



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea in Scienze Biologiche

RICICLAGGIO A BASSE EMISSIONI DI CARBONIO DELLA PLASTICA PET POST-CONSUMER
ATTRAVERSO UNA POLIESTERE IDROLASI METAGENOMICA

LOW CARBON FOOTPRINT RECYCLING OF POST-CONSUMER PET PLASTIC WITH A
METAGENOMIC POLYESTER HYDROLASE

Relatore: Chiar.mo
Prof. IKE OLIVOTTO

A.A. 2020/2021

Tesi di Laurea di:
DANIELE MORICONI

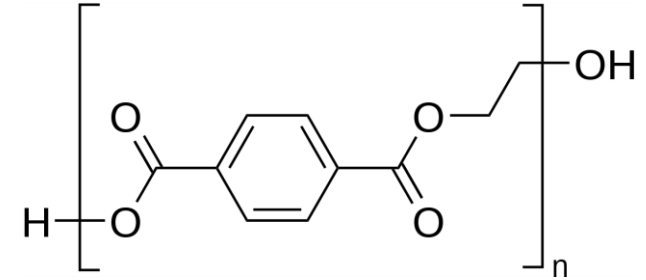


UNIVERSITÀ
POLITECNICA
DELLE MARCHE

Introduzione

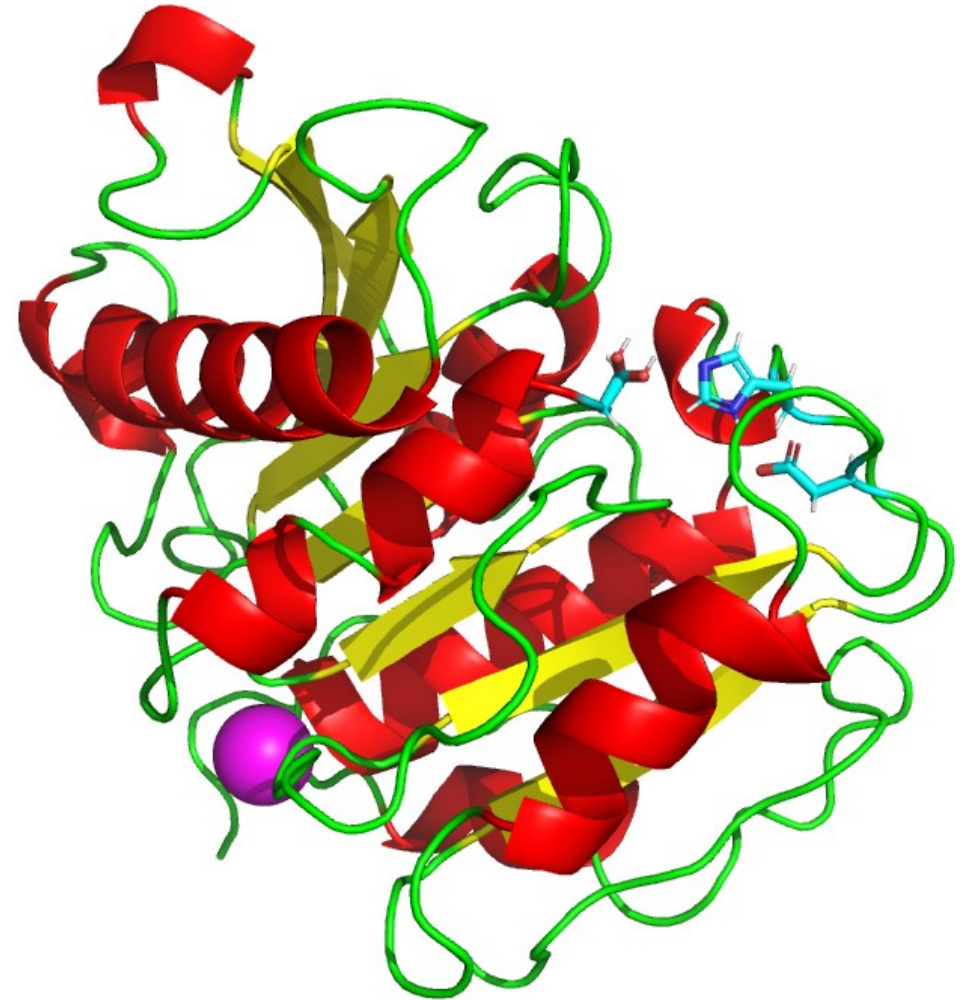
Le plastiche sono onnipresenti e indispensabili nella vita di tutti i giorni, grazie alle illimitate applicazioni e al basso costo di lavorazione

- Il PET consiste in un polimero formato da un'alternanza di monomeri di acido tereftalico (TPA) e glicole etilenico (EG) uniti da un legame estere, viene utilizzato nel packaging di cibo e bevande e nell'industria tessile.
- Delle 368 milioni di tonnellate di plastica prodotta ogni anno, 70 sono di Polietilene Tereftalato (PET) ed il 70% di quest'ultimo finisce in discarica dopo il primo utilizzo.
- L'utilizzo di enzimi per la conversione del PET in monomeri è una possibile e nuova strategia per i processi di riciclo di questa tipologia di plastica, in particolare per quei rifiuti composti da differenti tipologie di plastica che risultano difficili da riciclare con metodi convenzionali.
- Gli enzimi che maggiormente hanno mostrato efficacia nell'idrolizzare il legame estere del PET sono le cutinasi di origine fungina, le quali hanno mostrato una bassa specificità per il substrato e sono quindi in grado di degradare anche le plastiche PET come tale.



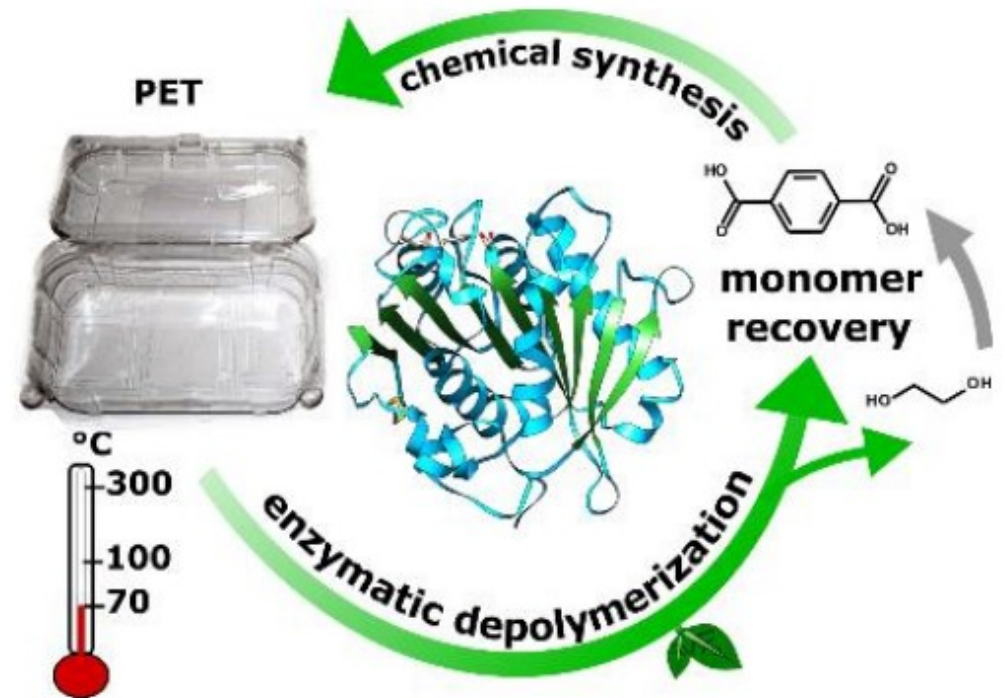
Enzimi PET-Idrolasi

- Sono enzimi che appartengono alla super famiglia delle α/β Poliesteridrolasi le quali degradano la plastica a livello del legame estere del polimero.
- Una cutinasi recentemente scoperta, la PHL7, si è rivelata essere l'enzima con la maggiore efficienza degradativa per il PET amorfo.
- Nonostante esistano enzimi in grado di degradare il PET a temperatura ambiente si è visto che la temperatura ideale è di circa 70°C, poiché tale è la temperatura di fusione vetrosa della plastica (la quale diviene più viscosa) permettendo agli enzimi un migliore accesso alla catena polimerica.



Scopo

- Fornire un'alternativa alle già esistenti strategie di riciclaggio delle plastiche PET che possa produrre un materiale con caratteristiche e qualità paragonabili ad un prodotto di nuova sintesi, che sia al contempo ecosostenibile.
- Tale processo consentirebbe di applicare il concetto di economia circolare al riciclo della plastica PET

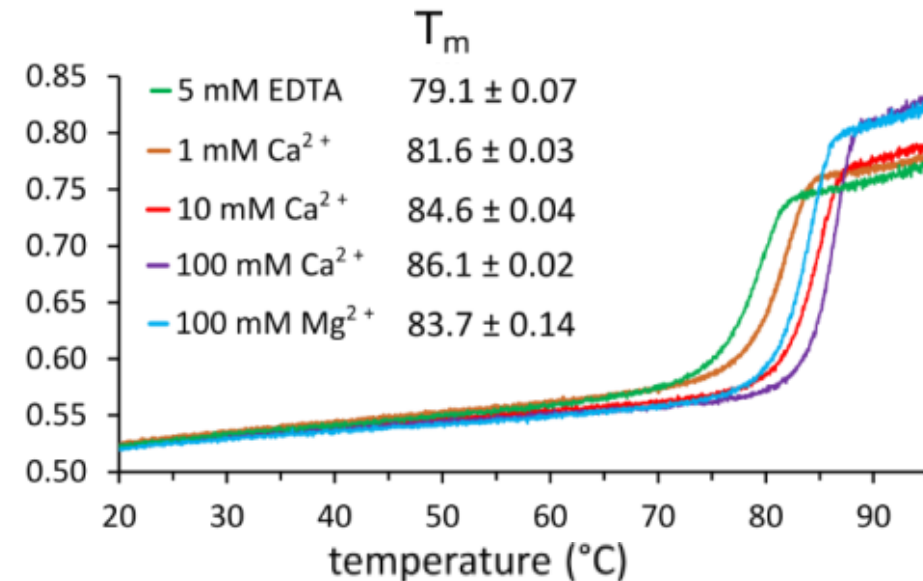


Metodi

- Campioni di compost sono stati prelevati da tre siti di compostaggio di Lipsia, Germania. Il DNA metagenomico purificato ricavato dai campioni è stato sottoposto a PCR con l'ausilio di primer degenerati costruiti sulla base di una sequenza consenso derivata da 54 idrolasi note, al fine di identificare nuove possibili PET-idrolasi
- Il gene di PHL7 è stato clonato in plasmidi, poi trasferiti in vettori di espressioni di *E. Coli*. Il prodotto ottenuto è stato purificato mediante cromatografia e la frazione proteica è stata incubata a 62°C per 30min, successivamente centrifugata e il surnatante, contenete la proteina di interesse purificata, è stata separato dal pellet.
- La struttura dell'enzima è stata ricavata mediante x-ray diffraction.
- La temperatura di melting (T_m) dell'enzima è stata ottenuta tramite nano-fluorometria a scansione differenziale (nanoDSF).
- L'efficienza degradativa dell'enzima è stata determinata tramite la degradazione di film di PET amorfo con un rapporto di $0.6\text{mg}_{\text{enzyme}} / \text{g}_{\text{PET}}$ in soluzione tampone con buffer fosfato a pH 8.

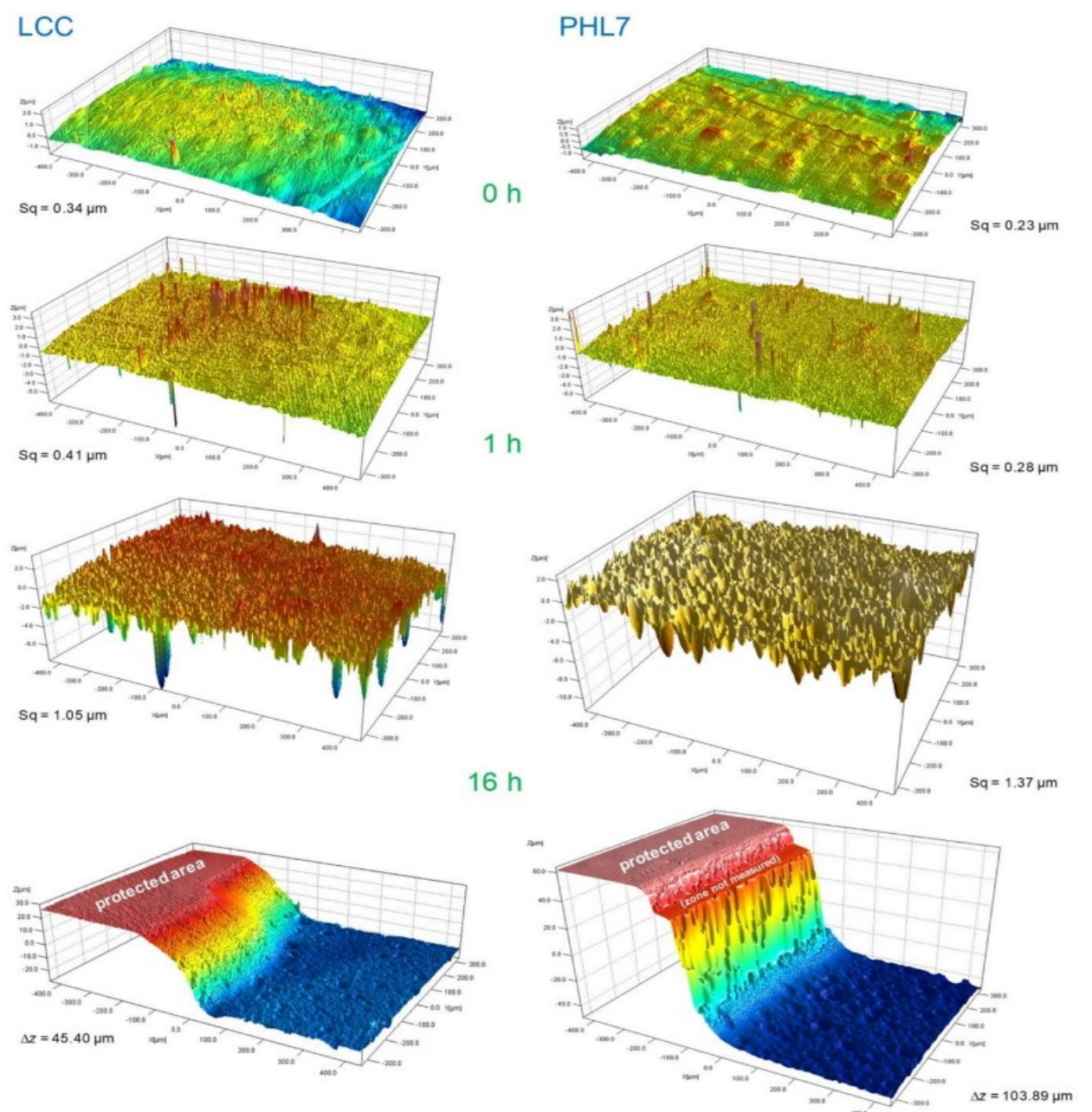
Risultati

- Dall'analisi metagenomica sono stati individuati sette possibili enzimi poliestere-idrolasi. Tra queste la PHL7 è quella che ha dato migliori risultati in termini di stabilità termica ed efficienza degradativa.
- PHL7 ha la tipica struttura conservata α/β delle cutinasi e presenta un sito attivo costituito da Ser-Asp-His in cui viene scisso il PET a livello del legame estere.
- L'analisi della termostabilità dell'enzima tramite nanoDSF ha mostrato una T_m che raggiunge i 79.1°C. L'enzima viene ulteriormente stabilizzato in presenza di ioni Ca^{2+} e Mg^{2+} in soluzione: con concentrazione 100 mM, la T_m della proteina aumenta rispettivamente ad 86,1°C e 83,7°C



Risultati

- L'efficienza degradativa è stata determinata dal confronto su un film di PET amorfo tra il PHL7 ed LCC, la cutinasi precedentemente nota per aver la maggiore efficienza degradativa.
- Il confronto è avvenuto con il rapporto di $0.6 \text{mg}_{\text{enzyma}} / \text{g}_{\text{PET}}$.
- Dopo 16h il PHL7 ha degradato $>90\%$ in peso del PET amorfo, mentre LCC il 45%. Una completa degradazione da parte del PHL7 è stata ottenuta in 18h, mentre LCC in 24h ne ha degradato solamente il 73%.

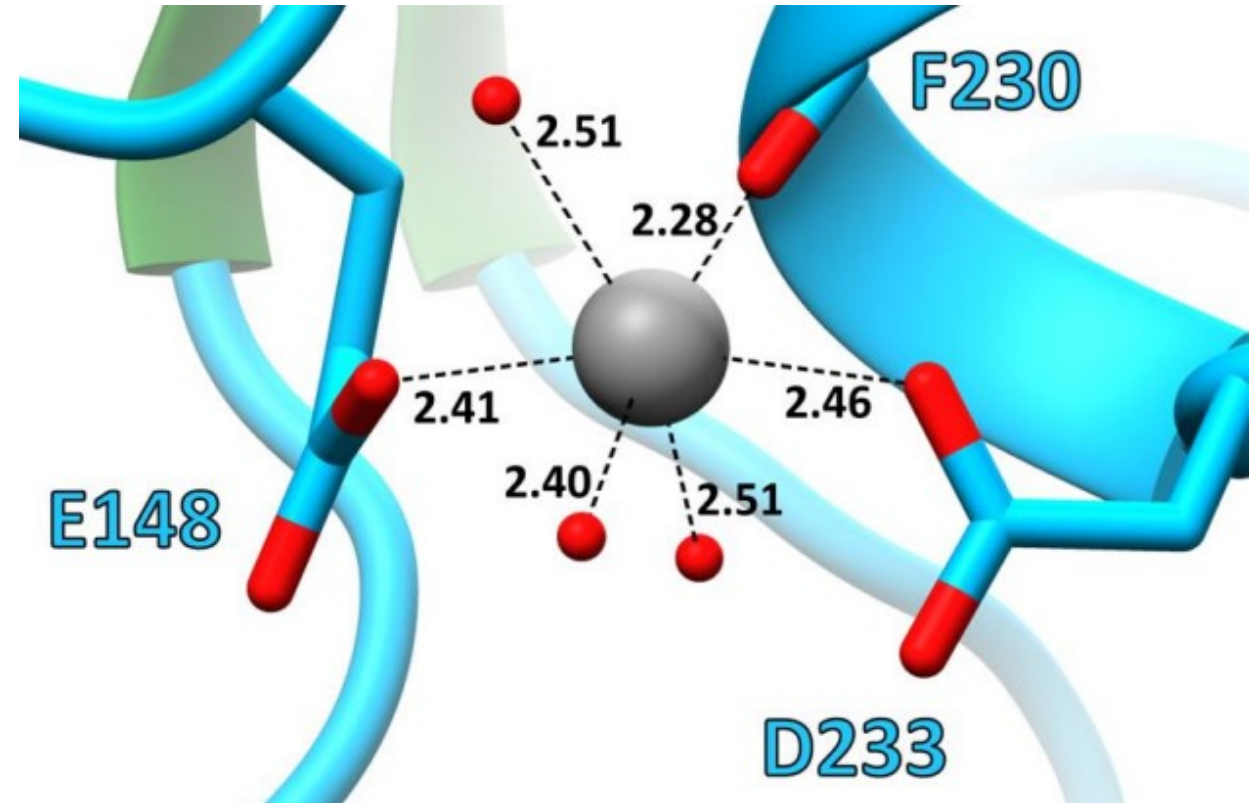


Discussione

- Si è ipotizzato che microrganismi termofili coinvolti nella degradazione dei composti vegetali, come la cutina, potessero essere una valida fonte di enzimi poliestere-idrolasi. È stata effettuata un'analisi metagenomica di campioni di compost prelevati da differenti siti di compostaggio a Lipsia.
- A tal fine, una sequenza consenso derivata da 54 idrolasi identificate in precedenti studi è stata utilizzata per disegnare dei primer da poter utilizzare in PCR, in modo da poter identificare le eventuali nuove poliestere idrolasi.
- Delle sette idrolasi identificate, il PHL7, nonostante abbia una struttura conservata alfa/beta ed un sito attivo formato dalla triade Ser-Asp-His, in comune con le cutinasi note, mostra delle differenze strutturali, tra le quali in particolare, in posizione 210 un residuo di Leucina contrariamente alla Fenilalanina presente negli altri enzimi.
- Tale differenza strutturale consente una maggiore capacità di legame per il PET amorfo dovuta al minore ingombro della Leucina rispetto alla Fenilalanina nel solco di legame e quindi un più efficiente docking del polimero. Ciò è stato dimostrato dal fatto che sostituendo la L210 con una Fenilalanina la resa del PHL7 era notevolmente ridotta.

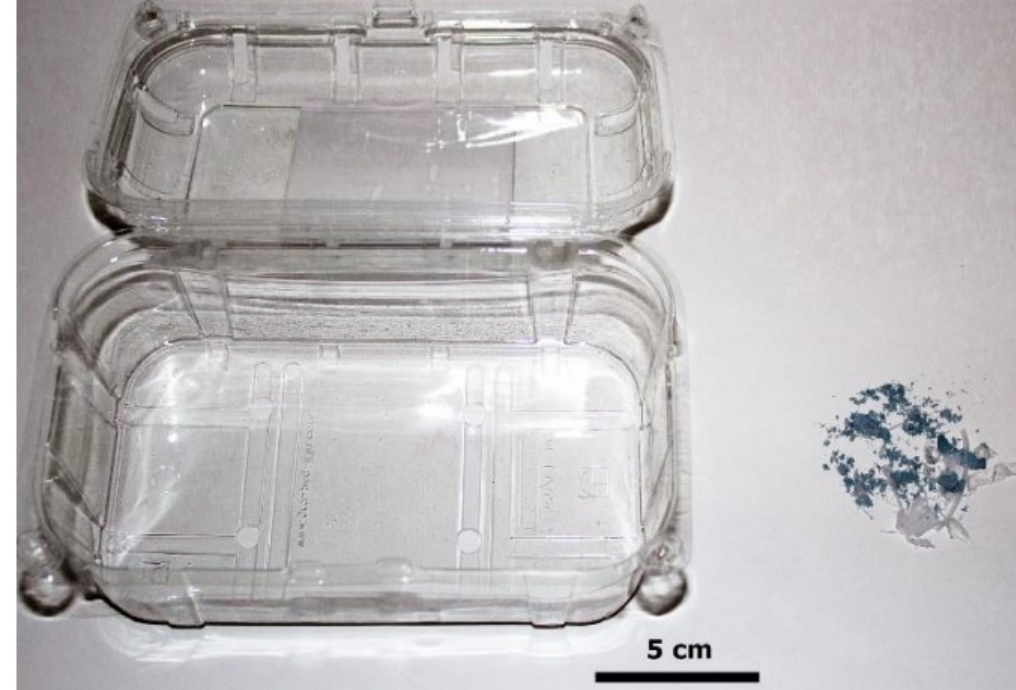
Discussione

- Le analisi sulla termostabilità del PHL7 hanno dimostrato come possa operare a temperatura prossima a quella di fusione vetrosa del PET pari a circa 70°C, data la sua T_m di 79.1°C.
- In condizioni operative la T_m viene aumentata dalla presenza di Ca^{2+} e Mg^{2+} che ad una concentrazione di 100 mM portano la T_m a rispettivamente 86.1°C e 83.7°C.
- Questi ioni vanno a legarsi alle catene laterali dei residui superficiali di Glu148 e Asp233, che risultano vicini nella struttura terziaria dell'enzima, creando un ponte salino tra i due e stabilizzando la proteina.



Discussione

- Dai risultati del confronto sull'efficienza degradativa tra il PHL7 e LCC si è visto come il primo sia due volte più efficiente nella degradazione del PET amorfo.
- Il PET amorfo post consumer è stato degradato attraverso lisi enzimatica al 98% in 48h senza la necessità di spese energetiche per macinazione e fusione del polimero.
- PET vergine sintetizzato utilizzando il TPA prodotto dalla degradazione enzimatica del PET amorfo post-consumer possiede caratteristiche comparabili a quello prodotto a partire da materie prime fossili.
- Il PET cristallizzato non può essere degradato a causa della sua struttura e richiede un pretrattamento che riduca la cristallinità del polimero post-consumer, prima di poter essere sottoposto alla degradazione enzimatica.



Conclusione

- Un metodo a primer degenerati si è rivelato utile per l'isolamento di nuove poliestere-idrolasi da metagenoma.
- Tra i vari enzimi, il PHL7 ha mostrato un'elevata efficienza nel degradare i film di PET amorfo, superando i risultati degli altri enzimi e l'analisi della sua struttura indica che la Leucina in posizione 210 contribuisce all'alta attività idrolitica in confronto alle altre PET-idrolasi.
- il PHL7 potrebbe quindi essere utilizzato per la degradazione diretta del PET amorfo ed il TPA ricavato dal processo enzimatico può essere riutilizzato per la produzione di PET vergine con caratteristiche paragonabili a quello di neosintesi, rispecchiando il concetto di economia circolare.
- Ulteriori modificazioni sitospecifiche mediante ingegneria proteica potranno aumentare l'efficienza di PHL7 al fine di ottenere un riciclo ecosostenibile e vantaggioso del PET su scala industriale.



Bibliografia

- C. Sonnendecker, J. Oeser, P. K. Richter, P. Hille, Z. Zhao, C. Fischer, H. Lippold, P. Blázquez-Sánchez, F. Engelberger, C. A. Ramírez-Sarmiento, T. Oeser, Y. Lihanova, R. Frank, H. Jahnke, S. Billig, B. Abel, N. Sträter, J. Matysik, W. Zimmermann, «Low Carbon Footprint Recycling of Post-Consumer PET Plastic with a Metagenomic Polyester Hydrolase», *Chemistry Europe*, 2021.
- PlasticsEurope, «Plastics – the Facts 2020: An analysis of European plastics production, demand and waste data», 2020.
- J. Zhou, M. A. Bruns, J. M. Tiedje, *Appl. Environ. Microbiol.* 1996, 62, 316–322

GRAZIE PER L'ATTENZIONE

