

36. Országos Tudományos Diákköri Konferencia

Szeged, 2023. április 12-15.



PET-lebontó rekombináns enzimek aktivitás vizsgálata

Szerző:

Nagy Blanka-Eszter

Babes-Bolyai Tudományegyetem, Kémia és Vegyészmérnöki Kar, I. év, Nano- és bioanyagok mérnökkémia MSc

Témavezetők:

Dr. Bencze László-Csaba - egyetemi adjunktus, Babes-Bolyai Tudományegyetem, Kémia és Vegyészmérnöki Kar, Kémia Intézet, Enzimológia és Alkalmazott Biokatalízis Kutatóközpont

Boros Krisztina – PhD hallgató, tudományos segédmunkatárs, Babes-Bolyai Tudományegyetem, Kémia és Vegyészmérnöki Kar, Enzimológia és Alkalmazott Biokatalízis Kutatóközpont

Szekció: Kémia és Vegyipari Szekció

Lezárva: 2022. szeptember 29. Kolozsvár

Kivonat

A polietilén-tereftalát (PET) az egyik leggyakoribb felhasználású polimer, melynek jelenlegi használat utáni kezelése jelentős környezetszennyezési problémát okoz. Ennek megoldására napjainkban egyre több figyelmet fordítanak, a jelenleg alkalmazott módszerek azonban számos hátránnyal rendelkeznek: a termokémiai úton való PET-újrahasznosítás roncsolja a polimer számos mechanikai tulajdonságát, míg a kémiai úton való PET-lebontás toxikus melléktermékek képződéséhez vezet.[1] Az előzőekben felsorolt módszerek hátrányai miatt a közelmúltban a környezetbarát módszerek kifejlesztése előtérbe került, az enzimatis úton való PET lebontás feltérképezésére.

Egy biokatalízisen alapuló hatékony PET lebontási módszer kifejlesztésénél a tesztelt PETáz enzimek aktivitásának pontos mérése elengedhetetlen. Kísérleteink során alkalmaztuk az irodalomban eddig ismert PETáz enzim-aktivitás-mérési módszereket, továbbá célkitűzésünk új HPLC aktivitás-mérési módszer kidolgozása, ahol belső standard használatával kizárjuk a korábbi módszerekben jelentkező alacsony reprodukálhatósági fokot. Az általunk kidolgozott módszerrel vizsgáltuk a laboratóriumokban izolált egyik legismertebb PET lebontó biokatalizátor, az LCC [2] (leaf branch compost cutinase), rekombináns változatainak aktivitását.

Tartalomjegyzék

1.	Elméleti bevezető	4
2.	Célkitűzések	10
3.	Anyagok és módszerek.....	10
3.1.	Rekombináns plazmidot tartalmazó kompetens gazdasejtek előkészítése.....	10
3.2.	Kolónia PCR (cPCR)	11
3.3.	A rekombináns fehérje termelése és tisztítása	12
3.4.	Molekuláris klónozás	13
3.5.	LCC mutánsok létrehozása	14
3.6.	PET-lebontási reakció körülményei	15
3.7.	Enzimaktivitás értékelése UV-VIS spektroszkópiával	15
3.8.	Enzimaktivitás mérések HPLC elemzéssel	15
4.	Eredmények és kiértékelésük	16
4.1.	A transzformálások és fehérje tisztítások eredménye	16
4.2.	A klónozás eredménye	17
4.3.	LCC mutagenézisének eredménye	18
4.4.	Aktivitás mérés UV-VIS spektrofotométerrel	19
4.5.	Belső standardot tartalmazó kalibrációs görbék	20
4.5.	Enzimaktivitás mérés HPLC-vel belső standardot alkalmazva	25
5.	Következtetések	26
6.	Köszönetnyilvánítás	26
7.	Bibliográfia.....	27

1. Elméleti bevezető

A mai fogyasztótársadalom számos problémával rendelkezik, ezek közül a napjainkban az egyik legfontosabb a környezetszennyezés. Elsődleges környezetszennyezők a gyakori használatban levő műanyagok, melyeket főként csomagolásra használunk fel. Az egyik leggyakoribb a PET (polietilén-tereftalát) polimer, mely nagy népszerűségnek örvend, hiszen számos előnyös mechanikai tulajdonsággal rendelkezik. Magas a szakító- és ütésállósága, megfelelő merevséggel rendelkezik, jó a hőstabilitása, a kémiai ellenállása, illetve előállítása után nagy tisztaságú polimert kapunk.[3] Első szintézise 1929-ben a DuPont laboratóriumban történt, ipari mértékű gyártása az 1950-es évektől kezdődött el.[4]

Önmagában a PET nem egy környezetszennyező anyag, de mivel normál körülmények között több száz év szükséges a lebomlásához, ezért a kommunális hulladékok nagy százalékát teszi ki. A nagymértékű hulladék mennyiségét figyelembe véve rájöttek, hogy szükség van a PET hatékony lebontására, illetve újrahasznosítására. Az eddigiekben, a mechanikai, illetve kémiai feldolgozás mellett a PET hulladékot a leggyakrabban hulladéklerakókba gyűjtötték, mivel ez tűnt a legkönnyebben kivitelezhetőnek, azonban az óriási hulladéktermelés mellett magasabb hatékonyságú tárolási/újrahasznosítási módszerek kifejlesztése zajlik.[1]

A PET ipari újrahasznosítását többféleképpen lehet véghez vinni. Ezek közé tartozik az elsődleges újrafeldolgozás, még az üzemben belül, amikor is az újrahasznosítandó anyagunk még tiszta, szennyeződésektől mentes így a gyártáshoz való felhasználása már nagyon egyszerű. Egy másik mechanikai feldolgozási lehetőség esetében a szennyeződésmentes polimert granulálják hő segítségével. A mechanikai újrahasznosítás a következő szakaszból áll: válogatás, szennyeződések eltávolítása, őrlés, olvadékszűrés és a műanyag újraformázása. Az említett fizikai módszerek fő hátránya, hogy a termék tulajdonságai minden egyes következő ciklusban romlanak, az újrahasznosított polimer molekulatömegének csökkenése következtében, amit a víz és a savas szennyeződések jelenléte által elindított láncreakció okoz.[5]

A földhiányban szenvedő országok esetében a hulladéklerakók nem jelenthetnek hosszútávú megoldást, éppen ezért ezekben az országokban a műanyagégetést helyezik előnybe. Az égetés során felszabadult toxikus gázok (furánok és dioxánok) megtisztítása viszont kihívást jelent. A káros reakciók megelőzésére alkalmazott technikák közé tartozik az intenzív szárítás, a gáztalanító vákuummal történő újrafeldolgozás, a lánchosszabbító vegyületek használata.[1]

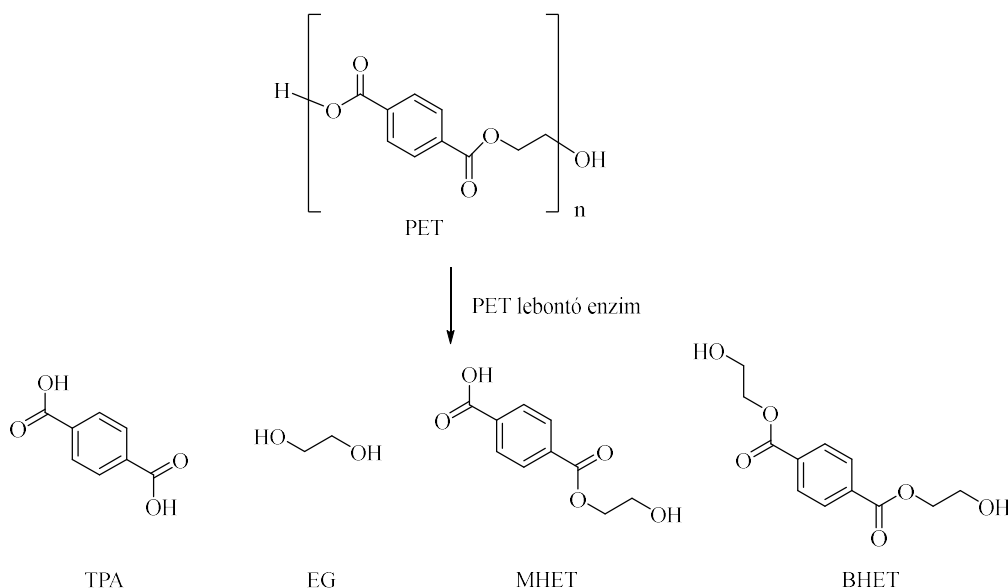
Az elterjedt mechanikai úton történő lebontása mellett a PET kémiai feldolgozása is használatos. A kémiai újrahasznosítás olyan fejlett technológiai eljárásokra utal, amelyek a műanyagokat kisebb molekulákká, általában folyadékokká vagy gázokká alakítják, amelyek

alkalmasak arra, hogy új petrokkémiai és műanyagipari alapanyagként használhatóak legyenek. Mivel a PET monomerjének alapeleme egy diészter, ezért a polimer viselkedése hasonló a különböző reakciókban, részt vehet hidrolízisben, alkoholízisben, glikolízisben. A reakcióktól függően a kémiai újrahasznosítás során különböző toxikus, környezetszennyező melléktermékek (dioxánok és furánok) jelentkeznek.[6]

Mivel egyre sürgetőbb a probléma, olyan biológiailag lebomló műanyagokat is kifejlesztettek, melyek additívjai elősegítik a polimer lebomlását/oxidációját. A napfénnel és levegővel való érintkezésük azonban gyors fragmentációhoz vezet, mely során nagy mennyiségű mikroműanyag keletkezik. Ezek biológiai lebomlása sok időt igényel, így ez sem jelent megoldást a nagyléptékű környezetszennyezéssel szemben.[7]

Amiatt, hogy a környezetünk veszélyeztetettsége egyre nőtt elkezdtek „zöldebb” utakat keresni a polimer lebontására. Maga a PET műanyag biológiai lebontása egy elég lassú folyamat, melyet könnyen befolyásol a hőmérséklet, pH, nedvességtartalom és az ultraibolya sugárzás. Az iparban próbálkoztak biokémiai vagy kemoenzimatikus módszerekkel, amikor is kémiai úton megbontják a PET szerkezetét, majd mikroorganizmusokat alkalmaznak a teljes lebontás érdekében. A PET biológiai lebomlása általában a polimerlánc rövidülését okozza, ami később csökkenti a polimer molekulatömegét. Ezt követően oligomerek, dimerek, vízben oldódó monomerek keletkeznek, amelyek átjuthatnak a mikrobiális sejtmembránon, és szénforrásként felhasználhatók. Befolyásoló tényezőnek számítanak: a polimer molekulatömege, hidrofób felülete, kristályossága, illetve az erős C-C kötések.[8]

A műanyag hulladék biológiai lebontása egy hosszútávon költségbarát és környezetbarát stratégia lenne. Az első PET lebontó enzimet 2005-ben izolálták a Gram-pozitív, aktinobaktérium *Thermobifida fusca*-ból, az addig feltételezett lipázok mellett ez mutatott valós potenciált a PET hidrolízisére.[9] Yoshida és munkatársai 2016-ban találtak egy *Ideonella sakaiensis* nevű baktériumtörzset, mely ígéretesnek bizonyult a PET biokatalitikus lebontásában.[10] Ezen baktérium rendelkezik két olyan enzimmal is, PETase illetve MHETase, melyek a PET lebontásában játszanak szerepet. Az IsMHETase az IsPETase-t követő második kulcsfontosságú enzim. Ez az IsPETase által elindított hidrolízis termékét, a mono-(2-hidroxi-etil) tereftalátot (MHET-et) bontja le tereftálsavra és etilén-glikolra (**1 ábra**).[11] Ezen enzimek mellett vizsgáltak különböző észterázokat is, melyek által sikerült a PET felületét hidrolizálni. Ugyanakkor vizsgálták a lipázok aktivitását is a polimer lebontása során, de ezen enzimek nem voltak versenyképesek az előzőekben említett biokatalizátorokhoz képest.[12]



1. ábra: A PET enzimatis lebonása során keletkezett reakciótermékek.

Annak köszönhetően, hogy mára már jól megfigyelhető a PET felülete, megállapították, hogy ezeket a biokatalizátorokat két csoportra oszthatjuk fel: PET-felületmódosító enzimekre és PET-hidrolázokra. Továbbá a kísérletek és feltételezések alapján úgy gondolják, hogy a PET lebontása során az egész sejtes katalízis lenne megfelelőbb, mivel így a reakció időtartama könnyen rövidíthető lenne, ugyanakkor elkerülhető a költséges enzim tisztítási lépés.[10]

Az enzimek makromolekulák, melyek a biokémiai reakciókban játszanak fontos szerepet. Ha megnézzük az enzimek háromdimenziós szerkezetét akkor azt látjuk, hogy ezek módfelett komplexek (bonyolultak), melyet a lineáris polipeptid lánc spontán feltekeredése képez. Fontos szerepük van a kémiában, mivel katalitikus tulajdonságaik sokkal szerteágzóbbak, mint a szintetikus katalizátoroké, megnyitnak olyan új reakció utakat, amelyeket az eddigiekben a szintetikus katalizátorok még nem tettek lehetővé. Ezen biokatalizátorok segítségével a legtöbb esetben magasabb konverzió érhető el enyhébb körülmények között, mintha szintetikus katalizátorokat alkalmaztak volna a reakciók során.[13]

A biokatalizátorok ipari felhasználásához elsősorban szükség van bizonyos tulajdonságaik fejlesztésére. A jelenlegi enzimatis PET lebontás hatásfoka túl alacsony, ahhoz, hogy az használható legyen az egyre inkább felhalmozódó pillepalackokból és a műszalas ruhákból származó hulladékok nagyléptékű lebontására. Megoldásként szolgálhat az enzim aktivitásának a növelése vagy a PET-polimer módosítása annak érdekében, hogy egy, az enzimatis hidrolízissal szemben kevésbé ellenálló anyagot kapjunk. Mindezek mellett, gondot jelent az enzimek alacsony hőstabilitása, illetve az MHET és BHET általi termék inhibíció.[14] A PET

lebontó enzimekkel végzett kísérletek során megfigyelték, hogy az enzim aktivitásának növelése mellett a PET hulladék/minta kémiai vagy fizikai előkezelése jelentősen megnövelheti a hidrolizálási reakció hatásfokát.[3] A biokatalizátorok segítségével történő PET lebontás hatékonyabbá tehető a polimer kristályossági fokának a csökkentésével is. A PET egy aromás poliészter és a lebontásánál megjelenő nehézségek egyik fő okozója a nem hidrolizálható kovalens kötések a monomerben, az etilén-glikol és a tereftálsav között (a tereftálsav biszubsztituált észtere – BHET) (1. ábra).

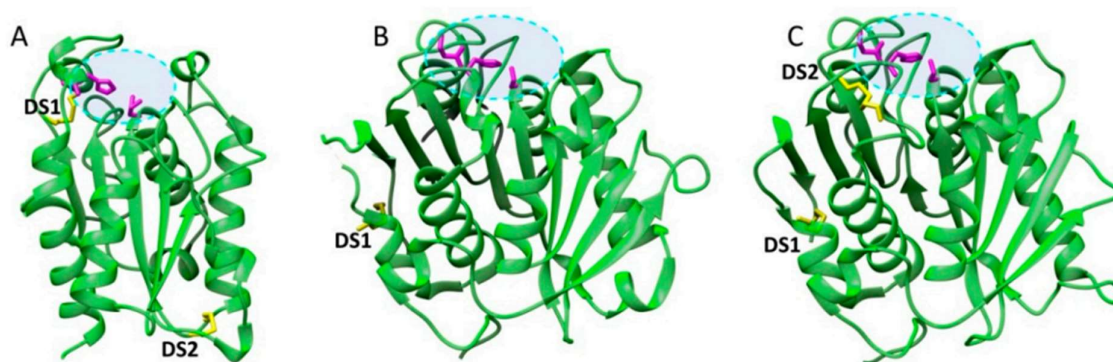
A PET lebontását katalizáló enzimek esetében a következő problémák vetődtek fel: alacsony hőstabilitás, alacsony aktivitás, oldhatósági nehézségek, illetve a katalizátor extrémebb körülmények (magas hőmérséklet, pH és sótartalom) között történő többszöri felhasználása során észlelt aktivitás veszteség. Ezek a problémák biomérnöki megoldásokat igényelnek, melyhez az enzimkatalizátorok módosításának eszközei közül a fehérjemérnökség segít be.

A kutinázok (E.C. 3.1.1.74) szintén a hidroláz enzimosztályba tartoznak, elsősorban a kutin vázát (egy hidroxil- és epoxi-zsírsavakból álló poliésztert) hidrolizálják, emellett hidrolizálják az észtereket és a triacilglicerineket, valamint katalizálják az észteresítést és az átészterezési reakciókat.[15] Ezen enzimek az α/β -hidrolázok szupercsaládjába tartozó szerin-észterázok, jellemzőik alapján hasonlóak a lipázokhoz és az észterázokhoz, aktív centrumukban egy katalitikus triád áll szerinből, hisztidinből és aszparaginsavból. A kutinázok által katalizált hidrolízis mechanizmusa két acilezési/deacilezési lépésben valósul meg, beleértve a hidrolizálandó észter karbonilcsoportja és a katalitikus triádban jelenlevő szerin közötti kovalens intermedier képződését.[16]

A kutinázok alcsaládjá jelenleg körülbelül 20 tagból áll, aminosavszekvenciájuk alapján csoportosítva. Ezeket egyszerű polipeptidek képezik, amelyek molekulatömege kisebb mint 40 kDa, harmadlagos szerkezetüket öt β -lánc és négy α -hélix alkotja. A lipázokkal ellentétben, melyek esetében az aktív központot hidrofób „sapka” fedi, a kutinázok katalitikus központja nem védett.[17] A növényi sejtfalat lebontó mikroorganizmusok különféle szénhidrátbontó, illetve lipolitikus/észterolitikus enzimeket is termelnek. Japánban a fákról levágott leveleket és ágakat időszakonként összegyűjtik, karbamiddal összekeverik, komposztálás céljából kevertetik és tárolják. A hőmérséklet 70 °C-ra emelkedik ebben a levélágkomposztban (leaf branch compost), majd nagyjából 1 év múlva a komposztálás befejeztével 50 °C-ra csökken. A kapott komposzt gazdag különféle növényi sejtfalat lebontó mikroorganizmusokban, ezért ígéretes forrása az új, kutináz aktivitással rendelkező enzimeket kódoló géneknek.[18] A kutinázok nyitott és sekély aktív hellyel rendelkeznek, és nincs „fedelük”, amely lehetővé teszi egy terjedelmes poliészter

lánc, például a PET polimer egy láncának befogadását és hozzáférhetővé teszi azt a katalitikus triád aktív szerinje számára. 2020-ban Tournier és munkatársai különböző kutinázokat vizsgáltak PET-lebontó képességük szempontjából, melyek közül igen hatékonyak bizonyultak a levélkomposztban fellelhető LCC kutináz (leaf branch compost cutinase).[15]

Az elmúlt pár évben a fő hangsúly az *Ideonella sakaiensis* PETase-on volt, mivel ennek az enzimnek volt a legnagyobb aktivitása szobahőmérsékleten, majd Tournier és munkatársai[2] elvégeztek bizonyos mutációkat az LCC-n, ezzel elérve egy sokkal nagyobb aktivitást és egy magasabb olvadáspontot az IsPETase-hoz képest. Ez amiatt lényeges, mivel a PET üvegesedési hőmérséklete nagyjából 70 °C (a kristályossága függvényében ez az érték növekedhet).[7] Efölött a hőmérséklet fölött a polimer kezd rugalmassá válni, elveszíti a merevségét, ezáltal hozzáférhetőbbé válik az enzimek számára.[19] Ebből kifolyólag lényeges, hogy a biokatalizátorunk termotabilitása magas legyen.

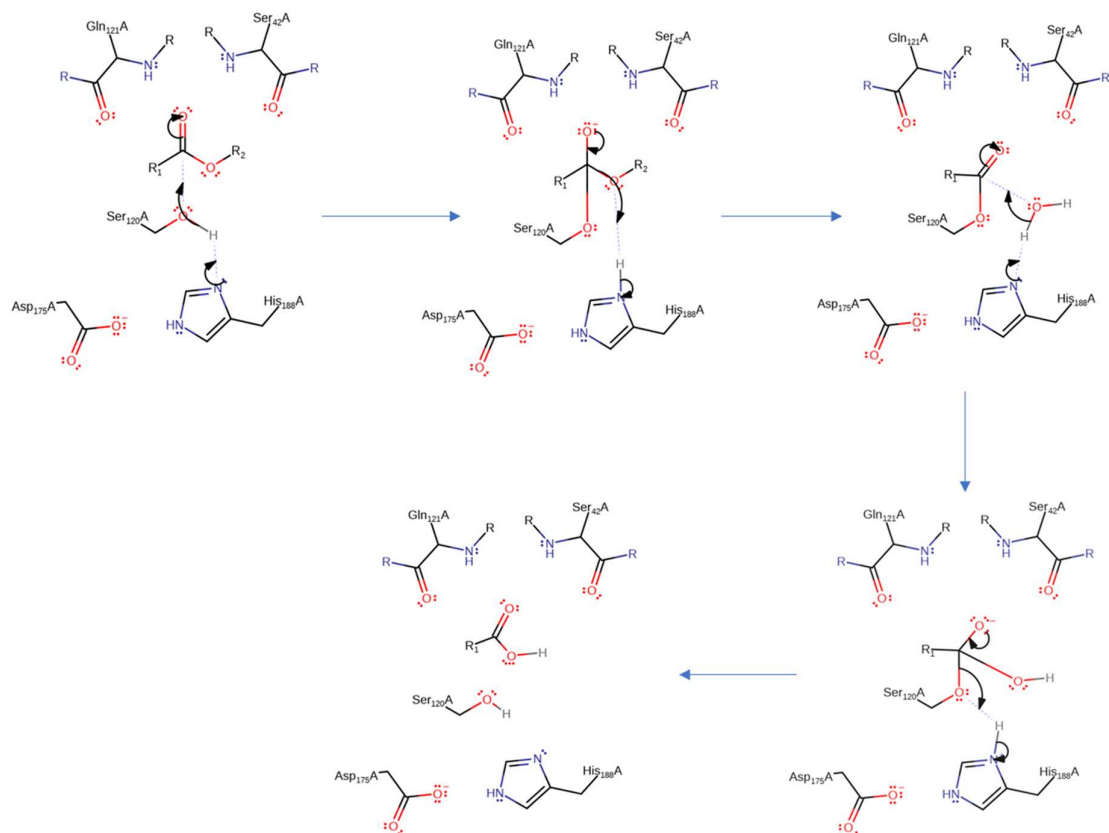


2. ábra: (A) *Fsp* cutinase, (B) *Thermobifida fusca* cutinase és (C) *Ideonella sakaiensis* PETase átfogó/teljes szerkezete. A katalitikus triádok lila színnel, a diszulfidkötések (DS) pedig sárga színnel vannak jelölve. A szubsztrátkötő hasadék szaggatott türkiz vonallal van bekarikázva.[16]

Ahogy az **2-es ábrán** is látszik, a kutinázok katalitikus triádja és az IsPETase katalitikus központjának térbeli elhelyezkedése nagyon hasonló. Az LCC esetében Ser165, Asp210 és His242 aminosavak alkotják a katalitikus triádot, míg az IsPETase esetében a Ser160, Asp206 és His237.[20] Mindkét enzim ezen aminosavakból álló triádon keresztül képes hidrolizálni a PET felületét.

Az LCC hidrolizálási mechanizmusa (**3. ábra**) a következő lépésekből áll: az általános bázisként működő His204 aktiválja a Ser136 hidroxilcsoportját a karbonil szénatom elleni nukleofil támadás érdekében. A katalitikus triád harmadik komponense – az Asp191 – a hisztidin bázikusságát növeli. A képződött oxianion intermediert a Gln137 és Ser58 amidcsoportjai stabilizálják. A második lépés során a tetraédes intermediér összeomlik és egy alkohol kilép. A harmadik lépésben a His204 aktiválja a vizet a nukleofil támadáshoz és egy másik oxianion

intermedier képződik. Az utolsó, negyedik lépésben, a tetraédes intermedier összeomlik és a Ser136 visszaalakul kezdeti állapotába.[21]



3. ábra: A kutinázok hatásmechanizmusa négy lépésben.

Összességében a PET-hidrolázoknak legalább két fontos tulajdonsággal kell rendelkezniük: hőstabilitással (>65 °C) és nagy kapacitású, nyitott aktív központtal, amely elegendő egynél több monomer egység, MHET, megkötéséhez. Ezeknek a követelményeknek megfelelő PET-hidrolázok eddig a hőstabil kutinázokra korlátozódtak.[7] Kutatásunk során Tournier és munkatársai[2] által kinyert a levélkomposztban fellelhető kutinázzal, az LCC-vel, dolgoztunk. Ez az enzim 28 kDa nagyságú, és katalitikus triádja megegyezik a kutinázokéval.

Ahogy az **1. ábrán** bemutatott reakcióból látható, a polimer hidrolízisével több terméket is kapunk, a tereftálsavat (TPA – terephthalic acid), etilén-glikolt (EG), monohidroxi-tereftalátot (MHET) és bisz-2-hidroxi-etil tereftalátot (BHET). Ezen reakciótermékek az enzim aktivitásától függően jelennek meg, kimutatásuk többféleképpen valósítható meg, például nagy teljesítményű folyadékkromatográfiás (angolul high pressure liquid chromatography - HPLC) módszerekkel, illetve UV-VIS abszorbancia mérésével.[22]

A PET lebontó enzimek aktivitásának meghatározása során nagy teljesítményű folyadékkromatográfia (HPLC) révén követték a kromatogrammon megjelenő abszorpciós csúcsok területének értékével számított teljes TPA tartalmat (azaz együttes TPA, MHET és BHET tartalmat).[2] A módszer hiányossága a következő: mivel az abszorpciós csúcsok abszolút értéke változhat a mintavétel/mintafeldolgozás során, ezért ugyanazon reakcióstádiumnak megfelelő minták analízise során a különböző termékek (TPA, MHET, BHET) jeleinek relatív integrálértéke állandó, azonban abszolútértékük (mely helytelenül van alkalmazva a minta összTPA tartalmának meghatározására) változó. Mindemellett, a szakirodalomban fellelhető egy másik, UV spektroszkópián alapuló aktivitás- módszer is. Ebben az esetben a különböző mértékben elnyelő bomlástermékeket, TPA, MHET, BHET, egy bizonyos hullámhosszon vizsgálják így azok ismeretlen mennyiségben járulnak hozzá az abszorbanciához, ezáltal módosítva a méréseket. A spektrofotometriás mérés esetében fontos megválasztani a megfelelő hullámhosszt, mivel, ha az nincs jól megválasztva akkor egyes bomlástermékek jobban elnyelhetnek, ezáltal még nagyobb hatást gyakorolva az abszorbancia értékére. Zhong-Johnson és munkatársai a TPA és az MHET reakció termékek esetében megállapították a moláris abszorpciós koeficienseket és ezek alapján egy átlaggal számoltak, ám kísérleteik alapján ez az átlagolás akár 1.3-szorosan alul vagy túlbecsülheti a reális abszorbancia értékeket.[22] A méréseink során azt tapasztaltuk, hogy a HPLC módszerrel mért aktivitás és az UV-VIS spektrofotométerrel mért aktivitás nincs összhangban, az értékek jelentős eltérést mutattak, ezért fontosnak találtuk ezen módszerek pontosságának továbbfejlesztését.

2. Célkitűzések

A Babeş-Bolyai Tudományegyetem, Enzimológia és Alkalmazott Biokatalízis Kutatóközpontjában végzett kutatásunk célja egy új aktivitás esszé (assay) kidolgozása, egy belső standardon alapuló HPLC módszerrel a PET-lebontó rekombináns enzimek aktivitásának mérésére. Erre azért van szükség mert az eddig használt, irodalomban megjelent módszerek nem adtak elég pontos eredményt, esetenként nem lehetett külön-külön vizsgálni vagy mennyiségileg meghatározni a különböző bomlástermékeket.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Rekombináns plazmidot tartalmazó kompetens gazdasejtek előkészítése

Az LCC enzim termelését vizsgáltuk többféle gazdasejtet is felhasználva, ennek érdekében a vad típusú LCC génjét kódoló plazmidot első lépésben transzformáltuk *E. coli* BL21 Gold

(DE3), Rosetta (DE3) pLysS és Rosetta-gami B (DE3) sejtekbe. Minden esetben steril fülke alatt dolgoztunk.

A Rosetta (DE3)pLysS és Rosetta-gami B(DE3) sejtek esetében hősokkal végeztük a transzformálást. Ez a módszer azon alapszik, hogy a kompetens sejtet és plazmidot tartalmazó szuszpenziót egyből, egy hirtelen melegítés segítségével sokkoljuk, emiatt a sejtfalak kitágulnak, így megnő a sejtünk térfogata. Mivel térfogatváltozás lép fel, emiatt megjelenik egy nyomáskülönbség és létrejön egy áramlás, mely segítségével a cél plazmidunk bekerül a gazdasejtbe.

A Rosetta-gami B (DE3) sejtek esetében, a 20 μL sejtállományra 2 μL rekombináns plazmidot szuszpendáltunk egy pipetta segítségével. Ezt követően 5 percig jégen hagytuk, majd következett maga a hősokk, mely során 30 másodpercig 42 $^{\circ}\text{C}$ -os vízbe helyeztük a 1.5 mL-es eppendorf csövet. Ezt követően visszakerült a cső további 2 percre a jégre, ezzel előidézve, hogy a sejtfal visszazáródjon. Ezután 80 μL LB tápoldatot pipettáztunk a transzformált sejtekre és inkubáltuk őket 37 $^{\circ}\text{C}$ -on, 250 rpm fordulatszámon, egy órán keresztül.

A Rosetta (DE3) pLysS sejtek esetében a hősokkal való transzformálás nagyon hasonló. 100 μL kiolvasztott gazdasejtre 3 μL rekombináns plazmidot szuszpendáltunk. Ezután jégre tettük a 1.5 mL-es eppendorf csövet 20 percre, majd 42 $^{\circ}\text{C}$ -nak tettük ki 45 másodpercig. Mikor ez lejárt újra 2 percre jégre került az eppendorf cső, majd 900 μL LB tápoldat hozzáadása után 37 $^{\circ}\text{C}$ -on, 250 rpm-en egy órán át inkubáltuk.

A BL21 Gold (DE3) sejteket elektroporálás révén transzformáltuk. 50 μL kiolvasztott gazdasejtre 3 μL rekombináns plazmidot adagoltunk, majd egy percre jégre tettük. Eközben egy elektroporáló küvettát is jégre tettünk. Az *E. coli* BL21 Gold (DE3) sejteket 1800 V-tal elektroporáltuk, majd újra jégre helyeztük a küvettát. Ezt követően átpipettázzuk egy eppendorf csőbe az elegyet és 250 μL SOC tápoldatot adagoltunk hozzá. Ezt a pipetta segítségével elegyítettük és akár a többi esetben is 37 $^{\circ}\text{C}$ -on, 250 rpm-n, egy órán át inkubáltuk.

Mindhárom esetben a transzformált baktériumokat 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ karbenicilint és 34 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kloramfenikolt tartalmazó agar lemezre eloszlattuk (szélesztettük), majd 37 $^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltuk éjszakán át. Kolónia-PCR segítségével meghatároztuk a plazmid-tartalmú, pozitív telepeket.

3.2. Kolónia PCR (cPCR)

Az előzőekben növesztett kolóniákban vizsgáltuk a rekombináns plazmid jelenlétét. Kiválasztottunk több, jól elkülöníthető kolóniát és ezeket használtuk DNS templákként a továbbiakban. Egy-egy kolóniát 20 μL kolónia-PCR keverékbe mostunk. A keveréket a Thermo

Scientific DreamTaq Green PCR Master Mix protokollja alapján készítettük el. A DreamTaq Green PCR Master Mix felhasználásra kész oldat, amely DreamTaq DNS polimerázt, optimalizált DreamTaq zöld puffert, MgCl₂-t és dNTP-t tartalmaz. Ezek mellett szükség volt még T7 promoter és T7 terminátor primerekre (**2. táblázat**). A felhasznált PCR reakció programja a következő volt:

1. táblázat: Alkalmazott cPCR protokoll. (A denaturációs, a kapcsolódási lépést és a kiterjesztési lépést 30x ismételtük meg.)

Kezdeti denaturáció		Denaturáció		Kapcsolódási lépés		Kiterjesztés		Végső kiterjesztés	
T (°C)	idő	T (°C)	idő	T (°C)	idő	T (°C)	idő	T (°C)	idő
95	3 perc	95	30 sec.	50	30 sec.	72	2 perc	72	15 perc

2. táblázat: A cPCR-hoz használt primerek.

Primer név	Szekvencia	T _m (°C)
T7 promoter	5'TAATACGACTCACTATAGGG3'	48
T7 terminator	5'GCTAGTTATTGCTCAGCGG 3'	54

A kapott PCR reakció terméket agaróz gélelektroforézis segítségével vizsgáltuk.

3.3. A rekombináns fehérje termelése és tisztítása

Meghatározva a plazmidot tartalmazó, pozitív telepeket, egyet felhasználtunk 50 mL, karbenicilint és kloramfenikolt tartalmazó, LB tápoldat beoltására. Ezt a táptalajt egy éjszakán át, 37 °C-on növesztettük, 200 rpm fordulatszámon. A kapott előtenyészetből 5 mL-t oltottunk át 500 mL LB (Luria-Bertani) tápoldatba. A tenyészeteket 37 °C-on inkubáltuk, mígnem a 600 nm-en mért abszorbancia értéke 0.6 – 0.8 érték közzé esett (OD₆₀₀ = 0.6 – 0.8), ekkor a sejt kultúrát 0.5 mM izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranoziddal (IPTG) indukáltuk, majd éjszakán át növesztettük 25 °C-on (Rosetta (DE3)pLysS és BL21 Gold(DE3) sejtek esetében), illetve 16 °C-on (Rosetta-gami B(DE3) sejtek esetében) és 180 rpm-n.

A terméket 4 °C-on és 6000 rpm-en centrifugáltuk, így a szuszpenzióból elválaszthatóvá váltak a sejtek. A felülúszót eltávolítottuk és a sejteket 60 mL lízis pufferben szuszpendáltuk (10 mM imidazol, 300 mM NaCl, 20 mM Tris.HCl, pH 8) kiegészítve lizozimmal, fenil-metil-szulfonil-fluoriddal (PMSF) és proteáz inhibitor tablettával. A sejtfeltárást ultrahangos szonda segítségével hajtottuk végre. Ezt követően a sejtízátumot 25 percig 10000 rpm-en 4 °C-on centrifugáltuk, hogy elválasszuk a felülúszót a sejtmaradványoktól.

A rekombináns fehérje tisztításhoz Ni-NTA affinitás kromatográfia módszerét alkalmaztuk. Az előzőekben centrifugált, szétesett sejt tömeg felülúszóját, amely tartalmazza a rekombináns LCC enzimet, átvezetjük kétszer is ezen az affinitás oszlopon egy perisztaltikus pompa segítségével. A cél-fehérje ebben a lépésben a His-tag címkéjén keresztül kötődik az oszlophoz. A nem specifikusan kötődött fehérjék lemosását 10 mM imidazolt tartalmazó puffer

oldattal végeztük el. Ezt követően 100 mM-os imidazol oldatot használunk, arra, hogy eluáljuk az oszlopról a cél-fehérjét. A mosási és eluálási lépéseket Bradford-reagens segítségével követtük.

Az eluált fehérje frakciót koncentráltuk majd Äkta-4 FPLC (Fast protein liquid chromatography – FPLC) segítségével sótalanítottuk (imidazol mentesítettük a rekombináns fehérjénket), használva a megfelelő HiTrap Desalting oszlopokat (GE Healthcare).

3.4. Molekuláris klónozás

Az eddig említett kísérletek során a kutatóintézetben lévő LCC enzim génje pET-28a(+) vektorban volt kódolva, mely egy C-terminális His-tag címkével rendelkező alacsony példányszámú (low-copy number) plazmid. A hatékonyabb fehérje termelés érdekében átklónoztuk az LCC enzimet kódoló gént egy N-terminális His-tag címkével rendelkező magas példányszámú (high-copy number) vektorba, a pET-15b plazmidba. Mivel eredetileg az enzimet kódoló gén pET-28a(+) C-terminális His-tag címkével rendelkező vektorban volt, szükséges volt a gén PCR reakció révén történő felszorzosítása, mely során az NdeI és BamHI emésztő enzimek hasító helyei mellett a Stop kodon is bekerült a génszerkezetbe. A használt primerek fel vannak tüntetve a **3-as táblázatban**, illetve a PCR reakció programja a **4. táblázatban** látható.

3. táblázat: Klónozáshoz használt primerek.

Primer név	Szekvencia	T _m (°C)
LCC Fw NdeI	5'CCATGGCATATGTCAAACCCGTATCAGC3'	55
LCC Rev BamHI Stop	5'GTCATACTTGGATCCTTACTGACAGTGGC3'	55

A használt DNS-polimeráz a Thermo Scientific által forgalmazott Phusion (Phusion High-Fidelity DNA Polymerase) volt. A PCR reakció specificitásának megnövelése céljából az elegyhez DMSO-t adagoltunk. Ezenkívül, a biztos siker érdekében a primerek kapcsolódási lépésénél több hőmérsékletet is kipróbáltunk, grádiens PCR készülék használatával. A reakció termékeket 1%-os agaróz gélen futattuk (**6.C ábra**).

4. táblázat: Alkalmazott PCR protokoll. (A denaturációs, a kapcsolódási lépést és a kiterjesztési lépést 30x ismétljük meg.)

Kezdeti denaturáció		Denaturáció		Kapcsolódási lépés		Kiterjesztés		Végso kiterjesztés	
T (°C)	idő	T (°C)	idő	T (°C)	idő	T (°C)	idő	T (°C)	idő
98	30 sec	98	10 sec.	60/61/65/66	30 sec	72	30 sec	72	10 perc

Ezután a vektort (pET-15b) és az inszert DNS-t is emésztettük NdeI és BamHI restriktációs enzimekkel. A vektor emésztéshez előkészített oldatban 12 µL 10x Tango Puffer, 3 µg hasítandó DNS, 2 µL BamHI, 2 µL NdeI enzimek, illetve steril víz volt 60 µL végtérfigatig, míg az inszert emésztéséhez előkészített oldatban 8 µL 10x Tango Puffer, 2 µg hasítandó DNS, 1.5 µL BamHI,

1.5 μL NdeI enzimek, illetve 40 μL -ig víz volt. A reakció elegyeket egy órára 37 °C-os vízfürdőre tettük. Ezt követően még adtunk hozzá 1 μL NdeI-et és 1 μL BamHI-et, a hatékonyabb hasítás érdekében és még egy óráig a vízfürdőn hagytuk.

A kapott termékeket 1%-os agaróz gélen futtattuk, majd UV lámpa és steril szike segítségével minél pontosabban kivágtuk a gélből a hasított vektornak, illetve inszert DNS-nek megfelelő sávokat. Ezt követően Qiagen QIAquick Gel Extraction Kit-et használva kivontuk a gélből a DNS-t, majd Zymo Research DNA Clean & Concentrator Kit-et használva koncentráltuk a DNS minták oldatait. T4 DNS ligáz segítségével összekapcsoltuk az LCC enzim génjét a linearizált pET-15b plazmiddal. A ligáláshoz szükség volt 20 μL tisztított DNS-re (tartalmazta a vektort és az inszertet is), 2 μL 10x T4 DNS Ligáz Puffer-re és 1 μL T4 DNS ligáz-ra. Az így előkészített ligálást 16 °C-on inkubáltuk 45 percig, ezt követően pedig 65 °C-on 10 percig való inkubálással inaktívtuk az enzimet. A ligálás terméket transzformáltuk kompetens *E. coli* XL1-Blue, plazmid tároló sejtekbe, majd az agarlemzen növekedett rekombináns-baktérium kolóniákat DNS-szintézis templátként használva polimeráz láncreakció (PCR) révén ellenőriztük a rekombináns plazmid jelenlétét. A pozitív kolóniák egyikéből éjszakai sejt kultúrát növesztettünk, amiből a következő napon kivontuk a plazmid DNS-t.

3.5. LCC mutánsok létrehozása

Tournier és munkatársai által publikált cikkben[2] arra mutattak rá, hogy bizonyos irányított pont-mutációkat elvégezve a vad-típusú LCC enzim szekvenciájában, jelentősen növelhető annak aktivitása és az olvadás pontja is, ezek alapján célunk volt ezen 4 mutáns variáns (F243I/D238C/S283C/Y127G; F243I/D238C/S283C/N246M; F243W/D238C/S283C/Y127G; F243W/D238C/S283C/N246M) előállítás, felhasználva a vad-típusú LCC génjét templát DNS-ként.

5. táblázat: A mutánsok létrehozásához használt primerek.

Megaprimer név	Szekvencia	T _m (°C)
D238C/F243I FP	5'GTATGTGGAAGTGTGAACGCCAGCCATATTGCGC3'	60
D238C/F243W FP	5'GAAGTGTGTAACGCCAGCCATTGGGCGCCGAATAG3'	56
S283C FP	5'CAATGTTAATGATCCGGCGCTGTGCGATTTTCGTAC3'	64
Y127G FP	5'GTTTTGATGGTCCGGATTTCGCGCGCGAG3'	60
N246M/FP	5'GCCGATGAGCAATAACGCGGCGATTAGCGTG3'	62
LCC silent RP	5'CGCGTCCCATTTCGCAATCCGGATATAGTTCCTC3'	72

A felsorolt mutációkat a megaprimer módszer segítségével vittük be az LCC génjébe, majd Sanger-szekvenálás (Biomi Kft., Gödöllő) révén igazoltuk ezen mutációk jelenlétét. A több mutációt tartalmazó variánsok esetében a mutációkat sorban vittük be. A mutációs PCR reakciókhoz szükség volt a következőkre: 10 μL 5x Phusion Buffer, 35 μL ddH₂O, 1 μL dNTP (10 μM), 1-1 μL primer (0.1 μM), ~100 μg DNS és a használt DNS-polimeráz a Thermo

Scientific oldaláról rendelt Phusion (Phusion High-Fidelity DNA Polymerase) volt. Az alkalmazott protokolt a **6-os táblázat** tartalmazza.

6. táblázat: *Alkalmazott PCR protokoll*

PCR reakciószakasz	Hőmérséklet (°C)	Idő	Ciklus szám
Kezdeti denaturáció	98	30 sec	1x
Denaturáció	98	10 sec	5x
Kapcsolódási lépés	70	30 sec	
A megaprimer kiterjesztése	72	15 sec	
Denaturáció	98	30 sec	25x
A megaprimer kapcsolódási lépése	98	30 sec	
A teljes plazmid kiterjesztése	72	3.5 perc	
Végző kiterjesztés	72	10 perc	1x

3.6. PET-lebontási reakció körülményei

A PET hidrolíziséhez eppendorf csövekbe adagoltunk 7 mg PET filmet és 75 µg LCC enzimet tartalmazó foszfát puffert (100 mM kálium-foszfát-pufferoldat, pH 8). A pontos aktivitás mérés érdekében előkészítettünk egy referencia mintát is, amelyben csak a PET film és a foszfát puffer volt. Ezeket a csöveket megjelöltük és 65 °C-on, 500 rpm-n, 20 órán át inkubáltuk. A reakciótermékből az inkubálás után mintát vettünk. UV spektroszkópiás mérés esetében 200 µL mintát előkészítés nélkül, direkt tudtunk mérni. HPLC-n való mérés esetében a minták előkészítése szükséges lépést jelent. Itt a mintával azonos mennyiségű acetonnitrilt adtunk a reakció elegyhez, illetve 2.11 mM-s végkoncentrációig koffeint adtunk hozzá. Az elegyet vortexeltük, majd centrifugáltuk azt (17000x g 3 min), ezt követte a felülúszó savasítása sósav hozzáadásával (22% HCl), majd egy 0.2 µm-es membránon keresztül történő leszűrés.

3.7. Enzimaktivitás értékelése UV-VIS spektroszkópiával

Mindhárom PET bomlástermék (TPA, MHET, BHET) UV abszorbancia spektrumát 0.1 mM kálium-foszfát pufferes (pH 8) oldatukból határoztuk meg. A felvett spektrum alapján (**9. ábra**) a 235 nm-es hullámhosszt választottuk ki az UV-aktivitás mérésekhez, mivel ez volt az a hullámhossz, amelyen a három vegyület abszorbanciájának nagyságrendje a legközelebbi értéket mutatta. Ezek után 235 nm-en külön-külön meghatároztuk a moláris abszorpciós együtthatókat minden termékre, a kálium-foszfát pufferben (pH 8). Ezen moláris abszorpciós együtthatók átlagát felhasználva meghatározhatóvá vált a PET hidrolíziséből származó teljes TPA tartalom.

3.8. Enzimaktivitás mérések HPLC elemzéssel

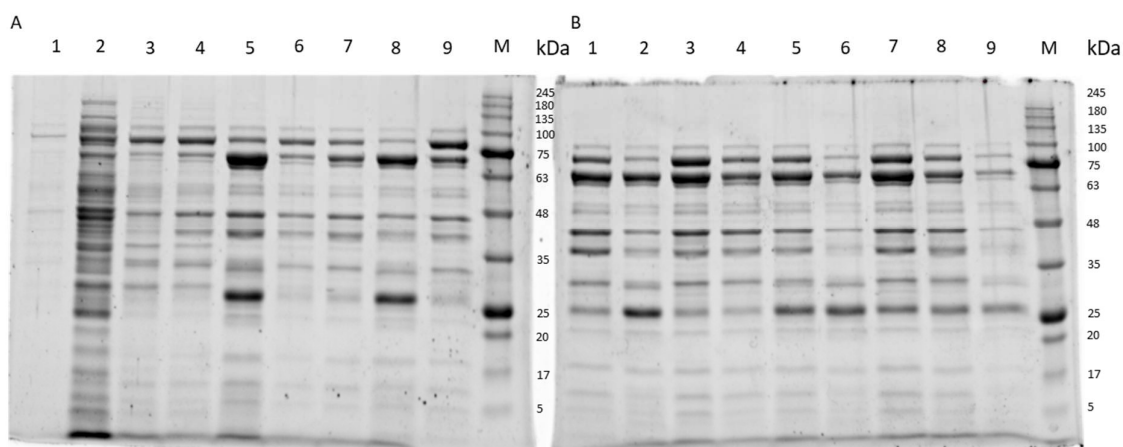
Az aktivitások HPLC-n való mérésére egy Agilent 1200 HPLC berendezést használtunk, mely DAAD detektorral rendelkezik. A PET biokatalitikus bontása után vett mintákat egy Phenomenex Luna C8 (2) oszlopra (150x4.6 mm; 5 µm) injektáltuk, 1.0 mL/min áramlási sebességgel 20 °C-on. Lineáris gradiens elúciót alkalmaztunk, a mozgó fázis (A) 0.1%-os hangyasav oldatból és (B) acetonnitrilből állt, változó összetétellel (a (B) értéke váltakozott 15%

-tól 27.5%-ig, 10 perces elúciós idő alatt), a termék elúcióját 240 nm-en figyeltük meg. Minden mérést/kísérletet háromszor ismételtünk meg. A reakcióminták TPA, MHET és BHET (a teljes TPA) tartalmát, és ezzel együtt az enzimaktivitást kalibrációs görbék alapján határoztuk meg, a TPA és BHET (Sigma-Aldrich) eredeti standardjának és a helyben szintetizált MHET-nek a felhasználásával.

4. Eredmények és kiértékelésük

4.1. A transzformálások és fehérje tisztítások eredménye

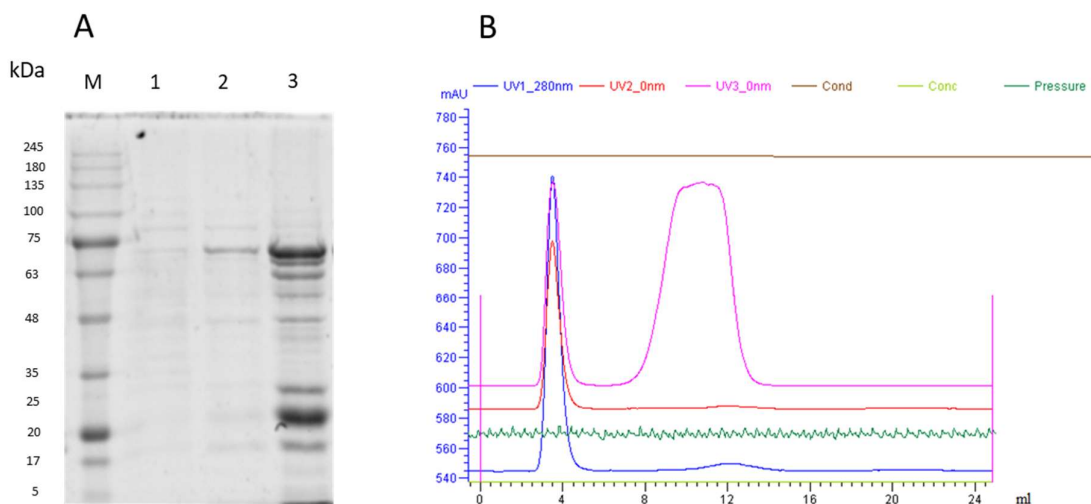
A transzformálásokat elvégezve *E. coli* BL21 Gold (DE3), Rosetta (DE3) pLysS és Rosetta-gami B (DE3) esetében azt láttuk, hogy az LCC génjét kódoló pET-28a(+) plazmid expresszálása *E. coli* BL21 Gold (DE3)-ban volt a legmegfelelőbb. A Rosetta-gami B sejtek nem kompatibilisek a pET-28a(+) vektorral (ugyanazon antibiotikum-rezisztencia génnel rendelkeznek), illetve a Rosetta (DE3)pLysS sejtek esetében kevesebb pozitív, rekombináns plazmidot tartalmazó telepet találtunk transzformálás után, mint a BL21 Gold sejtek esetében. A **4-es ábrán** feltüntetett gélen látható, hogy a fehérjénk tisztításához különböző imidazol koncentrációjú mosásokot teszteltünk (10 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM és 80 mM imidazolt tartalmazó oldatok) a Ni-NTA affinitás kromatográfiás lépés során. Ezekben az esetekben is a standard fehérjetisztítás lépéseit követtük, a különbséget a mosáshoz használt imidazol koncentrációja jelentette. Ahogy az ábrán is látható, ahogy növekedett az imidazol koncentráció 30 mM-nál a fehérjénk már elkezdett eluálódni a mosási frakcióban, ebből kifolyólag a 10 mM imidazol koncentrációjú mosó oldatot használata mellett döntöttünk a továbbiakban (annak ellenére, hogy a 30 mM-os imidazollal való mosás során tisztább elválást láthattunk).



4. ábra: Fehérje tisztítás optimalizálása; (A) 1. Harmadik mosás 10 mM imidazol, 2. Első mosás 10 mM imidazol, 3. Első mosás 30 mM imidazol, 4. Második mosás 30 mM imidazol, 5. elúció 150 mM

imidazol (30 mM-os mosás után), 6. Első mosás 40 mM imidazol, 7. Második mosás 40 mM imidazol, 8. elúció 150 mM imidazol (40 mM-os mosás után), 9. Első mosás 50 mM imidazol, 10. Blue Elf protein marker; (B) 1. Második mosás 50 mM imidazol, 2. elúció 150 mM imidazol (50 mM-os mosás után), 3. Első mosás 60 mM imidazol, 4. Második mosás 60 mM imidazol, 5. elúció 150 mM imidazol (60 mM-os mosás után), 6. Első mosás 80 mM imidazol 7. Második mosás 80 mM imidazol, 8. Második mosás 80 mM imidazol, 9. elúció 150 mM imidazol (80 mM-os mosás után), 10. Blue Elf protein marker.

A fehérjénket megisztítottuk a már optimalizált tisztítási módszert alkalmazva és ahogy az **5.A ábrán** látható, a 3-as minta esetében, a 100 mM-os elúciónál, nagyjából 30 kDa alatt megjelenik a fehérjénk jele, tehát a tisztítási folyamat megfelelő (az LCC enzim molekulatömege ~ 28 kDa).

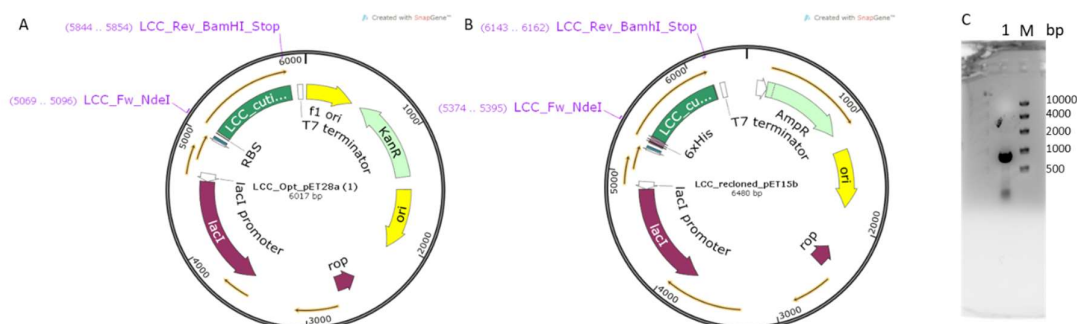


5. ábra: (A) SDS gélkép a fehérje tisztításról (M. Commasie Blue marker, 1. Első imidazolos mosás, 2. Második imidazolos mosás, 3. Eluált fehérje frakció) (B) Az LCC sóalanítása (desalting) során készített FPLC kromatogram.

Ahogy a megtisztított fehérjénk sóalanítása (desalting) során készített kromatogramon (**5.B ábra**) is látható az elsőnek jelentkező csúcs, a fehérje jele, szépen elválk az imidazolétól.

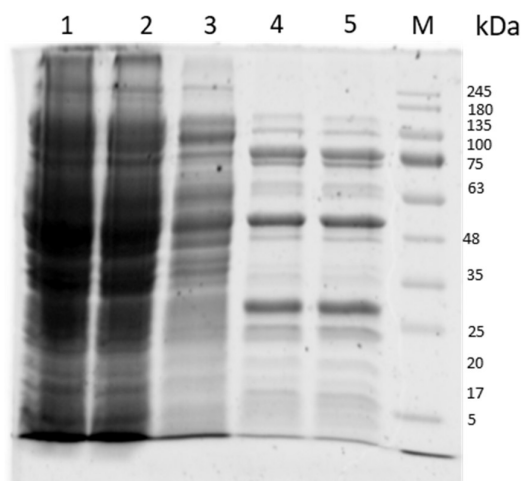
4.2. A klónozás eredménye

Az eddig említett kísérletek során a kutatóintézetben lévő LCC enzim génje pET-28a(+) (**6.A ábra**) vektorban volt kódolva, mely egy C-terminális His-tag címkével rendelkező alacsony példányszámú plazmid. Ezen plazmid nem kompatibilis az *E. coli* Rosetta-gami B típusú gazdasejtekkel, melyek fokozzák az eukarióta fehérjék expresszióját és a célfehérje diszulfid híd kötéseinek kialakulását. A hatékonyabb fehérje termelés érdekében átklónoztuk az LCC enzimet kódoló gént egy N-terminális His-tag címkével rendelkező magas példányszámú (high-copy number) vektorba, a pET-15b plazmidba (**6.B ábra**).



6. ábra: (A) LCC-pET-28a(+) plazmid géntérképe, (B) LCC-pET-15b plazmid géntérképe, (C) Polimeráz láncreakció segítségével felsokszorozított LCC gén (1. az amplifikált LCC gén (~800 bp), M- Fast Ruler DNS marker)-az átklózás sikerességét mutatta az LCC enzim génjének jelenléte PCR amplifikáció során.

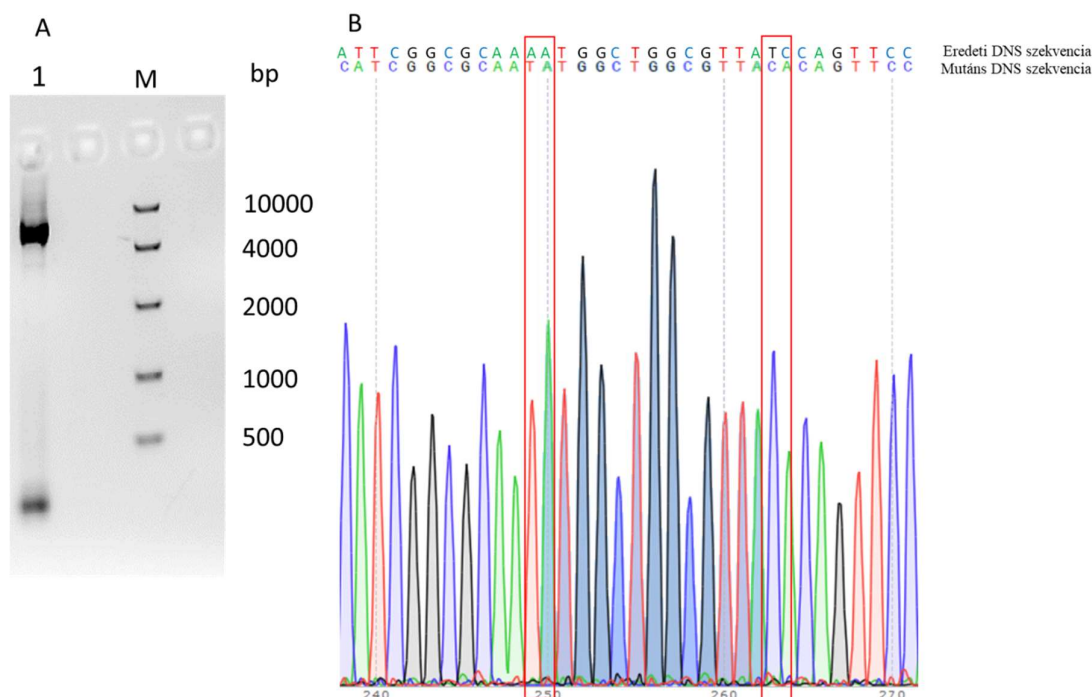
A nyert rekombináns LCC-pET-15b plazmidot Rosetta-gami B sejtekbe transzformáltuk, majd elvégeztük a fehérje expresszió és tisztítás lépéseit. A **7-es ábrán** látható a megtisztított fehérjénk, melynek tisztasági foka alacsonyabb, mint az eddigiekben BL21 Gold (DE3) sejtekből izolált LCC-é. Továbbiakban tervezzük az enzim génjének átklózását egy C-terminális His-tag címkével rendelkező, de magas példányszámú plazmidba (pET-21a).



7. ábra: LCC-pET-15b plazmid expresszálása *E. coli* Rosetta-gami B gazdasejtet használva. (1. Lizátum, 2. Az affinitás oszlopon áthaladó felülúszó (flow-through), 3. Mosási frakció (10 mM imidazol), 4. Eluált frakció (100 mM imidazol), 5. Kisózott és bekonzentrált fehérje, M – Blue Elf protein Marker)

4.3. LCC mutagenézisének eredménye

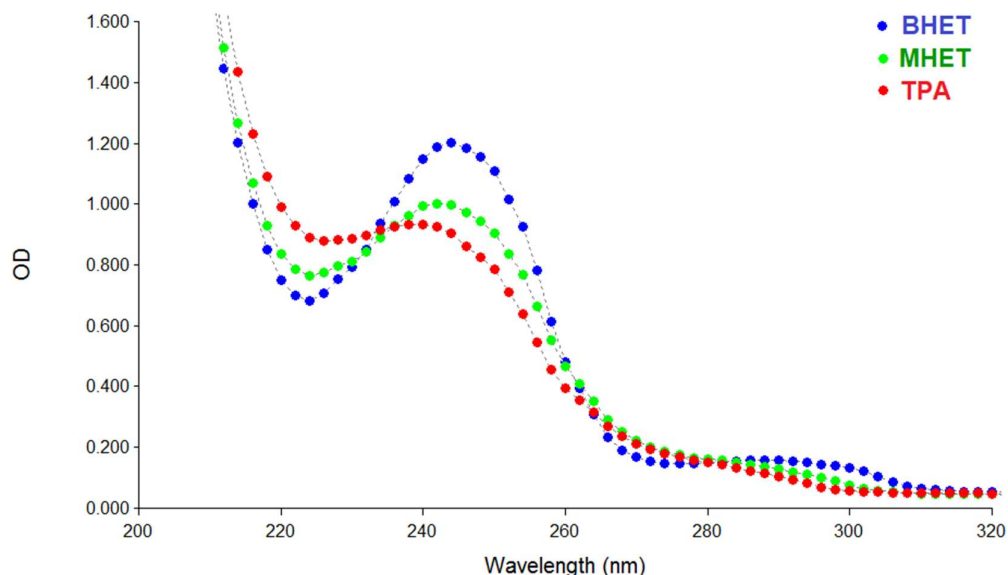
A megaprimer módszerrel létrehozott mutációk jelenlétét szekvenálás révén igazoltuk (**8. ábra**). A mutáns enzimek izolálását a továbbiakban optimalizált tisztítási módszerrel fogjuk elvégezni, majd ezt követően vizsgáljuk az aktivitásukat.



8. ábra: (A) Mutációs PCR reakció termék 1%-os agaróz gélen (1-LCC D238C/F243W/ S283C mutáns (a mutáns gént tartalmazó plazmid ~6000 bp), M-Fast Ruler DNS marker), (B) A mutáció utáni szekvenálás eredménye a D238C/F243I mutáns esetében.

4.4. Aktivitás mérés UV-VIS spektrofotométerrel

Az enzim aktivitását először UV spektrofotométer segítségével mértük. Első lépésben felvettük a bomlástermékeink (TPA, MHET és BHET) abszorpciós spektrumát, majd az irodalomban használt módszerhez[22] hasonlóan kalibrációs görbét készítettünk és a kapott moláris abszorptivitás érték segítségével számoltuk a továbbiakban az aktivitást. Míg az irodalomban közölt módszerek 240, illetve 260 nm hullámhosszakat használtak ezen meghatározásra, mi 235 nm-et választottunk ki mérési hullámhossznak, mivel a felvett spektrum alapján (9. ábra) ezen a hullámhosszon nagyjából ugyanolyan mértékben nyel el mind a három bomlástermék.



9. ábra: A TPA, MHET és BHET abszorpciós spektruma.

A PET-lebontási reakciók enzimaktivitási mérései során azt tapasztaltuk, hogy a kapott aktivitásértékek közötti eltérés (UV-VIS spektrofotométeres módszer és a HPLC-vel való vizsgálat) jelentős volt. Az optimalizált spektrofotométeres módszer még mindig nem a leghatékonyabb, hiszen nem vizsgálhatóak külön-külön a bomlástermékek, emiatt fektettük a továbbiakban a hangsúlyt a HPLC-vel való aktivitás mérés optimalizálására.

4.5 Belső standardot tartalmazó kalibrációs görbék

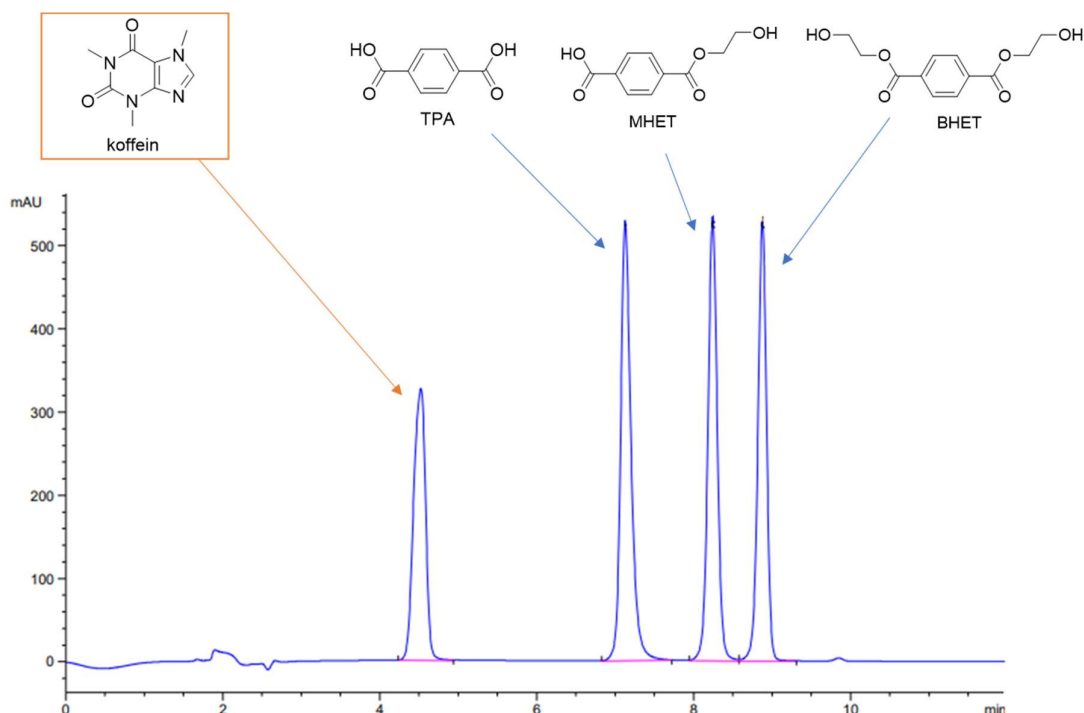
A belső standarddal való mérés lényege, hogy a standardunk mindig állandó koncentrációban van jelen, míg a mellette levő termékek koncentrációja változik. Ugyanakkor fontos megjegyezni azt is, hogy a belső standardunk jele nem tevődik rá egyik reakciótermék jelére sem. Méréseink során belső standardnak a koffeint választottuk. Először minden a PET-lebontási reakcióban jelentkező termékünkre külön-külön kalibrációs görbét készítettünk. Előzőleg a HPLC-vel való mérési módszert három termék elválasztására optimalizáltuk, majd a belső standardot beiktatva így már négy komponensre (**10. ábra**). A kalibrációs standard elegyek elkészítésekor szem előtt tartottuk, hogy a jeleink intenzitása nagyjából megegyező legyen minden esetben.

A PET enzimatis lebontása során vett mintákkal is hasonlóan jártunk el, ott is állandó koncentrációban jelenik meg a mintához reakcióvétel után hozzáadott standardunk, így a kalibrációs görbéknek köszönhetően meghatározható a TPA, MHET, BHET, illetve össz-TPA tartalom, ezekből pedig az LCC enzim aktivitása a PET-lebontási reakció során.

A kalibrációs görbék felvétele során előkészítettünk különböző, ismert koncentrációjú oldatokat, melyeket HPLC-vel vizsgáltunk. A belső standardos módszerhez a minták előkészítése, ugyanúgy zajlott akár a reakcióból vett minták előkészítése. Minden mérés sorozatot háromszor ismételtünk meg, ezáltal vizsgálva a módszer pontosságát és reprodukibilitását.

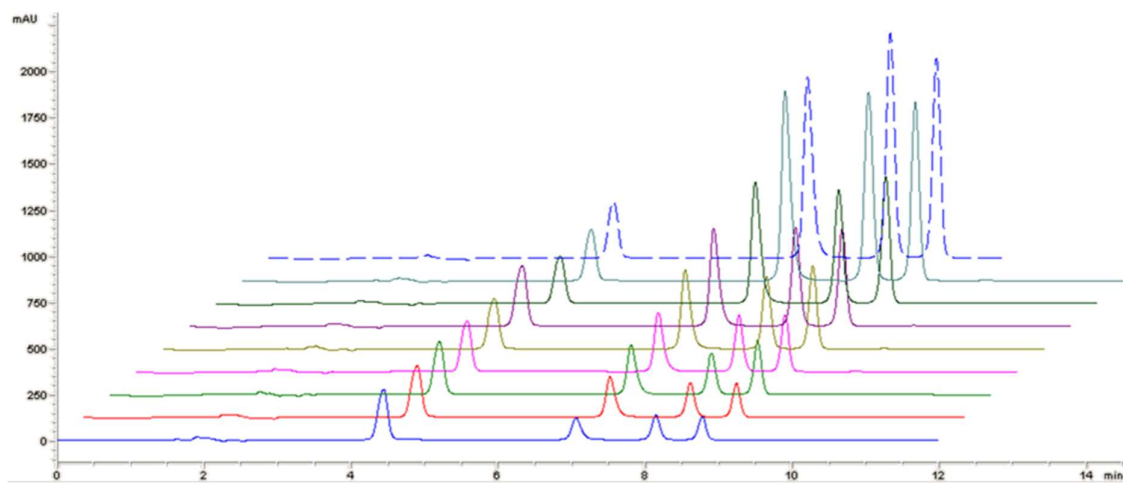
Minden mérésre kaptunk egy kromatogramot, mely esetében kiértékeljük a területeket, majd a reakció termékek és a koffein arányait ábrázolva az adott vegyület koncentrációjának függvényében megkaptuk a kalibrációs görbéket. A görbék elkészítéséhez független változónk a mért termék végső (mintabeli) koncentrációja (mM-ban). Ahhoz, hogy megkapjunk a függő változónkat egy arányt kell felállítani a belső standard (koffein) területe és a termék (TPA, BHET vagy MHET) területe között. A reakciókból vett minták esetében tehát, a kalibrációs görbe segítségével kiszámítható TPA, MHET, BHET és össz-TPA tartalom, mely nem függ a megfelelő bomlás termék területének abszolút értékétől, mivel a kalibrációs görbe felvételénél a bomlás termék és a koffein területének aránya van ábrázolva a megfelelő bomlás termék koncentrációjának függvényében.

Mivel az általunk mért enzimatis reakcióból vett minták jelintezítése legtöbbször az első kalibrálás egyik szélső tartományába esett, valamint észrevehető volt kis koncentrációk esetén a kalibrációs görbe meredekségének változása, szükséges volt tehát külön kalibrációs görbe készítésére a kisebb koncentrációk esetében, elkerülve a kalibrálási görbék extrapolációjából származandó pontatlanságokat.



10. ábra: A belső standard (narancssárga) és a PET lehetséges bomlástermékeinek elválasztása. (A jelek sorrendje: 4 percnél a koffein, 7.4 percnél a TPA, 8.25 percnél az MHET és 8.7 percnél a BHET.)

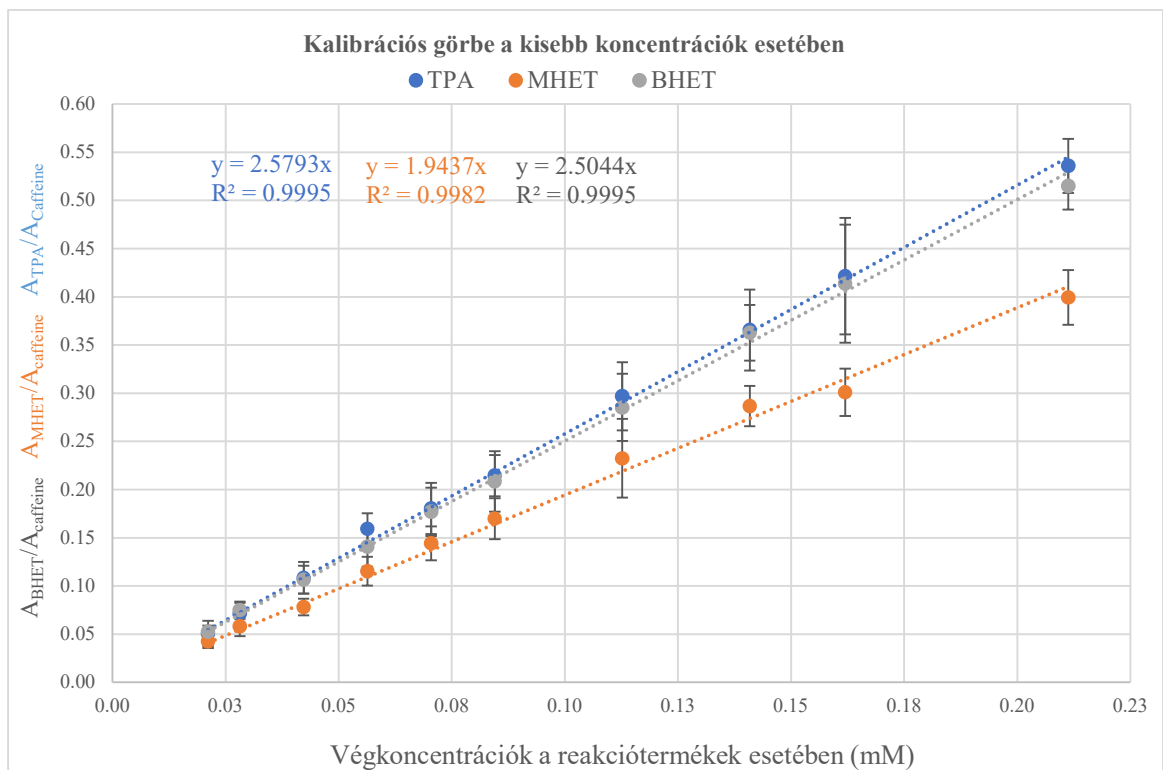
Hasonlóan külön-külön mindegyik reakció termékre elkészített pontos kalibrációs görbe mellett egy közös kalibrációt is készítettünk (**11. ábra**). A vegyes minták esetében is méretarányban tartottuk a különböző koncentrációkat.



11. ábra: A vegyes oldatok esetében a megjelenő frakciók jele (a koncentráció növekvő sorrendjében).

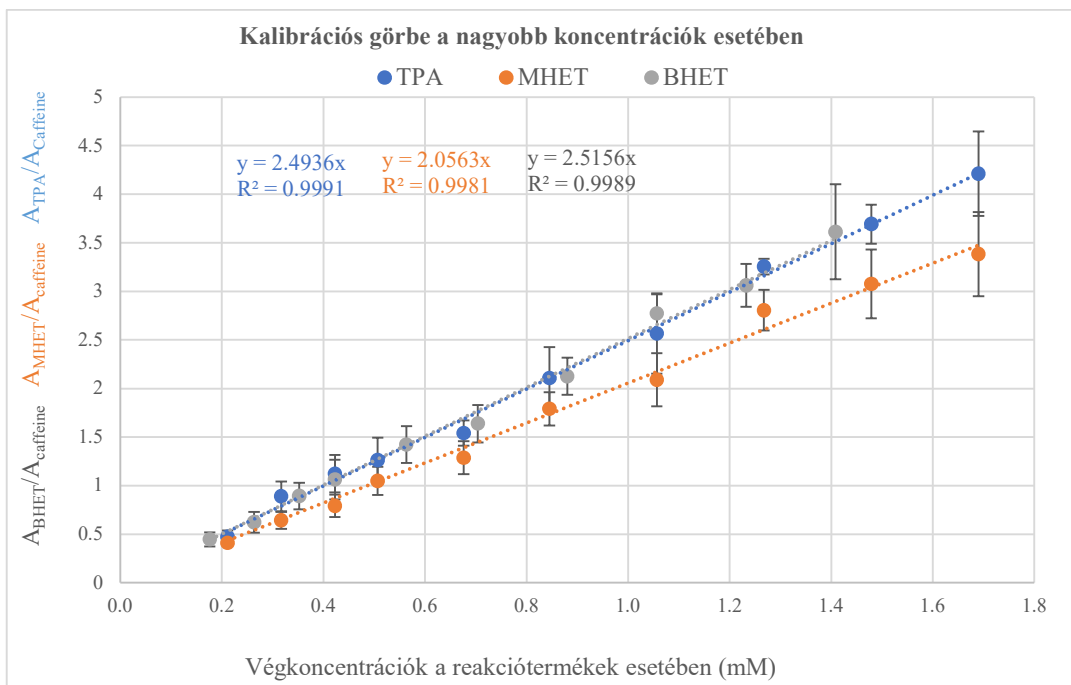
Az elkészített kalibrációs görbék a különböző bomlástermékek esetében az alábbi diagramokon figyelhetők meg.

A vegyes termék elegy kisebb koncentrációk esetében:



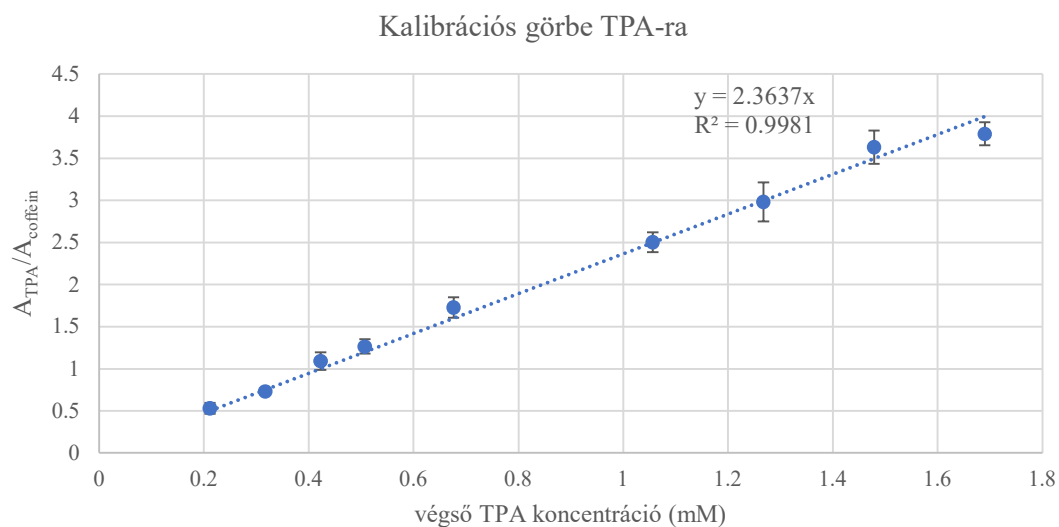
12. ábra: Kalibrációs görbe az enzimatisz hidrolízis során keletkezett termékekre kisebb koncentrációk esetében.

A vegyes termék elegy nagyobb koncentrációk esetében:



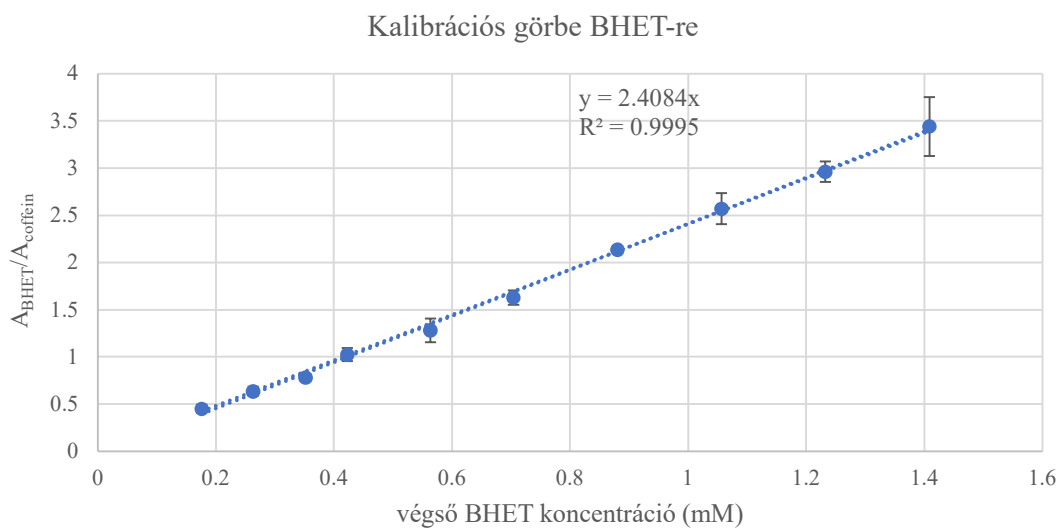
13. ábra: Kalibrációs görbe az enzimatisz hidrolízis során keletkezett termékekre nagyobb koncentrációk esetében.

A TPA esetében:



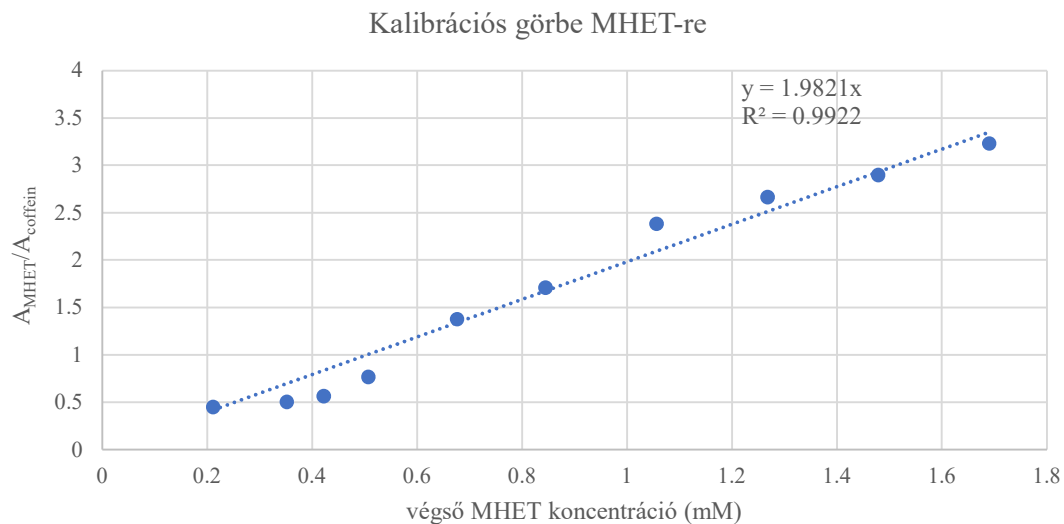
14. ábra: Belső standarddal mért kalibrációs görbe a TPA esetében.

A BHET esetében:



15. ábra: Belső standarddal mért kalibrációs görbe a BHET esetében.

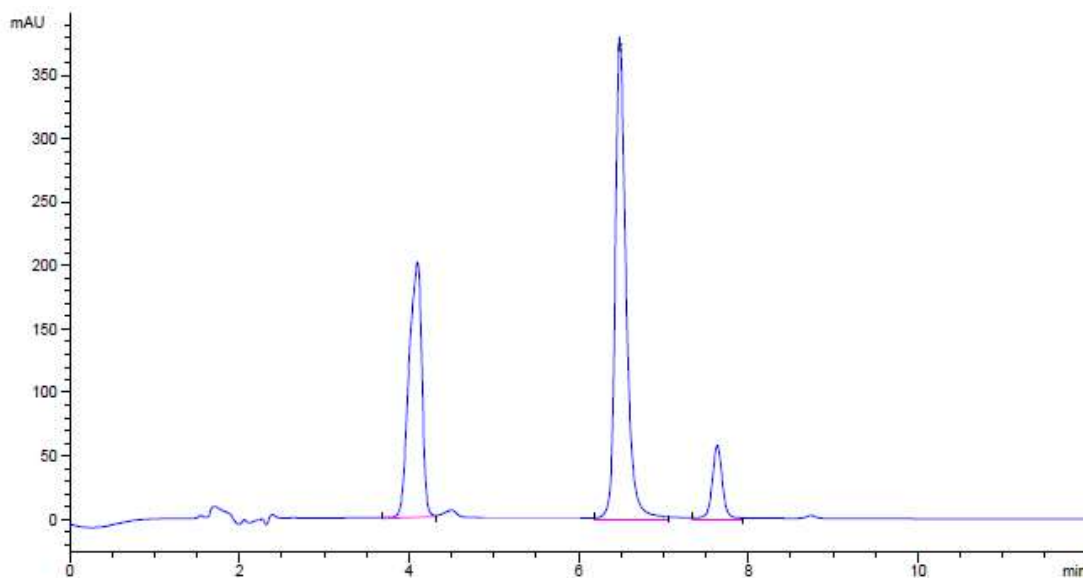
Az MHET esetében:



16. ábra: Belső standarddal mért kalibrációs görbe az MHET esetében.

4.5. Enzimaktivitás mérés HPLC-vel belső standardot alkalmazva

A kidolgozott módszer és a kapott kalibrációs görbék segítségével vizsgáltuk a reakciókban résztvevő enzimünk aktivitását (**12-es ábra**). Az LCC PET-hidrolizáló aktivitása 65 °C-on 0.015 mg TPA/mg enzim/1 h reakció idő alatt a HPLC elemzés alapján, míg UV spektroszkópiával való elemzésnél ez az aktivitás érték 0.0135 mg TPA/mg enzim/h volt.



17. ábra: A PET film LCC által katalizált bontásakor keletkezett reakciótermékek vizsgálata belső standard hozzáadásával. (A reakció során 7 mg PET filmet bontottunk 75 µg enzim segítségével 700 µL kálium-foszfát pufferben (pH 8), 65 °C-on 20 órán át.)

5. Következtetések

Kísérleteink során sikeresen optimalizáltuk a rekombináns LCC enzim tisztítási folyamatának bizonyos lépéseit, emellett vizsgáltuk a lehetséges expressziós rendszereket a hatékony fehérje termelés érdekében (C- és N-terminális His-tag címkével rendelkező vektorokba való klónozás révén, illetve többfajta gazdasejtet alkalmazva). A továbbiakban tervezzük a bevált BL21 Gold (DE3) gazdasejtet alkalmazva más N-terminális His-tag címkével rendelkező expressziós vektorok kipróbálását.

A kapott rekombináns enzimünk aktivitását sikeresen mértük UV-VIS spektroszkópiás módszerrel az általunk meghatározott megfelelő hullámhosszon és az elkészített kalibrációs görbék alapján. Emellett kifejlesztettünk egy nagy precizitással rendelkező, belső standard használatán alapuló HPLC módszert, felvettük mindegyik bomlás termékre, valamint azok elegyére a kalibrációs görbéket, majd sikeresen vizsgáltuk az LCC enzim aktivitását a kapott esszével.

Az irodalom alapján mutációkat vittünk be a vad típusú LCC enzim génszerkezetébe annak érdekében, hogy növeljük a biokatalizátor hatékonyságát. A továbbiakban meghatározott legoptimálisabb fehérje termelési és izolálási módszert felhasználva expresszáljuk és tisztítjuk az említett mutánsokat, illetve vizsgáljuk azok aktivitását a kifejlesztett módszerek segítségével.

6. Köszönetnyilvánítás

Ezen kutatómunka teljes terjedelemben a BBTE, Kémia és Vegyészmérnöki Karán, a Enzimológia és Alkalmazott Biokatalízis Kutatóközpontban volt elvégezve.

Köszönöm a témavezetőimnek, Dr. Bencze László-Csabának és Boros Krisztina PhD hallgatónak a kutatás során nyújtott segítséget és támogatást.

7. Bibliográfia

1. E. Langer, K. Bortel, S. Waskiewicz, M. Lenartowicz-Klik, *Methods of PET Recycling*. Plasticizers Derived from Post-Consumer PET. 2020, 127-171.
2. V. Tournier, C. M. Topham, A. Gilles, B. David, C. Folgoas, E. Moya-Leclair, E. Kamionka, M. L. Desrousseaux, H. Texier, S. Gavalda, M. Cot, E. Guemard, M. Dalibey, J. Nomme, G. Cioci, S. Barbe, M. Chateau, I. Andre, S. Duquesne, A. Marty, *Nature An engineered PET depolymerase to break down and recycle plastic bottles*, 2020, **580**, 216-219.
3. R. Wei, W. Zimmermann, *Microbial Biotechnology Biocatalysis as a green route for recycling the recalcitrant plastic polyethylene terephthalate*, 2017, **10**, 1302-1307.
4. J. R. Whinfield, J.T. Dickson, *Polymeric Linear Terephthalic Esters*, 1949.
5. Z. O. G. Schyns, M. P. Shaver, *Macromolecular Rapid Communications Mechanical Recycling of Packaging Plastics: A Review*, 2021, **42**, 2000415.
6. N. Thachnatharen, S. Shahabuddin, N. Sridewi, *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering The Waste Management of Polyethylene Terephthalate (PET) Plastic Waste: A Review*, 2021, **1127**.
7. F. Kawai, T. Kawabata, M. Oda, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering Current State and Perspectives Related to the Polyethylene Terephthalate Hydrolases Available for Biorecycling*, 2020, **8**, 8894-8908.
8. H.-Y. Sagong, H. Seo, T. Kim, H. F. Son, S. Joo, S. H. Lee, S. Kim, J.-S. Woo, S. Y. Hwang, K.-J. Kim, *ACS Catalysis Decomposition of the PET Film by MHETase Using Exo-PETase Function*, 2020, **10**, 4805-4812.
9. R.-J. Müller, H. Schrader, J. Profe, K. Dresler, W.-D. Deckwer, *Macromolecular Rapid Communications Enzymatic Degradation of Poly(ethylene terephthalate): Rapid Hydrolyse using a Hydrolase from T. fusca*, 2005, **26**, 1400-1405.
10. S. Yoshida, K. Hiraga, T. Takehana, I. Taniguchi, H. Yamaji, Y. Maeda, K. Toyohara, K. Miyamoto, Y. Kimura, K. Oda, *Science A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate)*, 2016, **351**, 1196-9.
11. G. J. Palm, L. Reisky, D. Bottcher, H. Muller, E. A. P. Michels, M. C. Walczak, L. Berndt, M. S. Weiss, U. T. Bornscheuer, G. Weber, *Nature Communications Structure of the plastic-degrading Ideonella sakaiensis MHETase bound to a substrate*, 2019, **10**, 1717.

12. N. A. Samak, Y. Jia, M.M. Sharshar, *Environment International Recent advances in biocatalysts engineering for polyethylene terephthalate plastic waste green recycling* 2020, **145**.
13. T.D.H.Bugg, *Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry*. 2004, Oxford: Blackwell Publishing.
14. M. Barth, Th. Oeser, R. Wei, J. Then, J. Schmidt, W. Zimmermann, *Biochemical Engineering Journal Effect of hydrolysis products on the enzymatic degradation of polyethylene terephthalate nanoparticles by a polyester hydrolase from Thermobifida fusca*, 2015, **93**, 222-228.
15. K. Dutta, Sh. Sen, V.D. Veeranki, *Process Biochemistry Production, characterization and applications of microbial cutinases*, 2009, **44**, 127-134.
16. E. Nikolaivits, M. Kanelli, M. Dimarogona, E. Topakas, *Catalysts A Middle-Aged Enzyme Still in Its Prime: Recent Advances in the Field of Cutinases*, 2018, **8**.
17. A. Martínez, S. Maicas, *Catalysts Cutinases: Characteristics and Insights in Industrial Production*, 2021, **11**.
18. S. Sulaiman, S. Yamato, E. Kanaya, J. J. Kim, Y. Koga, K. Takano, S. Kanaya, *Appl Environ Microbiol Isolation of a novel cutinase homolog with polyethylene terephthalate-degrading activity from leaf-branch compost by using a metagenomic approach*, 2012, **78**, 1556-62.
19. N.Miskolczi, *Műanyagok kémiája és technológiája*. 2012: Pannon Egyetem, 80-82.
20. S. Joo, I. J. Cho, H. Seo, H. F. Son, H. Y. Sagong, T. J. Shin, S. Y. Choi, S. Y. Lee, K. J. Kim, *Nature Communications Structural insight into molecular mechanism of poly(ethylene terephthalate) degradation*, 2018, **9**, 382.
21. C. Martinez, A. Nicolas, H. van Tilbeurgh, M. P. Egloff, C. Cudrey, R. Verger, C. Cambillau, *Biochemistry Cutinase, a lipolytic enzyme with a preformed oxyanion hole*, 1994, **33**, 83-89.
22. E. Z. L. Zhong-Johnson, C. A. Voigt, A. J. Sinskey, *Scientific Reports An absorbance method for analysis of enzymatic degradation kinetics of poly(ethylene terephthalate) films*, 2021, **11**, 928.