



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

Σχολή Χημικών Μηχανικών

Τομέας IV : Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών

Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας

## ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Ανακάλυψη & Βελτιστοποίηση  
ετερόλογης έκφρασης πολυεστερασών  
με δυνατότητα αποικοδόμησης  
πλαστικών**

Μακρυνιώτης Κωνσταντίνος

Επιβλέπων : Τόπακας Ευάγγελος,  
Αναπληρωτής Καθηγητής Ε.Μ.Π.

ΑΘΗΝΑ

Σεπτέμβριος 2021





*Εις μνήμην των παππούδων, Κώστα και Θοδωρή  
& γιαγιάδων μου, Αλεξάνδρας και Σοφίας..*



## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου (Ε.Μ.Π.), υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή του Ε.Μ.Π κ. Ευάγγελου Τόπακα.

Η εκπόνηση της Διπλωματικής Εργασίας αποτέλεσε, στο σύνολο της, μια εξαιρετικά εποικοδομητική διαδικασία, η οποία μου προσέφερε τόσο πληθώρα επιστημονικών γνώσεων όσο και σημαντική εργαστηριακή εμπειρία. Με αφορμή την ολοκλήρωση της, θεώρησα απαραίτητο να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στο σύνολο των ατόμων που συνέβαλλαν αισθητά στην υλοποίησή της.

Ξεκινώντας, ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω στον κ. Ευάγγελο Τόπακα, για την δυνατότητα που μου προσέφερε όσον αφορά την επιλογή του θέματος ενασχόλησής μου, ανάμεσα σε πλήθος τρεχούμενων ερευνητικών έργων του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας. Με τον τρόπο αυτό μου έδωσε την ευκαιρία να επιλέξω να αφοσιωθώ σε ένα σύγχρονο ζήτημα που συγκεντρώνει ολοένα και περισσότερο το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας. Παράλληλα, η καθοδήγησή του αλλά και η εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου αποτέλεσαν κινητήριο δύναμη για την συνεχή εντατικοποίηση των προσπαθειών μου.

Θερμές ευχαριστίες απονέμονται στον διδάκτορα του Ε.Μ.Π. Ευστράτιο Νικολάιβιτς, για την εξαιρετική συνεργασία μας, στο πλαίσιο της οποίας απέκτησα πολύτιμες επιστημονικές γνώσεις. Το αμείωτο ενδιαφέρον του και η συνεχής υποστήριξή του αποτέλεσαν καθοριστικούς παράγοντες για την ομαλή διεκπεραίωση της ερευνητικής μου μελέτης. Επιπλέον, η ελευθερία κινήσεων και αποφάσεων που μου προσέφερε, συνέβαλλαν στην επιβεβαίωση του εργαστηριακού ενδιαφέροντος μου και στην ενίσχυση της αγάπης μου για την έρευνα.

Ξεχωριστά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα του Ε.Μ.Π. και φίλο μου Γεώργιο Ταξείδη, για την ουσιαστική βοήθεια που μου προσέφερε. Το ειλικρινές ενδιαφέρον του, η συνεχής στήριξη του καθώς και οι προσωπικές συμβουλές του, αποτέλεσαν καταλύτες της προόδου της ερευνητικής μου μελέτης.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω το προσωπικό του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας και Τεχνολογίας Πολυμερών, για την ανιδιοτελή παροχή του εργαστηριακού τους εξοπλισμού, καθώς και την υποψήφια διδάκτορα του Εργαστηρίου Τεχνολογίας Πολυμερών του Ε.Μ.Π. Χριστίνα Γκουντέλα, για την συμβολή της στην επιτυχή διεκπεραίωση των πειραματικών αναλύσεων των μελετώμενων πολυμερικών δειγμάτων.

Ένα μεγάλο «ευχαριστώ» ανήκει σε όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας, για τη συνεχή προθυμία του για προσφορά βοήθειας και συμβουλών, δημιουργώντας ένα εξαιρετικό κλίμα συνεργασίας, μέσα στο οποίο μου δόθηκε η δυνατότητα να εξελιχθώ.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ε.Μ.Π. κα. Σταματίνα Βουγιούκα και τον Καθηγητή Ε.Μ.Π. κ. Κωνσταντίνο Κορδάτο, για τον χρόνο που διέθεσαν να διαβάσουν το κείμενο της Διπλωματικής μου Εργασίας.

Τέλος, τις μεγαλύτερες ευχαριστίες αξίζουν η οικογένεια, οι φίλοι και τα κοντινά μου πρόσωπα, για την αέναη υποστήριξη και συμπαράστασή τους, τόσο κατά το τελευταίο αυτό εξάμηνο των σπουδών μου, όσο και καθ' όλη την διάρκεια της φοίτησής μου. Αυτοί με παροτρύνουν καθημερινά να κυνηγώ τους στόχους και τα όνειρα μου.

Κώστας Μακρυνιώτης,

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2021



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα ερευνητική μελέτη είχε ως στόχο την ανακάλυψη ενζύμων με ικανότητα διάσπασης συμβατικών πολυεστερικών πλαστικών.

Για την επίτευξη αυτού, μελετήθηκαν δώδεκα πολυεστεράσες σε επτά διαφορετικά πολυεστερικά υποστρώματα. Από τα μελετώμενα ένζυμα, τα οκτώ (FoCut, HiC, LCC, PETase, PHAase, PHOase, PLAase και PUase) εντοπίστηκαν βιβλιογραφικά και επιλέχθηκαν λόγω των σημαντικών ενδείξεων αποικοδόμησης διαφορετικών πολυεστέρων. Συγκεκριμένα οι πολυεστεράσες PETase και LCC είναι γνωστές υδρολάσες του τереφθαλικού πολυαιθυλενίου (PET). Τα δύο ένζυμα, Dmest και Se1JFR, ανακαλύφθηκαν με την χρήση βιοπληροφορικού εργαλείου (BLAST®), αναζητώντας αλληλουχίες υψηλής ομοιότητας με αυτές των προαναφερθέντων PET-υδρολασών. Τα υπόλοιπα δύο ένζυμα (Prot. Bac. και Prot. Gr.) ήταν εμπορικά διαθέσιμα και επιλέχθηκαν λόγω της υδρολυτικής δράσης τους ως πρωτεάσες. Τα πολυεστερικά υποστρώματα, στα οποία μελετήθηκε η δράση τους, ήταν τα βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά πολύ(ηλεκτρικός βουτυλεστέρας) (PBS), πολυκαπρολακτόνη (PCL), πολύ(3-υδροξυ βουτυρικός) εστέρας (PHB) και πολυγαλακτικό οξύ (PLA) και τα μη βιοαποικοδομήσιμα, τереφθαλικό πολυαιθυλένιο (PET) (άμορφο και κρυσταλλικό) και πολυεστερική πολυουρεθάνη (PU).

Τα συνθετικά γονίδια των πολυεστερασών (πλην των εμπορικά διαθέσιμων) εισήχθησαν σε πλασμιδιακούς φορείς (pET-22b(+), pET-26b(+)) και εκφράστηκαν ετερόλογα σε επιδεκτικά κύτταρα *Escherichia coli* BL21 (DE3). Η ετερόλογη έκφραση των ενζύμων βελτιστοποιήθηκε, σε όσα ήταν απαραίτητο, με την εφαρμογή διαφορετικών πρωτοκόλλων που βασίστηκαν στην μεταβολή παραγόντων όπως το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης, η συγκέντρωση του επαγωγέα, ο χρόνος επαγωγής και άλλα. Τελικά εκφράστηκαν και απομονώθηκαν με επιτυχία τα ένζυμα Dmest, FoCut, HiC, LCC, PETase, PHOase, PUase και Se1JFR. Οι πολυεστεράσες εμφάνισαν μοριακά βάρη στο εύρος των 20-30 kDa, πλην της PUase (55 kDa).

Ακολούθησε ο προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών δράσης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών Dmest, PHOase, PUase και Se1JFR. Η Dmest εμφάνισε βέλτιστη θερμοκρασία δράσης στους 55 °C ενώ οι PHOase, PUase και Se1JFR στους 30 °C. Αντίστοιχα η Se1JFR εμφάνισε βέλτιστη δράση σε τιμή pH 9,0 ενώ οι Dmest, PHOase και PUase σε τιμή pH 7,0.

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις των ενζύμων με τα πολυεστερικά υποστρώματα, σε συνθήκες θερμοκρασίας 30 °C (FoCut, PETase, PHOase, PUase και Se1JFR) και 50 °C (Dmest, HiC, LCC, Prot. Bac., Prot. Gr.), σε ρυθμιστικό διάλυμα Νιτρικών-Φωσφορικών 0,1 M με τιμή pH 7,5, για 3 ημέρες. Η ικανότητα υποβάθμισης των πολυμερικών υλικών μελετήθηκε βάσει της προκαλούμενης, στο υλικό, μείωσης της μάζας ( $\Delta m$ ) και των μέσων μοριακών βαρών (μέσου αριθμού μοριακού βάρους  $\Delta M_n$  και μέσου βάρους μοριακού βάρους  $\Delta M_w$ ) (PBS, PCL, PHC, PLA και PU) ή της συγκέντρωσης των προϊόντων υδρόλυσης (ΣC) (άμορφο και κρυσταλλικό PET).



Όλες οι μελετώμενες πολυεστεράσες παρουσίασαν αποτελέσματα υποβάθμισης στα περισσότερα πολυμερικά υλικά. Συγκεκριμένα όσον αφορά τα βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά αξιοσημειώτες υποβαθμίσεις προκάλεσαν, στο σύνολό τους, τα ένζυμα Dmest, FoCut, LCC, PETase και Se1JFR.

Όσον αφορά τα μη βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά, η δράση των πολυεστερασών στην PU δεν εμφάνισε σημαντικά αποτελέσματα υδρόλυσης, πέραν των ενζύμων PETase ( $\Delta m=11,62\%$ ) και PHOase ( $\Delta m=10,43\%$ ). Στο μη βιοαποικοδομήσιμο PET, τις σημαντικότερες ενδείξεις αποικοδόμησης εμφάνισαν οι LCC ( $\Delta m=47,57\%$ ) και Dmest ( $\Delta m=46,90\%$ ), στο άμορφο και οι Dmest ( $\Delta m=4,96\%$ ,  $\Sigma C=1,658$  mM) και LCC ( $\Sigma C=1,289$  mM), στο κρυσταλλικό, αντίστοιχα. Έτσι η Dmest έδρασε αποτελεσματικότερα της μόνης γνωστής, έως σήμερα, θερμοφιλης PET-υδρολάσης, LCC.

*Λέξεις-κλειδιά : Βιοαποικοδόμηση, πολυεστεράσες, πολυεστέρες, πλαστικά, τereφθαλικό πολυαιθυλένιο, ετερόλογη έκφραση, Dmest, Se1JFR, PHOase, PUase*

## ABSTRACT

The purpose of the present diploma thesis was the discovery of novel enzymes capable of biodegrading conventional polyester plastics.

In order to achieve this purpose, twelve polyesters were studied on seven different polyester substrates. Eight of the enzymes (FoCut, HiC, LCC, PETase, PHAase, PHOase, PLAase and PUase) were identified through bibliographic research and selected due to biodegradation evidence on different polyesters. Specifically, PETase and LCC are the only, to date, known hydrolases of polyethylene terephthalate. Dmest and Se1JFR were discovered using a bioinformatics tool (BLAST<sup>®</sup>), after searching different sequences which share high homology with the beforementioned PET-hydrolases. The remaining enzymes (Prot. Bac. and Prot. Gr.) were commercially available and were selected cause of their hydrolytic capability as proteases. The studied polyester substrates were biodegradable, such as polybutylene succinate (PBS), polyhydroxy butyrate (PHB), polycaprolactone (PCL) and polylactic acid (PLA) and non-biodegradable plastics such as amorphous & crystalline polyethylene terephthalate (PET) and polyester polyurethane (PU).

Polyesterases' synthetic genes were then inserted into a plasmid vector (pET-22b(+), pET-26b(+)) and heterologous expressed in competent *Eschericia coli* BL21 (DE3) cells. The heterologous expression of the enzymes was optimized, where necessary, through application of different protocols based on parameters such as growth medium, inducer's concentration, induction time and more. Finally, Dmest, FoCut, HiC, LCC, PETase, PHOase, PUase and Se1JFR were successfully expressed and then purified. Polyesterases' molecular weights were identified in the range of 20-30 kDa, except from PUase (55 kDa).

Then, the optimal operating conditions of Dmest, PHOase, PUase and Se1JFR, were determined. Dmest showed optimum activity at 55 °C while PHOase, PUase and Se1JFR at 30 °C. Meanwhile, Se1JFR was most active at pH 9.0 and Dmest, PHOase, PUase at pH 7.0.

Subsequently, the enzymes reacted with the polyester substrates at 30 °C (FoCut, PETase, PHOase, PUase and Se1JFR) and 50 °C (Dmest, HiC, LCC, Prot. Bac., Prot. Gr.) in 0.1 M Sodium-Phosphate buffer of pH 7.5, at 1300 rpm, for 3 days long. The degradation of polymer materials was studied based on weight loss (Dm) and average molecular weights loss (number average molecular weight  $DM_n$  and weight average molecular weight  $DM_w$ ) (for PBS, PCL, PHB, PLA and PU) or total concentration of hydrolysis products ( $\Sigma C$ ) (for amorphous and crystalline PET).

The studied polyesterases showed degradation results in most of the polymer materials. Specifically, on biodegradable plastics the most significant degradation rates were caused, in total, by Dmest, FoCut, LCC, PETase and Se1JFR.

As far as, the non-biodegradable plastics concerns, the action of most polyestersases on PU didn't cause significant hydrolysis results, except for PETase ( $\Delta m=11.62\%$ ) and PHOase ( $\Delta m=10.43\%$ ). The most distinct biodegradation results in PET, were caused by, LCC ( $Dm=47.57\%$ ) and Dmest ( $Dm=46.90\%$ ) in amorphous and Dmest ( $Dm=4.96\%$ ,  $\Sigma C=1.658$  mM) and LCC ( $\Sigma C=1.289$  mM) in crystalline, respectively. It's obvious that Dmest acted more effectively on crystalline PET than the, only known to date, thermophilic PET-hydrolase, LCC.

Keywords: *Biodegradation, polyestersases, polyesters, plastics, polyethylene terephthalate, heterologous expression, Dmest, Se1JFR, PHOase, PUase*

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

|  |      |
|--|------|
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....   | viii |
| ABSTRACT .....   | x    |
| ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ .....  | xii  |
| 1) ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....   | 2    |
| 1.1) Εισαγωγή.....   | 2    |
| 1.2) Πλαστική Εποχή.....   | 3    |
| 1.2.1) Πλαστικά & Μικροπλαστικά .....  | 3    |
| 1.2.1.1) Πλαστικά.....   | 3    |
| 1.2.1.2) Μικροπλαστικά .....   | 5    |
| 1.2.2) Επιπτώσεις των πλαστικών και των μικροπλαστικών στο περιβάλλον και στον άνθρωπο ..... | 6    |
| 1.2.3) Διαχείριση πλαστικών στην σύγχρονη εποχή .....  | 8    |
| 1.2.4) Προβλήματα συμβατικών τρόπων διαχείρισης πλαστικών και μικροπλαστικών .....           | 11   |
| 1.3) Βιοαποικοδόμηση πλαστικών .....   | 13   |
| 1.3.1) Γενικά.....   | 13   |
| 1.3.2) Στάδια βιοαποικοδόμησης πλαστικών .....   | 14   |
| 1.3.3) Παράγοντες που επηρεάζουν την βιοαποικοδόμηση πλαστικών .....                         | 15   |
| 1.3.4) Βιολογικής προέλευσης & Βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά .....                              | 19   |
| 1.3.4.1) Βιολογικής προέλευσης πλαστικά.....   | 19   |
| 1.3.4.2) Βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά .....  | 20   |
| 1.3.5) Πολυεστέρες ως εμπορικά πλαστικά : Σύνθεση & Βιοαποικοδόμηση .....                    | 23   |
| 1.3.5.1) Πολυγαλακτικό οξύ (PLA) .....   | 23   |
| 1.3.5.2) Πολύ(3-υδροξυ βουτυρικός) εστέρας (PHB).....  | 27   |
| 1.3.5.3) Πολύ(ηλεκτρικός βουτυλεστέρας) (PBS) .....  | 30   |
| 1.3.5.4) Τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο (PET) .....   | 33   |
| 1.3.5.5) Πολυουρεθάνες (PUs).....  | 39   |
| 1.3.5.6) Πολυκαπρολακτόνη (PCL) .....  | 42   |
| 1.4) Ένζυμα & ετερόλογη έκφραση .....  | 44   |
| 1.4.1) Ορισμός, δράση & κατηγορίες.....  | 44   |
| 1.4.1.1) Εστεράσες .....   | 45   |
| 1.4.1.2) Κουτινάσες.....   | 46   |
| 1.4.2) Ετερόλογη έκφραση ενζύμων .....   | 47   |
| 1.4.2.1) Γενετική μηχανική .....   | 47   |
| 1.4.2.2) Το βακτήριο <i>Escherichia coli</i> ως ξενιστής ετερόλογης έκφρασης ενζύμου .....   | 48   |

|  |    |
|--|----|
| 1.4.2.3) Παράγοντες που επηρεάζουν την ετερόλογη έκφραση ενζύμων .....                                       | 49 |
| 2) ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....  | 52 |
| 2.1) Υλικά.....  | 52 |
| 2.1.1) Όργανα & Συσκευές.....  | 52 |
| 2.1.2) Βιοπληροφορικά εργαλεία .....   | 53 |
| 2.1.3) Ξενιστής και φορέας ετερόλογης έκφρασης πολυεστερασών .....   | 54 |
| 2.1.3.1) Ξενιστής ετερόλογης έκφρασης πολυεστερασών .....  | 54 |
| 2.1.3.2) Φορείς ετερόλογης έκφρασης πολυεστερασών.....   | 55 |
| 2.1.4) Αντιδραστήρια .....   | 56 |
| 2.1.4.1) Θρεπτικά υλικά .....  | 56 |
| 2.1.4.2) Ρυθμιστικά διαλύματα (Buffers).....   | 57 |
| 2.1.4.3) Αντιβιοτικά & Επαγωγέας ετερόλογης έκφρασης .....   | 57 |
| 2.1.4.4) Διαλύματα απομόνωσης παραγόμενων πολυεστερασών .....  | 58 |
| 2.1.4.5) Διαλύματα ηλεκτροφόρησης πολυεστερασών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου και χρωματισμού πηκτής.....        | 59 |
| 2.1.4.6) Διαλύτες χρωματογραφικών τεχνικών .....   | 59 |
| 2.1.5) Πολυμερικά υλικά.....   | 60 |
| 2.2) Μέθοδοι.....  | 61 |
| 2.2.1) Επιλογή μελετώμενων πολυεστερασών & Βιοπληροφορική ανακάλυψη γονιδίων νέων πολυεστερασών .....        | 61 |
| 2.2.2) Παραγωγή πολυεστερασών.....   | 61 |
| 2.2.2.1) Απομόνωση πλασμιδιακού DNA .....  | 61 |
| 2.2.2.2) Μετασχηματισμός πλασμιδίων στα επιδεικτικά κύτταρα <i>E. coli</i> .....                             | 62 |
| 2.2.2.3) Έκφραση πολυεστερασών.....  | 63 |
| 2.2.2.4) Παραλαβή εσωκυτταρικά παραγόμενων πολυεστερασών .....   | 66 |
| 2.2.2.5) Απομόνωση παραγόμενων πολυεστερασών .....   | 68 |
| 2.2.2.6) Μέτρηση πρωτεϊνικής συγκέντρωσης.....   | 71 |
| 2.2.2.7) Ηλεκτροφόρηση παραγόμενων πολυεστερασών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες ..... | 71 |
| 2.2.2.8) Συμπύκνωση παραγόμενων πολυεστερασών .....  | 74 |
| 2.2.2.9) Εξισορρόπηση παραγόμενων πολυεστερασών .....  | 76 |
| 2.2.3) Χαρακτηρισμός πολυεστερασών .....   | 77 |
| 2.2.3.1) Ποσοτικός προσδιορισμός παραγόμενων πολυεστερασών με τη μέθοδο Beer-Lambert .....                   | 77 |
| 2.2.3.2) Ποσοτικός προσδιορισμός παραγόμενων πολυεστερασών με τη μέθοδο Lowry .....                          | 78 |
| 2.2.3.3) Προσδιορισμός ενεργότητας παραγόμενων πολυεστερασών .....   | 79 |

|   |     |
|---|-----|
| 2.2.3.4) Μελέτη βέλτιστων συνθηκών δράσης παραγόμενων πολυεστερασών .....   | 80  |
| 2.2.4) Μελέτη δράσης πολυεστερασών σε πολυεστερικά υλικά (πλαστικά) .....   | 81  |
| 2.2.4.1) Αντιδράσεις παραγόμενων πολυεστερασών με πολυεστερικά υλικά .....  | 81  |
| 2.2.4.2) Μέτρηση απώλειας βάρους πολυεστερικών υλικών λόγω ενζυμικής δράσης...  | 82  |
| 2.2.4.3) Μέτρηση απελευθερωμένων προϊόντων υδρόλυσης με Υγρή Χρωματογραφία<br>Υψηλής Πίεσης (HPLC).....                               | 83  |
| 2.2.4.4) Μέτρηση απώλειας μοριακών βαρών με Χρωματογραφία Πηκτώματος (GPC)  | 85  |
| 3) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....  | 88  |
| 3.1) Γονίδια πολυεστερασών.....   | 88  |
| 3.1.1) Γονίδια βιβλιογραφικά επιλεγμένων πολυεστερασών .....  | 88  |
| 3.1.2) Γονίδια βιοπληροφορικά ανακαλυπτόμενων πολυεστερασών.....  | 89  |
| 3.1.3) Βιοπληροφορική ευθυγράμμιση των γονιδίων πολυεστερασών.....  | 90  |
| 3.1.4) Φυλογενετικό δέντρο πολυεστερασών.....   | 93  |
| 3.2) Ετερόλογη έκφραση πολυεστερασών .....  | 94  |
| 3.2.1) Ετερόλογη έκφραση πολυεστερασών ακολουθώντας συμβατικό πρωτόκολλο .....  | 94  |
| 3.2.2) Βελτιστοποίηση ετερόλογης έκφρασης πολυεστερασών με μεταβολή παραμέτρων  | 95  |
| 3.2.2.1) Βελτιστοποίηση ετερόλογης έκφρασης πολυεστεράσης Dmest .....   | 99  |
| 3.2.2.2) Βελτιστοποίηση ετερόλογης έκφρασης πολυεστεράσης PHAase .....  | 100 |
| 3.2.2.3) Βελτιστοποίηση ετερόλογης έκφρασης πολυεστεράσης PHOase .....  | 101 |
| 3.2.2.4) Βελτιστοποίηση ετερόλογης έκφρασης πολυεστεράσης PLAase .....  | 102 |
| 3.2.2.5) Βελτιστοποίηση ετερόλογης έκφρασης πολυεστεράσης PUase .....   | 103 |
| 3.2.2.6) Βελτιστοποίηση ετερόλογης έκφρασης πολυεστεράσης Se1JFR .....  | 104 |
| 3.2.3) Τελική έκφραση πολυεστερασών με βελτιστοποιημένα πρωτόκολλα.....   | 105 |
| 3.3) Εκτίμηση καθαρότητας παραγόμενων πολυεστερασών μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή<br>πολυακριλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες..... | 107 |
| 3.4) Χαρακτηρισμός πολυεστερασών .....  | 109 |
| 3.4.1) Προσδιορισμός ενεργότητας των μη χαρακτηρισμένων πολυεστερασών .....   | 109 |
| 3.4.2) Προσδιορισμός βέλτιστου pH δράσης (pH <sub>OPTIMUM</sub> ) των μη χαρακτηρισμένων<br>πολυεστερασών .....                       | 110 |
| 3.4.3) Προσδιορισμός βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης (T <sub>OPTIMUM</sub> ) των μη<br>χαρακτηρισμένων πολυεστερασών .....              | 113 |
| 3.5) Δράση πολυεστερασών σε πολυεστερικά υλικά (πλαστικά) .....   | 117 |
| 3.5.1) Επιλεγμένες συνθήκες αντιδράσεων των παραγόμενων πολυεστερασών με τα<br>πολυεστερικά υλικά.....                                | 117 |
| 3.5.2) Μεταβολή μάζας και πολυμερικών μεγεθών των πολυεστερικών υλικών λόγω<br>δράσης των παραγόμενων πολυεστερών.....                | 117 |

|  |            |
|--|------------|
| 3.5.2.1) Βιοαποικοδομητική δράση των παραγόμενων πολυεστερασών στη πολυεστερική σκόνη PCL .....                      | 117        |
| 3.5.2.2) Βιοαποικοδομητική δράση των παραγόμενων πολυεστερασών στη πολυεστερική σκόνη PBS.....                       | 119        |
| 3.5.2.3) Βιοαποικοδομητική δράση των παραγόμενων πολυεστερασών στη πολυεστερική σκόνη PHB .....                      | 120        |
| 3.5.2.4) Βιοαποικοδομητική δράση των παραγόμενων πολυεστερασών στη πολυεστερική σκόνη PLA .....                      | 121        |
| 3.5.2.5) Βιοαποικοδομητική δράση των παραγόμενων πολυεστερασών στη πολυεστερική σκόνη PU.....                        | 124        |
| 3.5.2.6) Βιοαποικοδομητική δράση των παραγόμενων πολυεστερασών στη πολυεστερική σκόνη άμορφου PET .....              | 125        |
| 3.5.2.7) Βιοαποικοδομητική δράση των παραγόμενων πολυεστερασών στη πολυεστερική σκόνη κρυσταλλικού PET.....          | 128        |
| <b>4) ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ , ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ &amp; ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ .....</b>                                    | <b>132</b> |
| 4.1) Συζήτηση αποτελεσμάτων και συμπεράσματα .....   | 132        |
| 4.1.1) Μελετώμενες πολυεστεράσες .....   | 132        |
| 4.1.1.1) Γονίδια πολυεστερασών.....  | 132        |
| 4.1.1.2) Ετερόλογη έκφραση μελετώμενων πολυεστερασών.....  | 134        |
| 4.1.1.3) Μοριακά βάρη και καθαρότητα των ετερόλογα εκφρασμένων πολυεστερασών .....                                   | 135        |
| 4.1.1.4) Βέλτιστες συνθήκες δράσης παραγόμενων πολυεστερασών .....   | 136        |
| 4.1.2) Δράση μελετώμενων πολυεστερασών σε πολυεστερικά υλικά (πλαστικά).....   | 138        |
| 4.1.2.1) Δράση μελετώμενων πολυεστερασών σε βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά.....  | 138        |
| 4.1.2.2) Δράση μελετώμενων πολυεστερασών σε μη βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά... ..                                      | 140        |
| 4.1.3) Γενικά συμπεράσματα.....  | 142        |
| 4.2) Μελλοντικές προτάσεις.....  | 143        |
| <b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>   | <b>146</b> |
| <b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α : Καμπύλη αναφοράς μεθόδου Lowry .....</b>  | <b>158</b> |
| <b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β : Μεθοδολογία προσδιορισμού ενεργότητας πολυεστερασών στο εστερικό υπόστρωμα rNPB.....</b>            | <b>159</b> |
| <b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ : Μοριακά βάρη και μοριακοί συντελεστές απορρόφησης των παραγόμενων πολυεστερασών .....</b>           | <b>159</b> |
| <b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Δ : Χρωματογράφημα (HPLC) πρότυπων δειγμάτων ενώσεων TPA, MHET &amp; BHET .....</b>                     | <b>160</b> |
| <b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ε : Καμπύλη αναφοράς μοριακών βαρών πολυμερικής σκόνης για την Χρωματογραφία Πηκτώματος (GPC) .....</b> | <b>161</b> |

|  |     |
|--|-----|
| ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΣΤ : Απαραίτητα αντιβιοτικά για την ετερόλογη έκφραση των πολυεστερασών .....        | 162 |
| ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ζ : Τελικές μάζες, μέσα μοριακά βάρη και συγκεντρώσεις των προϊόντων υδρόλυσης ..... | 162 |

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

|   |    |
|---|----|
| <b>Εικόνα 1:</b> Η παραγωγή πλαστικών παγκοσμίως από το 1950 μέχρι σήμερα, καθώς και η εκτίμηση παραγωγής τους για τις επόμενες δεκαετίες. [18] .....   | 5  |
| <b>Εικόνα 2 :</b> Σχηματική απεικόνιση των τρόπων ανακύκλωσης πλαστικών αποβλήτων. (Α) Πρωτογενής ανακύκλωση, (Β) Δευτερογενής Ανακύκλωση, (C) Τριτογενής Ανακύκλωση (D) Τεταρτογενής Ανακύκλωση – Αποτέφρωση [56].....   | 10 |
| <b>Εικόνα 3:</b> Σχεδιάγραμμα του μηχανισμού βιοαποικοδόμησης πλαστικού. Στάδια : 1) Βιο-φθορά 2) Βιο-κατακερματισμός 3) Αφομοίωση 4) Ανοργανοποίηση (υπό αερόβιες συνθήκες) [90]. .....  | 15 |
| <b>Εικόνα 4:</b> Φωτογραφία με τη μέθοδο ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης (TEM), του κυττάρου του βακτηρίου <i>Bacillus megaterium</i> με κόκκους πολυμερούς PHB σε συσσώρευση στο κυτταρόπλασμα του [105]. .....  | 20 |
| <b>Εικόνα 5:</b> Οι παραγόμενες (και εκτιμώμενες) ποσότητες βιοπλαστικών παγκοσμίως, 2019-2025 [113]. .....   | 21 |
| <b>Εικόνα 6:</b> Κατηγοριοποίηση των πλαστικών με κριτήριο την πηγή προέλευσής τους και την ικανότητα βιοαποικοδόμησης [30], [109].....   | 22 |
| <b>Εικόνα 7 :</b> Το μοντέλο «κλειδιού-κλειδαριάς» (πάνω) : Το υπόστρωμα (γκρι, πορτοκαλί) προσεγγίζει το ενεργό κέντρο του ενζύμου, στο οποίο και δεσμεύεται με απόλυτη συμπληρωματικότητα δημιουργώντας το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος, στη συνέχεια παράγονται τα επιθυμητά προϊόντα (πράσινο) κατά τη πραγματοποίηση της αντίδρασης, και τέλος τα προϊόντα απελευθερώνονται. Το μοντέλο επαγόμενης προσαρμογής (κάτω) : Το υπόστρωμα (πράσινο) προσεγγίζει το ενεργό κέντρο του ενζύμου, το οποίο μεταβάλλεται ελαφρώς ώστε να δεσμευτεί σε αυτό το υπόστρωμα, δημιουργείται το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος, παράγονται τα επιθυμητά προϊόντα (γκρι, πορτοκαλί) λόγω αντίδρασης και απελευθερώνονται [175]. ..... | 45 |
| <b>Εικόνα 8 :</b> Μοντέλο της τρισδιάστατης δομής της κουτινάσης του φυτοπαθογόνου μύκητα <i>Fusarium solani pisi</i> , που αποτελεί την πρώτη δομή κουτινάσης που προσδιορίστηκε. Χαρακτηριστικά διακρίνεται το ενεργό κέντρο (γαλάζια διακεκομμένη γραμμή), τα αμινοξέα της καταλυτικής τριάδας (φούζια ράβδοι) και οι δύο δισουλφιδικοί δεσμοί (κίτρινες ράβδοι-DS1,DS2) [149]. .....  | 47 |
| <b>Εικόνα 9 :</b> Αποικίες μετασηματισμένων στελεχών <i>E. coli</i> BL21 (DE3) σε τρυβλία Petri. ....   | 63 |
| <b>Εικόνα 10 :</b> Προκαλλιέργειες κυττάρων στελεχών <i>E. coli</i> πριν την επώαση τους overnight. ....  | 63 |
| <b>Εικόνα 11 :</b> Προκαλλιέργεια κυττάρων στελεχών <i>E. coli</i> πριν (αριστερά) και μετά (δεξιά) την επώαση overnight. Η εμφανής αύξηση της θολερότητας, υποδηλώνει βακτηριακή ανάπτυξη. ....  | 64 |
| <b>Εικόνα 12 :</b> Υγρές καλλιέργειες ανασυνδυασμένων στελεχών <i>E. coli</i> , διαφόρων θρεπτικών υλικών, πριν την επώαση. ....  | 65 |
| <b>Εικόνα 13 :</b> Καθίζηση κυττάρων, λόγω φυγοκέντρωσης, που εμπεριέχουν εσωκυτταρικά εκφρασμένο το επιθυμητό ένζυμο. ....   | 66 |
| <b>Εικόνα 14 :</b> Επαναίωρημενα κύτταρα που εμπεριέχουν την επιθυμητή πρωτεΐνη στον εσωκυτταρικό χώρο (αριστερά) και το παραλαμβανόμενο εσωκυτταρικό υγρό, με την επιθυμητή πρωτεΐνη και άλλα μόρια, έπειτα από λύση των κυττάρων και φυγοκέντρωση (δεξιά). ....   | 68 |
| <b>Εικόνα 15 :</b> Τα παραλαμβανόμενα κλάσματα της διαδικασίας καθαρισμού του εσωκυτταρικού υγρού, προς απομόνωση της επιθυμητής πρωτεΐνης, μέσω χρωματογραφίας IMAC. Η επιθυμητή πρωτεΐνη παραλαμβάνεται τελικώς στο ενζυμικό διάλυμα “Im. 100B”. ....   | 70 |
| <b>Εικόνα 16 :</b> Επίδραση της 2-μερκαπτοαιθανόλης και του SDS στην αποδιάταξη της πρωτεΐνης και την αρνητική φόρτισή της βάσει του μοριακού της βάρους. [195].....  | 72 |



|  |     |
|--|-----|
| <b>Εικόνα 17</b> : Αναπαράσταση των σταδίων της διαδικασίας ηλεκτροφόρησης δειγμάτων των παραγόμενων πολυεστερασών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες. ....   | 74  |
| <b>Εικόνα 18</b> : Προϊόντα της ενζυμικής υδρόλυσης του PET. Παρατηρείται η αύξηση της πολυανθρακικής αλυσίδας κατά σειρά των TPA, BHET, MHET (κατά μια EG), γεγονός που αυξάνει την υδροφοβικότητα, και συνεπώς την προσκόλληση στην στήλη για μεγαλύτερους χρόνους. [197] .....  | 84  |
| <b>Εικόνα 19</b> : Ευθυγράμμιση των αμινοξικών αλληλουχιών των γονιδίων των ενζύμων Dmest και PETase. ....   | 91  |
| <b>Εικόνα 20</b> : Ευθυγράμμιση των αμινοξικών αλληλουχιών των γονιδίων των ενζύμων LCC και PETase. ....   | 91  |
| <b>Εικόνα 21</b> : Ευθυγράμμιση των αμινοξικών αλληλουχιών των γονιδίων των ενζύμων Se1JFR και PETase.....   | 91  |
| <b>Εικόνα 22</b> : Ευθυγράμμιση των αμινοξικών αλληλουχιών των γονιδίων των ενζύμων Dmest και LCC. ....  | 92  |
| <b>Εικόνα 23</b> : Ευθυγράμμιση των αμινοξικών αλληλουχιών των γονιδίων των ενζύμων Se1JFR και LCC. ....   | 92  |
| <b>Εικόνα 24</b> : Φυλογενετικό δέντρο που κατασκευάστηκε βάσει της μεθόδου “Neighbor-Joining” [213]. Τα μήκη των «κλαδιών» (τιμές που αναγράφονται πάνω από αυτά) αντιπροσωπεύουν τις αποστάσεις ομολογίας των πολυεστερασών. Αυτές υπολογίστηκαν βάσει της μεθόδου “Poisson correction method” [214] και έχουν μονάδες «υποκαταστατών αμινοξέων ανά θέση». Η ανάλυση βασίστηκε σε 8 διαφορετικές αμινοξικές αλληλουχίες. Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού MEGA11 [215], [216]. ....              | 93  |
| <b>Εικόνα 25</b> : Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης ενζυμικών κλασμάτων των μελετώμενων ενζύμων και προσδιορισμός των μοριακών βαρών τους σε σύγκριση με το προχρωματισμένο πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους. Α) Πηκτή πολυακρυλαμιδίου έπειτα από ηλεκτροφόρηση των ενζυμικών δειγμάτων FoCut, LCC, Dmest, Se1JFR, PUase, PHOase, PETase και HiC (αριστερά προς δεξιά). Β) Πηκτή πολυακρυλαμιδίου έπειτα από ηλεκτροφόρηση των ενζυμικών δειγμάτων Prot. Gr., Prot. Bac., PUase και PHOase (αριστερά προς δεξιά)..... | 108 |

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

|   |    |
|---|----|
| <b>Πίνακας 1</b> : Ενδεικτικοί μικροοργανισμοί και ένζυμα που βιοαποικοδομούν το PLA, οι συνθήκες βιοαποικοδόμησης, και τα τελικά αποτελέσματα δράσης. ....   | 25 |
| <b>Πίνακας 2</b> : Ενδεικτικοί μικροοργανισμοί και ένζυμα που βιοαποικοδομούν το PHB, οι συνθήκες βιοαποικοδόμησης, και τα τελικά αποτελέσματα δράσης. ....   | 28 |
| <b>Πίνακας 3</b> : Ενδεικτικοί μικροοργανισμοί και ένζυμα που βιοαποικοδομούν το PBS, οι συνθήκες βιοαποικοδόμησης, και τα τελικά αποτελέσματα δράσης. ....   | 32 |
| <b>Πίνακας 4</b> : Ενδεικτικοί μικροοργανισμοί και ένζυμα που βιοαποικοδομούν το PET, οι συνθήκες βιοαποικοδόμησης, και τα τελικά αποτελέσματα δράσης. ....   | 36 |
| <b>Πίνακας 5</b> : Ενδεικτικοί μικροοργανισμοί και ένζυμα που βιοαποικοδομούν τη PU, οι συνθήκες βιοαποικοδόμησης, και τα τελικά αποτελέσματα δράσης. ....  | 40 |
| <b>Πίνακας 6</b> : Ενδεικτικοί μικροοργανισμοί και ένζυμα που βιοαποικοδομούν τη PCL, οι συνθήκες βιοαποικοδόμησης, και τα τελικά αποτελέσματα δράσης. ....   | 43 |
| <b>Πίνακας 7</b> : Σύσταση θρεπτικού μέσου LB.....  | 56 |
| <b>Πίνακας 8</b> : Σύσταση θρεπτικού μέσου 2×YT.....  | 56 |
| <b>Πίνακας 9</b> : Σύσταση θρεπτικού μέσου TB.....  | 56 |
| <b>Πίνακας 10</b> : Σύσταση & pH χρησιμοποιούμενων ρυθμιστικών διαλυμάτων.....  | 57 |
| <b>Πίνακας 11</b> : Χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά και οι συγκεντρώσεις αυτών. ....   | 58 |
| <b>Πίνακας 12</b> : Χρησιμοποιούμενος επαγωγέας ετερόλογης έκφρασης, συστατικά και τελικές συγκεντρώσεις χρήσης. ....   | 58 |
| <b>Πίνακας 13</b> : Χρησιμοποιούμενα διαλύματα και οι συγκεντρώσεις αυτών, κατά τη διαδικασία απομόνωσης των παραγόμενων πολυεστερασών, σε στήλη βαρύτητας TalonR ακινητοποιημένων ιόντων κοβαλτίου. .... | 58 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Πίνακας 14</b> : Χρησιμοποιούμενα διαλύματα κατά την ηλεκτροφόρηση των πολυεστερασών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου και κατά τον χρωματισμό της πηκτής.....                | 59  |
| <b>Πίνακας 15</b> : Χρησιμοποιούμενοι διαλύτες, ως κινητές φάσεις, στις χρωματογραφικές μεθόδους ανάλυσης HPLC και GPC. ....   | 59  |
| <b>Πίνακας 16</b> : Χαρακτηριστικά και ιδιότητες των πολυμερικών σκονών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη δράσης των παραγόμενων πολυεστερασών.....                     | 60  |
| <b>Πίνακας 17</b> : Πρωτόκολλο HPLC για τα πολυμερικά δείγματα άμορφου και κρυσταλλικού PET.....   | 85  |
| <b>Πίνακας 18</b> : Πρωτόκολλα GPC-IR για τα πολυμερικά δείγματα PBS,PHB,PLA,PU & PCL. ....  | 87  |
| <b>Πίνακας 19</b> : Προέλευση και αμινοξική ακολουθία των, βιβλιογραφικά επιλεγμένων, μελετώμενων πολυεστερασών. ....  | 88  |
| <b>Πίνακας 20</b> : Αμινοξική ακολουθία των, βιοπληροφορικά ανακαλυμμένων, μελετώμενων πολυεστερασών. ....   | 90  |
| <b>Πίνακας 21</b> : Αποτελέσματα ευθυγράμμισης των βιβλιογραφικά και βιοπληροφορικά επιλεγμένων ενζύμων ως προς το ένζυμο PETase.....                                    | 90  |
| <b>Πίνακας 22</b> : Αποτελέσματα ευθυγράμμισης των βιβλιογραφικά και βιοπληροφορικά επιλεγμένων ενζύμων ως προς το ένζυμο LCC. ....                                      | 92  |
| <b>Πίνακας 23</b> : Ενζυμική συγκέντρωση επιθυμητών πολυεστερασών ακολουθώντας συμβατικό πρωτόκολλο έκφρασης σε E. coli BL21 (DE3).....                                  | 94  |
| <b>Πίνακας 24</b> : Αποτελέσματα βελτιστοποίησης ετερόλογης έκφρασης της πολυεστεράσης Dmest με τις τελικές παραλαμβανόμενες ενζυμικές συγκεντρώσεις. ....               | 99  |
| <b>Πίνακας 25</b> : Αποτελέσματα βελτιστοποίησης ετερόλογης έκφρασης της πολυεστεράσης PHAase με τις τελικές παραλαμβανόμενες ενζυμικές συγκεντρώσεις. ....              | 100 |
| <b>Πίνακας 26</b> : Αποτελέσματα βελτιστοποίησης ετερόλογης έκφρασης της πολυεστεράσης PHOase με τις τελικές παραλαμβανόμενες ενζυμικές συγκεντρώσεις. ....              | 101 |
| <b>Πίνακας 27</b> : Αποτελέσματα βελτιστοποίησης ετερόλογης έκφρασης της πολυεστεράσης PLAase με τις τελικές παραλαμβανόμενες ενζυμικές συγκεντρώσεις. ....              | 102 |
| <b>Πίνακας 28</b> : Αποτελέσματα βελτιστοποίησης ετερόλογης έκφρασης της πολυεστεράσης PUase με τις τελικές παραλαμβανόμενες ενζυμικές συγκεντρώσεις. ....               | 103 |
| <b>Πίνακας 29</b> : Αποτελέσματα βελτιστοποίησης ετερόλογης έκφρασης της πολυεστεράσης Se1JFR με τις τελικές παραλαμβανόμενες ενζυμικές συγκεντρώσεις. ....              | 104 |
| <b>Πίνακας 30</b> : Τελικά χρησιμοποιούμενα πρωτόκολλα ετερόλογης έκφρασης πολυεστερασών. ....   | 106 |
| <b>Πίνακας 31</b> : Οι ποσότητες ενζύμου ανά όγκο καλλιέργειας για κάθε πολυεστεράση έπειτα από την ετερόλογη έκφρασή με τα βελτιστοποιημένα πρωτόκολλα. ....            | 106 |
| <b>Πίνακας 32</b> : Τελικές συγκεντρώσεις των ανασυνδυασμένων πολυεστερασών. ....  | 107 |
| <b>Πίνακας 33</b> : Προσδιοριζόμενα μοριακά βάρη των ετερόλογα εκφρασμένων πολυεστερασών μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες. .... | 109 |
| <b>Πίνακας 34</b> : Ενεργότητα παραγόμενων πολυεστερασών σε υπόστρωμα pNPB. ....   | 109 |
| <b>Πίνακας 35</b> : Βέλτιστες τιμές pH δράσης των παραγόμενων πολυεστερασών σε εστερικό υπόστρωμα pNPB. ....   | 113 |
| <b>Πίνακας 36</b> : Βέλτιστες τιμές θερμοκρασίας δράσης των παραγόμενων πολυεστερασών σε εστερικό υπόστρωμα pNPB.....  | 116 |

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

|  |     |
|--|-----|
| <b>Διάγραμμα 1</b> : Εξάρτηση της σχετικής ενεργότητας της πολυεστεράσης Dmest από το pH. ....   | 110 |
| <b>Διάγραμμα 2</b> : Εξάρτηση της σχετικής ενεργότητας της πολυεστεράσης PHOase από το pH. ....  | 111 |
| <b>Διάγραμμα 3</b> : Εξάρτηση της σχετικής ενεργότητας της πολυεστεράσης PUase από το pH. ....   | 111 |
| <b>Διάγραμμα 4</b> : Εξάρτηση της σχετικής ενεργότητας της πολυεστεράσης Se1JFR από το pH. ....  | 112 |
| <b>Διάγραμμα 5</b> : Εξάρτηση της σχετικής ενεργότητας της πολυεστεράσης Dmest από τη θερμοκρασία (T).<br>.....  | 114 |
| <b>Διάγραμμα 6</b> : Εξάρτηση της σχετικής ενεργότητας της πολυεστεράσης PHOase από τη θερμοκρασία (T).<br>.....   | 114 |
| <b>Διάγραμμα 7</b> : Εξάρτηση της σχετικής ενεργότητας της πολυεστεράσης PUase από τη θερμοκρασία (T).<br>.....  | 115 |
| <b>Διάγραμμα 8</b> : Εξάρτηση της σχετικής ενεργότητας της πολυεστεράσης Se1JFR από τη θερμοκρασία (T).<br>.....   | 115 |
| <b>Διάγραμμα 9</b> : Μεταβολή της μάζας και των μέσων μοριακών βαρών της πολυεστερικής σκόνης PCL λόγω ενζυμικής δράσης των μελετώμενων πολυεστερασών (ND : Not Determined).....                                 | 118 |
| <b>Διάγραμμα 10</b> : Μεταβολή της μάζας και των μέσων μοριακών βαρών της πολυεστερικής σκόνης PBS λόγω ενζυμικής δράσης των μελετώμενων πολυεστερασών (ND : Not Determined).....                                | 119 |
| <b>Διάγραμμα 11</b> : Μεταβολή της μάζας και των μέσων μοριακών βαρών της πολυεστερικής σκόνης PHB λόγω ενζυμικής δράσης των μελετώμενων πολυεστερασών. ....   | 120 |
| <b>Διάγραμμα 12</b> : Μεταβολή της μάζας και των μέσων μοριακών βαρών της πολυεστερικής σκόνης PLA λόγω ενζυμικής δράσης των μελετώμενων πολυεστερασών. ....   | 121 |
| <b>Διάγραμμα 13</b> : Μεταβολή της μάζας και των μέσων μοριακών βαρών της πολυεστερικής σκόνης PU λόγω ενζυμικής δράσης των μελετώμενων πολυεστερασών. ....  | 124 |
| <b>Διάγραμμα 14</b> : Μεταβολή της μάζας και της πολυεστερικής σκόνης άμορφου PET και η συνολική συγκέντρωση απελευθερωμένων προϊόντων υδρόλυσης, λόγω ενζυμικής δράσης των μελετώμενων πολυεστερασών. ....      | 126 |
| <b>Διάγραμμα 15</b> : Συγκεντρώσεις των απελευθερωμένων προϊόντων υδρόλυσης της πολυμερικής σκόνης άμορφου PET, TPA MHET και BHET. ....  | 127 |
| <b>Διάγραμμα 16</b> : Μεταβολή της μάζας και της πολυεστερικής σκόνης κρυσταλλικού PET και η συνολική συγκέντρωση απελευθερωμένων προϊόντων υδρόλυσης, λόγω ενζυμικής δράσης των μελετώμενων πολυεστερασών. .... | 128 |
| <b>Διάγραμμα 17</b> : Συγκεντρώσεις των απελευθερωμένων προϊόντων υδρόλυσης της πολυμερικής σκόνης κρυσταλλικού PET, TPA MHET και BHET. ....   | 129 |

# 1) ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 1.1) Εισαγωγή

Τα πλαστικά αποτελούν ένα αναπόσπαστο κομμάτι της σύγχρονης ζωής και η απουσία τους από αυτή φαντάζει αδύνατη. Αυτά έκαναν το ταξίδι στο διάστημα πραγματικότητα, έσωσαν ανθρώπινες ζωές μέσω επαναστατικών ιατρικών μηχανημάτων και προστατεύουν καθημερινά τους ανθρώπους με τη χρήση κατάλληλα κατασκευασμένου εξοπλισμού [1]. Οι ανέσεις που προσφέρουν τα πλαστικά στον άνθρωπο βελτιώνουν την ποιότητα της ζωής, γεγονός που οδηγεί σε συνεχή αύξηση της αποζήτησής τους.

Η τάση αυτή, για συνεχή χρήση πλαστικού, έχει κατευθύνει την παγκόσμια βιομηχανία σε ακατάπαυτη παραγωγή πλαστικών μιας χρήσης. Εκτιμάται ότι περίπου το 40% των πλαστικών που χρησιμοποιούνται από τον καθένα είναι μιας χρήσης. Στη κατηγορία αυτή ανήκουν οι πλαστικές σακούλες μεταφοράς, οι συσκευασίες φαγητού, τα πλαστικά μπουκάλια, τα καθαριστικά μαντηλάκια, τα καλαμάκια και δεκάδες άλλα αντικείμενα που χρησιμοποιούνται καθημερινά. Τα πλαστικά μιας χρήσης είναι κατασκευασμένα καταλλήλως με στόχο την απόρριψη τους αμέσως μετά τη χρήση τους [2]. Είναι γνωστό όμως ότι τα πλαστικά είναι υλικά με έντονες μηχανικές ιδιότητες και μεγάλη αντίσταση στην χημική και βιολογική αποικοδόμηση [3], γεγονός που εμποδίζει την διάσπαση τους έπειτα από την απόρριψη τους, παρά μόνον με πολύ αργούς ρυθμούς [1]. Ένα πλαστικό μπουκάλι, που εναποτίθεται στο περιβάλλον, χρειάζεται από 70 έως 450 έτη για να αποσυντεθεί πλήρως ενώ αντίστοιχα μια πλαστική σακούλα μπορεί να χρειαστεί μέχρι και 1000 έτη [4]. Η συνεχής λοιπόν χρήση των πλαστικών μιας χρήσης σε συνδυασμό με την αδυναμία διάσπασής τους, έχει ως αποτέλεσμα την συσσώρευσή τους στο περιβάλλον.

Η συσσώρευση των πλαστικών στο περιβάλλον δεν οφείλεται μόνο στην ασύστολη χρήση και απόρριψη των πλαστικών μιας χρήσης. Αν και είναι δύσκολο να γίνει αντιληπτό με το ανθρώπινο μάτι, σημαντική είναι και η συμβολή των μικροπλαστικών στην ενίσχυσή της συσσώρευσης αυτής. Συγκεκριμένα, τα μικροπλαστικά αποτελούν πλαστικά σωματίδια τα οποία είτε κατασκευάζονται συνειδητά, είτε προέρχονται από μερική διάσπαση άλλων μεγαλύτερων πλαστικών πηγών. Έτσι πέραν από τα πλαστικά, και τα μικροπλαστικά απελευθερώνονται στο περιβάλλον, στο οποίο όχι μόνο συσσωρεύονται αλλά και διασκορπίζονται ευκολότερα, κυρίως μέσω των υδάτινων περιβαλλόντων, όπως τα ποτάμια και τα ρυάκια αλλά και του αέρα [5].

Η τάση συσσώρευσης πλαστικών στο περιβάλλον ακολουθεί εκθετική αύξηση. Συγκεκριμένα, η ποσότητα πλαστικών αποβλήτων αυξήθηκε μέσα σε μια δεκαετία, στις αρχές του 2000, περισσότερο από ότι τα προηγούμενα 40 χρόνια. Σήμερα, παράγονται περίπου 300 εκατομμύρια τόνοι πλαστικών αποβλήτων ετησίως, μέγεθος το οποίο ισοδυναμεί με το βάρος όλου του ανθρώπινου πληθυσμού [6]. Περίπου 12

δισεκατομμύρια τόνοι πλαστικών αποβλήτων εκτιμάται ότι θα βρίσκονται συσσωρευμένα στις χωματερές ή ελεύθερα στα διάφορα φυσικά περιβάλλοντα, μέχρι το 2050, αριθμός υπερδιπλάσιος του αντίστοιχου σημερινού. Στα υδάτινα περιβάλλοντα αντίστοιχα αναμένεται, την ίδια χρόνια, συσσώρευση μικροπλαστικών, βάρους 150 τόνων, ποσότητα τριπλάσια αυτής του 2015 [4]. Η Κίνα εκτιμάται ότι θα κυριαρχεί στην παραγωγή πλαστικών αποβλήτων μέχρι το 2025, με 1.397.755 τόνους τη μέρα, ακολουθούμενη από την Ινδία και την Βραζιλία με 376.639 και 333.960 τόνους ημερησίως, αντίστοιχα [7]. Γίνεται λοιπόν αντιληπτό ότι η «μόλυνση των πλαστικών» είναι έντονη και εμφανής σε κάθε άκρη της Γης, με το βασικό ερώτημα να αποτελεί η επίδραση που έχει στα διάφορα περιβάλλοντα, στα έμβια όντα που εμπεριέχονται σε αυτά και στον άνθρωπο.

Οι συμβατικοί τρόποι διαχείρισης των πλαστικών αποβλήτων, όπως η υγειονομική ταφή και η ανακύκλωση (μηχανική, χημική, αποτέφρωση), προσπαθούν να επιβραδύνουν τον εκθετικό ρυθμό αύξησης της συσσώρευσης των πλαστικών στον πλανήτη και του διασκορπισμού τους στα διάφορα περιβάλλοντα, αλλά δεν αποτελούν πανάκεια του προβλήματος, αφού εμφανίζουν υψίστης σημασίας οικονομικά και περιβαλλοντικά προβλήματα. Στην σημερινή «πλαστική εποχή» λοιπόν, είναι, επιτακτικότερη από ποτέ, η ανάγκη εφαρμογής και βελτιστοποίησης νέων διεργασιών διαχείρισης των πλαστικών, οι οποίες δεν θα παρουσιάζουν τα μειονεκτήματα των ήδη υπάρχοντων, με χαρακτηριστικό παράδειγμα την ενζυμική αποικοδόμησή τους (βιοαποικοδόμηση).

## 1.2) Πλαστική Εποχή

### 1.2.1) Πλαστικά & Μικροπλαστικά

#### 1.2.1.1) Πλαστικά

Αποτελούμενα από ένα ευρύ φάσμα συνθετικών και ημισυνθετικών, ανόργανων και οργανικών, κυρίως, ενώσεων, ως πλαστικά ορίζονται τα υλικά που έχουν την ικανότητα να διαμορφώνονται σε συμπαγή αντικείμενα πληθώρας σχημάτων και μεγεθών. Εξάλλου στην παγκόσμια επιστημονική ορολογία, η λέξη «πλαστικό» (plastic) έχει ελληνικές ρίζες, προερχόμενη από την λέξη «πλαστικός», που σημαίνει «αυτός που δύναται να τροποποιηθεί σε διαφορετικά σχήματα» [8]. Επιπροσθέτως, σύμφωνα με τη Διεθνή Ένωση Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας (International Union of Pure and Applied Chemistry – IUPAC) ως πλαστικό χαρακτηρίζεται «το πολυμερικό υλικό που πιθανώς να εμπεριέχει άλλες επιπρόσθετες ουσίες για τη βελτίωση της απόδοσης ή/και τη μείωση του κόστους παραγωγής του» [9].

Οι παραπάνω ορισμοί αφορούν τα «σύγχρονα» πλαστικά, τα οποία είναι, με λίγα λόγια, τεχνητά πολυμερή, η έρευνα για την σύνθεση των οποίων ξεκίνησε παραπάνω από μισό

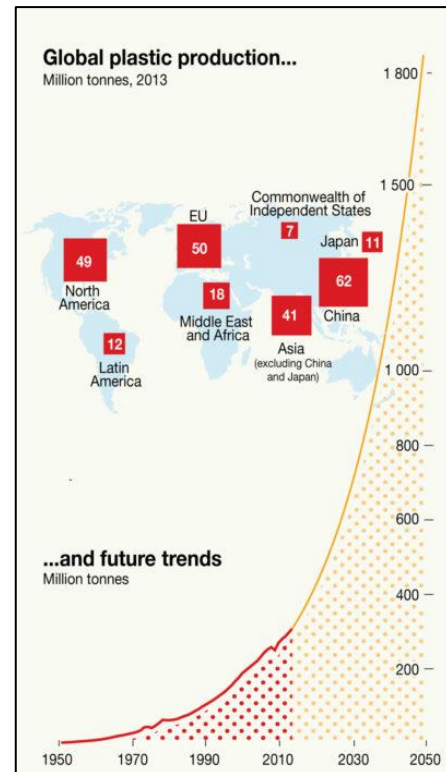
αιώνα πριν [8]. Αν και τα πλαστικά θεωρούνται ως μια συγκαιρινή ανακάλυψη, προϋπήρχαν ως «φυσικά πολυμερή» στο περιβάλλον με χαρακτηριστικά παραδείγματα το κεχριμπάρι, τα κελύφη χελωνών και τα κέρατα ζώων [10]. Το πρώτο τεχνητό πλαστικό, η παρκετίνη (κελλουλοΐτης), συνετέθη από τον Άγγλο μεταλλουργό Αλεξάντερ Παρκς (Alexander Parkes) το 1860, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το φυσικό πολυμερές νιτροκυτταρίνη (βαμβακοπυρίτιδα), αναμιγμένη με πληθώρα ελαίων, ως πλαστικοποιητές που προσφέρουν στο τελικό υλικό μαλακή και εύκαμπτη δομή, μικρές ποσότητες διαλυτών οργανικής φύσεως καθώς και μέταλλα του χλωρίου, με σκοπό την ενίσχυση της θερμικής ανθεκτικότητας του υλικού [11]. Το 1907, ο Βέλγος χημικός Λέο Μπέικελαντ (Leo Hendrik Arthur Baekeland) κατασκεύασε το πρώτο μαζικής παραγωγής συνθετικό πολυμερές, το βακελίτη, από φαινόλη και φορμαλδεΰδη [12]. Ο βακελίτης αποτέλεσε μια επαναστατική ανακάλυψη στον τομέα των υλικών, αφού οι μηχανικές ιδιότητες του, προσέφεραν την δυνατότητα σχηματισμού και παραγωγής πληθώρας αντικειμένων [13], όπως κάμερες και τηλέφωνα [10]. Έτσι παρά το χαρακτηρισμό της παρκετίνης ως το πρώτο παραγόμενο πλαστικό, ως «πατέρας των πλαστικών» αναγνωρίζεται ο Μπέικελαντ (Baekeland). Οι παραπάνω ανακαλύψεις σηματοδοτούν και την έναρξη της έρευνας για την ανάπτυξη νέων πολυμερών από τις χημικές βιομηχανίες, ενώ με την έλευση του Β' Παγκοσμίου Πολέμου η βιομηχανία των πλαστικών επεκτάθηκε σημαντικά (300% αύξηση της παραγωγής πλαστικών) [14] και η λεγόμενη «εποχή των πλαστικών» ξεκίνησε, με την παραγωγή τους να αυξάνεται εκθετικά [4].

Τα σύγχρονα πλαστικά, ως συνθετικά πολυμερή, αποτελούνται από εκατοντάδες ή και χιλιάδες επαναλαμβανόμενες δομικές μονάδες, που ονομάζονται μονομερή και συνδέονται μεταξύ τους με χημικούς δεσμούς μέσω της διαδικασίας του πολυμερισμού. Λόγω της σημαντικά αυξανόμενης παραγωγής των πλαστικών, απαραίτητη καθίσταται η κατηγοριοποίηση τους, η οποία γίνεται βάσει του πολυμερικού σκελετού, των μονομερών, των ιδιοτήτων, της διαδικασίας πολυμερισμού και της χρήσης τους. Τα παραδοσιακά πλαστικά συντίθενται από πετροχημικά μονομερή, που προέρχονται από ορυκτά έλαια, φυσικό αέριο και γαιάνθρακα, ενώ κυρίως είναι στερεά με άμορφη ή ημι-κρυσταλλική δομή ή υψηλού ιξώδους υγρά [4], [15].

Βασικά χαρακτηριστικά των πλαστικών, τα οποία τους προσφέρουν ποικιλομορφία σαν υλικά, είναι η ανθεκτικότητα στη φθορά και το νερό, η ευκαμψία, το μικρό βάρος, η αντίσταση στη θερμοκρασία, τα χημικά και το φως καθώς και οι χαμηλού κόστους διεργασίες παραγωγής τους [9], [16], [3]. Για το λόγο αυτό, αποτελούν βασικοί πυλώνες και «υλικά-κλειδιά» στους τομείς της συσκευασίας, των κατασκευών, των μεταφορών και των ιατρικών συσκευών. Οι παραπάνω εφαρμογές, πέραν από άμεσα αποτελέσματα, προσφέρουν και μακροπρόθεσμες θετικές απόρροιας. Αναλυτικότερα, τα πλαστικά συμβάλλουν σημαντικά, στην μείωση των οργανικών υπολειμμάτων τροφών λόγω των πλαστικών συσκευασιών που προστατεύουν και περιορίζουν την διαρροή φαγητού, στην ενεργειακή εξοικονόμηση στο τομέα των μέσων μεταφοράς με αποτέλεσμα τη μείωση των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου (χαρακτηριστικό

παράδειγμα αποτελούν τα πλαστικά εξαρτήματα αυτοκινήτων), ενώ τέλος ο τομέας της βιομηχανίας των πλαστικών προσέφερε, μόνο το 2015, παραπάνω από 1,5 εκατομμύριο θέσεις εργασίας σε ανθρώπους στην Ευρωπαϊκή Ένωση [3].

Λόγω της πληθώρας εφαρμογών τους και της βελτίωσης της ποιότητας ζωής που προσφέρουν, τα πλαστικά αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της σύγχρονης καθημερινότητας. Από τη δεκαετία του 50' μέχρι σήμερα, εκτιμάται ότι η παραγωγή πλαστικών παρουσιάζει ετήσια αύξηση 9%. Συγκεκριμένα ξεκινώντας από 1,7 εκατομμύρια τόνους παραγόμενων πλαστικών το 1950, η παραγωγή «άγγιξε», το 2018, τους 360 εκατομμύρια τόνους παγκοσμίως [17], ενώ εκτιμάται ότι ο αριθμός αυτός θα διπλασιαστεί στις επόμενες δύο δεκαετίες (Εικόνα 1, [18]) [19]. Από αυτά, στην Ευρωπαϊκή Ένωση, το πολυαιθυλένιο (PE), το πολυπροπυλένιο (PP), το πολυβινυλοχλωρίδιο (PVC), η πολυουρεθάνη (PUR), το τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο (PET) και το πολυστυρένιο (PS), καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο όγκο παραγωγής με 29,8 %, 19,4 %, 10%, 7,9%, 7,9% και 6,2% επί της συνολικής παραγωγής, το 2019, αντίστοιχα [20].



**Εικόνα 1:** Η παραγωγή πλαστικών παγκοσμίως από το 1950 μέχρι σήμερα, καθώς και η εκτίμηση παραγωγής τους για τις επόμενες δεκαετίες. [18]

### 1.2.1.2) Μικροπλαστικά

Τα μικροπλαστικά αποτελούν σωματίδια πλαστικού τα οποία συναντώνται σε σχεδόν όλα τα περιβάλλοντα, κυρίως στα υδάτινα. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει κάποιος επίσημος ορισμός για το «μικροπλαστικό» [21], αφού αποτελεί ένα σύγχρονο φλέγον θέμα και οι έρευνες επί αυτού δεν έχουν ολοκληρωθεί πλήρως. Παρ' όλα αυτά, ανεπίσημα, με τον όρο μικροπλαστικά ορίζονται τα πλαστικά σωματίδια με μέγεθος μικρότερο των 5 χιλιοστών (<5 mm) [22]. Η πρώτη έρευνα για τα πλαστικά αυτά σωματίδια πραγματοποιήθηκε το 1972, κατά την ανάλυση υδάτων από τις ακτές της νότιας Αγγλίας [23].

Η κατηγοριοποίηση των μικροπλαστικών γίνεται βάσει της προέλευσης του μεγέθους τους (<5 mm), και συγκεκριμένα εάν κατασκευάστηκαν εξ αρχής ή κατέληξαν στο μέγεθος αυτό, σε πρωτογενή και δευτερογενή. Τα πρωτογενή μικροπλαστικά αποτελούν σωματίδια τα οποία εκ κατασκευής έχουν μέγεθος μικρότερο των 5 χιλιοστών (<5 mm), ενώ τα δευτερογενή μικροπλαστικά έχουν καταλήξει στο αντίστοιχο μέγεθος από την διάσπαση μεγαλύτερων πλαστικών [24].

Συνεπώς, τα πρωτογενή μικροπλαστικά απελευθερώνονται απευθείας στο περιβάλλον με την μορφή μικρών σωματιδίων, και έτσι θεωρείται ότι προσθέτουν ένα νέο πλαστικό σωματίδιο στο περιβάλλον [23]. Χαρακτηριστικά παραδείγματα πρωτογενών μικροπλαστικών αποτελούν τα πρόσθετα πλαστικά σωματίδια σε προϊόντα καθαρισμού (οικιακά καθαριστικά), περιποίησης (καθαριστικά προσώπου, οδοντόκρεμες) και καλλυντικά (κρέμες απολέπισης) [25], η προσθήκη των οποίων συμβάλλει στη βελτίωση της λειτουργικότητας των προϊόντων. Παράλληλα πρωτογενή μικροπλαστικά είναι και τα πλαστικά σωματίδια που απελευθερώνονται στο περιβάλλον ως παραπροϊόντα κατά τη παραγωγή, χρήση ή συντήρηση πλαστικών αντικειμένων, όπως κατά το πλύσιμο συνθετικών υφασμάτων [24] και κατά τη χρήση χρωμάτων ή τεχνητού χλοοτάπητα [23].

Αντιθέτως τα δευτερογενή μικροπλαστικά «δημιουργούνται» στο περιβάλλον από κάποια μεγαλύτερη πηγή πλαστικού, όταν αυτό εκτίθεται σε χημικές, βιολογικές και φυσικές διεργασίες. Αισθητή είναι η παρουσία τους στα υδάτινα περιβάλλοντα, στα οποία προκύπτουν λόγω έκθεσης των υπαρχόντων πλαστικών στην υπεριώδη ηλιακή ακτινοβολία (φωτοαποικοδόμηση) σε συνδυασμό με τις υψηλές ή χαμηλές (κύκλος ψύξης-απόψυξης) θερμοκρασίες των υδάτων. Η αποικοδόμηση προκαλεί μείωση της δομικής ακεραιότητας του πολυμερούς με αποτέλεσμα τον κατακερματισμό του στα μικροσκοπικά αυτά πλαστικά σωματίδια. Τέτοια πλαστικά είναι κυρίως απόβλητα που απορρίπτονται στο θαλάσσιο περιβάλλον, όπως πλαστικές σακούλες, μπουκάλια ή δίχτυα ψαρέματος [24]–[28].

Σε όλη την επιστημονική κοινότητα κυριαρχεί η αντίληψη ότι «τα μικροπλαστικά βρίσκονται παντού». Ωκεανογράφοι εκτιμούν ότι στα υδάτινα περιβάλλοντα, στην επιφάνεια ποταμών και ωκεανών, επιπλέουν από 15 έως 51 τρισεκατομμύρια σωματίδια μικροπλαστικών [29]. Μικροπλαστικά, πέραν από τα υδάτινα περιβάλλοντα, βρίσκονται διεσπαρμένα και στον αέρα με αποτέλεσμα να καταλήγουν στον ανθρώπινο οργανισμό μέσω της αναπνοής. Εκτιμάται ότι, παιδιά και ενήλικες μπορούν να εισπνέουν καθημερινά έως και 100.000 μικροπλαστικά [21]. Τέλος έρευνες δείχνουν ότι περίπου το 6% των υγρών προϊόντων της Ευρωπαϊκής Ένωσης περιέχει μικροπλαστικά [30].

### 1.2.2) Επιπτώσεις των πλαστικών και των μικροπλαστικών στο περιβάλλον και στον άνθρωπο

Όπως προαναφέρθηκε (1.1) Εισαγωγή), η συσσώρευση των πλαστικών στον πλανήτη, αποτελεί ένα σύγχρονο περιβαλλοντικό πρόβλημα με εκθετικές τάσεις αύξησης. Το παραπάνω συνεπάγεται την ύπαρξη των πλαστικών και μικροπλαστικών σε όλα τα περιβάλλοντα, διαταράσσοντας την οικολογική ισορροπία τους.

Εκατοντάδες χιλιάδες θαλάσσια ζώα χάνουν τη ζωή τους λόγω της παγίδευσής τους σε πλαστικά απόβλητα [3]. Συγκεκριμένα, σχεδόν το 80% των θαλάσσιων ζώων που εγκλωβίζονται σε πλαστικό, πεθαίνουν [30]. Η κατάποση πλαστικών υπολειμμάτων,



στην επιφάνεια των ωκεανών, από ψάρια και θαλάσσια πουλιά, είναι πιθανό να οδηγήσει σε θάνατο είτε νευρολογικές δυσλειτουργίες [31]. Βασικές συνέπειες της κατάποσης αποτελούν το φράξιμο και ο εσωτερικός τραυματισμός του πεπτικού σωλήνα των ζώων, με αποτέλεσμα την δυσκολία κατά την κατανάλωση τροφής που οδηγεί σε σημαντική μείωση της πρόσληψης των απαραίτητων, για την ανάπτυξη τους, θρεπτικών συστατικών [30]. Εκτός των μακροπλαστικών, εξίσου σημαντική είναι η επιρροή των μικροπλαστικών στην θαλάσσια χλωρίδα και πανίδα. Η ύπαρξη μικροπλαστικών στην επιφάνεια της θάλασσας επηρεάζει την μετάδοση του φωτός στο νερό, η οποία σχετίζεται άμεσα με την διαδικασία της φωτοσύνθεσης των φυτοπλαγκτόν. Μέσω της φωτοσύνθεσης, τα φυτοπλαγκτόν προσφέρουν οξυγόνο και οργανική ύλη στα θαλάσσια οικοσυστήματα, συστατικά τα οποία συμβάλλουν στην ομαλή ανάπτυξη των οργανισμών. Συνεπώς η μόλυνση των υδάτινων περιβαλλόντων με πλαστικά διαταράσσει την ισορροπία τους προκαλώντας προβλήματα ανάπτυξης, ακόμα και επιβίωσης, στα έμβια όντα. Παράλληλα, πολλά ήδη ζωοπλαγκτόν καταναλώνουν τα μικροπλαστικά ως πηγή άνθρακα. Το παραπάνω προκαλεί πρόβλημα στους θαλάσσιους οργανισμούς, αφού για πολλούς από αυτούς τα ζωοπλαγκτόν αποτελούν βασική τροφή [32]. Γίνεται λοιπόν αντιληπτό ότι τα μικροπλαστικά εισέρχονται στο πυλώνα της τροφικής αλυσίδας των υδάτινων οικοσυστημάτων, και μεταφέρονται σταδιακά στα υψηλότερα επίπεδα, παρεμβαίνοντας στην ομαλή λειτουργία τους [28]. Συμπερασματικά, η συσσώρευση πλαστικών και μικροπλαστικών στον θαλάσσιο (υδροφόρο) ορίζοντα επηρεάζει άμεσα ή έμμεσα την παραγωγικότητα (για παράδειγμα μείωση αριθμού των αυγών και προνυμφών των στρειδιών [33]) και τη δυναμική των οικοσυστημάτων.

Λαμβάνοντας υπ' όψη ότι οι περισσότερες ανθρώπινες δραστηριότητες που περιλαμβάνουν την χρήση πλαστικών λαμβάνουν χώρα στο έδαφος καθώς και ότι σε αυτό απορρίπτονται αποκλειστικά τα πλαστικά απόβλητα, γίνεται αντιληπτό ότι τα επίγεια οικοσυστήματα επηρεάζονται άμεσα από την συσσώρευση των πλαστικών, ως άμεσοι αποδέκτες [34], [35]. Περίπου το 7% του ξηρού βάρους των καλλιεργήσιμων Ευρωπαϊκών εδαφών καταλαμβάνεται από σωματίδια πλαστικών τα οποία μεταβάλλουν σημαντικά τις βιοφυσικές ιδιότητές τους. Συγκεκριμένα η παρουσία μικροπλαστικών εκτιμάται ότι μειώνει το pH του εδάφους και προκαλεί μεταστροφές στην σταθερότητα του. Οι μεταβολές αυτές επηρεάζουν την υπόγεια χλωρίδα, τη βιομάζα [36], αλλά κυρίως τους οργανισμούς που αναπτύσσονται στο υπέδαφος, με χαρακτηριστικό παράδειγμα τους γαιοσκώληκες. Οι γαιοσκώληκες διαδραματίζουν ρόλο υψίστης σημασίας στην εδαφική τροφική αλυσίδα ενώ συμβάλλουν αισθητά στην διατήρηση ισορροπίας στα επίγεια οικοσυστήματα, βοηθώντας το μεταβολισμό, την γονιμότητα και την λειτουργικότητα του εδάφους [37]. Τελευταίες έρευνες υποστηρίζουν ότι μεγάλη ποσότητα μικροπλαστικών που συσσωρεύονται επίγεια καταναλώνονται από τους γαιοσκώληκες και άλλους επίγειους οργανισμούς δημιουργώντας τους αναπτυξιακά προβλήματα [38]. Παρ' ότι η «μόλυνση των πλαστικών», ποσοτικά, επικρατεί στα χερσαία οικοσυστήματα συγκριτικά με τα υδάτινα, η αφετηρία για μελέτες σχετικά με τις επιδράσεις της τόσο στο ίδιο το έδαφος

όσο και στην γλωρίδα και πανίδα του, τέθηκε τα τελευταία χρόνια [34], [38], [39], με αυτές να καταλήγουν σε εντυπωσιακά αποτελέσματα.

Όπως γίνεται κατανοητό, η μόλυνση των οικοσυστημάτων με πλαστικά και μικροπλαστικά, έχει εισχωρήσει στην τροφική αλυσίδα με αποτέλεσμα να επηρεάζει έμμεσα τον τελικό αποδέκτη, τον άνθρωπο. Μικροπλαστικά έχουν βρεθεί σε πληθώρα εμπορικών ψαριών και στρειδιών που έχουν καταναλωθεί, με αποτέλεσμα να προσβάλλουν το ανθρώπινο εντερικό σύστημα [33], [40]. Αρκετές μελέτες, σε ποντίκια, έχουν αποδείξει ότι τα μικροπλαστικά στο εντερικό σύστημα μπορούν να προκαλέσουν διαταραχές αμινοξέων, χολικών οξέων και ηπατικών λιπιδίων, ενώ παράλληλα μεταβάλλουν το περιβάλλον ανάπτυξης μικροβίων του εντέρου, απαραίτητων για την ομαλή λειτουργία του. Επιπροσθέτως, όπως έχει προαναφερθεί, μέσω της εισπνοής ο ανθρώπινος οργανισμός προσβάλλεται από ποσότητες μικροπλαστικών. Έρευνες δείχνουν ότι οι εργαζόμενοι σε βιομηχανίες συνθετικών υφασμάτων ή παρασκευής πλαστικών (για παράδειγμα πολυβυνιλοχλωριδίου), που εκτίθενται σε υψηλές συγκεντρώσεις πρωτογενών μικροπλαστικών, είναι πιθανό να εμφανίσουν υψηλά ποσοστά θνησιμότητας [41], που σχετίζονται με τον καρκίνο του πνεύμονα [42], του στομάχου ή του οισοφάγου [43], ενώ τείνουν να εμφανίζουν συχνά πνευμονικές παθήσεις. Τέλος η ύπαρξη μικροπλαστικών στο εσωτερικό του ανθρώπινου οργανισμού προκαλεί νευροτοξικότητα, διαταραχή του ενδοκρινικού συστήματος και αναπαραγωγικές ανωμαλίες [33].

### 1.2.3) Διαχείριση πλαστικών στην σύγχρονη εποχή

Η ασταμάτητη συσσώρευση των πλαστικών στο περιβάλλον άρχισε να γίνεται αισθητή στο τέλος της δεκαετίας του 60', με έρευνες που επικεντρώθηκαν στην ανάλυση πλαγκτόν από υδάτινα οικοσυστήματα [44]. Μέχρι εκείνη τη περίοδο βασικός τρόπος διαχείρισης των πλαστικών αποβλήτων αποτελούσε η μαζική αποθήκευσή τους σε χωματερές. Η διαδικασία είναι αρκετά απλοϊκή και αφορά τη ταφή των αποβλήτων σε ένα μεγάλο κενό στο εσωτερικό του εδάφους. Όταν ο κενός χώρος γεμίσει, τα απόβλητα καίγονται και το κενό καλύπτεται με χώμα [45]. Η ιδέα των χωματερών έχει δοκιμαστεί σε βάθος χρόνου και έχει εξελιχθεί λειτουργικά με τη δημιουργία ειδικά, πλέον, διαμορφωμένων χώρων για την ταφή των πλαστικών απορριμμάτων. Οι Χώροι Υγειονομικής Ταφής Απορριμμάτων (ΧΥΤΑ) αποτελούν μια, πιο φιλική προς το περιβάλλον, μορφή χωματερών, με στεγανοποίηση του χώρου αποθήκευσης έτσι ώστε να υπάρχει πλήρης απομόνωση των αποβλήτων από το φυσικό περιβάλλον (κυρίως το έδαφος μέσω του οποίου εισέρχονται στον υδροφόρο ορίζοντα και τις αστικές περιοχές) [46]. Μόνο το 2018, στην Αμερική, εισήχθησαν, στους ΧΥΤΑ, 27 εκατομμύρια τόνοι πλαστικού, δηλαδή το 18,5 % όλων των αστικών αποβλήτων ενώ αντιστοίχως την ίδια χρονιά, στην Ευρώπη, εισήχθησαν παραπάνω από 3 εκατομμύρια τόνοι, το 27,3 % όλων των παραγόμενων πλαστικών αποβλήτων [47]. Αν και μέχρι σήμερα οι ΧΥΤΑ αποτελούν τον βασικό τρόπο προσπάθειας διαχείρισης του προβλήματος της «μόλυνσης των πλαστικών», παρά τις συνεχείς προσπάθειες βελτιστοποίησής τους, το οικολογικό τους αποτύπωμα είναι αρκετά αυξημένο, γεγονός

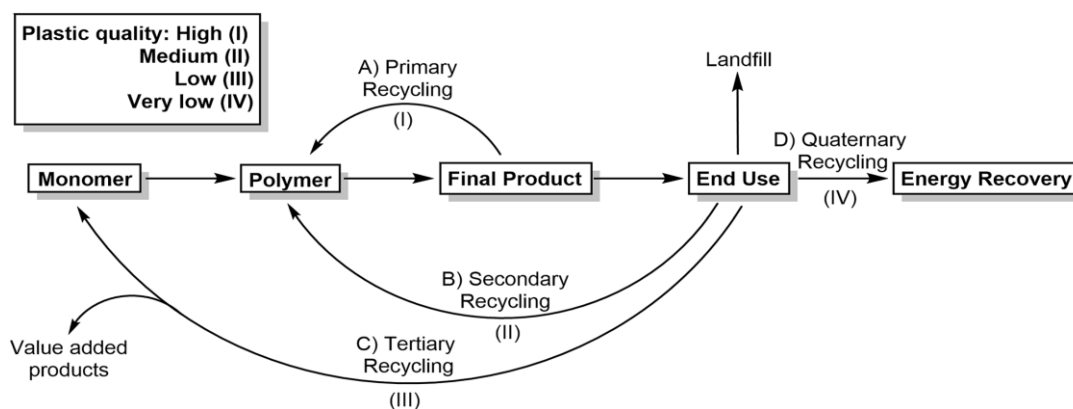
που έγινε αντιληπτό χρόνια πριν, οπότε και ξεκίνησε η αναζήτηση νέων τρόπων διαχείρισης της συσσώρευσης των πλαστικών στο πλανήτη.

Όπως και με τα υπόλοιπα παραδοσιακά υλικά, έτσι και με το πλαστικό, η ανακύκλωση αποτελεί βασική λύση για τον έλεγχο των παραγόμενων αποβλήτων τους, ενώ ωφελεί ταυτόχρονα τη κοινωνία και το περιβάλλον. Η ιδέα της ανακύκλωσης αφορά στην συλλογή και επεξεργασία υλικών αποβλήτων με σκοπό την μετατροπή τους σε νέα προϊόντα, με παρόμοια ή διαφορετική χρήση [48], [49]. Το 2020, το 9% των παραγόμενων πλαστικών αποβλήτων (567 εκατομμύρια τόνοι εκ των 6,3 δισεκατομμυρίων παραγόμενων τόνων) ανακυκλώθηκε [47]. Από τη στιγμή που το πλαστικό απόβλητο συλλεχθεί, κατηγοριοποιηθεί και επεξεργαστεί κατάλληλα μπορεί να ακολουθήσει τέσσερις διαφορετικές διεργασίες ανακύκλωσης, ανάλογα με το νέο τελικό προϊόν :

1. Πρωτογενής ανακύκλωση : Η πρωτογενής ανακύκλωση αφορά στην επανεπεξεργασία του πλαστικού αποβλήτου, μέσω μηχανικών διεργασιών θερμότητας, ώστε να μετατραπεί εκ νέου στο αρχικό προϊόν και να έχει την ίδια ακριβώς χρήση και χαρακτηριστικά με αυτό. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι τα ανακυκλωμένα πλαστικά μπουκάλια PET, στα οποία το ανακυκλωμένο PET αναμιγνύεται εκ νέου με πλαστικό προς τη δημιουργία του τελικού προϊόντος [48], [50].
2. Δευτερογενής ανακύκλωση : Η δευτερογενής ανακύκλωση, σαν διεργασία, είναι όμοια της πρωτογενούς, δηλαδή μέσω μηχανικής επεξεργασίας το πλαστικό απόβλητο μετατρέπεται σε πρώτη ύλη για την δημιουργία νέου προϊόντος. Το τελικό προϊόν όμως σε αυτή τη περίπτωση έχει υποβαθμισμένα χαρακτηριστικά και είναι λιγότερο ανακυκλώσιμο του πλαστικού από το οποίο προέκυψε. Η μετατροπή πλαστικών μπουκαλιών PET σε ίνες πολυεστέρα, μέσω τήξης και επαναδιαμόρφωσης, είναι μια διαδοδομένη διεργασία που επιτυγχάνεται μέσω της δευτερογενούς ανακύκλωσης [48], [51].
3. Τριτογενής ανακύκλωση : Η τριτογενής ανακύκλωση αναφέρεται στις χημικές διεργασίες που χρησιμοποιούνται με σκοπό τον αποπολυμερισμό των πλαστικών αποβλήτων στα μονομερή τους, τα οποία στη συνέχεια επαναπολυμερίζονται στο αρχικό πολυμερές ή μετατρέπονται σε άλλα χρήσιμα προϊόντα. Η αποδιάταξη του πολυμερικού σκελετού του πλαστικού αποβλήτου επιτυγχάνεται κυρίως μέσω χημικών αντιδράσεων (θερμοχημικές προσεγγίσεις, καταλυτικές μετατροπές) και τα τελικά προϊόντα είναι είτε χημικά είτε μονομερή για τη παραγωγή νέων πλαστικών ή καυσίμων [48], [52], [53].

Η πρωτογενής και δευτερογενής ανακύκλωση αποτελούν μεθόδους που εντάσσονται στην κατηγορία της μηχανικής ανακύκλωσης, η οποία πραγματοποιείται κυρίως μέσω μηχανικής καταπόνησης των πλαστικών αποβλήτων υπό την επιβολή θερμότητας, ενώ η τριτογενής ανακύκλωση στην κατηγορία της χημικής ανακύκλωσης.

4. Τεταρτογενής ανακύκλωση ή αποτέφρωση : Η τεταρτογενής ανακύκλωση ή αποτέφρωση αφορά στη θερμική επεξεργασία των πλαστικών αποβλήτων, παρουσία οξυγόνου [54]. Η αποτέφρωση εφαρμόζεται κυρίως σε πλαστικά απόβλητα χαμηλής ποιότητας και όντας εξώθερμη διεργασία απελευθερώνει ως προϊόν θερμική ενέργεια. Αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ατμού, ο οποίος συμβάλλει στη λειτουργία συστημάτων θέρμανσης, και ηλεκτρικής ενέργειας. Σύμφωνα με έρευνα του πανεπιστήμιου του Stanford, η αποτέφρωση ενός τόνου πλαστικών αποβλήτων εξοικονομεί 7200 κιλοβατώρες ηλεκτρικού ρεύματος, αρκετή ηλεκτρική ενέργεια για την ομαλή λειτουργία μιας οικείας για περίπου επτά μήνες [55]–[57].



**Εικόνα 2:** Σχηματική απεικόνιση των τρόπων ανακύκλωσης πλαστικών αποβλήτων. (A) Πρωτογενής ανακύκλωση, (B) Δευτερογενής Ανακύκλωση, (C) Τριτογενής Ανακύκλωση (D) Τεταρτογενής Ανακύκλωση – Αποτέφρωση [56].

Οι σύγχρονοι τρόποι διαχείρισης των πλαστικών αποβλήτων προσπαθούν να επιβραδύνουν τους εκθετικούς ρυθμούς της συσσώρευσης των πλαστικών, ωφελώντας παράλληλα το περιβάλλον και τη κοινωνία. Οι ΧΥΤΑ αποτελούν μια εξαιρετική πηγή ενέργειας, αφού κατά την ταφή των αποβλήτων και την σταδιακή διάσπαση τους με το πέρασμα του χρόνου, απελευθερώνονται αέρια διοξειδίου του άνθρακα και μεθανίου, τα οποία μετά από κατάλληλη επεξεργασία χρησιμοποιούνται για τη παραγωγή ενέργειας. Στους ΧΥΤΑ τα απόβλητα απομονώνονται απολύτως από το περιβάλλον και την κοινωνία, με ειδικά διαμορφωμένα όρια και κατάλληλη στεγανοποίηση, με αποτέλεσμα μέχρι και τα επικίνδυνα για την υγεία και το περιβάλλον απόβλητα να αδρανοποιούνται. Τέλος στους χώρους αυτούς απασχολείται πλήθος εργαζομένων ενώ τα λειτουργικά τους κόστη είναι αρκετά μειωμένα [58]. Βέβαια, συγκεκριμένα για τα πλαστικά απόβλητα, δεν ικανοποιούνται όλα τα παραπάνω οφέλη (για παράδειγμα η χρόνια διάσπαση τους προς παραγωγή ενέργειας είναι αρκετά δύσκολη έως και αδύνατη για κάποια πλαστικά, προσφέρει όμως πολλά θρεπτικά συστατικά για το υπέδαφος), όμως οι χώροι αυτοί καταφέρνουν, αν όχι να λύσουν, να περιορίσουν το πρόβλημα της διασποράς τους στα περιβάλλοντα. Αφού λοιπόν η διαχείριση των πλαστικών αποβλήτων στους ΧΥΤΑ εμφανίζει περιορισμούς, η επιλογή της ανακύκλωσης τους, προσφέρει πληθώρα επιλογών τόσο ως προς τον τρόπο της αποσύνθεσης όσο και ως προς το τελικό παραγόμενο προϊόν. Με το τρόπο αυτό αυξάνεται ο ελεύθερο χώρος των ΧΥΤΑ για άλλα βλαβερά, πλην των πλαστικών,

απόβλητα ενώ παράλληλα μειώνεται το αποτύπωμα του άνθρακα με την επαναχρησιμοποίηση ανακυκλώσιμων πλαστικών από πετροχημικές πηγές. Θέσεις εργασίας προσφέρει ομοίως και η ανακύκλωση ενώ τέλος σαν ιδεολογία εξελίσσει και αυξάνει το κοινωνικό επίπεδο [59], [60].

#### 1.2.4) Προβλήματα συμβατικών τρόπων διαχείρισης πλαστικών και μικροπλαστικών

Η εκθετική τάση παραγωγής πλαστικών συνεπάγεται την αύξηση των όγκων αποβλήτων τους που πρέπει να διαχειριστούν με τους συμβατικούς τρόπους των ΧΥΤΑ, της ανακύκλωσης και της αποτέφρωσης. Όπως προαναφέρθηκε οι παραπάνω τρόποι βασίζονται στην επιβράδυνση της υπερσυσσώρευσης των πλαστικών και στον περιορισμό της διασποράς τους στα διάφορα περιβάλλοντα. Παρά την μερική λειτουργικότητα των μεθόδων διαχείρισης, αυτή η υπεραύξηση των όγκων αποβλήτων έχει φέρει στο προσκήνιο πολλά από τα μειονεκτήματα και τα προβλήματα τους.

Οι ελεύθεροι χώροι για εγκατάσταση ΧΥΤΑ όλο και περιορίζονται ενώ δεν είναι λίγες οι χώρες στις οποίες έχουν εκλείψει εντελώς [61], [62]. Επιπλέον οι ήδη χρησιμοποιούμενοι χώροι καταλαμβάνουν εδάφη τα οποία θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για παραγωγικότερους σκοπούς, όπως η γεωργία και η κτηνοτροφία. Ταυτόχρονα οι ΧΥΤΑ χρησιμοποιούνται μακροχρόνια αφού η αποικοδόμηση των περισσότερων πλαστικών αποβλήτων είναι εξαιρετικά αργή. Συγκεκριμένα έρευνες απέδειξαν ότι στις συνθήκες που επικρατούν στους ΧΥΤΑ (συνθήκες χαμηλού οξυγόνου, αναερόβιες συνθήκες) [63] τα πλαστικά απόβλητα χρειάζονται παραπάνω από 20 χρόνια για αποικοδόμηση, με δυσκολότερη να είναι αυτή των συμβατικών πετροχημικών πλαστικών όπως το πολυπροπυλένιο, το πολυαιθυλένιο και οι πολυεστέρες [61],[64]. Συνεπώς οι χώροι εγκατάστασης των ΧΥΤΑ είναι συνεχώς κατελημμένοι και η απελευθέρωσή τους με στόχο τη χρήση τους για άλλους σκοπούς είναι αδύνατη [61]. Επιπλέον τα συσσωρευμένα πλαστικά απόβλητα στους ΧΥΤΑ αποτελούν πηγή δευτερογενών περιβαλλοντικών ρύπων οι οποίοι, αν δεν χρησιμοποιηθούν κατάλληλα ως πηγές ενέργειας, απελευθερώνονται κατά την αποσύνθεση της οργανικής ύλης των πλαστικών. Τέτοιοι είναι πτητικοί οργανικοί ρύποι (βενζόλιο, τολουόλιο, ξυλένιο, αιθυλοβενζόλιο, τριμεθυλοβενζόλιο) και αέρια του θερμοκηπίου (μεθάνιο και διοξείδιο του άνθρακα), οι οποίοι είτε απελευθερώνονται στην ατμόσφαιρα είτε μεταφέρονται στα υδάτινα περιβάλλοντα. Ιδιαίτερα επικίνδυνη κρίνεται και η απελευθέρωση της ένωσης δισφαινόλη Α, κατά την αποσύνθεση των πλαστικών αποβλήτων στους ΧΥΤΑ, η οποία έχει αναγνωριστεί ως «χημική ουσία που προκαλεί ενδοκρινικές διαταραχές», όπως η μείωση των σπερματοζωαρίων, οι γενετικές διαταραχές και η εμφάνιση ορμονικών καρκίνων [65]–[70]. Η δισφαινόλη Α, επιπλέον, προκαλεί τη παραγωγή υδροθείου, μέσω αναερόβιων βακτηρίων, που τη διασπούν ως οργανική ύλη. Το υδροθείο μπορεί να μεταφερθεί μέσω του υδροφόρου ορίζοντα με τελικό αποδέκτη τον άνθρωπο, μεγάλη συγκέντρωση του οποίου, μπορεί να οδηγήσει στο θάνατο [69].

Η διαδικασία της ανακύκλωσης των πλαστικών αποτελεί μια αρκετά ελκυστική πρόταση για την επίλυση του προβλήματος της συσσώρευσής τους στο περιβάλλον προωθώντας παράλληλα την ιδέα της «κυκλικής οικονομίας», η οποία αποσκοπεί στην πλήρη κατάργηση των αποβλήτων και την συνεχόμενη χρήση των υλικών, δημιουργώντας έναν κλειστό κύκλο παραγωγής [71]. Η ανακύκλωση των πλαστικών αποβλήτων, όμως, αποτελεί στο σύνολο μια εξαιρετικά κοστοβόρα, τόσο ενεργειακά όσο και λειτουργικά, διεργασία. Συγκεκριμένα τα στάδια που ακολουθούνται για την εφαρμογή της είναι η συλλογή των πλαστικών αποβλήτων, ο διαχωρισμός τους ανάλογα με το τύπο πλαστικού, το καθάρισμά τους, η ξήρανση και η άλεσή τους [72]. Μόνο έπειτα από την κατάλληλη προαναφερθείσα προκατεργασία είναι δυνατή η διαδικασία της μετατροπής του πλαστικού αποβλήτου σε πρώτη ύλη για επαναχρησιμοποίηση. Η αποικοδόμηση των αποβλήτων συνήθως απαιτεί την χρήση επικίνδυνων διαλυτών [73]. Επιπλέον τα ανακυκλωμένα πλαστικά προϊόντα που προκύπτουν έχουν χαμηλότερη ποιότητα και ελαττωμένες μηχανικές ιδιότητες (κυρίως λόγω του σταδίου της άλεσης που μειώνει σημαντικά το μέγεθος των πολυμερικών αλυσίδων [73]), ενώ παράλληλα υφίστανται εύκολη αποικοδόμηση κατά τη χρήση [74] με αποτέλεσμα να έχουν έντονα μειωμένη εμπορική αξία συγκριτικά με τα συμβατικά πλαστικά. Τελικά, αν και η ανακύκλωση των πλαστικών αποβλήτων, σαν ιδέα αντιμετώπισης της συσσώρευσης τους στο πλανήτη, έχει αρκετές προοπτικές, πρακτικά αποτελεί, μέχρι σήμερα τουλάχιστον, μια ασύμφορη διεργασία (σε αντίθεση για παράδειγμα με την ανακύκλωση των χάρτινων αποβλήτων που παρουσιάζει αρκετά ενθαρρυντικά αποτελέσματα) [75]. Τα παραπάνω αιτιολογούν και τα αποτελέσματα ερευνών που ισχυρίζονται ότι μέχρι σήμερα έχει ανακυκλωθεί, μηχανικά ή χημικά, πλήρως μόλις το 10% όλων των παραγόμενων πλαστικών [76].

Όσον αφορά την τεταρτογενή ανακύκλωση ή αποτέφρωση, πέραν από τις δυσκολίες που εμφανίζουν οι πρωτογενής, δευτερογενής και τριτογενής μορφές ανακύκλωσης (μηχανική και χημική ανακύκλωση), κυρίως ως προς το τελικό προϊόν, αυτή παρουσιάζει επιπλέον σημαντικά προβλήματα και κατά το στάδιο της αποικοδόμησης του πλαστικού αποβλήτου υπό την επιβολή θερμότητας. Συγκεκριμένα μέσω της αποτέφρωσης απελευθερώνονται στην ατμόσφαιρα τοξικά αέρια, τα οποία εξαρτώνται από τον τύπο πλαστικού που αποτεφρώνεται. Συνήθως από τα κοινά πλαστικά προκύπτουν αέρια όπως διοξίνες, φουράνια, πολυχλωριωμένα διφαινύλια, υδρογονούχες ενώσεις, και αέρια του θερμοκηπίου (κυρίως διοξείδιο του άνθρακα). Επιπλέον η αποτέφρωση του PVC παράγει επικίνδυνα αλογόνα και του PS ενώσεις που έχουν άμεση συσχέτιση με δυσλειτουργίες του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος. Τα παραπάνω αέρια αναγνωρίζονται τοξικά τόσο για το περιβάλλον όσο και την ανθρώπινη υγεία [77], [78]. Έτσι, είναι πιθανό να αυξήσουν σημαντικά τις πιθανότητες εμφάνισης καρδιακών προσβολών και να συνδέονται με την επιδείνωση αναπνευστικών παθήσεων (άσθμα και εμφύσημα), με την εμφάνιση εξανθημάτων, πονοκεφάλων, ναυτίας και άλλων [77]. Οι μεγάλες ποσότητες των παραγόμενων αερίων του θερμοκηπίου, εντείνουν το πρόβλημα της υπερθέρμανσης του πλανήτη [78], ενώ παράλληλα οι παραπάνω ενώσεις μπορούν να εισέλθουν και στα υδάτινα οικοσυστήματα, μέσω της προσρόφησης τους από τα φυτά ή το χώμα, καταστρέφοντας

την ομαλή λειτουργία τους [79]. Με τη βοήθεια κατάλληλων φίλτρων είναι εφικτός ο καθαρισμός των απαερίων της αποτέφρωσης, παρουσιάζονται όμως προβλήματα λόγω της απαιτούμενης αποθείωσης των ρευμάτων, διαδικασία αρκετά απαιτητική και χρονοβόρα [80]. Γίνεται αντιληπτό ότι και η αποτέφρωση, όπως και η χημική και μηχανική ανακύκλωση εμφανίζει σημαντικούς περιορισμούς, σε αυτή τη περίπτωση στο τομέα της υγείας και της μόλυνσης του περιβάλλοντος. Τα προβλήματα αυτά καθιστούν την αποτέφρωση μια αμφίβολη λύση για την διαχείριση των πλαστικών αποβλήτων, με μόλις το 12% αυτών να έχουν αποτεφρωθεί μέχρι σήμερα [76], [81].

### 1.3) Βιοαποικοδόμηση πλαστικών

#### 1.3.1) Γενικά

Ως «βιοαποικοδόμηση» χαρακτηρίζεται η διεργασία υποβάθμισης, φθοράς ή πλήρους καταστροφής οργανικών ενώσεων, από μικροοργανισμούς, στα συστατικά από τα οποία αποτελούνται [82]. Η βιοαποικοδόμηση λαμβάνει χώρα είτε παρουσία είτε απουσία οξυγόνου και επιτυγχάνεται κυρίως μέσω δύο διαφορετικών μεθόδων. Η πρώτη (ανάπτυξη), αφορά την χρήση της οργανικής ύλης ως μέσο ανάπτυξης του μικροοργανισμού, λειτουργώντας ως πηγή άνθρακα και ενέργειας. Η άμεση κατανάλωση της οργανικής ένωσης συνεπάγεται την πλήρη αποικοδόμηση της. Η δεύτερη μέθοδος (συμεταβολισμός), λαμβάνει χώρα κατά την ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο, παρουσία της επιθυμητής αποικοδομήσιμης οργανικής ένωσης. Παράλληλα με τον μεταβολισμό του θρεπτικού μέσου ο μικροοργανισμός παράγει και κατάλληλα ένζυμα για την αποικοδόμηση της οργανικής ένωσης [83], [84]. Οι μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στη βιοαποικοδόμηση είναι κυρίως βακτήρια, μύκητες και ζύμες, με τα φύκη και τα πρωτόζωα, παρότι έχουν μελετηθεί εκτενώς, να παρουσιάζουν ελάχιστα αξιοσημείωτα ερευνητικά αποτελέσματα [82], [84].

Όπως προαναφέρθηκε (1.2.1.1) Πλαστικά) τα συμβατικά πλαστικά είναι και αυτά συνθετικές οργανικές ενώσεις, επομένως αποτελούν τα κατάλληλα υποστρώματα για να επιδεχθούν βιοαποικοδόμηση. Πράγματι, μέχρι το 2017, παραπάνω από 90 ήταν οι μικροοργανισμοί που είχαν εμφανίσει ενδείξεις αποικοδόμησης πλαστικών [85]. Η βιοαποικοδόμηση των πλαστικών πραγματοποιείται σε συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας και πίεσης, ενώ απαιτεί μικρή κατανάλωση ενέργειας και αντιδραστηρίων. Αποτελεί συνεπώς μια φιλική προς το περιβάλλον διεργασία, σε αντίθεση με τις συμβατικές μεθόδους διαχείρισης των πλαστικών αποβλήτων [76], [86]. Παράλληλα, έπειτα από την αποικοδόμηση τα ολιγομέρη και μονομερή που προκύπτουν, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρώτη ύλη για την σύνθεση του αρχικού πλαστικού ή να αποτελέσουν πλατφόρμα για τη δημιουργία νέων προϊόντων, με την ποιότητα και τις μηχανικές ιδιότητες αυτών να μην υποβαθμίζονται, διατηρώντας την εμπορική τους αξία [86], [87].

### 1.3.2) Στάδια βιοαποικοδόμησης πλαστικών

Η βιοαποικοδόμηση αποτελεί μια περίπλοκη βιολογική διεργασία, πολλών σταδίων, η οποία περιπλέκεται περισσότερο όταν αφορά τα πλαστικά, αφού κάθε είδος αποτελείται από διαφορετικό πολυμερικό σκελετό, και διαθέτει συνεπώς διαφορετικές μηχανικές ιδιότητες.

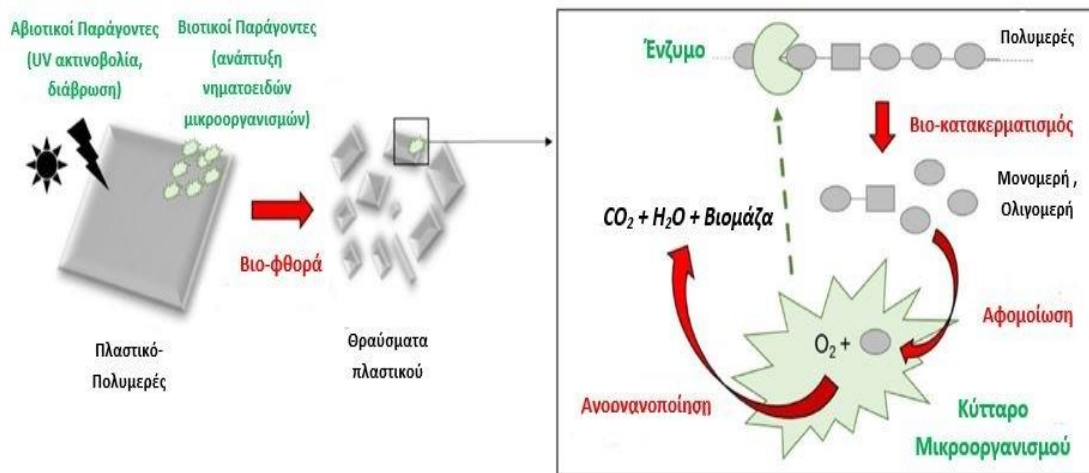
Παρ' όλα αυτά, ο γενικότερος μηχανισμός της βιοαποικοδόμησης των πλαστικών, μπορεί να συνοψιστεί στα εξής βήματα [88]–[91] :

1. Βιο-φθορά : Το αρχικό στάδιο της βιοαποικοδόμησης αφορά στην επιφανειακή φθορά του πλαστικού, μεταβάλλοντας τις φυσικές, μηχανικές και χημικές ιδιότητες του. Αυτό επιτυγχάνεται με τη συμβολή αβιοτικών (καιρικές συνθήκες, υπεριώδης ακτινοβολία UV, γήρανση του πλαστικού, θερμοκρασία, ατμοσφαιρικοί ρύποι, ατμοσφαιρικό οξυγόνο, υπόγεια υδάτινα ρεύματα) και/ή βιοτικών (επιφανειακή ανάπτυξη νηματοειδών μικροοργανισμών) παραγόντων. Συνήθως οι αβιοτικοί παράγοντες εξασθενούν την δομή του πολυμερούς, δρώντας ουσιαστικά συνεργιστικά με τους βιοτικούς παράγοντες, βοηθώντας την δράση τους. Οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται στην επιφάνεια και στο εσωτερικό του πλαστικού δημιουργώντας ένα μικροβιακό φιλμ, η έκταση του οποίου εξαρτάται τόσο από τις επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες όσο και από την σύσταση του πλαστικού. Οι αναπτυσσόμενοι μικροοργανισμοί σχηματίζουν, κυρίως, νηματοειδείς δομές οι οποίες εισχωρούν στους πόρους του πολυμερούς, διευρύνοντάς τους, προκαλώντας ρωγμές στο πλαστικό και αποδυναμώνοντας τις μηχανικές του ιδιότητες (φυσική φθορά). Παράλληλα κατά την ανάπτυξη τους, οι μικροοργανισμοί, ανάλογα το είδος τους, είναι πιθανό να απελευθερώνουν όξινες ενώσεις (νιτρώδη, νιτρικά και θειικά οξέα, καθώς και οργανικά οξέα, από ετερότροφους, όπως οξαλικό, φουμαρικό, κιτρικό, γλουταμινικό και οξαλικό οξύ), οι οποίες εισχωρούν στο εσωτερικό του πλαστικού, μειώνουν σημαντικά το pH των πόρων, γεγονός που προκαλεί μεταβολές στην μικροδομή του πολυμερούς (χημική φθορά).
2. Βιο-κατακερματισμός : Στη συνέχεια, οι αναπτυσσόμενοι μικροοργανισμοί, παράγοντας εξωκυτταρικά ένζυμα αποπολυμερίζουν το πλαστικό στα ολιγομερή και μονομερή από τα οποία αποτελείται, μέσω ενζυμικής υδρόλυσης ή/και οξείδωσης. Τέτοια ένζυμα είναι κυρίως οι οξυγενάσες (προσθέτουν μόρια οξυγόνου στις ανθρακικές πολυμερικές αλυσίδες, αποσταθεροποιώντας το ηλεκτρικό φορτίο του πολυμερούς), οι εστεράσες και οι λιπάσες (καταλύουν την υδρόλυση των εστερικών δεσμών μεταξύ των δομικών μονάδων) και οι ενδοπεπτιδάσες (καταλύουν την υδρόλυση δεσμών μεταξύ των αμιδίων του πολυμερικού σκελετού).
3. Αφομοίωση : Τα μικρού μοριακού βάρους ολιγομερή και μονομερή, που προκύπτουν από το στάδιο του βιο-κατακερματισμού, είναι εφικτό να αφομοιωθούν από τους μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται πάνω στο πλαστικό.



Για να αφομοιωθούν τα κομμάτια, πρέπει να διαπεράσουν τη κυτταρική μεμβράνη, να εισέλθουν στο εσωτερικό του κυττάρου, το οποίο στη συνέχεια θα τα χρησιμοποιήσει ως πηγή ενέργειας, ηλεκτρονίων και θρεπτικών συστατικών (άνθρακας, άζωτο, οξυγόνο, θείο και άλλα), με σκοπό την ανάπτυξη του, η οποία συνεπάγεται πολλαπλασιασμό των μικροβιακών αποικιών.

4. Ανοργανοποίηση : Αφορά το τελικό στάδιο της βιοαποικοδόμησης του πλαστικού. Η αφομοίωση των ολιγομερών και μονομερών από τα κύτταρα των μικροοργανισμών, δεν συνεπάγεται και την πλήρη αποικοδόμηση τους. Ανάλογα το περιβάλλον ανάπτυξης, η χρήση των ολιγομερών και μονομερών για τις κυτταρικές δραστηριότητες του κυττάρου, μπορεί να επιτευχθεί αναερόβια (χρήση θείου, διοξειδίου του άνθρακα, νιτρικών ιόντων, θειικών ιόντων, σιδήρου, και άλλων ως δέκτες ηλεκτρονίων), αερόβια (χρήση οξυγόνου ως δέκτη ηλεκτρονίων) είτε μέσω ζύμωσης (παραγωγή μορίων από το κύτταρο ως δέκτες ηλεκτρονίων). Κατά την κατανάλωση τους από το κύτταρο, λαμβάνει χώρα η παραγωγή πληθώρας πρωτογενών και δευτερογενών μεταβολιτών. Στο τελικό στάδιο, της ανοργανοποίησης, οι μεταβολίτες αυτοί αποικοδομούνται πλήρως και απεκκρίνονται από το κύτταρο, πλήρως οξειδωμένοι ( $H_2O$ ,  $CO_2$ ,  $CH_4$  και κατάλοιπα, υπό αναερόβιες συνθήκες και  $H_2O$ ,  $CO_2$ , και βιομάζα υπό αερόβιες συνθήκες).



**Εικόνα 3:** Σχεδιάγραμμα του μηχανισμού βιοαποικοδόμησης πλαστικού. Στάδια : 1) Βιο-φθορά 2) Βιο-κατακερματισμός 3) Αφομοίωση 4) Ανοργανοποίηση (υπό αερόβιες συνθήκες) [90].

### 1.3.3) Παράγοντες που επηρεάζουν την βιοαποικοδόμηση πλαστικών

Γίνεται αντιληπτό, μελετώντας τον μηχανισμό της βιοαποικοδόμησης των πλαστικών, ότι η συνολική διεργασία εξαρτάται άμεσα από την αλληλεπίδραση ανάμεσα στο πολυμερές και τους μικροοργανισμούς. Η αλληλεπίδραση αυτή επηρεάζεται από πληθώρα παραγόντων, οι οποίοι είτε αφορούν τις επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες έκθεσης είτε τα χαρακτηριστικά του πολυμερούς [92].

Συγκεκριμένα, όσον αφορά τα χαρακτηριστικά του πολυμερούς, η ευκαμψία, η κρυσταλλικότητα, η μορφολογία, οι χαρακτηριστικές ομάδες του πολυμερικού σκελετού, οι διακλαδώσεις των πολυμερικών αλυσίδων, το μοριακό βάρος, τα συμπολυμερή, το αρχικό πολυμερικό μείγμα, η τακτικότητα (τοποθέτηση των μακρομορίων στον χώρο) και η ύπαρξη προσθέτων, επηρεάζουν αισθητά την τελική απόδοση της βιοαποικοδόμησης. [93] Συνοπτικά για τα σημαντικότερα από αυτά ισχύει :

1. Μοριακό βάρος : Το μοριακό βάρος των πολυμερών διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις τελικές ιδιότητες τους. Αυξημένο μοριακό βάρος συνεπάγεται και μειωμένη απόδοση της βιοαποικοδόμησης του πλαστικού. Συγκεκριμένα, με την αύξηση του μοριακού βάρους το πολυμερές γίνεται λιγότερο εύκαμπτο και πιο υαλώδες, χαρακτηριστικά που δυσχεραίνουν την προσέγγισή και αποίκηση του από μικροοργανισμούς. Ακόμα, όσο μεγαλύτερο είναι το μοριακό βάρος ενός πολυμερούς, τόσο περισσότεροι είναι οι δεσμοί μεταξύ των δομικών μονάδων του. Επομένως για την τελική βιοαποικοδόμηση του απαιτείται η διάσπαση περισσότερων δεσμών, με σκοπό την θραύση και τη τελική αφομοίωση του, γεγονός που επιβραδύνει την συνολική διεργασία. Γενικότερα τα ένζυμα δρουν αποτελεσματικότερα σε υποστρώματα χαμηλού μοριακού βάρους, με βραχείες δομικές αλυσίδες [88], [92], [94], [95].
2. Σχήμα & Μέγεθος : Το σχήμα και το μέγεθος του πολυμερούς καθορίζουν την επιφάνεια του πλαστικού, χαρακτηριστικό που επηρεάζει άμεσα την βιοαποικοδόμηση του. Μια μεγάλη ελεύθερη επιφάνεια πλαστικού οδηγεί σε ευκολότερη προσβολή του από μικροοργανισμούς και συνεπώς ευνοϊκότερη ανάπτυξη τους. Έτσι αναπτύσσονται περισσότερες μικροβιακές αποικίες, παράγονται περισσότερα ένζυμα και το πολυμερές βιοαποικοδομείται αποτελεσματικότερα. Πέραν από την επιφάνεια, το σχήμα και το μέγεθος του πλαστικού, διαμορφώνουν και τον όγκο του. Ο λόγος της ελεύθερης επιφάνειας ως προς τον όγκο του πολυμερούς επηρεάζει αισθητά την αποικοδόμηση του, με τα μικρά και λεπτά πλαστικά να επιδέχονται ευκολότερα διάβρωση. Γίνεται λοιπόν αντιληπτό γιατί το στάδιο της βιο-φθοράς και της θραύσης του πολυμερούς βοηθάει στην έναρξη της βιοαποικοδόμησης, όπως προαναφέρθηκε (1.3.2) Στάδια βιοαποικοδόμησης πλαστικών) [88], [96].
3. Πρόσθετα : Τα πολυμερικά πρόσθετα είναι οργανικά, κυρίως, χημικά πολυμερή μικρού μοριακού βάρους τα οποία έχουν την ικανότητα να τροποποιούν τις ιδιότητες του πλαστικού, αυξάνοντας την εμπορική αξία του. Ο ρόλος τους στην διεργασία της βιοαποικοδόμησης είναι διττός. Ως μικρού μοριακού βάρους πολυμερή είναι, όπως προαναφέρθηκε, εύκολα βιοαποικοδομήσιμα, με αποτέλεσμα να αποτελούν το εναρκτήριο σημείο για την ανάπτυξη μικροβιακών αποικιών. Επιπλέον πολλά πρόσθετα συμβάλλουν στην αυτοοξειδωση του πλαστικού καθώς και στη μείωση του μοριακού του βάρους καθιστώντας το εύκολο βιοαποικοδομήσιμο στόχο. Παρ' όλα αυτά πληθώρα προσθέτων προκαλούν την

μετουσίωση των μικροβιακών ενζύμων βιοαποικοδόμησης, αναστέλλοντας την δράση τους, ενώ πολλά είναι και τα πρόσθετα που εγκαθίστανται επιφανειακά του πολυμερούς, καταλαμβάνοντας τις θέσεις εγκατάστασης των μικροοργανισμών για ανάπτυξη βιοφιλμ [88], [92], [93]–[95], [97].

4. Χημικοί πολυμερικοί δεσμοί & πλευρικές ομάδες : Οι δεσμοί που συνδέουν τα μονομερή του πλαστικού αποτελούν υψίστης σημασίας παράγοντα της βιοαποικοδόμησης. Οι δεσμοί ατόμων άνθρακα είναι οι ισχυρότεροι μεταξύ όλων των γνωστών δεσμών, με αποτέλεσμα η κύρια πολυμερική αλυσίδα που σχηματίζεται από αυτούς να είναι μη επιδεκτική σε υποβάθμιση. Η διάσπαση τέτοιων δεσμών είναι εξαιρετικά δύσκολη τόσο από αβιοτικούς όσο και από βιοτικούς παράγοντες, με την οξειδωση τους να αποτελεί προϋπόθεση για την προσπάθεια περαιτέρω αποπολυμερισμού κατά την βιοαποικοδόμηση. Γενικότερα οι δεσμοί μεταξύ μη ανθρακικών ατόμων, όπως αζώτου, οξυγόνου και θείου, είναι αρκετά ασθενέστεροι και σημαντικά ευκολότεροι στόχοι για διάσπαση. Επομένως πλαστικά με πολυμερικό σκελετό που αποτελείται από μονομερή, που ενώνονται με μη ανθρακικούς δεσμούς, μπορούν να βιοαποικοδομηθούν αποδοτικότερα. Όσον αφορά τις πλευρικές ομάδες της πολυμερικής αλυσίδας, η παρουσία καρβονυλικών ομάδων καθιστά το πολυμερές πιο προσιτό για βιοαποικοδόμηση, ενώ αντίστοιχα η ύπαρξη αρωματικών ομάδων προσφέρει ανθεκτικότητα. Έχει παρατηρηθεί ότι εστερικοί δεσμοί κοντά σε ογκώδεις αρωματικές ομάδες παρεμποδίζουν την υδρολύση, λόγω στερικής παρεμπόδισης (συμφόρηση που δημιουργείται γύρω από το άτομο λόγω της φυσικής παρουσίας ογκωδών προσδεμάτων). Τέλος υδροφοβικές πλευρικές ομάδες δημιουργούν υδροφοβικές πολυμερικές επιφάνειες, οι οποίες περιορίζουν αισθητά την καταλυτική δράση των ενζύμων και εμποδίζουν την απορρόφηση τους, δυσκολεύοντας την βιοαποικοδόμηση του πλαστικού [96], [98], [99].
5. Κρυσταλλικότητα : Τα ένζυμα δρουν κυρίως σε άμορφες περιοχές του πολυμερούς όπου τα μόρια είναι χαλαρότερα τοποθετημένα στο χώρο και οι πολυμερικές αλυσίδες λιγότερο περιπλεγμένες μεταξύ τους. Οι άμορφες περιοχές είναι ευκολότερα προσιτές από τους μικροοργανισμούς στις οποίες και εγκαθίστανται προς ανάπτυξη. Σε αντίθεση με τις άμορφες, οι κρυσταλλικές περιοχές καθιστούν το πλαστικό πιο ανθεκτικό στην βιοαποικοδόμηση, δυσχεραίνοντας την μικροβιακή δράση. Τη κρυσταλλικότητα επηρεάζει και η προσθήκη συμμονομερών στο πολυμερικό σκελετό, τα οποία αυξάνουν την αταξία των πολυμερικών αλυσίδων. Η αταξία αυτή οδηγεί σε μείωση της κρυσταλλικότητας του πολυμερούς γεγονός το οποίο αυξάνει την απόδοση της βιοαποικοδόμησης του πλαστικού [92], [94], [96].

Οι περιβαλλοντικές συνθήκες έκθεσης επηρεάζουν άμεσα την βιοαποικοδόμηση του πλαστικού. Αυτές χωρίζονται στους αβιοτικούς και βιοτικούς παράγοντες, με τους κύριους αβιοτικούς παράγοντες να αφορούν την θερμοκρασία, την υγρασία, το pH και την υπεριώδη ακτινοβολία (UV). Συγκεκριμένα :

1. Θερμοκρασία : Η θερμοκρασία έκθεσης του πλαστικού μπορεί να συμβάλλει στην ευκολότερη βιοαποικοδόμηση του. Χαρακτηριστικά υψηλές θερμοκρασίες συνεπάγονται υψηλότερους ρυθμούς υδρόλυσης των πολυμερικών δεσμών, ενώ καθιστούν το πλαστικό επιδεικτικότερο σε μικροβιακή αποίκηση. Ειδικότερα όταν η θερμοκρασία περιβάλλοντος είναι μεγαλύτερη αυτής της υαλώδους μετάπτωσης του πολυμερούς, η επιφάνεια του πλαστικού γίνεται περισσότερο ελαστική γεγονός που βοηθάει στην προσέγγιση του από μικροοργανισμούς αλλά και στην αύξηση της ενεργότητας των ενζύμων που παράγουν. Παρ' όλα αυτά πολύ υψηλές θερμοκρασίες έκθεσης μπορούν να απενεργοποιήσουν την δράση των ενζύμων και παράλληλα να εμποδίσουν ή και να σταματήσουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, αναστέλλοντας την βιοαποικοδόμηση του πλαστικού [92], [93].
2. Υγρασία : Η υγρασία αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες της ανάπτυξης των μικροοργανισμών, αφού συνδέεται άμεσα με τις απαιτήσεις τους σε νερό. Συνήθως οι περισσότεροι μικροοργανισμοί πολλαπλασιάζονται ευκολότερα και γρηγορότερα σε συνθήκες υψηλής υγρασίας. Γενικότερα η ταχύτητα βιοαποικοδόμησης του πλαστικού αυξάνεται υπό κατάλληλες συνθήκες υγρασίας. Παράλληλα σε περιβάλλοντα έκθεσης με υγρασία ευνοούνται οι υδρολύσεις των πολυμερικών δεσμών, αφού πραγματοποιούνται περισσότερες αντιδράσεις σχάσης, με αποτέλεσμα το πολυμερές να αποπολυμερίζεται [92], [93], [95], [100].
3. pH: Το pH του περιβάλλοντος μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την απόδοση της βιοαποικοδόμησης, μεταβάλλοντας τον ρυθμό υδρόλυσης των πολυμερικών δεσμών, ανάλογα με τον είδος της υδρόλυσης και αν αυτή καταλύεται από όξινες ή βασικές συνθήκες. Επιπλέον το pH καθορίζει και τον ρυθμό του πολλαπλασιασμού των μικροοργανισμών στην επιφάνεια του πλαστικού [92], [101].
4. Υπεριώδης ακτινοβολία : Η υπεριώδης ακτινοβολία στην οποία εκτίθεται το πλαστικό μπορεί να επηρεάζει θετικά ή αρνητικά την βιοαποικοδόμηση του, και αυτό διότι δύναται να προκαλέσει είτε σχάση της κύριας πολυμερικής αλυσίδας είτε αύξηση των διασυνδέσεων μεταξύ των μακρομορίων. Στη πρώτη περίπτωση ευνοούνται οι αντιδράσεις υδρόλυσης, ακολουθεί αποπολυμερισμός του πολυμερικού σκελετού σε μικρότερα μόρια, τα οποία μπορούν να αφομοιωθούν από τους μικροοργανισμούς και η βιοαποικοδόμηση ενισχύεται, ενώ κατά την περιπλοκή των πολυμερικών αλυσίδων περιορίζονται οι θέσεις προσβολής του πλαστικού από μικροοργανισμούς ενώ τα μακρομόρια γίνονται μεγαλύτερα και σταθερότερα, με αποτέλεσμα να επιδέχονται δυσκολότερη κατανάλωση από τους μικροοργανισμούς και η βιοαποικοδόμηση παρεμποδίζεται [92].

Όσον αφορά τους βιοτικούς παράγοντες βιοαποικοδόμησης, το βασικότερο ρόλο διαδραματίζουν τα εξωκυτταρικά ένζυμα. Όπως προαναφέρθηκε αναλύοντας τον μηχανισμό της βιοαποικοδόμησης, ο αποπολυμερισμός του πλαστικού επιτυγχάνεται μέσω της δράσης ενζύμων που διασπών τους δεσμούς του πολυμερικού σκελετού. Το

είδος του εξωκυτταρικού ενζύμου, ανάλογα τον μικροοργανισμό από τον οποίο προέρχεται, επηρεάζει σημαντικά την απόδοση της βιοαποικοδόμησης. Κάποια ένζυμα είναι καταλληλότερα από άλλα, διαθέτοντας εξειδικευμένα ενεργά κέντρα, με κατάλληλο σχήμα και εκλεκτικότητα ως προς το πλαστικό υπόστρωμα. Άλλος ένας βιοτικός παράγοντας είναι η υδροφιλία, η οποία και προαναφέρθηκε στα χαρακτηριστικά των πολυμερών. Υδροφιλες επιφάνειες ευνοούν την προσβολή του πλαστικού από μικροοργανισμούς και την ανάπτυξη τους προς κατανάλωση του. Τέλος σημαντικός βιοτικός παράγοντας είναι και η ύπαρξη βιοεπιφανειοδραστικών στο αποικοδομήσιμο πλαστικό. Αυτά είναι αμφίφιλες ενώσεις που παράγονται πάνω στην επιφάνεια του πολυμερούς και ενισχύουν την απόδοση της βιοαποικοδόμησης αφού εμπεριέχουν εξειδικευμένες λειτουργικές ομάδες που αποτελούν εύκολους «στόχους» για την έναρξη της [88], [92], [93].

### 1.3.4) Βιολογικής προέλευσης & Βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά

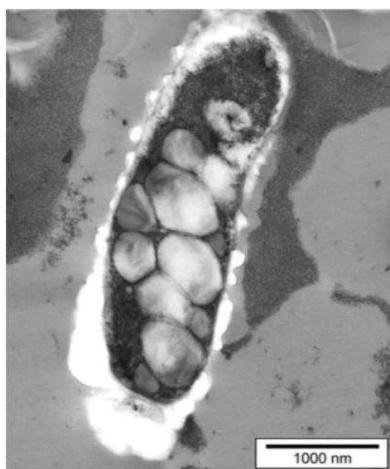
#### 1.3.4.1) Βιολογικής προέλευσης πλαστικά

Όπως προαναφέρθηκε τα περισσότερα συμβατικά πλαστικά, διαχρονικώς, συντίθενται από πετροχημικά μονομερή, που προέρχονται από ορυκτά έλαια, φυσικό αέριο και γαιάνθρακα (1.2.1.1) Πλαστικά). Με τον όρο «βιολογικής προέλευσης πλαστικά» χαρακτηρίζονται τα πλαστικά τα οποία προκύπτουν εν μέρει ή ολικώς από ενώσεις οι οποίες προέρχονται από βιολογικές ανανεώσιμες πηγές, όπως τα φυτά, οι μικροοργανισμοί και η βιομάζα [102], [103].

Η παραγωγή τους από μικροοργανισμούς πραγματοποιείται, κυρίως, σε συνθήκες ισορροπημένης ανάπτυξης, με τον σχηματισμό μικρών αδιάλυτων κόκκων πολυμερούς ως αποθήκη πηγής άνθρακα και ενέργειας με σκοπό τον ομαλό πολλαπλασιασμό τους, σε περιπτώσεις έλλειψης συστατικών στο θρεπτικό υλικό ανάπτυξης τους, όπως οξυγόνο, νάτριο, φώσφορος, θείο και ιχνοστοιχεία. Επιπλέον οι μικροοργανισμοί είναι εφικτό να συνθέσουν βιολογικά μονομερή πλαστικών μέσω της ζύμωσης βιομάζας, όπως είναι τα ζαχαρότευτλα, τα ζαχαροκάλαμα, οι πατάτες, τα δημητριακά (σιτάρι και καλαμπόκι) και τα γεωργικά απόβλητα καθαρισμού όλων των παραπάνω. Όσον αφορά τα φυτά, από αυτά μπορούν να εξαχθούν σημαντικές ενώσεις οι οποίες μπορούν να λειτουργήσουν ως δομικές μονάδες πλαστικών [104]. Αυτές είναι κυρίως φυσικοί πολυσακχαρίτες όπως το άμυλο, η κυτταρίνη, η χιτινή και η χιτοζάνη [103]. Η επιστήμη της βιοτεχνολογίας και συγκεκριμένα ο τομέας της γενετικής μηχανικής επικεντρώνεται σημαντικά στην μετάλλαξη του γονιδιώματος τόσο των μικροοργανισμών όσο και των φυτών με σκοπό την πιο αποτελεσματική και αποδοτική παραγωγή των βιολογικής προέλευσης πολυμερών και των μονομερών τους.

Το πρώτο γνωστό βιολογικής προέλευσης πλαστικό, ο πολύ(3-υδροξυ βουτυρικός) εστέρας (PHB), ανακαλύφθηκε το 1926 από τον Γάλλο ερευνητή Μορίς Λεμουάν

(Maurice Lemoigne) παραγμένο στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων του βακτηρίου *Bacillus megaterium* [102], [105].



**Εικόνα 4:** Φωτογραφία με τη μέθοδο ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης (TEM), του κυττάρου του βακτηρίου *Bacillus megaterium* με κόκκους πολυμερούς PHB σε συσσώρευση στο κυτταρόπλασμά του [105].

Συνεπώς, τα βιολογικής προέλευσης πλαστικά μπορούν να παραχθούν είτε άμεσα βιολογικά στο εσωτερικό των οργανισμών είτε έμμεσα μέσω βιολογικής παραγωγής των μονομερών τους και περαιτέρω πολυμερισμό τους (βιολογικά-ενζυμικά ή χημικά), ενώ αποτελούν μια φιλική προς το περιβάλλον εναλλακτική των συμβατικών πλαστικών μειώνοντας το αποτύπωμα του άνθρακα και ενέργειας, που απαιτείται για την εξαγωγή των πετροχημικών μονομερών [106].

#### 1.3.4.2) Βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά

«Βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά» χαρακτηρίζονται τα πολυμερή που επιδέχονται αποσύνθεση υπό την δράση μικροοργανισμών προς μεταβολικά προϊόντα ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_4$  και βιομάζα), τα οποία μπορούν να ενσωματωθούν στο περιβαλλοντικό ορίζοντα χωρίς τοξική επίδραση. Ουσιαστικά τα βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά είναι τα πολυμερή που έχουν τις κατάλληλες ιδιότητες έτσι ώστε, υπό συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες, οι μικροοργανισμοί να μπορέσουν να εκτελέσουν την διεργασία της βιοαποικοδόμησης, όπως αυτή αναλύθηκε (1.3.2) Στάδια βιοαποικοδόμησης πλαστικών) [30], [107].

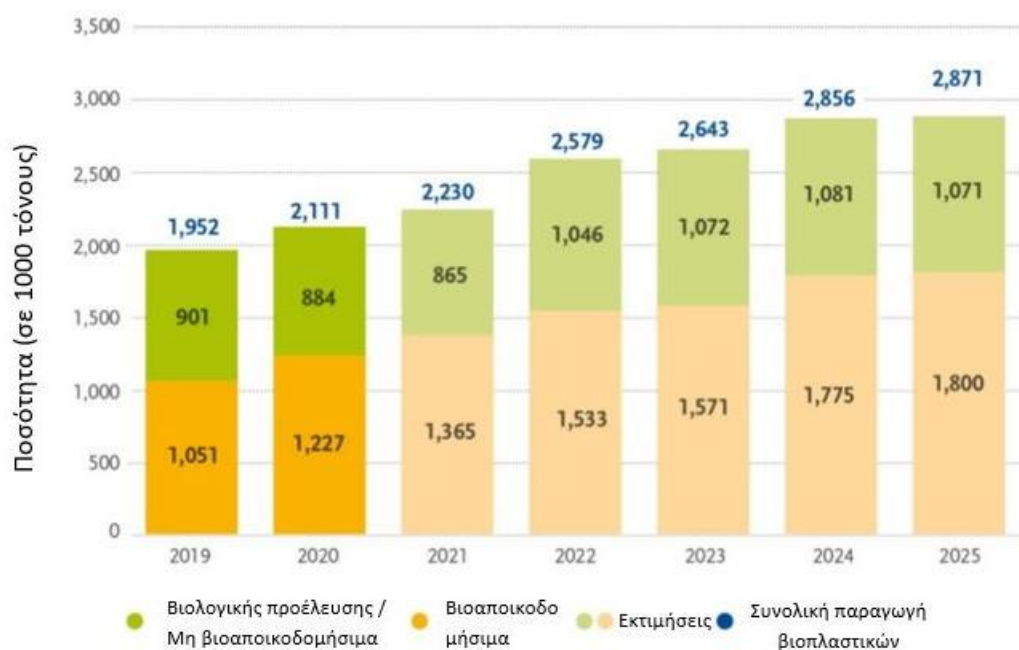
Η σύνθεση βιοαποικοδομήσιμων πλαστικών ξεκίνησε μέσω της ανάμειξης των συμβατικών (πετροχημικών) πολυμερικών υλικών με φυσικές πηγές τροφίμων, όπως το άμυλο. Στη συνέχεια ακολούθησαν προσπάθειες προσθήκης λειτουργικών ομάδων στον πολυμερικό σκελετό (για παράδειγμα μονάδες με μεγάλο αριθμό εστερικών δεσμών) που επιδέχονται μικροβιακή αποικοδόμηση. Τέλος τα προκύπτοντα βιοπλαστικά από μικροοργανισμούς (όπως το PHB που αναλύθηκε), χαρακτηρίζονται ως «πραγματικά βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά» [108].

Το γεγονός ότι τα βιολογικής προέλευσης πλαστικά, όπως προαναφέρθηκε, προέρχονται από βιολογικές ανανεώσιμες πηγές δεν τα καθιστά και

βιοαποικοδομήσιμα. Αντιστοίχως το ότι τα βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή δύναται να διασπαστούν από μικροοργανισμούς δεν συνεπάγεται ότι προέρχονται από βιολογικά μονομερή. Έτσι, όλα τα βιολογικής προέλευσης πλαστικά δεν είναι βιοαποικοδομήσιμα και αντιστοίχως όλα τα βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά δεν είναι βιολογικής προέλευσης. [106] Τα πλαστικά τα οποία είτε είναι βιολογικής προέλευσης είτε είναι βιοαποικοδομήσιμα ή και τα δυο, χαρακτηρίζονται ως «βιοπλαστικά» [109], [110].

Τα βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά μπορούν να βοηθήσουν στην επίλυση του προβλήματος της μόλυνσης των πλαστικών αποβλήτων, αφού έχουν την ικανότητα έπειτα από την εναπόθεση τους στο περιβάλλον να μετατρέπονται σε βιομάζα και αέρια, ενώ κάποια από αυτά μπορούν να μετατραπούν και σε κομπόστ, ένα φυσικό λίπασμα [111].

Τα παραγόμενα βιοπλαστικά αποτέλεσαν μόλις το 0,57 % των συνολικά παραγόμενων συμβατικών πλαστικών το 2020 (2111 και 367 εκατομμύρια, τόνοι αντίστοιχα) [112], ενώ η παγκόσμια παραγωγή τους εκτιμάται ότι θα αυξηθεί περίπου 35 % την επόμενη πενταετία [113] :



**Εικόνα 5:** Οι παραγόμενες (και εκτιμώμενες) ποσότητες βιοπλαστικών παγκοσμίως, 2019-2025 [113].

Επομένως τα πλαστικά μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με κριτήριο τη πηγή προέλευσης τους και την δυνατότητα βιοαποικοδόμησης τους. Οι κατηγορίες, με χαρακτηριστικά παραδείγματα, έχουν ως εξής [30], [109] :

1. Πετροχημικά, μη βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά (συμβατικά πλαστικά) :

Πολυαιθυλένιο (PE), Πολυπροπυλένιο (PP), Πολυστυρένιο (PS), Τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο (PET), Πολυβινυλοχλωρίδιο (PVC), Πολυουρεθάνη (PUR),

Πολυανθρακικά (PC), Πολυαμίδια (PA), Στυρόλιο βουταδιενίου ακρυλονιτριλίου (ABS), Τερεφθαλικό πολυτριμεθυλένιο (PTT), Θερμοπλαστικά πολυεστερικά ελαστομερή (TPC-ET)

2. Πετροχημικά, βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά (βιοπλαστικά) :

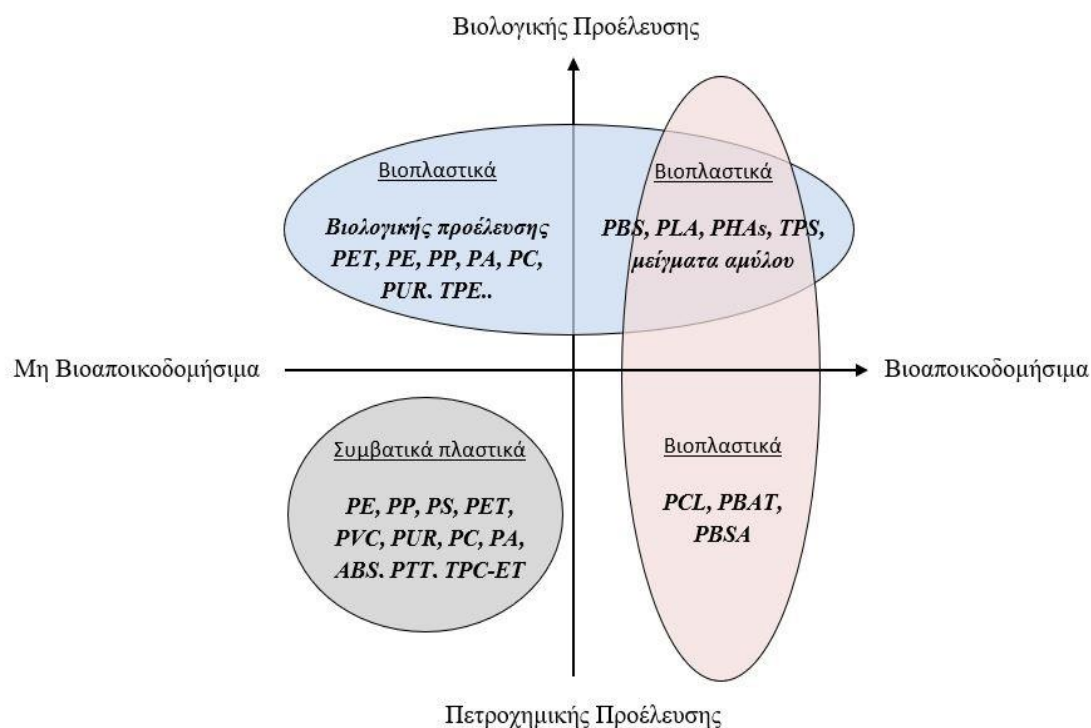
Πολυκαπρολακτόνη (PCL), Τερεφθαλικό αδιπικό πολυβουτυλένιο (PBAT), Ηλεκτικό αδιπικό πολυβουτυλένιο (PBSA)

3. Βιολογικά, μη βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά (βιοπλαστικά) :

Βιολογικής προέλευσης PET, PE, PP, PA, PC, PUR, θερμοπλαστικά ελαστομερή (TPE) και άλλα.

4. Βιολογικά, βιοαποικοδομήσιμα βιοπλαστικά (βιοπλαστικά) :

Πολύ(ηλεκτρικός βουτυλεστέρας) (PBS), Πολυγαλακτικό οξύ (PLA), Πολύυδροξυαλκανοϊκοί εστέρες (PHAs), Βιολογικής προέλευσης TPE, Θερμοπλαστικό άμυλο (TPS).



**Εικόνα 6:** Κατηγοριοποίηση των πλαστικών με κριτήριο την πηγή προέλευσής τους και την ικανότητα βιοαποικοδόμησης [30], [109].



### 1.3.5) Πολυεστέρες ως εμπορικά πλαστικά : Σύνθεση & Βιοαποικοδόμηση

#### 1.3.5.1) Πολυγαλακτικό οξύ (PLA)

##### Δομή, Ιδιότητες & Εφαρμογές του PLA

Το πολυγαλακτικό οξύ (PLA) αποτελεί ένα θερμοπλαστικό πολυμερές της οικογένειας των αλειφατικών πολυεστέρων. Χαρακτηρίζεται ως ένα από τα περισσότερο καταναλισκόμενα πλαστικά με τις βασικές βιομηχανικές εφαρμογές του να αποτελούν τα νήματα 3D εκτυπωτών, τα βιοδιασπώμενα υλικά συσκευασίας (σακούλα τσαγιού) και τα ποτήρια μιας χρήσης.

##### Βιολογική και χημική σύνθεση του PLA

Το βασικό μονομερές του PLA, είναι το γαλακτικό οξύ (LA) το οποίο έχει δύο στερεοϊσομερή L-γαλακτικό οξύ (L-LA) και D-γαλακτικό οξύ (D-LA). Για υψηλής κρυσταλλικότητας PLA προτιμάται η χρήση σημαντικά καθαρού μονομερούς LA, οποιουδήποτε εναντιομερούς, έναντι του ρακεμικού μίγματος και των δύο εναντιομερών μορφών, μέσω του οποίου προκύπτει ανεπιθύμητο άμορφο πολυμερές [104]. Τέτοιο μίγμα προκύπτει κυρίως κατά τη χημική σύνθεση του LA από ορυκτές και πετροχημικές πηγές. Επιπλέον η χημική σύνθεση του LA έχει αρκετά υψηλό λειτουργικό και κατασκευαστικό κόστος καθώς ενέχει και περιορισμούς που αφορούν την παραγόμενη ποσότητα του μονομερούς [114]. Τα παραπάνω σε συνδυασμό με τη πληθώρα αρνητικών περιβαλλοντικών επιπτώσεων που ενέχει η εκμετάλλευση ορυκτών πηγών έχουν ως αποτέλεσμα το να έχει επικρατήσει βιομηχανικά πλέον η παραγωγή του μονομερούς, μη χημικά, από βιολογικές πηγές, με τη βοήθεια μικροοργανισμών.

Βιομάζα, ως πρώτη ύλη, για την παραγωγή LA αποτελούν κυρίως ζαχαρότευτλα, ζαχαροκάλαμα, καλαμπόκι και πατάτες, λόγω των σακχάρων που εμπεριέχουν (μαλτόζη, γλυκόζη, ξυλόζη, άμυλο) καθώς και πηγές βιταμίνης-B, αμινοξέων και νουκλεοτιδίων, όπως τα υγρά που προκύπτουν ως παραπροϊόντα κατά την επεξεργασία του καλαμποκιού (corn steep liquor) που βοηθούν σημαντικά την ανάπτυξη των βακτηρίων [104]. Η αναερόβια ζύμωση διαλυμάτων των παραπάνω από ειδικά (γαλακτικά) βακτήρια οδηγεί στην διάσπαση της βιομάζας προς το επιθυμητό μονομερές LA. Πιο αναλυτικά, η ζύμωση μπορεί να συμβεί ακολουθώντας δύο μεταβολικά μονοπάτια, ανάλογα με την ομάδα γαλακτικών βακτηρίων που συμμετέχουν, τα ομογαλακτικά βακτήρια (*Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp., *Pediococcus* sp.) ή τα ετερογαλακτικά βακτήρια (μερικοί *Streptococcus* sp., *Leuconostoc* sp.), τη διαθέσιμη ενέργεια και τις συνθήκες που επικρατούν. Η διαφορά των δύο μονοπατιών έγκειται στο τύπο σακχάρου ζύμωσης, στην απαιτούμενη ενέργεια και στο τελικό προϊόν ζύμωσης. Έτσι το μονοπάτι των ομογαλακτικών βακτηρίων ή EMP (Embden-Mayerhof Pathway) ακολουθείται κατά την ζύμωση της γλυκόζης ή πολυμερών της (άμυλο, μαλτόζη), χρησιμοποιώντας ως ενέργεια 2 μόρια ATP και παράγοντας καθαρό LA ως προϊόν (μέσω αναγωγής του παραγόμενου

πυροσταφυλικού οξέος) . Το ετερογαλακτικό μονοπάτι ή PKP (PhosphoKetolase Pathway) ακολουθείται κατά τη ζύμωση κυρίως πεντοζών (όπως ξυλόζη), χρησιμοποιώντας ενεργειακά 1 μόριο ATP και παράγοντας ένα μίγμα προϊόντων ζύμωσης (μέσω αναγωγής του παραγόμενου πυροσταφυλικού οξέος) , αποτελούμενο από το επιθυμητό μονομερές LA, αλλά και από ποσότητες αιθανόλης, διοξειδίου του άνθρακα, οξικού οξέος και μορφών διακετυλίου [104], [115]. Η παραγόμενη ποσότητα LA, όμως, περιορίζεται σημαντικά, λόγω της μη ανθεκτικότητας των γαλακτικών βακτηρίων σε πολύ όξινα (κάτω του 4) pH. Για το λόγο αυτό, έχουν ερευνηθεί μικροοργανισμοί, πέραν των γαλακτικών βακτηρίων, οι οποίοι έχουν την ικανότητα ζύμωσης σακχάρων σε γαλακτικό οξύ. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν άλλα βακτήρια, όπως το *Escherichia coli*, το *Corynebacterium glutamicum* και το *Bacillus coagulans* [104], [116].

Η χημική σύνθεση του πολυμερούς PLA πραγματοποιείται μέσω 3 σταδίων χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το παραγόμενο, με ζύμωση, καθαρό βιομονομερές LA. Το LA δεν μπορεί να πολυμεριστεί κατευθείαν σε PLA αλλά μετατρέπεται σε πρώιμο PLA (χαμηλού μοριακού βάρους PLA, περίπου 1000-5000 g/mol) μέσω αντίδρασης συμπύκνωσης. Αυτό συμβαίνει λόγω σχηματισμού ενός μορίου νερού κατά την αντίδραση πολυμερισμού, το οποίο συντελεί στη μερική αποδόμηση της σχηματιζόμενης πολυμερικής αλυσίδας και κατ' επέκταση στη μείωση του μοριακού της βάρους. Στη συνέχεια το πρώιμο PLA αποπολυμερίζεται σε μονομερή, τα λεγόμενα λακτίδια , τα οποία με τη σειρά τους επιδέχονται αντίδραση πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου προς το τελικό, υψηλού μοριακού βάρους (μεγαλύτερο των 100000 g/mol), PLA. Η παραπάνω διαδικασία της χημικής σύνθεσης του PLA λαμβάνει χώρα παρουσία οργανομεταλλικού καταλύτη [116], [117].

Επίτευγμα της τελευταίας δεκαετίας, αποτελεί η μελέτη της πλήρως βιολογικής σύνθεσης του PLA μέσω του πολυμερισμού του βιομονομερούς LA με τη χρήση ενζύμων. Ο ενζυμικός πολυμερισμός του PLA πραγματοποιείται με τη βοήθεια του συμπλόκου γαλακτικού οξέος – CoA (LA-CoA), το οποίο παράγεται από ένα στέλεχος του βακτηρίου *E. coli* μέσω γενετικής μηχανικής. Παρ' όλα αυτά, χρησιμοποιώντας αυτή τη στρατηγική, δεν καθίσταται δυνατή η σύνθεση ομοπολυεστέρα PLA, αλλά ο σχηματισμός ενός συμπολυεστέρα ο οποίος αποτελείται μόλις από 6% LA [117].

#### Βιοαποικοδόμηση του PLA

Το PLA, όπως αναλύθηκε, προέρχεται από βιολογικές πηγές ενώ είναι και βιοαποικοδομήσιμο. Συγκεκριμένα, σε συνθήκες απουσίας άνθρακα, ορισμένοι μικροοργανισμοί εκφράζουν την αποπολυμεράση του PLA (σε εξωκυτταρικό περιβάλλον). Η έκφραση της αποπολυμεράσης του PLA στις συνθήκες αυτές γίνεται με πολύ ταχείς ρυθμούς, με το ένζυμο να διεγείρεται και να ξεκινά τη λειτουργία του με τη βοήθεια προσθήκης συγκεκριμένων επαγωγών. Τέτοιοι επαγωγείς είναι ζελατίνη, ελαστίνη, ίνες μεταξιού, πεπτίδια και αμινοξέα, τα οποία έχουν το χαρακτηριστικό ότι αποτελούνται από πολλά μόρια L-αλανίνης, η οποία έχει όμοια δομή με τα μόρια L-γαλακτικού οξέος στη θέση του χηλικού άνθρακα της στερεοδομής του PLA. Στη συνέχεια οι αποπολυμεράσες «επιτίθεται» στους ενδομοριακούς εστερικούς δεσμούς

του PLA, σπάζοντας το σε oligομερή, διμερή και μονομερή. Τα πολύ μικρού μοριακού βάρους κομμάτια διεισδύουν πλέον στο εσωτερικό των μικροβιακών κυττάρων και αποικοδομούνται στις μεμβράνες τους σε διοξείδιο του άνθρακα, νερό ή μεθάνιο από τα αντίστοιχα από αυτά εκφραζόμενα ένζυμα. Οι παραπάνω μικροοργανισμοί μπορεί να είναι μύκητες (ακτινομύκητες όπως *Amicolatopsis orientalis*, *Laceyella sacchari*, *Pseudocardia alni*, *Amycolatopsis thailandensis*, *Saccharothrix waywayandensis* και άλλα), βακτήρια (*Bacillus brevis*, *Bacillus licheniformis*, *Alcaligenes* sp., *Pseudomonas* sp. και άλλα) και ζύμες (*Tritachium album*, *Cryptococcus* sp. και άλλα), οι οποίοι μπορούν να βρεθούν σε περιοχές όπως το υγρό έδαφος και τα υδάτινα απόβλητα. Οι αποπολυμεράσεις του PLA είναι κυρίως πρωτεάσες, εστεράσες, λιπάσες και κουτινάσες. Τα μονομερή του PLA που προκύπτουν από την διάσπαση δεν αποτελούν ρυπαντές του περιβάλλοντος [118].

Πειραματικά, οι πρώτοι βιοαποικοδομητές μικροοργανισμοί του PLA που προσδιορίστηκαν είναι, ο ακτινομύκητας *Amycolatopsis* HT-32 με την πρωτεάση του να προκαλεί μείωση βάρους των PLA φιλμς κατά 60 % έπειτα από 14 μέρες, το βακτήριο *Bacillus brevis* και οι ζύμες *Fusarium moniliforme* και *Penicillium roqueforti* [119]. Πιο σύγχρονες έρευνες εκτιμούν ότι η πρωτεάση K δύναται να αποικοδομήσει το PLA με απώλεια βάρους 80 % σε διαφορετικούς χρόνους ανάλογα την μορφή του πολυμερούς (έπειτα από 65 ώρες για PLA σε μορφή φιλμς και έπειτα από 7 με 9 ώρες για PLA σε μορφή ινών) [120]. Ισχυρή δράση στο PLA, συγκεκριμένα στο ρακεμικό μίγμα του (D,L-PLA), έχει η εστεράση ABO2449/*Alcanivorax borkumensis* με 90% μετατροπή του προς oligομερή και μονομερή γαλακτικού οξέος (σε μερικές ώρες για διαλυτό PLA και σε 2 μέρες για στερεό PLA) [121]. Τέλος, ενδεικτικά ένζυμα με βιοαποικοδομητική δράση στο PLA από τη βιβλιογραφία εμπεριέχουν, τη κουτινάση PaE/*Pseudozyma antarctica*, την αλκαλάση/*Bacillus licheniformis*, την εστεράση από ζωικό συκώτι (χοίρων) και την λιπάση/*Candida cylindracea*, με 50,4 % μετατροπή του PLA σε διαλυτά προϊόντα [122], 25 %, περίπου 4 % και 1,4 % μείωση βάρους υφάσματος PLA σε 21 μέρες, αντίστοιχα [123].

**Πίνακας 1** : Ενδεικτικοί μικροοργανισμοί και ένζυμα που βιοαποικοδομούν το PLA, οι συνθήκες βιοαποικοδόμησης, και τα τελικά αποτελέσματα δράσης.

| Μορφή PLA   | Ένζυμο/<br>Προέλευση                       | Συνθήκες<br>αντίδρασης  | Αποτέλεσμα<br>δράσης                  | Αναφορά |
|---|--|---|---------------------------------------|---------|
| Πέλλετ-<br>σφαιρίδια ( $M_n$<br>= $1,3 \times 10^5$ )             | Πρωτεάση/<br><i>Amycolatopsis</i><br>HT-32 | Επώαση σε τρυβλία<br>με θρεπτικό υλικό<br>και<br>γαλακτοματοποιημέ<br>νο PLA, pH 7,0, 30<br>°C, 14 ημέρες | Απελευθέρωση 121<br>mgL-lactic acid/L | [120]   |
| Φιλμ (πάχος<br>50 $\mu$ m, $M_n$ =<br>$4,5 \times 10^4$ , $T_g$ = | -/ <i>Bacillus</i><br><i>brevis</i>        | Υγρές καλλιέργειες<br>με θρεπτικό υλικό με<br>0,5 % συγκέντρωση   | ≈25% μείωση<br>βάρους                 | [124]   |

|  |   |   |   |       |
|--|---|---|---|-------|
| 58 °C, T <sub>m</sub> = 175 °C)  |   | PLA φιλμ, 60 °C, 120 rpm, 20 ημέρες)  |   |       |
| 85% Υδατικό διάλυμα ρακεμικού D,L-PLA  | -/ <i>Fusarium moniliforme</i><br>-/ <i>Penicillium roqueforti</i>  | Υγρές καλλιέργειες με θρεπτικό υλικό με συγκέντρωση 10 g <sub>D,L-PLA</sub> /L, pH 6,6, 30 °C, 150 rpm, 7 ημέρες  | Τελική συγκέντρωση : 0 g <sub>D,L-PLA</sub> /L, 6,1±0,8 g <sub>D,L-PLA</sub> /L               | [125] |
| Ίνες PLLA (M <sub>n</sub> = 2,25 ×10 <sup>5</sup> , πάχος 0,27±0,2 mm, μέγεθος 2 cm × 2 cm)        | Πρωτεάση Κ λυσοφιλωμένη/<br>-   | 250 mL 0,05 M Tris/HCl, pH 8,6, 9 h, 37 °C, 2 μg/mL   | 80 % μείωση βάρους  | [126] |
| Υφασμα (100% PLA) (πάχος 0,126 mm, βάρος 30 g/m <sup>2</sup> , μέγεθος 50 mm πλάτος ×150 mm μήκος) | Λιπάση/ <i>Candida cylindracea</i><br>Εστεράση/ <i>Zωϊκό συκώτι (χοίρων)</i><br>Αλκαλάση/ <i>Bacillus licheniformis</i> | Λιπάση, Εστεράση : 25 mL Tris διάλυμα, pH 8,0, 40 °C, 10% συγκέντρωση ενζύμου, 0,5 g υφάσματος PLA, 10 mM χλωριούχο ασβέστιο, 21 ημέρες<br><br>Αλκαλάση : 25 mL Tris διάλυμα, pH 9,5, 60 °C), 50% συγκέντρωση ενζύμου ως προς βάρος υφάσματος, 3 mM L-κυστεΐνη, 21 ημέρες<br><br>Σε όλες τις αντιδράσεις προσθήκη 0,05 %wt αζίδιο του νατρίου | Λιπάση : 4 % μείωση βάρους<br>Εστεράση : 1,4 % μείωση βάρους<br>Αλκαλάση : 25 % μείωση βάρους | [122] |
| Φιλμ (από 0,1 g PLA πέλλετ, M <sub>n</sub> = 1,3 ×10 <sup>5</sup> )                                | Κουτινάση PaE/ <i>Pseudozyma antarctica</i>   | 0,05 mL 20 M Tris/HCl, pH 8,8, 24 h, 30 °C, 0,004 mg <sub>PLA</sub> /mL, 0,2 mg <sub>ενζύμου</sub> /g <sub>PLA</sub>  | 50,4% αποικοδόμηση σε διαλυτές ενώσεις  | [123] |
| Στερεό PLA (M <sub>w</sub> = 1,0-1,8 ×10 <sup>4</sup> )  | Εστεράση ABO2449/ <i>Alc anivorax borkumensis</i>   | 1,0 mL 0,4 M Tris/HCl, pH 8, 36 h, 35 °C, 10-12 mg <sub>PLA</sub> /mL, 0,005 g <sub>ενζύμου</sub> /g <sub>PLA</sub>   | 90 % μετατροπή προς oligομερή και μονομερή LA   | [121] |

### 1.3.5.2) Πολύ(3-υδροξυ βουτυρικός) εστέρας (PHB)

#### Δομή, Ιδιότητες & Εφαρμογές του PHB

Ο πολύ(3-υδροξυ βουτυρικός) εστέρας (PHB) αποτελεί τον πιο διαδεδομένο πολυεστέρα της οικογενείας των πολύ(ύδροξυ αλκανοϊκών εστέρων) ή πολύ(ύδροξυ αλκανοϊκών) οξέων (PHAs), πολυμερή τα οποία σχηματίζονται στο κυτταρόπλασμα πληθώρας μικροοργανισμών μέσω ζύμωσης σακχάρων ή λιπιδίων [127]. Οι βιομηχανικές εφαρμογές του PHB, και των PHAs γενικότερα, είναι ακόμα σχετικά περιορισμένες λόγω του υψηλού λειτουργικού και πάγιου κόστους παραγωγής και απομόνωσής του. Κάποιες από αυτές όμως εστιάζουν στα υλικά συσκευασίας, στα βιοκαύσιμα και βιοϊατρικά αντικείμενα (μοσχεύματα και φάρμακα) [128].

#### Βιολογική σύνθεση του PHB

Το PHB, όπως αναλύθηκε παραπάνω (1.3.4.1) Βιολογικής προέλευσης πλαστικά), χαρακτηρίζεται ως το πρώτο βιολογικής προελεύσεως πλαστικό παραγόμενο από τα κύτταρα του βακτηρίου *Bacillus megaterium*. Επισημαίνεται ξανά ότι η παραγωγή πλαστικών από τους μικροοργανισμούς λαμβάνει χώρα υπό συνθήκες ισορροπημένης ανάπτυξης ως μέσο αποθήκευσης άνθρακα και ενέργειας. Στα περισσότερα βακτήρια, η σύνθεση του PHB, ακολουθεί μεταβολικό μονοπάτι με πηγή άνθρακα γλυκόζη ή σακχαρόζη. Το σημαντικότερο ρόλο για τον σχηματισμό PHB στα κύτταρα των μικροοργανισμών, κυρίως των βακτηρίων, διαδραματίζουν τα ένζυμα β-κετοθειολάση (phaA), ακετοακέτυλο συνένζυμο Α αναγωγάση (phaB) και PHB συνθάση ή πολυμεράση (phaC). Τα γονίδια των τριών αυτών ενζύμων σχηματίζουν το οπερόνιο phaCAB με έναν ισχυρό δομικό εκκινητή μπροστά από το γονίδιο phaC. Ο ρόλος των παραπάνω ενζύμων διαφέρει. Συγκεκριμένα το phaA είναι υπεύθυνο για τον σχηματισμό του συμπυκνωμένου μορίου ακετοακέτυλο συνενζύμου Α (Acetoacetyl-CoA), από ακέτυλο συνένζυμο Α παραγόμενο κατά τη ζύμωση των σακχάρων, το οποίο στη συνέχεια θα μετατραπεί με τη βοήθεια του phaB στο κατάλληλο σύμπλοκο-συνένζυμο Α (3 ή 4,υδροξυάκυλο-CoA ή 3-υδροξυβουτυρο-CoA), το οποίο με τη σειρά του θα πολυμεριστεί σε PHB μέσω του phaC [105], [129].

Τα βακτήρια που εκ φύσεως παράγουν, σε συνθήκες ισορροπημένης ανάπτυξης, το PHB, εμφανίζουν αδυναμίες όσον αφορά, το ρυθμό ανάπτυξης τους. Το παραπάνω επηρεάζει αισθητά τους ρυθμούς παραγωγής πολυμερούς όπως και την παραγόμενη ποσότητα του, αφού αρκετά από τα βακτήρια αυτά χρησιμοποιούν το παραγόμενο PHB ως πηγή ενέργειας στις μη ευνοϊκές συνθήκες ανάπτυξης που υποβάλλονται. Τέλος σημαντική δυσκολία εμφανίζεται και στην διαδικασία απομόνωσης των κόκκων πολυμερούς από το κυτταρόπλασμα των κυττάρων των παραγωγών μικροοργανισμών. Στα παραπάνω προβλήματα λύση δίνουν τα εργαλεία της βιοτεχνολογίας μέσω της δημιουργίας «μηχανικά κατασκευασμένων» βακτηρίων, τα οποία δεν πραγματοποιούν εκ φύσεως τη παραπάνω διαδικασία, αλλά αποτελούν εξαιρετικούς ξενιστές προσφέροντας πληθώρα προτερημάτων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το βακτήριο *E. coli*, το οποίο έχει σημαντικά υψηλούς ρυθμούς ανάπτυξης, με την ικανότητα να παράγει σημαντική ποσότητα PHB στο κυτταρόπλασμα του χωρίς να το

καταναλώνει ως πηγή ενέργειας αφού απουσιάζουν από το γονιδίωμα του τα γονίδια έκφρασης των αντίστοιχων αποπολυμερασών, ενώ παράλληλα η απομόνωση των κόκκων πολυμερούς είναι αρκετά απλή και εύκολη [104].

### Βιοαποικοδόμηση του PHB

Το PHB αποτελεί ένα βιοπλαστικό, σημαντικά βιοαποικοδομήσιμο υπό συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες. Επιπλέον έχει εξαιρετική δυνατότητα επεξεργασίας, βιοσυμβατότητα και μηχανικές ιδιότητες [130]. Η βιοαποικοδόμηση του PHB πραγματοποιείται, κυρίως από τους μικροοργανισμούς παραγωγούς του, μέσω της έκκρισης εξωκυτταρικών αποπολυμερασών, συνήθως υπό συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών και πηγής άνθρακα. Οι αποπολυμεράσες του PHB λειτουργούν υδrolύοντας τους εστερικούς δεσμούς του πολυμερικού σκελετού του, ενώ αποικοδομούν και πολλά συμπολυμερή του (Πίνακας 2) [131]. Αυτές αποτελούνται από δυο λειτουργικούς τομείς, ο ένας υπεύθυνος για την πρόσδεση του υποστρώματος στο ένζυμο και ο άλλος υπεύθυνος για την καταλυτική δράση του ενζύμου, μέσω της καταλυτικής τριάδας Ser-Asp-His (Σερίνη-Ασπαρτικό οξύ-Ιστιδίνη). Ανάμεσα στους δύο λειτουργικούς τομείς υπάρχει η περιοχή του συνδετικού τομέα που τους ενώνει [132], [133]. Το προϊόν της βιολογικής υδρόλυσης του PHB είναι το R-3-υδροξυβουτικό οξύ, μικρού μεγέθους μονομερές και διαλυτό στο νερό, το οποίο διαχέεται παθητικά δια μέσου της κυτταρικής μεμβράνης των μικροοργανισμών αποικοδομητών, όπου και μεταβολίζεται αερόβια προς παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα και νερού καθώς και μεθανίου, υπό αναερόβιες συνθήκες [8].

Πληθώρα αερόβιων και αναερόβιων μικροοργανισμών που βιοαποικοδομούν το PHB έχουν απομονωθεί από διάφορα περιβάλλοντα. Συγκεκριμένα PHA αποπολυμεράσες έχουν ανακαλυφθεί από μικροοργανισμούς που βρίσκονται στο χώμα (*Acidovorax faecilis*, *Aspergillus fumigatus*, *Comamonas* sp., *Pseudomonas lemognei* και *Variovorax paradoxus*), στην ενεργό (*Alcaligenes faecalis* και *Pseudomonas*) και αναερόβια ιλύ (*Ilyobacter delafieldii*) καθώς και στα θαλάσσια οικοσυστήματα (*Comamonas testosteroni*) [8]. Ειδικότερα PHB αποπολυμεράσες έχουν απομονωθεί από τους *Alcaligenes faecalis*, *Comamonas* sp., *Comamonas testosteroni*, *Presudomonas lemognei*, *Pseudomonas pickettii*, *Pseudomonas stutzeri*, *Penicillium funiculosum*, *Streptovercillium kashmriense* AF1, *Paecilomyces lilacinus* και *Aspergillus oryzae* [16], [132].

**Πίνακας 2:** Ενδεικτικοί μικροοργανισμοί και ένζυμα που βιοαποικοδομούν το PHB, οι συνθήκες βιοαποικοδόμησης, και τα τελικά αποτελέσματα δράσης.

| Μορφή PHB  | Ένζυμο/<br>Προέλευση                              | Συνθήκες<br>αντίδρασης  | Αποτέλεσμα<br>δράσης  | Αναφορά |
|--|---|---|---|---------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>Φιλμ P(3HB) (<math>M_n = 228000</math>, Crystallinity = <math>60 \pm 5\%</math>)</li> </ul> | PHB αποπολυμεράση/<br><i>Alcaligenes faecalis</i> | 1 mL 0,1 M K-Phosphate, pH 7,4, 5 h, 37 °C, 8 mg <sub>φιλμ</sub> /mL<br>1 μg <sub>ένζυμου</sub> /mL | Ρυθμός διάβρωσης <ul style="list-style-type: none"> <li>P(3HB): <math>0,17 \pm 0,04</math> mg/h/cm<sup>2</sup>,</li> <li>P(3HP): <math>0,21 \pm 0,05</math> mg/h/cm<sup>2</sup>,</li> </ul> | [134]   |

|   |  |   |   |       |
|---|--|---|---|-------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Φιλμ P(3HP) (<math>M_n = 143000</math>, Crystallinity = <math>40 \pm 5\%</math>)</li> <li>• Φιλμ (4HB) (<math>M_n = 203000</math>, Crystallinity = <math>38 \pm 5\%</math>) (διαστάσεις <math>10 \times 10 \times 0,07</math> mm)</li> </ul> |  |   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• P(4HB): <math>0,08 \pm 0,03</math> mg/h/cm<sup>2</sup></li> </ul>                              |       |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Φιλμ P(3HB)</li> <li>• Φιλμ P(3HP)</li> <li>• Φιλμ P(4HB) (διαστάσεις <math>10 \times 10 \times 0,07</math> mm)</li> </ul>   | PHB αποπολυμεράση/<br><i>Alcaligenes faecalis</i>    | 1 mL 0,1 M K-Phosphate, pH 7,4, 5 h, 37 °C, 8 mg <sub>φιλμ</sub> /mL 2 μg <sub>γενζύμου</sub> /mL   | Μείωση βάρους <ul style="list-style-type: none"> <li>• P(3HB): 21,15 %,</li> <li>• P(3HP): 26,25 %,</li> <li>• P(4HB): 10 %</li> </ul>  | [134] |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Φιλμ P(3HB)</li> <li>• Φιλμ P(3HP)</li> <li>• Φιλμ P(4HB) (διαστάσεις <math>10 \times 10 \times 0,07</math> mm)</li> </ul>   | PHB αποπολυμεράση/<br><i>Pseudomonas limoignei A</i> | 1 mL 0,1 M K-Phosphate, pH 7,4, 5 h, 37 °C, 8 mg <sub>φιλμ</sub> /mL 8 μg <sub>γενζύμου</sub> /mL   | Μείωση βάρους <ul style="list-style-type: none"> <li>• P(3HB): 13,75 %,</li> <li>• P(3HP): 13,75%,</li> <li>• P(4HB): 7,5 %</li> </ul>  | [134] |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Φιλμ P(3HB)</li> <li>• Φιλμ P(3HP) (διαστάσεις <math>10 \times 10 \times 0,07</math> mm)</li> </ul>  | PHB αποπολυμεράση/<br><i>Pseudomonas limoignei B</i> | 1 mL 0,1 M K-Phosphate, pH 7,4, 5 h, 37 °C, 8 mg <sub>φιλμ</sub> /mL 8 μg <sub>γενζύμου</sub> /mL   | Μείωση βάρους <ul style="list-style-type: none"> <li>• P(3HB): 18,75 %,</li> <li>• P(3HP): 6,25 %,</li> </ul>                           | [134] |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Φιλμ P(3HB)</li> <li>• Φιλμ P(3HP)</li> <li>• Φιλμ P(4HB) (διαστάσεις <math>10 \times 10 \times 0,07</math> mm)</li> </ul>   | PHB αποπολυμεράση/<br><i>Pseudomonas pickettii</i>   | 1 mL 0,1 M K-Phosphate, pH 7,4, 5 h, 37 °C, 8 mg <sub>φιλμ</sub> /mL 2 μg <sub>γενζύμου</sub> /mL   | Μείωση βάρους <ul style="list-style-type: none"> <li>• P(3HB): 12,50 %,</li> <li>• P(3HP): 12,50 %,</li> <li>• P(4HB): 2,5 %</li> </ul> | [134] |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Φιλμ P(3HB)</li> <li>• Φιλμ P(3HP)</li> <li>• Φιλμ P(4HB) (διαστάσεις <math>10 \times 10 \times 0,07</math> mm)</li> </ul>   | PHB αποπολυμεράση/<br><i>Pseudomonas limoignei A</i> | 1 mL 0,1 M K-Phosphate, pH 7,4, 5 h, 37 °C, 8 mg <sub>φιλμ</sub> /mL 0,5 μg <sub>γενζύμου</sub> /mL | Μείωση βάρους <ul style="list-style-type: none"> <li>• P(3HB): 18,75%,</li> <li>• P(3HP): 6,25 %,</li> <li>• P(4HB): 7,5 %</li> </ul>   | [134] |

|  |   |  |  |       |
|--|---|--|--|-------|
| 10×10×0,07 mm)   |   |  |  |       |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Φιλμ PHBV (Crystallinity = 61%)</li> <li>• Φιλμ PHBV-a-PHB (90/10) Crystallinity = 56%)</li> <li>• Φιλμ PHBV-a-PHB (80/20) Crystallinity = 50%)</li> <li>• Φιλμ PHBV-a-PHB (50/50) Crystallinity = 30%)</li> </ul> (διαστάσεις 25×8×mm <sup>2</sup> ) | PHB αποπολυμεράση/ <i>Pseudomonas limoignei</i> A | 1,5 mL 0,05 M Tris-HCl, pH 8,0, 20 h, 37 °C, 0,1 mM CaCl <sub>2</sub> , 2,8 μg <sub>γενζύμιου</sub> / mL | Μείωση βάρους <ul style="list-style-type: none"> <li>• PHBV: 85 %</li> <li>• PHBV-a-PHB (90/10): 78 %,</li> <li>• PHBV-a-PHB (80/20): 81 %,</li> <li>• PHBV-a-PHB (50/50): 94 %</li> </ul> | [135] |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Φιλμ P(3HB-co-98%4HB) (M<sub>n</sub>=143000, διαστάσεις 5×5 mm, πάχος 0,05 mm)</li> </ul>   | Λιπάση/Πάγκρεας χοιρινού                          | 3 mL D-PBS με 500 μg <sub>γενζύμιου</sub> /mL με 5,4 units/mg, 37, 120 h, 1-2 mg φιλμ                    | 85 % μείωση βάρους   | [130] |

### 1.3.5.3 Πολύ(ηλεκτρικός βουτυλεστέρας) (PBS)

#### Δομή, Ιδιότητες & Εφαρμογές του PBS

Ο πολύ(ηλεκτρικός βουτυλεστέρας) (PBS) αποτελεί έναν αλειφατικό κορεσμένο πολυεστέρα με θερμοπλαστικές ιδιότητες. Έχει υψηλή χημική και θερμική αντίσταση και επεξεργάζεται εύκολα, γεγονός που του δίνει την ικανότητα να αποτελεί βασική πρώτη ύλη σε πληθώρα τελικών προϊόντων. Έτσι το PBS έχει βρει χρήση σε τομείς όπως της γεωργίας, της αλιείας, της δασοκομίας και των κατασκευών, στους οποίους η ανάκτηση των χρησιμοποιούμενων υλικών με ανακύκλωση αποτελεί βασική δυσκολία. Σημαντική είναι η συμβολή του PBS και στο τομέα των υλικών συσκευασίας με τη παραγωγή βιοδιασπώμενων σακούλων και πλαστικών μεμβρανών [136].

#### Βιολογική και χημική σύνθεση του PBS

Το PBS έχει ελκύσει τον ενδιαφέρον της σύγχρονης επιστημονικής κοινότητας λόγω της ικανότητας του να παρασκευάζεται αποκλειστικά και μόνο μέσω βιολογικών μονοπατιών, με τα δύο απαραίτητα μονομερή για τη παρασκευή του να είναι η 1,4-



βουτανοδιόλη (BDO) και το σουκινικό (ηλεκτρικό) οξύ ή παράγωγα αυτού. Η BDO συντίθεται συμβατικά χρησιμοποιώντας πετροχημικές πρώτες ύλες. Βιολογικά η BDO είναι εφικτό να παραχθεί μέσω της ζύμωσης βιομάζας σακχάρων (γλυκόζης) από γενετικά τροποποιημένους μικροοργανισμούς. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το ανασυνδυασμένο βακτήριο *E. coli* που βιοσυνθέτει BDO ξεκινώντας από το 4-υδροξυβουτυρικό οξύ (4HB), μέσω ζύμωσης βιομάζας, ως πηγή γλυκόζης. Ομοίως με τη BDO, το ηλεκτρικό οξύ συντίθεται κυρίως χρησιμοποιώντας πετροχημικές πρώτες ύλες. Βιολογικά το ηλεκτρικό οξύ αποτελεί βασικό προϊόν του μεταβολικού μονοπατιού ζύμωσης βιομάζας, των αναερόβιων και προαιρετικά αναερόβιων μικροοργανισμών. Η βιομάζα αποτελείται κυρίως από δημητριακά, όπως σιτάρι και καλαμπόκι, καθώς και αγροτικά απόβλητα καθαρισμού των παραπάνω. Παράλληλα μελετάται η χρήση άλλων βιομηχανικών παραπροϊόντων ως πηγή άνθρακα (έναντι των εξευγενισμένων υδρογονανθράκων) και τα υγρά που προκύπτουν ως παραπροϊόντα κατά την επεξεργασία του καλαμποκιού (corn steep liquor) ως πηγή αζώτου. Πληθώρα μικροοργανισμών παράγουν ηλεκτρικό οξύ εκ φύσεως, και πιο συγκεκριμένα πολλά τυπικά γαστρικά βακτήρια, βακτήρια της μεγάλης κοιλίας και γαλακτικά βακτήρια [104], [136], [137].

Η παραγωγή του PBS μέσω χημικών διαδρομών αποτελεί μια εκτενώς μελετημένη διεργασία, ενώ οι συμβατικές τεχνολογίες παρασκευής του πολυμερούς εφαρμόζονται με επιτυχία σε βιομηχανική κλίμακα. Οι πιο γνωστές χημικές τεχνολογίες αφορούν, τον πολυμερισμό τήγματος με μετεστεροποίηση και πολυσυμπύκνωση (χρήση χημικού καταλύτη όπως το τετραβουτυλτιτανικό), τον άμεσο πολυμερισμό ηλεκτρικού οξέος και 1,4-βουτανοδιόλης με πολυμερισμό τήγματος (απλή μέθοδος με παραγωγή PBS υψηλού μοριακού βάρους) ή πολυμερισμό διαλύματος (με διάλυση των μονομερών σε χημικό διαλύτη), τον πολυμερισμό συμπύκνωσης ακολουθούμενος από επέκταση αλυσίδας (χρήση χημικών επιμηκυντών με ακραίες καρβοξυλομάδες, όπως ο δισοκυανικός εστέρας, ο τετρακαρβοξυλικός διανυδρίτης ή υδροξυλομάδες, όπως το αδιπικό και τερεφθαλικό οξύ) και τον μεταπολυμερισμό στερεάς κατάστασης (για αύξηση του μοριακού βάρους των παραγόμενων πολυμερών). Όλες οι παραπάνω συμβατικές τεχνολογίες σύνθεσης PBS απαιτούν την χρήση χημικών τοξικών καταλυτών και άλλων πετροχημικών ουσιών. Έτσι τις τελευταίες δεκαετίες μελετάται η πλήρως βιολογική σύνθεση του PBS, με παραγωγή των μονομερών του από ζύμωση μικροοργανισμών, όπως πρναφέρθηκε, και τον πολυμερισμό των μονομερών με τη χρήση ενζύμων. Ο ενζυμικός πολυμερισμός του PBS πραγματοποιείται με τη βοήθεια μιας λιπάσης. Γενικότερα οι λιπάσες αποτελούν ένζυμα, της κατηγορίας των υδρολασών, που καταλύουν την αντίδραση υδρόλυσης των εστέρων των λιπαρών οξέων. Παρ' όλα αυτά σε οργανικά περιβάλλοντα οι λιπάσες παραμένουν σταθερές και καταλύουν τις αντιδράσεις εστεροποίησης και μετεστεροποίησης, με αποτέλεσμα να αποτελούν βασικοί καταλύτες πολυμερισμού αλειφατικών πολυεστέρων, όπως το PBS. Η πιο διαδεδομένη λιπάση που χρησιμοποιείται στον ενζυμικό πολυμερισμό είναι η λιπάση B (CALB), η οποία έχει απομονωθεί από τον μύκητα *Candida antarctica*. Μέσω του ενζυμικού πολυμερισμού προκύπτει PBS με ικανοποιητικό μοριακό βάρος (130000 g/mol) και υψηλή μετατροπή μονομερών [138].

### Βιοαποικοδόμηση του PBS

Το PBS, που συντίθεται είτε βιολογικά είτε χημικά, πέραν από τις εξαιρετικές μηχανικές ιδιότητες του, επιδέχεται και βιοαποικοδόμηση. Η βιοαποικοδόμηση αφορά την υδρόλυση των εστερικών δεσμών του αλειφατικού πολυεστέρα με αποτέλεσμα το μοριακό βάρος του πολυμερούς να μειώνεται έως ότου οι μικροοργανισμοί δύναται να το αφομοιώσουν [139]. Πληθώρα μικροοργανισμών έχουν μελετηθεί ως προς την ικανότητα βιοαποικοδόμησης του PBS και τα αποτελέσματα που έχουν προκύψει είναι αρκετά ενθαρρυντικά και αυτό διότι οι μετατροπές του πολυμερούς είναι εξαιρετικά υψηλές και οι συνθήκες θερμοκρασίας και pH είναι αντιπροσωπευτικές ενός φυσικού περιβάλλοντος καθιστώντας το PBS ένα από τα πιο υποσχόμενα βιοπλαστικά. Ενδεικτικά έχουν απομονωθεί και μελετηθεί ένζυμα από μικροοργανισμούς όπως *Fusarium solani*/κουτινάση, *Rhizopus delemar*/λιπάση, *Alcanivorax borkumensis*/εστεράση, *Rhodopseudomonas palustris*/εστεράση, *Pseudomonas cepacia*/λιπάση, *Pseudomonas* sp./λιπάση, *Cryptococcus* sp./λιπάση, *Candida antarctica*/λιπάση, *Pseudomonas fluorescens*/λιπάση και *Candida cylindracea*/λιπάση [8], [121], [139]–[144].

**Πίνακας 3** : Ενδεικτικοί μικροοργανισμοί και ένζυμα που βιοαποικοδομούν το PBS, οι συνθήκες βιοαποικοδόμησης, και τα τελικά αποτελέσματα δράσης.

| Μορφή PBS   | Ένζυμο/<br>Προέλευση                        | Συνθήκες<br>αντίδρασης   | Αποτέλεσμα<br>δράσης  | Αναφορά |
|---|---|--|---|---------|
| Φιλμ PBS<br>( $M_n=36657$<br>g/mol, $X_c =$<br>$48,2 \pm 1,4$ %,<br>διαστάσεις<br>$30 \times 10 \times 0,1$ mm)   | Κουτινάση/<br><i>Fusarium<br/>solani</i>    | Ρυθμιστικό διάλυμα<br>20 mM $Na_2HPO_4$ ,<br>pH 7,4, $37 \pm 0.1$ °C,<br>12h, 10<br>mg <sub>κουτινάση</sub> /mL, 130-<br>150 mg φιλμ   | 98,4 %<br>μείωση<br>βάρους  | [139]   |
| Θερμικά<br>επεξεργασμένες<br>ίνες και φιλμ<br>PBS ( $M_n=53000$<br>Da, διαστάσεις<br>φιλμ $5 \times 60 \times 0,2$<br>mm <sup>3</sup> , ίνες<br>μήκους 70 mm)   | Λιπάση/ <i>Pse<br/>udomonas<br/>cepacia</i> | 7,6 mL ρυθμιστικό<br>διάλυμα 0,1 M<br>$KH_2PO_4/KOH$ , pH<br>6,0, 50 °C, 14<br>ημέρες, 1,24<br>mg <sub>λιπάση</sub> /mL, 0,176<br>units/mL, 5 g φιλμ,<br>10-12 ίνες  | Μείωση<br>βάρους<br>• PBS ίνες:<br>< 10 %<br>• PBS<br>φιλμ: $\approx$<br>80 %   | [140]   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>Φιλμ PBSA<br/>(50/40/10 :<br/>But/Suc/Adi,<br/><math>M_n = 64000</math>,<br/>πάχος 0,1<br/>mm)</li> <li>Φιλμ PBS<br/>(<math>M_n =</math><br/>59500,<br/>διαστάσεις<br/><math>6 \times 6 \times 0,15</math><br/>mm</li> </ul> | Λιπάση/ <i>Rhi<br/>zopus<br/>delemar</i>    | <ul style="list-style-type: none"> <li>Ρυθμιστικό<br/>διάλυμα<br/>φωσφορικών, pH<br/>7,0, 37 °C, 240<br/>h, 5<br/>units<sub>λιπάση</sub>/mg<sub>πολυ<br/>μερούς</sub>, 30 mg φιλμ</li> <li>1 mL ρυθμιστικό<br/>διάλυμα pH 7,2,<br/>37 °C, 15 ημέρες</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>96,1 %<br/>μείωση<br/>βάρους</li> <li>&lt; 10 %<br/>μείωση<br/>βάρους</li> </ul> | [141]   |

|  |  |  |  |       |
|--|--|--|--|-------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Φιλμ PBS (<math>M_n = 132000</math>, πάχος 0,1 mm)</li> <li>• Φιλμ PBST (90%:10% BT, <math>M_n \approx 300000</math>, διαστάσεις 30×10 mm, πάχος 0,1 mm)</li> </ul> | Λιπάση/ <i>Pseudomonas sp.</i>           | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, pH 7,0, 37 °C, 240 h, 5 units<sub>λιπάση</sub>/mg<sub>πολυμερούς</sub>, 30 mg φιλμ</li> <li>• 3 mL ρυθμιστικό διάλυμα 0,001 M φωσφορικών (<math>KH_2PO_4/K_2HPO_4</math>), pH 7,0, 37 °C, υπό ανάδευση, 15 ημέρες, 0,1 mg λιπάσης</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• &gt;10 % μείωση βάρους</li> <li>• 94,6 % μείωση βάρους</li> </ul> | [141] |
| Φιλμ PBS ( $M_n = 60000$ , πάχος 200 μm)   | Λιπάση/ <i>Cryptococcus sp.</i>          | 10 mL ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M φωσφορικών, pH 7,0, 30 °C, 96 h, 120 rpm, 61,3 units/mg <sub>λιπάσης</sub> , 25 mg φιλμ   | 100 % μείωση βάρους μετά τις 72 h  | [142] |
| Φιλμ PBS (100000 g/mol, διαστάσεις 30×10×0,5)  | Λιπάση/ <i>Candida antarctica</i>        | 10 mL ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, pH 7,2, 45 °C, 24 h, 18 units/mL <sub>λιπάσης</sub>   | >80 % μείωση βάρους  | [145] |
| Φιλμ PBS ( $M_n = 59500$ , διαστάσεις 6×6×0,15 mm)   | Εστεράση/ <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 1 mL ρυθμιστικό διάλυμα pH 7,2, 37 °C, 15 ημέρες   | 10 % μείωση βάρους   | [143] |
| Φιλμ PBS ( $M_n = 59500$ , διαστάσεις 6×6×0,15 mm)   | Λιπάση/ <i>Candida cylindracea</i>       | 1 mL ρυθμιστικό διάλυμα pH 7,2, 30 °C, 15 ημέρες   | <10 % μείωση βάρους  | [143] |

#### 1.3.5.4) Τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο (PET)

##### Δομή, Ιδιότητες & Εφαρμογές του PET

Το τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο ή πολύ(τερεφθαλικός αιθυλενεστέρας) (PET) είναι ένα από τα πιο δημοφιλή πολυμερή παγκοσμίως. Ανήκει στην κατηγορία των θερμοπλαστικών πολυεστέρων και στη φυσική του κατάσταση έχει δομή άχρωμης ημικρυσταλλικής ρητίνης. Ανάλογα με το τρόπο επεξεργασίας του, το PET μπορεί να είναι άκαμπτο ή ημι-άκαμπτο, με πολύ μικρό βάρος. Η βιομηχανική παραγωγική διαδικασία του είναι σχετικά απλή, με αποτέλεσμα οι εφαρμογές του ως πλαστικό να ποικίλλουν. Έτσι το PET χρησιμοποιείται κυρίως σε υφαντικές ίνες, περιέκτες και

μπουκάλια, συσκευασίες τροφίμων και στη κατασκευή προηγμένων υλικών [150], [213].

#### Βιολογική και χημική σύνθεση του PET

Τα μονομερή του PET είναι η αιθυλενογλυκόλη (EG) και το τερεφθαλικό οξύ (TPA) των οποίων οι συμβατικές χημικές μέθοδοι παρασκευής ποικίλλουν. Παρ' όλα αυτά το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας έχει στραφεί έντονα στην εύρεση μεθόδων βιοπαραγωγής των παραπάνω μονομερών με σκοπό την ισοστάθμιση των περιβαλλοντικών επιδράσεων του πολυμερούς. Η βιοEG είναι εφικτό να παραχθεί μέσω υδρόλυσης του βιοαιθυλενίου, υδρογονόλυσης της γλυκερόλης ή της σορβιτόλης και της ξυλιτόλης καθώς και με επεξεργασία κυτταρινούχας βιομάζας. Το βιοTPA παράγεται μέσω καταλυτικής αερόβιας οξείδωσης του π-ξυλενίου σε όξινο μέσο. Η βιολογική καταγωγή του TPA βασίζεται στη παραγωγή του π-ξυλενίου από βιομάζα. Έτσι βιολογικά το π-ξυλένιο μπορεί να παραχθεί από βιοαιθυλένιο, από υδροξυμεθυλοφουρουράλη (χημική ουσία που προκύπτει από υδρόλυση της βιομάζας σε σάκχαρα και περαιτέρω αφυδάτωση αυτών), από βιοισοβουτανόλη (ζύμωση βιομάζας από μικροοργανισμούς), από βιοισοπρένιο (ζύμωση σακχάρων από βακτήρια) και βιοακρυλικό οξύ (μέσω επεξεργασίας γαλακτικού οξέος, γλυκερίνης και 3-υδροξυπροπανικού οξέος παραγόμενο από ανασυνδυασμένα βακτήρια), από λιμονένιο (συστατικό της φλούδας των εσπεριδοειδών), από φουρφουράλη (χημικό που προκύπτει από την υδρόλυση και αφυδάτωση ξυλάνης λιγνοκυταττινούχας βιομάζας) ή μέσω πυρόλυσης βιομάζας από την εξαγόμενη πίσσα. Στη συνέχεια τα δύο βιομονομερή πολυμερίζονται προς βιοPET σε υψηλή θερμοκρασία (220 °C-260 °C) και πίεση (2,7 με 5 bar), απουσία νερού [214].

#### Βιοαποικοδόμηση του PET

Παρά τις θετικές εφαρμογές του PET σε βιομηχανική κλίμακα, λόγω της έντονης ανθεκτικότητάς του και άλλων μηχανικών ιδιοτήτων του, εμφανίζει αδυναμία στην βιοαποικοδόμηση γεγονός το οποίο το καθιστά σημαντικό υπαίτιο για την μόλυνση και επιβάρυνση του φυσικού περιβάλλοντος από τη συσσώρευσή του.

Συγκεκριμένα η αδυναμία βιοαποικοδόμησης έγκειται κυρίως στις δομικές μονάδες του πολυμερούς και στο φυσικοχημικό προφίλ που του προσδίδουν. Η παρουσία επαναλαμβανόμενων δομικών αρωματικών τερεφθαλικών μονάδων στο πολυμερικό σκελετό του PET συνεπάγεται μειωμένη κινητικότητα των πολυμερικών αλυσίδων, γεγονός που εμποδίζει την προσβολή του πολυμερούς από μικροοργανισμούς, την ανάπτυξη τούς και την παραγωγή των υδρολυτικών ενζύμων τους. Επιπλέον η υδροφοβική φύση του PET περιορίζει σημαντικά την αποτελεσματική επιφανειακή απορρόφηση των ενζύμων μειώνοντας την δράση τους και την δυνατότητα φθοράς του πολυμερούς. Ακόμα σημαντικό ρόλο στην αδυναμία διάσπασης του PET διαδραματίζει η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης του η οποία είναι αρκετά υψηλή ( $T_g = 65 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Όπως προαναφέρθηκε (1.3.3) Παράγοντες που επηρεάζουν την βιοαποικοδόμηση πλαστικών), σε θερμοκρασίες έκθεσης του πολυμερούς μεγαλύτερες από της υαλώδους μετάπτωσης, η προσβολή του από μικροοργανισμούς και η δράση των ενζύμων τους ευνοείται λόγω της αύξησης της ελαστικότητας των άμορφων περιοχών και της

κινητικότητας των πολυμερικών αλυσίδων, γεγονός που τις καθιστά ευκολότερα προσβάσιμες από τα υδρολυτικά ένζυμα. Συνεπώς η αποδοτικότητα της βιοαποικοδόμησης του PET εξαρτάται και από το πόσο δραστικά και σταθερά δύναται να διατηρούνται τα υδρολυτικά ένζυμα σε τέτοιες υψηλές θερμοκρασίες, προϋπόθεση αρκετά περιοριστική. Τέλος η κρυσταλλικότητα του PET, που αποτελεί έναν βασικό παράγοντα της απόδοσης της βιοδιάσπασης, ποικίλλει ανάλογα με τις χρήσεις του. Έτσι το πολυμερές που αποτελεί πρώτη ύλη για τη κατασκευή περιεκτών/μπουκαλιών και υφασμάτων ινών έχει κρυσταλλικότητα σημαντικά υψηλή (30 % και 40% αντίστοιχα) σε αντίθεση με αυτό που προορίζεται για παραγωγή υλικών συσκευασίας και μπουκαλιών που είναι χαμηλής κρυσταλλικότητας (άμορφο), και χρησιμοποιείται λόγω της έντονης διαύγειάς του που προσομοιάζεται με αυτή του γυαλιού [217]. Συνεπώς δεν εμφανίζουν όλα τα είδη PET την ίδια αδυναμία βιοαποικοδόμησης, αφού αυτή εξαρτάται σημαντικά και από το βαθμό κρυσταλλικότητάς τους [146].

Η υδρολυτική διάσπαση του PET οδηγεί στην απελευθέρωση διαλυτών προϊόντων όπως τα μονομερή του, αιθυλενογλυκόλη (EG) και τереφθαλικό οξύ (TPA), καθώς και οι ενώσεις μονο-(2-υδροξυαιθυλ)-τερεφθαλικό οξύ (MHET) και δι-(2-υδροξυαιθυλ)-τερεφθαλικό οξύ (BHET). Αρκετά είναι τα ένζυμα που έχουν απομονωθεί από μικροοργανισμούς και δύναται να αποικοδομήσουν διάφορες μορφές, άμορφου και χαμηλής κρυσταλλικότητας κυρίως, PET. Τέτοια ένζυμα ανήκουν στις ευρύτερες κατηγορίες των λιπασών, υδρολασών, εστερασών (καρβοξυλεστερασών κυρίως), με κάθε μια από τις κατηγορίες να έχει διαφορετική ενεργότητα στα υποστρώματα PET. Έτσι μελετώμενες κουτινάσες και λιπάσες έχουν αποδειχθεί ικανές να υδρολύουν άμορφο PET και να τροποποιούν την επιφάνεια φιλμ PET, με τις πρώτες να είναι δραστικότερες. Αυτό συμβαίνει διότι στις κουτινάσες, σε αντίθεση με τις λιπάσες, το ενεργό κέντρο βρίσκεται σε εύκολα προσιτή, από το υπόστρωμα, θέση και δεν καλύπτεται από κάποια «δομή καπακιού». Οι εστεράσες, από την άλλη, έχει αποδειχθεί να υδρολύουν ίνες PET, ενώ συγκριτικά με τις λιπάσες υδρολύουν πολυεστέρες με μικρότερου μεγέθους αλειφατική αλυσίδα. Πολλά από τα ένζυμα των παραπάνω κατηγοριών που έχουν την ικανότητα να διασπούν άμορφες ή χαμηλής κρυσταλλικότητας PET αδυνατούν να δράσουν όμοια και σε υψηλής κρυσταλλικότητας μορφές [146], [147].

Η θερμοανθεκτική κουτινάση HiC/*Thermomyces insolens* (πρώην *Humicola insolens*) αποτελεί μια από τις δραστικότερες μυκητιακές υδρολάσες του PET, με σχεδόν πλήρη αποικοδόμηση χαμηλής κρυσταλλικότητας μορφής του (7 %) έπειτα από 96 ώρες δράσης, στους 70 °C. Σε 24 ώρες στην ίδια θερμοκρασία και για το ίδιο υλικό, η βακτηριακή LC-κουτινάση (LCC) αποικοδόμησε περίπου το 25% του υλικού. Υψίστης σημασίας ρόλο, στο τομέα έρευνας της βιοαποικοδόμησης του PET, διαδραμάτισε η πρόσφατη (2016) ανακάλυψη του βακτηρίου *Ideonella sakaiensis* 201-F6 το οποίο χρησιμοποιεί το PET ως πηγή άνθρακα και ενέργειας κατά την ανάπτυξη του, με τη διάσπαση να επιτυγχάνεται μέσω ενός εξωκυτταρικά παραγόμενου ενζύμου, την ονομαζόμενη PETase, που εμφανίζει υψηλή ομολογία με ένζυμα της ομάδας των κουτινασών. Η PETase βιοαποικοδομεί το PET σε χαμηλές θερμοκρασίες, περίπου 30

°C. Ενδεικτικά άλλα ένζυμα βιοαποικοδόμησης του PET είναι TfH/*Thermobifida fusca* DSM43793, FsC/*Fusarium solani*, PmC/*Pseudomonas mendocina*, The\_Cut1, The\_Cut2/*Thermobifida cellulosilytica* DSM44535, Thf42\_Cut1/*Thermobifida fusca* DSM44342, Tha\_Cut1/*Thermobifida alba*, Thh\_Est/*Thermobifida halotolerans*, Cut190/*Saccharomonospora viridis* AHK190, BsEstB/*Bacillus subtilis*, PET5/*Oleispira Antarctica* RB-8, PET6/*Vibrio gazogenes*, PET12/*Polyangium brachysporum*, Tcur1278 και Tcur0390/*Thermomonospora Curvata* DSM43183 [148].

Η αδυναμία αποικοδόμησης του PET έχει οδηγήσει στην χρήση τροποποιημένων PET υλικών τα οποία εμπεριέχουν στον πολυμερικό σκελετό τους επιδεκτικά στην υδρόλυση συμμομερή, όπως αιθερικά, αμιδικά και αλειφατικά μονομερή, τα οποία διευκολύνουν την υδρολυτική δράση των ενζύμων προωθώντας την βιοαποικοδόμηση του PET. Τέτοια τροποποιημένα PET υλικά είναι το τερεφθαλικό αδιπικό πολυβουτυλένιο (PBAT) και το συμπολυμερές τερεφθαλικό-αδιπικό τετραμεθυλενιο (PTMAT) [8]. Τα προϊόντα υδρόλυσης του PET (EG, TPA, MHET, BHET) είναι πιθανόν να παρεμποδίζουν την δράση των υδρολυτικών ενζύμων με αποτέλεσμα να αναστέλλουν την βιοαποικοδομητική ικανότητα τους (χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η κουτινάση TfCut2/*Thermobifida fusca* KW3). Για να επιλυθεί το παραπάνω πρόβλημα χρησιμοποιούνται κατάλληλα φίλτρα για την συνεχή απομάκρυνση των βιοαποικοδομήσιμων προϊόντων, προστίθενται συνεργιστικά ένζυμα που έχουν την ικανότητα διάσπασης των προϊόντων (συνεργιστική δράση καρβοξυλεστεράσης TfCa/*Thermobifida fusca* KW3 και TfCut2, με την πρώτη να προσδένεται στα MHET και BHET που παρεμποδίζουν την υδρολυτική δράση της δεύτερης, διασπώντας τα και συνεργιστική δράση λιπάσης CaIB/*Candida antarctica* και HiC, με την CaIB να αποικοδομεί το απελευθερωμένο MHET) ή τροποποιούνται με γενετική μηχανική προκειμένου να μην δύναται η πρόσδεση των προϊόντων και συνεπώς η απενεργοποίηση του ενζύμου (τροποποίηση των αμινοξέων του τομέα πρόσδεσης της TfCut2) [146]. Γενικότερα η γενετική μηχανική αποτελεί έναν αρκετά ενεργό τομέα όσον αφορά τα υδρολυτικά ένζυμα του PET. Αρκετά είναι τα ένζυμα που έχουν τροποποιηθεί γενετικά με στόχο της αύξησης της θερμοσταθερότητάς τους, γεγονός που βοηθάει στην δράση τους στις υψηλές (κοντά στο  $T_g$ ) θερμοκρασίες, με στόχο την αύξηση της απόδοσης διάσπασης του PET. Χαρακτηριστικά παραδείγματα, η κουτινάση AoC/A. *oryzae* και η κουτινάση του *Malbranchea cinnamomea*. [149] Τέλος τροποποιήσεις στους τομείς πρόσδεσης των ενζύμων (κυρίως των κουτιναςών) για ενισχυμένη αλληλεπίδραση υποστρώματος PET και ενζύμου, δείχνουν να βελτιώνουν τις αποδόσεις της βιοαποικοδόμησης [81].

**Πίνακας 4** : Ενδεικτικοί μικροοργανισμοί και ένζυμα που βιοαποικοδομούν το PET, οι συνθήκες βιοαποικοδόμησης, και τα τελικά αποτελέσματα δράσης.

| Μορφή PET                                   | Ένζυμο/<br>Προέλευση               | Συνθήκες<br>αντίδρασης                                | Αποτέλεσμα<br>δράσης      | Αναφορά |
|---|------------------------------------|---|---------------------------|---------|
| Φιλμ PET<br>(εμπορικό<br>μπουκάλι<br>υψηλής | -/ <i>Ideonella<br/>sakaiensis</i> | Ανάπτυξη<br>μικροοργανισμ<br>ού σε 10 mL<br>θρεπτικού | 100 %<br>μείωση<br>βάρους | [150]   |

|  |   |  |  |       |
|--|---|--|--|-------|
| κρυσταλλικότητα,<br>διαστάσεις<br>20×15×0,2<br>mm)   |   | μέσου MLE<br>για 6<br>εβδομάδες  |  |       |
| Φιλμ PET<br>(πάχος 250<br>μm,<br>διαστάσεις<br>15×15 mm <sup>2</sup> )   | HiC/ <i>Humicola<br/>insolens</i>   | 3 mL<br>ρυθμιστικού<br>διαλύματος<br>Tris-HCl, pH<br>8,0, 10 %<br>γλυκερόλη, 70<br>°C, 96 h, 100<br>rpm 10 μM<br>HiC, 80 mg<br>φιλμ  | 97 % μείωση<br>βάρους  | [151] |
| Φιλμ PET<br>(πάχος 250<br>μm,<br>διαστάσεις<br>1×1 cm <sup>2</sup> )   | Ανασυνδιασμένη<br>LCC <sub>(MH)</sub><br>ΓΛΥΚΟΖΥΛΩΜΕΝΗ/<br><i>E. Coli</i>                     | 3 mL 1μM<br>ενζυμικού<br>διαλύματος<br>LCC σε<br>ρυθμιστικό<br>διάλυμα<br>500mM<br>HEPES, pH 8,<br>70 °C, 100<br>rpm, 24-48 h  | 100 %<br>μείωση<br>βάρους  | [152] |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Φιλμ PET-G<br/>(εμπορικό<br/>μπουκάλι,<br/>T<sub>g</sub> = 75<br/>°C)</li> <li>• Φιλμ PET-B<br/>(εμπορικά<br/>πέλλετς,<br/>T<sub>g</sub> = 80<br/>°C)<br/>(χαμηλής<br/>κρυσταλλικότητα,<br/>κυκλικού<br/>σχήματος<br/>ακτίνας 12<br/>mm)</li> </ul> | Υδρολάση<br>TfH/ <i>Thermobifid<br/>a fusca</i> (πρώην<br><i>Thermomonospor<br/>a fusca</i> ) | 5 mL<br>ρυθμιστικού<br>διαλύματος 0,1<br>M<br>φωσφορικών<br>(Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH<br><sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ), pH 7,<br>55 °C, 50 rpm,<br>3 εβδομάδες,<br>0,1 g ενζύμου, 20-<br>25 mg φιλμ | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 50 %<br/>μείωση<br/>βάρους</li> <li>• 50 %<br/>μείωση<br/>βάρους</li> </ul>     | [153] |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Φιλμ PET-G<br/>(εμπορικό<br/>μπουκάλι,<br/>T<sub>g</sub> = 75<br/>°C, 10 %</li> </ul>   | Ανασυνδυασμένη<br>Υδρολάση<br>rTfH/ <i>E. Coli</i>  | 5 mL<br>ρυθμιστικού<br>διαλύματος 0,1<br>M<br>φωσφορικών<br>(Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH<br><sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ), pH 7,   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 54,2 %<br/>μείωση<br/>βάρους</li> <li>• 43,1 %<br/>μείωση<br/>βάρους</li> </ul> | [153] |

|   |  |   |                      |       |
|---|--|---|----------------------|-------|
| <p>κρυσταλλικότητα)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Φιλμ PET-B (εμπορικά πέλλετς, T<sub>g</sub> = 80 °C, 9 % κρυσταλλικότητα) (κυκλικού σχήματος ακτίνας 12 mm)</li> </ul> |  | 55 °C, 50 rpm, 3 εβδομάδες, 0,1 γενζύμιου, 20-25 mg φιλμ  |                      |       |
| <p>Φιλμ PET (χαμηλής κρυσταλλικότητας, πάχος 250 μm, επιφάνεια 11 cm<sup>2</sup>)</p>   | <p>Ανασυνδυασμένη Υδρολάση rTfH/<i>E. Coli</i> (με προσθήκη Ca<sup>2+</sup>)</p>                             | <p>1,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος 1 M Tris-HCl, pH 8,5, 65 °C, 2 ημέρες, 125 rpm, 0,4 nmol<sub>γενζύμιου</sub>/cm<sup>2</sup>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 162 mg φιλμ</p> | 12,9 % μείωση βάρους | [154] |
| <p>Φιλμ PET (χαμηλής κρυσταλλικότητας, πάχος 250 μm, επιφάνεια 11 cm<sup>2</sup>)</p>   | <p>Ανασυνδυασμένη Υδρολάση rTfCut2/<i>E. Coli</i> (με προσθήκη Ca<sup>2+</sup>)</p>                          | <p>1,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος 1 M Tris-HCl, pH 8,5, 65 °C, 2 ημέρες, 125 rpm, 0,4 nmol<sub>γενζύμιου</sub>/cm<sup>2</sup>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 162 mg φιλμ</p> | 12,6 % μείωση βάρους | [154] |
| <p>Φιλμ PET (χαμηλής κρυσταλλικότητας, πάχος 250 μm, επιφάνεια 3 cm<sup>2</sup>)</p>  | <p>Ανασυνδυασμένη Υδρολάση rTfCut2/<i>E. Coli</i> (γενετικά τροποποιημένη ως προς τη θερμοανθεκτικότητα)</p> | <p>1,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος 0,5 M HEPES, pH 8, 70 °C, 2 ημέρες, 50 μg<sub>γενζύμιου</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 45 mg φιλμ</p>                                | 25 % μείωση βάρους   | [155] |
| <p>PET-GP φιλμ (πάχος 250 μm, 2,3% κρυσταλλικότητα)</p>   | <p>Ανασυνδυασμένη Υδρολάση rTfCut2/<i>B. subtilis</i></p>  | <p>1,8 mL ρυθμιστικού διαλύματος 1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/Cl,</p>   | 22,2 % μείωση βάρους | [156] |



|  |  |  |  |  |
|--|--|--|--|--|
|  |  | pH 8,0, 70 °C,<br>1000 rpm, 1<br>nmol <sub>καθαρούTfCut</sub><br>2/cm <sup>2</sup> , 44,2 mg<br>φιλμ |  |  |
|--|--|--|--|--|

### 1.3.5.5) Πολυουρεθάνες (PUs)

#### Δομή, Ιδιότητες & Εφαρμογές των PUs

Οι πολυουρεθάνες (PUs) αντιπροσωπεύουν μια κατηγορία συνθετικών πολυμερών που χρησιμοποιούνται ως υλικά σε σχεδόν όλα τα είδη βιομηχανιών και η παρουσία τους είναι αισθητή σε κάθε πτυχή της καθημερινής ζωής. Το έντονο ενδιαφέρον για τις PUs έγκειται στις σημαντικές μηχανικές ιδιότητες τους ως πολυμερή. Συγκεκριμένα έχουν εξαιρετική αντοχή στον εφελκυσμό, στην διάβρωση, στη φθορά, στη τριβή και στις καιρικές συνθήκες, λόγω της υψηλής θερμοκρασίας υαλώδους μετάπτωσής τους, ενώ είναι συμβατές με ποικιλία ουσιών με αποτέλεσμα να μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πληθώρα εφαρμογών. Τέλος κατέχουν εξειδικευμένες ηλεκτρικές ιδιότητες (όπως η μόνωση) χρήσιμες σε βιομηχανικό, και όχι μόνο, επίπεδο. Έτσι οι PUs χρησιμοποιούνται ευρέως στην αυτοκινητοβιομηχανία (για την θερμική κάλυψη), στην ιατρική (για ράμματα και ικρίωματα ιστών), στα έπιπλα και στα υφάσματα (σε κλινοσκεπάσματα), υπό τη μορφή κόλλας, εύκαμπτου αφρού, ινών και καλυμμάτων [146], [157]–[160].

#### Βιολογική και χημική σύνθεση των PUs

Οι PUs προκύπτουν από τον πολυμερισμό μορίων που φέρουν τουλάχιστον δύο υδροξυλομάδες (διό-, πολυόλες) και μορίων που φέρουν τουλάχιστον δυο κυανικές ομάδες (δι-, πολυισοκυανικό). Τα μόρια ενώνονται μεταξύ τους μέσω της αντίδρασης των παραπάνω λειτουργικών ομάδων, με έναν δεσμό ουρεθάνης. Ο ουρεθανικός δεσμός είναι αυτός που προσφέρει στις PUs τις ιδιαίτερες μηχανικές ιδιότητες τους. Η ποικιλία των δυο δομικών μορίων των PUs, τους προσφέρει ευελιξία και προσαρμοστικότητα. Ανάλογα με το είδος της χρησιμοποιούμενης πολυόλης, πολυεστέρας ή πολυαιθέρας, οι PUs κατηγοριοποιούνται σε πολυεστερικές και πολυαιθερικές αντίστοιχα, με κάθε κατηγορία να κατέχει διαφορετικές εξειδικευμένες ιδιότητες. Έτσι οι πολυεστερικές PUs συνήθως έχουν μεγαλύτερη αντίσταση στη διάβρωση, αντοχή στον εφελκυσμό και τη θραύση, και αντίσταση στους οργανικούς διαλύτες, ενώ οι πολυαιθερικές PUs έχουν ισχυρότερη αντίσταση στο νερό και τη βιοαποικοδόμηση και μεγαλύτερη ευκαμψία σε χαμηλές θερμοκρασίες [160], [161].

Ο πλέον συμβατικός χημικός τρόπος σύνθεσης των PUs αφορά την αντίδραση πολυπροσθήκης μεταξύ μιας πολυόλης και ενός δισοκυανικού εκ των, 4,4-δισοκυανικό διφαινύλιο του μεθυλενίου (MDI) και δισοκυανικό τολουολίο (TDI). Τα δυο δισοκυανικά χρησιμοποιούνται ευρέως στον πολυμερισμό PUs, διότι εμφανίζουν υψηλή αντιδραστικότητα, μηχανική αντίσταση, βιολογική σταθερότητα και αντοχή στη διάβρωση, ιδιότητες που προσδίδουν και στο τελικό πολυμερές. Βέβαια τα

ισοκυανικά μονομερή είναι εξαιρετικά τοξικά τόσο για τον άνθρωπο (καρκινογόνα, προκαλούν ερεθισμούς στα μάτια, τη μύτη, το στόμα και το λαιμό, είναι υπαίτια για την εμφάνιση άσθματος πολλών εργαζομένων βιομηχανιών πολυμερικών υλικών, και άλλα) όσο και για το περιβάλλον. Για τον λόγο αυτό η σύγχρονη επιστημονική κοινότητα έχει επικεντρωθεί στις προσπάθειες παραγωγής των PUs από μη ισοκυανικά μονομερή. Βιολογικά, γίνονται προσπάθειες παραγωγής των PUs, από πολυμερικές πλατφόρμες που προκύπτουν από τη χρήση βιομάζας (πολυσακχαρίτες, ζωικές και φυτικές πρωτεΐνες, λιπίδια και άλλα), όπως οι βιολογικής προελεύσεως εστέρες, αλειφατικές και αρωματικές πολυόλες, αμίνες και εποξειδία [162].

### Βιοαποικοδόμηση των PUs

Παρά τις ιδιαίτερες ιδιότητες των PUs ως υλικά σε πληθώρα πτυχών της καθημερινότητας, εμφανίζουν ένα σημαντικό μειονέκτημα. Συγκεκριμένα οι PUs δεν επιδέχονται βιοαποικοδόμηση, γεγονός το οποίο συνεπάγεται την έντονη συσσώρευση τους στον επίγειο και υδροφόρο ορίζοντα. Σύμφωνα με μελέτες βέβαια, οι εστερικές PUs, όπως προαναφέρθηκε, επιδεικνύουν μια μεγαλύτερη ευκολία βιοαποικοδόμησης λόγω των εστερικών δεσμών του πολυμερικού σκελετού τους, που επιδέχονται υδρόλυση [158].

Αρκετές είναι οι μελέτες που έχουν διεξαχθεί σχετικά με την βιοαποικοδόμηση των PUs, από τις οποίες πληθώρα μικροοργανισμών, κυρίως βακτηρίων και μυκήτων, έχουν ξεχωρίσει. Συγκεκριμένα οι μύκητες έχουν την ικανότητα να καταναλώνουν την PU, ως πηγή άνθρακα, με χαρακτηριστικά παραδείγματα τους *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus* sp., *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium ochrochloron*, *Curvularia senegalensis*, *Corynebacterium* sp., *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium* sp., *Nectria haematococca*, *Nectria gliocladiodes*, *Penicillium viridicatum*, *Fusarium solani*, *P. ochrochloron* και *Pestalotiopsis microspore*. Όσον αφορά τα βακτήρια, τα εξωκυτταρικά ένζυμα που παράγουν βοηθούν στην υδρόλυση των εστερικών δεσμών της PU, με τα βασικότερα από αυτά να προέρχονται από τους *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Bacillus subtilis*, *Comamonas acidovorans* και *Pseudomonas aeruginosa*, καθώς και από τον ακτινομύκητα *Thermobifida fusca* [163], [164].

**Πίνακας 5:** Ενδεικτικοί μικροοργανισμοί και ένζυμα που βιοαποικοδομούν τη PU, οι συνθήκες βιοαποικοδόμησης, και τα τελικά αποτελέσματα δράσης.

| Μορφή PU   | Ένζυμο/<br>Προέλευση   | Συνθήκες<br>αντίδρασης   | Αποτέλεσμα<br>δράσης  | Αναφορά |
|--|--|--|---|---------|
| Κύβοι<br>θερμοπλαστικού<br>PU (διαστάσεις<br>0,5×0,5×0,2 cm)<br>• Elastollan<br>B85A-10<br>• Elastollan<br>C85A-10 | Υδρολάση<br>TfCut2/ <i>Ther<br/>mobifida<br/>fusca</i> KW3<br>ανασυνδυασμ<br>ένη σε <i>E.<br/>Coli</i> | 1 mL<br>ρυθμιστικού<br>διαλύματος 1<br>M<br>φωσφορικών,<br>pH 8,0, 60-70<br>°C, 100 h,<br>1000 rpm, 50 | Μείωση βάρους<br>• Elastollan<br>B85A-10: 1 %, 1,9% (60°C, 70°C)<br>• Elastollan<br>C85A-10: 1,1 %, 1,5% (60°C, 70°C) | [159]   |

|  |  |   |  |       |
|--|--|---|--|-------|
|  |  | mg <sub>ενζύμου</sub> , 80<br>mg PU   |  |       |
| Κύβοι<br>θερμοπλαστικού<br>PU (διαστάσεις<br>0,5×0,5×0,2 cm)<br>• Elastollan<br>B85A-10<br>• Elastollan<br>C85A-10 | Υδρολάση<br>Tcur0390/ <i>Thermomonospora curvata</i><br>DSM43183<br>ανασυνδυασμένη σε <i>E. Coli</i> | 1 mL<br>ρυθμιστικού<br>διαλύματος 1<br>M<br>φωσφορικών,<br>pH 8,0, 60<br>°C, 100 h,<br>1000 rpm, 50<br>mg <sub>ενζύμου</sub> , 80<br>mg PU    | Μείωση βάρους<br>• Elastollan<br>B85A-10: 0,3<br>%<br>• Elastollan<br>C85A-10: 0,4<br>%  | [159] |
| Κύβοι<br>θερμοπλαστικού<br>PU (διαστάσεις<br>0,5×0,5×0,2 cm)<br>• Elastollan<br>B85A-10<br>• Elastollan<br>C85A-10 | Υδρολάση<br>Tcur1278/ <i>Thermomonospora curvata</i><br>DSM43183<br>ανασυνδυασμένη σε <i>E. Coli</i> | 1 mL<br>ρυθμιστικού<br>διαλύματος 1<br>M<br>φωσφορικών,<br>pH 8,0, 60-70<br>°C, 100 h,<br>1000 rpm, 50<br>mg <sub>ενζύμου</sub> , 80<br>mg PU | Μείωση βάρους<br>• Elastollan<br>B85A-10: 0,6<br>%<br>• Elastollan<br>C85A-10: 0,8<br>%  | [159] |
| Κύβοι<br>θερμοπλαστικού<br>PU (διαστάσεις<br>0,5×0,5×0,2 cm)<br>• Elastollan<br>B85A-10<br>• Elastollan<br>C85A-10 | Ανασυνδυασμένη LCC/ <i>E. Coli</i>   | 1 mL<br>ρυθμιστικού<br>διαλύματος 1<br>M<br>φωσφορικών,<br>pH 8,0, 60-70<br>°C, 100 h,<br>1000 rpm, 50<br>mg <sub>ενζύμου</sub> , 80<br>mg PU | Μείωση βάρους<br>• Elastollan<br>B85A-10:<br>1,2%, 3,2%<br>(60°C, 70°C)<br>• Elastollan<br>C85A-10: 1,2<br>%, 2,5% (60°C,<br>70°C) | [159] |
| Αφρός PU   | -<br><i>Corynebacterium sp.</i>  | Ανάπτυξη<br>καλλιέργειας<br>σε θρεπτικό<br>μέσο<br>απουσία<br>εκχυλίσματος<br>μαγιάς  | 15,77 % μείωση<br>βάρους   | [165] |
| Αφρός PU   | -<br><i>Pseudomonas aeruginosa</i><br>(ATCC<br>13388)  | Ανάπτυξη<br>καλλιέργειας<br>σε θρεπτικό<br>μέσο<br>απουσία<br>εκχυλίσματος<br>μαγιάς  | 9,30 % μείωση<br>βάρους  | [165] |
| PU φιλμ (πάχος<br>0,2 mm,<br>ορθογώνιο<br>σχήμα,   | -/ <i>Aspergillus sp.</i> S45  | Ανάπτυξη<br>καλλιέργειας<br>σε 50 mL<br>διαλύματος  | 15-20 % μείωση<br>βάρους   | [164] |

|                       |  |   |  |  |
|-----------------------|--|---|--|--|
| διαστάσεις 2×2<br>cm) |  | αλάτων,<br>30°C, 28<br>ημέρες, 100<br>rpm |  |  |
|-----------------------|--|---|--|--|

### 1.3.5.6) Πολυκαπρολακτόνη (PCL)

#### Δομή, Ιδιότητες & Εφαρμογές της PCL

Η πολυκαπρολακτόνη (PCL) αποτελεί έναν εμπορικά διαδεδομένο αλειφατικό πολυεστέρα. Είναι ένα ημικρυσταλλικό πολυμερές με τη μέγιστη κρυσταλλικότητα του ίση με 69%. Οι φυσικές, θερμικές και μηχανικές ιδιότητες της PCL εξαρτώνται άμεσα από το μοριακό της βάρος το οποίο κυμαίνεται από 3000 έως 90000 g/mol. Παράλληλα το πολυμερές είναι αναμειξιμο και μηχανικά συμβατό με πληθώρα συμβατικών πλαστικών όπως το πολυαιθυλένιο (PE) και το πολυπροπυλένιο (PP). Παρ' όλα αυτά το χαμηλό σημείο τήξης όλων των μορφών της ( $T_m=58-60$  °C) καθιστά τις μηχανικές της ιδιότητες μειονεκτικές έναντι των υπολοίπων συμβατικών πλαστικών που αναλύθηκαν. Έτσι, οι εφαρμογές της PCL είναι σχετικά περιορισμένες, και αισθητές κυρίως στις βιομηχανίες πολυμερικών υλικών (ως πρόσθετα στις κατασκευαστικές ρητίνες για την βελτίωση των χαρακτηριστικών τους), σε βοηθητικά ιατρικά υλικά (γύψος, εμφυτεύματα, πληρωτικό οδοντιατρικό υλικό), στη μοντελοποίηση και στα νήματα 3D εκτυπωτών [166]–[168].

#### Βιολογική και χημική σύνθεση της PCL

Το μονομερές της PCL είναι η ε-καπρολακτόνη, ένας κυκλικός εστέρας, η οποία πολυμερίζεται προς PCL μέσω πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου, παρουσία χημικών ή ενζυμικών καταλυτών. Άλλος τρόπος σύνθεσης της PCL είναι μέσω αντίδρασης πολυσυμπύκνωσης του 6-υδροεξανοϊκού οξέος. Η βιολογική σύνθεσης της PCL ερευνάται ακόμα και αποτελεί βασικός στόχος της σύγχρονης επιστημονικής κοινότητας [166], [169].

#### Βιοαποικοδόμηση της PCL

Η PCL, παρότι δεν είναι βιολογικής προελεύσεως, αποτελεί ένα από τα περισσότερο υποσχόμενα βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά εξαιτίας των ασθενών μηχανικών ιδιοτήτων της που τη καθιστούν εύκολα προσβάσιμη από μικροοργανισμούς. Η βιοαποικοδόμηση της PCL βασίζεται στην υδρόλυση των εστερικών δεσμών της πολυμερικής αλυσίδας της από υδρολυτικά ένζυμα όπως λιπάσες, κουτινάσες, εστεράσες και άλλα [168], [170], [171].

**Πίνακας 6:** Ενδεικτικοί μικροοργανισμοί και ένζυμα που βιοαποικοδομούν τη PCL, οι συνθήκες βιοαποικοδόμησης, και τα τελικά αποτελέσματα δράσης.

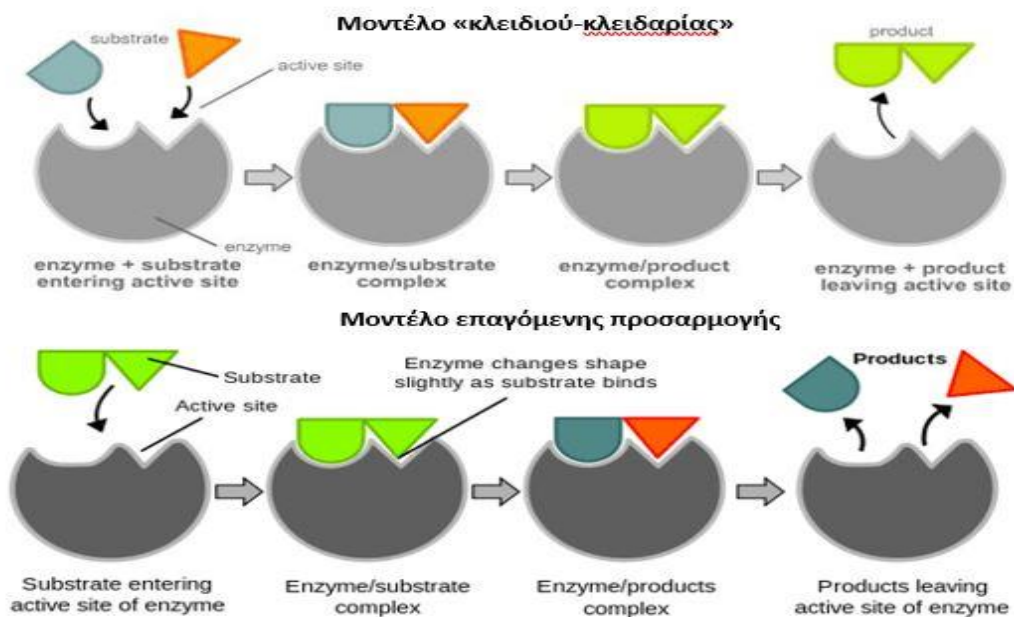
| Μορφή PCL  | Ένζυμο/ Προέλευση   | Συνθήκες αντίδρασης   | Αποτέλεσμα δράσης  | Αναφορά |
|--|---|---|--|---------|
| PCL φιλμ ( $M_n = 125000$ , πάχος 0,1-0,3 mm, διαστάσεις 10×10 mm) | Λιπάση/ <i>Pseudomonas</i>  | 1,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών με 0,5 mg <sub>λιπάσης</sub> /mL, pH 7,0, 37 °C, 94 h, 10 mg φιλμ      | 100 % μείωση βάρους  | [170]   |
| PCL φιλμ (πάχος 250 μm, εμβαδόν επιφάνειας 1 cm <sup>2</sup> )     | Κουτινάση/ <i>F. solani</i> ανασυνδυασμένη σε <i>P. pastoris</i>    | 2,6 mL ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl, pH 8,0, 40-60 °C, 12 h, 100 rpm, 0,4 mL <sub>κουτινάσης</sub> (1 mg/mL) | 44,3 % μείωση βάρους (40°C, 12 h), 23,9 % μείωση βάρους (60°C, 12 h) | [171]   |
| PCL φιλμ (πάχος 250 μm, εμβαδόν επιφάνειας 1 cm <sup>2</sup> )     | Κουτινάση/ <i>A. fumigatus</i> ανασυνδυασμένη σε <i>P. pastoris</i> | 2,6 mL ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl, pH 8,0, 40-60 °C, 12 h, 100 rpm, 0,4 mL <sub>κουτινάσης</sub> (1 mg/mL) | 100 % μείωση βάρους (40°C, 6 h), 100 % μείωση βάρους (60°C, 12 h)    | [171]   |

## 1.4) Ένζυμα & ετερόλογη έκφραση

### 1.4.1) Ορισμός, δράση & κατηγορίες

Σύμφωνα με τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι η βιοαποικοδόμηση βασίζεται σε ένζυμα τα οποία συμβάλλουν στον μεταβολισμό της οργανικής ύλης. Με την έννοια «ένζυμο» ορίζεται το πρωτεϊνικό μόριο το οποίο λειτουργεί ως βιολογικός καταλύτης αυξάνοντας την ταχύτητα των χημικών αντιδράσεων έως και εκατομμύρια φορές. Σημαντική είναι η παρουσία ενζύμων στις μεταβολικές αντιδράσεις του κυττάρου και συνεπώς των οργανισμών, πολλές από τις οποίες, απουσία αυτών, δεν θα πραγματοποιούνταν με την επιθυμητή ταχύτητα. Έπειτα από το πέρας της αντίδρασης, το ένζυμο παραμένει αμετάβλητο [172], [173].

Η μηχανισμός δράσης των ενζύμων βασίζεται στην ύπαρξη ενός ειδικά διαμορφωμένου ενεργού κέντρου, πάνω στο οποίο δεσμεύεται συμπληρωματικά το υπόστρωμα. Αφού το υπόστρωμα προσδεθεί στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, σχηματίζεται το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος, μια μεταβατική κατάσταση μειωμένης ενέργειας ενεργοποίησης (ενεργειακό φράγμα της αντίδρασης) και παράγονται τα επιθυμητά προϊόντα, τα οποία στη συνέχεια απομακρύνονται από το ενεργό κέντρο και απελευθερώνονται. Η συμπληρωματικότητα του ενεργού κέντρου με το υπόστρωμα ταυτίστηκε, από τον Έμιλ Φίσερ (Emil Fischer) το 1894, με αυτή του κλειδιού και της κλειδαριάς («μοντέλο κλειδαριάς-κλειδιού»), με το ενεργό κέντρο να είναι άκαμπτο. Πάνω από μισό αιώνα αργότερα, το 1958, παρατηρήθηκε από τον Ντάνιελ Κόσλαντ (Daniel Koshland) ότι η διαμόρφωση του ενεργού κέντρου μπορεί, σε πολλές περιπτώσεις, και να μεταβληθεί καταλλήλως κατά την αναγνώριση του υποστρώματος από το ένζυμο («μοντέλο επαγόμενης προσαρμογής»), επικρατώντας δυναμική συσχέτιση [174], [175], [176].



**Εικόνα 7** : Το μοντέλο «κλειδιού-κλειδαριάς» (πάνω) : Το υπόστρωμα (γκρι, πορτοκαλί) προσεγγίζει το ενεργό κέντρο του ενζύμου, στο οποίο και δεσμεύεται με απόλυτη συμπληρωματικότητα δημιουργώντας το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος, στη συνέχεια παράγονται τα επιθυμητά προϊόντα (πράσινο) κατά τη πραγματοποίηση της αντίδρασης, και τέλος τα προϊόντα απελευθερώνονται. Το μοντέλο επαγόμενης προσαρμογής (κάτω) : Το υπόστρωμα (πράσινο) προσεγγίζει το ενεργό κέντρο του ενζύμου, το οποίο μεταβάλλεται ελαφρώς ώστε να δεσμευτεί σε αυτό το υπόστρωμα, δημιουργείται το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος, παράγονται τα επιθυμητά προϊόντα (γκρι, πορτοκαλί) λόγω αντίδρασης και απελευθερώνονται [175].

Πληθώρα παραγόντων επηρεάζουν την καταλυτική δράση των ενζύμων στις αντιδράσεις που συμμετέχουν. Επιγραμματικά παρατίθενται η θερμοκρασία, το pH, η συγκέντρωση του ενζύμου, η συγκέντρωση του υποστρώματος και η παρουσία παρεμποδιστών (χημικές ενώσεις ή ιόντα, η παρουσία των οποίων αναστέλλει τη δράση των ενζύμων) [173].

Ανάλογα την αντίδραση που καταλύουν, τα ένζυμα χωρίζονται στις εξής κατηγορίες, σύμφωνα με την Επιτροπή Ενζύμων (Enzyme Commission) [174], [177] :

1. Οξειδοαναγωγάσες (EC 1.) : Ένζυμα τα οποία καταλύουν οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, μέσω μεταφοράς ηλεκτρονίων (άτομα υδρογόνου ή ιόντα υδριδίου).
2. Τρανφεράσες (EC 2.) : Ένζυμα τα οποία καταλύουν αντιδράσεις μεταφοράς ομάδων.
3. Υδρολάσες (EC 3.) : Ένζυμα τα οποία καταλύουν την υδρόλυση δεσμών.
4. Λυάσες (EC 4.) : Ένζυμα τα οποία καταλύουν την μη υδρολυτική απόσπαση ομάδων από υποστρώματα, δημιουργώντας διπλό δεσμό ή την προσθήκη ομάδων σε διπλό δεσμό.
5. Ισομεράσες (EC 5.) : Ένζυμα τα οποία καταλύουν το φαινόμενο της ισομερείωσης (ενδομοριακές διευθετήσεις).
6. Λιγάσες (EC 6.) : Ένζυμα τα οποία καταλύουν την σύνθεση δεσμών.

Σε κάθε κατηγορία ενζύμων αποδόθηκε ένας αριθμός “EC”, ενώ κάθε μια από αυτές αποτελείται από πολλές περαιτέρω υποκατηγορίες ανάλογα με το είδος της αντίδρασης που καταλύεται [174].

#### 1.4.1.1) Εστεράσες

Οι εστεράσες αποτελούν ένζυμα τα οποία καταλύουν την υδρόλυση των εστερικών δεσμών και ανήκουν στην ευρύτερη κατηγορία των υδρολασών. Σε οργανική φάση, οι εστεράσες, έχουν την ικανότητα να ευνοούν τον σχηματισμό εστέρων (εστεροποίηση) τους οποίους και υδρολύουν στην υδατική φάση [178]. Όντας ευρέως διαδεδομένα συναντώνται σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς, όπως τα φυτά, τα έντομα, τα ζώα και οι μικροοργανισμοί (κυρίως βακτήρια και μύκητες) [179], [180]. Το γεγονός ότι είναι παρόντα σαν ένζυμα σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς καθώς και η ικανότητα τους να δέχονται πληθώρα διαφορετικών υποστρωμάτων κάνει φανερό τον διαχρονικό ρόλο των εστερασών, ο οποίος αφορούσε την πρόσβαση των οργανισμών στις διάφορες πηγές άνθρακα και στο μεταβολισμό αυτών, με σκοπό την επιβίωση και την εξέλιξη [179].

Δομικά, οι εστεράσες, έχουν τη κανονική δομή των  $\alpha/\beta$ -υδρολασών, με  $\beta$ -πτυχωτά φύλλα στο κέντρο του ενζύμου περικυκλωμένα από  $\alpha$ -έλικες. Στο ενεργό τους κέντρο βρίσκεται η καταλυτική τριάδα των αμινοξέων Ser-Asp-His (Σερίνη-Ασπαρτικό οξύ-Ιστιδίνη), η οποία είναι χαρακτηριστική και σε άλλα ένζυμα όπως οι πρωτεάσες και υδρολάσες σερίνης [180]. Η στερεοδομή των εστερασών τους προσφέρει υψηλή τόπο- και στέreo-εκλεκτικότητα καθώς και σταθερότητα, χαρακτηριστικά τα οποία, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι δεν απαιτούν συμπαραγόντες (μη πρωτεϊνικές ενώσεις, οργανικής ή ανόργανης φύσεως, η παρουσία των οποίων απαιτείται για την δράση του ενζύμου), τις καθιστούν ένζυμα με πρωταγωνιστικό ρόλο στη βιομηχανία [181]. Συγκεκριμένα σημαντικές είναι οι εφαρμογές τους σε βιοτεχνολογικούς τομείς όπως η φαρμακοβιομηχανία (σύνθεση φαρμάκων μέσω εστεροποίησης) και η βιομηχανία ευγενών αερίων (σύνθεση και διαχωρισμός οπτικών μονομερών προς σύνθεση φαρμάκων) [182], [183], η χημική βιομηχανία (υδρόλυση συσσωρευμένων ρητίνων σε σωληνώσεις) [184], η βιομηχανία τροφίμων (υδρόλυση λιπαρού γάλακτος με στόχο την ενίσχυση γεύσης τυροκομικών προϊόντων, υδρόλυση αμύλου προς σιρόπι φρουκτόζης) [178], η βιομηχανία σύνθεσης αρωματικών ουσιών (απομόνωση φερουλικού οξέος από φυτικούς πολυσακχαρίτες προς ενζυμική μετατροπή σε βανιλίνη, μια υψίστης σημασίας αρωματική ένωση) [185] και η βιομηχανία εντομοκτόνων (χρήση εστερασών για αποικοδόμηση ενώσεων οργανοφωσφορικής φύσεως, που αποτελούν υπολείμματα των εντομοκτόνων στο περιβάλλον) [181].

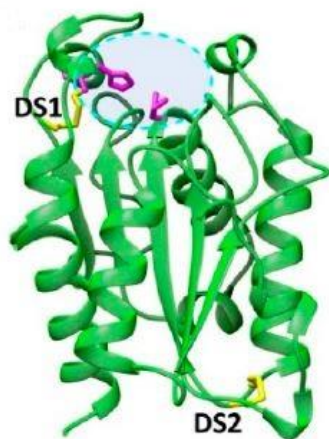
#### 1.4.1.2) Κουτινάσες

Οι κουτινάσες είναι ένζυμα που ανήκουν στην κατηγορία των υδρολασών και ο φυσικός τους ρόλος είναι η αποικοδόμηση της κουτίνης, ενός αλειφατικού πολυεστέρα, από τον οποίο αποτελείται η επιδερμίδα των εναέριων τμημάτων (φύλλα, φρούτα, λουλούδια και άλλα) των ανώτερων φυτών [149], [146]. Το βιοπολυμερές της κουτίνης αποτελείται, κυρίως, από τα υδρόξυ λιπαρά οξέα (περιέχουν τουλάχιστον μια υδροξυλομάδα στην αλυσίδα)  $C_{16}$  και  $C_{18}$ , εποξειδία, αλδεΐδες και κετόνες, που συνδέονται μεταξύ τους κυρίως με εστερικούς δεσμούς, δημιουργώντας τον πολυμερικό σκελετό [76], [149]. Έχουν μικρά μεγέθη τα οποία, στις περισσότερες περιπτώσεις, δεν υπερβαίνουν τα 20-25 kDa (μυκητιακές κουτινάσες) και τα 30 kDa (βακτηριακές κουτινάσες). Το βέλτιστο pH δράσης τους είναι ουδέτερο ή αλκαλικό (7,0 - 9,5), ενώ η βέλτιστη θερμοκρασία διαφέρει για τις μυκητιακές και βακτηριακές κουτινάσες, από 50-60°C και 40-45°C αντίστοιχα [149].

Πιο συγκεκριμένα, το ενεργό κέντρο των κουτινασών αποτελείται από την καταλυτική τριάδα Ser-Asp-His (Σερίνη-Ασπαρτικό οξύ-Ιστιδίνη), με τη σερίνη να βρίσκεται σε εύκολα προσβάσιμη, στο διαλύτη, θέση. Η θέση αυτή καθιστά τη σερίνη έντονα καταλυτική στο ενεργό κέντρο της κουτινάσης, με αποτέλεσμα οι κουτινάσες να θεωρούνται μέλη της οικογενείας των υδρολασών σερίνης. Τρισδιάστατα, οι κουτινάσες ανήκουν στην υπεροικογένεια των  $\alpha/\beta$ -πρωτεϊνών, με  $\beta$ -πτυχωτά φύλλα περιβαλλόμενα από  $\alpha$ -έλικες και δύο δισουλφιδικούς δεσμούς ανάμεσα σε αμινοξέα κυστεΐνης που προσφέρουν θερμική αντοχή και εξειδίκευση του ενεργού κέντρου στα



υποστρώματα. Η δομή των κουτινασών, όσον αφορά, των αριθμό των β-πτυχωτών φύλλων, α- ελίκων και δισουλφιδικών δεσμών, διαφέρει ανάμεσα σε ευκαρυωτικές και προκαρυωτικές. Συγκεκριμένα οι προκαρυωτικές κουτινάσες έχουν συνήθως 9 β-πτυχωτά φύλλα, 7 α-έλικες και 1 δισουλφιδικό δεσμό, ενώ οι ευκαρυωτικές κουτινάσες, 5, 4-5 και 2-3 αντίστοιχα [76], [149], [186], [187].



**Εικόνα 8** : Μοντέλο της τρισδιάστατης δομής της κουτινάσης του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium solani pisi*, που αποτελεί την πρώτη δομή κουτινάσης που προσδιορίστηκε. Χαρακτηριστικά διακρίνεται το ενεργό κέντρο (γαλάζια διακεκομμένη γραμμή), τα αμινοξέα της καταλυτικής τριάδας (φούξια ράβδοι) και οι δύο δισουλφιδικοί δεσμοί (κίτρινες ράβδοι-DS1,DS2) [149].

Η καταλυτική δράση των κουτινασών εξειδικεύεται στην υδρόλυση εστερικών δεσμών, όπως αυτών που συγκρατούν τον πολυμερικό σκελετό της κουτίνης. Πέραν από πολυεστέρες οι κουτινάσες έχουν την δυνατότητα να καταλύουν την υδρόλυση τριγλυκεριδίων καθώς και τις αντιδράσεις σύνθεσης εστέρων (εστεροποίηση και μετεστεροποίηση), υπό ήπιες συνθήκες θερμοκρασίας [186] .

#### 1.4.2) Ετερόλογη έκφραση ενζύμων

##### 1.4.2.1) Γενετική μηχανική

Τα ένζυμα προκειμένου να χρησιμοποιηθούν σε εύρος τομέων της σύγχρονης ζωής όπως στη θεραπεία (εμβόλια και θεραπευτικές πρωτεΐνες), στη κτηνοτροφία, στα τρόφιμα και στη βιοκατάλυση διεργασιών (βιοαποικοδόμηση πλαστικών), απαιτείται να παραχθούν σε μεγάλες, με υψηλή καθαρότητα, ποσότητες, μέσω οικονομικά βιώσιμων και αποδοτικών διεργασιών.

Τα εργαλεία της γενετικής μηχανικής αποτελούν αρωγό στη παραπάνω προσπάθεια μέσω του σχεδιασμού στρατηγικών που βασίζονται στις τεχνικές χειρισμού του DNA μικροοργανισμών, έξω από το κύτταρο για την δημιουργία τεχνητών, ήδη υπαρχόντων ή νέων, γονιδίων με προκαθορισμένα σημεία ελέγχου. Το κατασκευασμένο γενετικά τροποποιημένο γονίδιο μπορεί να εκφραστεί είτε από τον δότη μικροοργανισμό

(φέροντας πλέον, για παράδειγμα, κάποια επιθυμητή μετάλλαξη) είτε από κάποιον μικροοργανισμό ξενιστή (ετερόλογη έκφραση).

Συνοπτικά τα βασικά βήματα της γενετικής μηχανικής για την ετερόλογη έκφραση ενζύμων αφορούν :

1. την αρχική λήψη του επιθυμητού γονιδίου από το DNA του μικροοργανισμού δότη, την απομόνωση του (μέσω κλωνοποίησης τυφλής στόχευσης, υβριδίουσης, χημικής σύνθεσης ή συμπληρωματικού DNA) και την εισαγωγή του σε ένα μικρό κομμάτι DNA που θα λειτουργήσει ως μεταφορέας του (φορέας),
2. την εισαγωγή του επιθυμητού γονιδίου-φορέα στα κύτταρα του μικροοργανισμού ξενιστή με τεχνικές όπως η ηλεκτροδιάτρηση (επιβολή παλμού υψηλής τάσης συνεπάγεται διάνοιξη των κυτταρικών πόρων και είσοδο του φορέα, κυρίως στις ζύμες) ή μέσω θερμικού σοκ (επιβολή υψηλής θερμοκρασίας για μικρό χρονικό διάστημα οδηγεί στη διατάραξη του περιβάλλοντος του κυττάρου με αποτέλεσμα την αφομοίωση του φορέα, κυρίως στα βακτήρια),
3. την επιλογή των ξενιστών που παρέλαβαν τον ανασυνδυασμένο φορέα, με τεχνικές άμεσης (αντιβιοτικό) ή έμμεσης (αυξοτροφικά κύτταρα) επιλογής,
4. τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων ξενιστών και την έκφραση του γονιδίου (με χρήση επαγωγέα), προς παραγωγή του επιθυμητού ενζύμου [115].

#### 1.4.2.2) Το βακτήριο *Escherichia coli* ως ξενιστής ετερόλογης έκφρασης ενζύμου

Η επιλογή του κατάλληλου ξενιστή για την ετερόλογη έκφραση του ενζύμου αποτελεί ένα βήμα υψίστης σημασίας. Συγκεκριμένα από την επιλογή αυτή θα εξαρτηθεί η επιτυχία ή αποτυχία της διεργασίας. Βασικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα του επιθυμητού παραγόμενου ενζύμου είναι αυτά που καθορίζουν τις περισσότερες φορές την επιλογή του ξενιστή. Έτσι εάν απαιτούνται σημαντικές ή απλές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του ενζύμου, επιλέγεται κάποιο ζωικό κύτταρο ή κύτταρα ζύμης και μύκητα αντίστοιχα. Άλλο βασικό χαρακτηριστικό αφορά την χρήση του ενζύμου, και συγκεκριμένα εάν προορίζεται για τον τομέα των τροφίμων. Στη περίπτωση αυτή ως ξενιστές επιλέγονται κυρίως ζύμες που είναι αναγνωρισμένες ως ασφαλείς (GRAS-Generally Regarded As Safe), όπως η *Saccharomyces cerevisiae*. Πάρα πολλά είναι τα συστήματα ξενιστών (βακτήρια, ζύμες, μύκητες, έντομα, φυτά, θηλαστικά και άλλα) που έχουν μελετηθεί, αναλόγως με τα χαρακτηριστικά του παραγόμενου ενζύμου, και έχουν αξιολογηθεί ως προς την απόδοση και τη βιωσιμότητα. Από αυτά η επιλογή του βακτηρίου *Escherichia coli* (*E. coli*) ξεχωρίζει σημαντικά [115].

Τα βακτηριακά συστήματα επιλέγονται συνήθως ως ξενιστές για την έκφραση ετερόλογων γονιδίων στις περιπτώσεις που οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις δεν είναι απαραίτητες. Από τα βακτήρια, το *E. coli* αποτελεί μια εξαιρετικά δημοφιλή επιλογή, και αυτό λόγω των πλεονεκτημάτων που εμφανίζει κατά την ετερόλογη

έκφραση αλλά κυρίως λόγω του μεγάλου εύρους γνώσεων που υπάρχει στην επιστημονική βιβλιογραφία περί αυτού. Έτσι το *E. coli* επιδέχεται πληθώρα γενετικών τροποποιήσεων με μεγάλη ευκολία, λόγω της μεγάλης βάσης δεδομένων (κατάλληλοι φορείς, υποκινητές), γεγονός που επιταχύνει την διαδικασία του ανασυνδυασμού. Συγκεκριμένα ειδικές τροποποιημένες «σειρές» κυττάρων *E. coli* (BL21(DE3)) (επιδεκτικά κύτταρα) έχουν κατασκευαστεί με σκοπό τη μεγιστοποίηση της ενζυμικής παραγωγής. Παράλληλα το βακτήριο εμφανίζει υψηλούς ρυθμούς ανάπτυξης (μειονέκτημα για παθολογία) σε απλά και φθηνά θρεπτικά υλικά (όπως η Luria-Bertani/LB) καθώς και υψηλά επίπεδα έκφρασης του ενζύμου που συνεπάγονται υψηλή παραγωγικότητα ως προς μονάδα όγκου [115].

Παρ' όλα αυτά το *E. coli* ως ξενιστής εμφανίζει και σημαντικά εμπόδια στην έκφραση τα οποία βασίζονται κυρίως στο γεγονός ότι το βακτήριο δεν εκκρίνει πρωτεΐνες εκ φύσεως. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το ένζυμο να παράγεται ενδοκυτταρικά με αποτέλεσμα η διαλυτή (ενεργή) μορφή του να είναι αρκετά περιορισμένη λόγω της πρωτεολυτικής αποδόμησης, η οποία βασίζεται στην αποδόμηση του «ξένου» ενζύμου από ενδοπρωτεΐνες του βακτηρίου. Άλλο ένα εξαιρετικά σημαντικό πρόβλημα που εμφανίζεται από την ενδοκυτταρική παραγωγή του ενζύμου σε *E. coli* είναι ο σχηματισμός πρωτεϊνικών εγκλείστων (inclusion bodies). Αυτά σχηματίζονται όταν το ένζυμο υπερεκφράζεται στο εσωτερικό του κυττάρου, με αποτέλεσμα το κύτταρο να «αποθηκεύει» τη ποσότητα αυτή μέσα σε μεμβράνες μαζί με άλλα κυτταρικά υλικά. Μέσα στα εγκλείστα το ένζυμο βρίσκεται σε λανθασμένη αναδίπλωση και πολλές φορές καταβυθισμένο, συνεπώς βιολογικά απενεργοποιημένο. Επομένως για την παραλαβή του απαιτείται η ανάκτηση των εγκλείστων και η επαναδιαλυτοποίησή τους, διαδικασία αρκετά περίπλοκη ανάλογα με το ένζυμο. Ακόμα, ως προκαρυώτης, το *E. coli* δεν έχει την δυνατότητα να εκτελεί πολύπλοκες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (όπως γλυκοζυλίωση, φωσφορυλίωση, πρωτεολυτικές επεξεργασίες και άλλα) αφού εκλείπει από τα κύτταρά του το σύμπλεγμα Golgi. Οι απώλεια των τροποποιήσεων αυτών από το ένζυμο μπορεί να οδηγήσουν σε μειωμένη δραστηριότητα. Τέλος το ενδοκυτταρικό περιβάλλον του *E. coli* δεν επιτρέπει τον σχηματισμό δισουλφιδικών γεφυρών, γεγονός που οδηγεί σε κακή αναδίπλωση του ενζύμου και πιθανή απενεργοποίησή του [115], [188].

#### 1.4.2.3) Παράγοντες που επηρεάζουν την ετερόλογη έκφραση ενζύμων

Τα μειονεκτήματα που φέρει ο *E. coli* ως ξενιστής μπορούν να επιλυθούν με πληθώρα τρόπων. Αρχικά σημαντικές προσπάθειες γίνονται ώστε να κατασκευαστούν κατάλληλες «σειρές» κυττάρων *E. coli* οι οποίες θα έχουν την ικανότητα να εκκρίνουν την επιθυμητή πρωτεΐνη, γεγονός που θα διευκολύνει σημαντικά την ανάκτηση και το καθαρισμό της.

Σε επίπεδο ετερόλογης έκφρασης, αρκετοί είναι οι παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται η διεργασία, με αποτέλεσμα η κατάλληλη μεταβολή τους να οδηγεί σε βελτιστοποίηση της ενζυμικής παραγωγής. Συγκεκριμένα, το θρεπτικό μέσο, ο χρόνος

επαγωγής, η συγκέντρωση του επαγωγέα, το στέλεχος του ξενιστή, η θερμοκρασία ανάπτυξης, η συγκέντρωση του επαγωγέα, η προσθήκη ενώσεων με κατασταλτικό ρόλο (όπως η γλυκόζη), και ο ρυθμός ανάδευσης, μπορούν να επηρεάσουν αισθητά την απόδοση της ετερόλογης έκφρασης.

Ενδεικτικά για τους σημαντικότερους από τους παραπάνω παράγοντες ισχύει [115], [189], [190], [191]:

1. Θερμοκρασία έκφρασης : Η θερμοκρασία που εκτυλίσσεται η ετερόλογη έκφραση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αποδοτικότητα της διεργασίας. Εκτιμάται ότι η μείωση της θερμοκρασίας έκφρασης (15-25 °C) βοηθάει την διαλυτότητα των παραγόμενων πρωτεϊνών με αποτέλεσμα να μειώνει την πιθανότητα καταβύθισης ή λανθασμένης αναδίπλωσής τους. Επιπλέον οι χαμηλές θερμοκρασίες επιβραδύνουν τις μεταβολικές δραστηριότητες των κυττάρων (όπως η μεταγραφή, η μετάφραση και η κυτταρική διαίρεση) με αποτέλεσμα να μειώνεται αισθητά η πιθανότητα υπερσυσσώρευσης του ενζύμου στο κύτταρο και να προλαμβάνεται ο σχηματισμός πρωτεϊνικών εγκλείστων. Ακόμα πολλές από τις εκ φύσεως πρωτεάσες του *E. coli* εμφανίζουν μειωμένη δράση σε χαμηλές θερμοκρασίες, με αποτέλεσμα να περιορίζεται και η αποικοδομητική τους δράση στο επιθυμητό παραγόμενο ένζυμο.
2. Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης : Τα θρεπτικά μέσα ανάπτυξης των βακτηρίων ποικίλλουν και επηρεάζουν σημαντικά τη διαλυτότητα του ενζύμου στον ενδοκυτταρικό χώρο. Συγκεκριμένα αν στο θρεπτικό μέσο εμπεριέχονται χημικές ενώσεις που ενεργοποιούν την έκφραση των chaperones (πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην διαδικασία αναδίπλωσης του ενζύμου), η ενζυμική διαλυτότητα αυξάνεται και η παραλαβή του ενζύμου διευκολύνεται. Ακόμα το θρεπτικό μέσο καθορίζει και την κυτταρική πυκνότητα από την οποία είναι άμεσα εξαρτώμενη η ενζυμική παραγωγικότητα. Γενικότερα αύξηση της κυτταρικής πυκνότητας συνεπάγεται και αύξηση της παραγωγικότητας ως προς μονάδα βιομάζας. Ενδεικτικά θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιούνται για την ετερόλογη έκφραση από *E. coli* είναι το Luria-Bertani (LB, καθιερωμένο θρεπτικό μέσο), το Terrific broth (TB, ιδανικό πρωτίστως για υψηλή κυτταρική πυκνότητα και δευτερευόντως για αύξηση της διαλυτότητας του ενζύμου) και το “Two time of yeast extract tryptone” (2×YT, ιδανικό πρωτίστως για αύξηση της διαλυτότητας του ενζύμου και δευτερευόντως για υψηλή κυτταρική πυκνότητα).
3. Συγκέντρωση επαγωγέα : Η συσχέτιση της συγκέντρωσης του επαγωγέα και της απόδοσης της ετερόλογης έκφρασης είναι αντίστοιχη με αυτή της θερμοκρασίας. Συγκεκριμένα έχει εκτιμηθεί ότι η μείωση της συγκέντρωσης του επαγωγέα συνεπάγεται αύξηση της διαλυτότητας του παραγόμενου ενζύμου, γεγονός που μειώνει τις πιθανότητες καταβύθισης του. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι μειωμένη ποσότητα επαγωγέα οδηγεί σε μείωση του ρυθμού έκφρασης του ενζύμου, αφού λιγότερα μόρια στη μονάδα του χρόνου αναγνωρίζονται από τον

υποκινητή και το γονίδιο του καταστολέα υπερεκφράζεται, γεγονός που περιορίζει την υπερέκφραση της πρωτεΐνης και την δημιουργία εγκλείστων. Γενικότερα οι συγκεντρώσεις IPTG (επαγωγέας του συστήματος *E. coli*) κυμαίνονται από 0,1-1 mM. Παρ' όλα αυτά μείωση κάτω από το ελάχιστο όριο μπορεί να συμβάλει στην αύξηση της απόδοσης της ετερόλογης έκφρασης.

## 2) ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 2.1) Υλικά

#### 2.1.1) Όργανα & Συσκευές

Καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκε βασικός εργαστηριακός εξοπλισμός, όπως : αυτόματες πιπέτες μεταβλητού όγκου, πιπέτες Pasteur, ποτήρια ζέσεως, κωνικές φιάλες, ογκομετρικοί κύλινδροι, γυάλινα μπουκάλια αποστείρωσης, χωνιά, σωλήνες Eppendorf – Eppendorf tubes (1,5 & 2,0 mL), σωληνάρια φυγοκέντρου τύπου Falcon – Falcon tubes (15 & 50 mL), αποστειρωμένες σύριγγες μιας χρήσης, φίλτρα σύριγγας Micron (0,22 mm), αποστειρωμένα τρυβλία Petri, σπαθίδες ανάδευσης και μεταφοράς υλικού και σπαθίδες διανομής κυτταρικού υλικού (spreaders).

Πέραν από τα τυπικά εργαστηριακά όργανα και τις συσκευές έγινε χρήση και εξειδικευμένου εργαστηριακού εξοπλισμού, ο οποίος εμπεριείχε :

- Αναλυτικό ζυγό Abs 120-4N, KERN & Sohn GmbH (Γερμανία)
- Αναλυτικό σύστημα υγρής χρωματογραφίας και χρωματογραφίας πηκτώματος (HPLC & GPC) Agilent 1260 Infinity II LC, Agilent Technologies (Η.Π.Α.)
- Ανακινούμενους επωαστικούς θαλάμους ZHWY-211C, ZHICHENG Analytical Instruments Manufacturing Co Ltd (Κίνα)
- Αποστειρωμένο χώρο εργασίας UNIFLOW UV1200
- Αυτόκαυστο Labo Autoclave, SANYO (Η.Π.Α.)
- Ζυγούς Mark 2060, Mark 4065, BEL Engineering (Ιταλία)
- Θερμαινόμενους και ανακινούμενους επωαστήρες Eppendorf Thermomixer Comfort (1,5 & 2,0 mL), Eppendorf (Γερμανία)
- Θερμαινόμενες πλάκες με δυνατότητα μαγνητικής ανάδευσης
- Θερμοστατούμενο υδατόλουτρο
- Μετρητή pH (pH-meter 537), WTW (Γερμανία)
- Μικροφυγόκεντρο πάγκου Eppendorf 3200 (Γερμανία)
- Μύλο κρυσταλλικής άλεσης Pulverisette 14, Fritsch Corp. (Γερμανία)
- Στήλη βαρύτητας, Biorad (Η.Π.Α.) με ρητίνη TalonR ακινητοποιημένων ιόντων κοβαλτίου, Clontech (Η.Π.Α.)
- Στήλες-φίλτρα φυγοκέντρωσης Amicon® Ultra – 0,5 mL Centrifugal Filters Ultracel®-10 K Regenerated Cellulose, Merck Millipore Ltd (Γερμανία)
- Στήλη Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης (HPLC) CC 250/4.6 NUCLEOSIL 100-5 C18 Cat. No: 721662.46, MACHEREY-NAGEL (Γερμανία)
- Στήλες Υγρής Χρωματογραφίας Πηκτώματος (GPC) PLgel 5um MIXED-D 300 7.5 mm Part No; PL1110-6504, Agilent Technologies (Η.Π.Α.)
- Συσκευή ανάδευσης Orbit LS, Labnet (Μ. Βρετανία)
- Συσκευή Καθαρισμού Υπερήχων Ultrasonic cleaner WUC-1,2 – 22 Liter 40 kHz, witeg (Γερμανία)

- Συσκευή ηλεκτροφόρησης για διαχωρισμό πρωτεϊνών Mini-PROTEAN® Tetra System, BIO-RAD (Η.Π.Α.)
- Συσκευή λυοφιλίωσης με θάλαμο κενού ALPHA 1-4, B. Braun Biotech International (Γερμανία)
- Συσκευή παραγωγής απιονισμένου νερού
- Συσκευή υπερδιήθησης Amicon Stirred Cell 8400 με μεμβράνη PM-10, Millipore (Η.Π.Α.)
- Συσκευή υπερήχων Vibra-Cell Processor VC 400, Sonics and Materials (Η.Π.Α.)
- Συσκευή φωτομέτρησης Microplate Reader, Spectra Max 250, Molecular Devices (Η.Π.Α.)
- Σύστημα παραγωγής υπερκαθαρού νερού Millipore Direct-Q, Merck Millipore (Η.Π.Α.)
- Υπερκατάψυξη FORMA SCIENTIFIC FULL SIZE -86C BIO FREEZER, THERMO FISCHER SCIENTIFIC (Η.Π.Α.)
- Φίλτρα υπερδιήθησης Ultracel® 10 kDa Ultrafiltration Discs, Merck Millipore (Η.Π.Α.)
- Φωτόμετρο S-22 UV/Vis. Spectrophotometer, BOECO (Γερμανία)
- Φυγόκεντρο δοκιμαστικών σωλήνων Vortex-2-Genie, Fischer Scientific (Η.Π.Α.)
- Φυγόκεντρο Beckman Model TJ-6 Centrifuge, Beckman Coulter (Η.Π.Α.)
- Φυγόκεντρο Beckman Model J2-21 Centrifuge, Beckman Coulter (Η.Π.Α.)
- Φυγόκεντρο High Speed Refrigerated Centrifuge 4239R, ALC (Κίνα)
- Φυγόκεντρο ROTANTA 460R, Hettich ZENTRIFUGEN (Γερμανία)
- Φυγόκεντρο Sigma 3K30 Centrifuge, B. Braun Biotech (Γερμανία)
- SPECTROstar Nano Microplate Reader, BMG Labtech (Γερμανία)

### 2.1.2) Βιοπληροφορικά εργαλεία

Η βιοπληροφορική αποτελεί ένα διεπιστημονικό πεδίο που εξελίσσεται τα τελευταία χρόνια και αναπτύσσει μεθόδους και υπολογιστικά εργαλεία με σκοπό την παραγωγή χρήσιμων πληροφοριών και συμπερασμάτων για τη κατανόηση των βιολογικών δεδομένων.

Κατά την εκπόνηση της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκαν τα εξής βιοπληροφορικά εργαλεία και λογισμικά :

- Ο αλγόριθμος **Standard Protein Blast (blastp)** του εργαλείου Basic Local Alignment Search Tool (BLAST®) του Εθνικού Κέντρου Πληροφοριών Βιοτεχνολογίας (NCBI), της Εθνικής Ιατρικής Βιβλιοθήκης των Ηνωμένων Πολιτειών (NLM), υποκατάστημα των Εθνικών Ινστιτούτων Υγείας (NIH) [192] :

Ο συγκεκριμένος αλγόριθμος λαμβάνει ως ψηφιακή πληροφορία τη πρωτεϊνική αλληλουχία (αμινοξέα ή νουκλεοτίδια), και την συγκρίνει (ευθυγραμμίζει) με άλλες αλληλουχίες γνωστών πρωτεϊνών, επιλέγοντας την επιθυμητή βάση δεδομένων (UniProtKB/Swiss-Prot). Τα τελικά αποτελέσματα κατηγοριοποιούνται βάσει στατιστικών αποτελεσμάτων, με μεγέθη όπως η ομολογία και η κάλυψη των αλληλουχιών. Στη παρούσα πειραματική διαδικασία ο αλγόριθμος χρησιμοποιήθηκε ως εργαλείο για την ευθυγράμμιση των αλληλουχιών των

γονιδίων των ετερόλογα εκφρασμένων πολυεστερασών με αυτών γνωστών, από τη βιβλιογραφία, ενζύμων που λειτουργούν ως σημεία αναφοράς (benchmark) στη βιοαποικοδόμηση των πλαστικών. Βάσει των αποτελεσμάτων προέκυψαν συμπεράσματα σχετικά με την δράση των νέων ενζύμων.

→ Ο αλγόριθμος **SignalP 5.0**, του ερευνητικού ινστιτούτου μικρο- και νανοτεχνολογίας του Πολυτεχνείου της Δανίας (DTU Health Tech) [193] :

Ομοίως με τον αλγόριθμο blastp, ο SignalP 5.0, λαμβάνει ως ψηφιακή πληροφορία την αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης και προβλέπει την ύπαρξη και την θέση σηματοδοτικών αλληλουχιών (signal peptides). Η σηματοδοτική αλληλουχία αποτελεί μια εγγενή αλληλουχία αμινοξέων της πρωτεΐνης που λειτουργεί ως αναγνωριστικό σήμα για την έκκριση της συντιθέμενης πρωτεΐνης από το κύτταρο. Η χρησιμότητα του βιοπληροφορικού αυτού εργαλείου, στην πειραματική διαδικασία που αναλύεται, αφορούσε στον εντοπισμό των πιθανών αυτών σηματοδοτικών αλληλουχιών έκκρισης, στα γονίδια των νέων πολυεστερασών, με σκοπό την αφαίρεση τους. Η αφαίρεση αυτή συνέβαλε στην επίλυση του προβλήματος της πιθανής μη αναγνώρισης τους από τον ξενιστή *E. coli*, λόγω της προέλευσής τους από άλλα είδη, γεγονός που θα εμπόδιζε, πιθανά, την μετάφραση του γονιδίου και την σωστή έκφραση και λειτουργία των τελικών πολυεστερασών.

→ Το **MEGA (έκδοση 11)**, βιοπληροφορικό λογισμικό, του Πανεπιστημίου της Πενσιλβάνιας (Pennsylvania State University) [215], [216] :

Το MEGA11, αποτελεί είναι πρόγραμμα πολλαπλής ευθυγράμμισης πρωτεϊνικών αλληλουχιών το οποίο χρησιμοποιεί τα αποτελέσματα της αλληλούχισης για τη δημιουργία πρωτεϊνικών φυλογενετικών δέντρων. Στην αναλυόμενη πειραματική διαδικασία το πρωτεϊνικό φυλογενετικό δέντρο που προέκυψε χρησίμευσε στην ομαδοποίηση των γονιδίων των νέων πολυεστερασών, μεταξύ τους αλλά και συγκριτικά με τα ένζυμα αναφοράς της βιοαποικοδόμησης των πλαστικών.

### 2.1.3) Ξενιστής και φορέας ετερόλογης έκφρασης πολυεστερασών

Όπως προαναφέρθηκε και στο θεωρητικό μέρος (1.4.2) Ετερόλογη έκφραση ενζύμων), η ετερόλογη έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών εξαρτάται άμεσα από την κατάλληλη επιλογή του μικροοργανισμού έκφρασης (ξενιστή) και του φορέα μεταφοράς του γονιδίου.

#### 2.1.3.1) Ξενιστής ετερόλογης έκφρασης πολυεστερασών

Έτσι στην παρούσα πειραματική διαδικασία, για την ετερόλογη έκφραση όλων των πολυεστερασών, χρησιμοποιήθηκε ως ξενιστής το κολοβακτηρίδιο *Escherichia coli* (*E.*



*coli*), και συγκεκριμένα δύο επιδεκτικά στελέχη (μετασηματισμένα στελέχη *E. coli*, με θερμοκρασιακούς χειρισμούς παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων ιόντων ασβεστίου, με σκοπό την αύξηση του δυναμικού της κυτταρικής επιφάνειας για δέσμευση του «ξένου» DNA/φορέα) του βακτηρίου:

- **BL21 (DE3), Novagen (H.Π.A.)**: Τα επιδεκτικά κύτταρα *E. coli* BL21 (DE3) έχουν όμοιο χρωμόσωμα με τα κύτταρα του *E. coli* απλά με κάποιες τροποποιήσεις που λάβαν χώρα μέσω γενετικής μηχανικής, με σκοπό την επαγόμενη (ρυθμιζόμενη) έκφραση της πρωτεΐνης σε υψηλά επίπεδα. Η επαγόμενη έκφραση βασίζεται στην μίμηση του μηχανισμού του οπερονίου της λακτόζης. Συγκεκριμένα στο χρωμόσωμα των κυττάρων BL21 (DE3) εμπεριέχονται με τη σειρά, ένας υποκινητής της βακτηριακής RNA πολυμεράσης, ένας *lac* χειριστής (ρυθμιστική περιοχή), το γονίδιο έκφρασης της T7 RNA πολυμεράσης (ταχύτερη και αποτελεσματικότερη της βακτηριακής πολυμεράσης) και το γονίδιο έκφρασης *lac* καταστολέα. Ο μηχανισμός πρωτεϊνικής έκφρασης υψηλού επιπέδου βασίζεται στο σύστημα επαγωγής T7 RNA πολυμεράσης-IPTG (β-D-1-θειογαλακτοπυρανοζίδιο). Το IPTG αποτελεί ανάλογο της λακτόζης και δεν μεταβολίζεται από το κύτταρο. Απουσία IPTG λαμβάνει χώρα η έκφραση του γονιδίου του *lac* καταστολέα, ο οποίος προσδένεται στον *lac* χειριστή, με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η έκφραση του γονιδίου της T7 RNA πολυμεράσης, και τα κύτταρα απλά πολλαπλασιάζονται. Παρουσία του IPTG, το γονίδιο του *lac* καταστολέα δεν εκφράζεται, οπότε ο *lac* χειριστής δεν παρεμποδίζεται με αποτέλεσμα η βακτηριακή RNA πολυμεράση να εκφράζει το γονίδιο της T7 RNA πολυμεράσης το οποίο στη συνέχεια «διαβάζει» το γονίδιο έκφρασης της επιθυμητής πρωτεΐνης..
- **ArcticExpress (DE3), Novagen (H.Π.A.)**: Τα επιδεκτικά κύτταρα ArcticExpress (D3) είναι γενετικά τροποποιημένα έτσι ώστε να λειτουργούν όπως και τα BL21 (D3), με την μόνη διαφορά ότι φέρουν και γονίδια έκφρασης ανεκτικών, στις χαμηλές θερμοκρασίες επαγωγής, *chaperones* (πρωτεϊνών). Τα εκφραζόμενα *chaperones* συμβάλλουν σημαντικά στην κυτταρική ανάπτυξη και στην σωστή αναδίπλωση της παραγόμενης πρωτεΐνης αυξάνοντας τη διαλυτότητα της και μειώνοντας τις πιθανότητες καταβύθισης ή δημιουργίας πρωτεϊνικών εγκλείστων.

#### 2.1.3.2) Φορείς ετερόλογης έκφρασης πολυεστερασών

Οι φορείς που επιλέχθηκαν για χρήση κατά τη πειραματική διαδικασία είναι οι εξής :

- **Πλασμίδιο pET-22b(+), Novagen (H.Π.A.)** : Ο πλασμδιακός φορέας pET-22b(+), αποτελεί ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA (5493 βάσεων), το οποίο φέρει το γονίδιο αντίστασης στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη (κατάλληλο για την επιλογή των ανασυνδυασμένων κυττάρων), το γονίδιο έκφρασης *lac* καταστολέα (για προστασία σε περίπτωση αποτυχίας ή λάθους του μηχανισμού των κυττάρων του ξενιστή), έναν υποκινητή της T7 RNA πολυμεράσης, ένα *lac* χειριστή και το

γονίδιο έκφρασης της ετερόλογης πρωτεΐνης. Το πλασμίδιο pET-22b(+) επιλέγεται διότι λειτουργεί συνεργιστικά με τα επιδεκτικά κύτταρα DE3, κατηγορία στην οποία ανήκουν τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στην εκπόνηση των πειραμάτων έκφρασης. Συγκεκριμένα η T7 RNA πολυμεράση, έπειτα από την παραγωγή της παρουσία IPTG όπως αναλύθηκε παραπάνω, αναγνωρίζει τον υποκινητή της στο πλασμίδιο και προχωρά προς έκφραση του γονιδίου της επιθυμητής πρωτεΐνης.

→ **Πλασμίδιο pET-26b(+), Novagen (Η.Π.Α.)** : Ο πλασμιδιακός φορέας pET-26b(+), αποτελεί ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA (5360 βάσεων), το οποίο φέρει τα ίδια γονίδια με το πλασμίδιο pET-22b(+) με την μόνη διαφορά να βρίσκεται στο γονίδιο αντίστασης αντιβιοτικού το οποίο στη περίπτωση του pET-26b(+) αφορά την καναμυκίνη.

#### 2.1.4) Αντιδραστήρια

Όλα τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την εκπόνηση του πειράματος είχαν καθαρότητα αναλυτικού βαθμού και προμηθεύτηκαν, κυρίως, από τις εταιρείες Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.) και AppliChem (Γερμανία).

##### 2.1.4.1) Θρεπτικά υλικά

Τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των στελεχών *E. coli*, BL21 (DE3) και ArcticExpress (DE3), είχαν τις εξής συστάσεις:

**Πίνακας 7** : Σύσταση θρεπτικού μέσου LB.

| <b>Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας Luria-Bertani (LB)</b> |  |
|--|--|
| <b>Συστατικό</b>                                     | <b>Σύσταση (% w/w σε απιονισμένο νερό)</b> |
| Εκχύλισμα ζύμης (yeast extract)                      | 0,5  |
| Τρυπτόνη   | 1,0  |
| NaCl   | 1,0  |
| Άγαρ <sup>*1</sup>                                   | 1,5  |

**Πίνακας 8** : Σύσταση θρεπτικού μέσου 2×YT.

| <b>Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας “Two time of yeast extract tryptone” (2×YT)</b> |  |
|---|--|
| <b>Συστατικό</b>  | <b>Σύσταση (% w/w σε απιονισμένο νερό)</b> |
| Εκχύλισμα ζύμης (yeast extract)   | 1,0  |
| Τρυπτόνη  | 1,6  |
| NaCl  | 0,5  |

**Πίνακας 9** : Σύσταση θρεπτικού μέσου TB.

| <b>Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας Terrific Broth (TB)</b> |  |
|---|--|
| <b>Συστατικό</b>                                      | <b>Σύσταση (% w/v σε απιονισμένο νερό)</b> |

|   |                    |
|---|--------------------|
| Εκχύλισμα ζύμης (yeast extract)   | 2,4                |
| Τρυπτόνη  | 2,0                |
| Γλυκερόλη   | 4,0 <sup>*2</sup>  |
| Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών<br>(0,17 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,72 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) | 10,0 <sup>*2</sup> |

\*<sup>1</sup> : Η προσθήκη του άγαρ επιλέχθηκε στην περίπτωση ανάπτυξης των στελεχών *E. coli* σε τρυβλία Petri.

\*<sup>2</sup> : Οι συστάσεις είναι σε %v/v σε απιονισμένο νερό.

Όλα τα θρεπτικά υλικά παρασκευάστηκαν με διαλύτη απιονισμένο νερό (H<sub>2</sub>O) και αποστειρώθηκαν σε αυτόκαυστο (Labo Autoclave, SANYO). Τα θρεπτικά υλικά LB και 2×YT υποβλήθηκαν σε συνθήκες αποστείρωσης θερμοκρασίας 121 °C για 20 min και το TB σε συνθήκες αποστείρωσης 109 °C για 40 min (λόγω της γλυκόζης η οποία σε υψηλότερη θερμοκρασία κρυσταλλώνεται).

#### 2.1.4.2) Ρυθμιστικά διαλύματα (Buffers)

Τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την απομόνωση των πολυεστερασών αλλά και την μελέτη της δράσης τους είχαν την εξής σύσταση και pH:

**Πίνακας 10** : Σύσταση & pH χρησιμοποιούμενων ρυθμιστικών διαλυμάτων

| Ρυθμιστικό Διάλυμα      | Συστατικά   | Συγκέντρωση                                       | pH   |
|-------------------------|---|---|------|
| Talon 10×               | Tris base, NaCl, πυκνό HCl  | 0,5 M, 3 M,<br>στάγδην προσθήκη<br>για ρύθμιση pH | 8,05 |
| Talon 0,5×-Ιμιδαζόλιο   | Talon 10×, Σκόνη<br>ιμιδαζολίου (99%<br>καθαρότητα)                 | 0,01-0,02 M<br>ιμιδαζολίου σε<br>Talon 0,5×       | 7,4  |
| Citrate-Phosphate (C-P) | Κιτρικό οξύ, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                       | 0,1 M, 0,1 M                                      | 5,0  |
| Citrate-Phosphate (C-P) | Κιτρικό οξύ, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                       | 0,1 M, 0,1 M                                      | 6,0  |
| Sodium-Phosphate (S-P)  | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 0,1 M, 0,1 M                                      | 6,0  |
| Sodium-Phosphate (S-P)  | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 0,1 M, 0,1 M                                      | 7,0  |
| Sodium-Phosphate (S-P)  | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 0,1 M, 0,1 M                                      | 7,5  |
| Sodium-Phosphate (S-P)  | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 0,1 M, 0,1 M                                      | 8,0  |
| Tris-HCl                | Tris base, πυκνό HCl  | 0,1 M, 0,1 M                                      | 8,0  |
| Tris-HCl                | Tris base, πυκνό HCl  | 0,1 M, 0,1 M                                      | 9,0  |

#### 2.1.4.3) Αντιβιοτικά & Επαγωγέας ετερόλογης έκφρασης

Για την επιλογή των ανασυνδυασμένων στελεχών *E. coli* (που έχουν λάβει το επιθυμητό πλασμίδιο με το ξένο DNA), χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιβιοτικά τόσο κατά την ανάπτυξη των κυττάρων σε τρυβλία Petri όσο και στις υγρές καλλιέργειες:

**Πίνακας 11** : Χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά και οι συγκεντρώσεις αυτών.

| Στέλεχος <i>E. coli</i> | Αντιβιοτικό  | Τελική συγκέντρωση (συγκέντρωση Stock)  |
|-------------------------|--|---|
| BL21 (DE3)              | Αμπικιλίνη <sup>*3</sup>   | 100 µg/mL (100 mg/mL)                   |
| BL21 (DE3)              | Καναμυκίνη <sup>*3</sup>   | 50 µg/mL (100 mg/mL)                    |
| ArcticExpress (DE3)     | Γενταμικίνη και Αμπικιλίνη <sup>*3</sup><br>ή Καναμυκίνη <sup>*3</sup> | 20 µg/mL (100 mg/mL)<br>για Γενταμικίνη |

<sup>\*3</sup> : Η επιλογή του αντιβιοτικού για τα κύτταρα *E. coli* BL21 (DE3) εξαρτάται από τον φορέα έκφρασης της παραγόμενης πολυεστεράσης (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΣΤ : Απαραίτητα αντιβιοτικά για την ετερόλογη έκφραση των πολυεστερασών).

Όσον αφορά τον επαγωγέα ετερόλογης έκφρασης, αυτός είναι το β-D-1-θειογαλακτοπυρανοζίδιο (IPTG), το οποίο παρασκευάζεται από στερεή σκόνη ως διάλυμα υπερκάθαρου αποστειρωμένου H<sub>2</sub>O:

**Πίνακας 12** : Χρησιμοποιούμενος επαγωγέας ετερόλογης έκφρασης, συστατικά και τελικές συγκεντρώσεις χρήσης.

| Επαγωγέας ετερόλογης έκφρασης | Συστατικά                                    | Τελική συγκέντρωση (συγκέντρωση Stock) |
|-------------------------------|--|--|
| IPTG                          | IPTG σκόνη (99% καθαρότητα), υπερκάθαρο νερό | 0,05-1,0 M (1,0 M)                     |

#### 2.1.4.4) Διαλύματα απομόνωσης παραγόμενων πολυεστερασών

Κατά την διαδικασία της απομόνωσης των παραγόμενων πολυεστερασών από τον ενδοκυτταρικό περιεχόμενο των στελεχών του *E. coli*, σε στήλη βαρύτητας με ρητίνη TalonR ακινητοποιημένων ιόντων κοβαλτίου, χρησιμοποιήθηκαν τα εξής διαλύματα:

**Πίνακας 13** : Χρησιμοποιούμενα διαλύματα και οι συγκεντρώσεις αυτών, κατά τη διαδικασία απομόνωσης των παραγόμενων πολυεστερασών, σε στήλη βαρύτητας TalonR ακινητοποιημένων ιόντων κοβαλτίου.

| Διάλυμα                                | Συστατικά  | Συγκέντρωση  |
|--|--|--|
| Ρυθμιστικό διάλυμα Talon 1×-Ιμιδαζόλιο | Talon 10×, Απιονισμένο H <sub>2</sub> O, Σκόνη ιμιδαζολίου (≥99,5% καθαρότητα) | 0,005-0,1 M ιμιδαζολίου σε Talon 1×                                |
| Απιονισμένο H <sub>2</sub> O           | -  | -  |
| Αιθανόλη                               | Καθαρή αιθανόλη (99,8%, Απιονισμένο H <sub>2</sub> O)                          | Αναλογία καθαρής αιθανόλης : απιονισμένου H <sub>2</sub> O (20:80) |

#### 2.1.4.5) Διαλύματα ηλεκτροφόρησης πολυεστερασών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου και χρωματισμού πηκτής

Κατά την διαδικασία της ηλεκτροφόρησης των τελικών ενζυμικών διαλυμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες και στη συνέχεια κατά τον χρωματισμό της πηκτής, έγινε χρήση των παρακάτω διαλυμάτων :

**Πίνακας 14** : Χρησιμοποιούμενα διαλύματα κατά την ηλεκτροφόρηση των πολυεστερασών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου και κατά τον χρωματισμό της πηκτής

| Διάλυμα  | Συνταγή (Συστατικά και συστάσεις)   | pH                  |
|--|---|---------------------|
| Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης ή ηλεκτροδίων (SDS Running Buffer 10×) | 30,3 g/L Tris base, 144 g/L Γλυκίνη, 10 g/L δωδεκυλοθειϊκού νατρίου (SDS)   | 8,3 (εκ παρασκευής) |
| Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (SDS Loading Buffer)                         | 1 g SDS, 5 mL 0,25 M Tris base (pH 6,8), 2,5 mL 50% γλυκερόλη, 2,5 mL 2-μερκαπτοαιθανόλη, 4 mL 0,1 % μπλε της βρωμοθυμόλης                      | -                   |
| Υδατικό διάλυμα χρώσης (Staining Solution)                               | 0,1% w/v Coomassie Brilliant Blue G-250/AppliChem (H.P.A.), 10% v/v παγετώδες οξικό οξύ, 40% v/v μεθανόλη, 50% v/v απιονισμένο H <sub>2</sub> O | -                   |
| Υδατικό διάλυμα αποχρωματισμού (Destaining Solution)                     | 70 % v/v απιονισμένο H <sub>2</sub> O, 20 % v/v μεθανόλη, 10 % v/v οξικό οξύ  | -                   |

#### 2.1.4.6) Διαλύτες χρωματογραφικών τεχνικών

Οι κινητές φάσεις που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εφαρμογή τεχνικών χρωματογραφίας (HPLC και GPC), παρασκευάστηκαν ως εξής :

**Πίνακας 15** : Χρησιμοποιούμενοι διαλύτες, ως κινητές φάσεις, στις χρωματογραφικές μεθόδους ανάλυσης HPLC και GPC.

| Κινητή Φάση   | Συστατικά  | Σύσταση  |
|---|--|--|
| Κινητή φάση HPLC δειγμάτων PET (άμορφου και κρυσταλλικού) | Υπερκάθαρο H <sub>2</sub> O, Ακετονιτρίλιο (HPLC grade), Θεϊκό οξύ (10 mM, από 96 % by mass H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) | 60 % H <sub>2</sub> O, 20 % AcN, 20 % H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> |
| Κινητή φάση GPC δειγμάτων PBS και PHB                     | Χλωροφόρμιο (≥99,8%)* <sup>4</sup>   | 100% CHCl <sub>3</sub>   |
| Κινητή φάση GPC δειγμάτων PCL, PLA, PU                    | Τετραϋδροφουράνιο (≥99,9%)* <sup>4</sup>   | 100% THF   |

\*4: Οι συγκεκριμένοι διαλύτες χρησιμοποιήθηκαν και κατά την διάλυση των πολυεστερικών σκονών προς χρωματογραφική ανάλυση GPC (2.2.4.4) Μέτρηση απώλειας μοριακών βαρών με Χρωματογραφία Πηκτώματος).

### 2.1.5) Πολυμερικά υλικά

Τα πολυμερικά υλικά στα οποία μελετήθηκε η δράση των πολυεστερασών προμηθευτήκαν σε μορφή μικρών συμπιεσμένων πέλλετς και με κατάλληλη προκατεργασία μετατράπηκαν σε μορφή κόνεων, με διάμετρο μικρότερη των 500 μm (μικροπλαστικά). Η προκατεργασία εμπεριείχε αρχική εμβάπτιση των πέλλετς σε υγρό άζωτο και στη συνέχεια εισαγωγή τους στον μύλο κρυογονικής άλεσης Pulverisette 14 (17000 rpm) με περαιτέρω προσθήκη υγρού αζώτου για να αποφευχθεί η συσσωμάτωση. Τέλος, πριν την χρήση, η πολυμερική σκόνη ξηράθηκε σε διαφορετικές συνθήκες ανάλογα το πολυμερές (για παράδειγμα για την σκόνη PET έλαβε χώρα ξήρανση στους 140 °C για 8 ώρες ενώ για τις σκόνες PLA και PBS στους 80 °C για 5 ώρες).

Οι τελικές χρησιμοποιούμενες πολυεστερικές σκόνες είναι οι εξής:

**Πίνακας 16** : Χαρακτηριστικά και ιδιότητες των πολυμερικών σκονών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη δράσης των παραγόμενων πολυεστερασών.

| Πολυμερές                                    | Υπόστρωμα              | Εταιρεία                  | Μοριακό βάρος (g/mol) | Κρυσταλλικότητα (%) | Θερμοκρασία μετάπτωσης (°C) |
|--|------------------------|---------------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------------|
| Πολυγαλακτικό οξύ (PLA)                      | PLA 4043D              | NatureWorks (Η.Π.Α.)      | 174300                | 11                  | 59                          |
| Πολύ (υδροξυ βουτυρικός) εστέρας (PHB)       | PHB Biomer P226        | Biomer (Γερμανία)         | 20000                 | 49                  | -                           |
| Πολύ (ηλεκτρικός βουτυλεστέρας) (PBS)        | PBS NaturePlast PBE003 | NaturePlast (Γαλλία)      | 29000                 | 64                  | -                           |
| Άμορφο τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο (αPET)      | PBS NaturePlast PBE003 | NaturePlast (Γαλλία)      | 29000                 | ≈6                  | -                           |
| Κρυσταλλικό τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο (κPET) | PET PAPET clear        | Lotte Chemical (Η.Β.)     | 36100                 | 35                  | 80                          |
| Θερμοπλαστική Πολυουρεθάνη (TPU)             | PU LRP7560             | Coim Laripur (Ιταλία)     | 70000 <sup>*5</sup>   | -                   | -                           |
| Πολυκαπρολακτόνη (PCL)                       | PCL CARA 6500          | Ravago Chemicals (Βέλγιο) | 66000                 | 45                  | -64                         |

\*5 : Το μοριακό βάρος προσδιορίστηκε μέσω χρωματογραφίας πηκτώματος (GPC).

## 2.2) Μέθοδοι

### 2.2.1) Επιλογή μελετώμενων πολυεστερασών & Βιοπληροφορική ανακάλυψη γονιδίων νέων πολυεστερασών

Η πειραματική διαδικασία που θα αναλυθεί, επικεντρώθηκε στην μελέτη της δράσης δώδεκα διαφορετικών ενζύμων (Dmest, FoCut, HiC, LCC, PETase, PHAase, PHOase, PLAase, PUase, Prot. Bac, Prot. Gr. και Se1JFR) σε πολυεστερικά υποστρώματα. Από τα δώδεκα αυτά ένζυμα, τα δέκα (Dmest, FoCut, HiC, LCC, PETase, PHAase, PHOase, PLAase, PUase και Se1JFR) χρησιμοποιήθηκαν έπειτα από προσπάθειες ετερόλογης έκφρασής τους στο βακτήριο *E. coli*, ενώ τα δύο (Prot. Bac, Prot. Gr.) ήταν εμπορικά διαθέσιμα. Δύο από τα ένζυμα (LCC, PETase) έχουν ήδη μελετηθεί εκτενώς και χαρακτηριστεί από ερευνητικά εργαστήρια και ξεχωρίζουν λόγω της υψηλής συμβολής τους στην βιοαποικοδόμηση πολυεστέρων, κυρίως του τереφθαλικού πολυαιθυλενίου (PET). Αναγνωρίζονται λοιπόν ως βιβλιογραφικά ένζυμα αναφοράς, για το υπόστρωμα του PET, ενώ στη παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η δράση τους και σε περαιτέρω πολυεστέρες, λόγω της ικανότητας υδρόλυσης των πολυεστερικών δεσμών. Ακόμα δύο από αυτά (FoCut, HiC) έχουν παρουσιάσει ενδείξεις αποικοδόμησης του PET οι οποίες δεν είναι τόσο ικανοποιητικές ώστε να χαρακτηρίζονται ως PET-υδρολάσες. Από τα υπόλοιπα ένζυμα, τέσσερα (PHAase, PLAase, PHOase, PUase) εντοπίστηκαν βιβλιογραφικά για την βιοαποικοδομητική δράση, των μικροοργανισμών-παραγωγών τους, σε πολυεστερικά υποστρώματα, πλην του PET, οπότε και μελετήθηκε η πιθανή δράση τους και στους υπόλοιπους πολυεστέρες. Ακόμα, τα γονίδια δύο ενζύμων (Dmest, Se1JFR) προέκυψαν μέσω σύγκρισης πρωτεϊνικών αλληλουχιών, από βιοπληροφορικά εργαλεία (2.1.2) Βιοπληροφορικά εργαλεία), και η τελική επιλογή βασίστηκε στα γονίδια που εμφάνιζαν ομολογία και επικάλυψη με κάποια από τα βιβλιογραφικά ένζυμα αναφοράς του PET, που προαναφέρθηκαν, και η δράση τους μελετήθηκε σε όλα τα πολυεστερικά υποστρώματα. Τα δύο εμπορικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν επιλέχθηκαν προς μελέτη λόγω της υδρολυτικής δράσης τους, ως πρωτεάσες.

### 2.2.2) Παραγωγή πολυεστερασών

#### 2.2.2.1) Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA, με σκοπό την δημιουργία επαρκούς ποσότητας για τις δοκιμές έκφρασης που διεξήχθησαν, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση κατάλληλου πακέτου προπαρασκευασμένων χημικών αντιδραστηρίων NucleoSpin® Plasmid 250 preps Mini kit for DNA, RNA & protein purification, MACHEREY-NAGEL (Γερμανία), ακολουθώντας το παρεχόμενο πρωτόκολλο απομόνωσης. Συνοπτικά αυτό αφορούσε την ανάπτυξη αποικιών ανασυνδυασμένων (με τα

επιθυμητά πλασμίδια απομόνωσης) βακτηρίων *E. coli*, του στελέχους BL21 (DE3), σε τρυβλία Petri, στη συνέχεια την ανάπτυξη των αποικιών σε υγρές καλλιέργειες, την παραλαβή των κυττάρων και των κυτταρικών θραυσμάτων και την επεξεργασία τους με τα παρεχόμενα ρυθμιστικά διαλύματα και διαλύματα λύσης προς απομόνωση του πλασμιδιακού DNA για κάθε εκφραζόμενο ένζυμο.

#### 2.2.2.2) Μετασχηματισμός πλασμιδίων στα επιδεκτικά κύτταρα *E. coli*

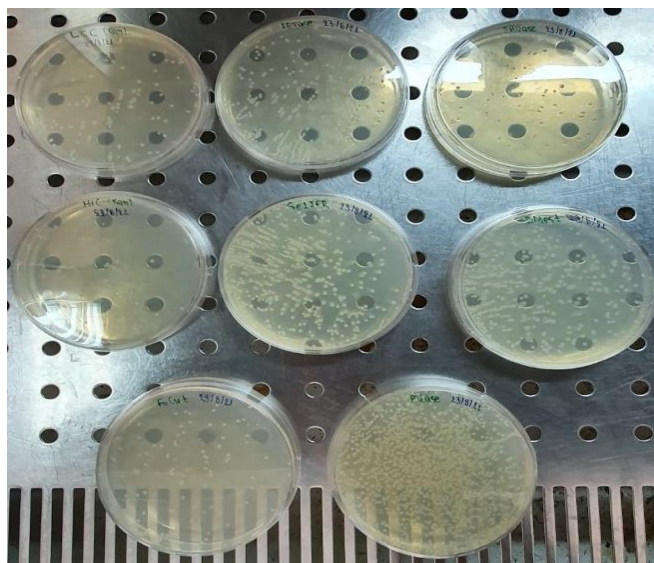
Η εισαγωγή των πλασμιδίων στα επιδεκτικά κύτταρα BL21 (DE3) και ArcticExpress (DE3), πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου θερμικού σοκ, λόγω της βακτηριακής φύσης των επιλεγμένων στελεχών. Συγκεκριμένα για τη διαδικασία του μετασχηματισμού των πλασμιδίων στα επιδεκτικά κύτταρα ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

- 1) Ανάμειξη ποσότητας επιθυμητού πλασμιδίου μετασχηματισμού ίση με 0,7  $\mu\text{L}$  και επιδεκτικών κυττάρων (αποθηκευμένα στην υπερκατάψυξη στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) ίση με 50  $\mu\text{L}$ , υγρής κατάστασης, σε Eppendorf των 1,5 mL.
- 2) Επώαση του περιεχομένου σε παγόλουτρο ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) για 30 min (στο στάδιο αυτό το αρνητικά φορτισμένο πλασμίδιο προσεγγίζει την θετικά φορτισμένη επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης του επιδεκτικού κυττάρου).
- 3) Απευθείας τοποθέτηση του περιεχομένου από το παγόλουτρο σε θερμαινόμενο και ανακινούμενο επωαστήρα Eppendorf των 1,5 mL, σε θερμοκρασία  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  για 1 min και 20 sec, δίχως ανάδευση (στο στάδιο αυτό η υψηλή μεταβολή θερμοκρασίας,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}\rightarrow 42\text{ }^{\circ}\text{C}$ , μεταβάλλει την ρευστότητα της κυτταρικής μεμβράνης και οδηγεί στην διάνοιξη πόρων ενώ παράλληλα διαταράσσει το κυτταρικό περιβάλλον με αποτέλεσμα την είσοδο του πλασμιδίου στο κύτταρο).
- 4) Μετακίνηση του περιεχομένου πίσω στο παγόλουτρο και προσθήκη θρεπτικού υλικού LB, ποσότητας 150  $\mu\text{L}$ .
- 5) Τοποθέτηση του περιεχομένου σε θερμαινόμενο και ανακινούμενο επωαστήρα Eppendorf των 1,5 mL, σε θερμοκρασία  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  για 1 h, με ανάδευση 500 rpm.
- 6) Στρώσιμο του περιεχομένου ( $\approx 200\text{ } \mu\text{L}$ ) σε αποστειρωμένο τρυβλίο Petri το οποίο εμπεριείχε στερεό θρεπτικό μέσο LB, ποσότητας 20-25 mL. Είχε προηγηθεί αποστείρωση του θρεπτικού υλικού LB και προσθήκη σε αυτό ποσότητας κατάλληλου αντιβιοτικού αντίστασης, ανάλογα το στέλεχος που μετασχηματίστηκε και της επιθυμητής τελικής συγκέντρωσης, βλ. Πίνακας 11).
- 7) Επώαση του τρυβλίου σε επωαστήρα, σε θερμοκρασία  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  overnight (μέχρι την επόμενη ημέρα,  $\approx 17-20$  ώρες)

Όλη η διαδικασία του μετασχηματισμού του πλασμιδίου σε επιδεκτικά κύτταρα στελέχους *E. coli*, πραγματοποιήθηκε με την χρήση αποστειρωμένων ( $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 20 min) ρυγχών (tips) αυτοματοποιημένης πιπέτας μεταβλητού όγκου, ενώ η διαδικασία του στρώσιματος των αποστειρωμένων τρυβλίων Petri τόσο με το θρεπτικό υλικό LB-αντιβιοτικό όσο και με το περιεχόμενο των κυττάρων-πλασμιδίου έλαβε χώρα στον ειδικά αποστειρωμένο χώρο εργασίας (απαγωγό), παρουσία φλόγας. Ο χειρισμός των



αντιβιοτικών έγινε σε κατάλληλη απόσταση από την φλόγα ώστε να προληφθεί πιθανή απενεργοποίηση τους λόγω ανάπτυξης υψηλής θερμοκρασίας.



**Εικόνα 9** : Αποικίες μετασχηματισμένων στελεχών *E. coli* BL21 (DE3) σε τρυβλία Petri.

### 2.2.2.3) Έκφραση πολυεστερασών

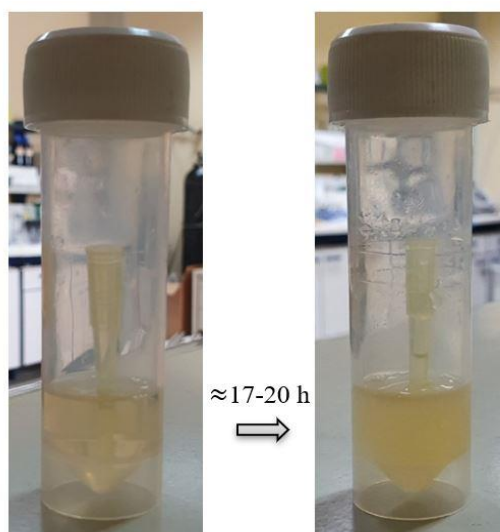
#### Παρασκευή εμβολίων – προκαλλιιεργειών

Η προκαλλιέργεια των μετασχηματισμένων στελεχών *E. coli* χρησιμοποιήθηκε ως εμβόλιο της υγρής καλλιέργειας μεγάλου όγκου και παρασκευάστηκε ανασηκώνοντας μια μεμονωμένη διακριτή αποικία του τρυβλίου με τη βοήθεια ενός ρύγχους πιπέτας μεταβλητού όγκου και την απόρριψη του σε αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου Sterilin των 20 mL, που εμπεριείχε 5 mL αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού LB και κατάλληλη ποσότητα αντιβιοτικού επιλογής (Πίνακας 11). Στη συνέχεια το Sterilin τοποθετήθηκε σε ανακινούμενο επωαστήρα σε θερμοκρασία 37 °C υπό συνεχή ανάδευση 180 rpm, overnight ( $\approx$ 17-20 ώρες).



**Εικόνα 10** : Προκαλλιέργειες κυττάρων στελεχών *E. coli* πριν την επώαση τους overnight.

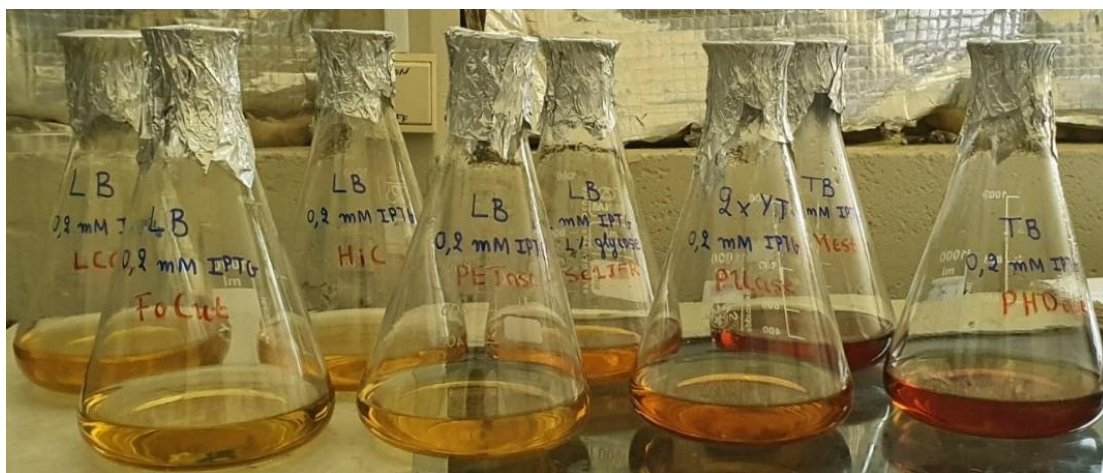
Έπειτα από το πέρας της επώασης η προκαλλιέργεια απομακρύνθηκε από τον επωαστήρα και έγινε οπτική σύγκριση της θολερότητας του περιεχομένου, αύξηση της οποίας υποδήλωσε βακτηριακή ανάπτυξη.



**Εικόνα 11** : Προκαλλιέργεια κυττάρων στελεχών *E. coli* πριν (αριστερά) και μετά (δεξιά) την επώαση overnight. Η εμφανής αύξηση της θολερότητας, υποδηλώνει βακτηριακή ανάπτυξη.

#### Έκφραση πολυεστερασών σε υγρές καλλιέργειες μεγάλου όγκου

Η προκαλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε ως εμβόλιο σε υγρή καλλιέργεια μεγάλου όγκου. Συγκεκριμένα, κατάλληλη ποσότητα του περιεχομένου του Sterilin (VΕΜΒΟΛΙΟΥ :  $V_{\text{ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ}} = 1 : 100$ ) εγχύθηκε σε κωνική φιάλη ( $V_{\text{ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ}} : V_{\text{ΚΩΝΙΚΗΣ ΦΙΑΛΗΣ}} = 1 : 4$ ), που εμπεριείχε κατάλληλο αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό (LB, TB ή  $2 \times \text{YT}$ ) και ποσότητα αντιβιοτικού αντίστασης (Πίνακας 11). Η κωνική φιάλη τοποθετήθηκε σε ανακινούμενο επωαστήρα σε θερμοκρασία  $37^\circ\text{C}$  υπό συνεχή ανάδευση 180 rpm. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα η κωνική φιάλη απομακρύνθηκε από τον επωαστήρα, ελήφθη δείγμα με 1 mL, τοποθετήθηκε σε Eppendorf των 1,5 mL, και φωτομετρήθηκε (Φωτόμετρο S-22 UV/Vis. Spectrophotometer) στα 600 nm. Ως τυφλό δείγμα φωτομέτρησης χρησιμοποιήθηκε ποσότητα 1 mL του περιεχομένου της κωνικής φιάλης, αφού αυτό φυγοκεντρήθηκε με στόχο την καθίζηση των κυττάρων. Η διαδικασία της επώασης ολοκληρώθηκε όταν η οπτική πυκνότητα του δείγματος που φωτομετρήθηκε ( $\text{OD}_{600\text{nm}}$ ) ήταν ίση με 0,8 για θρεπτικό υλικό LB/ $2 \times \text{YT}$  για overnight επαγωγή και 2,5 ή 3,0 για θρεπτικό υλικό TB και χρόνους επαγωγής 3 h και overnight αντίστοιχα. Η οπτική πυκνότητα της υγρής καλλιέργειας υποδηλώνει την φάση βακτηριακής ανάπτυξης η οποία, για τέτοια μεγέθη αντιστοιχεί περίπου στα  $2/3$  της εκθετικής. Το στάδιο της βακτηριακής ανάπτυξης επηρεάζει σημαντικά την απόδοση της πρωτεϊνικής έκφρασης αφού χαμηλή κυτταρική πυκνότητα συνεπάγεται μειωμένη παραγωγικότητα.



**Εικόνα 12** : Υγρές καλλιέργειες ανασυνδυασμένων στελεχών *E. coli*, διαφόρων θρεπτικών υλικών, πριν την επώαση.

Όταν η οπτική πυκνότητα έφτασε την επιθυμητή τιμή, η κωνική φιάλη απομακρύνθηκε από τον επωαστήρα και μεταφέρθηκε σε ειδικά ψυχόμενο χώρο (cold room) σε θερμοκρασία 4 °C, έως ότου το περιεχόμενο καταλήξει στην θερμοκρασία των 16 °C και σταματήσει η περαιτέρω κυτταρική ανάπτυξη ( $\approx 15-20$  min).

Στη συνέχεια προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα επαγωγέα IPTG στην υγρή καλλιέργεια για την έναρξη της πρωτεϊνικής παραγωγής και η κωνική φιάλη τοποθετήθηκε πίσω στον ανακινούμενο επωαστήρα σε θερμοκρασία 16 °C υπό συνεχή ανάδευση 180 rpm, overnight ( $\approx 17-20$  h).

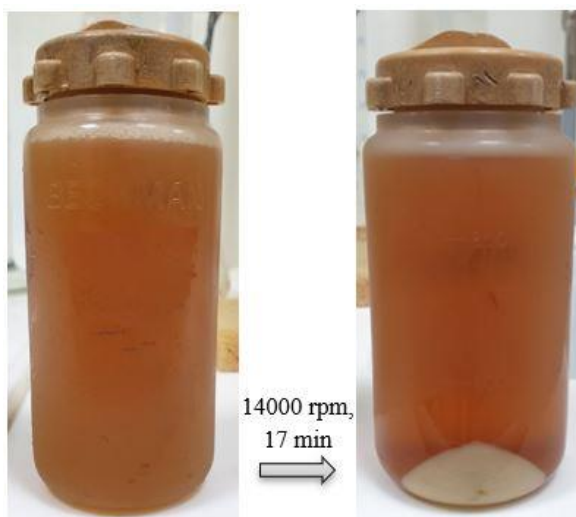
Η προαναφερθείσα πειραματική διαδικασία έλαβε χώρα στον ειδικά αποστειρωμένο χώρο εργασίας (απαγωγό), παρουσία φλόγας υπό τη χρήση αποστειρωμένου εξοπλισμού (121 °C, 20 min), ενώ ο χειρισμός των αντιβιοτικών έγινε σε κατάλληλη απόσταση από την φλόγα ώστε να προληφθεί πιθανή απενεργοποίηση τους λόγω ανάπτυξης υψηλής θερμοκρασίας. Οι συνεχείς υψηλοί ρυθμοί ανάδευσης (180 rpm) στα προαναλύσαντα στάδια συνέβαλαν στην διασφάλιση αερισμού (διαθεσιμότητα οξυγόνου) και θρεπτικών συστατικών για την κυτταρική ανάπτυξη και στην αποφυγή της βακτηριακής καθίζησης στον πυθμένα της φιάλης, η οποία θα είχε ως αποτέλεσμα την, με αργούς ρυθμούς, αναερόβια ανάπτυξη των βακτηρίων. Ο σωστός αερισμός και η οξυγόνωση των βακτηρίων επετεύχθη και με την κατάλληλη επιλογή του μεγέθους της κωνικής φιάλης συγκριτικά με τον όγκο της υγρής καλλιέργειας, με λόγο 4:1. Τέλος, η έκφραση των επιθυμητών πολυεστερασών έλαβε χώρα παράλληλα για πολλές κωνικές φιάλες, με διαφορετικά στελέχη *E. coli*, θρεπτικά υλικά και αντιβιοτικά, χρόνους επαγωγής, θερμοκρασίες κυτταρικής ανάπτυξης, συγκεντρώσεις επαγωγέα IPTG και ρυθμό ανάδευσης, με τους συνδυασμούς να παρουσιάζονται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 3.2.2) Βελτιστοποίηση ετερόλογης έκφρασης πολυεστερασών με μεταβολή παραμέτρων.

#### 2.2.2.4) Παραλαβή εσωκυτταρικά παραγόμενων πολυεστερασών

##### Παραλαβή άσπαστων κυττάρων και κυτταρικών θραυσμάτων

Η έκφραση των επιθυμητών πολυεστερασών λαμβάνει χώρα, πιθανώς, στο περίπλασμα των στελεχών *E. coli*, λόγω της χημικής σύνθεσης των γονιδίων έκφρασης τους, χωρίς την παρουσία του πεπτιδίου σήματος έκκρισης το οποίο εντοπίστηκε βιοπληροφορικά (2.1.2) Βιοπληροφορικά εργαλεία) καθώς και της αλληλουχίας *pelB* του πλασμιδιακού φορέα pET.

Για την παραλαβή των κυττάρων *E. coli*, από την υγρή καλλιέργεια, στο εσωτερικό των οποίων υπάρχει η παραγόμενη πρωτεΐνη ακολουθήθηκε η διαδικασία της φυγοκέντρησης. Συγκεκριμένα, η κωνική φιάλη απομακρύνθηκε από τον επωαστήρα και τοποθετήθηκε σε παγόλουτρο (προκειμένου να διατηρηθεί η χαμηλή θερμοκρασία του περιεχομένου και να απενεργοποιηθούν τα μεταβολικά μονοπάτια των κυττάρων τα οποία έπειτα από τις στρεσογόνες συνθήκες φυγοκέντρησης τείνουν να αποσυνθέσουν τη παραγόμενη πρωτεΐνη). Στη συνέχεια το περιεχόμενο της αποχύθηκε ισοβαρώς σε μπουκάλια των 250 mL της ψυχόμενης φυγοκέντρου Beckman Model TJ-6 Centrifuge, στην οποία ακολούθως τοποθετήθηκαν αντιδιαμετρικά. Η φυγοκέντρηση ορίστηκε στα 14000 rpm, σε θερμοκρασία 4 °C για 17 min.



**Εικόνα 13** : Καθίζηση κυττάρων, λόγω φυγοκέντρησης, που εμπεριέχουν εσωκυτταρικά εκφρασμένο το επιθυμητό ένζυμο.

##### Επαναιώρηση άσπαστων κυττάρων και κυτταρικών θραυσμάτων

Τα κύτταρα του στελέχους *E. coli* που εμπεριέχουν στον εσωκυτταρικό τους χώρο παραγμένο το επιθυμητό ένζυμο αφού καθίζαναν λόγω φυγοκέντρησης, παραλήφθηκαν και επαναιωρήθηκαν. Συγκεκριμένα με το πέρας της φυγοκέντρησης, τα μπουκάλια απομακρύνθηκαν και τοποθετήθηκαν σε παγόλουτρο, επιστώντας τη προσοχή κατά τη μετακίνησή τους προκειμένου να αποφευχθεί πιθανή επαναιώρηση τους. Στη συνέχεια ακολούθησε απόχυση του περιεχομένου με φορά αντίθετη της πλευράς που έχουν καθίζάνει τα κύτταρα ώστε να αποφευχθεί μερική απομάκρυνση τους. Στα εναπομείναντα, στον πυθμένα, κύτταρα και κυτταρικά θραύσματα προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος Talon 1× (μέσω αραιώσης ρυθμιστικού διαλύματος Talon 10× με απιονισμένο H<sub>2</sub>O, Πίνακας 10), ίση με 20, 30 και 40 mL για OD<sub>600nm</sub>=0,8, 2,5 και 3,0 αντίστοιχα, και με τη βοήθεια χειροκίνητης

ανάδευσης και σπαθίδας το κυτταρικό υλικό επαναιωρήθηκε. Το κυτταρικό διάλυμα συλλέχθηκε σε Falcon των 50 mL και αποθηκεύτηκε σε χαμηλή θερμοκρασία (3-4 °C).

### Μηχανική λύση κυτταρικών μεμβρανών

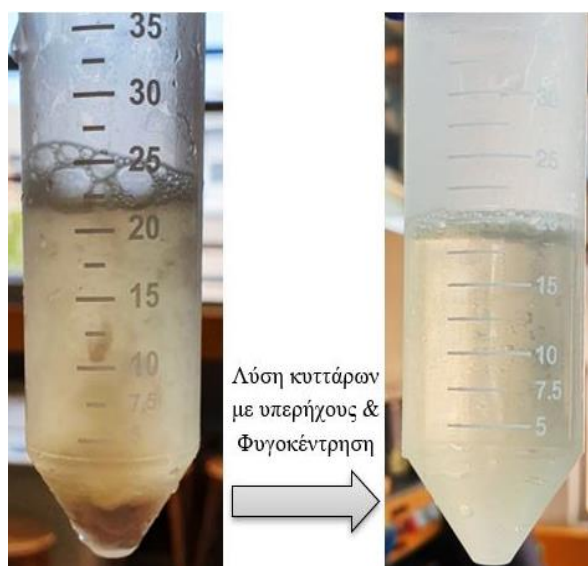
Εφόσον τα κύτταρα του *E. coli* απομονώθηκαν ακολούθησε μηχανική λύση αυτών με σκοπό την παραλαβή του εσωκυτταρικού υλικού στο οποίο βρισκόταν η επιθυμητή παραγόμενη πρωτεΐνη. Η μηχανική λύση διεξήχθη με επιβολή ηχητική ενέργειας (υπερηχητικής) στο επαναιωρημένο κυτταρικό διάλυμα μέσω της χρήσης συσκευής υπερήχων Vibra-Cell Processor VC 400. Η συσκευή παράγει υπερηχητικά κύματα τα οποία μέσω μετασχηματιστή μετατρέπονται σε μηχανικές ταλαντώσεις. Η ηχητική ενέργεια προκαλεί την δημιουργία φυσαλίδων στο κυτταρικό διάλυμα, φαινόμενο ονομαζόμενο ως «σπηλαίωση». Η ενέργεια που απελευθερώνεται λόγω της σπηλαίωσης οδηγεί σε ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης με αποτέλεσμα το εσωκυτταρικό περιεχόμενο να απελευθερώνεται στο διάλυμα επαναιώρησης. Ένα σημαντικό πρόβλημα της κυτταρικής διάσπασης με υπερήχους είναι η θερμική διασπορά λόγω της θερμικής ενέργειας που απελευθερώνεται με την λύση των κυττάρων. Η έντονη θερμότητα είναι πιθανό να προκαλέσει μετουσίωση των παραγόμενων πρωτεϊνών και απενεργοποίησή τους. Για τον λόγο αυτό η διαδικασία λαμβάνει χώρα με τη τοποθέτηση του κυτταρικού διαλύματος σε παγόλουτρο (4 °C) που αποτρέπει την αύξηση της θερμοκρασίας σε μη επιθυμητά επίπεδα.

Συνοπτικά, το κυτταρικό διάλυμα μεταφέρθηκε από το Falcon των 50 mL σε ποτήρι ζέσεως το οποίο τοποθετήθηκε σε μικρό παγόλουτρο, με τον πάγο να περιβάλλει πλήρως τα τοιχώματα του διατηρώντας το κυτταρικό διάλυμα σε χαμηλή θερμοκρασία. Το σύστημα στερεώθηκε στην ειδική βάση της συσκευής υπερήχων και το ύψος της ρυθμίστηκε έτσι ώστε το ρύγχος παραγωγής υπερήχων να καλύπτει περίπου τα 3/4 του κυτταρικού διαλύματος. Στη συνέχεια η συσκευή ενεργοποιήθηκε και έλαβαν χώρα 4 ή 5 κύκλοι λύσης για κυτταρικό διάλυμα με  $OD_{600nm}=0,8$  και 2,5-3,0 αντίστοιχα, συνολικής διάρκειας 1 min ο καθένας (παλμική συχνότητα 8 sec και παύση 5 sec, προκειμένου να περιοριστεί η θερμική διασπορά), με ένταση ίση με το 40% της μέγιστης. Ανάμεσα στους κύκλους λύσης ελέγχθηκε η θερμοκρασία των τοιχωμάτων του ποτηριού ζέσεως για πιθανή θέρμανση, εμπλουτίστηκε το παγόλουτρο και παρακολούθηθηκε η μορφή του κυτταρικού διαλύματος λύσης για πιθανό αφρισμό που υποδηλώνει καταστροφή των απελευθερωμένων πρωτεϊνών. Τέλος με το πέρας των κύκλων λύσης το κυτταρικό διάλυμα ελέγχθηκε ως προς τη διαύγεια του η οποία ήταν αρκετά αυξημένη συγκριτικά με αυτή πριν από την επεξεργασία του με υπερήχους, γεγονός που υποδήλωσε την μείωση της κυτταρικής πυκνότητας λόγω λύσης των κυττάρων και απελευθέρωσης του εσωκυτταρικού περιεχομένου τους που οδήγησε σε αραίωσή του. Τέλος το κυτταρικό διάλυμα λύσης συλλέχθηκε σε Falcon των 50 mL.

### 2.2.2.5) Απομόνωση παραγόμενων πολυεστερασών

Το κυτταρικό διάλυμα λύσης που παραλήφθηκε εμπεριείχε πέραν από την επιθυμητή πολυεστεράση, άλλες πρωτεΐνες του βακτηρίου, νουκλεϊκά οξέα, κυτταρικά υπολείμματα και άλλα. Η απομόνωση της παραγόμενης πολυεστεράσης πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια. Στο πρώτο, μέσω φυγοκέντρησης, απομακρύνθηκαν από το διάλυμα τα κυτταρικά υπολείμματα ενώ σε δεύτερη φάση η επιθυμητή πρωτεΐνη απομονώθηκε με τη χρήση χρωματογραφικής διαδικασίας διαχωρισμού.

Συγκεκριμένα, το κυτταρικό διάλυμα λύσης αποχύθηκε ισοβαρώς σε πλαστικά μπουκάλια της ψυχόμενης φυγοκέντρου Sigma 3K30 Centrifuge, B. Braun Biotech, στην οποία και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν αντιδιαμετρικά. Η φυγοκέντρηση πραγματοποιήθηκε σε δύο κύκλους, των 30 min και 20 min, με ορισμένη σχετική δύναμη της φυγοκέντρου (δύναμη που ασκείται από τη φυγόκεντρο στα δείγματα) ίση με 2000 RCF σε θερμοκρασία 5 °C. Ανάμεσα στους δύο κύκλους φυγοκέντρησης το υπερκείμενο υγρό συλλέχθηκε, τα κυτταρικά υπολείμματα απομακρύνθηκαν και η διαδικασία επαναλήφθηκε.



**Εικόνα 14**: Επαναιώρημα κύτταρα που εμπεριέχουν την επιθυμητή πρωτεΐνη στον εσωκυτταρικό χώρο (αριστερά) και το παραλαμβανόμενο εσωκυτταρικό υγρό, με την επιθυμητή πρωτεΐνη και άλλα μόρια, έπειτα από λύση των κυττάρων και φυγοκέντρηση (δεξιά).

Το παραλειπτό υπερκείμενο υγρό εμπεριείχε πλέον πέραν από την επιθυμητή πρωτεΐνη, άλλες βακτηριακές πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα και διαλυμένες ενώσεις από τις διεργασίες το κυττάρου. Η απομόνωση της πολυεστεράσης έλαβε χώρα με χρωματογραφική στήλη συγγένειας μέσω χρωματογραφίας αλληλεπίδρασης μετάλλου. Στη χρωματογραφία αλληλεπίδρασης μετάλλου (Immobilized Metal Affinity Chromatography/IMAC) ο διαχωρισμός των συστατικών του μείγματος βασίζεται σε ειδικές χημικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων της διαλυμένης ουσίας του μείγματος και προσδεμάτων της στατικής φάσης. Συγκεκριμένα στην περίπτωση της πρωτεϊνικής απομόνωσης, το μείγμα είναι το εσωκυτταρικό περιεχόμενο, η διαλυμένη ουσία η επιθυμητή πρωτεΐνη και η στατική φάση μια ρητίνη με προσδέματα. Κατά την απομόνωση των παραγόμενων πολυεστερασών έγινε χρήση στήλης βαρύτητας TalonR με ρητίνη Talon με ακινητοποιημένα ιόντα κοβαλτίου (TALON<sup>®</sup> Metal Affinity Resin, Column volume (CV)  $\approx$  5 mL), τα οποία λειτουργούν ως προσδέματα αλληλεπίδρασης με μόρια ιστιδίνης τα οποία βρίσκονται στην επιφάνεια των πολυεστερασών και λειτουργούν ως «ετικέτα συγγένειας» (“tag”). Η αλληλουχία του His-tag βρίσκεται

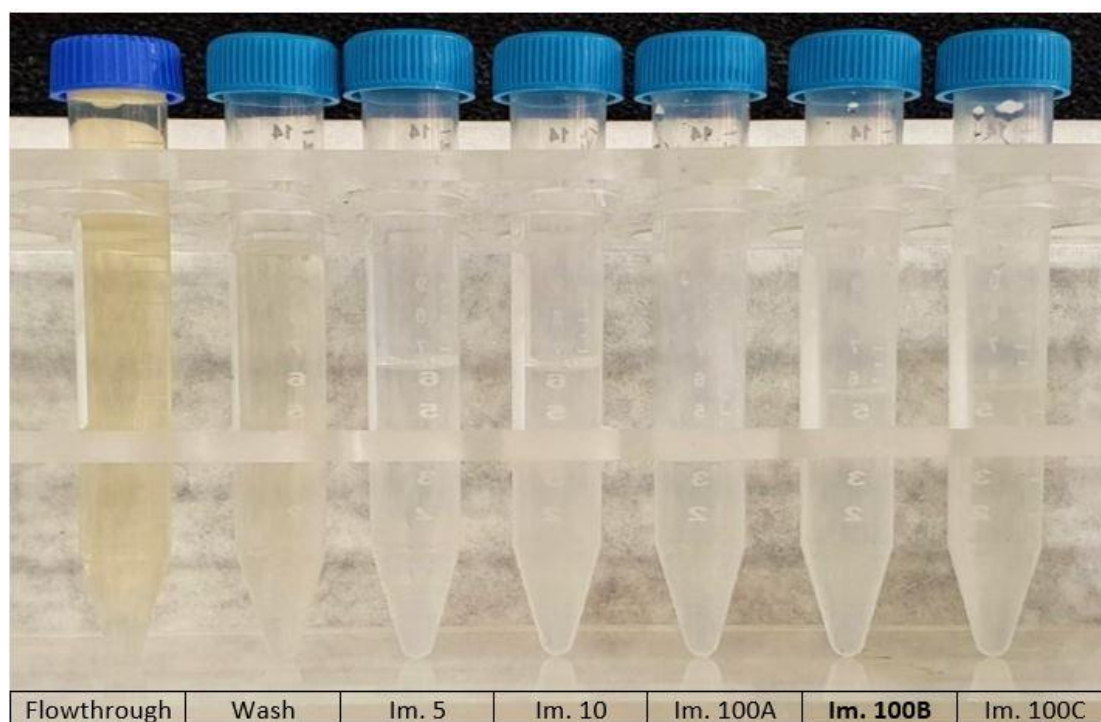
στον κατάλληλα επιλεγμένο φορέα έκφρασης. Με τον παραπάνω τρόπο οι πολυεστεράσες προσδένονται ομοιοπολικά με τη ρητίνη και δεσμεύονται σε αυτή. Η αποδέσμευση και παραλαβή των πρωτεϊνών από τη ρητίνη επιτυγχάνεται μέσω της έκπλυσής της με ρυθμιστικό διάλυμα υψηλής ιοντικής ισχύος το οποίο δρα ανταγωνιστικά ως προς την αλληλεπίδραση με τα προσδέματα. Συγκεκριμένα στην πειραματική διαδικασία που εκτελέστηκε χρησιμοποιήθηκε ως ρυθμιστικό διάλυμα ανταγωνισμού των ιστιδινών, διάλυμα μεταβλητών συγκεντρώσεων ιμιδαζολίου (Πίνακας 13). Τα μόρια του ιμιδαζολίου αλληλεπιδρούν εντονότερα με τα ιόντα κοβαλτίου της ρητίνης οδηγώντας σε αποδέσμευση των ομοιοπολικά προσδεμένων πρωτεϊνών και παραλαβή τους με τη κινητή φάση.

Συγκεκριμένα τα βήματα καθαρισμού που εκτελέστηκαν ήταν τα εξής :

- 1) Έκπλυση της στήλης από τον διαλύτη αποθήκευσης (20 % αιθανόλη) με απιονισμένο νερό, ποσότητας ίσης με έξι όγκους στήλης ( $6 \times CV = 6 \times 5 \text{ mL} = 30 \text{ mL dH}_2\text{O}$ ).
- 2) Εξισορρόπηση της στήλης στο ρυθμιστικό διάλυμα του κυτταρικού διαλύματος (Talon 1×), με ποσότητα Talon 1× ίση με εννιά όγκους στήλης ( $9 \times CV = 9 \times 5 \text{ mL} = 45 \text{ mL dH}_2\text{O}$ ).
- 3) Απόχυση του κυτταρικού διαλύματος στη στήλη και συλλογή του εκπλύματος (Flowthrough) σε Falcon των 50 mL. Στο στάδιο αυτό η επιθυμητή πολυεστεράση κατά την κίνηση της δια μέσου της ρητίνης δεσμεύτηκε λόγω ομοιοπολικής σύνδεσης των ιστιδινών της με τα ιόντα κοβαλτίου της στήλης. Επομένως στο έκπλυμα (Flowthrough) αναμενόταν μηδενική ποσότητα της πολυεστεράσης.
- 4) Έκπλυση της στήλης με ρυθμιστικό διάλυμα Talon 1× ποσότητας 10 mL και συλλογή του εκπλύματος (Wash), σε Falcon των 15 mL. Στο στάδιο αυτό το ρυθμιστικό διάλυμα, ως κινητή φάση, παρέσυρε μαζί του οποιαδήποτε πρωτεΐνη, πλην της επιθυμητής πολυεστεράσης (πρωτεΐνη, νουκλεϊκά οξέα και άλλα), δεν είχε δεσμευτεί στην ρητίνη.
- 5) Έκπλυση της στήλης με ρυθμιστικό διάλυμα Talon 1×-Ιμιδαζολίου, συγκέντρωσης 0,005 M, ποσότητας 7 mL, και συλλογή του εκπλύματος (Im. 5) σε Falcon των 15 mL. Στο στάδιο αυτό το ρυθμιστικό διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης ιμιδαζολίου δρα ως ανταγωνιστής μορίων ή πρωτεϊνών που πιθανώς να έχουν συνδεθεί ασθενώς ομοιοπολικά με την στήλη.
- 6) Έκπλυση της στήλης με ρυθμιστικό διάλυμα Talon 1×-Ιμιδαζολίου, συγκέντρωσης 0,010 M, ποσότητας 7 mL, και συλλογή του εκπλύματος (Im. 10) σε Falcon των 15 mL. Στο στάδιο αυτό το ρυθμιστικό διάλυμα υψηλότερης συγκέντρωσης ιμιδαζολίου δρα ως ανταγωνιστής μορίων ή πρωτεϊνών που πιθανώς να έχουν συνδεθεί μερικώς ομοιοπολικά με την στήλη.
- 7) Έκπλυση της στήλης με ρυθμιστικό διάλυμα Talon 1×-Ιμιδαζολίου, συγκέντρωσης 0,1 M, ποσότητας 4 mL, και συλλογή του εκπλύματος (Im. 100A) σε Falcon των 15 mL. Στο στάδιο αυτό το ρυθμιστικό διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης ιμιδαζολίου δρα ως ανταγωνιστής της πολυεστεράσης για αλληλεπίδραση με τα ιόντα κοβαλτίου της στήλης, οδηγώντας σε αποδέσμευση της από αυτή.

- 8) Έκπλυση της στήλης με ρυθμιστικό διάλυμα Talon 1×-Ιμιδαζολίου, συγκέντρωσης 0,1 M, ποσότητας 6 mL, και συλλογή του εκπλύματος (Im. 100B) σε Falcon των 15 mL. Στο στάδιο αυτό το ρυθμιστικό διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης ιμιδαζολίου παρασύρει μαζί του (ως κινητή φάση) την αποδεσμευμένη, από τη στήλη, πολυεστεράση ενώ παράλληλα δρα ως ανταγωνιστής πιθανών ποσοτήτων της που δεν κατάφεραν να αποδεσμευτούν στο «Βήμα 7».
- 9) Έκπλυση της στήλης με ρυθμιστικό διάλυμα Talon 1×-Ιμιδαζολίου, συγκέντρωσης 0,1 M, ποσότητας 6 mL, και συλλογή του εκπλύματος (Im. 100C) σε Falcon των 15 mL. Στο στάδιο αυτό το ρυθμιστικό διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης ιμιδαζολίου παρασύρει την επιπλέον αποδεσμευμένη πολυεστεράση.
- 10) Έκπλυση της στήλης από τις δεσμευμένες ποσότητες ιμιδαζολίου με απιονισμένο νερό, ποσότητας ίσης με τρεις όγκους κενής στήλης ( $\approx 3 \times 15 \text{ mL} = 45 \text{ mL dH}_2\text{O}$ ).
- 11) Έκπλυση της στήλης με 5 mL διαλύματος αιθανόλης 20% και αποθήκευσή της σε  $\approx 10 \text{ mL}$  του ίδιου διαλύματος.

Τα παραπάνω βήματα εκτελέστηκαν με μεγάλη προσοχή, χρησιμοποιώντας αυτοματοποιημένες πιπέτες μεταβλητού όγκου και αποχύνοντας τα διαλύματα σταδιακά με κυκλικές κινήσεις προκειμένου να μην δημιουργηθεί κοιλότητα στο κέντρο της ρητίνης, γεγονός που θα μείωνε την απόδοση της απομόνωσης, αφού δεν θα διαπερνούσαν τα διαλύματα δια μέσου όλου του όγκου της. Επιπλέον όλα τα κλάσματα απομόνωσης κάθε βήματος αποθηκεύονταν σε παγόλουτρο ( $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ), προκειμένου να μην μετουσιωθεί η πολυεστεράση που πιθανώς εμπεριεχόταν σε καθένα από αυτά.



**Εικόνα 15** : Τα παραλαμβανόμενα κλάσματα της διαδικασίας καθαρισμού του εσωκυτταρικού υγρού, προς απομόνωση της επιθυμητής πρωτεΐνης, μέσω χρωματογραφίας IMAC. Η επιθυμητή πρωτεΐνη παραλαμβάνεται τελικώς στο ενζυμικό διάλυμα “Im. 100B”.



#### 2.2.2.6) Μέτρηση πρωτεϊνικής συγκέντρωσης

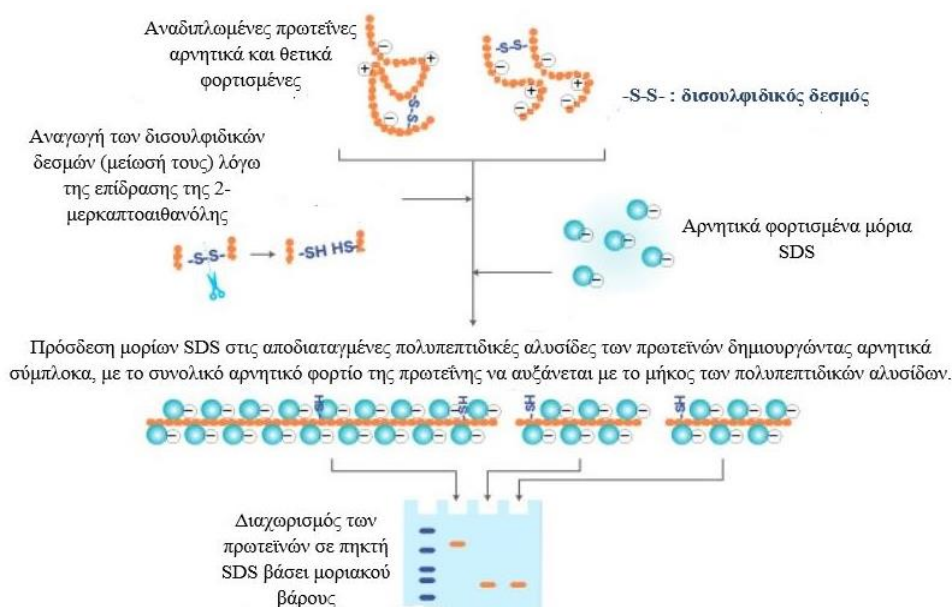
Η επιτυχία της απομόνωσης της επιθυμητής πρωτεΐνης, στα κλάσματα καθαρισμού IMAC, προσδιορίστηκε με φωτομέτρηση δείγματος, από κάθε κλάσμα απομόνωσης, στα 280 nm (υπεριώδης ακτινοβολία UV). Σε τέτοιο μήκος κύματος απορροφούν κυρίως αμινοξέα των πρωτεϊνών με αρωματικούς δακτυλίους, όπως είναι η τυροσίνη και η τρυπτοφάνη, χαρακτηριστικά σε πληθώρα παραγόμενων ενζύμων. Η απορρόφηση στα 280 nm είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του ενζύμου. Συγκεκριμένα, ποσότητα ίση με 250  $\mu\text{L}$  από κάθε δείγμα, τοποθετήθηκαν με τη βοήθεια αυτοματοποιημένης πιπέτας μεταβλητού όγκου σε κελιά του UV-microplate, με ίδιες ποσότητες των αντίστοιχων τυφλών δειγμάτων (το διάλυμα έκλουσης για κάθε βήμα) και μεταφέρθηκαν στην συσκευή φωτομέτρησης Microplate Reader, Spectra Max 250. Υψηλότερη απορρόφηση στο κλάσμα “Im. 100B” υποδήλωσε την απομόνωση της επιθυμητής πολυεστεράσης.

#### 2.2.2.7) Ηλεκτροφόρηση παραγόμενων πολυεστερασών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες

Η απομόνωση της επιθυμητής πολυεστεράσης επιβεβαιώθηκε μέσω ηλεκτροφόρησης ποσότητας του ενζυμικού διαλύματος σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες, γνωρίζοντας το μοριακό βάρος του ενζύμου, βιοπληροφορικά.

Συγκεκριμένα η ηλεκτροφόρηση ενζυμικού διαλύματος σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες οδηγεί στον διαχωρισμό των πρωτεϊνών βάσει του μοριακού τους βάρους. Η μέθοδος βασίζεται κυρίως σε δύο αντιδραστήρια, την 2-μερκαπτοαιθανόλη και το δωδεκυλοθειικό νατρίο (SDS). Οι πρωτεΐνες στην τριτοταγή τους δομή βρίσκονται αναδιπλωμένες, με τη βοήθεια δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των αμινοξέων τους (κυρίως των κυστεϊνών), και είναι θετικά και αρνητικά φορτισμένες. Η επίδραση του αντιδραστηρίου 2-μερκαπτοαιθανόλη, οδηγεί στην αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών (αποδιατακτικές συνθήκες) που συγκρατούν την τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα αυτές να αποδιατάσσονται στο χώρο. Το αντιδραστήριο SDS, που αποτελείται από ισχυρά αρνητικά φορτισμένα μόρια, χαρακτηρίζεται ως απορρυπαντικό, διότι η δομή του βασίζεται σε μια πολική-υδρόφιλη ομάδα και μια μη πολική-υδρόφοβη ομάδα. Τα αρνητικά φορτισμένα μόρια του SDS συνδέονται μη ομοιοπολικά με τις πεπτιδικές αλυσίδες των πρωτεϊνών, δημιουργώντας αρνητικά φορτισμένα σύμπλοκα, με αποτέλεσμα το φορτίο της αρχικής φυσικής δομής να θεωρείται αμελητέο συγκριτικά με αυτό των μορίων του SDS. Στην ηλεκτροφόρηση που ακολουθήθηκε η 2-μερκαπτοαιθανόλη βρίσκεται σε διάλυμα προκατεργασίας του δείγματος ενώ το SDS, στο ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (Πίνακας 14) και στην πηκτή, στην οποία τοποθετούνται τα δείγματα. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται με την επιβολή δυναμικού στον χώρο που τοποθετούνται τα δείγματα, με αποτέλεσμα οι αρνητικά πλέον αποδιαταγμένες πρωτεΐνες να κατευθύνονται από την άνοδο,

αρνητικού φορτίου (περιοχή φόρτωσης των δειγμάτων), προς την κάθοδο, θετικού φορτίου. Η ταχύτητα κίνησής τους είναι ανάλογη μόνο του μεγέθους τους (μοριακού βάρους τους). Το σχήμα και το αρχικό φορτίο των πρωτεϊνών δεν διαδραματίζει, πλέον, κάποιον ρόλο, αφού μέσω της προκατεργασίας έχουν όλες αποδιαταχτεί και φορτιστεί αρνητικά. Οι πρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους κινούνται πιο αργά βρίσκοντας αντίσταση στους πόρους της πηκτής πολυακρυλαμιδίου, σε αντίθεση με τις πρωτεΐνες μικρότερου μοριακού βάρους που κινούνται δια μέσου αυτών. Έτσι επιτυγχάνεται ο επιθυμητός διαχωρισμός βάσει μεγέθους.

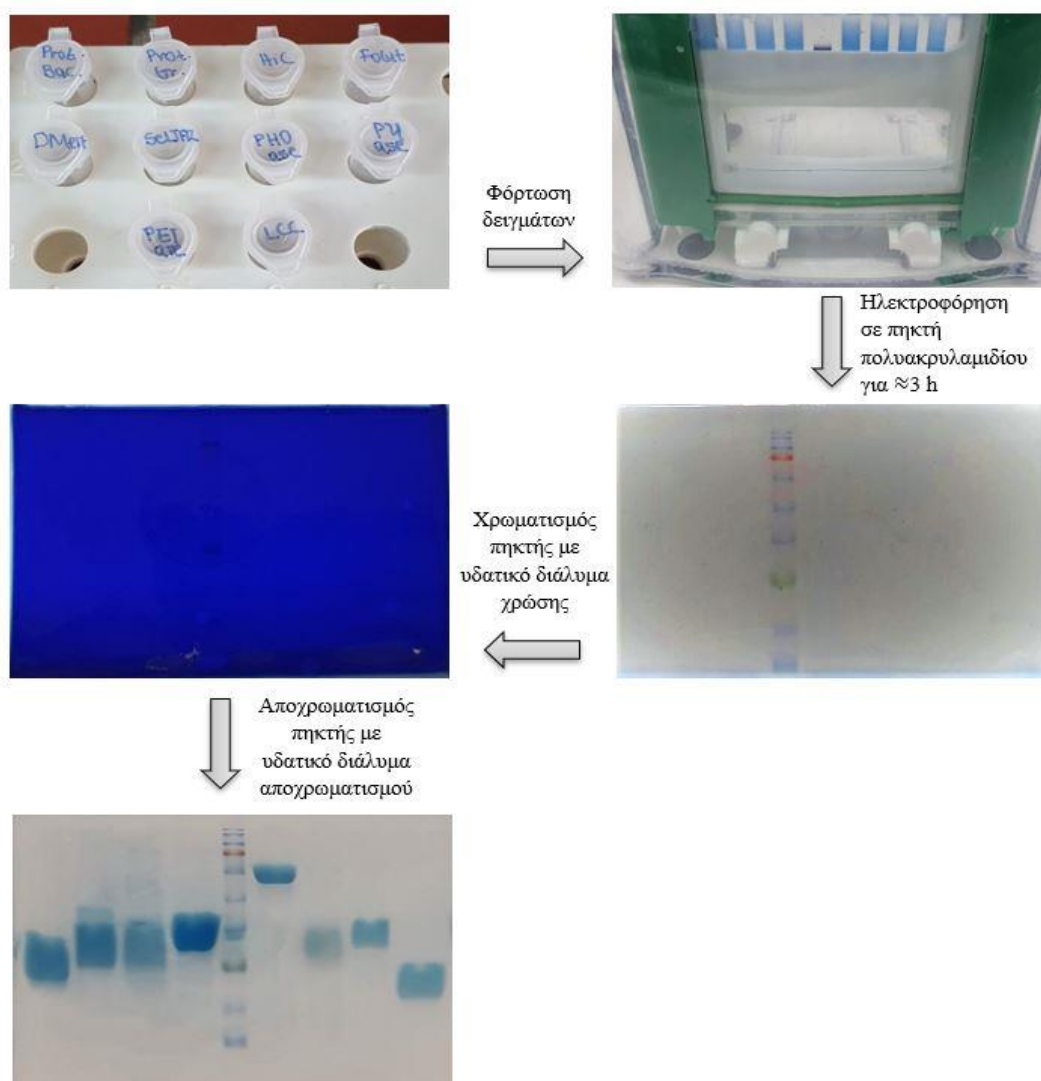


**Εικόνα 16** : Επίδραση της 2-μερκαπτοαιθανόλης και του SDS στην αποδιάταξη της πρωτεΐνης και την αρνητική φόρτίσή της βάσει του μοριακού της βάρους [195].

Η πειραματική διαδικασία της ηλεκτροφόρησης ξεκίνησε με την προετοιμασία της πηκτής. Ένα ζεύγος ορθογώνιων γυαλιών τοποθετήθηκε σε ειδική συσκευή η οποία τα σταθεροποιούσε κατάλληλα δημιουργώντας μεταξύ τους κενό πάχους 1,5 mm, στη βάση της οποίας είχε τοποθετηθεί ένα ορθογώνιο κομμάτι σπογγώδους υλικού. Στον οριοθετημένο χώρο με τη βοήθεια αυτοματοποιημένης πιπέτας μεταβλητού όγκου προστέθηκε απιονισμένο νερό και το σύστημα αφήθηκε για μικρό χρονικό διάστημα ( $\approx 5$  min) προκειμένου να ελεγχθεί η στεγανοποίηση του συστήματος των δύο γυαλιών, μέσω της πιθανής διαρροής νερού η οποία πραγματοποιήθηκε με οπτική παρατήρηση της απορρόφησης του σπογγώδους υλικού. Εφόσον το σύστημα των γυλιών ήταν στεγανό, το νερό αποχύθηκε και στον οριοθετημένο χώρο προστέθηκε διάλυμα το οποίο αποτελούνταν από απιονισμένο νερό ( $\text{dH}_2\text{O}$ ), 0,75 M Tris/SDS 0,2% ( $\text{pH}=8,8$ ), 40% δις-ακρυλαμίδιο, τετραμέθυλαιθυλοδιαμίνη (TEMED) και 10% υπερθεϊκό αμμώνιο (SDS) (φρέσκο), σε ποσότητες 1,75 mL, 4,7 mL, 2,9 mL, 15  $\mu\text{L}$  και 90  $\mu\text{L}$  αντίστοιχα, μέχρι τη κάλυψη των 3/4 του χώρου. Το υπόλοιπο 1/4 του χώρου καλύφθηκε με απιονισμένο νερό με σκοπό την κατάστροφη πιθανών δημιουργούμενων φυσαλίδων και την ευθυγράμμιση του διαλύματος στον χώρο. Το διάλυμα αφήθηκε προς πήξη (TEMED, SDS πηκτικοί παράγοντες) για 20-25 min σχηματίζοντας το πήκτωμα διαχωρισμού (Resolving Gel). Στη συνέχεια το νερό αποχύθηκε και στο 1/4

του χώρου πλέον προστέθηκε διάλυμα το οποίο αποτελούνταν από απιονισμένο νερό (dH<sub>2</sub>O), 0,25 M Tris/SDS 0,2% (pH=6,8), 40% δις-ακρυλαμίδιο, TEMED και 10% SDS (φρέσκο), σε ποσότητες 1,5 mL, 1,9 mL, 0,38 mL, 10 μL και 30 μL αντίστοιχα. Στη συνέχεια στην επιφάνεια του διαλύματος και στον οριοθετημένο χώρο εισήχθη ειδική συσκευή (χτενάκι) το οποίο φέρει κατάλληλες διαμορφώσεις προς σχηματισμό κενών θέσεων («πηγάδια φόρτωσης») έπειτα από πήξη του διαλύματος. Ομοίως το διάλυμα αφέθηκε προς πήξη (≈20-25 min) λόγω των ιδίων πηκτικών παραγόντων προς σχηματισμό του πηκτώματος επιστόιβασης (Stacking Gel). Τελικά το «χτενάκι» αφαιρέθηκε με κατακόρυφες προσεκτικές κινήσεις προς τα άνω. Έτσι σχηματίστηκε η πηκτή πολυακρυλαμιδίου η οποία αποτελούνταν από το πηκτώμα επιστόιβασης που έφερε θέσεις φόρτωσης των δειγμάτων πρωτεΐνης, και το οποίο έδωσε χώρο για να ευθυγραμμιστούν τα δείγματα της πρωτεΐνης και να υπάρξει μια κοινή αφετηρία ηλεκτροφόρησης, και από το πηκτώμα διαχωρισμού δια μέσου του οποίου «κινήθηκαν» τα δείγματα. Στην συνέχεια το ζεύγος γυαλιών με τη πηκτή στον οριοθετημένο χώρο αφαιρέθηκαν από τη ειδική συσκευή σταθεροποίησης και τοποθετήθηκαν σε άλλη παρόμοια οι οποία πέραν από τη σταθεροποίηση των γυαλιών και της πηκτής έφερε και ειδικό σύρμα για την επιβολή δυναμικού. Η συσκευή με τη σειρά της τοποθετήθηκε σε ειδικό κελί το οποίο πληρώθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης ή ηλεκτροδίων SDS (Πίνακας 14) μέχρι την ένδειξη “1 gel”. Στα «πηγάδια φόρτωσης» τοποθετήθηκε ήδη προκατεργασμένο δείγμα του διαλύματος της πολυεστεράσης, συνολικού όγκου 50 μL. Αυτό αποτελούνταν από ποσότητα διαλύματος πολυεστεράσης συγκέντρωσης 15 mgΠΡΩΤΕΪΝΗΣ σε τελικό όγκο 50 μL από τα οποία τα 10 μL ήταν ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (Πίνακας 14) (εμπεριέχει την 2-μερκαπτοαιθανόλη η οποία όπως προαναφέρθηκε συμβάλλει στην αποδιάταξη της πρωτεΐνης που είναι απαραίτητη ώστε να αλληλεπιδράσουν οι πεπτιδικές αλυσίδες με τα μόρια SDS), και είχε θερμανθεί σε υδατόλουτρο με dH<sub>2</sub>O που βρισκόταν σε βρασμό, για 5 min (η υψηλή θερμοκρασία βοήθησε επίσης την αποδιάταξη της πρωτεΐνης). Πέραν από το δείγμα σε ένα «πηγάδι φόρτωσης» προστέθηκαν 5 μL προχρωματισμένου πρότυπου διαλύματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (BlueStar Prestained Protein Marker, NIPPON Genetics EUROPE GmbH). Το σύστημα στη συνέχεια έκλεισε με την τοποθέτηση ειδικού καπακιού και συνδέθηκαν τα ηλεκτρόδια στη συσκευή. Το δυναμικό που επιβλήθηκε ήταν 50 V για 20 min προκειμένου να ευθυγραμμιστούν τα δείγματα και στη συνέχεια αυξήθηκε στα 100 V έως ότου τα δείγματα φτάσουν στη βάση της πηκτής (≈2,5-3 h). Έπειτα η συσκευή αποσυναρμολογήθηκε, το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης ή ηλεκτροδίων απορρίφθηκε και αποθηκεύτηκε για επαναχρησιμοποίηση και η πηκτή αφαιρέθηκε με προσοχή από την συσκευή σταθεροποίησης και εμβαπτίστηκε σε περιέκτη με υδατικό διάλυμα χρώσης (Πίνακας 14), για περίπου 1 h υπό ήπια ανάδευση στη συσκευή Orbit LS. Κατά τη διάρκεια της 1 h η βαφή Coomassie που εμπεριείχε το διάλυμα χρώσης συνδέθηκε με τις πρωτεΐνες, που βρίσκονταν διαχωρισμένες στην πηκτή ανάλογα με το μοριακό τους βάρος, με αλληλεπιδράσεις Van der Waals μεταξύ των ομάδων σουλφονικού οξέος της βαφής και των θετικών πρωτεϊνικών αμινομάδων. Το υδατικό διάλυμα χρώσης συλλέχθηκε και αποθηκεύτηκε για περαιτέρω χρήση ενώ στον περιέκτη με τη πηκτή προστέθηκε υδατικό διάλυμα αποχρωματισμού (Πίνακας 14),

έως πλήρους εμβάπτισης του, και αφέθηκε overnight ( $\approx 17-20$  h) υπό ήπια ανάδευση στη συσκευή Orbit LS. Το υδατικό διάλυμα αποχρωματισμού απομάκρυνε το διάλυμα χρώσης από τη πηκτή, πέραν των σημείων όπου βρίσκονταν οι αποδιαταγμένες πρωτεΐνες διαχωρισμένες βάσει μοριακού βάρους, αφού εκεί το διάλυμα χρώσης ήταν ομοιοπολικά συνδεδεμένο. Τελικά παραλήφθηκε η πηκτή πολυακρυλαμίδιου με μπλε διακριτές πρωτεϊνικές ζώνες, οι οποίες συγκρίθηκαν με τις αντίστοιχες του προχρωματισμένου πρότυπου διαλύματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους, προς επιβεβαίωση της απομονωμένης πολυεστεράσης βάσει του γνωστού μεγέθους της.



**Εικόνα 17** : Αναπαράσταση των σταδίων της διαδικασίας ηλεκτροφόρησης δειγμάτων των παραγόμενων πολυεστερασών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες.

#### 2.2.2.8) Συμπύκνωση παραγόμενων πολυεστερασών

Η πολυεστεράση που απομονώθηκε στα κλάσματα της IMAC ήταν ορισμένης συγκέντρωσης. Προκειμένου να πραγματοποιηθούν τα επιθυμητά πειράματα με προκαθορισμένες συγκεντρώσεις του ενζύμου έλαβε χώρα συμπύκνωση του ενζυμικού

διαλύματος. Η διαδικασία της συμπύκνωσης βασίστηκε στην χρήση μεμβρανών Ultracel® 10 kDa Ultrafiltration Discs, οι οποίες επιτρέπουν την διέλευση μακρομορίων μοριακού βάρους μικρότερου των 10 kDa. Συγκεκριμένα επιθυμητή ποσότητα του ενζυμικού διαλύματος αποχύθηκε στο κελί της συσκευής υπερδιήθησης Stirred Cell Model 8400 των 50 mL, στο οποίο με τη βοήθεια παροχής αδρανούς αερίου (40-50 Psi) που ασκούσε κατακόρυφη δύναμη στην επιφάνεια του διαλύματος, η οποία υπερνικούσε την ωσμωτική πίεση που αναπτυσσόταν, με αποτέλεσμα το ενζυμικό διάλυμα να εξαναγκαστεί να διέλθει από την μεμβράνη, η οποία συγκρατούσε την πολυεστεράση λόγω του μοριακού βάρους της, όντας μεγαλύτερο των 10 kDa. Η διαδικασία ολοκληρώθηκε για όγκο συμπυκνωμένου ενζυμικού διαλύματος παρακράτησης ίσο με περίπου 5 mL (ελάχιστος όγκος διαλύματος παρακράτησης για πρόληψη τραυματισμού της μεμβράνης), ενώ το κλάσμα που διήλθε από την μεμβράνη συλλέχθηκε αρχικά σε ογκομετρικό κύλινδρο (για μέτρηση του επακριβούς όγκου του) και στη συνέχεια μεταφέρθηκε σε Falcon των 15 ή 50 mL.

Πριν την απόχυση του ενζυμικού διαλύματος προηγήθηκε διέλευση ποσότητας 50 mL καυστικού νατρίου (NaOH) συγκέντρωσης 0,1 M, και στη συνέχεια διέλευση διπλάσιας ποσότητας (100 mL) απιονισμένου νερού. Καθ' όλη τη διάρκεια της συμπύκνωσης η συσκευή και ο ογκομετρικός κύλινδρος συλλογής του υπερδιηθήματος βρισκόταν σε παγόλουτρο (αποφυγή μετουσίωσης της πολυεστεράσης) ενώ ανά τακτά χρονικά διαστήματα η συσκευή ανακινούνταν χειροκίνητα με στόχο την επαναιώρηση των πρωτεϊνικών μακρομορίων του συμπυκνώματος που πιθανόν να παρεμπόδιζαν τους πόρους της μεμβράνης. Τέλος ποσότητα ίση με 250  $\mu$ L, τόσο του συμπυκνώματος όσο και του υπερδιηθήματος, φωτομετρήθηκαν στα 280 nm (διαδικασία ίδια με αυτή που προαναφέρθηκε στο 2.2.2.5) Απομόνωση παραγόμενων πολυεστερασών), για ποιοτική κρίση της απόδοσης της συμπύκνωσης. Μικρή απορρόφηση του υπερδιηθήματος (κοντινή του τυφλού δείγματος) και αντίστοιχη μεγάλη του συμπυκνώματος (μεγαλύτερη του αρχικού ενζυμικού διαλύματος) υποδήλωσαν επιτυχία της διεργασίας.

Κατά τη διάρκεια εκπόνησης της πειραματικής διαδικασίας που αναλύεται έλαβε χώρα και συμπύκνωση του ενζυμικού διαλύματος σε τελικό όγκο μικρότερο των 5 mL (ελάχιστος όγκος συμπυκνώματος που επιτρέπει η συσκευή υπερδιήθησης Stirred Cell Model 8400), με τη χρήση ειδικών στηλών-φίλτρων φυγοκέντρωσης Amicon® Ultra – 0,5 mL, Centrifugal Filters, Ultracel®- 10 K, Regenerated Cellulose, για τη χρήση του σε διαδικασίες όπως η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου που αναλύθηκε προηγουμένως. Και σε αυτή τη περίπτωση η συμπύκνωση επιτευχθεί με φίλτρα στο εσωτερικό στηλών που συγκρατούν μακρομόρια με μοριακό βάρος μεγαλύτερο των 10 kDa. Έτσι ποσότητα του ενζυμικού διαλύματος ίση με 500  $\mu$ L (μέγιστος όγκος χωρητικότητας της στήλης) εισήχθη στη στήλη, η οποία με τη σειρά της τοποθετήθηκε σε Eppendorf των 2,0 mL. Το σύστημα τοποθετήθηκε στη ψυχόμενη φυγόκεντρο High Speed Refrigerated Centrifuge 4239R, στα 10000 rpm και θερμοκρασία 4 °C. Κατά τη φυγοκέντρωση οι δυνάμεις που αναπτύχθηκαν ανάγκασαν το ενζυμικό διάλυμα να διέλθει από τις μεμβράνες, ώστε να διατηρηθεί στο συμπύκνωμα η επιθυμητή

πολυεστεράση, ενώ το υπερδιήθημα συγκεντρώθηκε στο Eppendorf. Ο κύκλος της φυγοκέντρησης ολοκληρώθηκε όταν η ποσότητα του συμπυκνώματος έφτασε τα 50-100  $\mu\text{L}$  ( $\approx 7-10$  min), όπου και το σύστημα στήλης-Eppendorf απομακρύνθηκε, το υπερδιήθημα αποχύθηκε, και στη συνέχεια προστέθηκε ξανά στην στήλη ποσότητα ενζυμικού διαλύματος 400-450  $\mu\text{L}$  (έως την μέγιστη χωρητικότητα των 500  $\mu\text{L}$ ). Η διαδικασία των κύκλων φυγοκέντρησης επαναλήφθηκε επακριβώς με τα ίδια βήματα έως ότου όλη η επιθυμητή ποσότητα του ενζυμικού διαλύματος συμπυκνώθηκε σε όγκο 50-100  $\mu\text{L}$ . Το συμπύκνωμα απομακρύνθηκε από τη στήλη (δίχως να ακουμπήσει το ρύγχος τις μεμβράνες για πρόληψη του τραυματισμού τους) και μεταφέρθηκε σε Eppendorf των 1,5 mL για αποθήκευση σε χαμηλή θερμοκρασία.

#### 2.2.2.9) Εξισορρόπηση παραγόμενων πολυεστερασών

Το τελικό συμπυκνωμένο ενζυμικό διάλυμα εμπεριείχε την επιθυμητή πολυεστεράση σε ρυθμιστικό διάλυμα Talon 1 $\times$ , διότι το ρυθμιστικό αυτό διάλυμα συνέβαλε στην εύκολη απομόνωση της πολυεστεράσης σε κατάλληλη στήλη. Παρ' όλα αυτά για την τελική αποθήκευση του ενζύμου, με σκοπό την χρήση του στην πειραματική διαδικασία, έλαβε χώρα αλλαγή του ρυθμιστικού διαλύματος στο οποίο βρισκόταν διαλυμένο. Η αλλαγή του ρυθμιστικού διαλύματος αποθήκευσης συνέβαλε στην σταθεροποίηση του ενζύμου κατά τη χρόνια αποθήκευση του, και επετεύχθη με την διαδικασία της διαπίδυσης (dialysis). Η διαπίδυση είναι μια μέθοδος διαχωρισμού με μεμβράνες οι οποίες επιτρέπουν τη διέλευση επιλεκτικών μορίων βάσει μοριακού βάρους αποκοπής (cutoff MWCO). Η μετακίνηση των μορίων δια μέσου της μεμβράνης βασίζεται στο φαινόμενο της ώσμωσης μέχρι την αποκατάσταση ισορροπίας ανάμεσα στο πρώην και νέο ρυθμιστικό διάλυμα του ενζυμικού διαλύματος.

Συγκεκριμένα, ημιπερατή μεμβράνη Dialysis tubing cellulose membrane w. 25mm, μεγέθους το οποίο επιλέχθηκε μέσω εμπειρικών μεθόδων (περίπου 2 mL ενζυμικού διαλύματος πληρώνουν 1 cm της ημιπερατής μεμβράνης), τοποθετήθηκε σε ποτήρι ζέσεως στο οποίο εμπεριεχόταν υπερκάθαρο νερό (Milli-Q H<sub>2</sub>O). Με τη βοήθεια σπαθίδας η μεμβράνη αναδεύτηκε με το Milli-Q H<sub>2</sub>O, με προσεκτικές κινήσεις για πρόληψη τραυματισμού της, με στόχο την έκπλυση της από το εργοστασιακό υλικό συντήρησης, το οποίο φέρει υψηλή επικινδυνότητα για το εργαστηριακό προσωπικό κατά τη χρήση. Το Milli-Q H<sub>2</sub>O αποχύθηκε, το ποτήρι ζέσεως με την ημιπερατή μεμβράνη επαναπληρώθηκε και η διαδικασία επαναλήφθηκε 3-4 φορές έως ότου το νερό ήταν πλήρως διαυγές. Στη συνέχεια η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε ποτήρι ζέσεως που εμπεριείχε Milli-Q H<sub>2</sub>O, που προηγουμένως είχε βράσει, για 30 min, με σκοπό την ενυδάτωσή της. Έπειτα από το πέρας της ενυδάτωσης, η μεμβράνη απομακρύνθηκε από το ποτήρι ζέσεως, το κάτω άκρο της σφραγίστηκε με την χρήση πλαστικού σφιγκτήρα, ενώ στην άνω άκρη χειροκίνητα δημιουργήθηκε οριοθετημένο άνοιγμα μέσα στο οποίο αποχύθηκε το ενζυμικό διάλυμα. Ακολούθησε ασφάλιση και του άνω άκρου με πλαστικό σφιγκτήρα και τοποθέτηση της πληρωμένης μεμβράνης σε πλαστικό περιέκτη που εμπεριείχε το επιθυμητό ρυθμιστικό διάλυμα αποθήκευσης

(Talon 0,5× ή Talon 0,5×-20 mM ιμιδαζολίου, pH=7,4, σε αναλογία  $V_{\text{ΕΝΖΥΜΙΚΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ}} : V_{\text{ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ}} = 1 : 100$ ). Το σύστημα μεταφέρθηκε στον ειδικά ψυχόμενο χώρο (cold room, 7 °C), overnight ( $\approx 17-20$  h). Τέλος, με το πέρας της διεργασίας αλλαγής του ρυθμιστικού διαλύματος αποθήκευσης με τη μέθοδο διαπίδησης, η μεμβράνη αποσφραγίστηκε, το ενζυμικό διάλυμα αποχύθηκε σε Falcon των 15 mL, φυγοκεντρήθηκε σε ήπιες συνθήκες (προς πρόληψη της μετουσίωσής της) στην ψυχόμενη φυγόκεντρο ROTANTA 460R, στα 4000 rpm για 3 min σε θερμοκρασία 4 °C (με το βήμα αυτό πραγματοποιήθηκε έλεγχος της μετουσίωσης της πολυεστεράσης λόγω της μεταβολής της αλατότητας του ρυθμιστικού διαλύματος της, ο μικρός αριθμός στροφών ανά λεπτό συμβάλλει στη πρόληψη μετουσίωσης του ενζύμου λόγω μηχανικής καταπόνησης) και ποσότητα ίση με 250  $\mu\text{L}$  φωτομετρήθηκε στα 280 nm (2.2.2.5) Απομόνωση παραγόμενων πολυεστερασών) για προσδιορισμό της απώλειας ενζύμου κατά τη διεργασία.

Μέσω των βημάτων που αναλύθηκαν καθ' όλη την έκταση των υποκεφαλαίων 2.2.2) Παραγωγή πολυεστερασών - 2.2.2.9) Εξισορρόπηση παραγόμενων πολυεστερασών και την επακολούθησή τους για 10 διαφορετικά ένζυμα, πραγματοποιήθηκε η παραγωγή των επιθυμητών πολυεστερασών σε συμπυκνωμένα ενζυμικά διαλύματα, προς χαρακτηρισμό και έλεγχο της δράσης τους σε υποστρώματα πολυεστερικών υλικών.

### 2.2.3) Χαρακτηρισμός πολυεστερασών

#### 2.2.3.1) Ποσοτικός προσδιορισμός παραγόμενων πολυεστερασών με τη μέθοδο Beer-Lambert

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των επιθυμητά παραγόμενων πολυεστερασών στα τελικώς παραλαμβανόμενα συμπυκνωμένα ενζυμικά διαλύματα ήταν απαραίτητη με σκοπό την οργάνωση των πειραμάτων μελέτης δράσης τους στα πολυεστερικά υλικά. Ο ποσοτικός αυτός προσδιορισμός επετεύχθη υπολογιστικά με την χρήση του νόμου Beer-Lambert, ο οποίος συνδέει την απορρόφηση (A) του ενζυμικού διαλύματος στα 280 nm (γνωστή από το στάδιο 2.2.2.5) Απομόνωση παραγόμενων πολυεστερασών), με το μήκος (b) της οπτικής διαδρομής που αντιστοιχεί στο πάχος της κυψελίδας – κελιού microplate (γνωστό από τις κατασκευαστικές προδιαγραφές του microplate), τον μοριακό συντελεστή απορροφητικότητας ( $\epsilon$ ) της πρωτεΐνης που είναι χαρακτηριστικό της μέγεθος και δηλώνει το πόσο φως απορροφάται από αυτήν σε συγκεκριμένο μήκος κύματος (γνωστός μέσω της αμινοξικής αλληλουχίας των πολυεστερασών και του εργαλείου λογισμικού ProtParam του βιοπληροφορικού ιστοτόπου ExPASy του Ελβετικού Ινστιτούτου Βιοπληροφορικής, [196]), το μοριακό βάρος (MW) των πολυεστερασών (ομοίως προσδιοριζόμενο όπως ο μοριακός συντελεστής απορροφητικότητας, από την αμινοξική ακολουθία) και την συγκέντρωση (C) της πολυεστεράσης (επιθυμητό μέγεθος προσδιορισμού), μέσω της εξίσωσης :

$$C = \frac{A * MW}{\epsilon * b}, \text{ όπου:}$$

ο συντελεστής απορροφητικότητας ( $\epsilon$ ) σε [ $1/(M*cm)$ ], το πάχος του κελιού microplate ίσο με 0,67 cm, και η τελική ενζυμική συγκέντρωση C σε mg/mL.

### 2.2.3.2) Ποσοτικός προσδιορισμός παραγόμενων πολυεστερασών με τη μέθοδο Lowry

Πέραν από τον ποσοτικό προσδιορισμό της τελικής συγκέντρωσης των πολυεστερασών στα τελικώς παραλαμβανόμενα συμπυκνωμένα ενζυμικά διαλύματα, ακολουθώντας τον νόμο Lambert-Beer, πραγματοποιήθηκε και ποσοτικός προσδιορισμός μέσω της μεθόδου Lowry κατά την διάρκεια εκπόνησης πειραμάτων βελτιστοποίησης των συνθηκών έκφρασης των πολυεστερασών.

Η αρχή της μεθόδου Lowry βασίζεται στην προκατεργασία δειγμάτων των ενζυμικών διαλυμάτων με δισθενή ιόντα χαλκού, τα οποία αντιδρούν με τους πεπτιδικούς δεσμούς του ενζύμου, υπό αλκαλικές συνθήκες, με αποτέλεσμα την οξειδωσή τους και την αντίστοιχη αναγωγή των δισθενών ιόντων χαλκού σε μονοσθενή. Τα μονοσθενή ιόντα χαλκού με τη σειρά τους και οι λειτουργικές ομάδες των αρωματικών αμινοξέων (τυροσίνη, τρυπτοφάνη και κυστεΐνη) των ενζύμων αντιδρούν με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (συγκεκριμένα με τις ενώσεις του φωσφομολυβδαινικού και του φωσφοβολφραμικού οξέος που εμπεριέχονται σε αυτό) σχηματίζοντας τελικό προϊόν μπλε χρώματος, η ένταση του οποίου φωτομετράται σε μήκος κύματος του ορατού φάσματος της ακτινοβολίας. Η απορρόφηση του προϊόντος της αντίδρασης μεθόδου Lowry είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του ενζύμου.

Συγκεκριμένα παρασκευάστηκε το διάλυμα Lowry (Lowry Solution) με ανάμειξη ποσοτήτων 100  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 4,9 mL και 4,9 mL προπαρασκευασμένων διαλυμάτων, A : 1% θεικού χαλκού ( $CuSO_4$ ) (Solution A), B : 2 % τρυγικό καλιονάτριο ( $NaKC_4H_4O_6$ ) (Solution B), C : Καυστικό νάτριο συγκέντρωσης 0,2 M ( $NaOH$ ) (Solution C) και D : 2% ανθρακικό νάτριο ( $Na_2CO_3$ ) αντιστοίχως. Στη συνέχεια προστέθηκε ποσότητα του διαλύματος Lowry ίση με 250  $\mu$ L σε ειδικό κελί του microplate καθώς και 50  $\mu$ L του ενζυμικού διαλύματος ποσοτικοποίησης. Με την βοήθεια της αυτοματοποιημένης πιπέτας μεταβλητού όγκου το περιεχόμενο του κελιού αναμίχθηκε και αφέθηκε για επώαση 10 min (στο στάδιο της επώασης αυτής αντέδρασαν τα δισθενή ιόντα χαλκού, του θεικού χαλκού, με τους πεπτιδικούς δεσμούς του ενζύμου προς αναγωγή σε μονοσθενή ιόντα χαλκού). Με το πέρας της επώασης προστέθηκε στο ίδιο κελί ποσότητα προπαρασκευασμένου υδατικού διαλύματος Folin-Ciocalteu ( $V_{Folin-Ciocalteu}:V_{dH_2O}=1:1$ ) ίση με 25  $\mu$ L, και το περιεχόμενο αφέθηκε για επώαση 30 min, υπό συνθήκες έλλειψης φωτός, λόγω της έντονης φωτοευαισθησίας του Folin-Ciocalteu που μπορεί να επηρεάσει την αντίδραση (στο στάδιο αυτό αντέδρασαν τα μονοσθενή ιόντα χαλκού, με τις αρωματικές ομάδες των αμινοξέων του ενζύμου και τα οξέα του Folin-Ciocalteu προς σχηματισμό μπλε προϊόντος). Τέλος το περιεχόμενο φωτομετρήθηκε στη συσκευή φωτομέτρησης Microplate Reader, Spectra Max 250 στα 750 nm (χρησιμοποιώντας ως τυφλό δείγμα το ρυθμιστικό διάλυμα του ενζυμικού



διαλύματος, 325  $\mu\text{L}$  Talon 1 $\times$ ) και η απορρόφηση ανήχθη σε συγκέντρωση ενζύμου χρησιμοποιώντας καμπύλη αναφοράς η οποία παρασκευάστηκε χρησιμοποιώντας δείγματα γνωστής ενζυμικής συγκέντρωσης και διεξάγοντας την παραπάνω διαδικασία (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α : Καμπύλη αναφοράς μεθόδου Lowry).

### 2.2.3.3) Προσδιορισμός ενεργότητας παραγόμενων πολυεστερασών

Ο προσδιορισμός της ενεργότητας των παραγόμενων πολυεστερασών έλαβε χώρα μέσω της αντίδρασης υδρόλυσης του υποστρώματος εστέρας του 4-νιτροφαινόλου βουρικού οξέος (pNPB). Το pNPB αποτελεί εστέρα με τέσσερα άτομα άνθρακα, τον οποίο οι εστεράσες υδρολύουν, δρώντας στον εστερικό δεσμό, προς 4-νιτροφαινόλη (pNP) και βουτυρικό οξύ. Το προϊόν pNP, με μοριακό τύπο  $\text{O}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}$ , αποτελεί ένα ασθενές οξύ του οποίου η ιονισμένη μορφή ( $\text{O}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}^-$ ) απορροφά σε μήκος κύματος 410 nm. Η υδρόλυση, λοιπόν, του υποστρώματος από τις πολυεστεράσες, σε pH ιοντισμού, απελευθέρωσε pNP η απορρόφηση του οποίου στα 410 nm ανήχθη σε συγκέντρωση απελευθερωμένου pNP και στη συνέχεια σε ενεργότητα των πολυεστερασών (με τη χρήση κατάλληλης εξίσωσης που βασίζεται στον νόμο Beer-Lambert, απαραίτητων ιδιοτήτων των πρωτεϊνών και μεθοδολογία, που αναλύονται στα ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β : Μεθοδολογία προσδιορισμού ενεργότητας πολυεστερασών στο εστερικό υπόστρωμα pNPB, ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ : Μοριακά βάρη και μοριακοί συντελεστές απορρόφησης των παραγόμενων πολυεστερασών).

Αρχικά παρασκευάστηκε stock διάλυμα pNPB συγκέντρωσης 20 mM χρησιμοποιώντας ως διαλύτη το διμεθυλοσουλφίδιο (Dimethyl sulfoxide, DMSO  $\geq$  99,9 %), και στη συνέχεια ποσότητα αυτού διαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα Κιτρικών-Φωσφορικών (Citrate-Phosphate) με pH = 6,0 (Πίνακας 10) σε τελική συγκέντρωση pNPB ίση με 1,1 mM. Τέλος ποσότητα 230  $\mu\text{L}$  του διαλύματος αυτού τοποθετήθηκαν σε κελί του microplate στο οποίο προστέθηκαν και 20  $\mu\text{L}$  δείγματος ενζυμικού διαλύματος. Συνεπώς ο τελικός όγκος αντίδρασης ήταν ίσος με 250  $\mu\text{L}$  συγκέντρωσης pNPB 1 M. Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε για όλα τα διαλύματα πολυεστερασών. Τα περιεχόμενα φωτομετρήθηκαν στη συσκευή φωτομέτρησης Microplate Reader, Spectra Max 250 στα 410 nm σε θερμοκρασία 35  $^{\circ}\text{C}$  (χρησιμοποιώντας ως τυφλό δείγμα αντίδρασης 20  $\mu\text{L}$  του ρυθμιστικού διαλύματος κάθε ενζυμικού διαλύματος σε 230  $\mu\text{L}$  διαλύματος pNPB/Citrate-Phosphate), για χρονικό διάστημα 10 min, με τη λήψη μετρήσεων απορρόφησης κάθε 20 sec. Τα αποτελέσματα απορροφήσεων παραλήφθηκαν και μετατράπηκαν σε ενεργότητα των παραγόμενων πολυεστερασών.

#### 2.2.3.4) Μελέτη βέλτιστων συνθηκών δράσης παραγόμενων πολυεστερασών

##### Εύρεση βέλτιστου pH δράσης των πολυεστερασών

Ο προσδιορισμός του βέλτιστου pH δράσης καθεμιάς πολυεστεράσης πραγματοποιήθηκε μέσω φωτομέτρησης των προϊόντων ενζυμικής υδρόλυσης, με τη διαδικασία που περιεγράφηκε στο 2.2.3.3) Προσδιορισμός ενεργότητας παραγόμενων πολυεστερασών. Για την μελέτη του pH ως παράμετρο της δράσης των πολυεστερασών, παρασκευάστηκαν διαφορετικά διαλύματα pNPB/Ρυθμιστικό διάλυμα με σταθερή συγκέντρωση 1,1 mM pNPB σε DMSO. Τα ρυθμιστικά διαλύματα που μελετήθηκαν ήταν, ρυθμιστικά διαλύματα Κιτρικών-Φωσφορικών (Citrate-Phosphate, C-P) pH = 5 & 6, Νιτρικών (Φωσφορικών)-Φωσφορικών (Sodium-Phosphate, S-P) pH = 6,7 & 8 και Tris-Υδροχλωρίου (Tris-HCl, T-H) pH = 8 & 9, με συγκεντρώσεις και συστάσεις οι οποίες αναφέρονται στον Πίνακα 10. Έτσι 230  $\mu$ L καθενός από τα διαλύματα pNPB/Ρυθμιστικό διάλυμα αναμειχθήκαν με 20  $\mu$ L των πολυεστερικών διαλυμάτων και έλαβε χώρα φωτομέτρηση στη συσκευή φωτομέτρησης Microplate Reader, Spectra Max 250 στα 410 nm σε θερμοκρασία 35 °C (χρησιμοποιώντας ως τυφλό δείγμα αντίδρασης 20  $\mu$ L του ρυθμιστικού διαλύματος κάθε ενζυμικού διαλύματος σε 230  $\mu$ L καθενός διαλύματος pNPB/Ρυθμιστικό διάλυμα), για χρονικό διάστημα 10 min. Οι απορροφήσεις συγκρίθηκαν και το καλύτερο αποτέλεσμα επιλέχθηκε ως το βέλτιστο pH δράσης.

##### Εύρεση βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης των πολυεστερασών

Ο προσδιορισμός της βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης καθεμιάς πολυεστεράσης πραγματοποιήθηκε μέσω φωτομέτρησης των προϊόντων ενζυμικής υδρόλυσης, με τη διαδικασία που περιεγράφηκε στο 2.2.3.3) Προσδιορισμός ενεργότητας παραγόμενων πολυεστερασών. Για την μελέτη της θερμοκρασίας ως παράμετρο της δράσης των πολυεστερασών, τοποθετήθηκαν 275  $\mu$ L διαλύματος pNPB/Citrate-Phosphate συγκέντρωσης pNPB ίσης με 1,0 mM σε θερμαινόμενους και ανακινούμενους επωαστήρες Eppendorf Thermomixer Comfort (1,5 & 2,0 mL), θερμοκρασιών λειτουργίας εύρους 25-50 °C, με τις αναλυτικές θερμοκρασίες μελέτης για κάθε πολυεστεράση να παρουσιάζονται στο 3.4.3) Προσδιορισμός βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης (TOPTIMUM) των μη χαρακτηρισμένων πολυεστερασών, στους οποίους και προθερμάθηκαν για 7 min. Στη συνέχεια προστέθηκαν 25  $\mu$ L δείγματος των πολυεστερικών διαλυμάτων και οι ανακινούμενοι επωαστήρες Eppendorf Thermomixer Comfort (1,5 & 2,0 mL) τέθηκαν σε λειτουργία, με αρχικά στιγμιαία αύξηση και ακαριαίο μηδενισμό των στροφών για επίτευξη ανάδευσης του περιεχομένου των Eppendorf των 1,5 mL, για 5 min. Έπειτα από το πέρας της διεργασίας τα Eppendorf των 1,5 mL απομακρύνθηκαν και τοποθετήθηκαν σε παγόλουτρο (4 °C) με στόχο την ενζυμική απενεργοποίηση των πολυεστερασών και την παρεμπόδιση της περαιτέρω εξέλιξης της αντίδρασης. Τέλος ποσότητα ίση με 250

μL καθενός περιεχομένου τοποθετήθηκε σε κελιά του microplate και αυτά φωτομετρήθηκαν στη συσκευή φωτομέτρησης Microplate Reader, Spectra Max 250 στα 410 nm (χρησιμοποιώντας ως τυφλό δείγμα αντίδρασης 20 μL του ρυθμιστικού διαλύματος κάθε ενζυμικού διαλύματος σε 230 μL διαλύματος pNPB/Citrate-Phosphate για κάθε διαφορετική θερμοκρασία). Οι απορροφήσεις συγκρίθηκαν και το καλύτερο αποτέλεσμα επιλέχθηκε ως η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης.

Τόσο για τον προσδιορισμό του βέλτιστου pH όσο και της θερμοκρασίας δράσης κάθε μιας πολυεστεράσης χρησιμοποιήθηκαν τρεις αντιδράσεις και δύο τυφλά δείγματα. Οι συγκεντρώσεις των προστιθέμενων ενζυμικών διαλυμάτων καθορίστηκαν κατά την διαδικασία προσδιορισμού ενεργότητας των πολυεστερασών με κριτήριο γραμμικότητας της γραφικής παράστασης κατανάλωσης υποστρώματος pNPB και απορρόφησης, εντός των ορίων απορρόφησης της συσκευής φωτομέτρησης Microplate Reader, Spectra Max 250 ( $A = 0 - 1,0$ ). Το παραπάνω επετεύχθη επαναλαμβάνοντας επακριβώς τα βήματα που προαναφέρθηκαν στο 2.2.3.3) Προσδιορισμός ενεργότητας παραγόμενων πολυεστερασών, για αραιωμένα δείγματα των ενζυμικών διαλυμάτων κάθε πολυεστεράσης, μελετώντας την προκύπτουσα γραφική παράσταση αλλά και την γραμμικότητα των υπολογιζόμενων ενζυμικών συγκεντρώσεων, με τις τελικές αραιώσεις να αναφέρονται αναλυτικά στον Πίνακα 34. Τέλος καθ' όλη την έκταση των πειραμάτων χαρακτηρισμού των παραγόμενων πολυεστερασών τα απαραίτητα διαλύματα αντιδραστηρίων παρασκευάζονταν μαζικά (Mastermix) προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν τόσο τα τυχαία όσο και τα συστηματικά σφάλματα.

#### 2.2.4) Μελέτη δράσης πολυεστερασών σε πολυεστερικά υλικά (πλαστικά)

##### 2.2.4.1) Αντιδράσεις παραγόμενων πολυεστερασών με πολυεστερικά υλικά

#### Προετοιμασία πολυεστερικών διαλυμάτων των αντιδράσεων

Έχοντας ως βασικό στόχο την μελέτη της δράσης των παραγόμενων πολυεστερασών σε υποστρώματα πολυεστερικών υλικών αλλά και την μεταξύ τους σύγκριση χρησιμοποιήθηκε κοινή ενζυμική συγκέντρωση στις αντιδράσεις, η οποία καθορίστηκε ίση με 10 mM (οι μελετώμενες πρωτεάσες προστέθηκαν σε συγκέντρωση 5 mg<sub>ENZYMΟΥ</sub>/Ml). Έτσι κάθε μια από τις πολυεστεράσες αραιώθηκε από το συμπυκνωμένο ενζυμικό διάλυμα της (stock, Πίνακας 32) με κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος εξισορρόπησης.

#### Δράση παραγόμενων πολυεστέρων σε πολυεστερικά υλικά

Για την μελέτη της δράσης των ανασυνδυασμένων πολυεστερασών πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις με ένα εύρος πολυεστερικών υλικών σε μορφή σκόνης (Πίνακας 16). Συγκεκριμένα 5 mg κάθε πολυμερικής σκόνης ζυγίστηκαν σε αναλυτικό ζυγό και τοποθετήθηκαν σε Eppendorf των 1,5 mL, στο εσωτερικό των

οποίων προστέθηκαν 50  $\mu\text{L}$  πολυεστεράσης (συγκέντρωσης 10 mM) και 450  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος Φωσφορικών  $\text{pH} = 7,5$ , προς τελικό όγκο αντίδρασης ίσο με 500  $\mu\text{L}$ . Τα Eppendorf των 1,5 mL μοιράστηκαν σε ανακινούμενους επωαστήρες Eppendorf Thermomixer Comfort (1,5 & 2,0 mL) προθερμασμένους στις θερμοκρασίες των 30  $^{\circ}\text{C}$  και 50  $^{\circ}\text{C}$ , ανάλογα με τη δρούσα πολυεστεράση και την προσδιορισμένη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της, οι οποίοι στη συνέχεια τέθηκαν σε λειτουργία στα 1300 rpm για χρονικό διάστημα 3 ημερών. Με το πέρας κάθε ημέρας η ποσότητα των πολυεστερασών ανανεώθηκε μέσω προσθήκης ποσότητας ίση με 25  $\mu\text{L}$  (στις 24 h και 48 h αντίστοιχα). Η ανανέωση αυτή στόχευσε στην πρόληψη της πιθανής απενεργοποίησης των παραγόμενων ενζύμων λόγω απουσίας μελέτης της θερμοσταθερότητάς τους κατά την πειραματική διαδικασία. Έπειτα από 3 ημέρες, οι ανακινούμενοι επωαστήρες Eppendorf Thermomixer Comfort (1,5 & 2,0 mL) απενεργοποιήθηκαν και το περιεχόμενο των αντιδράσεων παραλήφθηκε προς επεξεργασία.

Για τις αντιδράσεις κάθε παραγόμενης πολυεστεράσης με καθένα από τα πλαστικά προετοιμάστηκαν τρία δείγματα ενώ για κάθε θερμοκρασία (30  $^{\circ}\text{C}$  και 50  $^{\circ}\text{C}$ ) προετοιμάστηκαν δύο δείγματα που λειτούργησαν ως τυφλά και στα οποία προστέθηκαν 50  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος Talon 0,5 $\times$ , έναντι ενζυμικού διαλύματος. Όλα τα μείγματα αντίδρασης παρασκευάστηκαν μαζικά (Mastermix) για την ελαχιστοποίηση σφαλμάτων.

#### 2.2.4.2) Μέτρηση απώλειας βάρους πολυεστερικών υλικών λόγω ενζυμικής δράσης

Η απώλεια μάζας του πολυεστερικού υλικού είναι μια σημαντική ένδειξη της βιοαποικοδόμησης του λόγω δράσης της πολυεστεράσης. Έτσι, με το πέρας των αντιδράσεων, τα Eppendorf των 1,5 mL τοποθετήθηκαν αντιδιαμετρικά στην ψυχόμενη φυγόκεντρο High Speed Refrigerated Centrifuge 4239R, για 10 min, στα 14000 rpm). Στη συνέχεια το υπερκείμενο υγρό απομακρύνθηκε με τη βοήθεια αυτοματοποιημένης πιπέτας μεταβλητού όγκου με αποτέλεσμα να παραμείνει στον πυθμένα του Eppendorf των 1,5 mL η καθιζάνουσα σκόνη του πολυεστερικού υλικού. Ακολούθως προστέθηκε ποσότητα διαλύτη SDS, ίση με 200  $\mu\text{L}$ , και έγινε τοποθέτηση στους ανακινούμενους επωαστήρες Eppendorf Thermomixer Comfort (1,5 & 2,0 mL), σε θερμοκρασία δωματίου, για 10 min στα 1300 rpm με σκοπό την ανάμειξη της πολυμερικής σκόνης με τον διαλύτη SDS, ο οποίος ως επιφανειοδραστικό στόχευσε στην διάλυση των πιθανά προσκολλημένων πρωτεϊνικών μακρομορίων στην επιφάνεια του υλικού ή των αντίστοιχων μακρομορίων που πιθανών εισήλθαν στους πόρους του υλικού. Έπειτα τα Eppendorf των 1,5 mL επανατοποθετήθηκαν αντιδιαμετρικά στην ψυχόμενη φυγόκεντρο στις ίδιες συνθήκες. Το υπερκείμενο SDS με τα διαλυμένα μακρομόρια απομακρύνθηκε με τη βοήθεια αυτοματοποιημένης πιπέτας μεταβλητού όγκου. Τέλος ακολούθησαν 3 κύκλοι προσθήκης 1 mL υπερκάθαρου νερού (Mill-Q  $\text{H}_2\text{O}$ ) με στόχο το ξέπλυμα των διαλυτών προϊόντων. Ανάμεσα σε κάθε κύκλο, έλαβε χώρα φυγοκέντρωση στις ίδιες συνθήκες και απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού. Έτσι το περιεχόμενο κατέληξε σε πολυμερική σκόνη υψηλή σε υγρασία. Τα δείγματα

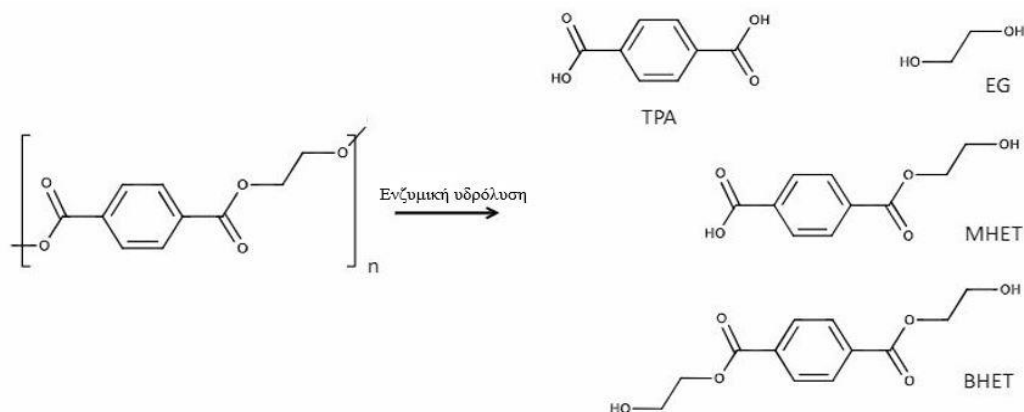
τοποθετήθηκαν στην συσκευή λυοφιώσεως με θάλαμο κενού ALPHA 1-4, στους -30 °C υπό κενό, προς ξήρανση. Τα δείγματα αφέθηκαν προς ξήρανση για μια ημέρα και τελικώς επαναζυγίστηκαν, προς υπολογισμό της εναπομένουσας πολυμερικής σκόνης.

#### 2.2.4.3) Μέτρηση απελευθερωμένων προϊόντων υδρόλυσης με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC)

Πέραν από την απώλεια μάζας των πολυεστερικών δειγμάτων, ένδειξη για την βιοαποικοδομητική δράση των παραγόμενων πολυεστερασών αποτελεί η απελευθέρωση μονομερών ή олиγομερών προϊόντων στο διάλυμα της αντίδρασης. Ο εντοπισμός και η ποσοτικοποίηση τους επιτυγχάνεται με την εφαρμογή χρωματογραφικής τεχνικής, και συγκεκριμένα της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC). Ο διαχωρισμός και εντοπισμός των συστατικών ενός μίγματος με τη μέθοδο της HPLC είναι αποτέλεσμα της συνδυαστικής δράσης μιας στατικής και μιας κινητής φάσης. Οι ουσίες προς ανάλυση κατανέμονται μεταξύ των δύο φάσεων γεγονός που συνεπάγεται την μετακίνησή τους με διαφορετικές ταχύτητες κατά μήκος της στήλης. Η κινητή βάση ρέει υπό την επίδραση αντλίας, γεγονός που επιταχύνει την ανάλυση και μειώνει σημαντικά το μέγεθος της στήλης.

Κατά την εκπόνηση της πειραματικής διαδικασίας εφαρμόστηκε η HPLC αντίστροφης φάσης, η οποία αφορά τον διαχωρισμό των συστατικών λόγω της προσρόφησης υδρόφοβων μορίων σε υδρόφοβη στατική φάση, υπό την ροή της κινητής φάσης έντονης πολικότητας. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε η στήλη CC 250/4.6 NUCLEOSIL 100-5 C18, της οποίας η στατική φάση αποτελείται από οξείδιο του πυριτίου συζευγμένο με πολυανθρακικές αλυσίδες 18 ατόμων άνθρακα  $[-(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]$ , οι οποίες της προσδίδουν έντονα άπολο χαρακτήρα, ενώ η κινητή φάση, ανάλογα το προς ανάλυση δείγμα, ήταν ιδιαίτερα πολική.

Τα πρωτόκολλα που εφαρμόστηκαν επικεντρώθηκαν σε δύο πολυεστερικά υλικά, αυτά του άμορφου και κρυσταλλικού τερεφθαλικού πολυαιθυλενίου (PET). Τα προϊόντα της υδρόλυσης του PET, TPA, MHET και BHET (παράγραφος Βιοαποικοδόμηση του PET) φέρουν, κατά σειρά αναφοράς, αύξοντες χρόνους έκλυσης, λόγω της κατά σειράς αυξημένης υδροφοβικότητας που προσδίδει το ένα (MHET) και τα δύο (BHET) μόρια αιθυλενογλυκόλης, συγκριτικά με το TPA (Εικόνα 18).



**Εικόνα 18** : Προϊόντα της ενζυμικής υδρόλυσης του PET. Παρατηρείται η αύξηση της πολυανθρακικής αλυσίδας κατά σειρά των TPA, BHET, MHET (κατά μια EG), γεγονός που αυξάνει την υδροφοβικότητα, και συνεπώς την προσκόλληση στην στήλη για μεγαλύτερους χρόνους. [197]

### Προετοιμασία δειγμάτων

Με το πέρας των αντιδράσεων, τα Eppendorf των 1,5 mL, απομακρύνθηκαν και έγινε οπτική παρατήρηση του περιεχόμενου όγκου του μείγματος αντίδρασης. Σε περίπτωση που αυτός ήταν μειωμένος του αρχικού (0,5 mL, απώλειες λόγω πιθανής εξάτμισης του περιεχομένου εξαιτίας της επιβολής του σε υψηλές θερμοκρασίες για μεγάλο χρονικό διάστημα) ισορροπήθηκε στον αρχικό όγκο με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας υπερκίθου νερού (Milli-Q H<sub>2</sub>O). Ο όμοιος όγκος όλων των δειγμάτων αποτελεί προϋπόθεση για την σωστή σύγκριση των τελικών συγκεντρώσεων των απελευθερωμένων προϊόντων μέσω της χρωματογραφίας HPLC. Στη συνέχεια προστέθηκε στα μείγματα των αντιδράσεων ποσότητα διαλύματος πυκνού HCl συγκέντρωσης 5 M ίση με 0,5 μL, προκειμένου να απενεργοποιηθεί η δράση των πολυεστερασών και να τερματιστούν οι αντιδράσεις. Μετέπειτα τα δείγματα τοποθετήθηκαν στην ψυχόμενη φυγόκεντρο High Speed Refrigerated Centrifuge 4239R, για 10 min, στα 14000 rpm και σε θερμοκρασία 4 °C. Το υπερκείμενο υγρό των δειγμάτων συλλέχθηκε με τη χρήση πιπέτας μεταβλητού όγκου, με αρκετή προσοχή προς αποφυγή επαναιώρησης της πολυμερικής σκόνης που είχε καθιζάνει, σε Eppendorf των 1,5 mL. Σε αυτά προστέθηκαν 25 μL διαλύτη DMSO, προκειμένου να διευκολυνθεί η διάλυση πιθανόν αδιάλυτων προϊόντων στα τελικά δείγματα. Τέλος, ποσότητες 500 μL των δειγμάτων, τοποθετήθηκαν με την βοήθεια αυτοματοποιημένης πιπέτας μεταβλητού όγκου σε γυάλινα Vials των 1,5 mL και μεταφέρθηκαν στον ειδικό υποδοχέα του αναλυτικού συστήματος υγρής χρωματογραφίας και χρωματογραφίας ηλεκτρώματος (HPLC & GPC) Agilent 1260 Infinity II LC προς ανάλυση.

### Πρωτόκολλο

Η μέθοδος για την χρωματογραφική ανάλυση των πολυμερικών δειγμάτων PET (άμορφου και κρυσταλλικού) βασίστηκε στο εξής πρωτόκολλο :

**Πίνακας 17** : Πρωτόκολλο HPLC για τα πολυμερικά δείγματα άμορφου και κρυσταλλικού PET.

| Πολυμερικό υλικό δείγματος | Όγκος ένεσης | Κινητή φάση <sup>*6</sup>   | Ροή κινητής φάσης | Χρόνος ανάλυσης δείγματος | Μήκος κύματος ανιχνευτή | Θερμοκρασία κλίβανου | Μέθοδος    |
|----------------------------|--------------|---|-------------------|---------------------------|-------------------------|----------------------|------------|
| PET (κρυσταλλικό ή άμορφο) | 20 $\mu$ L   | 60% H <sub>2</sub> O,<br>20% AcN,<br>20% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0,8 mL/min        | 8 min                     | 241 nm                  | 38 °C                | Ισοκρατική |

Τα παραπάνω στοιχεία εισήχθησαν στο ειδικά παρεχόμενο λογισμικό του αναλυτικού συστήματος υγρής χρωματογραφίας και χρωματογραφίας πηκτώματος (HPLC & GPC) Agilent 1260 Infinity II L. Μέσω του ίδιου λογισμικού επετεύχθη και η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των παραλαμβανόμενων κορυφών του χρωματογραφήματος. Η ταυτοποίηση των ενώσεων βασίστηκε στον χρόνο έκλουσής τους, βάσει αντίστοιχων χρόνων πρότυπων διαλυμάτων (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Δ : Χρωματογράφημα (HPLC) πρότυπων δειγμάτων ενώσεων TPA, MHET & BHET).

<sup>\*6</sup> Πίνακας 15.

#### 2.2.4.4) Μέτρηση απώλειας μοριακών βαρών με Χρωματογραφία Πηκτώματος (GPC)

Η διαφορά μάζας καθώς και τα απελευθερωμένα, στο διάλυμα της αντίδρασης, προϊόντα υδρόλυσης αποτελούν κατευθυντήριο δύναμη για την μελέτη της βιοαποικοδομητικής δράσης των πολυεστερασών. Παρ' όλα αυτά δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά πρωτόκολλα για μεθόδους χρωματογραφίας προς προσδιορισμό των προϊόντων υδρόλυσης όλων των πολυεστερικών υλικών που χρησιμοποιήθηκαν. Αντ' αυτού είναι εφικτή η μελέτη της τελικής δομικής κατάστασης των πολυμερικών σκονών, ένδειξη της ενζυμικής δράσης των πολυεστερασών, η οποία επιτυγχάνεται μέσω της χρωματογραφίας πηκτώματος (GPC) και τη βοήθεια του ανιχνευτή δείκτη διαθλάσεως (ανιχνευτής RI), ο οποίος υπολογίζει τα επιθυμητά μεγέθη μέσω της μέτρησης της διαφοράς του δείκτη διάθλασης μεταξύ της καθαρής κινητής φάσης και της κινητής φάσης που εμπεριέχει την, προς ανάλυση, ουσία.

Η χρωματογραφία πηκτώματος (GPC) αποτελεί είδος υγρής χρωματογραφίας και βασίζεται στον διαχωρισμό μακρομοριακών αλυσίδων των πολυμερών βάσει του μεγέθους τους. Αυτός επιτυγχάνεται με τη χρήση πορωδών υλικών, ως στατική φάση, που είναι συνήθως ρητίνες από συμπολυμερισμό στυρενίου-διβινυλοβενζολίου, και μιας κινητής φάσης του πολυμερικού, προς ανάλυση, δείγματος διαλυμένο σε οργανικό διαλύτη. Μέσω της GPC προσδιορίζονται τα μέσα μοριακά βάρη των πολυμερικών δειγμάτων καθώς και η κατανομή του μοριακού βάρους (μοριακή διασπορά), καταλήγοντας σε συμπεράσματα για τις ιδιότητες των τελικών πολυμερικών σκονών.

Συγκεκριμένα με το πέρας της ανάλυσης υπολογίζεται το μέσου αριθμού μοριακό βάρος ( $M_n$ ), το μέσου βάρους μοριακό βάρος ( $M_w$ ), το μόριο με το μεγαλύτερο μοριακό βάρος ( $M_p$ ) καθώς και ο δείκτης διασποράς των μοριακών βαρών (PD), του δείγματος.

Το πολυμερές, σε αντίθεση με τις απλές ενώσεις, είναι μίγμα ομόλογων μακρομορίων διαφορετικού μήκους, οπότε και δεν χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένο μοριακό βάρος, αλλά από μέσο μοριακό βάρος. Συνοπτικά, το μέσο αριθμού μοριακό βάρος ( $M_n$ ) υποδηλώνει τον μέσο όρο του μοριακού βάρους όλων των μορίων που αποτελούν το δείγμα του πολυμερούς, το μέσο βάρους μοριακό βάρος ( $M_w$ ) υποδηλώνει το μέσο μοριακό βάρος του δείγματος που εξαρτάται από την μάζα του πολυμερούς που βρίσκεται σε μια περιοχή μοριακών βαρών, ενώ ο δείκτης διασποράς των μοριακών βαρών (PD) αποτελεί τον λόγο των παραπάνω μέσων μοριακών βαρών και εκφράζει την ανομοιογένεια του δείγματος ( $PD \approx 1$ , μονοδιάσπαρτο δείγμα ενώ πάντα ισχύει  $PD > 1$ ).

Με λίγα λόγια, όσον αφορά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της βιοαποικοδομητικής δράσης ενζύμων σε ένα δείγμα πολυεστερικού υλικού, μείωση στο μέσο αριθμού μοριακό βάρος ( $M_n$ ), υποδηλώνει διάσπαση πολλών μακρομορίων πληθώρας μοριακών βαρών ενώ μείωση στο μέσο βάρους μοριακό βάρος ( $M_w$ ) υποδηλώνει διάσπαση μακρομορίων μεγάλου μοριακού βάρους.

Στην παρούσα πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν δύο στήλες, PLgel 5um MIXED-D 300 7.5 mm PL1110-6504, σε σειρά.

#### Προετοιμασία δειγμάτων

Τα δείγματα προς ανάλυση όφειλαν να βρίσκονται σε υγρή μορφή. Έτσι, έπειτα από την ζύγιση των τελικών ξηρών πολυμερικών σκονών (2.2.4.2 Μέτρηση απώλειας βάρους πολυεστερικών υλικών λόγω ενζυμικής δράσης), αυτές μεταφέρθηκαν σε γυάλινα Vials των 10 mL, στα οποία προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα οργανικού διαλύτη, προς τελική συγκέντρωση 2 mgΠΟΛΥΜΕΡΙΚΗΣ ΣΚΟΝΗΣ/mL. Για τις πολυεστερικές σκόνες PBS και PHB χρησιμοποιήθηκε οργανικός διαλύτης χλωροφόρμιο ( $CHCl_3$ ) ενώ για τις σκόνες των PLA, PCL και PU χρησιμοποιήθηκε οργανικός διαλύτης τετραϋδροφουράνιο (THF) (Πίνακας 15). Τα Vials των 10 mL τοποθετήθηκαν στη Συσκευή Καθαρισμού Υπερήχων Ultrasonic cleaner WUC-1,2 – 22 Liter 40 kHz, έως ότου οι πολυμερικές σκόνες διαλυθήκαν στον οργανικό διαλύτη. Στη συνέχεια τα διαλύματα φιλτραρίστηκαν με τη χρήση φίλτρων Syringe Filters Nylon 25 mm 0,22 um, προς κατακράτηση πιθανών αδιάλυτων κόκκων μικροπλαστικού που θα προξενούσαν προβλήματα στα εργοστασιακά εξαρτήματα του αναλυτικού συστήματος υγρής χρωματογραφίας και χρωματογραφίας πηκτώματος (HPLC & GPC) Agilent 1260 Infinity II LC. Τέλος, ποσότητες 500 μL των δειγμάτων, τοποθετήθηκαν με την βοήθεια αυτοματοποιημένης πιπέτας μεταβλητού όγκου σε γυάλινα Vials των 1,5 mL και μεταφέρθηκαν στον ειδικό υποδοχέα του αναλυτικού συστήματος υγρής χρωματογραφίας και χρωματογραφίας πηκτώματος (HPLC & GPC) Agilent 1260 Infinity II LC προς ανάλυση.



## Πρωτόκολλα

Οι μέθοδοι για την μελέτη των πολυμερικών σκονών PLA, PU, PCL, PBS & PHB χρωματογραφίας πηκτώματος (GPC) βασίστηκαν στα εξής πρωτόκολλα :

**Πίνακας 18** : Πρωτόκολλα GPC-IR για τα πολυμερικά δείγματα PBS,PHB,PLA,PU & PCL.

| Πολυμερικό υλικό δείγματος | Όγκος ένεσης | Κινητή φάση <sup>*6</sup> | Ροή κινητής φάσης | Χρόνος ανάλυσης δείγματος | Μήκος κύματος ανιχνευτή | Θερμοκρασία κλίβανου | Θερμοκρασία ανιχνευτή |
|----------------------------|--------------|---------------------------|-------------------|---------------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------|
| PLA, PU, PCL               | 100 $\mu$ L  | 100 % THF                 | 1,0 mL/min        | 30 min                    | 650 nm                  | 35 $^{\circ}$ C      | 35 $^{\circ}$ C       |
| PBS, PHB                   | 100 $\mu$ L  | 100 % CHCl <sub>3</sub>   | 1,0 mL/min        | 30 min                    | 650 nm                  | 35 $^{\circ}$ C      | 35 $^{\circ}$ C       |

Τα παραπάνω στοιχεία εισήχθησαν στο ειδικά παρεχόμενο λογισμικό του αναλυτικού συστήματος υγρής χρωματογραφίας και χρωματογραφίας πηκτώματος (HPLC & GPC) Agilent 1260 Infinity II L. Μέσω του ίδιου λογισμικού επετεύχθη η ποσοτικοποίηση των παραλαμβανόμενων κορυφών του χρωματογραφήματος, η οποία βασίστηκε σε πρότυπη καμπύλη αναφοράς μέσω των μοριακών βαρών γνωστών πολυμερικών δειγμάτων (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ε : Καμπύλη αναφοράς μοριακών βαρών πολυμερικής σκόνης για την Χρωματογραφία Πηκτώματος (GPC)).

<sup>\*6</sup> Πίνακας 15.

### 3) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1) Γονίδια πολυεστερασών

Η πειραματική διαδικασία επικεντρώθηκε στην έκφραση και την μελέτη δράσης, σε πολυεστερικά υποστρώματα, δώδεκα ενζύμων με πιθανή ικανότητα υδρόλυσης εστερικών δεσμών. Από αυτά δύο, η πρωτεάση/*Bacillus licheniformis* (χρήση της συντομογραφίας Prot. Bac. στην ανάλυση που ακολουθεί) και η πρωτεάση/*Streptomyces griseus* (χρήση της συντομογραφίας Prot. Gr. στην ανάλυση που ακολουθεί), χρησιμοποιήθηκαν απευθείας από εμπορικά σκευάσματα ενώ τα γονίδια των υπολοίπων είτε εντοπίστηκαν βιβλιογραφικά είτε προσδιορίστηκαν βιοπληροφορικά.

##### 3.1.1) Γονίδια βιβλιογραφικά επιλεγμένων πολυεστερασών

Πληθώρα ενζύμων, βακτηριακών και μη, έχουν μελετηθεί έως σήμερα ως προς την βιοαποικοδομητική τους δράση σε πλαστικά υποστρώματα. Από αυτά, επιλέχθηκαν ένζυμα τα οποία εξειδικεύονται στην αποικοδόμηση συγκεκριμένων πλαστικών υλικών και μελετήθηκε η περαιτέρω δράση τους και σε άλλα πολυεστερικά υποστρώματα.

Τα γονίδια των βιβλιογραφικά επιλεγμένων πολυεστερασών, παρουσιάζονται ως εξής:

**Πίνακας 19** : Προέλευση και αμινοξική ακολουθία των, βιβλιογραφικά επιλεγμένων, μελετώμενων πολυεστερασών.

| Ένζυμο | Κατηγορία | Μικροοργανισμός προέλευσης  | Αμινοξική ακολουθία <sup>*7</sup>   | Αναφορά |
|--------|-----------|-----------------------------|---|---------|
| FoCut  | Κουτινάση | <i>Fusarium oxysporum</i>   | MKFSIISTLLAATASALPAGQDAAALEARQLGGSITRNDLANG<br>NSGSCPGVIFIYARGSTESGNLGTLPVASKLEAKYGKNGVWI<br>QGVGGAYRATLGDNALPRGTSSAAIREMLGHFNDANQKCPDA<br>VLIAGGYSQGAALAAASVTDVDPGIREKIAGVVLFGYTKNLQN<br>RGKIPSYPEDRTKVCNTGDLVCTGSLIVAAPHLAYQSAASGAA<br>PEFLIQKADAAGAA   | [198]   |
| HiC    | Κουτινάση | <i>Humicola insolens</i>    | QLGAIENGLESANACPDAILIFARGSTEPGNMGITVGPALANG<br>LESHIRNIWIQVGGPYDAALATNLFPRGTSQANIDEGKRLFAL<br>ANQKCPNTPVAVAGGYSQGAALIAAAVSELSGAVKEQVKGVVAL<br>FGYTQNLQNRGGIPNYPRERTKVFVNCVGDVCTGTLIITPAHLS<br>YTIARGEAAARFLDRIRA  | [151]   |
| LCC    | Κουτινάση | -                           | MSNPYQRGNPNTSALTADGPFVATYTVSRLSVSGFGGGVVIYY<br>PTGTSLTFGGIAMSPLYTADASSLAWLGRRLASHGFVVLVINTN<br>SRFDGPDSRASQLSALNLYLRTSSPSAVRARLDANRLAVAGHS<br>MGGGGTLRIAEQNPSSLKAAVPLTPWHDTKTFNTSVPLVIGAE<br>ADTVAPVSQHAIPFYQNLPTTPKVVYVELCNASHIAPNSNNAAIS<br>VYTISWMKLWVDNDTRYRQFLCNVNDPALCDFRTNNRHQCLE<br>HHHHHH                      | [199]   |
| PETase | Υδρολάση  | <i>Ideonella sakaiensis</i> | MNFPRASRLMQAAVLGGLMAVSAATAQTNPYARGPNPTAA<br>SLEASAGPFTVRSFTVSRPSGYGAGTVYYPTNAGGTVGAIAIVP<br>GYTARQSSIKWWGPRLASHGFVITIDTNSLTDQPSRSSQOMA<br>ALRQVASLNGTSSSPIYGKVDTARMGMVGMWSMGGGGSLISAA<br>NNPSLKAAAPQAPWDSSTNFSSVTVPPLIFACENDSIAPVNSSAL<br>PIYDSMSRNAKQFLEINGGSHSCANSNGNSNQALIGKKGVAWMK<br>RFMDNDTRYSTFACENPNSTRVSDFRANC | [150]   |

|        |                        |  |   |       |
|--------|------------------------|--|---|-------|
| PHAase | Αποπολυμεράση          | <i>Comamonas testosteroni 31A</i>  | <b>MRVQSWRS</b> GVAAALALWGGVNLAAAGAMDAVPLGQYNIATDQ<br>ISVSLSSGGFMANQLGNAYSASFMGVGTFAAGPYMCAGLNN<br>YTACMYNASISSAQLNAMQSSIDSYSSAASIDAKSRIAAQKIYIF<br>TGTSDYTVGPNTDALQTQYLNNGVPOANIA YVKRSGAAHVLP<br>TDFDSSGNACSSASPYISNCGYDGAKAALHTFYGALNPRND<br>APATGNYIEFNQASYTNANPMASGTWLYVPQSCASGTQCRHLV<br>VLHGCGQSTDKIGDKFVRNTGFSRWADTNNIIVLYPQTQVDNN<br>NRSTSKSGSLANPNACWDWIGWYGNFQAQKSGVQMTAIKAMI<br>DRIASGAGSGTGGGNGGNPTQPALAAPTGLGASAASTSMQL<br>DWAPVTSAASYNVYRNGNKANALPVSAATYVDAALSPATNYS<br>WTVRAVDGNGAESADSAAVSASTLTGSNPAGTCTTASNYAHV<br>QANRAYQQGGYAYATASGQNMGLWNVYFTTLTKQTGSNYV<br>IGTCPLHHHHHHH  | [200] |
| PHOase | Αποπολυμεράση          | <i>Pseudomonas fluorescens</i>   | <b>MPLR</b> TLLCGLLAVCLGQH <del>AL</del> AMDASRCSERPTLLRPAEVS<br>CSYQSTWLD SGLVGRKIIYQTPLGTPPAGGWVPLIYQGSFFP<br>LNDFSYHSLNLPFGGYYEGKLVQNLDDHGYAVIAPSAPADLFWQ<br>TNIPGLAQAYELSTDYDFLGNVLAALIASGHFPLNAQRQYATGI<br>SSGGYNTSRMAVSFPKFRALAVQSGSYATCSGPLCVVPDQLP<br>ADHPPTLFLHGFVDAVVPWWSMDL YYDRLLHQGIETARYTEPL<br>GGHEWFAASPGKVLAWFNAHPLEHHHHHHH  | [201] |
| PLAase | Πρωτεάση<br>σερίνης    | <i>Laceyella sacchari LP175</i>  | <b>MKLKLSTIL</b> FTACATLAAALPSPEEVDSMDQAGKLYAPGQV<br>VVKYKDNASASAVKSARAKANGTVMEKNNKLGFEVVKVKG<br>VEATIEKLLKDPNVEYAEPNYYLHATYTPNDPYFSSRQYGPQKI<br>QAPQAWDIAEGSGVKIAIVDTGVQSNHPDLAGKVVGGWDFVD<br>NDSTPQDGNHGHGTHCAGIAAAVTNNSTGIAGTAPKASILAVRV<br>LNNSGSGTWTAVANGITYAADQGAQVISLSLGGTVGNSGLQQA<br>VDYAWSKGVSVVAAAGNAGNTAPNYPAYYSNAIAVASTDQN<br>DNKSSFSTYGSWVDVAAPGSSYSTYPTSTYASLSGTSMATPHV<br>AGVAGLLASQGRSASNIRAAIENTADKISGTGTYWAKGRVNAV<br>KAVQYLEHHHHHHH   | [202] |
| PUase  | Μεμβρανική<br>εστεράση | <i>Comamonas acidovorans TB-35</i><br>( <i>Pseudomonas acidovorans</i> )<br>( <i>Comamonas acidovorans</i> ) | <b>MNSRSLTKAIRFP</b> TILALAGFSVLGAMDCGGSDNDSSNNQG<br>APAVAITVAGQVQAVDRLGMRRYFGIPFAAPPVGNLRWMPAP<br>PQSWAAPLAKTQSNAPCMQTGATDPLRLPNGTEDCLYLDVHAP<br>ATGEGPFPVMVWIHGGAFSIGGTITYADPSPLVSKGVIVVNIAYR<br>MGAMGFLGHPSLRAADGTVGNYGIMDQQAALRWVQDNIAAF<br>GGDKSNVTIFGESAGGFSVMTHLASPLSKGLFAKAIQVSGGYGF<br>DRQLTQAQLEAQSTSIVNSALAAAGVSCPTVDAACLRLGSLAE<br>VNLATAFTTANWSVPVSDGKVLPKSIKATFVAGENNKVPLV<br>NGSNQDEWSYFVASREL VAGPLTAAQYPSYLTSLGLPPLAT<br>VYPLTDYGTNTAQQP <del>SLA</del> ATAAGTDMHFSPALNLSKRVLSQA<br>TPIFMYEFRDRTAIPSIGRNTISFNQAGHTYELQYLFNLRDLET<br>AEHRDLQASMARYWTNFARTSNPNNGDPVATSWPAFTGPTKV<br>LGLDVASAGGIRELATFETDHCNTAWTSLTFLEHHHHHHH | [203] |

\*7: Στις αμινοξικές ακολουθίες, με έντονη γραφή (bold) επισημαίνονται τα πεπτίδια σήματος (signal peptides), όπως αυτά προσδιορίστηκαν με την χρήση του βιοπληροφορικού αλγορίθμου SignalP-5.0 (2.1.2) Βιοπληροφορικά εργαλεία).

### 3.1.2) Γονίδια βιοπληροφορικά ανακαλυπτόμενων πολυεστερασών

Πέραν των παραπάνω ενζύμων ανακαλύφθηκαν βιοπληροφορικά δύο περαιτέρω ένζυμα, τα γονίδια των οποίων προέκυψαν μέσω σύγκρισης πρωτεϊνικών αλληλουχιών, από βιοπληροφορικά εργαλεία (2.1.2) Βιοπληροφορικά εργαλεία), και επιλέχθηκαν ως αυτά που εμφάνιζαν ικανοποιητική ομολογία και επικάλυψη με τα ένζυμα αναφοράς διάσπασης του PET, LCC και PETase (Πίνακας 19), τα οποία μέσω των βιβλιογραφικά προσδιορισμένων αποδόσεων εμφανίζουν τις σημαντικότερες ενδείξεις βιοαποικοδόμησης, το ένα σε υψηλή (LCC) και το άλλο σε χαμηλή θερμοκρασία (PETase).

Τα γονίδια έκφρασης των βιοπληροφορικά ανακαλυπτόμενων πολυεστερασών, παρουσιάζονται ως εξής:

**Πίνακας 20:** Αμινοξική ακολουθία των, βιοπληροφορικά ανακαλυμμένων, μελετώμενων πολυεστερασών.

| Ένζυμο | Κατηγορία                | Αλληλουχία αμινοξέων γονιδίου <sup>*7</sup>  |
|--------|--------------------------|--|
| Dmest  | Λιπάση<br>τριγλυκεριδίων | <b>MKQIKSNTLLSLFAASALLFSLSA</b> AANNPAPTPTPTPTPGTSPAYQR<br>GPAPSVSFLQASRGDLSVRTSRVSSFTSGFGGGTIHYPTGTTGTMAAI<br>VVIPGYVSAESSIEWWGPKLASYGFVVMTIDTNSGFDQPPSRARQIN<br>SALDYLVSQNSSSRSPVRGMIDTNRLLGTVVWWSMGGGGTLRVAEEG<br>RIKAAIPLAPWDTTNFRDNYTPILIFACQSDVIAPVNHASPFYNQIPS<br>STDKAFVELSGGSHYCGNGGGVYNNVLGRLGVSWMKRHLDDQDTR<br>YDQFLCGPNHESDSRISEYRGNCN |
| Se1JFR | Λιπάση                   | <b>MDAANPYERGPAPTNASIEASRGPYA</b> TSQTSVSSLVASGFGGGTIY<br>YPTSTADGTFGAVVISPGFTA YQSSIAWLGPRLASQGFVVTIDTNTT<br>LDQPDSRGRQLLSALDYLQORSSVRTRVDATRLGVMGHSMGGGGS<br>LEAAKSRSTSLKAAIPLTGWNTDKTWPELRTPTLVVADGDTVAPVA<br>THSKPFYESLPGSLDKAYLELRGASHFTPTNTSDTTIAKYSISWLKRFID<br>SDTRYEQFLCPIPRSLTIAEYRGTCPHTSLEHHHHHHH                                      |

<sup>\*7</sup>: Στις αμινοξικές αλληλουχίες των γονιδίων με έντονη γραφή (bold) επισημαίνονται τα πεπτίδια σήματος (signal peptides), όπως αυτά προσδιορίστηκαν με την χρήση του βιοπληροφορικού αλγορίθμου SignalP-5.0 (2.1.2) Βιοπληροφορικά εργαλεία).

### 3.1.3) Βιοπληροφορική ευθυγράμμιση των γονιδίων πολυεστερασών

Τα γονίδια των παραπάνω ενζύμων ευθυγραμμίστηκαν, βιοπληροφορικά, με στόχο την παρατήρηση τόσο της ομοιότητας των αμινοξικών αλληλουχιών τους όσο και της επικάλυψης τους. Τέτοιες πληροφορίες αποτέλεσαν σημαντικό εργαλείο για την ομαδοποίηση των ενζύμων και την συγκριτική σύνδεση των αποτελεσμάτων της δράσης τους στα πολυεστερικά υλικά.

Η ευθυγράμμιση πραγματοποιήθηκε, μέσω του βιοπληροφορικού εργαλείου BLAST<sup>®</sup> (2.1.2) Βιοπληροφορικά εργαλεία) ως προς τα δύο βιβλιογραφικά δραστικότερα, από τα χρησιμοποιούμενα ένζυμα, έναντι στο PET, LCC και PETase, με τα αποτελέσματα να παρουσιάζονται, ως εξής :

**Πίνακας 21:** Αποτελέσματα ευθυγράμμισης των βιβλιογραφικά και βιοπληροφορικά επιλεγμένων ενζύμων ως προς το ένζυμο PETase.

| Ένζυμο | Επικάλυψη ως προς PETase (%) | Ομοιότητα ως προς PETase (%) |
|--------|------------------------------|------------------------------|
| Dmest  | 89                           | 51,33                        |
| FoCut  | -                            | -                            |
| HiC    | -                            | -                            |
| LCC    | 89                           | 48,67                        |
| PHAase | -                            | -                            |
| PHOase | -                            | -                            |
| PLAase | -                            | -                            |
| PUase  | -                            | -                            |
| Se1JFR | 88                           | 47,51                        |

Παρατηρείται ότι διακριτά αποτελέσματα ευθυγράμμισης προέκυψαν για τα ένζυμα Dmest, LCC και Se1JFR. Η ομολογία των υπολοίπων ενζύμων ως προς την PETase

ήταν μηδενική. Συγκεκριμένα τα αποτελέσματα επικάλυψης και ομοιότητας παρουσιάζονται αναλυτικότερα :

|        |     |   |     |
|--------|-----|---|-----|
| DMest  | 32  | YARGPNPTAASLEASAGPFTVRSFTVSR-PSGYGAGTVYYPTNAGGTVGAIIVPGYTAR   | 90  |
| PETase | 45  | Y RGP P+ + L+AS G +VR+ VS SG+G GT++YPT GT+ AI ++PGY +<br>YQ RGPAPSVSFLQASRGDLSVRTSRVSSFTSGFGGGTIHYPTGTTGTMAIIVIPGYVSA     | 104 |
| DMest  | 91  | QSSIKWGWPR LASHGFVITIDTNSTLDQPSSRSSQMAALRQVASLNGTSSSPIYGVKVD  | 150 |
| PETase | 105 | +SSI+WWGP+LAS+GFVV+TIDTNS DQP SR+ Q +AL + S N +S SP+ G +D<br>ESSIEWGWPKLASYG FVMTIDTNSGFDQPPSRARQINSALDYLVSQNSSSRSPVRGMID | 164 |
| DMest  | 151 | TARMGVMGWSMGGGSLISAANNPSLKAAPQAPWDSSTNFSSVTVPTLIFACENDSIAP  | 210 |
| PETase | 165 | T R+GV+GWSMGGGG+L A +KAA P APWD +TNF PTLIFAC++D IAP<br>TNRLGVVWWSMGGGGTL-RVAEEGRKAAIPLAPWD-TTNFRDNYTPTLIFACQSDVIAP        | 222 |
| DMest  | 211 | VNSSALPIYDSM-SRNAKQFLEINGGSHSCANSNGSNQALIGKKGVAMMKRFMDNDTRY   | 269 |
| PETase | 223 | VN A P Y+ + S K F+E++GGSH C N G ++G+ GV+WMKR +D DTRY<br>VNQHASPFPYQIPSSTDKAFVELSGGSHYCGNGGGVYNNVLGRLGVSWMKRHLDDQDTRYD     | 282 |
| DMest  | 270 | TFAC--ENPNSTRVSDFR TANCS  | 290 |
| PETase | 283 | F C + + +R+S++R NCS<br>QFLCGPNHESDSRISEYR-GNCS  | 304 |

**Εικόνα 19** : Ευθυγράμμιση των αμινοξικών αλληλουχιών των γονιδίων των ενζύμων Dmest και PETase.

|        |     |   |     |
|--------|-----|---|-----|
| LCC    | 30  | NPYARGPNPTAASLEASAGPFTVRSFTVSR--PSGYGAGTVYYPTN-AGGTVGAIIVPG   | 86  |
| PETase | 5   | NPY RGP PT AS+EAS GP+ +VS SG+G GT+YYPT+ A GT GA+ I PG<br>NPYERGPAPTNASIEASRGPYATSQTSVSSSLVASGFGGGTIYYPTSTADGTFGAWVISP | 64  |
| LCC    | 87  | Y TARQSSIKWGWPR LASHGFVITIDTNSTLDQPSSRSSQMAALRQVASLNGTSSSPIY  | 146 |
| PETase | 65  | +TA QSSI W GPRLAS GFVV TIDTN+TLDQP SR Q ++AL + T S +<br>FTAYQSSIAWLGPRLASQGFVVF TIDTNTTLDQPDSRGRQLLSALDYL-----TQRSSVR | 119 |
| LCC    | 147 | GKVD TARMGVMGWSMGGGSLISAANNPSLKAAPQAPWDSSTNFSSVTVPTLIFACEND   | 206 |
| PETase | 120 | +VD R+GVMG SMGGGSL +A + SLKAA P W++ + + PTL+ + D<br>TRVDATRLGVMGWSMGGGSLA AKSRTSLKAAIPLTGWNTDKTWPELRTPTLVVGADGD       | 179 |
| LCC    | 207 | SIAPVNSSALPIYDSMSRNA-KQFLEINGGSHSCANSNGSNQALIGKKGVAMMKRFMDND  | 265 |
| PETase | 180 | ++APV + + P Y+S+ + K +LE+ G SH N+ ++ I K ++W+KRF+D+D<br>TVAPVATHSKPFYESLPGSLDKAYLELRGASHFTPNTSDTT---IAKYSISWLKRFIDSD  | 236 |
| LCC    | 266 | TRYSTFACENPN-STRVSDFR   | 285 |
| PETase | 237 | TRY F C P S ++++R<br>TRYEQFLCPIPRPSLTIAEYR  | 257 |

**Εικόνα 20** : Ευθυγράμμιση των αμινοξικών αλληλουχιών των γονιδίων των ενζύμων LCC και PETase.

|        |     |   |     |
|--------|-----|---|-----|
| Se1JFR | 30  | NPYARGPNPTAASLEASAGPFTVRSFTVSR--PSGYGAGTVYYPTN-AGGTVGAIIVPG   | 86  |
| PETase | 5   | NPY RGP PT AS+EAS GP+ +VS SG+G GT+YYPT+ A GT GA+ I PG<br>NPYERGPAPTNASIEASRGPYATSQTSVSSSLVASGFGGGTIYYPTSTADGTFGAWVISP | 64  |
| Se1JFR | 87  | Y TARQSSIKWGWPR LASHGFVITIDTNSTLDQPSSRSSQMAALRQVASLNGTSSSPIY  | 146 |
| PETase | 65  | +TA QSSI W GPRLAS GFVV TIDTN+TLDQP SR Q ++AL + T S +<br>FTAYQSSIAWLGPRLASQGFVVF TIDTNTTLDQPDSRGRQLLSALDYL-----TQRSSVR | 119 |
| Se1JFR | 147 | GKVD TARMGVMGWSMGGGSLISAANNPSLKAAPQAPWDSSTNFSSVTVPTLIFACEND   | 206 |
| PETase | 120 | +VD R+GVMG SMGGGSL +A + SLKAA P W++ + + PTL+ + D<br>TRVDATRLGVMGWSMGGGSLA AKSRTSLKAAIPLTGWNTDKTWPELRTPTLVVGADGD       | 179 |
| Se1JFR | 207 | SIAPVNSSALPIYDSMSRNA-KQFLEINGGSHSCANSNGSNQALIGKKGVAMMKRFMDND  | 265 |
| PETase | 180 | ++APV + + P Y+S+ + K +LE+ G SH N+ ++ I K ++W+KRF+D+D<br>TVAPVATHSKPFYESLPGSLDKAYLELRGASHFTPNTSDTT---IAKYSISWLKRFIDSD  | 236 |
| Se1JFR | 266 | TRYSTFACENPN-STRVSDFR   | 285 |
| PETase | 237 | TRY F C P S ++++R<br>TRYEQFLCPIPRPSLTIAEYR  | 257 |

**Εικόνα 21** : Ευθυγράμμιση των αμινοξικών αλληλουχιών των γονιδίων των ενζύμων Se1JFR και PETase.

**Πίνακας 22:** Αποτελέσματα ευθυγράμμισης των βιβλιογραφικά και βιοπληροφορικά επιλεγμένων ενζύμων ως προς το ένζυμο LCC.

| Ένζυμο | Επικάλυψη ως προς LCC (%) | Ομοιότητα ως προς LCC (%) |
|--------|---------------------------|---------------------------|
| Dmest  | 93                        | 49,62                     |
| FoCut  | -                         | -                         |
| HiC    | -                         | -                         |
| PETase | 95                        | 48,48                     |
| PHAase | -                         | -                         |
| PHOase | -                         | -                         |
| PLAase | -                         | -                         |
| PUase  | -                         | -                         |
| Se1JFR | 97                        | 53,21                     |

Ομοίως με την ευθυγράμμιση ως προς το ένζυμο PETase, προέκυψαν και για το ένζυμο LCC τα ίδια σετ ενζύμων (Dmest, PETase, Se1JFR) με ευδιάκριτα αποτελέσματα, ενώ τα υπόλοιπα ένζυμα εμφάνισαν μηδενική ομολογία με την PETase. Τα αποτελέσματα επικάλυψης και ομοιότητας παρουσιάζονται αναλυτικότερα :

|       |     |   |     |
|-------|-----|---|-----|
| Dmest | 5   | YQRGPNPTRSALTAD-GPFSVATYTVSRLSVSGFGGGVIYYPTGTSLTFGGIAMSPGYTA  | 63  |
| LCC   | 45  | YQRGP P+ S L A G SV T VS + SGFGGG I+YPTGT+ T I + PGY + YQRGPAPSVSFLQASRGDLSVRTSRVSSFT-SGFGGGTIHYPTGTTGTMAAIWVIPGYVS | 103 |
| Dmest | 64  | DASSLAWLGRRLASHGFVVLVINTNSRFDGPDSTRASQLSAALNYL--RTSSPSAVRARL  | 120 |
| LCC   | 104 | SS+ W G +LAS+GFVV+ I+TNS FD P SRA Q+++AL+YL +SS S VR + AESSIEWGPKLASYGFFVMTIDTNSGFDQPPSRARQINSALDYLVSQNSSSRSPVRGMI  | 163 |
| Dmest | 121 | DANRLAVAGHSMGGGGTLRIAEQNPSLKAAPLTPWHTDKTFNTSVPVLIVGAEADTVAP   | 180 |
| LCC   | 164 | D NRL V G SMGGGGTLR+AE+ +KAA+PL PW T + P LI ++D +AP DTNRLGVVGSWGGGGTLRVAEEG-RIKAAIPLAPWDTTFRDNYTPTLIFACQSDVIAP      | 222 |
| Dmest | 181 | VSQHAIPFYQNLPTSTPKVYVELCNASHIAPNSN--NAAISVYTISSWMKLVNDNDTRYR  | 237 |
| LCC   | 223 | V+QHA PFY +PS+T K +VEL SH N N + +SWMK +D DTRY VNQHASPFFYNQIPSSDQKAFVELSGGSHYCGNGGGVYNNVLGRLGVSWMKRHLDDQDTRYD        | 282 |
| Dmest | 238 | QFLCNVN---DPALCDFRTN  | 254 |
| LCC   | 283 | QFLC N D + ++R N QFLCGPNHESDSRISEYRGN   | 302 |

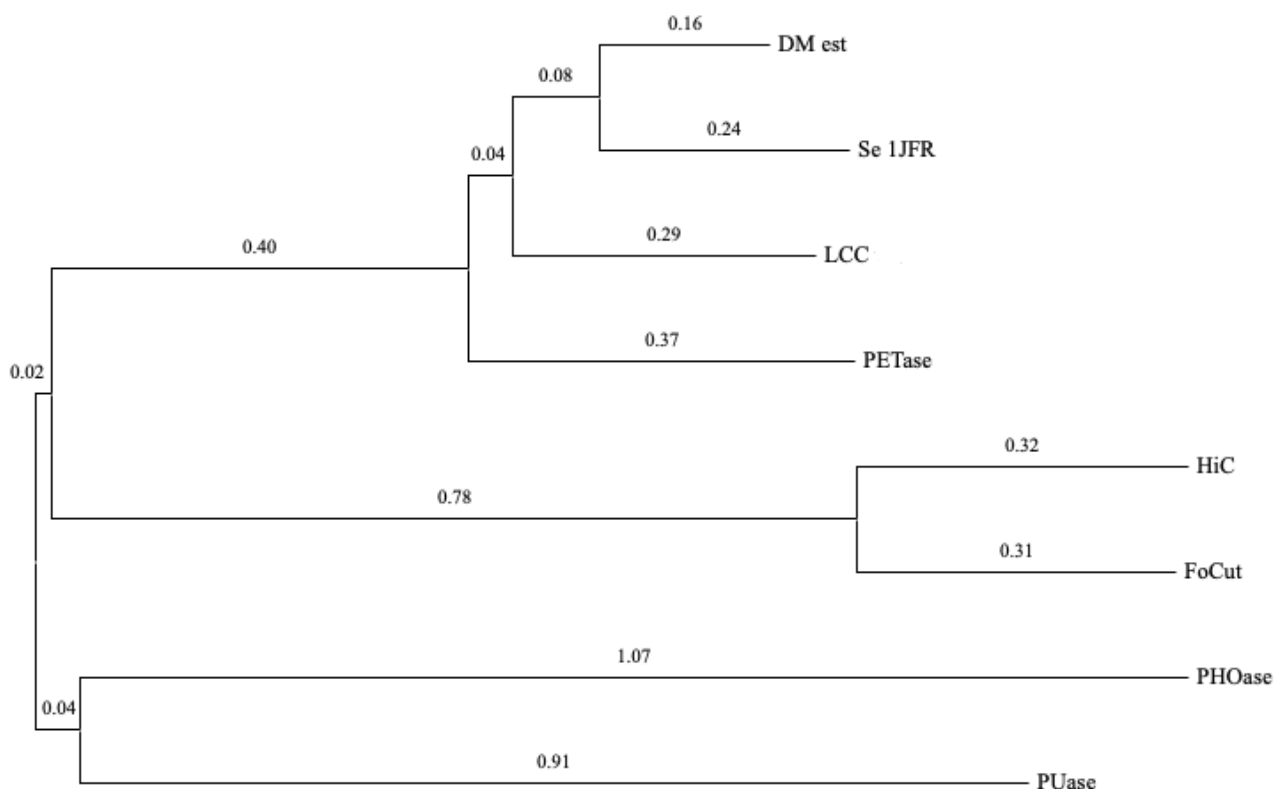
**Εικόνα 22:** Ευθυγράμμιση των αμινοξικών αλληλουχιών των γονιδίων των ενζύμων Dmest και LCC.

|        |     |   |     |
|--------|-----|---|-----|
| Se1JFR | 2   | SNPYQRGPNPTRSALTAD-GPFSVATYTVSRLSVSGFGGGVIYYPTGTSL-TFGGIAMSP  | 59  |
| LCC    | 4   | +NPY+RGP PT +++ A GP++ + +VS L SGFGGG IYYPT T+ TFG + +SP ANPYERGPAPTNASIEASRGPYATSQTSVSSLVASGFGGGTIYYPTSTADGTFGAVVISP | 63  |
| Se1JFR | 60  | GYTADASSLAWLGRRLASHGFVVLVINTNSRFDGPDSTRASQLSAALNYLRTSSPSAVRAR   | 119 |
| LCC    | 64  | G+TA SS+AWLG RLAS GFVV I+TN+ D PDSR QL +AL+YL + S+VR R GFTAYQSSIAWLGPRLASQGFVVFITDNTTLDQPDSTRGRQLLSALDYL--TQRSSVRTR   | 121 |
| Se1JFR | 120 | LDANRLAVAGHSMGGGGTLRIAEQNPSLKAAPLTPWHTDKTF-NTSVPVLIVGAEADTV   | 178 |
| LCC    | 122 | +DA RL V GHSMGGGG+L A+ SLKAA+PLT W+TDKT+ P L+VGA+ DTV VDATR LGVMGHSMGGGGSLEAAKSRTSLKAAIPLTGWNTDKTWPELRTPTLVVGADGDTV   | 181 |
| Se1JFR | 179 | APVSQHAIPFYQNLPTSTPKVYVELCNASHIAPNSNNAAISVYTISSWMKLVNDNDTRYRQ   | 238 |
| LCC    | 182 | APV+ H+ PFY++LP + K Y+EL ASH PN+++ I+ Y+ISW+K ++D+DTRY Q APVATHSKPFYESLPGSLDKAYLELRGASHFTPNSTDTTIAKYSISWLKRFIDSDTRYEQ | 241 |
| Se1JFR | 239 | FLCNVNDPAL--CDFRTNNRHCQLE   | 261 |
| LCC    | 242 | FLC + P+L ++R H LE FLCPIRPSLTI AEYRGTCPTSLE   | 266 |

**Εικόνα 23:** Ευθυγράμμιση των αμινοξικών αλληλουχιών των γονιδίων των ενζύμων Se1JFR και LCC.

### 3.1.4) Φυλογενετικό δέντρο πολυεστερασών

Η ευθυγράμμιση των αλληλουχιών των οκτώ, τελικά παραγόμενων (3.2.3) Τελική έκφραση πολυεστερασών με βελτιστοποιημένα πρωτόκολλα), πολυεστερασών οπτικοποιήθηκε, με την βοήθεια κατάλληλου λογισμικού, μέσω της κατασκευής φυλογενετικού δέντρου, το οποίο προέκυψε ως εξής :



**Εικόνα 24** : Φυλογενετικό δέντρο που κατασκευάστηκε βάσει της μεθόδου “Neighbor-Joining” [213]. Τα μήκη των «κλαδιών» (τιμές που αναγράφονται πάνω από αυτά) αντιπροσωπεύουν τις αποστάσεις ομολογίας των πολυεστερασών. Αυτές υπολογίστηκαν βάσει της μεθόδου “Poisson correction method” [214] και έχουν μονάδες «υποκαταστατών αμινοξέων ανά θέση». Η ανάλυση βασίστηκε σε 8 διαφορετικές αμινοξικές αλληλουχίες. Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού MEGA11 [215], [216].

Με μια πρώτη παρατήρηση, επιβεβαιώνονται τα αποτελέσματα ομολογίας που προέκυψαν από την ευθυγράμμιση μέσω του λογισμικού BLAST<sup>®</sup>, ως προς τις γνωστές PET-υδρολάσες, PETase και LCC. Συγκεκριμένα στο ίδιο κλαδί με αυτές ανήκουν μόνο τα ένζυμα Dmest και Se1JFR, τα μοναδικά που εμφάνισαν ομολογία σύμφωνα με τα αποτελέσματα του 3.1.3) Βιοπληροφορική ευθυγράμμιση των γονιδίων πολυεστερασών. Ειδικότερα οι Dmest και Se1JFR, που ανήκουν στο ίδιο κλαδί και σε κοντινές αποστάσεις γεγονός που υποδεικνύει σημαντική ομολογία μεταξύ τους, δείχνουν μεγαλύτερη ομοιότητα με την LCC και στη συνέχεια με την PETase, η οποία βρίσκεται κοντινότερα της LCC. Από την ανάλυση του φυλογενετικού δέντρου προκύπτει επίσης ότι στο ίδιο κλαδί, μόνες τους και σε ελάχιστη απόσταση μεταξύ τους, βρίσκονται οι μυκητιακές κουτινάσες HiC και FoCut, αρκετά απομακρυσμένες, όμως, από το κλαδί των PET-υδρολασών και των ενζύμων Dmest και Se1JFR, γεγονός που υποδηλώνει μεγάλες διαφορές των αμινοξικών αλληλουχιών τους. Τέλος οι

πολυεστεράσες PHOase και PUase βρίσκονται αρκετά απομακρυσμένες από όλες τις πολυεστεράσες ενώ μεταξύ τους παρουσιάζουν ομολογία αφού βρίσκονται στο ίδιο κλαδί.

## 3.2) Ετερόλογη έκφραση πολυεστερασών

### 3.2.1) Ετερόλογη έκφραση πολυεστερασών ακολουθώντας συμβατικό πρωτόκολλο

Η προσπάθεια έκφρασης των επιθυμητών πολυεστερασών πραγματοποιήθηκε αρχικά ακολουθώντας το συμβατικό πρωτόκολλο ετερόλογης έκφρασης στο βακτήριο *E. coli*, το οποίο αφορούσε τα στελέχη *E. coli* BL21 (DE3), για ανάπτυξη τους σε θρεπτικό υλικό LB σε θερμοκρασία 37 °C ( $T_{GROWTH} = 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ), με έναρξη της επαγωγής σε κυτταρική πυκνότητα οπτικής απορρόφησης στα 600 nm ίση με 0,8 ( $OD_{600nm}=0,8$ ), θερμοκρασία επαγωγής 16 °C ( $T_{INDUCTION} = 16 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ), συγκέντρωση επαγωγέα IPTG 0,2 mM ( $C_{IPTG}=0,2 \text{ mM}$ ), και χρόνο επαγωγής overnight ( $t_{INDUCTION}\approx 17-20 \text{ h}$ ), σε υγρές καλλιέργειες των 500 mL, ακολουθώντας την πειραματική μέθοδο όπως αναλύθηκε στο υποκεφάλαιο 2.2.2) Παραγωγή πολυεστερασών.

Τα ποσοτικά αποτελέσματα της συγκέντρωσης των εκφρασμένων πολυεστερασών, προσδιορίστηκαν με αναγωγή της απορρόφησης, του κλάσματος “Im. 100B” της διαδικασίας απομόνωσης της επιθυμητής πρωτεΐνης με χρωματογραφία IMAC, στα 280 nm, χρησιμοποιώντας τον νόμο Beer-Lambert (2.2.3.1) Ποσοτικός προσδιορισμός παραγόμενων πολυεστερασών με τη μέθοδο Beer-Lambert), και παρουσιάζονται ως εξής :

**Πίνακας 23** : Ενζυμική συγκέντρωση επιθυμητών πολυεστερασών ακολουθώντας συμβατικό πρωτόκολλο έκφρασης σε *E. coli* BL21 (DE3).

| Συνθήκες έκφρασης                 |            | Πολυεστεράση  | Ενζυμική συγκέντρωση κλάσματος “Im. 100B” (mg/mL) ( $C_{ENZ}$ ) |
|-----------------------------------|------------|---------------|---|
| <b>Στέλεχος <i>E. coli</i></b>    | BL21 (DE3) | Dmest         | 0,06  |
| <b>Θρεπτικό μέσο</b>              | LB         | <b>FoCut</b>  | <b>3,67</b>   |
| <b><math>T_{GROWTH}</math></b>    | 37 °C      | <b>HiC</b>    | <b>5,46</b>   |
| <b><math>OD_{600nm}</math></b>    | 0,8        | <b>LCC</b>    | <b>0,51</b>   |
| <b><math>T_{INDUCTION}</math></b> | 16 °C      | <b>PETase</b> | <b>1,03</b>   |
| <b><math>C_{IPTG}</math></b>      | 0,2 mM     | PHAase        | 0,08  |
| <b><math>t_{INDUCTION}</math></b> | 17-20 h    | PHOase        | 0,03  |
|                                   |            | PLAase        | 0,05  |
|                                   |            | PUase         | 0,05  |
|                                   |            | Se1JFR        | 0,10  |



Από τις τελικές ενζυμικές συγκεντρώσεις ικανοποιητικές τιμές, ως προς την επιθυμητή συγκέντρωση για τα πειράματα που θα ακολουθούσαν αλλά και λαμβάνοντας υπ' όψη την οικονομική επιβάρυνση έκφρασης (όσον αφορά τον όγκο των καλλιιεργειών και τη ποσότητα των χρησιμοποιούμενων αντιδραστηρίων), εμφάνισαν οι πολυεστεράσες FoCut, HiC, PETase και LCC. Το γεγονός αυτό ήταν αναμενόμενο αφού τα συγκεκριμένα ένζυμα είχαν εκφρασθεί, ομοίως, βιβλιογραφικά από πληθώρα ερευνητών.

Οι συγκεντρώσεις των υπολοίπων ενζύμων κρίθηκαν μη ικανοποιητικές και για τον λόγο αυτό έλαβε χώρα μια σειρά πειραμάτων βελτιστοποίησης της ετερόλογης έκφρασης τους, μεταβάλλοντας τους παράγοντες που επηρεάζουν την διεργασία άμεσα, όπως αυτοί αναφέρθηκαν στο υποκεφάλαιο 1.4.2.3) Παράγοντες που επηρεάζουν την ετερόλογη έκφραση ενζύμων, με σκοπό την παραγωγή τους στην επιθυμητή ποσότητα και συγκέντρωση.

### 3.2.2) Βελτιστοποίηση ετερόλογης έκφρασης πολυεστερασών με μεταβολή παραμέτρων

Οι πολύ χαμηλές πρωτεϊνικές συγκεντρώσεις κατά την έκφραση ακολουθώντας το συμβατικό πρωτόκολλο ήταν πιθανό να οφείλονται σε πληθώρα αιτιών, με τις σημαντικότερες να αφορούν :

1) Στην υψηλή πιθανότητα δημιουργίας πρωτεϊνικών εγκλείστων, λόγω υπερέκφρασης των επιθυμητών πρωτεϊνών. Τα πρωτεϊνικά εγκλείστα, θα έπρεπε να απομονωθούν και να επαναδιαλυτοποιηθούν, προκειμένου να παραληφθεί η πρωτεΐνη, διεργασία αρκετά δύσκολη και χρονοβόρα.

2) Στην σημαντική δυσκολία αναδίπλωσης των πρωτεϊνών κατά την έκφραση τους (κυρίως λόγω έλλειψης των κατάλληλων ενζύμων του ξενιστή *E. coli*), με αποτέλεσμα την αδυναμία διαλυτοποίησης τους στον ενδοκυτταρικό χώρο, προς παραλαβή τους.

3) Στην φύση των πρωτεϊνών, με χαρακτηριστικό παράδειγμα, στην περίπτωση των μελετώμενων πολυεστερασών, αυτές που ανήκουν στην κατηγορία των πρωτεασών (όπως η PLAase), οι οποίες εύκολα και γρήγορα αποικοδομούνται πρωτεολυτικά από ενδοπρωτεάσες του *E. coli*. Το παραπάνω μπορεί να οφείλεται στην δράση των επιθυμητά παραγόμενων πρωτεασών οι οποίες κατά την παραγωγή τους ίσως αποικοδομούν εσωτερικά βακτηριακά πεπτιδικά μόρια με αποτέλεσμα να αναγνωρίζονται ως «κίνδυνος» για το κύτταρο, και οι βακτηριακές ενδοπρωτεάσες να στρέφονται προς διάσπαση τους. Επομένως κατά την παραγωγή τους, καταστρέφονται από τον ξενιστή.

4) Στην δυσκολία ή καθυστέρηση έκφρασης του γονιδίου από τον ξενιστή ή την χαμηλή κυτταρική ανάπτυξη, φαινόμενα τα οποία οφείλονται στην έλλειψη απαραίτητων συστατικών στο θρεπτικό μέσο, και οδηγούν στην παραγωγή μικρών ποσοτήτων πρωτεΐνης, χαμηλής τελικής συνολικής συγκέντρωσης.

Τα πειράματα βελτιστοποίησης της ετερόλογης έκφρασης των υπολιπόντων πολυεστερασών επικεντρώθηκαν στην επίλυση των παραπάνω πιθανών προβλημάτων, μέσω μελέτης της επίδρασης παραγόντων της διεργασίας, οι οποίοι κατηγοριοποιούνται ως εξής :

1) Παράγοντες που συμβάλλουν στην πρόληψη σχηματισμού πρωτεϊνικών εγκλείστων :

- **Συγκέντρωση IPTG (C<sub>IPTG</sub>) :** Η συγκέντρωση του IPTG επηρεάζει αισθητά την υπερέκφραση των πρωτεϊνών αφού αποτελεί τον επαγωγέα που ενεργοποιεί την διαδικασία έκφρασης των επιθυμητών γονιδίων. Μεγάλες συγκεντρώσεις IPTG συνεπάγονται συνεχή έκφραση των γονιδίων από τα κύτταρα του ξενιστή *E. coli* ενώ αντίστοιχα χαμηλότερες συγκεντρώσεις περιορίζουν την υπερέκφραση των γονιδίων (λιγότερα μόρια αναγνωρίζονται από τον υποκινητή και το γονίδιο του καταστολέα υπερεκφράζεται), συμβάλλοντας στην πρόληψη σχηματισμού πρωτεϊνικών εγκλείστων. Στα πειράματα βελτιστοποίησης έκφρασης των πολυεστερασών χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις IPTG σε εύρος που κυμαίνεται από 0,05 mM έως 1,0 mM (C<sub>IPTG</sub>=0,05-1,0 mM).
- **Χρόνος επαγωγής (t<sub>INDUCTION</sub>) :** Ο χρόνος επαγωγής επηρεάζει αναλογικά την απόδοση της ετερόλογης έκφρασης των πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα είναι αντιληπτό ότι για μεγάλους χρόνους επαγωγής το γονίδιο της επιθυμητής πρωτεΐνης εκφράζεται συνεχώς με αποτέλεσμα την υπερέκφραση του (εφόσον η συγκέντρωση του IPTG θεωρείται πρακτικά σταθερή αφού δεν μεταβολίζεται από τα κύτταρα), ενώ αντίστοιχη μείωση του χρόνου επαγωγής περιορίζει την διάρκεια έκφρασης του γονιδίου συμβάλλοντας στην πρόληψη της δημιουργίας πρωτεϊνικών εγκλείστων. Στα πειράματα βελτιστοποίησης έκφρασης των πολυεστερασών μελετήθηκαν χρόνοι επαγωγής 4 h και 24 h (t<sub>INDUCTION</sub> = 4 h, 24 h).
- **Προσθήκη «καταστολέα έκφρασης»-γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο :** Η προσθήκη γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας επιβραδύνει σημαντικά τους ρυθμούς έκφρασης της πρωτεΐνης επηρεάζοντας άμεσα την λειτουργία του οπερονίου. Συγκεκριμένα, παρουσία γλυκόζης, η πρωτεΐνη ενεργοποίησης CAP δεν προσδένεται στην ρυθμιστική αλληλουχία του DNA, με αποτέλεσμα η RNA πολυμεράση να μεταγράφει μη αποτελεσματικά το επιθυμητό γονίδιο (αφού δεν υπάρχει η αλληλεπίδραση της με την πρωτεΐνη ενεργοποίησης), με τελικό αποτέλεσμα την μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης. Στα πειράματα βελτιστοποίησης έκφρασης των πολυεστερασών μελετήθηκε η προσθήκη ποσότητας γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο ίση με 1% w/v (C<sub>GLUCOSE</sub> = 1% w/v).
- **Θερμοκρασία ανάπτυξης (T<sub>GROWTH</sub>) :** Η μείωση της θερμοκρασίας, κατά την ανάπτυξη των κυττάρων, συστήνεται κυρίως σε συνθήκες υπερέκφρασης και στοχεύει στον περιορισμό της κυτταρικής ανάπτυξης η οποία συνεπάγεται και μειωμένους ρυθμούς πρωτεϊνικής έκφρασης. Με αυτό το τρόπο περιορίζεται η

συσσώρευση της ετερόλογα εκφρασμένης πρωτεΐνης γεγονός που προλαμβάνει την δημιουργία πρωτεϊνικών εγκλείστων. Έτσι στα πειράματα βελτιστοποίησης μελετήθηκαν θερμοκρασίες ανάπτυξης των βακτηρίων *E. coli* στους 37 °C και 25 °C ( $T_{GROWTH} = 25\text{ }^{\circ}\text{C}, 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

2) Παράγοντες που συμβάλλουν στην βελτίωση της διαλυτότητας των παραγόμενων πρωτεϊνών :

- **Θρεπτικό μέσο :** Η διαλυτότητα των παραγόμενων πολυεστερασών επηρεάζεται άμεσα από τα συστατικά του θρεπτικού μέσου, στο οποίο λαμβάνει χώρα η έκφραση. Κατάλληλα πεπτίδια, πεπτόνες, αμινοξέα, βιταμίνες, ιχνοστοιχεία και άλατα βοηθούν σημαντικά στην σωστή αναδίπλωση των ετερόλογα παραγόμενων πρωτεϊνών από τα βακτηριακά κύτταρα. Στα πειράματα βελτιστοποίησης μελετήθηκε η χρήση θρεπτικού μέσου **2×YT** (2.1.4.1) Θρεπτικά υλικά), με τις αναλογίες των συστατικών του να στοχεύουν στην σωστή διαλυτοποίηση των πολυεστερασών.
- **Στελέχος ξενιστή *E. coli*:** Τα κύτταρα *E. coli*, όπως και αυτά των επιδεκτικών στελεχών BL21 (DE3), εμπεριέχουν στο γονιδίωμά τους, γονίδια έκφρασης πρωτεϊνικών μορίων που συμβάλλουν στην σωστή αναδίπλωση των, εκ φύσεως, παραγόμενων πρωτεϊνών τους. Τα chaperones αυτά εκφράζονται σε συνθήκες ανάπτυξης των βακτηρίων, οι οποίες κυμαίνονται σε υψηλές τιμές θερμοκρασιών ( $\approx 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Παρ' όλα αυτά η ετερόλογη έκφραση λαμβάνει χώρα σε χαμηλές θερμοκρασίες όπου οι παραπάνω πρωτεΐνες δεν δύναται να λειτουργήσουν ικανοποιητικά, προς πραγματοποίηση των κατάλληλων μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων διαλυτοποίησης στις επιθυμητές, ετερόλογα εκφρασμένες, πρωτεΐνες. Τα επιδεκτικά κύτταρα *E. coli* του στελέχους ArcticExpress (DE3), έχουν κατασκευαστεί κατάλληλα ώστε να εμπεριέχουν σε πλασμίδια γονίδια έκφρασης κατάλληλων ψυχρόφιλων chaperones, που δρουν ικανοποιητικά στις χαμηλές θερμοκρασίες επαγωγής, με αποτέλεσμα την συμβολή τους στην σωστή αναδίπλωση της παραγόμενης πρωτεΐνης, αυξάνοντας τη διαλυτότητα της και την τελική παραλαβή της σε υψηλές συγκεντρώσεις. Η έκφραση των πολυεστερασών με τη χρήση στελεχών *E. coli ArcticExpress (DE3)* έλαβε χώρα στα πειράματα βελτιστοποίησης.
- **Ρυθμός ανάδευσης :** Ο ρυθμός ανάδευσης καθορίζει τα μεταβολικά μονοπάτια του κυττάρου, αφού από αυτόν εξαρτάται η σωστή οξυγόνωση των κυττάρων καθώς και η πρόσληψη των απαραίτητων θρεπτικών συστατικών από το μέσο ανάπτυξης. Μείωση του ρυθμού ανάδευσης λοιπόν περιορίζει τον ρυθμό των κυτταρικών διεργασιών, όπως αυτή της μεταγραφής, με αποτέλεσμα να επιβραδύνεται και να δίνεται χρόνος για την σωστή αναδίπλωση των πολυεστερασών κατά την παραγωγή τους. Στα πειράματα βελτιστοποίησης μελετήθηκαν ρυθμοί ανάδευσης **0 rpm & 180 rpm**.

- **Θερμοκρασία ανάπτυξης ( $T_{GROWTH}$ )** : Η μείωση της θερμοκρασίας κατά την ανάπτυξη των κυττάρων συστήνεται κυρίως σε συνδυασμό με την χρήση των στελεχών *E. coli* ArcticExpress (DE3) και στοχεύει στην έναρξη έκφρασης των ψυχρόφιλων chaperones που βοηθούν στην σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνικών μορίων. Έτσι στα πειράματα βελτιστοποίησης μελετήθηκαν θερμοκρασίες ανάπτυξης των βακτηρίων *E. coli* στους 37 °C και 25 °C, για χρήση στελεχών *E. coli* ArcticExpress (DE3) ( $T_{GROWTH} = 25\text{ °C}, 37\text{ °C}$ ).

3) Παράγοντες που συμβάλλουν στην πρόληψη αποικοδόμησης των παραγόμενων πρωτεϊνών από ενδοπρωτεάσες του *E. coli*:

- **Χρόνος επαγωγής ( $t_{INDUCTION}$ )** : Η αποικοδόμηση των παραγόμενων πρωτεϊνών από πρωτεολυτικά ένζυμα του *E. coli*, μπορεί να προληφθεί με την μείωση του χρόνου επαγωγής, που έχει ως αποτέλεσμα την έκφραση της επιθυμητής πρωτεΐνης για σύντομο χρονικό διάστημα, γεγονός που συνεπάγεται τον περιορισμό της πιθανής πρωτεολυτικής δράσης της σε βακτηριακά μόρια. Με τον τρόπο αυτό ίσως περιοριστεί και η δράση των ενδοπρωτεασών του *E. coli* προς καταστροφή της ετερόλογα εκφρασμένης πρωτεΐνης. Στα πειράματα βελτιστοποίησης μελετήθηκαν για τον παραπάνω σκοπό, μειωμένοι χρόνοι επαγωγής των 4 h, πέρα των overnight εκφράσεων ( $t_{INDUCTION} = 4\text{ h} \& 24\text{ h}$ ).

4) Παράγοντες που συμβάλλουν στην αύξηση της έκφρασης των επιθυμητών γονιδίων των πολυεστερασών:

- **Θρεπτικό μέσο** : Ομοίως με την σωστή αναδίπλωση της πρωτεΐνης, τα συστατικά των θρεπτικών μέσων, μπορούν να στοχεύσουν και στην βελτίωση της έκφρασης των γονιδίων των πολυεστερασών, μέσω της συμβολής τους στην αύξηση της κυτταρικής πυκνότητας των καλλιιεργειών. Συνοπτικά, όσο περισσότερα είναι τα κύτταρα του ξενιστή που εκφράζουν ετερόλογα την επιθυμητή πολυεστεράση τόσο μεγαλύτερες θα είναι και οι τελικές παραλαμβανόμενες ενζυμικές συγκεντρώσεις. Στα πειράματα βελτιστοποίησης μελετήθηκε η χρήση θρεπτικού μέσου **TB** (2.1.4.1) Θρεπτικά υλικά), με τις αναλογίες των συστατικών του (θρεπτικά συστατικά, άλατα, βιταμίνες και άλλα) να επιτρέπουν την υψηλή κυτταρική ανάπτυξη ( $OD_{600nm} = 2,5, 3,0$ ).

Σύμφωνα με τα παραπάνω λοιπόν έλαβαν χώρα πειράματα ετερόλογης έκφρασης των επιθυμητών πολυεστερασών στον ξενιστή *E. coli*, με πρωτόκολλα που αφορούσαν συνδυαστικές μεταβολές των παραγόντων που προαναφέρθηκαν. Λόγω της κοινής φύσης των πολυεστερασών (βακτηριακές υδρολάσες) πολλά ήταν τα πρωτόκολλα έκφρασης που δεν επαναλαμβάνονταν σε όλα τα ένζυμα με τις επακριβώς ίδιες συνθήκες αλλά με μερικές μεμονωμένες παραμετρικές μεταβολές, με σκοπό την μελέτη πληθώρας παραγόντων, λαμβάνοντας υπ' όψη την έλλειψη βιβλιογραφίας, θεωρώντας ότι όλες οι πολυεστεράσες θα αντιδρούν παρόμοια σε ίδιες μεταβολές.

Τα ποσοτικά αποτελέσματα των ενζυμικών συγκεντρώσεων των διαφορετικών ακολουθούμενων πρωτοκόλλων για κάθε πολυεστεράση ξεχωριστά αναφέρονται αναλυτικά στην συνέχεια καθώς και η προσπάθεια αναγνώρισης του πιθανού αρχικού προβλήματος έκφρασης μέσω του συμβατικού πρωτοκόλλου. .

### 3.2.2.1) Βελτιστοποίηση ετερόλογης έκφρασης πολυεστεράσης Dmest

Τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν για την ετερόλογη έκφραση της πολυεστεράσης Dmest, σε ξενιστή βακτήριο *E. coli*, καθώς και οι τελικές παραλαμβανόμενες ενζυμικές συγκεντρώσεις, έχουν ως εξής:

**Πίνακας 24:** Αποτελέσματα βελτιστοποίησης ετερόλογης έκφρασης της πολυεστεράσης Dmest με τις τελικές παραλαμβανόμενες ενζυμικές συγκεντρώσεις.

| Συνθήκες έκφρασης<br>(V CULTURE / Στέλεχος <i>E. coli</i> / Θρεπτικό μέσο / T GROWTH / OD <sub>600nm</sub> / T INDUCTION / C IPTG / t INDUCTION / rpm) | Ενζυμική συγκέντρωση κλάσματος “Im. 100B” (CENZ) |
|--|--|
| 100 mL / BL21 (DE3) / LB / 37 °C / 0,8 / 16 °C / 0,2 mM / 20 h / 180 rpm   | 3,18 mg/mL <sup>*8</sup>                         |
| 100 mL / Arc.Exp. (DE3) / LB / 37 °C / 0,8 / 16 °C / 0,2 mM / 20 h / 180 rpm   | 1,56 mg/mL <sup>*8</sup>                         |
| 500 mL / BL21 (DE3) / LB / 37 °C / 0,8 / 16 °C / 0,5 mM / 20 h / 180 rpm   | 0,05 mg/mL                                       |
| 500 mL / BL21 (DE3) / LB 1% glucose / 37 °C / 0,8 / 16 °C / 1,0 mM / 20 h / 180 rpm  | 0,02 mg/mL                                       |
| 500 mL / BL21 (DE3) / 2×YT / 37 °C / 0,8 / 16 °C / 0,2 mM / 20 h / 180 rpm   | 0,20 mg/mL                                       |
| 500 mL / BL21 (DE3) / TB / 37 °C / 2,5 / 16 °C / 0,2 mM / 20 h / 180 rpm   | 0,32 mg/mL                                       |
| 500 mL / BL21 (DE3) / TB / 37 °C / 2,5 / 16 °C / 0,2 mM / 20 h / 0 rpm   | 0,01 mg/mL                                       |
| <b>500 mL / BL21 (DE3) / TB / 37 °C / 2,5 / 16 °C / 0,5 mM / 20 h / 180 rpm</b>  | <b>0,36 mg/mL</b>                                |
| 500 mL / BL21 (DE3) / TB / 37 °C / 2,5 / 16 °C / 0,5 mM / 20 h / 0 rpm   | 0,0005 mg/mL                                     |

<sup>\*8</sup> : Οι συγκεντρώσεις προέκυψαν από απορροφήσεις στα 750 nm, δείγματος του αραιωμένου (10 φορές) παραλαμβανόμενου εσωκυτταρικού περιεχομένου των *E. coli*, έπειτα από μηχανική λύση, που εμπειρείχε την επιθυμητή πολυεστεράση Dmest, αλλά και περαιτέρω βακτηριακές πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα και άλλα. Οι απορροφήσεις ποσοτικοποιήθηκαν προς συνολική πρωτεϊνική συγκέντρωση όλων των προαναφερθέντων εμπεριεχόμενων μορίων στο δείγμα, χρησιμοποιώντας κατάλληλη καμπύλη αναφοράς (2.2.3.2) Ποσοτικός προσδιορισμός παραγόμενων πολυεστερασών με τη μέθοδο Lowry) και οι συγκεντρώσεις συγκρίθηκαν μεταξύ τους, προκειμένου να προσδιοριστεί το καλύτερο στέλεχος *E. coli* για την ετερόλογη έκφραση (θεωρώντας ότι όλο το πρωτεϊνικό περιεχόμενο πλην της Dmest ήταν όμοιο και για τα δυο διαφορετικά βακτηριακά στελέχη *E. coli*, BL21 (DE3) και ArcticExpress (DE3). Μεγαλύτερη προσδιορίζεται η συγκέντρωση του πρωτεϊνικού περιεχομένου των *E. coli* BL21 (DE3), τα οποία και επιλέχθηκαν για την βελτιστοποίηση έκφρασης της Dmest.

Από τα 9 διαφορετικά πρωτόκολλα που ακολουθήθηκαν για την ετερόλογη έκφραση της Dmest σε *E. coli*, επιλέχθηκε αυτό που εμφάνισε την μεγαλύτερη ενζυμική συγκέντρωση στο τελικό κλάσμα της IMAC “Im. 100B”, τιμής 0,36 mg<sub>Dmest</sub>/mL. Έτσι,

η έκφραση της Dmest έλαβε χώρα σε στελέχη *E. coli* BL21 (DE3), σε καλλιέργειες θρεπτικού μέσου TB, με θερμοκρασία ανάπτυξης των κυττάρων ίση με 37 °C και τελική κυτταρική πυκνότητα με οπτική απορρόφηση στα 600 nm ίση με 2,5, θερμοκρασία επαγωγής 16 °C, προκαλούμενη από τη προσθήκη IPTG συγκέντρωσης 0,5 mM, για 20 h, υπό ανάδευση.

Γενικότερα, το ένζυμο Dmest εμφάνισε, καθ' όλη την διαδικασία της βελτιστοποίησης έκφρασης του, σημαντική δυσχέρεια παραγωγής στα θρεπτικά μέσα LB και 2×YT, ενώ η αλλαγή του θρεπτικού υλικού σε TB βελτίωσε αισθητά τις παραγόμενες ποσότητες της πρωτεΐνης. Σύμφωνα με τα παραπάνω λοιπόν το γονίδιο της Dmest δεν υπερεκφραζόταν, αφού η μείωση συγκεντρώσεων του επαγωγέα, η προσθήκη γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο ή μείωση του ρυθμού ανάδευσης δεν έφεραν βελτιωμένα αποτελέσματα. Παράλληλα γίνεται αντιληπτό ότι ούτε εκφραζόταν με δυσκολία σωστής αναδίπλωσης, το οποίο θα είχε ως αποτέλεσμα την αδιάλυτη μορφή του στον εσωκυτταρικό χώρο η οποία δεν θα μπορούσε να παραληφθεί, αφού το θρεπτικό υλικό 2×YT συμβάλλει στην σωστή αναδίπλωση της παραγόμενης πρωτεΐνης. Το πρόβλημα της αρχικής έκφρασης αφορούσε την ένταση της έκφρασης του γονιδίου της Dmest από τα κύτταρα, η οποία ήταν σημαντικά μικρή. Έτσι αυτή σε όλα τα πρωτόκολλα παραγόταν από τα κύτταρα αλλά σε πολύ μικρή ποσότητα. Με την αύξηση της συγκέντρωσης του επαγωγέα IPTG ( $C_{IPTG} = 0,5 \text{ mM}$ ) καθώς και με την έντονη ενίσχυση της κυτταρικής πυκνότητας της καλλιέργειας λόγω χρήσης θρεπτικού υλικού TB, τα κύτταρα που παράγουν μικρές ποσότητες της Dmest σχεδόν υπερτριπλασιάστηκαν (από  $OD_{600nm, LB \& 2 \times YT} = 0,8$  σε  $OD_{600nm, TB} = 2,5$ ), οπότε οι χαμηλές αυτές ποσότητες παραγόμενης πρωτεΐνης πολλαπλασιάστηκαν με την σειρά τους, με αποτέλεσμα την παραγωγή της επιθυμητής πολυεστεράσης Dmest σε σχετικά υψηλή συγκέντρωση ( $C_{Dmest} = 0,36 \text{ mg}_{Dmest}/\text{mL}$ ).

### 3.2.2.2) Βελτιστοποίηση ετερόλογης έκφρασης πολυεστεράσης PHAase

Τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν για την ετερόλογη έκφραση της πολυεστεράσης PHAase, σε ξενιστή βακτήριο *E. coli*, καθώς και οι τελικές παραλαμβανόμενες ενζυμικές συγκεντρώσεις, έχουν ως εξής:

**Πίνακας 25** : Αποτελέσματα βελτιστοποίησης ετερόλογης έκφρασης της πολυεστεράσης PHAase με τις τελικές παραλαμβανόμενες ενζυμικές συγκεντρώσεις.

| Συνθήκες έκφρασης<br>( $V_{CULTURE}$ / Στέλεχος <i>E. coli</i> / Θρεπτικό μέσο / $T_{GROWTH}$ / $OD_{600nm}$ / $T_{INDUCTION}$ / $C_{IPTG}$ / $t_{INDUCTION}$ / rpm) | Ενζυμική συγκέντρωση κλάσματος "Im. 100B" ( $C_{ENZ}$ ) |
|--|---|
| 100 mL / BL21 (DE3) / LB / 37 °C / 0,8 / 16 °C / 0,2 mM / 20 h / 180 rpm   | 0,13 mg/mL <sup>*8</sup>                                |
| 100 mL / Arc.Exp. (DE3) / LB / 37 °C / 0,8 / 16 °C / 0,2 mM / 20 h / 180 rpm   | 0,64 mg/mL <sup>*8</sup>                                |
| 500 mL / BL21 (DE3) / LB / 37 °C / 0,8 / 16 °C / 0,5 mM / 20 h / 180 rpm   | 0,04 mg/mL  |
| 500 mL / BL21 (DE3) / LB 1% glucose / 37 °C / 0,8 / 16 °C / 0,2 mM / 20 h / 180 rpm  | 0,02 mg/mL  |
| 500 mL / Arc.Exp.(DE3) /LB 1% glucose/37 °C /0,8 /16 °C /1,0 mM/20 h/ 180 rpm  | 0,04 mg/mL  |

|   |             |
|---|-------------|
| 500 mL / BL21 (DE3) / 2×YT / 37 °C / 0,8 / 16 °C / 0,05 mM / 20 h / 180 rpm | 0,07 mg/mL  |
| 500 mL / BL21 (DE3) / 2×YT / 37 °C / 0,8 / 16 °C / 0,05 mM / 20 h / 0 rpm   | 0,002 mg/mL |
| 500 mL / BL21 (DE3) / 2×YT / 37 °C / 0,8 / 16 °C / 0,2 mM / 20 h / 180 rpm  | 0,06 mg/mL  |
| 500 mL / BL21 (DE3) / TB / 37 °C / 2,5 / 16 °C / 0,2 mM / 20 h / 180 rpm    | 0,06 mg/mL  |
| 500 mL / BL21 (DE3) / TB / 37 °C / 2,5 / 16 °C / 0,5 mM / 20 h / 180 rpm    | 0,05 mg/mL  |

\*8 : Οι συγκεντρώσεις προέκυψαν από απορροφήσεις στα 750 nm, δείγματος του αραιωμένου (20 φορές) παραλαμβανόμενου εσωκυτταρικού περιεχομένου των *E. coli*, έπειτα από μηχανική λύση, που εμπειρείχε την επιθυμητή πολυεστεράση PHAase, αλλά και περαιτέρω βακτηριακές πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα και άλλα. Αισθητά μεγαλύτερη προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του πρωτεϊνικού περιεχομένου των *E. coli* ArcticExpress (DE3), τα οποία και επιλέχθηκαν για κάποιο από τα πρωτόκολλα βελτιστοποίησης έκφρασης της PHAase, χωρίς να εμφανίζουν επιτυχία, οπότε και συνεχίστηκαν οι δοκιμές με τα συμβατικά στελέχη *E. coli* BL21 (DE3).

Από τα 10 διαφορετικά πρωτόκολλα που ακολουθήθηκαν για την ετερόλογη έκφραση της PHAase σε *E. coli*, κανένα δεν εμφάνισε σημαντική ενζυμική συγκέντρωση.

### 3.2.2.3) Βελτιστοποίηση ετερόλογης έκφρασης πολυεστεράσης PHOase

Τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν για την ετερόλογη έκφραση της πολυεστεράσης PHOase, σε ξενιστή βακτήριο *E. coli*, καθώς και οι τελικές παραλαμβανόμενες ενζυμικές συγκεντρώσεις, έχουν ως εξής:

**Πίνακας 26** : Αποτελέσματα βελτιστοποίησης ετερόλογης έκφρασης της πολυεστεράσης PHOase με τις τελικές παραλαμβανόμενες ενζυμικές συγκεντρώσεις.

| Συνθήκες έκφρασης<br>(VCULTURE / Στέλεχος <i>E. coli</i> / Θρεπτικό μέσο / TGROWTH / OD <sub>600nm</sub> / TINDUCTION / C IPTG / tINDUCTION / rpm) | Ενζυμική συγκέντρωση κλάσματος "Im. 100B" (CENZ) |
|--|--|
| 100 mL / BL21 (DE3) / LB / 37 °C / 0,8 / 16 °C / 0,2 mM / 20 h / 180 rpm   | 1,33 mg/mL <sup>*8</sup>                         |
| 100 mL / Arc.Exp. (DE3) / LB / 37 °C / 0,8 / 16 °C / 0,2 mM / 20 h / 180 rpm   | 1,26 mg/mL <sup>*8</sup>                         |
| 500 mL / BL21 (DE3) / LB / 37 °C / 0,8 / 16 °C / 0,05 mM / 20 h / 180 rpm  | 0,09 mg/mL                                       |
| 500 mL / BL21 (DE3) / LB / 37 °C / 0,8 / 16 °C / 0,5 mM / 20 h / 180 rpm   | 0,06 mg/mL                                       |
| 500 mL / BL21 (DE3) / LB 1% glucose / 37 °C / 0,8 / 16 °C / 0,2 mM / 20 h / 180 rpm  | 0,05 mg/mL                                       |
| 500 mL / BL21 (DE3) / LB 1% glucose / 37 °C / 0,8 / 16 °C / 1,0 mM / 20 h / 180 rpm  | 0,14 mg/mL                                       |
| 500 mL / BL21 (DE3) / 2×YT / 37 °C / 0,8 / 16 °C / 0,2 mM / 20 h / 180 rpm   | 0,03 mg/mL                                       |
| <b>500 mL / BL21 (DE3) / TB / 37 °C / 2,5 / 16 °C / 0,2 mM / 20 h / 180 rpm</b>  | <b>0,22 mg/mL</b>                                |
| 500 mL / BL21 (DE3) / TB / 37 °C / 2,5 / 16 °C / 0,2 mM / 20 h / 0 rpm   | 0,05 mg/mL                                       |

\*8 : Οι συγκεντρώσεις προέκυψαν από απορροφήσεις στα 750 nm, δείγματος του αραιωμένου (20 φορές) παραλαμβανόμενου εσωκυτταρικού περιεχομένου των *E. coli*, έπειτα από μηχανική λύση, που εμπειρείχε την επιθυμητή πολυεστεράση PHOase,

αλλά και περαιτέρω βακτηριακές πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα και άλλα. Οι τιμές των απορροφήσεων, που ανήχθησαν σε συγκεντρώσεις, ήταν σχεδόν όμοιες με ελάχιστα μεγαλύτερη αυτή της συγκέντρωσης του πρωτεϊνικού περιεχομένου των *E. coli* BL21 (DE3), όπου και επιλέχθηκαν για την βελτιστοποίηση έκφρασης της PHOase.

Από τα 9 διαφορετικά πρωτόκολλα που ακολουθήθηκαν για την ετερόλογη έκφραση της PHOase σε *E. coli*, επιλέχθηκε αυτό που εμφάνισε την μεγαλύτερη ενζυμική συγκέντρωση στο τελικό κλάσμα της IMAC “Im. 100B”, τιμής 0,22 mg<sub>PHOase</sub>/mL. Έτσι, η έκφραση της PHOase έλαβε χώρα σε στελέχη *E. coli* BL21 (DE3), σε καλλιέργειες θρεπτικού μέσου TB, με θερμοκρασία ανάπτυξης των κυττάρων ίση με 37 °C και τελική κυτταρική πυκνότητα με οπτική απορρόφηση στα 600 nm ίση με 2,5, θερμοκρασία επαγωγής 16 °C, προκαλούμενη από τη προσθήκη IPTG συγκέντρωσης 0,2 mM, για 20 h, υπό ανάδευση.

Παρόμοια συμπεριφορά, με την Dmest, εμφάνισε και καθ’ όλη την διάρκεια των πειραμάτων βελτιστοποίησης η PHOase, αν και υπήρξε μια σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης του παραγόμενου ενζύμου σε συνθήκες προσθήκης καταστολέα-γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο, συμπεριφορά που υποδηλώνει τάσεις υπερέκφρασης του γονιδίου. Βέβαια στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο ήταν σημαντικά αυξημένη και η συγκέντρωση του IPTG ( $C_{IPTG} = 1 \text{ mM}$ ), γεγονός που υποστηρίζει την πιθανή χαμηλή ένταση έκφρασης του γονιδίου της PHOase στο συμβατικό πρωτόκολλο. Τελικά, με τη χρήση θρεπτικού υλικού TB και την διατήρηση της συγκέντρωσης του IPTG σε συμβατικά επίπεδα ( $C_{IPTG} = 0,2 \text{ mM}$ ), κατέστη εφικτή η παραγωγή ικανοποιητικής συγκέντρωσης PHOase ( $C_{PHOase} = 0,22 \text{ mg}_{PHOase}/\text{mL}$ ), υποδηλώνοντας ότι το γονίδιο έκφρασης του ενζύμου εκφραζόταν σε ελάχιστο βαθμό και η αύξηση της κυτταρικής πυκνότητας συνέβαλλε στην ενίσχυση του τελικώς παραγόμενου ενζύμου, ως άθροισμα των επιμέρους μικρών ποσοτήτων.

#### 3.2.2.4) Βελτιστοποίηση ετερόλογης έκφρασης πολυεστεράσης PLAase

Τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν για την ετερόλογη έκφραση της πολυεστεράσης PLAase, σε ξενιστή βακτήριο *E. coli*, καθώς και οι τελικές παραλαμβανόμενες ενζυμικές συγκεντρώσεις, έχουν ως εξής:

**Πίνακας 27** : Αποτελέσματα βελτιστοποίησης ετερόλογης έκφρασης της πολυεστεράσης PLAase με τις τελικές παραλαμβανόμενες ενζυμικές συγκεντρώσεις.

| Συνθήκες έκφρασης<br>( $V_{CULTURE}$ / Στέλεχος <i>E. coli</i> / Θρεπτικό μέσο / $T_{GROWTH}$ / $OD_{600nm}$ / $T_{INDUCTION}$ / $C_{IPTG}$ / $t_{INDUCTION}$ / rpm) | Ενζυμική συγκέντρωση κλάσματος “Im. 100B” ( $C_{ENZ}$ ) |
|--|---|
| 100 mL / BL21 (DE3) / LB / 37 °C / 0,8 / 16 °C / 0,2 mM / 20 h / 180 rpm   | 1,57 mg/mL <sup>*8</sup>                                |
| 100 mL / Arc.Exp. (DE3) / LB / 37 °C / 0,8 / 16 °C / 0,2 mM / 20 h / 180 rpm   | 2,18 mg/mL <sup>*8</sup>                                |
| 500 mL / Arc.Exp. (DE3) / LB / 37 °C / 0,8 / 16 °C / 1,0 mM / 20 h / 180 rpm   | 0,03 mg/mL  |
| 500 mL / BL21 (DE3) / TB / 37 °C / 3,0 / 30 °C / 0,2 mM / 3 h / 180 rpm <sup>*9</sup>  | 0,04 mg/mL  |



|   |            |
|---|------------|
| 500 mL / BL21 (DE3) / TB / 37 °C / 3,0 / 16 °C / 0,5 mM / 3 h / 180 rpm <sup>*9</sup> | 0,01 mg/mL |
|---|------------|

<sup>\*8</sup> : Οι συγκεντρώσεις προέκυψαν από απορροφήσεις στα 750 nm, δείγματος του αραιωμένου (10 φορές) παραλαμβανόμενου εσωκυτταρικού περιεχομένου των *E. coli*, έπειτα από μηχανική λύση, που εμπειρείχε την επιθυμητή πολυεστεράση PLAase, αλλά και περαιτέρω βακτηριακές πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα και άλλα. Οι απορροφήσεις ανήχθησαν, ομοίως με τις προηγούμενες πολυεστεράσεις, προς πρωτεϊνικές συγκεντρώσεις, με τα βακτηριακά στελέχη *E. coli* ArcticExpress (DE3) να εμφανίζουν μεγαλύτερη τιμή. Για τον λόγο αυτό και επιλέχθηκαν ως στελέχη ετερόλογης έκφρασης σε κάποιο από τα μελετούμενα πρωτόκολλα, χωρίς αποτέλεσμα.

<sup>\*9</sup> : Στα συγκεκριμένα πρωτόκολλα έλαβε χώρα διπλή προσθήκη επαγωγέα (της αναγραφόμενης συγκέντρωσης) στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας. Μια κατά την έναρξη και μια στο χρονικό μέσον της επαγωγής.

Από τα 5 διαφορετικά πρωτόκολλα που ακολουθήθηκαν για την ετερόλογη έκφραση της PLAase σε *E. coli*, κανένα δεν εμφάνισε σημαντική ενζυμική συγκέντρωση.

### 3.2.2.5) Βελτιστοποίηση ετερόλογης έκφρασης πολυεστεράσης PUase

Τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν για την ετερόλογη έκφραση της πολυεστεράσης PUase, σε ξενιστή βακτήριο *E. coli*, καθώς και οι τελικές παραλαμβανόμενες ενζυμικές συγκεντρώσεις, έχουν ως εξής:

**Πίνακας 28** : Αποτελέσματα βελτιστοποίησης ετερόλογης έκφρασης της πολυεστεράσης PUase με τις τελικές παραλαμβανόμενες ενζυμικές συγκεντρώσεις.

| Συνθήκες έκφρασης<br>(VCULTURE / Στέλεχος <i>E. coli</i> / Θρεπτικό μέσο / TGROWTH / OD <sub>600nm</sub> / TINDUCTION / C IPTG / tINDUCTION / rpm) | Ενζυμική συγκέντρωση κλάσματος "Im. 100B" (CENZ) |
|--|--|
| 100 mL / BL21 (DE3) / LB / 37 °C / 0,8 / 16 °C / 0,2 mM / 20 h / 180 rpm   | 1,04 mg/mL <sup>*8</sup>                         |
| 100 mL / Arc.Exp. (DE3) / LB / 37 °C / 0,8 / 16 °C / 0,2 mM / 20 h / 180 rpm   | 1,19 mg/mL <sup>*8</sup>                         |
| 500 mL / BL21 (DE3) / LB / 37 °C / 0,8 / 16 °C / 0,5 mM / 20 h / 180 rpm   | 0,18 mg/mL                                       |
| 500 mL / Arc.Exp. (DE3) / LB 1% glucose / 37 °C / 0,8 / 16 °C / 1,0 mM / 20 h / 180 rpm  | 0,08 mg/mL                                       |
| <b>500 mL / BL21 (DE3) / 2×YT / 37 °C / 0,8 / 16 °C / 0,2 mM / 20 h / 180 rpm</b>  | <b>0,25 mg/mL</b>                                |
| 500 mL / BL21 (DE3) / TB / 37 °C / 2,5 / 16 °C / 0,5 mM / 20 h / 180 rpm   | 0,12 mg/mL                                       |
| 500 mL / BL21 (DE3) / TB / 37 °C / 2,5 / 16 °C / 0,5 mM / 20 h / 0 rpm   | 0,10 mg/mL                                       |

<sup>\*8</sup> : Οι συγκεντρώσεις προέκυψαν από απορροφήσεις στα 750 nm, δείγματος του αραιωμένου (20 φορές) παραλαμβανόμενου εσωκυτταρικού περιεχομένου των *E. coli*, έπειτα από μηχανική λύση, που εμπειρείχε την επιθυμητή πολυεστεράση PUase, αλλά και περαιτέρω βακτηριακές πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα και άλλα. Μεγαλύτερη τιμή πρωτεϊνικής συγκέντρωσης εμφάνισαν τα στελέχη ArcticExpress (DE3), τα οποία

επιλέχθηκαν και προς μελέτη σε πρωτόκολλο έκφρασης. Ομοίως με τις προηγούμενες πολυεστεράσες η αλλαγή του στελέχους δεν συνέβαλε σε βελτίωση της έκφρασης, οπότε και τα πρωτόκολλα συνεχίστηκαν με τη χρήση των συμβατικών στελεχών *E. coli* BL21 (DE3).

Από τα 7 διαφορετικά πρωτόκολλα που ακολουθήθηκαν για την ετερόλογη έκφραση της PUase σε *E. coli*, επιλέχθηκε αυτό που εμφάνισε την μεγαλύτερη ενζυμική συγκέντρωση στο τελικό κλάσμα της IMAC “Im. 100B”, τιμής 0,25 mg<sub>PUase</sub>/mL. Έτσι, η έκφραση της PUase έλαβε χώρα σε στελέχη *E. coli* BL21 (DE3), σε καλλιέργειες θρεπτικού μέσου 2×YT, με θερμοκρασία ανάπτυξης των κυττάρων ίση με 37 °C και τελική κυτταρική πυκνότητα με οπτική απορρόφηση στα 600 nm ίση με 0,8, θερμοκρασία επαγωγής 16 °C, προκαλούμενη από τη προσθήκη IPTG συγκέντρωσης 0,2 mM, για 20 h, υπό ανάδευση.

Η πορεία των πειραμάτων βελτιστοποίησης της έκφρασης της PUase, υποδεικνύει ότι το αρχικό πρόβλημα, κατά το συμβατικό πρωτόκολλο, αφορούσε την πιθανώς λανθασμένη αναδίπλωση και συνεπώς τη μερική διαλυτότητα του παραγόμενου ενζύμου. Συγκεκριμένα, αν και στο θρεπτικό υλικό LB υπήρξε μια ικανοποιητική συγκέντρωση παραγόμενης PUase ( $C_{PUase} = 0,18 \text{ mg}_{Uase}/\text{mL}$  με  $C_{IPTG} = 0,5 \text{ mM}$ ), η έκφραση σε θρεπτικό μέσο 2×YT για μικρότερη συγκέντρωση επαγωγέα οδήγησε σε υψηλότερη τελική παραγωγή,  $C_{PUase} = 0,25 \text{ mg}_{Uase}/\text{mL}$  ( $C_{IPTG} = 0,2 \text{ mM}$ ). Έτσι στην περίπτωση του LB με υψηλή συγκέντρωση επαγωγέα η υπερέκφραση της πρωτεΐνης οδήγησε στο να παραχθεί μεγαλύτερο ποσοστό τόσο διαλυμένης όσο και αδιάλυτης PUase, παραλαμβάνοντας μόνο την διαλυμένη στο εσωκυτταρικό υγρό μορφή. Ενώ με την χρήση του θρεπτικού μέσου 2×YT διευκολύνθηκε η διαλυτοποίηση όλης της μικρότερης (λόγω χαμηλότερη συγκέντρωσης IPTG) παραγόμενης ποσότητας ενζύμου, η οποία και παραλήφθηκε.

### 3.2.2.6) Βελτιστοποίηση ετερόλογης έκφρασης πολυεστεράσης Se1JFR

Τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν για την ετερόλογη έκφραση της πολυεστεράσης Se1JFR, σε ξενιστή βακτήριο *E. coli*, καθώς και οι τελικές παραλαμβανόμενες ενζυμικές συγκεντρώσεις, έχουν ως εξής:

**Πίνακας 29** : Αποτελέσματα βελτιστοποίησης ετερόλογης έκφρασης της πολυεστεράσης Se1JFR με τις τελικές παραλαμβανόμενες ενζυμικές συγκεντρώσεις.

| Συνθήκες έκφρασης<br>( $V_{CULTURE}$ / Στέλεχος <i>E. coli</i> / Θρεπτικό μέσο / $T_{GROWTH}$ / $OD_{600nm}$ / $T_{INDUCTION}$ / $C_{IPTG}$ / $t_{INDUCTION}$ / rpm) | Ενζυμική συγκέντρωση κλάσματος “Im. 100B” ( $C_{ENZ}$ ) |
|--|---|
| 100 mL / BL21 (DE3) / LB / 37 °C / 0,8 / 16 °C / 0,2 mM / 20 h / 180 rpm   | 1,65 mg/mL <sup>*8</sup>                                |
| 100 mL / Arc.Exp. (DE3) / LB / 37 °C / 0,8 / 16 °C / 0,2 mM / 20 h / 180 rpm   | 1,44 mg/mL <sup>*8</sup>                                |
| <b>500 mL / BL21 (DE3) / LB 1% glucose / 37 °C / 0,8 / 16 °C / 1,0 mM / 20 h / 180 rpm</b>   | <b>0,64 mg/mL</b>                                       |

\*8 : Οι συγκεντρώσεις προέκυψαν από απορροφήσεις στα 750 nm, δείγματος του αραιωμένου (10 φορές) παραλαμβανόμενου εσωκυτταρικού περιεχομένου των *E. coli*, έπειτα από μηχανική λύση, που εμπεριείχε την επιθυμητή πολυεστεράση Se1JFR, αλλά και περαιτέρω βακτηριακές πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα και άλλα. Μεγαλύτερη προσδιορίζεται η συγκέντρωση του πρωτεϊνικού περιεχομένου των *E. coli* BL21 (DE3), τα οποία και επιλέχθηκαν για την βελτιστοποίηση έκφρασης της Se1JFR.

Από τα 3 διαφορετικά πρωτόκολλα που ακολουθήθηκαν για την ετερόλογη έκφραση της Se1JFR σε *E. coli*, επιλέχθηκε αυτό που εμφάνισε την μεγαλύτερη ενζυμική συγκέντρωση στο τελικό κλάσμα της IMAC “Im. 100B”, τιμής 0,64 mg<sub>Se1JFR</sub>/mL. Έτσι, η έκφραση της Se1JFR έλαβε χώρα σε στελέχη *E. coli* BL21 (DE3), σε καλλιέργειες θρεπτικού μέσου LB με 1 % γλυκόζη, με θερμοκρασία ανάπτυξης των κυττάρων ίση με 37 °C και τελική κυτταρική πυκνότητα με οπτική απορρόφηση στα 600 nm ίση με 0,8, θερμοκρασία επαγωγής 16 °C, προκαλούμενη από τη προσθήκη IPTG συγκέντρωσης 1,0 mM, για 20 h, υπό ανάδευση.

Παρατηρείται ότι τα πρωτόκολλα έκφρασης της Se1JFR ήταν αισθητά λιγότερα, συγκριτικά με αυτά των προαναφερθέντων πολυεστερασών, αφού εξ αρχής έγινε αντιληπτή η δυσκολία που εμφάνισε η έκφραση της πρωτεΐνης με το συμβατικό πρωτόκολλο. Η Se1JFR υπερεκφραζόταν και η συσσώρευση αυτή δημιουργούσε πρωτεϊνικά έγκλειστα με αποτέλεσμα την δυσκολία παραλαβής του παραγόμενου ενζύμου. Με την προσθήκη γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο LB η υπερέκφραση αυτή περιορίστηκε, τα πρωτεϊνικά έγκλειστα δεν δημιουργήθηκαν και η ποσότητα του τελικού παραλαμβανόμενου ενζύμου ήταν υψηλότερη εκ των τεσσάρων ενζύμων, C<sub>Se1JFR</sub> = 0,64 mg<sub>Se1JFR</sub>/mL.

Όλα τα απαραίτητα στοιχεία που αφορούν την διαδικασία ετερόλογης έκφρασης των πολυεστερασών, όπως τα αντιβιοτικά αντίστασης και την απαραίτητη συγκέντρωσή τους, ή την ποσοτικοποίηση των απορροφήσεων (καμπύλες αναφοράς, μοριακούς συντελεστές απορροφητικότητας και μοριακά βάρη πολυεστερασών) επισυνάπτονται στα ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α : Καμπύλη αναφοράς μεθόδου Lowry

### 3.2.3) Τελική έκφραση πολυεστερασών με βελτιστοποιημένα πρωτόκολλα

Τα τελικώς επιλεγμένα βελτιστοποιημένα πρωτόκολλα πρωτεϊνικής έκφρασης των πολυεστερασών έλαβαν χώρα με στόχο την παραλαβή των τελικών ενζύμων υψηλής συγκέντρωσης, των οποίων η δράση μελετήθηκε σε πολυμερικά υλικά. Έτσι τα πρωτόκολλα εφαρμόστηκαν επακριβώς όπως και στα πειράματα βελτιστοποίησης που προαναλύθηκαν, με την μόνη διαφορά να αφορά τον όγκο καλλιέργειών, ο οποίος στην περίπτωση της τελικής παραγωγής ήταν μεγαλύτερος με σκοπό την υψηλή ποσότητα και ποιότητα των παραλαμβανόμενων πολυεστερασών για τα πειράματα μελέτης δράσης που ακολούθησαν. Ο όγκος των τελικών καλλιέργειών καθορίστηκε από τις ενδείξεις ενζυμικής συγκέντρωσης, όπως αυτές προέκυψαν από τα πειράματα

βελτιστοποίησης και συγκρίθηκαν μεταξύ τους προκειμένου να υπάρχει μια ποιοτικά κοινή βάση τελικής συγκέντρωσης.

Η τελική ετερόλογη έκφραση των πολυεστερασών πραγματοποιήθηκε ως εξής :

**Πίνακας 30** : Τελικά χρησιμοποιούμενα πρωτόκολλα ετερόλογης έκφρασης πολυεστερασών.

| Πολυεστεράση | Συνθήκες έκφρασης<br>(Στέλεχος <i>E. coli</i> / Θρεπτικό μέσο / T <sub>GROWTH</sub> / OD <sub>600nm</sub> / T <sub>INDUCTION</sub> / C <sub>IPTG</sub> / t <sub>INDUCTION</sub> / rpm) |
|--------------|--|
| Dmest        | BL21 (DE3) / TB / 37 °C / 2,5 / 16 °C / 0,5 mM / 20 h / 180 rpm  |
| FoCut        | BL21 (DE3) / LB / 37 °C / 0,8 / 16 °C / 0,2 mM / 20 h / 180 rpm  |
| HiC          | BL21 (DE3) / LB / 37 °C / 0,8 / 16 °C / 0,2 mM / 20 h / 180 rpm  |
| LCC          | BL21 (DE3) / LB / 37 °C / 0,8 / 16 °C / 0,2 mM / 20 h / 180 rpm  |
| PETase       | BL21 (DE3) / LB / 37 °C / 0,8 / 16 °C / 0,2 mM / 20 h / 180 rpm  |
| PHOase       | BL21 (DE3) / TB / 37 °C / 2,5 / 16 °C / 0,2 mM / 20 h / 180 rpm  |
| PUase        | BL21 (DE3) / 2×YT / 37 °C / 0,8 / 16 °C / 0,2 mM / 20 h / 180 rpm  |
| Se1JFR       | BL21 (DE3) / LB 1% glucose / 37 °C / 0,8 / 16 °C / 1,0 mM / 20 h / 180 rpm   |

Οι ενζυμικές συγκεντρώσεις των τελικώς παραλαμβανόμενων ενζυμικών διαλυμάτων, έπειτα από την απομόνωση των επιθυμητών πολυεστερασών με IMAC, όπως και η ποσότητα κάθε ενζύμου ανά όγκο καλλιέργειας, έπειτα από την βελτιστοποίηση της ετερόλογης έκφρασής του, παρουσιάζονται ως εξής :

**Πίνακας 31** : Οι ποσότητες ενζύμου ανά όγκο καλλιέργειας για κάθε πολυεστεράση έπειτα από την ετερόλογη έκφρασή με τα βελτιστοποιημένα πρωτόκολλα.

| Πολυεστεράση | Ποσότητα ενζύμου ανά όγκο καλλιέργειας (mg/L <sub>CULTURE</sub> ) |
|--------------|---|
| Dmest        | 9,263   |
| FoCut        | 40,37   |
| HiC          | 60,06   |
| LCC          | 5,610   |
| PETase       | 6,510   |
| PHOase       | 3,025   |
| PUase        | 2,625   |
| Se1JFR       | 11,10   |

Για την τελική χρήση τους στα πειράματα μελέτης βιοαποικοδομητικής δράσης τους σε πολυεστερικά υποστρώματα, κάποιες από τις παραγόμενες πολυεστεράσες συμπυκνώθηκαν, με στόχο την επίτευξη της υψηλότερης δυνατής συγκέντρωσης (διατηρώντας έναν ελάχιστο όγκο  $\approx$  5-10 mL, αρκετό για όλα τα πειράματα που εκτελέστηκαν) η οποία θα ήταν και κοινή για όλα τα ένζυμα, με αποτέλεσμα την διευκόλυνση σύγκρισης της δράσης τους.

Τελικά οι πολυεστεράσες που εκφράστηκαν ετερόλογα σε ξενιστή *E. coli*, έπειτα από λύση των κυττάρων και παραλαβή του εσωκυτταρικού περιεχομένου, απομόνωση τους από αυτό με IMAC, εξισορρόπησή τους σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα και συμπύκνωση τους, κατέληξαν να εμπεριέχονται στα εξής ενζυμικά διαλύματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα του χαρακτηρισμού τους αλλά και της μελέτης της βιοαποικοδομητικής τους δράσης έναντι σε πολυεστερικά υποστρώματα:

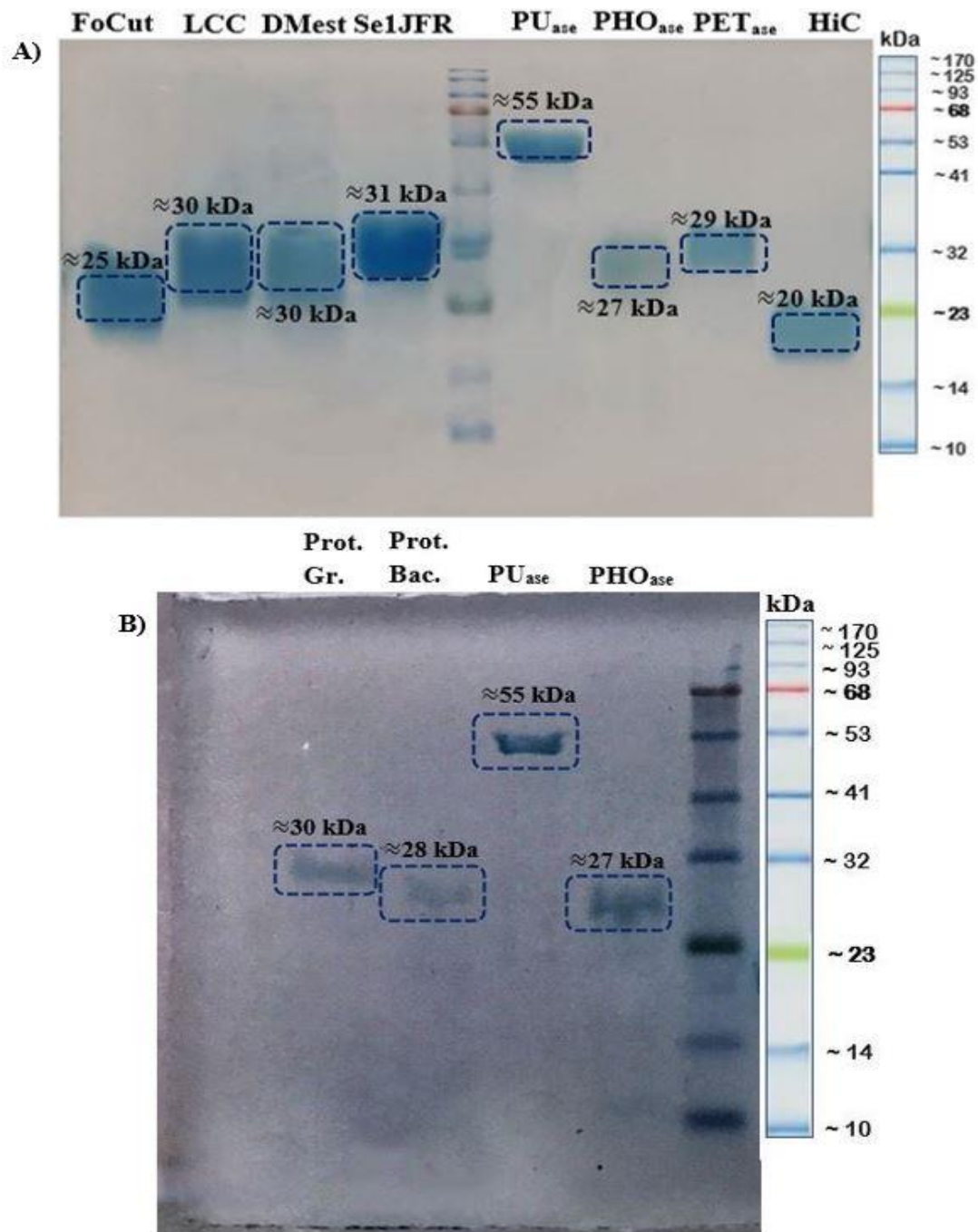
**Πίνακας 32** : Τελικές συγκεντρώσεις των ανασυνδυασμένων πολυεστερασών.

| Πολυεστεράση | Συγκέντρωση τελικού ενζυμικού διαλύματος |          |
|--------------|--|----------|
|              | mg/mL                                    | mM       |
| Dmest        | 1,19 mg/mL                               | 38,6 mM  |
| FoCut        | 3,67 mg/mL                               | 159,1 mM |
| HiC          | 5,44 mg/mL                               | 266,8 mM |
| LCC          | 0,51 mg/mL                               | 17,6 mM  |
| PETase       | 1,72 mg/mL                               | 59,4 mM  |
| PHOase       | 0,34 mg/mL                               | 11,5 mM  |
| PUase        | 0,58 mg/mL                               | 10,4 mM  |
| Se1JFR       | 1,71 mg/mL                               | 58,3 mM  |

### 3.3) Εκτίμηση καθαρότητας παραγόμενων πολυεστερασών μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες

Τα τελικά παραλαμβανόμενα ενζυμικά διαλύματα των παραγόμενων πολυεστερασών ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες, ακολουθώντας την διαδικασία όπως αναλύθηκε στο υποκεφάλαιο 2.2.2.7) Ηλεκτροφόρηση παραγόμενων πολυεστερασών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες, με σκοπό τον προσδιορισμό της καθαρότητας τους ως προς την επιθυμητή πολυεστεράση (απόδοση διαδικασίας απομόνωσης με IMAC) αλλά και την επιβεβαίωση του μοριακού βάρους των ανασυνδυασμένων πολυεστερασών.

Η πηκτή πολυακρυλαμίδιου έπειτα από την εκτέλεση της διαδικασίας ηλεκτροφόρησης όπως και των σταδίων χρωματισμού και αποχρωματισμού της παρουσιάζεται ως εξής:



**Εικόνα 25:** Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης ενζυμικών κλασμάτων των μελετώμενων ενζύμων και προσδιορισμός των μοριακών βαρών τους σε σύγκριση με το προχρωματισμένο πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους. Α) Πηκτή πολυακρυλαμίδιου έπειτα από ηλεκτροφόρηση των ενζυμικών δειγμάτων FoCut, LCC, Dmest, Se1JFR, PU<sub>ase</sub>, PHO<sub>ase</sub>, PET<sub>ase</sub> και HiC (αριστερά προς δεξιά). Β) Πηκτή πολυακρυλαμίδιου έπειτα από ηλεκτροφόρηση των ενζυμικών δειγμάτων Prot. Gr., Prot. Bac., PU<sub>ase</sub> και PHO<sub>ase</sub> (αριστερά προς δεξιά).

Τα μοριακά βάρη των ετερόλογα εκφρασμένων πολυεστερασών προσδιορίζονται μέσω ταυτοποίησης του μεγέθους της έντονης ζώνης (μπάντας), που σχηματίζεται στον χώρο ηλεκτροφόρησης του πρωτεϊνικού δείγματος, βάσει των αντίστοιχων ζωνών του προχρωματισμένου πρότυπου διαλύματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους.

Τελικά, για τα μοριακά βάρη των πολυεστερασών, προέκυψαν τα εξής αποτελέσματα:

**Πίνακας 33** : Προσδιοριζόμενα μοριακά βάρη των ετερόλογα εκφρασμένων πολυεστερασών μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες.

| Πολυεστεράση | Μοριακό βάρος (MW) (kDa) |
|--------------|--------------------------|
| Dmest        | ≈30                      |
| FoCut        | ≈25                      |
| HiC          | ≈20                      |
| LCC          | ≈30                      |
| PETase       | ≈29                      |
| PHOase       | ≈27                      |
| PUase        | ≈55                      |
| Se1JFR       | ≈31                      |
| Prot. Bac.   | ≈28                      |
| Prot. Gr.    | ≈30                      |

### 3.4) Χαρακτηρισμός πολυεστερασών

Από τις ετερόλογα εκφρασμένες πολυεστεράσες, αυτές για τις οποίες δεν υπήρχαν βιβλιογραφικά δεδομένα ενζυμικού χαρακτηρισμού, ήταν οι Dmest, PHOase, PUase, Se1JFR, για τις οποίες και εκτελέστηκαν πειράματα προσδιορισμού ενζυμικής ενεργότητας καθώς και βέλτιστων συνθηκών δράσης, με στόχο την επιλογή των κατάλληλων συνθηκών των αντιδράσεων με τα πολυεστερικά υλικά.

#### 3.4.1) Προσδιορισμός ενεργότητας των μη χαρακτηρισμένων πολυεστερασών

Όπως προαναφέρθηκε στο υποκεφάλαιο 2.2.3.3) Προσδιορισμός ενεργότητας παραγόμενων πολυεστερασών, η ενεργότητα των πολυεστερασών υπολογίστηκε έμμεσα λαμβάνοντας υπ' όψη την απορρόφηση στα 410 nm ( $A_{410nm}$ ) της ιονισμένης μορφής της απελευθερωμένης, από την αντίδραση τους με υπόστρωμα pNPB, pNP. Η απορρόφηση αυτή ανήχθη σε συγκέντρωση προϊόντος χρησιμοποιώντας τον νόμο Beer-Lambert (2.2.3.1) Ποσοτικός προσδιορισμός παραγόμενων πολυεστερασών με τη μέθοδο Beer-Lambert), με τις απαραίτητες παραμέτρους της εξίσωσης και την μεθοδολογία υπολογισμού, να αναφέρονται αναλυτικά στο . Τελικά η ενεργότητα των πολυεστερασών στο υπόστρωμα pNPB εκφράστηκε σε Units/mg<sub>ENZYMΟΥ</sub>, όπου ως 1 Unit ορίζεται το ποσό του ενζύμου που απελευθερώνει 1 μmol pNP ανά λεπτό.

Τα τελικά αποτελέσματα του προσδιορισμού ενεργότητας των πολυεστερασών στο εστερικό υπόστρωμα pNPB, προέκυψαν ως εξής :

**Πίνακας 34** : Ενεργότητα παραγόμενων πολυεστερασών σε υπόστρωμα pNPB.

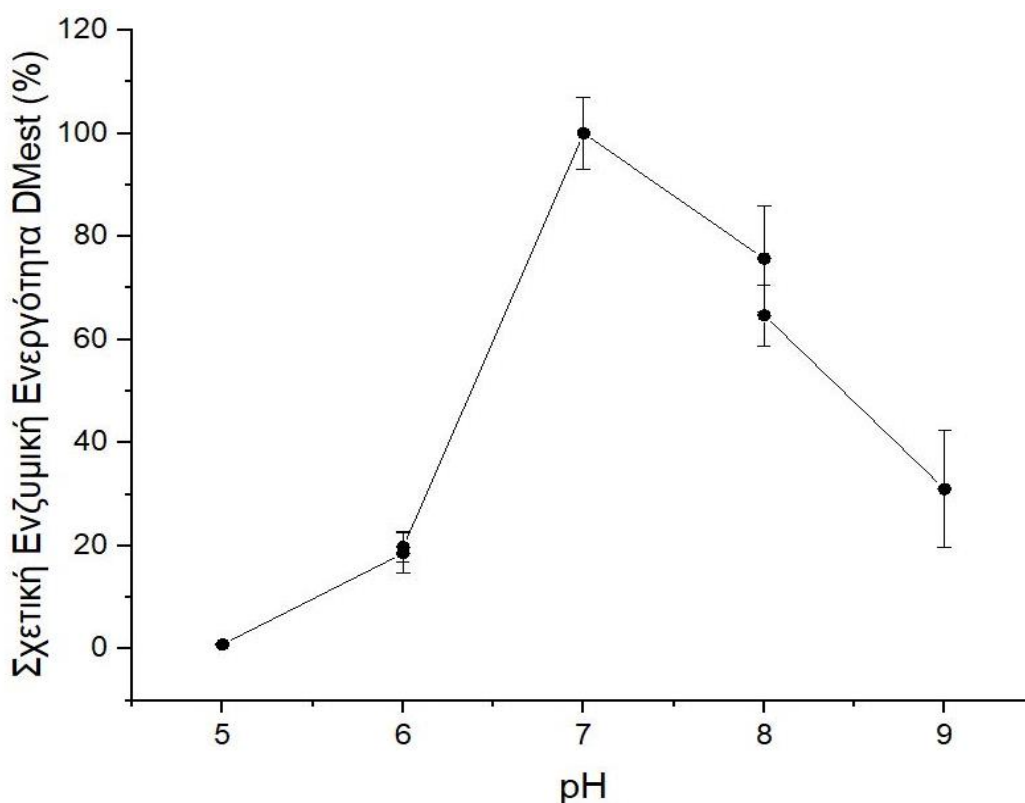
| Πολυεστεράση | Ενεργότητα πολυεστεράσης σε υπόστρωμα pNPB (Units/mg <sub>ENZYMΟΥ</sub> ) |
|--------------|---|
| Dmest        | 5,96  |
| PHOase       | 5,14  |

|        |      |
|--------|------|
| PUase  | 2,25 |
| Se1JFR | 9,37 |

### 3.4.2) Προσδιορισμός βέλτιστου pH δράσης (pH<sub>OPTIMUM</sub>) των μη χαρακτηρισμένων πολυεστερασών

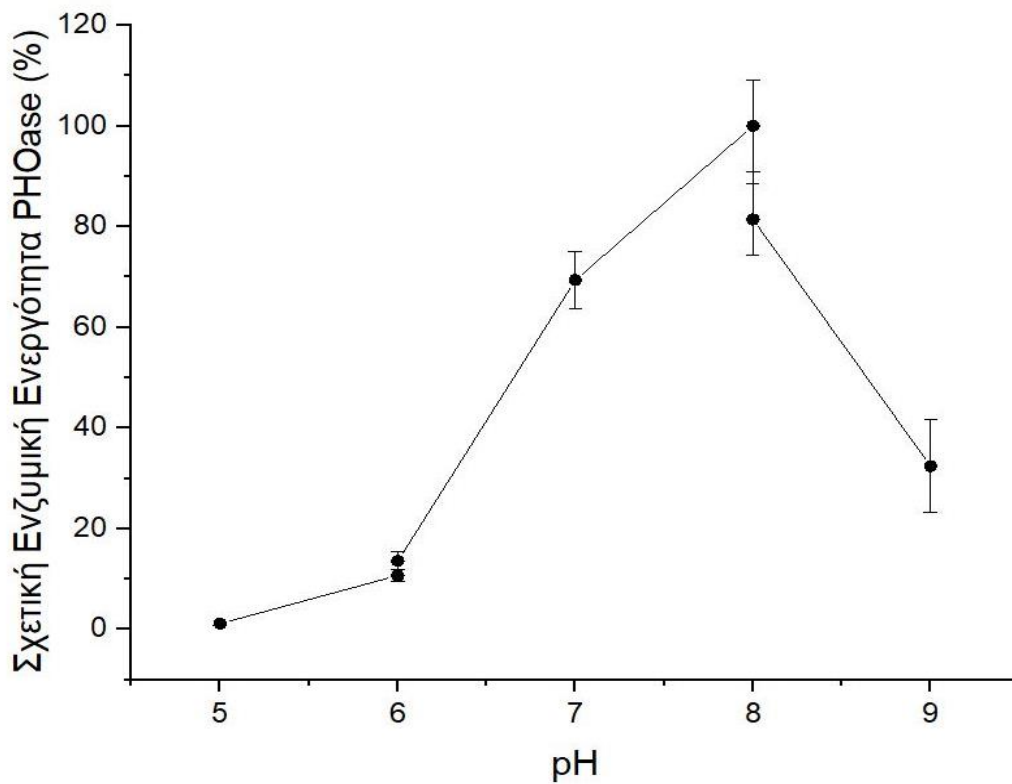
Τα αποτελέσματα του προσδιορισμού του βέλτιστου pH δράσης των μη χαρακτηρισμένων πολυεστερασών (Dmest, PHOase, PUase, Se1JFR) παρατίθενται υπό την μορφή διαγραμμάτων.

Σε αυτά παρουσιάζεται η επίδραση του pH αντίδρασης στην δράση του ενζύμου. Η ενζυμική δράση εκφράζεται μέσω της ποσοστιαίας σχετικής ενεργότητας, που υποδηλώνει τις ενεργότητες για κάθε pH ως προς την μέγιστη ενεργότητα που επετεύχθη (στο pH<sub>OPTIMUM</sub>) :

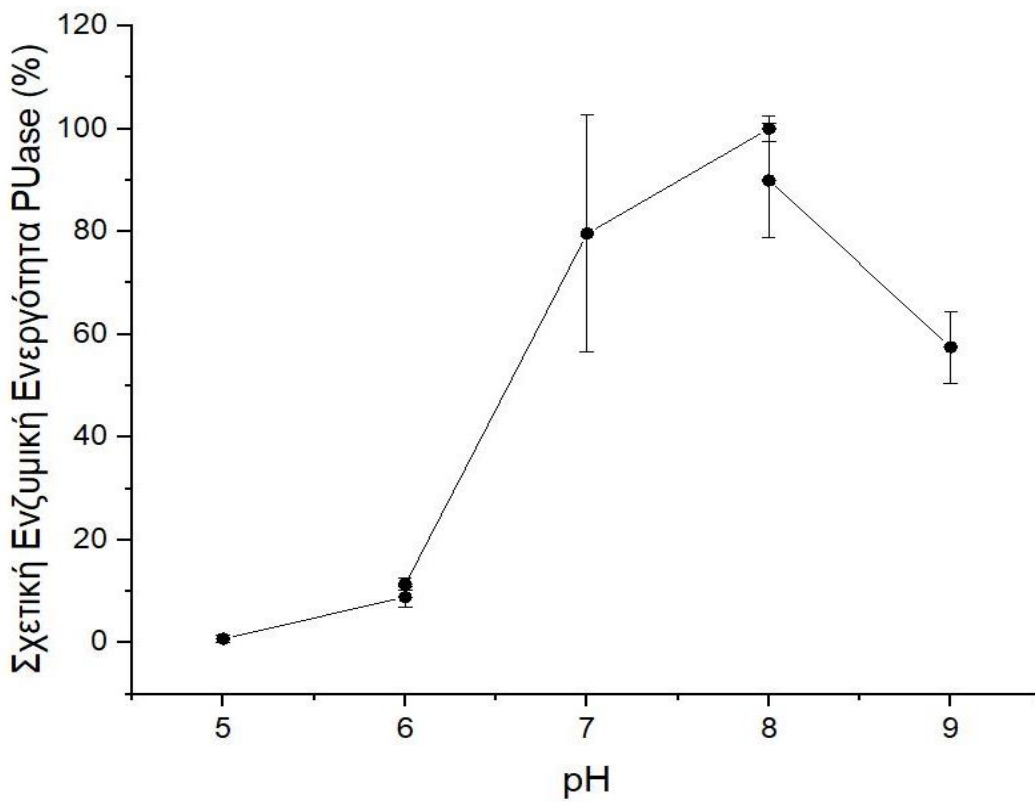


**Διάγραμμα 1** : Εξάρτηση της σχετικής ενεργότητας της πολυεστεράσης Dmest από το pH.

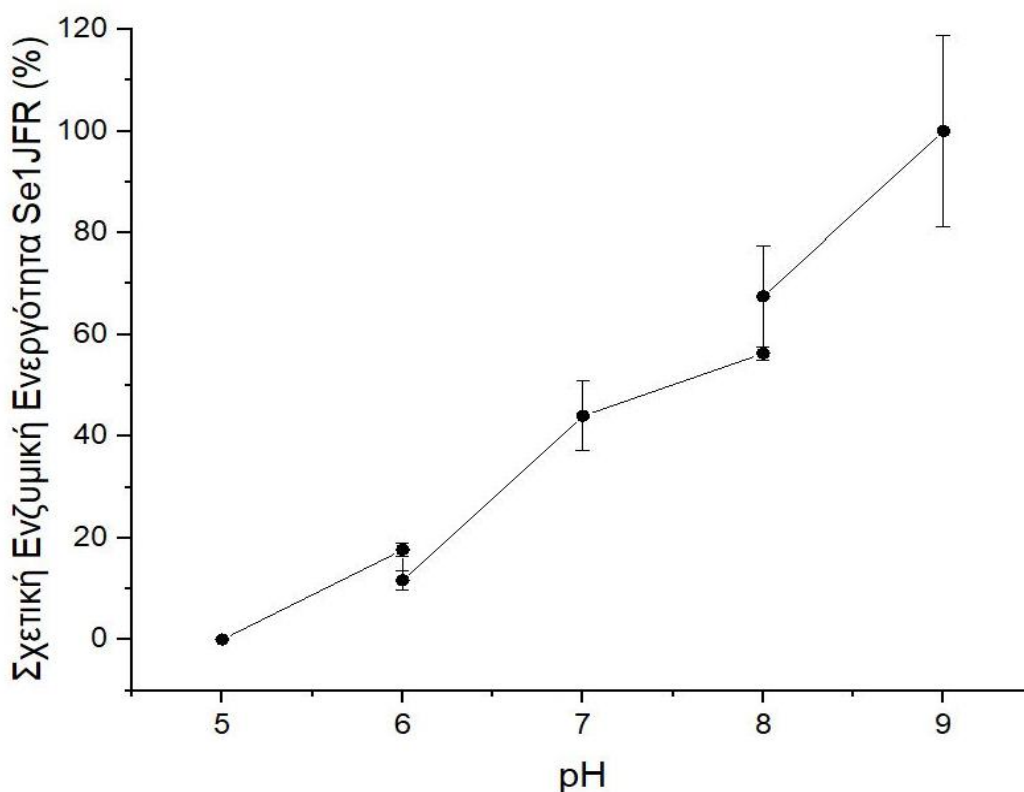




**Διάγραμμα 2** : Εξάρτηση της σχετικής ενεργότητας της πολυεστεράσης PHOase από το pH.



**Διάγραμμα 3** : Εξάρτηση της σχετικής ενεργότητας της πολυεστεράσης PUase από το pH.



**Διάγραμμα 4** : Εξάρτηση της σχετικής ενεργότητας της πολυεστεράσης Se1JFR από το pH.

Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι το εύρος των επιλεγμένων μελετώμενων pH αντίδρασης καθορίστηκε με κριτήρια που αφορούν την γενική αρχή σταθερότητας των ενζύμων (τα οποία δεν είναι εξτρεμόφιλα, όπως στις μελετώμενες περιπτώσεις), η οποία ελαχιστοποιείται, συνήθως, σε ακραία pH (εξού και δεν μελετήθηκαν πολύ όξινα <4 ή πολύ βασικά >9 τιμές pH), καθώς και την αυτοϋδρόλυση του εστερικού υπόστρωματος pNPB σε υψηλές τιμές αλκαλικού pH (>9), η οποία είναι έντονα αισθητή και δυσχεραίνει σημαντικά την υπολογιστική ακρίβεια των μετρήσεων.

Από την ανάλυση των Διαγραμμάτων 2 και 3, γίνεται αντιληπτό ότι, τα ένζυμα PHOase και PUase εμφάνισαν βέλτιστη δράση στο ρυθμιστικό διάλυμα Φωσφορικών με ασθενώς αλκαλικό pH ίσο με 8,0. Και τα δύο ένζυμα σε ασθενώς όξινες τιμές pH εύρους 5,0-6,0 παρουσίασαν αρκετά μειωμένη δράση, μικρότερη του 20 % της μέγιστης ενεργότητας. Μάλιστα στο όξινο pH 5,0 η σχετική ενζυμική ενεργότητα των δύο πολυεστερασών ήταν σχεδόν μηδενική. Σε πιο αλκαλικές τιμές pH, όπως 9,0, η συμπεριφορά των δύο ενζύμων διέφερε με την δράση της PHOase να προσεγγίζει το 60 % της μέγιστης ενεργότητας σε αντίθεση με τη PUase η οποία έφτασε, περίπου, μόλις το 30%.

Παρόμοια ήταν και η συμπεριφορά της Dmest (Διάγραμμα 1), η οποία αν και εμφάνισε μέγιστη δράση σε ουδέτερο pH 7,0 (P-P), έδρασε στο 80 % περίπου της μέγιστης ενεργότητας στο pH 8,0 (P-P). Σε αλκαλικότερες τιμές (9,0, T-H) η δράση της Dmest μειώθηκε σημαντικά, όπως και στην PHOase, σε τιμές σχετικής ενζυμικής ενεργότητας

μικρότερες του 40%. Τέλος σε όξινα pH 5,0-6,0 (C-P, P-P) και η Dmest ήταν αρκετά ανενεργή, με σχετική ενζυμική ενεργότητα μικρότερη του 20 %.

Τέλος, η Se1JFR (Διάγραμμα 4), έδρασε βέλτιστα για pH αντίδρασης ίσο με 9,0 (T-H). Η αύξηση του pH ήταν αναλογική της ενεργότητας. Πιθανώς σε ισχυρότερο αλκαλικό pH η Se1JFR να εμφάνιζε καλύτερη απόδοση, παρ' όλα αυτά η αυτοϋδρόλυση του υποστρώματος pNPB σε τέτοιες τιμές pH, όπως προαναφέρθηκε, θα οδηγούσε σε μεγάλα σφάλματα μετρήσεων και ανακριβή αποτελέσματα, οπότε και δεν μελετήθηκε.

Έπειτα από την παραπάνω ανάλυση καθορίζονται οι βέλτιστες τιμές pH δράσης της κάθε πολυεστεράσης, ως εξής:

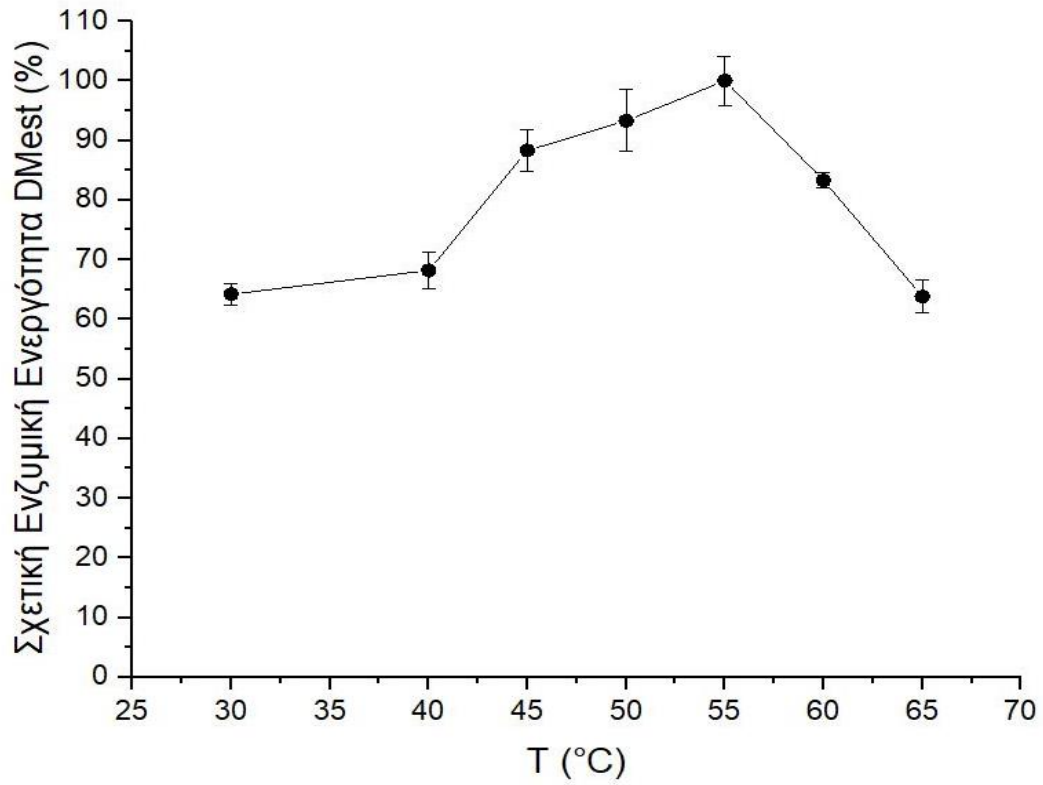
**Πίνακας 35** : Βέλτιστες τιμές pH δράσης των παραγόμενων πολυεστερασών σε εστερικό υπόστρωμα pNPB.

| <b>Πολυεστεράση</b> | <b>pH<sub>OPTIMUM</sub></b> | <b>Ρυθμιστικό Διάλυμα</b> |
|---------------------|-----------------------------|---------------------------|
| Dmest               | 7,0                         | Φωσφορικών (P-P)          |
| PHOase              | 8,0                         | Φωσφορικών (P-P)          |
| PUase               | 8,0                         | Φωσφορικών (P-P)          |
| Se1JFR              | 9,0                         | Tris-HCl (T-H)            |

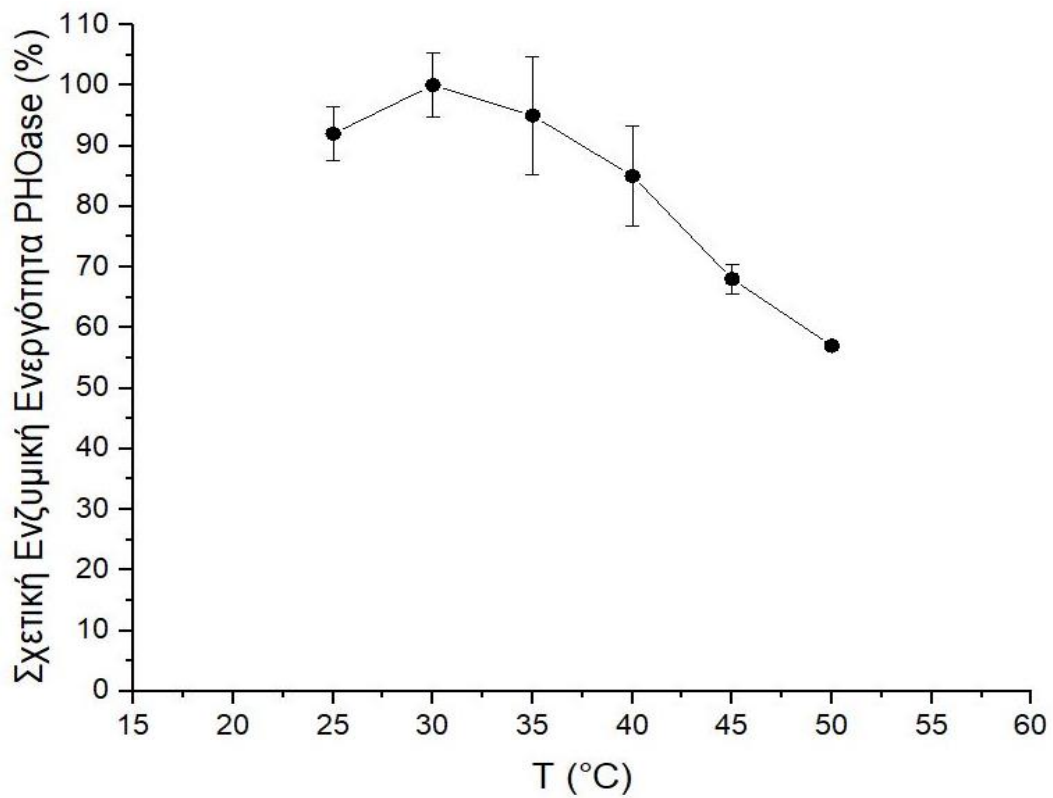
### 3.4.3) Προσδιορισμός βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης (T<sub>OPTIMUM</sub>) των μη χαρακτηρισμένων πολυεστερασών

Τα αποτελέσματα του προσδιορισμού της βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης των μη χαρακτηρισμένων πολυεστερασών (Dmest, PHOase, PUase, Se1JFR) παρατίθενται υπό την μορφή διαγραμμάτων.

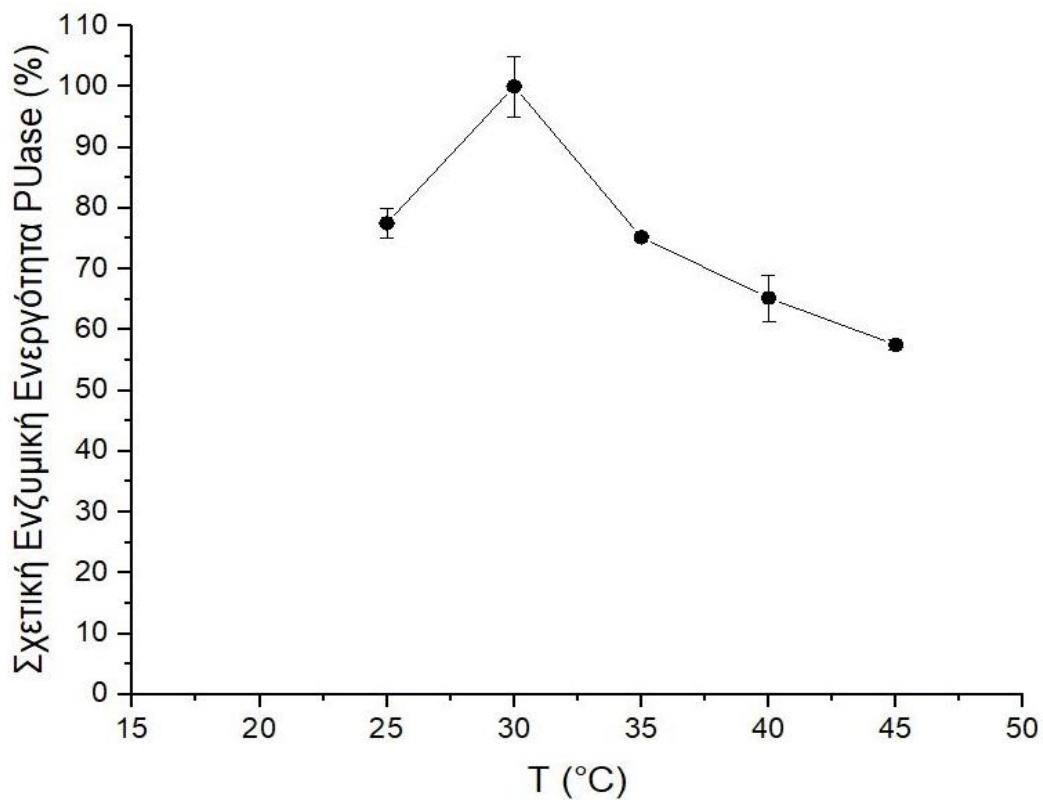
Σε αυτά παρουσιάζεται η επίδραση της θερμοκρασίας αντίδρασης στην δράση του ενζύμου. Η ενζυμική δράση εκφράζεται μέσω της ποσοστιαίας σχετικής ενεργότητας, που υποδηλώνει τις ενεργότητες για κάθε θερμοκρασία ως προς την μέγιστη ενεργότητα που επετεύχθη (στη T<sub>OPTIMUM</sub>) :



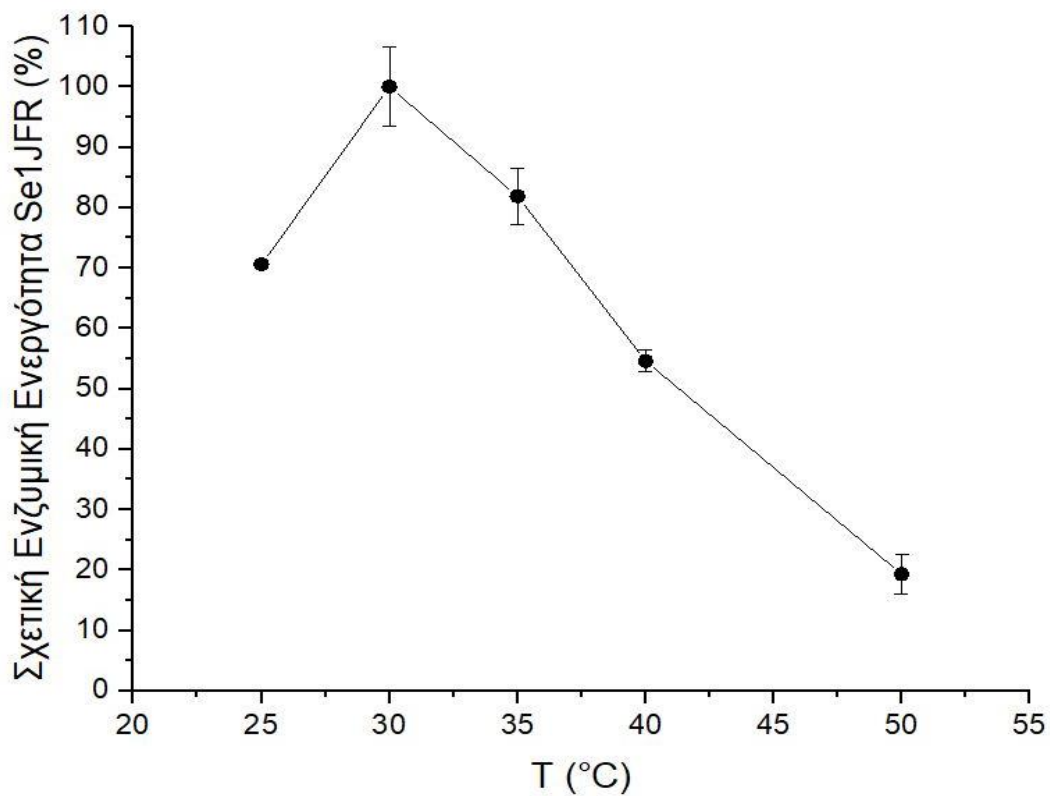
**Διάγραμμα 5** : Εξάρτηση της σχετικής ενεργότητας της πολυστεράσης Dmest από τη θερμοκρασία (T).



**Διάγραμμα 6** : Εξάρτηση της σχετικής ενεργότητας της πολυστεράσης PHOase από τη θερμοκρασία (T).



**Διάγραμμα 7 :** Εξάρτηση της σχετικής ενεργότητας της πολυεστεράσης PUase από τη θερμοκρασία (T).



**Διάγραμμα 8 :** Εξάρτηση της σχετικής ενεργότητας της πολυεστεράσης Se1JFR από τη θερμοκρασία (T).

Τα θερμοκρασιακά εύρη μελέτης ποικίλλουν για κάθε μια διαφορετική πολυεστεράση, αν και ξεκίνησαν από προκαθορισμένο εύρος των 30-45 °C (συμβατικές θερμοκρασίες δράσης βακτηριακών υδρολασών). Παρ' όλα αυτά κάθε ένζυμο έδειξε διαφορετική τάση δράσης στις παραπάνω θερμοκρασίες όποτε και μελετήθηκαν περαιτέρω οι θερμοκρασιακές περιοχές γύρω από τις βέλτιστες θερμοκρασίες των ενζύμων στο αρχικό αυτό εύρος.

Από την ανάλυση των Διαγραμμάτων 6-8, γίνεται αντιληπτό ότι τα ένζυμα, PHOase, PUase και Se1JFR εμφάνισαν μέγιστη ενεργότητα σε θερμοκρασία αντίδρασης 30 °C, ενώ η περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας οδήγησε σε μείωση της δράσης και των τριών ενζύμων. Η μείωση αυτή ήταν εντονότερη στο ένζυμο Se1JFR αφού η μεταβολή της θερμοκρασίας από τους 30 °C στους 50 °C μείωσε την ενεργότητα κατά 80%. Λιγότερο αισθητή ήταν η επίδραση της θερμοκρασίας στα ένζυμα PHOase και PUase στα οποία αντίστοιχη θερμοκρασιακή μεταβολή οδήγησε σε μείωση της ενεργότητας στο 50 % περίπου της μέγιστης. Σε θερμοκρασίες μικρότερες της βέλτιστης, όπως αυτή των 25 °C, και τα τρία ένζυμα εμφανίστηκαν αρκετά ενεργά, με τις σχετικές ενζυμικές ενεργότητες της PHOase, PUase και Se1JFR, ίσες με περίπου 90 %, 75 % και 70 % αντίστοιχα.

Η Dmest έδειξε (Διάγραμμα 5) μια διαφορετική εξάρτηση από την θερμοκρασία συγκριτικά με τα υπόλοιπα ένζυμα. Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της παρουσιάστηκε στους 55 °C υποδηλώνοντας έναν θερμοανθεκτικό χαρακτήρα, ο οποίος πιθανώς οφείλεται στην προέλευσή του ενζύμου από μικροοργανισμό ο οποίος συναντάται στην έρημο. Περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας έως τους 65 °C μείωσε την δράση της Dmest κατά 40%. Αντίστοιχου μεγέθους ήταν και η μείωση που προκλήθηκε με μείωση της θερμοκρασίας στους 30 °C. Παρ' όλα αυτά σε όλο το θερμοκρασιακό εύρος μελέτης 30 °C- 65 °C η Dmest, αν και εμφάνισε σημαντικά βέλτιστη δράση στους 55 °C, ήταν σχετικά ενεργή.

Έπειτα από την παραπάνω ανάλυση καθορίζονται οι βέλτιστες τιμές θερμοκρασίας δράσης της κάθε πολυεστεράσης, ως εξής:

**Πίνακας 36** : Βέλτιστες τιμές θερμοκρασίας δράσης των παραγόμενων πολυεστερασών σε εστερικό υπόστρωμα pNPB.

| Πολυεστεράση | ΤοPTIMUM |
|--------------|----------|
| Dmest        | 55 °C    |
| PHOase       | 30 °C    |
| PUase        | 30 °C    |
| Se1JFR       | 30 °C    |

### 3.5) Δράση πολυεστερασών σε πολυεστερικά υλικά (πλαστικά)

#### 3.5.1) Επιλεγμένες συνθήκες αντιδράσεων των παραγόμενων πολυεστερασών με τα πολυεστερικά υλικά

Η μελέτη της δράσης των παραγόμενων πολυεστερασών επετεύχθη μέσω παρακολούθησης, και επεξεργασίας των αποτελεσμάτων, των αντιδράσεών τους με πολυεστερικά υλικά. Οι συνθήκες αντίδρασης (2.2.4.1) Αντιδράσεις παραγόμενων πολυεστερασών με πολυεστερικά υλικά) επιλέχθηκαν κατάλληλα έτσι ώστε οι ενζυμικές συγκεντρώσεις των δρώντων ενζύμων να είναι παρόμοιες με στόχο την τελική σύγκριση τους καθώς και λαμβάνοντας υπ' όψη τις βέλτιστες συνθήκες δράσης των μη χαρακτηρισμένων και βιβλιογραφικών πολυεστερασών (Πίνακας 35, Πίνακας 36, [151], [152], [198], [204]–[207]). Έτσι ο θερμοκρασιακός διαχωρισμός έγινε ανάμεσα στους 30 °C και 50 °C, για τις πολυεστεράσες FoCut, PETase, PHOase, PUase και SeIJFR και για τις Dmest, HiC, LCC, Prot. Bac. και Prot. Gr., αντίστοιχα

Η πειραματική διαδικασία προετοιμασίας και πραγματοποίησης των αντιδράσεων έλαβε χώρα όπως αναλύθηκε στο 2.2.4.1) Αντιδράσεις παραγόμενων πολυεστερασών με πολυεστερικά υλικά, με τα αποτελέσματα να παρουσιάζονται στην συνέχεια.

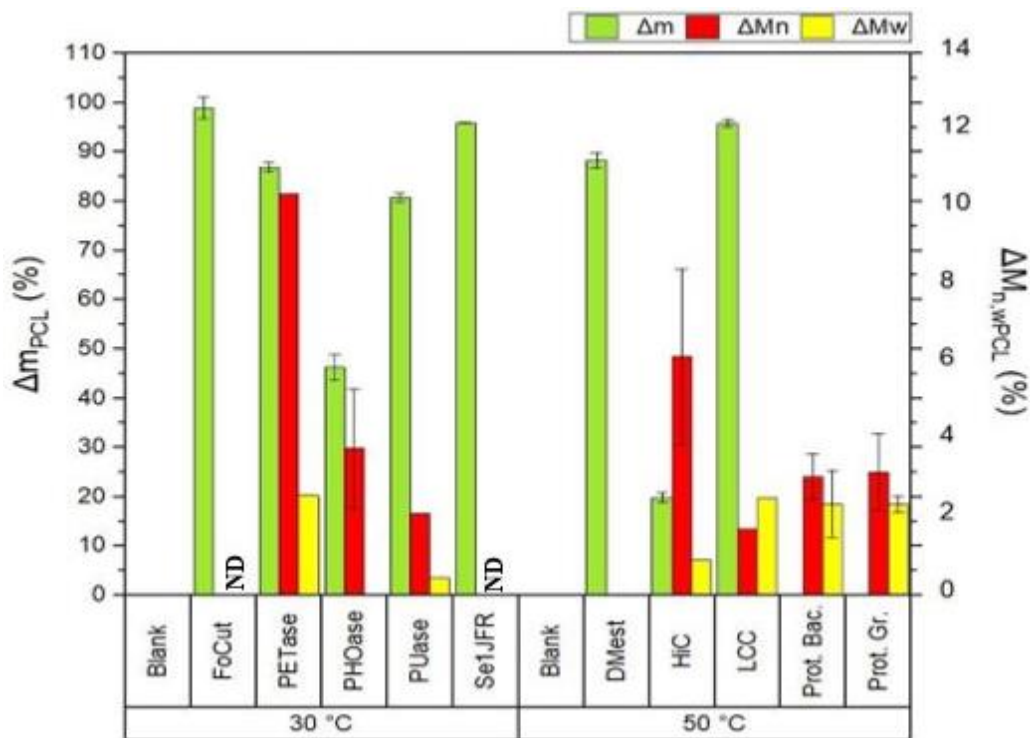
#### 3.5.2) Μεταβολή μάζας και πολυμερικών μεγεθών των πολυεστερικών υλικών λόγω δράσης των παραγόμενων πολυεστερών

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν την ενζυμική δράση των πολυεστερασών στις πολυμερικές σκόνες, κατηγοριοποιήθηκαν βάσει του πολυεστερικού υποστρώματος και της βιοαποικοδομητικής δράσης και των δέκα ενζύμων σε αυτό, και παρουσιάζονται διαγραμματικά στην συνέχεια.

##### 3.5.2.1) Βιοαποικοδομητική δράση των παραγόμενων πολυεστερασών στη πολυεστερική σκόνη PCL

Για το PCL υπολογίστηκε η τελική μάζα της πολυεστερικής σκόνης με το πέρας της αντίδρασης, καθώς και τα μέσα μοριακά βάρη,  $M_n$  και  $M_w$ , με τα αποτελέσματα να αναφέρονται επιγραμματικά στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ζ : Τελικές μάζες, μέσα μοριακά βάρη και συγκεντρώσεις των προϊόντων υδρόλυσης.

Βάσει αυτών των αποτελεσμάτων, υπολογίστηκαν οι ποσοσταίες μεταβολές των μεγεθών, με τις σημαντικότερες εκ αυτών να απεικονίζονται διαγραμματικά ως εξής :



**Διάγραμμα 9** : Μεταβολή της μάζας και των μέσων μοριακών βαρών της πολυεστερικής σκόνης PCL λόγω ενζυμικής δράσης των μελετώμενων πολυεστερασών (ND : Not Determined).

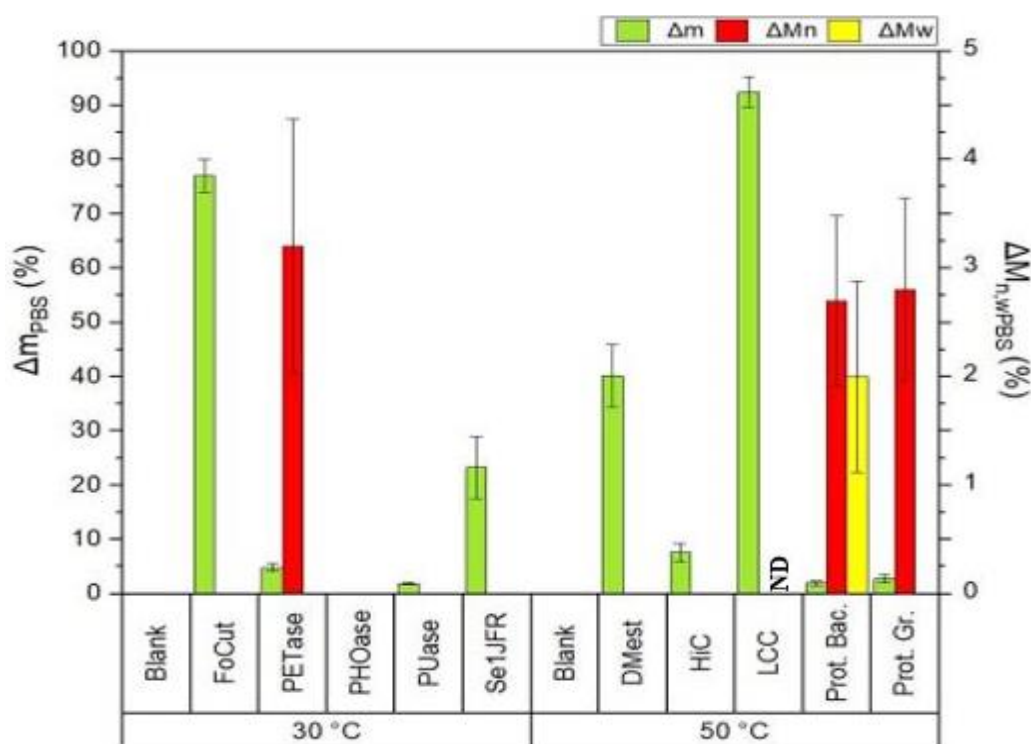
Από την ανάλυση του Διαγράμματος 9 γίνεται αντιληπτή η σημαντική δράση των πολυεστερασών στη πολυμερική σκόνη PCL. Συγκεκριμένα, όλα τα ένζυμα με θερμοκρασία δράσης 30 °C, προκάλεσαν υποβάθμιση του υλικού, η οποία αντικατοπτρίστηκε σε αξιοσημείωτες μεταβολές μάζας που κυμάνθηκαν σε ποσοστιαίες μειώσεις εύρους 47 % - 99 %. Οι πολυεστεράσες FoCut και Se1JFR αποικοδόμησαν σχεδόν πλήρως το πολυμερές ενώ σε αρκετά υψηλές τιμές (άνω του 80 %) παρουσιάζονται και οι μεταβολές μάζας που προκλήθηκαν από τις PETase και PUase. Η PHOase περιορίστηκε σε χαμηλότερο ποσοστό μείωσης, συγκριτικά με τα προαναφερθέντα ένζυμα, ίσο με περίπου 47 %. Όσον αφορά τη θερμοκρασία δράσης των 50 °C, παρατηρείται ότι υποβαθμίσεις του PCL δεν προκλήθηκαν από όλο το σύνολο των πολυεστερασών. Βέβαια, τα ένζυμα LCC και DMest, ξεχωρίζουν με ποσοστιαίες μεταβολές μάζας 95,75 % και 88,26 % αντίστοιχα. Η κουτινάση HiC προκάλεσε αρκετά μικρότερη υποβάθμιση, με μεταβολή μάζας περίπου 20 %. Από το σύνολο όλων των πολυεστερασών, μείωση μάζας, δεν εμφάνισε η δράση των πρωτεασών Prot. Bac. και Prot. Gr.. Όσον αφορά τα μέσα μοριακά βάρη οι πολυεστεράσες, στο σύνολο τους, προκάλεσαν μειώσεις κυρίως στο μέσου αριθμού μοριακό βάρος ( $M_n$ ), με τις υψηλότερες να προκαλούνται από την δράση της PETase και της HiC, ίσες με περίπου 11 % και 6 % αντίστοιχα. Οι μεταβολές στο μέσου βάρους μοριακό βάρος ( $M_w$ ) παρουσιάστηκαν ασθενέστερες, με την μέγιστη στο 4 % περίπου, από την PHOase. Η δράση των πρωτεασών Prot. Bac. και Prot. Gr., που δεν προκάλεσαν μείωση μάζας στο PCL, οδήγησε σε μειώσεις και των δύο μοριακών βαρών  $M_n$  και  $M_w$ .



### 3.5.2.2) Βιοαποικοδομητική δράση των παραγόμενων πολυεστερασών στη πολυεστερική σκόνη PBS

Για το PBS υπολογίστηκε η τελική μάζα της πολυεστερικής σκόνης με το πέρας της αντίδρασης, καθώς και τα μέσα μοριακά βάρη,  $M_n$  και  $M_w$ , με τα αποτελέσματα να αναφέρονται επιγραμματικά στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ζ : Τελικές μάζες, μέσα μοριακά βάρη και συγκεντρώσεις των προϊόντων υδρόλυσης.

Βάσει αυτών των αποτελεσμάτων, υπολογίστηκαν οι ποσοστιαίες μεταβολές των μεγεθών, με τις σημαντικότερες εκ αυτών να απεικονίζονται διαγραμματικά ως εξής :



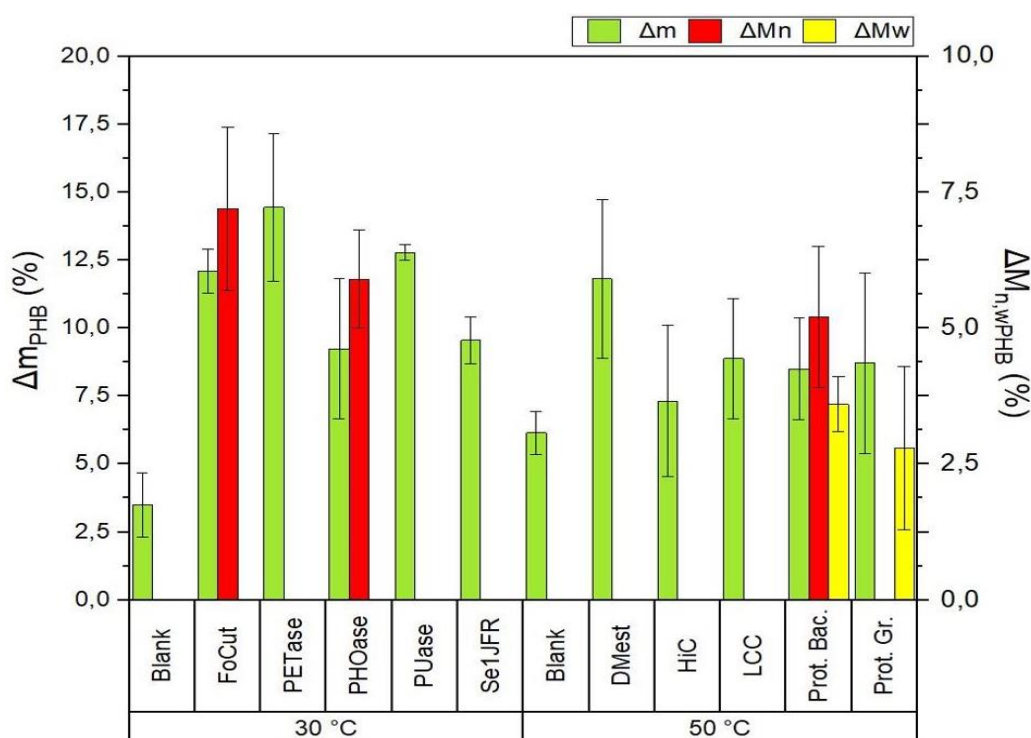
**Διάγραμμα 10** : Μεταβολή της μάζας και των μέσων μοριακών βαρών της πολυεστερικής σκόνης PBS λόγω ενζυμικής δράσης των μελετώμενων πολυεστερασών (ND : Not Determined).

Από την απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ενζυμικής δράσης των πολυεστερασών στην πολυμερική σκόνη PBS στο Διάγραμμα 10, γίνεται αντιληπτό ότι η δράση των ενζύμων LCC και FoCut, προκάλεσε την εμφανέστερη μεταβολή μάζας στο υλικό, με ποσοστά μείωσης, 92,44 % και 77,04 %, αντίστοιχα. Σε χαμηλότερα, αλλά αισθητά, επίπεδα κυμάνθηκαν οι προκαλούμενες μειώσεις των πολυεστερασών Dmest και Se1JFR. Τα παραπάνω ένζυμα ανήκαν και στις δύο μελετώμενες θερμοκρασίες δράσης, των 30 °C και 50 °C. Παράλληλα, αρκετά περιορισμένες, φαίνονται οι προκληθέντες μεταβολές στα μέσα μοριακά βάρη του PBS, από τις περισσότερες πολυεστεράσες. Σε ποσοστιαίες μειώσεις της τάξης του 3 % περίπου, στο  $M_n$ , οδήγησε η ενζυμική δράση των PETase, Prot. Gr. και Prot. Bac., με την τελευταία μάλιστα να εμφανίζει και την μοναδική προκαλούμενη μείωση του  $M_w$  ίση με 1,98 %.

### 3.5.2.3) Βιοαποικοδομητική δράση των παραγόμενων πολυεστερασών στη πολυεστερική σκόνη PHB

Για το PHB υπολογίστηκε η τελική μάζα της πολυεστερικής σκόνης με το πέρας της αντίδρασης, καθώς και τα μέσα μοριακά βάρη,  $M_n$  και  $M_w$ , με τα αποτελέσματα να αναφέρονται επιγραμματικά στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ζ : Τελικές μάζες, μέσα μοριακά βάρη και συγκεντρώσεις των προϊόντων υδρόλυσης.

Βάσει αυτών των αποτελεσμάτων, υπολογίστηκαν οι ποσοστιαίες μεταβολές των μεγεθών, με τις σημαντικότερες εκ αυτών να απεικονίζονται διαγραμματικά ως εξής :



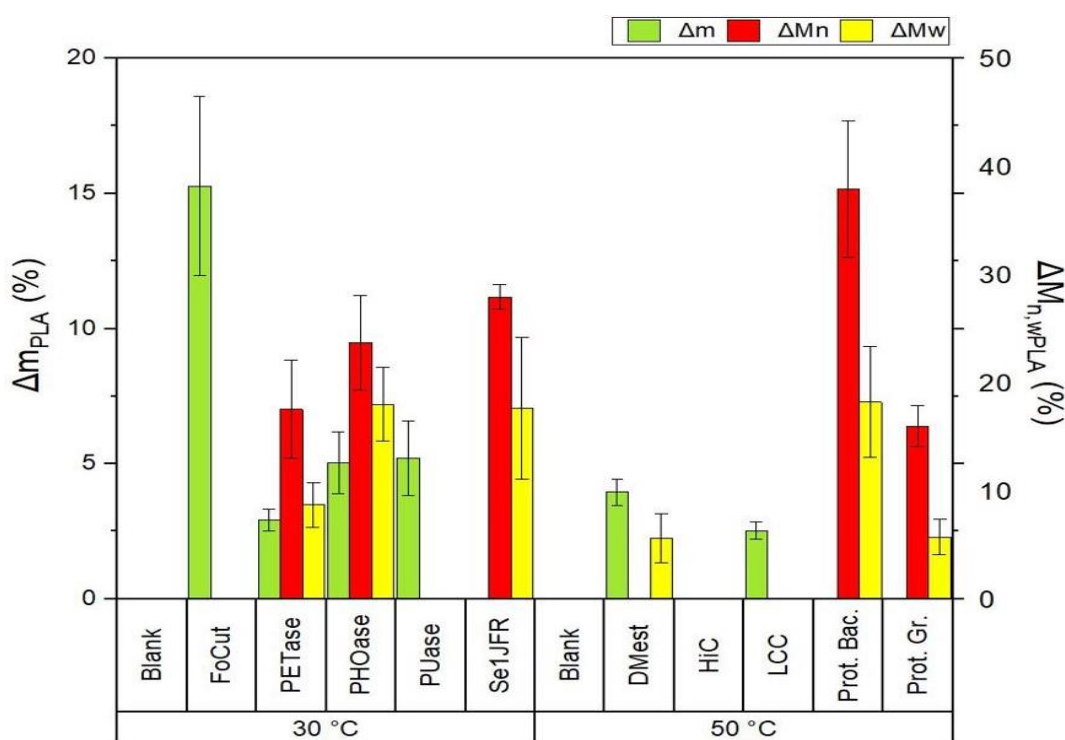
**Διάγραμμα 11** : Μεταβολή της μάζας και των μέσων μοριακών βαρών της πολυεστερικής σκόνης PHB λόγω ενζυμικής δράσης των μελετώμενων πολυεστερασών.

Όπως φαίνεται από το Διάγραμμα 11, η δράση των πολυεστερασών των 30 °C προκάλεσε μειώσεις μάζας της σκόνης PHB, από 9,24 % έως 14,45 %. Αισθητά μικρότερες, παρουσιάζονται, οι αντίστοιχες μειώσεις από τα ένζυμα δράσης των 50 °C, λαμβάνοντας υπ' όψη την υψηλή αυτοϋδρόλυση του υλικού στη θερμοκρασία αυτή (7,5 % περίπου μείωση μάζας στο δείγμα Blank). Τη σημαντικότερη μείωση, εκ αυτών, προκάλεσε η Dmest, στο 11,81 %. Όσον αφορά τις μεταβολές των μοριακών βαρών, η FoCut, που αποτέλεσε και το τρίτο συνολικά δραστικότερο ένζυμο όσον αφορά τη μεταβολή μάζας, μείωσε το  $M_n$  κατά 7,21 %, ακολουθούμενη από την PHOase σε ποσοστό περίπου 6 %. Στα ίδια επίπεδα μείωσης οδήγησε και η δράση της πρωτεάσης Prot. Bac., η οποία εμφάνισε και ενδείξεις μεταβολής του  $M_w$ , με μείωση 3,60 %. Αντίστοιχα η πρωτεάση Prot. Gr. μείωσε το  $M_w$  κατά 2,5 % περίπου.

### 3.5.2.4) Βιοαποικοδομητική δράση των παραγόμενων πολυεστερασών στη πολυεστερική σκόνη PLA

Για το PLA υπολογίστηκε η τελική μάζα της πολυεστερικής σκόνης με το πέρας της αντίδρασης, καθώς και τα μέσα μοριακά βάρη,  $M_n$  και  $M_w$ , με τα αποτελέσματα να αναφέρονται επιγραμματικά στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ζ : Τελικές μάζες, μέσα μοριακά βάρη και συγκεντρώσεις των προϊόντων υδρόλυσης.

Βάσει αυτών των αποτελεσμάτων, υπολογίστηκαν οι ποσοστιαίες μεταβολές των μεγεθών, με τις σημαντικότερες εκ αυτών να απεικονίζονται διαγραμματικά ως εξής :



**Διάγραμμα 12** : Μεταβολή της μάζας και των μέσων μοριακών βαρών της πολυεστερικής σκόνης PLA λόγω ενζυμικής δράσης των μελετώμενων πολυεστερασών.

Παρατηρώντας το Διάγραμμα 12 είναι εμφανές ότι το δραστηκότερο ένζυμο, όσον αφορά την μείωση μάζας της σκόνη PLA, ήταν η FoCut, με ποσοστιαία μείωση 15,27 %. Όλες οι υπόλοιπες πολυεστεράσες, και των δύο θερμοκρασιών δράσης, προκάλεσαν αντίστοιχες μειώσεις αρκετά χαμηλότερης τάξης, μικρότερες του 5 %, περίπου. Όσον αφορά τα μέσα μοριακά βάρη, και συγκεκριμένα το  $M_n$ , τα ένζυμα των 30 °C, PETase, PHOase και Se1JFR, κυμάνθηκαν σε μεταβολές του 20 % με 30 %, αρκετά σημαντικές μειώσεις, που υποδηλώνουν αισθητή δράση των ενζύμων στο υλικό PLA, παρά τις χαμηλές ή μηδενικές μειώσεις μάζας. Αντίστοιχα τα ένζυμα προκάλεσαν και μεταβολές του  $M_w$ , 9 % από την PETase και διπλάσιες, 18 %, από τις PHOase και Se1JFR. Οι πρωτεάσες, των 50 °C, εμφάνισαν μεταβολές των  $M_w$  και  $M_n$ , με τα αποτελέσματα της Prot. Bac. να φαίνονται σχεδόν διπλάσια της Prot. Gr. Γενικότερα από το Διάγραμμα 12, παρατηρείται ότι η δράση των πολυεστερασών στο PLA, αν και δεν προκάλεσε

αξιοσημείωτες μειώσεις μάζας, είναι αισθητή, κυρίως με μεταβολές στα μέσα μοριακά βάρη του υλικού.

#### Συνολική ανάλυση των αποτελεσμάτων ενζυμικής δράσης στα βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά PBS, PCL, PHB και PLA, ανά πολυεστεράση

Η ανάλυση των παραπάνω αποτελεσμάτων θα πραγματοποιηθεί και για καθένα από τα δέκα ένζυμα ως προς όλα τα πολυεστερικά, βιοαποικοδομήσιμα, υποστρώματα, όπως αυτά απεικονίστηκαν στα Διαγράμματα 9-12.

Ξεκινώντας, λοιπόν, από τα ένζυμα αναφοράς του PET, η LCC εμφάνισε σημαντικά αποτελέσματα όσον αφορά την διαφορά μάζας στα πολυεστερικά υλικά PCL και PBS, με μεταβολές τις τάξης των 98,88 % και 92,44 % αντίστοιχα. Η σχεδόν ολική βιοαποικοδόμηση μάλιστα του PCL επετεύχθη σε μόλις 24 h ενώ του PBS σε 3 ημέρες. Στα υπόλοιπα βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά η LCC δεν εμφάνισε αισθητή δράση με περίπου μόλις 2 % μείωση μάζας στις πολυμερικές σκόνες του PLA και PHB. Βέβαια, στο PLA υπήρξε μεταβολή του  $M_w$ , η οποία ποσοτικοποιήθηκε σε μείωση κατά 5,62 %, γεγονός που υποδηλώνει την υδρολυτική δράση του ενζύμου στις μεγάλες πολυμερικές αλυσίδες του PLA, διασπώντας τες σε μικρότερα, μη διαλυτά, oligομερή, με αποτέλεσμα να μην γίνεται αισθητή η μεταβολή αυτή και στη μάζα του υλικού.

Τα αποτελέσματα της δράσης της PETase στα βιοαποικοδομήσιμα υλικά υπέδειξαν βιοαποικοδόμηση των υλικών, χωρίς όμως έντονα αισθητές μεταβολές. Ομοίως με την LCC, η πολυμερική σκόνη PCL αποικοδομήθηκε σημαντικά, κατά 86,88 % σε 24 h. Επιπλέον η PETase εμφάνισε την μεγαλύτερη υποβάθμιση, από τα μελετώμενα ένζυμα, στο υλικό PHB, με περίπου 15 % μείωση της μάζας του, ενώ αντίστοιχες μειώσεις κατά περίπου μόλις 3 % και 5 % προκλήθηκαν στα πλαστικά PBS και PLA. Αν και η μείωση μάζας στο PLA είναι σχεδόν ανεπαίσθητη η PETase κατάφερε να προσβάλλει αρκετές από τις μεγάλου μοριακού βάρους αλυσίδες τις οποίες και διέσπασε σε μικρότερα oligομερή, μειώνοντας το  $M_w$ , κατά 8,70 %. Η διάσπαση αυτή, των μεγαλύτερων αλυσίδων, οδήγησε πιθανώς και στην σημαντική μείωση, κατά 17,53 %, και του  $M_n$ , του δείγματος PLA.

Μια από τις συνολικά ικανοποιητικότερες δράσεις στα βιοαποικοδομήσιμα πολυεστερικά υλικά υπέδειξε η κουτινάση FoCut. Συγκεκριμένα κατάφερε να βιοαποικοδομήσει πλήρως το PCL (98,88 %), καθώς και κατά 77,04 % το PBS, μείωση, μεγαλύτερη της οποίας, επετεύχθη μόνο από την LCC. Την σημαντικότερη μεταβολή μάζας, σχεδόν υπερτριπλάσια των άλλων ενζύμων, προκάλεσε η FoCut, στην πολυμερική σκόνη PLA, ίση με μείωση 15,27 % Τέλος προκάλεσε διάσπαση πολυμερικών αλυσίδων, ανεξαρτήτως μοριακού βάρους, του δείγματος PHB, αντίληψη που στηρίζεται στην κατά 7,5 % μείωση του  $M_n$  με αντίστοιχη 12,09 % μείωση μάζας.

Η κουτινάση HiC, γνωστή για χαρακτηριστικές αποικοδομήσεις του άμορφου PET, φάνηκε σχεδόν αδρανής ως προς την υποβάθμιση των βιοαποικοδομήσιμων εστερικών υλικών. Πέραν του PCL στο οποίο προκάλεσε μείωση μάζας, κατά 19,79 % (σχετικά

μικρή συγκριτικά με την πλήρη αποικοδόμηση που κατάφεραν αρκετά από τα υπόλοιπα ένζυμα), η δράση στα υπόλοιπα πολυεστερικά υλικά κυμάνθηκε σε χαμηλές τιμές. Στο υλικό PBS η δράση της HiC οδήγησε μόνο σε μεταβολή μάζας περίπου 7 % ενώ σχεδόν μηδενικές ήταν οι προκληθέντες μεταβολές στα PHB και PLA.

Όσον αφορά τα βιοπληροφορικά ανακαλυμμένα ένζυμα, Dmest και Se1JFR, και τα δύο εμφάνισαν σημαντικές ενδείξεις δράσης στα πολυεστερικά υποστρώματα, με την Dmest να ξεχωρίζει εκ των δύο, και όχι μόνο. Συγκεκριμένα, η Dmest αποικοδόμησε το PCL κατά 88,26 % και το PBS κατά 40,13 %, όντας το τρίτο ενεργότερο ένζυμο στο συγκεκριμένο υπόστρωμα. Λόγω της δράσης της Dmest το  $M_w$  του PLA μειώθηκε κατά 6 % περίπου, μεταβολή η οποία αντικατοπτρίστηκε και σε περίπου 4 % μείωση της μάζας του υλικού. Η παραπάνω δράση αποτελεί την ισχυρότερη στο PLA, συγκριτικά με όλα τα ένζυμα με θερμοκρασία δράσης τους 50 °C. Στο ίδιο εύρος δράσης με τις HiC και LCC, ανήκει και η Dmest, για το πλαστικό PHB, με πολύ χαμηλή μείωση μάζας και μηδενική μεταβολή των μέσων μοριακών βαρών στο εναπομείναν υλικό.

Η πολυεστεράση Se1JFR αποτέλεσε το δραστικότερο, στην θερμοκρασία δράσης των 30 °C, ένζυμο έναντι στο πλαστικό PBS. Συγκεκριμένα η δράση της προκάλεσε μείωση του βάρους του δείγματος PBS κατά 23,27 %, όντας το τέταρτο, εκ των δέκα, ενεργότερο ένζυμο στο αντίστοιχο υπόστρωμα, ενώ η εναπομένουσα πολυμερική σκόνη είχε μειωμένο  $M_n$  κατά περίπου 2 %. Πλήρης (95,88 %) αποικοδόμηση του PCL επέφερε το ένζυμο Se1JFR σε μόλις μια μέρα στο υλικό PCL και περίπου 10 % μείωση μάζας στη σκόνη PHB, τη δεύτερη μεγαλύτερη υποβάθμιση ανάμεσα στα ένζυμα δράσης στους 30 °C. Κάποιες από τις μεγαλύτερες μειώσεις των μοριακών βαρών του PLA επέφερε η εστερική δράση της Se1JFR με μεταβολές 27,91 % του  $M_n$  και 17,66 % του  $M_w$ . Οι παραπάνω μειώσεις υποδεικνύουν ότι η Se1JFR ήταν αρκετά δραστική στο PLA αφού πρόσβαλε ένα μεγάλο κομμάτι των πολυμερικών αλυσίδων του (μεγάλου και μικρού μοριακού βάρους) διασπώντας τις σε μικρότερα ολιγομερή, αδιάλυτα στο ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης (μηδενική μεταβολή μάζας της σκόνης PLA).

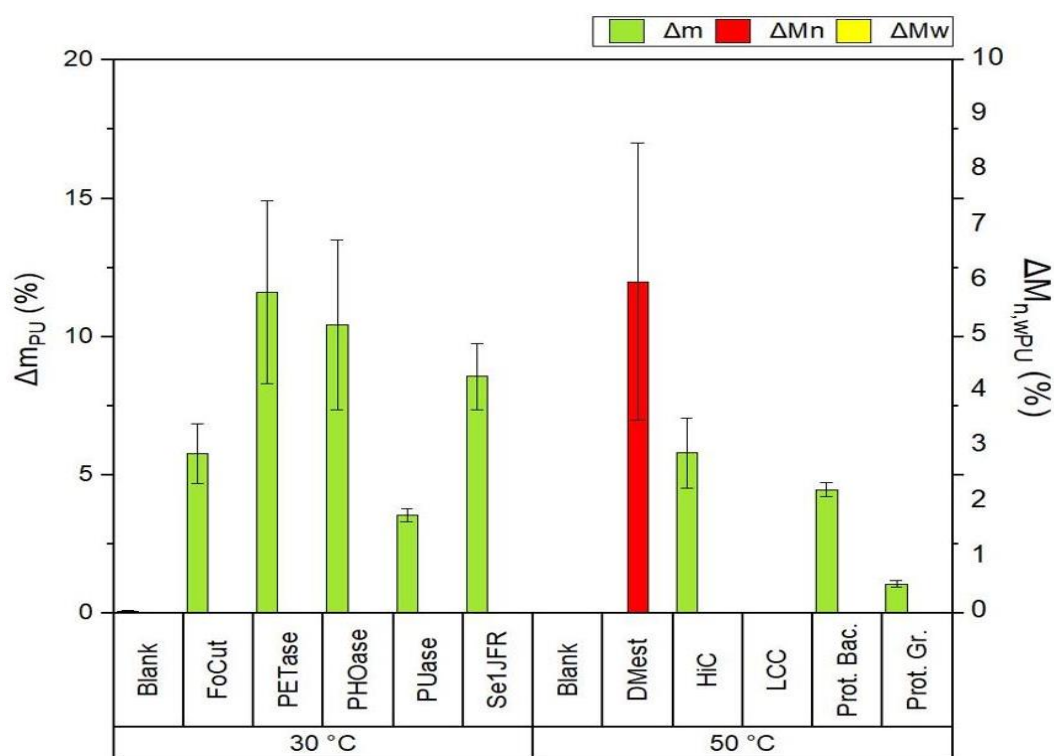
Οι εστεράσες PHOase και PUase εμφάνισαν σχεδόν όμοια αποτελέσματα δράσης στα βιοαποικοδομήσιμα πολυεστερικά υποστρώματα. Αδρανή εμφανίστηκαν και τα δύο ένζυμα στο PBS με σχεδόν μηδενικές μεταβολές μάζας, ενώ στα υπόλοιπα υλικά οι δράσεις των εστερασών ήταν αισθητές. Τη δεύτερη μεγαλύτερη μείωση μάζας παρουσίασαν οι PHOase και PUase και στο PHB, ίση με 9,24 % και 12,78 % αντίστοιχα. Διαφοροποιημένη εμφανίστηκε η εστερική δράση τους στο PCL το οποίο η PUase αποικοδόμησε κατά 80,75 % ενώ η PHOase μόλις κατά 46,74 %. Η PHOase παρουσίασε ενδείξεις διάσπασης των πολυμερικών αλυσίδων του υλικού PLA με μειώσεις του  $M_n$  κατά 27,91 % και του  $M_w$  κατά 17,66 % αντίστοιχα. Σε αντίθεση με την Se1JFR οι μειώσεις αυτές κατάφεραν να αντικατοπτριστούν, ελαχίστως, στην μεταβολή της μάζας του PLA, η οποία μειώθηκε κατά 5 % (και για τα δύο ένζυμα), αποτελώντας την δεύτερη μεγαλύτερη προκαλούμενη μείωση από όλες τις μελετώμενες πολυεστεράσες.

Τέλος οι μελετώμενες πρωτεάσες Prot. Bac. και Prot. Gr. προκάλεσαν σημαντικές μεταβολές στα μέσα μοριακά βάρη των βιοαποικοδομήσιμων πλαστικών αλλά σχεδόν σε όλα μηδενικές μεταβολές μάζας. Από τις μεταβολές μοριακών βαρών, τη μεγαλύτερη μείωση, εκ των δέκα μελετώμενων ενζύμων, του  $M_n$  του δείγματος PLA, εμφάνισε η Prot. Bac σε ποσοστό 37,87 % με αντίστοιχη μείωση 15,98 % της Prot.Gr. Σημαντικές ήταν και οι προσβολές των μεγάλων πολυμερικών αλυσίδων του PLA από τις πρωτεάσες με μειώσεις του  $M_w$  να κυμαίνονται σε εύρος περίπου 5 – 20 %. Οι Prot. Bac και Prot. Gr. αποτελούν τα μόνα ένζυμα που δεν βιοαποικοδόμησαν το PCL.

### 3.5.2.5) Βιοαποικοδομητική δράση των παραγόμενων πολυεστερασών στη πολυεστερική σκόνη PU

Για την πολυεστερική PU υπολογίστηκε η τελική μάζα της πολυεστερικής σκόνης με το πέρας της αντίδρασης, καθώς και τα μέσα μοριακά βάρη,  $M_n$  και  $M_w$ , με τα αποτελέσματα να αναφέρονται επιγραμματικά στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ζ : Τελικές μάζες, μέσα μοριακά βάρη και συγκεντρώσεις των προϊόντων υδρόλυσης.

Βάσει αυτών των αποτελεσμάτων, υπολογίστηκαν οι ποσοστιαίες μεταβολές των μεγεθών, με τις σημαντικότερες εκ αυτών να απεικονίζονται διαγραμματικά ως εξής :



**Διάγραμμα 13** : Μεταβολή της μάζας και των μέσων μοριακών βαρών της πολυεστερικής σκόνης PU λόγω ενζυμικής δράσης των μελετώμενων πολυεστερασών.

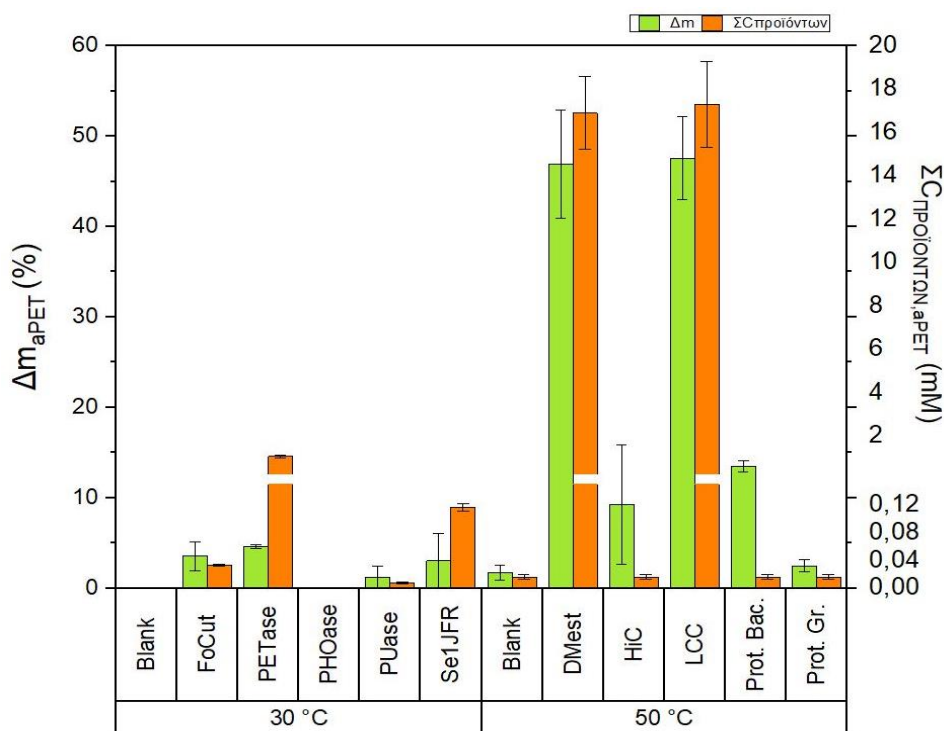
Σύμφωνα με το Διάγραμμα 13, τα περισσότερα ένζυμα παρουσίασαν μικρές ενδείξεις υποβάθμισης της πολυεστερικής PU. Συγκεκριμένα και τα πέντε ένζυμα δράσης στους 30 °C κατάφεραν να προκαλέσουν μείωση μάζας στην σκόνη. Την υψηλότερη δράση, από αυτά, παρουσίασε η PETase, ένα από τα δύο ένζυμα αναφοράς διάσπασης του

PET, με ποσοστιαία μείωση περίπου 12 %, ακολουθούμενη από τη PHOase, η οποία βιοαποικοδόμησε την PU κατά 10,43 %. Η δράση της λιπάσης Se1JFR οδήγησε σε 8,57 % μείωση της μάζας της PU ενώ τέλος μικρές απώλειες μάζας προκάλεσαν και τα ένζυμα FoCut και PUase ίσες με περίπου 6,0 % και 3,5 % αντίστοιχα. Όσον αφορά τις πολυεστεράσες με θερμοκρασία δράσης 50 °C τα αποτελέσματα υποβάθμισης ήταν λιγότερο αισθητά. Συγκεκριμένα την μέγιστη δράση εμφάνισε η κουτινάση HiC με περίπου 6 % μείωση της μάζας της PU ενώ 4,47 % μείωση προκάλεσε η δράση της πρωτεάσης Prot. Bac.. Αρκετά χαμηλή μείωση μάζας, ίση με 1,06 %, παρουσίασε η πολυμερική σκόνη PU έπειτα από την δράση της πρωτεάσης Prot. Gr.. Τέλος, τα ένζυμα Dmest και LCC δεν εμφάνισαν ενδείξεις υποβάθμισης της PU, βάσει διαφοράς μάζας. Η Dmest, βέβαια, παρουσίασε ενδείξεις δράσης στο υπόστρωμα PU μέσω μεταβολής του  $M_n$  κατά 6 % περίπου. Όσον αφορά όλα τα υπόλοιπα ένζυμα η δράση κανενός δεν οδήγησε σε μεταβολή των μέσων μοριακών βαρών της τελικής πολυμερικής σκόνης PU.

#### 3.5.2.6) Βιοαποικοδομητική δράση των παραγόμενων πολυεστερασών στη πολυεστερική σκόνη άμορφου PET

Για το άμορφο PET υπολογίστηκε η τελική μάζα της πολυεστερικής σκόνης με το πέρασ της αντίδρασης, καθώς και τα απελευθερωμένα προϊόντα υδρόλυσης στο διάλυμα της αντίδρασης, με τα αποτελέσματα να αναφέρονται επιγραμματικά στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ζ : Τελικές μάζες, μέσα μοριακά βάρη και συγκεντρώσεις των προϊόντων υδρόλυσης.

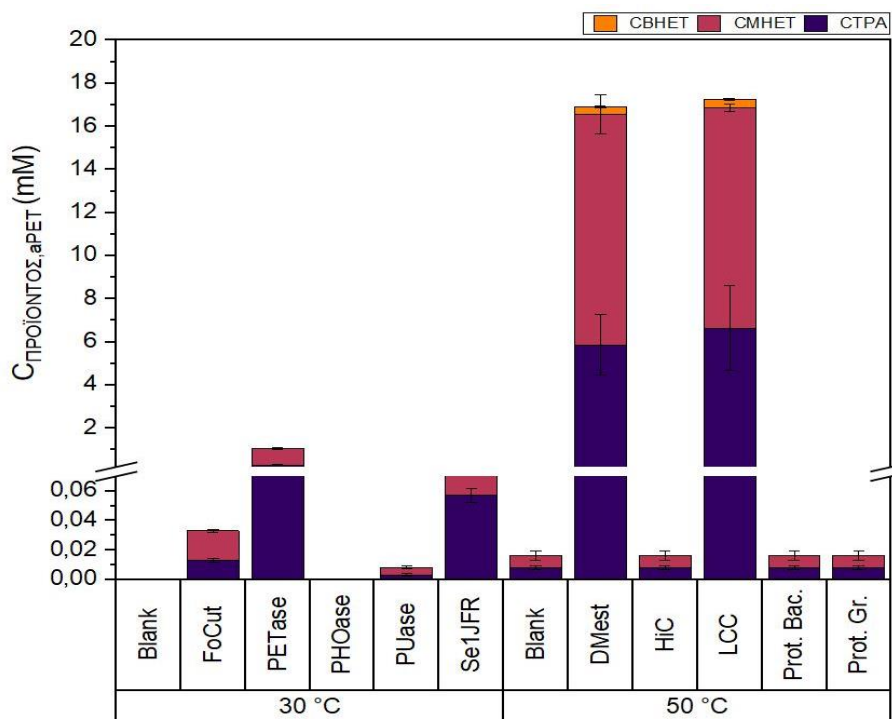
Βάσει αυτών των αποτελεσμάτων, υπολογίστηκαν οι ποσοστιαίες μεταβολές της μάζας της πολυμερικής σκόνης, με τις σημαντικότερες εκ αυτών, σε συνδυασμό με τις συγκεντρώσεις των απελευθερωμένων προϊόντων, να απεικονίζονται διαγραμματικά ως εξής :



**Διάγραμμα 14** : Μεταβολή της μάζας και της πολυεστερικής σκόνης άμορφου PET και η συνολική συγκέντρωση απελευθερωμένων προϊόντων υδρόλυσης, λόγω ενζυμικής δράσης των μελετώμενων πολυεστερασών.

Όπως προκύπτει από το Διάγραμμα 14, έξι πολυεστεράσες παρουσίασαν ενδείξεις υποβάθμισης του άμορφου PET. Γενικότερα το άμορφο PET, λόγω της ελάχιστης κρυσταλλικότητας του, επιδέχεται, θεωρητικά, ευκολότερη βιοαποικοδόμηση από το κρυσταλλικό. Συγκεκριμένα, δύο από τα ένζυμα δράσης στους 50 °C, προκάλεσαν αξιοσημείωτες ποσοστιαίες μείωσης μάζας της πολυμερικής σκόνης. Αρχικά η LCC βιοαποικοδόμησε την άμορφη σκόνη PET κατά 47,57 %, σε 3 ημέρες, ποσοστό το οποίο οδήγησε σε απελευθέρωση προϊόντων υδρόλυσης συνολικής συγκέντρωσης της τάξης των 17 mM. Στις ίδιες συνθήκες δράσης η Dmest προκάλεσε διάσπαση ίδιου μεγέθους, με ποσοστιαία μείωση του βάρους του άμορφου PET ίση με 46,90 % και επίσης περίπου 17 mM απελευθερωμένων προϊόντων. Συνεπώς η δράση της Dmest στο άμορφο PET μπορεί να εξισωθεί με αυτή της LCC, η οποία αποτελεί μια από τις δύο γνωστότερες PET-υδρολάσες που διασπά το άμορφο PET σε υψηλές θερμοκρασίες. Από τις υπόλοιπες μελετώμενες πολυεστεράσες με υψηλή θερμοκρασία δράσης, η πρωτεάση Prot. Bac. φαίνεται να αποικοδόμησε την σκόνη του άμορφου PET κατά 13,44 %, παρ' όλα αυτά η ποσοστιαία αυτή μείωση βάρους δεν αντικατοπτρίστηκε σε απελευθερωμένα προϊόντα υδρόλυσης στο διάλυμα της αντίδρασης, γεγονός που υποδηλώνει μεγάλη πιθανότητα πειραματικών σφαλμάτων. Παρόμοια συμπεριφορά παρουσίασαν και τα ένζυμα HiC (αν και τα βιβλιογραφικά αποτελέσματά της είναι αξιοσημείωτα) και Prot. Gr. με μηδενικές συγκεντρώσεις απελευθερωμένων ολιγομερών παρά τις ποσοστιαίες μεταβολές μάζας του άμορφου PET κατά περίπου 9,0 % και 2,5 % αντίστοιχα.





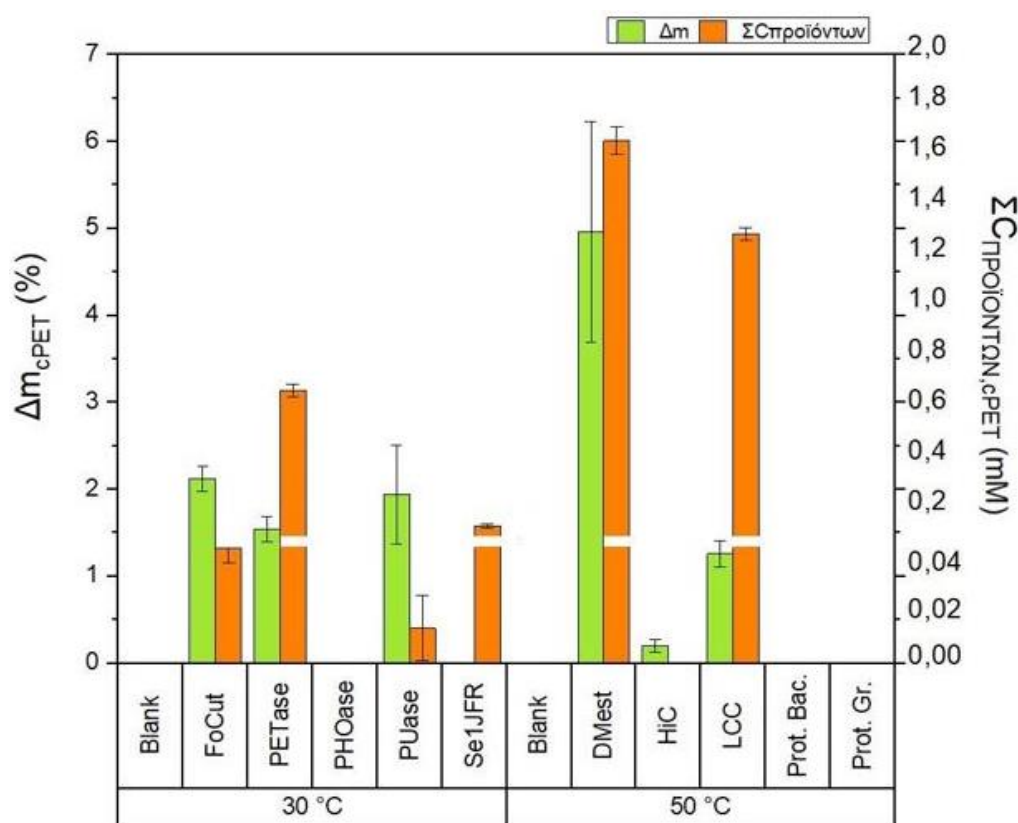
**Διάγραμμα 15** : Συγκεντρώσεις των απελευθερωμένων προϊόντων υδρόλυσης της πολυμερικής σκόνης άμορφου PET, TPA MHET και BHET.

Όπως προαναφέρθηκε και κατά την ανάλυση του Διαγράμματος 14, η συνολική συγκέντρωση των προϊόντων υδρόλυσης του άμορφου PET, από τα ένζυμα LCC και DMest ήταν σχεδόν παρόμοια και ίση με 17 mM. Από το Διάγραμμα 15, προκύπτει ότι οι συγκεντρώσεις αυτές αποτελούνται, ως επί το πλείστον, από τα προϊόντα TPA και MHET, και μάλιστα σε αναλογία περίπου 1:1, ως προς την συνολική συγκέντρωση, με τις ποσότητες του παραγόμενου BHET να είναι σημαντικά μικρότερες, της τάξης των 0,3 mM στα 17 mM (περίπου 2 %). Συνεπώς, για τις δύο δραστικότερες, στο άμορφο PET, πολυεστεράσες, πέρα των ίδιων συνολικών συγκεντρώσεων απελευθερωμένων προϊόντων επικρατεί και ίδια αναλογία TPA και BHET, υποδηλώνοντας παρόμοιο μηχανισμό δράσης. Για τις πολυεστεράσες των 30 °C, τα αποτελέσματα των συγκεντρώσεων των προϊόντων υδρόλυσης εμφανίζουν μικρές διαφορές. Συγκεκριμένα η FoCut απελευθερώνει τη μικρότερη ποσότητα προϊόντων υδρόλυσης με συνολική συγκέντρωση 0,033 mM και αναλογία TPA:MHET ίση με περίπου 2:3, επί της συνολικής συγκέντρωσης. Η υψηλότερη ποσότητα MHET στο διάλυμα την αντίδρασης πιθανώς υποδηλώνει την ασθενέστερη δράση της FoCut ως MHETase, συγκριτικά με τα ένζυμα PETase και Se1JFR, όπου οι αναλογίες των προϊόντων εμφανίζουν ίδια τάση, παρά την μεγάλη διαφορά στην συνολική συγκέντρωσή τους. Η αναλογία TPA:MHET κυμαίνεται στα επίπεδα του 1:1 για την Se1JFR και του 3:1 για την PETase, η οποία δείχνει να διασπά ευκολότερα το απελευθερωμένο MHET.

### 3.5.2.7) Βιοαποικοδομητική δράση των παραγόμενων πολυεστερασών στη πολυεστερική σκόνη κρυσταλλικού PET

Για το κρυσταλλικό PET υπολογίστηκε η τελική μάζα της πολυεστερικής σκόνης με το πέρας της αντίδρασης, καθώς και τα απελευθερωμένα προϊόντα υδρόλυσης στο διάλυμα της αντίδρασης, με τα αποτελέσματα να αναφέρονται επιγραμματικά στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ζ : Τελικές μάζες, μέσα μοριακά βάρη και συγκεντρώσεις των προϊόντων υδρόλυσης.

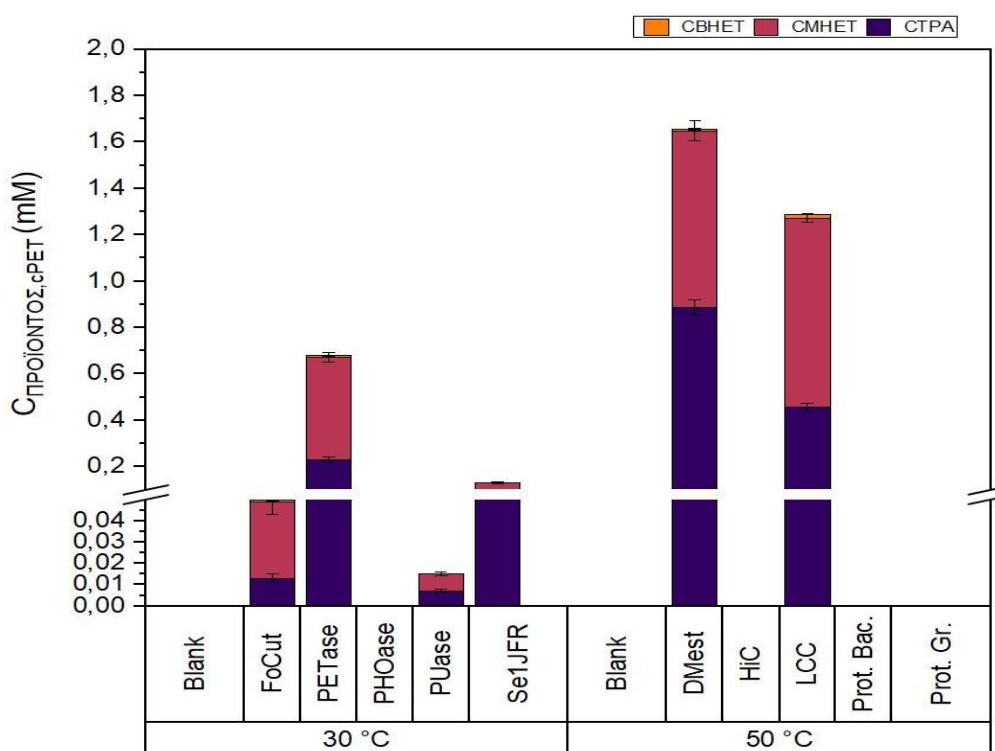
Βάσει αυτών των αποτελεσμάτων, υπολογίστηκαν οι ποσοστιαίες μεταβολές της μάζας της πολυμερικής σκόνης, με τις σημαντικότερες εκ αυτών, σε συνδυασμό με τις συγκεντρώσεις των απελευθερωμένων προϊόντων, να απεικονίζονται διαγραμματικά ως εξής :



**Διάγραμμα 16 :** Μεταβολή της μάζας και της πολυεστερικής σκόνης κρυσταλλικού PET και η συνολική συγκέντρωση απελευθερωμένων προϊόντων υδρόλυσης, λόγω ενζυμικής δράσης των μελετώμενων πολυεστερασών.

Για τις πολυεστεράσες δράσης χαμηλής θερμοκρασίας 30 °C, σύμφωνα με το Διάγραμμα 16, οι ποσοστιαίες μεταβολές μάζας της πολυμερικής σκόνης του κρυσταλλικού PET κυμαίνονται σε παρόμοια, μεταξύ τους, επίπεδα, με ποσοστιαίες μειώσεις του 2,0 %, από τα ένζυμα FoCut, PETase και PUase. Γενικότερα οι μεταβολές σε τέτοια μικρά επίπεδα μπορούν να ερμηνεύσουν την πιθανή εστερική δράση των ενζύμων, την οποία βέβαια μπορούν να υποδείξουν καλύτερα οι ποσότητες των απελευθερωμένων προϊόντων υδρόλυσης, μεγέθη μεγαλύτερης τάξης,

επιβεβαιώνοντας τις μειώσεις μάζας. Έτσι η PETase απελευθέρωσε την μεγαλύτερη ποσότητα προϊόντων από την διάσπαση των πολυμερικών αλυσίδων του κρυσταλλικού PET, ίση με 0,70 mM ακολουθούμενη από την Se1JFR με 0,13 mM. Χαμηλές συνολικές συγκεντρώσεις προϊόντων της τάξης των 0,015 και 0,05 mM απελευθέρωσαν τα ένζυμα PUase και FoCut, αντίστοιχα. Η PHOase δεν εμφάνισε ενδείξεις δράσης στο κρυσταλλικό PET. Συνεπώς η PETase αποτέλεσε την ισχυρότερη πολυεστεράση χαμηλής θερμοκρασίας δράσης στο κρυσταλλικό PET. Ενδείξεις δράσης εμφάνισε όμως και η Se1JFR οι οποίες ξεχώρισαν των υπολοίπων ενζύμων. Όσον αφορά τις πολυεστεράσες που έδρασαν στους 50 °C, η LCC, η οποία αναμενόταν και ως η δραστικότερη βάσει βιβλιογραφικών πληροφοριών, διέσπασε το κρυσταλλικό PET προς απελευθέρωση συγκέντρωσης προϊόντων ίση με 1,289 mM, ενώ δεν προκάλεσε αισθητή μεταβολή μάζας του υλικού. Γίνεται λοιπόν αντιληπτό ότι η LCC εμφανίζει σημαντικότερη δράση, από την PETase, με σχεδόν τριπλάσια συγκέντρωση προϊόντων υδρόλυσης. Παρ' όλα αυτά η LCC δεν αποτέλεσε το δραστικότερο ένζυμο, αφού η Dmest κατάφερε να ξεπεράσει τα αποτελέσματα της. Συγκεκριμένα, από το Διάγραμμα 16, προκύπτει ότι πέραν της μεγαλύτερης ποσότητας προϊόντων διάσπασης ίση με 1,658 mM, η Dmest οδήγησε και σε ποσοστιαία μείωση μάζας της πολυμερικής σκόνης του κρυσταλλικού PET, κατά περίπου 5 %, τη μοναδική αισθητή μεταβολή και από τις δέκα πολυεστεράσες. Τα υπόλοιπα ένζυμα των 50 °C παρουσίασαν μηδενικές (Prot. Bac. και Prot. Gr.) ή ανεπαίσθητες (HiC) μεταβολές μάζας, οι οποίες αντικατοπτρίστηκαν και σε μηδενικές συγκεντρώσεις απελευθερωμένων προϊόντων.



**Διάγραμμα 17** : Συγκεντρώσεις των απελευθερωμένων προϊόντων υδρόλυσης της πολυμερικής σκόνης κρυσταλλικού PET, TPA MHET και BHET.

Παρατηρώντας το Διάγραμμα 17, γίνεται αντιληπτό ότι οι αναλογίες των απελευθερωμένων προϊόντων υδρόλυσης για κάθε ένζυμο, διαφέρουν με αυτές της δράσης του στο άμορφο PET. Έτσι στο κρυσταλλικό PET, οι αναλογίες TPA:MHET (ελάχιστα παραγόμενο BHET ως προς την συνολική συγκέντρωση προϊόντων), των δραστικότερων πολυεστερασών Dmest και LCC, είναι ίσες περίπου με 1:1 και 2:1, αντίστοιχα, με τις ποσότητες βέβαια του απελευθερωμένου TPA και των δύο ενζύμων να κυμαίνονται στις ίδιες τιμές, περίπου 0,8 mM. Όσον αφορά τα ένζυμα δράσης των 30 °C, οι αναλογίες TPA:MHET διαφέρουν και σε αυτή τη περίπτωση από τις αντίστοιχες του άμορφου PET. Για τη FoCut η αναλογία είναι περίπου 1:3, με σημαντικές ποσότητες του MHET να μην διασπώνται περαιτέρω προς TPA. Παρόμοια κατεύθυνση, με τη FoCut, παρουσιάζει η αναλογία των απελευθερωμένων προϊόντων υδρόλυσης της PETase, με μεγαλύτερη ποσότητα MHET έναντι του TPA, 2:1. Τέλος το μίγμα προϊόντων υδρόλυσης του κρυσταλλικού PET από την Se1JFR έχει αναλογία TPA:MHET, περίπου 1:1.



## 4) ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ , ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ & ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

### 4.1) Συζήτηση αποτελεσμάτων και συμπεράσματα

#### 4.1.1) Μελετώμενες πολυεστεράσες

##### 4.1.1.1) Γονίδια πολυεστερασών

Η παρούσα διπλωματική εργασία επικεντρώθηκε στην ανακάλυψη και βελτιστοποίηση έκφρασης πιθανών πολυεστερασών, ενζύμων τα οποία συμβάλλουν στην βιοαποικοδόμηση πλαστικών μέσω της υδρολυτικής δράσης τους στους εστερικούς δεσμούς του πολυμερικού σκελετού.

Η επιλογή των μελετώμενων πολυεστερασών πραγματοποιήθηκε με τρεις τρόπους :

- 1) Μέσω βιβλιογραφικής αναζήτησης, σε αναφορές που επισημαίνουν μικροοργανισμούς ή ένζυμά τους, με ενδείξεις βιοαποικοδόμησης κάποιου πολυεστερικού υποστρώματος. Έτσι επιλέχθηκαν τα μελετώμενα ένζυμα **HiC/Thermomyces insolens** (πρώην *Humicola insolens*), **FoCut/Fusarium oxysporum**, **LCC**, **PETase/Ideonella sakakiensis**, **PHAase/Comamonas testosteroni** 31A, **PHOase/Pseudomonas fluorescens**, **PLAase/Laceyella sacchari** LP175 και **PUase/Delftia acidovorans**.
- 2) Μέσω βιοπληροφορικής ανακάλυψης αμινοξικών αλληλουχιών ενζύμων με υψηλή ομολογία με ήδη γνωστά ένζυμα βιοαποικοδόμησης πλαστικών. Με τον τρόπο αυτό ανακαλύφθηκαν τα γονίδια έκφρασης των μελετώμενων ενζύμων **Dmest** και **Se1JFR**.
- 3) Μέσω της εκ φύσεως υδρολυτικής δράσης ορισμένων ενζύμων, όπως για παράδειγμα των πρωτεασών, που διασπούν τους πεπτιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών. Έτσι επιλέχθηκαν οι εμπορικά διαθέσιμες πρωτεάσες των *Bacillus licheniformis* (**Prot. Bac.**) και *Streptomyces griseus* (**Prot. Gr.**).

Τα παραπάνω ένζυμα δεν έχουν ξαναμελετηθεί συνδυαστικά ως προς πληθώρα διαφορετικών πολυεστερικών υποστρωμάτων, επομένως η βιοπληροφορική ευθυγράμμιση των αμινοξικών ακολουθιών των γονιδίων έκφρασής τους, κρίθηκε απαραίτητη προκειμένου να καταστεί εφικτή μια πρώτη σύγκριση και ομαδοποίηση τους που θα οδηγούσε σε μια κατατοπιστικότερη ερμηνεία των αποτελεσμάτων δράσης τους στα πολυμερικά υλικά.

Τα αποτελέσματα της ευθυγράμμισης, η οποία έγινε ως προς τα ένζυμα LCC και PETase, που είναι δυο από τα πιο πολυσυζητημένα και αποτελεσματικά βιοαποικοδομητικά ένζυμα του άμορφου PET έως σήμερα, έδειξαν ομολογία των τριών από τα δέκα ένζυμα. Συγκεκριμένα το ένζυμο Dmest εμφάνισε ομολογία 49,62 % και 51,33 % ενώ το ένζυμο Se1JFR 53,21 % και 47,51 % ως προς τα ένζυμα LCC και PETase αντίστοιχα. Οι PET-υδρολάσες LCC και PETase εμφάνισαν ομολογία μεταξύ τους της τάξης του 48,67 %. Οι επικαλύψεις όλων των ομολογιών ήταν αρκετά υψηλές (σχεδόν όλες μεγαλύτερες του 90 %), γεγονός που ενισχύει την σημασία των ποσοστών ομολογίας.

Τα παραπάνω αποτελέσματα ακολουθούν αναμενόμενη πορεία. Συγκεκριμένα τα βιοπληροφορικά ανακαλυμμένα ένζυμα Dmest και Se1JFR προέκυψαν και επιλέχθηκαν από αναζήτηση αλληλουχιών με υψηλές ομολογίες με τις κουτινάσες υδρόλυσης του άμορφου PET, LCC και PETase, οι οποίες εμφανίζουν και αυτές μεταξύ τους υψηλή ομολογία.

Η έλλειψη ομολογίας μεταξύ όλων των υπολοίπων μελετώμενων πολυεστερασών δικαιολογείται κυρίως λόγω των διαφορετικών εξειδικευμένων πολυεστερικών υποστρωμάτων δράσης τους αλλά και των διαφορετικών μικροοργανισμών προέλευσής τους. Συγκεκριμένα οι κουτινάσες, είναι μυκητιακές, HiC/*Thermomyces insolens* (πρώην *Humicola insolens*) και FoCut/*Fusarium oxysporum* και στοχεύουν κυρίως στην βιοαποικοδόμηση του PET [151], [198]. Βιβλιογραφικά αναφέρεται ότι τα δύο αυτά ένζυμα έχουν την κατάλληλη στερεοδομή και θέση του ενεργού του κέντρου προκειμένου να προσεγγίζουν ευκολότερα την επιφάνεια του πολυμερικού σκελετού του PET προς βιοαποικοδόμησή του [198], [208]. Ακόμα η προέλευση της HiC από θερμόφιλο μύκητα συνεπάγεται την βέλτιστη δράση της σε υψηλές θερμοκρασίες, σημαντικές για την ευκολότερη διάσπαση του, δύσκολα βιοαποικοδομήσιμου PET [209]. Παράλληλα τα υπόλοιπα ένζυμα PHAase, PHOase, PLAase και PUase απομονώθηκαν από μικροοργανισμούς με βιβλιογραφικές ενδείξεις διάσπασης των εξειδικευμένων πολυεστερικών υποστρωμάτων. Έτσι, το ένζυμο PHAase προήλθε από το βακτήριο *Comamonas testosteroni*, το οποίο απομονώθηκε από θαλάσσιο οικοσύστημα, και κατάφερε να διασπάσει το βιοπλαστικό PHB (Εικόνα 4), της οικογένειας των PHA, χρησιμοποιώντας το ως πηγή άνθρακα προς ανάπτυξή του [200]. Ομοίως επετεύχθη και η ανακάλυψη του βιοαποικοδομητικού βακτηρίου *Pseudomonas fluorescens* έπειτα από την ανάπτυξη του σε μέσο καλλιέργειας παρουσία πολυμερικών αλυσίδων PHA μεσαίου μοριακού βάρους. Το βακτήριο κατάφερε να αποικοδομήσει το πολυ(3-υδροξυοκτανοϊκό οξύ) (PHO) μέσω της εξωκυτταρικής αποπολυμεράσης PHOase, η οποία και επιλέχθηκε προς ετερόλογη έκφραση και μελέτη της πολυεστερικής της δράσης [201]. Η PLAase προήλθε από το θερμόφιλο βακτήριο *Lacayella sacchari* και ανήκει στην κατηγορία των πρωτεασών σερίνης. Το βακτήριο κατάφερε να διασπάσει το πολυμερές PLLA, κατά την ανάπτυξη του σε τρυβλίο Petri, παρουσία θρεπτικού υλικού στο οποίο το πολυμερές βρισκόταν διαλυμένο υπό τη μορφή γαλακτώματος [202]. Τέλος το μελετώμενο ένζυμο PUase προήλθε από το βακτήριο *Comamonas acidovorans* (TB-35) το οποίο κατά την

ανάπτυξη του σε υγρή καλλιέργεια εμφάνισε ενδείξεις βιοαποικοδόμησης στερεών κύβων πολυεστερικής PU [203]. Γίνεται λοιπόν αντιληπτό ότι, πέραν των ενζύμων που εμφάνισαν υψηλή ομολογία, καθένα από τα υπόλοιπα ένζυμα συμβάλλουν στην βιοαποικοδόμηση, εκ φύσεως ή λόγω γονιδιακών τροποποιήσεων, συγκεκριμένων ειδών πλαστικού είτε προέρχονται από διαφορετικά είδη μικροοργανισμών, οπότε η υψηλή ομολογία τους με τις PET-υδρολάσες είναι, ορθώς, μη αναμενόμενη.

Συνεπώς σύμφωνα με τα αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ευθυγράμμισης των αμινοξικών αλληλουχιών των γονιδίων των μελετώμενων πολυεστερασών τα ένζυμα Dmest, LCC, PETase και Se1JFR αναμένεται, θεωρητικά, να εμφανίσουν δράση στην πολυεστερική σκόνη του άμορφου PET. Το αυτό επιβεβαιώνεται μέσω του Διάγραμμα 14, στο οποίο απεικονίζονται τα αποτελέσματα των ομόλογων πολυεστερασών ως τα μοναδικά αξιοσημείωτα στο άμορφο PET, ενώ παρατηρείται μια παρόμοια δράση των ενζύμων Dmest-LCC και PETase-Se1JFR, στους 50 °C και 30 °C, αντίστοιχα. Τα υπόλοιπα ένζυμα αναμένεται να εμφανίσουν ενζυμική δράση στα εξειδικευμένα πολυεστερικά υποστρώματα, μέσω των οποίων και ανακαλύφθηκαν, όπως αυτά αναλύθηκαν παραπάνω. Η συγκεκριμένη θεωρία δεν επιβεβαιώθηκε, με την PHOase και την PUase να μην προκαλούν σημαντικές μεταβολές στα υλικά PHB (Διάγραμμα 11) και πολυεστερική PU (Διάγραμμα 13), αντίστοιχα. Παράλληλα μελετάται και η πιθανή δράση τους σε υπόλοιπες πολυεστεράσες, λόγω των εστερικών δεσμών των πολυμερικών σκελετών τους.

#### 4.1.1.2) Ετερόλογη έκφραση μελετώμενων πολυεστερασών

Η παραγωγή των μελετώμενων πολυεστερασών επετεύχθη, όχι για όλες, έπειτα από εφαρμογή πληθώρας διαφορετικών πρωτοκόλλων, αποδεικνύοντας ότι η ετερόλογη πρωτεϊνική έκφραση αποτελεί μια ιδιαίτερη διεργασία χωρίς νόρμες και αναλογικές συσχετίσεις μεταξύ των παραμέτρων εξάρτησής της.

Ακολουθώντας το συμβατικό πρωτόκολλο έκφρασης πρωτεϊνών σε ξενιστή *E. coli*, πραγματοποιήθηκε με επιτυχία η έκφραση των τεσσάρων, εκ των δέκα, πολυεστερασών, HiC, FoCut, LCC, PETase, που άλλωστε είχαν ήδη εκφραστεί, ομοίως, από πολλούς ερευνητές βιβλιογραφικά. Η έκφραση των υπολοίπων έξι ενζύμων μελετήθηκε ενδελεχώς με μεταβολές παραμέτρων και είχε ως αποτέλεσμα την επιτυχημένη παραγωγή των τεσσάρων πολυεστερασών, Dmest, PHOase, PUase και Se1JFR. Συγκεκριμένα τα τελικά βελτιστοποιημένα πρωτόκολλα αυτών διαφέρουν μεταξύ τους βάσει των αρχικών προβλημάτων που εμπόδιζαν την αρχική έκφραση τους.

Όσον αφορά τα μελετώμενα ένζυμα PHAase και PLAase παρά τις πολλαπλές διαφορετικές εφαρμογές πρωτοκόλλων δεν κατάφεραν να εκφραστούν ετερόλογα, ούτε σε ελάχιστες συγκεντρώσεις. Κρίνεται πολύ πιθανό τα ένζυμα αυτά αφού παράγονταν ενδοκυτταρικά να αποικοδομούνταν από τις ενδοπρωτεΐνες του *E. coli*. Η παραπάνω υπόθεση ενισχύεται και βάσει της τελικής εικόνας των πηκτών



ακρυλαμιδίου οι οποίες δεν εμφάνιζαν καμία πρωτεϊνική μπάνα καθ' όλη την έκταση της γέλης, παρότι υπήρχαν μικρές απορροφήσεις των κλασμάτων στα 280 nm, που υποδήλωναν την ύπαρξη πρωτεΐνης. Αντ' αυτού στην βάση της πηκτής (στα εύρη των πολύ μικρών μοριακών βαρών,  $\approx 10$  kDa) εμφανίζονταν ασθενούς χρωματισμού συσσωρευμένες μπάντες που ίσως αποτελούσαν τα μικρά κομμάτια των αποσυντιθέμενων παραγόμενων ενζύμων, PHAase και PLAase. Οι προσπάθειες που έλαβαν χώρα για την επίλυση του παραπάνω προβλήματος, με πρωτόκολλα μειωμένου χρόνου επαγωγής, δεν έφεραν αποτελέσματα.

Όπως προαναφέρθηκε η ετερόλογη έκφραση αποτελεί μια εξαιρετικά πολύπλοκη διαδικασία, η οποία επηρεάζεται τόσο από τα μεταβολικά μονοπάτια του κυττάρου όσο και από πληθώρα άλλων λειτουργικών παραγόντων. Όλα τα παραπάνω (όπως και οι σχολιασμοί του 3.2.2) Βελτιστοποίηση ετερόλογης έκφρασης πολυεστερασών με μεταβολή παραμέτρων), αποτελούν πιθανά συμπεράσματα για την πορεία έκφρασης του κάθε ενζύμου και προέκυψαν συνδυαστικά με μελέτη ηλεκτροφόρησης των παραλαμβανόμενων κλασμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου.

#### 4.1.1.3) Μοριακά βάρη και καθαρότητα των ετερόλογα εκφρασμένων πολυεστερασών

Τα αποτελέσματα της διαδικασίας ηλεκτροφόρησης των παραγόμενων πολυεστερασών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (Πίνακας 33), υπό αποδιατακτικές συνθήκες, επιβεβαίωσαν τόσο τις θεωρητικές εκτιμήσεις των μοριακών τους βαρών (βάσει της αμινοξικής αλληλουχίας των γονιδίων τους, ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ : Μοριακά βάρη και μοριακοί συντελεστές απορρόφησης των παραγόμενων πολυεστερασών) όσο και την καθαρότητα των τελικών συμπυκνωμένων ενζυμικών διαλυμάτων.

Έτσι, καθ' όλη την έκταση της πηκτής, για καθένα πρωτεϊνικό δείγμα, δεν εμφανίστηκαν περαιτέρω μπάντες, γεγονός που επιβεβαιώνει τον επιτυχημένο καθαρισμό μέσω χρωματογραφίας IMAC αλλά και την σωστή διαχείριση των ενζυμικών δειγμάτων, χωρίς ενδείξεις πρωτεϊνικής αποικοδόμησης (μπάντες σε μικρότερα μοριακά βάρη).

Το εύρος των μοριακών βαρών των μελετώμενων πολυεστερασών κυμαίνεται σε μικρές τιμές, από  $\approx 20$ -30 kDa, με μόνη εξαίρεση την PUase η οποία εντοπίζεται σε σχεδόν διπλάσιο μέγεθος ίσο με  $\approx 55$  kDa. Οι υδρολάσες, κυρίως οι κουτινάσες, εμφανίζουν τυπικά μοριακά βάρη στο εύρος που προσδιορίστηκε για σχεδόν όλες τις παραγόμενες πολυεστεράσες (20-30 kDa) [210], ενώ μεγαλύτερα μοριακά βάρη της τάξης της PUase κατέχουν και άλλα ένζυμα με ενδείξεις βιοαποικοδόμησης πολυεστερικών υποστρωμάτων όπως οι εστεράσες Tcur0390&1278 /*Thermomonospora curvata* (35 kDa) [211] και BsEstB/ *Bacillus subtilis* (55,2 kDa) [212].

#### 4.1.1.4) Βέλτιστες συνθήκες δράσης παραγόμενων πολυεστερασών

Πλην των βιβλιογραφικά χαρακτηρισμένων (FoCut, HiC, LCC και PETase) και των εμπορικά διαθέσιμων (Prot. Bac. και Prot. Gr.) ενζύμων, προσδιορίστηκαν οι συνθήκες βέλτιστης δράσης των παραγόμενων πολυεστερασών Dmest, PHOase, PUase και Se1JFR.

#### Βέλτιστο pH δράσης (pH<sub>OPTIMUM</sub>) των παραγόμενων πολυεστερασών

Όσον αφορά το pH δράσης και τα τέσσερα ένζυμα προσδιορίστηκε ότι λειτουργούν βέλτιστα (στο εστερικό υπόστρωμα pNPB) σε ουδέτερες και αλκαλικές, ασθενώς κυρίως, τιμές pH, βάσει των αποτελεσμάτων που παρουσιάζονται στα Διαγράμματα 1-4 και στον Πίνακα 35.

Σε σύγκριση με πολλά ανακαλυμμένα βιοαποικοδομητικά ένζυμα οι βέλτιστες τιμές δράσης ταυτίζονται σημαντικά. Συγκεκριμένα ένζυμα όπως, η λυοφιλιωμένη πρωτεάση K και η εστεράση *ABO2449/Alcanivorax borkumensis*, που αποικοδομούν σημαντικά το PLA λειτουργούν βέλτιστα σε pH ίσο με 8,0 [121], [126], όπως οι PHOase και PUase. Επιπλέον σε ασθενώς αλκαλικό pH 8,0 δρουν και όλα τα βιβλιογραφικά αναφερόμενα ένζυμα αποικοδόμησης της PU. Σε εύρος τιμών pH (7,5-8,0) δρουν και οι περισσότερες PHBases [134], [135]. Σε ουδέτερο pH 7,0, τιμή στην οποία η Dmest δρα βέλτιστα ενώ οι PUase και PHOase εμφανίζουν ενεργότητα μεγαλύτερη του 70 % της μέγιστης, πληθώρα PBS-υδρολασών δρουν βέλτιστα προς βιοαποικοδόμηση του πολυεστερικού υποστρώματος [139]–[143], [145]. Όσον αφορά το δύσκολα βιοαποικοδομήσιμο PET, πέραν των μελετώμενων ενζύμων αναφοράς LCC και PETase που δρουν βέλτιστα στο pH 8,0, υδρολάσες όπως η TfH/*Thermobifida fusca* (πρώην *Thermomonospora fusca*) και η ανασυνδυασμένη μορφή της σε *E. coli*, δρουν σε ουδέτερο (7,0) pH [153]. Τέλος η λιπάση/*Pseudomonas* και η ανασυνδυασμένη κουτινάση/*A. fumigatus* που αποικοδομούν πλήρως το PCL εμφανίζουν την μέγιστη δράση τους σε pH 7,0 και 8,0 αντίστοιχα [170], [171].

Συμπερασματικά τα περισσότερα βιοαποικοδομητικά ένζυμα πολυεστερικών υποστρωμάτων εμφανίζουν βέλτιστη δράση σε τιμές pH εύρους 7,0-8,0, όπως και οι παραγόμενες πολυεστεράσες Dmest, PHOase και PUase. Όσον αφορά το αλκαλικό pH (9,0) βέλτιστης δράσης της Se1JFR δεν εντοπίστηκαν ένζυμα που να εμφανίζουν μέγιστη ενεργότητα στη τιμή αυτή με παράλληλα σημαντικά αποτελέσματα αποικοδόμησης των πλαστικών.

Έτσι οι βέλτιστες τιμές pH των τεσσάρων ενζύμων (Dmest, PHOase, PUase, Se1JFR) βρίσκονταν στο εύρος 7,0-9,0, και οι αντίστοιχες τιμές των χαρακτηρισμένων ενζύμων FoCut, HiC, LCC & PETase στο εύρος 7,0-9,5 [150]–[152], [198]. Οι εμπορικά διαθέσιμες πρωτεάσες Prot. Bac και Prot. Gr. εμφάνιζαν, σύμφωνα με τις οδηγίες των σκευασμάτων, βέλτιστη δράση για pH 6,5-8,5 και 7,0 αντίστοιχα [205], [206], [207]. Τελικά για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων επιλέχθηκε ένα μέσο pH του

συνολικού εύρους των δέκα ενζύμων, 6,0-9,5, ίσο με 7,5 (P-P). Στην τιμή αυτή και τα τέσσερα χαρακτηριζόμενα ένζυμα εμφάνιζαν αρκετά υψηλή ενεργότητα ενώ και οι βέλτιστες τιμές των υπολοίπων βιβλιογραφικών ενζύμων βρίσκονταν γύρω από αυτή. Επιπλέον η επιλογή ενός κοινού μέσου pH, στο οποίο όλα τα ένζυμα ήταν σημαντικά ενεργά, αν και όχι βέλτιστα, αποτελεί μια αντικειμενική βάση σύγκρισης.

#### Βέλτιστη θερμοκρασία δράσης (OPTIMUM) των παραγόμενων πολυεστερασών

Αντίστοιχα με τον προσδιορισμό του βέλτιστου pH δράσης προσδιορίστηκε και η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης των ενζύμων Dmest, PHOase, PUase και SeIJFR αφού για τα υπόλοιπα χρησιμοποιούμενα ένζυμα η γνώση αυτή υπήρχε βιβλιογραφικά. Βάσει των αποτελεσμάτων που παρουσιάζονται στα Διαγράμματα 5-8 και στον Πίνακα 35.

Έτσι τα μελετώμενα ένζυμα μπορούν να ομαδοποιηθούν σε αυτά με τη σχετικά χαμηλή βέλτιστη θερμοκρασία δράσης 30 °C (PHOase, PUase και SeIJFR) και με τη σχετικά υψηλή θερμοκρασία δράσης 50 °C (Dmest). Γενικότερα τα ένζυμα που έχουν μελετηθεί ως προς την βιοαποικοδομητική δράση των πλαστικών υποστρωμάτων ποικίλλουν ως προς τις θερμοκρασίες δράσης τους, σε αντίθεση με το pH το οποίο όπως έγινε αντιληπτό περιορίζεται σε ουδέτερες και ασθενώς αλκαλικές τιμές. Έτσι, κυρίως οι θερμοκρασίες δράσεις των ενζύμων αποικοδόμησης του PLA κυμαίνονται από 30 °C – 40 °C, με αρκετά ικανοποιητικές αποδόσεις (για παράδειγμα 80% μείωση βάρους από την πρωτεάση K στους 37 °C, 50,4 % αποικοδόμηση σε διαλυτές ενώσεις από την κουτινάση PaE/*Pseudozyma antarctica* στους 30 °C) [120], [121], [123]–[126]. Ειδική περίπτωση φαίνεται να αποτελεί η αλκαλάση/*Bacillus licheniformis* με ενδείξεις αποικοδόμησης υφάσματος PLA σε υψηλή θερμοκρασία δράσης 60°C [122]. Όσον αφορά τις PHBases οι περισσότερες δρουν σε θερμοκρασία 37 °C στα θερμοκρασιακά πλαίσια δηλαδή των PHOase, PUase και SeIJFR, με σημαντικά αποτελέσματα [130], [134], [135]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα η λιπάση παγκρέατος χοίρου που σε θερμοκρασία 37 °C βιοαποικοδομεί συμπολυμερές φιλμ PHB [130]. Τα ένζυμα που εντοπίστηκαν βιβλιογραφικά για την αποικοδόμηση του PBS μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες θερμοκρασιακής δράσης. Έτσι υπάρχουν PBSases με θερμοκρασίες δράσης 30 °C – 37 °C, όπως οι λιπάσες των *Rhizopus delemar*, *Pseudomonas* sp., *Candida cylindracea* και *Cryptococcus* sp., με την τελευταία μάλιστα να προκαλεί πλήρη βιοαποικοδόμηση του PBS στη θερμοκρασία των 30 °C [141]–[143]. Λειτουργικές φαίνονται να είναι και σε υψηλότερο θερμοκρασιακό εύρος 45 °C – 50 °C, με χαρακτηριστικά παραδείγματα τη λιπάση/*Pseudomonas cepacia* (αποικοδόμηση PBS φιλμ στους 50 °C) και τη λιπάση/*Candida antarctica* (αποικοδόμηση PBS φιλμ στους 45 °C) [140], [145]. Στη συνέχεια οι περισσότερες PU-υδρολάσες δείχνουν να λειτουργούν βέλτιστα σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες, όπως αυτή των 30 °C, με το ένζυμο του *Aspergillus* sp. S45 να προκαλεί μείωση βάρους σε φιλμ PU, ενώ πολλές υδρολάσες με θερμοκρασίες δράσης τους 60 °C προκαλούν αντίστοιχη μείωση σε κύβους PU [159], [164], [165]. Τα ένζυμα βιοαποικοδόμησης του PCL κυμαίνονται σε ένα εύρος δράσης 37 °C - 60 °C με πανομοιότυπα

αποτελέσματα [170], [171]. Τέλος όσον αφορά το PET, τα ένζυμα που καταφέρνουν να προκαλέσουν κάποια αισθητή μεταβολή φαίνεται να δρουν σε σχετικά υψηλές θερμοκρασίες (55 °C – 70 °C), οι οποίες πιθανώς να είναι και απαραίτητες για την υποβοήθηση της βιοαποικοδόμησης, είτε φτάνοντας στην θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης είτε αυξάνοντας την αταξία των πολυμερικών αλυσίδων του πλαστικού υποστρώματος (1.3.3) Παράγοντες που επηρεάζουν την βιοαποικοδόμηση πλαστικών [151]–[156]. Εξαιρέση αποτελεί η PETase/*Ideonella sakaiensis*, το χρησιμοποιούμενο ένζυμο αναφοράς, η οποία λειτουργεί βέλτιστα στους 30 °C [150].

Συμπερασματικά οι περισσότερες πολυεστεράσες έχουν θερμοκρασίες δράσης σε ένα εύρος 30 °C – 70 °C. Στο εύρος αυτό ανήκουν και τα δέκα μελετώμενα ένζυμα τα οποία συνοπτικά εμφανίζουν θερμοκρασίες βέλτιστης δράσης, στους 30 °C (PHOase, PUase, PETase και Se1JFR), στους 40 °C (FoCut) και στους 50 °C – 70 °C (Dmest, HiC, LCC, Prot. Bac. και Prot. Gr.) [151], [152], [198], [204]–[207]. Λόγω του μεγάλου θερμοκρασιακού εύρους επιλέχθηκαν οι αντιδράσεις με τα πολυεστερικά υποστρώματα να πραγματοποιηθούν σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες, στους 30 °C (FoCut, PETase, PHOase, PUase και Se1JFR) και στους 50 °C (Dmest, HiC, LCC, Prot. Bac. και Prot. Gr.). Οι θερμοκρασίες επιλέχθηκαν έτσι ώστε να καλύπτουν τις θερμοκρασιακές απαιτήσεις κάθε ενζύμου και να μην αποτελούν και ακραίες τιμές που ίσως οδηγούσαν σε απενεργοποίησή τους.

#### 4.1.2) Δράση μελετώμενων πολυεστερασών σε πολυεστερικά υλικά (πλαστικά)

Όπως προαναφέρθηκε, πέρα από την βελτιστοποίηση έκφρασης των παραγόμενων πολυεστερασών, βασικός στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε η μελέτη της ικανότητας τους ως προς την υποβάθμιση πολυεστερικών υποστρωμάτων. Οι πολυμερικές σκόνες που μελετήθηκαν ανήκαν σε βιοαποικοδομήσιμα (PLA, PBS, PCL, PHB) και μη πλαστικά (άμορφο και κρυσταλλικό PET, PU) ποικίλων μοριακών βαρών και βαθμών κρυσταλλικότητας.

##### 4.1.2.1) Δράση μελετώμενων πολυεστερασών σε βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά

Η μελέτη δράσης των παραγόμενων πολυεστερασών έλαβε χώρα ξεκινώντας από τα βιοαποικοδομήσιμα πολυμερικά υλικά στα οποία και αναμένονταν ενδείξεις υποβάθμισης, λόγω της εκ φύσεως δυνατότητας τους να επιδέχονται ενζυμικές προσβολές στο πολυμερικό σκελετό τους.

#### Σχολιασμός των αποτελεσμάτων δράσης και σύγκριση των παραγόμενων πολυεστερασών

Από την ανάλυση αποτελεσμάτων που πραγματοποιήθηκε στην παράγραφο Συνολική ανάλυση των αποτελεσμάτων ενζυμικής δράσης στα βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά PBS, PCL, PHB και PLA, προέκυψε η το συμπέρασμα ότι τα αποτελέσματα δράσης

όλων, σχεδόν, των ενζύμων σε τουλάχιστον ένα βιοαποικοδομήσιμο πολυμερές, υπήρξαν αρκετά ενθαρρυντικά και επιβεβαίωσαν την ενεργότητα τους ενώ απέδειξαν και την αναμενόμενη υδρολυτική δράση τους στους εστερικούς δεσμούς των πολυεστερικών υλικών. Βέβαια κάποια ένζυμα ξεχώρισαν λόγω των αποτελεσμάτων τους από τα υπόλοιπα. Τη μεγαλύτερη ποσοστιαία διαφορά μάζας στο PBS προκάλεσε η LCC (92,44 %), στο PHB η PETase (14,45 %), στο PLA η FoCut (15,27 %) και στο PCL οι Dmest, FoCut, LCC και Se1JFR, με σχεδόν πλήρη βιοαποικοδόμηση (88,26 %, 98,88 %, 95,75 % και 95,88 % αντίστοιχα) και από τα τέσσερα ένζυμα, σε μόλις μια ημέρα. Όσον αφορά τα μέσα μοριακά βάρη οι σημαντικότερες μεταβολές εντοπίστηκαν στο PLA από τις πρωτεάσες (μείωση 15,98 % - 37,87 % για το  $M_n$  και 5,73 % - 18,23 % για το  $M_w$ ) καθώς και τη Se1JFR (μείωση 27,91 % για το  $M_n$  και 17,66 % για το  $M_w$ ). Εν κατακλείδι, βάσει της συνολικής απόδοσης τους, τα ένζυμα Dmest, FoCut, LCC, PETase και Se1JFR, προκάλεσαν τις σημαντικότερες υποβαθμίσεις στις βιοαποικοδομήσιμες πολυεστερικές σκόνες. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι η PHOase, το μοναδικά παραγόμενο ένζυμο με εξειδικευμένο βιοαποικοδομήσιμο πολυμερές δράσης, PHO (της οικογένειας των PHAs), δεν κατάφερε να εμφανίσει την καλύτερη, αναμενόμενη, δράση στη πολυεστερική σκόνη PHB (PHAs).

#### Σύγκριση των αποτελεσμάτων δράσης των παραγόμενων πολυεστερασών με αυτά άλλων βιβλιογραφικών αποπολυμερασών βιοαποικοδομήσιμων πλαστικών

Συγκριτικά με βιβλιογραφικά ένζυμα πολλές από τις μελετώμενες πολυεστεράσες επέτυχαν εξίσου σημαντικά ή ακόμα και ικανοποιητικότερα αποτελέσματα ως προς την υποβάθμιση των βιοαποικοδομήσιμων πολυεστέρων.

Έτσι, όσον αφορά το πλαστικό PCL, τα ένζυμα FoCut και Se1JFR οδήγησαν σε πλήρη αποικοδόμηση του σε μόλις 24 h στους 30 °C, αποτέλεσμα που επιτυγχάνει η λιπάση/*Pseudomonas* σε περισσότερο χρόνο, 94 h, σε παρόμοιο εύρος θερμοκρασίας (37 °C) και pH [170]. Στους 60 °C οι κουτινάσες/*F. solani* και *A. fumigatus* διασπούν το PCL, κατά 23,9 % και 100 % αντίστοιχα, σε ελαφρώς αλκαλικό pH σε 12 h [171]. Οι μελετώμενες πολυεστεράσες Dmest και LCC εμφανίζουν, σε παρόμοιες συνθήκες, βελτιωμένη δράση συγκριτικά με τη κουτινάση/*F. solani* αλλά όχι του *A. fumigatus*.

Βέλτιστα αποτελέσματα αποικοδόμησης του PBS παρουσίασε του ένζυμο LCC σε θερμοκρασία δράσης 50 °C, με περίπου 93 % αποικοδόμηση του υλικού σε 3 ημέρες. Παράλληλα η λιπάση/*Pseudomonas cepacia* προκαλεί υποβάθμιση της παραπάνω τάξης, σε φιλμ PBS, σε ίδιες, περίπου, συνθήκες σε διάστημα 14 ημερών, σε τετραπλάσιο δηλαδή χρόνο [140]. Σε παρόμοιες συνθήκες, η λιπάση/*Cryptococcus* sp. προκάλεσε 80 % μείωση βάρους φιλμ PBS σε μόλις 1 ημέρα, με σημαντικά υψηλή βέβαια χρησιμοποιούμενη ποσότητα ενζύμου [142]. Η κουτινάση FoCut, που εμφάνισε την μεγαλύτερη δράση στο PBS από τις πολυεστεράσες των 30 °C, με ποσοστιαία μείωση του βάρους της σκόνης κατά 77 % σε 3 ημέρες, μπορεί να συγκριθεί με τη βιβλιογραφική κουτινάση/*Fusarium solani*, η οποία προκάλεσε σε θερμοκρασία 37 °C

αντίστοιχη μείωση 98 % σε 12 ώρες (υποεξαπλάσιο χρόνο) με τη χρήση υπερπολλαπλάσιας (50 φορές περίπου) ποσότητας ενζύμου [139]. Σε παρόμοιες συνθήκες η λιπάση/*Pseudomonas* sp. χρειάστηκε 15 ημέρες ώστε να διασπάσει το φιλμ PBS (μεγαλύτερου μοριακού βάρους από το μελετώμενο, 300 kDa έναντι 30 kDa) κατά 95 % [141].

Η δράση των μελετώμενων πολυεστερασών ως προς τα βιοαποικοδομήσιμα υλικά PHB και PLA εμφάνισε αποτελέσματα τα οποία δεν υπερσχύουν έναντι αντίστοιχων αποτελεσμάτων πολλών βιβλιογραφικών ενζύμων. Η δραστηρότερη, από τις δέκα πολυεστεράσες, PETase προκάλεσε, στην πολυμερική σκόνη PHB, μείωση μάζας της τάξης του 15 % περίπου, σε 3 ημέρες, υποβάθμιση που επιτυγχάνεται σε παρόμοιες συνθήκες από τις PHB αποπολυμεράσες/*Pseudomonas limoignei* A και *Alcaligenes faecalis* (ακόμα μεγαλύτερη μείωση, 21 %) σε μόλις 5 ώρες [134]. Στο PLA την πιο αισθητή μείωση βάρους προκάλεσε η κουτινάση FoCut της τάξης του 15 %, τιμή η οποία δεν δύναται να ανταγωνιστεί άλλες PLA υδρολάσες, που οδηγούν, σε θερμοκρασίες εύρους 30 °C – 40 °C, σε αποικοδομήσεις 25-80 % σε λίγες μόλις ώρες έως μερικές ημέρες [121]–[126].

#### 4.1.2.2) Δράση μελετώμενων πολυεστερασών σε μη βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά

Πράγματι, σύμφωνα με τα αποτελέσματα των Διαγραμμάτων 9-12, καθώς και τον παραπάνω σχολιασμό, προκύπτει ότι οι αναμενόμενες ενδείξεις υποβάθμισης των βιοαποικοδομήσιμων πολυεστερικών υλικών επιβεβαιώθηκαν από τις περισσότερες πολυεστεράσες. Στην συνέχεια λοιπόν οι παραγόμενες πολυεστεράσες μελετήθηκαν και ως προς την ικανότητα διάσπασης των μη βιοαποικοδομήσιμων πολυεστερικών υποστρωμάτων (άμορφου PET, κρυσταλλικού PET και πολυεστερικής PU). Η υποβάθμιση των μη βιοαποικοδομήσιμων πλαστικών από μικροοργανισμούς και ένζυμά τους αποτελεί σημαντική πρόκληση της διεθνούς επιστημονικής κοινότητας, με τα σημαντικά αποτελέσματα εκλείπουν

#### Σχολιασμός των αποτελεσμάτων δράσης στη PU και σύγκριση των παραγόμενων πολυεστερασών

Με μια πρώτη ματιά (Διάγραμμα 13) γίνεται αντιληπτό ότι τα αποτελέσματα υποβάθμισης του μη βιοαποικοδομήσιμου PU κυμαίνονται σε χαμηλότερα επίπεδα από τα αντίστοιχα των βιοαποικοδομήσιμων πλαστικών. Οι πολυεστεράσες χαμηλής θερμοκρασίας δράσης (30 °C) εμφανίζουν μια ικανοποιητικότερη τάση δράσης, με τα αποτελέσματα της PETase να δύναται να ανταγωνιστούν αντίστοιχα βιβλιογραφικών ενζύμων όπως των υδρολασών/*Thermobifida fusca* και *Thermomonospora curvata*, οι οποίες βέβαια δρουν σε υψηλότερες θερμοκρασίες, στο εύρος 50 °C - 70 °C [159], και προκαλούν, μικρές, μεταβολές μάζας κύβων θερμοπλαστικού PU. Οι μελετώμενες πολυεστεράσες που δρουν σε αυτό το ύψος θερμοκρασιών (50 °C) δεν προκάλεσαν αξιοσημείωτα αποτελέσματα. Η LCC, η οποία αποτελεί και ένζυμο αναφοράς

διάσπασης του PET το οποίο ανήκει επίσης στην κατηγορία των μη βιοαποικοδομήσιμων πλαστικών, φάνηκε αδρανής στο υπόστρωμα PU. Αντίστοιχα, η Dmest, η οποία ξεχώρισε για την δράση της στα βιοαποικοδομήσιμα υποστρώματα εμφάνισε ενδείξεις υποβάθμισης του PU μόνο μέσω διάσπασης των πολυμερικών αλυσίδων του δείγματος, που οδήγησαν σε μείωση του μέσου μοριακού βάρους κατά αριθμό. Η μεταβολή αυτή, ύψους 5%, δεν αποτυπώθηκε σε διαφορά μάζας της πολυμερικής σκόνης. Τέλος η PUase, η οποία απομονώθηκε από το βακτήριο *Comamonas acidovorans TB-35* [203], μικροοργανισμός που διασπά τη PU παράγοντας το ένζυμο εξωκυτταρικά, δεν προκάλεσε αξιοσημείωτες μεταβολές.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα γίνεται αντιληπτό ότι ο πολυμερικός σκελετός του PU δεν είναι επιδεκτικός για ενζυμική προσβολή, γεγονός που ίσως οφείλεται σε στερεοχημική παρεμπόδιση, με τη θέση των εστερικών δεσμών προσβολής να βρίσκονται σε κοντινή απόσταση από ογκώδεις αρωματικούς δακτυλίους που βρίσκονται στην δομή της. Παράλληλα, ακόμα και η αύξηση της θερμοκρασίας η οποία θεωρητικά συμβάλλει στην υποβοήθηση της βιοαποικοδόμησης δεν επέφερε αποτελέσματα.

#### Σύγκριση των αποτελεσμάτων δράσης των παραγόμενων πολυεστερασών με αυτά άλλων βιβλιογραφικών αποπολυμερασών της PU

Αν και τα αποτελέσματα δεν απέδειξαν την ύπαρξη μιας εστερικής PU-υδρολάσης ανάμεσα στα δέκα μελετώμενα ένζυμα, ακολουθούν την τάση της διεθνούς βιβλιογραφίας, με τα περισσότερα αναφερόμενα ένζυμα να προκαλούν ποσοστιαίες μειώσεις, του υλικού PU, της τάξης των 1,0 % - 3,2 % (σε υψηλές θερμοκρασίες, 60-70 °C) [159], ενώ πιο αισθητές υποβαθμίσεις, ύψους 9,0 % - 20 %, προκαλούνται υπό την ανάπτυξη μικροοργανισμών σε μέσο καλλιέργειας, παρουσία PU, μετά από πολύ περισσότερο χρόνο [164], [165].

#### Σχολιασμός των αποτελεσμάτων δράσης στο PET, σύγκριση των παραγόμενων πολυεστερασών και βιβλιογραφική σύγκριση με άλλες αποπολυμεράσες του PET.

Μέχρι σήμερα, πλήθος μελετών έχουν διεξαχθεί με απώτερο σκοπό την ανακάλυψη PET-υδρολασών, με τα αποτελέσματα να είναι αρκετά περιορισμένα. Τα δέκα μελετώμενα ένζυμα υποβλήθηκαν σε αντιδράσεις με πολυμερικές σκόνες άμορφου και κρυσταλλικού PET με τα αποτελέσματα υποβάθμισης να αναλύονται στη συνέχεια.

#### Σχολιασμός αποτελεσμάτων δράσης στο άμορφο-χαμηλής κρυσταλλικότητας PET και βιβλιογραφική σύγκριση

Τα αποτελέσματα, που αναλύθηκαν, μέσω του Διαγράμματος 14, όσον αφορά το άμορφο PET, συγκριτικά με τα αντίστοιχα του μη βιοαποικοδομήσιμου πλαστικού PU, κρίνονται αρκετά ενθαρρυντικά. Κυρίως η δράση της πολυεστεράσης Dmest ξεπέρασε

πληθώρα αποδόσεων άλλων βιβλιογραφικών ενζύμων με ενδείξεις αποικοδόμησης άμορφου ή χαμηλής κρυσταλλικότητας PET. Το παραπάνω κατάφερε και η LCC, κάτι το οποίο όμως θεωρείτο αναμενόμενο, λόγω της αναγνώρισης της ως η ισχυρότερη PET-υδρολάση μέχρι σήμερα. Έτσι τα αποτελέσματα της Dmest υπερσχύουν αντίστοιχα ανασυνδυασμένων βιβλιογραφικών υδρολασών με υψηλές θερμοκρασίες δράσης (65 °C – 70 °C) και ποσοστιαίες μειώσεις μάζας 12,6 % – 54,2 %, με την υψηλότερη να επιτυγχάνεται από την ανασυνδυασμένη υδρολάση rTfH/*Thermobifida fusca*, σε εβδομάδιο χρόνο (3 εβδομάδες) συγκριτικά με την Dmest [153]–[156]. Ακόμα και οι μικρές μεταβολές που προκάλεσαν τα ένζυμα Se1JFR και FoCut σε θερμοκρασία 30 °C, κρίνονται σημαντικές αφού ανήκαν στην τάξη των αντίστοιχων αποτελεσμάτων της PETase (στο εκπονούμενο πείραμα), η οποία είναι το μόνο βιβλιογραφικό ένζυμο δράσης στο άμορφο PET σε αυτή τη χαμηλή θερμοκρασία [150].

#### Σχολιασμός αποτελεσμάτων δράσης στο υψηλής κρυσταλλικότητας PET και βιβλιογραφική σύγκριση

Όσον αφορά το υψηλής κρυσταλλικότητας PET τα βιβλιογραφικά ένζυμα με υψηλές αποδόσεις βιοαποικοδόμησης του εκλείπουν. Ακόμα και οι γνωστές υδρολάσες του άμορφου PET, PETase και LCC, δεν έχουν καταφέρει να διασπάσουν το υψηλής κρυσταλλικότητας υλικό σε ποσοστά που θεωρούνται ικανοποιητικά για την χρήση τους σε διεργασίες βιοαποικοδόμησης υψηλής κλίμακας.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των Διαγραμμάτων 16 και 17 λοιπόν, πράγματι οι PET-υδρολάσες της άμορφης μορφής του PET, PETase και LCC, οι οποίες αποτελούν και τα πλέον περισσότερα μελετώμενα ένζυμα για την αντίστοιχη δράση σε κρυσταλλικό PET, εμφάνισαν ενδείξεις αποικοδόμησης. Η βιοπληροφορικώς ανακαλυμμένη πολυεστεράση Dmest όμως, ξεπέρασε τα παραπάνω αποτελέσματα και αποτέλεσε το δραστικότερο από τα μελετώμενα ένζυμα. Ακόμα, οι μικρές μεταβολές που προξένησε, στο κρυσταλλικό PET, η Se1JFR αποτελούν μια ενθαρρυντική πρώτη εικόνα, λαμβάνοντας υπ' όψη το γεγονός της χαμηλής θερμοκρασίας δράσης της.

#### 4.1.3) Γενικά συμπεράσματα

Συμπερασματικά και τα δέκα μελετώμενα ένζυμα εμφάνισαν ενδείξεις υποβάθμισης βιοαποικοδομήσιμων και μη πλαστικών. Τα αποτελέσματα μερικών από αυτά κρίνονται ιδιαίτερα ενδιαφέροντα ενώ κάποια άλλα περιορίζονται στην τάξη των ήδη βιβλιογραφικά αναφερόμενων. Έτσι τα ένζυμα HiC, PHOase, PUase, Prot. Gr. και Prot. Bac. παρουσίασαν μεταβολές στις πολυμερικές σκόνες, κυρίως των βιοαποικοδομήσιμων πλαστικών, και μάλιστα σε πληθώρα διαφορετικών υλικών. Τα αποτελέσματα τους αν και αποδεικνύουν τον πολυεστερικό χαρακτήρα των ενζύμων δεν υπερτερούν ανάμεσα στα αντίστοιχα της βιβλιογραφίας. Τα υπόλοιπα ένζυμα Dmest, FoCut, LCC, PETase και Se1JFR απέδειξαν ισχυρή δράση στα πολυμερικά



υλικά. Πέραν της σχεδόν πλήρους βιοαποικοδόμησης του PCL, τόσο σε χαμηλές όσο και σε υψηλές θερμοκρασίες, σε μόλις μια ημέρα, αποτέλεσμα αρκετά ανταγωνιστικό των αντίστοιχων της βιβλιογραφίας, τα παραπάνω ένζυμα στο σύνολο τους υποβάθμισαν και το PBS, ενώ στα υλικά PHB και PLA οι ισχυρότερες μεταβολές αφορούσαν τα μέσα μοριακά βάρη των πολυμερικών δειγμάτων. Υψίστης σημασίας κρίνονται τα αποτελέσματα των ενζύμων Dmest και Se1JFR, σε υψηλή και χαμηλή θερμοκρασία δράσης αντίστοιχα, ως προς την διάσπαση του μη βιοαποικοδομήσιμου PET. Η Se1JFR περιορίστηκε σε αποτελέσματα μικρότερης τάξης της γνωστής PET-υδρολάσης PETase, η οποία λειτουργεί στην ίδια χαμηλή θερμοκρασία. Παρ' όλα αυτά η PETase αποτελεί το μόνο βιβλιογραφικό ένζυμο, μέχρι σήμερα, που καταφέρνει να διασπάσει, όχι ικανοποιητικά, το κρυσταλλικό PET σε χαμηλή θερμοκρασία, και το γεγονός ότι σε αυτή τη θερμοκρασία η Se1JFR εμφανίζει ενδείξεις αποικοδόμησης είναι αρκετά ενθαρρυντικό. Το σημαντικότερο βέβαια από τα αποτελέσματα είναι αυτό που προκάλεσε η δράση του ενζύμου Dmest στο κρυσταλλικό PET. Συγκεκριμένα η Dmest κατάφερε να ξεπεράσει, στις ίδιες συνθήκες, τη δράση του ενζύμου LCC, που αποτελεί την μοναδική θερμόφιλη PET-υδρολάση, στο κρυσταλλικό PET, γεγονός το οποίο καθιστά επιτακτική την περαιτέρω έρευνα του ενζύμου, το οποίο μπορεί να αποτελέσει την κινητήριο δύναμη για την μεγάλης κλίμακας, βιομηχανική, ενζυμική υδρόλυση ανθεκτικών πολυεστέρων.

## 4.2) Μελλοντικές προτάσεις

Η μελέτη της βιοαποικοδόμησης των πολυμερών και η ανακάλυψη των κατάλληλων πολυεστερασών για την επίτευξή της, έχει ως απώτερο στόχο την δημιουργία βιώσιμων διεργασιών διάσπασης των συσσωρευμένων συμβατικών πλαστικών σε βιομηχανική κλίμακα. Για να είναι αποτελεσματική η χρήση των στοιχείων της παρούσας ερευνητικής μελέτης, σε ένα τέτοιο μελλοντικό σχέδιο, απαιτείται η πραγματοποίηση περαιτέρω πειραμάτων τα οποία στοχεύουν στην ενίσχυση της υδρολυτικής δράσης των μελετώμενων πολυεστερασών στα πολυμερικά υλικά.

Συγκεκριμένα παρατίθενται οι εξής μελλοντικές προτάσεις :

- 1) Πλήρης βιοχημικός χαρακτηρισμός των νέων παραγόμενων ενζύμων Dmest, PHOase, PUase και Se1JFR. Έτσι, προτείνεται ο προσδιορισμός της θερμοσταθερότητας των πολυεστερασών, με μελέτη την εξάρτησης της ενεργότητάς τους από τη θερμοκρασία και τον χρόνο. Παράλληλα συνιστάται ο προσδιορισμός της σταθερότητας των ενζύμων σε τιμές pH. Μέσω των παραπάνω θα δημιουργηθεί μια πληρέστερη εικόνα για τον μηχανισμό δράσης των ενζύμων με παράλληλο εμπλουτισμό των γνώσεων των βέλτιστων συνθηκών δράσης τους, με αποτέλεσμα την βελτιστοποίηση των αντιδράσεων με τα πολυεστερικά υλικά προς επίτευξη της μέγιστης δυνατής απόδοσης.
- 2) Μελέτη της δομής των ενζύμων και της πρόσδεσης του ενεργού τους κέντρου στα πολυεστερικά υποστρώματα, με τη βοήθεια της κρυσταλλογραφίας. Με τον τρόπο

αυτό θα αποκτηθούν γνώσεις για το πως επιτυγχάνεται η προσέγγιση κάθε πλαστικού από το κάθε ένζυμο, ξεχωριστά. Έτσι θα επιλυθούν σημαντικές απορίες για την υψηλή ή χαμηλή δράση των ενζύμων που προέκυψαν από τα αποτελέσματα των αντιδράσεων. Στη συνέχεια γνωρίζοντας την στερεοδομή των πρωτεϊνών μπορούν να σχεδιαστούν πειράματα κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης, οι οποίες θα στοχεύουν στην μεταβολή του μεγέθους του ενεργού κέντρου ή της υδροφοβικής φύσης του ενζύμου, με σκοπό την καλύτερη πρόσδεση των ενζύμων στα πολυεστερικά υποστρώματα.

- 3) Πραγματοποίηση πειραμάτων για την μελέτη της συνεργιστικής δράσης των μελετώμενων πολυεστερασών. Από τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας έγινε αντιληπτό ότι ένα ένζυμο μπορεί να διασπά τις μεγάλες πολυμερικές αλυσίδες και/ή να διασπά μικρότερες πολυμερικές αλυσίδες μεγαλύτερου αριθμού. Μια συνεργιστική δράση των ενζύμων που έχουν αυτή την ικανότητα ίσως αυξήσει σημαντικά την απόδοση των αντιδράσεων και οδηγήσει σε σημαντικότερες ενδείξεις υποβάθμισης των πολυεστέρων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα βάσει των αποτελεσμάτων αποτελούν, η συνεργιστική δράση της PHOase και της Prot. Gr. στο PHB (με κατάλληλη επιλογή θερμοκρασίας αντίδρασης), είτε της Dmest και της Prot. Gr. στο PLA.
- 4) Όσον αφορά τα μη βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά, και κυρίως τη PU, στην οποία δεν εμφανίστηκαν σημαντικές ενδείξεις δράσης από κανένα ένζυμο, προτείνεται η τροποποίηση των δραστικότερων πολυεστερασών (PETase και PHOase) μέσω γενετικής μηχανικής, με σκοπό την αύξηση της ενεργότητάς τους.
- 5) Προεπεξεργασία των πολυμερικών υλικών με στόχο τη μείωση της κρυσταλλικότητάς τους, που θα επιφέρει πιθανή αύξηση στην απόδοση υδρόλυσης. Παράλληλα η προσθήκη επιφανειοδραστικών στο διάλυμα της αντίδρασης η οποία ίσως συμβάλλει στην ευκολότερη προσβολή του πολυμερικού σκελετού από τις πολυεστεράσες.
- 6) Κλιμάκωση (scale up) της πειραματικής διαδικασίας των αντιδράσεων με τη χρήση μεγαλύτερων ποσοτήτων ενζύμων και πολυμερικών σκονών με παράλληλη μελέτη της επιρροής της τελική απόδοσης από αυτές. Το παραπάνω θα προσφέρει αποτελέσματα τα οποία ίσως αποτελέσουν ενθαρρυντικές ενδείξεις για εφαρμογή σε βιομηχανική κλίμακα.



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] L. Parker, “Plastic pollution facts and information,” 07-Jun-2019. [Online]. Available: <https://www.nationalgeographic.com/environment/article/plastic-pollution>. [Accessed: 28-Jul-2021].
- [2] “Cause of Plastic Pollution in the Environment - Plastic Soup Foundation.” [Online]. Available: <https://www.plasticsoupfoundation.org/en/plastic-problem/plastic-soup/cause-plastic-pollution/>. [Accessed: 28-Jul-2021].
- [3] T. Narancic and K. E. O’Connor, “Plastic waste as a global challenge: Are biodegradable plastics the answer to the plastic waste problem?,” *Microbiol. (United Kingdom)*, vol. 165, no. 2, pp. 129–137, 2019.
- [4] A. Chamas *et al.*, “Degradation Rates of Plastics in the Environment,” *ACS Sustain. Chem. Eng.*, vol. 8, no. 9, pp. 3494–3511, 2020.
- [5] B. He, M. Smith, P. Egodawatta, G. A. Ayoko, L. Rintoul, and A. Goonetilleke, “Dispersal and transport of microplastics in river sediments,” *Environ. Pollut.*, vol. 279, p. 116884, Jun. 2021.
- [6] “#BeatPlasticPollution This World Environment Day.” [Online]. Available: <https://www.unep.org/interactive/beat-plastic-pollution/>. [Accessed: 28-Jul-2021].
- [7] S. Nanda and F. Berruti, “Municipal solid waste management and landfilling technologies: a review,” *Environ. Chem. Lett.*, vol. 19, no. 2, pp. 1433–1456, 2021.
- [8] A. A. Shah, F. Hasan, A. Hameed, and S. Ahmed, “Biological degradation of plastics : A comprehensive review,” vol. 26, pp. 246–265, 2008.
- [9] J. P. da Costa, P. S. M. Santos, A. C. Duarte, and T. Rocha-Santos, “(Nano)plastics in the environment - Sources, fates and effects,” *Sci. Total Environ.*, vol. 566–567, pp. 15–26, 2016.
- [10] “Plastics Division : life cycle of a plastic product.” [Online]. Available: [https://web.archive.org/web/20100317004747/http://www.americanchemistry.com/s\\_plastics/doc.asp?CID=1571&DID=5972](https://web.archive.org/web/20100317004747/http://www.americanchemistry.com/s_plastics/doc.asp?CID=1571&DID=5972). [Accessed: 25-Jul-2021].
- [11] S. C. Rasmussen, “From Parkesine to Celluloid: The Birth of Organic Plastics,” *Angew. Chemie*, vol. 133, no. 15, pp. 8090–8094, 2021.
- [12] T. E. of E. Britannica, “Bakelite,” 22-Jul-2009. [Online]. Available: <https://www.britannica.com/science/Bakelite>. [Accessed: 25-Jul-2021].
- [13] D. Crespy, M. Bozonnet, and M. Meier, “100 Years of Bakelite, the material of a 1000 uses,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 47, no. 18, pp. 3322–3328, 2008.
- [14] “History and Future of Plastics | Science History Institute.” [Online]. Available: <https://www.sciencehistory.org/the-history-and-future-of-plastics>. [Accessed: 25-Jul-2021].
- [15] “Polymer Properties Database : Plastics.” [Online]. Available: [https://polymerdatabase.com/polymer\\_classes/Intro Plastics.html](https://polymerdatabase.com/polymer_classes/Intro%20Plastics.html). [Accessed: 25-Jul-2021].
- [16] V. M. Pathak and Navneet, “Review on the current status of polymer degradation: a microbial approach,” *Bioresour. Bioprocess.*, vol. 4, no. 1, 2017.
- [17] PlasticsEurope, “Annual Review 2017-2018,” *Assoc. Plast. Manuf.*, vol. 15, p. 44, 2018.
- [18] M. Bergmann, L. Gutow, and M. Klages, “Marine anthropogenic litter,” *Mar. Anthropog. Litter*, pp. 1–447, 2015.
- [19] S. A. Elias, *Plastics in the ocean*, vol. 1–5. Elsevier Inc., 2017.

- [20] Association of Plastic Manufacturers (Organization), “Plastics – the Facts 2020,” *PlasticEurope*, p. 16, 2020.
- [21] N. Hazimah, M. Nor, M. Kooi, and A. A. Koelmans, “Lifetime Accumulation of Microplastic in Children and Adults,” 2021.
- [22] M. Chang, “Microplastics in Facial Exfoliating Cleansers Michelle Chang,” *Spring*, pp. 1–26, 2013.
- [23] N. Laskar and U. Kumar, “Plastics and microplastics: A threat to environment,” *Environ. Technol. Innov.*, vol. 14, p. 100352, 2019.
- [24] GESAMP Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection), “Sources, fate and effects of microplastics in the marine environment: a global assessment (Kershaw, P. J., ed.). (IMO/FAO/UNESCO-IOC/UNIDO/WMO/IAEA/UN/UNEP/UNDP Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection),” *Rep. Stud. GESAMP*, vol. No. 90, p. 96 p., 2015.
- [25] J. Boucher and D. Friot, *Primary Microplastics in the Oceans*, vol. 111. 2017.
- [26] I. Efimova, M. Bagaeva, A. Bagaev, A. Kileso, and I. P. Chubarenko, “Secondary microplastics generation in the sea swash zone with coarse bottom sediments: Laboratory experiments,” *Front. Mar. Sci.*, vol. 5, no. SEP, 2018.
- [27] “Microplastics: sources, effects and solutions | News | European Parliament.” [Online]. Available: <https://www.europarl.europa.eu/news/en/headlines/society/20181116STO19217/microplastics-sources-effects-and-solutions>. [Accessed: 25-Jul-2021].
- [28] M. C. Krueger, H. Harms, and D. Schlosser, “Prospects for microbiological solutions to environmental pollution with plastics,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 99, no. 21, pp. 8857–8874, 2015.
- [29] X. Z. Lim, “Microplastics are everywhere - but are they harmful?,” *Nature*, vol. 593, no. 7857, pp. 22–25, May 2021.
- [30] J. Pinto da Costa, T. Rocha-Santos, and A. C. Duarte, “Requested by the PETI committee The environmental impacts of plastics and micro-plastics use , waste and pollution : EU and national measures,” 2020.
- [31] K. Rogers, “microplastics | Definition, Properties, & Plastic Pollution | Britannica.” [Online]. Available: <https://www.britannica.com/technology/microplastic>. [Accessed: 28-Jul-2021].
- [32] M. Shen *et al.*, “Can microplastics pose a threat to ocean carbon sequestration?,” *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 150, no. September, p. 110712, 2020.
- [33] Y. L. Wang, Y. H. Lee, I. J. Chiu, Y. F. Lin, and H. W. Chiu, “Potent impact of plastic nanomaterials and micromaterials on the food chain and human health,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 5, pp. 1–14, 2020.
- [34] R. R. Hurley and L. Nizzetto, “Fate and occurrence of micro(nano)plastics in soils: Knowledge gaps and possible risks,” *Curr. Opin. Environ. Sci. Heal.*, vol. 1, pp. 6–11, 2018.
- [35] A. A. De Souza MacHado *et al.*, “Impacts of Microplastics on the Soil Biophysical Environment,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 52, no. 17, pp. 9656–9665, 2018.
- [36] B. Boots, C. W. Russell, and D. S. Green, “Effects of Microplastics in Soil Ecosystems: Above and below Ground,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 53, no. 19, pp. 11496–11506, 2019.
- [37] X. Jiang, Y. Chang, T. Zhang, Y. Qiao, G. Klobučar, and M. Li, “Toxicological effects of polystyrene microplastics on earthworm (*Eisenia fetida*),” *Environ. Pollut.*, vol. 259, 2020.
- [38] W. Wang, J. Ge, X. Yu, and H. Li, “Environmental fate and impacts of microplastics in soil

- ecosystems: Progress and perspective,” *Sci. Total Environ.*, vol. 708, p. 134841, 2020.
- [39] L. Yang, Y. Zhang, S. Kang, Z. Wang, and C. Wu, “Microplastics in soil: A review on methods, occurrence, sources, and potential risk,” *Sci. Total Environ.*, vol. 780, p. 146546, Aug. 2021.
- [40] G. E. De-la-Torre, “Microplastics: an emerging threat to food security and human health,” *J. Food Sci. Technol.*, vol. 57, no. 5, pp. 1601–1608, 2020.
- [41] M. Hours, J. Févotte, S. Lafont, and A. Bergeret, “Cancer mortality in a synthetic spinning plant in Besançon, France,” *Occup. Environ. Med.*, vol. 64, no. 9, pp. 575–581, 2007.
- [42] S. E. Turcotte *et al.*, “Flock worker’s lung disease: Natural history of cases and exposed workers in Kingston, Ontario,” *Chest*, vol. 143, no. 6, pp. 1642–1648, 2013.
- [43] L. G. Gallagher *et al.*, “Occupational exposures and risk of stomach and esophageal cancers: Update of a cohort of female textile workers in Shanghai, China,” *Am. J. Ind. Med.*, vol. 58, no. 3, pp. 267–275, 2015.
- [44] “plastic pollution - Plastic pollution in oceans and on land | Britannica.” [Online]. Available: <https://www.britannica.com/science/plastic-pollution/Plastic-pollution-in-oceans-and-on-land>. [Accessed: 01-Aug-2021].
- [45] “What is a Modern Landfill Vs an Old Dump? | ERC of USA.” [Online]. Available: <https://www.ercofusa.com/blog/what-is-a-modern-landfill-so-much-more-than-the-old-dump/>. [Accessed: 01-Aug-2021].
- [46] “What You Probably Didn’t Know About the Benefits of Landfills | MSW Management.” [Online]. Available: <https://www.mswmanagement.com/landfills/article/13023301/what-you-probably-didnt-know-about-the-benefits-of-landfills>. [Accessed: 01-Aug-2021].
- [47] “Plastics: Material-Specific Data | US EPA.” [Online]. Available: <https://www.epa.gov/facts-and-figures-about-materials-waste-and-recycling/plastics-material-specific-data>. [Accessed: 01-Aug-2021].
- [48] K. Myer, Ed., *Applied Plastics Engineering Handbook Proseccing, Materials, and Applications*, Second Edi. 2017.
- [49] “Recycling Basics | US EPA.” [Online]. Available: <https://www.epa.gov/recycle/recycling-basics>. [Accessed: 01-Aug-2021].
- [50] S. M. Al-Salem, P. Lettieri, and J. Baeyens, “Recycling and recovery routes of plastic solid waste (PSW): A review,” *Waste Manag.*, vol. 29, no. 10, pp. 2625–2643, 2009.
- [51] A. R. Rahimi and J. M. García, “Chemical recycling of waste plastics for new materials production,” *Nat. Rev. Chem.*, vol. 1, pp. 1–11, 2017.
- [52] A. Lee and M. S. Liew, “Tertiary recycling of plastics waste: an analysis of feedstock, chemical and biological degradation methods,” *J. Mater. Cycles Waste Manag.*, vol. 23, no. 1, pp. 32–43, 2021.
- [53] R. Hatti-Kaul, L. J. Nilsson, B. Zhang, N. Rehnberg, and S. Lundmark, “Designing Biobased Recyclable Polymers for Plastics,” *Trends Biotechnol.*, vol. 38, no. 1, pp. 50–67, 2020.
- [54] M. D. Fernández Rodríguez, M. C. García Gómez, N. Alonso Blazquez, and J. V. Tarazona, “Soil Pollution Remediation,” *Encycl. Toxicol. Third Ed.*, no. June 2019, pp. 344–355, 2014.
- [55] D. R. Schneider and A. M. Ragossnig, “Recycling and incineration, contradiction or coexistence?,” *Waste Manag. Res.*, vol. 33, no. 8, pp. 693–695, 2015.
- [56] F. M. Lamberti, L. A. Román-Ramírez, and J. Wood, “Recycling of Bioplastics: Routes and Benefits,” *J. Polym. Environ.*, vol. 28, no. 10, pp. 2551–2571, 2020.
- [57] “Sustainability in the Workplace: 5 Major Benefits of Plastic Recycling.” [Online]. Available:

- <https://blog.impactplastics.co/blog/sustainability-in-the-workplace-5-major-benefits-of-plastic-recycling>. [Accessed: 01-Aug-2021].
- [58] “Advantages and Disadvantages of Landfills - Conserve Energy Future.” [Online]. Available: <https://www.conserve-energy-future.com/advantages-disadvantages-landfills.php>. [Accessed: 01-Aug-2021].
- [59] Howell Elizabeth and Lalonde Paul, “The Positive Impacts of Recycling Plastic | Lavergne,” 05-Jun-2020. [Online]. Available: <https://lavergne.ca/news/the-positive-impacts-of-recycling-plastic/>. [Accessed: 01-Aug-2021].
- [60] “Plastics recycling worldwide: current overview and desirable changes.” [Online]. Available: <https://journals.openedition.org/factsreports/5102#tocto2n2>. [Accessed: 01-Aug-2021].
- [61] H. K. Webb, J. Arnott, R. J. Crawford, and E. P. Ivanova, “Plastic degradation and its environmental implications with special reference to poly(ethylene terephthalate),” *Polymers (Basel)*, vol. 5, no. 1, pp. 1–18, 2013.
- [62] J. Siddiqui and G. Pandey, “A Review of Plastic Waste Management Strategies,” *Int. Res. J. Environ. Sci. Int. Sci. Congr. Assoc.*, vol. 2, no. 12, pp. 84–88, 2013.
- [63] V. Massardier-Nageotte, C. Pestre, T. Cruard-Pradet, and R. Bayard, “Aerobic and anaerobic biodegradability of polymer films and physico-chemical characterization,” *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 91, no. 3, pp. 620–627, 2006.
- [64] O. O. Nalcaci, N. Böke, and B. Ovez, “Comparative Study on the Removal of Various Phenoxyalkanoic Acid Herbicides from Aqueous Solutions on Polycaprolactone and Activated Carbon,” *J. Environ. Eng.*, vol. 137, no. 12, pp. 1136–1144, 2011.
- [65] J. Zhang, X. Wang, J. Gong, and Z. Gu, “A study on the biodegradability of polyethylene terephthalate fiber and diethylene glycol terephthalate,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 93, no. 3, pp. 1089–1096, 2004.
- [66] T. Urase, H. Okumura, S. Panyosaranya, and A. Inamura, “Emission of volatile organic compounds from solid waste disposal sites and importance of heat management,” *Waste Manag. Res.*, vol. 26, no. 6, pp. 534–538, 2008.
- [67] S. Y. Xu, H. Zhang, P. J. He, and L. M. Shao, “Leaching behaviour of bisphenol A from municipal solid waste under landfill environment,” *Environ. Technol.*, vol. 32, no. 11, pp. 1269–1277, 2011.
- [68] Y. N. Sundukov, “First record of the ground beetle *Trechoblemus postilenatus* (Coleoptera, Carabidae) in Primorskii krai,” *Far East. Entomol.*, vol. 165, no. April, p. 16, 2006.
- [69] D. Tsuchida, Y. Kajihara, N. Shimidzu, K. Hamamura, and M. Nagase, “Hydrogen sulfide production by sulfate-reducing bacteria utilizing additives eluted from plastic resins,” *Waste Manag. Res.*, vol. 29, no. 6, pp. 594–601, 2011.
- [70] “Endocrine disruptors - ECHA.” [Online]. Available: <https://echa.europa.eu/hot-topics/endocrine-disruptors>. [Accessed: 01-Aug-2021].
- [71] M. Geissdoerfer, P. Savaget, N. M. P. Bocken, and E. J. Hultink, “The Circular Economy – A new sustainability paradigm?,” *J. Clean. Prod.*, vol. 143, no. 0, pp. 757–768, 2017.
- [72] S. S. Ray and M. Bousmina, “Biodegradable polymers and their layered silicate nanocomposites: In greening the 21st century materials world,” *Prog. Mater. Sci.*, vol. 50, no. 8, pp. 962–1079, 2005.
- [73] I. S. Oberoi, P. Rajkumar, and S. Das, “Disposal and recycling of plastics,” *Mater. Today Proc.*, vol. 46, pp. 7875–7880, 2021.
- [74] A. F. O. Horodytska, A. Cabanes, “Plastic Waste Management: Current Status and Weaknesses,”

- [75] “Recycling is big business, but is it profitable? | plasticstoday.com.” [Online]. Available: <https://www.plasticstoday.com/recycling/recycling-big-business-it-profitable>. [Accessed: 21-Aug-2021].
- [76] C. C. Chen, L. Dai, L. Ma, and R. T. Guo, “Enzymatic degradation of plant biomass and synthetic polymers,” *Nat. Rev. Chem.*, vol. 4, no. 3, pp. 114–126, 2020.
- [77] R. Verma, K. S. Vinoda, M. Papireddy, and A. N. S. Gowda, “Toxic Pollutants from Plastic Waste- A Review,” *Procedia Environ. Sci.*, vol. 35, pp. 701–708, 2016.
- [78] T. Astrup, J. Møller, and T. Fruergaard, “Incineration and co-combustion of waste: Accounting of greenhouse gases and global warming contributions,” *Waste Manag. Res.*, vol. 27, no. 8, pp. 789–799, 2009.
- [79] B. Jiang, J. Yu, and Y. Liu, “The Environmental Impact of Plastic Waste,” *J. Environ. Earth Sci.*, vol. 2, no. 2, 2020.
- [80] R. Koshti, L. Mehta, and N. Samarth, “Biological Recycling of Polyethylene Terephthalate: A Mini-Review,” *J. Polym. Environ.*, vol. 26, no. 8, pp. 3520–3529, 2018.
- [81] A. L. Leitão and F. J. Enguita, “Structural insights into carboxylic polyester-degrading enzymes and their functional depolymerizing neighbors,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 5, pp. 1–14, 2021.
- [82] D. D. Focht, “Biodegradation,” *Access Sci.*, 2020.
- [83] N. T. Joutey, W. Bahafid, H. Sayel, and N. ElGhachtouli, “Biodegradation: Involved Microorganisms and Genetically Engineered Microorganisms,” *Biodegrad. - Life Sci.*, Jun. 2013.
- [84] S. Bahl, J. Dolma, J. Jyot, and S. Sehgal, “Materials Today : Proceedings Biodegradation of plastics : A state of the art review,” *Mater. Today Proc.*, vol. 39, pp. 31–34, 2021.
- [85] Z. Montazer, M. B. Habibi Najafi, and D. B. Levin, “Microbial degradation of low-density polyethylene and synthesis of polyhydroxyalkanoate polymers,” *Can. J. Microbiol.*, vol. 65, no. 3, pp. 224–234, 2019.
- [86] A. Magnin *et al.*, “Enzymatic recycling of thermoplastic polyurethanes: Synergistic effect of an esterase and an amidase and recovery of building blocks,” *Waste Manag.*, vol. 85, pp. 141–150, 2019.
- [87] B. Zhu, D. Wang, and N. Wei, “Enzyme Discovery and Engineering for Sustainable Plastic Recycling,” *Trends Biotechnol.*, pp. 1–16, 2021.
- [88] T. Ahmed *et al.*, “Biodegradation of plastics: current scenario and future prospects for environmental safety,” *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 25, no. 8, pp. 7287–7298, 2018.
- [89] N. Lucas, C. Bienaime, C. Belloy, M. Queneudec, F. Silvestre, and J. E. Nava-Saucedo, “Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques - A review,” *Chemosphere*, vol. 73, no. 4, pp. 429–442, 2008.
- [90] A. Magnin, E. Pollet, V. Phalip, and L. Avérous, “Evaluation of biological degradation of polyurethanes,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 39, no. April 2019, p. 107457, 2020.
- [91] “Bacterial degradation of synthetic plastics | Explore to understand, share to bring about change.” [Online]. Available: <https://oceans.taraexpeditions.org/en/m/science/news/bacterial-degradation-of-synthetic-plastics/>. [Accessed: 25-Aug-2021].
- [92] K. Thitisilp and A. Rafael, “Perspective Compostability of polymers,” *Polym. Int.*, pp. 793–804, 2008.
- [93] R. S. Devi, V. R. Kannan, K. Natarajan, K. Kannan, S. Chandru, and A. R. Antony, “The Role of Microbes in Plastic Degradation. Environmental Waste Management,” pp. 341–370, 2015.



- [94] Y. Tokiwa, B. P. Calabia, C. U. Ugwu, and S. Aiba, "Biodegradability of plastics," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 10, no. 9, pp. 3722–3742, 2009.
- [95] J. A. Glaser, "Biological Degradation of Polymers in the Environment," *Intech*, p. 23, 2016.
- [96] Henry Sintim, *Biodegradability of plastics in the open environment Mapping review*, no. 10, 2021.
- [97] H. Azevedo and R. Reis, "Understanding the Enzymatic Degradation of Biodegradable Polymers and Strategies to Control Their Degradation Rate," *Biodegrad. Syst. Tissue Eng. Regen. Med.*, pp. 177–202, 2004.
- [98] S. Ghosh, A. Qureshi, and H. J. Purohit, "Microbial degradation of plastics: Biofilms and degradation pathways," *Contam. Agric. Environ. Heal. Risks Remediat.*, no. January, pp. 184–199, 2019.
- [99] Steffan Robert, Ed., *Consequences of Microbial Interactions with Hydrocarbons, Oils, and Lipids: Biodegradation and Bioremediation*. Springer International Publishing, 2018.
- [100] A. Amobonye, P. Bhagwat, S. Singh, and S. Pillai, *Plastic biodegradation: Frontline microbes and their enzymes*, vol. 759. Elsevier B.V, 2021.
- [101] "The Effects of pH on Microbial Growth | Microbiology." [Online]. Available: <https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/the-effects-of-ph-on-microbial-growth/>. [Accessed: 26-Aug-2021].
- [102] "bioplastic | Definition & Facts | Britannica." [Online]. Available: <https://www.britannica.com/technology/bioplastic>. [Accessed: 28-Aug-2021].
- [103] M. Fliieger, M. Kantorová, A. Prell, T. Řezanka, and J. Votruba, "Biodegradable plastics from renewable sources," *Folia Microbiol. (Praha)*, vol. 48, no. 1, pp. 27–44, 2003.
- [104] P. Jambunathan and K. Zhang, "Engineered biosynthesis of biodegradable polymers," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 43, no. 8, pp. 1037–1058, 2016.
- [105] K. Grage, P. McDermott, and B. H. A. Rehm, "Engineering *Bacillus megaterium* for production of functional intracellular materials," *Microb. Cell Fact.*, vol. 16, no. 1, pp. 1–12, 2017.
- [106] T. P. Haider, C. Völker, J. Kramm, K. Landfester, and F. R. Wurm, "Plastics of the Future? The Impact of Biodegradable Polymers on the Environment and on Society," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 58, no. 1, pp. 50–62, Jan. 2019.
- [107] "Bio-based, biodegradable and compostable plastics." [Online]. Available: [https://ec.europa.eu/environment/topics/plastics/bio-based-biodegradable-and-compostable-plastics\\_el](https://ec.europa.eu/environment/topics/plastics/bio-based-biodegradable-and-compostable-plastics_el). [Accessed: 28-Aug-2021].
- [108] J. -C Huang, A. S. Shetty, and M. -S Wang, "Biodegradable plastics: A review," *Adv. Polym. Technol.*, vol. 10, no. 1, pp. 23–30, 1990.
- [109] "Definition of bioplastics." [Online]. Available: <http://natureplast.eu/en/the-bioplastics-market/>. [Accessed: 28-Aug-2021].
- [110] "Bio-based and Fossil-based Plastics - Impact Solutions." [Online]. Available: <https://www.impact-solutions.co.uk/bio-based-and-fossil-based-plastics/>. [Accessed: 28-Aug-2021].
- [111] "Why biodegradables won't solve the plastic crisis - BBC Future." [Online]. Available: <https://www.bbc.com/future/article/20191030-why-biodegradables-wont-solve-the-plastic-crisis>. [Accessed: 31-Aug-2021].
- [112] "Worldwide plastics production falls in 2020 due to COVID-19: Report." [Online]. Available: <https://www.republicworld.com/world-news/global-event-news/worldwide-plastics-production-falls-in-2020-due-to-covid-19-report.html>. [Accessed: 31-Aug-2021].

- [113] “Market – European Bioplastics e.V.” [Online]. Available: <https://www.european-bioplastics.org/market/>. [Accessed: 31-Aug-2021].
- [114] E. Castro-Aguirre, F. Iñiguez-Franco, H. Samsudin, X. Fang, and R. Auras, “Poly(lactic acid)—Mass production, processing, industrial applications, and end of life,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 107, pp. 333–366, 2016.
- [115] S. Michael and K. Fikret, *Bioprocess Engineering Basic Concepts*, Second. Prentice Hall PCR, 2002.
- [116] & T. A. K. Msuya N., Katima J.H.Y., Masanja E., “Poly ( lactic-acid ) Production \_ from Monomer to Polymer : A Review SciFed Journal of Polymer Science,” *Polym. Sci.*, vol. 1, no. 1, pp. 1–15, 2017.
- [117] M. Koller, A. Salerno, M. Dias, A. Reiterer, and G. Braunegg, “Modern biotechnological polymer synthesis: A review,” *Food Technol. Biotechnol.*, vol. 48, no. 3, pp. 255–269, 2010.
- [118] X. Qi, Y. Ren, and X. Wang, “New advances in the biodegradation of Poly(lactic) acid,” *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 117, no. February, pp. 215–223, 2017.
- [119] X. Qi, Y. Ren, and X. Wang, “New advances in the biodegradation of Poly(lactic) acid,” *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 117, pp. 215–223, 2017.
- [120] H. Pranamuda and Y. Tokiwa, “Degradation of poly(L-lactide) by strains belonging to genus *Amycolatopsis*,” *Biotechnol. Lett.*, vol. 21, no. 10, pp. 901–905, 1999.
- [121] M. Hajighasemi *et al.*, “Biochemical and Structural Insights into Enzymatic Depolymerization of Polylactic Acid and Other Polyesters by Microbial Carboxylesterases,” *Biomacromolecules*, vol. 17, no. 6, pp. 2027–2039, 2016.
- [122] S. H. Lee, I. Y. Kim, and W. S. Song, “Biodegradation of polylactic acid (PLA) fibers using different enzymes,” *Macromol. Res.*, vol. 22, no. 6, pp. 657–663, 2014.
- [123] Y. Shinozaki *et al.*, “Biodegradable plastic-degrading enzyme from *Pseudozyma antarctica*: Cloning, sequencing, and characterization,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 97, no. 7, pp. 2951–2959, 2013.
- [124] K. Tomita, Y. Kuroki, and K. Nagai, “Isolation of thermophiles degrading poly(L-lactic acid),” *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 87, no. 6, pp. 752–755, 1999.
- [125] A. Torres, S. M. Li, S. Roussos, and M. Vert, “Screening of microorganisms for biodegradation of poly(lactic acid) and lactic acid-containing polymers,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 62, no. 7, pp. 2393–2397, 1996.
- [126] J. Zeng, X. Chen, Q. Liang, X. Xu, and X. Jing, “Enzymatic degradation of poly(L-lactide) and poly( $\epsilon$ -caprolactone) electrospun fibers,” *Macromol. Biosci.*, vol. 4, no. 12, pp. 1118–1125, 2004.
- [127] M. F. Chek, A. Hiroe, T. Hakoshima, K. Sudesh, and S. Taguchi, “PHA synthase (PhaC): interpreting the functions of bioplastic-producing enzyme from a structural perspective,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 103, no. 3, pp. 1131–1141, 2019.
- [128] F. Masood, T. Yasin, and A. Hameed, “Polyhydroxyalkanoates – What are the uses? Current challenges and perspectives,” *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 35, no. 4, pp. 514–521, 2015.
- [129] J. M. Luengo, B. García, A. Sandoval, G. Naharro, and E. R. Olivera, “Bioplastics from microorganisms,” *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 6, no. 3, pp. 251–260, 2003.
- [130] J. A. Chuah, M. Yamada, S. Taguchi, K. Sudesh, Y. Doi, and K. Numata, “Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoate containing 5-hydroxyvalerate units: Effects of 5HV units on biodegradability, cytotoxicity, mechanical and thermal properties,” *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 98, no. 1, pp. 331–338, 2013.

- [131] S. Y. Ong, J. Y. Chee, and K. Sudesh, "Degradation of Polyhydroxyalkanoate (PHA): a Review," *J. Sib. Fed. Univ. Biol.*, vol. 10, no. 2, pp. 21–225, 2017.
- [132] K. I. Kasuya, Y. Inoue, and Y. Doi, "Adsorption kinetics of bacterial PHB depolymerase on the surface of polyhydroxyalkanoate films," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 19, no. 1, pp. 35–40, 1996.
- [133] J. Sun *et al.*, "Molecular weight-dependent degradation of d-lactate-containing polyesters by polyhydroxyalkanoate depolymerases from *Variovorax* sp. C34 and *Alcaligenes faecalis* T1," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 99, no. 22, pp. 9555–9563, 2015.
- [134] H. Abe and Y. Doi, "Structural effects on enzymatic degradabilities for poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] and its copolymers," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 25, no. 1–3, pp. 185–192, 1999.
- [135] M. Scandola *et al.*, "Polymer blends of natural poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and a synthetic atactic poly(3-hydroxybutyrate). Characterization and biodegradation studies," *Macromolecules*, vol. 30, no. 9, pp. 2568–2574, 1997.
- [136] J. Xu and B.-H. Guo, "Microbial Succinic Acid, Its Polymer Poly(butylene succinate), and Applications," vol. 14, pp. 347–388, 2010.
- [137] H. Yim *et al.*, "Metabolic engineering of *Escherichia coli* for direct production of 1,4-butanediol," *Nat. Chem. Biol.*, vol. 7, no. 7, pp. 445–452, 2011.
- [138] R. K. Srivastava, *Novel methods to synthesize aliphatic polyesters of vivid architectures*. 2005.
- [139] Z. Bai, Y. Liu, T. Su, and Z. Wang, "Effect of hydroxyl monomers on the Enzymatic degradation of poly(ethylene succinate), poly(butylene succinate), and poly(hexylene succinate)," *Polymers (Basel)*, vol. 10, no. 1, 2018.
- [140] I. Taniguchi, S. Nakano, T. Nakamura, A. El-Salmawy, M. Miyamoto, and Y. Kimura, "Mechanism of enzymatic hydrolysis of poly(butylene succinate) and poly(butylene succinate-co-L-lactate) with a lipase from *Pseudomonas cepacia*," *Macromol. Biosci.*, vol. 2, no. 9, pp. 447–455, 2002.
- [141] C. Tsutsumi, N. Hayase, K. Nakagawa, S. Tanaka, and Y. Miyahara, "The enzymatic degradation of commercial biodegradable polymers by some lipases and chemical degradation of them," *Macromol. Symp.*, vol. 197, pp. 431–442, 2003.
- [142] K. Thirunavukarasu *et al.*, "Degradation of poly(butylene succinate) and poly(butylene succinate-co-butylene adipate) by a lipase from yeast *Cryptococcus* sp. grown on agro-industrial residues," *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 110, pp. 99–107, 2016.
- [143] V. Tserki, P. Matzinos, E. Pavlidou, D. Vachliotis, and C. Panayiotou, "Biodegradable aliphatic polyesters. Part I. Properties and biodegradation of poly(butylene succinate-co-butylene adipate)," *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 91, no. 2, pp. 367–376, 2006.
- [144] F. Li, X. Xu, J. Yu, and A. Cao, "The morphological effects upon enzymatic degradation of poly(butylene succinate-co-butylene terephthalate)s (PBST)," *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 92, no. 6, pp. 1053–1060, 2007.
- [145] K. Shi, T. Su, and Z. Wang, "Comparison of poly(butylene succinate) biodegradation by *Fusarium solani* cutinase and *Candida antarctica* lipase," *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 164, pp. 55–60, 2019.
- [146] R. Wei and W. Zimmermann, "Microbial enzymes for the recycling of recalcitrant petroleum-based plastics: how far are we?," *Microb. Biotechnol.*, vol. 10, no. 6, pp. 1308–1322, 2017.
- [147] I. Taniguchi, S. Yoshida, K. Hiraga, K. Miyamoto, Y. Kimura, and K. Oda, "Biodegradation of PET: Current Status and Application Aspects," *ACS Catal.*, vol. 9, no. 5, pp. 4089–4105, 2019.
- [148] M. H. Weiland, "Enzymatic Biodegradation by Exploring the Rational Protein Engineering of

- the Polyethylene Terephthalate Hydrolyzing Enzyme PETase from *Ideonella sakaiensis* 201-F6,” *ACS Symp. Ser.*, vol. 1357, pp. 161–174, 2020.
- [149] E. Nikolaivits, M. Kanelli, M. Dimarogona, and E. Topakas, “A middle-aged enzyme still in its prime: Recent advances in the field of cutinases,” *Catalysts*, vol. 8, no. 12, 2018.
- [150] S. Yoshida *et al.*, “A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate),” *Science (80-. )*, vol. 353, no. 6301, p. 759, 2016.
- [151] Å. M. Ronkvist, W. Xie, W. Lu, and R. A. Gross, “Cutinase-Catalyzed hydrolysis of poly(ethylene terephthalate),” *Macromolecules*, vol. 42, no. 14, pp. 5128–5138, 2009.
- [152] A. N. Shirke *et al.*, “Stabilizing Leaf and Branch Compost Cutinase (LCC) with Glycosylation: Mechanism and Effect on PET Hydrolysis,” *Biochemistry*, vol. 57, no. 7, pp. 1190–1200, 2018.
- [153] R. J. Müller, H. Schrader, J. Profe, K. Dresler, and W. D. Deckwer, “Enzymatic degradation of poly(ethylene terephthalate): Rapid hydrolyse using a hydrolase from *T. fusca*,” *Macromol. Rapid Commun.*, vol. 26, no. 17, pp. 1400–1405, 2005.
- [154] J. Then *et al.*, “Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> binding site engineering increases the degradation of polyethylene terephthalate films by polyester hydrolases from *Thermobifida fusca*,” *Biotechnol. J.*, vol. 10, no. 4, pp. 592–598, 2015.
- [155] J. Then *et al.*, “A disulfide bridge in the calcium binding site of a polyester hydrolase increases its thermal stability and activity against polyethylene terephthalate,” *FEBS Open Bio*, vol. 6, no. 5, pp. 425–432, 2016.
- [156] R. Wei *et al.*, “Biocatalytic Degradation Efficiency of Postconsumer Polyethylene Terephthalate Packaging Determined by Their Polymer Microstructures,” *Adv. Sci.*, vol. 6, no. 14, 2019.
- [157] R. E. Vega, T. M. Gary, and T. Howard, “Cloning and expression in *Escherichia coli* of a polyurethane degrading enzyme from *Pseudomonas fluorescens*,” pp. 38–44, 1999.
- [158] Y. Akutsu, T. Nakajima-Kambe, N. Nomura, and T. Nakahara, “Purification and properties of a polyester polyurethane-degrading enzyme from *Comamonas acidovorans* TB-35,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 64, no. 1, pp. 62–67, 1998.
- [159] J. Schmidt *et al.*, “Degradation of polyester polyurethane by bacterial polyester hydrolases,” *Polymers (Basel)*, vol. 9, no. 2, p. 65, 2017.
- [160] G. T. Howard, W. N. Norton, and T. Burks, “Growth of *Acinetobacter gernerii* P7 on polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase enzyme,” *Biodegradation*, vol. 23, no. 4, pp. 561–573, 2012.
- [161] “Polyester Polyurethane vs Polyether Polyurethane.” [Online]. Available: <https://www.polydrive.com/polyester-polyurethane-vs-polyether-polyurethane/>. [Accessed: 30-Aug-2021].
- [162] S. Wendels and L. Avérous, “Biobased polyurethanes for biomedical applications,” *Bioact. Mater.*, vol. 6, no. 4, pp. 1083–1106, 2021.
- [163] A. Loredó-Treviño, G. Gutiérrez-Sánchez, R. Rodríguez-Herrera, and C. N. Aguilar, “Microbial Enzymes Involved in Polyurethane Biodegradation: A Review,” *J. Polym. Environ.*, vol. 20, no. 1, pp. 258–265, 2012.
- [164] M. Osman, S. M. Satti, A. Luqman, F. Hasan, Z. Shah, and A. A. Shah, “Degradation of Polyester Polyurethane by *Aspergillus* sp. Strain S45 Isolated from Soil,” *J. Polym. Environ.*, vol. 26, no. 1, pp. 301–310, 2018.
- [165] M. J. Kay, L. H. G. Morton, and E. L. Prince, “Bacterial degradation of polyester polyurethane,” *Int. Biodeterior.*, vol. 27, no. 2, pp. 205–222, 1991.
- [166] M. Labet and W. Thielemans, “Synthesis of polycaprolactone: A review,” *Chem. Soc. Rev.*, vol.

- 38, no. 12, pp. 3484–3504, 2009.
- [167] Q. Ma, K. Shi, T. Su, and Z. Wang, “Biodegradation of Polycaprolactone (PCL) with Different Molecular Weights by *Candida antarctica* Lipase,” *J. Polym. Environ.*, vol. 28, no. 11, pp. 2947–2955, 2020.
- [168] Y. Zhong, P. Godwin, Y. Jin, and H. Xiao, “Biodegradable polymers and green-based antimicrobial packaging materials: A mini-review,” *Adv. Ind. Eng. Polym. Res.*, vol. 3, no. 1, pp. 27–35, 2020.
- [169] R. P. Babu, K. O’Connor, and R. Seeram, “Current progress on bio-based polymers and their future trends,” *Prog. Biomater.*, vol. 2, no. 1, p. 8, 2013.
- [170] G. Zhihua, Q. Liang, Z. Jie, and X. Jing, “Enzymatic degradation of poly( E-caprolactone) film in phosphate buffer solution containing lipases,” *Polym. Degrad. Stability*, pp. 209–213, 1997.
- [171] L. F. Ping, X. Y. Chen, X. L. Yuan, M. Zhang, Y. J. Chai, and S. D. Shan, “Application and comparison in biosynthesis and biodegradation by *Fusarium solani* and *Aspergillus fumigatus* cutinases,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 104, pp. 1238–1245, 2017.
- [172] “enzyme | Definition, Mechanisms, & Nomenclature | Britannica.” [Online]. Available: <https://www.britannica.com/science/enzyme>. [Accessed: 24-Aug-2021].
- [173] “Enzymes: Function, definition, and examples.” [Online]. Available: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/319704#what-do-enzymes-do>. [Accessed: 24-Aug-2021].
- [174] E. Τόπακας, “1. Εισαγωγή στα ένζυμα,” 2020, p. 65.
- [175] “Biological Catalysts - Enzymes | A-Level Biology Revision Notes.” [Online]. Available: <https://alevelbiology.co.uk/notes/biological-catalysts-enzymes/>. [Accessed: 24-Aug-2021].
- [176] “What is the Difference Between Induced Fit and Lock and Key - Pediaa.Com.” [Online]. Available: <https://pediaa.com/what-is-the-difference-between-induced-fit-and-lock-and-key/>. [Accessed: 24-Aug-2021].
- [177] B. Antonio and B. Gustavo, *MEDICAL BIOCHEMISTRY*. 2017.
- [178] T. Panda and B. S. Gowrishankar, “Production and applications of esterases,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 67, no. 2, pp. 160–169, 2005.
- [179] U. T. Bornscheuer, “Microbial carboxyl esterases : classification, properties and application in biocatalysis,” *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 26, pp. 73–81, 2002.
- [180] C. W. Lee *et al.*, “Crystal structure and functional characterization of an esterase (EaEST) from *exiguobacterium antarcticum*,” *PLoS One*, vol. 12, no. 1, pp. 1–19, 2017.
- [181] U. T. Bornscheuer and K. Romas J., *Hydrolases in Organic Synthesis: Regio- and Stereoselective Biotransformations: Second Edition*. John Wiley and Sons, 2006.
- [182] Q. W. and B. C., “Development of a new *Bacillus* carboxyl esterase for use in the resolution on chiral drugs,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, pp. 425–431, 1994.
- [183] A. L. Margolin, “Enzymes in the synthesis of chiral drugs,” *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 15, no. 4, pp. 266–280, 1993.
- [184] H. Kontkanen, M. Tenkanen, R. Fagerström, and T. Reinikainen, “Characterisation of steryl esterase activities in commercial lipase preparations,” *J. Biotechnol.*, vol. 108, no. 1, pp. 51–59, 2004.
- [185] B. Falconnier *et al.*, “Vanillin as a product of ferulic acid biotransformation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus* I-937: Identification of metabolic pathways,” *J. Biotechnol.*, vol. 37, no. 2, pp. 123–132, 1994.

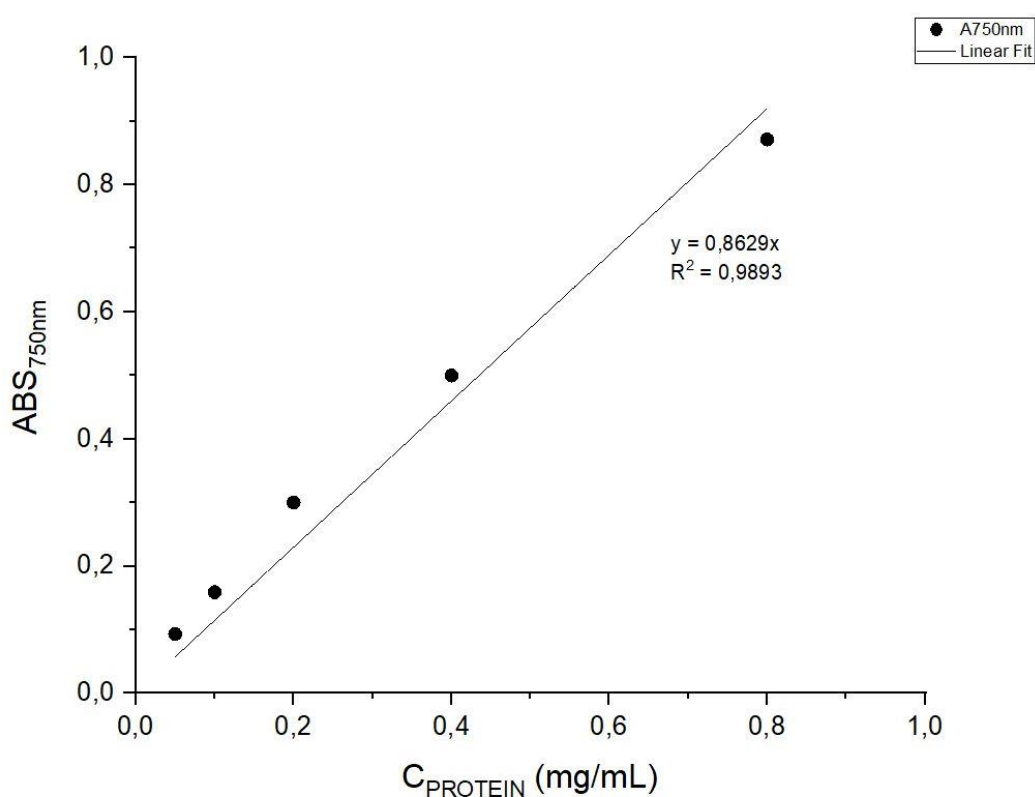
- [186] S. Chen, L. Su, J. Chen, and J. Wu, "Cutinase: Characteristics, preparation, and application," *Biotechnol. Adv.*, vol. 31, no. 8, pp. 1754–1767, 2013.
- [187] D. Danso, J. Chow, and W. R. Streita, "Plastics: Environmental and biotechnological perspectives on microbial degradation," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 85, no. 19, 2019.
- [188] S. M. Singh and A. K. Panda, "Solubihzation and refolding of bacterial inclusion body proteins," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 99, no. 4, pp. 303–310, 2005.
- [189] A. Sivashanmugam, V. Murray, C. Cui, Y. Zhang, J. Wang, and Q. Li, "Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using Escherichia coli," 2009.
- [190] D. M. Francis and R. Page, "Strategies to Optimize Protein Expression in E. coli."
- [191] G. J. Gopal and A. Kumar, "Strategies for the production of recombinant protein in escherichia coli," *Protein J.*, vol. 32, no. 6, pp. 419–425, 2013.
- [192] "Protein BLAST: search protein databases using a protein query." [Online]. Available: [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome). [Accessed: 02-Sep-2021].
- [193] "SignalP-5.0." [Online]. Available: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>. [Accessed: 02-Sep-2021].
- [194] "Clustal Omega." [Online]. Available: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>.
- [195] "The principle and method of polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) | MBL Life Science -JAPAN-." [Online]. Available: <https://ruo.mbl.co.jp/bio/e/support/method/sds-page.html>. [Accessed: 08-Sep-2021].
- [196] "ExPASy - ProtParam tool." [Online]. Available: <https://web.expasy.org/protparam/>. [Accessed: 08-Sep-2021].
- [197] M. Salvador *et al.*, "Microbial genes for a circular and sustainable bio-PET economy," *Genes (Basel)*, vol. 10, no. 5, 2019.
- [198] M. Dimarogona, E. Nikolaivits, M. Kanelli, P. Christakopoulos, M. Sandgren, and E. Topakas, "Structural and functional studies of a Fusarium oxysporum cutinase with polyethylene terephthalate modification potential," *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1850, no. 11, pp. 2308–2317, 2015.
- [199] V. Tournier *et al.*, "An engineered PET depolymerase to break down and recycle plastic bottles," *Nature*, vol. 580, no. 7802, pp. 216–219, 2020.
- [200] K. Mukai, K. Yamada, and Y. Doi, "Enzymatic degradation of poly(hydroxyalkanoates) by a marine bacterium," *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 41, no. 1, pp. 85–91, 1993.
- [201] A. Schirmer and D. Jendrossek, "Molecular characterization of the extracellular poly(3-hydroxyoctanoic acid) [P(3HO)] depolymerase gene of Pseudomonas fluorescens GK13 and of its gene product," *J. Bacteriol.*, vol. 176, no. 22, pp. 7065–7073, 1994.
- [202] S. Hanphakphoom, N. Maneewong, S. Sukkhum, S. Tokuyama, and V. Kitpreechavanich, "Characterization of poly(L-lactide)-degrading enzyme produced by thermophilic filamentous bacteria Laceyella sacchari LP175," *J. Gen. Appl. Microbiol.*, vol. 60, no. 1, pp. 13–22, 2014.
- [203] Y. Shigeno-Akutsu, T. Nakajima-Kambe, N. Nomura, and T. Nakahara, "Purification and properties of culture-broth-secreted esterase from the polyurethane degrader Comamonas acidovorans TB-35," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 88, no. 5, pp. 484–487, 1999.
- [204] S. Yoshida *et al.*, "A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate)," *Science (80- )*, vol. 351, no. 6278, pp. 1196–1199, Mar. 2016.
- [205] "Protease from Bacillus licheniformis  $\geq 2.4$  U/g | 9014-01-1." [Online]. Available:

- <https://www.sigmaaldrich.com/GR/en/product/sigma/p4860>. [Accessed: 20-Sep-2021].
- [206] “Protease from *Streptomyces griseus* Type XIV,  $\geq 3.5$  units/mg solid, powder | 9036-06-0.” [Online]. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/GR/en/product/SIGMA/P5147>. [Accessed: 20-Sep-2021].
- [207] S. Ghorbel, M. Kammoun, H. Soltana, M. Nasri, and N. Hmidet, “*Streptomyces flavogriseus* HS1: Isolation and characterization of extracellular proteases and their compatibility with laundry detergents,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2014, pp. 1–9, 2014.
- [208] F. Kawai, T. Kawabata, and M. Oda, “Current knowledge on enzymatic PET degradation and its possible application to waste stream management and other fields,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 103, no. 11, pp. 4253–4268, 2019.
- [209] M. Furukawa, N. Kawakami, A. Tomizawa, and K. Miyamoto, “Efficient Degradation of Poly(ethylene terephthalate) with *Thermobifida fusca* Cutinase Exhibiting Improved Catalytic Activity Generated using Mutagenesis and Additive-based Approaches,” *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–9, 2019.
- [210] D. Kold *et al.*, “Thermodynamic and structural investigation of the specific SDS binding of *Humicola insolens* cutinase,” *Protein Sci.*, vol. 23, no. 8, pp. 1023–1035, 2014.
- [211] R. Wei *et al.*, “Functional characterization and structural modeling of synthetic polyester-degrading hydrolases from *Thermomonospora curvata*,” *AMB Express*, vol. 4, no. 1, pp. 1–10, 2014.
- [212] D. Ribitsch *et al.*, “Hydrolysis of polyethyleneterephthalate by p-nitrobenzylesterase from *Bacillus subtilis*,” *Biotechnol. Prog.*, vol. 27, no. 4, pp. 951–960, 2011.
- [213] Saitou N. and Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- [214] Zuckerkandl E. and Pauling L. (1965). Evolutionary divergence and convergence in proteins. Edited in *Evolving Genes and Proteins* by V. Bryson and H.J. Vogel, pp. 97-166. Academic Press, New York.
- [215] Tamura K., Stecher G., and Kumar S. (2021). MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution* <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.
- [216] Stecher G., Tamura K., and Kumar S. (2020). Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) for macOS. *Molecular Biology and Evolution* 37:1237-1239.
- [217] T. Aging, R. Panowicz, M. Konarzewski, T. Durejko, M. Szala, and M. Łazi, “Properties of Polyethylene Terephthalate (PET) after,” 2021.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α : Καμπύλη αναφοράς μεθόδου Lowry

Η παραλαμβανόμενη απορρόφηση, στα 750 nm, του μπλε προϊόντος αντίδρασης των μονοσθενών ιόντων χαλκού και των λειτουργικών ομάδων των αρωματικών αμινοξέων (τυροσίνη, τρυπτοφάνη και κυστεΐνη) των πρωτεϊνών με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, ανήχθη σε πρωτεϊνική συγκέντρωση του δείγματος μέσω κατάλληλα κατασκευασμένης καμπύλης αναφοράς.

Η καμπύλη αναφοράς προέκυψε μέσω φωτομέτρησης, στα 750 nm, δειγμάτων των τελικών διαλυμάτων αντίδρασης Lowry, αντιδραστηρίου Follin-Ciocalteu με δείγματα γνωστής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης, ως εξής :



**Εικόνα Π.Α.1** : Καμπύλη αναφοράς μεθόδου Lowry, που απεικονίζει την απορρόφηση δείγματος αντίδρασης Lowry συναρτήσει της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης του δείγματος προσθήκης.



## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β : Μεθοδολογία προσδιορισμού ενεργότητας πολυεστερασών στο εστερικό υπόστρωμα pNPB

Η μετατροπή της απορρόφησης στα 410 nm προς ενεργότητα των πολυεστερασών βασίζεται στην μέθοδο Beer-Lambert (2.2.3.1) Ποσοτικός προσδιορισμός παραγόμενων πολυεστερασών με τη μέθοδο Beer-Lambert), λαμβάνοντας υπ' όψη και τον ορισμό του 1 Unit, ως το ποσό του ενζύμου που απελευθερώνει 1 μmol pNP ανά λεπτό.

Σύμφωνα με τα παραπάνω ισχύει :

$$A = C * \epsilon * b \rightarrow A_{410nm} = C_{pNP} * \epsilon_{pNP} * b_{CELL} \xrightarrow{C=\frac{n}{V}} n_{pNP} = \frac{V_{SAMPLE} * A_{410nm}}{\epsilon_{pNP} * b_{CELL}} \rightarrow$$

$$\frac{U}{mg_{PROTEIN}} = \frac{V_{SAMPLE} * A_{410nm}}{\epsilon_{pNP} * b_{CELL} * V_{PROTEIN} * C_{PROTEIN}} * 1000000, \text{ όπου:}$$

- $A_{410nm}$  : Η απορρόφηση (ανά μονάδα χρόνου) του δείγματος με αφαίρεση της αντίστοιχης απορρόφησης του τυφλού δείγματος.
- $V_{SAMPLE}$ : Ο όγκος του διαλύματος αντίδρασης που βρίσκεται στο κελί του Microplate προς φωτομέτρηση (0,00025 L)
- $\epsilon_{pNP}$  : Ο μοριακός συντελεστής απορροφητικότητας της pNP (17500 1/M\*cm)
- $b_{CELL}$  : Το βάθος του κελιού του Microplate (0,67 cm)
- $V_{PROTEIN}$ : Ο προστιθέμενος όγκος πρωτεϊνικού διαλύματος στο διάλυμα αντίδρασης που βρίσκεται στο κελί του Microplate προς φωτομέτρηση (0,00002 L)
- $C_{PROTEIN}$ : Η συγκέντρωση του ενζυμικού διαλύματος προσθήκης (mg/mL, Πίνακας 32)

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ : Μοριακά βάρη και μοριακοί συντελεστές απορρόφησης των παραγόμενων πολυεστερασών

Τα μοριακά βάρη (MW) και οι μοριακοί συντελεστές απορροφητικότητας ( $\epsilon$ ) των παραγόμενων πολυεστερασών, όπως προσδιορίστηκαν βάσει της αμινοξικής αλληλουχίας των γονιδίων έκφρασής τους, παρατίθενται ως εξής :

**Πίνακας Π.Γ.1** : Μοριακά βάρη και μοριακοί συντελεστές απορροφητικότητας των παραγόμενων πολυεστερασών.

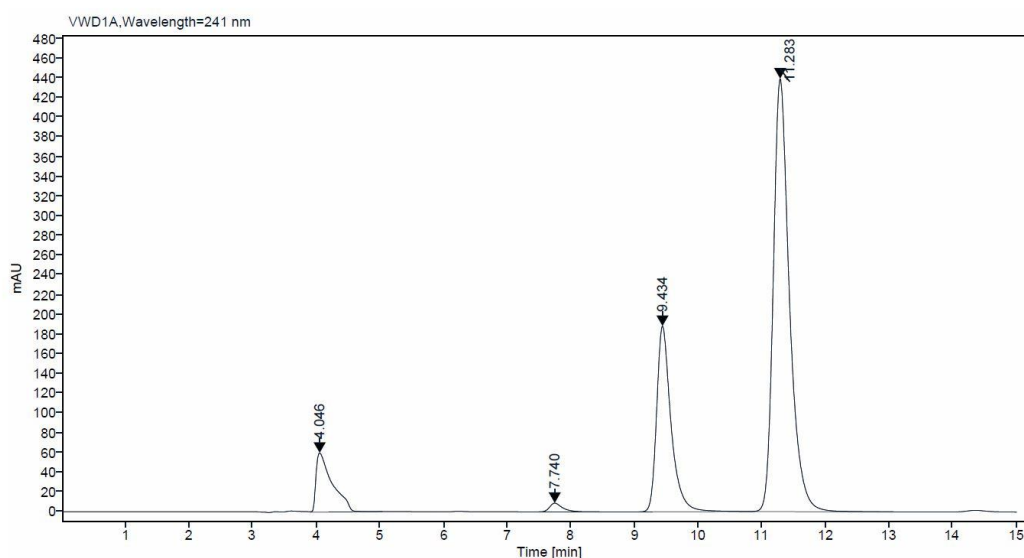
| Πολυεστεράση | Μοριακό βάρος (kDa) (MW) | Μοριακός συντελεστής απορροφητικότητας (1/M*cm) ( $\epsilon$ ) |
|--------------|--------------------------|--|
| Dmest        | 30827                    | 40005  |
| FoCut        | 23067                    | 16180  |
| HiC          | 20383                    | 13200  |

|        |       |       |
|--------|-------|-------|
| LCC    | 28834 | 37150 |
| PETase | 28870 | 39670 |
| PHAase | 51858 | 87835 |
| PHOase | 29290 | 61100 |
| PLAase | 38106 | 62800 |
| PUase  | 56308 | 72225 |
| SeIJFR | 29252 | 38515 |

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Δ : Χρωματογράφημα (HPLC) πρότυπων δειγμάτων ενώσεων TPA, MHET & BHET

Οι χρόνοι έκλυσης των προϊόντων υδρόλυσης του άμορφου και κρυσταλλικού PET προσδιορίστηκαν μέσω ανάλυσης πρότυπων δειγμάτων με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC). Το πρωτόκολλο ανάλυσης που ακολουθήθηκε ήταν όμοιο αυτού των πολυμερικών δειγμάτων PET (Πίνακας 17).

Το χρωματογράφημα που παραλήφθηκε παρουσιάζεται ως εξής :



**Εικόνα Π.Α.1 :** Χρωματογράφημα (HPLC) πρότυπων δειγμάτων προϊόντων υδρόλυσης του PET.

Λαμβάνοντας υπ' όψη τον γνωστό χρόνο έκλυσης της ένωσης DMSO (με την οποία προκατεργάστηκαν τα δείγματα), καθώς και την αναμενόμενη σειρά των χρόνων έκλυσης των προϊόντων υδρόλυσης του PET (TPA, MHET, BHET), όπως αναλύθηκε στην υποπαράγραφο 2.2.4.3) Μέτρηση απελευθερωμένων προϊόντων υδρόλυσης με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC), προκύπτουν τα εξής αποτελέσματα για την ερμηνεία του χρωματογραφήματος :

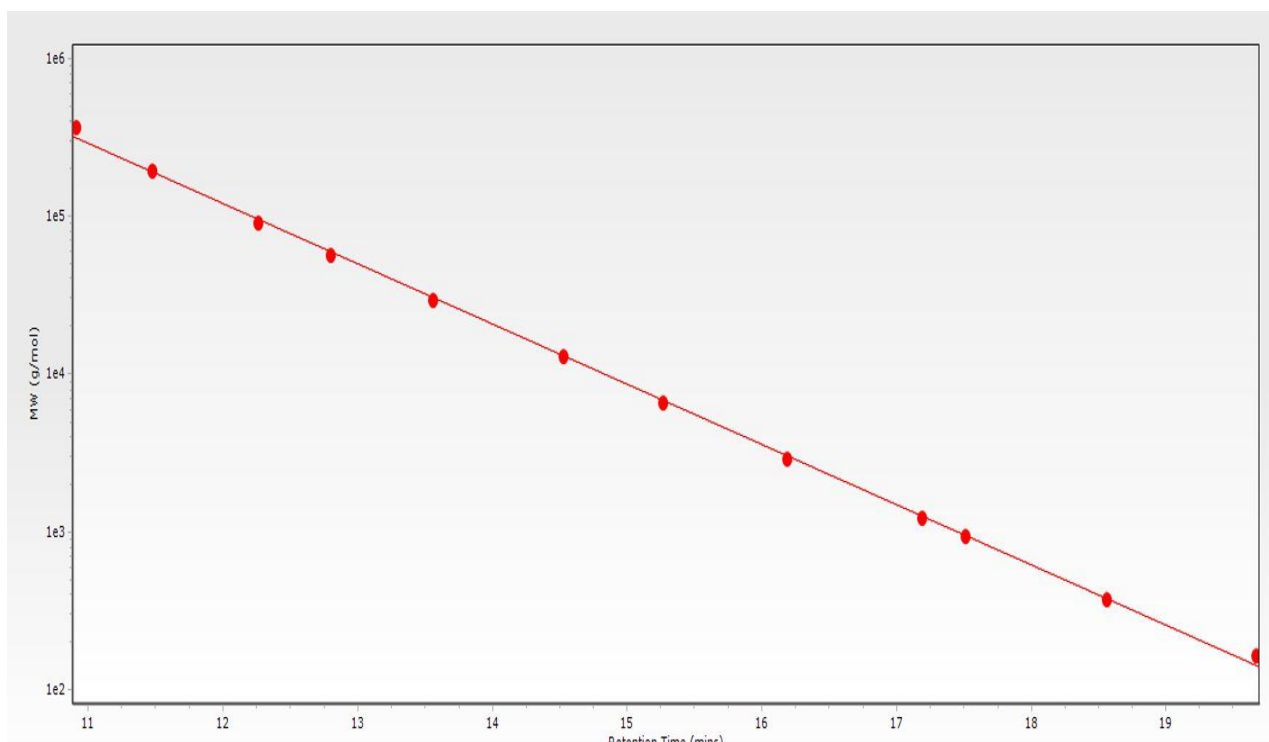
**Πίνακας Π.Δ.1** : Χρόνοι έκλυσης των προϊόντων υδρόλυσης του PET, καθώς και της ένωσης προκατεργασίας των δειγμάτων (DMSO), με το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε για την ανάλυση των δειγμάτων άμορφου και κρυσταλλικού PET.

| Ένωση | Χρόνος έκλυσης (min) |
|-------|----------------------|
| DMSO  | 4,046                |
| TPA   | 7,740                |
| MHET  | 9,434                |
| BHET  | 11,283               |

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ε : Καμπύλη αναφοράς μοριακών βαρών πολυμερικής σκόνης για την Χρωματογραφία Πηκτώματος (GPC)

Η ταυτοποίηση των παραλαμβανόμενων κορυφών των χρωματογραφημάτων που προέκυψαν έπειτα από ανάλυση δειγμάτων πολυμερικών σκονών μέσω Χρωματογραφίας Πηκτώματος (GPC), πραγματοποιήθηκε μέσω καμπύλης αναφοράς.

Η καμπύλη αναφοράς μοριακών βαρών κατασκευάστηκε έπειτα από χρωματογραφική ανάλυση GPC, δειγμάτων πολυμερικής σκόνης πολυστυρενίου (PS) γνωστών μεταβλητών μοριακών βαρών, μέσω του ειδικά παρεχόμενου πακέτου Agilent EasiVial GPC/SEC Calibarion Standards, Agelint Technologies, και έχει ως εξής :



**Εικόνα Π.Ε.1** : Καμπύλη αναφοράς μοριακών βαρών συναρτήσει του χρόνου έκλυσης.

Η καμπύλη αναφοράς εισήχθη στο ειδικά παρεχόμενο λογισμικό του αναλυτικού συστήματος υγρής χρωματογραφίας και χρωματογραφίας ηλεκτώματος (HPLC & GPC) Agilent 1260 Infinity II L, και συνέβαλε στον αυτόματο προσδιορισμό του μοριακού βάρους ανάλογα με τον χρόνο έκλυσης της διαλυμένης πολυμερικής σκόνης, από αυτό.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΣΤ : Απαραίτητα αντιβιοτικά για την ετερόλογη έκφραση των πολυεστερασών

Τα απαραίτητα αντιβιοτικά έκφρασης των πολυεστερασών, όπως και οι τελικές επιθυμητές συγκεντρώσεις τους, παρατίθενται ως εξής :

**Πίνακας Π.ΣΤ.1** : Αντιβιοτικά αντίστασης απαραίτητα για την έκφραση των πολυεστερασών καθώς και οι αναγκαίες συγκεντρώσεις τους.

| Πολυεστεράση | Αντιβιοτικό | Τελική συγκέντρωση (μg/mL) |
|--------------|-------------|----------------------------|
| Dmest        | Αμπικιλλίνη | 100                        |
| FoCut        | Αμπικιλλίνη | 100                        |
| HiC          | Καναμυκίνη  | 50                         |
| LCC          | Καναμυκίνη  | 50                         |
| PETase       | Αμπικιλλίνη | 100                        |
| PHAase       | Αμπικιλλίνη | 100                        |
| PHOase       | Αμπικιλλίνη | 100                        |
| PLAase       | Αμπικιλλίνη | 100                        |
| PUase        | Αμπικιλλίνη | 100                        |
| Se1JFR       | Αμπικιλλίνη | 100                        |

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ζ : Τελικές μάζες, μέσα μοριακά βάρη και συγκεντρώσεις των προϊόντων υδρόλυσης

Τα αποτελέσματα των ζυγίσεων και των Χρωματογραφικών Αναλύσεων (HPLC & GPC) των τελικών πολυεστερικών σκονών, όπως αυτά χρησιμοποιήθηκαν για των υπολογισμό των μεταβολών που απεικονίζονται στα Διαγράμματα 9-17, παρουσιάζονται ως εξής :

**Πίνακας Π.Ζ.1** : Αποτελέσματα ενζυμικής δράσης των μελετώμενων πολυεστερασών στη πολυεστερική σκόνη PCL.

| Πολυεστεράση | Μάζα πολυμερικής σκόνης μετά την αντίδραση (mg) | Μέσου αριθμού μοριακό βάρος πολυμερικής σκόνης μετά την αντίδραση (g/mol) | Μέσου βάρους μοριακό βάρος πολυμερικής σκόνης μετά την αντίδραση (g/mol) | Δείκτης διασποράς μέσω μοριακών βαρών (PD) |
|--------------|---|---|--|--|
| Dmest        | 0,590 ± 0,079                                   | 83198 <sup>*11</sup>  | 118905 <sup>*11</sup>  | 1,429 <sup>*11</sup>                       |
| FoCut        | 0,057 ± 0,009                                   | ND <sup>*10</sup>   | ND <sup>*10</sup>  | ND <sup>*10</sup>                          |

|                 |               |                       |                        |                       |
|-----------------|---------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
| HiC             | 4,027 ± 0,072 | 78847 ± 2744          | 110948 ± 12318         | 1,876 ± 0,702         |
| LCC             | 0,213 ± 0,035 | 81448 * <sup>11</sup> | 116970 * <sup>11</sup> | 1,436 * <sup>11</sup> |
| PETase          | 0,657 ± 0,045 | 73960 * <sup>11</sup> | 117397 * <sup>11</sup> | 1,587 * <sup>11</sup> |
| PHOase          | 2,677 ± 0,101 | 78926 ± 1853          | 118734 ± 1558          | 1,505 ± 0,017         |
| PUase           | 0,963 ± 0,045 | 80751 * <sup>11</sup> | 119349 * <sup>11</sup> | 1,478 * <sup>11</sup> |
| Se1JFR          | 0,207 ± 0,006 | ND * <sup>10</sup>    | ND * <sup>10</sup>     | ND * <sup>10</sup>    |
| Prot. Bac.      | 5,077 ± 0,076 | 80656 ± 600           | 117143 ± 315           | 1,452 ± 0,011         |
| Prot. Gr.       | 5,023 ± 0,028 | 80558 ± 1001          | 117146 ± 1266          | 1,454 ± 0,013         |
| Blank (T=30 °C) | 5,002 ± 0,038 | 80699 ± 3315          | 118649 ± 2368          | 1,471 ± 0,034         |
| Blank (T=50 °C) | 5,102 ± 0,056 | 83260 ± 663           | 119809 ± 294           | 1,439 ± 0,015         |

\*<sup>10</sup>: Not determined / Οι τελικές πολυεστερικές σκόνες δεν επαρκούσαν για την δημιουργία δείγματος συγκέντρωσης 2 mg<sub>ΠΟΛΥΜΕΡΙΚΗΣ ΣΚΟΝΗΣ</sub>/mL, απαραίτητη συγκέντρωση για την διεκπεραίωση της ανάλυσης GPC.

\*<sup>11</sup>: Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε ένα μόνο δείγμα το οποίο προέκυψε από την ένωση των εναπομείναντων πολυμερικών σκονών και των τριών δειγμάτων, ώστε να δημιουργηθεί δείγμα συγκέντρωσης 2 mg<sub>ΠΟΛΥΜΕΡΙΚΗΣ ΣΚΟΝΗΣ</sub>/mL, εξού και η έλλειψη τυπικής απόκλισης της μέτρησης.

**Πίνακας Π.Ζ.2** : Αποτελέσματα ενζυμικής δράσης των μελετώμενων πολυεστερασών στη πολυεστερική σκόνη PBS.

| Πολυεστεράση    | Μάζα πολυμερικής σκόνης μετά την αντίδραση (mg) | Μέσου αριθμού μοριακού βάρους πολυμερικής σκόνης μετά την αντίδραση (g/mol) | Μέσου βάρους μοριακού βάρους πολυμερικής σκόνης μετά την αντίδραση (g/mol) | Δείκτης διασποράς μέσω μοριακών βαρών (PD) |
|-----------------|---|---|--|--|
| Dmest           | 2,993 ± 0,315                                   | 15922 ± 677   | 28352 ± 81   | 1,783 ± 0,073                              |
| FoCut           | 1,150 ± 0,147                                   | 16189 * <sup>11</sup>   | 28815 * <sup>11</sup>  | 1,780 * <sup>11</sup>                      |
| HiC             | 4,610 ± 0,104                                   | 15734 ± 286   | 28308 316  | 1,799 ± 0,013                              |
| LCC             | 0,380 ± 0,141                                   | ND * <sup>10</sup>  | ND * <sup>10</sup>   | ND * <sup>10</sup>                         |
| PETase          | 4,750 ± 0,069                                   | 15223 ± 225   | 27639 ± 703  | 1,834 ± 0,052                              |
| PHOase          | 5,080 ± 0,123                                   | 15853 ± 569   | 28858 ± 147  | 1,822 ± 0,060                              |
| PUase           | 4,913 ± 0,047                                   | 15651 ± 98  | 29200 ± 259  | 1,866 ± 0,015                              |
| Se1JFR          | 3,843 ± 0,272                                   | 15496 ± 247   | 28948 ± 234  | 1,868 ± 0,030                              |
| Prot. Bac.      | 4,870 ± 0,040                                   | 14739 ± 145   | 27521 ± 303  | 1,865 ± 0,014                              |
| Prot. Gr.       | 4,893 ± 0,049                                   | 14723 ± 175   | 28241 ± 177  | 1,918 ± 0,044                              |
| Blank (T=30 °C) | 5,017 ± 0,015                                   | 15723 ± 725   | 26363 ± 3234   | 1,674 ± 0,153                              |
| Blank (T=50 °C) | 5,001 ± 0,036                                   | 15149 ± 356   | 27995 ± 419  | 1,848 ± 0,040                              |

\*<sup>10</sup>: Not determined / Οι τελικές πολυεστερικές σκόνες δεν επαρκούσαν για την δημιουργία δείγματος συγκέντρωσης 2 mg<sub>ΠΟΛΥΜΕΡΙΚΗΣ ΣΚΟΝΗΣ</sub>/mL, απαραίτητη συγκέντρωση για την διεκπεραίωση της ανάλυσης GPC-IR.

\*<sup>11</sup>: Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε ένα μόνο δείγμα το οποίο προέκυψε από την ένωση των εναπομείναντων πολυμερικών σκονών και των τριών δειγμάτων, ώστε να

δημιουργηθεί δείγμα συγκέντρωσης 2 mg ΠΟΛΥΜΕΡΙΚΗΣ ΣΚΟΝΗΣ/mL, εξού και η έλλειψη τυπικής απόκλισης της μέτρησης.

**Πίνακας Π.Ζ.3 :** Αποτελέσματα ενζυμικής δράσης των μελετώμενων πολυεστερασών στη πολυεστερική σκόνη PHB.

| Πολυεστεράση    | Μάζα πολυμερικής σκόνης μετά την αντίδραση (mg) | Μέσου αριθμού μοριακό βάρος πολυμερικής σκόνης μετά την αντίδραση (g/mol) | Μέσου βάρους μοριακό βάρος πολυμερικής σκόνης μετά την αντίδραση (g/mol) | Δείκτης διασποράς μέσω μοριακών βαρών (PD) |
|-----------------|---|---|--|--|
| Dmest           | 4,430 ± 0,092                                   | 57132 ± 6144  | 147394 ± 3237  | 2,595 ± 0,217                              |
| FoCut           | 4,390 ± 0,072                                   | 46775 ± 935   | 139646 ± 5722  | 2,993 ± 0,145                              |
| HiC             | 4,630 ± 0,142                                   | 57132 ± 6144  | 147394 ± 3237  | 2,595 ± 0,217                              |
| LCC             | 4,580 ± 0,115                                   | 58095 ± 1463  | 145756 ± 599   | 2,510 ± 0,053                              |
| PETase          | 4,283 ± 0,107                                   | 49495 ± 2486  | 143129 ± 3171  | 2,895 ± 0,090                              |
| PHOase          | 4,543 ± 0,057                                   | 47419 ± 536   | 141377 ± 4243  | 2,982 ± 0,057                              |
| PUase           | 4,080 ± 0,643                                   | 51122 ± 7848  | 146524 ± 12637   | 2,887 ± 0,211                              |
| Se1JFR          | 4,513 ± 0,070                                   | 49563 ± 410   | 140153 ± 1967  | 2,828 ± 0,020                              |
| Prot. Bac.      | 4,590 ± 0,078                                   | 45188 ± 754   | 137239 ± 2532  | 3,042 ± 0,132                              |
| Prot. Gr.       | 4,547 ± 0,183                                   | 49410 ± 5560  | 136027 ± 779   | 2,776 ± 0,304                              |
| Blank (T=30 °C) | 4,800 ± 0,072                                   | 50410 ± 6584  | 140009 ± 4068  | 2,802 ± 0,283                              |
| Blank (T=50 °C) | 4,680 ± 0,036                                   | 47664 ± 1527  | 141148 ± 3186  | 2,962 ± 0,059                              |

**Πίνακας Π.Ζ.4 :** Αποτελέσματα ενζυμικής δράσης των μελετώμενων πολυεστερασών στη πολυεστερική σκόνη PLA.

| Πολυεστεράση    | Μάζα πολυμερικής σκόνης μετά την αντίδραση (mg) | Μέσου αριθμού μοριακό βάρος πολυμερικής σκόνης μετά την αντίδραση (g/mol) | Μέσου βάρους μοριακό βάρος πολυμερικής σκόνης μετά την αντίδραση (g/mol) | Δείκτης διασποράς μέσω μοριακών βαρών (PD) |
|-----------------|---|---|--|--|
| Dmest           | 4,817 ± 0,058                                   | 68948 ± 1515  | 98714 ± 790  | 1,540 ± 0,025                              |
| FoCut           | 4,230 ± 0,140                                   | 80711 ± 8388  | 134979 ± 14848   | 1,672 ± 0,055                              |
| HiC             | 4,673 ± 0,575                                   | 76500 ± 12108   | 131574 ± 22491   | 1,719 ± 0,022                              |
| LCC             | 4,880 ± 0,046                                   | 69804 ± 7008  | 122486 ± 17964   | 1,643 ± 0,024                              |
| PETase          | 4,857 ± 0,035                                   | 69117 ± 5378  | 111367 ± 7026  | 1,610 ± 0,138                              |
| PHOase          | 4,767 ± 0,035                                   | 63941 ± 5187  | 100048 ± 5882  | 1,566 ± 0,035                              |
| PUase           | 4,727 ± 0,068                                   | 67184 ± 19935   | 111249 ± 30867   | 1,661 ± 0,068                              |
| Se1JFR          | 4,990 ± 0,026                                   | 60418 ± 1348  | 100435 ± 13029   | 1,661 ± 0,179                              |
| Prot. Bac.      | 5,000 ± 0,036                                   | 43427 ± 6461  | 85765 ± 15074  | 1,936 ± 0,395                              |
| Prot. Gr.       | 5,017 ± 0,029                                   | 56997 ± 1960  | 98316 ± 2414   | 1,633 ± 0,015                              |
| Blank (T=30 °C) | 5,037 ± 0,014                                   | 83806 ± 2503  | 121981 ± 4277  | 1,409 ± 0,006                              |
| Blank (T=50 °C) | 5,067 ± 0,027                                   | 67854 ± 9477  | 104592 ± 16249   | 1,566 ± 0,035                              |

**Πίνακας Π.Ζ.5 :** Αποτελέσματα ενζυμικής δράσης των μελετώμενων πολυεστερασών στη πολυεστερική σκόνη PU.

| Πολυεστεράση    | Μάζα πολυμερικής σκόνης μετά την αντίδραση (mg) | Μέσου αριθμού μοριακό βάρος πολυμερικής σκόνης μετά την αντίδραση (g/mol) | Μέσου βάρους μοριακό βάρος πολυμερικής σκόνης μετά την αντίδραση (g/mol) | Δείκτης διασποράς μέσω μοριακών βαρών (PD) |
|-----------------|---|---|--|--|
| Dmest           | 5,070 ± 0,127                                   | 65896 ± 2014  | 122326 ± 8314  | 1,844 ± 0,070                              |
| FoCut           | 4,733 ± 0,052                                   | 72308 ± 1525  | 133365 ± 1187  | 1,845 ± 0,025                              |
| HiC             | 4,857 ± 0,055                                   | 69888 ± 1399  | 128827 ± 1950  | 1,873 ± 0,044                              |
| LCC             | 5,020 ± 0,015                                   | 68410 ± 1539  | 128068 ± 1002  | 1,844 ± 0,033                              |
| PETase          | 4,407 ± 0,166                                   | 69727 ± 1216  | 129877 ± 3563  | 1,862 ± 0,021                              |
| PHOase          | 4,490 ± 0,156                                   | 69397 ± 3979  | 127505 ± 6502  | 1,838 ± 0,038                              |
| PUase           | 4,820 ± 0,012                                   | 70998 ± 796   | 134890 ± 2998  | 1,900 ± 0,038                              |
| Se1JFR          | 4,553 ± 0,061                                   | 69733 ± 1723  | 129339 ± 3492  | 1,855 ± 0,022                              |
| Prot. Bac.      | 4,770 ± 0,012                                   | 70904 ± 1844  | 131758 ± 3578  | 1,858 ± 0,007                              |
| Prot. Gr.       | 4,960 ± 0,006                                   | 67065 ± 4434  | 122433 ± 9166  | 1,825 ± 0,032                              |
| Blank (T=30 °C) | 4,997 ± 0,056                                   | 69625 ± 1051  | 128565 ± 5766  | 1,846 ± 0,057                              |
| Blank (T=50 °C) | 5,003 ± 0,042                                   | 70077 ± 4982  | 127107 ± 8114  | 1,815 ± 0,048                              |

**Πίνακας Π.Ζ.6 :** Αποτελέσματα ενζυμικής δράσης των μελετώμενων πολυεστερασών στη πολυεστερική σκόνη άμορφου PET.

| Πολυεστεράση    | Μάζα πολυμερικής σκόνης μετά την αντίδραση (mg) | Απελευθερωμένη συγκέντρωση TPA (mM) (C <sub>TPA</sub> ) | Απελευθερωμένη συγκέντρωση MHET (mM) (C <sub>MHET</sub> ) |
|-----------------|---|---|---|
| Dmest           | 2,658 ± 0,263                                   | 5,856 ± 1,403   | 10,720 ± 0,910 mM   |
| FoCut           | 4,883 ± 0,099                                   | 0,013 ± 0,001   | 0,020 ± 0,001   |
| HiC             | 4,530 ± 0,348                                   | 0,000 ± 0,000   | 0,000 ± 0,000   |
| LCC             | 2,627 ± 0,225                                   | 6,645 ± 1,984   | 10,233 ± 0,169  |
| PETase          | 4,773 ± 0,040                                   | 0,285 ± 0,015   | 0,768 ± 0,054   |
| PHOase          | 4,985 ± 0,007                                   | 0,000 ± 0,000   | 0,000 ± 0,000   |
| PUase           | 4,923 ± 0,006                                   | 0,003 ± 0,001   | 0,005 ± 0,001   |
| Se1JFR          | 4,840 ± 0,030                                   | 0,057 ± 0,005   | 0,060 ± 0,002   |
| Prot. Bac.      | 4,337 ± 0,065                                   | 0,000 ± 0,000   | 0,000 ± 0,000   |
| Prot. Gr.       | 4,840 ± 0,000                                   | 0,000 ± 0,000   | 0,000 ± 0,000   |
| Blank (T=30 °C) | 5,097 ± 0,090                                   | 0,000 ± 0,000   | 0,000 ± 0,000   |
| Blank (T=50 °C) | 4,883 ± 0,111                                   | 0,008 ± 0,001   | 0,008 ± 0,003   |

| Απελευθερωμένη συγκέντρωση BHET (mM) (C <sub>BHET</sub> ) | Συνολική συγκέντρωση απελευθερωμένων προϊόντων υδρόλυσης (mM) (C <sub>ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ</sub> ) |
|---|---|
| 0,322 ± 0,050   | 16,898 ± 1,673  |
| 0,000 ± 0,000   | 0,033 ± 0,0014  |
| 0,000 ± 0,000   | 0,000 ± 0,000   |
| 0,383 ± 0,033   | 17,290 ± 1,991  |

|                |                |
|----------------|----------------|
| 0,000 ± 0,000  | 1,053 ± 0,056  |
| 0,000 ± 0,000  | 0,000 ± 0,000  |
| 0,000 ± 0,000  | 0,008 ± 0,0014 |
| 0,002 ± 0,0001 | 0,117 ± 0,0054 |
| 0,000 ± 0,000  | 0,000 ± 0,000  |
| 0,000 ± 0,000  | 0,000 ± 0,000  |
| 0,000 ± 0,000  | 0,000 ± 0,000  |
| 0,000 ± 0,000  | 0,000 ± 0,000  |

**Πίνακας Π.Ζ.7 :** Αποτελέσματα ενζυμικής δράσης των μελετώμενων πολυεστερασών στη πολυεστερική σκόνη κρυσταλλικού PET.

| Πολυεστεράση    | Μάζα πολυμερικής σκόνης μετά την αντίδραση (mg) | Απελευθερωμένη συγκέντρωση TPA (mM) (C <sub>TPA</sub> ) | Απελευθερωμένη συγκέντρωση MHET (mM) (C <sub>MHET</sub> ) |
|-----------------|---|---|---|
| Dmest           | 4,723 ± 0,047                                   | 0,886 ± 0,034   | 0761 ± 0,043  |
| FoCut           | 4,920 ± 0,000                                   | 0,013 ± 0,002   | 0,036 ± 0,006   |
| HiC             | 5,040 ± 0,010                                   | 0,000 ± 0,000   | 0,000 ± 0,000   |
| LCC             | 4,970 ± 0,020                                   | 0,456 ± 0,017   | 0,814 ± 0,014   |
| PETase          | 4,903 ± 0,029                                   | 0,230 ± 0,013   | 0,441 ± 0,020   |
| PHOase          | 5,007 ± 0,126                                   | 0,000 ± 0,000   | 0,000 ± 0,000   |
| PUase           | 4,897 ± 0,032                                   | 0,007 ± 0,001   | 0,008 ± 0,001   |
| Se1JFR          | 4,997 ± 0,046                                   | 0,059 ± 0,008   | 0,070 ± 0,005   |
| Prot. Bac.      | 5,040 ± 0,072                                   | 0,000 ± 0,000   | 0,000 ± 0,000   |
| Prot. Gr.       | 5,020 ± 0,036                                   | 0,000 ± 0,000   | 0,000 ± 0,000   |
| Blank (T=30 °C) | 5,113 ± 0,074                                   | 0,000 ± 0,000   | 0,000 ± 0,000   |
| Blank (T=50 °C) | 5,217 ± 0,107                                   | 0,000 ± 0,000   | 0,000 ± 0,000   |

| Απελευθερωμένη συγκέντρωση BHET (mM) (C <sub>BHET</sub> ) | Συνολική συγκέντρωση απελευθερωμένων προϊόντων υδρόλυσης (mM) (C <sub>ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ</sub> ) |
|---|---|
| 0,008 ± 0,003   | 1,658 ± 0,055   |
| 0,0006 ± 0,0001   | 0,0496 ± 0,0063   |
| 0,000 ± 0,000   | 0,000 ± 0,000   |
| 0,019 ± 0,001   | 1,289 ± 0,024   |
| 0,0067 ± 0,0003   | 0,6687 ± 0,0239   |
| 0,000 ± 0,000   | 0,000 ± 0,000   |
| 0,000 ± 0,000   | 0,015 ± 0,0014  |
| 0,0021 ± 0,0001   | 0,1311 ± 0,009  |
| 0,000 ± 0,000   | 0,000 ± 0,000   |
| 0,000 ± 0,000   | 0,000 ± 0,000   |
| 0,000 ± 0,000   | 0,000 ± 0,000   |
| 0,000 ± 0,000   | 0,000 ± 0,000   |