PET lebontó rekombináns enzimek termelése és aktivitásának meghatározása

Nagy Blanka-Eszter, Boros Krisztina, Bencze László-Csaba
Enzimológia és Alkalmazott Biokatalízis Kutatóközpont, Kémia és Vegyészmérnöki Kar, Babes-Bolyai Tudományegyetem, Arany János utca 11 szám, RO-400028 Kolozsvár, Románia
e-mail: blanka.eszter.nagy@stud.ubbcluj.ro

Bevezető

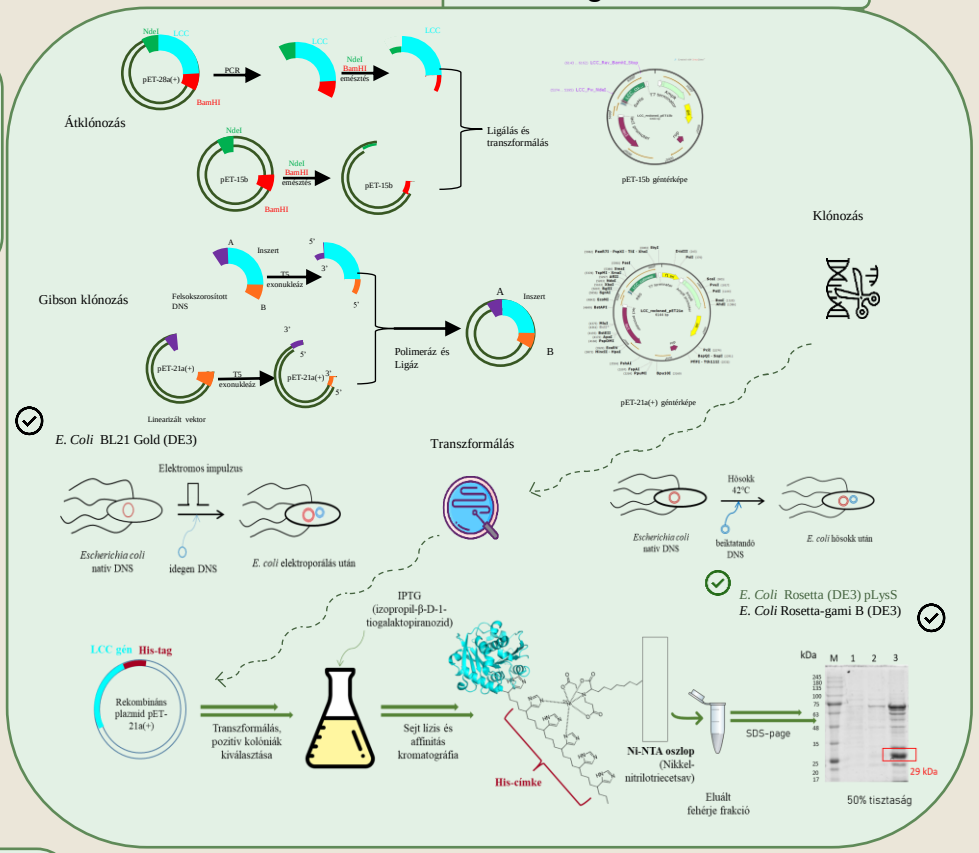
Környezetünket megfigyelve láthatjuk, hogy a nagy léptékű hulladék jelenléte egyre sürgetőbb megoldást igényel annak lebontására. Környezetbarát módon való megközelítése ezen problémának az elmúlt pár évben számos kutatás célja volt. A polietilén tereftalát (PET – polyethylene terephtalate) polimer monomerjeire való bontására számos enzimmel végeztek kísérleteket, köztük hidrolázokkal és kutinázokkal.

Egy hatékony PET-lebontó biokatalizátor kidolgozásához a megfelelő expressziós rendszer feltérképezése mellett fontos, hogy az adott enzim aktivitását, illetve a reakció során képződő termékek képződését is nyomon tudjuk követni. Ehhez az irodalomban is használt két módszerre alapozva, UV-Vis spektroszkópia[1], illetve HPLC[2] segítségével vizsgáltuk a jelenleg ismert, egyik legmagasabb PET-degradáló aktivitással rendelkező kutinázt, a levélágkomposztban fellelhető kutinázt (leaf branch compost cutinase-t, LCC-t[2]). Kísérleteink során céljaink közé tartozott egy hatékony expressziós rendszer kidolgozása a rekombináns PET lebontó enzim termelésére (különböző expressziós vektorokat és gazdasejteket alkalmazva), illetve az említett analitikai módszerek pontosságának növelése. A megfelelő expressziós rendszer alkalmazásával sikerült kinyerni az aktív LCC enzimet, illetve az újítások bevezetésének köszönhetően sikerült az említett módszerek precizitását növelnünk.

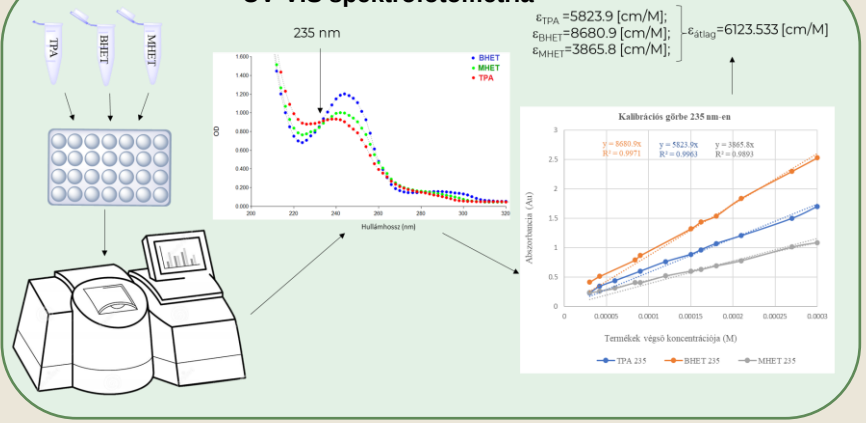
Célkitűzések

A kísérleteink során egy aktív rekombináns LC kutináz biokatalizátor kitermelését tűztük ki célul, valamint az irodalomban fellelhető HPLC és az UV-VIS spektrofotométeres PETáz aktivitás-mérési módszerek pontosságának továbbfejlesztését.

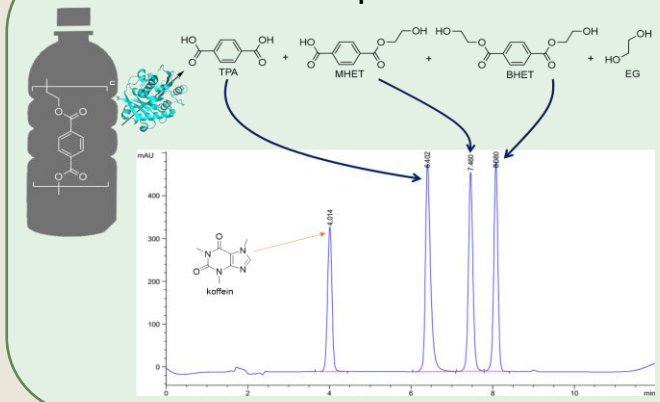
Metodológia és kísérleti rész

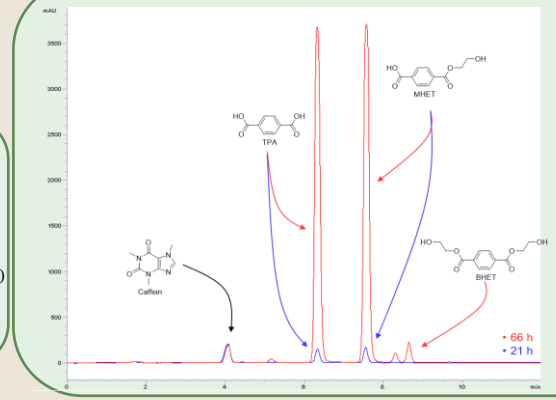


UV-VIS spektrofotometria

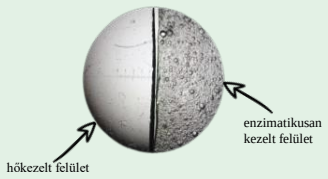


Belső standardon alapuló HPLC módszer

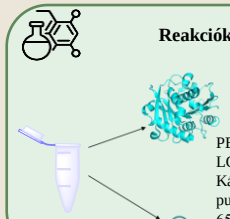




Reakció idő	Specifikus aktivitás (mg TPA_{eq}/mg enzim/h)	
	UV-VIS mérések	HPLC mérések
21 h	0,17	0,13
66 h	1,43	1,23



Reakciókörülmények



PET (7 mg)
LCC enzim (75 µg)
Kálium-foszfát puffer (8 pH)
65 °C

HPLC módszer:
oszlop: Phenomenex Luna C8 (150x4,6 mm; 5 µm)
mozgó fázis: A- 0,1%-os HCOOH oldat, B- acetonitril
1,0 mL/min 20°C-on
240 nm-en
a B gradiense 15%-ról 27,5%-ra 10 perc alatt

Következtetések

- hatékony expressziós rendszer: pET-21a(+)/LCC *E. coli* Rosetta B(DE3) gazdasejtben
- UV-VIS spektrofotometriás módszer, a megfelelő hullámhosszon: 235 nm
- nagy precizitással rendelkező belső standardon alapuló HPLC módszer: koffein – belső standard, mindhárom bomlástermék egyéni kvantifikálása

Köszönetnyilvánítás: A kutatást a Márton Áron Tehetséggondozó Ösztöndíjprogram és az Enzimológia és Alkalmazott Biokatalízis Kutatóközpont támogatta.

Referenciák:
1) Zhong-Johnson E.Z.L., Voigt C. A. and Sinskey A.J., Sci Rep, 2021, 11, 928
2) Tournier V., Topham C.M., Gilles A., David B., Folgoas C., Moya-Leclair E., Kamionka E., Desrousseaux M.L., Texier H., Gavalda S., Cot M., Guemard E., Dalibey M., Nomme J., Cioci G., Barbe S., Chateau M., Andre I., Duquesne S. and Marty A., Nature, 2020, 580, 216-219.
3)Son H.F., Cho I.J., Joo S., Seo H., Sagong H.-Y., Choi S.Y. , Lee S.Y. and Kim K.-J. , ACS Catalysis, 2019, 9, 3519-3526.