

Muhammad Latif NAZIROV,
O'zR FA Mikrobiologiya instituti k.i.x
E-mail: nazirovlatif015@gmail.com
Tel: (97) 765 02 70

Ilxom XALILOV,
O'zR FA Mikrobiologiya instituti b.f.n.,
Fazliddin QOBILOV,
O'zR FA Mikrobiologiya instituti k.i.x

O'zRFA Genetika va o'simliklar eksperimental biologiyasi instituti
b.f.n Turaev Ozod Sunnatliyevich taqrizi asosida

EXPRESSION OF PETASE ENZYME IN *ESCHERICHIA COLI* BACTERIA FOR EFFICIENT DEGRADATION OF POLYETHYLENE

Annotation

Plastic pollution, primarily associated with polyethylene terephthalate (PET) plastics, has become a major global environmental crisis. *Ideonella sakaiensis* strain 201-F6 is the most effective solution to degrade PET. In this article, we described the results of studies on cloning the FAST-PETase enzyme with thermostable mutations and its expression in *E.coli* bacteria, purifying the protein by nickel chelate chromatography, and determining the enzyme activity. The study results showed that the active FAST-PETase enzyme was effectively purified.

Key words: PET plastic degradation, *Ideonella sakaiensis*, PETase, enzyme engineering, signal peptide.

ЭКСПРЕССИЯ ФЕРМЕНТА ПЕТАЗЫ В БАКТЕРИЯХ *ESCHERICHIA COLI* ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ ДЕГРАДАЦИИ ПОЛИЭТИЛЕНА

Аннотация

Пластиковое загрязнение, прежде всего связанное с пластиками из полиэтилентерефталата (ПЭТ), стало серьезным глобальным экологическим кризисом. Штамм бактерий *Ideonella sakaiensis* 201-F6 является наиболее эффективным способом, используемым для разложения ПЭТ. В этой статье мы описали результаты исследований по клонированию фермента FAST-PETase с термостабильными мутациями и его экспрессии в бактериях *E.coli*, очистке белка методом никель-хелатной хроматографии и определению активности фермента. Результаты исследования показали, что активный фермент FAST-PETaza был эффективно очищен.

Ключевые слова: деградация пластика ПЭТ, *Ideonella sakaiensis*, ПЭТаза, ферментная инженерия, сигнальный пептид.

POLIETILENNI SAMARALI PARHALASH UCHUN PETaza FERMENTINI *ESCHERICHIA COLI* BAKTERIYASIDA EXPRESSIYALASH

Аннотация

Plastik ifloslanish, birinchi navbatda, polietilen tereftalat (PET) plastmassalari bilan bog'liq bo'lib, jiddiy global ekologik inqirozga aylandi. Bakteriyaning *Ideonella sakaiensis* 201-F6 turi shtami PETni parchalash uchun eng samaralii yechim sifatida foydalaniladi. Biz ushbu maqolada, termostabil mutatsiyalarga ega bo'lgan FAST-PETaza fermentini klonlash va uni *E.coli* bakteriyasida ekspressiyalash, oqsilni nikel xelat xromotografiya usulida tozalab olish va ferment aktivligini aniqlash kabi tadqiqot natijalarini bayon etdik. Tadqiqot natijalari aktivlikga ega bo'lgan FAST-PETaza fermentini samarali tozalab olinganini ko'rsatdi.

Kalit so'zlar: PET plastik degradatsiyasi, *Ideonella sakaiensis*, PETaza, ferment muhandisligi, signal peptid.

Kirish. Plastik ifloslanish global muammo bo'lib, PET (polietilen tereftalat) plastmassasi atrof-muhitning ifloslanishiga sezilarli hissa qo'shmoqda. Biroq, 2016-yildagi muvaffaqiyatli kashfiyot bu muammoga istiqbolli yechim bo'la oladigan bakteriyaning taqdim etdi. 2016-yil Yoshida va boshqalar dunyoni plastik ifloslanishiga qarshi kurashda asos bo'ladigan *Ideonella sakaiensis* 201-F6 bakteriyasini taklif etdi [1]. Bu mikroorganizm PET plastmassasini samarali parchalaydigan o'ziga xos xususiyatga ega. Ko'pincha plastik idishlar, qadoqlash mahsulotlari va to'qimachilikda uchraydigan PET sekin parchalanganligi sababli atrof-muhitga jiddiy xavf soladi

Ideonella sakaiensis 201-F6 PET ikkita asosiy moddaga: mono(2-gidroksietil) tereftal kislota (MHET) va tereftal kislota (TPA) ga parchalanishini amalga oshiradigan PETaza fermentini ishlab chiqaradi. Ushbu tabiiy PET ning degradatsiya jarayoni plastik chiqindilar muammosini yengillatishga katta imkoniyat beradi. MHETaza va bu jarayonda ishtirok etadigan boshqa fermentlar MHETni TPA va etilen glikol(EG)ga aylantiradi. Fermentativ jarayonning asosiy tarkibiy qismi bo'lgan TPA bakteriya hujayrasiga TPATP deb nomlangan maxsus transporter orqali kiradi. Hujayrani ichida TPA, TPA 1,2-dioksigenaza (TPADO) va 1,2-digidroksi-3,5-siklogeksadiyen-1,4-dikarboksilat degidrogenaza (DCDDH) tomonidan amalga oshiriladigan metabolik o'zgarishlarga uchraydi. Ushbu fermentativ jarayonlar oxir-oqibatda protokatechuk kislota (PCA) hosil bo'lishiga olib keladi, bu esa keyinchalik PCA 3-4-dioksigenaza(Pca34) tomonidan halqa shaklida parchalanadi.

Tadqiqotchilar *Ideonella sakaiensis* 201-F6da PET gidrolizini o'rganish jarayonida PET-gidrolitik fermentlariga o'xshash ISF6_4831 ni aniqladilar. ISF6_4831 oqsili PET plyonkasini tozalash va inkubatsiyadan so'ng plyonka yuzasida chuqurchalar paydo bo'lishiga olib keldi. Bu fermentativ reaksiya, birinchi navbatda, MNET bilan kichik TPA va bis(2-gidroksietil) tereftal kislota (BHET) hosil qildi. ISF6_4831 PET va BHET ning samarali gidrolizini namoyon qildi, bu esa alifatik efirlarga nisbatan PET ni afzal ko'rishini ko'rsatdi. Shunday qilib, ISF6_4831 PETaza deb belgilandi. RNK ketma-ketligini o'rganishda tadqiqotchilar hujayralar TPA-Na, BHET, yoki PET plyonkasida o'stirilganda TPA va PCA katabolizmi bilan bog'liq genlarning yuqori ifodalinishini ko'rsatdilar. PET plyonkaning ustida hujayralarning o'sish jarayonida PETaza genining ekspressiyasi eng yuqori cho'qqisiga yetdi, bu PET plyonkasi yoki tegishli degradatsiya mahsulotlari tomonidan induksiyani ko'rsatdi. Ajablanarlisi shundaki, PETaza genining ekspression shakllari ISF6_0224 bilan yaqindan mos keladi, tannazalar oilasi oqsilini

kodlash uchun mas'ul bo'lgan qo'shni gen MHETni samarali gidrolizlaydi, ammo PET yoki boshqa birikmalarni parchalashga qodir emas. Natijada ISF6_0224 MHETaza deb belgilandi [1].

2017-yil Han va boshqalar PETazaning ichki struktural tuzilishi haqida tushunchalar berib, uning PETni qanday parchalashi to'g'risidagi tushunchalarimizni rivojlantirdi [2].

Ferment faolligini aniqlash uchun pNP -alifatik efirler 30°C va pH 7.0 sharoitda ishlatiladi. Pnp-atsetat, pNP-kaproat, pNP-butirat, pNP-kaprilatlar orasida pNP-atsetat eng yaxshi natijani berdi [1]. IsPETaza o'zining eng yuqori ferment faolligini pH 8da, pH 7-9 oralig'ida ko'rsatadi. Uning optimal harorati 25°C dan 35°C gacha tushadi. Tuz konsentratsiyasi

(100-500 mM) IsPETazani faolligini oshiradi, glitserol (10-20%) ham kuchaytiradi. Organik erituvchilar va detergentlar past konsentratsiyada ham IsPETaza faolligini pasaytiradi [3]. PET plynkasi gidroliz pH 9 uchun optimal pH pNP-efir gidrolizi uchun optimal pH 8.0. pH 6-10 bilan faol ferment, optimal diapozon pH 7-9 bilan ; pH 7.0 dan past yoki pH 9.0 dan yuqori bo'lmagan holda inaktivlanadi [1,3].

Shi va boshqalar pelB signal peptididan foydalangan holda *E.coli* da PETaza ishlab chiqarishni rivojlantirdi va PET degradatsiyasi samaradorligini oshirdi [4]. 3-rasmda tadqiqotchilar pelB sayt signalida mutatsiyalar o'tkazdilar va PETazaning rentabelligini baholadilar. Mutantlar orasida PM3 eng yuqori samaradorlikni namoyon etdi va shuning uchun bu PM3 ketma-ketligi tadqiqot uchun signal peptidi sifatida tanlandi. So'nggi yillarda PET plastik degradatsiyasi uchun fermentlarning imkoniyatlarini oshirishda sezilarli yutuqlarga erishildi. 2020-yilda tadqiqotchilar PET plastmassasini parchalash qobiliyati bilan mashhur bo'lgan IsPETaza fermentiga e'tibor qaratdilar, uning substratni bog'lash joyini optimallashtirish uchun strukturaviy bioinformatikaga asoslangan oqsil muhandisligidan foydalanadilar, natijada ikkita takomillashtirilgan variant - IsPETazaS242T va IsPETazaN246D yaratilgan. Yovvoyi turdagi IsPETaza bilan solishtirganda ikkalasida ham sezilarli darajada yuqori faollik bilan 25°C va 37°C namoyon bo'lgan. To'rtta variant, IsPETaza S121E/D186H/ S242T/N246D, yovvoyi turdagi IsPETaza [5] dan keskin farqli o'laroq, 37°C da 20 kun davomida PET degradatsiyasi faolligini saqlab, ajoyib barqarorlikni namoyish etdi.

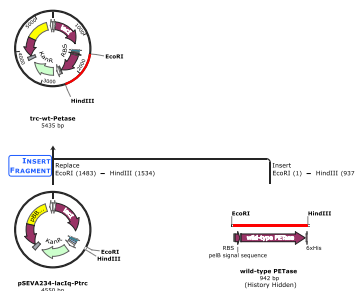
2021 yilda Cui va boshqalar *Ideonella sakaiensis* dan PETaza fermentini kuchaytirish uchun GRAPE (Oqsil muhandisligi uchun to'plangan strategiya) kompyuter strategiyasini taqdim etdi, natijada yumshoq haroratlarda yuqori erish harorati va yaxshilangan PET plynka degradatsiyasini (30%) ko'rsatadigan va yumshoq sharoitda mikroplastmassalarning suvda eruvchan mahsulotlarga biologik parchalanishi ta'minlaydigan DuraPETaza erishdi [6]. 2022 yilda Lu va boshqalar. FAST-PETaza (S121E/D186H/N233K/R224Q/R280A) ni yaratish uchun strukturaga asoslangan mashinani o'rganish algoritmidan foydalangan, bu yovvoyi turdagi PETazaga nisbatan beshta asosiy mutatsiyaga ega bo'lgan mustahkam va yuqori faol PET gidrolaza. FAST-PETaza samarali va tez degradatsiyaga uchragan iste'moldan so'ng tozalanmagan PET, 50°C da depolimerizatsiyalangan suv idishlari va qayta tiklangan monomerlardan PETni qayta sintez qilish orqali yopiq tsikli PETni qayta ishlashni osonlashtirdi [7].

Ushbu tadqiqotlar birgalikda PET plastik degradatsiyasi sohasida muhim yutuqlarni ifodalaydi, fermentlar samaradorligini optimallashtirish va plastik chiqindilarni boshqarish uchun barqaror yechimlarni ilgari surish uchun innovatsion strategiyalarni taklif qiladi.

Material va uslublar. Tadqiqotlar O'zRFA Mikrobiologiya instituti, Molekulyar biologiya laboratoriyasida amalga oshirildi.

Vektor konstruktsiya dizayn qilish. Wt-PETaza fermenti ketma-ketligi uniprot.org saytidan olingan. Keyinchalik, FAST-PETaza ketma-ketligi keltirilgan [7] adabiyotda batafsil tavsiflangan 5 ta o'ziga xos aminokislotalarni almashtirish orqali ishlab chiqildi.

Olingan aminokislotalar ketma-ketligi Integrated DNA Technologies (IDT) platformasi orqali *E.coli* uchun mos kodonlar yordamida optimallashtirildi. Ushbu gen pelB (PM3 mutant) signal peptidini birlashtirgan holda puxta ishlab chiqilgan va EcoRI va HindIII restriktaza fermentlari orqali pSEVA234 plazmidasiga kiritildi, bularning barchasi SNAPGENE dasturi yordamida amalga oshirildi. Ushbu konstruktsiyaning sintezi 5-rasmda ko'rsatilganidek, SYN BIO TECHNOLOGIES firmasi tomonidan amalga oshirildi.



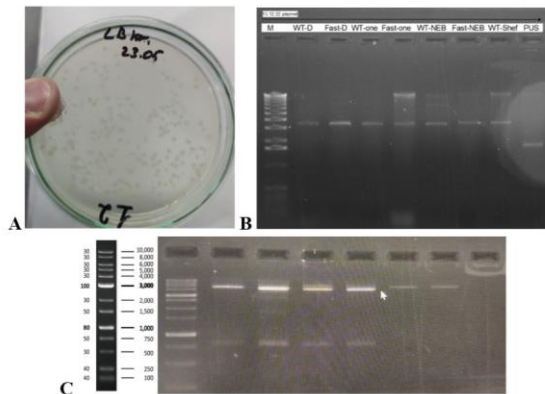
5-rasm. SnapGene dasturida tuzilgan tadqiqot dizayni.

Sintezlangan genni o'z ichiga olgan plazmidlar heat-shock usuli yordamida NEBExpress *E.coli* shtammiga kiritildi. Keyin transformatsiyalangan hujayralar inkulyatsiya va seleksiya uchun 50 mg/ml kanamitsin tarkibli LB agar chashkalariga yoyildi. Plazmidalar QIAprep Spin Miniprep majmuasida ajratildi va KpnI va BamHI restriktaza fermentlari bilan tekshirildi.

Oqsilni ekspressiyalash va tozalash. Plazmidada kiritilgan NEBExpress *E.coli* shtamlari ekspressiyasi NEB Express (C2523) qo'llanmasida tasvirlangan usulga muvofiq 10 ml LB muhitida ekspressiya qilindi [8]. Keyinchalik, hujayralar ultratovush yordamida lizis qilindi va hosil bo'lgan supernatant Wide Mini-Sub Cell GT gorizontal elektroforez (Bio-Rad, AQSh) tizimida Precision Plus Protein Dual Color Standards 10-250 kD 1610374 markeridan foydalangan holda SDS-PAGE elektroforez qilindi. So'ngra, oqsillar Bio-Rad Trans-Blot Turbo tizimi yordamida nitroselyuloza membranalariga o'tkazildi. Western blotting usulini amalga oshirishda, sichqon anti-histidin (MCA1396GA) va echki Anti-Sichqon IgG (H + L)-HRP konjugati 1706516 antiternalari, hamda DAB sigma-aldrich D5637-5G substratlaridan foydalanildi. Western blot tahlilida ijobiy sinovdan o'tgan namunalar 400 ml LB suyuq ozuqasiga ekildi. Shundan so'ng, namunalar 4000 rpm tezlikda santrifuga qilindi va hosil bo'lgan supernatant Nuvia™ IMAC, 25 ml #7800800 sorbent bilan jihozlangan BioLogic LP (Bio-Rad, AQSh) tizimi yordamida xromatografiyadan o'tkazildi. Oqsillarning elutsiyasiga 150 mM imidazol optimizatsiya qilindi. Xromatografiya jarayonidan olingan eluatant keyinchalik Western blotting yordamida tahlil qilindi.

Ferment faolligini aniqlash. Faollik p-nitrofenil asetatning (4-pNPA) gidrolizini spektrofotometrik tarzda o'lchash orqali o'lchandi. Tozalangan PETaza polistirol mikrotitr plitalarida natriy fosfat tampon (pH-8, 100 mM) bilan aralashtirildi. So'ngra, ferment reaksiyasini boshlash uchun 4-pNPA (4 mM) qo'shildi. P-nitrofenol ishlab chiqarishga asoslangan katalitik faollikni hisoblash uchun 405 nm da yutilish xona haroratida 6 daqiqa davomida kuzatildi. PETazasiz nazorat reaksiyasida NEBExpress *E.coli* pSAVE234 supernatantidan foydalanilgan [4].

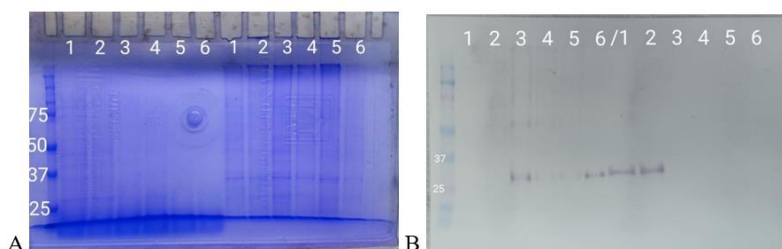
Natijalar. Sintezlangan plazmidalar NEBExpress *E.coli* ga klonlandi va keyinchalik plazmidlar ajratildi. So'ngra, *EcoRI* va *HindIII* restriktaza fermentlari bilan kesib tahlil qilindi (6-rasm). Restriktaza qilingan tajribada esa loyihalashtirilgan gen bilan taxminan bir xil o'lchamdagi, 800 j.a. bo'lgan DNK fragmentlari hosil bo'ldi.



6-rasm. A- klonlangan koloniyalar. B- ajratilgan plazmidlarning agarozda gelidagi elektroforez tasviri. C- restriktaza qilingan plazmidlar

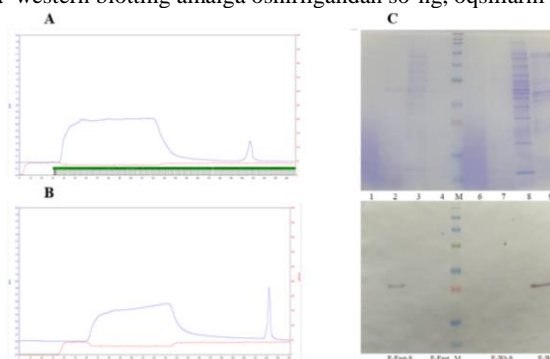
Oqsilini ekspresiyalash va tozalash

7-rasmda ko'rinib turibdiki, 1 va 2 namunalardagi PETaza fermenti kultural suyuqlikda ekspressiya bo'lganligi SDS-PAGE elektroforez natijasidan ma'lum bo'ldi.



7-rasm. A rasmda kumassi ko'kida bo'yalgan oqsillarning SDS-PAGE elektroforezi tasviri

B-rasmda Western Blotting natijasi. O'ngdagi 1-6 namunalar ultratovush bilan yorilgan hujayra ichidagi oqsillar. Chap paneldagi 1-6 namunalar kultural suyuqlikda chiqqan oqsil na'munalari. Mazkur oqsillarda xromatografiya tahlilini amalga oshirganda, Wt-PETaza 3 soat 25 daqiqada chiziq (peak), Fast-PETaza esa 3 soat 45 daqiqada chiziq berganligi tadqiq etildi. Ushbu oqsil namunalari yig'ilganda va western blotting amalga oshirilgandan so'ng, oqsillarni tozaligi tasdiqlandi (8-rasm).



8-rasm. A-Wt-PETaza, B-FAST-PETaza, C-Western blotting

Ferment faolligini aniqlash

Esteraza faolligi 4-nitrofenil asetat bilan tekshirilganda, natijalar gen kiritilmagan pSEVA234 na'munada 3,06, ishlov berilmagan na'munalarda 3,92 va tozalangan oqsil na'munalarda 3,66-3,77 ni tashkil etdi. Bu esa xromatografiya paytida fermentlarning tozalanganligi va faolligi ortganligini ko'rsatadi (8-rasm).

405 nm	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	3,0592	3,077	3,3926	3,0141	3,4683	2,3896	3,6639	3,6576	3,771	3,7807	1,1044	0,9793
	234-S	Wt-S	Fast-S	234	Wt	Fast	E-Fast-S	E-Fast	E-Wt-S	E-Wt	K	K

Ushbu tadqiqotda biz *Ideonella sakaiensis* 201-F6 dan kelib chiqqan PETaza fermentining muhandisligi va tavsifi bo'yicha keng qamrovli tadqiqot o'tkazdik, bunda uning polietilen tereftalat (PET) plastmassalarning parchalanishi uchun katalitik faolligini oshirishga alohida e'tibor qaratildi. Bir qator puxta materiallar, usullar va jiddiy tajribalar orqali biz global plastik ifloslanish inqirozini hal qilishda potentsial qo'llanilishi uchun PETazani tushunish va optimallashtirishda muhim yutuqlarga erishdik.

PETaza variantlarini konstruksiyalash va loyihalash, shu jumladan ishlab chiqilgan FAST-PETaza, recombinant oqsiliga aniqlik bilan erishildi. Biz pelB (PM3 mutant) signal peptidini o'z ichiga olgan ilg'or molekulyar biologiya vositalari va dasturlaridan foydalangan holda maqsadli genlarni muvaffaqiyatli sintez qildik va plazmidlarga birlashtirdik. O'zgartirilgan plazmidlar NEBExpress *E.coli* shtammlariga kiritildi, bu esa muvaffaqiyatli oqsil ekspressiyasiga olib keldi. Western blotting va xromatografik tahlillari hujayra ichidagi va hujayradan tashqari fraktsiyalarda PETaza fermenti mavjudligini tasdiqladi.

Shunisi e'tiborga loyiqki, ferment faolligini aniqlash istiqbolli katalitik qobiliyatlarni aniqladi, tozalangan PETaza 3,66-3,77 katalitik faolligini ko'rsatdi. Xromatografiya paytida faollikning bu ortishi muvaffaqiyatli tozalash va PET plastik degradatsiyasini yaxshilash potentsialini ta'kidlaydi.

Xulosa. Xulosa qilib aytganda, ushbu tadqiqot fermentativ PET plastik degradatsiyasi sohasida oldinga muhim qadamdir. PETazaning ishlab chiqilgan variantlari, xususan, FAST-PETaza, plastik chiqindilarning dolzarb muammosini hal qilish uchun samarali vosita sifatida qo'llanilishi mumkin. Ushbu topilmalar barqaror plastik chiqindilarni boshqarish strategiyalarini yanada tadqiq qilish va ishlab chiqish uchun yo'l ochadi, natijada atrof-muhitni saqlash va global miqyosda plastik ifloslanishni yumshatishga hissa qo'shadi.

ADABIYOTLAR

1. Yoshida S, Hiraga K, Takehana T, Taniguchi I, Yamaji H, Maeda Y, Toyohara K, Miyamoto K, Kimura Y, Oda K. A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate), *Science*, vol. 351, no. 6278, pp. 1196–1199, Mar. 2016, doi: 10.1126/science.aad6359.
2. Han X, Liu W, Huang JW, Ma J, Zheng Y, Ko TP, Xu L, Cheng YS, Chen CC, Guo RT. Structural insight into catalytic mechanism of PET hydrolase, *Nat. Commun.*, vol. 8, no. 1, p. 2106, Dec. 2017, doi: 10.1038/s41467-017-02255-z.
3. Liu C, Shi C, Zhu S, Wei R, Yin CC. Structural and functional characterization of polyethylene terephthalate hydrolase from *Ideonella sakaiensis*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 508, no. 1, pp. 289–294, Jan. 2019, doi: 10.1016/j.bbrc.2018.11.148.
4. Shi L, Liu H, Gao S, Weng Y, Zhu L. Enhanced Extracellular Production of Is PETase in *Escherichia coli* via Engineering of the pelB Signal Peptide, *J. Agric. Food Chem.*, vol. 69, no. 7, pp. 2245–2252, Feb. 2021, doi: 10.1021/acs.jafc.0c07469.
5. Son HF, Joo S, Seo H, Sagong HY, Lee SH, Hong H, Kim KJ. Structural bioinformatics-based protein engineering of thermo-stable PETase from *Ideonella sakaiensis*, *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 141, p. 109656, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.enzmictec.2020.109656.
6. Yinglu C, Yanchun Ch, Xinyue L, Saijun D, Yu'e T, Yuxin Q, Ruchira M, Jing H, Chunli L, Xu H, Weidong L, Quan Ch, Wangqing W, Xin W, Wenbin D, Shuangyan T, Hua X, Haiyan L, Yong L, Kendall N, Bian W. Computational Redesign of a PETase for Plastic Biodegradation under Ambient Condition by the GRAPE Strategy, *ACS Catal.*, vol. 11, no. 3, pp. 1340–1350, Feb. 2021, doi: 10.1021/acscatal.0c05126.
7. Lu H, Diaz DJ, Czarnecki NJ, Zhu C, Kim W, Shroff R, Acosta DJ, Alexander BR, Cole HO, Zhang Y, Lynd NA, Ellington AD, Alper HS. Machine learning-aided engineering of hydrolases for PET depolymerization, *Nature*, vol. 604, no. 7907, pp. 662–667, Apr. 2022, doi: 10.1038/s41586-022-04599-z.
8. <https://www.neb.com/en/protocols/0001/01/01/protocol-for-expression-using-neb-express-2523>.