

POLIMEREK ENZIMKATALIZÁLT LEBONTÁSA

HUNPROTEXC II. KONFERENCIA



NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL
MEGVALÓSULÓ
PROJEKT

POLIMEREK ENZIMKATALIZÁLT LEBONTÁSA

HOSSZÚ TÁVÚ CÉLOK:

1. A cél a fenntartható fejlődés
2. Ennek a feltételei egyelőre nem adottak
3. A polimeripar elsődleges alapanyagbázisa még mindig a kőolaj
4. Megújuló alapanyagforrás (PLA, mikrobiális poliészterek)

RÖVID TÁVÚ CÉLOK:

1. A teljes élelciklus tervezése
2. Az élelciklus végén a polimer visszabontása monomereire
3. A folyamat gyorsítása katalízissel

A KUTATÁSI PROJEKT ÁTTEKINTÉSE

MÉRFÖLDKÖVEK:

- Az enzimatiskus degradáció megvalósíthatósága, kísérletek egy ezimmel
- Enzimaktivitás növelése az aktív centrum módosításával
- Több különböző polihidroxi-alkanoát lebonthatóságának vizsgálata
- Több különböző enzim alkalmazása

ENZIMATIKUS DEGRADÁCIÓ

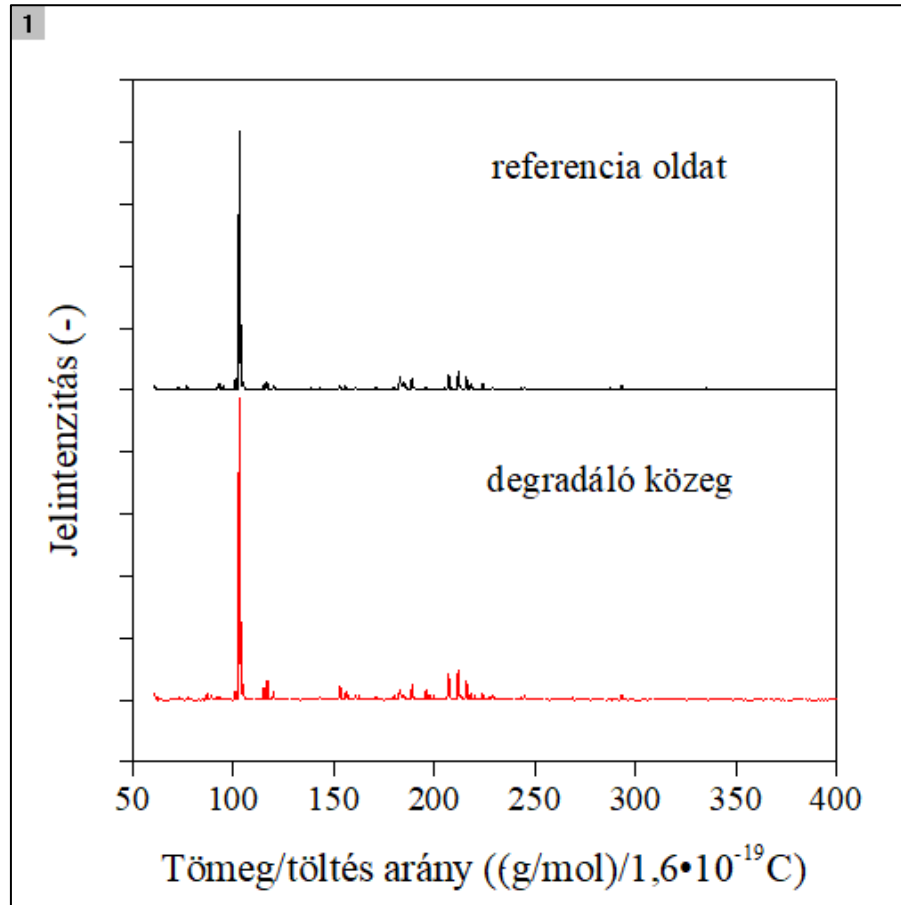
VIZSGÁLT POLIMER

- Poli(3-hidroxibutirát)
- Mikrobiális poliészter
- Egyes prokarióta törzseknél funkcionál intracelluláris anyag- és energiaraktárként

ALKALMAZOTT ENZIM

- Törzs: *Bacillus megaterium*
- Intracelluláris PHB depolimeráz
- Exokináz, amit LC-MS mérésekkel mi is igazoltunk

ENZIMATIKUS DEGRADÁCIÓ



LC-MS MÉRÉS EREDMÉNYE

- 3-hidroxibutánsav vizes oldata illetve a degradáló közeg
- Csak a monomer képződik
- A reakciókinetika mennyiségi jellemzése

ENZIMATIKUS DEGRADÁCIÓ

$$\frac{d[E](t)}{dt} = -k_1 \cdot [E](t) \cdot [S](t) + k_{-1} \cdot [ES](t) + k_{cat} \cdot [ES](t) \quad (1)$$

$$\frac{d[S](t)}{dt} = -k_1 \cdot [E](t) \cdot [S](t) + k_{-1} \cdot [ES](t) \quad (2)$$

$$\frac{d[ES](t)}{dt} = +k_1 \cdot [E](t) \cdot [S](t) - k_{-1} \cdot [ES](t) - k_{cat} \cdot [ES](t) \quad (3)$$

$$\frac{d[P](t)}{dt} = +k_{cat} \cdot [ES](t) \quad (4)$$

Michaelis-Menten

- Homogén fázisú reakciókra
- A PHB külön fázist képez
- Ennek a felületén adszorbeálódnak az enzimmolekulák
- Így alakul ki ez enzim-szubsztrát komplex

ENZIMATIKUS DEGRADÁCIÓ

$$\frac{d[E](t)}{dt} = -k_1 \cdot [E](t) \cdot s + k_{-1} \cdot [ES](t) + k_{cat} \cdot [ES](t) - k_{den} \cdot [E](t) \quad (5)$$

$$\frac{d[S](t)}{dt} = 0; \quad s = const. \quad (6)$$

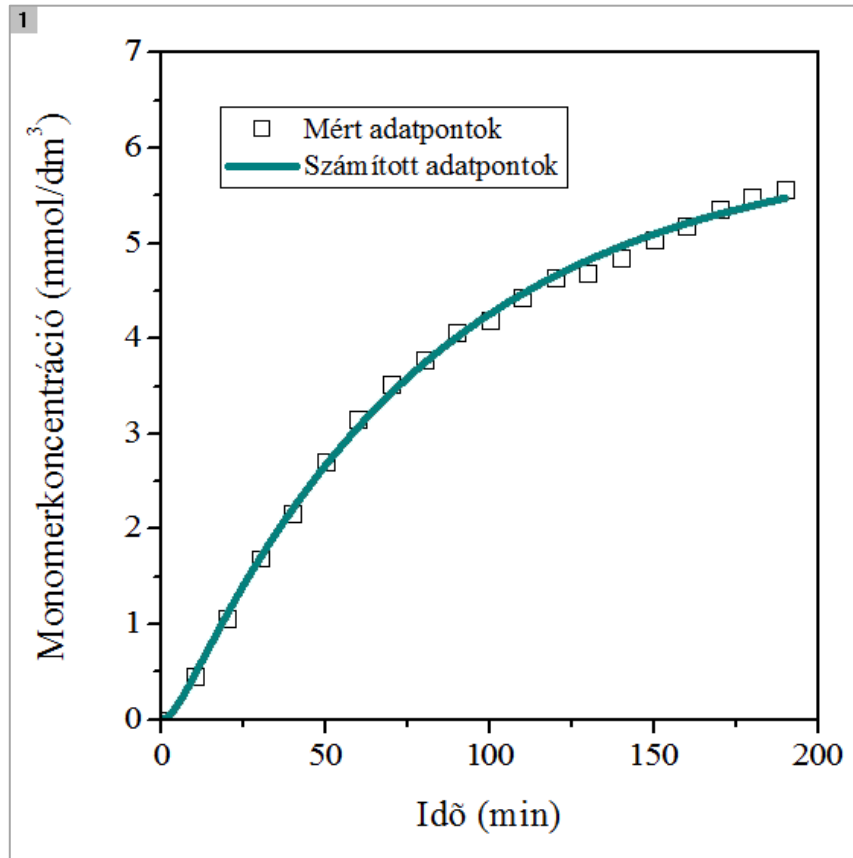
$$\frac{d[ES](t)}{dt} = +k_1 \cdot [E](t) \cdot s - k_{-1} \cdot [ES](t) - k_{cat} \cdot [ES](t) \quad (7)$$

$$\frac{d[P](t)}{dt} = +k_{cat} \cdot [ES](t) \quad (8)$$

MM módosítása

- Heterogén fázisú reakciókra
- A polimer fázis felülete állandónak tekinthető
- Az ES komplexet kialakítani képes észtercsoportok száma állandó
- Enzimdenaturáció

ENZIMATIKUS DEGRADÁCIÓ



MÉRT ÉS SZÁMÍTOTT ADATOK

- A numerikus megoldás jól illeszkedik a mért adatokra
- A reakciók időállandói is becsülhetők
- Előre ki tudjuk számolni a kívánt mennyiségű polimer lebontásához szükséges időt

MÉRETNÖVELÉS

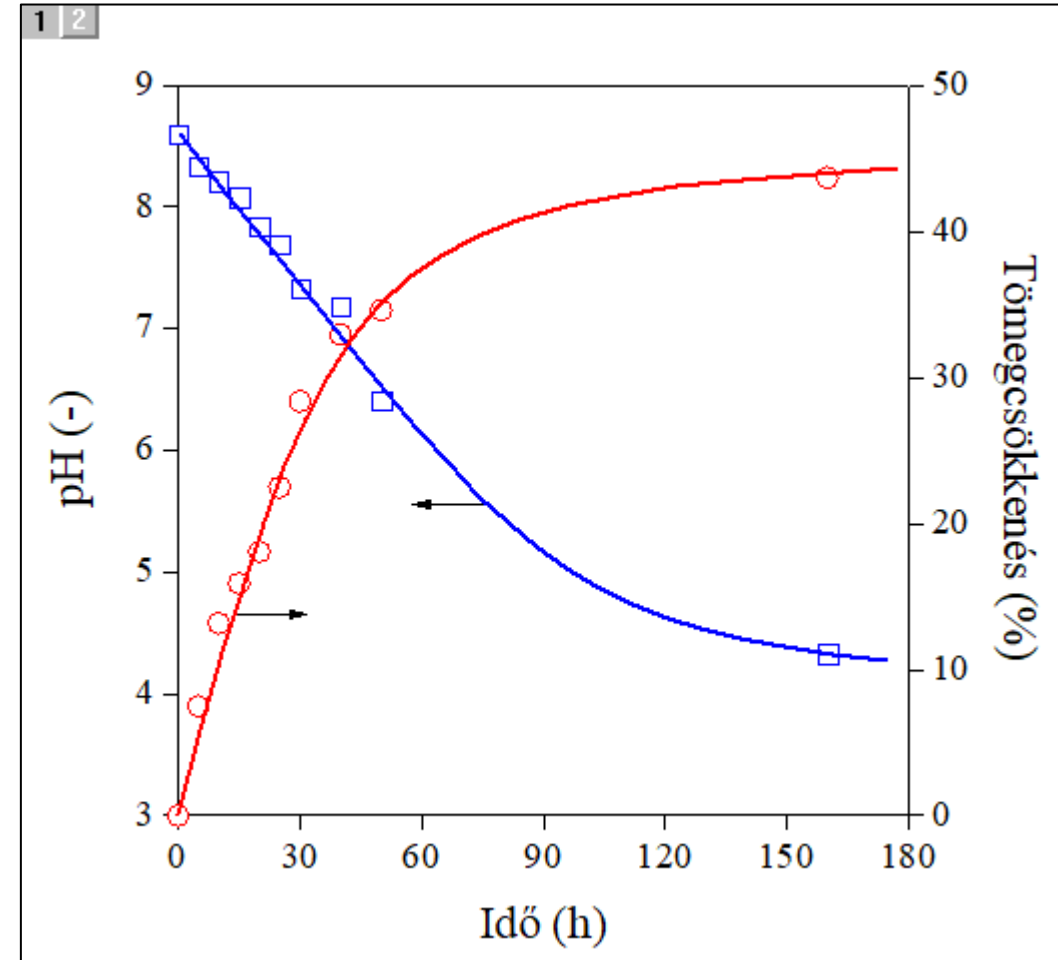
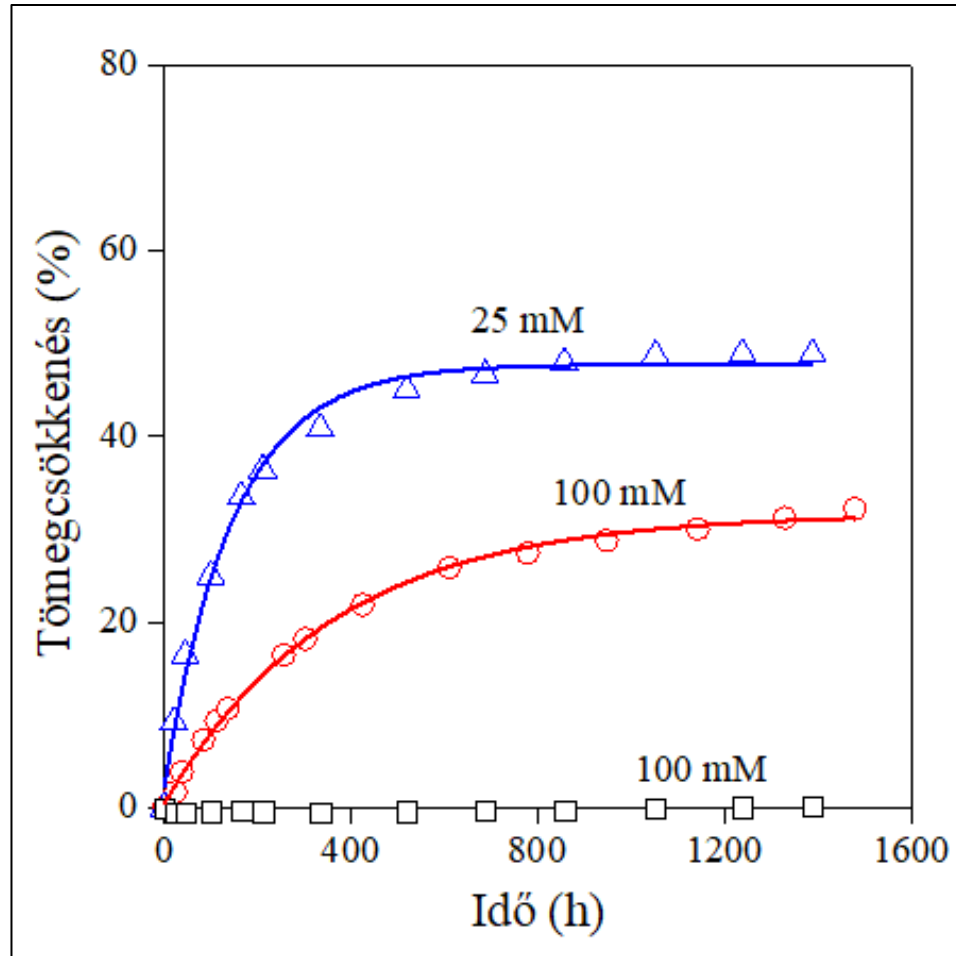
AZ AKTIVITÁS NÖVELÉSE

- Ragaszkodunk a *Bacillus megaterium* intracelluláris depolimerázához
- Az aktív centrum módosítása
- Szerin helyett cisztein

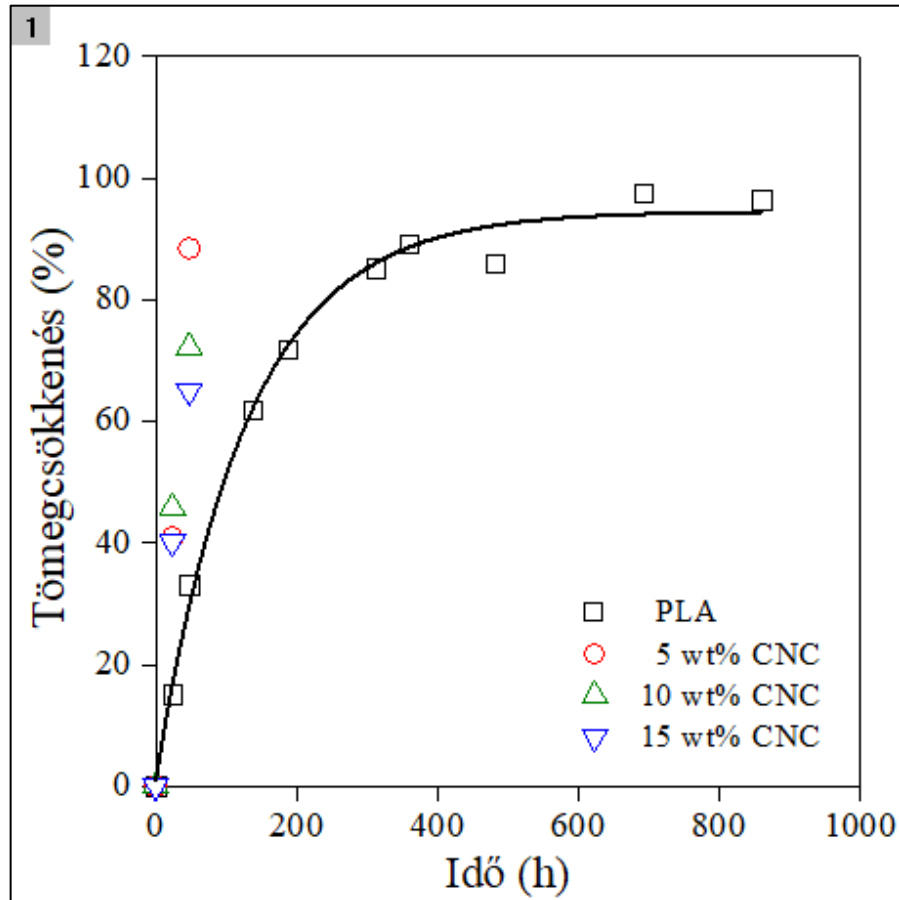
MÁS ENZIMEK ALKALMAZÁSA

- Törzs: *Burkholderia cepacia*, Amano Lipase PS
- Endokinázok
- Láncfragmentumok sztochasztikus halmaza a termék

ENDOKINÁZOK OPTIMUMPARAMÉTEREI



TOVÁBBI POLIHIDROXI-ALKANOÁTOK LEBONTÁSA



VIZSGÁLT POLIMEREK

- Polikaprolakton (PCL)
- Politejsav (PLA)
- Akár kompozitok enzimkatalizált lebontása is kivitelezhető: PLA-nanokristályos cellulóz (CNC) kompozitok

KVANTITATÍV ANALÍZIS, FORMÁLKINETIKA

- A tömegváltozás időfüggését szeretnénk leírni
- Egy időállandó jellemzi a folyamat sebességét
- Egy paraméter írja le a denaturáció sebességét
- Nem elegáns, sok paralel és konszekutív reakcióval kell számolnunk
- A cél a használhatóság

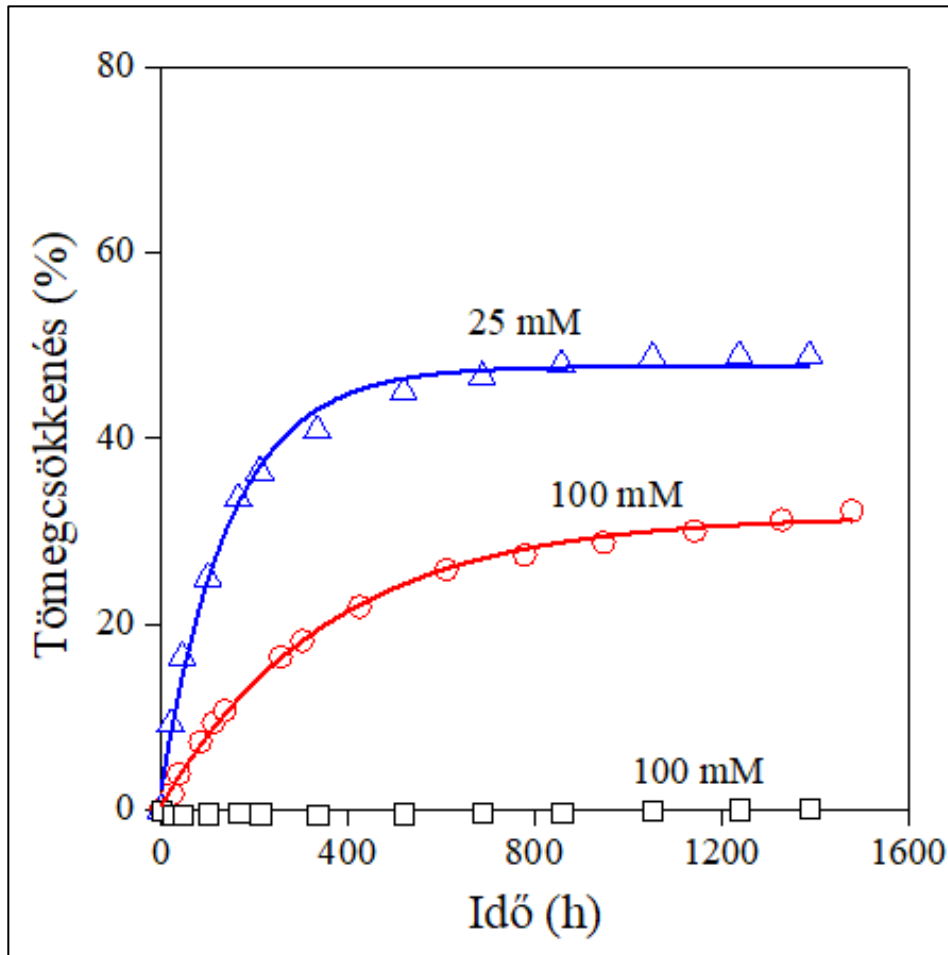
A FOLYAMATOT LEÍRÓ EGYENLET

$$\frac{dm(t)}{dt} = v_d - \frac{1}{\tau} \cdot m(t)$$

ANALITIKUS MEGOLDÁS

$$m(t) = v_d \cdot \tau \cdot \left(1 - e^{-\frac{1}{\tau} \cdot t}\right)$$

KVANTITATÍV ANALÍZIS, FORMÁLKINETIKA



$$\frac{dm(t)}{dt} = v_d - \frac{1}{\tau} \cdot m(t)$$

$$m(t) = v_d \cdot \tau \cdot \left(1 - e^{-\frac{1}{\tau} \cdot t}\right)$$

- Több paralel és konszekutív folyamatot jellemzünk egyetlen időállandóval
- A gyakorlatban mégis jól használható

TOVÁBBI KÍSÉRLETEK

ENZIMEXPRESSZIÓ

- Törzs: *Burkholderia cepacia*
- Vektor: pET-15b
- Cloning site: NdeI-BamHI

DEPOLIMERIZÁCIÓ

- Polimerek: PHB, PLA, PCL
- Filmek
- Szálak, scaffoldok
- Mikroszemcsék

KÖSZÖNÖM A FIGYELMET!

EDDIG MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK

1. International Journal of Biological Macromolecules, Volume 112, June 2018, Pages 156-162
2. Enzyme and Microbial Technology, Volume 120, January 2019, Pages 110-116
3. Industrial Crops and Products, Volume 141, 1 December 2019, 111799
4. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Volume 186, February 2020, 110678