcije (Ipsen i sur., 2021). Ovakva redukcija dvovalentnog u jednovalentni oblik atoma bakra je prvi korak katalize, a odvija se s pomoću donora elektrona, nakon čega dolazi do aktivacije molekularnog kisika ili vodikovog peroksida (slika 1). Pritom donor elektrona može potjecati iz supstrata, biti dodan u reakcijsku smjesu ili može potjecati iz enzima koji djeluju sinergistički s LPMO. Posljedica redukcije bakra u jednovalentni oblik je promjena konformacije enzima, odnosno povećani afinitet LPMO enzima prema supstratu. Konformacijski promijenjen LPMO enzim katalizira reakciju izdvajanja atoma vodika iz glikozidne veze, odnosno s C1 ili C4 atoma. Posljedica ovoga je neravnoteža elektrona glikozidne veze, te reakcijom eliminacije konačno dolazi do cijepanja glikozidne veze (Manavalan i sur., 2021).



**Slika 1.** Shema reakcije katalizirane LPMO enzimom (prema Manavalan i sur., 2021).

Kao kosupstrat, LPMO enzimi preferiraju vodikov peroksid u odnosu na kisik, te je katalitička učinkovitost LPMO enzima čak 100 % veća u prisutnosti vodikovog peroksida. Stoga LPMO enzimi djeluju kao peroksidaze, a ne kao striktne monooksidaze (Kuusk i sur., 2019). Svi do sada poznati LPMO enzimi djeluju na C1 ili C4 atom supstrata, te se prema regio selektivnosti razlikuju tri tipa: enzimi koji oksidiraju C1 atom ugljika glikozidne veze polisaharidnih supstrata (LPMO-1 tip), oni koji oksidiraju C4 atom (LPMO-2 tip) te enzimi koji mogu djelovati na C1 kao i na C4 atom (LPMO-3 tip). Primijećeno je kako enzimi čiji je supstrat hitin spadaju u LPMO-1 tip, dok su oni aktivni na celulozi LPMO-1 ili LPMO-3 tip. Zanimljivo je da LPMO-3 tip aktivan na celulozi također oksidira C1 atom hitina (Forsberg i sur., 2014). Produkti C1 oksidacije su u

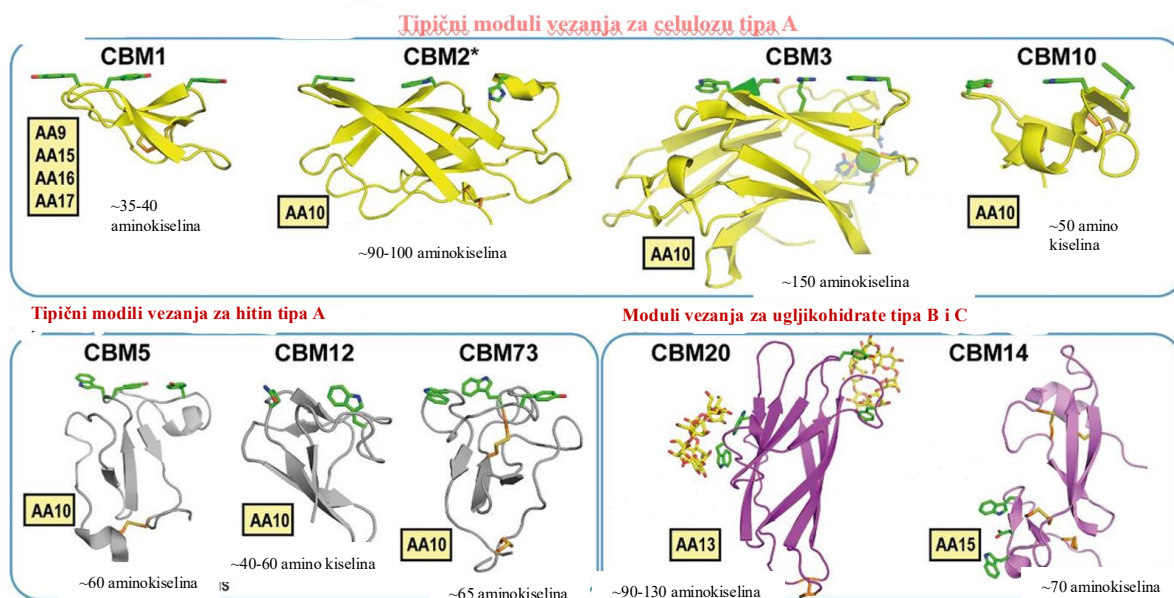
pravilu laktoni, dok djelovanjem enzima na C4 atom nastaju ketoaldoze. Enzimi LPMO-3 tipa mogu dati dvostruko oksidirane produkte, odnosno dolazi do dvostrukog cijepanja veza u istom lancu polisaharida (Forsberg i sur., 2018).

## **2.2. MODUL VEZANJA ZA UGLJIKOHIDRATE**

Moduli vezanja za ugljikohidrate, skraćeno CBM, su sastavni dijelovi enzima čiji su supstrati ugljikohidrati. CBM su malene, pomoćne domene spomenutih enzima bez katalitičke aktivnosti. Glavna uloga im je poboljšanje vezanja enzima na supstrat, što se ostvaruje kroz koordinirano prepoznavanje glikana i opću adheziju supstrata te doprinose strukturi i funkciji samog katalitičkog mjesta (Abbott i van Bueren, 2014). Moduli vezanja za ugljikohidrate također mogu utjecati na specifičnost enzima prema supstratu, kao i afinitet prema supstratu (Forsberg i sur., 2018).

### **2.2.1. Uloga CBM modula u reakcijama kataliziranim LPMO enzimima**

Kod enzima čija je uloga razgradnja biomase, kao što je LPMO, glavna funkcija modula je usmjeravanje enzima prema supstratu. Ovime se osigurava visoka koncentracija enzima na površini supstrata. Većina LPMO enzima ima više od jednog CBM modula. Moduli su međusobno povezani peptidnim lancima različite strukture i dužine (Forsberg i Courtade, 2023). S obzirom na sličnosti sekvenci CBM modula, oni se dijele na čak 93 obitelji unutar baze CAZy. Nadalje, na temelju strukture i funkcije, moduli vezanja za ugljikohidrate dijele se na tri tipa: tip-A, tip-B te tip-C. CBM tipa-A vežu se na površinu supstrata, odnosno kristalične celuloze, te stupaju u interakcije s aromatskim ostatcima aminokiselina na ravnoj površini supstrata. Većina CBM modula LPMO enzima pripada upravo tipu-A. Duboki procijepi u neuređenoj strukturi celuloze i škroba mjesta su na koja se CBM moduli tipa-B vežu na pojedinačne lance glikana (Georgelis i sur., 2012). Iako je tip-B najčešće primijećeni tip CBM modula u prirodi, pronađeni su samo u nekoliko LPMO enzima grupe AA13. Moduli tipa-C vežu se na terminalne krajeve lanaca glikana u strukturi hitina te se pronalaze kod LPMO enzima grupe AA15 i AA9 (slika 2).



**Slika 2.** Tipovi CBM modula te obitelji LPMO enzima u kojima se oni najčešće nalaze (prema Forsberg i Courtade, 2023).

U istraživanju provedenom 2016. godine, CBM domene bile su uklonjene iz različitih bakterijskih LPMO enzima te zamijenjene domenom iz neke druge od 93 obitelji CBM modula. U nekim slučajevima došlo je do poboljšane aktivnosti enzima, dok je u drugim slučajevima zabilježen pad ili potpuni gubitak aktivnosti LPMO enzima. Koji od spomenutih ishoda će se dogoditi ovisi o supstratu, kao i o samom enzimu. Razlog gubitka ili smanjenja aktivnosti može biti usmjeravanje enzima prema dijelovima supstrata na koje isti nema katalitičku aktivnost, za što je odgovorna upravo CBM domena. Ovim istraživanjem dokazano je kako CBM moduli usmjeravaju i mijenjaju aktivnost enzima (Crouch i sur., 2016). Prisutnost CBM modula važnija je za aktivnost enzima čiji je supstrat kristalična celuloza u usporedbi s ostalim LPMO enzimima čiji su supstrati topivi u vodi. Zanimljivo je da sama vezna mjesta LPMO enzima koji ne sadrže modul vezanja za ugljikohidrate imaju veći afinitet za vezanje supstrata, u usporedbi s veznim mjestima LPMO enzima koji imaju CBM modul. Ipak, ukupno gledajući, LPMO enzimi koji sadrže CBM module imaju veći afinitet prema supstratima. Ako se iz strukture takvih enzima ukloni CBM domena, efikasnost oksidacije supstrata bit će znatno manja jer će i vezanje enzima na supstrat biti manje učestalo. U nekim slučajevima, enzim i supstrat neće uopće stupiti u interakciju te do reakcije neće doći. Ipak, LPMO enzimi u čijoj je strukturi CBM modul odsutan daju nasumično oksidirane produkte, odnosno nemoguće je predvidjeti hoće li se oksidirati C1 ili C4 atom supstrata (Forsberg i Courtade, 2023).

Kod LPMO enzima koji sadrže više CBM modula, moduli često imaju afinitet prema različitim supstratima. Primjer ovakvog enzima jest CjLPMO10A u čijoj se strukturi nalaze tri domene:

katalitička, CBM5 te CBM73. Iako su navedene CBM domene vrlo slične, pokazalo se da CBM73 ima veći afinitet prema kristaličnim strukturama hitina, dok CBM5 usmjerava ovaj enzim prema topivom obliku hitina (Madland i sur., 2021). Iako je vezanje supstrata najvažnija, CBM moduli LPMO enzima imaju više uloga, kao što su provođenje lokalizirane površinske oksidacije i produžena aktivnost enzima. CBM moduli provode lokaliziranu površinsku oksidaciju, što za posljedicu ima cijepanje većeg broja veza koje se u strukturi polisaharida nalaze blizu jedna drugoj. Ova aktivnost posebno je izražena na unutrašnjim vezama supstrata kristalične strukture. Pri niskim koncentracija supstrata, CBM modul zaslužan je za produženu aktivnost enzima zahvaljujući visokom afinitetu prema supstratu (Forsberg i Courtade, 2023). LPMO enzimi gube aktivnost uslijed smanjenja broja obrtaja, što je posljedica autokatalitičke inaktivacije do koje dolazi kada reducirani enzim koji nije vezan na supstrat stupi u kontakt s kisikom ili vodikovim peroksidom. Tada dolazi do oksidacije bakrovog atoma, te takav enzim ne može provoditi reakciju. S obzirom na to da je posljedica oksidacije koju provode neki od LPMO enzima stvaranje vodikovog peroksida *in situ*, isti učestalo gube katalitičku sposobnost. Pretpostavlja se da CBM modul može spriječiti autokatalitičku inaktivaciju enzima tako što štiti aktivno mjesto enzima od reducensa, te tako sprječava oksidaciju, odnosno reakciju s molekulom kisika (Stepnov i sur., 2022).

## **2.3. PRIMJENA CBM MODULA U VEZANJU LPMO ENZIMA NA PLASTIKU**

### **2.3.1 Plastika i njena razgradnja**

Pojam plastika obuhvaća sintetske ili polu sintetske organske polimere građene od dugih lanaca ugljikovih atoma, a mogu sadržavati i atome kisika, dušika, sumpora te rjeđe i silicija. Najčešće korišteni tipovi plastike su polimeri: polipropilen, polietilen tetraftalat, polietilen, polistiren te polivinil klorid (Rhodes, 2018). Plastika ima široku primjenu zbog niske cijene, raznolikosti svojstava, lakog oblikovanja, niske gustoće, lake sterilizacije, mogućnosti kemijske modifikacije te otpornosti. Plastika se danas primjenjuje u gotovo svim djelatnostima, kao što su: izrada pakiranja za velik broj proizvoda, proizvodnja odjeće i obuće, jednokratna sterilna oprema za medicinsku i laboratorijsku uporabu i dr (Millet i sur., 2018). Ipak, velika otpornost plastike uzrok je njene dugotrajne razgradnje, a široka primjena čini plastiku jednim od najvećih zagađivača okoliša. Prirodna razgradnja plastike može trajati nekoliko desetljeća, pa i stoljeća. Plastična ambalaža i ostali otpad koji ljudi odlažu u prirodu predstavlja najmanju prijetnju za okoliš jer se mogu fizički otkloniti te adekvatno zbrinuti, no problem predstavlja fragmentiranje plastike na mikro- i nano- čestice koje je gotovo nemoguće otkloniti. Mikro- i nano-plastika pronađene su u svim sferama živog svijeta, u oceanima, rijekama i jezerima, u tlu, u različitim živim organizmima, te u ljudskim organima i tkivima (Macleod i sur., 2021). Plastični otpad potrebno je reciklirati kako bi se spriječilo nastajanje spomenutih čestica. Recikliranje je poželjno i zbog mogućnosti iskorištenja energije koja se u tom procesu

oslobađa. Postoje dvije metode recikliranja plastike: mehanička i kemijska. Mehaničko recikliranje provodi se bez promjene kemijske strukture plastike, a provodi se usitnjavanjem plastičnog otpada te ponovne uporabe tako usitnjene plastike. Kemijsko recikliranje podrazumijeva razgradnju plastike do nisko molekularnih dijelova s pomoću hidrolize, pirolize i sličnih postupaka, u kojima se koriste štetne kemikalije, za koje je potrebna velika količina energije te tijekom kojih nastaju različite otpadne tvari (Kijo-Kleczkowska i Gnatowski, 2022). Ekološki prihvatljiva alternativa ovim postupcima je enzimska razgradnja plastike koja se počela razmatrati nakon otkrića bakterije *Ideonella sakaiensis*, koja zahvaljujući enzimu PETaza može koristiti plastiku kao jedini izvor ugljika. Otkriveni su i enzimi MHETaza te kutinaza imena LCC (eng. leaf-compost cutinase) koji imaju sposobnost razgradnje plastike (Bishnu i Biobuilderclub, 2020). Navedeni enzimi su hidrolaze, te kao takvi mogu razgrađivati samo oblike plastike podložne hidrolizi (Ru i sur., 2020). U pronalasku do sada nepoznatih enzima za razgradnju plastike, odnosno mikroorganizama producenata tih enzima, koriste se tehnike metagenomike i proteomike. Pritom se posebna pažnja posvećuje proučavanju mikroorganizama čije stanište je zagađeno plastikom, a razlog tome je veća vjerojatnost da mikroorganizmi izloženi plastici evoluiraju na način da mogu razgrađivati plastiku (Zhu i sur., 2022). Mogućnost enzimске razgradnje plastike koja nije podložna hidrolizi do sada nije primijećena, no smatra se da enzimi korišteni za razgradnju biljne biomase, pogotovo celuloze, imaju potencijalnu ulogu u razgradnji spomenute plastike. Ova pretpostavka polazi od činjenice da su celuloza i plastika hidrofobni polimeri kristalične strukture (Ru i sur., 2020). U ove enzime ubrajaju se i ranije spomenute litičke polisaharidne monooksigenaze.

### 2.3.2. Vežanje enzima na plastiku pomoću CBM modula

Iako je velika pažnja posvećena enzimskoj razgradnji plastike, samo vežanje enzima za plastiku koja nije prirodni supstrat enzima, nije dovoljno istraženo. Prema Sabatierovom načelu, poznato je da supstrat prema kojem enzim ima najveći afinitet nije nužno i supstrat na kojem enzim ima najveću aktivnost. Stoga je potrebno posvetiti posebnu pažnju afinitetu enzima za potencijalnu razgradnju plastike za vežanje na površinu iste (Arnling Bååth i sur., 2022). Fuzioniranje enzima za razgradnju plastike s CBM domenama pomoću metoda enzimskog i proteinskog inženjerstva jedan je od načina povećanja afiniteta enzima za vežanje plastike (Zhu i sur., 2022). Poseban potencijal imaju CBM moduli tipa-A, budući da imaju visok afinitet prema vežanju netopive celuloze kristalične strukture, na koju se vežu putem aromatskih aminokiselinskih ostataka na površini celuloze. Osim strukturne sličnosti s celulozom, na površini plastičnih materijala također se nalaze aromatski aminokiselinski ostatci (Rennison i sur., 2023). Istraživanje provedeno 2019. godine proučavalo je afinitet različitih CBM domena prema polietilen tetrataftalatu (PET) *in vitro*. Utvrđeno je da modul BaCBM2 ima najveći afinitet prema vežanju na PET, te je utvrđeno da se prilikom vežanja

modula na PET uspostavljaju polarna  $\pi$  veze, kao i hidrofobne vodikove veze između CBM modula i estera na površini polietilen tetraftalata. Također je utvrđeno da mora postojati ravnoteža između uspostavljenih polarnih i hidrofobnih veza između CBM modula i PET-a, kao i dovoljna dodirna površina između istih. Dokazano je i da izolacija i pročišćavanje enzima za razgradnju PET-a fuzioniranih s CBM modulom vrlo komplicirano, te da je prinos ovakvih postupaka nedovoljan, što otvara pitanje primjene enzima u čijoj se strukturi prirodno nalaze CBM domene (Weber i sur., 2019). Nadalje, 2023. godine, istraživanjem je utvrđeno da *BaCBM2* ima najveći afinitet za vezanje na PET pri temperaturi od 30 °C, te da se afinitet enzima prema vezanju na PET povećava s povećanjem kristaličnosti strukture PET-a. Kristaličnost polietilen tetraftalata povećava se s povećanjem temperature. U strukturi CBM modula nalaze se tri tirozinska ostatka odgovorna za vezanje enzima na supstrat: W9, W44 te W63. Utvrđeno je da tirozinski ostatak W63 ima najmanju ulogu pri vezanju na supstrat, što ga čini povoljnim za provođenje enzimskog i proteinskog inženjerstva kako bi se povećao afinitet CBM modula prema plastici kao supstratu (Rennison i sur., 2023). Proteinskim inženjerstvom nastoji se i povećati termostabilnost enzima, što je bitno za korištenje enzima s CBM modulom tipa-A, s obzirom na spomenutu činjenicu da se kristaličnost strukture plastike povećava s povećanjem temperature. Navedeno se može postići uvođenjem disulfidnih mostova i vodikovih veza u strukturu enzima, kao i zamjenu pojedinih aminokiselina prolinom. Uvođenje ovih promjena može dovesti do gubitka djela katalitičke sposobnosti enzima, s obzirom da ove promjene mogu utjecati na strukturu aktivnog mjesta (Zhu i sur., 2022).

### 2.3.3. Mogućnost razgradnje plastike metaloenzimima

Metaloenzimi kao što su LPMO, lakaze te peroksidaze koje kao koenzim koriste molekule Hema imaju sposobnost razgradnje prirodnih polimera, pri čemu je ključni korak reakcije cijepanje veza između dva atoma ugljika ili atoma ugljika i atoma kisika u strukturi polimera. Provođenje ovog koraka jednako je potrebno i za razgradnju sintetskih polimera, stoga se postavlja pitanje mogu li ovi enzimi razgrađivati i sintetske polimere, kao što je plastika. U svrhu korištenja navedenih enzima za razgradnju plastike, nužno je uvesti modifikacije metodama proteinskog inženjerstva kako bi se osigurala stabilnost enzima, promijenila njihova selektivnost te povećao broj obrtaja. Potrebno je prilagoditi selektivnost enzima prema sintetskim polimerima s obzirom da oni nisu prirodni supstrati enzima, kao i osigurati stabilnost u uvjetima reakcije potrebnim za razgradnju tih polimera. Aktivnost metaloenzima do sada je zabilježena na dvije vrste plastike, polietilenu i najlonu, no točan mehanizam njihovog djelovanja još nije poznat (Rovaletti i sur., 2023).

## 2.4. UMJETNA INTELIGENCIJA

Umjetna inteligencija je grana računalstva koja se bavi razvojem sposobnosti računala za koje je potrebna inteligencija. Razvoj umjetne inteligencije temelji se na korištenju neuronskih mreža, odnosno strojnog učenja, što omogućava prikupljanje velike količine znanja, donošenje logičnih zaključaka te komunikaciju s ljudima. Primjena umjetne inteligencije je raznolika, te ju je moguće primijeniti u svim znanstvenim disciplinama (Wang, 2019). Razdoblje moderne umjetne inteligencije započelo je 1956. godine, te se od tada umjetna inteligencija neprestano razvija. Postoji više tipova umjetne inteligencije koji djeluju na različite načine. Neki oblici umjetne inteligencije koriste velike baze podataka kako bi unutar istih pronašli uzorke, dok drugi rade kao ljudski mozak – skupljaju informacije i stvaraju poveznice između prikupljenih informacija. Skupljanje informacija i stvaranje povezanosti između istih naziva se obradom prirodnog jezika ili skraćeno LLM (eng. Language Learning Model). Jedan od oblika umjetne inteligencije koji se koristi obradom prirodnog jezika je ChatGPT, sustav koji može procesuirati tekstove te je sposoban voditi dijalog s čovjekom, generirajući prikladne odgovore (Deng i Lin, 2022). OpenAI, laboratorij za istraživanje umjetne inteligencije, predstavio je ChatGPT javnosti 2022. godine. Trenutno su dostupne dvije verzije ChatGPT-a: besplatna 3.5 verzija te napredna, 4.0 verzija kojoj je moguće pristupiti uz mjesečnu pretplatu. Predviđanje odgovora, primjećivanje uzoraka i stvaranje poveznica između informacija vještine su koje je ChatGPT stekao korištenjem podskupa strojnog učenja zvanog podržano učenje. Pritom je korišten tzv. 'reward model', odgovori koje je ChatGPT pružao bili su ocijenjeni prema kvaliteti. Odgovori su nasumično odabrani, nakon čega je umjetna inteligencija ponudila više inačica istog odgovora, te je skupina informatičara zvanih 'AI trainers' poredala inačice po kvaliteti. Najmanje kvalitetni odgovori zatim su odbačeni, dok oni najkvalitetniji služe kao primjer samom ChatGPT-u u generiranju odgovora o raznovrsnim temama. Ono što ChatGPT čini drugačijim od ostalih modela umjetne inteligencije je sposobnost održavanja dijaloga, postavljanja potpitanja, prihvaćanje pogreški te ispravljanje istih. Također, može odbiti pružiti odgovor na pitanja koja smatra neprimjerenim. Svi odgovori koje ChatGPT pruža temelje se na usporedbi izlaznih informacija i baze podataka korištene pri 'treniranju' ChatGPT-a, stoga njegovi odgovori mogu biti pogrešni.

### 2.4.2. Primjena ChatGPT-a u biotehnologiji

Sposobnost ChatGPT-a da analizira veliku količinu informacija, iz nje sažme najbitnije te odgovori na pitanja vezana uz analizirano čine ga korisnim pomagalom tijekom provođenja istraživanja, odnosno može se koristiti kao 'virtualni asistent'. Ipak, pri korištenju ChatGPT-a potreban je oprez i provjera dobivenih podataka, te eventualno pružanje pomoći i ispravaka kako bi isti dao konačne rezultate, stoga je korištenju ovog alata u biotehnologiji potrebno dodatno unaprjeđenje (Chatterjee i sur., 2023). Pokazano je da umjetna inteligencija može



sudjelovati u unaprjeđenju genetičkih istraživanja mikroorganizama, odnosno može predvidjeti funkciju gena te regulaciju njihove ekspresije, prepoznati i definirati do sada nepoznate genske klastere i predložiti provođenje eksperimenata u svrhu dokazivanja predviđenog. Ovako je znatno ubrzan proces otkrivanja i definiranja interakcija mikroorganizama s okolinom (Page i sur., 2023). Sposobnost ChatGPT-a da obavi ovakve zadatke testirana je na nekoliko načina, a jedan od njih je korištenje 'GeneTurning' testa razvijenog upravo u ovu svrhu. ChatGPT odgovorio je na ukupno 600 pitanja podijeljenih u 12 modula. Ispitana je sposobnost ChatGPT-a da u tekstu prepozna nazive gena i njihovih produkata, da prepozna pseudonime istih i međusobno ih poveže, da definira na kojem se kromosomu nalaze određeni geni i slično (tablica 2). Istraživanje se pokazalo uspješnim te je utvrđen potencijal korištenja ChatGPT-a u navedene svrhe (Hou i Ji, 2023). Provedeno je i istraživanje u kojem je ChatGPT pružio odgovore na pitanja vezana uz molekularnu genetiku, te je na ista pitanja odgovorila i kontrolna skupina, odnosno određen broj ljudi koji se bave genetikom i srodnim znanostima. Prosječan rezultat kontrolne skupine bio je 66 % točnosti, dok je ChatGPT na 70 % odgovorio ispravno. Na temelju uspjeha ovog istraživanja, daljnja ispitivanja pokazala su da ChatGPT može uspješno predlagati provođenje znanstvenih eksperimenata i hipoteze istih. Primjenu ChatGPT-a u ove svrhe ograničava činjenica da ChatGPT nema pristup datotekama koje sadrže dosad prikupljene informacije, već samo tekst koji mu se izravno zadaje. (Emmert-Streib, 2023).

Primjena ChatGPT-a u području bioinformatike ispitana je istraživanjem u kojem su ChatGPT-u zadani zadatci da napravi filogenetsko stablo devet različitih vrsta te generira kod koji bi povezo kratke sekvence s ljudskim genomom. Tijekom izvršenja zadataka, ChatGPT bio je nadziran te su mu pružana upozorenja i smjernice ako je pogriješio. U prosijeku su bila potrebna dva ispravka da generira kod koji bi rezultirao smislenim filogenetskim stablom, no ChatGPT nije uspio izraditi samo filogenetsko stablo. Generiranje koda koji bi povezivao sekvencije s ljudskim genomom bilo je manje uspješno, a problem predstavlja činjenica da rezultati nisu reproducibilni, odnosno prilikom ponavljanja postupka je primijećeno da su dobiveni različiti odgovori nakon pružanja istih ispravaka i smjernica (Shue i sur., 2023). Inspirirani ChatGPT-em, razvijeni su različiti modeli učenja jezika specijalizirani za određena područja, kao što je GeneGPT i DNABERT koji se koriste za identifikaciju gena, pretraživanje baza podataka gena, proučavanje interakcija između genskih produkata te interpretaciju različitih sekvencija DNA te DrugChat koji je specijaliziran za analiziranje komponenata različitih lijekova (Chatterjee i sur., 2023).

ChatGPT pronalazi primjenu i u biotehnoškoj proizvodnji lijekova, te može pomoći u otkrivanju ciljnog mjesta djelovanja novih terapijskih molekula, strukture ciljnog mjesta te, ako je ciljno mjesto protein, pomaže u definiranju aktivnog mjesta i biološke aktivnosti proteina. Također pomaže pri određivanju farmakokinetičkih i farmakodinamičkih svojstava, kao i

potencijalnu toksičnost novog lijeka. Iako je ovako dobivene informacije potrebno dodatno provjeriti i eksperimentalno utvrditi, korištenje ChatGPT-a ubrzava proces otkrivanja novog biotehnološkog lijeka (Zhao i Wu, 2023). Juhi i suradnici proveli su istraživanje u kojem je ChatGPT predviđao interakcije između dvaju lijekova u ljudskom tijelu (tablica 2). Poznavanje ovih interakcija iznimno je bitno jer one mogu imati štetne posljedice na zdravlje pojedinca. ChatGPT-u postavljena su dva pitanja: mogu li se dva lijeka uzimati u isto vrijeme i zašto se mogu, odnosno ne mogu uzimati skupa, ovisno o odgovoru na prvo pitanje. ChatGPT pružio je točne odgovore na 39 od 40 postavljenih pitanja i pokazao se korisnim alatom za istraživanje ovakvih interakcija (Juhi i sur., 2023). Primjeri pitanja postavljenih ChatGPT-u te odgovori koje je isti pružio nalaze se u tablici 2. Uzevši u obzir rezultate navedenih istraživanja, jasno je da ChatGPT ima velik potencijal u unaprjeđenju svih grana biotehnologije, no sve ovako dobivene rezultate potrebno je uzeti s rezervom te dodatno provjeriti. Vjerodostojnost informacija povećala bi se navođenjem referenci uz svaku pruženu informaciju, a s obzirom na to da je ChatGPT relativno nova tehnologija, razumno je očekivati njeno poboljšanje (Tong i Zhang, 2023). Primjeri postavljenih pitanja te na njih pruženih odgovora prikazani su u tablici 2.

**Tablica 2.** Pregled pitanja postavljenih ChatGPT-u i na njih pruženih odgovora

Pitanje	Odgovor	Literatura
Koji je službeni simbol gena SNAT6?	Službeni simbol gena SNAT6 je SLC38A6, obitelj transportnih proteina 38, član 6.	Hou i Ji, 2023
Na kojem se kromosomu ljudskog genoma nalazi gen RGS16?	Gen RGS16 nalazi se na prvom kromosomu ljudskog genoma.	Hou i Ji, 2023
Hoće li transkripcijski faktor RELA aktivirati ili reprimirati gen IL10?	Dokazano je da transkripcijski faktor RELA (p56 podjedinica NF-kappaB) aktivira ekspresiju gena IL10 (interleukin10).	Hou i Ji, 2023
Mogu li se lijekovi Methotrexate i Probenecid uzimati istodobno?	Ne, Methotrexate i Probenecid ne mogu se uzimati istodobno.	Juhi i sur., 2023
Zašto se Methotrexate i Probenecid ne mogu uzimati istodobno?	Methotrexat i Probenecid međusobno stupaju u interakcije, te njihovo istodobno uzimanje može izazvati otrovanje Methotrexatom. Razlog ovome je što Probenecid sprječava lučenje Methotrexata iz tijela, što uzrokuje njegovu povećanu koncentraciju u krvi. Simptomi trovanja Methotrexatom uključuju povraćanje, mučnine, oštećenja jetre i bubrega.	Juhi i sur., 2023
Sumnja se da pacijent ima genetski nasljedan oblik rabdomiolize. Na koji biosintetski put/mehanizam utječe ova bolest? A) žučne kiseline, B) oksidacija masnih kiselina C) peroksisomalni metabolizam D) ciklus uree	Genetski nasljedan oblik rabdomiolize povezan je s oksidacijom masnih kiselina (odgovor B). Rabdomioliza je stanje koje se karakterizira razgradnjom mišićnih vlakana i oslobađanjem mioglobina i drugih mišićnih enzima u krvotok, što može rezultirati mnogim komplikacijama, poput zatajenja bubrega.	Emmert-Streib, 2023

### 2.4.3. Primjena ChatGPT-a u zaštiti okoliša

U nedavno provedenom istraživanju, Tunali i sur. ispitali su kvalitetu odgovora koje ChatGPT pruža na konkretna pitanja vezana uz zagađenje okoliša mikroplastikom, česticama nastalim trošenjem guma te različitim umjetnim nanomaterijalima. Također su usporedili ChatGPT s dva vrlo slična modela obrade prirodnog jezika, Microsoft Bing Chat i Google Bard, te su uspoređeni odgovori koje ChatGPT pruža na različitim jezicima (engleskom, njemačkom, turskom, kineskom, korejskom i španjolskom). Spomenuti modeli obrade prirodnog jezika ispitani su o izvorima mikroplastike, njihovoj prisutnosti i koncentraciji u vodama, oceanima i tlu te o metodama uklanjanja mikroplastike. Sva pitanja postavljena su dvaput, a gotovo svi dobiveni odgovori su bili zadovoljavajući (tablica 3). Na pitanja postavljena na temu mikroplastike, ChatGPT je pružio jasne i lako razumljive odgovore te ih dodatno potkrijepio primjerima, no nije uspio razlikovati pojmove nanoplastike i mikroplastike te je pružio nekolicinu krivih informacija koje je ispravio kada je isto pitanje postavljeno drugi put. Na pitanje vezano uz koncentraciju mikroplastike u tlu, ChatGPT pružio je vrlo neprecizan odgovor, odnosno spektar od nekoliko čestica po kilogramu do nekoliko tisuća čestica po kilogramu tla. Ipak, ovaj odgovor ne može se smatrati netočnim jer neki od analiziranih uzoraka tla ne sadrže ni jednu česticu mikroplastike, dok su u gradovima izuzeti utorci koji sadrže i nekoliko stotina tisuća čestica. Općenito, smatra se da je prosječna koncentracija čestica mikroplastike 930 čestica po kilogramu tla, no ChatGPT nije pružio tu informaciju. Kada je upitan o uklanjanju čestica mikroplastike, ChatGPT pružio je konkretne postupke kao što su degradacija UV zračenjem, biorazgradnja, elektrostatske metode i drugo. Pri usporedbi ChatGPT-a s Microsoft Bing Chat-om i Google Bard-om, utvrđeno je su ovi modeli vrlo slični, kao i odgovori koje oni pružaju, uz poneke razlike u sadržaju, kompleksnosti odgovora te brojčanim vrijednostima. Prednost Binga pred ChatGPT-om je činjenica da Bing uz svaku pruženu informaciju navodi i njen izvor, te da koristi podatke iz 2022 i 2023 godine. Najnoviji podatci s kojima ChatGPT raspolaže datiraju iz 2021 godine. ChatGPT pruža mnogo kompleksnije odgovore koji obuhvaćaju veću količinu sadržaja, dok Bing pruža vrlo kratak odgovor na specifično pitanje. Google Bard pruža odgovore najniže kvalitete, dok ChatGPT pruža najkvalitetnije odgovore, usprkos navedenim prednostima Binga. Prilikom ispitivanja kvalitete odgovora na različitim jezicima, odgovori pruženi na svim jezicima bili su približno jednake kvalitete (Tunali i sur., 2023).

**Tablica 3.** Pregled pitanja postavljenih ChatGPT-u na temu očuvanja okoliša i na njih pruženih odgovora

Pitanje	Odgovor	Literatura
<p>Pruži informacije o izvorima mikroplastike.</p>	<p>Mikroplastika su male čestice plastike čiji je promjer manji od 5 mm. Mogu potjecati iz različitih izvora i mogu se pronaći u raznolikom okolišu, od slatkovodnih sustava do oceana, tla i zraka. Izvori mikroplastike mogu se podijeliti u dvije kategorije: primarne i sekundarne izvore. Primarni izvori mikroplastike su sitne plastične čestice koje su namjerno proizvedene i dodane u proizvode za osobnu njegu i kozmetiku poput pilinga za tijelo, paste za zube i gelova za tuširanje. Također se dodaju i u proizvode za čišćenje, boje i tekstil. Sekundarni izvori mikroplastike rezultat su razgradnje većih plastičnih predmeta poput plastičnih vrećica, bočica za vodu i ribarskih mreža. Tijekom vremena, ti veći plastični predmeti raspadaju se na manje fragmente kroz procese fotodegradacije, mehaničkog trošenja i biološke razgradnje. Mikrovlakna iz sintetičke odjeće također mogu biti izvor mikroplastike. Kada se sintetički materijali poput poliesteru ili najlona peru, otpuštaju se sitna vlakna koja mogu završiti u sustavima otpadnih voda i na kraju u oceanima i slatkovodnim sustavima.</p>	<p>Tunali i sur., 2023</p>
<p>Predstavljaju li čestice mikroplastike prijetnju oceanima, slatkim vodama i tlu?</p>	<p>Da, mikroplastika predstavlja značajnu prijetnju slatkovodnim sustavima, morskim vodama i tlima. Kao male plastične čestice, mikroplastika se lako može nakupiti u okolišu, predstavljajući rizike kako za okoliš tako i za ljudsko zdravlje. U slatkovodnim sustavima, mikroplastika može negativno utjecati na vodene ekosustave ometanjem prehranbenog lanca i utjecajem na ponašanje i razmnožavanje organizama. Također može smanjiti kvalitetu pitke vode i utjecati na ljudsko zdravlje potencijalnim unošenjem toksičnih kemikalija i patogena. U oceanima, mikroplastika može imati niz negativnih utjecaja, uključujući unos od strane morskih organizama i uništavanje staništa. Mikroplastika također može prenositi štetne onečišćivače i toksine, koji se mogu nakupiti u prehranbenom lancu i potencijalno utjecati na ljudsko zdravlje. U tlima, mikroplastika može ometati plodnost i strukturu tla, utječući na rast biljaka i potencijalno smanjujući prinose usjeva. Također može prenositi toksične kemikalije i teške metale, koji mogu potencijalno onečistiti tlo i podzemne vode te utjecati na zdravlje.</p>	<p>Tunali i sur., 2023</p>

**Tablica 3.** Pregled pitanja postavljenih ChatGPT-u na temu očuvanja okoliša i na njih pruženih odgovora – *nastavak*

Pitanje	Odgovor	Literatura
Kolika je koncentracija mikroplastike u tlu?	Koncentracija mikroplastike u tlima varira ovisno o raznim faktorima kao što su vrsta tla, korištenje zemljišta i izvori onečišćenja. Međutim, istraživanja su pokazala da se mikroplastika može pronaći u tlima diljem svijeta, s koncentracijama koje variraju od nekoliko čestica po kilogramu do nekoliko stotina čestica po kilogramu. Istraživanja su pokazala da su najviše koncentracije mikroplastike u tlima često prisutne u urbanim područjima, gdje postoji veća ljudska aktivnost i proizvodnja otpada. Primjerice, istraživanje provedeno u Kini pokazalo je da je koncentracija mikroplastike u urbanim tlima značajno veća nego u ruralnim tlima, pri čemu su koncentracije varirale od 37 do 440 čestica po kilogramu. Istraživanje provedeno u Europi pokazalo je da su mikroplastike prisutne u poljoprivrednim tlima, s koncentracijama koje variraju od 1 do 10 čestica po kilogramu. Isti studija je pokazala da se vrsta plastike pronađena u tlu razlikovala ovisno o lokaciji, pri čemu su polietilen i polipropilen bili najčešće detektirane vrste plastike.	Tunali i sur., 2023
Što je mikroplastika?	Mikroplastika su malene čestice plastike, čiji promjer je obično manji od 5 milimetara, koje su u okoliš dospjele na različite načine, koji uključuju razlaganje većih plastičnih proizvoda te iz mikrovlakana odjeće i tekstila. Čestice mikroplastike su raširene u okolišu te su pronađene u morima, jezerima, rijekama i zraku. Mikroplastika može biti štetna za životinje ukoliko se udahne ili konzumira putem hrane, te postoji zabrinutost za ljude koji mikroplastiku konzumiraju kroz prehrambeni lanac.	Zhu i sur., 2023

#### 2.4.4. Primjena ChatGPT-a u istraživanju potencijala razgradnje plastike LPMO enzimima

Na temelju u ovom radu spomenutih istraživanja, kao i mnogih drugih, jasno je da ChatGPT predstavlja vrlo koristan alat koji svoju primjenu pronalazi u raznolikim disciplinama, te postoji velik potencijal za njegov daljnji razvoj. U svrhu potvrde ovog zaključka, ChatGPT je pružio odgovore na pitanja vezana uz ranije spomenut potencijal razgradnje plastike LPMO enzimima, te o ulozi CBM modula u vezanju LPMO enzima na plastiku. Devet pitanja na ovu temu postavljena su 3.5 verziji ChatGPT-a 2. travnja 2024. godine:

Pitanje 1: Misliš li da je pretpostavka da LPMO enzimi imaju potencijalnu primjenu u razgradnji plastike osnovana? Zašto?

Odgovor 1: *Pretpostavka da LPMO (litičke polisaharidne monooksigenaze) enzimi imaju potencijalnu primjenu u razgradnji plastike zasnovana je na nekoliko bitnih čimbenika:*

1. **Sposobnost razgradnje prirodnih polimera:** *LPMO enzimi su već poznati po svojoj sposobnosti razgradnje prirodnih polisaharida poput celuloze. Njihova aktivnost u cijepanju veza između atoma ugljika i atoma kisika u strukturi polisaharida sugerira da bi mogli imati sličnu aktivnost i prema sintetskim polimerima poput plastike.*

2. **Strukturne sličnosti između celuloze i plastike:** *Plastika, iako sintetički polimer, dijeli neke strukturne sličnosti s prirodnim polisaharidima poput celuloze. Ova strukturna sličnost sugerira da bi enzimi koji su već prilagođeni za razgradnju polisaharida mogli imati potencijalnu ulogu i u razgradnji plastike.*

3. **Proteinsko inženjerstvo:** *Tehnike proteinskog inženjerstva omogućavaju modifikaciju enzima kako bi se poboljšala njihova aktivnost i selektivnost. Ove tehnike mogu se koristiti za prilagodbu LPMO enzima za bolju učinkovitost u razgradnji plastike.*

4. **Dosadašnja istraživanja:** *Iako još uvijek u ranoj fazi, istraživanja su pokazala određenu aktivnost LPMO enzima na nekim vrstama plastike poput polietilena i najlona. Iako detaljni mehanizmi djelovanja nisu potpuno razumljivi, ovi rezultati sugeriraju da LPMO enzimi imaju potencijal za razgradnju plastike. U cjelini, iako još uvijek potrebno provesti daljnja istraživanja i razvoj, pretpostavka da LPMO enzimi imaju potencijalnu primjenu u razgradnji plastike čini se opravdanom na temelju njihove prirodne funkcije, strukturnih sličnosti s prirodnim polisaharidima te mogućnosti proteinskog inženjerstva.*

Pitanje 2: Za koju vrstu plastike misliš da bi LPMO enzimi imali najveći afinitet? Zašto?

Odgovor 2: *LPMO enzimi imaju potencijal za djelovanje na različite vrste plastike, ali bi vjerojatno najveći afinitet imali prema polietilenu tereftalatu (PET). Evo nekoliko razloga zašto:*

1. **Strukturna sličnost s prirodnim supstratima:** *PET je poliester sličan prirodnim polimerima kao što su celuloza i hemiceluloza. Budući da LPMO enzimi prirodno djeluju na*

polisaharide, postoji mogućnost da bi imali afinitet prema poliesterskim strukturama poput PET-a.

2. **Hidrofobnost:** PET je hidrofoban polimer, a LPMO enzimi, posebno oni koji sadrže CBM module, često djeluju na hidrofobne supstrate poput kristalične celuloze. Sposobnost LPMO enzima da se vežu na hidrofobne supstrate mogla bi biti korisna u interakciji s PET-om.

3. **Molekularna sličnost s potencijalnim supstratima:** PET sadrži esterske veze u svojoj strukturi, slično nekim supstratima koji su prirodni supstrati za LPMO enzime. Postojanje esterskih veza u strukturi PET-a može omogućiti LPMO enzimima da prepoznaju ovaj polimer kao potencijalni supstrat.

4. **Prethodna istraživanja:** Istraživanja su pokazala da su neki LPMO enzimi pokazali aktivnost na PET-u. Iako mehanizam djelovanja još nije u potpunosti razumljiv, postojanje aktivnosti na PET-u sugerira da LPMO enzimi imaju potencijalni afinitet prema ovom polimeru. Iako PET može biti jedan od potencijalnih supstrata za LPMO enzime, važno je napomenuti da bi potrebna dodatna istraživanja kako bi se potvrdila ta pretpostavka i razumjelo djelovanje LPMO enzima na ovom materijalu.

Pitanje 3: Kako iskoristiti strukturne sličnosti prirodnih supstrata LPMO enzima i plastike za razgradnju plastike LPMO enzimima?

Odgovor 3: Iskorištavanje strukturnih sličnosti između prirodnih supstrata LPMO enzima poput celuloze i plastike za razgradnju plastike LPMO enzimima zahtijeva nekoliko pristupa:

1. **Identifikacija relevantnih strukturnih sličnosti:** Prvi korak je detaljna analiza strukturnih sličnosti između prirodnih polisaharida i plastike. Važno je identificirati dijelove strukture plastike koji bi mogli biti ciljani od strane LPMO enzima, poput određenih kemijskih veza ili funkcionalnih grupa.

2. **Prilagodba aktivnog mjesta enzima:** Na temelju strukturnih sličnosti, može se provesti prilagodba aktivnog mjesta LPMO enzima kako bi se poboljšala afinitetnost prema plastici. Ovo može uključivati modifikiranje aminokiselinskih ostataka u aktivnom mjestu kako bi se poboljšala interakcija s plastikom.

3. **Razvoj specifičnih CBM modula:** CBM (moduli vezanja za ugljikohidrate) igraju ključnu ulogu u usmjeravanju enzima prema supstratu. Razvoj specifičnih CBM modula koji imaju visok afinitet prema određenim tipovima plastike može poboljšati vezanje LPMO enzima na plastiku i time povećati učinkovitost razgradnje.

4. **Proteinsko inženjerstvo za poboljšanje termostabilnosti:** Budući da su uvjeti reakcije za razgradnju plastike često različiti od uvjeta za prirodne polisaharide, proteinsko inženjerstvo može se koristiti za poboljšanje termostabilnosti LPMO enzima kako bi se osigurala stabilnost i aktivnost enzima u takvim uvjetima.

5. **Evolucijski pristup:** Istraživanje prirodnih mikroorganizama koji su evoluirali za razgradnju



plastike može pružiti uvid u prirodne mehanizme razgradnje plastike. Identifikacija i proučavanje enzima koji su ključni za ovu aktivnost može pružiti temelj za razvoj i optimizaciju LPMO enzima za razgradnju plastike. U cjelini, iskorištavanje strukturnih sličnosti između prirodnih supstrata LPMO enzima i plastike za razgradnju plastike LPMO enzimima zahtijeva interdisciplinarni pristup koji uključuje proteinsko inženjerstvo, molekularnu biologiju, biokemiju i razvoj novih tehnologija.

Pitanje 4: Možeš li predložiti konkretnu modifikaciju CBM modula LPMO enzima koja bi dovela do većeg afiniteta za vezanje plastike?

Odgovor 4: *Da, mogu predložiti nekoliko konkretnih modifikacija CBM modula LPMO enzima koje bi mogle rezultirati većim afinitetom za vezanje plastike:*

**1. Uvođenje aminokiselinskih ostataka s hidrofobnim svojstvima:** Dodavanje ili zamjena aminokiselinskih ostataka unutar CBM modula s onima koji imaju izraženija hidrofobna svojstva može povećati afinitet za vezanje plastike. Hidrofobne interakcije mogu biti ključne za stabilno vezanje CBM modula na hidrofobne površine plastike.

**2. Optimizacija površinske topografije:** Modifikacija površinske topografije CBM modula tako da se poveća kontaktna površina s plastikom može povećati afinitet za vezanje. To se može postići promjenom rasporeda aminokiselinskih ostataka ili uvođenjem strukturalnih promjena koje povećavaju dostupnost aktivnih mjesta za interakciju s plastikom.

**3. Uvođenje specifičnih funkcionalnih grupa:** Modifikacija CBM modula kako bi se uvela specifična funkcionalna grupa koja može tvoriti kovalentne ili nekovalentne veze s plastikom može povećati afinitet za vezanje. Primjerice, uvođenje aminokiselinskih ostataka s oksidacijskim svojstvima može omogućiti stvaranje kovalentnih veza s plastikom.

**4. Optimizacija veličine i oblika CBM modula:** Promjene u veličini i obliku CBM modula mogu utjecati na afinitet za vezanje plastike. Smanjenje veličine ili promjena konformacije CBM modula kako bi se poboljšala komplementarnost s površinom plastike može rezultirati povećanim afinitetom za vezanje.

**5. Kombinacija različitih tipova CBM modula:** Kombinacija više različitih CBM modula s različitim specifičnostima za vezanje različitih tipova plastike može rezultirati sinergijskim učinkom i povećanim afinitetom za vezanje širokog spektra plastičnih materijala. Ove su modifikacije samo neki od mogućih pristupa za poboljšanje afiniteta CBM modula LPMO enzima za vezanje plastike, a njihova učinkovitost može varirati ovisno o specifičnim karakteristikama plastike i CBM modula. Daljnja istraživanja i eksperimentalni rad bit će potrebni za detaljnije razumijevanje ovih mehanizama i razvoj optimalnih modifikacija.

Pitanje 5: Možeš li predložiti postupke koji bi povećali prinos izolacije i pročišćavanja tako

modificiranog enzima?

Odgovor 5: *Da, postupci koji bi mogli povećati prinos izolacije i pročišćavanja tako modificiranog enzima obično uključuju kombinaciju različitih tehnika ekspresije, pročišćavanja i stabilizacije. Evo nekoliko mogućih pristupa:*

**1. Optimizacija uvjeta ekspresije:** *Promjene u uvjetima ekspresije mogu znatno utjecati na prinos i kvalitetu eksprimiranog proteina. To uključuje promjene u mediju za kultivaciju, temperaturi inkubacije, indukcijskim uvjetima i vremenu ekspresije. Optimizacija ovih parametara može rezultirati povećanim prinosom modificiranog enzima.*

**2. Primjena odgovarajućih vektora i promotora:** *Odabir odgovarajućeg vektora i promotora može biti ključan za postizanje visokog prinosa proteina. Korištenje snažnih promotora i vektora visoke kopije može povećati ekspresiju enzima u bakterijskim ili eukariotskim stanicama domaćinima.*

**3. Optimizacija uvjeta pročišćavanja:** *Odabir odgovarajuće tehnike pročišćavanja i optimizacija postupka pročišćavanja mogu povećati prinos i čistoću modificiranog enzima. To uključuje odabir odgovarajuće metode lize stanica, tehnike vezanja na kolonu, elucije i koncentracije.*

**4. Primjena tehnologija vezanja na površinu:** *Tehnike vezanja na površinu, poput imobilizacije na nosač, mogu olakšati pročišćavanje modificiranog enzima iz kulture izraženih stanica. Ovo može rezultirati većim prinosom i stabilnošću enzima tijekom procesa pročišćavanja.*

**5. Korištenje stabilizirajućih agenasa:** *Dodatak stabilizirajućih agenasa poput glicerola, sorbitola ili polietilen glikola tijekom ekspresije i pročišćavanja može pomoći u očuvanju stabilnosti modificiranog enzima i povećati prinos.*

**6. Primjena "high-throughput" tehnologija:** *Korištenje tehnologija visoke propusnosti za pročišćavanje modificiranog enzima može povećati učinkovitost procesa pročišćavanja i rezultirati većim prinosom. Ovi su postupci samo neki od mogućih pristupa za povećanje prinosa izolacije i pročišćavanja modificiranog enzima. Odabir odgovarajuće kombinacije postupaka ovisit će o specifičnostima enzima, izraženim stanicama domaćinima i zahtjevima za krajnjom primjenom.*

Pitanje 6: Možeš li predložiti optimalne reakcijske uvjete za razgradnju plastike LPMO enzimima?

Odgovor 6: *Optimalni reakcijski uvjeti za razgradnju plastike LPMO enzimima ovise o mnogim faktorima, uključujući vrstu plastike, tip LPMO enzima i njihove osobine, kao i uvjete okoline. Međutim, evo nekoliko općih smjernica koje bi mogle biti korisne:*

**1. Temperatura:** *Temperatura reakcije može biti važan čimbenik. Treba odabrati temperaturu koja je optimalna za aktivnost određenog LPMO enzima, ali koja istovremeno neće uzrokovati*

denaturaciju ili gubitak aktivnosti enzima. Često se istražuju rasponi temperatura od 30 °C do 60 °C, ovisno o termostabilnosti enzima i specifičnosti supstrata.

2. **pH:** pH okoliša također može utjecati na aktivnost enzima. Treba odabrati pH koji je optimalan za aktivnost LPMO enzima, obično u rasponu pH 4-8. Međutim, specifični uvjeti pH mogu varirati ovisno o karakteristikama enzima i supstrata.

3. **Vrijeme reakcije:** Vrijeme reakcije ovisit će o brzini razgradnje plastike enzimima te o željenom stupnju razgradnje. Potrebno je odabrati dovoljno vrijeme reakcije kako bi se postigla potpuna ili djelomična razgradnja plastike, ali izbjegavati preduge reakcijske periode koji mogu rezultirati smanjenjem aktivnosti enzima ili neželjenim reakcijama.

4. **Kofaktori:** Neke reakcije LPMO enzima mogu zahtijevati prisutnost kofaktora poput bakra. Stoga je važno osigurati optimalne uvjete za aktivaciju ili stabilizaciju kofaktora tijekom reakcije.

5. **Koncentracija enzima i supstrata:** Važno je odabrati odgovarajuće koncentracije enzima i supstrata kako bi se postigla maksimalna učinkovitost reakcije, ali istovremeno izbjeći nepotrebno trošenje enzima ili supstrata. Ove smjernice trebaju se prilagoditi za svaki konkretni slučaj, uzimajući u obzir specifičnosti plastike, svojstva LPMO enzima i ciljeve razgradnje. Eksperimenti s optimizacijom uvjeta reakcije pomoći će u određivanju najboljih uvjeta za razgradnju plastike LPMO enzimima.

Pitanje 7: Možeš li predložiti postupak modifikacije LPMO enzima koje bi ga učinile stabilnim u uvjetima razgradnje plastike?

Odgovor 7: *Da, postoje nekoliko strategija koje se mogu primijeniti za modifikaciju LPMO enzima kako bi se povećala njihova stabilnost u uvjetima razgradnje plastike:*

1. **Inženjering termostabilnosti:** Ovo uključuje uvođenje mutacija koje povećavaju termostabilnost enzima. Ova modifikacija može se postići identifikacijom stabilnih domena ili regija unutar enzima te uvođenjem stabilizirajućih mutacija, poput uvođenja disulfidnih mostova ili promjene hidrofobnih interakcija.

2. **Poboljšanje otpornosti na kemijske uvjete:** Enzimi koji se koriste za razgradnju plastike često su izloženi kemijskim uvjetima kao što su prisutnost organskih otapala ili visoke koncentracije kiselina ili baza. Modifikacije koje povećavaju otpornost enzima na ove uvjete mogu uključivati uvođenje aminokiselina koje povećavaju otpornost na denaturaciju ili stabilizaciju aktivnog mjesta.

3. **Stabilizacija aktivnog mjesta:** Aktivno mjesto enzima može biti osjetljivo na denaturaciju ili promjene u okolišu. Uvođenje mutacija koje stabiliziraju aktivno mjesto ili promjene u strukturi koja štiti aktivno mjesto od vanjskih utjecaja može povećati stabilnost enzima.

4. **Optimizacija posttranslacijskih modifikacija:** Posttranslacijske modifikacije poput glikozilacije ili fosforilacije mogu utjecati na stabilnost i aktivnost enzima. Modifikacije koje

potiču određene posttranslacijske modifikacije ili optimiziraju njihovu funkciju mogu poboljšati stabilnost enzima.

**5. Fuzija s nosačem proteina:** Fuzija LPMO enzima s nosačem proteina može povećati stabilnost enzima tako što ih štiti od vanjskih utjecaja i pomaže u održavanju njihove strukture. Ove strategije mogu se primijeniti pojedinačno ili u kombinaciji kako bi se postigla maksimalna stabilnost LPMO enzima u uvjetima razgradnje plastike. Važno je provesti detaljne eksperimente kako bi se odabrale najučinkovitije modifikacije za konkretni enzim i uvjete razgradnje.

Pitanje 8: Možeš li predložiti konkretan primjer LMPO enzima za kojeg misliš da bi se mogao primijeniti u razgradnji plastike?

Odgovor 8: Jedan primjer LPMO enzima koji se može razmotriti za potencijalnu primjenu u razgradnji plastike je AA13 LPMO enzim. Ova podskupina LPMO enzima posebno je interesantna jer se većinom vežu uz hitin, koji je organski polimer sličan celulozi, ali se također koristi kao materijal u proizvodnji nekih vrsta bioplastike. Ovdje su neki razlozi zašto bi AA13 LPMO enzimi mogli biti pogodni za razgradnju plastike:

1. **Afinitet prema hitinu:** Budući da hitin i plastika dijele neke sličnosti u svojoj kemijskoj strukturi, LPMO enzimi s afinitetom prema hitinu mogli bi imati tendenciju interakcije i s nekim vrstama plastike, osobito bioplastike koje sadrže slične funkcionalne skupine kao hitin.

2. **Prilagodljivost aktivnog mjesta:** LPMO enzimi su poznati po svojoj sposobnosti prilagođavanja aktivnog mjesta za različite supstrate. Uz odgovarajuće modifikacije, aktivno mjesto LPMO enzima može se optimizirati za reakciju s plastikom.

3. **Poznavanje katalitičkog mehanizma:** Iako detalji katalitičkog mehanizma LPMO enzima u razgradnji plastike nisu u potpunosti poznati, istraživanja su pokazala da ovi enzimi imaju potencijal za razgradnju različitih polimera. Modifikacijom aktivnog mjesta i povećanjem termostabilnosti, LPMO enzimi mogu postati učinkovitiji u razgradnji plastike.

4. **Proteinsko inženjerstvo:** Kroz proteinsko inženjerstvo, može se mijenjati struktura i svojstva LPMO enzima kako bi se poboljšala njihova sposobnost razgradnje plastike. Ovo može uključivati uvođenje novih aminokiselina ili promjene u strukturi aktivnog mjesta. Naravno, potrebno je provesti daljnja istraživanja i eksperimente kako bi se utvrdila stvarna učinkovitost i primjenjivost AA13 LPMO enzima u razgradnji plastike.

Pitanje 9: Možeš li predložiti algoritam umjetne inteligencije koji bi se mogao iskoristiti za predviđanje aktivnosti enzima i odgovarajuće strukture za vezanje CBM modula enzima?

Odgovor 9: Da, možemo razmotriti primjenu dubokog učenja, posebno konvolucijskih neuronskih mreža (CNN) ili rekurentnih neuronskih mreža (RNN) u kombinaciji s metodama strojnog učenja za predviđanje aktivnosti enzima. Evo kako bi takav algoritam mogao izgledati:

1. **Priprema podataka:** Prvi korak je prikupljanje i priprema podataka o strukturi enzima i njihovim aktivnostima. Ovo uključuje informacije o sekvenci aminokiselina, strukturi enzima, prisutnosti određenih funkcionalnih grupa, kao i bilo kakve dodatne podatke o aktivnosti enzima koji su dostupni.
2. **Izrada modela dubokog učenja:** Zatim se kreira model dubokog učenja koji će koristiti te podatke kako bi naučio predvidjeti aktivnost enzima. Model može biti konvolucijska neuronska mreža (CNN) ili rekurentna neuronska mreža (RNN), ili čak hibridni model koji kombinira obje arhitekture.
3. **Treniranje modela:** Nakon izrade modela, potrebno je trenirati ga koristeći pripremljene podatke. Tijekom treninga, model će prilagođavati svoje parametre kako bi minimizirao grešku između predviđene aktivnosti enzima i stvarne aktivnosti.
4. **Validacija modela:** Nakon treninga, model se provjerava i evaluira na neovisnom skupu podataka kako bi se provjerila njegova učinkovitost i pouzdanost. Ova faza pomaže u identifikaciji bilo kakvih problema u modelu i prilagodbama koje su potrebne.
5. **Optimizacija i iteracija:** Ako je potrebno, model se može optimizirati dodavanjem dodatnih slojeva, promjenom hiperparametara ili korištenjem različitih tehnika regularizacije kako bi se poboljšala njegova učinkovitost. Nakon svake iteracije, model se ponovno trenira i provjerava kako bi se osiguralo da postiže željene rezultate. Kada se model smatra dovoljno pouzdanim, može se koristiti za predviđanje aktivnosti enzima na novim, nepoznatim podacima. Ovaj algoritam omogućuje automatsko i brzo predviđanje aktivnosti enzima na temelju njihove strukture, što može biti korisno u razvoju novih enzimatskih procesa ili optimizaciji postojećih.

### 3. ZAKLJUČCI

1. Metaloenzimi se smatraju jednim od najefikasnijih prirodnih biokatalizatora zbog svoje selektivnosti i aktivnosti u vrlo blagim uvjetima. Prednosti primjene litičkih polisaharidnih monooksigenaza pred ostalim metaloenzimima su mogućnost katalize reakcije razgradnje teško razgradivih, kristaličnih i u vodi netopivih polimera. Zbog sličnosti strukture plastike s ovim polimerima, smatra se da bi LPMO enzimi mogli katalizirati reakcije razgradnje plastike.
2. Moduli vezanja za ugljikohidrate su malene, pomoćne domene spomenutih enzima koji kataliziraju reakcije razgradnje polisaharida čija je uloga poboljšanje vezanja enzima na supstrat. Fuzioniranje ovih domena s odgovarajućim enzimima moglo bi povećati efikasnost enzimske razgradnje plastike, pri čemu se ističu CBM moduli tipa-A, zbog svog visokog afiniteta za netopivu celulozu kristalične strukture.
3. Zbog svoj intenzivnog razvoja i napretka u posljednjih nekoliko godina, umjetna inteligencija nalazi primjenu u gotovo svim znanstvenim disciplinama. ChatGPT je izrazito popularan model umjetne inteligencije zbog jednostavnosti korištenja i široke primjene. Mnoga istraživanja pokazala su velik potencijal primjene ChatGPT-a u biotehnologiji, i to u svrhu: unaprjeđenja genetičkih istraživanja mikroorganizama, bioinformatički, otkrivanju i karakterizaciji ciljnog mjesta djelovanja lijeka te farmakokinetičkih i farmakodinamičkih svojstava lijekova. Ipak, sve ovako prikupljene informacije ne mogu se smatrati potpuno pouzdanim te je potrebna njihova dodatna provjera.
4. ChatGPT u stanju je pružiti smislene, razrađene odgovore na temu razgradnje plastike korištenjem LPMO enzima te navodi da se pretpostavka da LPMO enzimi imaju potencijalnu primjenu u razgradnji plastike čini se opravdanom na temelju njihove prirodne funkcije, strukturnih sličnosti s prirodnim polisaharidima te mogućnosti proteinskog inženjerstva. Izdvaja kako bi LPMO enzimi imali najveći afinitet prema PET-u, te kako bi najveći potencijal za razgradnju plastike imao AA13 LPMO enzim. ChatGPT je također pokazao sposobnost za predlaganje modifikacija CBM modula koje bi rezultirale većim afinitetom za vezanje plastike, postupke koji bi povećali prinos izolacije i pročišćavanja modificiranog enzima i optimalne reakcijske uvjete za razgradnju plastike LPMO enzimima.

#### 4. POPIS LITERATURE

- Abbott DW, van Bueren AL (2014) Using structure to inform carbohydrate binding module function. *Curr Opin Struct Biol* **28**, 32–40. <https://doi.org/10.1016/J.SBI.2014.07.004>
- Arling Bååth J, Jensen K, Borch K, Westh P, Kari J (2022) Sabatier Principle for Rationalizing Enzymatic Hydrolysis of a Synthetic Polyester. *JACS Au* **2**, 1223–1231. <https://doi.org/10.1021/jacsau.2c00204>
- Bishnu P, Biobuilderclub KD (2020) Enzymes for PET degradation
- Blomberg MRA, Borowski T, Himo F, Liao RZ, Siegbahn PEM (2014) Quantum chemical studies of mechanisms for metalloenzymes. *Chem Rev* **114**:3601–3658.
- Chatterjee S, Bhattacharya M, Lee SS, Chakraborty C (2023) Can artificial intelligence-strengthened ChatGPT or other large language models transform nucleic acid research? *Mol Ther Nucleic Acids* **33**:205–207.
- Crouch LI, Labourel A, Walton PH, Davies GJ, Gilbert HJ (2016) The contribution of non-catalytic carbohydrate binding modules to the activity of lytic polysaccharide monoxygenases. *Journal of Biological Chemistry* **291**, 7439–7449. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.702365>
- Deng J, Lin Y *Frontiers in Computing and Intelligent Systems The Benefits and Challenges of ChatGPT: An Overview*
- Emmert-Streib F (2023) Can ChatGPT understand genetics? *European Journal of Human Genetics*
- Forsberg Z, Bissaro B, Gullesen J, Dalhus B, Vaaje-Kolstad G, Eijsink VGH (2018) Structural determinants of bacterial lytic polysaccharide monoxygenase functionality. *Journal of Biological Chemistry* **293**, 1397–1412. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.817130>
- Forsberg Z, Courtade G (2023) On the impact of carbohydrate-binding modules (CBMs) in lytic polysaccharide monoxygenases (LPMOs). *Essays Biochem* **67**:561–574.
- Forsberg Z, Mackenzie AK, Sørli M, Røhr ÅK, Helland R, Arvai AS, i sur. (2014) Structural and functional characterization of a conserved pair of bacterial cellulose-oxidizing lytic polysaccharide monoxygenases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 8446–8451. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402771111>
- Georgelis N, Yennawar NH, Cosgrove DJ (2012) Structural basis for entropy-driven cellulose binding by a type-A cellulose-binding module (CBM) and bacterial expansin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 14830–14835. <https://doi.org/10.1073/pnas.1213200109>
- Hou W, Ji Z (2023) GeneTuring tests GPT models in genomics. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2023.03.11.532238>
- Ipsen J, Hallas-Møller M, Brander S, Leggio L Lo, Johansen KS (2021) Lytic polysaccharide monoxygenases and other histidine-brace copper proteins: Structure, oxygen activation and biotechnological applications. *Biochem Soc Trans* **49**:531–540.
- Juhi A, Pipil N, Santra S, Mondal S, Behera JK, Mondal H (2023) The Capability of ChatGPT in Predicting and Explaining Common Drug-Drug Interactions. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.36272>
- Kijo-Kleczkowska A, Gnatowski A (2022) Recycling of PlasticWaste, with Particular Emphasis on Thermal Methods—Review. *Energies (Basel)* **15**. <https://doi.org/10.3390/en15062114>
- Kuusk S, Kont R, Kuusk P, Heering A, Sørli M, Bissaro B, i sur. (2019) Kinetic insights into the role of the reductant in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-driven degradation of chitin by a bacterial lytic polysaccharide monoxygenase. *Journal of Biological Chemistry* **294**, 1516–1528. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006196>
- Lin Y-W (2017) Rational design of metalloenzymes: From single to multiple active 1 sites 2 3 4
- Macleod M, Peter H, Arp H, Tekman MB, Jahnke A The global threat from plastic pollution Madland E, Forsberg Z, Wang Y, Lindorff-Larsen K, Niebisch A, Modregger J, i sur. (2021) Structural and functional variation of chitin-binding domains of a lytic polysaccharide monoxygenase from *Cellvibrio japonicus*. *Journal of Biological Chemistry* **297**. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101084>

- Manavalan T, Stepnov AA, Hegnar OA, Eijsink VGH (2021) Sugar oxidoreductases and LPMOs – two sides of the same polysaccharide degradation story? *Carbohydr Res* 505
- Millet H, Vangheluwe P, Block C, Sevenster A, Garcia L, Antonopoulos R The Nature of Plastics and Their Societal Usage
- Page AJ, Tumelty NM, Sheppard SK (2023) Navigating the AI frontier: ethical considerations and best practices in microbial genomics research. *Microb Genom* 9
- Rennison AP, Westh P, Møller MS (2023) Protein-plastic interactions: The driving forces behind the high affinity of a carbohydrate-binding module for polyethylene terephthalate. *Science of the Total Environment* **870**.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.161948>
- Rhodes CJ (2018) Plastic pollution and potential solutions. *Sci Prog* **101**, 207–260.  
<https://doi.org/10.3184/003685018X15294876706211>
- Rieder L, Petrović D, Våljamäe P, Eijsink VGH, Sørlie M (2021) Kinetic Characterization of a Putatively Chitin-Active LPMO Reveals a Preference for Soluble Substrates and Absence of Monoxygenase Activity. *ACS Catal* **11**, 11685–11695.  
<https://doi.org/10.1021/acscatal.1c03344>
- Roelfes G (2019) LmrR: A Privileged Scaffold for Artificial Metalloenzymes. *Acc Chem Res* **52**, 545–556. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.9b00004>
- Rosati F, Roelfes G (2010) Artificial Metalloenzymes. *ChemCatChem* 2:916–927.
- Rovaletti A, De Gioia L, Fantucci P, Greco C, Vertemara J, Zampella G, i sur. (2023) Recent Theoretical Insights into the Oxidative Degradation of Biopolymers and Plastics by Metalloenzymes †. *Int J Mol Sci* 24
- Ru J, Huo Y, Yang Y (2020) Microbial Degradation and Valorization of Plastic Wastes. *Front Microbiol* 11
- Shue E, Liu L, Li B, Feng Z, Li X, Hu G Empowering Beginners in Bioinformatics with ChatGPT. <https://doi.org/10.1101/2023.03.07.531414>
- Stepnov AA, Eijsink VGH, Forsberg Z (2022) Enhanced in situ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production explains synergy between an LPMO with a cellulose-binding domain and a single-domain LPMO. *Sci Rep* **12**. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10096-0>
- Tong Y, Zhang L (2023) Discovering the next decade's synthetic biology research trends with ChatGPT. *Synth Syst Biotechnol* 8:220–223.
- Valdez CE, Smith QA, Nechay MR, Alexandrova AN (2014) Mysteries of metals in metalloenzymes. *Acc Chem Res* **47**, 3110–3117. <https://doi.org/10.1021/ar500227u>
- Wang P (2019) On Defining Artificial Intelligence. *Journal of Artificial General Intelligence* **10**, 1–37. <https://doi.org/10.2478/jagi-2019-0002>
- Weber J, Petrović D, Strodel B, Smits SHJ, Kolkenbrock S, Leggewie C, i sur. (2019) Interaction of carbohydrate-binding modules with poly(ethylene terephthalate). *Appl Microbiol Biotechnol* **103**, 4801–4812. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09760-9>
- Zhu B, Wang D, Wei N (2022) Enzyme discovery and engineering for sustainable plastic recycling. *Trends Biotechnol* 40:22–37.



## Izjava o izvornosti

Ja                     Katja Jakuš                     izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Katja Jakuš  
Vlastoručni potpis